

**RBBP6 aktiviert die Spaltung von humanen Prä-mRNAs:
Rekonstitution und Charakterisierung der 3'-Prozessierung**

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt von

Herrn Moritz Schmidt

Gutachter:

Prof. Dr. Elmar Wahle

Prof. Dr. Milton Stubbs

Prof. Dr. Sutapa Chakrabarti

Verteidigt: Halle (Saale), 28.06.2024

“Success consists of going from failure to failure
without loss of enthusiasm”

—
Sir Winston Churchill

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
1.1 Genexpression	1
1.2 3‘-Prozessierung von mRNAs	2
1.3 Etablierte 3‘-Prozessierungsfaktoren	6
1.3.1 CPSF	9
1.3.2 CstF	11
1.3.3 CF I	12
1.3.4 CF II	13
1.3.5 PAP	14
1.3.6 RBBP6	15
1.4 Weitere putative 3‘-Prozessierungsfaktoren	16
1.4.1 C-terminale Domäne der RNA Polymerase II	16
1.4.2 CTD-spezifische Phosphatase PP1 und Ssu72	18
1.5 Phasentrennung	18
1.6 Zielstellung der Arbeit	20
2 ERGEBNISSE	21
2.1 Rekonstitution der Spaltungsreaktion von Vorläufer-mRNAs	21
2.1.1 Reinigungen und RNA-Bindungsaktivität von mCF3 und mCF4	21
2.1.2 Expression und Reinigung von RBBP6 erlaubt die Rekonstitution der Prä-mRNA-Spaltung	23
2.1.3 <i>Domain with no name</i> (DWNN) und die <i>zinc knuckle</i> -Domäne in RBBP6 sind ausreichend für die Spaltaktivität von RBBP6	32
2.1.4 Charakterisierung der rekonstituierten 3‘-Prä-mRNA-Spaltung	36
2.1.5 CF I ist nicht essentiell für die Spaltung der 3‘-Prozessierung	39
2.1.6 mCF3 und mCF4 sind beide aktiv in der Spaltung von Prä-mRNAs	39
2.1.7 Beide CstF64-Paraloge sind spaltaktiv und alle CstF-Untereinheiten sind wichtig für die RNA-Spaltung	41

2.1.8	Essentielle 3'-Prozessierungsfaktoren binden die SV40 <i>late</i> -RNA mit hoher Affinität	45
2.1.9	Weitere putative 3'-Prozessierungsfaktoren haben nur einen geringfügigen Einfluss auf die Spaltreaktion	50
2.1.10	Vergleich zwischen viralen und nicht viralen RNA-Substraten	54
2.2	Präzipitationsanalyse der Spaltungsreaktion	59
2.2.1	Spaltreaktionen sind abhängig von <i>macromolecular crowding</i>	59
2.2.2	mPSF und CstF sind für die beobachtete Proteinpräzipitation verantwortlich	64
2.2.3	Die Proteinpräzipitation unter Reaktionsbedingungen ist nicht leicht reversibel	66
2.2.4	Intrinsisch ungeordnete Regionen verursachen die Proteinpräzipitation	70
2.2.5	WDR33 E bildet <i>liquid-liquid droplets</i> ; mPSF und der Spaltkomplex nicht	75
2.2.6	Proteine und Substrat-RNA ko-aggregieren	78
2.2.7	Aggregate mit GFP-CstF und WDR33 E zeigen einen Austausch mit der Umgebung	79
2.3	mPSF-Komplexe ohne hFip1 und CPSF4 sind aktiv in der 3'-Prozessierung	83
2.3.1	hFip1 und CPSF4 sind nicht essentiell für die Spaltungsreaktion	83
2.3.2	hFip1 ist nicht essentiell für die Polyadenylierungsreaktion	87
3	DISKUSSION	91
3.1.1	Rekonstitution der 3'-Prä-mRNA Spaltungsreaktion mit rekombinanten Faktoren	91
3.1.2	Essentielle Rolle von RBBP6 in der Spaltung von Vorläufer mRNAs	95
3.1.3	Die Aktivität von CstF ist unabhängig von der CstF64-Variante und CstF50 besitzt einen starken Einfluss	97
3.1.4	Essentielle 3'-Prozessierungsfaktoren binden RNA mit hoher Affinität	97
3.1.5	Vergleich der Spaltung viraler und nicht viraler RNA-Substrate	98
3.2	Die 3'-Prä-mRNA-Spaltung wird von einer Präzipitation der beteiligten Moleküle begleitet	100
3.3	Die Präzipitation der Makromoleküle unter Reaktionsbedingungen beruht auf Aggregation, nicht auf der Bildung von zwei flüssigen Phasen	102
3.4	Proteinmix ohne IDRs	104
3.5	Spaltungs- und Polyadenylierungsaktivität von mPSF-Subkomplexen	105

4 ZUSAMMENFASSUNG	107
5 MATERIALIEN	109
5.1 Chemikalien	109
5.2 Verbrauchsmittel	111
5.3 Geräte	112
5.4 Chromatographiesäulen und -materialien	113
5.5 Software	113
5.6 DNA-Konstrukte	114
5.6.1 Bacmide/Baculoviren	114
5.6.2 <i>E. coli</i> Expressionsplasmide	116
5.6.3 ORFs	117
5.6.4 Transkriptionsvorlagen	118
5.6.5 DNA-Primer	121
5.7 Proteine	121
5.7.1 Antikörper	121
5.7.2 Verwendete Proteinfusionen und zusätzliche Aminosäuren der rekombinanten Proteine	122
5.7.3 Kommerzielle Enzyme und sonstige Proteine	124
5.8 Zellstämme	124
5.8.1 Bakterien	124
5.8.2 Insektenzellen	125
5.8.3 Medien	126
5.8.4 Medienzusätze bakterieller Kulturen	126
6 METHODEN	127
6.1 Mikro- und molekularbiologische Methoden	127
6.1.1 Sterilisation	127
6.1.2 Herstellung elektrokompetenter Bakterien	127

6.1.3 Transformation elektrokompetenter Bakterien	127
6.1.4 Herstellung von Glycerinkulturen	128
6.2 Das MultiBac-System	128
6.2.1 Klonierung und Multiplikation von Zielgenen	128
6.2.2 Fusion von Transfervektoren mittels <i>In vitro</i> Cre-loxP-Rekombination	129
6.2.3 Herstellung elektrokompetenter DH10-MultiBac ^{Cre} -Zellen	130
6.2.4 Integration von Transfervektoren in Bacmide via Cre-loxP-Rekombination	130
6.2.5 Integration von Transfervektoren in Bacmide via Tn7-Transposition	130
6.2.6 Isolation rekombinanter Bacmid-DNA	131
6.3 Zellkultur	132
6.3.1 Aussaat und Propagation von Sf21 Zellen	132
6.3.2 Bestimmung der Zelldichte von Sf21-Suspensionen	132
6.3.3 Herstellung von Vorratskulturen (<i>cryo stocks</i>)	133
6.3.4 Transfektion rekombinanter Bacmid-DNA in Sf21 Insektenzellen	133
6.3.5 Kontrolle der Transfektionsreaktion	134
6.3.6 Viruspropagation und Herstellung größerer Virustiter	134
6.3.7 Baculovirale Proteinexpression in Sf21-Zellen	135
6.4 Nukleinsäurebiochemische Methoden	135
6.4.1 Standardmethoden	135
6.4.2 Agarose-Gelektrophorese	135
6.4.3 5' Markierung von Oligonukleotiden und pBR322-Fragmenten	136
6.4.4 Denaturierende Harnstoff-Polyacrylamid-Gelektrophorese	136
6.4.5 <i>In vitro</i> -Synthese radioaktivmarkierter RNA durch Transkription	137
6.4.6 <i>In vitro</i> -Synthese nicht-markierter RNAs	139
6.5 Proteinbiochemische Methoden	139
6.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration	139
6.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelektrophorese (SDS-PAGE)	139
6.5.3 Western Blot Analyse	141
6.6 Reinigungs- und Fraktionierungsmethoden von Proteinen	142
6.6.1 Kultur und Aufschluss überproduzierender Bakterien	143
6.6.2 Aufschluss von Insektenzellen	143

6.6.3 Proteinfällungen mit Ammoniumsulfat	143
6.7 Affinitätschromatographische Verfahren	144
6.7.1 Nickel-NTA-Affinitätschromatographie	144
6.7.2 Strep-Affinitätschromatographie	144
6.7.3 Flag-Affinitätschromatographie	145
6.8 Proteinfraktionierungen mit dem Äkta-Chromatographiesystem	146
6.8.1 Anionenaustauschchromatographie	146
6.8.2 Heparin-Sepharose	147
6.8.3 Größenausschlusschromatographie	147
6.9 Abspaltung von RBBP6-Fusionsproteinen (MBP/MBP-SNAP)	148
6.10 Dephosphorylierung von Proteinen	148
6.11 Rekombinante Proteine	149
6.12 Aktivitätsassays	154
6.12.1 3' mRNA-Spaltassay	154
6.12.2 Präzipitationsassays	156
6.12.3 Polyadenylierungsreaktion	156
6.12.4 Filterbindung	158
6.13 Fluoreszenzmikroskopie	159
7 LITERATURVERZEICHNIS	161
7.1 Publikationen	161
7.2 Dissertationen und Studienarbeiten	176
7.3 Internetquellen	177
8 TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS	178
8.1 Tabellenverzeichnis	178
8.2 Abbildungsverzeichnis	178

8.3 Abkürzungsverzeichnis	180
9 ANHANG	VII
9.1 Zusätzliche Abbildungen	VII
9.2 <i>Curriculum vitae</i>	XIX
9.3 Publikationen	XX
9.4 Eidesstattliche Erklärung	XXI
9.5 Danksagung	XXII

1 Einleitung

1.1 Genexpression

Erbinformationen sind in Form von Desoxyribonukleinsäure (*desoxyribonucleic acid*; DNA) gespeichert. In Eukaryoten ist die DNA im Zellkern lokalisiert, kann jedoch diesen nicht verlassen. Somit ist die Erbinformation räumlich von der Proteinbiosynthese getrennt, welche im Zytoplasma stattfindet. Damit die in der DNA kodierte Information ins Zytoplasma gelangen kann, muss die Sequenz der DNA in eine *messenger* Ribonukleinsäure (mRNA) umgeschrieben und anschließend aus dem Zellkern exportiert werden. Im Zytoplasma wird die mRNA in Proteine translatiert. Für die mRNA-Synthese werden die proteinkodierenden Sequenzen der DNA durch die RNA-Polymerase II (RNA Pol II) abgelesen und es wird die sogenannte Vorläufer- oder Prä-mRNA synthetisiert. Damit diese als gereifte mRNA in das Zytoplasma exportiert werden kann, muss sie prozessiert werden. Die Prozessierung wird in drei Schritten ko-transkriptionell vollzogen. Unmittelbar nach Beginn der Synthese, wenn das Transkript etwa 20-30 Nukleotide lang ist, wird am 5'-Ende eine 7-Methyl-Guanosin *Cap*-Struktur angehängt. Diese dient der gereiften mRNA als Stabilitätskontrolle, verhindert den Abbau durch Exonukleasen im Zytoplasma und verstärkt die Translation. Bei den meisten Prä-mRNAs ist die kodierende Sequenz durch zusätzliche nicht-kodierende Sequenzen, die Introns, unterbrochen. Diese werden durch das Spleißosom enzymatisch herausgeschnitten und die proteinkodierenden Sequenzen werden zusammengefügt. Zum Ende der Transkription wird die Prä-mRNA durch eine Endonuklease gespalten und am neu entstandenen 3'-Ende ein Schwanz aus Adenosinmonophosphaten angehängt. Dieser dient der Stabilitätskontrolle und dem Schutz vor Abbau durch 3'-Exonukleasen. Der Poly(A)-Schwanz sorgt außerdem für eine effizientere Translations-Initiation. Mit Hilfe einer Protein-vermittelten Interaktion mit dem 5'-Ende der mRNA kommt es zur Bildung einer geschlossenen Schleife (Park et al., 2011; Tarun & Sachs, 1996). Die gereifte mRNA bildet mit Proteinen einen Ribonukleopartikel (RNP) und wird in das Zytoplasma exportiert, um in Proteine übersetzt zu werden (Bentley, 2014; Hocine et al., 2010). Eine schematische Darstellung des Teilschrittes der 3'-Prozessierung ist in **Abbildung 1.1** gezeigt.

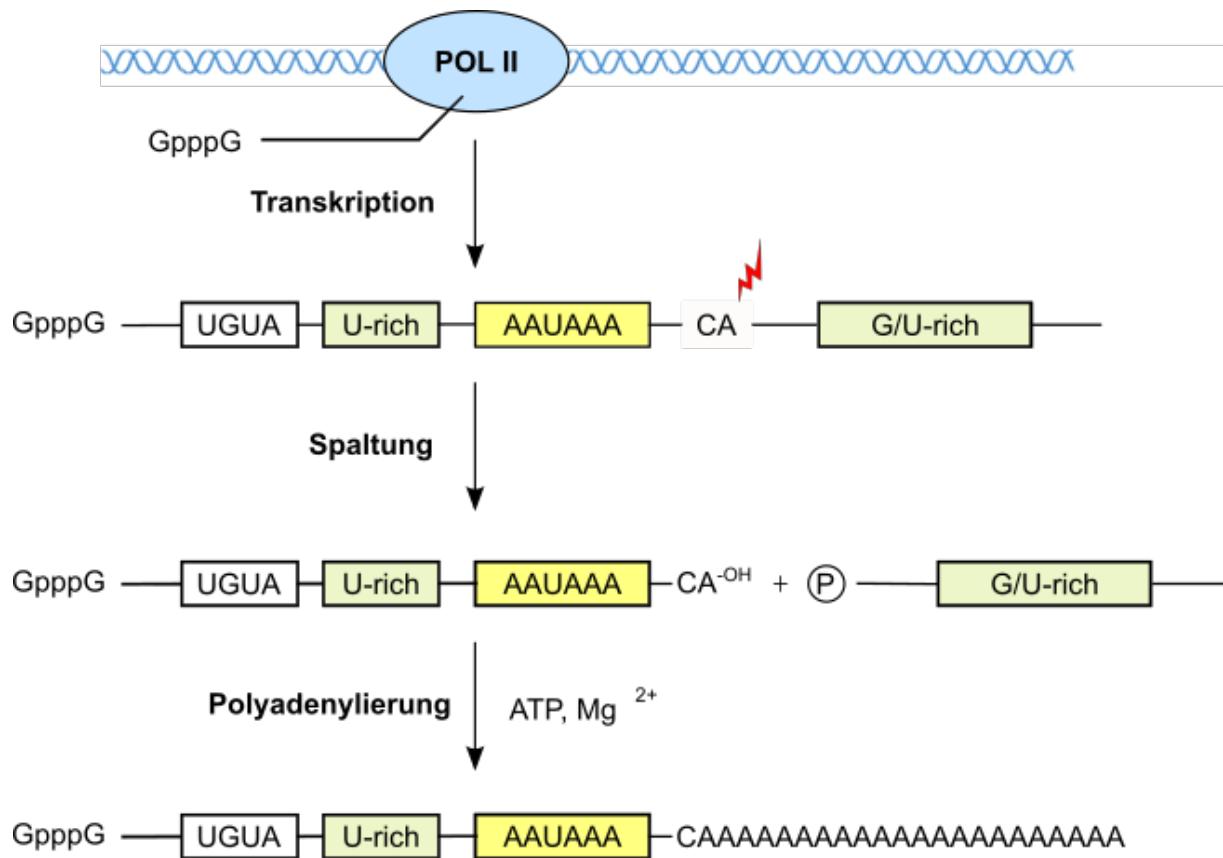


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der 3'-Prozessierungsreaktion in Metazoa

Dargestellt sind die mechanistischen Teilschritte der 3'-Prozessierung. Das Schema zeigt die konservierten RNA-Sequenzelemente, welche von den beteiligten 3'-Prozessierungsfaktoren gebunden werden (siehe Einleitung 1.2). Die Spaltstelle ist mit einem roten Blitz angedeutet. Abbildung modifiziert nach (Wahle & Kühn, 2021).

1.2 3'-Prozessierung von mRNAs

Die 3'-Prozessierung ist ein zentraler Schritt für die Reifung von mRNAs. Sie läuft simultan zum Anhängen der 5'-cap-Struktur und dem Spleißen der intronischen Sequenzen ab. Die Prozessierung ist eine zweistufige Reaktion, bei der die Vorläufer-mRNA zunächst endonukleolytisch gespalten wird. An das neu entstandene 3'-OH wird nun durch die Poly(A)-Polymerase (PAP) ein Poly(A)-Schwanz angehängt. Mit Ausnahme von Histon mRNAs werden alle mRNAs polyadenyliert (Ogorodnikov et al., 2016).

Die reifende mRNA besitzt interne Sequenzmotive, sogenannte *cis*-Elemente, die die 3'-Prozessierung steuern. Diese werden durch den 3'-Prozessierungskomplex gebunden (Xiang et al., 2014). Allen voran steht das Polyadenylierungssignal (PAS), bestehend aus dem AAUAAA-Hexanukleotid, das zwar stark konserviert ist, jedoch eine gewisse Variabilität aufweisen kann, z. B. AUUAAA (Sheets et al., 1990). Das PAS wird durch den zentralen Faktor der 3'-Prozessierung gebunden, den *cleavage and polyadenylation specificity factor* (CPSF) (S.

L. Chan et al., 2014; Clerici et al., 2018; Keller et al., 1991; Schönemann et al., 2014). Eine Punktmutation des einzelnen Uracils in ein Guanin im Hexanukleotid (AAGAAA) kann zur Inhibierung der CPSF-Bindung an das Polyadenylierungssignal führen und damit zur Inhibierung der 3'-Prozessierung (Bienroth et al., 1991).

CPSF besteht aus zwei Subkomplexen: *mammalian specificity factor* (mPSF) und *mammalian cleavage factor* (mCF). mPSF setzt sich aus den Untereinheiten CPSF1, WDR33, hFip1 und CPSF4 zusammen. Die Bindung des PAS erfolgt über die mPSF-Untereinheiten WDR33 und CPSF4 (Clerici et al., 2018). Verknüpft ist mPSF mit mCF durch eine Wechselwirkung zwischen WDR33 und der mCF-Untereinheit CPSF2 (Y. Zhang et al., 2020). Neben CPSF2 besteht mCF aus den Untereinheiten CPSF3 und Symplekin. mCF spaltet den mRNA-Vorläufer nach einem CA-Dinukleotid, welches sich ca. 10-30 Nukleotide stromabwärts (-3') des PAS befindet. Die Spaltung wird durch die von zweiwertigen Metallionen abhängige Endonuklease CPSF3 katalysiert (Huang et al., 2023; Mandel et al., 2006; Ryan et al., 2004). Eine genauere Beschreibung der Komplexe erfolgt in **Einleitung 1.3**.

Neben dem PAS werden weitere Sequenzmotive der RNA durch 3'-Prozessierungsfaktoren gebunden. Durch Protein-Protein Interaktionen werden diese von CPSF rekrutiert (siehe **Einleitung 1.3**). Etwa 40-60 Nukleotide stromaufwärts (5') der Spaltstelle befinden sich eine oder mehrere Kopien eines UGUA-Motivs, die durch den *cleavage factor I* (CF I) gebunden werden (Brown & Gilmartin, 2003; Martin et al., 2012; Venkataraman et al., 2005; Q. Yang et al., 2010). Neben den UGUA-Motiven gibt es u. a. noch U-reiche Sequenzen (*auxiliary elements*) stromaufwärts des AAUAAA-Hexamers, die von hFip1 gebunden werden (Lackford et al., 2014). In einem bis zu 40 Nukleotide großen Bereich stromabwärts (-3') der Spaltstelle, dem sogenannten *downstream element* (DSE), bindet der *cleavage stimulatory factor* (CstF) U/GU-reiche Sequenzen (MacDonald et al., 1994; Perez Canadillas, 2003; W. Yang et al., 2018). Nachfolgende G/GU-reiche Sequenzen werden wahrscheinlich durch den *mammalian cleavage factor II* (CF II) über die Untereinheit Pcf11 gebunden (Schäfer et al., 2018). Die Bindung von CPSF und CstF an die RNA erfolgt dabei kooperativ (Murthy & Manley, 1995). Eine schematische Darstellung des bis zu Beginn dieser Arbeit bekannten 3'-Prozessierungskomplexes ist in **Abbildung 1.2** zu finden.

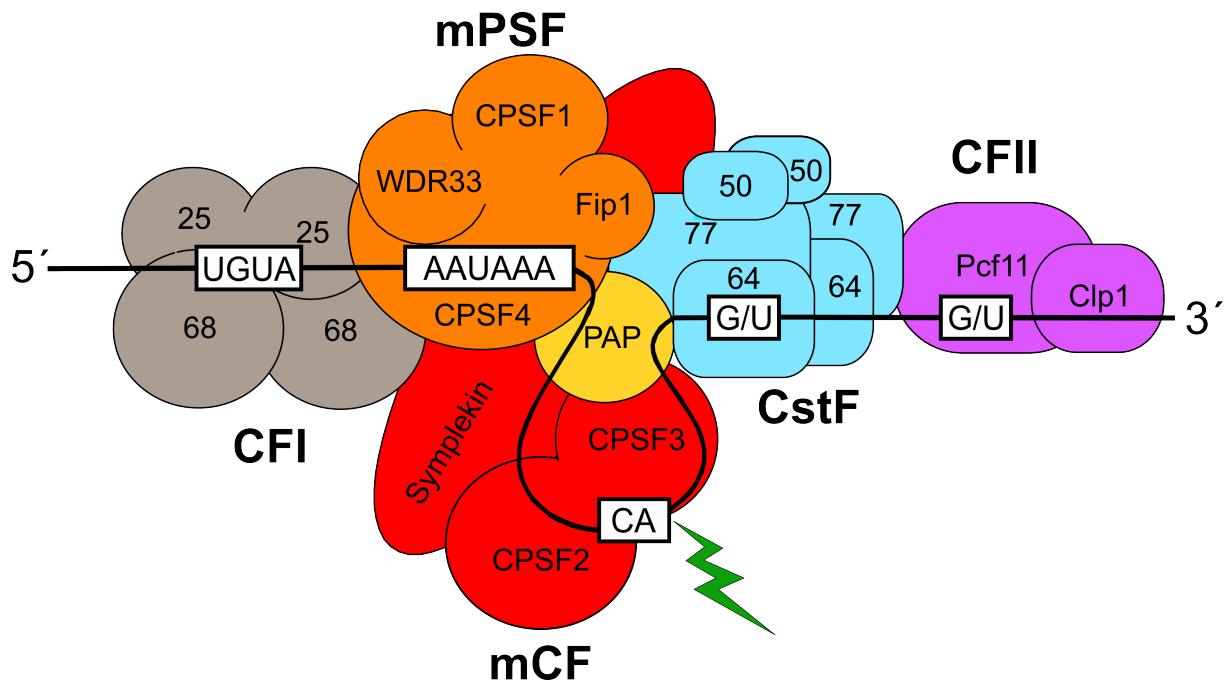


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des humanen 3'-Prozessierungskomplexes

Die schematische Darstellung einer Prä-mRNA mit dem humanen 3'-Prozessierungskomplexes entspricht dem Wissenstand zu Beginn dieser Arbeit. mPSF (orange) bindet das Polyadenylierungs-signal. Das UGUA-Motiv wird von CF I (grau) gebunden, U/GU-reiche Sequenzen im downstream element (DSE) werden von CstF (blau) und G/U-reiche Sequenzen von CF II (violett) gebunden. mCF spaltet (grüner Blitz) die Vorläufer mRNA, und mPSF rekrutiert die Poly(A)-Polymerase (gelb). Abbildung modifiziert nach (Wahle & Kühn, 2021).

Das durch die Spaltung der Prä-mRNA neu entstandene 3'-Spaltprodukt besitzt nach bisheriger Erkenntnis keine Funktion und wird unmittelbar nach der Spaltung abgebaut. Dieser Schritt ist möglicherweise eng an die Transkriptions-Termination gekoppelt. Der genaue Ablauf des Abbaus des 3'-Fragmentes wird in der Literatur diskutiert. Die bekannteste Theorie ist das sogenannte „Torpedo-Modell“, nach der das Fragment ko-transkriptionell durch die 5'-3'-Exonuklease XRN2 abgebaut wird (Rat1; *Saccharomyces cerevisiae*) (Connelly & Manley, 1988; Kim et al., 2004; West et al., 2004). Dagegen spielt XRN2 bei der Termination von Histon mRNAs keine bekannte Rolle; hier wird das 3'-Fragment vielmehr durch eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität von CPSF3 abgebaut (X. Yang et al., 2020). Ein alternatives Modell, das sogenannte allosterische Modell, besagt, dass es zu einem Pausieren der RNA Pol II auf Höhe des PAS kommt. Dadurch, oder auch durch den Akt der 3'-Prozessierung, kommt es zu einer Konformationsänderung des elongierenden Polymerase-Komplexes. Diese sorgt für eine erhöhte Wahrscheinlichkeit der Dissoziation des Komplexes. Unterstützend dazu zeigten *in vitro*-Versuche auch eine PAS-unabhängige Termination durch Konformationsänderung der RNA Polymerase II (Proudfoot, 2016; Rodríguez-Molina et al., 2023; H. Zhang et al., 2015).

Nach der endonukleolytischen Spaltung des Vorläufers wird durch die Poly(A)-Polymerase (PAP) ein Poly(A)-Schwanz angehangen, der in Säugern etwa 250 Nukleotid lang ist (Ogorodnikov et al., 2016). Die Affinität der Poly(A)-Polymerase zu dem gespaltenen Substrat ist sehr gering, sodass durch das Enzym nur wenige Adenlyate an die RNA angefügt werden, bevor dieses wieder dissoziiert. Dieses Verhalten der PAP wird als distributiv beschrieben. Die Gegenwart von CPSF an der reifenden RNA sorgt für die Spezifität der Reaktion und einer kooperativen Stimulation der Aktivität der PAP (Bienroth et al., 1993). Ein weiterer wichtiger Interaktionspartner ist das nukleäre Poly(A)-Bindungsprotein (PABPN1), das den wachsenden Poly(A)-Schwanz bedeckt. Zusammen mit CPSF bewirkt PABPN1 eine noch stärkere Stimulation der PAP, sodass die Polyadenylierung zu einer prozessiven Reaktion wird. Das bedeutet, dass die PAP relativ lange eine einzelne Substrat-RNA verlängert, bevor das Enzym von dieser dissoziiert und ein neues Substrat verlängert (Bienroth et al., 1993; Wahle, 1991a). CPSF sorgt für die Spezifität der Reaktion und die Rekrutierung der PAP und PABPN1, das nach ca. 10-11 Nukleotiden den wachsenden Poly(A)-Schwanz bindet. Je länger der Poly(A)-Schwanz wird, desto mehr Kopien von PABPN1 können an diesen binden. Zum Ende der Reaktion sorgt die Anzahl der PABPN1-Kopien für eine ausreichende räumliche Trennung, sodass es zur Dissoziation von PABPN1 und CPSF kommt. Ab diesem Zeitpunkt wird das Verhalten der PAP wieder distributiv, was dazu führt, dass nur noch wenige Adenylate angehängt werden und PAP von der mRNA dissoziiert. Die Polyadenylierungsreaktion ist also längenkontrolliert (Kühn et al., 2009, 2017).

In Zellen besitzen ca. 70% der reifenden mRNAs nicht nur ein einziges Polyadenylierungs signal mit den notwendigen *cis*-Elementen, sondern enthalten mehrere dieser Polyadenylierungssignale. Bei diesen müssen jedoch nicht alle *cis*-Elemente enthalten sein (Derti et al., 2012; A. R. Gruber et al., 2014). Das Vorhandensein und Übereinstimmen mit der Konsensussequenz erhöht die Wahrscheinlichkeit der Interaktion und Nutzung der Spaltstelle. Die Wahrscheinlichkeit der Nutzung führt zur Einordnung von schwachen und starken Polyadenylierungsstellen (Tian & Manley, 2017). Neben der Stärke kann man die Polyadenylierungsstellen auch nach Abstand zum 3'-Ende des offenen Leserahmens (ORF) klassifizieren. Diese werden in proximale und distale Polyadenylierungsstellen unterschieden. Proximale Polyadenylierungsstellen sind dabei näher an den kodierenden Sequenzen der Prä-mRNA und gelten als schwächer im Vergleich zu den distalen Polyadenylierungsstellen (A. J. Gruber & Zavolan, 2019). Durch die Benutzung unterschiedlicher Polyadenylierungsstellen (alternative Polyadenylierung) entstehen verschiedene Isoformen der jeweiligen mRNA. Wenn die alternativen Polyadenylierungsstellen außerhalb der kodierenden Sequenzen liegen, sorgt

deren Benutzung für unterschiedliche Längen der 3'-untranslatierten Regionen (UTR). Bei alternativen Polyadenylierungsstellen stromaufwärts des Stopcodons entstehen dagegen mRNA-Varianten, die verschiedene C-terminale Aminosäuresequenzen kodieren. Distale Polyadenylierungsstellen werden meist durch den 3'-Prozesierungskomplex bevorzugt (A. J. Gruber & Zavolan, 2019). Knockdown-Experimente von CF I zeigten allerdings einen Wechsel zu proximalen PAs, welche eine geringere Anzahl an UGUA-Bindungssequenzen aufweisen (Martin et al., 2012; Zhu et al., 2018). Im Gegensatz dazu führten Knockdowns von Pcf11, CstF64 oder CstF64 τ zu einem gegenteiligen Effekt, sodass mehr distale Polyadenylierungsstellen verwendet wurden. Generell führt eine Kürzung des 3'-UTRs zu einer Reduzierung von Bindungsstellen von regulatorischen Proteinen oder micro-RNAs (Tian & Manley, 2017; Yao et al., 2013). In verschiedenen Krebsarten kommt es häufig zur Expression von mRNAs mit gekürzten 3'-UTRs (Mayr & Bartel, 2009).

1.3 Etablierte 3'-Prozessierungsfaktoren

Eine Mehrzahl der 3'-Prozessierungsfaktoren ist seit längerem durch Reinigungen aus Kalbsthymus oder HeLa-Zellen bekannt. Allerdings konnte die Spaltungsreaktion der humanen 3'-Prozessierung mit rekombinanten Proteinen bei Beginn dieser Arbeit noch nicht rekonstituiert werden und stellt somit einen zentralen Aspekt dieser Arbeit dar. Ein Blick auf Homologien zum bereits rekonstituierten Hefe-Komplex (*Saccharomyces cerevisiae*) zeigt hierbei bereits viele Homologe zu den identifizierten humanen Faktoren (Hill et al., 2019). Dafür ist ein Vergleich zwischen den homologen 3'-Prozessierungsfaktoren in **Tabelle 1.1** aufgeführt. Für die Rekonstitution in der Bäckerhefe wird ein CPFcore (*cleavage and polyadenylation factor*) benötigt. Dieser besitzt Homologien zu den humanen Komplexen mPSF und mCF. Dazu kommt Mpe1, für das bislang die Homologie zu dem Protein RBBP6 aufgrund des N-Terminus vermutet wird (Di Giammartino et al., 2014). Daneben werden CF IA und CF IB (*cleavage factor* IA; IB) als essentielle Faktoren benötigt. Die restlichen bekannten Faktoren sind nicht essentiell. Die Prozessierungsfaktoren aus der Hefe und Säugetieren entsprechen sich weitgehend, wie aus **Tabelle 1.1** ersichtlich ist. Lediglich für den essentiellen Hefe-Faktor Hrp1 (= CF IB) gibt es bislang kein Säuger-Äquivalent. Umgekehrt gibt es keine konservierten Homologe zum humanen CF I-Komplex in der Hefe. Gleichzeitig besteht der CstF-Komplex in der Hefe nur aus den Untereinheiten Rna14 und Rna15, was den humanen CstF77 und CstF64 entspricht. Ein Pendant zu CstF50 gibt es in der Hefe nicht. Das Symplekin-Homolog Pta1 wird in der Hefe dem Phosphatase-Modul zugeordnet und ist, wie das gesamte Phosphatase-Modul, kein essentieller Faktor. Das Phosphatase-Modul besteht neben Pta1 unter

anderem aus den Proteinen Glc7, Swd2, Ref2, die konservierte Homologe der Untereinheiten PP1 α , WDR82 und PNUTS des Proteinphosphatase Komplex 1 (PP1) sind. Dazu kommen die für die C-terminalen Domäne der RNA Polymerase II (CTD)-spezifische Phosphatase Ssu72, die eine wichtige Rolle in der Transkription spielt, sowie Pti1 (Casañal et al., 2017). Vergleicht man den 3'-Prozessierungskomplex der Bäckerhefe mit dem humanen Spaltkomplex, fällt somit zum einen auf, dass mit Mpe1 ein zusätzlicher Faktor essentiell ist. Zum anderen ist eine große Diskrepanz in der Größe zu erkennen. Der humane Prozessierungskomplex besitzt eine Gesamtmasse von ca. 1,5 MDa, während der Hefe-Komplex eine Gesamtmasse von etwa 0,85 MDa besitzt. Zu den 1,5 MDa trägt ein großer Teil an intrinsisch ungeordneten Regionen (IDRs) der einzelnen Proteine bei.

Tabelle 1.1: Vergleich der 3'-Prozessierungsfaktoren aus dem Menschen und der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*)

Bekannte homologe 3'-Prozessierungsfaktoren aus dem Menschen und der Bäckerhefe im tabellarischen Vergleich, mit farblicher Unterstreichung der jeweiligen Proteinkomplexe. Der Hefefaktor CPFcore ist zusätzlich in drei Module (orange, rot, weiß) unterteilt. Pta1 ist mit einem Stern gekennzeichnet, da das Symplekin-Homolog nicht zum core CPF-Komplex gehört. Es ist Teil des Phosphatase-Moduls. Mpe1 ist Bestandteil des Nuklease-Moduls in Hefe und damit Teil des core Komplexes. Es wird vermutet, dass RBBP6 das humane Homolog sein könnte, dessen Beteiligung an der 3'-Prozessierung bislang noch nicht eindeutig geklärt werden konnte. Es gibt bisher keine experimentell bestätigte Homologie zwischen Pti1 und CstF64 τ . Beide Proteine besitzen jedoch eine Ähnlichkeit in ihrer Aminosäuresequenz.

<i>Homo sapiens</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
CPSF	mPSF	CPSF1 CPSF4 hFip1 WDR33	Cft1 Yth1 Fip1 Pfs2
		RBBP6?	Mpe1
	mCF	CPSF3 CPSF2 Symplekin	Ysh1 Cft2 Pta1*
	PP1	PP1 α Tox4 WDR82 PNUTS	Glc7
		hSsu72 CstF64 τ ?	Phosphatase Modul/APT Komplex
	CstF	CstF77/CstF3 CstF64/CstF2 CstF64 τ /CstF2 τ CstF50/CstF1	Rna14 Rna15
	CF II	Clp1 Pcf11	Clp1 Pcf11
	CF I	CF I25/CPSF5 CF I68/CPSF6 CF I59/CPSF7	Hrp1
	PAP	Poly(A) Polymerase PAPBN1	Pap1
		RNA Pol II Rbp1 CTD	Polymerase Modul
			Rbp1 CTD

1.3.1 CPSF

Der *cleavage and polyadenylation specificity factor* (CPSF) ist der zentrale Faktor der 3'-Prozessierung von Vorläufer mRNAs, da er das AAUAAA-Hexamer, das Polyadenylierungssignal, bindet. Außerdem enthält CPSF die Endonuklease und rekrutiert die Poly(A)-Polymerase. CPSF besteht aus den beiden Subkomplexen mPSF und mCF. Der mPSF-Komplex wurde 2014 im Rahmen der Rekonstitution der Polyadenylierungsreaktion beschrieben (Schönemann et al., 2014). Ursprünglich galt CPSF als ein Komplex aus den vier Untereinheiten CPSF1 (=CPSF160), 2 (=CPSF100), 3 (=CPSF73) und 4 (=CPSF30), der aus Kalbsthymus oder HeLa-Zellen fraktioniert wurde (Bienroth et al., 1991; Murthy & Manley, 1992). hFip1 wurde später als fünfte Untereinheit beschrieben (Kaufmann et al., 2004). Schönemann et al. 2014 zeigten, dass auch WDR33 Bestandteil des Komplexes ist und zusammen mit CPSF1, CPSF4 und hFip1, den Subkomplex, mPSF bildet. WDR33 besitzt eine konservierte WD40-Domäne am N-Terminus (Ito et al., 2001). Außerdem konnten Schönemann et al. die Aussage revidieren, nach der CPSF1 die AAUAAA-erkennende Untereinheit zusammen mit dem Zinkfingerprotein CPSF4 darstellt (S. M. Barabino et al., 1997; Keller et al., 1991). Das Polyadenylierungssignal wird vielmehr durch WDR33 und CPSF4 erkannt. Über die Basen U3 und A6 wird die AAUAAA-Sequenz von WDR33 unter Bildung eines Hogsteen-Basenpaares gebunden. CPSF4 bindet gleichzeitig über zwei seiner fünf Zinkfinger die Basen A1, A2, A4 und A5 (S. L. Chan et al., 2014; Clerici et al., 2018; Schönemann et al., 2014; Sun et al., 2018). CPSF1 dient dem Komplex als Gerüst und interagiert mit CstF77 und PAP (Murthy & Manley, 1995; Y. Zhang et al., 2020). hFip1 sorgt ebenfalls für die Rekrutierung und Bindung der Poly(A)-Polymerase, die mit der N-HAT-Domäne von CstF77 um die hFip1-Bindung konkurriert. Die Bindung ist Grundlage der Polyadenylierungsinhibition durch CstF (Muckenfuss et al., 2022). Gleichzeitig bindet hFip1 mit einer Spezifität für U-reiche Sequenzen den mRNA-Vorläufer (Kaufmann et al., 2004; Lackford et al., 2014). Des Weiteren sind in mPSF zwei Kopien von hFip1 enthalten, die jedoch nur eine Kopie der Poly(A)-Polymerase rekrutieren (Muckenfuss et al., 2022).

Der mCF-Komplex besteht aus den Untereinheiten CPSF2, CPSF3 und Symplekin und bildet einen stabilen Komplex (Sullivan et al., 2009). Lange Zeit galt CPSF3 als eine zinkabhängige Endonuklease. Sie katalysiert die Spaltreaktion sowohl für Prä- als auch Histon-Prä-mRNAs (Dominski, Yang, & Marzluff, 2005; Mandel et al., 2006; Ryan et al., 2004). Jüngst konnte gezeigt werden, dass im kanonischen Spaltkomplex zum Großteil Eisen-Ionen im aktiven Zentrum von CPSF3 gebunden sind und der Anteil an koordinierten Zink-Ionen deutlich kleiner ist. Dagegen ist es beim Histon-Spaltkomplex genau umgekehrt. Ob CPSF3 mit koordinierten

Eisen-Ionen genauso aktiv ist wie mit Zink-Ionen, konnte jedoch nicht bestimmt werden (Huang et al. 2023). Das Protein gehört zur Metallo- β -Lactamase-Familie und besitzt zusätzlich eine β -CASP-Domäne (Dominski, 2010). CPSF2 ist eine inaktive Pseudoendonuklease mit Homologie zu CPSF3. Die Interaktion zwischen CPSF2 und 3 kommt durch beide C-Termini zustande (Dominski, Yang, Purdy, et al., 2005). CPSF2 und 3 weisen Sequenzhomologität zu den Integratorkomplex-Proteinen Ints9 (CPSF2) und Ints11 (CPSF3) auf, die an der Prozessierung von snRNAs beteiligt sind (Baillat et al., 2005; Dominski, Yang, Purdy, et al., 2005). CPSF2 stellt das Bindeglied zu mPSF dar, indem dieses über das sogenannte *PSF interaction motif* (PIM) von WDR33 gebunden wird (Y. Zhang et al., 2020).

Symplekin ist die dritte Untereinheit. Sie wurde bereits 2000 als Prozessierungsfaktor entdeckt und dient mCF als Gerüstprotein (Sullivan et al., 2009; Takagaki & Manley, 2000; Xiang et al., 2014). In der Mitte des Proteins befinden sich zwei Bindungsdomänen für CstF64 und CPSF3 (Ruepp et al., 2011; Y. Zhang et al., 2020). Interessanterweise ist Symplekin in der Bäckerhefe ein Teil des nicht-essentiellen Phosphatase-Moduls in der 3'-Prozessierung (Casañal et al., 2017; Hill et al., 2019). Eine Darstellung der Domänen der CPSF-Untereinheiten ist in **Abbildung 1.3** gezeigt.

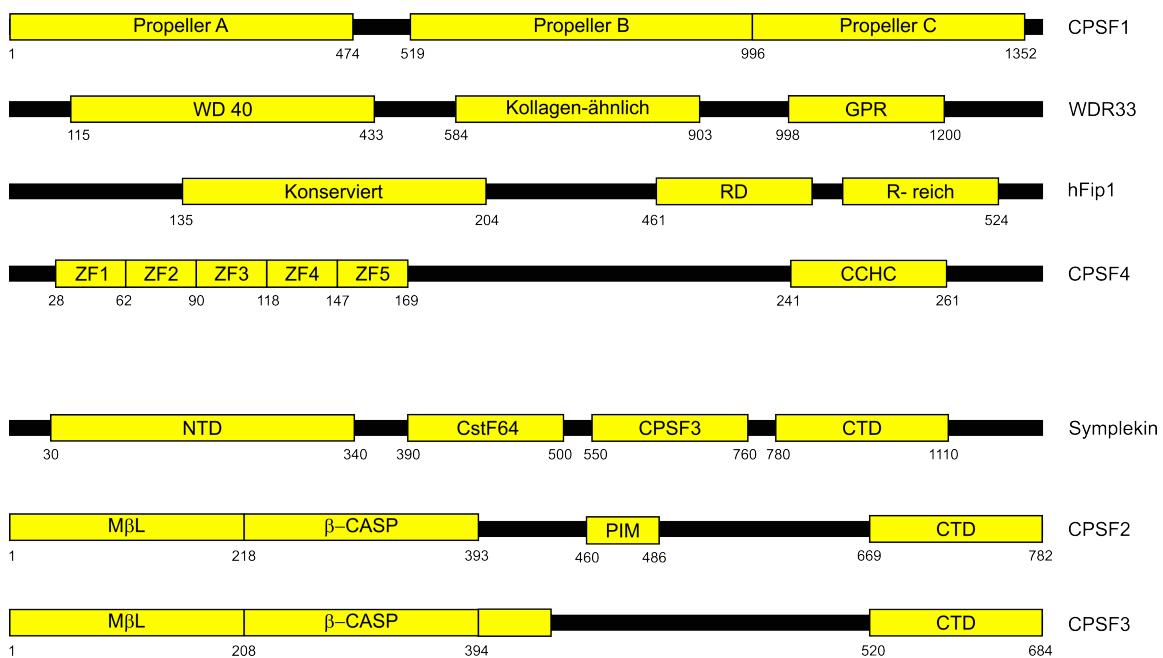


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Domänen der CPSF-Untereinheiten

Schematische Darstellung der Domänenstruktur der mPSF und mCF Untereinheiten. GPR ist eine Glycin-, Prolin- und Arginin-reiche Domäne. RD und R-reich sind Domänen mit überwiegendem Anteil an Arginin (R) und Aspartat (D). CPSF besitzt fünf CCCH-Zinkfinger-Domänen (ZF) und einen CCHC zinc knuckle. Symplekin besitzt in der Mitte Interaktionsdomänen für CstF64 und CPSF3. CPSF2 und 3 besitzen β -Metallo-Lactamase-Domänen gefolgt von β -CASP-Domänen. Zusätzlich besitzt CPSF2 in der Mitte das *PSF interaction motif* (PIM) für die Interaktion mit WDR33.

1.3.2 CstF

Der *cleavage stimulatory factor* (CstF) besteht aus jeweils zwei Kopien der Untereinheiten CstF77 (=CstF3), CstF64 (=CstF2) und CstF50 (=CstF1) (Bai et al., 2007; Takagaki et al., 1990; W. Yang et al., 2018). CstF ist ein essentieller Faktor der 3'-Prozessierungsreaktion, wird aber nur für die Spaltung und nicht für die nachfolgende Polyadenylierungsreaktion benötigt. Über ein *RNA recognition motif* (RRM) bindet die Untereinheit CstF64 an die Vorläufer-mRNA in einem GU/U-reichen *downstream element* unterhalb der Spaltstelle (MacDonald et al., 1994).

CstF77 dient dem Komplex mittels seiner Dimerisierung als Brücke und verknüpft die beiden kleineren Untereinheiten miteinander. Die Dimerisierung von CstF77 kommt über die N-terminalen HAT-N und HAT-C Domänen (*half a tetratricopeptide*) zustande (Moreno-Morcillo, Minvielle-Sébastia, Fribourg, et al., 2011). Mittels *CryoEM*-Strukturen konnten Interaktionen mit WDR33 und CPSF1 über die HAT-C Domäne gezeigt werden, die zur kooperativen Bindung der RNA von CstF und CPSF beitragen (Bai et al., 2007; Legrand et al., 2007; Murthy & Manley, 1995; Y. Zhang et al., 2020).

Im Zuge von *Pulldown*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass Symplekin mit CstF77 um die Bindung von CstF64 konkurrieren kann. Die Proteinbindung erfolgt über die Gelenkdomäne (*hinge*) von CstF64 (Ruepp et al., 2011; Takagaki & Manley, 2000). Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass CstF64 nicht nur Untereinheit von CstF ist, sondern auch von mCF sein könnte. Für den Spaltkomplex von Histon-Prä-mRNAs konnte gezeigt werden, dass CstF64 ein Teil des Komplexes sein kann. Es besteht jedoch keine Notwendigkeit dafür, dass CstF64 ein Teil des Spaltkomplexes ist, da auch Komplexe in Abwesenheit von CstF64 Histon-Prä-mRNAs *in vitro* spaltaktiv sind. (Sun et al., 2018; X.-C. Yang et al., 2013). Über den C-Terminus von CstF64 kommt es zur Interaktion mit der CF II Untereinheit Pcf11. Hiermit wird CstF mit einem weiteren 3'-Prozessierungsfaktor verknüpft. (Qu et al., 2007).

CstF50 ist die einzige der CstF Untereinheiten, die kein Homolog in der Bäckerhefe besitzt. Das Protein interagiert über seine C-terminale WD40-Domäne mit CstF77 (Takagaki & Manley, 1992, 2000). Dafür bindet CstF50 an einen konservierten Bereich zwischen der HAT-Domäne und der CstF64-Bindungstelle. Zusätzlich sorgt die Untereinheit für eine stärkere Bindung an die GU/U-reichen Sequenzen der RNA des CstF-Komplexes (W. Yang et al., 2018).

CstF64 besitzt mit CstF64 τ ein Paralog, welches in allen Geweben, aber besonders stark in Hoden, Gehirn und Herzen exprimiert wird (Wallace et al., 1999; Yao et al., 2013). In den Hoden spielt es eine besondere Rolle innerhalb der Spermatogenese für die Wahl bestimmter

3'-Prozessierungssignale und hat damit maßgeblichen Anteil an alternativer Polyadenylierung (Dass et al., 2007; MacDonald & McMahon, 2010). Es scheint der Fall zu sein, dass die τ -Variante CstF64 im Komplex ersetzen kann. Allerdings verändert sich die Sequenzspezifität der RNA-Bindung von einem GU-reichen zu einem U-reichen Bereich (Monarez et al., 2007). Die Domänen von CstF sind schematisch in **Abbildung 1.4** dargestellt.

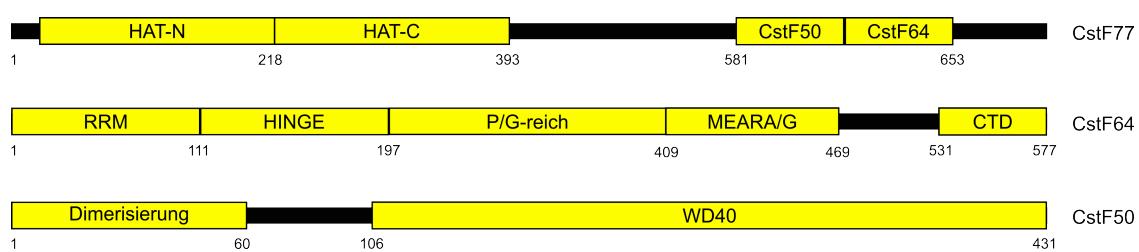


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Domänen von CstF

Die N-terminale HAT-Domäne von CstF77 wird in N und C unterteilt. Am C-Terminus befinden sich die Interaktionsdomänen für CstF50 und CstF64. CstF64 besitzt N-terminal ein *RNA recognition motif* (RRM), gefolgt von der Gelenkdomäne (*hinge*). In der Mitte befindet sich eine Prolin und Glycin (P/G) reiche Domäne, an die sich eine wiederholende Sequenz aus Methionin, Glutamat, Alanin, Arginin und Alanin bzw. Glycin anschließt.

1.3.3 CF I

Cleavage factor I (CF I) ist ein tetramerer Komplex aus jeweils zwei Kopien von CF I 25 (=CPSF 5/Nudt21) und CF I 68 (=CPSF 6). Die letztere Untereinheit kann durch CF I 59 (=CPSF 7) ersetzt werden, das auf einem anderen Gen kodiert ist (Rüegsegger et al., 1996). Durch alternatives Spleißen kann aus dem ORF des CF I 68-Transkriptes noch eine CF I 72-Untereinheit entstehen (Rüegsegger et al., 1998).

Über eine N-terminale Nudix-Domäne von CF I 25 wird das UGUA-Bindungsmotiv im *upstream element* der Prä-mRNA gebunden. Die Nudix-Domäne trägt zum einen maßgeblich zur RNA-Bindung bei, zum anderen dient sie zur Interaktion mit CF I 68 sowie PAP und PABPN1 (Brown & Gilmartin, 2003; Dettwiler et al., 2004). CF I 68 besitzt N-terminal ein RRM mit schwacher Bindungsaktivität, das hauptsächlich kooperativ zur RNA-Bindung von CF I 25 beiträgt.

CF I kann als ein Regulator der alternativen Polyadenylierung angesehen werden, da die Expression des Proteins Einfluss auf die Wahl der Spleiß- und Polyadenylierungsstellen hat (A. R. Gruber et al., 2014; Martin et al., 2012; Zhu et al., 2018). Die Domänenstruktur von CF I ist schematisch in **Abbildung 1.5** dargestellt.

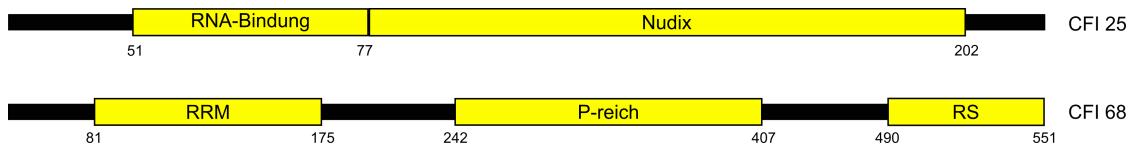


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Domänen von CF I

Schematische Darstellung der Domänenstruktur von CF I. CF I 68 besitzt mittig eine Prolin-reiche (P) und C-terminal eine Arginin/Serin-reiche (RS) Sequenz.

1.3.4 CF II

Der *cleavage factor* II (CF II) ist ein Heterodimer aus den Untereinheiten hPcf11 und hClp1 und konnte jüngst rekonstituiert werden (Schäfer et al., 2018). Der Proteinkomplex gilt als ein essentieller Faktor der 3'-Prozessierung. In der Hefe bilden die beiden Homologen zusammen mit den Homologen von CstF77 (=Rna14) und CstF64 (=Rna15) den essentiellen CF IA-Komplex. CF II bindet über Pcf11 G-reiche Sequenzen der mRNA-Vorläufer (Schäfer et al., 2018). Im N-terminalen Bereich besitzt Pcf11 eine konservierte CTD interagierende Domäne (CID). Über diese Interaktionsdomäne wird eine Bindung zur CTD der RNA Polymerase II vermittelt. Dadurch wird die 3'-Prozessierung eng mit der Transkription und im speziellen mit der Transkriptionselongation gekoppelt (Barillà et al., 2001; Meinhart & Cramer, 2004). Mit der Bindung zwischen der CTD und der CID wird der Elongationskomplex gestört, wodurch es eine erhebliche Rolle in der Transkriptions-Termination besitzt (West & Proudfoot, 2007; Z. Zhang et al., 2005). Im mittleren Bereich des Proteins befinden sich 30 FEGP-Wiedererholungen, die essentiell für die Spaltung der 3'-Prozessierung sind (Schäfer et al., 2018). Die genaue Funktion der FEGP-Motive ist unbekannt. Zwei Zinkfinger im C-Terminus sorgen für die Bindung der G-reichen RNA-Sequenzen. Die Clp1-Interaktionsdomäne wird von den beiden Zinkfingern flankiert (Guégueniat et al., 2017; Noble et al., 2005; F. Yang et al., 2017).

hClp1 bildet die zweite Untereinheit von CF II und ist innerhalb von Eukaryoten hoch konserviert. Humanes Clp1 besitzt in seiner mittleren Struktur eine 5'-Polynukleotid-kinase-Domäne (PNK) mit entsprechender Aktivität. Die PNK-Domäne ist zwar im Clp1 aus Hefe ebenfalls vorhanden, jedoch ohne entsprechende PNK-Aktivität. In seiner Kinaseaktivität bevorzugt hClp1 einzelsträngige RNA-Substrate (Weitzer & Martinez, 2007). Die Kinasedomäne besitzt eine ausgeprägte Sequenzhomologie zur T4-PNK (Dikfidan et al., 2014). Der N- und der C-Terminus sind in Hefe an der ATP-Bindung und Protein-Protein-Wechselwirkung beteiligt (Gordon et al., 2011; Gross & Moore, 2001). Zusätzlich konnte eine Beteiligung von hClp1 am tRNA-Splicing-Endonuklease-Komplex beschrieben werden. Die

genaue Funktion des Proteins beim tRNA-Spleißen bleibt bislang jedoch ungeklärt (Paushkin et al., 2004). Zusätzlich wurden durch Clp1 vermittelte Interaktionen mit CF I und CPSF beschrieben (de Vries, 2000). Eine schematische Darstellung der Domänen von CF II ist in gezeigt.

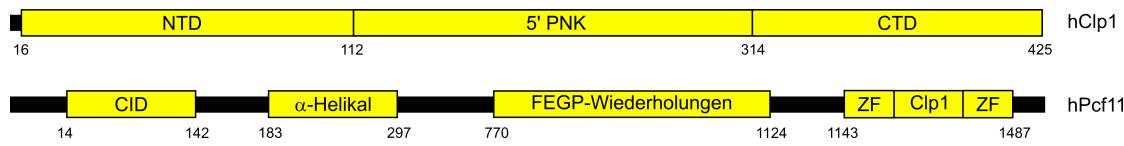


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der Domänen von CF II

hClp1 besitzt in der Mitte eine 5'-Polynukleotidkinase-Domäne (PNK). hPcf11 besitzt am N-Terminus eine CTD-interagierende Domäne (CID). Mittig sind wiederholende Sequenzen aus Phenylalanin, Glutamat, Glycin und Prolin (FEGP) zu finden. C-terminal wird die Clp1-Interaktionsdomäne von zwei Zinkfingern (ZF) flankiert.

1.3.5 PAP

Die Poly(A)-Polymerase (PAPOL α) gehört zu den kanonischen Poly(A)-Polymerasen. Sie ist ein wichtiger Bestandteil der 3'-Prozessierung. Während der Spaltungsreaktion ist sie ein wichtiger stimulierender Faktor, wohingegen sie für die Polyadenylierungsreaktion essentiell ist (S. Chan et al., 2011; Christofori & Keller, 1989; Wahle, 1991b). Die Bindung des Proteins an den Prozessierungskomplex scheint jedoch lose zu sein. In Kernextrakt-Faktionierungsversuchen zeigte sich bereits nach Ammoniumsulfatfällung und anschließender Größenausschlusschromatographie eine Trennung des Proteins vom Komplex (Christofori & Keller, 1988; Takagaki et al., 1989; Dissertation Schönemann, 2017).

Das aktive Zentrum der PAP liegt im N-Terminus, in welchem ATP gebunden ist und zweiwertige Metallionen wie Mg²⁺ oder Mn²⁺ komplexiert sind. Die Bindung von ATP sorgt für eine Konformationsänderung, die durch andere Substrate nicht herbeigeführt werden kann (Martin, 2000; Martin et al., 2004). Der C-Terminus der Polymerase ist für die katalytische Aktivität nicht essentiell.

Für die PAP wurden Interaktionen mit weiteren 3'-Prozessierungsfaktoren wie PABPN1, hFip1, CPSF1 und CF I berichtet (Dettwiler et al., 2004; Kaufmann et al., 2004; Kerwitz, 2003; Martin, 2000).

1.3.6 RBBP6

Das Retinoblastom-Bindungsprotein 6 (RBBP6) galt zu Beginn dieser Arbeit als ein putativer humaner 3'-Prozessierungsfaktor, der in massenspektrometrischen Untersuchungen zur 3'-Prozessierung nachgewiesen wurde (Shi et al., 2009). Zudem hat es in RNAi-Experimenten (RNA-Interferenz) von HeLa-Kernextrakten die Spaltaktivität gerettet, wenn der depletierte Kernextrakt mit dem rekombinanten N-Terminus komplementiert wurde (Di Giammartino et al., 2014). Der N-terminale Bereich besitzt eine ausgeprägte Homologie zu dem Hefe Protein Mpe1. In vorangegangenen Fraktionierungen konnte RBBP6 dagegen nicht nachgewiesen werden (Dissertation Schönemann, 2017). Daher war die rekombinante Darstellung des RBBP6 ein zentraler Aspekt dieser Arbeit.

Wie bereits oben angedeutet, besitzt RBBP6 einen konservierten N-Terminus mit einer DWNN- (*domain with no name*) oder Ubiquitin-ähnlichen Domäne, einem *zinc knuckle* vom CCHC-Typ und einer Ubiquitin-E3-Ligasedomäne (RING, *really interesting new gene*) (Kappo et al., 2012; Pugh et al., 2006). Für die Prä-mRNA Spaltung soll der N-Terminus notwendig sein (Di Giammartino et al., 2014; S. D. Lee & Moore, 2014; Vo et al., 2001). Das homologe Bäckerhefe-Protein entspricht lediglich dem strukturierten, humanen, N-terminalen Bereich (siehe Anhang **Abbildung 9.1**). Es ist Teil des für die Spaltung von Hefe-Vorläufer-mRNAs essentielle Nuklease-Moduls (siehe **Tabelle 1.1**) und interagiert mit dem CPSF3-Homolog Ysh1 (Hill et al., 2019; Rodríguez-Molina et al., 2022). Des Weiteren wurde dem *zinc knuckle* im Bäckerhefe-Protein eine essentielle Funktion für die Spaltung zugeschrieben (S. D. Lee & Moore, 2014). Bei hoher Konzentration wird dem RING-Finger eine Dimerisierungsfunktion attestiert (Kappo et al., 2012). Im humanen Protein folgt noch ein ca. 1000 Aminosäuren langer, unstrukturierter C-terminaler Bereich mit Arginin/Serin-reichen Sequenzen in der Mitte, einer Retinoblastom- und einer p53-Bindungsstelle.

Über eine Selektion der RNA-Sequenzen scheint RBBP6 Einfluss in der alternativen Polyadenylierung nehmen zu können und so zu einer Verlängerung der 3'-UTR zu führen (Di Giammartino et al., 2014; Tian & Manley, 2017). Mit der Verwendung einer intronischen 3'-Prozessierungsstelle kann eine Isoform (Isoform 3) erzeugt werden, die lediglich die DWNN und einen kleinen C-Terminus besitzt und dementsprechend durch alternative Polyadenylierung entsteht. Dieser Isoform wird eine inhibierende Wirkung auf die Spaltungsreaktion zugeschrieben. Dabei konkurriert Isoform 3 mit dem RBBP6 Wildtyp (Isoform 1) um die Assoziation an die 3'-Prozessierungsmaschinerie (Tian & Manley, 2017). In verschiedenen Krebsarten ist die Isoform 3 herunterreguliert (Di Giammartino et al., 2014; Mbita et al., 2012;

Tian & Manley, 2017). Im Gegensatz dazu wird die Isoform 1 in verschiedenen Krebsarten überexprimiert (Chen et al., 2013; Q. Wang et al., 2020; Xiao et al., 2019).

RBBP6 ist als ein multifunktionales Protein, beschrieben mit zellulären Funktionen wie mRNA-Metabolismus, Tumorgenese, Zellzyklus-Regulation und Entwicklung (L. Li et al., 2007; Scott et al., 2003; Witte & Scott, 1997; Yoshitake et al., 2004). Ursprünglich wurde das Protein als Interaktionspartner des Tumorsuppressor-Proteins Rb entdeckt (Sakai et al., 1995). Später wurde mit p53 ein weiterer Tumorsuppressor als Interaktionspartner gefunden (Simons et al., 1997). RBBP6 assoziiert über die RING-Domänen vermittelte Ubiquitinierung mit dem Transkriptionsfaktor YB-1 (*Y-box binding protein* 1) und reguliert diesen (Chibi et al., 2008). Des Weiteren wurde eine Interaktion mit CstF64 nachgewiesen, wodurch eine Assoziation mit der 3'-Prozessierungsmaschinerie beschrieben werden konnte (Di Giammartino et al., 2014). Eine schematische Darstellung der Domänen von RBBP6 ist in **Abbildung 1.7** zu finden.



Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der Domänen von RBBP6

N-terminal folgen der *domain with no name* (DWNN) ein CCHC *zinc knuckle* und ein RING-Finger (*really interesting new gene*). C-terminal folgt ein intrinsisch ungeordneter Bereich, der Arginin/Serin-reiche Bereiche (RS) sowie Interaktionsdomänen für das Retinoblastom-Protein und p53 besitzt.

1.4 Weitere putative 3'-Prozessierungsfaktoren

Zu Beginn dieser Arbeit lag ein Großteil der oben beschriebenen 3'-Prozessierungsfaktoren (CPSF, CstF, CF I, CF II und PAP) als rekombinant dargestellte Proteine/Proteinkomplexe vor. Diese waren jedoch nicht ausreichend, um die Spaltungsreaktion *in vitro* mit rekombinanten Proteinen zu rekonstituieren. Dies führte zwangsläufig zu dem Schluss, dass entweder noch ein oder mehrere Faktoren und/oder essentielle Modifizierungen der Proteine fehlen. Ein gereinigter humaner Spaltkomplex zeigte in massenspektrometrischen Untersuchungen ca. 85 Proteine (Shi et al., 2009). Dies ist ein weiterer Hinweis auf das Fehlen möglicher weiterer Faktoren. Mit Blick auf die homologen Proteine der Bäckerhefe und die 85 assoziierten Proteine gab es weitere potentielle 3'-Prozessierungsfaktoren, die untersucht werden konnten. Eine Auswahl an putativen 3'-Prozessierungsfaktoren, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, wird nun im weiteren Verlauf kurz vorgestellt.

1.4.1 C-terminale Domäne der RNA Polymerase II

Einer dieser putativen Faktoren ist die C-terminale Domäne (CTD) von Rbp1, der größten Untereinheit der RNA-Polymerase II. In der Literatur wurde dem Protein bereits eine essentielle

Rolle in der 3'-Prozessierung *in vitro* (Hirose & Manley, 1998) und zumindest einem stimulierenden Einfluss für die *in vivo* Reaktion zugeschrieben (McCracken et al., 1997). Die CTD gilt als Assoziationsplattform für die Proteine der 3'-Prozessierung und koppelt diese mit der Synthese der Vorläufer-mRNAs und der 5'-*capping*-Reaktion (Rodríguez-Molina et al., 2023; Xiang et al., 2014). Die CTD besteht aus 52 Wiederholungen einer Heptapeptid-Konsensussequenz YSPTSPS. Je nach Transkriptionsstatus liegen unterschiedliche Phosphorylierungsstadien der CTD vor. Cyclin-abhängige Kinase (CDKs) phosphorylieren einzelne Aminosäuren. Durch die Phosphorylierungen der Serine-2 und 5 werden sowohl weitere Transkriptionsfaktoren als auch 3'-Prozessierungsfaktoren zur Transkriptionsmaschinerie rekrutiert (Ahn et al., 2004; Barillà et al., 2001). Einer dieser 3'-Prozessierungsfaktoren ist die CF II Untereinheit Pcf11. Das Protein interagiert über seine CTD-Interaktionsdomäne (CID) mit dem phosphorylierten Serin-2 der CTD während der Transkriptions-Elongation (Noble et al., 2005). Dagegen wird Serin-5 bereits während der Transkriptions-Initiation phosphoryliert. Auch die Phosphorylierung von Tyrosin-1, Threonin-4 und Serin-7 spielt eine Rolle während der Transkription (Rodríguez-Molina et al., 2023). Der Phosphorylierungsstatus der CTD während der Transkription ist in **Abbildung 1.8** dargestellt. Neben der Phosphorylierung gibt es noch weitere Modifikationen wie Peptidyl-Prolyl-Isomerisierung der Proline-3 und 6 und Glykosylierung der Serine und Threonin-4. Auch diese werden je nach Transkriptionsstatus hinzugefügt oder entfernt (Egloff et al., 2012).

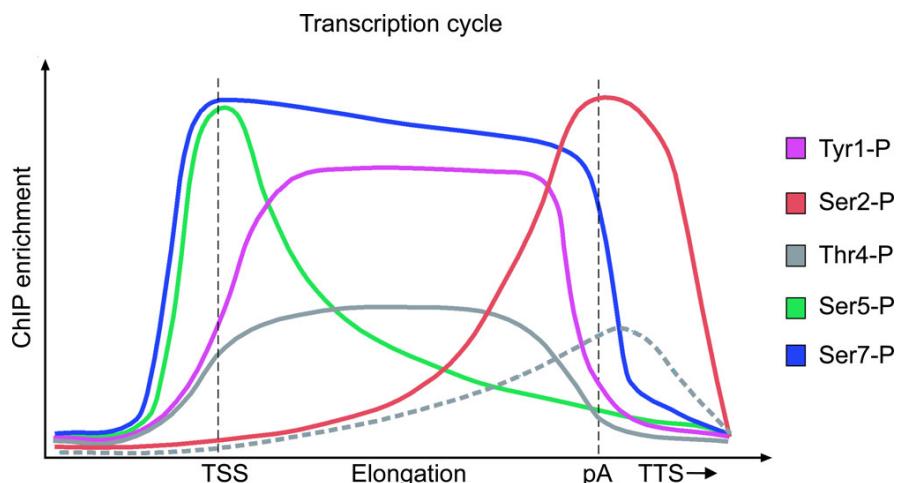


Abbildung 1.8: Veränderung des Phosphorylierungsstatus der CTD während der Transkription
Dargestellt ist der CTD-Phosphorylierungsstatus während der Transkriptions-Initiation, -Elongation und -Termination. Entnommen Eick & Geyer, 2013.

1.4.2 CTD-spezifische Phosphatase PP1 und Ssu72

Der Phosphorylierungsstatus der CTD spielt eine wichtige Rolle in der Reifung von mRNAs. Aus diesem Grund sind Phosphatasen essentiell für eine korrekte Synthese von mRNAs, da zum jeweiligen Zeitpunkt die Phosphorylierung an den oben aufgeführten Positionen entfernt wird. Eine dieser Phosphatasen ist die Proteinphosphatase-1 (PP1) mit der katalytischen Untereinheit α . Neben PP1 α gehören die Untereinheiten WDR82, Tox4 und PNUTS zu dem Komplex (J.-H. Lee et al., 2010). In der Hefe konnte die Dephosphorylierung des Tyrosin-1 der RNA Pol II-CTD durch das PP1 α -Homolog Glc7 gezeigt werden. Die Phosphatase dephosphoryliert das Tyrosin-1 und rekrutiert weitere Proteine für die Transkriptions-Termination (Rodríguez-Molina et al., 2023; Schreieck et al., 2014).

Eine weitere CTD-spezifische Phosphatase ist Ssu72. Diese dephosphoryliert Serin-5 während der Transkriptions-Elongation. Zusätzlich besitzt die Phosphatase eine Dephosphorylierungsaktivität für Serin-7, welche jedoch deutlich schwächer ist als für Serin-5 (Xiang et al., 2012). Die Dephosphorylierungen der Serine 5 und 7 erfolgt noch vor der Termination (Bataille et al., 2012). Neben der Beteiligung an der Transkription scheint ein Einfluss auf die 3'-Prozessierung gegeben zu sein, da Ssu72 mit dem N-Terminus von Symplekin interagiert (Ghazy et al., 2009; Xiang et al., 2010). In der Hefe wurde für Ssu72 eine Beteiligung an der 3'-Prozessierung nachgewiesen (Dichtl et al., 2002; Krishnamurthy et al., 2004).

Die Phosphatasen Glc7 und Ssu72 sind in Hefe beides Bestandteile des APT-Komplexes (*associated with Pta1*) / Phosphatase-Moduls (Casañal et al., 2017; Lidschreiber et al., 2018). Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass für Rekonstitution in Hefe dieses Modul nicht essentiell ist (Hill et al., 2019). Vielmehr scheint eine erhebliche Beteiligung an der Prozessierung von kleineren sn/snoRNAs zu bestehen (Lidschreiber et al., 2018).

1.5 Phasentrennung

Die Phasentrennung (LLPS; *liquid-liquid phase separation*) beschreibt einen spontanen Zustand einer konzentrierten und einer verdünnten wässrigen Phase. Es kommt zu einer reversiblen und metastabilen Entmischung, bei der Proteine und/oder RNA zwei flüssige koexistierende Phasen bilden. Dadurch kann es in Zellen zur Bildung von membranlosen Organellen (MLOs) kommen, zu denen unter anderem *stress granules* und *P-bodies* (Banani et al., 2017) gehören. Eine treibende Kraft zur Bildung sind multiple reversible Wechselwirkungen zwischen Proteinen, die häufig durch sogenannte intrinsisch ungeordnete Regionen (IDR) oder auch *prion-like* Domänen vermittelt werden (Huai et al., 2022; Kato et al., 2012). IDRs bestehen zu einem Großteil aus Glycin, Arginin, Lysin und Tyrosin (Huai et

al., 2022; Nesterov et al., 2021). Diese kommen unter anderem in RNA-bindenden Proteinen wie *Fused in Sarcoma* Protein (FUS) oder auch bei manchen Proteinen der 3'-Prozessierungs-maschinerie vor. So soll z. B. FUS über diese Kondensate die CTD der RNA Pol II rekrutieren und Einfluss auf die Transkription nehmen (Thompson et al., 2018). Generell scheint die Phasentrennung ein weit verbreiteter Zustand für die Regulation vieler Mechanismen in den Zellen und wichtig für die Kompartimentierung der Zellen zu sein (Huai et al., 2022; Shin & Brangwynne, 2017).

LLPS ist konzentrationsabhängig und beeinflusst Protein-Protein- und Protein-RNA-Interaktionen. Bei der LLPS kommt es zunächst zu einem Übergang von einer verteilten Phase (*dispersed*) zu „flüssigen“ Tropfen, die sich später zu Hydrogelen oder gar festen Phasen (*solid-like states*) entwickeln können (Kato et al., 2012; Patel et al., 2015). Allerdings sind die Zustände fester Phasen irreversibel. Übergang und Bildung der *liquid droplets* können abhängig von verschiedenen Modifikationen wie Methylierung oder Phosphorylierung sein (Ji et al., 2022; Qamar et al., 2018). Außerdem ist der Prozess abhängig von Temperatur und Salzkonzentration. Häufiges Auftreten dieses Vorgangs, mit nachfolgender Aggregation der Proteine scheint ein Treiber für verschiedene Krankheiten zu sein (Huai et al., 2022).

LLPS kann *in vitro* durch sogenannte *crowding* Reagenzien (*crowder*), wie z. B. Polyethylen-glykol (PEG), herbeigeführt werden (Patel et al., 2015). Dabei sorgt solch ein Makromolekül für einen *macromolecular crowding* Effekt, der durch Ausschluss des freien Wassers zu einer lokalen Konzentrierung von Proteinen und RNAs führt (Ralston, 1990).

Für die biochemische Rekonstitution der Spaltungsreaktion der 3'-Prozessierung sind *crowder* essentiell. Daher werden den Reaktionen z. B. PEG oder Polyvinylalkohol (PVA) zugeführt. Ohne diese ist die Polyadenylierungsreaktion *in vitro* nicht möglich (McLauchlan et al., 1988).

WDR33 (siehe **Einleitung 1.3.1**) ist einer der 3'-Prozessierungsfaktoren, die IDRs besitzen. Für das WDR33-Homolog FCA aus *Arabidopsis thaliana* wurde eine Phasentrennung gezeigt (Fang et al., 2019). Es wurde behauptet, dass zumindest in Arabidopsis die 3'-Prozessierung in phasengetrennten Tropfen abläuft. Ob LLPS bei der 3'-Prozessierung generell und vor allem für die Prozessierung in Säugetieren auftritt oder gar notwendig ist, ist bislang nicht geklärt.

1.6 Zielstellung der Arbeit

Die 3'-Prozessierung von Säuger mRNAs wird seit mehr als 30 Jahren untersucht. Die Untersuchungen wurden zunächst mit Hilfe von Kernextrakten durchgeführt. Die beteiligten Faktoren wurden durch Reinigung aus Kernextrakten und z. T. auch aus Kalbsthymus identifiziert. Für die genauere Charakterisierung hilft die Darstellung der Proteine nach Überexpression. Dieses Verfahren ist essentiell für eine detailliertere, mechanistische und strukturelle Analyse der Reaktionen.

Mit der Rekonstitution der Polyadenylierungsreaktion, dem zweiten Schritt der 3'-Prozessierung, konnten bereits genauere Charakterisierungen erfolgen (Schönemann et al., 2014). Eine Rekonstitution der Spaltungsreaktion mit rekombinanten Säugerfaktoren war bislang nicht gelungen und sollte in dieser Arbeit realisiert werden.

Für diese Untersuchungen wurden die bereits vorhandenen Faktoren, wie CPSF, erneut exprimiert und gereinigt. Zusätzlich sollten mit dem Ziel der Rekonstitution weitere putative Faktoren kloniert, exprimiert, gereinigt und untersucht werden.

Nach der Etablierung eines minimalen, rekonstituierten Systems sollten genauere Untersuchungen der Spaltungsreaktion erfolgen. Dabei wurde das Hauptaugenmerk auf Experimente zu einer möglichen Rolle der Phasentrennung gelegt.

2 Ergebnisse

2.1 Rekonstitution der Spaltungsreaktion von Vorläufer-mRNAs

Vor Beginn der experimentellen Arbeiten zu dieser Dissertation konnte Lars Schönemann in seiner Dissertation (2017) die zweite Teilreaktion der 3'-Prozessierung, die Polyadenylierung, mit rekombinanten Proteinen rekonstituieren. Dabei wurde der für die Polyadenylierung essentielle mPSF-Komplex als CPSF-Subkomplex charakterisiert. Außerdem wurden in den Dissertationen von Peter Schäfer (2020) und Christian Tüting (2020) die essentiellen Prozessierungsfaktoren CstF, CF I und CF II rekombinant gereinigt und charakterisiert. Die beiden CPSF-Subkomplexe mPSF und mCF sowie CstF, CF I, CF II und Poly(A)-Polymerase wurden zu Beginn der vorliegenden Arbeiten verwendet und die Präparationen in Zusammenarbeit mit Dr. Uwe Kühn und Florian Kluge weiter verbessert. CPSF besteht aus dem Heterotetramer mPSF und dem zweiten Subkomplex mCF. Für Versuche zur Rekonstitution der Prä-mRNA-Spaltung sollte mCF zunächst unabhängig von mPSF in Insektenzellen exprimiert und gereinigt werden, um eine bessere Qualität und höhere Reinheit der Proteinkomplexe zu erzielen.

2.1.1 Reinigungen und RNA-Bindungsaktivität von mCF3 und mCF4

Zur Darstellung eines möglichen CPSF-Komplexes aus den Subkomplexen mPSF und mCF wurden die Untereinheiten von mCF kloniert, exprimiert und gereinigt. mCF enthält die Untereinheiten CPSF2, CPSF3 und Symplekin (siehe **Einleitung 1.3.1**). Zu diesem Zeitpunkt gab es aber auch Hinweise darauf, dass CstF64 nicht nur eine Untereinheit von CstF ist, sondern gleichzeitig auch ein Bestandteil von mCF sein könnte. Unter anderem basierte diese Annahme auf der Sequenzähnlichkeit zu der Untereinheit Pti1 des APT-Komplexes aus der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*), der an der Prozessierungsreaktion beteiligt sein sollte (Nedea et al., 2003; Skaar & Greenleaf, 2002). Diese interagiert unter anderem mit dem Symplekin-Homolog, das ebenfalls Teil dieses Komplexes ist (Casañal et al., 2017). Für CstF64 und Symplekin ist auch eine Interaktion beschrieben (siehe **Einleitung 1.3.1**). Zusätzlich wurde in affinitätschromatographischen Präzipitationen (*Flag-pull downs*) von mCF-Untereinheiten lediglich CstF64 als einzige der CstF Untereinheiten gefunden (Dissertation C. Tüting, 2020). Gleicherweise zeigte sich bei Untersuchungen zu Rekonstitution der Spaltung von Histon-Prä-mRNAs. Dort galt CstF64 bis zur Rekonstitution lange als essentieller Faktor des Spaltkomplexes (Sun et al., 2020; X.-C. Yang et al., 2013). Daher wurden zwei Versionen von mCF exprimiert.

Im Folgenden wird das Resultat der Expressionen und der Reinigungen von mCF3 (Symplekin, CPSF2, CPSF3) und mCF4 (Symplekin, CPSF2, CPSF3, CstF64) gezeigt (**Abbildung 2.1**). Beide Komplexe wurden ohne Affinitätsfusionpeptid exprimiert und in dieser Reihenfolge über DEAE-Sepharose, Resource S, Heparin-Sepharose und Größenausschlusschromatographie (Superose6) gereinigt. Peter Schäfer führte für mCF3 die ersten drei Reinigungsschritte durch.

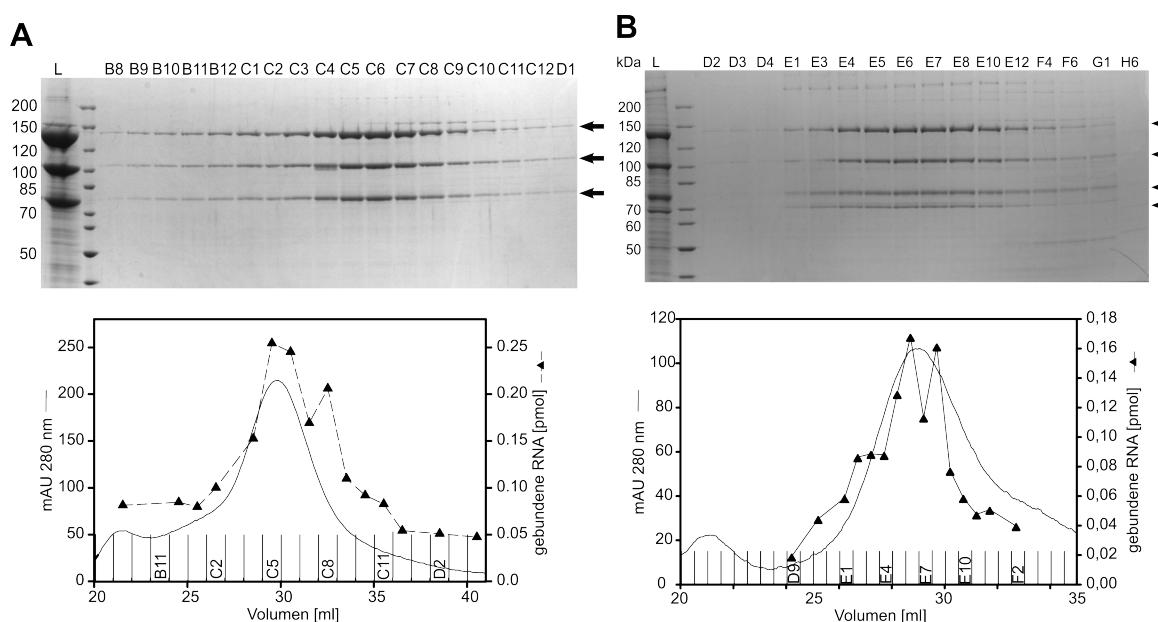


Abbildung 2.1: Finaler Reinigungsschritt von mCF3 und mCF4

Gezeigt ist der letzte Reinigungsschritt von mCF3 und mCF4 nach einer Größenausschlusschromatographie und RNA-Bindungsmessungen einzelner Fraktionen der Reinigung. Die RNA-Bindungsmessungen sind in **Methoden 6.12.4** dargestellt. **(A)** Oben: Analyse der finalen Größenausschlusschromatographie von mCF3 auf einer Coomassie-gefärbten SDS-PAGE. L ist der *load* der Säule. Die Fraktionsnummern (z. B. B8) sind oberhalb des SDS-Gels angegeben. Unten: Ko-gereinigte RNA-Bindungsaktivität mit mCF3. UV-Profil der Superose6 mit RNA-Bindungsaktivität der jeweiligen Fraktionen. Die Messpunkte an gebundener RNA der einzelnen Fraktionen sind mit einem Dreieck (\blacktriangle) gekennzeichnet. Die Bindungsaktivität wurde mit Hilfe eines Nitrozellulose-Filterbindungsassays gemessen. **(B)** Oben: Coomassie-gefärbte SDS-PAGE zur Analyse der finalen Größenausschlusschromatographie von mCF4. L ist der *load* der Säule. Die Fraktionsnummern (z. B. D2) sind oberhalb des SDS-Gels angegeben. Unten: Ko-gereinigte RNA-Bindungsaktivität mit mCF4. UV-Profil der Superose6 mit RNA-Bindungsaktivität der jeweiligen Fraktionen. Die Messpunkte an gebundener RNA der einzelnen Fraktionen sind mit einem Dreieck (\blacktriangle) gekennzeichnet. Die Bindungsaktivität wurde mit Hilfe eines Nitrozellulose-Filterbindungsassays gemessen.

In **Abbildung 2.1A** ist die Analyse der finalen Superose6-Fraktionen von mCF3 in einem Coomassie-gefärbten SDS-Gel zu sehen. Hierfür wurden die Fraktionen (B8-D1) aufgetragen, welche im Chromatogramm eine Extinktion bei 280 nm zeigen. Das Gel zeigt in den Spuren C3-C8 einen homogenen und stöchiometrischen Komplex. Im unteren Abschnitt ist das UV-Profil der Chromatographie zusammen mit der Analyse der RNA-Bindungsaktivität dargestellt. Dabei ist zu sehen, dass eine Bindungsaktivität vorhanden ist, die mit den mCF-haltigen Fraktionen korrespondiert. Die Aktivität wurde mittels Nitrozellulose-Filterbindungsassays ermittelt. Wie das Coomassie-gefärbte SDS-Gel zeigt, sind die Fraktionen nahezu frei von

Verunreinigungen, und somit kann die Bindungsaktivität sehr wahrscheinlich auf mCF3 zurückgeführt werden. Bislang ist diese Aktivität in der Literatur nicht beschrieben worden. In **Abbildung 2.1B** ist das Coomassie-gefärbte SDS-Gel der finalen Größenausschlusschromatographie von mCF4 zu sehen. Auch hier zeigt sich ein nahezu homogener Komplex mit leichten Verunreinigungen, wie z. B. an der Bande oberhalb von 200 kDa zu sehen ist. Im Vergleich zu den anderen drei Untereinheiten ist CstF64 minimal im Unterschuss vorhanden. Das Diagramm darunter zeigt ebenfalls eine RNA-Bindungsaktivität in den Hauptfraktionen von mCF4. Die *Peak*-Fraktion zeigt nicht die höchste Bindungsaktivität, obwohl das aufgrund der höchsten Proteinkonzentration zu erwarten wäre. Dies ist vermutlich auf einen Messfehler zurückzuführen. mCF3 zeigt in seinen Hauptfraktionen eine ca. zweifach stärkere RNA-Bindungsaktivität als mCF4. Allerdings ist dem UV-Profil der beiden Diagramme zu entnehmen, dass auch die Proteinkonzentration im Vergleich zu mCF4 ca. zweifach höher ist. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass sich die Bindungsaktivitäten beider Komplexe nur geringfügig unterscheiden und diese nicht auf CstF64 zurückzuführen ist.

Versuche zur Rekonstitution der Prä-mRNA-Spaltung durch Kombination von mCF3 oder mCF4 mit den anderen gereinigten Prozessierungsfaktoren (mPSF, CstF, CF I, CF II, PAP, CTD) blieben zu diesem Zeitpunkt erfolglos (Daten nicht gezeigt).

2.1.2 Expression und Reinigung von RBBP6 erlaubt die Rekonstitution der Prä-mRNA-Spaltung

Ein zusätzlicher putativer 3'-Prozessierungsfaktor ist RBBP6 (siehe **Einleitung 1.3.6**). Vorausgegangene Versuche der Expression und Reinigung eines unverkürzten RBBP6 (*full-length protein*) waren nicht erfolgreich, da ein Großteil des Proteins während Expression und Reinigung proteolytisch verdaut wurde. Aus diesem Grund sollten die Expression und Reinigung optimiert werden, so dass weitere Versuche zur Rekonstitution der Spaltung in Anwesenheit von RBBP6 durchgeführt werden konnten.

Die ersten Präparationen von unverkürztem RBBP6 (Daten nicht gezeigt) wiesen die gleichen Probleme auf, welche bereits bei Expressions- und Reinigungsversuchen von Lars Schönemann aufgetreten waren. Schon während der Expression in Sf21-Zellen wurden große Mengen des Proteins proteolytisch abgebaut (Western-Blot Analyse nach mehreren Expressionszeitpunkten; Daten nicht gezeigt). Die Verwendung unterschiedlicher N-terminaler Affinitätsfusionspeptiden (Strep-*tag*, His-*tag*, His-Flag-*tag*, N-terminaler His-*tag* und C-terminaler Flag-*tag*) führte zu keiner verbesserten Ausbeute. Eine Ko-Expression mit CF I erhöhte aber die Ausbeute an vollständigem Protein. Allerdings war auch bei ko-exprimierten

Präparationen der Anteil an Fragmenten größer als der des vollständigen Proteins. Die ko-exprimierten Präparationen führten nicht zu einer Rekonstitution der Spaltaktivität bei der Komplementation eines Proteinmixes aus mPSF, mCF, CF I, CF II, CstF, PAP, Kreatinkinase (CK) und ggf. WDR82, PP1 α (beide PP1-Komplex) Ssu72 und CTD auf der L3-Substrat-RNA (Daten nicht gezeigt).

Aus diesem Grund wurden neue Überlegungen zum Erhalt höherer Mengen von aktivem RBBP6 vorgenommen. Eine Literaturrecherche ergab eine Interaktion zwischen 3'-Prozessierungsfaktoren wie CPSF2, Pcf11 und der CTD der RNA Pol II mit dem THO-Komplex, welcher am Export von RNPs beteiligt ist (Katahira, 2012; Meinel et al., 2013; Tran et al., 2014). Deshalb wurde RBBP6 in Insektenzellen nicht nur mit CF I, sondern auch mit Untereinheiten des THO-Komplexes ko-exprimiert. Abgesehen von einer möglichen Stabilisierung von RBBP6 erschien auch eine Beteiligung des THO-Komplexes an der Spaltung der Prä-mRNA möglich. Der THO-Komplex (bestehend aus den Untereinheiten Tho1, 2, 3, 5, 6, 7) bildet zusammen mit zwei DEAD-box Helikasen und ALYREF den TREX-Komplex (*Transcription-Export*) und ist neben seiner Funktion des Exports von RNPs aus dem Zellkern an der Transkription, Prozessierung und dem Abbau von mRNAs beteiligt (Katahira, 2012).

Die neuen Ko-Expressionen von RBBP6 mit CF I bzw. ThoCI (Tho1, Tho3, Tho5, Tho6, Tho7) wurden mit Hilfe von Ni-NTA-Säulen gereinigt und im Spaltassay getestet. Das entsprechende Experiment ist in **Abbildung 2.2** gezeigt.

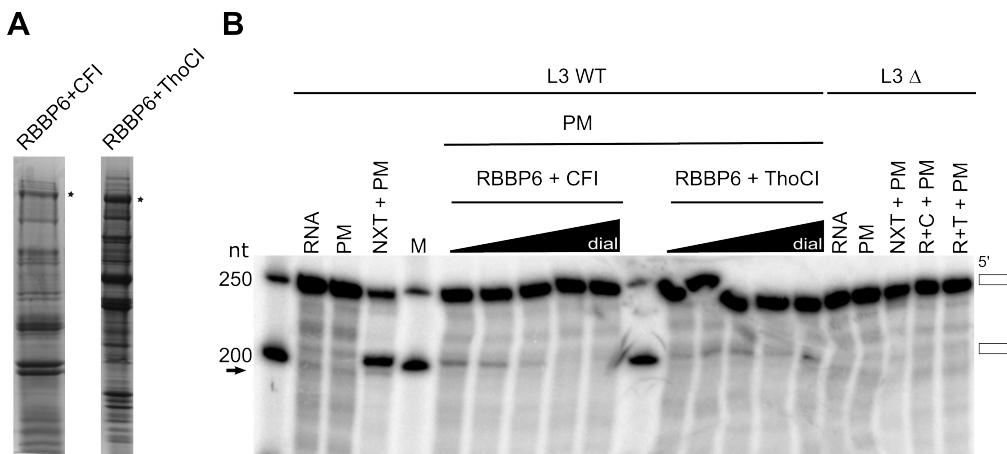


Abbildung 2.2: RBBP6 Nickel-NTA Fraktionen aktivieren Proteinmix

(A) Ausschnitte von SDS-PAGEs von Elutionsfraktionen (Ni-NTA-Säule) von RBBP6 nach Ko-Expressionen mit CF I oder ThoCl. Die Gele wurden mit Coomassie gefärbt. RBBP6 wurde jeweils mit einem Stern gekennzeichnet. **(B)** Titration der in (A) gezeigten RBBP6-Fraktionen (50-400 fmol) in einem Spaltassay, dargestellt in einem Autoradiogramm einer 5%-igen PA-Harnstoff-PAGE. Der verwendete Spaltbuffer enthielt Kreatinphosphat und PVA als *crowding* Reagenz. Als Substrat-RNA wurden 25 fmol L3 WT bzw. L3 Δ verwendet. Als Kontrollen wurde der Proteinmix (PM) alleine und ein Gemisch aus HeLa-Kernextrakt (NXT) und PM eingesetzt. Der PM beinhaltete jeweils 100 fmol mPSF, mCF4, PAP, CF I, CF II, CstF, CTD, PAPBN1, CDC73, PP1 α -Komplex, XRN2 und 100 ng CK. Die höchst eingesetzte Menge an titriertem Protein (ca. 400 fmol) wurde zusätzlich einmal gegen Nickel-Elutionspuffer ohne Imidazol dialysiert (dial). RBBP6 + CF I (R+C) und RBBP6 + ThoCl (R+T) ist die jeweilige RBBP6-Präparation. M ist der Marker. Die Größen der Markerbanden sind links aufgeführt. Das 5'-Spaltprodukt ist mit einem Pfeil indiziert. Das 5'-Spaltprodukt ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Abbildung 2.2 zeigt die jeweilige Nickel-Eluat-Fraktion, welche im Spaltexperiment titriert wurde. Der Assay wurde mit L3-RNA bzw. der in der AAUAAA-Sequenz mutierten Variante von L3 Δ durchgeführt (**Abbildung 2.2B**). Als Positivkontrolle diente eine Mischung aus HeLa-Kernextrakt (NXT; nicht dialysiert; Ipracell) und Proteinmix. Als Negativkontrolle diente der Proteinmix alleine. Für die Titration der RBBP6-Präparationen wurden aufsteigende Volumina an RBBP6-Eluaten der Nickel-NTA-Säule verwendet. Aufgrund der in (A) gezeigten Fraktionen, die viele Kontaminationen enthalten, konnte eine genaue Menge von RBBP6 nicht bestimmt, sondern lediglich 50-400 fmol abgeschätzt werden. Weil höhere Imidazol-Konzentrationen zu einer Inhibition der Spaltung führen, wurde die jeweils letzte Spur der Titration mit einem dialysierten Aliquot der Fraktion durchgeführt. Bereits die geringste Konzentration der Nickel-Fraktion aus der Ko-Expression von RBBP6 mit CF I komplementierte den PM und ein geringer Teil der Substrat-RNA wurde gespalten (siehe 5'-Spaltprodukt bei ca. 200 Nukleotiden). Mit steigendem Volumen an RBBP6-CF I Fraktion verringerte sich im Assay der Anteil an gespaltener RNA soweit, dass mit der höchsten Konzentration, sowohl un- als auch dialysiert, keine Spaltaktivität mehr nachgewiesen werden konnte. Die Abnahme der Menge an 5'-Spaltprodukt mit größer werdendem Volumen der Nickel-Fraktion könnte an möglicherweise inhibierenden verkürzten RBBP6-Fragmenten

liegen, die in der Fraktion enthalten sind oder an weiteren Verunreinigungen, die sich ebenfalls negativ auf die Spaltung auswirken könnten. Die mit ThoCI ko-exprimierte RBBP6-Präparation konnte ebenfalls den PM komplementieren und einen geringen Teil der Substrat-RNA spalten, allerdings weniger effizient. Die Menge an 5'-Spaltfragment nahm hier mit steigender RBBP6 Konzentration zu. Zur Überprüfung der Spezifität der RNA-Spaltung wurde L3 Δ als Substrat-RNA verwendet, die eine U nach G-Mutation in der AAUAAA-Sequenz trägt. Mit dem mutierten Substrat wurde neben den drei Kontroll-Reaktionen jeweils eine mittlere Konzentration der beiden RBBP6-Präparationen eingesetzt. In keiner dieser Spuren (siehe letzten beiden Spuren R+C+PM, R+T+PM) wurde eine Spaltaktivität beobachtet. Die Spaltung der RNA war also eine spezifische Reaktion. Derselbe Assay wurde auch mit L3 $short$ als Substrat-RNA ausgeführt, mit demselben Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Das Experiment zeigt, dass beide RBBP6-Präparationen den Proteinmix aus jeweils 100 fmol mPSF, mCF4, PAP, CF I, CF II, CstF, CTD, PAPBN1, CDC73, PP1 α -Komplex, XRN2 und 100 ng CK zu einer spezifischen 3'-Spaltaktivität komplementieren können. Durch die vielen Verunreinigungen in beiden Präparationen ist allerdings nicht klar, ob diese Aktivität alleine auf RBBP6 zurückzuführen ist oder durch einen mitgereinigten Faktor verursacht wird. In der vorsichtigsten Interpretation zeigt das Experiment, dass die im Proteinmix eingesetzten Proteine aktiv sind.

Die nachgewiesene Komplementation der spezifischen 3'-Spaltaktivität durch RBBP6 Nickel-NTA-Fraktionen kann sowohl auf RBBP6 selbst als auch auf andere mitgereinigte Proteine oder Moleküle zurückzuführen sein. Ein Vergleich von RBBP6 mit dem Hefe-Homolog Mpe1, welches für die Aktivität von CPF in der Bäckerhefe benötigt wird, zeigt, dass das Hefe-Protein bedeutend kleiner ist als das humane Protein (Hill et al., 2019; S. D. Lee & Moore, 2014). Beide Proteine besitzen drei konservierte Domänen im N-Terminus (DWNN/Ubiquitin ähnliche Domäne, CCHC-Zinkknöchel, RING-Finger Domäne) (siehe **Einleitung 1.3.6**). Das humane Protein besitzt zusätzlich einen ausgedehnten C-terminalen Bereich, für den eine Abwesenheit von tertiären Strukturen vorhergesagt wird. Überwiegend unter Beibehaltung der konservierten Domänen wurden daher unterschiedliche C-terminale RBBP6-Verkürzungen hergestellt (Schema in **Abbildung 2.3**). Damit wurde die Hoffnung verbunden, dass solche Deletionsvarianten sich besser exprimieren und reinigen lassen würden, um den Einfluss möglicher Kontaminationen zu minimieren.

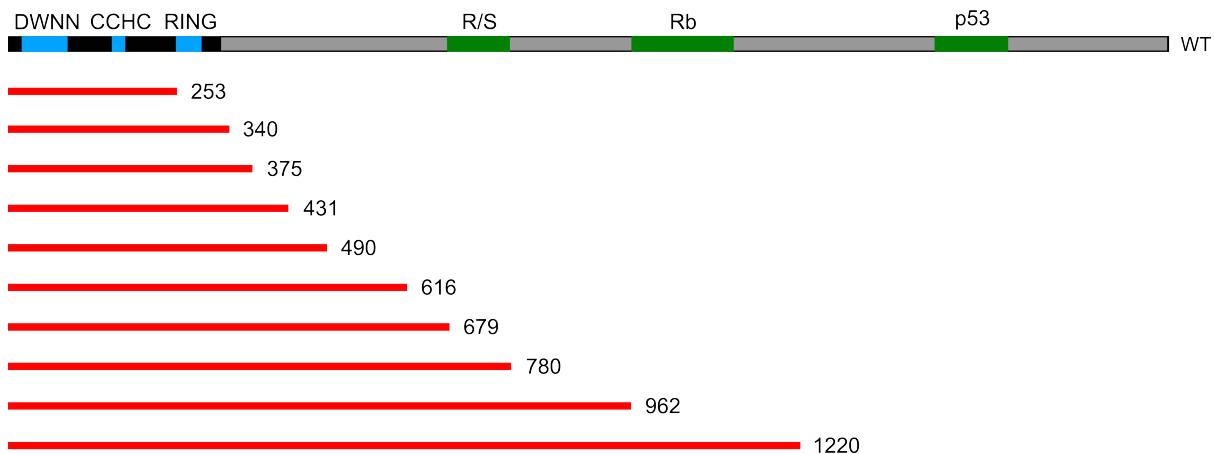


Abbildung 2.3 Schematische Darstellung der C-terminalen RBBP6 Verkürzungen

Schematische Darstellung von RBBP6. Die Wildtypsequenz ist oben dargestellt. Der graue Bereich zeigt die intrinsisch ungeordnete Region (IDR) des Proteins. Die N-terminalen Domänen sind in blau, restliche Bindungsdomänen in grün abgebildet. Die Verkürzungen sind in rot mit der jeweiligen Anzahl der Aminosäuren ab dem N-Terminus. DWNN ist die *domain with no name*, CCHC ist der *zinc knuckle*, RING ist der RING-Finger, R/S sind Arginin/ Serin-reiche Sequenzen, Rb und p53 sind Bindungsstellen für das Rb1 Protein sowie p53.

Die C-terminal verkürzten RBBP6-Varianten $1\text{-}340$, $1\text{-}375$, $1\text{-}431$ und $1\text{-}490$ wurden sowohl bakteriell als auch in Insektenzellen exprimiert und gereinigt ($1\text{-}253$ wurde zu einem späteren Zeitpunkt exprimiert und gereinigt). Varianten mit einem längeren C-Terminus als $1\text{-}490$ konnten bakteriell nicht mehr effizient synthetisiert bzw. gereinigt werden, sondern nur noch in Sf21-Zellen. Die Proteine wurden zunächst über eine Ni-NTA-Säule gereinigt. Für die bakteriell exprimierten Proteine wurde dies von Jonas Buhl und Uwe Kühn durchgeführt. Anschließend wurden sowohl das bakteriell exprimierte als auch das Protein aus Insektenzellen dialysiert und auf eine Resource Q-Säule (RQ-Säule) zur Anionenaustauschchromatographie geladen. Beispielhaft ist im Folgenden die Reinigung von RBBP6 $1\text{-}340$ und RBBP6 $1\text{-}780$ gezeigt.

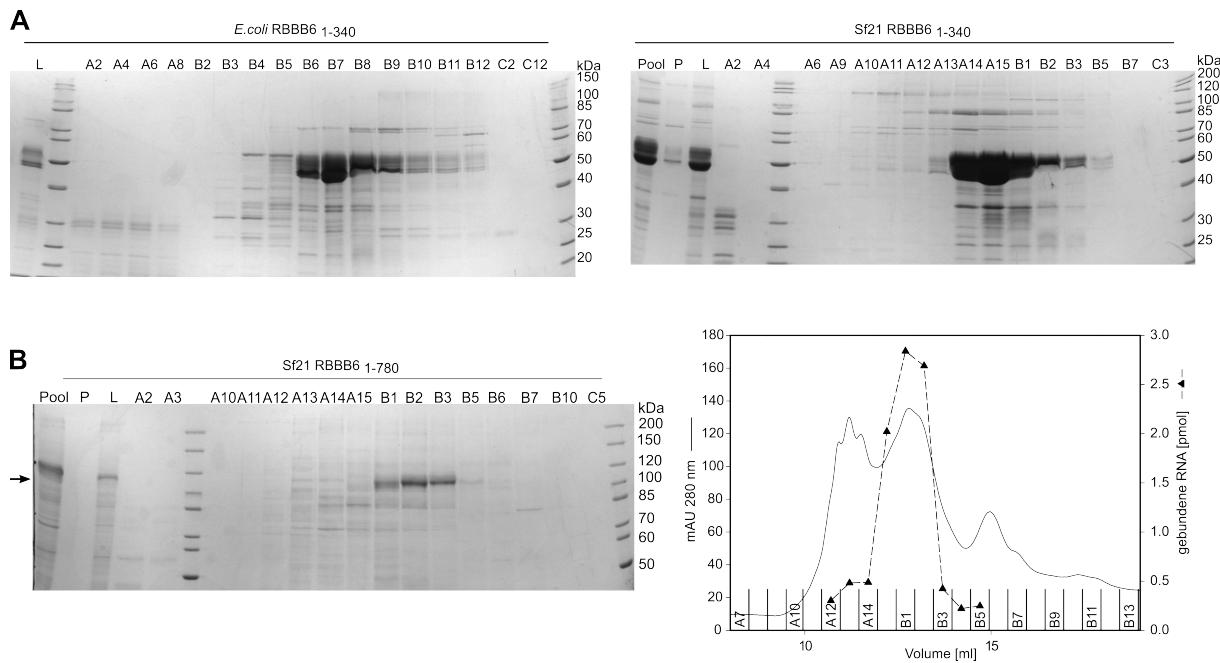


Abbildung 2.4 Resource Q-Reinigungen von RBBP6₁₋₃₄₀ und RBBP6₁₋₇₈₀

(A) Resource Q-Reinigungen von RBBP6₁₋₃₄₀ aus *E. coli* und Sf21 Zellen; Analyse auf Coomassie-gefärbten SDS-Gelen. Aufgetragen wurden ein Aliquot des Dialysats (L (*load*)), das Präzipitat nach Dialyse (P), die zusammengefassten Nickel-NTA-Fraktionen (Pool) und die Fraktionen der RQ Säule (A-C). Die Molekulargewichte der Markerproteine sind rechts angegeben. Für die Hauptfraktionen B6 bis B8 des linken Gels sind 5 µl, für die restlichen Fraktionen 10 µl aufgetragen worden. Im rechten Gel wurden für alle Fraktionen 10 µl auf das Gel geladen. Die Elutionspeaks der beiden Proteine unterscheidet sich aufgrund der unterschiedlichen Beladungsvolumina der RQ-Säule. Die Chromatogramme der Reinigungen befinden sich im Anhang **Abbildung 9.3**. **(B)** Links: Resource Q Reinigung von RBBP6₁₋₇₈₀ aus Sf21 Zellen. Analyse auf Coomassie-gefärbten SDS-Gel. Aufgetragen wurden ein Aliquot des Dialysats (L (*load*))), das Präzipitat nach Dialyse (P) und zusammengefassten Nickel-NTA-Fraktionen (Pool) und die Fraktionen der RQ Säule (A-C). Die Molekulargewichte der Markerproteine sind rechts angegeben. Elutionsfraktionen wurden mit 20 µl aufgetragen. Rechts: Ko-gereinigte RNA-Bindungsaktivität mit RBBP6₁₋₇₈₀. Das UV-Profil der RQ mit RNA-Bindungsaktivität mit den jeweiligen Fraktionen wurden im Diagramm dargestellt. Die Messpunkte an gebundener RNA der einzelnen Fraktionen sind mit einem Dreieck (▲) gekennzeichnet. Die Bindungsaktivität wurde mit Hilfe eines Nitrozellulose-Filterbindungsassays gemessen. Das Chromatogramm der Reinigung befindet sich im Anhang **Abbildung 9.3**.

Abbildung 2.4A zeigt zwei Coomassie-gefärbte SDS-PAGE zur Analyse der Resource Q-Reinigungen von RBBP6₁₋₃₄₀ aus *E. coli* (links) und Sf21-Zellen (rechts). Beide Reinigungen zeigen ein ähnliches Bandenmuster für das Zielprotein bei ca. 50 kDa. Neben einer größeren Hauptbande sind knapp oberhalb von dieser noch mehrere weitere Banden zu sehen. Zusätzlich gibt es darunter noch mehrere Proteolyseprodukte. Ein Großteil dieser Banden gehören zu RBBP6 (siehe **Abbildung 2.7B** Western Blot Analyse).

Abbildung 2.4B ist das SDS-Gel zur Analyse der RQ-Reinigung von RBBP6₁₋₇₈₀ abgebildet. In diesem ist eine Hauptbande bei ca. 110 kDa zu sehen. Einen Teil der Verunreinigungen, die im *load* zu finden sind, konnten abgetrennt werden. Dennoch sind unterhalb der Hauptbande noch vereinzelte Verunreinigungen zu finden. Im rechten Teil der Abbildung ist das UV-Profil

mit der RNA-Bindungsaktivität einzelner Fraktionen der Reinigungen dargestellt, welche mittels Filterbindungsassays ermittelt wurde. Hierbei konnte eine Bindungsaktivität nachgewiesen werden, welche mit den RBBP6-haltigen Fraktionen (B1-B3) ko-gereinigt wurde. Vermutlich beruht die Bindungsaktivität auf dem *zinc knuckle* und dem RING-Finger, da beide Domänen für eine effiziente RNA-Bindungsaktivität des Hefe-Homologs Mpe1 verantwortlich sind (S. D. Lee & Moore, 2014).

Nachdem, neben den bereits vorhandenen rekombinanten Prozessierungsfaktoren, mCF und RBBP6 gereinigt werden konnten, wurden diese als kanonischer oder Standard-Proteinmix bezeichnet und diente als Basis für die weiteren Untersuchungen.

In ähnlicher Weise wurden auch andere C-terminal verkürzte RBBP6-Varianten in *E. coli* und in Sf21 Zellen exprimiert und über Ni-NTA- und RQ-Säulen gereinigt. Im folgenden Experiment wurden die Hauptfraktionen der RBBP6 Varianten 1-340, 1-375, 1-431 und 1-490 in verschiedenen Konzentrationen in einer Spaltreaktion eingesetzt und miteinander verglichen.

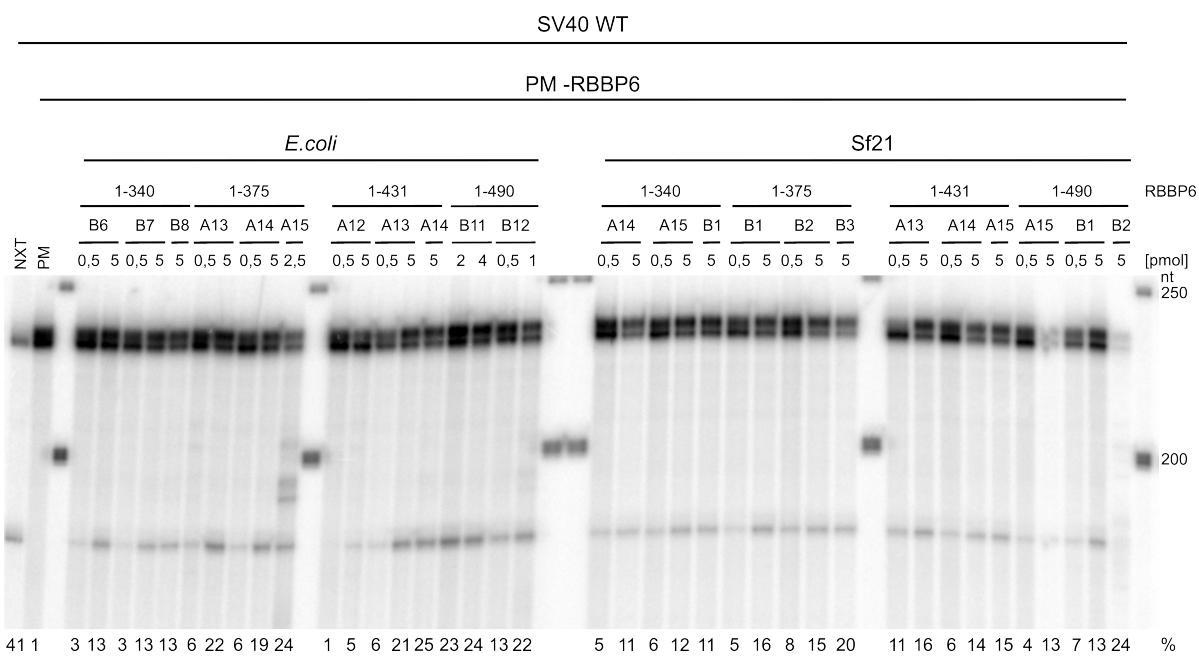


Abbildung 2.5: N-terminale RBBP6-Fragmente erlauben die Rekonstitution der Prä-mRNA-Spaltung

Spaltanalyse von titrierten RBBP6-Präparationen. Die Hauptfraktionen verschiedener N-terminaler RBBP6-Präparationen aus bakterieller und Sf21 Expression wurden in Spaltassays in den angegebenen Mengen eingesetzt. SV40/late WT diente als Substrat-RNA. Der Proteinmix (PM) enthielt alle kanonischen Prozessierungsfaktoren. mPSF wurde mit 500 fmol/Reaktion eingesetzt. Als *crowder* wurde PVA verwendet und der HeLa-Kernextrakt (NXT) diente als Positivkontrolle. Die RNA wurde in einer denaturierenden (5%igen) PAGE aufgetrennt und autoradiographisch sichtbar gemacht. Die RNA Spur alleine wurde aufgrund eines Gelartefaktes entfernt. Die Größen der Markerbanden sind rechts aufgeführt.

In **Abbildung 2.5** ist das Autoradiogramm des Vergleichs der vier RBBP6-Varianten aus bakterieller und Insektenzell-Expression dargestellt.

Mit allen Präparationen ist zu sehen, dass RBBP6 den Proteinmix komplementieren kann und die Substrat-RNA gespalten wird. Unisono weisen Reaktionen mit 0,5 pmol RBBP6 eine geringere Aktivität auf als die zehnfache Menge (5 pmol) bzw. die jeweils höchste eingesetzte Menge. Für die Reaktionen mit dem geringer konzentrierten RBBP6 wurden Aktivitäten zwischen 3 und 13% erreicht. Im Vergleich dazu konnten höhere Mengen RBBP6 Spaltaktivitäten bis zu 24% nachgewiesen werden. Außerdem scheint die 1-340-Variante den Proteinmix minimal schwächer zu komplementieren. Sowohl für die *E. coli* als auch für die Sf21-Proteine konnten die drei längeren Varianten höhere Effizienzen erzielen. Außerdem war die Spaltaktivität für die nicht bakteriellen Proteine geringer als die der vergleichbaren bakteriellen Varianten.

Die Substrat-RNA war in allen Reaktionen mit eingesetztem Proteinmix als Doppelbande zu sehen. Diese ist auf eine Exonuklease-Verunreinigung der eingesetzten CF II-Präparation zurückzuführen. Wahrscheinlich ist die Exonuklease Uridyl-spezifisch, da die *in vitro* synthetisierte SV40late-RNA sechs 3'-terminale Uridylat-Reste trägt und diese verdaut werden.

Mit allen oben gezeigten RBBP6-Präparationen wurde, unabhängig von der Expression in *E. coli* oder Sf21-Zellen, eine Spaltung der RNA beobachtet. Damit gelang zum ersten Mal eine Rekonstitution der Prä-mRNA-Spaltung mit rekombinanten, hochgereinigten Proteinen. Die Kombination von mPSF, mCF, CstF, CF I, CF II, PAP und RBBP6 reicht also für die Rekonstitution der Spaltung aus. Gleichzeitig weist das Experiment nach, dass RBBP6 ein essentieller Bestandteil des Spaltkomplexes ist. Dies wurde bereits vorher von (Di Giammartino et al., 2014) vermutet. Da auch das in *E. coli* exprimierte RBBP6 aktiv war, kann die Aktivität nicht auf Posttranskriptionale Modifikationen zurückgeführt werden. Schließlich zeigt das Experiment, dass der N-terminale, strukturierte Bereich von RBBP6 für die Spaltaktivität ausreicht. Bakteriell exprimierte, also nicht post-translational modifizierte, RBBP6 ist in der RNA-Spaltung aktiv.

Es wurden weitere, unterschiedlich lange C-terminale RBBP6-Deletionen getestet, um mehr Informationen über den Einfluss der RBBP6-Bereiche auf die Spaltaktivität zu erhalten. Das Experiment zuvor gab bereits einen ersten Hinweis darauf, dass die Länge des C-Terminus und damit der Anteil an intrinsisch ungeordneten Bereichen die Spaltung stimulieren könnte. RBBP6-Proteine mit mehr als 490 Aminosäuren wurden ausschließlich in Sf21 Zellen

exprimiert. Eine Titration der C-terminalen RBBP6-Verkürzungen 1-322, 1-616, 1-679, 1-780, 1-962 und 1-1220 ist in **Abbildung 2.6** dargestellt. Dabei beziehen sich die angegeben Zahlen auf die im Konstrukt vorhandenen N-terminalen Aminosäuren.

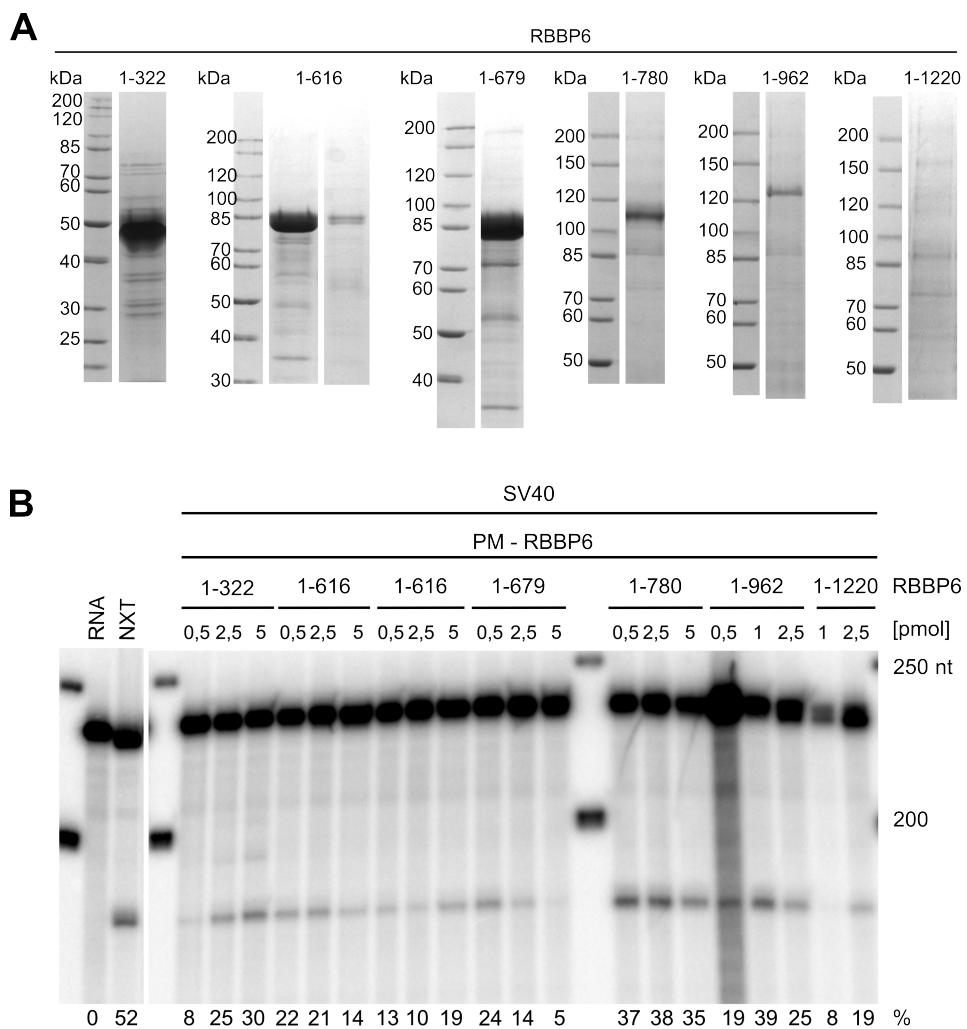


Abbildung 2.6: Titration weiterer C-terminaler RBBP6-Verkürzungen

(A) Hauptfraktionen der Titration der RBBP6-Varianten 1-322, 1-616, 1-679, 1-780, 1-962 und 1-1220 auf einer Coomassie gefärbten SDS-PAGE. Die Molekulargewichte der Markerbanden sind jeweils links der Gelausschnitte angegeben. **(B)** Titration der RBBP6-Varianten 1-322, 1-616, 1-679, 1-780, 1-962 und 1-1220, dargestellt in einem Autoradiogramm einer 5%igen PA-Harnstoff-PAGE. Das Experiment wurde mit 500 fmol mPSF und PVA im Spaltbuffer ausgeführt. Als Positivkontrolle diente HeLa-Kernextrakt (NXT). Der Proteinmix (PM) enthielt kein RBBP6. Für RBBP6₁₋₆₁₆ wurden zwei verschiedene Fraktionen titriert. Die Größen der Markerbanden sind rechts aufgeführt.

Die Titration der jeweiligen Hauptfraktion der Präparationen, welche in **Abbildung 2.6A** abgebildet sind, zeigte überwiegend einen Anstieg der Menge an Spaltprodukt mit zunehmender RBBP6-Menge. Vergleicht man die RBBP6 1-322 mit 1-616 bzw. 1-679, sieht man, dass die kürzere Variante aktiver ist als die längeren. Bei Stoffmengen zwischen 2,5 und 5 pmol konnten zwischen 25 und 30% Substrat-RNA gespalten werden, während bei den beiden längeren Proteinen nur ca. 20% Aktivität nachgewiesen werden konnte. Außerdem scheinen hier

kleinere Mengen die Reaktion mehr zu stimulieren als größere Mengen von RBBP6. Interessanterweise sinkt auch bei den längeren Präparationen die Menge an Spaltprodukt bei höheren Mengen an RBBP6. Die Varianten 1-780 und 1-962 stimulieren den Proteinmix stärker (zwischen 19 und 39%) als 1-322 (vgl. Spuren 3-6 und 17-22). Für das Protein 1-1220 konnte lediglich Aktivität zwischen 8 und 19% erzielt werden. Dies ist jedoch vermutlich auf die schlechte Proteinpräparation zurückzuführen, vergleicht man das Protein mit den verbliebenen Verunreinigungen in der Fraktion (siehe **Abbildung 2.6A**). Durch den Einsatz von RBBP6-Präparationen mit einem zunehmenden Anteil an IDR zeigt sich, dass die IDR stimulierend, aber nicht essentiell auf die Spaltaktivität wirkt. Die Stimulation sorgt dafür, dass bereits geringere Mengen an RBBP6 (0,5 pmol) den Proteinmix in gleicher Weise komplementieren und Spalteffizienten aufweisen können wie größere Mengen (2,5-5 pmol) an RBBP6 einer kürzeren Deletionsvariante.

In den folgenden Rekonstitutions-Experimenten zur Charakterisierung der *in vitro*-Spaltreaktion wurde die bakterielle Version von RBBP6₁₋₃₄₀ eingesetzt, die N-terminal die drei strukturierten Domänen des Proteins enthält sowie 41 weitere Aminosäuren am C-Terminus besitzt (siehe **Abbildung 2.3**).

2.1.3 *Domain with no name* (DWNN) und die *zinc knuckle*-Domäne in RBBP6 sind ausreichend für die Spaltaktivität von RBBP6

Im Folgenden sollte noch mehr auf den Vergleich zwischen dem strukturierten N-Terminus von RBBP6 und dem intrinsisch ungeordneten Bereich des C-Terminus und dessen mögliche stimulierende Wirkung eingegangen werden.

Abbildung 2.7A sind ferner mehrere verkürzte RBBP6-Varianten, eine RING-Finger Deletionsvariante und zwei nicht verkürzte Proteine nach Reinigung und Trennung auf einer Coomassie-gefärbten SDS-PAGE gezeigt. Bis auf 1-253 konnte keine der exprimierten RBBP6-Varianten zur Homogenität gereinigt werden: Bei beiden RBBP6₁₋₃₄₀ Proteinen (*E. coli* und Sf21) waren nicht nur eine Hauptbande, sondern bis zu vier Banden zu sehen, drei davon mit einem größeren apparenten Molekulargewicht. Die bakterielle Präparation von RBBP6₁₋₄₉₀ hatte ein apparentes Molekulargewicht von ca. 70 kDa und enthielt unterhalb der Hauptbande zwei proteolytische Fragmente (siehe Western Blot Analyse in **Abbildung 2.7B**). Das Insektenzellprotein dagegen hatte bis zu vier Banden mit ähnlichen apparenten Molekulargewichten. Im Vergleich dazu waren die längeren Konstrukte mit mehr Verunreinigungen versehen. Die Δ RING-Variante ist eine Deletionsmutante, bei der die RING-Domäne (Aminosäuren 254-327) deletiert ist. Die *full-length*-Variante ist identisch mit der MBP-Fusion,

mit Ausnahme der Abspaltung der MBP-Fusion mittels Proteolyse. Ob es sich bei den Inhomogenitäten der RBBP6-Präparationen um Verunreinigungen mit anderen Proteinen oder um Abbauprodukte von RBBP6 handelte, wurde durch eine Western Blot-Analyse untersucht **Abbildung 2.7B**). Als Kontrollen wurden NXT und mit einem „leeren“ Virus infizierte Sf21-Zellen (negative Kontrolle) eingesetzt. Der verwendete Antikörper, der gegen den N-Terminus von RBBP6 gerichtet war, detektierte die jeweiligen Hauptbanden, die in der Coomassie-Färbung zu sehen waren. Neben diesen wurden zusätzliche proteolytische Abbauprodukte detektiert, mit Ausnahme der Variante 1-253. Diese Ergebnisse zeigten eine zusätzliche C-terminale Verkürzung der Deletionen. Auch die kürzeren Spezies in den Präparationen der *full-length*-Proteine waren zu einem Teil C-terminale Deletionsvarianten. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass der strukturierte N-Terminus von RBBP6 Proteolyse unempfindlich ist. Im Gegensatz dazu scheint der C-terminale Bereich proteolysesensitiv zu sein (siehe Banden bei ca. 46 kDa und 32 kDa). Zusätzlich wurde ersichtlich, dass die Banden oberhalb des 1-340 Hauptproteins ebenfalls RBBP6 enthielten. Auch für die *full-length*-Proteine konnte oberhalb der Hauptbande bei ca. 250 kDa eine Bande detektiert werden. Die Banden mit höheren Molekulargewichten könnten auf eine Modifikation von RBBP6 zurückgehen, deren Natur nicht geklärt ist. Da aber auch in der aus *E. coli* gereinigten Variante 1-340 solche Banden auftreten, ist eine Modifikation als alleinige Erklärung eher unwahrscheinlich.

Die dargestellten RBBP6-Varianten wurden im Spaltassay titriert und miteinander verglichen. In diesem Assay wurde eine neue, aktiver Präparation von mPSF verwendet, sodass lediglich noch 50 fmol des Proteins pro Reaktion eingesetzt wurden. Das Autoradiogramm dazu ist in **Abbildung 2.7C** abgebildet. Die quantitativ analysierte Spaltaktivität der einzelnen Präparationen ist unterhalb des Autoradiogramms graphisch dargestellt. Die unterschiedlichen C-terminal verkürzten RBBP6-Konstrukte waren in dem hier abgebildeten Experiment ähnlich aktiv und besaßen eine mit der Konzentration ansteigende Spaltaktivität zwischen 3 und maximal 11%. Bei je 5 pmol sorgten die drei Präparationen für Spaltungseffizienzen von 6,7 und 8%. Von den drei Präparationen war RBBP6₁₋₂₅₃ ohne die RING-Domäne die aktivste, was zeigt, dass diese Domäne für die Spaltung nicht essentiell ist. Einen ähnlichen Effekt auf die Spaltaktivität zeigten die langen RBBP6-Präparationen. Sie waren aber bei geringeren Konzentrationen (1 nM bzw. 20 fmol) aktiv. Das vollständige Protein ohne MBP-*tag* und die Variante ohne RING-Finger waren am aktivsten und erzielten eine Spaltung von 8-11% maximal der Substrat-RNA. Damit wird bestätigt, dass die RING-Domäne keine erkennbare Rolle in der RNA-Spaltung spielt. Auch scheint es so, dass der C-Terminus dafür sorgt, dass RBBP6 bereits bei geringeren Konzentrationen den Proteinmix erfolgreich komplementieren

kann, was möglicherweise an einer besseren RNA-Bindungsaktivität liegt. Dies müsste jedoch in weiteren Experimenten nachgewiesen werden.

Wurde das N-terminale Maltose-Bindungs-Fusionsprotein nicht von RBBP6 abgespalten, so besaß das Protein nur eine schwache Aktivität. Größere *tags* oder *linker* am N-Terminus des Proteins scheinen dementsprechend einen negativen Einfluss auf die Spaltaktivität von RBBP6 zu besitzen. Ähnliches wurde bei einer 1-322 Präparation, die einen zusätzlichen N-terminalen *linker* zwischen Histidin-*tag* und Start-Methionin der RBBP6-Sequenz trug, beobachtet. Allerdings wurde bei diesem Konstrukt überhaupt keine Aktivität nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Der Anteil der N-terminalen Fragmente in den Präparationen der (fast) vollständigen RBBP6-Varianten war vernachlässigbar; bei den getesteten Konzentrationen war ein Einfluss auf die Spaltaktivität nicht zu erwarten.

Nachdem gezeigt wurde, dass die DWNN und der *zinc knuckle* für die Spaltung in der 3'-Prozessierung ausreichen (siehe **Abbildung 2.7**; RBBP6₁₋₂₅₃), wurden RBBP6₁₋₇₈₀-Varianten mit Punktmutationen exprimiert und gereinigt. Eine der Varianten besitzt eine Doppelmutation (C161G; C164G) im *zinc knuckle*, um dessen Zn²⁺-Bindung zu inhibieren. Des Weiteren wurde eine Mutation im RING-Finger (N312D) eingeführt, die eine Dimerisierung des RING-Fingers verhindert (Kappo et al., 2012; S. D. Lee & Moore, 2014). Beide Punktmutanten wurden mit RBBP6₁₋₇₈₀ im Spaltassay verglichen. Das Autoradiogramm ist in **Abbildung 2.7D** abgebildet. Die Aktivität der RING-Mutante unterschied sich nur marginal von der des Wildtyps. Eine RING-abhängige Dimerisierung von RBBP6 ist also funktionell nicht relevant. Das Ergebnis wurde erwartet, da selbst eine vollständige Deletion der RING-Domäne die Aktivität von RBBP6 nicht beeinträchtigte. Dagegen ging durch die Mutation des *zinc knuckles* die Spaltaktivität nahezu vollständig verloren. Die strukturelle Integrität dieses Bereiches ist offensichtlich essentiell für die Spaltung von mRNAs. Diese wichtige Funktion des *zinc knuckle* wurde durch die Inaktivität der isolierten DWNN (RBBP6₁₋₈₁) bestätigt (Daten nicht gezeigt).

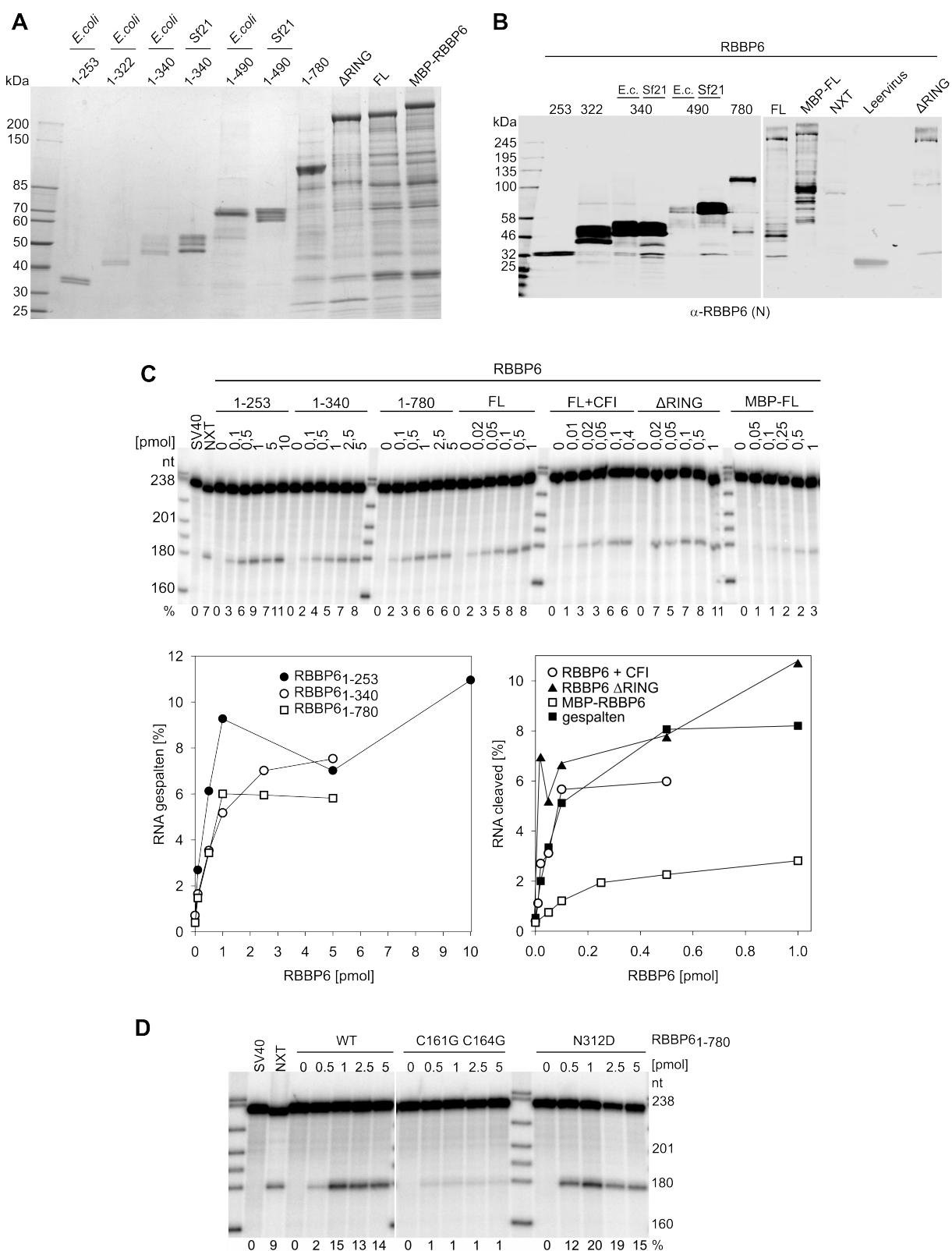


Abbildung 2.7: DWNN und zinc knuckle von RBBP6 sind essentiell für die Spaltung von Prä-mRNAs

(A) Verschiedener rekombinante RBBP6-Präparationen unterschiedlicher Größe aufgetrennt auf einer Coomassie gefärbte 4-15%ige SDS-PAGE. Die jeweilige Präparation ist oberhalb des SDS-Gels angegeben. MBP-RBBP6 ist das *full-length* (FL) Protein mit Maltose-Bindungs-Protein (MBP)-Fusion und FL ohne MBP-Fusion. Die Molekulargewichte der Markerbanden sind links vom Gelbild angegeben. *Beschriftung wird auf der folgenden Seite fortgesetzt.*

(B) Western-Blot Analyse verschiedener RBBP6-Varianten. Die jeweilige Präparation ist oberhalb des Blots angegeben. *E. coli* wurde mit E.c. abgekürzt. Als Kontrollen wurde HeLa-Kernextrakt und mit Leervirus infizierte Sf21-Zellen verwendet. Der primäre Antikörper (Biomol) war gegen den N-Terminus von RBBP6 gerichtet. **(C)** Titration verschiedener RBBP6-Proteine unterschiedlicher Länge in einem Spaltassay, analysiert auf einer 6%igen PA-Harnstoff-Gelelektrophorese. *Full-length* Protein (FL) ist ein MBP-RBBP6 Fusionsprotein mit abgespaltener MBP-Fusion. FL+CF I ist eine ko-exprimierte Präparation des *full-length* RBBP6 mit CF I. HeLa-Kernextrakt (NXT) diente als Kontrolle. Die Größen der Markerbanden sind links aufgeführt. Die Quantifizierung der Spaltaktivität ist unterhalb des Autoradiogramms in Zahlen angegeben und unten graphisch dargestellt. **(D)** Titration der RBBP6₁₋₇₈₀-Variante mit Punktmutationen im *zinc knuckle* (C161G C164G) und der RING-Domäne (N312D). Für das Experiment wurde ein Proteinmix ohne RBBP6 und nuklearer HeLa-Extrakt (NXT) als Positivkontrolle verwendet. Die Größen der Markerbanden sind rechts aufgeführt. Die Quantifizierung der Spaltaktivität ist unterhalb des Autoradiogramms in Zahlen angegeben.

2.1.4 Charakterisierung der rekonstituierten 3'-Prä-mRNA-Spaltung

Im Abschnitt zuvor konnte die Rekonstitution der 3'-Prä-mRNA-Spaltungsreaktion mit rekombinanten Proteinen gezeigt werden. **Abbildung 2.8A** gibt eine schematische Übersicht der einzelnen rekombinanten Säuger-Faktoren des Proteinmixes inklusive ihres Molekulargewichtes. Das Migrationsverhalten, sowie die Reinheit der einzelnen Faktoren, ist in einem Coomassie-gefärbten SDS-PAGE in **Abbildung 2.8B** gezeigt. Die relevanten Polypeptide sind mit einem weißen Stern markiert. Für RBBP6 ist die Variante 1-340 stellvertretend dargestellt. In einer Kinetik des Spaltexperimentes ist der Vergleich des Proteinmixes mit einem kommerziellen Kernextrakt (NXT; Ipracell) aus HeLa-Zellen gezeigt (**Abbildung 2.8C**; Experiment durchgeführt von Florian Kluge; Dissertation Florian Kluge 2023). Als Substrat-RNA wurde SV40_{late} WT sowie SV40_{late} Δ, die als Spezifitätskontrolle dient, verwendet. Mit voranschreitender Inkubation erkennt man im Autoradiogramm eine Zunahme der beiden Spaltprodukte. Das 5'-Spaltprodukt besitzt eine Länge von ca. 180 Nukleotiden, das 3'-Spaltprodukt eine von ca. 50 Nukleotiden. Zusätzlich erkennt man, dass das 3'-Spaltprodukt keine einzelne distinkte Bande, sondern heterogen ist. In den Kontrollspuren mit der mutierten Δ-Substrat-RNA ist keine Spaltung nachweisbar; damit ist die Spezifität der Spaltung der SV40_{late} RNA durch den Proteinmix nachgewiesen. Im NXT ist eine ähnliche Kinetik zu sehen und ebenfalls eine Abhängigkeit der Reaktion von der AAUAAA-Sequenz. Weder in der rekonstituierten Reaktion noch im Kernextrakt ist eine *lag*-Phase zu Beginn der Reaktion zu beobachten. Die Reaktion ist insgesamt langsam und ineffizient: Obwohl ein Überschuss von Proteinen gegenüber der Substrat-RNA verwendet wurde, ist nach 120 Minuten nur ca. 1/3 der RNA gespalten. Für die **Abb. 2.8D** wurde 3'-dATP verwendet, um die Polyadenylierung zu unterbinden und das 5'-Fragment direkt analysieren zu können. Wurde ATP verwendet, kam es aufgrund der langen Reaktionszeit und der hohen Poly(A)-Polymerase-Konzentration zur exzessiven Polyadenylierung der RNA (siehe **Abbildung 2.8D**). Reaktionen mit ATP wurden

nach Abschluss der Reaktion mit RNaseH/Oligo(dT) behandelt. Dabei zeigte sich durch den nach der Verdauung verbleibenden kurzen Oligo(A)-Rest, dass nicht nur das 5'-Spaltprodukt, sondern auch die Substrat-RNA polyadenyliert wurde. In den gezeigten Experimenten ist eine leichte Heterogenität der 5'-Spaltprodukte zu erkennen. Diese resultiert aus dem nicht hundertprozentigen Einbau des *cap*-Analogons ($m_2^{7,3'-O}GP3G$ (ARCA Cap Analog)) während der Synthese der Substrat-RNAs, wie in einem Experiment mit zwei RNAs mit und ohne *cap* gezeigt werden konnte (siehe Anhang **Abbildung 9.2**). Das 3'-Fragment liegt im Vergleich zum 5'-Fragment in substöchiometrischen Mengen vor, wird also offenbar während der Reaktion zum Teil abgebaut. Die Heterogenität des 3'-Spaltprodukts ist vermutlich auf eine Heterogenität der 3'-Enden zurückzuführen (Dissertation Florian Kluge, 2023).

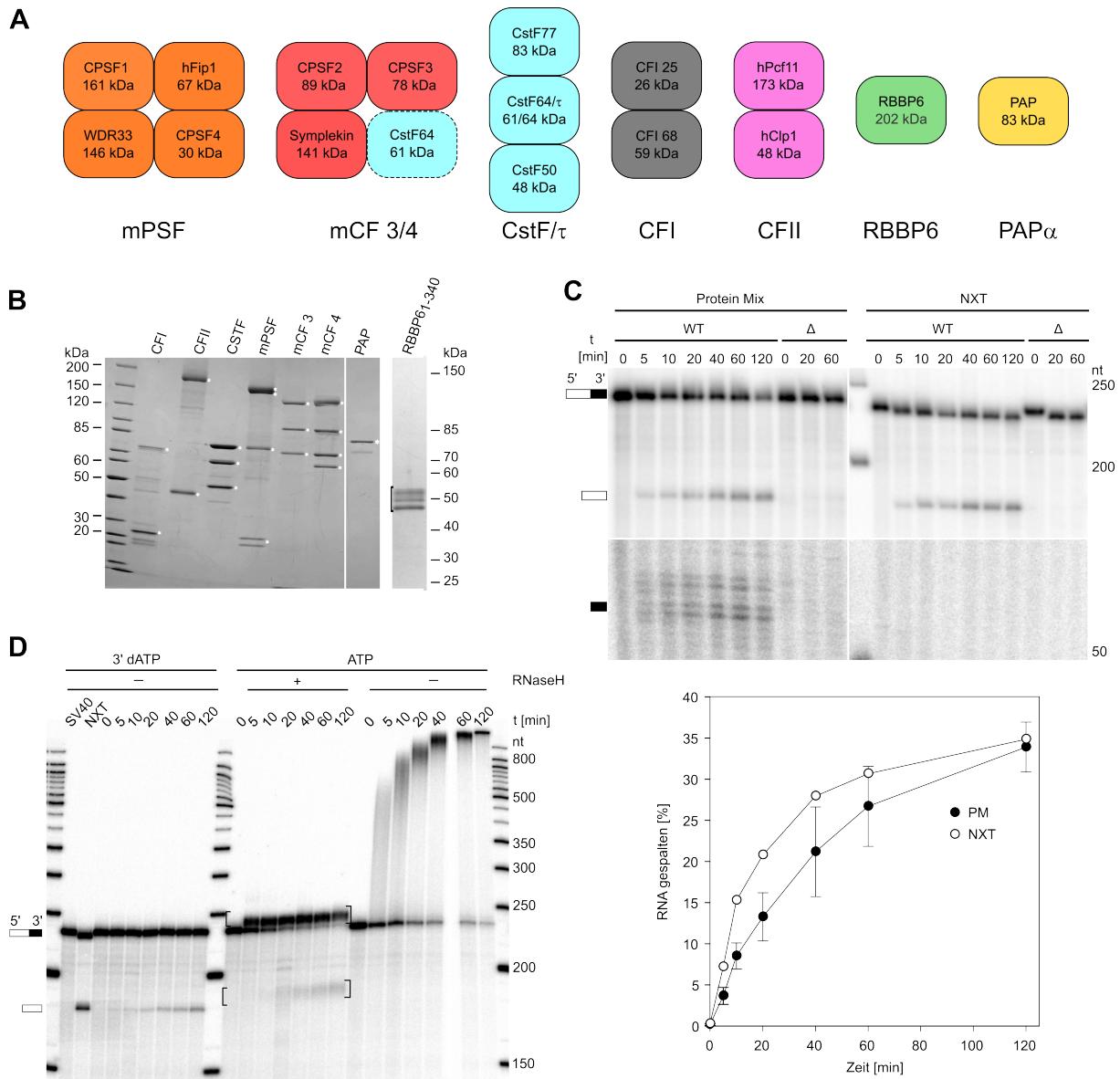


Abbildung 2.8: Rekonstitution der Spaltreaktion der 3'-Prozessierung von Vorläufer-mRNAs

(A) Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der zur Rekonstitution der Spaltungsreaktion verwendeten 16 Polypeptide. **(B)** Auftrennung der gereinigten Proteinkomplexe auf einer SDS-PAGE mit einem Gradienten von 4-15% Polyacrylamid. Die Komplexe wurden mit einem weißen Stern gekennzeichnet und das Molekulargewicht der Markerbanden wurde links bzw. rechts der SDS-Gele angegeben. Die Gelfärbung erfolgte mit Coomassie. Repräsentativ ist für RBBP6 die Variante 1-340 gezeigt, welche auf einem separaten SDS-Gel zu sehen ist. **(C)** Analyse der Kinetik von Spaltungsreaktionen auf SV40late WT und Δ in einem Autoradiogramm einer 6%igen Harnstoff-PAGE. Das Gel zeigt den Vergleich des Proteinmixes (PM) mit nukleärem Extrakt (NXT). Im unteren Bereich ist das 3'-Spaltfragment der Substrat-RNA zu sehen. Die Größen der Markerbanden sind rechts aufgeführt. Der Graph darunter zeigt die Zunahme des 5'-Spaltproduktes über die Reaktionszeit. Das Experiment und die Auswertung sind von Florian Kluge durchgeführt worden (Dissertation Florian Kluge 2023). **(D)** Spaltungs- und Polyadenylierungskinetik mit 3'-dATP im Vergleich zu ATP. Die Reaktion wurden auf einer 6%igen Polyacrylamid-Harnstoff-PAGE analysiert. Einige Proben wurden mit RNaseH und Oligo(dT) behandelt. Die Größen der Markerbanden sind rechts aufgeführt.

2.1.5 CF I ist nicht essentiell für die Spaltung der 3'-Prozessierung

Mit den zuvor gezeigten Experimenten konnte die Spaltungsreaktion der 3'-Prozessierung von Vorläufer mRNAs *in vitro* rekonstituiert werden. Dieser Befund ermöglichte nun eine weitergehende Charakterisierung der 3'-Spaltreaktion. Im Folgenden sollte zuerst ein minimaler Spaltkomplex mit lediglich den essentiellen Faktoren für diese Reaktion definiert werden. Dazu wurde jeweils ein Faktor aus dem Proteinmix weggelassen und die Spaltung von SV40late RNA analysiert (Abbildung 2.9). Die Spuren der Kontrollen mit NXT und PM zeigen ein 5'-Spaltprodukt bei ca. 180 Nukleotiden. Auch wenn CF I nicht im PM enthalten war, konnte dieses Spaltprodukt nachgewiesen werden, allerdings schwächer als bei der kompletten Reaktion. Dagegen zeigten alle anderen Reaktionen mit einem fehlenden Faktor im PM keine sichtbare Spaltaktivität mehr. Somit zeigt sich, dass CF I kein essentieller, aber ein stimulierender Faktor für die 3'-Prozessierung ist. Alle anderen Faktoren sind dagegen für die Spaltreaktion essentiell.

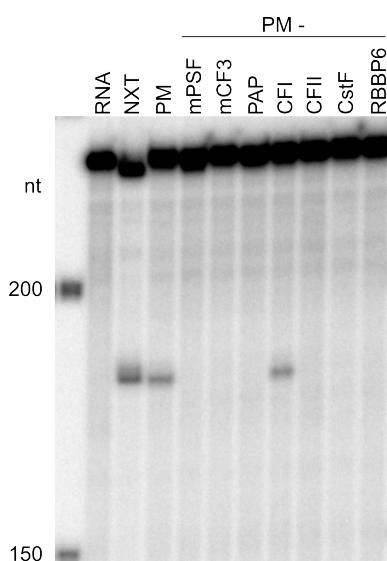


Abbildung 2.9 CF I ist kein essentieller 3'-Prozessierungsfaktor
Analyse einer Spaltreaktion, bei der jeweils ein 3'-Prozessierungsfaktor aus dem Proteinmix (PM) ausgelassen wurde. Gezeigt ist ein Autoradiogramm einer 6%igen Polyacrylamid-Harnstoff-PAGE mit SV40late als Substrat-RNA. Eine Reaktion mit nukleärem HeLa-Kernextrakt (NXT) und des vollständigen PMs diente als Positivkontrolle für das 5'-Spaltprodukt. Die Größen der Markerbanden sind links aufgeführt.

Die stimulierende, nicht essentielle Rolle von CF I und ihre Abhängigkeit von den CF I-Bindestellen (UGUA) wurde von F. Kluge in Titrationsexperimenten bestätigt (Florian Kluge Dissertation, 2023).

2.1.6 mCF3 und mCF4 sind beide aktiv in der Spaltung von Prä-mRNAs

Jüngst konnte die Spaltung von Histon Vorläufer-mRNAs rekonstituiert werden (Sun et al., 2020). Der rekonstituierte Histon-Spaltkomplex (HCC) ist dem Spaltkomplex für Prä-mRNAs sehr ähnlich. Dieser besteht ebenfalls aus den drei Proteinen Symplekin, CPSF2 und CPSF3. Zusätzlich gibt es mit CstF64 einen weiteren Faktor, der Teil des HCCs, aber nicht essentiell

ist. Da sich die beiden Spaltkomplexe sehr ähneln, sollte ein möglicher Einfluss von CstF64 auf das Verhalten von mCF überprüft werden. Aus diesem Grund sind von dem CPSF-Subkomplexe mCF zwei verschiedenen Versionen, mCF3 und mCF4, hergestellt worden (siehe **Kapitel 2.1.1**). Beim Vergleich der beiden Komplexe bezüglich ihrer RNA-Bindungsaktivität zeigte sich bereits, dass eine RNA-Bindungsaffinität mit mCF3 ko-gereinigt werden konnte und das Substrat mit ähnlicher Affinität gebunden wurde, wie der Komplex mit CstF64. Der Einfluss der RNA bindenden Untereinheit von CstF war hierbei nur minimal. In **Abbildung 2.10** ist ein Vergleich der beiden Proteine in einer Spaltreaktion dargestellt.

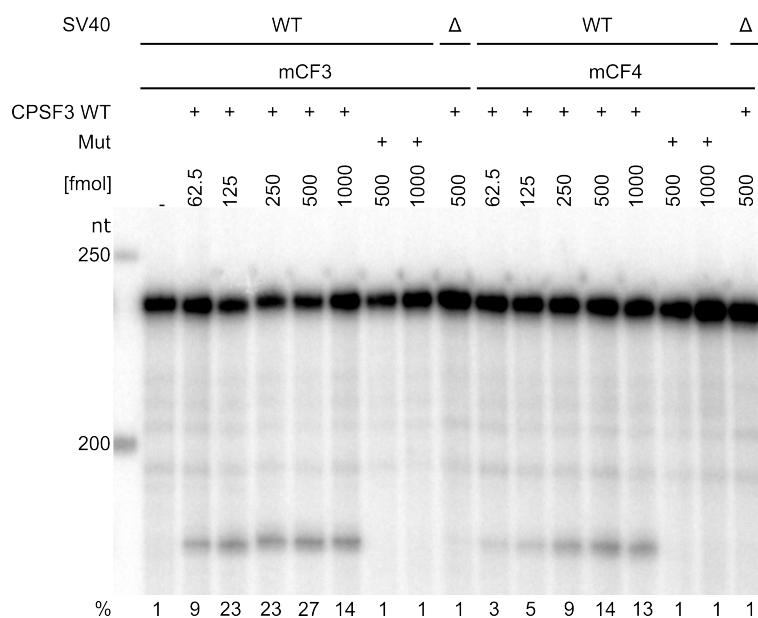


Abbildung 2.10: mCF3 und mCF4 sind aktiv in der Spaltung der 3'-Prozessierung

Titrationen von mCF3 und mCF4 in einer Spaltreaktion. Die Wildtyp-Komplexe wurden zwischen 62,5 und 1000 fmol titriert. Zur Kontrolle wurde die CPSF3-Mutante (Mut) mit 500 bzw. 1000 fmol anstelle des jeweiligen Wildtyp Komplexes eingesetzt. Die Reaktionen wurden mit SV40/late WT als Substrat-RNA durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Reaktion auf der AAUAA-mutierten (Δ) Substrat-RNA durchgeführt. Die Größen der Markerbanden sind links aufgeführt. Die Quantifizierung der Spaltaktivität ist unterhalb des Autoradiogramms angegeben.

Abbildung 2.10 zeigt das Autoradiogramm der Titration von mCF3 im Vergleich zu mCF4 (Experiment durchgeführt von F. Kluge mit Proteinpräparationen von M. Schmidt). Beide Komplexe waren in der Lage, die SV40/late Substrat-RNA zu spalten. Während für mCF3 die Reaktion bei 125 fmol bereits in Sättigung war (23-27%), wurde diese für mCF4 erst bei 500 fmol erreicht (14%). Bei der höchsten Menge gleicht sich die Spaltaktivität an, dennoch besitzt mCF3 eine höhere Spaltaktivität als mCF4 (vgl. Spuren 4-6 und 13-15). Mutationen von CPSF3 im aktiven Zentrum (D75K, H76A; Mandel et al., 2006) führten im Kontext beider Komplexe zum Verlust der Spaltaktivität. Neben der CPSF3-Mutante diente die Δ -RNA in dieser Reaktion als weitere Negativkontrolle, ebenso die Reaktion ohne mCF. In beiden Fällen konnte das Substrat nicht gespalten werden. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass mCF3 in einer CPSF3-abhängigen Reaktion die RNA spaltet und dementsprechend CstF64 für die Aktivität von mCF nicht essentiell ist. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass CstF64 Bestandteil des Spaltkomplexes sein kann, ähnlich dem Spaltkomplex für Histon-mRNAs (Sun

et al., 2020). Auch bei der Histon-mRNA-Spaltung ist die Gegenwart von CstF64 im Spaltmodul nicht notwendig.

2.1.7 Beide CstF64-Paraloge sind spaltaktiv und alle CstF-Untereinheiten sind wichtig für die RNA-Spaltung

Mit Hilfe der rekonstituierten Spaltungsreaktion wurde im Folgenden CstF, ein Komplex aus jeweils zwei Kopien der Untereinheiten CstF77, CstF64 und CstF50, untersucht. Mit CstF64 τ besitzt der Komplex ein Paralog zur CstF64 Untereinheit, das vor allem in Gehirn und Hoden exprimiert wird (siehe **Einleitung 1.3.2**). Mit Pti1 gibt es in der Bäckerhefe ein Protein des APT-Komplexes, das sowohl zu CstF64 als auch CstF64 τ Sequenzähnlichkeit besitzt. Dies führte zur Überlegung, dass CstF64 τ für die Spaltungsreaktion benötigt werden könnte. Mittlerweile wird dem APT-Komplex/Phosphatase-Modul jedoch eine Beteiligung an der Prozessierung von sn/snoRNAs zugeschrieben (Lidschreiber et al., 2018; Nedea et al., 2003; Skaar & Greenleaf, 2002). Zum Überprüfen dieser Möglichkeit wurden verschiedene Varianten von CstF hergestellt, die sich in den CstF64-Paralogen unterschieden. Anders als für CstF77 und CstF64 gibt es für CstF50 kein orthologes Protein in der Bäckerhefe. Um die Funktion dieses Proteins zu untersuchen, wurden CstF-Varianten hergestellt, denen die CstF50-Untereinheit fehlte. Schließlich wurden CstF64 und CstF50 als isolierte Proteine präpariert. Für CstF77 erwies sich dies leider als nicht möglich.

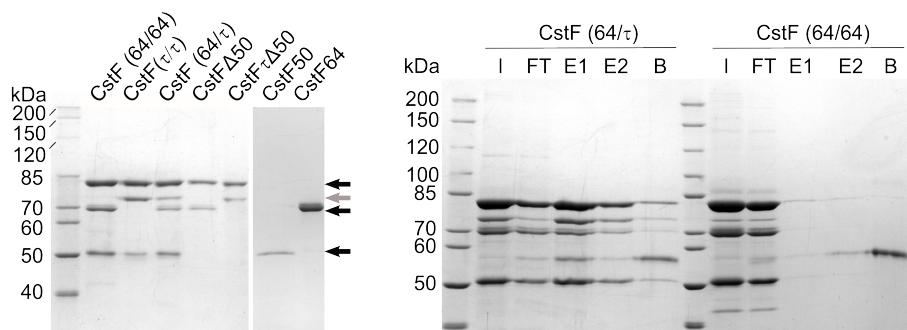
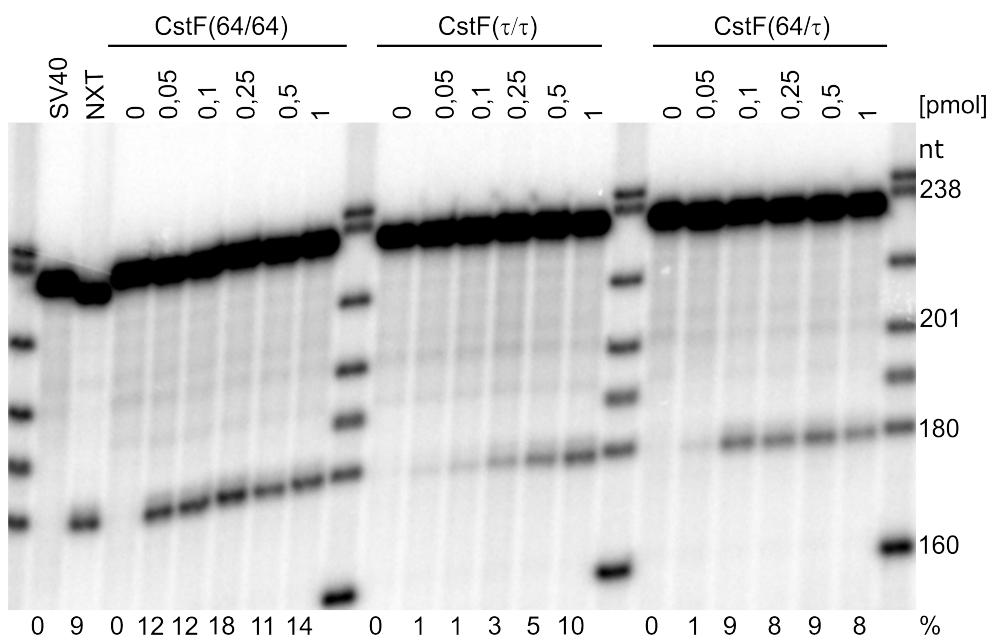
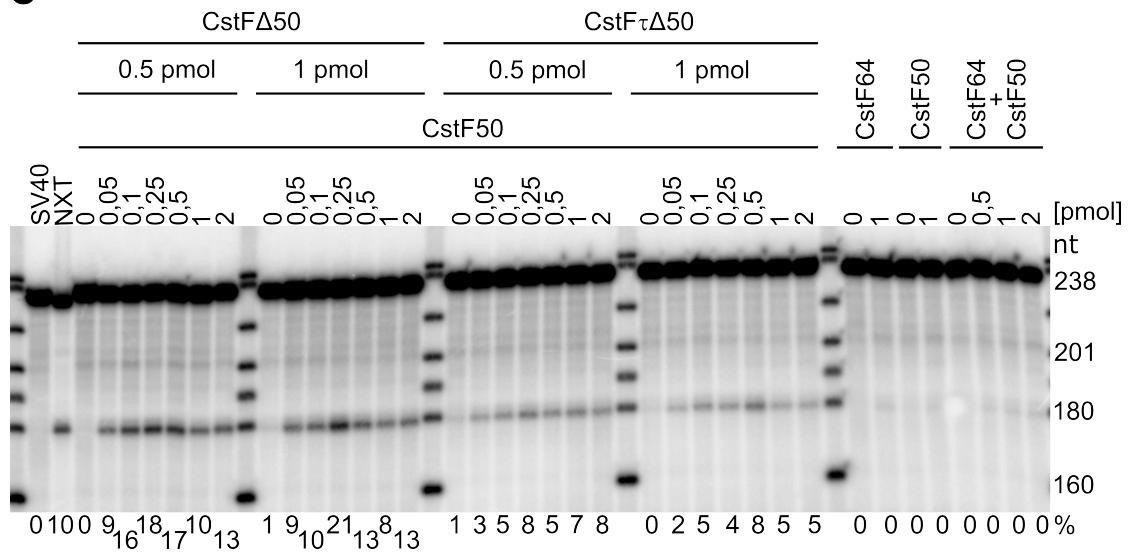
A**B****C**

Abbildung 2.11: CstF64 und CstF64 τ sind aktiv in der 3'-Prozessierung

(A) Links: Coomassie gefärbte SDS-PAGE mit verschiedenen CstF-Präparationen mit unterschiedlicher Zusammensetzung der Untereinheiten. Die kanonischen Untereinheiten sind mit einem schwarzen und CstF64 τ mit einem grauen Pfeil gekennzeichnet. Zahlen bzw. Symbole in den Klammern zeigen die Zusammensetzung des CstF64 Dimers. Die Molekulargewichte der Markerbanden sind links vom Gel angegeben. Rechts: Coomassie gefärbte SDS-PAGE einer Flag-Immunpräzipitation von kanonischem CstF und einer CstF-Präparation mit einer gemischten CstF64 -Zusammensetzung. CstF64 τ besitzt einen N-terminalen Flag-tag. Analysiert wurden Inputs (I), Durchflüsse (FT), zwei Elutionsfraktionen (E1/E2) und mit SDS-Ladepuffer versetzte Säulenmaterialien (B). Das Molekulargewicht der Markerproteine ist links vom Gel angegeben. **(B)** Titration der CstF-Komplexe im Spaltassay. Als Positivkontrolle der Reaktion wurde HeLa-Kernextrakt (NXT) benutzt. Die Größen der Markerbanden sind rechts aufgeführt. Die Quantifizierung der Spaltaktivität ist unterhalb des Autoradiogramms angegeben. **(C)** Titration der isolierten CstF50-Untereinheit zu einem Komplex aus CstF77 und CstF64 sowie Tests von CstF64 und CstF50. Als Positivkontrolle der Reaktion wurde HeLa-Kernextrakt (NXT) benutzt. Die Größen der Markerbanden sind rechts aufgeführt. Die Quantifizierung der Spaltaktivität ist unterhalb des Autoradiogramms angegeben.

In **Abbildung 2.11A** sind links die unterschiedlichen CstF-Komplexe in einem Coomassie-gefärbten SDS-PAGE dargestellt. Neben dem kanonischen CstF (64/64) mit zwei CstF64-Kopien sind CstF (τ/τ) mit zwei CstF64 τ -Kopien und ein gemischter Komplex (CstF (64/ τ) mit jeweils einer Kopie beider CstF64-Varianten gezeigt. Dazu kommen CstF Δ 50-Komplexe mit jeweils einer der beiden CstF64-Varianten sowie CstF50 und CstF64 als eigenständige Proteine. Die kanonischen Untereinheiten sind mit einem schwarzen Pfeil und CstF64 τ mit einem grauen Pfeil gekennzeichnet.

Das in den Komplexen enthaltene CstF64 τ enthielt einen N-terminalen Flag-tag. Um die Existenz des gemischten Komplexes nachzuweisen, wurde daher eine Flag-Immunpräzipitation durchgeführt. Als Kontrolle wurde die Immunpräzipitation mit kanonischem CstF ohne Flag-tag parallel ausgeführt. Die Analyse der ko-präzipitierter Untereinheiten ist in **Abb. 2.11.A** rechts zu sehen. Im Durchfluss (FT) des „gemischten“ Komplexes ist ein Anteil des Komplexes ohne die τ -Untereinheit zu sehen, der nicht an das Säulenmaterial bindet. Im Eluat sind dagegen alle vier Untereinheiten vorhanden, sodass ein gemischter Komplex vorliegen muss. Eine unspezifische Bindung des CstF64 kann ausgeschlossen werden, da der kanonische Komplex nicht an das Anti-Flag-Matrix bindet. Damit ist ein gemischter CstF-Komplex nachgewiesen. Die Identität der schwachen Bande mit derselben Mobilität wie CstF64 τ , die in dem kanonischen Komplex zu sehen ist, ist unbekannt. Im Western Blot konnte eine Identität mit CstF64 τ ausgeschlossen werden (siehe Anhang **Abbildung 9.7**).

Die Analyse der drei CstF-Komplexe in der Spaltungsreaktion ist in **Abbildung 2.11B** abgebildet. Dabei wurden alle drei Komplexe in Spaltungsreaktionen titriert. Jeder der drei Komplexe konnte den Proteinmix komplementieren und die RNA-Spaltung bewirken. Allerdings waren Unterschiede zwischen den Komplexen zu beobachten. CstF (64/64) führte

bereits bei einer zugegebenen Stoffmenge von 50 fmol zur Sättigung der Spaltung (12-18%), wohingegen bei CstF (τ/τ) auch 1000 fmol zu keiner Sättigung führten (maximal 14% Spaltung). 50 fmol CstF (τ/τ) führten nur zu einer sehr geringen Spaltaktivität (ca. 1%). Der gemischte Komplex zeigte ebenfalls mit 50 fmol minimale Spaltaktivität (ca. 1%) und erreichte bei ca. 100 fmol mit 9% Spaltung die Sättigung. Im Vergleich mit dem WT war die Menge an gebildetem 5'-Spaltprodukt deutlich reduziert. Aus dem Experiment lässt sich schließen, dass CstF-Komplexe, welche die τ -Variante von CstF64 enthalten, RNA spaltaktiv sind, jedoch deutlich weniger als die kanonischen Komplexe. Die Abhängigkeit der Spaltreaktion von der Art der 64k-Untereinheit lässt auch den allgemeineren Schluss zu, dass diese Untereinheit tatsächlich an der Reaktion beteiligt ist. Ob sie absolut essentiell ist, war experimentell nicht festzustellen, da ein CstF-Komplex ohne die 64k-Untereinheit nicht zur Verfügung stand.

Für die Untersuchung der verbleibenden CstF-Untereinheiten wurden die CstF Δ 50-Komplexe und die isolierten Untereinheiten CstF64 bzw. CstF50 verwendet. In **Abbildung 2.11C** ist ein Autoradiogramm einer CstF50-Titration zu sehen. Für die Titration wurde ein Proteinmix verwendet, der 0,5 oder 1 pmol CstF Δ 50 bzw. CstF $\tau\Delta$ 50 enthielt. In allen vier Titrationsreihen war zu beobachten, dass beide CstF-Komplexe ohne CstF50 nahezu inaktiv in der Spaltung der Substrat-RNA waren (maximal 1% Spaltung). Erst bei Zugabe von 50 fmol CstF50 wurde der Proteinmix aktiv. Für CstF Δ 50 war zwischen 50 und 100 fmol die Spaltung bereits in Sättigung (16-20%). Hingegen wurde mit dem τ -Komplex die Sättigung erst bei ca. 500 fmol erreicht. Wie bereits bei den vollständigen Komplexen war die Aktivität im Spaltassay mit 20 zu 8% deutlich geringer, wenn CstF64 τ anstatt CstF64 im Komplex vorlag. Die durch Zusatz von CstF50 rekonstituierten Komplexe hatten insgesamt eine ähnliche Aktivität wie die durch Ko-Expression erhaltenen, vollständigen Komplexe. Insgesamt führen die Experimente zu dem Schluss, dass CstF50 eine essentielle Untereinheit des Spaltkomplexes ist. Das bestätigt die Untersuchungen aus W. Yang et al., 2018, in denen vermutet wird, dass CstF50 für eine stabilere, mehr statische Form von CstF sorgt, welche u.a. das Binden der RNA erleichtert.

CstF64, CstF50 alleine oder die Mischung aus beiden waren nicht in der Lage, den Proteinmix zu komplementieren. Dies führte zu dem Schluss, dass CstF77 ebenfalls eine essentielle Rolle in der Spaltung von Vorläufer-mRNAs spielt. Eine Expression von CstF77 ohne andere Untereinheiten war jedoch nicht möglich, sodass eine Komplementation der Mischung von CstF50 und CstF64 nicht möglich war. Insofern fehlt zur Inaktivität dieser Mischung die positive Kontrolle.

2.1.8 Essentielle 3'-Prozessierungsfaktoren binden die SV40late-RNA mit hoher Affinität

Titrationen einzelner Faktoren in Gegenwart von 1000 fmol aller anderen Proteine und mit 50 fmol RNA zeigten bei ca. 100 fmol (entsprechend 5 nM) den optimalen Bereich für die meisten Proteine (siehe **Abbildung 2.12A**; siehe Anhang **Abbildung 9.4**). Wenn jedoch die in den einzelnen Titrationen ermittelten optimalen Mengen aller einzelnen Proteine (also typischerweise je 100 fmol) kombiniert wurden, konnten nur schwache Spaltaktivitäten beobachtet werden (pers. Mitteilung Florian Kluge). Wenn der kanonische Proteinmix insgesamt titriert wurde, wurde die beste Aktivität bei 500-1000 fmol pro Untereinheit/Protein (entsprechend 25 nM) ermittelt (siehe **Abbildung 2.12B**). Einzige Ausnahme davon war mPSF, für das 50 fmol optimal war (Daten nicht gezeigt). Außerdem wurde eine C-terminale RBBP6-Variante in der hohen Menge von 2500 fmol eingesetzt.

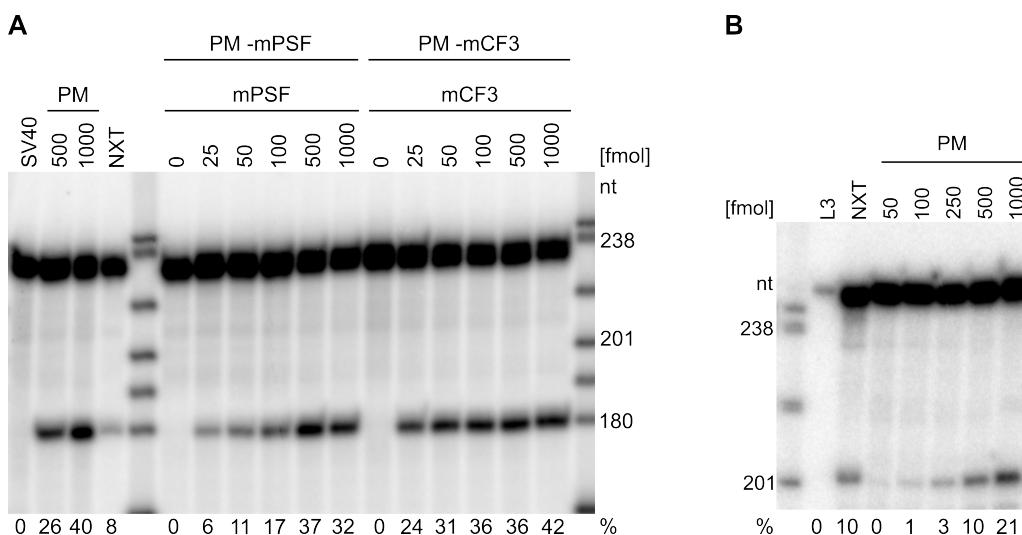


Abbildung 2.12: Einzelkomponenten- und Proteinmix Titration

(A) Spaltanalyse der Titration von mPSF und mCF auf SV40late RNA. Der Proteinmix ist konstant bei 1000 fmol und beinhaltet neben den kanonischen Komponenten 100 fmol CTD die Ni-NTA-Fraktion der ko-gereinigten RBBP6-Variante mit ThoCl (ca. 20 fmol) und 100 ng Kreatinkinase. Als Kontrollen wurden zwei verschiedene Mengen des vollständigen Proteinmixes (PM; 500 und 1000 fmol) sowie HeLa-Kernextrakt (NXT) verwendet. Die Größen der Markerbanden sind rechts aufgeführt. Die Spalteffizienz ist unterhalb des Autoradiogramms angegeben. Die Titration der weiteren kanonischen Komponenten ist dem Anhang **Abbildung 9.4** zu entnehmen. **(B)** Spaltanalyse eines titrierten Proteinmixes zwischen 50 und 1000 fmol auf L3 als Substrat-RNA. Der Proteinmix (PM) war identisch zu dem aus (A). Als Kontrolle wurde Hela-Kernextrakt (NXT) verwendet. Die Größen der Markerbanden sind links aufgeführt. Die Spalteffizienz ist unterhalb des Autoradiogramms angegeben.

In **Abbildung 2.12A** ist beispielhaft die Titration von mPSF bzw. mCF3 dargestellt, die einen Proteinmix (1000 fmol) komplementierten. Zusätzlich zu den kanonischen Komponenten enthielt der PM 100 fmol CTD, ca. 20 fmol der Ni-Eluat-Fraktion der ko-exprimierten Variante von RBBP6 mit ThoCl und 100 ng Kreatinkinase. Für mPSF ist zu sehen, dass bereits 25 fmol

ausreichend waren um den Proteinmix erfolgreich zu komplementieren und mit jeder weiteren Menge an mPSF die Aktivität gesteigert werden kann (spätere, aktivere mPSF-Präparationen zeigten bei äquimolarer Menge zur RNA (50 fmol) das Maximum der Spaltaktivität). Im Gegensatz dazu zeigt die mCF3 Titration, dass bei Mengen von 50 fmol fast die maximale Spalteffizienz erreicht wurde. Höhere Mengen an mCF3 sorgten dagegen nur für etwas höhere Spaltaktivität des Proteinmixes (ca. 10%). Wird nun der Proteinmix im Gesamten titriert (Stoffmengen an CTD und RBBP6 entsprechend dem Verhältnis angepasst) (siehe **Abbildung 2.12B**), ist die Aktivität zwischen 50 und 250 fmol mit lediglich bis zu 3% an gespaltener L3-Substrat-RNA deutlich geringer. Höhere Mengen an Proteinmix führten zu mehr Spaltung, die bei 1000 fmol am höchsten war (21%).

Ein möglicher Grund für die Notwendigkeit dieser hohen Proteinkonzentrationen bzw. Stoffmengen, für die meisten ein zehnfacher molarer Überschuss über die RNA, könnten niedrige Affinitäten für die Substrat-RNA sein.

RNA-Bindungsaktivitäten konnten bereits für einen Teil der 3'-Prozessierungsfaktoren beschrieben worden (siehe Einleitung). Dennoch sollte die Affinität der einzelnen Faktoren zur Substrat-RNA (*SV40late*) noch einmal systematisch unter Reaktionsbedingungen verglichen werden. Dieses geschah mit Hilfe von Nitrozellulose-Filterbindungsexperimenten bei konstanter RNA-Konzentration (0,1 nM) und steigenden Proteinkonzentrationen. Für die Experimente wurden die Bedingungen der Spaltreaktion benutzt. Allerdings wurde aus praktischen Gründen (Viskosität; ggf. unspezifische Bindung) auf einen *crowder* verzichtet. Die Daten sind in **Abbildung 2.13** graphisch dargestellt. Diese wurden rechnerisch einer quadratischen Gleichung angepasst und die für die halbmaximale Bindung erforderliche Proteinkonzentration (K_{50}) wurde ermittelt.

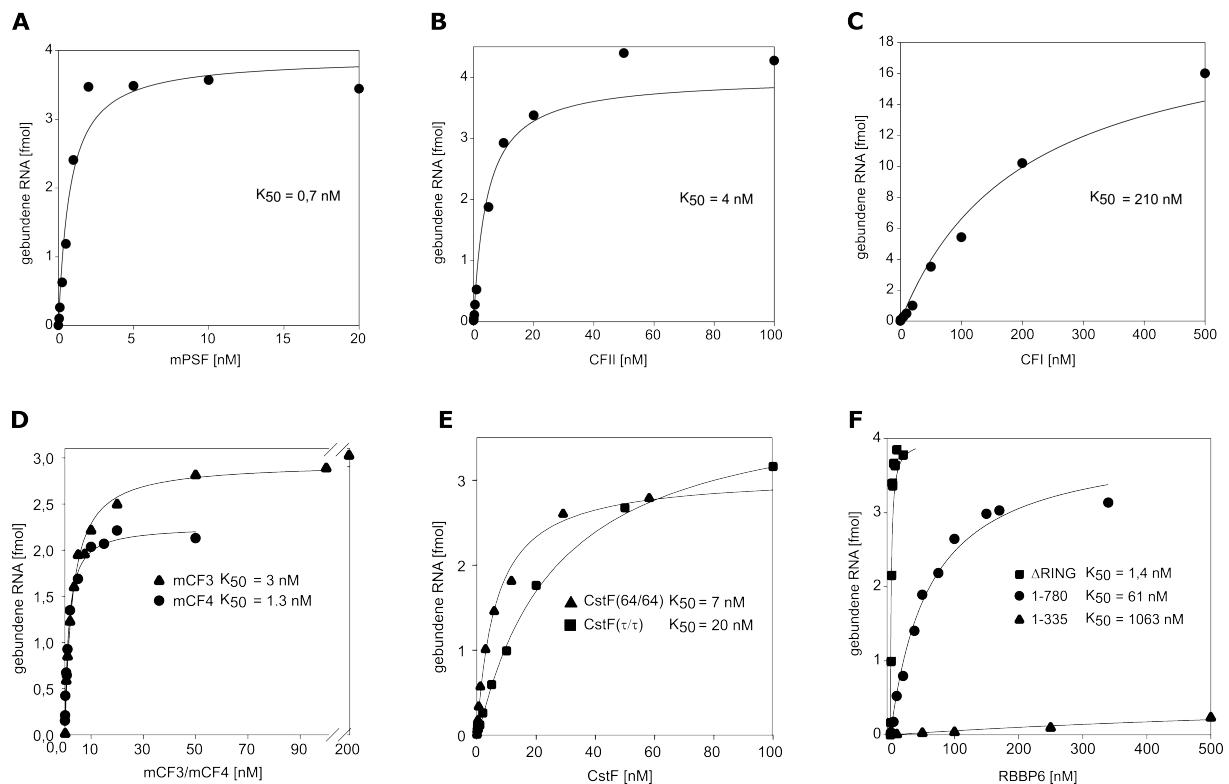


Abbildung 2.13: Essentielle 3'-Prozessierungsfaktoren binden Substrat-RNA mit hoher Affinität
 Titration von aufsteigenden Mengen der 3'-Prozessierungsfaktoren in Nitrozellulose-Filterbindungsexperimenten mit SV40/late als Substrat-RNA. Wenn nicht anders angegeben, wurde für die Substrat-RNA eine konstante Konzentration von 0,1 nM (4 fmol) eingesetzt und die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die ermittelten RNA-Bindungsaffinitäten wurden in den jeweiligen Graphen angegeben und summarisch in **Tabelle 2.1** zusammengefasst. **(A)** Filterbindungsperiment von mPSF. **(B)** Filterbindungsperiment von CF II. Die Messwerte der beiden höchsten Konzentrationen stammen aus einem einzelnen Experiment. **(C)** Filterbindungsperiment von CF I. Die Konzentration der RNA wurde für diese Titration auf 0,5 nM (20 fmol) erhöht. **(D)** Vergleich der Filterbindungsexperimente von mCF3 (▲) und mCF4 (■). Für mCF3 wurden drei und für mCF4 vier unabhängige Experimente durchgeführt. **(E)** Vergleich der Filterbindungsexperimente von CstF (64/64) (▲) mit zwei Kopien CstF64 und CstF (τ/τ) (■) mit zwei Kopien CstF64 τ . **(F)** Vergleich von drei verschiedenen RBBP6-Konstrukten in einem Filterbindungsperiment. Verwendet wurden die Konstrukte RBBP6₁₋₃₃₅ (▲), RBBP6₁₋₇₈₀ (●) und RBBP6_{ΔRING} (■).

Wie bereits in Schönemann et al., 2014 beschrieben, bindet mPSF im subnanomolaren Bereich RNA. In dieser Arbeit wurde eine K_{50} von 0,7 nM ermittelt, deutlich unterhalb der eingesetzten mPSF- und RNA-Konzentration im Spaltassay (**Abbildung 2.13A**). **Abbildung 2.13B** zeigt die RNA-Bindungskurve für CF II. Die ermittelte K_{50} lag bei 4 nM. Dagegen bindet CF I als nicht essentieller Faktor der Reaktion SV40/late mit deutlich geringerer Affinität. Die ermittelte K_{50} war bei ca. 210 nM (**Abbildung 2.13C**). (Aufgrund der niedrigen Affinität wurde in diesen Experimenten die RNA-Konzentration auf 0,5 nM erhöht). Dies ist interessant, da eine RNA-Bindungsaktivität von rekombinantem CF I an eine RNA bislang nur für SELEX-Konsensus-Sequenzen oder einem kurzen RNA-Oligonukleotid mit UGUA-Bindungsmotiven beschrieben wurde (Brown & Gilmartin, 2003; Q. Yang et al., 2010). Lediglich mit einem CF I gereinigt

aus HeLa-Kernextrakt konnte RNA-Bindung auf u.a. L3-RNA via UV-*crosslink*-Experimenten und nativer Gelelektrophorese (EMSA) qualitativ nachgewiesen werden (Rüegsegger et al., 1996).

SV40*late* besitzt lediglich ein CF I-Bindungsmotiv (UGUA), wohingegen die L3-RNA insgesamt drei Bindungsmotive, zwei oberhalb des Polyadenylierungssignals (PAS) sowie eine zwischen dem PAS und der Spaltstelle enthält. In Anhang **Abbildung 9.5** ist eine Titration von CF I mit dem RNA-Substrat dargestellt. Zusätzlich wurden die CF I Bindungsmotive in L3 durch eine G-C Substitution zu UcUA mutiert, sowohl die beiden vor der Polyadenylierungsstelle, als auch alle drei. Vergleicht man die Titrationen zwischen SV40*late* und L3, beobachtet man eine deutlich geringere Aktivität mit L3. Die Titrationen mit den mutierten RNAs zeigen darüber hinaus eine deutliche Reduktion der Spaltung im Vergleich zur ursprünglichen L3-RNA, wodurch erneut CF I keine essentielle, aber stimulierende Funktion zuzuschreiben ist. Die Mutationen der UGUA-Bindungssequenz besitzen auch keinen signifikanten Effekt auf die Spalteffizienz, wenn kein CF I in der Reaktion enthalten ist (Dissertation Florian Kluge 2017).

In Filterbindungsexperimenten mit einer L3pre_V2 RNA (vorgespaltenes RNA-Substrat für Polyadenylierungsexperimente; siehe **Materialien 5.6.4**) sowie entsprechenden RNAs, in denen die zwei bzw. drei CF I-Bindungsmotive mutiert waren, wurde ebenfalls apparente Affinitäten bestimmt. Die K_{50} für die L3pre_V2-RNA lag bei 200 nM und war damit sehr ähnlich zu dem mit SV40*late* als Substrat (vgl. **Abbildung 2.13C**). Waren die ersten beiden Bindungsmotive oberhalb der PAS mutiert, war die Affinität auf 800 nM reduziert worden (Anhang **Abbildung 9.6**). Wurden alle drei Bindungsmotive mutiert, ergab sich eine K_{50} von 900 nM. Dies ist im Einklang mit den Experimenten aus Anhang **Abbildung 9.5**, die zeigen, dass CF I nur die Spaltung der WT-RNA, nicht aber die der Mutanten stimuliert.

Für die Bestimmung der RNA-Bindungsaktivität von mCF wurden Messungen sowohl für den Komplex mit drei als auch für den Komplex mit vier Untereinheiten vollzogen. Der Vergleich der beiden Bindungskurven ist in **Abbildung 2.13D** zu sehen. Wie bereits in **Abbildung 2.1** zu beobachten war, bindet mCF3 RNA. In der Titration wurde eine K_{50} von 3 nM ermittelt. Die apparente Affinität von mCF4 war nur unwesentlich höher mit einer K_{50} von 1,3 nM. Beide mCFs binden also die Substrat-RNA mit hoher Affinität. Dass die Affinität von mCF4 gegenüber mCF3 höher ist, ist nicht verwunderlich, da mit CstF64 die RNA-bindende Untereinheit von CstF im Komplex vorhanden ist, auch wenn CstF64 alleine eine schwache Affinität im μ M-Bereich aufweist (Masterarbeit M. Schmidt, 2018).

Nachdem bereits in Spaltexperimenten ein Unterschied zwischen CstF (64/64) und CstF (τ/τ) festgestellt wurde, sieht man diesen auch bei der RNA-Bindung (**Abbildung 2.13E**): Für CstF (64/64) wurde eine K_{50} von 7 nM und für CstF (τ/τ) eine K_{50} von 20 nM gemessen. Möglicherweise ist die in **Abbildung 2.13** dokumentierte geringere Spaltaktivität von CstF τ auf die schwächere RNA-Bindung zurückzuführen.

Für das humane RBBP6 ist in der Literatur bislang keine RNA-Bindungsaktivität beschrieben worden. Jedoch erfolgte diese für das Mpe1 aus der Hefe, bei welchem der *zinc knuckle* und die RING-Domäne essentiell sind (S. D. Lee & Moore, 2014). Erste Experimente mit RBBP6₁₋₃₄₀ zeigten eine schwache Bindung von SV40-RNA (Daten nicht gezeigt). Eine stärkere Bindung konnte erst mit einer längeren Variante (1-780) gemessen werden. Die in **Abbildung 2.13F** dargestellte RNA-Bindungskurve zeigt für RBBP6₁₋₇₈₀ eine K_{50} von 61 nM und somit verglichen mit anderen 3'-Prozessierungsfaktoren eine schwächere RNA-Bindung. Im Vergleich hatte eine kürzere RBBP6-Variante (1-335; Präparation von Felix Sandmeir; Max-Planck-Institut für Biochemie Martinsried; AG Elena Conti) eine geringere Affinität mit einer K_{50} von 1063 nM. Diese K_{50} wurde durch zwei RBBP6₁₋₃₃₅-Punktmutanten (R73D R74D (RR-DD); K38D K40D R74D (KKR-DDD); Aminosäure Mutationen mit umgekehrter Ladung im CPSF3 Bindungsmotiv von RBBP6; Schmidt et al., 2022) bestätigt (Daten nicht gezeigt). Die längere RBBP6-Variante RBBP6_{ΔRING} hatte dagegen eine deutlich höhere Affinität mit einer K_{50} von 1,4 nM. Aus diesem Grund lässt sich sagen, dass eine C-terminale RBBP6-Deletionsvariante mit lediglich den drei strukturierten Domänen am N-Terminus keine hohe RNA-Affinität besitzt. Dementsprechend ist der CCHC-*zinc knuckle* nicht alleine für die RNA-Bindung verantwortlich, genauso wenig wie die RING-Domäne. C-terminale Sequenzen tragen deutlich zur Affinität bei. Vermutlich liegt der Anstieg der Affinität an dem hohen Anteil der basischen Aminosäure im C-terminalen Bereich. Damit zeigen die RNA-Bindungsdaten von RBBP6 ein ähnliches Bild, was in den Spaltexperimenten zu sehen war. Auch dort hat der C-terminale, intrinsisch ungeordnete Bereich dafür gesorgt, dass bereits bei deutlich geringeren Konzentrationen RNA gespalten wurde als bei RBBP6-Varianten, die nicht oder nahezu nicht dem *full-length* Protein entsprachen (siehe **Abbildung 2.7C**).

Zusammengefasst besitzen fast alle 3'-Prozessierungsfaktoren hohe Affinitäten zur Substrat-RNA SV40late (siehe **Tabelle 2.1**). Dementsprechend sind die für den Rekonstitutionsassay benötigten hohen Proteinkonzentrationen nicht auf eine schlechte RNA-Bindung zurückzuführen. Lediglich CF I besitzt eine schlechte RNA-Affinität, ist aber kein essentieller Teil der Reaktion. Zudem sind Protein-Protein-Interaktionen bei der Bildung des Prozessierungs-

komplexes zu erwarten. Diese sollten zu einer kooperativen Bindung der RNA und zu einer erhöhten RNA-Affinität des Komplexes im Vergleich mit den isolierten Faktoren führen (Rüegsegger et al., 1996).

Tabelle 2.1: Zusammenfassung der apparenten K_{50} -Werte der 3'-Prozesierungsfaktoren aus Filterbindungsexperimenten

Protein/Komplex	K_{50} [nM]
mPSF	0,7
CF II	4
CF I	210
mCF3	3
mCF4	1,3
CstF (64/64)	7
CstF (τ/τ)	20
RBBP6 _{ΔRING}	1,4
RBBP6 ₁₋₇₈₀	61
RBBP6 ₁₋₃₃₅	1063

2.1.9 Weitere putative 3'-Prozessierungsfaktoren haben nur einen geringfügigen Einfluss auf die Spaltreaktion

Neben den kanonischen Prozessierungsfaktoren, die für die Rekonstitution der 3'-Spaltung benutzt wurden, gibt es eine Vielzahl putativer Prozessierungsfaktoren, die teilweise in dieser Arbeit, teilweise auch in vorangegangenen Arbeiten dieser Arbeitsgruppe kloniert sowie, exprimiert und gereinigt wurden. Diese Proteine sind in **Abbildung 2.14** auf einem Coomassie gefärbten SDS-Gel aufgetragen. Die Faktoren sind an Reaktionen mit unmittelbarem Bezug zur 3'-Prozessierung von Prä-mRNAs beteiligt, wie z. B. der Transkription (C-terminale Domäne (CTD) der RNA-Polymerase II, CDC73 (Parafibromin)) (Hirose & Manley, 1998; Rozenblatt-Rosen et al., 2009) dem Abbau des 3'-Spaltprodukts und der Transkriptions-Termination (XRN2) (Eaton et al., 2018; West et al., 2004) oder der Polyadenylierung (PABPN1) (Bienroth et al., 1993). Andere sind Homologe von Proteinen, die in der Bäckerhefe mit dem Spaltkomplex assoziiert sind (Phosphatasen Ssu72 und PP1) (Nedea et al., 2003; Schreieck et al., 2014). In der Hefe sind Ssu72 und PP1 (Glc7) Bestandteil des Phosphatase-Moduls. Mittlerweile konnte jedoch gezeigt werden, dass das Phosphatase-Modul nicht für die Rekonstitution der Spaltung von Prä-mRNAs benötigt wird. Auch Phänotypen von Mutanten aus *in vivo* Experimenten deuten darauf hin. Viel mehr scheinen sie vor allem an der Prozessierung von nicht-kodierenden snRNAs/snoRNAs beteiligt zu sein (Casañal et al., 2017; Dheur, 2003; Hill et al., 2019; Lidschreiber et al., 2018). Die oben genannten Proteine wurden

in einem Spaltassay zum kanonischen Proteinmix titriert **Abbildung 2.14B**. Die Anwesenheit des PP1 α -Komplexes von Ssu72 oder XRN2 hatten keinen sichtbaren Effekt auf die Spaltaktivität. Die höchsten Konzentrationen von PABPN1 und CDC73 führten lediglich zu einer geringen Inhibition der Reaktion. Aus diesem Grund kann gesagt werden, dass diese Faktoren *in vitro* keinen messbaren positiven Einfluss auf die rekonstituierte 3'-Prozessierung besitzen.

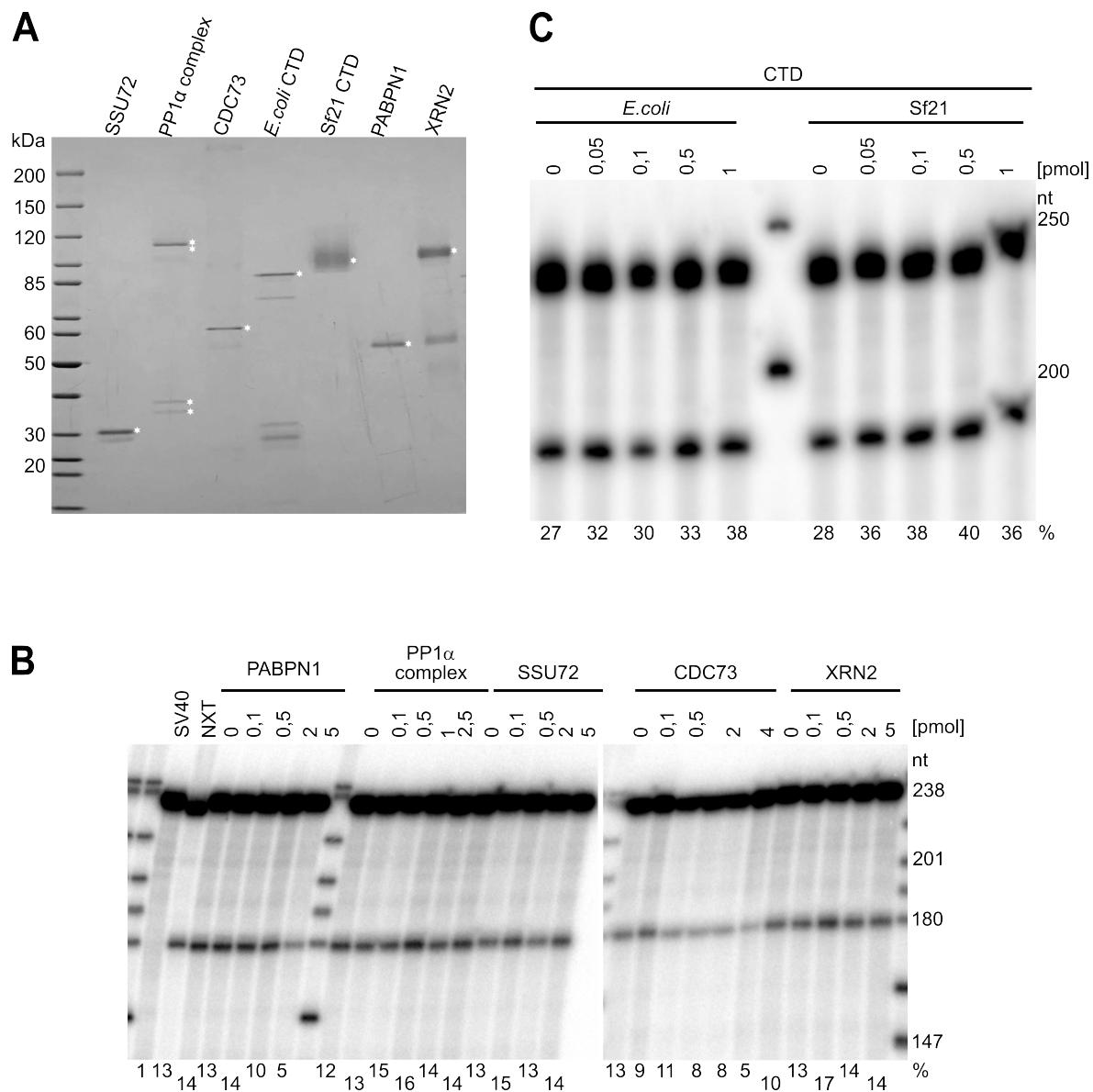


Abbildung 2.14: Putative 3'-Prozessierungsfaktoren stimulieren die Prä-mRNA-Spaltung nicht
(A) Putative 3'-Prozessierungsfaktoren Ssu72, PP1 α -Komplex, CDC73, CTD (aus *E. coli* und aus Sf21-Zellen), PABPN1 und XRN2 dargestellt in einer Coomassie gefärbten SDS-PAGE. Die Untereinheiten der Proteinkomplexe sind mit einem weißen Stern gekennzeichnet. Das Molekulargewicht der Markerbanden ist links vom Gel angegeben.

Fortsetzung auf der folgenden Seite.

(B) Titration der putativen 3'-Prozessierungsfaktoren in einer Prozessierungsreaktion. Die RNA wurde in einer 6%igen PA-Harnstoff-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiografie detektiert. Als Positivkontrolle wurde nukleärer Extrakt (NXT) aus HeLa-Zellen verwendet. Die Reaktionen wurden mit dem Standard-Proteinmix, jedoch mit 500 fmol mPSF und PVA als *crowding*-Reagenz durchgeführt. Die Größen der Markerbanden sind rechts aufgeführt. **(C)** Analyse der Spaltstimulation der CTD aus bakterieller und Insektenzell-Expression. Die Reaktionen wurden mit dem Standard-Proteinmix, jedoch mit 500 fmol mPSF und PVA als *crowding*-Reagenz durchgeführt. Die Größen der Markerbanden sind rechts aufgeführt.

Für **Abbildung 2.14C** wurde die in *E. coli* oder in Insektenzellen exprimierte CTD der RNA Polymerase II in einem Spaltassay titriert. Beide CTD-Präparationen besaßen lediglich einen geringen stimulatorischen Effekt (ca. 1,3-fach) auf die Reaktion. Ob es sich dabei um einen spezifischen Effekt handelt, ist fraglich. Die geringe Stimulation kann auch auf Schwankungen im Spaltassay zurückzuführen sein. Eine zuvor publizierte Notwendigkeit der CTD für die 3'-Prä-mRNA-Spaltung konnte somit nicht bestätigt werden (Hirose & Manley, 1998). Das in *E. coli* synthetisierte Protein besaß wahrscheinlich keine Proteinmodifikationen, wohingegen das in Sf21-Zellen synthetisierte Protein vermutlich phosphoryliert war. Hierfür sprach die langsame und heterogene Wanderung im SDS-Gel (**Abbildung 2.14A**). Der genaue Phosphorylierungsstatus des CTD aus Sf21-Zellen war zunächst nicht bekannt. Dieser besaß jedoch offenbar keinen Einfluss auf die Spaltungsreaktion, da sich die CTD-Präparationen aus *E. coli* und Sf21-Zellen ähnlich verhielten. Das ist durchaus erstaunlich, da die CTD als ein zentraler Faktor für die Reifung von mRNAs angesehen werden kann. Sie koppelt die Transkription, die *capping*-Reaktion des 5'- und die Prozessierung des 3'-Endes miteinander. Über Phosphorylierungen bzw. Dephosphorylierungen, vor allem der Serine-2 und 5, kommt es zur Rekrutierung wichtiger Transkriptions- und Prozessierungsfaktoren während der Transkriptions-Initiation, -Elongation und -Termination. Auch der Phosphorylierungsstatus des Tyrosin-1, Threonin-4 und Serin-7 spielt eine Rolle innerhalb der Transkription (Rodríguez-Molina et al., 2023). Der Status der Phosphorylierung der CTD wurde im Folgenden weiter untersucht (siehe **Abbildung 2.15**).

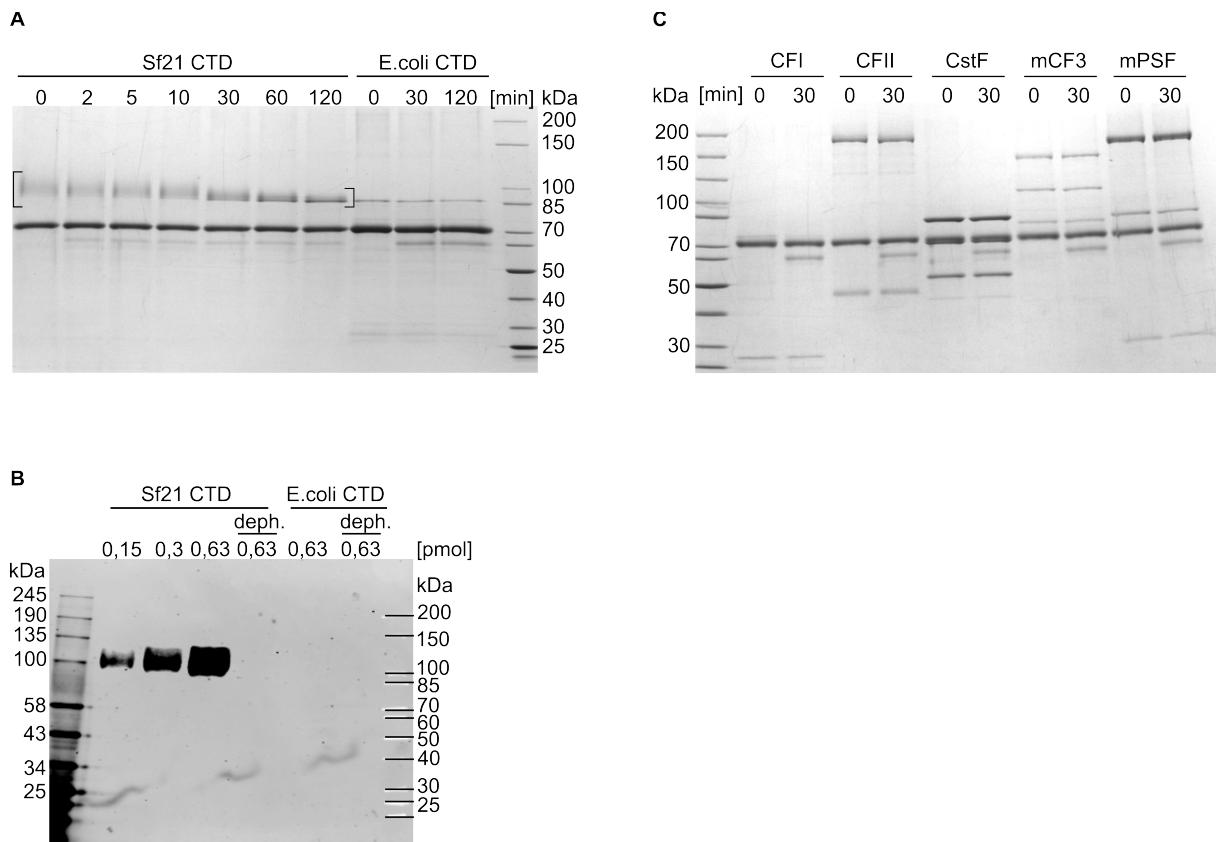


Abbildung 2.15: In Sf21-Zellen produzierte CTD besitzt Phosphorylierungen

(A) Coomassie gefärbte SDS-PAGE einer Dephosphorylierungskinetik von zwei CTD-Präparationen aus einem pro- und einem eukaryotischen Expressionssystems. Die CTD aus Sf21-Zellen ist mit Klammern markiert. Die prominente Bande bei ca. 70 kDa entspricht BSA aus dem Cutsmart-Puffer und Quick-CIP besitzt ein Molekulargewicht von ca. 60 kDa. Das Molekulargewicht der Markerbanden ist rechts vom Gel angegeben. **(B)** Western Blot Analyse des Phosphorylierungsstatus der CTD. Für Sf21 CTD wurden unterschiedliche Mengen geladen. Für die dephosphorylierte (deph.) sowie für die (nicht-phosphorylierte) bakterielle Variante wurden die größten Proteinmengen verwendet (0,63 pmol). Der primäre Antikörper war gegen eine Ser2-Phosphorylierung der CTD gerichtet (Chapman et al., 2007). Die Molekulargewichte der Markerbanden sind rechts und links vom SDS-Gel angegeben. **(C)** Behandlung der relevanten 3'-Prozessierungsfaktoren durch Quick-CIP. Die Reaktionen wurden nach 30 Minuten gestoppt. BSA aus dem Cutsmart Puffer ist bei ca. 70 und Quick-CIP bei ca. 60 kDa zu sehen. Das Molekulargewicht der Markerbanden ist links vom Gel angegeben.

Abbildung 2.15A zeigt das Coomassie-gefärbte SDS-PAGE einer Dephosphorylierungskinetik der CTDs durch Inkubation mit einer kommerziellen Phosphatasepräparation (Quick-CIP, NEB). Das in Sf21-Zellen synthetisierte Protein migrierte als diffuse Bande bei ca. 100 kDa. Mit fortlaufender Inkubation reduzierte sich die diffuse Bande zu einer einzigen distinkten Bande bei ca. 85 kDa entsprechend der Wanderung des in *E. coli* exprimierten Proteins. Als Kontrolle wurde das Experiment parallel mit dem bakteriellen Protein durchgeführt. Hierbei veränderte sich die Bande bei 85 kDa nicht, da das Protein bereits zu Beginn der Kinetik nicht modifiziert vorlag. Man kann dem Experiment entnehmen, dass die Dephosphorylierung des Sf21-Proteins annähernd vollständig war. Die in allen Reaktionen vorhandene Bande bei ca. 70 kDa entsprach BSA aus dem verwendeten Puffer (NEB). Das Enzym CIP besitzt ein

apparentes Molekulargewicht von ca. 60 kDa und ist unterhalb von BSA zu sehen. Zum eindeutigen Nachweis wurde zusätzlich eine Western Blot-Analyse mit einem Antikörper gegen die CTD mit phosphoryliertem Serin-2 (Chapman et al., 2007) durchgeführt (**B**). Der Antikörper markierte in der ursprünglichen Präparation der aus Sf21-Zellen eine breite, heterogene Bande entsprechend der, die auch in der Coomassie-Färbung zu sehen war. Die Antikörper-Reaktivität verschwand mit der Phosphatasebehandlung. Die als Kontrolle verwendete Präparation der CTD aus *E. coli* reagierte auch ohne Phosphatasebehandlung nicht mit dem Antikörper.

Das Ergebnis bestätigt, dass die CTD-Präparation aus Sf21-Zellen u. a. aber vermutlich nicht nur an Serin-2 phosphoryliert ist. Dies ist von besonderer Bedeutung, da die gängigen Modelle besagen, dass die Wechselwirkung des 3'-Prozessierungskomplexes mit der CTD durch die Phosphorylierung von Ser-2 begünstigt wird (Barillà et al., 2001; Noble et al., 2005; Z. Zhang et al., 2005). Außerdem sorgt der Phosphorylierungsstatus der CTD für Rekrutierung von 3'-Prozessierungsfaktoren zur Transkription (Ahn et al., 2004).

Die kanonischen Prozessierungsfaktoren aus Insektenzellen wurden ebenfalls einer Phosphatase-Behandlung unterzogen und auf einem SDS-Gel analysiert (siehe **Methoden 6.10**). Nach 30 minütiger Inkubation war jedoch in der Wanderungsgeschwindigkeit kein Unterschied zum unbehandelten Aliquot zu erkennen. Zumindest nach diesem relativ groben Kriterium sind diese Faktoren also nicht phosphoryliert. Eine Phosphorylierung der 3'-Prozessierungsfaktoren scheint dementsprechend für die Prä-mRNA-Spaltung nicht nötig zu sein.

2.1.10 Vergleich zwischen viralen und nicht viralen RNA-Substraten

In den vorausgegangenen Abschnitten wurde die Rekonstitution der 3'-Prozessierung mit rekombinanten Proteinen auf 3'-UTRs viraler RNAs mit starken Polyadenylierungssignalen (SV40late und L3) beschrieben. Danach wurde die rekonstituierte Spaltung mit nicht-viralen RNA-Substraten untersucht. Diese Substrat-RNAs besitzen möglicherweise weniger starke Poly(A)-Signale. Daraus ergab sich die Frage, ob die Rekonstitution der Spaltungsreaktion mit dem Proteinmix auch auf solchen RNAs möglich ist. Eines dieser Substrate war die 3'-UTR der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase- (GAPDH-) mRNA.

In verschiedenen Experimenten mit der 3'-UTR von GAPDH als Substrat konnte keine Spaltung in der rekonstituierten Reaktion beobachtet werden. Bei einer Inkubation mit Kernextrakt von HeLa-Zellen (Ipracell) wurde die RNA dagegen gespalten. In ersten

Versuchen ließen sich bei der chromatographischen Trennung der Kernextrakte (Dissertation Florian Kluge, 2023) Fraktionen identifizieren, die für sich keine Spaltaktivität besaßen, aber in Kombination mit dem Proteinmix die Spaltung der GAPDH-RNA herbeiführten (Daten nicht gezeigt). Daraus lässt sich schließen, dass der Standardproteinmix für die Spaltung von GAPDH-RNA unvollständig ist, weil mindestens ein Faktor gar nicht oder in nicht ausreichender Menge oder in der notwendigen spezifischen Modifikation vorliegt. Dies kann durch die Zugabe des Extraktes bzw. der Säulenfraktionen komplementiert werden.

Leider konnte Ipracell für weitere Versuche, den komplementierenden Faktor durch chromatographische Reinigung zu isolieren, zu diesem Zeitpunkt nicht ausreichend NXT liefern. Dies führte zu dem Versuch, vorhandene ältere Kernextrakte auf GAPDH-Spaltaktivität bzw. Komplementation des Proteinmixes zu prüfen. Mit einem alten Extrakt der AG Keller (NXT Keller, Basel; Präparation am 4.5.2001) wurde eine Spaltung des GAPDH-Substrates erzielt, wenn der Proteinmix vorhanden war. Ohne komplementierenden PM war der Extrakt dagegen nicht aktiv (**Abbildung 2.16**). Dies bestätigt die Existenz eines Faktors, der im Proteinmix fehlt und für die Spaltung der GAPDH-, nicht aber für die Spaltung der SV40late-RNA nötig ist. Versuche, diesen komplementierenden Faktor zu reinigen, schlugen leider fehl, da nach Ammoniumsulfat-Fällung und Größenausschlusschromatographie (Superose6) verschiedene weitere Reinigungsschritte zu einem vollständigen Verlust der komplementierenden Aktivität führten (Daten nicht gezeigt).

Daher wurden chimäre RNAs aus SV40- und GAPDH-Sequenzelementen benutzt, in der Hoffnung, RNA-Sequenzen zu identifizieren, die für die Abhängigkeit der Spaltung von dem komplementierenden Faktor verantwortlich waren. Dabei wurde jeweils der 5'-Bereich des einen Substrates, *upstream* der Spaltstelle, verwendet und mit dem 3'-Bereich (*downstream*-Fragment) der anderen RNA verknüpft und umgekehrt. Dadurch wurden neue Substrate (SV40-GAPDH; GAPDH-SV40) erhalten und in Rekonstitutionsversuchen mit den Wildtypen von SV40 und GAPDH verglichen. Zusätzlich wurden weitere humane RNAs mit HMOX-1 (Häm-Oxygenase 1) und BIK (BCL2 *interacting killer*) eingesetzt (Laishram & Anderson, 2010; W. Li et al., 2012); siehe **Materialien 5.6.4**). Beides sind Substrate für die nicht kanonische Nukleotidyl-Transferase TUT-1 (auch als Star-PAP (*speckle targeted PIPK1α regulated poly(A)-polymerase*) bekannt) (Laishram & Anderson, 2010; W. Li et al., 2012). TUT-1 besitzt Wechselwirkungen mit der 3'-Prozessierungsmaschinerie über Interaktionen mit CPSF1 und CPSF3 (Laishram & Anderson, 2010), wodurch ein näherer Bezug besteht. Das Experiment ist in **Abbildung 2.16** dargestellt.

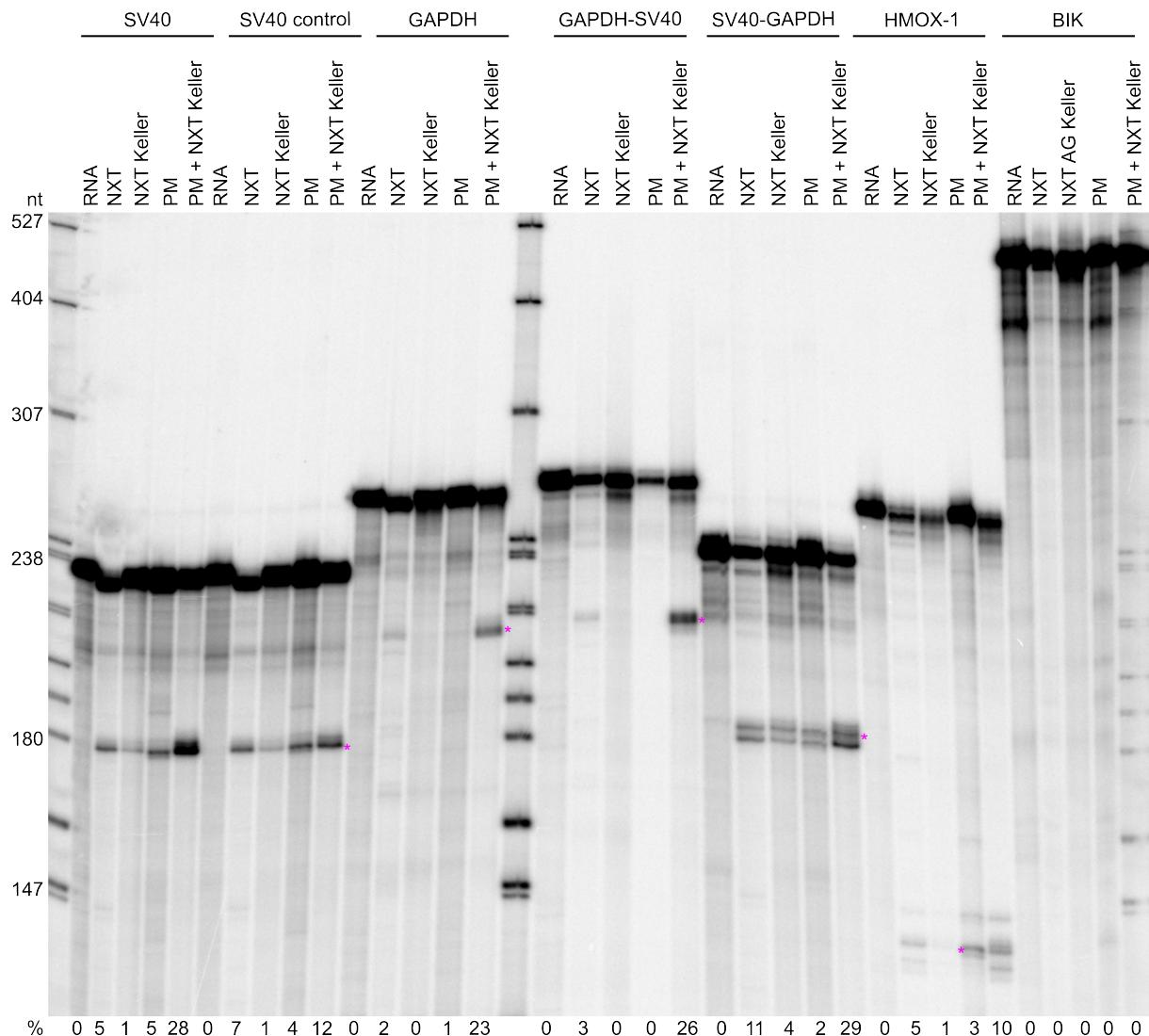


Abbildung 2.16: Proteinmix spaltet die HMOX-1-Prä-mRNA, aber nicht andere zelluläre mRNA-Vorläufer

Analyse der Spaltaktivität des Standard-Proteinmixes (PM) auf verschiedenen Substrat-RNAs. Die RNAs wurden auf einem 5%igen PA-Harnstoff-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert. Neben der viralen SV40/late RNA wurde eine SV40/late Kontrolle (s. Haupttext), GAPDH-3'-UTR, zwei chimäre RNAs aus SV40 und GAPDH, HMOX1 und BIK als Substrate verwendet. Als Kontrollen wurde ein kommerzieller HeLa-Kernextrakt (NXT; Ipracell) und ein weiterer NXT (NXT Keller; Präparation 4.5.01) von der AG Keller (Basel) verwendet. Zusätzlich wurde in der jeweils letzten Spur der verschiedenen Substrat-RNAs eine Komplementation aus PM und dem NXT Keller verwendet. Die 5'-Spaltprodukte sind mit einem Stern gekennzeichnet. In diesem Experiment wurde PVA als *crowding*-Reagenz verwendet. Die Größen der Markerbanden sind rechts aufgeführt.

Das Autoradiogramm zeigt die Spaltung von sieben unterschiedlichen Substrat-RNAs, die mit zwei unterschiedlichen Extrakten, Proteinmix oder einer Mischung aus Proteinmix und dem Keller Extrakt in einem Spaltassay eingesetzt wurden. Die SV40 control-RNA besitzt am 5'-Ende zwei Basenaustausche, die für die Klonierung der chimeren SV40-GAPDH eingeführt werden mussten. Das Experiment in **Abbildung 2.16** wurde mit PVA als *crowding*-Reagenz durchgeführt. Im Anhang **Abbildung 9.8** befindet sich das Autoradiogramm des gleichen

Experimentes mit TMAO im Spaltpuffer. Die Ergebnisse der beiden Experimente unterschieden sich nur geringfügig, allerdings war in Anwesenheit von PVA eine stärkere Spaltaktivität für Reaktionen mit NXT zu beobachten.

SV40*late* wurde mit kommerziellem NXT (Ipracell) mit 5% effizienter gespalten als mit dem nicht kommerziellen Extrakt der AG Keller (ca. 1%). Der Proteinmix spaltete das Substrat mit der gleichen Effizienz wie der kommerzielle Extrakt. Wurde der Proteinmix mit dem AG Keller Extrakt kombiniert, steigerte sich die Aktivität auf 28% erheblich (siehe Spaltprodukte bei ca. 180 Nukleotiden). Die Aktivitäten auf der SV40 *control*-RNA unterschieden sich nur kaum von der der WT-RNA, lediglich die Komplementation von Proteinmix durch den nicht kommerziellen Extrakt fiel mit 12% Spaltung schwächer aus.

GAPDH dagegen wurde nur schlecht vom kommerziellen Extrakt gespalten (2%). Wie bereits oben beschrieben, fand mit dem Extrakt der AG Keller oder dem Proteinmix gar keine Reaktion statt. Erst mit der Mischung des NXTs mit dem Proteinmix wurde eine deutliche Bande für das 5'-Spaltprodukt detektiert (23%). Eine nahezu identische Komplementation wurde mit chimären RNA mit dem 5'-Bereich aus GAPDH und dem 3'-Bereich aus SV40*late* beobachtet (26%). Für die komplementäre chimäre SV40-GAPDH RNA war dagegen in allen Spuren Spaltaktivität zu beobachten. So konnten der kommerzielle (11%) und der nicht kommerzielle Extrakt (4%) sowie der PM (2%) Spaltung aufweisen. Eine Stimulation durch die Mischung von Extrakt und Proteinmix auf 29% war allerdings auch mit dieser RNA zu sehen. Auffällig ist, dass mit der zweiten Chimäre zwei Spaltprodukte zu sehen waren. Der Grund dafür wurde nicht untersucht. Der Vergleich von SV40*late*, GAPDH und den beiden Chimären führt zu dem Schluss, dass die *upstream* der Spaltstelle der RNA gelegenen Sequenzen in erster Linie für das Verhalten in der Spaltreaktion verantwortlich sind: In der SV40*late*-RNA erlauben diese Sequenzen die Spaltung durch den Proteinmix. Ist jedoch die entsprechend GAPDH-Sequenz vorhanden, ist der PM alleine nicht spaltaktiv und es müssen ein oder mehrere Faktoren aus dem Kernextrakt zugeführt werden. Die Herstellung weiterer Chimären zur Eingrenzung der relevanten Sequenzen wurde aus Zeitmangel nicht mehr verfolgt.

Die HMOX-1 RNA wurde von dem kommerziellen NXT (5%), dem Proteinmix (3%) und der Kombination aus Extrakt und Proteinmix (11%) gespalten. Ein ähnliches Ergebnis konnte Florian Kluge in seiner Dissertation zeigen (2023). Als letztes Substrat-RNA wurde BIK verwendet. Das erwartete 5'-Spaltprodukt sollte lediglich 50 Nukleotide kleiner als das Ausgangssubstrat sein. Ein solches war jedoch in keiner der vier Spuren zu sehen.

Aus den Versuchen kann geschlossen werden, dass der rekombinante Proteinmix, der virale RNAs wie SV40*late* und L3-RNA spalten kann, auch bei einer nicht viralen RNA wie HMOX-1 spaltaktiv ist. Andere zelluläre RNA-Substrate wurden allerdings nicht gespalten. Die Experimente deuten stark darauf hin, dass für bestimmte RNAs weitere Faktoren an der Spaltung beteiligt sind oder die Konzentration der Proteine deutlich höher sein müsste. Diese Faktoren müssen noch identifiziert werden.

2.2 Präzipitationsanalyse der Spaltungsreaktion

2.2.1 Spaltreaktionen sind abhängig von *macromolecular crowding*

Die bisher gezeigten Spaltassays wurden alle in Anwesenheit von Additiven durchgeführt, die die hohe Konzentration von Makromolekülen imitieren und das verfügbare Lösungsmittelvolumen reduzieren („*excluded volume effect*“); Bedingungen, wie sie in einer lebenden Zelle vorherrschen. Dieses Phänomen, das als *macromolecular crowding* bezeichnet wird, kann Auswirkungen auf die Stabilität der Proteine, Assoziations-Dissoziations-Gleichgewichte und Enzymkinetiken haben (Ellis, 2001; Minton, 2005; Ralston, 1990). Zu Beginn der Experimente wurden die makromolekularen Verbindungen Polyvinylalkohol (PVA) oder Polyethylenglycol (PEG) als *crowder* benutzt, später in den meisten Fällen das kleine Molekül Trimethylaminoxid (TMAO), für welche der „*excluded volume effect*“ beschrieben (Atha & Ingham, 1981; Bhat & Timasheff, 1992; Cho et al., 2011). Solche *crowders* werden für eine effiziente Prozessierung benötigt (McLauchlan et al., 1988). Reaktionen, die mit Kernextrakten durchgeführt werden, zeigen ohne diese Zusätze keine oder nur sehr geringe Spaltaktivitäten. Florian Kluge fraktionierte zu Beginn seiner Dissertation (2023) kommerzielle, nicht dialysierte Kernextrakte von humanen Zelllinien. Die Fraktionen wurden benutzt, um in Kombination mit den damals verfügbaren rekombinanten 3'-Prozessierungsfaktoren die Spaltung der Prä-mRNA zu rekonstituieren. Die Spaltreaktionen mit Kernextrakt oder daraus abgeleiteten Fraktionen hatten alle eine deutlich höhere Gesamtproteinkonzentration als die in dieser Arbeit dargestellten Reaktionen, welche ausschließlich mit Hilfe von gereinigten Proteinen rekonstituiert wurden. Aufgrund der hohen Gesamtproteinkonzentration fiel auf, dass sich in den Reaktionen eine Trübung entwickelte. Durch eine kurze Mikrozentrifugation ließ sich die Bildung von Präzipitaten nachweisen (festgestellt durch F. Kluge). Die Substrat-RNA präzipitierte hierbei größtenteils und nur ein geringer Anteil blieb löslich. Das durch die Reaktion entstandene 5'-Fragment war fast ausschließlich im Präzipitat zu finden.

In der Literatur ist für das WDR33-Orthologe aus *Arabidopsis thaliana* die Bildung von *liquid droplets* (*liquid-liquid phase separation, LLPS*; Flüssig-Flüssig-Phasentrennung) beschrieben (Fang et al., 2019). Es wurde postuliert, dass *in vivo* die 3'-Prozessierung von mRNA-Vorläufern in solchen *liquid droplets* abläuft. Der Begriff beschreibt ein Phänomen, bei dem es in einer wässrigen Lösung zur Bildung von zwei flüssigen Phasen kommt. Dabei kommt es in einer der beiden Phasen zu einer Konzentrationserhöhung der gelösten Makromoleküle. Diese Phase tritt in Form von sphärischen Tröpfchen auf. Voraussetzung dafür sind multiple, reversible Wechselwirkungen zwischen den Makromolekülen, die häufig durch intrinsisch

ungeordnete Regionen (IDRs) innerhalb der Proteinstruktur vermittelt werden. Ein großer Teil der 3'-Prozessierungsfaktoren besitzt IDRs (**Abbildung 2.17**).

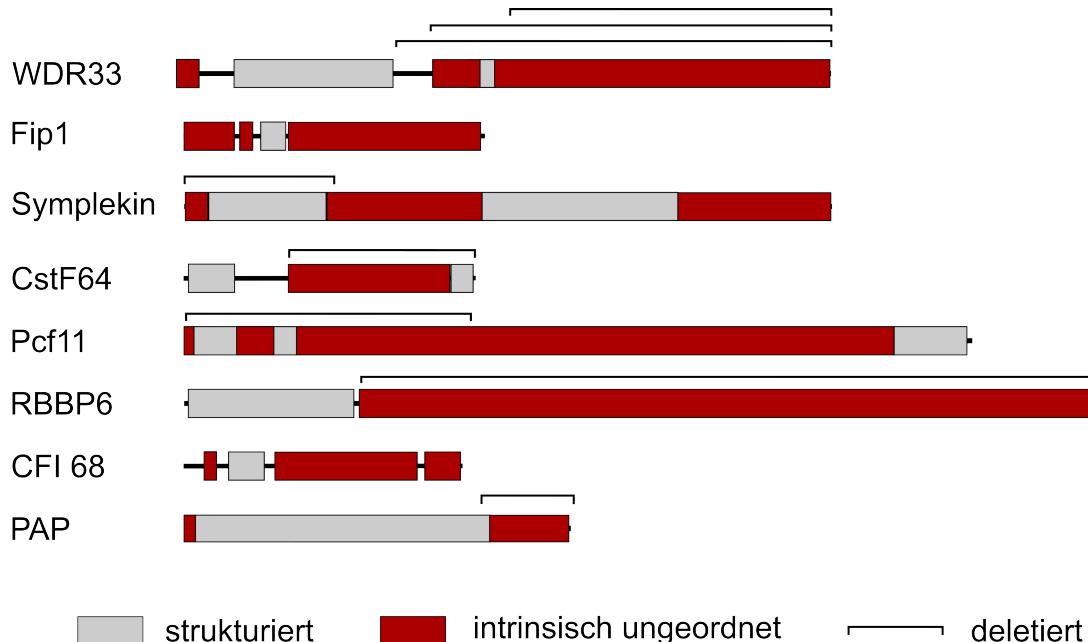


Abbildung 2.17: Intrinsisch ungeordnete Bereiche der 3'-Prozessierungsfaktoren

Schematische Darstellung der intrinsisch ungeordneten Bereiche (IDRs) der 3'-Prä-mRNA-Prozessierungsfaktoren. Die strukturierten Domänen sind in grau und die IDRs in Rot dargestellt. Die IDRs wurden mit Hilfe von PLAAC (Lancaster et al., 2014), PrDOS (Ishida & Kinoshita, 2007) und IUPred (Mészáros et al., 2018) bestimmt. Bereiche der Prozessierungsfaktoren, die in verschiedenen Experimenten in dieser Arbeit deletiert wurden, sind mit Klammern oberhalb der Sequenz angezeigt.

Ferner ist bekannt, dass Additive, die zum *macromolecular crowding* führen, auch die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung begünstigen (Patel et al., 2015; J. Wang et al., 2018). Schließlich führt die Bildung von *liquid droplets* dazu, dass die beteiligten Makromoleküle sich in einer kurzen Mikrozentrifugation sedimentieren lassen (Sheu-Gruttaduria & MacRae, 2018; J. Wang et al., 2018). Diese Umstände führen zu der Hypothese, dass humane 3'-Prozessierungsfaktoren auch zur Phasentrennung neigen könnten und die Phasentrennung in der Reaktion durch den Zusatz von *crowder* herbeigeführt wird. Da die *crowders* für die Prozessierungsreaktion essentiell sind, ist möglicherweise die 3'-Prozessierung von der Bildung von *liquid droplets* abhängig. Im Folgenden wurde die Präzipitation von RNA und Proteinen in der Spaltreaktion untersucht.

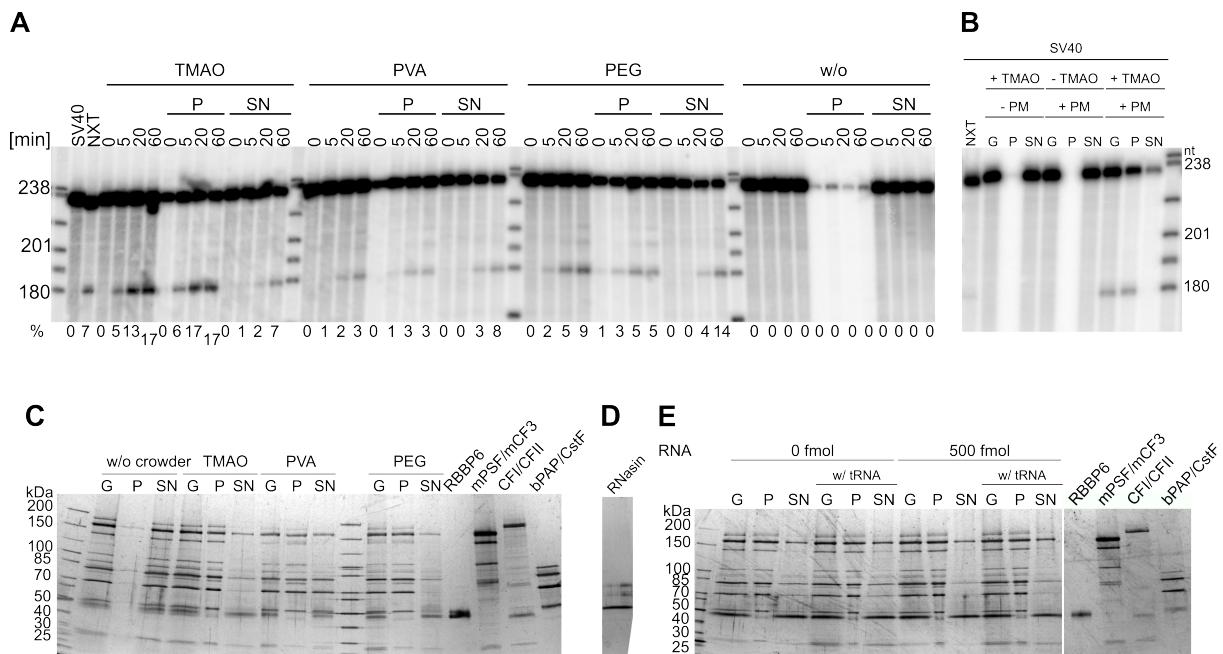


Abbildung 2.18: *Crowder-abhängige* Präzipitation von RNA und Proteinen

(A) Analyse der Spaltkinetiken von Reaktionen mit TMAO, PVA, PEG (Polyethylenglykol) oder ohne *crowder* (w/o), dargestellt auf einem Autoradiogramm einer denaturierenden PAGE. Für jede Bedingung ist zunächst ein Aliquot der Gesamtreaktion aufgetragen. Außerdem wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Aliquots 2 Minuten lang zentrifugiert. Das Präzipitat (P) und der Überstand (SN) wurden separiert und beide unabhängig voneinander auf dieselbe Art und Weise gestoppt wie die Kontrollreaktion ohne Zentrifugation. Die beiden Typen von Proben wurden nach den Aliquots aus der Gesamtreaktion aufgetragen. Als Kontrolle wurde HeLa-Kernextrakt (NXT) verwendet. Die Größen der Markerbanden sind rechts und die Spalteffizienzen darunter aufgeführt. **(B)** Vergleich der Präzipitation des RNA-Substrats in An- und Abwesenheit von TMAO oder Proteinmix (PM). Die Reaktionen wurden nach 15 Minuten Inkubation gestoppt (G) oder Präzipitat (P) und Überstand (SN) voneinander getrennt und die Reaktionen anschließend gestoppt. Die Analyse erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung in einer denaturierenden-PAGE und Autoradiographie. Die Markergrößen sind rechts aufgeführt. **(C)** Analyse des Präzipitationsverhaltens des Proteinmixes bei unterschiedlichen *crowders* auf einer silbergefärbten SDS-PAGE. Die Reaktionen wurden wie in (A) aufgearbeitet. Als Kontrolle wurde unter allen Bedingungen je eine Reaktion nach 15 Minuten ohne Zentrifugation gestoppt (G). Zusätzlich wurden die einzelnen Proteine bzw. Proteingemische zu dem Zweck aufgetragen die Polypeptide in der Reaktionsmischung anhand ihrer Größe zu identifizieren. **(D)** Ausschnitt einer Silber- gefärbten SDS-PAGE von RNasin, das ebenfalls in den Prozessierungsreaktionen vorhanden war. **(E)** Silbergefärbte SDS-PAGE zur Analyse des Präzipitationsverhalts des Proteinmixes abhängig von Substrat- und tRNA. Substrat-RNA wurde entweder weggelassen (0 fmol) oder in einer Menge von 500 fmol (äquimolar zu Proteinen mit Ausnahme von RBBP6) zugesetzt, das dem zehnfachen der Standardspaltreaktion entspricht. Das Reaktionsvolumen betrug 20 μ l. tRNA wurde entweder weggelassen oder in der Standardkonzentration zugesetzt (w/). Die Reaktionen wurden mit TMAO durchgeführt wie beschrieben. Zusätzlich wurden die einzelnen Proteine bzw. Proteingemische zur Identitätskontrolle aufgetragen.

Abbildung 2.18A zeigt das Autoradiogramm einer Spaltkinetik in Anwesenheit unterschiedlicher *crowders*. Dafür wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Aliquots der Reaktion entnommen und gestoppt. Die Reaktion wurde doppelt ausgeführt. Bei der zweiten Reaktion wurde jedes Aliquot für zwei Minuten bei 20.000 g zentrifugiert, das Präzipitat vom Überstand getrennt und die Reaktion wurde in beiden Proben separat gestoppt. Als *crowding*-Reagenzien wurden TMAO, PVA und PEG verwendet. Eine weitere Reaktionsserie wurde ohne Zusatz von *crowder* durchgeführt.

In der Abbildung ist zu erkennen, dass mit TMAO die größte Spaltaktivität zu beobachten war (bis zu 17%). Beim Vergleich der Spuren der Gesamtreaktion mit denen des Präzipitats und des Überstandes ist zu erkennen, dass nahezu das gesamte 5'-Spaltprodukt in den Präzipitaten zu finden war und nur zu einem geringen Teil im Überstand (vergleiche Spuren P mit SN). Während in der Gesamtreaktion (Spur G) und im Präzipitat (Spur P) bereits nach 5 Minuten Spaltprodukt zu beobachten war und die Reaktion nach etwa 20 Minuten zum Stillstand kam, war im Überstand über den gesamten Verlauf der Reaktion nur eine vergleichsweise schwache Bande des 5'-Spaltproduktes zu erkennen. Im Gegensatz zur Gesamtreaktion nahm aber im Überstand die Menge des Spaltprodukts zwischen 20 und 60 Minuten zu. In den PVA enthaltenden Reaktionen war die Spaltaktivität etwa um den Faktor 5 schwächer, sodass erst nach 20 Minuten eine Spaltung deutlich nachzuweisen war. Auch hier befand sich das Spaltprodukt im Präzipitat. Allerdings war es in ähnlichen Mengen im Überstand vorhanden. Die Spaltaktivität mit PEG als *crowder* war etwa um den Faktor 2 größer als mit PVA. Erst nach 20 Minuten war das Spaltprodukt im Überstand zu finden, wohingegen es bereits nach 5 Minuten im Präzipitat beobachtet wurde. In den Reaktionen ohne *crowder* fand keine Spaltung und keine Präzipitation der RNA statt; nur Spuren des Substrats waren im „Präzipitat“ zu finden. Vermutlich handelt es sich hierbei um den geringen Anteil des Substrats, der beim Abnehmen der Lösung nicht entfernt wurde.

Das Experiment bestätigt zunächst, dass die RNA-Spaltung von einem *crowder* abhängig ist und die Anwesenheit des *crowders* zu einer teilweisen Präzipitation der RNA führt. Die Tatsache, dass das Reaktionsprodukt erst im Präzipitat und erst später im Überstand auftaucht, lässt zudem den Ablauf der Spaltreaktion im Präzipitat vermuten. Eine Abhängigkeit der Spaltreaktion von der Präzipitation würde auch die Abhängigkeit von einem *crowder* erklären. Die geringeren Produktmengen, die mit Verzögerung im Überstand zu finden sind, könnten entweder im Laufe der Zeit aus dem Präzipitat freigesetzt worden oder in einer langsameren Reaktion im Überstand entstanden sein. Schließlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Sedimentation der Präzipitate unter den gewählten Bedingungen unvollständig ist. Die Substrat-RNA allein, ohne Zusatz des Proteinmixes, konnte nicht in Anwesenheit von TMAO präzipitiert werden (**Abbildung 2.18B**). Erst die Kombination aus RNA, Proteinmix und TMAO führte zur Präzipitation von Substrat-RNA und 5'-Spaltprodukt.

In **Abbildung 2.18C** wurde das Präzipitationsverhalten der Proteine unter Spaltbedingungen untersucht. In **Abbildung 2.18A** und vorangegangenen Kinetiken war nach ca. 15-20 Minuten eine deutliche Spaltung der Substrat-RNA nachweisbar. Daher wurden für die Proteinuntersuchungen die Reaktionen nach 15 Minuten zentrifugiert. Für die Protein-Präzipitations-

experimente wurden die Mengen von RNA und mPSF auf je 500 fmol angehoben. Hierdurch lagen alle Faktoren außer RBBP6 in äquimolaren Konzentrationen vor. Das silbergefärbte SDS-Gel zeigt die Analyse der Proteinpräzipitationen bei Anwesenheit unterschiedlicher *crowders*. Für eine Identitätskontrolle wurden die eingesetzten Proteine paarweise rechts im Gel aufgetrennt. Zu beachten ist, dass nicht jedes Protein gleichermaßen durch die Silberfärbung angefärbt wird. Da die Reaktionen unter Spaltbedingungen stattfanden, enthielt jede Reaktion zudem RNase-Inhibitor. Ein silbergefärbter Gelausschnitt mit einer Auftrennung des RNase-Inhibitors ist in **Abbildung 2.18D** zu sehen. Der Inhibitor besitzt in etwa das gleiche Laufverhalten wie RBBP6₁₋₃₄₀.

Ohne Zusatz präzipitieren keine Proteine (praktisch keine Proteine in der Probe P = *pellet*, alle Proteine in der Probe SN = *supernatant*). Waren die Reaktionen jedoch mit TMAO oder PEG versetzt, präzipitieren etwa 80% der Proteine. Bei Verwendung von PVA waren es ca. 50%, wobei nicht alle Polypeptide im gleichen Maße in Lösung verblieben: WDR33 und CPSF1 wurden im Gel nicht voneinander getrennt, sondern liefen als eine Bande. Ein Anteil eines oder beider Proteine war nach Zentrifugation weiterhin löslich. Gleiches galt für alle drei CstF-Untereinheiten, RBBP6₁₋₃₄₀ und CPSF4. RBBP6₁₋₃₄₀, das in einem fünffachen molaren Überschuss gegenüber den anderen Proteinen eingesetzt wurde, blieb auch in Gegenwart der anderen *crowders* überwiegend im Überstand. In TMAO-haltigen Reaktionen, in denen 500 fmol RBBP6_{ΔRING} anstelle von 2500 fmol RBBP6₁₋₃₄₀ eingesetzt wurde, präzipitierte die lange RBBP6-Variante dagegen (Daten nicht gezeigt). Der RNase-Inhibitor blieb unter allen Bedingungen in Lösung und stellte daher eine geeignete Spezifitätskontrolle für die Präzipitation der Proteine dar.

Als nächstes sollte überprüft werden, ob die Proteinpräzipitation RNA-abhängig war. Dazu wurde der Präzipitationsassay erneut in An- und Abwesenheit von Substrat und tRNA durchgeführt. Das silbergefärbte SDS-Gel dieses Experiments ist in **Abbildung 2.18E** abgebildet. Unabhängig von Anwesenheit oder Abwesenheit von Substrat-RNA wurde das gleiche Proteinpräzipitationsmuster beobachtet. Dieses war zudem unbeeinflusst von der Präsenz von tRNA. Prinzipiell lässt sich also schließen, dass das Präzipitationsverhalten des Proteinmixes unabhängig von Substrat-RNA und tRNA ist. Lediglich PAP schien ohne RNA zu gleichen Teilen zu präzipitieren so wie löslich zu sein. Erst mit RNA wurde das Enzym überwiegend unlöslich.

2.2.2 mPSF und CstF sind für die beobachtete Proteinpräzipitation verantwortlich

Nachdem gezeigt werden konnte, dass ein Großteil der Prozessierungsfaktoren in der Reaktion durch den Einsatz von *crowding*-Reagenzien zur Präzipitation gebracht wird, sollte untersucht werden, ob sich das Verhalten der Proteine in Abwesenheit einzelner Faktoren ändert.

Für die Experimente, die in **Abbildung 2.19** gezeigt sind, wurden Proteinmischungen verwendet, in denen jeweils ein Prozessierungsfaktor ausgelassen wurde. Als Kontrollen dienten die Reaktionen mit dem vollständigen Proteinmix mit und ohne TMAO. Diese zeigten das gleiche Ergebnis wie in **Abbildung 2.18C**: Mit *crowder* präzipitierte das Gros der Proteine, wohingegen ohne TMAO keine Präzipitation stattfand. In den Reaktionen ohne mPSF waren, ähnlich der Reaktion ohne TMAO, die meisten Proteine im löslichen Überstand zu finden. Unter den Spuren von Proteinen, die im Präzipitat zu finden waren, stachen die drei Untereinheiten von CstF hervor. In der Reaktion ohne mCF war kein Unterschied zur positiven Kontrollreaktion zu beobachten. Das gleiche Ergebnis war in den Spuren der Reaktionen ohne PAP, RBBP6, CF I und CF II zu erkennen. In der Reaktion ohne CstF waren dagegen im Präzipitat lediglich kleine Anteile an Pcf11, WDR33/CPSF1 und von mCF3 sichtbar. Der Großteil der Proteine blieb im Überstand. Das Experiment zeigt, dass mPSF und CstF für die Präzipitation der 3'-Prozessierungsfaktoren in der Spaltreaktion verantwortlich sind.

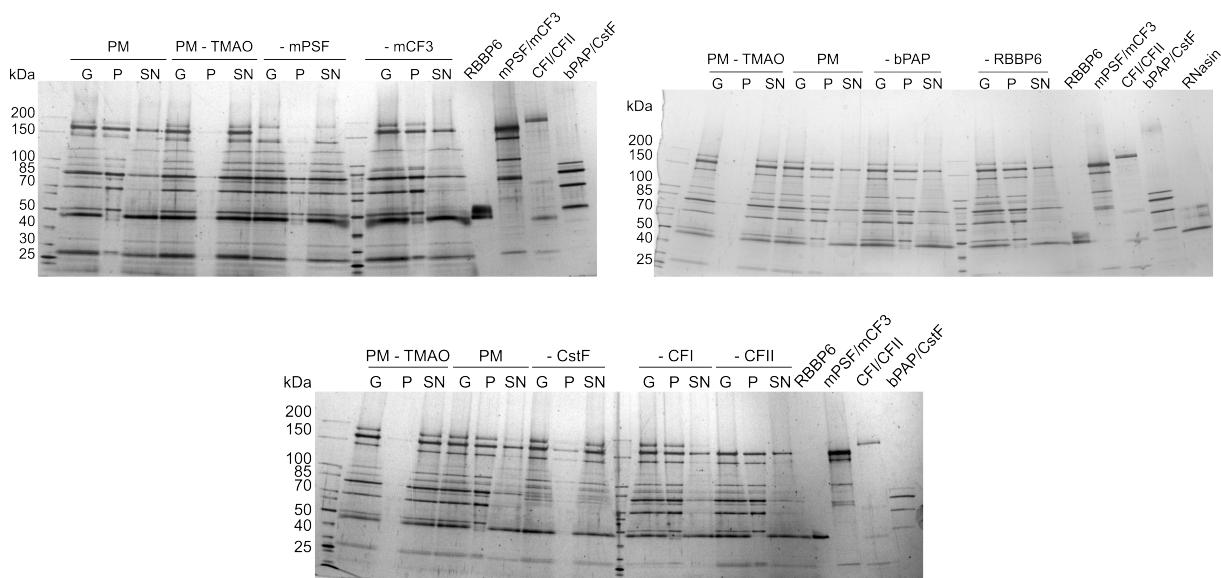


Abbildung 2.19: mPSF und CstF verursachen die Präzipitation der 3'-Prozessierungsfaktoren
 Analyse der Proteinpräzipitation des Proteinmixes (PM) im Vergleich zu PMs mit einem fehlenden Faktor auf silbergefärbten SDS-PAGEs. Aufgetragen wurde jeweils die Gesamtreaktion (G), das Präzipitat (P) und der lösliche Überstand (SN). Als Kontrollen wurden der Standardproteinmix mit und ohne TMAO auf Präzipitation getestet, außerdem wurden Kombinationen von je zwei Prozessierungsfaktoren aufgetragen.

Damit ergab sich die Frage nach dem Präzipitationsverhalten der einzelnen Proteine in An- und Abwesenheit von Substrat-RNA. Ein entsprechendes Experiment ist in **Abbildung 2.20** zu sehen. mPSF als zentraler Faktor der 3'-Prozessierung zeigte ohne RNA eine Gleichverteilung zwischen Präzipitat und Überstand. Dieses Verhalten veränderte sich jedoch, wenn RNA in der Reaktion enthalten war. Unter diesen Bedingungen blieben ca. 75% des Proteins löslich, während der restliche Teil präzipitierte. Solch ein Verhalten zeigte sonst nur noch CF II. Hier präzipitierte mehr als die Hälfte des Proteins in Abwesenheit von RNA und das Verhältnis kehrte sich in Anwesenheit der RNA um. Die restlichen Faktoren der Standard-Reaktionsmischung, darunter auch die C-terminal verkürzte Variante von RBBP6 (1-340), verblieben als individuelle Proteine in Lösung. Eine fast vollständige RBBP6-Variante (Δ RING (*full-length*)) präzipitierte jedoch, während die Verunreinigungen und Fragmente löslich waren. Die Präzipitation von RBBP6 unter Reaktionsbedingungen ist also von den IDRs im C-Terminus abhängig.

Das Experiment in **Abb. 2.20** stützt die Aussage, dass mPSF eine wichtige Rolle bei der Präzipitation der 3'-Prozessierungsfaktoren spielt. Für CstF ergab sich jedoch, dass das Protein zwar für die Ko-Präzipitation aller Proteine wichtig ist (**Abbildung 2.19**), alleine jedoch nicht präzipitiert (**Abbildung 2.20**). Möglicherweise beruht die Rolle in der Ko-Präzipitation aller Proteine darauf, dass CstF für die Assoziation der Proteine zu einem Komplex essentiell ist.

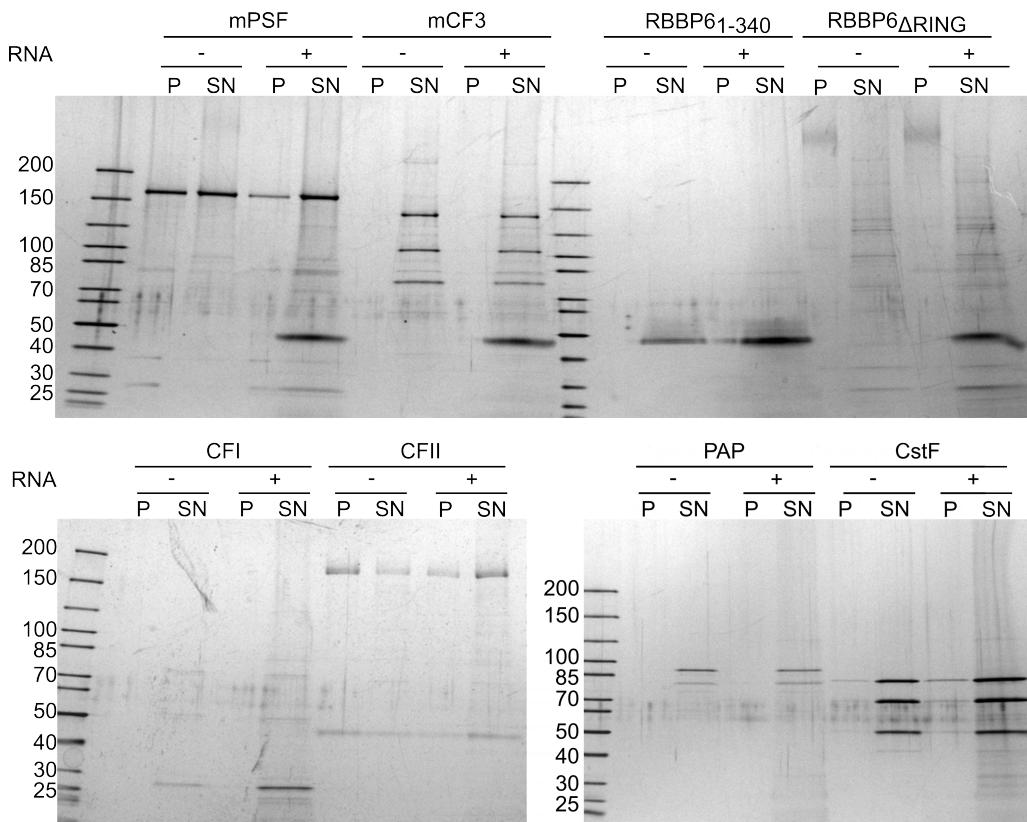


Abbildung 2.20: mPSF, CF II und eine lange RBBP6-Variante präzipitieren auch als einzelne Proteine

Analyse des Präzipitationsverhaltens der einzelnen 3'-Prozessierungsfaktoren in An- (+) und Abwesenheit (-) von Substrat-RNA und tRNA auf einer silbergefärzte SDS-PAGEs. Die Präzipitationen wurden unter Reaktionsbedingungen in Anwesenheit von TMAO durchgeführt.

2.2.3 Die Proteinpräzipitation unter Reaktionsbedingungen ist nicht leicht reversibel

Wie bereits oben diskutiert, könnte das bislang als „Präzipitation“ bezeichnete Verhalten der 3'-Prozessierungsfaktoren unter Reaktionsbedingungen eine Flüssig-Flüssig-Phasentrennung (LLPS) darstellen. Ein Charakteristikum dieses Phänomens ist die schnelle Reversibilität der Phasentrennung (Brangwynne, 2013; Patel et al., 2015). Als Überprüfung, ob in der 3'-Spaltreaktion eine LLPS stattfindet, wurde daher die Auflösung der Präzipitate (Resolubilisation) untersucht. Dafür wurden die Präzipitate in Reaktionspuffer in An- und Abwesenheit von TMAO resuspendiert und dann erneut zentrifugiert. Der experimentelle Ablauf ist zur besseren Veranschaulichung in **Abbildung 2.21** als Flussdiagramm schematisch aufgezeichnet.

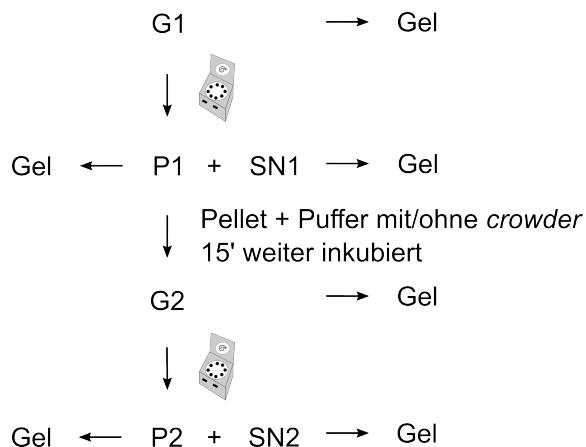


Abbildung 2.21: Flussdiagramm der Reversibilitätsexperimente

Die Präzipitate wurden unter Standard-Reaktionsbedingungen mit TMAO gebildet und abzentrifugiert. Auf das Gel aufgetragen wurden die Gesamtreaktion (ohne Zentrifugation; G1), Präzipitat (P1) und Überstand (SN1). Zum Test auf eine mögliche Reversibilität wurden die Präzipitate in Reaktionspuffer mit oder ohne *crowder* resuspendiert und für 15 Minuten bei 30°C weiter inkubiert (G2). Anschließend wurde die Reaktion erneut zentrifugiert und Pellet von Überstand getrennt (P2 und SN2). Gegebenenfalls wurden für die Resuspendierung der Pellets unterschiedliche Salzkonzentrationen verwendet. Die Auftrennung der Aliquots der Reaktion erfolgte auf einer 4-15% SDS-PAGE elektrophoretisch und die Sichtbarmachung der Proteine per Silberfärbung.

Da TMAO für die Präzipitation notwendig ist, würde man bei einer Reversibilität der Reaktion eine sofortige Auflösung der Präzipitate in Puffer ohne TMAO erwarten. Die folgenden Experimente wurden durchgeführt, wie in **Abbildung 2.21** aufgeführt. Dabei wurde eine Standardreaktion mit TMAO (oder ggf. einem anderen *crowder*) nach fünfzehn minütiger Inkubation zentrifugiert und das Pellet vom Überstand getrennt. Die Resuspendierung des Präzipitats erfolgte anschließend in Reaktionspuffer mit bzw. ohne *crowder* mit anschließender erneuter Inkubation für 15 Minuten. Dann wurde die Reaktion abermals zentrifugiert und das Präzipitat vom Überstand getrennt. Außerdem wurde die Salzkonzentrationen im Resuspensionspuffer mit 100, 300 oder 500 mM KCl variiert (eine Standardreaktion enthielt 100 mM KCl). Eine weitere Reaktion wurde nach der Resuspendierung mit 100 mM KCl im Puffer für 60 Minuten statt 15 Minuten weiter inkubiert. Die silbergefärbten SDS-PAGEs des Experiments sind in **Abbildung 2.22** zu sehen.

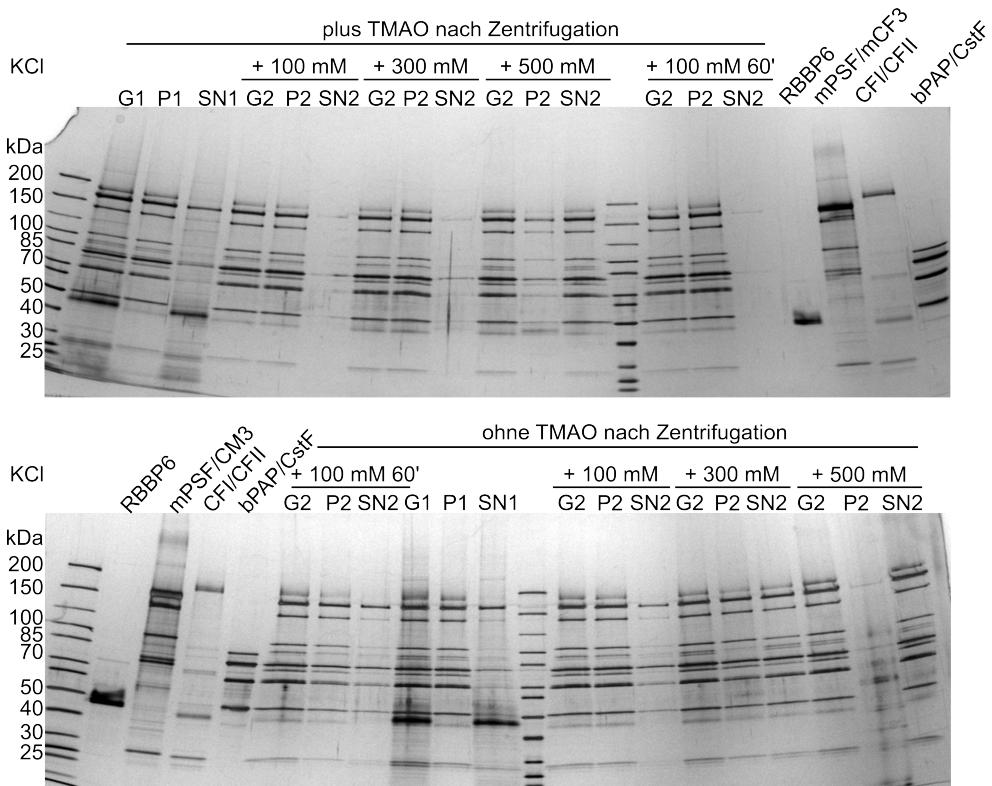
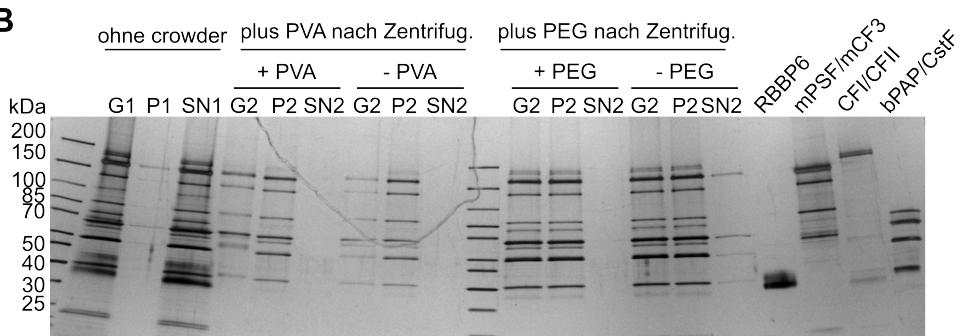
A**B**

Abbildung 2.22: Präzipitierte Proteine werden erst bei hoher Salzkonzentration wieder löslich
 Analyse der Präzipitationsreversibilität bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen und *crowders*. Die Proteine wurden auf einer 4-15%igen SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und die Gele silbergefärbt. Zur Identifikation der Proteine wurden diese in Zweierkombinationen mit aufgetragen. **(A)** Gezeigt sind Präzipitationsexperimente mit TMAO als *crowding*-Reagenz. Die Präzipitate wurden unter Standard-Reaktionsbedingungen gebildet und abzentrifugiert. Aufgetragen wurden die Gesamtreaktion (ohne Zentrifugation; G1), Präzipitat (P1) und Überstand (SN1). Die Präzipitate wurden vom Überstand getrennt, anschließend mit (oben) oder ohne TMAO (unten) bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen (100, 300 oder 500 mM KCl) resuspendiert (G2) und erneut für 15 Minuten inkubiert und zentrifugiert (P2 und SN2). Zusätzlich wurde eine Reaktion mit 100 mM KCl für 60 Minuten weiter inkubiert und erst danach gestoppt. **(B)** Analyse der Präzipitat-Reversibilität mit PVA oder PEG als *crowding*-Reagenz. Die ursprüngliche Reaktionsmischung enthielt entweder PVA oder PEG. Die Präzipitate wurden gebildet wie in den Experimenten zuvor und in Reaktionspuffer mit 100 mM KCl (Standardkonzentration im Assay) und PVA/PEG oder ohne *crowder* resuspendiert. Aufgetragen wurden das resuspendierte Pellet mit oder ohne *crowder* (G2) und das Pellet (P2) getrennt vom Überstand (SN2) nach erneuter Zentrifugation. Als Kontrolle wurde eine Standardreaktion ohne *crowder* und Pelletresuspendierung aufgetragen. Aus technischen Gründen wurde in dem hier gezeigten Experiment auf die Kontrolle (G1, P1, SN1) mit dem jeweiligen *crowding*-Reagenz verzichtet.

Im oberen Gel von **Abbildung 2.22A** wurden die Reaktionen aufgetragen, bei denen TMAO im Resuspensionspuffer enthalten war. Als Kontrollen wurden eine entsprechende Gesamtreaktion (G1) sowie Präzipitat (P1) und Überstand (SN1) einer solchen Reaktion mit TMAO aufgetragen. Wie erwartet war der Großteil der Proteine im Präzipitat zu finden. Enthielt der Resuspensionspuffer 100 bzw. 300 mM KCl, verblieben alle Proteine mit Ausnahme von minimalen Anteilen von WDR33/CPSF1 und CstF bei erneuter Zentrifugation im Präzipitat. Erst bei 500 mM KCl konnten die Proteine im TMAO-haltigen Puffer gelöst werden. Allerdings verblieb immer noch ein Anteil von etwa 10-20% mPSF, mCF3 und CF II im Präzipitat. Eine Reaktionsmischung, die nach Resuspension in TMAO-haltigem Puffer mit 100 mM KCl noch weitere 60 Minuten inkubiert und erst dann zentrifugiert wurde, unterschied sich nicht von einer vergleichbaren Reaktion, welche sofort nach Resuspension ein zweites Mal zentrifugiert wurde. Die Ergebnisse entsprechen der Erwartung, da die Pufferbedingungen in den resuspendierten Proben den Pufferbedingungen entsprachen, die ursprünglich zur Präzipitation der Proteine geführt haben.

Das SDS-Gel im unteren Teil der **Abbildung 2.22A** zeigt Proben, bei denen TMAO nicht im Resuspensionspuffer vorhanden war. Bei Anwesenheit von 100 mM KCl verblieb der größte Teil der Proteine bei erneuter Zentrifugation im Präzipitat, aber WDR33/CPSF1, mCF3 und CstF konnten zu einem kleinen Teil gelöst werden, mehr als in Anwesenheit von TMAO. Der Anteil der gelösten Proteine wurde durch eine einstündige Inkubation vor der zweiten Zentrifugation nicht wesentlich erhöht. Wurde die Salzkonzentration auf 300 mM erhöht, verteilten sich die Proteine nach der zweiten Zentrifugation zu gleichen Anteilen zwischen Pellet und Überstand. Bei einer Salzkonzentration von 500 mM ist zu erkennen, dass alle Proteine gelöst vorlagen und kein Proteinpräzipitat mehr vorhanden war. Die Ergebnisse zeigten, dass sich unter Pufferbedingungen, die nicht zur Proteinpräzipitation führen (Abwesenheit von TMAO), die Präzipitate unter normalen Salzbedingungen kaum auflösen. Mit anderen Worten, die Präzipitation ist unter diesen Bedingungen kaum reversibel. Erst hohe Salzkonzentrationen sind in der Lage, die Präzipitate zu lösen. Diese Beobachtung führt zu der Vermutung, dass die Präzipitation der Proteine nicht auf LLPS beruht.

In **Abbildung 2.22B** ist das Reversibilitätsexperiment nach Präzipitation durch PVA oder PEG gezeigt. Im Resuspensionspuffer wurden dieselben *crowders* verwendet bzw. weggelassen. Der Resuspensionspuffer enthielt außerdem die standardmäßige Salzkonzentration von 100 mM KCl. Vergleicht man die PVA-Reaktionen untereinander, ist zu erkennen, dass mit oder ohne *crowder* die Proteine nach Resuspension unlöslich blieben. Bei den PEG-Reaktionen war das Ergebnis ähnlich, jedoch ging ein kleiner Teil von WDR33/CPSF1 und CstF bei Abwesenheit

von PEG im Resuspensionspuffer in Lösung. Die Ergebnisse stützen die Feststellung, dass die Präzipitation der 3'-Prozessierungsfaktoren und Reaktionsbedingungen nicht leicht reversibel ist und deswegen vermutlich nicht auf Flüssig-Flüssig-Phasentrennung beruht.

2.2.4 Intrinsisch ungeordnete Regionen verursachen die Proteinpräzipitation

In **Abbildung 2.7** wurde bereits gezeigt, dass die Präzipitation von RBBP6 von der langen IDR des Proteins abhängig ist. In den folgenden Experimenten wurde getestet, ob dies auch für andere Prozessierungsfaktoren gilt. Ausgehend von der in Fang et al., 2019 beschriebenen Fähigkeit des pflanzlichen Orthologen von WDR33, in Abhängigkeit von seinen intrinsisch ungeordneten Regionen eine Phasentrennung zu durchlaufen, wurden die IDRs von WDR33 als mögliche Auslöser der Präzipitation aus dem Protein deletiert. Dafür wurde WDR33 unter anderem in die Fragmente A, P, B und E unterteilt (**Abbildung 2.22A**; Expression und Reinigung durch A.-K. Hoffmeister und Dr. U. Kühn). Fragment A enthält hauptsächlich die WD40-Domäne am N-Terminus des Proteins. Fragment P (entspricht der Sequenz des WDR33 aus Boreikaite et al., 2022) und B sind größere C-terminale Verkürzungen. Fragment E besitzt nur eine Sequenz aus dem C-Terminus. Außerdem wurden die Proteine für mikroskopische Experimente mit N-terminalen Fluoreszenzmarkierungen wie GFP versehen.

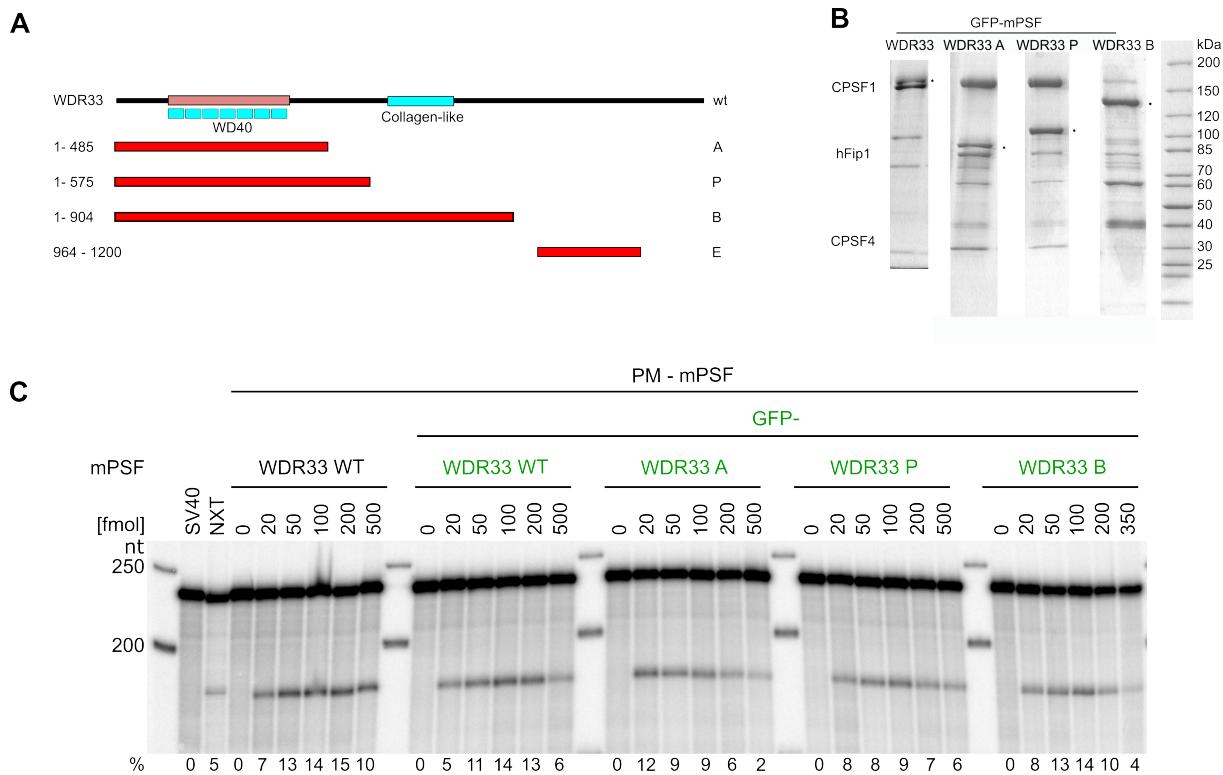


Abbildung 2.23 In WDR33 ist nur die WD40-Domäne essentiell für die Spaltung von prä-mRNAs
(A) Schematische Darstellung von WDR33-Wildtyp, drei C-terminalen Verkürzungen (A, P, B) und Fragment E. **(B)** Ausschnitte der Coomassie-gefärbten SDS-Gele von mPSF-Präparationen mit GFP-WDR33 oder den GFP-markierten verkürzten Varianten von WDR33 (A, P und B). Die WDR33-Varianten sind mit einem Stern gekennzeichnet. Die mPSF-Komplexe wurden von A.-K. Hoffmeister und U. Kühn präpariert. **(C)** Titrationen der unterschiedlichen mPSF-Präparationen in der Spaltungsreaktion. Gezeigt ist das Autoradiogramm einer 6%igen PA-Harnstoff-PAGE. Als Kontrolle wurde HeLa-Kernextrakt (NXT) verwendet. Ferner wurde Wildtyp-mPSF titriert. GFP-markierte Proteine sind in grün dargestellt. Die Größe der Markerbanden sind links und die Spalteffizienzen unterhalb des Autoradiogramms angegeben.

Abbildung 2.23B zeigt die Analyse von mPSF-Präparationen mit GFP-WDR33 und mit den GFP-markierten Deletionsvarianten A, P und B. Das jeweilige WDR33-Fragment ist mit einem schwarzen Stern gekennzeichnet. Alle GFP-markierten WDR33-Varianten ließen sich als stabile Komplexe mit den anderen mPSF-Untereinheiten präparieren. Die Komplexbildung mit der N-terminalen GFP-Fusion ist durchaus unerwartet, da der N-terminale Bereich von WDR33 an der Komplexbildung mit CPSF1 beteiligt ist (Clerici et al., 2017). Zum Test auf Aktivität der verschiedenen mPSF-Präparationen wurden diese in einem Spaltassay titriert (**Abbildung 2.23C**). Als Kontrolle wurde Wildtyp-mPSF ohne Fluoreszenzmarkierung (GFP) ebenfalls titriert. Im Vergleich zum Wildtyp ohne GFP-Fusion war der GFP-markierte Wildtyp zwar weniger aktiv, der Unterschied in der Spaltaktivität jedoch minimal. Die N-terminale GFP-Fusion an WDR33 hat dementsprechend keine nennenswerten Auswirkungen auf die Spaltung. Die GFP-markierten WDR33-Fragmente waren im mPSF-Kontext ebenfalls aktiv. Bei der niedrigsten eingesetzten Menge (20 fmol) waren sie minimal aktiver als der Wildtyp (12 bzw.

8% vs. 5%). Bei höheren Mengen stieg, anders als beim Wildtyp, die Aktivität hingegen kaum noch an. Auffällig war bei allen WDR33-Fragmenten die Abnahme des Spaltproduktes bei Mengen größer 100 fmol im Assay. Der Grund hierfür ist ungeklärt. Das Experiment gab zum einen Aufschluss darüber, dass die GFP-Fusion keine sterischen Auswirkungen auf das Assemblierungsverhalten des 3'-Prozessierungskomplexes besitzt. Zum anderen wird aus der Aktivität des Fragments A offenbar, dass lediglich der N-Terminus mit der strukturierten WD40-Domäne essentiell für die 3'-Prozessierung ist. Der restliche Anteil des Proteins mit der Kollagen-ähnlichen Domäne und dem intrinsisch ungeordneten C-Terminus wird dagegen nicht benötigt. Ein ähnliches Ergebnis wurde in einer Polyadenlyierungskinetik beobachtet. Beim Vergleich zwischen GFP-mPSF-Präparationen mit Wildtyp WDR33, WDR33 A und WDR33 P wiesen beide verkürzten Präparationen die gleiche Aktivität wie der Wildtyp auf. Auch die Stimulation mit PABPN1 führte zu diesem Ergebnis (siehe Anhang **Abbildung 9.9**).

Um herauszufinden, inwieweit die intrinsisch ungeordneten Regionen der anderen 3'-Prozessierungsfaktoren Einfluss auf die Spaltungsreaktion und Präzipitation besitzen, wurden diese ebenfalls weitgehend entfernt. Für CF II bedeutete dies, dass die ersten 769 Aminosäuren von Pcf11 nicht vorhanden waren und das Protein erst mit den FEGP-Wiederholungen begann. Eine solche Pcf11-Variante bildet einen stabilen Komplex mit Clp1 und ist in der RNA-Spaltung aktiv (Schäfer et al. 2018). Der C-Terminus von CstF64 ist größtenteils intrinsisch ungeordnet, sodass dieser Bereich ab Aminosäure 196 deletiert wurde (siehe **Abbildung 2.17**). Bei Symplekin wurde der N-Terminus (bis Aminosäure 340) und bei PAP der C-Terminus (ab Aminosäure 514) entfernt. Außerdem wurde, wie in den meisten Experimenten, die C-terminal verkürzte RBBP6-Variante 1-340 eingesetzt. Beide CF I-Untereinheiten (CF I 25, CF I 68) und hFip1 wurden dagegen vollständig mit IDRs verwendet. Das Präzipitationsverhalten der Proteine unter den Bedingungen der RNA-Spaltungsreaktion wurde untersucht. Dazu ist in **Abbildung 2.24A** ein silbergefärbtes SDS-Gel gezeigt.

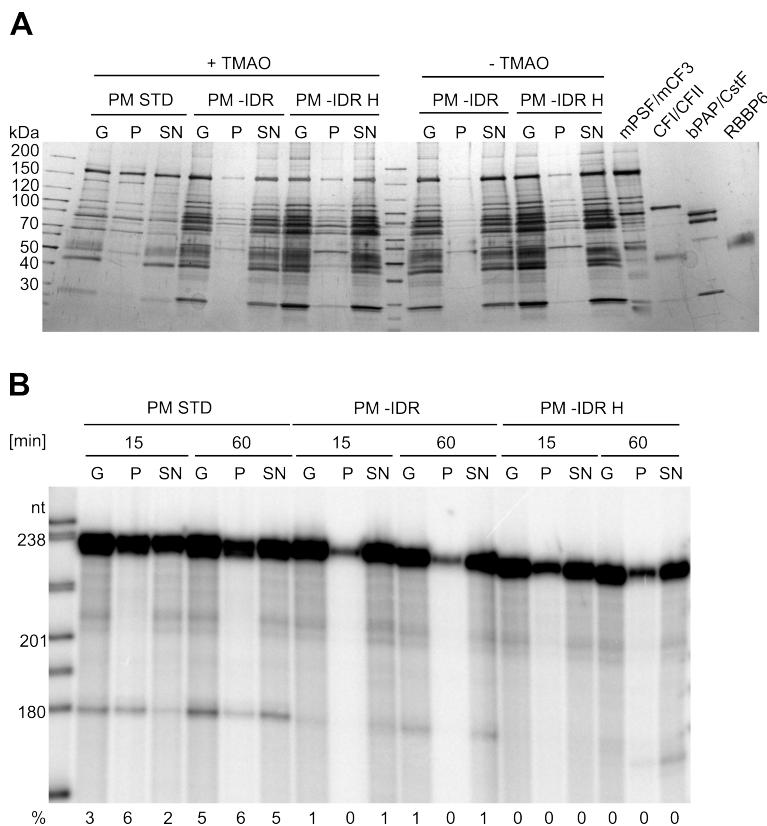


Abbildung 2.24: Ein Proteinmix ohne IDRs präzipitiert selbst bei erhöhten Konzentrationen nicht.
(A) Analyse der Präzipitation eines Proteinmixes mit Proteinen ohne IDRs bei unterschiedlichen Konzentrationen sowie mit und ohne *crowders* auf einem silbergefärbten SDS-Gel (4-15%). Der Proteinmix enthielt die im Text beschriebenen Varianten der Proteine mit IDR-Deletionen. Die Proteinkonzentrationen entsprachen den Standardbedingungen (PM -IDR) oder den RNA- und Proteinkonzentrationen der Rekonstitution von Boreikaite et al., 2022 (PM -IDR H). Als Kontrolle wurde eine Reaktion mit Standardproteinmix (PM STD) mit TMAO durchgeführt. Zusätzlich wurden die einzelnen Proteine (verkürzte Varianten) in Zweierkombinationen rechts aufgetrennt. G steht für Gesamtreaktion sowie P für Pellet und SN für den Überstand. **(B)** Präzipitationsanalyse der RNA in Proteinmix ohne IDRs bei zwei verschiedenen Konzentrationen (Standardkonzentration dieser Arbeit (-IDR) vs. Konzentrationen aus Boreikaite et al. (-IDR H)). Die Reaktionen wurden nach 15 bzw. 60 Minuten gestoppt. Zur Kontrolle wurde eine Reaktion mit dem Standardproteinmix nach 15 Minuten gestoppt. Die RNA wurde auf einem PA-Harnstoffgel aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert. G steht für Gesamtreaktion sowie P für Pellet und SN für den Überstand.

Zur Identitätsprüfung wurden die verkürzten Proteine paarweise rechts im Gel aufgetragen. Als Kontrolle diente die Mischung der Wildtyp-Faktoren mit und ohne TMAO. Die Kontrollen verhielten sich wie erwartet. In Gegenwart von TMAO befand sich ein großer Anteil der Proteine nach einer kurzen Mikrozentrifugation im Pellet, war also präzipitiert. In Abwesenheit von TMAO waren dagegen nur Spuren in der Pellet-Fraktion erkennbar.

In den Reaktionen des Proteinmixes ohne IDRs blieb jedoch in Gegenwart von TMAO der Großteil der Proteine löslich. Lediglich ein geringer Anteil an CPSF1, Symplekin, CPSF2, CstF77, CstF50 und PAP wurden präzipitiert. Die unter normalen Bedingungen beobachtete

Präzipitation der 3'-Prozessierungsfaktoren ist folglich von den IDRs (genauer: von mindestens einer IDR) abhängig.

Erwartet werden könnte, dass eine Erhöhung der Konzentration der Proteine diesen Effekt ausgleichen und zur Präzipitation führen könnte (J. Wang et al., 2018). Ein Anhaltspunkt für solch erhöhte Proteinkonzentration wurden aus Boreikaite et al., 2022 entnommen. Diese Autoren entwickelten parallel zu den hier geschilderten Arbeiten unabhängig ein rekonstituiertes System für die 3'-Prozessierung und setzten dafür überwiegend Varianten der Proteine ein, deren IDRs fehlten. Außerdem wurden weder CF I noch PAP verwendet, womit weitere IDRs fehlten. In der hier beschriebenen Rekonstitutionsreaktion wurde die RNA mit 2,5 nM eingesetzt, mPSF äquimolar dazu, die meisten anderen Faktoren mit 25 nM und das meistens verwendete RBBP6-Fragment mit 125 nM. In dem System von Boreikaite et al. (2022) wurde die RNA dagegen in einer Konzentration von 100 nM und CPSF (mPSF und mCF3) im Unterschuss (50 nM) zur RNA eingesetzt. CstF und CF II wurden ebenfalls mit 100 nM und RBBP6 mit 300 nM eingesetzt. Die Konzentrationen der Makromoleküle waren dementsprechend insgesamt deutlich höher als in dem in dieser Arbeit verwendeten System. Das System von Boreikaite et al. (2022) war unabhängig von *crowding reagents* und ATP (die ATP-Abhängigkeit ist in der Dissertation von Florian Kluge (2023) ausführlich beschrieben). Eine Erhöhung der Proteinkonzentrationen auf die von Boreikaite et al. (2022) verwendeten Werte (Reaktion PM -IDR H) zeigte, wenn überhaupt, nur minimale Unterschiede in der Präzipitation. Die Menge der Proteine in der Pelletfraktion war zwar größer, allerdings war dies fast genauso in der Probe ohne TMAO zu sehen. Vermutlich spiegelt die erhöhte Proteinmenge in der Pelletfraktion einfach nur die insgesamt höhere eingesetzte Menge wider. Der größte Teil der Proteine blieb auch in der konzentrierteren Proteinmischung in Gegenwart von TMAO in Lösung. Die Erhöhung der Proteinkonzentration in diesem Konzentrationsbereich konnte folglich das Fehlen der IDRs nicht kompensieren.

Die Präzipitation der RNA unter denselben Reaktionsbedingungen ist in **Abbildung 2.24B** zu beobachten. Dafür wurden die Reaktionen nach 15 Minuten (dies entspricht dem für die Proteinanalyse gewählten Zeitpunkt) und nach 60 Minuten (der Standardinkubationszeit einer normalen Spaltreaktion) zentrifugiert. In der Standardreaktion (STD PMs) wurde ein großer Teil der Substrat-RNA präzipitiert. Nach 15 Minuten war das Spaltprodukt überwiegend im Präzipitat zu finden. Nach 60 Minuten war das Spaltprodukt in den Überstand verschoben und nur ein geringer Anteil an gespaltener RNA noch in der Präzipitatspur zu beobachten. Das Präzipitat enthielt jedoch weiterhin einen großen Anteil der Substrat-RNA. In der Reaktion, der weitgehend die IDRs fehlten (PM-IDR), war dagegen zu beiden Zeitpunkten nur ein geringer

Teil der Substrat-RNA in der Pelletfraktion. Die Spaltaktivität war schwach, aber zu beiden Zeitpunkten war das Spaltprodukt im löslichen Überstand zu finden. Bei Reaktionen mit erhöhter Proteinkonzentration dagegen war keine Spaltung zu beobachten. Der Anteil an Substrat-RNA in der Pelletfraktion war gering. Die Ergebnisse spiegeln das Ergebnis auf Proteinebene wider. Eine Deletion eines großen Teils der IDRs verhindert die Präzipitation sowohl der Proteine wie auch der RNA. Vermutlich wird die RNA nur durch Komplexbildung mit den Protein ko-präzipitiert, wie bereits in **Abbildung 2.18** gezeigt. Die Ergebnisse führen auch zu der Vermutung, dass die Präzipitation der Prozessierungskomplexe für die 3'-Spaltung der RNA nicht essentiell ist. Die stark reduzierte Spaltungseffizienz lässt allerdings die Möglichkeit offen, dass die Präzipitation die Aktivität fördert. In Experimenten, bei denen der PM-IDR mit GAPDH-Spaltsubstrat sowie den beiden in **Abbildung 2.16** gezeigten chimären RNAs verwendet wurde, zeigte sich ein ähnliches Bild (siehe Anhang **Abbildung 9.10**): Die Spaltaktivität des PM-IDR auf SV40 war schwächer als die der Standardproteinmischung. Eine Erhöhung der Proteinkonzentration zeigte keine Aktivität. Wie die Standardproteinmischung konnte der PM mit den Verkürzungen das chimäre Substrat SV40-GAPDH spalten. Bei GAPDH und GAPDH-SV40 wurde keine Spaltung der Substrate im Assay nachgewiesen.

2.2.5 WDR33 E bildet *liquid-liquid droplets*; mPSF und der Spaltkomplex nicht

Ein Charakteristikum der *liquid droplets*, die bei der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung gebildet werden, ist ihr flüssiger Charakter. Dieser äußert sich u. a. in der sphärischen Struktur der Tröpfchen. Um weiter zu überprüfen, ob die beobachtete Präzipitation der 3'-Spaltfaktoren auf einer Phasentrennung beruht, wurde der Spaltkomplex mikroskopisch untersucht. Dazu wurden verschiedene Komponenten der Reaktion fluoreszenzmarkiert. Aliquots von Spaltreaktionen wurden sofort nach Zugabe der RNA auf einen Objektträger gegeben und im Verlauf der Reaktion im konfokalen Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Die Temperierung des Mikroskops betrug dafür die normale Reaktionstemperatur von 30 °C. Die Mikroskopie wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Nadine Bley (*Core Facility Imaging*, Medizinische Fakultät der MLU) ausgeführt.

Ein entsprechendes Experiment ist in **Abbildung 2.25B** gezeigt. Die fluoreszenzmarkierte Komponente der Prozessierungsreaktion war hier mPSF mit GFP-WDR33. Zum Vergleich mit dem Spaltkomplex wurde das GFP-markierte Fragment E von WDR33 (**Abbildung 2.23A**) untersucht (**Abbildung 2.25A**). Auf der Basis der Experimente mit dem pflanzlichen Orthologen (Fang et al., 2019) wurde für dieses Protein die Bildung von *liquid droplets* erwartet.

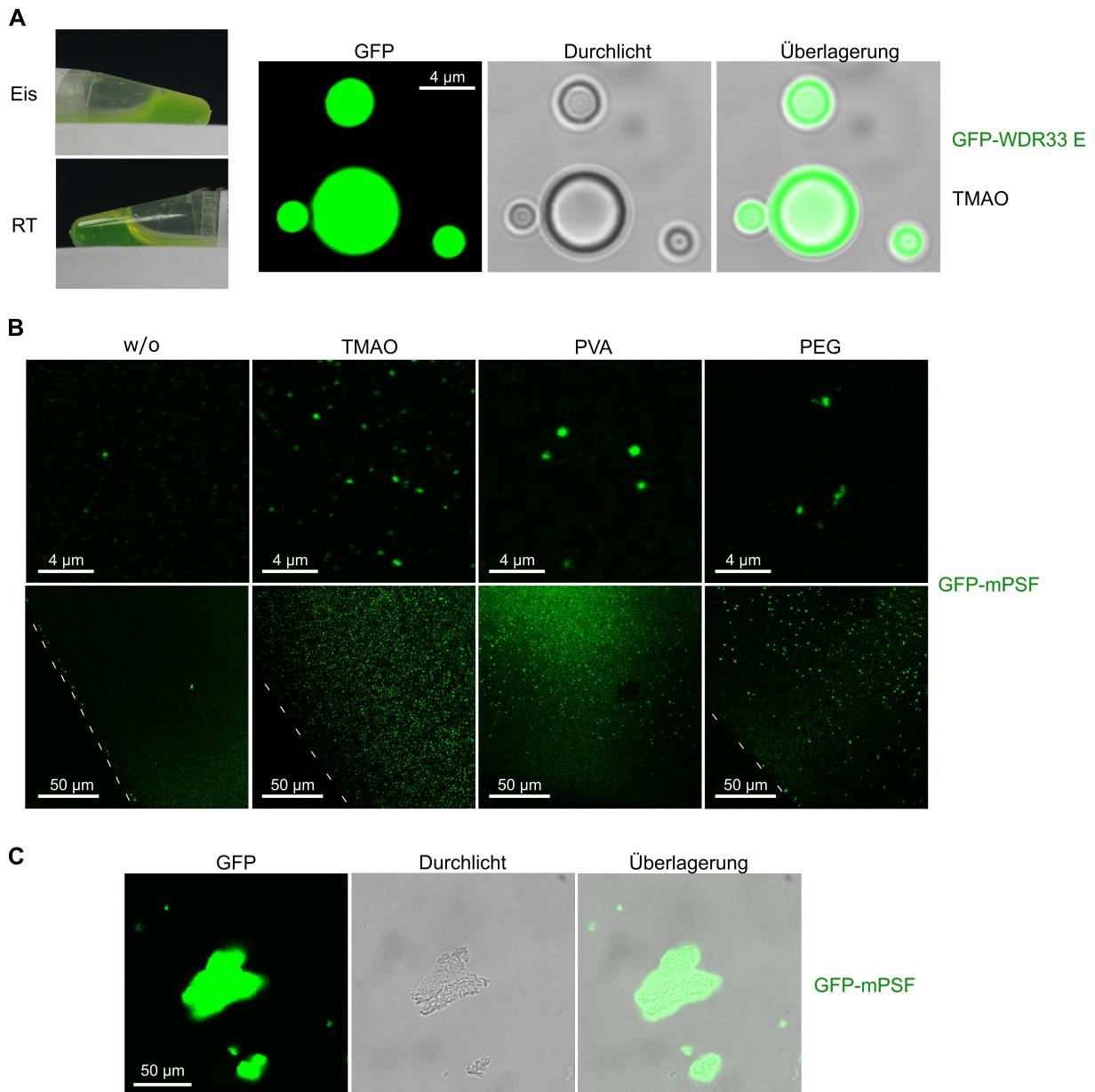


Abbildung 2.25: WDR33 E zeigt Phasentrennung, der Spaltkomplex nicht

(A) Links: Eine Lösung von GFP-WDR33 E (Ni-NTA-Elutionsfraktion) trübt sich auf Eis und bleibt bei Raumtemperatur (RT) klar. Rechts: GFP-WDR33 E mit TMAO-haltigen Spaltbuffer im Fluoreszenzmikroskop. Gezeigt ist das Protein im GFP-Kanal, mit Durchlicht sowie die Überlagerung der beiden Kanäle bei einer Konzentration von 5 μ M. **(B)** Spaltreaktion des rekonstituierten Proteinmixes mit unterschiedlichen *crowding* Reagenzien. Für die Visualisierung wurde mPSF mit GFP-WDR33 verwendet. Die oberen Bilder sind vergrößerte Ausschnitte aus den unteren. Die weiß gestrichelte Linie zeigt die Tropfengrenze auf dem Objektträger. **(C)** Eine mit PVA durchgeführte Spaltreaktion wurde nach 15 minütiger Inkubation zwei Minuten lang zentrifugiert. Hier dargestellt ist das in Reaktionspuffer resuspendierte Pellet. mPSF war mit GFP-WDR33 markiert. Abgebildet ist der GFP-Kanal, das Durchlicht und die Überlagerung beider.

Abbildung 2.25A zeigt GFP-WDR33 E in zwei verschiedenen Situationen. Im linken Bild ist erkennbar, dass eine Lösung des Proteins verschiedene Zustände aufweist (Eluat nach Ni-NTA-Chromatographie; 90 μ M) (Aufnahmen von U. Kühn; ursprüngliche Beobachtung von A.-K. Hoffmeister). Befand sich die Lösung auf Eis, wurde sie trübe, wohingegen die Lösung bei

Raumtemperatur klar blieb. Der Übergang der beiden Zustände war reversibel. Das gleiche Ergebnis wurde auch mit der in den mikroskopischen Experimenten verwendeten Heparin-Fraktion (19,7 μ M) beobachtet (Daten nicht gezeigt). Ein reversibler, temperaturabhängiger Übergang von Phasentrennung zu homogener Lösung ist bereits vielfach beschrieben worden (Ji et al., 2022; Kato et al., 2012; J. Wang et al., 2018). Es war daher zu vermuten, dass die Trübung auf der Bildung von *liquid droplets* beruhte. Auf der rechten Seite der Abbildung sind mikroskopische Aufnahmen der Lösung von GFP-WDR33 E zu sehen. Das Protein bildete unter den Lösungsbedingungen der Spaltreaktion (in Gegenwart von TMAO), aber in Abwesenheit weiterer Proteine und RNA, in sich homogene sphärische, tropfenartige Strukturen. Zur Verdeutlichung dieser Strukturen sind auch das Durchlicht und die Überlagerung des GFP-Kanals und des Durchlichts gezeigt. Diese Strukturen entsprechen der Erwartung an eine Flüssig-Flüssig-Phasentrennung. Experimente mit PVA statt TMAO führten zu dem gleichen Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Experimente ohne *crowder* führten zu weniger und verkleinerten *droplets* (Daten nicht gezeigt).

Verglichen mit den mikroskopischen Aufnahmen für eine Spaltreaktion mit dem Standardproteinmix (GFP-mPSF anstelle von mPSF), waren deutliche Unterschiede erkennbar (vgl. **Abbildung 2.25A** mit **Abbildung 2.25B** und **Abbildung 2.25C**). Die Aufnahmen in **Abbildung 2.25B** und **C** zeigen die Spaltreaktion nach 15-minütiger Inkubation. In allen Spaltreaktionen, die einen *crowder* enthielten (TMAO, PVA, PEG), bildeten sich fluoreszierende, also GFP-mPSF-haltige Aggregate in großer Zahl. Währenddessen fehlten die Aggregate in der Kontrolle ohne *crowder* fast völlig. Menge und Größe der Aggregate waren *crowder*-abhängig. Mit TMAO waren die Aggregate zahlreicher und kleiner als mit PVA. Strukturen in Anwesenheit von PEG waren etwa so klein wie mit TMAO, aber etwas seltener. Generell war im Laufe der Reaktionen ein Zuwachs in Menge und Größe der Gebilde zu beobachten. Alle Aggregate waren jedoch deutlich kleiner als die Tropfen, die von GFP-WDR33E gebildet wurden (vgl. den Größenstandard in der Abbildung).

Die Aggregate, die sich in den Prozessierungsreaktionen bildeten, waren keine runden Tropfen wie sie mit GFP-WDR33 E und generell bei Flüssig-Flüssig-Phasentrennung beobachtet werden. Dies ist in **Abbildung 2.25B+C** zu sehen. In **Abbildung 2.25C** ist erneut eine Spaltreaktion mit PVA als *crowder* gezeigt. Die Reaktion wurde, wie bei Präzipitationsassays, für 15 Minuten bei 30 °C inkubiert und anschließend 2 Minuten bei 20.000 g zentrifugiert. Das Präzipitat wurde in Spaltpuffer resuspendiert, ein Aliquot auf einen Objektträger gegeben und unter dem Mikroskop analysiert. In der Aufnahme ist zu erkennen, dass eine vergleichsweise sehr große blattartige Aggregation und nur wenige kleinere Strukturen gebildet wurden. Runde

oder sphärische Strukturen waren nicht vorhanden. Der restliche Bereich innerhalb des Reaktionstropfen war an Fluoreszenzfarbstoff verarmt. Dies ließ sich auch im Durchlicht beobachten. Das in der Abbildung gezeigte Präzipitat wies eine ähnliche Form wie Hydrogel-Phasen auf (Huai et al., 2022). Das Ergebnis dokumentiert, dass GFP-mPSF unter Reaktionsbedingungen präzipitiert. Vermutlich geschieht dies im Komplex mit anderen 3'-Prozessierungsfaktoren. Dies ist in Übereinstimmung mit den Präzipitationen, die in den SDS-Gelen und Autoradiogrammen zu beobachten waren. Die Spaltungsreaktion zeigte jedoch keine Anzeichen für die Trennung von zwei flüssigen Phasen, wie sie für das WDR33 E-Fragment beobachtet wurde. Bei dem Vergleich ist allerdings zu beachten, dass das Fragment mit einer 4000-fach höheren Konzentration ($5 \mu\text{M}$) eingesetzt wurde. Solch eine Konzentration konnte mit den Proteinen des Proteinmixes nicht erreicht werden.

2.2.6 Proteine und Substrat-RNA ko-aggregieren

Die bisherigen mikroskopischen Experimente zeigten eine Aggregation von GFP-markiertem WDR33 als Bestandteil von mPSF unter Reaktionsbedingungen. Aufgrund der vorangegangenen Experimente war zu vermuten, dass WDR33 im Zusammenhang nicht nur mit mPSF, sondern mit dem gesamten Spaltkomplex aggregierte. Um dies zu überprüfen, wurde die Reaktionen auf Ko-Lokalisation der Proteine und der Substrat-RNA in den Aggregaten untersucht. Zwei dieser Ko-Lokalisationsexperimente sind in **Abbildung 2.26** gezeigt.

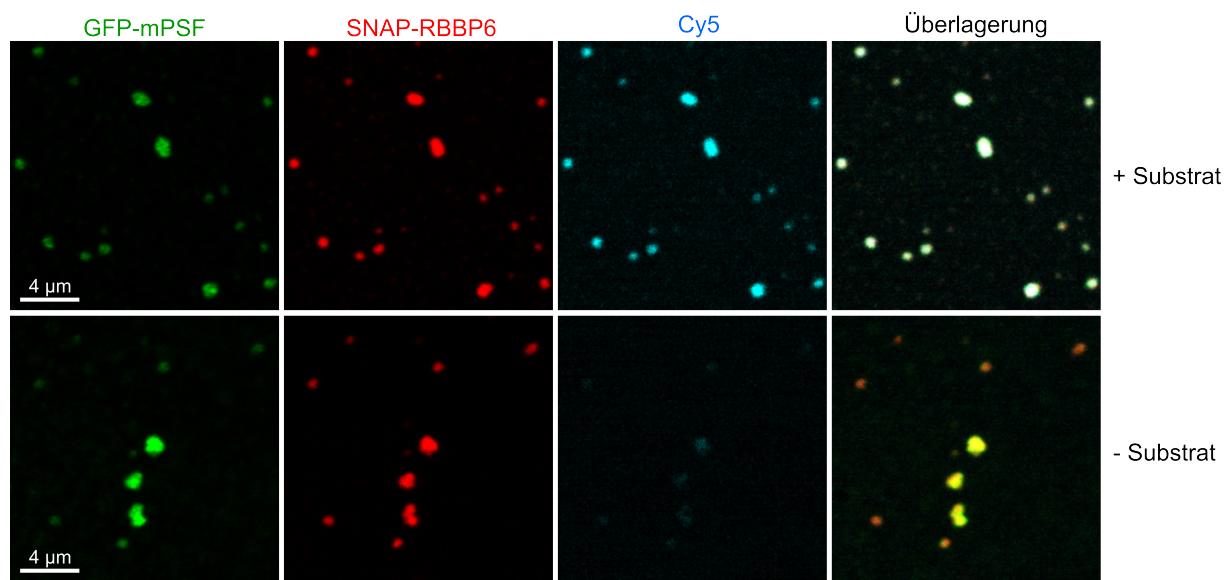


Abbildung 2.26: Ko-Lokalisation von mPSF, RBBP6 und Substrat-RNA in Präzipitaten
 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer Spaltreaktion mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenz-Fusionen an mPSF (GFP) und RBBP6 (SNAP) sowie mit Cy5-markierten DNA-Oligomeren, die mit dem 5'-Ende der SV40/late RNA hybridisiert waren. Die Reaktionen wurden mit (oben) bzw. ohne Substrat-RNA (unten) durchgeführt. Die Aufnahmen zeigen den grünen (GFP-), roten (SNAP-) und blauen (Cy5-) Bereich sowie die Überlagerung der Kanäle. Kommt es zur Ko-Lokalisation von grün und rot, ist in der Überlagerung gelb zu sehen. Wenn zusätzlich die RNA ko-lokalisiert, ist weiß erkennbar.

In **Abbildung 2.26** sind die Aufnahmen von Spaltreaktionen abgebildet, bei denen GFP-mPSF und SNAP-RBBP6 (*full-length*) Fluoreszenzfusionen zum Studium der Ko-Lokalisation verwendet wurden. Die oberen Aufnahmen zeigen Reaktionen mit, die unteren ohne Substrat-RNA. Für die Lokalisation der RNA wurde ein Cy5-markiertes DNA-Oligomer verwendet, welches mit dem 5'-Ende der Substrat-RNA hybridisierte. Das Oligomer war in beiden Reaktionen enthalten. GFP ist in grün, SNAP in rot und Cy5 in blau dargestellt. Im Falle einer Ko-Lokalisation der beiden Proteine kommt es in der Überlagerung zur Gelbfärbung. Sind Proteine und RNA ko-lokalisiert, entsteht eine Weißfärbung. Vergleicht man die verschiedenen Aufnahmen der Reaktion in Gegenwart von Substrat-RNA, so ist zu erkennen, dass sowohl beide Proteine als auch die RNA in kompakten Strukturen angereichert sind. Die Überlagerung der Kanäle zeigt die Ko-Lokalisation von beiden Proteinen und der RNA. Die Reaktion ohne RNA zeigt ebenfalls eine Ko-Lokalisation der Proteine. Da das fluoreszenzmarkierte Oligonukleotid in der Reaktion anwesend, aber nicht in den Aggregaten ko-lokalisiert war, kann daraus geschlossen werden, dass die Cy5-Färbung der Aggregate im oberen Teil der Abbildung eine spezifische RNA-Färbung durch die Hybridisierung des Oligomers repräsentiert. Dementsprechend stellt dieses Experiment die Ko-Lokalisation von mPSF und RBBP6 in den Aggregaten mit und ohne Substrat-RNA dar. Weitere Experimente mit anderen GFP-markierten Prozessierungsfaktoren, wie CstF und PAP, bestätigten dieses Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

2.2.7 Aggregate mit GFP-CstF und WDR33 E zeigen einen Austausch mit der Umgebung

Ein weiteres Merkmal von *liquid droplets* ist die Fähigkeit des schnellen Austauschens sowohl mit der umgebenen, schwach konzentrierten als auch innerhalb der konzentrierten Phase. Für diesen Nachweis können *fluorescence recovery after photobleaching- (FRAP-)*Experimente genutzt werden. Bei diesen Experimenten werden Strukturen gezielt durch einen Laserstrahl gebleicht. Danach wird eine Wiederherstellung der Struktur durch Rückkehr der Fluoreszenz (*recovery*) untersucht. Die Rückkehr der Fluoreszenz beruht auf einem Austausch der gebleichten gegen ungebleichte Moleküle durch Diffusion. Hier wurden Reaktionen mit GFP-CstF Δ IDR (CstF64 ohne IDR, siehe **Abbildung 2.17**) und GFP-mPSF gegenübergestellt.

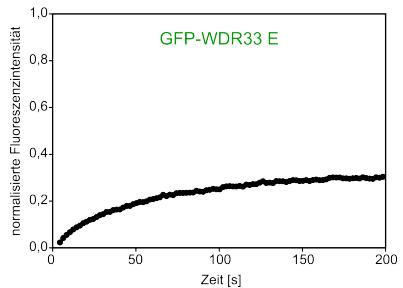
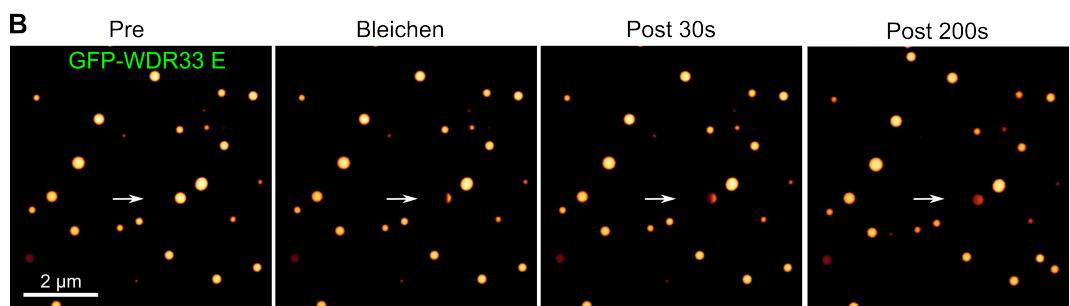
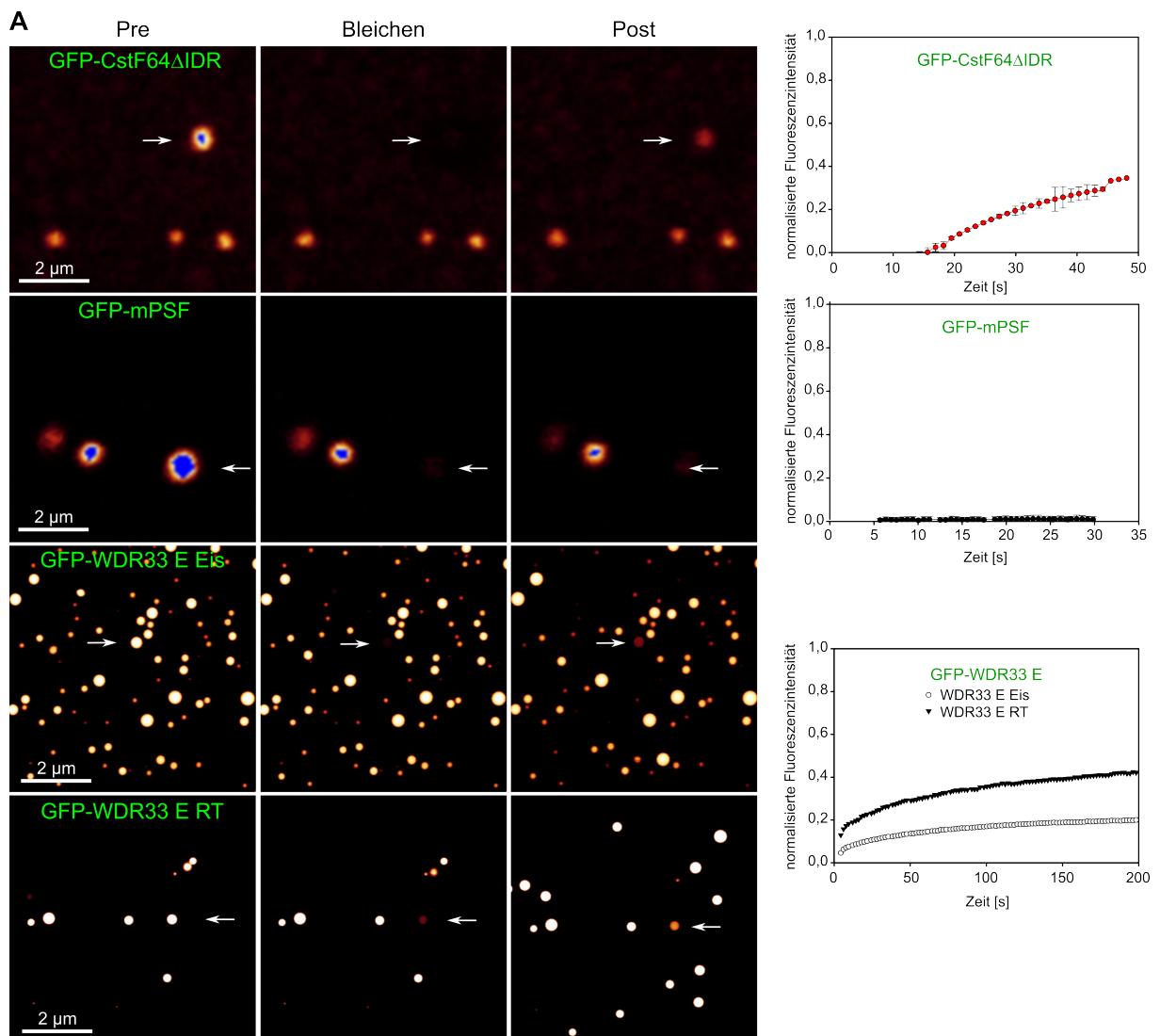


Abbildung 2.27: Präzipitate mit GFP-CstF besitzen ähnliche Fluoreszenzrückkehr wie WDR33 E
(A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zweier FRAP-Experimente von Spaltreaktionen (n=3) und zwei FRAP-Experimenten mit WDR33 E ohne RNA (n=2). Die Spaltreaktionen wurden mit dem gesamten Proteinmix durchgeführt. GFP-CstF64ΔIDR bzw. GFP-mPSF ersetzen die entsprechenden Wildtyp-Proteine. Die Reaktionen mit WDR33 E (2,5 μ M) wurden in TMAO-haltigen Spalt- und Proteinverdünnungspuffer durchgeführt. Die Reaktion WDR33 E Eis ist standardmäßig mit dem Protein auf Eis gestartet worden. Die Reaktion WDR33 E RT wurde mit einer „klaren“ Proteinlösung und Puffer auf Raumtemperatur gestartet. Links zeigt die Aufnahme vor dem Bleichen, in die Mitte den Moment des Bleichens und rechts den Zeitpunkt 30 Sekunden (bzw. 200 Sekunden für WDR33 E) nach dem Bleichen. Zur besseren Visualisierung wurde eine Falschfarben-Darstellung verwendet. Die Rückkehr der Fluoreszenz ist rechts graphisch dargestellt (WDR33 E Eis (O) und WDR33 E RT (▼)). Eine normalisierte Fluoreszenzintensität von 1 gibt eine vollständige Rückkehr der Fluoreszenz an. **(B)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines *half*-FRAP-Experimentes mit WDR33 E RT. Gezeigt sind Prä-, Bleichen und 30 bzw. 200 Sekunden post-Bleichen. Zur besseren Visualisierung wurde eine Falschfarben-Darstellung verwendet. Die Rückkehr der Fluoreszenz ist unterhalb der Aufnahmen graphisch dargestellt. Eine normalisierte Fluoreszenzintensität von 1 gibt eine vollständige Rückkehr der Fluoreszenz an.

Abbildung 2.27A zeigt ein *fluorescence recovery after photobleaching*- (FRAP-)Experiment der Spaltungsreaktionen. Die drei Aufnahmen zeigen jeweils einen Ausschnitt vor, während und 30 Sekunden nach dem Bleichen. Für eine bessere Visualisierung ist GFP mit einer Falschfarbe (rot) dargestellt. Blaufärbung zeigt eine Überexposition des Farbstoffs. In dem Experiment mit GFP-CstFΔIDR ist eine Rückkehr der gebleichten Struktur und damit ein Diffusionsaustausch der Fluoreszenz zu beobachten. 50 Sekunden nach dem Bleichen wurde eine normalisierte Fluoreszenzintensität von ca. 0,4 erreicht. Eine weitere Fluoreszenzzunahme wurde zu späteren Zeitpunkten nicht mehr beobachtet. Reaktionen mit GFP-CstF führten zum gleichen Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Die Reaktion mit GFP-mPSF lässt auch nach mehr als einer Stunde Inkubation keine Rückkehr der Fluoreszenz erkennen (Daten nicht gezeigt). Dass in den hier untersuchten Aggregaten ein Austausch von mPSF in einem langen Beobachtungszeitraum gar nicht und ein Austausch von CstF nur langsam und unvollständig erfolgt, stützt die bereits aus den früheren Experimenten gezogene Schlussfolgerung, dass die 3'-Prozessierungsfaktoren unter Reaktionsbedingungen aggregieren oder präzipitieren und keine Flüssig-Flüssig-Phasentrennung durchmachen. Bei Phasentrennungen ist ein schneller Austausch innerhalb weniger als 5 bis maximal 30 Sekunden zwischen hochkonzentrierten Tropfen und der proteinverarmten Umgebung zu erwarten (Alberti & Hyman, 2016; Maharana et al., 2018). Dieser Prozess wird jedoch vermutlich protein- und konzentrationsabhängig sein. Aus diesem Grund wurden zwei Experimente mit WDR33 E (2,5 μ M) durchgeführt. Diese enthielten, anders als die zwei zuvor beschriebenen Experimente, lediglich das Protein, Spaltpuffer mit TMAO und Proteinverdünnungspuffer. Für das erste Experiment wurde WDR33 E standardmäßig auf Eis zur Reaktion gegeben und anschließend ein Aliquot der Reaktion auf den Objektträger gegeben. Im FRAP-Experiment ist zu sehen, dass es zu einer

leichten Fluoreszenzrückkehr kam und eine normalisierte Fluoreszenzintensität von ca. 0,2 nach 200 Sekunden erreicht wurde. Im zweiten Experiment wurde WDR33 E auf RT erwärmt, sodass die Proteinlösung klar wurde. Anschließend erfolgte eine Zugabe dieser zu einer Reaktion bei RT. Hierbei zeigte sich zum einen, dass zu Beginn deutlich weniger und kleinere *liquid droplets* vorhanden waren als im Experiment zuvor. Die *droplets* wuchsen im Laufe der Reaktion und nahmen in ihrer Zahl zu. Zum anderen zeigte sich nach dem Bleichen eine stärkere Fluoreszenzrückkehr (normalisierte Fluoreszenzintensität ca. 0,4 nach 200 Sekunden). Somit besitzt das zu *liquid droplets* neigende WDR33 E eine sehr ähnliche Fähigkeit zur Rückkehr der Fluoreszenz wie die Aggregate der Spaltreaktionen mit GFP-CstF64ΔIDR. Ein Austausch ist möglich, sowohl in den Aggregaten als auch in *liquid droplets*. Dabei kann der Austausch sowohl innerhalb dieser als auch von außerhalb dieser Phasen aus der schwach konzentrierten Umgebung geschehen. In **Abbildung 2.27B** ist zusätzlich ein *half*-(FRAP-) Experiment von der WDR33 E RT Reaktion dargestellt. Hierfür wurde nur ein Teil des *droplets* gebleicht. In den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ist eine Zunahme der Fluoreszenz (von rechts nach links) nach 30 bzw. 200 Sekunden zu beobachten. Die normalisierte Fluoreszenz beläuft sich auf ca. 0,3. Ein solches Experiment mit Aggregaten des Spaltkomplexes war aus zeitlichen Gründen nicht mehr möglich.

Anhand dieser Experimente kann dargestellt werden, dass WDR33 E, wie bereits in **Kapitel 2.2.5** beschrieben, in der Lage ist *liquid droplets* zu bilden. Dies beruht auf der Tatsache, dass es die Eigenschaften der Tropfenbildung besitzt, das Protein Trübungsverhalten aufweist und nach Bleichen ein Austausch mit der Umgebung sowie innerhalb des Tropfens möglich ist. Auch Spaltkomplexe mit GFP-CstF64ΔIDR präsentieren die zuletzt beschriebene Eigenschaft, die Präzipitationsexperimente und die Form der Aggregate, zeigten jedoch, dass der Spaltkomplex in dieser Form keine *liquid droplets* bildet. Aufgrund der Abhängigkeit von vielen Faktoren sollte ein FRAP-Experiment nicht als alleiniges Merkmal dafür genutzt werden, die Assemblierung von Aggregationen oder Strukturen als *liquid droplets* zu (Alberti et al., 2019).

2.3 mPSF-Komplexe ohne hFip1 und CPSF4 sind aktiv in der 3'-Prozessierung

2.3.1 hFip1 und CPSF4 sind nicht essentiell für die Spaltungsreaktion

Bei Untersuchungen zur Proteinpräzipitation und der Rolle von intrinsisch ungeordneten Regionen (*IDR, intrinsic disordered regions*) bei der Prä-mRNA-3'-Prozessierung wurden nicht nur IDRs von WDR33 verkürzt, sondern auch mPSF-Komplexe ohne hFip1 und CPSF4 exprimiert und gereinigt. Diese mPSF-Komplexe sind entstanden, um ein mögliches, höheres, Expressionslevel und die damit verbundene Ausbeute an gereinigtem Komplex nach der Präparierung zu erhalten. Dafür sind bei der Klonierung Konstrukte aus WDR33 und CPSF1 bzw. CPSF4 und hFip1 sowohl jeweils alleine oder in Kombination entstanden. Dadurch wurde es ermöglicht, die mPSF-Komplexe ohne hFip1 oder CPSF4 darzustellen (siehe **Abbildung 2.28**).

hFip1 ist mit zwei Kopien Bestandteil von mPSF und wird von den CPSF4 Zinkfingern 4 und 5 gebunden (S. M. L. Barabino et al., 2000; Hamilton & Tong, 2020; Muckenfuss et al., 2022). Beide Kopien interagieren mit PAP und sorgen mit deren Bindung an CPSF für eine prozessive Polyadenylierungsreaktion (Kaufmann et al., 2004; Muckenfuss et al., 2022; Preker et al., 1995). In der Literatur wird dabei kontrovers diskutiert, ob die beiden hFip1 Kopien eine oder zwei PAP-Kopien dafür binden (Casañal et al., 2017; Hamilton & Tong, 2020; Muckenfuss et al., 2022). Des Weiteren kommt es zu Interaktionen mit weiteren 3'-Prozessierungsfaktoren wie WDR33 (Clerici et al., 2017; Ohnacker, 2000), CPSF1, CstF77 (Kaufmann et al., 2004; Preker et al., 1995), Symplekin (Ghazy et al., 2009) und CF I (Venkataraman et al., 2005). Neben der Isoform 1 von hFip1 existiert eine alternative Spleiß-Variante (Isoform 4). Bei dieser sind die letzten ca. 200 Aminosäuren der Isoform 1 mit einer RS-reichen Domäne nicht existent. Dies ist ähnlich dem Hefehomolog Fip1 (Kaufmann et al., 2004; Preker et al., 1995).

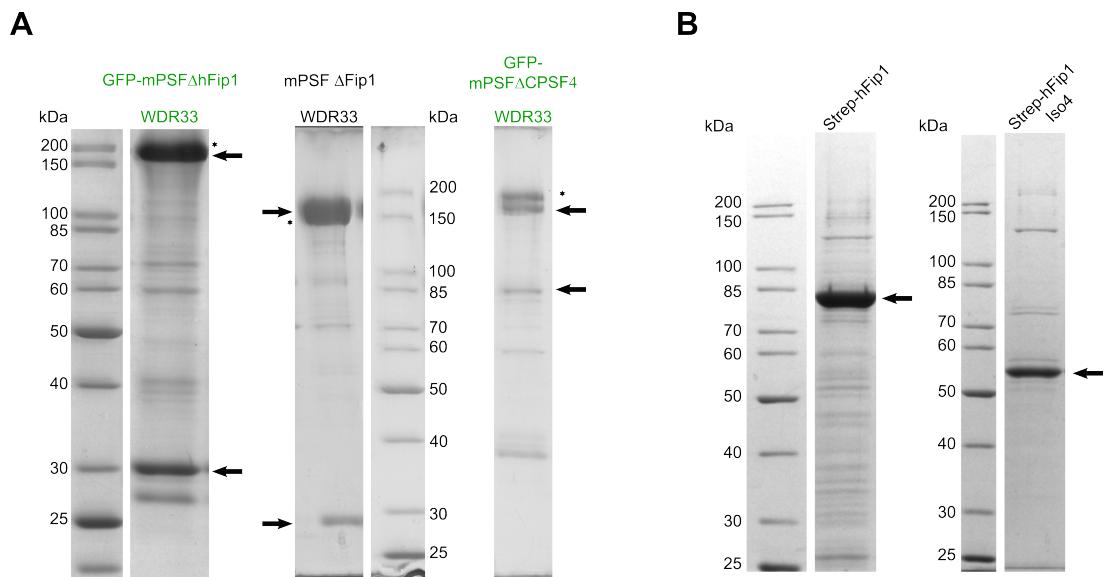
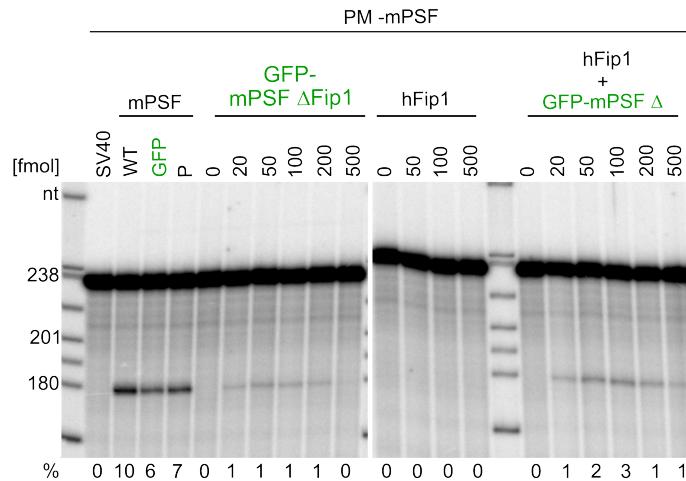


Abbildung 2.28: Präparationen von mPSFΔhHip1, mPSFΔCPSF4, hHip und hHip Isoform 4
 Gezeigt sind die Flag Elution #1 Fraktionen unterschiedlicher mPSFΔhHip1 und mPSFΔCPSF4 Konstrukte (**A**) auf Coomassie gefärbten SDS-PAGEs sowie die erste Strep-Elutionsfraktion von hHip1 bzw. der Isoform 4 (**B**). Die jeweiligen Proteine sind mit einem Pfeil gekennzeichnet und das jeweilige WDR33 ist mit einem Stern gekennzeichnet. Proteine mit einer GFP-WDR33 Fusion sind in grün dargestellt.

Abbildung 2.28 zeigt die Coomassie-gefärbten SDS-Gelausschnitte der finalen Flag-Elutionsfraktion der verschiedenen mPSFΔ-Komplexe sowie der finalen Strep-Elutionsfraktion von hHip1-Isoformen 1 und 4. Die Klonierung und Reinigung der mPSF-Komplexe wurde von Anne-Katrin Hoffmeister und Uwe Kühn durchgeführt. Für die Analyse der verschiedenen mPSF-Subkomplexe (Abbildung 2.28) wurden diese in einem Spaltassay titriert. Dazu wurden neben der Titration der einzelnen Komplexe bzw. Proteine auch mPSFΔhHip1 mit separat gereinigtem hHip1 komplementiert und zusammen titriert. Dieses Experiment ist in Abbildung 2.29A dargestellt.

A



B

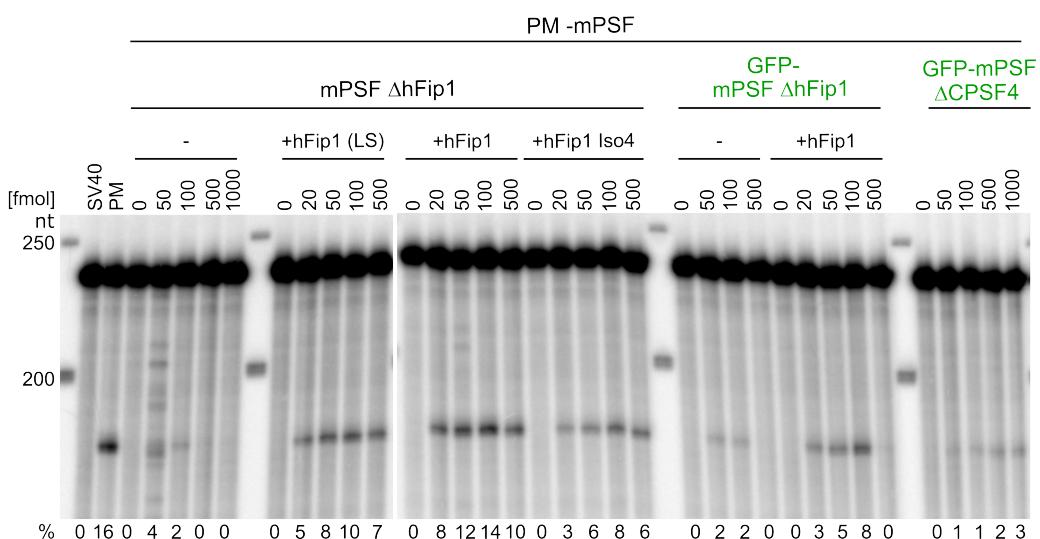


Abbildung 2.29: hFip1 und CPSF4 sind nicht essentiell für die 3'-Prozessierung von prä-mRNAs
(A) Titrationen von mPSF-Präparationen, hFip1 und der Komplementation der beiden. Für die mPSF-Präparationen wurde jeweils eine Präparation mit Wildtyp WDR33 GFP-Fusion verwendet. Als Kontrollen wurde Wildtyp, GFP- Wildtyp und GFP-P-Fragment verwendet. Für dieses Experiment enthielt der Proteinmix kein mPSF. Präparationen mit GFP-Fusionsprotein sind in grün dargestellt. Die Quantifizierung der Spaltaktivität ist unterhalb des Autoradiogramms, Größen der Markerbanden sind links angegeben. **(B)** Analyse der Spaltaktivität von mPSFΔhFip1 und der Komplementation mit drei verschiedenen Präparationen von hFip1(Isoform 1 (präpariert von Lars Schönenmann (LS)), Isoform 1 und Isoform 4 (Iso 4)), die in eine konstante Menge an mPSFΔhFip1 (50 fmol) titriert wurden. Zusätzlich ist die GFP- Fusionsvariante von mPSFΔhFip1 (grün dargestellt) mit und ohne hFip1 sowie eine GFP-Fusion einer mPSF-Präparation ohne CPSF4 titriert worden. Präparationen mit GFP-Fusion sind in grün dargestellt. Die Quantifizierung der Spaltaktivität ist unterhalb des Autoradiogramms, Größen der Markerbanden sind links angegeben.

GFP-markierte Komplexe sind in der Abbildung in Grün aufgeführt. Als Positivkontrollen wurden mit Wildtyp-, GFP- und mPSF P drei verschiedene mPSF-Präparationen eingesetzt. Dafür wurde für GFP-mPSF WDR33 bzw. für mPSF P die WDR33 P Verkürzung markiert (siehe **Abbildung 2.23**). Hierbei zeigt sich, dass der Wildtyp den Proteinmix am stärksten

(10%) und die beiden anderen mPSF-Komplexe nicht so stark stimuliert (6 bzw. 7%). Bei der Titration von GFP-fusioniertem mPSF Δ hFip1 ist zu sehen, dass der Komplex den Proteinmix komplementierte und bereits bei einer Stoffmenge von 20 fmol spaltaktiv war. Die Spaltaktivität war jedoch im Vergleich zu den Kontrollen mit 1% sehr schwach. hFip1 alleine hatte in Kombination mit dem Proteinmix keine Aktivität (siehe **Abbildung 2.29A**). Die Komplementation des Δ hFip1-Komplexes mit gereinigtem Strep-hFip1 führte zu einer Stimulation. Die Aktivität war bei 100 fmol mit 3% Spaltung am größten, allerdings war die Aktivität um den Faktor 2 bis 3 geringer als die der Kontrollen.

In **Abbildung 2.29B** ist eine Titration von drei verschiedenen hFip1-Präparationen gezeigt. Neben der in **Abbildung 2.29A** verwendeten Isoform 1-Präparation (hFip1) wurde eine weitere Präparation derselben Isoform (Dissertation Lars Schönenmann, 2018; hFip1 LS) und eine von Isoform 4 (hFip1 Iso 4) verwendet, welche mPSF Δ hFip1 komplementierten. mPSF Δ hFip1 ist konstant mit einer Menge von 50 fmol eingesetzt worden. Als Kontrolle diente der Standard-Proteinmix, der die Substrat RNA mit ca. 16% gespalten hat. Die Titration von mPSF Δ hFip1 zeigte erneut mit ca. 2% eine schwache Aktivität (Spur mit 100 fmol mPSF Δ hFip1). Spur 4 (50 fmol) ist mit RNase kontaminiert und konnte nicht zur Auswertung verwendet werden. Wurde mPSF Δ hFip1 mit einer der beiden hFip1 Wildtyp-Präparationen (Isoform 1) komplementiert, war bereits bei 20 fmol Spaltaktivität zu sehen (5% hFip1 (LS); 8% hFip1; 3% Iso4). Bei einer Menge zwischen 50 und 100 fmol wurde bei allen drei Präparationen die Sättigung mit 8-12% Spaltung erreicht. Die Aktivität war der der Kontrolle sehr ähnlich. Die beiden unabhängigen Präparationen von Isoform 1 verhielten sich ähnlich. Wurde die Isoform 4 verwendet, war die Spaltung der Substrat-RNA um den Faktor 2 schwächer. Auch GFP-mPSF Δ hFip1 ließ sich mit hFip1 komplementieren, war mit ca. 8% Spaltung jedoch schwächer als mit dem nicht GFP-markierten Komplex. Insgesamt kann aus den Ergebnissen abgeleitet werden, dass hFip1 für eine effiziente Spaltung der Prä-mRNA nötig, aber das Protein nicht essentiell ist. Zusätzlich scheint der C-Terminus von hFip1 für eine leichte Stimulation des Proteinmixes zu sorgen, da die Spalteffizienz der Isoform 4 etwas schwächer war.

Interessanterweise zeigte eine Titration von GFP-mPSF Δ CPSF4 ebenfalls eine schwache Spaltaktivität bei Stoffmengen ab 500 fmol (2-3%). Dies ist erstaunlich, da CPSF4 zusammen mit WDR33 das Polyadenylierungssignal AAUAAA erkennt (Clerici et al., 2018; Schönenmann et al., 2014). Zwar wurde nicht getestet, ob die Spaltung der RNA in Abwesenheit von CPSF4 noch AAUAAA-abhängig ist, jedoch war, im Rahmen der Auflösung des Gels erkennbar, dass die Spaltung an derselben Stelle erfolgt.

Das Experiment liefert einen ersten Hinweis, dass auch CPSF4 für die Spaltung der RNA wichtig, aber nicht essentiell ist. Dieses unerwartete Ergebnis müsste in zukünftigen Experimenten verifiziert und genauer untersucht werden.

2.3.2 hFip1 ist nicht essentiell für die Polyadenylierungsreaktion

Eine Reihe von Untersuchungen zur Rolle von hFip1 in der 3'-Prozessierung haben zu der Vorstellung geführt, dass hFip1 die Assoziation der PAP mit dem Prozessierungskomplex vermittelt. Die in den letzten Experimenten gezeigte Entbehrlichkeit für die Spaltungsreaktion ist mit diesem Modell kompatibel, da auch die PAP nicht unter allen Bedingungen für die Spaltung essentiell ist (Boreikaite et al., 2022). Es ist jedoch zu erwarten, dass ein mPSFΔhFip1-Komplex in der Polyadenylierung nicht funktionieren sollte, da PAP nicht mehr zu mPSF rekrutiert werden würde, ähnlich einem mPSF mit Mutationen in den Zinkfingern 4 und 5 von CPSF4 (Muckenfuss et al., 2022). Daher wurde die Funktionstüchtigkeit des mPSFΔhFip1-Komplexes in der Polyadenylierung experimentell überprüft. Dafür wurden mPSFΔhFip1, hFip1 und die Kombination der beiden Präparationen titriert. Die Assays mit L3pre als Substrat-RNA sind in **Abbildung 2.30** dargestellt.

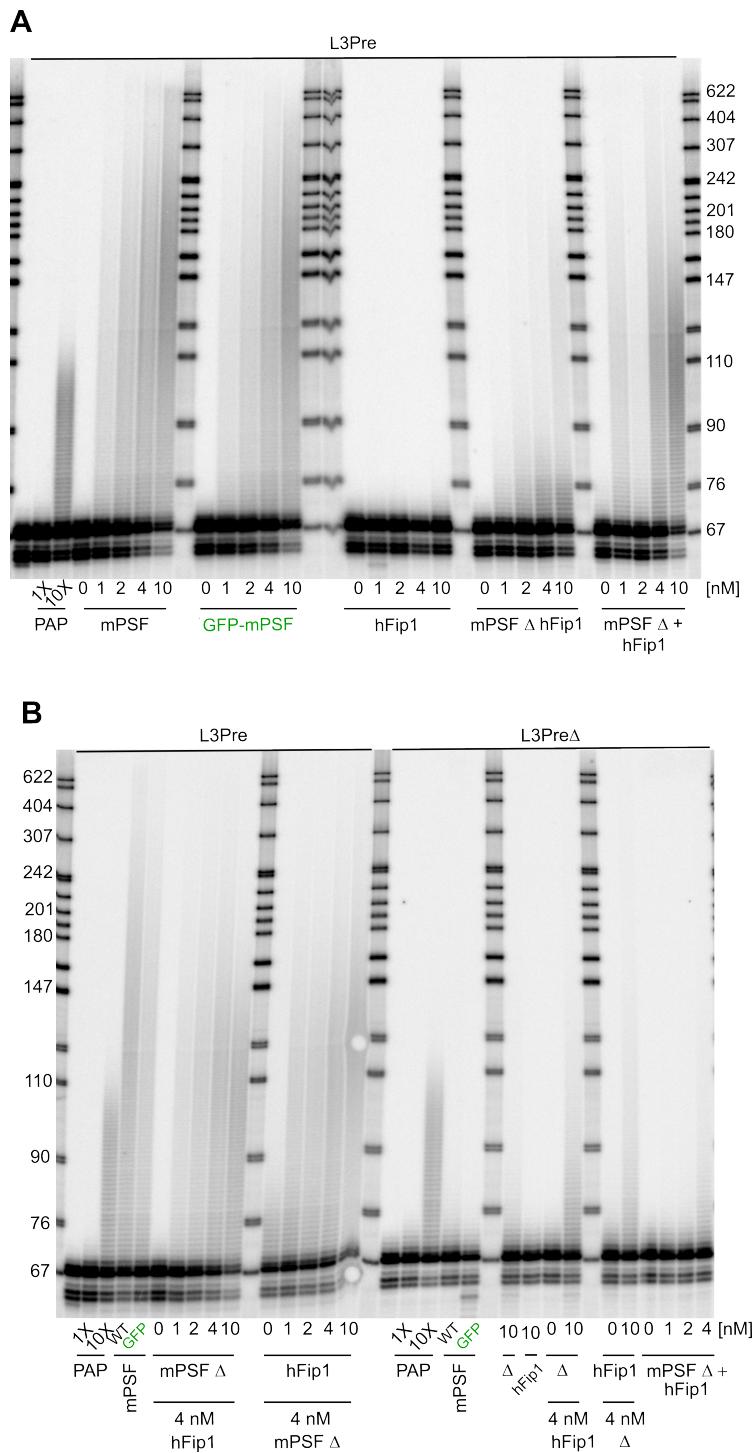


Abbildung 2.30: mPSF ohne hFip1 ist aktiv in der Polyadenylierung

(A) Analyse eines Polyadenylierungsassays von mPSF dargestellt in einem Autoradiogramm einer 8%igen denat. PAGE. Verschiedene mPSF-Präparationen wurden zwischen 0 und 10 nM titriert. Dabei wurde die mPSFΔhFip1-Präparation alleine verwendet oder mit separat gereinigtem Strep-hFip1 komplementiert. Die L3pre-RNA (4 nM) diente als Substrat. Die Reaktionen, mit Ausnahme der RNA alleine und 10x PAP, wurden mit 0,2 nM PAP (1x PAP) für 30 Minuten inkubiert. Die Größen der Markerbanden sind rechts angegeben. **(B)** Analyse der Polyadenylierungsaktivität der Titration von mPSFΔ mit konstanter Konzentration an hFip1 (4 nM) und umgekehrt dargestellt in einem Autoradiogramm einer 8%igen denat. PAGE. Neben der 1x und 10x PAP-Kontrolle wurden eine Wildtyp- und eine GFP-mPSF-Präparation (4 nM) als positive Kontrollen verwendet. Neben L3Pre wurde L3PreΔ als Spezifitätskontrolle verwendet (4 nM). mPSFΔhFip1 wurde für die Übersichtlichkeit zum Teil mit einem einfachen Δ abgekürzt.

Die in **Abbildung 2.30A** gezeigten Polyadenylierungssassays wurden mit 4 nM L3pre, 0,2 nM PAP und variablen Mengen mPSF für 30 Minuten durchgeführt. Zur Kontrolle wurde sowohl mPSF Wildtyp als auch GFP-mPSF verwendet. Beide Präparationen unterschieden sich hinsichtlich der Polyadenylierung nur geringfügig. Bereits bei der geringsten Konzentration war eine Stimulation der Poly(A)-Polymerase zu beobachten, bei der ein kleiner Anteil der Substrate von PAP verlängert wurde. Mit steigender Konzentration von mPSF wurden die angehängten Poly(A)-Schwänze nicht nur länger, sondern es wurden auch mehr Substrate polyadenyliert. hFip1 alleine war nicht in der Lage, PAP zu stimulieren. Mit der höchsten Konzentration kam es allenfalls zum Anhängen einzelner Adenylat-Reste an eine geringe Anzahl von Substratmolekülen. Die Anzahl der angehängten Adenylate schien minimal größer zu sein als in der Reaktion mit 1x PAP (vgl. Spuren 2 und 21). Wie bereits in der Spaltung zeigte die Titration des mPSFΔhFip1-Komplexes auch in der Polyadenylierung Aktivität. Bereits mit 1 nM kam es zu einer beobachtbaren Verlängerung der RNA. Mit steigender Konzentration stieg auch die Länge des Poly(A)-Schwanzes. Allerdings war die Stimulation der PAP deutlich schwächer als beim vollständigen mPSF-Komplex. Während bei der höchsten Konzentration von mPSFΔhFip1 (10 nM) ca. 100 Nukleotide angehängt wurden, waren es bei der geringsten Konzentration von mPSF bereits ca. 180 Nukleotide. Bei Komplementation von mPSFΔhFip1 mit getrennt gereinigtem Strep-hFip1 war die Stimulation der PAP deutlich ausgeprägter. Allerdings beschränkte sich die Verlängerung der RNAs überwiegend auf 50 bis 100 Nukleotide. Die Stimulation war damit geringer als mit „nativem“ mPSF.

Abbildung 2.30B zeigt die Titration von mPSFΔhFip1 bei einer konstanten hFip1-Konzentration von 4 nM und umgekehrt. Als Kontrollen sind die Reaktionen von WT und GFP-mPSF mit je 4 nM gezeigt. Die Titration von mPSFΔhFip1 bestätigt noch einmal, dass 4 nM hFip1 alleine die Poly(A)-Polymerase nicht stimulieren kann. Mit Zusatz von mPSFΔhFip1 kam es dagegen zur Stimulation der PAP. Steigende Konzentrationen führten zur erhöhten PAP-Stimulation, die hauptsächlich darin sichtbar wurde, dass mehr Substrate verlängert wurden. Die Aktivität von „nativem“ mPSF wurde hingegen nicht erreicht. Das gleiche Bild zeigte sich im komplementären Experiment. Der mPSFΔhFip1-Komplex allein führte zum Anhängen einzelner Adenylat-Reste an die RNA und mit steigender hFip1 Konzentration wurde PAP stärker stimuliert. Zur Kontrolle der Spezifität wurde für den Assay neben L3pre auch die L3preΔ-Variante mit mutiertem Polyadenylierungssignal verwendet. Hierbei zeigte sich, dass die Polyadenylierung durch mPSFΔhFip1 sowie die Komplementation mit hFip1 weniger AAUAAA-spezifisch war als die Reaktion mit nativem mPSF. Beim Vergleich der Spuren 10 und 16 der Polyadenylierungsreaktionen mit der mit den Spuren, bei denen die RNA-

Mutante eingesetzt wurde (Spur 27/29), scheint es als wären die unspezifisch verlängerten RNAs in ihrer Anzahl deutlich weniger und die Länge der Poly(A)-Schwänze geringer.

Insgesamt lässt sich aus diesen Polyadenylierungsexperimenten schließen, dass mPSFΔhFip1 die Poly(A)-Polymerase stimulieren kann. Allerdings ist die Aktivität deutlich geringer als die von nativem mPSF, also dem Komplex, der hFip1 enthält. Jedoch scheint diese unspezifischer zu sein. Die Fähigkeit von mPSFΔhFip1, die PAP zu stimulieren, führt zu der Vermutung, dass der Kontakt zwischen PAP und mPSF nicht ausschließlich durch hFip1 vermittelt wird.

In Experimenten, in denen L3preA₁₅ als Substrat diente, zeigten sich vergleichbare Ergebnisse (siehe Anhang **Abbildung 9.12**). In diesen kam es zu einer minimalen Stimulation von PAP durch hFip1 Isoform 1, welche die Isoform 4 nicht aufweisen kann. Die Komplementation von mPSFΔhFip1 mit hFip1 Isoform 1 ist auch hier schwächer als der Wildtyp-Komplex. Die Komplementation kann die PAP jedoch stärker stimulieren als hFip1 Isoform 4. Mit der Isoform 4 kommt es lediglich zu einer Verlängerung der Poly(A)-Schwänze von ca. 120 Nukleotiden, während diese mit Isoform 1 ca. viermal länger sind. Das spiegelt die Ergebnisse der RNA-Spaltung wider, die in **Abbildung 2.29B** dargestellt wurden. Auch in der Spaltung weist hFip1 Isoform 4 schwächere Aktivitäten auf als Isoform 1. In beiden Fällen sind die Stimulationen erneut unspezifisch. Interessanterweise zeigte eine Reaktion mit 10 nM mPSFΔCPSF4 eine schwache Stimulation der Poly(A)-Polymerase, sodass scheinbar weder hFip1 noch CPSF4 essentiell für die Polyadenylierung sind. Auch hier wurde damit das Ergebnis aus dem Experiment der RNA-Spaltung (vgl. **Abbildung 2.29B**) bestätigt. Für eine effiziente Spaltung und Polyadenylierung von Vorläufer-mRNAs werden die mPSF-Untereinheiten hFip1 und CPSF4 nach Auswertung der vorliegenden Ergebnisse aber wahrscheinlich benötigt.

3 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Rekonstitution der 3'-Prä-mRNA-Spaltung mit rekombinanten humanen Proteinen und damit die Identifikation der benötigten Prozessierungsfaktoren. Bei diesen Experimenten wurde festgestellt, dass, zusätzlich zu den bereits bekannten Proteinen, RBBP6 für die Reaktion essentiell ist. Mit der Rekonstitution wurde ein System für weitere Untersuchungen zur 3'-Prozessierung etabliert. Nach der erfolgreichen Rekonstitution wurde untersucht, ob der Spaltkomplex unter Reaktionsbedingungen eine Flüssig-Flüssig-Phasentrennung zeigt. Hinweise auf dieses Phänomen gab es durch Experimente von F. Kluge und dieser Arbeit. Dafür wurden Präzipitationsexperimente auf RNA- und Protein-Ebene sowie mikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl die Prozessierungsfaktoren als auch die RNA unter Reaktionsbedingungen Präzipitate bilden. Evidenz für eine Phasentrennung gab es nicht.

3.1.1 Rekonstitution der 3'-Prä-mRNA Spaltungsreaktion mit rekombinanten Faktoren

Bereits zu Beginn dieser Arbeit gab es etablierte Faktoren für die 3'-Prozessierung von Säuger Prä-mRNAs, welche als essentiell angesehen wurden. Dazu zählten CPSF mit seinen zwei Subkomplexen mPSF und mCF, CstF, CF I, CF II und die Poly(A)-Polymerase sowie PABPN1 für die Polyadenylierungsreaktion (Christofori & Keller, 1988; Kühn et al., 2009, 2017; Rüegsegger et al., 1996; Schäfer et al., 2018; Schönemann et al., 2014; Takagaki et al., 1990; Wahle, 1991b; Y. Zhang et al., 2020). Diese erwiesen sich jedoch als nicht ausreichend für eine Rekonstitution der 3'-Prä-mRNA-Spaltung. In dieser Arbeit konnte die Rekonstitution der 3'-Prä-mRNA Spaltungsreaktion erstmals erfolgreich erzielt werden (**Ergebnisse 2.1; Abbildung 2.2**). Dabei zeigte sich, dass zusätzlich zu den genannten Faktoren RBBP6 für die Spaltung der Prä-mRNA essentiell ist. Der kanonische Faktor CF I erwies sich dagegen als nicht essentiell. Er führte aber zu einer Effizienzerhöhung der Reaktion. Damit ergab sich, dass ein Minimalkomplex aus 14 Polypeptiden (mPSF, mCF, RBBP6, CstF, CF II und PAP) die Reaktion katalysiert (**Ergebnisse 2.1.5; Abbildung 2.9**). Die beteiligten Faktoren ähneln dem Prozessierungskomplex aus der Bäckerhefe (Hill et al., 2019). Einige Unterschiede sind CstF50, welches spezifisch für den Komplex aus Säugetieren ist und Hrp1 aus der Bäckerhefe, für das es im Säugerkomplex kein Äquivalent gibt. Außerdem ist Symplekin in der Säugerreaktion essentieller Bestandteil des Spaltkomplexes von mCF. Dieses dient vermutlich als Gerüstprotein. In der Bäckerhefe ist das Symplekin-Homolog Pta1 dagegen lediglich im nicht essentiellen Phosphatase-Modul zu finden (Casañal et al., 2017; Hill et al., 2019). Des

Weiteren konnte gezeigt werden, dass mCF als mCF3 (Symplekin, CPSF2 und CPSF3) und mCF4 (mCF3 im Komplex mit CstF64) spaltaktiv sind und eine Anwesenheit von CstF64 in mCF keine Auswirkung auf die Aktivität hat (**Kapitel 2.1.6; Abbildung 2.10**). Der Subkomplex mCF3 ist auch im Spaltungskomplex für die Vorläufer von Histon-mRNAs vorhanden. Auch dort hat ein Zusatz von CstF64 keine Auswirkung auf die Spezifität (Sun et al., 2020). Eine RNA-Bindungsaktivität von mCF3 wurde gefunden, obwohl bislang keinem der drei Proteine eine RNA-Bindungsaktivität nachgewiesen werden konnte.

CF I galt aufgrund von Rekonstitutionsexperimenten mit aus Kernextrakt (partiell) gereinigten Faktoren lange Zeit als essentiell für die Prozessierung der Prä-mRNA (Rüegsegger et al., 1996). Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, besitzt CF I jedoch nur eine stimulierende Funktion während der Spaltung. Die Stimulation war in den gezeigten Experimenten so stark, dass der Faktor nicht aus den Reaktionen ausgelassen wurde. Dass CF I nicht essentiell ist, stimmt mit seiner Rolle während der alternativen Polyadenylierung überein. Knockdowns von CF I führten zu einem Wechsel der bevorzugt genutzten distalen Polyadenylierungsstellen zu proximalen Polyadenylierungsstellen (A. J. Gruber & Zavolan, 2019). Das geht einher mit der Verteilung von CF I-Bindungsstellen (UGUA-Bindungssequenz). Diese sind vermehrt bei distalen und weniger bei proximalen 3'-Prozessierungsstellen zu finden. Durch die Bindung von CF I an die UGUA-Bindungssequenz gilt es als ein Verstärker für die 3'-Prozessierung an distalen Polyadenylierungsstellen (Zhu et al., 2018).

Experimente in einer parallel eingereichten Publikation (Boreikaite et al., 2022) konnten ebenfalls die Rekonstitution der 3'-Prä-mRNA-Spaltung erzielen. In ihren Reaktionen verwendeten diese Autoren jedoch deutlich höhere Konzentrationen der Proteine und Substrat-RNA (50-100 nM; 300 nM RBBP6) im Vergleich zu der in dieser Arbeit gezeigten rekonstituierten Reaktion (RNA und mPSF je 2,5 nM; restliche Proteine 25 nM; RBBP6 125 nM). Während in der hier vorgestellten Rekonstitution alle Proteine bis auf RBBP6, vollständig waren, benutzten Boreikaite et al. für einige Proteine Deletionsvarianten, in denen intrinsisch ungeordnete Regionen fehlten. Auch ein *crowder* war in den Experimenten von Boreikaite et al. nicht nötig, während er in der hier beschriebenen Rekonstitutionsreaktion essentiell war. Die Rekonstitution von Boreikaite verzichtete gänzlich auf das nicht essentielle CF I, die Poly(A)-Polymerase und ATP. Im Gegensatz dazu waren in der hier dargestellten Reaktion die Poly(A)-Polymerase und ATP essentiell (**Kapitel 2.1.5; Abbildung 2.9**; Dissertation Florian Kluge, 2023). Dementsprechend gibt es eine Diskrepanz, sodass nach der Publikation beide Arbeitsgruppen Proteinpräparationen, RNA-Substrate und die jeweils verwendeten Puffer miteinander austauschten. In diesen Experimenten wurden sowohl die

beiden Reaktionen in Gänze miteinander verglichen, als auch der Austausch von jeweils einer Komponente des Proteinmix mit dem Protein der jeweils anderen Arbeitsgruppe. Die Experimente wurden unter den Reaktionsbedingungen dieser Arbeit und der in Boreikaite et al., 2022 beschriebenen Bedingungen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Reaktion unserer Proteine unter unseren Bedingungen gut funktionierte. Das gleiche Ergebnis konnte für die Reaktion der Boreikaite-Proteine bei ihren Bedingungen unter deutlich höheren RNA- und Proteinkonzentrationen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Wurden jedoch die Bedingungen der jeweils anderen Arbeitsgruppe verwendet, konnte nur eine deutlich schlechtere Aktivität beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Ein genauer Grund wurde nicht gefunden. Möglicherweise könnte es das jeweilige mPSF sein. Nach Austausch von je einem Protein aus dem Proteinmix der jeweils anderen Gruppe konnte mit mPSF der Proteinmix der jeweils anderen Arbeitsgruppe nicht aktiviert werden. Die bestehende Diskrepanz mit PAP, ATP und *crowder* konnte bislang nicht ausgeräumt werden. Ein Grund könnte aber die deutlichen Konzentrationsunterschiede sein. Dass die Reaktion von Boreikaite et al. unter den Bedingungen dieser Arbeit weniger gut funktionierte, liegt möglicherweise an den Proteinen die zum Teil verkürzt waren (IDRs deletiert), sodass dies mit höheren Proteinkonzentrationen aufgefangen werden musste.

Jüngst konnten Rekonstitutionen der Spaltungsreaktion und damit ein Teil der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse bestätigt werden (Huang et al., 2023). Diese Rekonstitution wurden ebenfalls mit einem Proteinmix (bestehend aus mPSF, mCF; CstF, CF II, PAP; RBBP6) ohne CF I dargestellt. Für diese Reaktion wurden die Faktoren jedoch mit 250 nM bzw. 1 μ M RBBP6 und damit mit um den Faktor 10 höhere Konzentrationen eingesetzt. Auch die 70 Nukleotid lange Substrat-RNA war mit einer Konzentration von 125 nM 50-mal höher als das eingesetzte Substrat in dieser Arbeit. Allerdings konnten damit Spaltaktivitäten um die 40-60% für die rekonstituierte Reaktion und bis zu 80% für Reaktionen mit CF II und PAP komplementierten HeLa Kernextrakt erzielt werden. Vergleiche von mCF3 und mCF4 führten wie in **Abbildung 2.10** gezeigt, zu keinem signifikanten Unterschied. *Crowders* und ATP bzw. diverse ATP-Analoga werden ebenfalls für die *in vitro* Reaktion benötigt (Dissertation Florian Kluge, 2023; Huang et al., 2023). Die von Huang und Kollegen gezeigten Spaltungsreaktionen wurden wie die von Boreikaite et al. bei deutlich höheren Protein- und RNA-Konzentrationen ausgeführt. Des Weiteren war die verwendete Substrat-RNA mit 70 Nukleotiden deutlich kleiner.

Für eine Beteiligung weiterer putativer 3'-Prozessierungsfaktoren an der Spaltung der Vorläufer mRNAs, wie der CTD der RNA Pol II, Proteinphosphatase 1, Ssu72, XRN2, CDC73

(Parafibromin) und PABPN1 konnte in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten kein Anhaltspunkt gefunden werden (**Kapitel 2.1.9; Abbildung 2.14**). Die untersuchten Faktoren zeigten, sofern sie nicht mit überhöhten Konzentrationen eingesetzt wurden, weder einen stimulatorischen noch einen inhibitorischen Einfluss auf die Spaltungsaktivität des Proteinmixes. Lange Zeit wurde für die CTD und ihren Serin-Phosphorylierungsstatus eine essentielle Rolle während der *in vitro* 3'-Prozessierung angenommen. Nach dieser Vorstellung sollte die CTD als Plattform für den gebildeten 3'-Prozessierungskomplexes dienen und so die Prozessierung mit der Transkription der mRNAs koppeln (Ahn et al., 2004; Hirose & Manley, 1998; Noble et al., 2005). Die CTD war jedoch in den Experimenten dieser Arbeit nicht nur für die Reaktion unnötig, sondern besaß weder mit noch ohne Phosphorylierungen einen signifikanten Einfluss (**Abbildung 2.15**). Das nukleäre Poly(A) Bindungsprotein hatte, abgesehen von einer leichten und vermutlich unspezifischen Hemmung bei hohen Konzentrationen, ebenfalls keinen Einfluss auf die Spaltungsreaktion und wird nur für den zweiten Teil der Prozessierungsreaktion, die Polyadenylierung, benötigt (Kühn et al., 2009, 2017; Wahle, 1991a). Die Bäckerhefe-Homologe der CTD-spezifischen Phosphatasen PP1 (Glc7) und Ssu72 gehören zum APT-Komplex bzw. Phosphatase-Modul. Zwar ist das Modul mit CPF (*cleavage and polyadenylation factor*) assoziiert und daher potentieller Teil des Prozessierungskomplexes, es ist jedoch für die Spaltung in der Hefe nicht essentiell (Casañal et al., 2017; Hill et al., 2019). Da Syc1 mit Ysh1 um die Bindung zu Pta1 konkurriert, ist der APT-Komplex nur Teil von CPF, wenn Syc1 nicht Bestandteil des Komplexes ist (Casañal et al., 2017; Lidschreiber et al., 2018). Mittlerweile wird dem Phosphatase-Modul eine Rolle in der Prozessierung von nicht-kodierenden RNAs wie snRNAs und snoRNAs zugeschrieben, die keine Polyadenylierung benötigen. Hierbei scheint Syc1 entscheidenden Anteil daran zu besitzen, da Deletionen von Syc1 zu einer verringerten Transkription von sn/snoRNAs führten. Syc1 besitzt Homologien zum C-Terminus von Ysh1/CPSF3 und der Integrator-Komplex-Endonuklease Ints11. Der Integrator-Komplex ist ebenfalls für die Prozessierung von snRNAs in Metazoa verantwortlich (Baillat et al., 2005; Lidschreiber et al., 2018).

Eine Beteiligung an der 3'-Prozessierung *in vivo* durch die CTD der RNA-Polymerase II und des Phosphatase-Moduls, bzw. seiner Homologen aus Säugern, wird durch die hier aufgeführten Experimente nicht ausgeschlossen. Diese Funktionen sollen in der Kopplung von Transkription, 3'-Prozessierung und Transkriptions-Termination liegen. Die hier durchgeführten Prozessierungsexperimente benutzten eine unabhängig synthetisierte RNA als Substrat. Sie verliefen also transkriptionsunabhängig. Ein solches System ist zur Untersuchung von Ereignissen, die mit der Transkription zusammenhängen, ungeeignet. Es wurde jedoch

auch behauptet, dass die CTD in einer transkriptionsunabhängigen Prozessierungsreaktion essentiell sei (Hirose & Manley, 1998). Eine solche Funktion wurde in den Experimenten nicht sichtbar.

Vergleicht man die Reaktionen des Proteinmixes mit Reaktionen, die Kernextrakt enthielten, sind, was die Spaltaktivität angeht, nahezu keine Unterschiede zu erkennen. In beiden Reaktionen konnten maximale Spaltungseffizienzen zwischen 30-40 % beobachtet werden und eine Sättigung wurde erst nach ein bis zwei Stunden Reaktionszeit erreicht (**Kapitel 2.1.4; Abbildung 2.8**). Dies führt zu dem Schluss, dass es zu keinem *turnover* kam. Es kam folglich nicht zu einer Dissoziation des Komplexes von der gespaltenen RNA und einer Assoziation mit einer neuen Substrat-RNA. In einer normalen, effizienten enzymatischen Reaktion wäre *turnover* zu erwarten. Versuche bei denen die Zugabe der Reaktionskomponenten variiert, nicht mit RNA gestartet oder die Proteine des Proteinmixes zu unterschiedlichen Zeitpunkten zugegeben wurden, lösten dieses Problem nicht. Es kam sogar zu einer deutlichen Minderung der Spalteffizienzen (Daten nicht gezeigt). Dementsprechend ist das Fehlen eines weiteren Faktors in Betracht zu ziehen. Eine Möglichkeit wäre z. B. eine Helikase, die eine Dissoziation des Spaltkomplexes von der gespaltenen RNA katalysiert. Dass sowohl rekonstituierte Spaltungsreaktionen wie auch Reaktionen im Kernextrakt sehr langsam sind, mag an der Benutzung „fertiger“ RNA-Substrate, also einer fehlenden Kopplung mit der Transkription liegen. Die rekonstituierte Polyadenylierungsreaktion ist dagegen schnell. Sie verläuft im Bereich von Sekunden (Bienroth et al., 1993; Schönemann et al., 2014). Boreikaite et al., 2022 zeigten in ihren Experimenten ähnliche Spalteffizienzen wie jene, die in dieser Arbeit erzielt wurden. Gleiches ist in den oben bereits erwähnten Reaktionen von (Huang et al., 2023) mit Spalteffizienzen von ca. 50% in der rekonstituierten- und ca. 80% in der Kernextraktreaktion nach zweistündiger Inkubation erkennbar gewesen. Auch die rekonstituierte Spaltung der Hefeprozessierung zeigte fast vollständige Spaltung der Substrat-RNA. Jedoch wurde dies ebenfalls erst nach 30-60 Minuten erreicht. Dies ist zwar deutlich schneller im Vergleich zur humanen Reaktion, aber immer noch erheblich langsamer als die Polyadenylierungsreaktion (Hill et al., 2019). Dies bestätigt die oben getätigten Vermutungen, dass in der Spaltreaktion kein *turnover* unter den gewählten *in vitro* Bedingungen vorhanden ist.

3.1.2 Essentielle Rolle von RBBP6 in der Spaltung von Vorläufer mRNAs

Als die an der 3'-Prozessierung von Prä-mRNA beteiligten Faktoren aus Säugerzellen durch biochemische Fraktionierung gereinigt und identifiziert wurden, ist RBBP6 nicht als Prozessierungsfaktor identifiziert worden. Erst mit den massenspektrometrischen Unter-

suchungen des Spaltkomplexes wurde RBBP6 als möglicher Bestandteil des Komplexes identifiziert (Shi et al., 2009). Eine Beteiligung an der 3'-Prozessierung wurde durch die Homologie zu dem gut charakterisierten Hefefaktor Mpe1 vermutet, der eine stabile Untereinheit des Nuklease-Moduls von CPF ist (Hill et al., 2019; Rodríguez-Molina et al., 2022; Vo et al., 2001). Die RNAi-vermittelte Depletion von RBBP6 und anschließende Analysen *in vivo* und in Kernextrakten erbrachten weitere Evidenzen für eine Beteiligung des Proteins an der Reaktion (Di Giammartino et al., 2014). In dieser Arbeit wurde eine essentielle Rolle von RBBP6 in der Spaltung der Vorläufer-mRNAs durch biochemische Rekonstitution zweifelsfrei bestätigt.

RBBP6 besitzt in seinem N-terminalen Bereich drei strukturierte Domänen. Eine Ubiquitin-ähnliche Domäne (DWNN), einen *zinc knuckle* und eine RING-Finger Domäne. Die drei Domänen weisen eine starke Konservierung zu dem Homolog Mpe1 aus der Hefe auf, welches nur aus den drei genannten Domänen besteht. Der C-terminale Bereich des Proteins (Aminosäuren 300 – 1792) ist unstrukturiert. Mutationsexperimente zeigten, dass die Ubiquitin-ähnliche DWNN-Domäne und der *zinc knuckle* ausreichend sind, um die Spaltung der Prä-mRNA zu stimulieren (**Kapitel 2.1.3; Abbildung 2.7**). Die Mutationen im *zinc knuckle* bestätigten die Notwendigkeit für die Spaltungsreaktion, die bereits für Mpe1 beschrieben wurde (S. D. Lee & Moore, 2014). Dagegen ist die dritte N-terminale Domäne, der RING-Finger und damit eine mögliche Dimerisierung, nicht essentiell für die Reaktion (Kappo et al., 2012). Der intrinsisch ungeordnete C-Terminus ist für die Reaktion nicht notwendig, sorgt jedoch für eine Stimulation. Außerdem verstärkt der C-Terminus die RNA-Bindung von RBBP6 an die SV40late RNA (siehe **Abbildung 2.13**). Das Bäckerhefe-Homolog von RBBP6, Mpe1, ist ebenfalls essentiell für die Spaltung von Vorläufer-mRNAs (Hill et al., 2019; S. D. Lee & Moore, 2014). Mpe1 interagiert direkt mit dem CPSF3-Homolog, der Endonuklease Ysh1, und führt zu einer Konformationsänderung und Aktivierung des Enzyms (Rodríguez-Molina et al., 2022). Für das humane Protein ist ein ähnlicher Mechanismus wahrscheinlich. Kryo-EM-Experimente von Felix Sandmeir (Max-Planck-Institut für Biochemie Martinsried; AG Elena Conti) zeigten im Spaltkomplex eine Bindung der DWNN-Domäne von RBBP6 nahe dem aktiven Zentrum der β-Lactamase-Domäne von CPSF3 (Schmidt et al., 2022). Mutationen der Aminosäuren, welche für die Bindung an CPSF3 verantwortlich sind (siehe RBBP6 1-335; **Abbildung 2.13**) und zum Verlust dieser Bindung führten, verhinderten auch die Spaltung (Schmidt et al., 2022). Des Weiteren gibt es zwischen dem *zinc knuckle* und dem RING-Finger eine konservierte *pre-mRNA sensing region* (PSR), die zumindest in der Hefe für eine Bindung an die Polyadenylierungsstelle sorgt (Rodríguez-Molina et al., 2022). Für das humane Protein

wurde ebenfalls eine RNA-Bindungsaktivität experimentell bestätigt. Bislang konnte aber keine bestimmte RNA-Bindungsstelle auf mRNA-Vorläufern identifiziert werden. Es ist durchaus möglich, dass RBBP6 nicht über eine ausgeprägte eigene Sequenzspezifität in der RNA-Bindung verfügt, sondern durch den Einbau in den Spaltungskomplex an eine bestimmte Stelle dirigiert wird. Posttranskriptionale Modifikationen von RBBP6 werden für die Spaltungsreaktion nicht benötigt, da sowohl Proteine aus bakteriellen als auch Insektenzell-Expressionssystemen aktiv sind.

3.1.3 Die Aktivität von CstF ist unabhängig von der CstF64-Variante und CstF50 besitzt einen starken Einfluss auf die Spaltung

Durch die Rekonstitution konnten verschiedene Prozessierungsfaktoren genauer untersucht werden. Titrationsexperimente mit verschiedenen Formen von CstF zeigten, dass alle, ob mit zwei Untereinheiten vom ‚kanonischen‘ Typ CstF64 (64/64), mit zwei Untereinheiten der Variante CstF64 τ (64 τ /64 τ) oder mit zwei unterschiedlichen Typen (64/64 τ) spaltaktiv sind (**Kapitel 2.1.7; Abbildung 2.11**). Die Aktivität der Komplexe, die CstF64 τ enthalten, war allerdings in den Rekonstitutionsexperimenten konsistent schwächer. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die CstF50-Untereinheit, für die es kein Äquivalent in der Bäckerhefe gibt, für die Funktion von CstF wichtig ist. Komplexe ohne diese Untereinheit waren nahezu inaktiv und ließen sich durch Komplementation mit separat gereinigtem CstF50 stark stimulieren. W. Yang et al., 2018 beschrieben bereits, dass CstF50 den Komplex und seine Bindung an die RNA stabilisiert. Die Stabilisierung des Komplexes wird unter Umständen durch die C-terminale WD40-Domäne von CstF50 vermittelt. Diese sorgt für die Interaktion mit CstF77 (Bai et al., 2007; Takagaki & Manley, 2000). Des Weiteren sorgt der N-Terminus von CstF50 für die Dimerisierung der Untereinheit (Moreno-Morcillo, Minvielle-Sébastia, Mackereth, et al., 2011).

3.1.4 Essentielle 3'-Prozessierungsfaktoren binden RNA mit hoher Affinität

Für die meisten der 3'-Prozessierungsfaktoren wurde bereits früher eine RNA-Bindungsaktivität beschrieben. So binden sowohl WDR33, CPSF4 sowie hFip1 als Untereinheiten von mPSF RNA. Für die RNA-Bindung von CstF ist CstF64, für CF I CF I-25 und für CF II Pcf11 verantwortlich (Kaufmann et al., 2004; Rüegsegger et al., 1996; Schäfer et al., 2018; Schönemann et al., 2014; Q. Yang et al., 2010; W. Yang et al., 2018). Zum Teil sind diese Faktoren auch strukturell analysiert (Clerici et al., 2017; Martin, 2000; Noble et al., 2006; Rodríguez-Molina et al., 2022; Q. Yang et al., 2011; W. Yang et al., 2018; Y. Zhang et al.,

2020). In dieser Arbeit wurde bestätigt, dass mPSF ($K_{50}= 0,7$ nM), CstF ($K_{50}= 7$ nM) und CF II ($K_{50}= 4$ nM) eine SV40*late* Substrat-RNA in einem Nitrozellulose-Filterbindungsexperiment mit hoher Affinität binden (siehe **Abbildung 2.13; Tabelle 2.1**). Des Weiteren konnte für mCF3 ($K_{50}= 3$ nM), mCF4 ($K_{50}= 1,3$ nM) und RBBP6 ($\Delta_{RING} K_{50}= 1,4$ nM) eine RNA-Bindung im nanomolaren Bereich nachgewiesen werden. Die Anwesenheit von CstF64 als bekannte RNA-bindende Untereinheit von CstF hatte dabei erstaunlicherweise nur geringfügigen Einfluss auf die RNA-Affinität von mCF. Die RNA-Bindung von mCF3 ist eine neue Erkenntnis. Jedoch ist dies nicht verwunderlich, da der Komplex die Endonuklease CPSF3 enthält und eine Bindung der Endonuklease für den enzymatischen Vorgang zu erwarten wäre. Die RNA-Bindung von CF I war mit einer apparenten K_{50} von ca. 210 nM deutlich schwächer als die der anderen Faktoren. Hierbei zeigte sich die erwartete UGUA-Abhängigkeit für CF I (Brown & Gilmartin, 2003; Q. Yang et al., 2011; Dissertation Florian Kluge, 2023). Je weniger UGUA-Bindungsstellen auf dem Substrat vorhanden waren, umso schlechter wurde die RNA gebunden. Dies beschreibt sehr gut die Verzichtbarkeit von CF I für die Prä-mRNA-Spaltung. Die RNA-Affinität von RBBP6 war vom C-Terminus des Proteins abhängig. Das längste Protein ($RBBP6_{\Delta RING}$) konnte die RNA mit hoher Affinität binden ($K_{50}= 1,4$ nM). Je mehr Aminosäuren C-terminal deletiert wurden, umso schwächer wurde das Substrat gebunden. Die Bindung erfolgte bis zu einer K_{50} von etwa 1063 nM für den strukturierten N-terminalen Bereich.

3.1.5 Vergleich der Spaltung viraler und nicht viraler RNA-Substrate

Die Rekonstitution mit dem kanonischen Proteinmix erfolgte sowohl mit der SV40*late*- als auch mit der L3-RNA. Experimente mit L3 zeigten jedoch eine schwächere Spaltungseffizienz. Dennoch sind beides virale RNAs mit starken Poly(A)-Signalen. Eine Rekonstitution mit dem 3'-UTR von GAPDH als Substrat missglückte. Bei der Verwendung von Kernextrakt anstelle der Mischung rekombinanter Proteine konnte das Substrat dagegen gespalten werden (Daten nicht gezeigt). Ein Kernextrakt der AG Keller aus Basel zeigte selbst keine Spaltungsaktivität mit dem GAPDH-Substrat, konnte jedoch mit dem Proteinmix komplementiert werden. Dies führte zu der Annahme, dass noch mindestens ein weiterer Faktor oder auch Modifikationen der bereits bekannten Proteine für die Spaltung dieses Substrates benötigt werden. Eine Fraktionierung von Kernextrakt mit dem Ziel, den fehlenden (oder den modifizierten) Faktor zu identifizieren, schlug jedoch fehl. Zwar konnte die komplementierende Aktivität in ersten Fraktionierungsschritten verfolgt werden, sie ging bei weiteren Reinigungsschritten jedoch schnell verloren. Zudem ließ sie sich, soweit sie detektierbar war, schlecht von den kanonischen

Faktoren trennen. Eine ähnlich schlechte Auf trennung der Prozessierungsfaktoren wurde auch bei anderen Chromatographieversuchen beobachtet (Florian Kluge, pers. Mitteilung). Möglicherweise hängt dieses Verhalten der Faktoren auch mit ihrer Präzipitationsneigung zusammen. Als Alternative zu den gescheiterten Reinigungsversuchen wurde eine Konstruktion chimärer Substrate aus SV40- und GAPDH-RNAs unternommen (siehe **Tabelle 5.1**). Ziel war die Identifizierung der Sequenzen, die für das unterschiedliche Verhalten der beiden RNAs in den Spaltungsreaktionen verantwortlich sind. Es wurde festgestellt, dass RNAs mit einem 5'-Bereich, der der SV40*late* RNA entsprach, eine ähnliche Spalteffizienz aufwiesen wie der SV40*late*-Wildtyp (siehe **Kapitel 2.1.10; Abbildung 2.16**). Entsprach der 5'-Bereich jedoch der GAPDH-RNA, war eine Spaltung durch den Proteinmix nicht möglich. Wieder ließ sich die Aktivität durch nukleären Extrakt komplementieren. Ähnliches gilt für die BIK RNA als Substrat in der Spaltung, bei der weder mit Kernextrakt noch mit Proteinmix oder der Komplementation Aktivität nachgewiesen wurde. Die für das unterschiedliche Verhalten der RNAs verantwortlichen Sequenzen wurden aus Zeitmangel nicht weiter eingegrenzt.

Ein anderes nicht virales RNA-Substrat entstammte dem Vorläufer der HMOX-1-mRNA. HMOX-1 gehört wie BIK zu den möglichen Substraten für die nicht-kanonische Poly(A)-Polymerase TUT-1 (Laishram & Anderson, 2010; W. Li et al., 2012). Beide Gene werden durch oxidativen Stress reguliert und laut Literatur unter Beteiligung von TUT-1 prozessiert. Nach Laishram & Anderson, 2010 hat TUT-1 über Wechselwirkungen mit CPSF1 und CPSF3 eine direkte Beziehung zu Proteinen der 3'-Prozessierungsmaschinerie. Diese in der Literatur beschriebene Spaltaktivität der TUT-1 mit einem HMOX-1 Substrat konnten in der eigenen Arbeitsgruppe nicht bestätigt werden (Dissertation Florian Kluge, 2023).

In dieser Arbeit zeigte sich, dass der Proteinmix das HMOX-1-Substrat spaltet. Dieses Ergebnis wurde von Florian Kluge bestätigt (Dissertation Florian Kluge, 2023). Das führt wiederum zu dem Schluss, dass der Proteinmix nicht nur auf viralen RNAs mit besonders starkem Poly(A)-Signal Aktivität besitzt, sondern auch zelluläre mRNAs prozessieren kann. Die Theorie des Fehlens eines weiteren stimulierenden Faktors wird somit nicht ausgeschlossen. Möglicherweise wird ein solcher Faktor nur für bestimmte Substrate, wie z. B. GAPDH, benötigt und nicht generell für alle zellulären Prä-mRNAs.

3.2 Die 3'-Prä-mRNA-Spaltung wird von einer Präzipitation der beteiligten Moleküle begleitet

Die Spaltung der Prä-mRNA ist eine *crowder*-abhängige Reaktion. Ein *crowder* ist ein Makromolekül oder in Form von TMAO ein Osmolyt, das durch die Verdrängung anderer Makromoleküle innerhalb einer Reaktion für einen *excluded volume effect* sorgt. Dadurch kommt es zur lokalen Konzentrationserhöhung der Proteine, wodurch sehr wahrscheinlich Protein-Protein-Interaktionen stabilisiert werden. Es wird vermutet, dass ein *crowder* die sehr hohe Gesamtkonzentration von Makromolekülen im Inneren der Zelle simuliert (Minton, 2001; Zimmerman & Minton, 1993). Neben den gezeigten Reagenzien wie TMAO, PVA und PEG sorgten auch Betain und Dextran für eine Aktivierung der RNA-Spaltung (Daten nicht gezeigt; Dissertation Florian Kluge, 2023). Dennoch zeigten die *crowders* Unterschiede bei der Spalt- effizienz. Von den getesteten Reagenzien zeigte TMAO das beste Ergebnis. Aus diesem Grund und weil, im Gegensatz zu den makromolekularen Additiven keine Viskositätsprobleme beim Pipettieren auftraten, wurde TMAO als Standardreagenz eingesetzt.

Bei Versuchen von Florian Kluge, in denen die RNA-Spaltung mit Hilfe von partiell gereinigten Fraktionen aus Kernextrakt rekonstituiert wurde, zeigte sich bei Zugabe von *crowders* eine Trübung im Reaktionsgefäß. Diese Trübung ließ sich mittels Mikrozentrifugation sedimentieren, beruhte also offenbar auf einer Art von Präzipitation. Dabei verteilten sich RNA-Substrat und 5'-Spaltprodukt zwischen Präzipitat und dem löslichen Überstand. Bei der Rekonstitution aus gereinigten Proteinen wurde keine Trübung sichtbar. Dies ist vermutlich auf die geringere Gesamtproteinkonzentration zurückzuführen. Zentrifugationsversuche wiesen jedoch auch hier eine Präzipitation der RNA nach (siehe **Kapitel 2.2.1; Abbildung 2.18**). Bei den Versuchen zeigte sich nicht immer die gleiche Verteilung der RNA zwischen Sediment und Überstand. Dies korrespondierte mit der generell hohen Schwankungsbreite des Spaltassays. Generell trat das Spaltprodukt jedoch nach wenigen Minuten Reaktionszeit zunächst im Präzipitat auf und ließ sich erst im weiteren Verlauf der Reaktion auch im Überstand nachweisen. Es führte zu der Vermutung, dass die Reaktion womöglich im Präzipitat stattfindet und das Spaltprodukt erst nach Ablauf der Reaktion in den Überstand entlassen wird. Für die Abhängigkeit der Reaktion von der Präzipitation spricht auch die Tatsache, dass alle Additive, die die Spaltreaktion aktivierten, gleichzeitig zur Präzipitation führten. Dies galt sowohl für niedermolekulare Verbindungen (z. B. TMAO) als auch für makromolekulare Substanzen (PEG oder PVA).

Es war anzunehmen, dass die beobachtete Präzipitation der RNA unter Reaktionsbedingungen nicht auf die RNA beschränkt war, sondern die Proteine ebenfalls ganz oder teilweise präzipitierten. Bei der Analyse von Präzipitationsexperimenten auf Proteinebene zeigte sich in der Tat, dass der größte Teil der Proteine aus der Reaktionsmischung nach einer Inkubation von 15 Minuten ebenfalls im Präzipitat zu finden war. Dies war unabhängig von der Anwesenheit von Substrat-RNA und tRNA (siehe **Kapitel 2.2.1; Abbildung 2.18**). Die RNA wurde dagegen in Abwesenheit der Proteine unter Reaktionsbedingungen nicht präzipitiert. Sie gelangt also nur passiv, durch die Assoziation mit Proteinen, in das Präzipitat.

Die Präzipitation der Proteine war selektiv, also spezifisch. Der in der Reaktion vorhandene RNase-Inhibitor diente in diesem Zusammenhang als negative Kontrolle. Dieses Protein blieb im löslichen Überstand. Unter den Prozessierungsfaktoren präzipitierten die meisten annähernd vollständig. Dies galt nicht für die Poly(A)-Polymerase. Die Präzipitation der PAP war abhängig von der Anwesenheit der Substrat-RNA. Zudem waren die Anteile zwischen dem präzipitierten und dem löslichen Protein nahezu gleich. Das N-terminale Fragment von RBBP6, das in einem großen Überschuss eingesetzt wurde, blieb zum größten Teil löslich. Wenn dagegen das vollständige RBBP6 in niedrigeren Konzentrationen eingesetzt wurde, war die Präzipitation vollständig. Das Auslassen von mPSF oder CstF aus der Reaktionsmischung erhöhte die Löslichkeit der verbleibenden Faktoren (siehe **Kapitel 2.2.2; Abbildung 2.19**). Diese beiden Komplexe können folglich als die wesentlichen Treiber für die Präzipitation gelten. Bei der Inkubation einzelner Prozessierungsfaktoren unter Reaktionsbedingungen zeigten mPSF, CF II und RBBP6_{ΔRING} eine starke Präzipitationsneigung während mCF3, CstF, CF I, RBBP6₁₋₃₄₀ und PAP überwiegend in Lösung blieben.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Präzipitation der 3'-Prozessierungsfaktoren unter Reaktionsbedingungen auf der Präzipitationsneigung bestimmter Proteine (mPSF, CstF) und ihrer Komplexbildung mit allen anderen Faktoren beruht. Die Substrat- und Produkt-RNAs werden aufgrund ihrer Assoziation mit den Proteinen ko-präzipitiert. Anders sieht es dagegen während der Polyadenylierung aus. In keiner untersuchten Reaktion neigten RNA oder Proteine zur Präzipitation und waren ausschließlich im Überstand zu finden (pers. Mitteilung Florian Kluge).

3.3 Die Präzipitation der Makromoleküle unter Reaktionsbedingungen beruht auf Aggregation, nicht auf der Bildung von zwei flüssigen Phasen

Im Vergleich zur Polyadenylierungsreaktion sind die benötigten Proteinkonzentrationen für die Spaltungsreaktion deutlich höher (Schönemann et al., 2014). Wodurch diese Unterschiede zustande kommen, ist unbekannt. Das lässt jedoch Überlegungen zu, dass die höheren Konzentrationen für eine bestimmte biologische Funktion benötigt werden. Dieses und das beschriebene Phänomen der Präzipitation führte zu der Überlegung, dass die Spaltungsreaktion nach dem Prinzip der Phasentrennung (*liquid-liquid phase separation; LLPS*) in einer hochkonzentrierten flüssigen Phase ablaufen könnte. Gleichzeitig sind Diese Annahme wurde dadurch gestützt, dass das *Arabidopsis thaliana*-Protein FCA, ein Homolog von WDR33, in der Lage ist die LLPS herbeizuführen (Fang et al., 2019). Solche *liquid droplets* lassen sich ebenfalls durch eine kurze Zentrifugation sedimentieren (Sheu-Gruttaduria & MacRae, 2018; J. Wang et al., 2018). Ein weiteres Argument ist die bekannte Induktion der LLPS durch verschiedene *crowders* (André & Spruijt, 2020; Hofweber et al., 2018; Patel et al., 2015; J. Wang et al., 2018). Die Bildung von *liquid droplets* würde erklären, warum die RNA-Spaltung in den „Präzipitaten“ ablaufen kann, da während der LLPS die Proteine in einer wässrigen Phase gelöst, also gefaltet und funktionell bleiben.

Zur Unterscheidung zwischen *liquid droplets* und nicht-flüssigen Proteinaggregaten wurde die mögliche Reversibilität der Präzipitatbildung untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Präzipitate erst unter nicht-physiologischen Hochsalz-Konzentrationen löslich wurden (**Kapitel 2.2.3; Abbildung 2.22**). Dies sollte bei *liquid droplets* nicht der Fall sein, da die beteiligten Makromoleküle löslich bleiben, so dass es zu einem schnellen Austausch mit der umgebenden Phase kommt. Das bedeutet auch, dass sich *liquid droplets* bei Änderung der Bedingungen, z. B. Verdünnung unter einer kritischen Konzentration, schnell auflösen (Patel et al., 2015; Shin & Brangwynne, 2017; J. Wang et al., 2018). Im Falle von Präzipitaten oder Aggregaten kann es dagegen nicht zu einem Austausch kommen. Eine schnelle Auflösung der Präzipitate ist nicht ausgeschlossen, aber nicht unbedingt zu erwarten.

Das Charakteristikum der LLPS ist der Flüssigkeitscharakter der konzentrierten Phase und damit die fortdauernde Lösung der beteiligten Makromoleküle in einer wässrigen Umgebung. Wenn eines oder mehrere der beteiligten Moleküle fluoreszenzmarkiert werden, lassen sich diese Eigenschaften der konzentrierten Phase mikroskopisch untersuchen. In solchen Experimenten zeigt sich der flüssige Charakter der konzentrierten Phase in einer sphärischen Struktur und der Fähigkeit von zwei Tröpfchen miteinander zu einem größeren Tropfen zu

verschmelzen. Die Löslichkeit der beteiligten Makromoleküle lässt sich als schneller Austausch mit der verdünnten Phase in *FRAP*-Experimenten nachweisen.

In den Experimenten zeigte sich, dass ein GFP-markiertes WDR33-Fragment (WDR33 E), welches hauptsächlich aus einer intrinsisch ungeordneten Region (IDR) besteht, eine sphärische konzentrierte Phase, also *liquid droplets* bildet (siehe **Kapitel 2.2.5; Abbildung 2.25**). Das Protein demonstrierte das für *liquid droplets* typische Verhalten, da neben der Bildung eine Rückkehr der Fluoreszenz und Fusionen der Tropfen nachgewiesen wurden (siehe **Abbildung 2.27**, siehe Anhang **Abbildung 9.11**). Somit gab es einen Zusammenhang zwischen einem essentiellen Faktor der 3'-Prozessierungsmaschinerie und *liquid-liquid-phase separation*. Dies wurde bereits von Fang et al., 2019 für das Pflanzenhomologe FCA beschrieben.

Im Gegensatz zu den Experimenten mit WDR33 E zeigten die Standardreaktionen keine Bildung von *liquid droplets*. Wenn die Reaktionsmischungen einen GFP-markierten Prozessierungsfaktor enthielten, waren im Mikroskop zunächst kleine Aggregate sichtbar (**Abbildung 2.25**). Wegen der geringen Größe konnte die sphärische Form nicht beurteilt werden. Während einer fort dauernden Inkubation wurde eine Zunahme der Größe der Strukturen beobachtet. Eine weitere Vergrößerung konnte durch Zentrifugation erreicht werden. Danach war sichtbar, dass die Aggregate nicht sphärisch, also keine *liquid droplets* waren. Die Ko-Lokalisation der Prozessierungsfaktoren in diesen Aggregaten konnte dargestellt werden. Ebenso die Unabhängigkeit von der Substrat-RNA bei der Aggregatbildung und der Ko-Lokalisation (**Abbildung 2.26**). In *FRAP*-Experimenten mit GFP-mPSF kam es zu keiner Rückkehr der Fluoreszenz und somit fand kein Austausch mit der Umgebung statt, anders als bei *liquid droplets* erwartet (siehe **Abbildung 2.27**). Für die langsame Erholung der Fluoreszenz, die mit GFP-CstF bzw. GFP-CstF64ΔIDR beobachtet wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die zehnfach höhere Stoffmenge des markierten Proteins im Vergleich zu mPSF ausschlaggebend war. Generell glichen die nachgewiesenen Strukturen mehr Hydrogel-artigen oder *solid-state*-Phasen als *liquid droplets* (Patel et al., 2015). In der Literatur beschriebene Experimente z. B. mit den FUS-Proteinen zeigten eine Tröpfchenbildung erst bei deutlich höheren Konzentrationen (7-10 μ M) (J. Wang et al., 2018), während die Gesamtproteinkonzentration der Faktoren unter den Bedingungen der 3'-Prozessierungsreaktion nur bei 25 nM respektive 2,5 nM (mPSF) und 125 nM (RBBP6) lag. Auch die Erhöhung der Proteinkonzentration auf 100 nM respektive 50 nM (mPSF/mCF3) und 300 nM (RBBP6) nach (Boreikaite et al., 2022) hatte keinen auffallenden Effekt auf die Aggregation (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt widerlegen die Daten die Hypothese, dass die in verschiedenen Experimenten nachgewiesene Aggregatbildung der Prozessierungsfaktoren unter Reaktionsbedingungen auf LLPS zurückgeht. *Liquid droplets* können allerdings zu weniger reversiblen Aggregatformen, wie beispielsweise Hydrogelen oder gar Fibrillen, „reifen“ (Kato et al., 2012; Patel et al., 2015). Möglicherweise ist die Phase der *liquid droplets* in der 3'-Prozessierungsreaktion so kurz, dass diese nicht nachgewiesen und nur spätere Aggregationsformen (z. B. *solid-states*) dargestellt werden können. In Reaktionen mit WDR33 E konnte vermutlich ebenfalls die Bildung von *solid-states* beobachtet werden (siehe Anhang **Abbildung 9.11**). Ab ca. fünfzehn Minuten Reaktionszeit deformierten die sphärischen Tropfen und auch die Größe dieser Aggregate nahm deutlich zu. Die Annahme von *solid-states* wurde durch die *half-FRAP* und FRAP-Experimente unterstützt, welche keine Fluoreszenzrückkehr darstellten. *Solid-states* sind irreversibel und wären somit auch eine mögliche Erklärung, warum während der Spaltung von Prä-mRNAs bislang kein *turnover* beobachtet wurde (siehe oben). Da aber die Prozessierungsreaktion langsam abläuft, ist ein Ablauen der Reaktion in *liquid droplets* unter den hier benutzten Bedingungen sehr unwahrscheinlich.

3.4 Proteinmix ohne IDRs

Ein Treiber für die Bildung von *liquid droplets* sind intrinsisch ungeordnete Regionen (IDRs) oder auch *prion-like domains* (J. Wang et al., 2018). Es wurde in den oben diskutierten Experimenten gezeigt, dass die Proteinaggregation in der 3'-Prozessierungsreaktion nicht auf LLPS, sondern auf der Bildung stabilerer Präzipitate beruht. Da aber eine Vielzahl der humanen 3'-Prozessierungsfaktoren IDRs besitzen (WDR3, hFip1, Symplekin, CstF64, Pcf11, RBBP6, CF I68, PAP), wurde untersucht, ob diese IDRs das Aggregationsverhalten beeinflussen.

Folgende IDRs in den Prozessierungsfaktoren wurden deletiert: WDR33 $\Delta C486$ (A), WDR33 $\Delta C576$ (P), WDR33 $\Delta C905$ (B), WDR33 $\Delta N963\Delta C1201$ (E), Pcf11 $\Delta N769$, Symplekin $\Delta N340$, CstF64 $\Delta C196$, RBBP6 $\Delta C341$, PAP $\Delta C514$ (ΔN gibt die jeweils letzte Aminosäure vor der IDR an, die deletiert wurde; ΔC ist die jeweils erste Aminosäure nach der IDR) (siehe **Abbildung 2.17** und **Abbildung 2.23**). Eine Mischung dieser verkürzten Proteine war spaltaktiv. Im Vergleich zum Standardproteinmix war die Aktivität jedoch deutlich schwächer (**Abbildung 2.24**). Auch eine Erhöhung der Protein- und RNA-Konzentrationen führte zu keiner Verbesserung der Spaltaktivität, sondern zu gänzlicher Inaktivität. Wie erwartet ließen sich die Proteine ohne TMAO nicht präzipitieren und eine Erhöhung der Proteinkonzentration konnte den Präzipitationseffekt von TMAO bei diesen Proteinen nicht ausgleichen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unter Standardbedingungen die Reaktion offenbar von der Präzipitation abhängig ist. Dieses lässt sich aber durch die IDR-Deletionen umgehen und auch die Präzipitationen können nicht mehr durch Zugabe von TMAO induziert werden.

3.5 Spaltungs- und Polyadenylierungsaktivität von mPSF-Subkomplexen

Die Spaltungs- und Polyadenylierungsversuche der mPSF-Komplexe ohne hFip1 zeigten den stimulierenden Effekt von hFip1. Der Komplex war sowohl in der Spaltung als auch in der Polyadenylierung aktiv (siehe **Kapitel 2.3**; **Abbildung 2.29** und **Abbildung 2.30**). Allerdings zeigte sich eine deutliche Abnahme der Aktivität in beiden Reaktionen. Während isoliertes hFip1 mPSF weder in der Spaltung noch in der Polyadenylierung ersetzen konnte, erzielte die Komplementation von mPSF mit hFip1 nahezu die gleiche Aktivität wie ein Wildtypkomplex. Der stimulierende Effekt von hFip1 auf die PAP ist bereits seit längerem bekannt (Kaufmann et al., 2004). Da hFip1 als diejenige Untereinheit galt, die die PAP an mPSF koppelt, hätte man eigentlich eine essentielle Funktion von hFip1 erwartet. Dementsprechend ist es verwunderlich, dass ein mPSF-Komplex ohne hFip1 eine Restaktivität besitzt. Es ist also zu vermuten, dass die PAP noch über mindestens eine weitere Untereinheit von mPSF an den Komplex gebunden wird. Die hFip1 Isoform 4 konnte ebenfalls die Polyadenylierungsreaktion stimulieren (**Abbildung 2.30**). Im Vergleich zum Wildtyp war diese verkürzte Version jedoch schwächer. Dies stimmt mit publizierten Ergebnissen aus Muckenfuss et al., 2022 überein.

Erstaunlicherweise konnte eine Spaltungs- wie auch Polyadenylierungsreaktion ohne CPSF4 ablaufen (siehe **Abbildung 2.30**). In beiden Reaktionen war allerdings die Aktivität sehr schwach und es mussten relativ hohe Proteinkonzentrationen eingesetzt werden. Dennoch war die Aktivität deutlich zu erkennen. Dass eine erhöhte Konzentration von mPSFΔCPSF4 aufgebracht werden musste, lässt sich mit der nur noch einseitigen PAS-Bindung durch WDR33 erklären. Ob diese noch AAUAA-spezifisch ist, wurde nicht getestet (Clerici et al., 2018; Sun et al., 2018). Es ist nicht auszuschließen, dass durch die Expression in Sf21-Zellen endogenes CPSF4 mit dem Komplex gereinigt wurde. Allerdings konnten in verschiedenen Western Blot-Analysen gegen diverse 3'-Prozessierungsfaktoren keine endogenen Proteine nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Außerdem konnte veranschaulicht werden, dass der N-Terminus von WDR33 mit seinen sieben WD40-Domänen für die Spaltung und die Polyadenylierung ausreichend ist (siehe **Abbildung 2.23**; **Abbildung 9.9**). In der Spaltung besitzt mPSF, welches das WDR33-A-Fragment integriert hat, fast die gleiche Spalt- und Polyadenylierungsaktivität wie der Wildtyp oder GFP-markiertes mPSF. Erstaunlicherweise führte die N-terminale GFP-Fusion zu keiner

Verschlechterung der Aktivität, obwohl der N-Terminus wichtig für die Interaktionen mit dem AAUAAA-Polyadenylierungssignal und CPSF1 ist. Dabei sorgt der N-terminus mit den Aminosäuren Phenylalanin-43, -153 und Isoleucin-156 für die Bildung des Hogsteen-Basenpaars mit der U3- und der A6- Base des AAUAAA-Hexamers. Der Kontakt mit CPSF1 kommt über einen Hohlraum der Beta-Propeller-1 und -3 von CPSF1 zustande, in den die NTD des WDR33 mit einem unstrukturierten Bereich und einer alpha-Helix vollständig hineinragt. Dies hilft dem Zusammenhalten des mPSF-Komplexes (Clerici et al., 2017, 2018; Sun et al., 2018). Dass das Fehlen des IDR-haltigen C-Terminus die Aktivität nicht beeinträchtigt, ist wiederum ein Hinweis darauf, dass die Proteinaggregation für die Spaltungsreaktion nicht essentiell ist.

4 Zusammenfassung

Die Polyadenylierungsreaktion als zweiter Teilschritt der 3'-Prozessierung konnte bereits mit humanen rekombinanten Proteinen dargestellt werden (Schönemann et al., 2014). Hingegen konnte der erste Teilschritt, die Spaltung der Vorläufer-mRNA, noch nicht erfolgreich rekonstituiert werden. Die bis dato bekannten und für essentiell befundenen 3'-Prozessierungsfaktoren mPSF, mCF, CstF, CF I, CF II und PAP waren nicht ausreichend für eine erfolgreiche Katalyse.

In dieser Arbeit konnte erstmals die erste Teilreaktion der 3'-Prozessierung, die 3'-Prä-mRNA-Spaltung, *in vitro* mit rekombinanten Proteinen rekonstituiert werden. Es wurde gezeigt, dass für die Spaltungsreaktion 14 Polypeptide, bestehend aus den 3'-Prozessierungsfaktoren mPSF, mCF, CstF, CF II, PAP und RBBP6, benötigt werden (siehe **Kapitel 2.1; Abbildung 4.1**). Die Reaktion war ATP-abhängig. Wie bereits zuvor in der Literatur beschrieben, war die RNA-Spaltung von einem *crowding*-Reagenz wie PVA, PEG oder einem Osmolyten wie TMAO abhängig, sowohl in rekonstituierten Reaktionen mit rekombinanten Proteinen als auch in Reaktionen mit Kernextrakt. Dies liegt vermutlich an dem *excluded volume effect*, welcher für eine lokale Konzentrationserhöhung der Proteine und damit für eine zusätzliche Stabilisierung der Protein-Protein-Interaktionen sorgt.

CF I ist ein Faktor, der lange Zeit als essentieller Bestandteil der Reaktion angesehen wurde. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CF I lediglich eine stimulierende Wirkung besitzt. Dieses Ergebnis ist konsistent mit der prominenten Rolle von CF I in der alternativen Polyadenylierung. Gleichzeitig konnte die wichtige Rolle von RBBP6 und vor allem des konservierten N-Terminus dargestellt werden. In der Bäckerhefe konnte die Funktion durch das Homolog Mpe1 bereits beschrieben werden. Ähnlich dem Spaltkomplex der Bäckerhefe scheint RBBP6 durch die Bindung der essentiellen DWNN-Domäne an das katalytische Zentrum der Endonuklease CPSF3 die Aktivierung des Spaltkomplexes zu ermöglichen (Hill et al., 2019; Rodríguez-Molina et al., 2022). Neben der DWNN ist die N-terminale *zinc knuckle*-Domäne ein notwendiger Bestandteil der Rekonstitution.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass ein CstF-Komplex, der die CstF64-Variante CstF64 τ enthält, aktiv ist, wenn auch weniger aktiv im Vergleich zu CstF mit der kanonischen CstF64-Untereinheit. Auch eine Mischung beider CstF64-Varianten ist möglich.

Der rekonstituierte Spaltkomplex war mit zwei verschiedenen RNA-Substraten mit starken viralen Polyadenylierungssignalen aktiv, aber auch mit einem Substrat aus der nicht-viralen HMOX-1-RNA. Ein Substrat aus der GAPDH-RNA wurde dagegen nicht prozessiert. Es

wurden Hinweise auf die Existenz eines weiteren Faktors gefunden. Dieser komplementierte die Mischung der gereinigten Prozessierungsfaktoren und ermöglichte die Spaltung des GAPDH-Substrats

Induziert durch die für die Spaltungsreaktion notwendigen *crowders* bildeten die 3'-Prozessierungsfaktoren und die assoziierte RNA unter Reaktionsbedingungen Aggregate. Mehrere Beobachtungen stützten die Vermutung, dass die Spaltungsreaktion in diesen Aggregaten ablief. Die Hypothese, dass es sich bei den Aggregaten um phasengetrennte *liquid droplets* handeln könnte, wurde mit verschiedenen Experimenten getestet. Die Ergebnisse zeigten übereinstimmend, dass keine *liquid droplets* gebildet wurden.

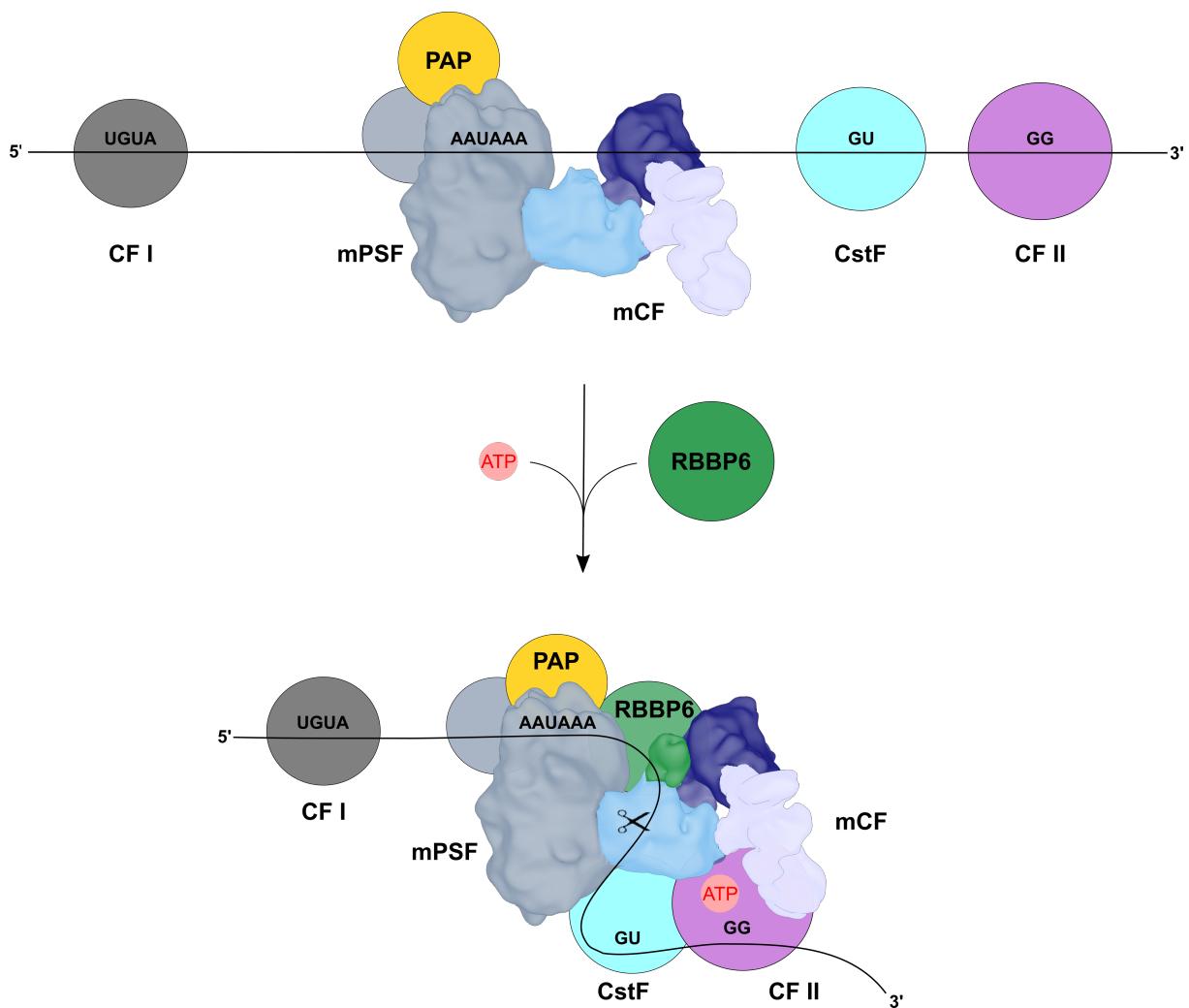


Abbildung 4.1: Modell des rekonstituierten Spaltkomplexes in Säugetieren

Schematische Modelldarstellung des ATP-abhängigen 3'-Prä-mRNA-Spaltkomplexes in Säugetieren. Durch die Bindung von RBBP6 an mCF kommt es zur Konformationsänderung und der Aktivierung des Spaltkomplexes. Die Reaktion ist ATP abhängig. ATP ist von der CF II Untereinheit Clp1 gebunden.

5 Materialien

5.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2-(4-(2-Hydroxyethyl) -1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Gerbu
2-Mercaptoethanol	Fluka
2-Propanol (Isopropanol), \geq 99,8 %	Carl Roth
50 bp DNA Ladder	NEB
[α - ³² P]-UTP, 3000 Ci/mmol	Hartmann Analytic
[γ - ³² P] -ATP, 6000 Ci/mmol	Hartmann Analytic
m ₂ ^{7,3'-O} GP ₃ G (ARCA Cap Analog)	Jena Bioscience
Aceton	Carl Roth
Acrylamid: Bisacrylamid-Lösung 30 % (37,5:1)	Serva
Acrylamid: Bisacrylamid-Lösung 40 % (19:1)	Serva
Agar-Agar, Kobe 1	Carl Roth
Agarose	Peqlab
Ampicillin, Natriumsalz 99 %	Carl Roth
Baktotrypton (Pepton aus Casein), tryptisch verdaut, für die Mikrobiologie	Carl Roth
Betain	Sigma-Aldrich
BlueSlick™	Serva
Bovines Serumalbumin (BSA), Fraktion V, für biochemische Zwecke	Merck
Bromphenolblau, Natriumsalz	Merck
Carbenicillin, Dinatriumsalz	Carl Roth
Cellfectin II reagent (Transfektionsreagenz)	Invitrogen
Color Prestained Protein Standard, Broad Range (10-250 kDa)	NEB
Coomassie Brilliant Blue und R-250	Serva
Cordycepin-Triphosphat (3'-dATP)	Sigma-Aldrich
D-Desthiobiotin	IBA
Dextran aus Leuconostoc mesenteroides (mol wt 9,000-11,000)	Sigma-Aldrich
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Gerbu
Essigsäure, 100%, p. a	Carl Roth

Ethanol, $\geq 99,8 \%$	Honeywell
FBS (Fetal bovine serum) Superior	Biochrom
FLAG-Peptid, Lyophilisat	Sigma-Aldrich
Formaldehyd, mindestens 36,5%, p. a.	Sigma-Aldrich
FuGENE HD Transfektionsreagenz	Promega
Gentamycinsulfat, für die Biochemie	Carl Roth
Glycerin, $\geq 99,5\%$, p. a	Carl Roth
Glycin	Serva
Glykogen (aus der Auster)	Serva
Harnstoff, $\geq 99,5\%$, p. a	Carl Roth
Hefeextrakt, SERVABACTER	Serva
HiScribe SP6 RNA Synthesis Kit	NEB
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Peqlab
Kalibrier-Kit für Gelfiltrationen	Pharmacia
Kanamycinsulfat	Carl Roth
Kreatinphosphat, Dinatriumsalz	Sigma-Aldrich
L-Arabinose, $\geq 99 \%$	Sigma-Aldrich
Leupeptin	Roche
Magermilchpulver Sucofin	Edeka
Methanol, $\geq 99 \%$	Carl Roth
Natriumchlorid, p.a.	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED), p.a.	Merck
Nonidet P-40 (NP-40)	Sigma-Aldrich
O-Phospho-L-serin	Sigma-Aldrich
PageRuler unstained protein ladder (10 - 200 kDa)	Thermo Fisher Scientific
Pepstatin	Roche
Phenol, Roti-Phenol (TE-gesättigt)	Carl Roth
Phenol, Roti-Aqua-Phenol (Wasser-gesättigt)	Carl Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), $\geq 99 \%$	Sigma-Aldrich
Plasmid Mini Prep Kit PeqGOLD I	Peqlab
Plasmid Mini Prep Kit PeqGOLD II	Peqlab
Polyethylenglycol 6000	Carl Roth

Polyvinylalkohol (mol wt 30,000-70,000)	Sigma-Aldrich
Ribonukleosidtriphosphate (NTPs)	Sigma-Aldrich
Spectinomycin-dichlorid-pentahydrat	Sigma-Aldrich
Tetracyclin-hydrochlorid,96%	Calbiochem
Trimethylaminoxid (TMAO)	Sigma-Aldrich
Triethanolamin-hydrochlorid	Sigma-Aldrich
tRNA (<i>E. coli</i>)	Roche
Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan	Merck
Trypanblau-Lösung, 0,4% in PBS	BioRad
Tween-20	Merck
Ultima Gold XR	Perkin-Elmer
Xylencyanol	Carl Roth
X-Gal	Peqlab
Zeocin	Invitrogen
Zymoclean Gel-DNA recovery kit	Zymoclean

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck in p.a.-Qualität erworben.

5.2 Verbrauchsmittel

Material	Hersteller
Chromatographiesäulen aus Polypropylen, 10 ml, mit Fritte	BioRad
Cryokonservierungsgefäße, 2ml	Greiner
DE81-Papier	Whatman
Dialyseschläuche	Serva
Einweg-Zählkammern für Zellzähler TC20	BioRad
Einwegpipetten für die Zellkultur, 2 - 50 ml	Corning, Diagonal
Filterpapier	Whatman
Nitrozellulose-Membranfilter NC20 und RC58, Porengröße 0,2µm	Whatman
Parafilm „M“	Pechiney
Protran Nitrozellulosemembran	Whatman
Reaktionsgefäße, 1,5ml	Sarstedt
Reaktionsgefäße, 2 ml, <i>safe-lock</i>	Eppendorf

Reaktionsgefäß, 5 ml, <i>safe-lock</i>	Eppendorf
Reaktionsgefäß, 5ml	Greiner
Reaktionsgefäß "Protein LoBind" 1,5ml, Safe Lock	Eppendorf
Schnappdeckelröhrchen, 12 ml, Polypropylen	Greiner
Schraubdeckelgefäß, 15 und 50 ml	Greiner
TC-Platte 6well, Standard F	Sarstedt
Ultrafiltrationseinheit Amicon Ultra-2, MWCO30, 2 ml	Merck
Ultrafiltrationseinheit Amicon Ultra-2, MWCO30, 4 ml	Merck

5.3 Geräte

Gerät	Hersteller
ÄKTA pure, FPLC-System	Cytiva
ÄKTA purifier, FPLC-System	Cytiva
Automatischer Zellzähler TC20	BioRad
Blotting-Apparatur, 20 x 20 cm, <i>semi-dry</i>	OWL
Brutschränke	Heraeus Instrument
Cell disruptor	Constant Systems
Cryopräservationskontainer 5100, „Mr. Frosty“	Nalgene
Durchlichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss
Elektroporationsgerät Eporator	Eppendorf
Elektroporationsküvetten, Elektrodenabstand 1 mm	CellProjects
Fluoreszenz- und Autoradiographie-Imager Typhoon 9200	Cytiva
<i>storage phosphor screen</i>	Cytiva
Gelelektrophoresekammern, horizontal	OWL
Gradient Master (Gradienten-Mischer)	BioComp
Kammern für vertikale Gelektrophorese, Gelbreiten 10, 20 und 35 cm	OWL
Kühl-Tischzentrifuge 5417 R	Eppendorf
Kühl-Tischzentrifuge 5427 R	Eppendorf
Kühl-Tischzentrifuge 5810 R	Eppendorf
Kühlzentrifuge Avanti XJN-26	Beckmann
Odyssey DLx	Li-Cor
Rotor JA-16.250	Beckmann

Rotor JA-25.50	Beckmann
Schüttelinkubatoren für die Zellkultur	Infors
Sonifikator, Branson Sonifier 250	Branson
Spektrophotometer U-3000	Hitachi
Sterilbank Scanlaf Mars	Labogene
Szintillationszähler Tri-Carb 2100TR	Packard
Thermoblockheizer	Bioblock Scientific
Tischzentrifuge, Biofuge <i>pico</i>	Heraeus Instruments
UV-Vis Quarzglasküvetten, 15, 80 und 100 µl (1 cm)	Hellma

5.4 Chromatographiesäulen und -materialien

Säule	Material
Anti-FLAG M2 Affinitätsgel	Sigma Aldrich
DEAE-Sepharose CL-6B	Cytiva
HiTrap Heparin HP 1 ml/5 ml	Cytiva
Ni-NTA-Agarose, 50 % Suspension	Qiagen
Resource Q 1 ml	Cytiva
Resource S 6 ml	Cytiva
Strep-Tactin-Sepharose, 50 % Suspension	IBA
Superose6 10/300 24 ml	Cytiva
Superose6 <i>prep grade</i>	Cytiva

5.5 Software

Software	Herausgeber
ImageQuant, Version 5.2	Cytiva
Image Studio	Li-Cor
Inkscape 1.1.2	Free Software
	Foundation, Inc
Jalview 2.11.3.0	Waterhouse et al., 2009
Microsoft Office	Microsoft
Photoshop, CS6, Version 13.0.1 (2012)	Adobe
SigmaPlot 12.5	Systat
SnapGene	GSL Biotech

5.6 DNA-Konstrukte

Die Herstellung der Baculoviren und die Insektenzellexpressionen erfolgte größtenteils gemeinsam durch Anne-Katrin Hoffmeister und Dr. Uwe Kühn (Planung, Klonierung, Herstellung Bacmide).

5.6.1 Bacmide/Baculoviren

Bacmid/Baculovirus	ORFs	Ursprung
pBac-mCherry ^{loxP} -His-Rbbp6-CFlag ^{Tn7}	mCherry; His-RBBP6-CFlag	U. Kühn, diese Arbeit
pBac-mCherry ^{loxP} HF-Rbbp6 ^{Tn7}	mCherry; His-Flag-RBBP6 ₁₋₇₈₀	A-K. Hoffmeister, U. Kühn, diese Arbeit
pBac mCherry ^{loxP} His-MBP-HisMycRbbp6 ^{Tn7}	mCherry; His-MBP-HisMyc-RBBP6	P.Schäfer
pBac HF-Rbbp6aa780 C161G C163G ^{Tn7} mcherry ^{loxP}	mCherry; His-Flag-RBBP6 ₁₋₇₈₀ C161G C163G	A-K. Hoffmeister, U. Kühn
pBac mcherry ^{loxP} HF-Rbbp6_780 N312D ^{Tn7}	mCherry; His-Flag-RBBP6 ₁₋₇₈₀ N312D	A-K. Hoffmeister, U. Kühn
pBac HF-GFP-Rbbp6 fl ^{Tn7}	HF-GFP-Rbbp6 fl	A-K. Hoffmeister, U. Kühn
pBac mCherry ^{loxP} HF-Rbbp6 ΔU-box ^{Tn7}	Mcherry; HF-Rbbp6 fl ΔU-box	A-K. Hoffmeister, U. Kühn
pBac mCherry ^{loxP} HF-MBP-Snap-HF-Rbbp6_340 ^{Tn7}	mcherry, His-MBP-Snap-His-Flag-RBBP6 ₁₋₃₄₀	A-K. Hoffmeister, U. Kühn
pBac YFP ^{loxP} HF-Rbbp6ΔDWNN ^{Tn7}	YFP, His-Flag-Rbbp6ΔDWNN	A-K. Hoffmeister, U. Kühn
pBac mPSF ^{Tn7}	His-Myc-Wdr33 healed, Flag-CPSF1, CPSF4, hFip1	A-K. Hoffmeister, U. Kühn
pBac Flag-CPSF1 CPSF4 MH-WDR33healed ^{Tn7}	Flag-CPSF1, CPSF4, Myc-His-WDR33healed	A-K. Hoffmeister, U. Kühn
pBac Flag-CPSF1 ^{loxP} HF-GFP-WDR33-P ^{Tn7}	Flag-CPSF1, His-Flag-GFP-WDR33-P	A-K. Hoffmeister, U. Kühn

pBac Flag-CPSF1 ^{loxP} HF-GFP-WDR33-A ^{Tn7}	Flag-CPSF1, His-Flag-GFP-WDR33-A	A-K. Hoffmeister, U. Kühn
pBac HF-EGFP WDR33 E ^{loxP}	HF-EGFP WDR33 E	A-K. Hoffmeister, U. Kühn
pBAC GFP-mPSF	mCherry, CPSF4, hFip1; Flag-CPSF1; His-Flag-GFP-WDR33	A-K. Hoffmeister, U. Kühn
pBac YFP ^{loxP} StrepII-hFip1 ^{Tn7}	YFP, StrepII-hFip1	A-K. Hoffmeister, U. Kühn
pBac YFP ^{loxP} StrepII-hFip1 Isoform4 ^{Tn7}	YFP, StrepII-hFip1 Isoform4	A-K. Hoffmeister, U. Kühn
pBac Flag-CPSF1 CPSF4 MH-WDR33healed ^{Tn7*}	Flag-CPSF1; His-Flag-GFP-WDR33; CPSF4-His	A-K. Hoffmeister, U. Kühn
pBAC GFP-mPSF Δ CPSF4	YFP, StrepII-hFip1; Flag-CPSF1; His-Flag-GFP-WDR33	A-K. Hoffmeister, U. Kühn
pBac YFP ^{loxP} StrepII-CF I 68k His8-CF I 25k ^{Tn7}	YFP, StrepII-CF I 68k, His8-CF I 25k	M. Lorbeer, P. Schäfer
pBac YFP ^{loxP} Symplekin Δ N340 ^{Tn7}	YFP, Symplekin Δ N340	A-K. Hoffmeister, U. Kühn
pBac YFP ^{loxP} StrepII-CPSF3 CPSF2 ^{Tn7}	YFP, StrepII-CPSF3, CPSF2	A-K. Hoffmeister, U. Kühn
pBac untagged mCF3 ^{loxP}	CFP; Symplekin; CPSF3; CPSF2	U. Kühn, diese Arbeit
pBac untagged mCF3mutated ^{loxP}	CFP; Symplekin; CPSF3D75K/H76A; CPSF2	A-K. Hoffmeister, U. Kühn, diese Arbeit
pBac untagged mCF3 ^{loxP} CstF2 ^{Tn7}	CFP; Symplekin; CPSF3; CPSF2, CstF2	diese Arbeit
pBac CSTF Δ IDR(GFP-CstF50) ^{Tn7}	CSTF64 Δ IDR(GFP-CstF50)	A-K. Hoffmeister, U. Kühn
pBac-mCherry ^{loxP} -CstF ^{Tn7}	mCherry; Strep-CstF 50k, CstF 64k, His-CstF77k	M. Lorbeer, P. Schäfer, diese Arbeit

pBac-mCherry ^{loxP} - StrepCstF50Tn7	mCherry, Strep-CstF50	Masterarbeit M. Schmidt
pBac-mCherry ^{loxP} - CstFΔ50k ^{Tn7}	mCherry, His-CstF77, CstF64	Masterarbeit M. Schmidt
pBac-mCherry ^{loxP} - CstFtau ^{Tn7}	mCherry; His-CstF77, Flag- CstF2tau, StrepII-CstF50	Masterarbeit M. Schmidt
pBac-mCherry ^{loxP} - CstF+CstFtau ^{Tn7}	MCherry; His- CstF77_Flag2tau_CstF64_St repII-CstF50	Masterarbeit M. Schmidt
pBac-mCherry ^{loxP} - CstFtauΔ50k ^{Tn7}	MCherry; His-CstF77, Flag- CstF2tau	Masterarbeit M. Schmidt
pBac-YFP ^{loxP} -CF II ^{mTn7}	YFP; Strep-hPcf11, His- hClp1	A-K. Hoffmeister, F. Kluge, P. Schäfer
pBac-YFP ^{loxP} -CF II ^{m-481Tn7}	YFP; His-hClp1, Pcf11 (770-1555)	C. Tüting
pBac GST- CTD ^{Tn7} mcherry ^{loxP}	GST-CTD; mCherry	J. Buhl, A-K. Hoffmeister
pBac YFP ^{loxP} His-Xrn2 ^{Tn7}	YFP; His-Xrn2	A-K. Hoffmeister, U. Kühn, diese Arbeit
pBac Xrn2 D235A ^{Tn7} YFP ^{loxP}	YFP; His-Xrn2D235A	A-K. Hoffmeister, U. Kühn, diese Arbeit
pBac-His-CDC73 ^{Tn7}	His-CDC73	U. Kühn, M. Schmidt
pBac PP1alpha Komplex ^{Tn7} mCherry ^{loxP}	PP1a-Komplex: His- WDR82_hTox4_hPP1a_Fla g-mPnnts; mCherry	A-K. Hoffmeister, U. Kühn

* *healed* bedeutet, dass zwei Punktmutationen in WDR33 geheilt wurden. Die Mutationen besaßen jedoch keinen Einfluss auf die Spaltreaktionen. RBBP6ΔCxx entspricht den C-terminalen RBBP6 Deletionsvarianten 1-253 bis 1-1220.

5.6.2 *E. coli* Expressionsplasmide

Plasmid	Ursprung
pET21-His-GST-CTD	U. Kühn, Bachelorarbeit M. Schmidt
pET30 HF-Rbbp6 aa322	U. Kühn
pET30 HF-Rbbp6 aa340	J. Buhl, U. Kühn
pET30 HF-Rbbp6 aa375	J. Buhl, U. Kühn

pET30 HF-Rbbp6 aa431

J. Buhl, U. Kühn

pET30 HF-Rbbp6 aa490

J. Buhl, U. Kühn

5.6.3 ORFs

ORF/Protein	UniProt/Genbank	Ursprung
hFip1	Q6UN15	Kaufmann et al., 2004; Schönemann et al., 2014
hFip1 Isoform4	Q6UN15-4	Schönemann et al., 2014
hWDR33 (WDC146)	Q9C0J8	Ito et al., 2001; Schönemann et al., 2014
hSymplekin	Q92797	Schönemann et al., 2014
hCPSF1 (=CPSF160)	Q10570	Schönemann et al., 2014
hCPSF4 (=CPSF30)	O95639-2	Schönemann et al., 2014
hCPSF2 (=CPSF100)	Q9P2I0	SinoBiological
hCPSF3 (=CPSF73)	Q9UKF6	SinoBiological
hRBBP6	Q7Z6E9	Promega (#FHC25637)
eYFP		Berger et al., 2004)
CFP	CAO79586.1 (gb)	Schönemann et al., 2014
mEGFP, SNAP-tag		J. Wang et al., 2018
mCherry	ADO95149.1 (gk)	Schönemann et al., 2014
hPcf11	O94913	Schäfer et al., 2018
hClp1	Q92989	de Vries, 2000; Schäfer et al., 2018
CstF1 (=CstF50)	Q05048	Schäfer et al., 2018
CstF2 (=CstF64)	P33240	Schäfer et al., 2018
CSTF2 τ (=CstF64 τ)	Q9H0L4	Walter Keller
CstF3 (=CstF77)	Q12996	Schäfer et al., 2018

CF I 25	O43809	Dettwiler et al., 2004; Schäfer et al., 2018
CF I 68	Q16630	Dettwiler et al., 2004; Schäfer et al., 2018
bovine PAP α	P25500	Kühn et al., 2017
bovines PABPN1	Q28165 (NP- 776994)	Kühn et al., 2017
mCTD	P08775	David Bentley
PP1 Komplex		
hPP1 α	P62136	Sino Biological (HG10533- M), David G. Skalnik
mPNUTS	Q80W00 (mouse)	David G. Skalnik
hWDR82	Q6UXN9	Diese Arbeit
hTOX4	O94842	David G. Skalnik
hSsu72	Q9NP77	Promega (# FHC08360)
hCDC73	Q6P1J9	U. Kühn, M. Schmidt
hXRN2/hXRN2 D235A	Q9H0D6	Steven West

#Bestellnummer

5.6.4 Transkriptionsvorlagen

Die Bezeichnungen Wildtyp (WT) und Mutante (Δ) beziehen sich auf das Polyadenylierungssignal AAUAA und ggf. den Basenaustausch von Uracil nach Guanin AAGAA in der mutierten Version.

Plasmid/Vorlage	Linearisierung des Plasmids mit	Ursprung
pSP64-L3 WT / Δ	DraI	Humphrey et al., 1987
pSP64-L3pre WT / Δ	RsaI	Christofori & Keller, 1989
L3pre_V2	PCR	Florian Kluge, Uwe Kühn
pSP64-L3pre A15 WT / Δ	BbsI	Kerwitz, 2003; Kühn et al., 2009
pSP64-SV40 WT / Δ	DraI	Conway & Wickens, 1987

- Materialien -

pSP64-SV40 control	DraI	Uwe Kühn, diese Arbeit
pSP64-HMOX WT	BamHI	Christine Wagner, Uwe Kühn;
pSP64-GAPDH WT /Δ	PstI	Uwe Kühn; diese Arbeit
pSP64-SV40- GAPDH	PstI	Uwe Kühn; diese Arbeit
pSP64-GAPDH- SV40	DraI	Uwe Kühn; diese Arbeit
pSP64-BIK WT	PstI	Uwe Kühn

Tabelle 5.1: DNA-Sequenzen der Transkriptionsvorlagen

Das Polyadenylierungssignal (AAUAAA/AATAAA) ist in orange, CF I-Bindungssequenzen in grau und die Spaltstelle sind in grün markiert. Die Sequenzen sind in einem pSP64 Vektor kloniert und besitzen einen SP6-Promoter mit der Sequenz attaggtgacactatag, sodass alle Transkripte mit einem Guanin starten.

Polyadenylierungssignal AAUAAA

CFI Erkennungssequenz UGUA

Spaltstelle ⚡

5.6.5 DNA-Primer

Name	Sequenz 5' – 3'	Hersteller/Ursprung
RBBP6 N312D 723 for	CTCCTGATGCTTAATTGCCGATAAGTTTACGAC AGGCTGTAAATAAC	Invitrogen/ U. Kühn
RBBP6 N312D 724 rev	GTTATTTACAGCCTGTCGAAAAACTTATCGGCAA TTAAAGCATCAGGAG	Invitrogen/ U. Kühn
RBBP6 C161G/C164G 725 for	CCACCTCCATCTTACACGGGTTCCGTGGTGGTAA ACCTGGACATTATATTAAG	Invitrogen/ U. Kühn
RBBP6 C161G/C164G 726 rev	CTTAATATAATGTCCAGGTTACCACCAACGGAAAC CCGTGTAAGATGGAGGTGG	Invitrogen/ U. Kühn
WDR82 cDNA 366 5'UTR	TGGCCGACTTCCCGCTAG	Invitrogen/ U. Kühn
WDR82 cDNA 367 3'UTR	CAGAAATAGCCAAGCAGCAAC	Invitrogen/ U. Kühn
CDC73 cDNA382 for	GCTAGCGAATTCATGGCGGACGTGCTTAGCGT	Invitrogen/ U. Kühn
CDC73 cDNA 383 rev	GGTACCAAGCTTCAGAATCTCAAGTGCGATTAT GCTTTACC	Invitrogen/ U. Kühn

5.7 Proteine

5.7.1 Antikörper

Name	Ursprung	Verdünnung	Herkunft
α-CstF2	Maus	1:2000	Abnova
α-CstF3	Maus	1:2000	Abnova
α-Flag, M2, monoklonal	Maus	1:2000	Sigma-Aldrich
α-Flag RBBP6-(N)	Kaninchen	1:1000	Biomol

α -Ser2-P CTD	Ratte	1:1000	Chapman et al., 2007; Prof. Dr. Aloys Schepers
CTD7 3E10			
α -Kaninchen, IRDye 800CW	Esel	1:15000	Li-Cor
α -Maus, IRDye 800CW	Ziege	1:15000	Li-Cor
α -Ratte, IRDye 800CW	Ziege	1:15000	Li-Cor
α -Maus, IRDye 680RD	Esel	1:15000	Li-Cor

5.7.2 Verwendete Proteinfusionen und zusätzliche Aminosäuren der rekombinanten Proteine

Proteine	N-terminale Peptidfusionen und zusätzliche Aminosäuren
CFP	MVLA – CFP
Cherry	MVLA – mCherry
eYFP	eYFP – RSI
His-CF I 25	MSHHHHHHHHGDP – CF I 25 (aa2-227)
Strep-CF I 68	MWSHPQFEKG – CF I 68
Strep-Pcf11	MWSHPQFEKARGA – Pcf11
Pcf11 Δ N769	Pcf11 (aa770-1555)
Flag-CPSF1 (=CPSF160)	MDYKDDDDKAIA – CPSF160
CPSF1 (=CPSF160)	CPSF160 – V
CPSF2 (CPSF100)	keine
CPSF3 (CPSF73)	keine
CPSF4 (CPSF30)	keine
hFip1	keine
hFip1 Isoform 4	MWSHPQFEKLA – hFip1 – Isoform 4
Myc-His-WDR33	MEQKLISEEDLHHHHHHTS – WDR33
Symplekin	keine
Δ NSymplekin	Symplekin (aa341-
Strep-CstF50 (CSTF1)	MWSHPQFEKDP – CstF50 (aa2-431)
GFP-CstF50	mGFP (A206k) – LEVLFQGPIA – CstF50

GFP-CstF64	mGFP (A206k) – LEVLFQGPIA – CstF64
CstF64 (CSTF2)	Keine
CstF64 ΔIDR	CstF77 (aa1-195)
Flag-CstF64τ (CSTF2τ)	MDYKDDDDKLD – CstF64tau
GFP-WDR33	MVLAHHHHHHHADYKDDDDKDP – eGFP – AAARVTS – WDR33
GFP-WDR33 E	MVLAHHHHHHHADYKDDDDKDP – eGFP – AAARVTSM- WDR33 aa964-1200
His-CstF77 (CSTF3)	MSHHHHHHHHGDP – CstF77 (aa2-717)
His-RBBP6-Flag	MSHHHHHHHHAIA – Rbbp6 – VLDYKDDDDK
HF-RBBP6 und C-terminal	MSHHHHHHHADYKDDDDKAIA – RBBP6
Deletionsvarianten	
HF-RBBP6-ΔRING	MSHHHHHHHADYKDDDDKAIA – hRBBP6 (aa1-252 + aa327-1792)
HF-GFP-RBBP6	MSHHHHHHHADYKDDDDKAI-eGFP(A206K)- LEVLFQGPIA-RBBP6
His-MBP-RBBP6	MGSSHHHHHSSGR – MBP – NSSNNNNNNNNNNSSGRLEVLFQGPAIA – RBBP6 GPAIA – RBBP6 (nach HRV 3 C Spaltung)
His-MBP-SNAP-HF-RBBP6	MGSSHHHHHSSGR – MBP – NSSNNNNNNNNNNSSGRLEVLFQGP –Snap – GSSSGRENLYFQGAAA- MSHHHHHHHADYKDDDDKAIA - RBBP6 GP –Snap-HF-RBBP6 (nach HRV 3 C Spaltung)
RBBP6-FLAG aa1-335 (HEK293) und Varianten (Felix Sandmeir)	GP - RBBP6 (aa1-335) - DYKDDDDK
pBIG1a-PP1A complex:	
His-WDR82	MSHHHHHHHHGDP – WDR82
TOX4	keine
PP1α	keine
Flag-maus Pnnts	MDYKDDDDKASVVEF – mPnnts

His-CDC73	MSHHHHHHHHHQF – CDC73
His-SUMO-Ssu72	RDL – Ssu72 (nach Spaltung)
His-Xrn2 und Mutante D235A	MSHHHHHHHHASRASEA – Xrn2
GST-mouse RNA Pol II CTD	MTGGQQ – GST – SDLVPRGSV – mCTD (aa1586- 1970/S1724 fehlen)
bovine PAP α and Varianten	MAHHHHHH – bPAP
bovines His-PABPN1	MAHHHHHH – bPABPN1

N- oder C-terminale Verlängerungen sind im Ein-Buchstaben-Code gelistet. MBP- Maltose Bindungs-Protein; CFP-Cyan fluoreszierendes Protein

5.7.3 Kommerzielle Enzyme und sonstige Proteine

Protein	Hersteller
<i>Calf intestinal phosphatase</i> (CIP)	NEB
Cre-Rekombinase und Reaktionspuffer	NEB
HeLa nukleärer Extrakt	Ipracell
Proteinkinase K	Merck
Pyrophosphatase, anorganische (0,1 U/ μ l)	Thermo Fisher Scientific
Restriktionsendonukleasen und Reaktionspuffer	NEB
RNase-Inhibitor (40 U/ μ l), Murin	NEB
SNAP-Surface549	NEB
SP6-RNA-Polymerase (20 U/ μ l)	NEB
T4 Polynukleotidkinase (PNK; 10 U/ μ l)	NEB
T4-DNA-Ligase (400 U/ μ l)	NEB

5.8 Zellstämme

5.8.1 Bakterien

Stamm	Genotyp	Ursprung / Hersteller
DH10B	<i>E. coli</i> , F-, <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), $\varphi 80 lacZ \Delta M15$, $\Delta lacX74$, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>araD13</i> , Δ (<i>ara, leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , λ - <i>rpsL</i> , <i>nupG/pMON14272/pMON7124</i>	

BL21-CodonPlus (DE3)	<i>E. coli</i> B F- <i>ompT hsdS(r-m-)</i> <i>dcm+</i> Tetr gal λ(DE3) <i>endA metA::Tn5(kanr)</i> BB Hte [<i>argU ileY leuW Camr</i>]	T7-Promotor-basierter Expressionsstamm. Von Agilent.
BW23474	<i>E. coli</i> , F-, Δ(<i>argF-lac</i>)169, Δ <i>uidA4::pir-116</i> , <i>recA1</i> , <i>rpoS396</i> (Am), <i>endA9</i> (del-ins)::FRT, <i>rph-1</i> , <i>hsdR514</i> , <i>rob-1</i> , <i>creC510</i>	Propagation der Plasmide pUCDM und pSPL des MultiBac-Systems (Berger et al., 2004)
DH10-MultiBac	<i>E. coli</i> , F-, <i>mcrA</i> , Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Φ80 <i>lacZΔM15</i> , Δ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>araD139</i> , Δ(<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , λ- <i>rpsL</i> , <i>nupG</i> /pMON14272/ pMON7124	Stamm enthält das MultiBac-Bacmid (Berger et al., 2004)
DH10-MultiBac ^{Cre}	<i>E. coli</i> , F-, <i>mcrA</i> , Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), 80 <i>lacZΔM15</i> , Δ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>araD139</i> , Δ(<i>ara</i> , <i>leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , λ- <i>rpsL</i> , <i>nupG</i> /pMON14272/ pMON7124	Stamm DH10-MultiBac transformiert mit Plasmid pBADZ- HisCre

5.8.2 Insektenzellen

Stamm	Ursprung	Hersteller
Sf21	IPLB-Sf21AE, Immortalisierte Zelllinie aus Ovarzellen von <i>Spodoptera frugiperda</i> (Vaughn et al., 1977)	Invitrogen

5.8.3 Medien

Name	Bestandteile / Einsatz	Hersteller
LB	10 g/l Baktotrypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl	Carl Roth
SOB	20 g/l Trypton, 5g/l Hefeextrakt, 0,96 g/l MgCl ₂ , 0,5 g/l NaCl, 0,186 g/l KCl	Carl Roth
SOC	30,7 g/l SOB-Trockenmedium, 20 mM Glukose	Carl Roth
SB	24 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Trypton;4 ml/l Glycerin	Carl Roth
TY	10 g/l Baktotrypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, pH 7,5 (mit NaOH eingestellt), autoklaviert	Carl Roth
ExCell 420 SFM	Serumfreies Medium für die Kultivierung von Insektenzellen	Sigma-Aldrich

5.8.4 Medienzusätze bakterieller Kulturen

Substanz	Stammkonzentration	Endkonzentration	Hersteller
Ampicillin	100 mg/mL in 50% Ethanol	100 µg/mL	Carl Roth
Carbenicillin	50 mg/mL in 50% Ethanol	50 µg/mL	Carl Roth
Chloramphenicol	30 mg/mL in Ethanol	30 µg/mL	Merck
Gentamycin	10 mg/mL in Wasser	10 µg/mL	Carl Roth
IPTG	400 mM in Wasser	0,5 mM	Peqlab
Kanamycin	30 mg/mL in Wasser	30 µg/mL	Carl Roth
Tetracyclin	12,5 mg/mL in 50% Ethanol	12,5 µg/mL	Calbiochem
X-Gal	20 mg/ml in DMF	0,2 mg/mL	Peqlab

6 Methoden

6.1 Mikro- und molekularbiologische Methoden

6.1.1 Sterilisation

Nährmedien, Lösungen, Materialien und Glasgeräte wurden, soweit möglich, für mindestens 30 Minuten bei 121 °C sterilisiert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden per Filtration über Nitrozellulosefilter mit einer Porengröße von 0,2 µm sterilisiert. Plastikgeräte wurden mittels UV-Bestrahlung und / oder Behandlung mit Bacillol sterilisiert.

6.1.2 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Zur Herstellung elektrokompetenter Bakterien wurden diese aus einer Glycerin-Stammkultur auf einer LB-Agar-Platte mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen, vereinzelt und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach Erhalt isolierter Kolonien wurde eine Vorkultur mit LB-Medium und entsprechenden Antibiotika inokuliert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) der Vorkultur wurde bestimmt, und 400 ml frisches LB-Medium wurden bei einer optischen Dichte zwischen 0,05 und 0,1 inokuliert. Die Inkubation bei 37 °C erfolgte bis eine OD_{600} zwischen 0,6-0,8 erreicht wurde. Die Zellen wurden auf Eis abgekühlt und dann für 15 Minuten bei 3300 g und 4 °C geerntet. Die Bakterien wurden mit 1 Volumen eiskalter 10 %iger Glycerinlösung resuspendiert und erneut geerntet. Dieser Vorgang wurde mit 200 ml und 40 ml Glycerinlösung wiederholt. Anschließend wurden die Zellen in 0,8 ml Glycerinlösung aufgenommen, in 40-50 µl aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. Die gefrorenen Aliquots wurden bei -80 °C gelagert.

6.1.3 Transformation elektrokompetenter Bakterien

Die Transformation von elektrokompetenten Bakterien erfolgte durch Elektroporation. Dabei wurden aufgetaute elektrokompetente Zellen mit 100-250 ng der Plasmid-DNA gemischt und kurze Zeit in einer Elektroporationsküvette auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 5 ms mit 1800 V elektroporiert (Spaltbreite der Küvette 1 mm; bei 2 mm 2500 V). Die Zellen wurden sofort mit 1 ml SOC-Medium bei Raumtemperatur resuspendiert, in ein geeignetes Reaktionsgefäß überführt und für 45-60 Minuten bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Erholungszeit konnte bei Ampicillin als Selektionsmarker vernachlässigt werden. Anschließend wurde die Suspension bei drei verschiedenen Verdünnungen auf selektiven LB-Agar-Platten ausgestrichen und auf positive Klone selektiert.

6.1.4 Herstellung von Glycerinkulturen

Glycerinkulturen dienten zur langfristigen Lagerung von bakteriellen Klonen. Dafür wurden 750 µl einer Über-Nacht-Kultur mit 250 µl steriler 60 %iger (w/v) Glycerinlösung gemischt, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei –80 °C gelagert.

6.2 Das MultiBac-System

Für die Expression von rekombinanten Proteinen in Insektenzellen wurde in dieser Arbeit das MultiBac-System als Klonierungs- und Expressionssystem verwendet (Berger et al., 2004; Fitzgerald et al., 2006). Das System dient vor allem der Expression größerer Proteinkomplexe und wurde von T.J. Richmond und Kollegen an der ETH Zürich, ausgehend vom Bac-to-Bac-System von Invitrogen, entworfen.

6.2.1 Klonierung und Multiplikation von Zielgenen

Die Klonierungsarbeiten für das MultiBac System erfolgten mit den sechs Transfervektoren pSPL, pUCDM (Donorplasmide), pFBDM, pKL, pFL und pKDM (Akzeptorplasmide). In allen Vektoren unterliegt die Transkription der Zielgene der Kontrolle durch die viralen Promotoren p10 und polH und alle Vektoren besitzen entsprechend zwei *multiple cloning sites* (MCS). Mit diesen können gewünschte Zielgene per Restriktionsverdauung und Ligation in kurzer Zeit zielgerichtet in die Transfervektoren kloniert werden. Die Donorplasmide unterscheiden sich mit einem R6K γ -Replikationsursprung von den Akzeptorplasmiden (BR322/Cole1-Replikationsursprung). Durch den R6K γ -Replikationsursprung können diese nur in Wirtsorganismen mit *pir*-Gen exprimiert werden, welches in regulären *E. coli*-Zellen nicht vorhanden ist. Bei erfolgreicher Fusion bleibt die Antibiotika-Resistenz des Donors erhalten. Hierdurch kann über diesen Selektionsmarker in *pir*-Zellen nach positiven Klonen selektiert werden. Zusätzlich unterscheiden sich die Vektoren durch ihre unterschiedlichen Antibiotika-Resistenzen (Bieniossek et al., 2008).

Konstrukte, die für mehr als zwei rekombinante Proteine kodieren, können auf zwei verschiedenen Wegen generiert werden. Zum einen besitzen die Transfervektoren sogenannte Multiplikationsmodule zwischen den beiden MCS. In diese können mittels Restriktion beide MCS aus einem zweiten Transfervektor in den Zielvektor kloniert werden. Zum anderen besteht die Option für eine *in vitro* Cre-loxP-Rekombination: ein Donorplasmid wird mit einem Akzeptorplasmid pKL oder pFL fusioniert (**Abbildung 6.1**).

Die Integration eines Transfervektors in das Baculovirusgenom erfolgt entweder über die Cre/loxP-Elemente für Konstrukte, basierend auf Donorplasmiden, oder für fusionierte,

beziehungsweise auf Akzeptorplasmid basierenden Konstrukte über eine Tn7-Transposition. Dazu besitzen Akzeptorplasmide Tn7-Transpositionselemente. Für die Integration werden spezielle *E. coli*-Zellen verwendet in denen das MultiBac-Baculovirusgenom als einzelne, künstliche Kopie vorhanden ist.

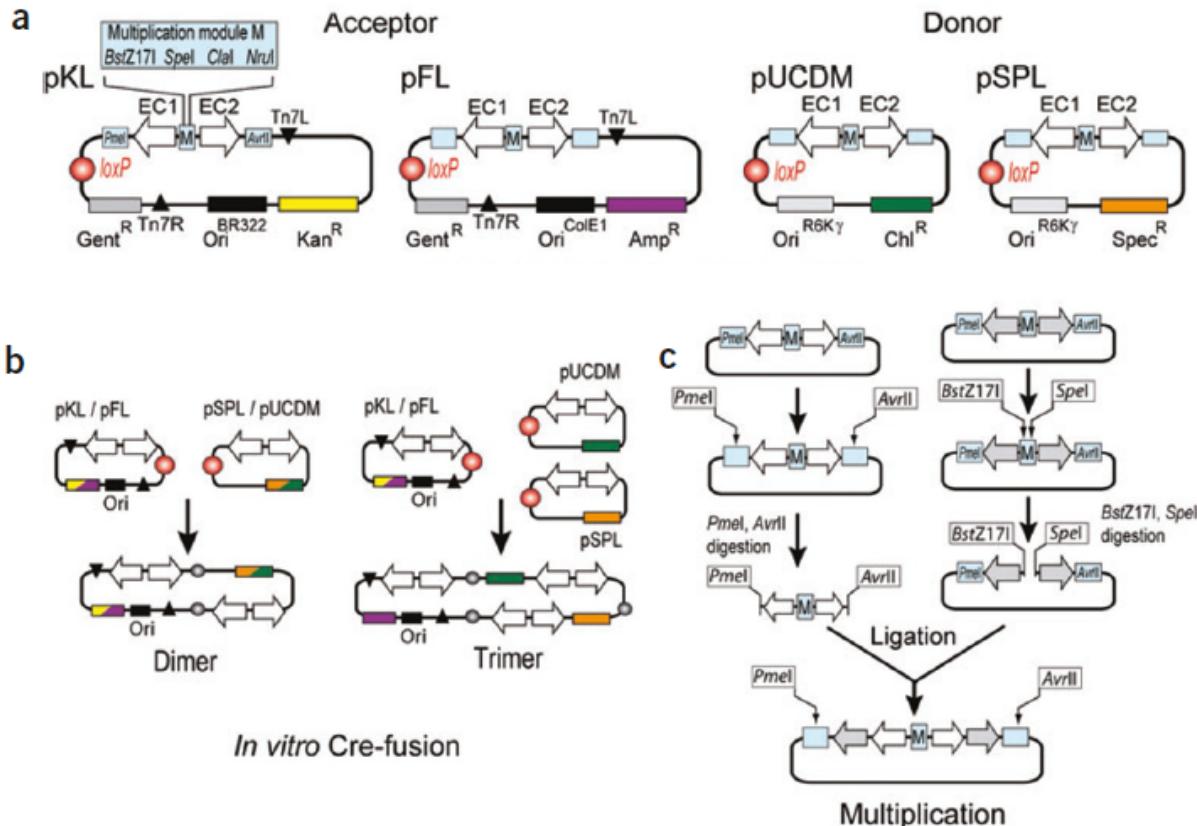


Abbildung 6.1: Schematische Darstellung zur Erstellung von MultiBac-Transfervektoren
(A) Übersichtsdarstellung der Akzeptorplasmide pKL und pFL und der Donorplasmide pUCDM und pSPL. **(B)** Schematische Darstellung der Assemblierung von Akzeptor- und Donorplasmiden durch die Verwendung der Cre-loxP-Rekombinase. Für die Generierung von Multigen-Plasmiden (Dimere oder Trimere) kann die Fusion von Akzeptorplasmiden mit Donorplasmiden sowohl mit einem als auch zwei Donorplasmiden ablaufen. **(C)** Erstellung von Multigenen über die Verwendung des Multiplikationsmoduls M. Hierbei werden über Restriktion die MCSs des einen Vektors in einen Akzeptor integriert und Vektoren mit mehreren ORFs können generiert werden. Entnommen aus Fitzgerald et al., 2006.

6.2.2 Fusion von Transfervektoren mittels *In vitro* Cre-loxP-Rekombination

Die Fusion der Transfervektoren durch Cre-loxP-Rekombination erfolgte in dieser Arbeit für die Erstellung des mPSF-Komplexes und wurde nach dem Hersteller Protokoll (NEB) durchgeführt.

Die Reaktion erfolgte für 30 Minuten bei 37 °C. 1-5 µl der Rekombinationsmischung wurde in elektrokompetente Bakterien transformiert. Zum Erhalt positiver Klone wurden die transformierten Zellen auf LB-Platten mit Antibiotika selektiert. Der Erfolg der Rekombination ist über die Antibiotika-Resistenzen des Donorplasmids kontrolliert worden.

In vitro Cre-loxP-Rekombination

1x Cre-Reaktionspuffer
1 U Cre-Rekombinase
500 ng Donorplasmid
500 ng Akzeptorplasmid
ad ddH₂O 10 µl

6.2.3 Herstellung elektrokompetenter DH10-MultiBac^{Cre}-Zellen

Elektrokompetente DH10-MultiBac^{Cre}-Zellen, die für die Integration von Transfervektoren via Cre-loxP-Rekombination benötigt werden, wurden nach dem Protokoll aus Fitzgerald et al., 2006 hergestellt. Die Identifikation positiver Klone erfolgte über die Selektion auf den Antibiotika Kanamycin, Tetracyclin und Zeocin.

6.2.4 Integration von Transfervektoren in Bacmide via Cre-loxP-Rekombination

Für eine Integration von Donorplasmiden in das MultiBac-Baculovirusgenom wird eine Rekombination über die Cre-loxP-Rekombinase benötigt (siehe **Abbildung 6.2**). Hierfür wurden 250 ng Donorplasmid durch Elektroporation in DH10-MultiBac^{Cre}-Zellen transformiert. Die DH10-MultiBac^{Cre}-Zellen enthalten sowohl das MultiBac-Bacmid und können die Cre-Rekombinase exprimieren. Die transformierten Zellen wurden in 1,5 ml SOC-Medium aufgenommen und einer 6-8 stündlichen Erholungszeit bei 37 °C ausgesetzt. Die Selektion positiver Klone erfolgte auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika sowie durch Blau-Weiß-Selektion. Positive Klone waren blau. Diese wurden entweder zur Herstellung von neuen elektrokompetenten Zellen oder zur Integration weiterer Transfervektoren über Tn7-Transposition verwendet.

6.2.5 Integration von Transfervektoren in Bacmide via Tn7-Transposition

Zur Integration von Transfervektoren in das MultiBac-Baculovirusgenom wurden 250 ng Akzeptorplasmid in elektrokompetente DH10B-Multibac-Zellen transformiert. Nach der Transformation wurden die Zellen in 1,5 ml SOC-Medium aufgenommen und für 6-8 Stunden Erholungszeit bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Während der Inkubationszeit erfolgte die Integration des Plasmids in das Bacmid-Genom mittels Tn7-Transposition (siehe **Abbildung 6.2**). Anschließend wurden die Zellen auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika selektiert. Aufgrund einer Blau-Weiß-Selektion wurden positive von negativen Kolonien unterschieden

(positiv=weiß). Zum Ausschluß von falsch positiven oder Mischklonen wurden die Kolonien zweimal vereinzelt.

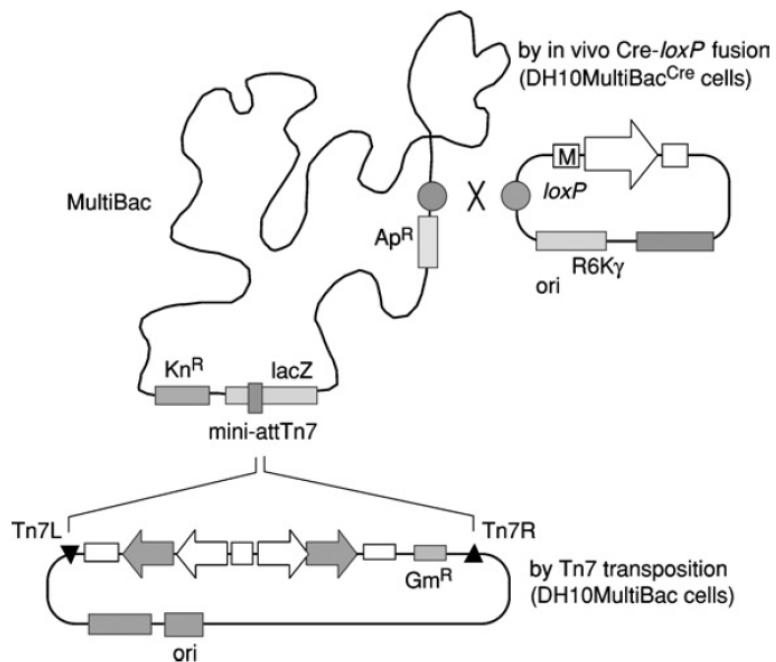


Abbildung 6.2: Schematische Darstellung der Erzeugung eines Bacmid

Gezeigt ist die Integration eines Transfervektors in das Baculovirus-Genom über Cre-loxP-Rekombination von Donorplasmiden. Dabei werden DH10MultiBac^{Cre}-Zellen benötigt, da diese die Cre-Rekombinase exprimieren können. Zusätzlich ist unten die Integration über die Tn7-Transposition abgebildet. Hierbei erfolgt die Integration in DH10MultiBac-Zellen von Akzeptorplasmiden oder von Akzeptorplasmiden mit integrierten Donorplasmiden. Entnommen aus Bieniossek et al., 2008.

6.2.6 Isolation rekombinanter Bacmid-DNA

Die Isolation rekombinanter Bacmid-DNA erfolgte mittels alkalischer Lyse und anschließender Isopropanolfällung.

Puffer I Resuspensionspuffer	Puffer II Lysepuffer	Puffer III Neutralisationspuffer
50 mM Tris/HCl pH 8	200 mM NaOH	3 M KAc pH 5,5
10 mM EDTA	1 % (w/v) SDS	
100 µg/ml RNase A		

Sechs Milliliter LB-Medium wurden mit einer positiven Kolonie und entsprechenden Antibiotika inkuliert. Am nächsten Tag wurde die Kultur für zehn Minuten bei 3220 g und 4 °C geerntet. Das Pellet wurde in 250 µl Resuspensionspuffer aufgenommen und mit gleichem

Volumen Lysepuffer versetzt. Nach dem Invertieren des Gefäßes wurde das Gemisch mit 350 µl Puffer III neutralisiert und die genomische DNA sowie Proteine für 20 Minuten bei 20.000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend mit 0,8 Volumen Isopropanol versetzt, für 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 15 Minuten bei 20.000 g abzentrifugiert. Die DNA wurde zweimal mit 80 % Ethanol gewaschen, steril getrocknet und in 50 µl 10 mM Hepes, pH 7,0, aufgenommen. Die Bacmide wurden bis zu einem Jahr bei 4 °C oder bei -20 °C gelagert und für die Transfektion in Sf21-Insektenzellen verwendet.

6.3 Zellkultur

Die Handhabung und das Arbeiten mit den Sf21-Zellen in dieser Arbeit erfolgten grundsätzlich nach den Vorgaben des Lieferanten Thermo Fisher Scientific [1]. Die verwendete Zelllinie wurde sowohl für die Propagation von Baculoviren, als auch für die Expression von einzelnen oder mehreren Proteinen sowie Proteinkomplexen verwendet.

6.3.1 Aussaat und Propagation von Sf21 Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen stammten aus gefrorenen Stammkulturen.

Die gefrorenen Kulturen lagerten in flüssigem Stickstoff. Nach dem Auftauen im Wasserbad wurden die Zellen in 10 ml frischem Medium aufgenommen und die Zelldichte bestimmt. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 200 g zentrifugiert und in frischem Medium aufgenommen. Nach Einstellen einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml sind die Zellen in einem Kulturkolben ausgesät worden. Alle 48-72 h wurde ein Aliquot der Kultur entnommen, die Zellen unter einem Lichtmikroskop begutachtet und die Zelldichte gemessen. Anschließend wurden die Zellen in einen neuen sterilen Kolben mit frischem Medium passagiert. Hierbei sollte die Dichte in den ersten Passagen nicht unter $0,8 \times 10^6$ Zellen/ml fallen. Ab der vierten Passage wurde die Zelldichte auf $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml angepasst.

Die Kultivierung der Insektenzellen erfolgte in ExCell-Medium (Sigma) bei 27 °C und 125 RPM im Schüttelinkubator.

6.3.2 Bestimmung der Zelldichte von Sf21-Suspensionen

Zum Bestimmen der Zelldichte der Sf21-Suspension wurde ein 50 µl-Aliquot der Kultur entnommen. Von diesem Aliquot sind 10 µl mit einer Trypanblau-Lösung (0,4 % (w/v) in PBS) 1:1 gemischt worden. 10 µl des Gemisches wurden in eine BioRad-Zählkammer überführt, unter einem Lichtmikroskop kontrolliert und anschließend mittels TC20 Zellzähler (BioRad; [2]) vermessen. Mit Hilfe des Trypanblaus werden lebende Zellen nicht angefärbt, da der Farbstoff eine intakte Zellmembran nicht durchdringen kann. Tote Zellen werden hingegen gefärbt.

Somit können die Lebendzellzahl, die Anzahl und der Durchmesser genau bestimmt werden. Der Durchmesser gibt Auskunft über einen möglichen Infektionsgrad durch einen Virus oder mehreren Viren oder über die Alterung der Zellen. Der Standard-Durchmesser der Sf21-Zellen beträgt 14 μm . Während der Infektion mit dem Virus beginnen die Zellen auf 20-24 μm anzuschwellen. Auch nach häufiger Propagation der Zellen kommt es zur Anschwellung der Zellen.

6.3.3 Herstellung von Vorratskulturen (*cryo stocks*)

Für die langfristige Lagerung der Insektenzellen in flüssigem Stickstoff wurden Zellen einer frühen Passage gezählt und für 10 Minuten bei 200 g geerntet. Die Zellen wurden mit einer Dichte von $1-2 \times 10^7$ Zellen/ml in Cryopräservationsmedium resuspendiert. Die Suspension wurde in mit 1-2 ml je Cryokonservierungsgefäß aliquotiert. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe des Cryopräservationscontainers „Mr. Frosty“ langsam eingefroren ($-1^\circ\text{C}/\text{Minute}$) und über Nacht bei -80°C gelagert. Zur dauerhaften Lagerung wurden die Gefäße in den Stickstofftank überführt.

Cryopräservationsmedium

45 % altes Medium

45 % frisches Medium

10 % DMSO

6.3.4 Transfektion rekombinanter Bacmid-DNA in Sf21 Insektenzellen

Die Transfektion der rekombinanten Bacmid-DNA wurde mit den Transfektionsreagenzien Cellfectin II oder FUGENE nach den Protokollen der Hersteller, und wie in Schönemann, 2017 beschrieben, durchgeführt [3, 4].

Für die Transfektion mit dem FUGENE-Reagenz wurden Sf21-Zellen mit einer Dichte von 0,5 Zellen/ml in eine 6-well-Platte ausgesät und für 30 Minuten inkubiert. Währenddessen wurden 5 μl FUGENE-Reagenz mit 200 μl Medium und 2 μg Bacmid-DNA gemischt und für 15 Minuten bei 27°C inkubiert. Anschließend wurde die Transfektionsmischung auf die Zellen gegeben und für fünf Tage bei 27°C inkubiert. Danach erfolgte eine Kontrolle der Expression des Fluoreszenzproteins (auf Bacmid-DNA kodiert) mittels PhosphorImager und eine Abnahme des Überstandes. Dieser enthält den initialen Virustiter V_0 ; er wurde bei 4°C gelagert und diente als Quelle für die Propagation des V_1 -Virus.

6.3.5 Kontrolle der Transfektionsreaktion

Wie bereits beschrieben, erfolgte die Kontrolle der Transfektion über die Expression eines Fluoreszenzproteins, welches im Baculovirusgenom integriert war. Bei erfolgreicher Transfektion konnte die Expression der Fluoreszenzproteine (z. B. mCherry oder YFP) mittels Fluoreszenzscanner nachgewiesen werden. Dazu wurden ein Laser mit der Anregungs-wellenlänge von 523 nm und eine Detektion bei 526 nm und einer Detektorspannung von 600 V verwendet.

Zusätzlich wurde die Expression des Zielproteins mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Brilliantblau-Färbung oder Western-Blot nachgewiesen. Hierzu wurden die Zellen von der 6-well-Platte mit 1 x PBS gelöst und für fünf Minuten bei 200 g geerntet. Das Pellet wurde in Lysepuffer oder 2 x SDS-Ladepuffer aufgenommen und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Das entstandene Lysat wurde durch eine SDS-PAGE analysiert.

1xPBS	Lysepuffer
137 mM NaCl	300 mM NaCl
2,7 mM KCl	30 mM Tris/HCl pH 7,5
10,1 mM K ₂ HPO ₃	1 mM DTT
1,8 mM KH ₂ PO ₃	1% (v/v) NP-40
	1 mM PMSF
	1 µg/ml Pepstatin
	1 µg/ml Leupeptin

6.3.6 Viruspropagation und Herstellung größerer Virustiter

Für die Herstellung größerer Virentiter wurden mindestens 50 ml Sf21 Zellen bei einer Zelldichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml mit bis zu 10 µl V₀ -Virus angeimpft und für 3-7 Tage im Schüttelinkubator inkubiert. Die Zelldichte und das Wachstum der Zellen wurden nach 48 h geprüft und die Zellen wurden ab 1×10^6 Zellen/ml auf $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml verdünnt. Nach Beginn des Wachstumsarrestes wurde die Kultur alle 24 h geprüft. Betrug die Lebend-Zellzahl weniger als 50 % der Gesamzellzahl mit einem mittleren Durchmesser von mindestens 20 µm, erfolgte eine Zentrifugation der Kultur bei 1.000 g für 5 Minuten. Der Überstand wurde als V₁ bei 4 °C und Aliquots des Virentiters bei -80°C gelagert. Gegebenenfalls wurde das Zellpellet

aufgeschlossen, und das exprimierte Protein wurde daraus gereinigt. Unter Umständen wurde ein V₂-Virus nach gleichem Verfahren angesetzt, um frischen Virus zu erhalten.

6.3.7 Baculovirale Proteinexpression in Sf21-Zellen

Für die baculovirale Expression von Proteinen sowie Proteinkomplexen in Sf21-Zellen wurde eine Dichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml in der Kultur eingestellt. Diese wurde mit ca. 1 % V₁-Virus angeimpft und für 68-72 h bei 27 °C und 125 RPM inkubiert. Anschließend wurden die Zelldichte und der mittlere Durchmesser der Zellen ermittelt, bevor die Kultur für 10 Minuten bei 200 g geerntet wurde. Die Zellen wurden mit 1 xPBS gewaschen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Zelldichte wurde bestimmt, um zur Analyse mittels SDS-PAGE gleiche Mengen an Zellen geladen zu haben. Über den Durchmesser wurde eine Infektion überprüft (siehe **Methoden 6.3.2**)

6.4 Nukleinsäurebiochemische Methoden

6.4.1 Standardmethoden

Biochemische Standardmethoden wie Ethanol- und Isopropanolfällungen sowie Phenol-Chloroform-Extraktionen wurden nach Protokollen aus (Sambrook & Russell, 2001) durchgeführt. *E. coli*-Plasmid-DNA wurde mit Hilfe von Kits von Peqlab oder Qiagen nach den entsprechenden Herstellervorgaben präpariert. Die Konzentrationsbestimmung der präparierten Nukleinsäuren erfolgte photometrisch durch Messung der Extinktion bei 260 nm (A₂₆₀). Hierbei entspricht eine A₂₆₀ von 1 einer DNA-Konzentration von 50 ng/µl oder einer RNA-Konzentration von 40 ng/µl.

6.4.2 Agarose-Gelelektrophorese

Mittels horizontaler Gelelektrophorese wurden Restriktionsanalysen von Plasmid-DNA, PCR-Produkten und Kontrollen durchgeführt. Abhängig von der Größe der einzelnen Fragmente wurden Agarosekonzentrationen im Bereich zwischen 0,8-1,5 % (w/v) in 0,5x TBE verwendet. Für die Elektrophorese wurde eine konstante Spannung zwischen 10-20 Volt pro Zentimeter angelegt.

0,5xTBE

45 mM Tris-Base

45 mM Borsäure

0,5 mM EDTA

6.4.3 5' Markierung von Oligonukleotiden und pBR322-Fragmenten

Die Reaktionsmischung wurde zwischen ein und zwei Stunden bei 37 °C inkubiert, anschließend mit DEPC-Wasser auf 200 µl aufgefüllt und die RNA oder DNA mittels Ethanolfällung präzipitiert. Das Präzipitat wurde in 10 mM Hepes (pH 7) oder DEPC-Wasser aufgenommen. Der radioaktiv markierte, mit HpaII restriktionsverdaute pBR322-Marker oder die 50 bp DNA *ladder* wurden als Größenstandard bei Elektrophoresen mit Polyacrylamid-Harnstoffgelen verwendet.

PNK-Reaktion

[10x] T4 PNK Puffer

20 µCi $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP

500 ng DNA

20 U PNK

ad H₂O 30 µl

6.4.4 Denaturierende Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Eine denaturierende Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung von radioaktiv markierten RNAs durchgeführt. Dafür wurden Gele im Format 20x20x0,04 cm für bis zu 30 Proben und im Format 35x45x0,04 cm für bis zu 56 Proben verwendet. Die benötigten Gellösungen wurden aus frisch eingewogenem Harnstoff, 40 -prozentiger (w/v) Acrylamid-Stammlösung (19:1) und 10x TBE-Lösung gemischt, sodass sich die unten angegebenen Endkonzentrationen ergaben.

Die kürzere der beiden vorbereiteten Glasplatten wurde mit BlueSlick (Serva) behandelt. Für die Polymerisation wurden zu 100 ml Gellösung (für 35x45x0,04 cm Gele) 500 µl 10 % (w/v) APS-Lösung und 100 µl TEMED hinzugefügt, kurz gemischt und zügig zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen. Die vollständige Polymerisation war nach 30-60 Minuten abgeschlossen. Zur Herstellung der denaturierenden Bedingungen während der Gelelektrophorese wurde ein mindestens 30 minütiger Vorlauf durchgeführt, sodass eine Betriebstemperatur von mindestens 40 °C erreicht wurde. Bei Gelen mit einer Größe von 20x20x0,04 cm wurde eine Leistung von 20 W und für Gele mit 35x45x0,04 cm eine Leistung von 50 W verwendet.

Die mit Formamid-Ladepuffer versetzten RNA-Proben wurden für zwei Minuten bei 95 °C erhitzt und anschließend bis zum Beladen des Gels auf Eis gestellt. Als Referenz für die Beurteilung der Laufzeit dienten die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol im Ladepuffer.

Die Detektion der radioaktiven RNA erfolgte durch Exposition mit einem *storage phosphor screen* über Nacht oder ggf. länger. Die Auslesung des *screens* erfolgte mit einem FluoreszenzImager.

Gellösung	1x TBE	Formamid-Ladepuffer
8,3 M Harnstoff	10 mM EDTA	95 % (v/v) deionisiertes Formamid
5 bis 20 % (w/v)	90 mM Tris-Base	5 mM EDTA [0,5 M pH8]
Acrylamid:Bisacrylamid (19:1) [40%]	90 mM Borsäure	0,25 % (w/v) Xylencyanol
APS [10%] (w/v)		0,25 % (w/v) Bromphenolblau
TEMED		H ₂ O
1x TBE		

6.4.5 *In vitro*-Synthese radioaktivmarkierter RNA durch Transkription

Für Aktivitätsassays zur Untersuchung der 3'-Prä-mRNA-Spaltungsreaktion sowie der Polyadenylierungsreaktion wurden radioaktiv markierte Substrat-RNAs benötigt (siehe **Material 5.6.4**). Die Transkription wurde als *run-off*-Transkription durchgeführt, bei der die Ausgangsplasmide durch Restriktionsenzyme linearisiert wurden. Die Substrat-RNAs, SV40late (WT/Δ), L3 (WT/Δ), GAPDH, SV40-GAPDH-Chimere, HMOX, BIK für Spaltassays sowie L3 und L3-Prä-A15 (WT/Δ) für Polyadenylierungsassays, wurden in 25 µl-Reaktionen synthetisiert.

Transkriptionsreaktion	Gelelutionspuffer
Transkriptionspuffer (NEB) [10x]	500 mM Ammoniumacetat
2 mM ATP/CTP	0,1 mM EDTA
1 mM GTP	0,5 % (w/v) SDS
0,2 mM UTP	
10 mM MgCl ₂	
7 mM Arca Cap Analog	
40 U RNase-Inhibitor	
1-2 µg linearisiertes Plasmid	
0,01 U Pyrophosphatase	
20 U SP6-RNA-Polymerase	
40 µCi α- ³² P-UTP	
ddH ₂ O ad 25 µl	

Die Transkriptionsreaktionen für intern radioaktiv markierte RNAs wurden mit Zugabe der Polymerase gestartet und vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Der Start der Reaktion erfolgte ohne GTP. Die Hälfte des GTP wurde nach einer Minute und die fehlende Hälfte nach einer Stunde der Reaktion hinzugefügt. Nach Abschluss der Reaktion wurde auf 100 µl mit DEPC-H₂O aufgefüllt, die RNA mit Ethanol präzipitiert und das Präzipitat in 12,5 µl Hepes (10 mM pH 7) und 12,5 µl Formamid-Ladepuffer aufgenommen. Die gelösten Transkriptionsprodukte wurden 5 Minuten bei 95 °C erhitzt, auf einer denaturierenden Polyacrylamid-Harnstoff-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Autoradiographie detektiert. Die gewünschten RNAs wurden aus dem Gel ausgeschnitten und in 400 µl Gelelutionspuffer über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde der RNA-haltige Überstand abgenommen, mit Phenol-/Chloroform extrahiert und die RNA mit 2,5 Volumen Ethanol präzipitiert. Das Präzipitat wurde in 25 µl Hepes-Lösung (10 mM pH 7,9) resuspendiert. Die Ausbeute und die Konzentration der gereinigten RNA wurden mit Hilfe der spezifischen Radioaktivität des eingesetzten UTPs berechnet.

Für RNAs, die für *in vitro*-Polyadenylierungsreaktionen eingesetzt wurden, wurde auf das Cap-Analogon verzichtet.

6.4.6 *In vitro*-Synthese nicht-markierter RNAs

Transkripte, die nicht radioaktiv markiert wurden, wurden mittels des SP6 HiScribe KIT von NEB nach Vorgaben des Herstellers hergestellt. Am Ende der Reaktion wurde das Template mit 1 µl DNase I für 15 Minuten bei 37 °C verdaut. Zur Reinigung der entstandenen RNAs wurden eine Phenol-/Chloroform-Extraktion und anschließende Lithiumchlorid-Fällung (0,5 M) durchgeführt. Das Pellet wurde in DEPC-Wasser aufgenommen und die Konzentration photometrisch bestimmt.

6.5 Proteinbiochemische Methoden

6.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

6.5.1.1 Photometrische Bestimmung

Für reine Lösungen jeweils eines bestimmten Proteins können die Konzentrationen photometrisch bei 280 nm (E_{280}) bestimmt werden. Dafür muss für jedes Protein der spezifische Extinktionskoeffizient ε bestimmt werden. Dieser lässt sich aus der Anzahl der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan im Protein und den Extinktionskoeffizienten dieser drei Aminosäuren mit guter Genauigkeit berechnen. Mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes ($E_{280} = \varepsilon * c * d$) erfolgt dann die Konzentrationsermittlung. Für die Messungen wurde jeweils der Puffer der letzten Säule als Nullprobe verwendet.

6.5.1.2 Densitometrische Konzentrationsbestimmung aus SDS-PAGE

Für die Konzentrationsbestimmung von einzelnen Proteinen aus Proteingemischen wurden die Proteine im SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Die relevanten Banden wurden densitometrisch quantifiziert und mit Hilfe der Software ImageQuant ausgewertet. Eine Eichgerade mit BSA, die sich auf demselben Gel befand, diente zur Bestimmung der Proteinkonzentration. Da die Effizienz der Coomassie-Färbung zwischen verschiedenen Proteinen variiert, kann diese Methode fehlerbehaftet sein.

Konzentrationen für Proteine mit mehr als einer Untereinheit, Fraktionen, welche noch mit RNA verunreinigt waren, wurden entsprechend nach diesem Verfahren ermittelt. Für Proteine, die nur aus einer Untereinheit bestehen, wurden die Konzentrationen photometrisch bestimmt.

6.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden mit diskontinuierlichem Gelsystem nach Laemmli (Laemmli, 1970) elektrophoretisch aufgetrennt:

Sammelgel	Trenngel
3,5 % (w/v) Acrylamid:Bisacrylamid (37,5:1)	4-15 % (w/v) Acrylamid:Bisacrylamid (37,5:1)
62,5 mM Tris/HCl pH 6,8	375 mM Tris/HCl pH 8,8
0,05 % (w/v) SDS	0,1 % (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer [2x]	Laemmli-Laupuffer [1x]
10 % (v/v) Glycerin	50 mM Tris-Base
62,5 mM Tris/HCl pH 6,8	380 mM Glycin
2 % (w/v) SDS	0,1 % (w/v) SDS
715 mM 2-Mercaptoethanol	
0,125 % (w/v) Bromphenolblau	

Die Gelmaße betrugen standardmäßig 10x20x0,1 cm. Für diese Gele wurden 20 ml Trenngellösung mit der gewünschten Polyacrylamid-Konzentration hergestellt. Zur Polymerisation wurden 120 µl 10 % (w/v) APS-Lösung und 60 µl TEMED hinzugefügt und stetig zwischen die beiden Glasplatten gegossen. Zur Verhinderung des Austrocknens wurde das Trenngel direkt nach dem Gießen mit 0,01 % (w/v) SDS-Lösung überschichtet. Diese wurde nach erfolgter Polymerisation verworfen. Die Sammelgellösung (10 ml) wurde mit 60 µl APS (10%) und 30 µl TEMED komplementiert und zum Polymerisieren auf das Trenngel gegossen. Nach abgeschlossener Polymerisation erfolgte die Elektrophorese bei konstanten 40 mA.

Proteinproben wurden mit 2x bzw. 4x SDS-Ladepuffer versetzt und fünf Minuten bei 95 °C denaturiert. Als Größenstandards wurden die *unstained protein marker* von NEB oder Thermo Fisher Scientific verwendet.

6.5.2.1 Kolloidalfärbung mit Coomassie-Brilliantblau

Coomassie-Brilliant-Blau wurde zum Anfärben der Proteinbanden in SDS-Polyacrylamid-Gelen verwendet. Hierbei lagert sich der Farbstoff an basische Aminosäureseitenketten an. Nach beendeter Gelelektrophorese wurde das SDS-Gel 15 Minuten in Fixierlösung geschwenkt und 60 Minuten oder über Nacht gefärbt. Anschließend wurde das Gel bis zur gewünschten Bandenintensität mit Essigsäure (10 % (v/v)) entfärbt. Die Entfärbung wurde beendet, sobald das gewünschte Verhältnis zwischen Hintergrundfärbung und Bandenintensität erreicht war.

Fixierlösung	Färbelösung	Entfärber
25 % (v/v) Isopropanol	0,01 % (w/v) Coomassie-	10 % (v/v) Essigsäure
10 % (v/v) Essigsäure	Briliantblau R-250	
	10 % (v/v) Essigsäure	

6.5.2.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung ist eine sensitive Methode, die zur Anfärbung von Proteinen in SDS-Gelen genutzt wird. Dabei lagern sich Silberionen an die negativ geladenen Seitenketten der Proteine an und werden zu elementarem Silber reduziert.

Nach abgeschlossener Gelelektrophorese wurde das SDS-Gel mindestens 30 Minuten oder über Nacht in 100 ml Fixierlösung inkubiert. Anschließend wurde das Gel drei Mal sechs Minuten mit 20 % Ethanol gewaschen, bevor es für zwei Minuten in 100 ml Sensibilisierungslösung inkubiert wurde. Danach wurde das Gel zweimal für eine Minute mit bidestilliertem Wasser gewaschen, bevor es für 20 Minuten in 100 ml Färbelösung gelegt und wiederum zweimal für 30 Sekunden gewaschen wurde. Das SDS-Gel wurde bis zu der gewünschten Färbung mit 100 ml Entwicklerlösung versetzt, bis die Entwicklung mit 100 ml 12 % (v/v) Essigsäure gestoppt wurde. Alle Schritte erfolgten unter Schütteln.

Fixierlösung	Sensibilisierungslösung	Färbelösung	Entwicklerlösung
50 % (v/v)	0,02 % (w/v)	0,2 %	6 % (w/v)
Ethanol	Natriumthiosulfat	Silbernitrat	Natriumcarbonat
12 % (v/v)		0,076 % (v/v)	0,0004 % (w/v)
Essigsäure		Formaldehyd	Natriumthiosulfat
0,05 % (v/v)			0,05 % (v/v)
Formaldehyd			Formaldehyd

6.5.3 Western Blot Analyse

Für die Detektion von spezifischen Proteinen in Proteingemischen wurde die Western-Blot-Analyse (Burnette, 1981) verwendet. Dabei wurden die Proteingemische zunächst per SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels *Semi-Dry*-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (*blotting*).

Transferpuffer	TN-Puffer	TN-Tween
50 mM Tris-Base	20 mM Tris/HCl pH 7,9	20 mM Tris/HCl pH 7,9
40 mM Glycin	150 mM NaCl	150 mM NaCl
0,37 % (w/v) SDS		0,05 % (v/v) Tween 20
20 % (v/v) Methanol		

Strip-Puffer	Blocking-Lösung	Ponceau S
0,2 M NaOH	2,5 % (w/v) Magermilchpulver in TN	0,5 % (w/v) Ponceau S 1 % (v/v) Essigsäure

Aufbau und Verwendung der Blotting-Apparatur wurde nach Angaben des Herstellers (OWL) durchgeführt. Für den Proteintransfer auf die Nitrozellulosemembran wurde eine konstante Stromstärke von 3 mA/cm^2 Gel-Fläche angelegt. Nach Abschluss wurde die Membran mit einer Ponceau S-Lösung gefärbt, um Marker-Banden zu markieren und eine gleichmäßige Beladung der Spuren zu dokumentieren. Vor dem Einsatz des primären Antikörpers wurden überschüssige Bindungsstellen der Membran durch eine 30-minütige Inkubation mit Blocking-Lösung abgesättigt. Geeignete Antikörperverdünnungen (in 0,5 % (w/v) Magermilchpulver in TN-Tween) wurden mit der so vorbehandelten Membran mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C schüttelnd inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit TN-Tween erfolgte die 30-minütige Inkubation mit dem sekundären Antikörper (fluoreszenzmarkiert, Li-Cor; 1:15000 in TN-Tween) unter Lichtausschluss, gefolgt von erneutem Waschen mit TN-Tween und TN-Lösung. Die Detektion erfolgte nach Herstellerangaben mit einem Li-Cor Fluoreszenzscanner.

Nach abgeschlossener Detektion wurde die Nitrozellulosemembran mit Strip-Puffer, ddH₂O und TN-Puffer inkubiert (jeweils 10 Minuten bei Raumtemperatur), sofern weitere Antikörper verwendet worden sind.

6.6 Reinigungs- und Fraktionierungsmethoden von Proteinen

Im folgenden Abschnitt werden Reinigungen von rekombinanten Proteinen beschrieben, die in dieser Arbeit Verwendung fanden. Abweichungen von Standardverfahren werden in den beschriebenen Ergebnissen erläutert. Alle affinitätschromatographischen Reinigungsschritte wurden im Kühllraum bei 6°C durchgeführt. Alle weiteren Reinigungen sind in einem Kühlkabinett bei 4°C mit dem Äkta Pure System durchgeführt worden. Im ersten

Reinigungsschritt enthielten Lysis-/Wasch- und Elutionspuffer 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 µg/ml Pepstatin und 1 µg/ml Leupeptin. Die einzelnen Reinigungsverfahren der rekombinanten Proteine sind in **Kapitel 6.11 Rekombinante Proteine** summarisch aufgeführt.

6.6.1 Kultur und Aufschluss überproduzierender Bakterien

Für die bakterielle Expression wurde das gewünschte Plasmid in BL21-Codon Plus (DE3)-Zellen transformiert. Die Bakterien wurden in LB-Medium mit entsprechenden Selektions-Antibiotika kultiviert. Für die Expression wurde eine Vorkultur propagiert, mit welcher dann die Expressionskultur in SB-Medium inkuliert wurde. Die Expression wurde bei einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,6-0,8 mit 1 mM IPTG induziert und die Kultur weitere vier Stunden bei 37 °C oder über Nacht bei 18 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 4000 g und 4 °C für 15 Minuten geerntet, in geringem Volumen Aufschlusspuffer (100 mM KCl, 20 mM Tris/HCl pH 8) aufgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen bei -80 °C gelagert.

Nach dem Auftauen wurden die Zellen mittels Hochdrucks (Cell Disruptor Constant Systems) aufgeschlossen. Weitere Pufferkomponenten wie Glycerin oder Saccharose sowie Protease-Inhibitoren wurden unmittelbar nach dem Aufschluss hinzugegeben. Das Lysat wurde für 30 Minuten bei 20.000 g und 4 °C geklärt und der pH-Wert des löslichen Lysates überprüft. Andernfalls wurde der pH-Wert mittels passender Säure oder Lauge richtig eingestellt.

6.6.2 Aufschluss von Insektenzellen

Für die Lyse der Zellen wurden diese in entsprechendem Lysepuffer (siehe **Methoden 6.11**) aufgenommen. Dabei wurde eine Zelldichte zwischen 2-4x10⁷ Zellen/ml eingestellt. Der Aufschluss erfolgte mittels Ultraschall-Sonde. Die Suspensionen wurden 5x20 Impulsen (50 % Betriebszeit; 40 % Intensität) unterzogen und dabei dauerhaft auf Eis gehalten. Anschließend wurde das Lysat für 30 Minuten bei 20.000 g und 4 °C geklärt. Der pH-Wert des löslichen Überstandes wurde überprüft, ggf. eingestellt, und es wurde mit der jeweiligen Reinigung begonnen.

6.6.3 Proteinfällungen mit Ammoniumsulfat

Fällungen von Proteinen mit Ammoniumsulfat wurden mit Hilfe einer eiskalten gesättigten Ammoniumsulfat-Lösung erreicht. Durch kontinuierliche Zugabe der Lösung in das Proteingemisch wurde die gewünschte Salzkonzentration eingestellt. Die Zugabe erfolgte unter vorsichtigem Mischen. Anschließend wurde die Suspension für 60 Minuten auf Eis inkubiert, und die gefällten Proteine wurden für 20 Minuten bei 20.000 g und 0 °C abzentrifugiert. Das

Präzipitat wurde in Gelfiltrations-Puffer mCF (siehe **Methoden 6.8.3**) resuspendiert und für weitere Reinigungsschritte eingesetzt.

6.7 Affinitätschromatographische Verfahren

6.7.1 Nickel-NTA-Affinitätschromatographie

Rekombinante Proteine mit einem Oligohistidin-Fusionspeptid wurden mit Hilfe von immobilisierten Nickel-Ionen gereinigt. Hierbei wird eine Matrix aus CL-6B-Sepharose verwendet, an welche kovalent Nitriloessigsäure-Reste (NTA) gebunden sind, die wiederum mit Ni^{2+} -Ionen komplexiert sind. Aufgrund der hohen Affinität der Histidin-Reste für Ni^{2+} kommt es zur Bindung des Fusionsproteins an die Säulenmatrix.

Für die Ni-NTA-Reinigung der einzelnen Proteine wurden jeweils die Lysepuffer verwendet, denen frisches DTT, Protease-Inhibitoren und außerdem 10 mM Imidazol zur Beladung der Säulenmatrix und zum Waschen bzw. 250 mM Imidazol zur Elution hinzugefügt wurde.

Die Bindung der Proteine aus dem löslichen Lysats geschah im *batch*-Verfahren mit in Säulenpuffer äquilibriertem Säulenmaterial für 2-4 Stunden schüttelnd bei 6 °C. Darauf wurde das Gemisch kurz bei 500 g zentrifugiert, der Überstand (= Durchfluss) für weitere Analysen gesammelt, das Säulenmaterial mit Waschpuffer resuspendiert und in eine Leersäule überführt, sodass es sich durch Gravitationsfluss setzen konnte. Die Ni-NTA-Agarose wurde dreimal mit fünf Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte, indem einem Säulenvolumen Elutionspuffer erlaubt wurde, in das Säulenmaterial einzusickern. Danach wurde 30 Minuten inkubiert und dann die Elution mit fünf weiteren Schritten von je einem Säulenvolumen Elutionspuffer abgeschlossen.

6.7.2 Strep-Affinitätschromatographie

Für die Reinigung von Proteinen mit einem Strep-Fusionspeptid wurde Strep-Tactin-Sepharose (IBA) verwendet. Hierfür wird eine stabile, aber nicht kovalente Bindung zwischen dem Fusionspeptid und der Säulenmatrix genutzt.

Die Reinigung des CstF50 erfolgte im *batch*-Verfahren. Das geklärte Lysat wurde zwei Stunden schüttelnd an 100 μl äquilierte Strep-Tactin-Sepharose gebunden. Die Matrix wurde bei 500 g abzentrifugiert, der Überstand (= Durchfluss) gesammelt und das Säulenmaterial dreimal mit je 5 Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen. Für die einzelnen Waschschritte wurde jeweils 5 Minuten schüttelnd inkubiert. Zur Elution wurde das Säulenmaterial 15 Minuten mit einem Säulenvolumen Elutionspuffer (Bindungspuffer +2,5 mM D-Desthiobiotin) inkubiert. Anschließend wurde noch zwei Mal auf dieselbe Art und Weise eluiert, die Inkubation jedoch

auf 5 Minuten verkürzt. Nach jedem Wasch- sowie Elutionsschritt wurde jeweils kurz bei 500 g geerntet und der Überstand gesammelt. Die Reinigungen für hFip1 Isoform 1 und hFip1 Isoform 4 erfolgten analog. Allerdings enthielt der Elutionspuffer 5 mM D-Desthiobiotin und wurde in 5 Fraktionen eluiert.

Bindungs-/Waschpuffer Strep CstF50	Bindungs-/Waschpuffer Strep hFip1	Elutionspuffer Strep
200 mM KCl	150 mM KCl	Waschpuffer +2,5 mM
50 mM Tris/HCl pH 7,5	50 mM Tris/HCl pH 8,0	/5 mM D-Desthiobiotin
10 % (w/v) Saccharose	10 % (w/v) Saccharose	
10 µM ZnCl ₂	3 mM MgCl ₂	
1 mM DTT	1 mM DTT	
1 mM PMSF	1 mM PMSF	
1 µg/ml Pepstatin	1 µg/ml Pepstatin	
1 µg/ml Leupeptin	1 µg/ml Leupeptin	

6.7.3 Flag-Affinitätschromatographie

Die Flag-Affinitätschromatographie basiert auf der Bindung zwischen einem Flag-Fusionspeptid und immobilisierten Flag-Antikörpern auf einer Agarose-Matrix. Vor der Reinigung wurde das Säulenmaterial kurz mit TN-Puffer, dann für 10 Minuten mit 0,3 M Glycin (pH 3) und mit Flag-Puffer gewaschen. Fusionsproteine wurden aus den Zellysaten im Batch-Verfahren 1-2 Stunden schüttelnd an die Matrix gebunden und 1 Minute bei 500 g abzentrifugiert. Der Überstand (= Durchfluss) wurde gesammelt und die Matrix mit 10 Säulenvolumen Flag-Puffer gewaschen. Zur Elution wurde der Waschpuffer mit 200 ng/µl Flag-Peptid komplementiert und für 30 Minuten mit der Matrix inkubiert. Dieser Schritt wurde noch zweimal wiederholt.

Flag-Puffer mPSF	Flag-Puffer mPSF-Derivate	TN-Puffer
250 mM KCl	250 mM KCl	20 mM Tris/HCl pH 7,9
20 mM Hepes pH 8,0	50 mM TEA pH 8,0	150 mM NaCl
10 % (w/v) Saccharose	10 % (w/v) Saccharose	
0,2 mM AEBSF		
2 µg/ml Pepstatin		
2 µg/ml Leupeptin		

6.8 Proteinfraktionierungen mit dem Äkta-Chromatographiesystem

Nach einer ersten Affinitätschromatographie wurden weitere Reinigungsschritte mit dem Chromatographiesystem Äkta *purifier* oder Äkta *Pure* und der entsprechenden Software UNICORN durchgeführt. Gegebenenfalls wurde anstelle der Affinitätschromatographie auch DEAE-Sepharose-Chromatographie als erster Reinigungsschritt angewendet (z. B. mPSF oder mCF).

6.8.1 Anionenaustauschchromatographie

In dieser Arbeit wurde neben einer DEAE-Sepharose- vor allem eine 1 ml Resource Q-Säule verwendet. Normalerweise wurde die DEAE-Sepharose mit Lysat beladen, während die Resource Q-Säule für Proteinfraktionen benutzt wurde, die bereits einen oder mehrere Reinigungsschritte durchlaufen hatten. Die Beladung der Säule geschah bei niedriger Salzkonzentration (erreicht durch Dialyse oder Verdünnung). Die Elution wurde durch einen ansteigenden Salzgradienten über mehrere Säulenvolumen erzielt, normalerweise in einem Bereich von 50-500 mM KCl. Für jeden Gradienten wurden 40 – 60 Fraktionen gesammelt. Zusätzlich wurde noch eine Stufenelution bis 1 M KCl verwendet.

RBBP6-Reinigungen bilden bei den verwendeten Gradienten eine Ausnahme. Zunächst wurde ein steiler Gradient über 2 Säulenvolumen bis 200 mM KCl und anschließend ein flacherer Gradient über 10 Säulenvolumen bis 400 mM KCl verwendet ehe über 5 Säulenvolumen bis 1 M KCl eluiert wurde.

Für die Reinigung von CstF50 sind die Strep-Elutions-Fraktionen unverdünnt bei 200 mM KCl geladen worden. Zunächst wurde ein steiler Gradient über 3 Säulenvolumen bis 400 mM KCl und anschließend eine Stufenelution bis 1 M KCl verwendet.

Eine weitere Ausnahme bildet mPSF, welches bei einer Salzkonzentration von 250 mM KCl an die DEAE-Sepharose gebunden wurde.

Anionen-Puffer:	Anionen-Puffer mCF:	Anionen-Puffer mPSF:
0-1000 mM KCl	0-1000 mM KCl	0-1000 mM KCl
50 mM Tris/HCl pH 7,5/8,0	50 mM Tris/HCl pH 8,0	20 mM TEA pH 8,0
10 % (w/v) Saccharose	10 % (w/v) Saccharose	10 % (w/v) Saccharose
10 µM ZnCl ₂	10 µM ZnCl ₂	1 mM DTT
1 mM DTT	1 mM DTT	0,2 mM AEBSF
		2 µg/ml Leupeptin

6.8.2 Heparin-Sepharose

In dieser Arbeit erfolgte der Einsatz einer 5 ml HiTrap-Heparin-Säule als ein Reinigungsschritt für mCF3/4. Die Proteinlösungen wurden vorher gegen 75 mM KCl dialysiert und bei dieser Salzkonzentration auf die Säule geladen. Die Säule wurde mit einem Gradienten über 15 Säulenvolumen bis 500 mM KCl entwickelt mit abschließender Stufenelution bis 1 M KCl.

Heparin-Puffer:

0-1000 mM KCl
20 mM Hepes pH 8,0
10 % (w/v) Saccharose
10 μ M ZnCl₂
1 mM DTT

6.8.3 Größenausschlusschromatographie

In dieser Arbeit wurden eine kommerzielle Superdex200 10/30 HR, eine kommerzielle Superose6-Gelfiltrationssäule (24 ml) sowie eine selbstgepackte Superose6-Säule (49 ml; Florian Kluge) verwendet. Es wurden maximal 2 % des Säulenvolumens geladen und mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,2-0,25 ml/min entwickelt. Die Elution erfolgte in 30-60 Fraktionen.

Für die mCF3/4 Reinigung ist das Ammoniumsulfat-Pellet in 500 μ l Gelfiltrationspuffer (siehe unten) resuspendiert, anschließend für zehn Minuten bei 20.000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand auf die Superose6 geladen worden.

Für die CTD-Reinigungen sind einzelne GSH-Sepharose Fraktionen für 15 Minuten bei 20.000 g und 4 °C zentrifugiert und auf eine Superdex200 geladen worden.

Gelfiltrations-Puffer mCF

200 mM KCl
20 mM Hepes pH 7,9
10 % (w/v) Saccharose
10 μ M ZnCl₂
1 mM DTT

Gelfiltrations-Puffer CTD

100 mM KCl
50 mM Tris/HCl pH 7,5
10 % (v/v) Glycerin
5 mM DTT

6.9 Abspaltung von RBBP6-Fusionsproteinen (MBP/MBP-SNAP)

Für die Abspaltung der MBP-Fusion von RBBP6 wurden 140 pmol MBP-RBBP6 (*full-length*) nach der Anionenaustauscherchromatographie mit 8 pmol GST-Precission-Protease und 1 mM DTT für zwei Stunden bei Raumtemperatur rotierend inkubiert. Anschließend wurden 20 µl äquilierte Amylose-Matrix (NEB) sowie 10 µl GSH-Sepharose hinzugefügt und erneut zwei Stunden inkubiert. Die Spaltung wurde mittels SDS-PAGE dokumentiert. Die Äquilibrierung der Säulenmaterialien erfolgte mit Resource Q Puffer bei 150 mM KCl und 0,1% Tween-20.

Für die Abspaltung der MBP-Fusion von SNAP gefärbten RBBP6₁₋₃₄₀ (SNAP-Färbung erfolgte nach Hersteller Vorgaben; NEB) wurden 1,8 nmol des Proteins für eine Stunde mit 150 µl äquilibrierter Amylose-Matrix (NEB) bei Raumtemperatur rotierend inkubiert. Das Säulenmaterial wurde zweimal mit CDB200 gewaschen. Anschließend wurden 100 pmol GST-Precission-Protease in 200 µl CDB200 hinzugegeben und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 20 µl GSH-Sepharose hinzugegeben und weiter 30 Minuten inkubiert. Die Spaltung wurde mittels SDS-PAGE dokumentiert und die Funktionalität des Proteins in einem Spaltassay getestet.

6.10 Dephosphorylierung von Proteinen

Für die Dephosphorylierung wurden 10 pmol der 3'-Prozessierungsfaktoren bzw. 30 pmol der RNA Polymerase II-CTD mit 2,5 Units Quick CIP (NEB) für 30-120 Minuten bei 37 °C inkubiert. Als Puffer kam Cutsmart (NEB) zum Einsatz. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Aliquots der Reaktion entnommen, mit 2x SDS-Ladepuffer versetzt und auf einer SDS-PAGE analysiert. Die Dephosphorylierung wurde anhand einer beschleunigten Wanderung der Proteine sowohl mit Coomassie-Brilliantblau-Färbung als auch mittels Western Blot nachgewiesen.

Dephosphorylierung

10 pmol Protein / 30 pmol Sf21-CTD

2,5 U Quick CIP

(1x) Cutsmart

ad ddH₂O

6.11 Rekombinante Proteine

RBBP6

Protein: RBBP6₁₋₂₅₃; RBBP6₁₋₃₂₂; RBBP6₁₋₃₄₀; RBBP6₁₋₃₇₅; RBBP6₁₋₄₃₁; RBBP6₁₋₄₉₀; RBBP6₁₋₆₁₆; RBBP6₁₋₆₇₉; RBBP6₁₋₇₈₀; RBBP6₁₋₉₆₂; RBBP6₁₋₁₂₂₀; RBBP6_{ΔRING}, MBP-RBBP6_{FL}; GFP-RBBP6_{FL}; RBBP6₁₋₈₁; MBP-RBBP6₃₄₀; MBP-RBBP6_{FL}; MBP-SNAP-RBBP6₃₄₀; MBP-SNAP-RBBP6_{FL}

Reinigungsverfahren:

- Expression C-terminaler Deletionen aus 500 ml Sf21-Zellen oder 800 ml *E. coli*; GFP-RBBP6 aus 400 ml Sf21-Zellen, MBP- und RBBP6_{ΔRING} aus je 800 ml Sf21-Zellen, MBP-SNAP-Varianten aus 1 l Sf21-Zellen
 - Lysispuffer: 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 200 mM KCl, 10 % Saccharose (bei Reinigung aus **Sf21-Zellen**) /Glycerin (bei Reinigung aus *E. coli*)
 - Nickel-Affinitätschromatographie
 - Dialyse gegen Lysispuffer mit 50 mM KCl und 10 % Saccharose
 - Resource Q Anionenaustauschchromatographie
 - ggf. Spaltung des MBP-/ MBP-SNAP-Tag (siehe **6.9 Abspaltung von RBBP6-Fusionsproteinen (MBP/MBP-SNAP)**)
-

mPSF/mPSF_ΔhFip1/mPSF_ΔCPSF4

Untereinheiten: CPSF1; WDR33; hFip1 Isoform **Ursprung:** F. Kluge, U. Kühn, A.-K. Hoffmeister, diese Arbeit 1; CPSF4;

Reinigungsverfahren:

- Expression aus 1,6 l Sf21-Zellen
 - Lysispuffer: 50 mM TEA-Puffer pH 8,0, 250 mM KCl, 10 % Saccharose
 - DEAE-Sepharose-Säule (Anionenaustauscherchromatographie)
 - Mit dem Durchfluss Nickel-Affinitätschromatographie
 - Dialyse gegen Lysispuffer mit 150 mM KCl
 - Flag-Affinitätschromatographie
 - Dialyse gegen FLAG-Puffer mit 25 mM KCl und 4 mM DTT
 - Zusatz von 1 % Tween-20 für Lagerung
-

hFip1

Proteine: hFip1 Isoform 1; hFip1 Isoform 4

Ursprung: L. Schönemann,
diese Arbeit

Reinigungsverfahren:

- Expression aus 400 ml (hFip1 Isoform 1) und 800 ml (hFip1 Isoform 4)
 - Lysispuffer: 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM KCl, 10 % Saccharose
 - Strep-Tactin-Sepharose (Affinitätschromatographie) (siehe **6.7.2 Strep-Affinitätschromatographie**)
-

mCF3 WT/Δ; mCF4 WT/Δ

Untereinheiten: CPSF2; CPSF3 oder CPSF3 **Ursprung:** F. Kluge, P. D75K/H76A; Symplekin; für mCF3 Schäfer, diese auch CstF2 Arbeit

Reinigungsverfahren:

- Expression aus 1,6 l Sf21-Zellen
 - Lysispuffer: 50 mM Tris/HCl pH 8, 75 mM KCl, 10 % Saccharose, 10 µM ZnCl₂
 - DEAE-Sepharose-Säule (Anionenaustauschchromatographie; Elution mit einem Gradienten von 6 Säulenvolumen bis 600 mM KCl in Anionen-Puffer (Tris/HCl))
 - Dialyse gegen 75 mM KCl Heparin-Puffer
 - Resource S-Säule (Kationenaustauschchromatographie)
 - Durchfluss auf zwei 5 ml HiTrap Heparin-Säulen
 - Fällung mit 50 % (NH₄)₂SO₄
 - In Gelfiltrations-Puffer (siehe **6.8.3 Größenausschlusschromatographie**) resuspendiertes Pellet auf 24 ml/49 ml Superose6 10/300-Säule (Größenausschluss-chromatographie)
-

CstF/CstF τ /CstF Δ 50/CstF $\tau\Delta$ 50/CstF64/CstF50

Untereinheiten: CstF77; CstF64 oder CstF64 τ ; CstF50; **Ursprung:** C. Tütting, diese Arbeit

Reinigungsverfahren: • modifiziert nach Schäfer et al. 2018

- Expression aus 800 ml Sf21-Zellen; CstFΔ50/ CstF τ Δ50 aus 400 ml Sf21-Zellen
 - Lysispuffer: 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 200 mM KCl, 10% Saccharose, 10 mM Imidazol
 - Modifikationen: Der Lyse-/Wasch-Puffer enthielt bereits 10 mM Imidazol. Auf EDTA und NP-40 wurde verzichtet. Nickel-Eluat-Fraktionen wurden auf 75 mM KCl verdünnt und nicht dialyisiert. Gradient der Anionenaustauscherchromatographie: 10 Säulenvolumen bis 500 mM KCl gefolgt von einer Stufenelution bis 1 M KCl.

CstF50

Protein: CstF50

Ursprung: diese Arbeit

Reinigungsverfahren:

- Expression aus 250 ml Sf21-Zellen
 - Lysispuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 200 mM KCl, 10% Saccharose
 - Strep-Tactin-Sepharose (Affinitätschromatographie)
 - Resource Q-Säule (Anionenaustauscherchromatographie)

CF II/CF II ΔΝ769

Untereinheiten: Pcf11 oder Pcf11 Δ N769; Clp1

Ursprung: F. Kluge

Reinigungsverfahren: nach Schäfer et al. 2018

- Lysispuffer: 50 mM Tris/HCl pH 8, 200 mM KCl, 10% Saccharose
 - Nickel-Affinitätschromatographie
 - Dialyse gegen Lysispuffer mit 150 mM KCl
 - MonoQ-Säule (Anionenaustauscherchromatographie) (siehe **6.8.1**)

CF I

Untereinheiten: CF I 86; CF I 25;

Ursprung: P. Schäfer

Reinigungsverfahren: • Schäfer et al., 2018

PAP/PAP D115A/PAP513

Protein: PAP- α : WT; PAP- α D115A; PAP- α 513

Ursprung: F. Kluge, A.

Knoth, U. Kühn

Reinigungsverfahren:

- Lysispuffer: 50 mM Tris/HCl pH 8, 300 mM KCl, 10% Glycerin
 - Nickel-Affinitätschromatographie
 - Dialyse gegen Anionen-Puffer (Tris/HCl) mit 50 mM KCl;
 - MonoQ-Säule (Anionenaustauscherchromatographie)
 - Dialyse gegen Heparin-Puffer mit 50 mM KCl (siehe **6.8.2 Heparin-Sepharose**)
 - 1 ml HiTrap Heparin-Säule in Heparin-Puffer + 2 mM DTT
-

C-terminale Domäne der RNA Polymerase II

Protein: CTD

Ursprung: J. Buhl, U.

Kühn, diese
Arbeit

Reinigungsverfahren:

- Lysispuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 300 mM KCl, 10% Glycerin
 - GSH-Sepharose
 - Superdex200 Gelfiltration (siehe **6.8.3 Größenausschlusschromatographie**)
-

Phosphatase 1 α -Komplex

Untereinheiten: Tox4; mPnnts; WDR82; PP1 α

Ursprung: A.-K.

Hoffmeister,
diese Arbeit

Reinigungsverfahren:

- Lysispuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 200 mM KCl, 10% Saccharose, 10 μ M ZnCl₂, 20 mM Imidazol
 - Nickel-Affinitätschromatographie (siehe **6.7.1 Nickel-NTA-Affinitätschromatographie**)
 - Flag-Affinitätschromatographie (siehe **6.7.3 Flag-Affinitätschromatographie**)
-

Ssu72

Protein: Ssu72

Ursprung: G. Scholz, U. Kühn

Reinigungsverfahren:

- bakterielle Expression 16 °C über Nacht- in SB-Medium induziert mit 0,5 mM IPTG
 - Lysispuffer: 100 mM Tris/HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 10% Glycerin
 - Nickel-Affinitätschromatographie nach Zhang et al. 2011
 - Zwei Stunden Dialyse gegen 100 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM 2-Mercaptoethanol und SUMO-Protease
 - Nickel-Affinitätschromatographie
-

XRN2 WT/Δ

Protein: XRN2; XRN2 D235A

Ursprung: diese Arbeit

Reinigungsverfahren:

- Lysispuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 200 mM KCl, 10% Saccharose, 3 mM MgCl₂, 10 μM ZnCl₂, 10 mM Imidazol
 - Nickel-Affinitätschromatographie
 - Dialyse gegen Lysispuffer mit 75 mM KCl
 - 1 ml MonoQ-Säule (Anionenaustauscherchromatographie) mit einem Gradienten bis 500 mM über 15 Säulenvolumen und einem Gradienten bis 1 M KCl über 3 Säulenvolumen (siehe **6.8.1 Anionenaustauscherchromatographie**)
-

PABPN1

Protein: PABPN1

Ursprung: U. Kühn

Reinigungsverfahren: • Kühn et al., 2009

CDC73

Protein: CDC73

Ursprung:

M. Schmidt, U.

Kühn

Reinigungsverfahren:

- Expression aus 400 ml Sf21-Zellen
 - Lysispuffer: 500 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,5, 300 mM KCl, 10% Glycerin, 10 mM Imidazol
 - Nickel-Affinitätschromatographie Elution mit 500 mM Imidazol
 - Nickel-Elutions-Fraktion auf 100 mM KCl verdünnt
 - 1 ml Resource Q-Säule (Anionenaustauscherchromatographie) (siehe **6.8.1 Anionenaustauscherchromatographie**)
-

6.12 Aktivitätsassays

6.12.1 3' mRNA-Spaltassay

Für die Analyse der AAUAAA-abhängigen Spaltung der Prä-mRNA wurde radioaktiv markierte Substrat-RNA in einem Reaktionsvolumen von 20 µl eingesetzt. Vor Beginn der Reaktion wurden Proteinverdünnungspuffer (CDB200) und Spaltpuffer in einem Reaktionsgefäß vorgelegt, bevor der Proteinmix hinzugefügt wurde. Die standardmäßige Salzkonzentration betrug ca. 100 mM KCl. Für verwendete Proteinpräparationen wurden auf 1 µM in CDB200 eingestellte Vorverdünnungen eingesetzt. Zum Unterbinden von Polyadenylierung der Substrat-RNA bzw. des 5'-Spaltproduktes enthielt der Spaltpuffer entweder 3'-dATP (Cordycepin) anstelle von ATP oder enzymatisch nicht aktive Poly(A)-Polymerase (D115A) anstelle von PAP Wildtyp. Auch für Reaktionen mit HeLa-Kernextrakt (Ipracell; nicht dialysiert) wurde Cordycepin verwendet. Die RNA wurde für zwei Minuten auf 95 °C erhitzt, auf Eis abgeschreckt und der Reaktionsmischung hinzugefügt, wodurch die Reaktion gestartet wurde. Das Reaktionsgefäß wurde sofort bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 80 µl Proteinase K-Puffer [1x] mit 0,1 g/l Glykogen gestoppt, normalerweise nach einer 60-minütigen Inkubation. Es folgte eine Verdauung mit Proteinase K (0,2 g/l) von 30 Minuten bei 37 °C. Anschließend wurde die RNA mit Ethanol gefällt und in entweder 2 µl 10 mM Hepes, pH 7,0, und 4 µl Formamid-Ladepuffer oder direkt in 6 µl Formamid-Ladepuffer aufgenommen. Zur elektrophoretischen Auftrennung der Substrat RNA von dem 5'- bzw. 3'-Fragment wurde ein 6 % Polyacrylamid-Harnstoffgel verwendet. Für die Auswertung wurde das Gel einer Autoradiographie unterzogen, auf einem PhosphorImager

gelesen und mittels ImageQuant Software analysiert. Für die Quantifizierung der Spaltung wurde das Hintergrundrauschen von dem verbliebenen Substrat und 5'-Fragment abgezogen. Da das 3'-Spaltfragment zu einem erheblichen Teil abgebaut wird, wurde mit Hilfe der gemessenen Menge des 5'-Fragments die erwartete äquimolare Menge des 3'-Fragmentes errechnet. Die Spaltung wurde durch die Division der Summe der beiden Fragmente durch die Summe aus ungespaltener RNA und beiden Fragmenten berechnet.

Spaltreaktion [1x]

[10 x] RNA-Mix (2 µl)
Proteinmix (4-8 µl)
[2,5x]/[5x] Spaltpuffer (8 µl/4 µl)
Proteinverdünnungspuffer (ad 20 µl)

RNA-Mix [10x]	Protein-Mix	Spaltpuffer [2,5x]	Proteinverdünnungspuffer CDB200
500 fmol RNA	50 fmol mPSF	50 mM Hepes-KOH pH 8	200 mM KCl
1,25 µg/µl tRNA (<i>E. coli</i>)	500 fmol mCF	5 mM DTT	50 mM Hepes-KOH pH8
ad Hepes-KOH	500 fmol CstF	2,5 mM MgCl ₂	10 % (v/v) Glycerin
pH 7,9 [10 mM]	500 fmol CF I	1,25 mM ATP/3'dATP	0,1 % (v/v) Tween20
	500 fmol CF II	1,25 M TMAO/BSA	0,5 mM EDTA
	500 fmol PAP/PAPD115A	10 % (v/v) PVA	0,2 g/l RNase-freies
	2500 fmol RBBP6 ₁₋₃₄₀		
	8 U RNasin		1 mM DTT
	ad CDB200		

Proteinase K Puffer [2x]

200 mM Tris/HCl pH8
25 mM EDTA
300 mM NaCl
2 % (w/v) SDS

Proteinase K Reaktion

20 µl Spaltreaktion
50 µl Proteinase K Puffer [2x]
0,2 g/l Proteinase K
0,1 g/l Glykogen
ad 100 µl ddH₂O

6.12.2 Präzipitationsassays

Zur Analyse der Präzipitation von RNA während der Spaltreaktion wurde, wie bereits beschrieben, ein Spaltassay, durchgeführt. Die Reaktionsmischungen wurden nach 15 oder 60 Minuten Inkubation für zwei Minuten bei ca. 20.000 g zentrifugiert, und das Präzipitat wurde vom Überstand getrennt. Anschließend wurden sowohl Präzipitat als auch der Überstand mit Proteinase K-Puffer versetzt und die Reaktionen dadurch gestoppt. Das weitere Verfahren erfolgte wie im 3'-mRNA-Spaltassay.

Für die Analyse der Protein-Präzipitation während der Reaktion wurde anstelle von 50 fmol radioaktiv markierter RNA 500 fmol unmarkierte Substrat-RNA verwendet. Außerdem wurde die Menge an mPSF ebenfalls auf 500 fmol erhöht, so dass RNA und alle Proteinfaktoren in äquimolaren Mengen vorlagen. Lediglich RBBP6 war mit 2500 fmol höher konzentriert. Die Reaktionen wurden nach 15 Minuten für zwei Minuten bei 20.000 g zentrifugiert und Präzipitat wurde vom Überstand getrennt. Das Präzipitat wurde in [1x] Reaktionspuffer aufgenommen. Anschließend wurden die einzelnen Proben mit [2x] SDS-Probenpuffer versetzt. Reaktionen, die PEG6000 oder PVA als *crowding* Reagenz enthielten, wurden vor dem Zusatz von SDS-Probenpuffer einer Aceton-Fällung (PEG) oder einer TCA-Fällung (PVA) unterzogen. Während PEG bzw. PVA im Überstand blieben, konnten die Proteine so gefällt werden. Die Auf trennung und Analyse der Proteine erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese und anschließender Silberfärbung.

Reaktionspuffer [1x]

2 µl RNA-Mix
4 µl [5x] Spaltpuffer
10 µl CDB200
ad 20 µl ddH20

6.12.3 Polyadenylierungsreaktion

Polyadenylierungsreaktionen erfolgten nach den Angaben von Schönemann et al. 2014. Reaktionen wurden bei 37 °C für ca. 5 Minuten vorinkubiert und durch ATP-Zugabe gestartet. Titrationen wurden für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Eine Polyadenylierungsreaktion enthielt 4 nM Substrat-RNA und 0,2 nM PAP. Jeweils eine Kontrollreaktion enthielt 2 nM PAP (10x). mPSF wurde äquimolar zur RNA und PABPN1 im

Überschuss (50 nM) eingesetzt. Proteine wurden mit FBK-50-Puffer verdünnt. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Reaktionen gestoppt, wie für die Spaltungsreaktion beschrieben. Die Proteine wurden mit Proteinase K verdaut und die RNA wurde mit Ethanol präzipitiert, abzentrifugiert und in 2 µl Hepes (10 mM, pH 7,9) und 4 µl Formamid-Ladepuffer aufgenommen. Die Proben wurden zwei Minuten bei 95 °C erhitzt und bis zum Beladen eines denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamid-Gels auf Eis gehalten. Für die Auswertung wurde das Gel einer Autoradiographie unterzogen, auf einem PhosphorImager gescannt und mittels ImageQuant Software analysiert.

[1x] Polyadenylierungsreaktion	[2x] SPAB	FBK-50-Puffer
4 nM L3Pre/L3preA15	50 mM Hepes pH 7,9	50 mM KCl
0,2 nM PAP	100 mM KCl	50 mM Tris/HCl pH 8,0
4 nM mPSF	4% (w/v) PEG6000	10 % (v/v) Glycerin
50 nM PABPN1	0,1 mM EDTA	0,2 g/l BSA (RNase frei)
[1x] SPABP	0,02 % (v/v) NP-40	0,01 % (v/v) NP-40
8 U RNasin	0,8 g/L BSA (RNase frei)	1 mM EDTA
		1 mM DTT
0,5 mM ATP	20 % (v/v) Glycerin	
ad 20 µl H ₂ O	4 mM MgCl ₂	
	2 mM DTT	

Stopp-Mix

[1x] Proteinase K Puffer
0,2 g/l PK
0,1 g/l Glykogen
ad ddH ₂ O

6.12.4 Filterbindung

Als schnelle Methode für die Analyse von RNA-Protein-Interaktionen diente der Nitrozellulose-Filterbindungsassay. Dabei wird die apparente Affinität verschiedener Proteinpräparationen für unterschiedliche RNA-Substrate bestimmt.

Für die Experimente wurde der Spaltpuffer ohne *crowding*-Reagenz und mit zusätzlich 100 mM NaCl verwendet. Proteinverdünnungen erfolgten in dem bereits beschriebenen Proteinverdünnungspuffer CDB. Allerdings wurden 100 mM NaCl anstelle von KCl verwendet. Als Substrat diente die radioaktiv markierte SV40*late* Wildtyp-RNA. Diese wurde vor Beginn der Experimente für zwei Minuten bei 95 °C erhitzt und danach auf Eis abgeschreckt. Anschließend wurde die RNA mit konstanter Konzentration in 36 µl Puffer vorgelegt. Die Bindungsreaktionen (Gesamtvolumen = 40 µl) wurden durch Zugabe von Protein mit steigenden Konzentrationen gestartet. Nach einer Inkubation von 20-30 Minuten bei Raumtemperatur wurden 90 % jeder Reaktionsmischung auf einen Nitrozellulosefilter appliziert (vorher in Waschpuffer mit 5 ng/µl *E. coli*-rRNA inkubiert) und unter Vakuum abgesaugt. Nicht gebundene RNA wurde durch Waschung mit 5 ml eiskaltem Waschpuffer entfernt. Die von den Proteinen gebundene und dadurch auf dem Filter zurückgehaltene RNA wurde anschließend per Szintillationszählung quantifiziert.

Zur Kontrolle wurden mindestens drei Reaktionen ohne Protein mitgeführt, die zur Ermittlung der Hintergrundbindung dienten. Für die Ermittlung der Gesamtradioaktivität wurden wiederum zwei Reaktionen ohne Protein verwendet, welche jedoch nicht auf den Filter appliziert, sondern direkt in ein Szintillationsgefäß überführt wurden. Mit Hilfe dieser zwei Reaktionen kann die spezifische Radioaktivität der Substrat-RNA berechnet werden:

$$A_{spez.} = \frac{A_{total}}{n_{Substrat\ RNA}}$$

Über die spezifische Aktivität kann die Menge an proteingebundener RNA für die anderen Reaktionen ermittelt werden:

$$n_{gebundene\ RNA} = \frac{A_{gebundene\ RNA}}{A_{spez.}}$$

Die Auswertung der Daten erfolgte über den Solver von Microsoft Excel zum Lösen einer quadratischen Gleichung mit zwei Unbekannten. Der hyperbole Kurvenverlauf ergab sich aus der Auftragung der eingesetzten Proteinmenge (X-Achse) gegen die Menge an gebundener RNA (Y-Achse). Hierbei entspricht die Konzentration des Proteins bei halbmaximaler RNA-Bindung dem apparenten K_{50} . (Da die eingesetzten RNA-Konzentrationen unterhalb der K_{50}

und unterhalb der eingesetzten Proteinkonzentrationen lagen, konnte der Unterschied zwischen freiem Protein und Gesamtprotein vernachlässigt werden.) Zur Bestätigung des hyperbolischen Fits wurde eine Linearisierung mittels doppelt reziproker Auftragung nach Lineweaver-Burk verwendet.

Das Verfolgen der RNA-Bindungsaktivitäten über das Säulenprofil der finalen mCF- oder RBBP6₁₋₇₈₀-Chromatografie wurde analog zu dem oben beschriebenen Filterbindungsassay durchgeführt. Allerdings wurde die eingesetzte Konzentration von SV40late auf 10 nM erhöht und zusammen mit 2 U RNasin (NEB) und Spaltpuffer ohne *crowding* Reagenz vorgelegt. Mit 5 µl der unverdünnten Proteinfraktion wurde die Reaktion gestartet.

Spaltpuffer	Waschpuffer
100 mM NaCl	100 mM NaCl
20 mM Hepes pH 7,9	50 mM Tris/HCl pH8,0
1 mM MgCl ₂	1 mM EDTA
0,5 mM ATP	
0,04 % (v/v) Tween 20	
2 mM DTT	

6.13 Fluoreszenzmikroskopie

Für die Analyse der Präzipitation von Proteinen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops wurden Spaltreaktionen angesetzt, bei denen ein Prozessierungsfaktor mit einem GFP-Fusionsanteil markiert war. Der Reaktionsstart erfolgte durch Zusatz von RNA. Sofort wurde 5 µl der Reaktionsmischung auf einen µ-Slide 18 well Glasboden-Objektträger (Ibidi) gegeben und unter das Mikroskop gelegt. Die Temperierung des Mikroskops betrug konstant 30 °C um exakte Spaltbedingungen zu simulieren. Die Bildung sichtbarer Präzipitate wurde für 15 bis 30 Minuten verfolgt und photographisch dokumentiert.

Für die Analyse der Ko-Präzipitation von zwei unterschiedlichen Prozessierungsfaktoren wurden zusätzlich zu einem GFP-markierten Prozessierungsfaktor entsprechende Mengen SNAP-fusioniertes RBBP6 mit SNAP-Surface549 (NEB) markiert (Markierung nach Herstellerangaben [5]) zugesetzt. Zur Detektion der Ko-Präzipitation von Proteinfaktoren mit der Substrat-RNA wurden 2 pmol fluoreszenzmarkierte Cy5-DNA-Oligomere eingesetzt, die zu verschiedenen Bereichen der Substrat-RNAs komplementär waren.

Diese Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Uwe Kühn und der Core Facility Imaging des Charles-Tanford-Proteinzentrums durchgeführt. Die Mikroskopie wurde von Dr. Nadine Bley ausgeführt.

7 Literaturverzeichnis

7.1 Publikationen

- Ahn, S. H., Kim, M., & Buratowski, S. (2004). Phosphorylation of Serine 2 within the RNA Polymerase II C-Terminal Domain Couples Transcription and 3' End Processing. *Molecular Cell*, 13(1), 67–76. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00492-1](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00492-1)
- Alberti, S., Gladfelter, A., & Mittag, T. (2019). Considerations and Challenges in Studying Liquid-Liquid Phase Separation and Biomolecular Condensates. *Cell*, 176(3), 419–434. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.035>
- Alberti, S., & Hyman, A. A. (2016). Are aberrant phase transitions a driver of cellular aging? *BioEssays*, 38(10), 959–968. <https://doi.org/10.1002/bies.201600042>
- André, A. A. M., & Spruijt, E. (2020). Liquid–Liquid Phase Separation in Crowded Environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 5908. <https://doi.org/10.3390/ijms21165908>
- Atha, D. H., & Ingham, K. C. (1981). Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols. Analysis in terms of excluded volume. *The Journal of Biological Chemistry*, 256(23), 12108–12117.
- Bai, Y., Auperin, T. C., Chou, C.-Y., Chang, G.-G., Manley, J. L., & Tong, L. (2007). Crystal Structure of Murine CstF-77: Dimeric Association and Implications for Polyadenylation of mRNA Precursors. *Molecular Cell*, 25(6), 863–875. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.01.034>
- Baillat, D., Hakimi, M.-A., Näär, A. M., Shilatifard, A., Cooch, N., & Shiekhattar, R. (2005). Integrator, a Multiprotein Mediator of Small Nuclear RNA Processing, Associates with the C-Terminal Repeat of RNA Polymerase II. *Cell*, 123(2), 265–276. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.019>
- Banani, S. F., Lee, H. O., Hyman, A. A., & Rosen, M. K. (2017). Biomolecular condensates: Organizers of cellular biochemistry. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(5), 285–298. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.7>
- Barabino, S. M., Hübner, W., Jenny, A., Minvielle-Sebastia, L., & Keller, W. (1997). The 30-kD subunit of mammalian cleavage and polyadenylation specificity factor and its yeast homolog are RNA-binding zinc finger proteins. *Genes & Development*, 11(13), 1703–1716. <https://doi.org/10.1101/gad.11.13.1703>
- Barabino, S. M. L., Ohnacker, M., & Keller, W. (2000). Distinct roles of two Yth1p domains in 3'-end cleavage and polyadenylation of yeast pre-mRNAs. *The EMBO Journal*, 19(14), 3778–3787. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.14.3778>
- Barillà, D., Lee, B. A., & Proudfoot, N. J. (2001). Cleavage/polyadenylation factor IA associates with the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(2), 445–450. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.2.445>

Bataille, A. R., Jeronimo, C., Jacques, P.-É., Laramée, L., Fortin, M.-È., Forest, A., Bergeron, M., Hanes, S. D., & Robert, F. (2012). A Universal RNA Polymerase II CTD Cycle Is Orchestrated by Complex Interplays between Kinase, Phosphatase, and Isomerase Enzymes along Genes. *Molecular Cell*, 45(2), 158–170. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.11.024>

Bentley, D. L. (2014). Coupling mRNA processing with transcription in time and space. *Nature Reviews Genetics*, 15(3), 163–175. <https://doi.org/10.1038/nrg3662>

Berger, I., Fitzgerald, D. J., & Richmond, T. J. (2004). Baculovirus expression system for heterologous multiprotein complexes. *Nature Biotechnology*, 22(12), 1583–1587. <https://doi.org/10.1038/nbt1036>

Bhat, R., & Timasheff, S. N. (1992). Steric exclusion is the principal source of the preferential hydration of proteins in the presence of polyethylene glycols. *Protein Science*, 1(9), 1133–1143. <https://doi.org/10.1002/pro.5560010907>

Bieniossek, C., Richmond, T. J., & Berger, I. (2008). MultiBac: Multigene Baculovirus-Based Eukaryotic Protein Complex Production. *Current Protocols in Protein Science*, 51(1). <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0520s51>

Bienroth, S., Keller, W., & Wahle, E. (1993). Assembly of a processive messenger RNA polyadenylation complex. *The EMBO Journal*, 12(2), 585–594. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05690.x>

Bienroth, S., Wahle, E., Suter-Cazzolara, C., & Keller, W. (1991). Purification of the cleavage and polyadenylation factor involved in the 3'-processing of messenger RNA precursors. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(29), 19768–19776.

Boreikaite, V., Elliott, T. S., Chin, J. W., & Passmore, L. A. (2022). RBBP6 activates the pre-mRNA 3' end processing machinery in humans. *Genes & Development*, 36(3–4), 210–224. <https://doi.org/10.1101/gad.349223.121>

Brangwynne, C. P. (2013). Phase transitions and size scaling of membrane-less organelles. *Journal of Cell Biology*, 203(6), 875–881. <https://doi.org/10.1083/jcb.201308087>

Brown, K. M., & Gilmartin, G. M. (2003). A Mechanism for the Regulation of Pre-mRNA 3' Processing by Human Cleavage Factor Im. *Molecular Cell*, 12(6), 1467–1476. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00453-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00453-2)

Burnette, W. N. (1981). “Western Blotting”: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*, 112(2), 195–203. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90281-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90281-5)

Casañal, A., Kumar, A., Hill, C. H., Easter, A. D., Emsley, P., Degliesposti, G., Gordiyenko, Y., Santhanam, B., Wolf, J., Wiederhold, K., Dornan, G. L., Skehel, M., Robinson, C. V., & Passmore, L. A. (2017). Architecture of eukaryotic mRNA 3'-end processing machinery. *Science*, 358(6366), 1056–1059. <https://doi.org/10.1126/science.aa06535>

Chan, S., Choi, E.-A., & Shi, Y. (2011). Pre-mRNA 3'-end processing complex assembly and function: Pre-mRNA 3'-end processing complex assembly. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 2(3), 321–335. <https://doi.org/10.1002/wrna.54>

- Chan, S. L., Huppertz, I., Yao, C., Weng, L., Moresco, J. J., Yates, J. R., Ule, J., Manley, J. L., & Shi, Y. (2014). CPSF30 and Wdr33 directly bind to AAUAAA in mammalian mRNA 3' processing. *Genes & development*, 28(21), 2370–2380.
- Chapman, R. D., Heidemann, M., Albert, T. K., Mailhammer, R., Flatley, A., Meisterernst, M., Kremmer, E., & Eick, D. (2007). Transcribing RNA Polymerase II Is Phosphorylated at CTD Residue Serine-7. *Science*, 318(5857), 1780–1782. <https://doi.org/10.1126/science.1145977>
- Chen, J., Tang, H., Wu, Z., Zhou, C., Jiang, T., Xue, Y., Huang, G., Yan, D., & Peng, Z. (2013). Overexpression of RBBP6, Alone or Combined with Mutant TP53, Is Predictive of Poor Prognosis in Colon Cancer. *PLOS ONE*, 8(6), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066524>
- Chibi, M., Meyer, M., Skepu, A., G. Rees, D. J., Moolman-Smook, J. C., & Pugh, D. J. R. (2008). RBBP6 Interacts with Multifunctional Protein YB-1 through Its RING Finger Domain, Leading to Ubiquitination and Proteosomal Degradation of YB-1. *Journal of Molecular Biology*, 384(4), 908–916. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.09.060>
- Cho, S. S., Reddy, G., Straub, J. E., & Thirumalai, D. (2011). Entropic Stabilization of Proteins by TMAO. *The Journal of Physical Chemistry B*, 115(45), 13401–13407. <https://doi.org/10.1021/jp207289b>
- Christofori, G., & Keller, W. (1988). 3' cleavage and polyadenylation of mRNA precursors in vitro requires a poly(A) polymerase, a cleavage factor, and a snRNP. *Cell*, 54(6), 875–889. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(88\)91263-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(88)91263-9)
- Christofori, G., & Keller, W. (1989). Poly(A) Polymerase Purified from HeLa Cell Nuclear Extract Is Required for Both Cleavage and Polyadenylation of Pre-mRNA In Vitro. *MOL. CELL. BIOL.*, 9.
- Clerici, M., Faini, M., Aebersold, R., & Jinek, M. (2017). Structural insights into the assembly and polyA signal recognition mechanism of the human CPSF complex. *eLife*, 6, e33111. <https://doi.org/10.7554/eLife.33111>
- Clerici, M., Faini, M., Muckenfuss, L. M., Aebersold, R., & Jinek, M. (2018). Structural basis of AAUAAA polyadenylation signal recognition by the human CPSF complex. *Nature Structural & Molecular Biology*, 25(2), 135–138. <https://doi.org/10.1038/s41594-017-0020-6>
- Connelly, S., & Manley, J. L. (1988). A functional mRNA polyadenylation signal is required for transcription termination by RNA polymerase II. *Genes & Development*, 2(4), 440–452. <https://doi.org/10.1101/gad.2.4.440>
- Conway, L., & Wickens, M. (1987). Analysis of mRNA 3' end formation by modification interference: The only modifications which prevent processing lie in AAUAAA and the poly(A) site. *The EMBO Journal*, 6(13), 4177–4184. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02764.x>
- Dass, B., Tardif, S., Park, J. Y., Tian, B., Weitlauf, H. M., Hess, R. A., Carnes, K., Griswold, M. D., Small, C. L., & MacDonald, C. C. (2007). Loss of polyadenylation protein τCstF-64 causes spermatogenic defects and male infertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(51), 20374–20379. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707589104>

de Vries, H. (2000). Human pre-mRNA cleavage factor II_m contains homologs of yeast proteins and bridges two other cleavage factors. *The EMBO Journal*, 19(21), 5895–5904. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.21.5895>

Derti, A., Garrett-Engele, P., MacIsaac, K. D., Stevens, R. C., Sriram, S., Chen, R., Rohl, C. A., Johnson, J. M., & Babak, T. (2012). A quantitative atlas of polyadenylation in five mammals. *Genome research*, 22(6), 1173–1183.

Dettwiler, S., Aringhieri, C., Cardinale, S., Keller, W., & Barabino, S. M. L. (2004). Distinct Sequence Motifs within the 68-kDa Subunit of Cleavage Factor Im Mediate RNA Binding, Protein-Protein Interactions, and Subcellular Localization. *Journal of Biological Chemistry*, 279(34), 35788–35797. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403927200>

Dheur, S. (2003). Pti1p and Ref2p found in association with the mRNA 3' end formation complex direct snoRNA maturation. *The EMBO Journal*, 22(11), 2831–2840. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg253>

Di Giammartino, D. C., Li, W., Ogami, K., Yashinskie, J. J., Hoque, M., Tian, B., & Manley, J. L. (2014). RBBP6 isoforms regulate the human polyadenylation machinery and modulate expression of mRNAs with AU-rich 3' UTRs. *Genes & Development*, 28(20), 2248–2260. <https://doi.org/10.1101/gad.245787.114>

Dichtl, B., Blank, D., Ohnacker, M., Friedlein, A., Roeder, D., Langen, H., & Keller, W. (2002). A Role for SSU72 in Balancing RNA Polymerase II Transcription Elongation and Termination. *Molecular Cell*, 10(5), 1139–1150. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00707-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00707-4)

Dikfidan, A., Loll, B., Zeymer, C., Magler, I., Clausen, T., & Meinhart, A. (2014). RNA Specificity and Regulation of Catalysis in the Eukaryotic Polynucleotide Kinase Clp1. *Molecular Cell*, 54(6), 975–986. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.04.005>

Dominski, Z. (2010). The hunt for the 3' endonuclease. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 1(2), 325–340. <https://doi.org/10.1002/wrna.33>

Dominski, Z., Yang, X., & Marzluff, W. F. (2005). The Polyadenylation Factor CPSF-73 Is Involved in Histone-Pre-mRNA Processing. *Cell*, 123(1), 37–48. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.002>

Dominski, Z., Yang, X., Purdy, M., Wagner, E. J., & Marzluff, W. F. (2005). A CPSF-73 Homologue Is Required for Cell Cycle Progression but Not Cell Growth and Interacts with a Protein Having Features of CPSF-100. *Molecular and Cellular Biology*, 25(4), 1489–1500. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.4.1489-1500.2005>

Eaton, J. D., Davidson, L., Bauer, D. L. V., Natsume, T., Kanemaki, M. T., & West, S. (2018). Xrn2 accelerates termination by RNA polymerase II, which is underpinned by CPSF73 activity. *Genes & Development*, 32(2), 127–139. <https://doi.org/10.1101/gad.308528.117>

Egloff, S., Dienstbier, M., & Murphy, S. (2012). Updating the RNA polymerase CTD code: Adding gene-specific layers. *Trends in Genetics*, 28(7), 333–341. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.03.007>

Eick, D., & Geyer, M. (2013). The RNA Polymerase II Carboxy-Terminal Domain (CTD) Code. *Chemical Reviews*, 113(11), 8456–8490. <https://doi.org/10.1021/cr400071f>

- Ellis, R. J. (2001). Macromolecular crowding: Obvious but underappreciated. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(10), 597–604. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(01\)01938-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(01)01938-7)
- Fang, X., Wang, L., Ishikawa, R., Li, Y., Fiedler, M., Liu, F., Calder, G., Rowan, B., Weigel, D., Li, P., & Dean, C. (2019). Arabidopsis FLL2 promotes liquid–liquid phase separation of polyadenylation complexes. *Nature*, 569(7755), 265–269. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1165-8>
- Fitzgerald, D. J., Berger, P., Schaffitzel, C., Yamada, K., Richmond, T. J., & Berger, I. (2006). Protein complex expression by using multigene baculoviral vectors. *Nature Methods*, 3(12), 1021–1032. <https://doi.org/10.1038/nmeth983>
- Ghazy, M. A., He, X., Singh, B. N., Hampsey, M., & Moore, C. (2009). The Essential N Terminus of the Pta1 Scaffold Protein Is Required for snoRNA Transcription Termination and Ssu72 Function but Is Dispensable for Pre-mRNA 3'-End Processing. *Molecular and Cellular Biology*, 29(8), 2296–2307. <https://doi.org/10.1128/MCB.01514-08>
- Gordon, J. M. B., Shikov, S., Kuehner, J. N., Liriano, M., Lee, E., Stafford, W., Poulsen, M. B., Harrison, C., Moore, C., & Bohm, A. (2011). Reconstitution of CF IA from Overexpressed Subunits Reveals Stoichiometry and Provides Insights into Molecular Topology. *Biochemistry*, 50(47), 10203–10214. <https://doi.org/10.1021/bi200964p>
- Gross, S., & Moore, C. (2001). Five subunits are required for reconstitution of the cleavage and polyadenylation activities of *Saccharomyces cerevisiae* cleavage factor I. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(11), 6080–6085. <https://doi.org/10.1073/pnas.101046598>
- Gruber, A. J., & Zavolan, M. (2019). Alternative cleavage and polyadenylation in health and disease. *Nature Reviews Genetics*, 20(10), 599–614. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0145-z>
- Gruber, A. R., Martin, G., Keller, W., & Zavolan, M. (2014). Means to an end: Mechanisms of alternative polyadenylation of messenger RNA precursors: Alternative polyadenylation of messenger RNA precursors. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 5(2), 183–196. <https://doi.org/10.1002/wrna.1206>
- Guégueniat, J., Dupin, A. F., Stojko, J., Beaurepaire, L., Cianférani, S., Mackereth, C. D., Minvielle-Sébastia, L., & Fribourg, S. (2017). Distinct roles of Pcf11 zinc-binding domains in pre-mRNA 3'-end processing. *Nucleic Acids Research*, 45(17), 10115–10131. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx674>
- Hamilton, K., & Tong, L. (2020). Molecular mechanism for the interaction between human CPSF30 and hFip1. *Genes & Development*, 34(23–24), 1753–1761. <https://doi.org/10.1101/gad.343814.120>
- Hill, C. H., Boreikaitė, V., Kumar, A., Casañal, A., Kubík, P., Degliesposti, G., Maslen, S., Mariani, A., von Loeffelholz, O., Girbig, M., Skehel, M., & Passmore, L. A. (2019). Activation of the Endonuclease that Defines mRNA 3' Ends Requires Incorporation into an 8-Subunit Core Cleavage and Polyadenylation Factor Complex. *Molecular Cell*, 73(6), 1217–1231.e11. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.12.023>
- Hirose, Y., & Manley, J. L. (1998). RNA polymerase II is an essential mRNA polyadenylation factor. *Nature*, 395(6697), 93–96. <https://doi.org/10.1038/25786>

Hocine, S., Singer, R. H., & Grunwald, D. (2010). RNA Processing and Export. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(12), a000752–a000752. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000752>

Hofweber, M., Hutten, S., Bourgeois, B., Spreitzer, E., Niedner-Boblenz, A., Schifferer, M., Ruepp, M.-D., Simons, M., Niessing, D., Madl, T., & Dormann, D. (2018). Phase Separation of FUS Is Suppressed by Its Nuclear Import Receptor and Arginine Methylation. *Cell*, 173(3), 706–719.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.004>

Huai, Y., Mao, W., Wang, X., Lin, X., Li, Y., Chen, Z., & Qian, A. (2022). How do RNA binding proteins trigger liquid–liquid phase separation in human health and diseases? *BioScience Trends*, 16(6), 389–404. <https://doi.org/10.5582/bst.2022.01449>

Huang, J., Liu, X., Sun, Y., Li, Z., Lin, M.-H., Hamilton, K., Mandel, CoreyR., Sandmeir, F., Conti, E., Oyala, PaulH., & Tong, L. (2023). An examination of the metal ion content in the active sites of human endonucleases CPSF73 and INTS11. *Journal of Biological Chemistry*, 103047. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.103047>

Humphrey, T., Christofori, G., Lucijanic, V., & Keller, W. (1987). Cleavage and polyadenylation of messenger RNA precursors in vitro occurs within large and specific 3' processing complexes. *The EMBO Journal*, 6(13), 4159–4168. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02762.x>

Ishida, T., & Kinoshita, K. (2007). PrDOS: Prediction of disordered protein regions from amino acid sequence. *Nucleic Acids Research*, 35(Web Server), W460–W464. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm363>

Ito, S., Sakai, A., Nomura, T., Miki, Y., Ouchida, M., Sasaki, J., & Shimizu, K. (2001). A Novel WD40 Repeat Protein, WDC146, Highly Expressed during Spermatogenesis in a Stage-Specific Manner. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 280(3), 656–663. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.4163>

Ji, Y., Li, F., & Qiao, Y. (2022). Modulating liquid–liquid phase separation of FUS: mechanisms and strategies. *J. Mater. Chem. B*, 10(42), 8616–8628. <https://doi.org/10.1039/D2TB01688E>

Kappo, M. A., Ab, E., Hassem, F., Atkinson, R. A., Faro, A., Muleya, V., Mulaudzi, T., Poole, J. O., McKenzie, J. M., Chibi, M., Moolman-Smook, J. C., Rees, D. J. G., & Pugh, D. J. R. (2012). Solution Structure of RING Finger-like Domain of Retinoblastoma-binding Protein-6 (RBBP6) Suggests It Functions as a U-box. *Journal of Biological Chemistry*, 287(10), 7146–7158. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.217059>

Katahira, J. (2012). mRNA export and the TREX complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(6), 507–513. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.12.001>

Kato, M., Han, T. W., Xie, S., Shi, K., Du, X., Wu, L. C., Mirzaei, H., Goldsmith, E. J., Longgood, J., Pei, J., Grishin, N. V., Frantz, D. E., Schneider, J. W., Chen, S., Li, L., Sawaya, M. R., Eisenberg, D., Tycko, R., & McKnight, S. L. (2012). Cell-free Formation of RNA Granules: Low Complexity Sequence Domains Form Dynamic Fibers within Hydrogels. *Cell*, 149(4), 753–767. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.017>

- Kaufmann, I., Martin, G., Friedlein, A., Langen, H., & Keller, W. (2004). Human Fip1 is a subunit of CPSF that binds to U-rich RNA elements and stimulates poly(A) polymerase. *The EMBO Journal*, 23(3), 616–626. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600070>
- Keller, W., Bienroth, S., Lang, K. M., & Christofori, G. (1991). Cleavage and polyadenylation factor CPF specifically interacts with the pre-mRNA 3' processing signal AAUAAA. *The EMBO Journal*, 10(13), 4241–4249. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb05002.x>
- Kerwitz, Y. (2003). Stimulation of poly(A) polymerase through a direct interaction with the nuclear poly(A) binding protein allosterically regulated by RNA. *The EMBO Journal*, 22(14), 3705–3714. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg347>
- Kim, M., Krogan, N. J., Vasiljeva, L., Rando, O. J., Nedea, E., Greenblatt, J. F., & Buratowski, S. (2004). The yeast Rat1 exonuclease promotes transcription termination by RNA polymerase II. *Nature*, 432(7016), 517–522. <https://doi.org/10.1038/nature03041>
- Krishnamurthy, S., He, X., Reyes-Reyes, M., Moore, C., & Hampsey, M. (2004). Ssu72 Is an RNA Polymerase II CTD Phosphatase. *Molecular Cell*, 14(3), 387–394. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(04\)00235-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(04)00235-7)
- Kühn, U., Buschmann, J., & Wahle, E. (2017). The nuclear poly(A) binding protein of mammals, but not of fission yeast, participates in mRNA polyadenylation. *RNA*, 23(4), 473–482. <https://doi.org/10.1261/rna.057026.116>
- Kühn, U., Gündel, M., Knoth, A., Kerwitz, Y., Rüdel, S., & Wahle, E. (2009). Poly(A) Tail Length Is Controlled by the Nuclear Poly(A)-binding Protein Regulating the Interaction between Poly(A) Polymerase and the Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor. *Journal of Biological Chemistry*, 284(34), 22803–22814. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.018226>
- Lackford, B., Yao, C., Charles, G. M., Weng, L., Zheng, X., Choi, E.-A., Xie, X., Wan, J., Xing, Y., Freudenberg, J. M., Yang, P., Jothi, R., Hu, G., & Shi, Y. (2014). Fip1 regulates mRNA alternative polyadenylation to promote stem cell self-renewal. *The EMBO Journal*, 33(8), 878–889. <https://doi.org/10.1002/embj.201386537>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Laishram, R. S., & Anderson, R. A. (2010). The poly A polymerase Star-PAP controls 3'-end cleavage by promoting CPSF interaction and specificity toward the pre-mRNA. *The EMBO Journal*, 29(24), 4132–4145. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.287>
- Lancaster, A. K., Nutter-Upham, A., Lindquist, S., & King, O. D. (2014). PLAAC: A web and command-line application to identify proteins with prion-like amino acid composition. *Bioinformatics*, 30(17), 2501–2502. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu310>
- Lee, J.-H., You, J., Dobrota, E., & Skalnik, D. G. (2010). Identification and Characterization of a Novel Human PP1 Phosphatase Complex*. *Journal of Biological Chemistry*, 285(32), 24466–24476. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.109801>
- Lee, S. D., & Moore, C. L. (2014). Efficient mRNA Polyadenylation Requires a Ubiquitin-Like Domain, a Zinc Knuckle, and a RING Finger Domain, All Contained in the Mpe1 Protein. *Molecular and Cellular Biology*, 34(21), 3955–3967. <https://doi.org/10.1128/MCB.00077-14>

Legrand, P., Pinaud, N., Minvielle-Sebastia, L., & Fribourg, S. (2007). The structure of the CstF-77 homodimer provides insights into CstF assembly. *Nucleic Acids Research*, 35(13), 4515–4522. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm458>

Li, L., Deng, B., Xing, G., Teng, Y., Tian, C., Cheng, X., Yin, X., Yang, J., Gao, X., Zhu, Y., Sun, Q., Zhang, L., Yang, X., & He, F. (2007). PACT is a negative regulator of p53 and essential for cell growth and embryonic development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(19), 7951–7956. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701916104>

Li, W., Laishram, R. S., Ji, Z., Barlow, C. A., Tian, B., & Anderson, R. A. (2012). Star-PAP Control of BIK Expression and Apoptosis Is Regulated by Nuclear PIPK1α and PKCδ Signaling. *Molecular Cell*, 45(1), 25–37. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.11.017>

Lidschreiber, M., Easter, A. D., Battaglia, S., Rodríguez-Molina, J. B., Casañal, A., Carminati, M., Baejen, C., Grzechnik, P., Maier, K. C., Cramer, P., & Passmore, L. A. (2018). The APT complex is involved in non-coding RNA transcription and is distinct from CPF. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gky845>

MacDonald, C. C., & McMahon, K. W. (2010). Tissue-specific mechanisms of alternative polyadenylation: Testis, brain, and beyond: Tissue-specific mechanisms of alternative polyadenylation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 1(3), 494–501. <https://doi.org/10.1002/wrna.29>

MacDonald, C. C., Wilusz, J., & Shenk, T. (1994). The 64-Kilodalton Subunit of the CstF Polyadenylation Factor Binds to Pre-mRNAs Downstream of the Cleavage Site and Influences Cleavage Site Location. *Molecular and Cellular Biology*, 14(10), 6647–6654. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.10.6647-6654.1994>

Maharana, S., Wang, J., Papadopoulos, D. K., Richter, D., Pozniakovsky, A., Poser, I., Bickle, M., Rizk, S., Guillén-Boixet, J., Franzmann, T. M., Jahnel, M., Marrone, L., Chang, Y.-T., Sterneckert, J., Tomancak, P., Hyman, A. A., & Alberti, S. (2018). RNA buffers the phase separation behavior of prion-like RNA binding proteins. *Science*, 360(6391), 918–921. <https://doi.org/10.1126/science.aar7366>

Mandel, C. R., Kaneko, S., Zhang, H., Gebauer, D., Vethantham, V., Manley, J. L., & Tong, L. (2006). Polyadenylation factor CPSF-73 is the pre-mRNA 3'-end-processing endonuclease. *Nature*, 444(7121), 953–956. <https://doi.org/10.1038/nature05363>

Martin, G. (2000). Crystal structure of mammalian poly(A) polymerase in complex with an analog of ATP. *The EMBO Journal*, 19(16), 4193–4203. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.16.4193>

Martin, G., Gruber, A. R., Keller, W., & Zavolan, M. (2012). Genome-wide Analysis of Pre-mRNA 3' End Processing Reveals a Decisive Role of Human Cleavage Factor I in the Regulation of 3' UTR Length. *Cell Reports*, 1(6), 753–763. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.05.003>

Martin, G., Möglich, A., Keller, W., & Doublie, S. (2004). Biochemical and Structural Insights into Substrate Binding and Catalytic Mechanism of Mammalian Poly(A) Polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 341(4), 911–925. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.06.047>

Mayr, C., & Bartel, D. P. (2009). Widespread Shortening of 3'UTRs by Alternative Cleavage and Polyadenylation Activates Oncogenes in Cancer Cells. *Cell*, 138(4), 673–684. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.016>

Mbita, Z., Meyer, M., Skepu, A., Hosie, M., Rees, J., & Dlamini, Z. (2012). De-regulation of the RBBP6 isoform 3/DWNN in human cancers. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 362(1), 249–262. <https://doi.org/10.1007/s11010-011-1150-5>

McCracken, S., Fong, N., Yankulov, K., Ballantyne, S., Pan, G., Greenblatt, J., Patterson, S. D., Wickens, M., & Bentley, D. L. (1997). The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature*, 385(6614), 357–361. <https://doi.org/10.1038/385357a0>

McLauchlan, J., Moore, C. L., Simpson, S., & Clements, J. B. (1988). Components required for in vitro cleavage and polyadenylation of eukaryotic mRNA. *Nucleic Acids Research*, 16(12), 5323–5344. <https://doi.org/10.1093/nar/16.12.5323>

Meinel, D. M., Burkert-Kautzsch, C., Kieser, A., O'Duibhir, E., Siebert, M., Mayer, A., Cramer, P., Söding, J., Holstege, F. C. P., & Sträßer, K. (2013). Recruitment of TREX to the Transcription Machinery by Its Direct Binding to the Phospho-CTD of RNA Polymerase II. *PLoS Genetics*, 9(11), e1003914. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003914>

Meinhart, A., & Cramer, P. (2004). Recognition of RNA polymerase II carboxy-terminal domain by 3'-RNA-processing factors. *Nature*, 430(6996), 223–226. <https://doi.org/10.1038/nature02679>

Mészáros, B., Erdős, G., & Dosztányi, Z. (2018). IUPred2A: Context-dependent prediction of protein disorder as a function of redox state and protein binding. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W329–W337. <https://doi.org/10.1093/nar/gky384>

Minton, A. P. (2001). The Influence of Macromolecular Crowding and Macromolecular Confinement on Biochemical Reactions in Physiological Media. *Journal of Biological Chemistry*, 276(14), 10577–10580. <https://doi.org/10.1074/jbc.R100005200>

Minton, A. P. (2005). Influence of macromolecular crowding upon the stability and state of association of proteins: Predictions and observations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94(8), 1668–1675. <https://doi.org/10.1002/jps.20417>

Monarez, R. R., Macdonald, C. C., & Dass, B. (2007). Polyadenylation proteins CstF-64 and τCstF-64 exhibit differential binding affinities for RNA polymers. *Biochemical Journal*, 401(3), 651–658. <https://doi.org/10.1042/BJ20061097>

Moreno-Morcillo, M., Minvielle-Sébastia, L., Fribourg, S., & Mackereth, C. D. (2011). Locked Tether Formation by Cooperative Folding of Rna14p Monkeytail and Rna15p Hinge Domains in the Yeast CF IA Complex. *Structure*, 19(4), 534–545. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.02.003>

Moreno-Morcillo, M., Minvielle-Sébastia, L., Mackereth, C., & Fribourg, S. (2011). Hexameric architecture of CstF supported by CstF-50 homodimerization domain structure. *RNA*, 17(3), 412–418. <https://doi.org/10.1261/rna.2481011>

Muckenfuss, L. M., Migenda Herranz, A. C., Boneberg, F. M., Clerici, M., & Jinek, M. (2022). Fip1 is a multivalent interaction scaffold for processing factors in human mRNA 3' end biogenesis. *eLife*, 11, e80332. <https://doi.org/10.7554/eLife.80332>

Murthy, K. G., & Manley, J. L. (1992). Characterization of the multisubunit cleavage-polyadenylation specificity factor from calf thymus. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(21), 14804–14811.

Murthy, K. G., & Manley, J. L. (1995). The 160-kD subunit of human cleavage-polyadenylation specificity factor coordinates pre-mRNA 3'-end formation. *Genes & Development*, 9(21), 2672–2683. <https://doi.org/10.1101/gad.9.21.2672>

Nedea, E., He, X., Kim, M., Pootoolal, J., Zhong, G., Canadien, V., Hughes, T., Buratowski, S., Moore, C. L., & Greenblatt, J. (2003). Organization and Function of APT, a Subcomplex of the Yeast Cleavage and Polyadenylation Factor Involved in the Formation of mRNA and Small Nucleolar RNA 3'-Ends. *Journal of Biological Chemistry*, 278(35), 33000–33010. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304454200>

Nesterov, S. V., Ilyinsky, N. S., & Uversky, V. N. (2021). Liquid-liquid phase separation as a common organizing principle of intracellular space and biomembranes providing dynamic adaptive responses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1868(11), 119102. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2021.119102>

Noble, C. G., Beuth, B., & Taylor, I. A. (2006). Structure of a nucleotide-bound Clp1-Pcf11 polyadenylation factor. *Nucleic Acids Research*, 35(1), 87–99. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl1010>

Noble, C. G., Hollingworth, D., Martin, S. R., Ennis-Adeniran, V., Smerdon, S. J., Kelly, G., Taylor, I. A., & Ramos, A. (2005). Key features of the interaction between Pcf11 CID and RNA polymerase II CTD. *Nature Structural & Molecular Biology*, 12(2), 144–151. <https://doi.org/10.1038/nsmb887>

Ogorodnikov, A., Kargapolova, Y., & Danckwardt, S. (2016). Processing and transcriptome expansion at the mRNA 3' end in health and disease: Finding the right end. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 468(6), 993–1012. <https://doi.org/10.1007/s00424-016-1828-3>

Ohnacker, M. (2000). The WD-repeat protein Pfs2p bridges two essential factors within the yeast pre-mRNA 3'-end-processing complex. *The EMBO Journal*, 19(1), 37–47. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.1.37>

Park, E.-H., Walker, S. E., Lee, J. M., Rothenburg, S., Lorsch, J. R., & Hinnebusch, A. G. (2011). Multiple elements in the eIF4G1 N-terminus promote assembly of eIF4G1•PABP mRNPs *in vivo*: Functionally redundant elements in the eIF4G1 N-terminus. *The EMBO Journal*, 30(2), 302–316. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.312>

Patel, A., Lee, H. O., Jawerth, L., Maharana, S., Jahnel, M., Hein, M. Y., Stoynov, S., Mahamid, J., Saha, S., Franzmann, T. M., Pozniakovski, A., Poser, I., Maghelli, N., Royer, L. A., Weigert, M., Myers, E. W., Grill, S., Drechsel, D., Hyman, A. A., & Alberti, S. (2015). A Liquid-to-Solid Phase Transition of the ALS Protein FUS Accelerated by Disease Mutation. *Cell*, 162(5), 1066–1077. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.047>

- Paushkin, S. V., Patel, M., Furia, B. S., Peltz, S. W., & Trotta, C. R. (2004). Identification of a Human Endonuclease Complex Reveals a Link between tRNA Splicing and Pre-mRNA 3' End Formation. *Cell*, 117(3), 311–321. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00342-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00342-3)
- Perez Canadillas, J. M. (2003). Recognition of GU-rich polyadenylation regulatory elements by human CstF-64 protein. *The EMBO Journal*, 22(11), 2821–2830. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg259>
- Preker, P. J., Lingner, J., Minvielle-Sebastia, L., & Keller, W. (1995). The FIP1 gene encodes a component of a yeast pre-mRNA polyadenylation factor that directly interacts with poly(A) polymerase. *Cell*, 81(3), 379–389. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90391-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90391-7)
- Proudfoot, N. J. (2016). Transcriptional termination in mammals: Stopping the RNA polymerase II juggernaut. *Science*, 352(6291), aad9926. <https://doi.org/10.1126/science.aad9926>
- Pugh, D. J., Ab, E., Faro, A., Lutya, P. T., Hoffmann, E., & Rees, D. J. G. (2006). DWNN, a novel ubiquitin-like domain, implicates RBBP6 in mRNA processing and ubiquitin-like pathways. *BMC Structural Biology*, 6(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1472-6807-6-1>
- Qamar, S., Wang, G., Randle, S. J., Ruggeri, F. S., Varela, J. A., Lin, J. Q., Phillips, E. C., Miyashita, A., Williams, D., Ströhl, F., Meadows, W., Ferry, R., Dardov, V. J., Tartaglia, G. G., Farrer, L. A., Schierle, G. S. K., Kaminski, C. F., Holt, C. E., Fraser, P. E., ... George-Hyslop, P. S. (2018). FUS Phase Separation Is Modulated by a Molecular Chaperone and Methylation of Arginine Cation-π Interactions. *Cell*, 173(3), 720-734.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.056>
- Qu, X., Perez-Canadillas, J.-M., Agrawal, S., De Baecke, J., Cheng, H., Varani, G., & Moore, C. (2007). The C-terminal Domains of Vertebrate CstF-64 and Its Yeast Orthologue Rna15 Form a New Structure Critical for mRNA 3'-End Processing. *Journal of Biological Chemistry*, 282(3), 2101–2115. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609981200>
- Ralston, G. B. (1990). Effects of „crowding“ in protein solutions. *Journal of Chemical Education*, 67(10), 857. <https://doi.org/10.1021/ed067p857>
- Rodríguez-Molina, J. B., O'Reilly, F. J., Fagarasan, H., Sheekey, E., Maslen, S., Skehel, J. M., Rappaport, J., & Passmore, L. A. (2022). Mpe1 senses the binding of pre-mRNA and controls 3' end processing by CPF. *Molecular Cell*, 82(13), 2490-2504.e12. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.04.021>
- Rodríguez-Molina, J. B., West, S., & Passmore, L. A. (2023). Knowing when to stop: Transcription termination on protein-coding genes by eukaryotic RNAPII. *Molecular Cell*, 83(3), 404–415. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.12.021>
- Rozenblatt-Rosen, O., Nagaike, T., Francis, J. M., Kaneko, S., Glatt, K. A., Hughes, C. M., LaFramboise, T., Manley, J. L., & Meyerson, M. (2009). The tumor suppressor Cdc73 functionally associates with CPSF and CstF 3' mRNA processing factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(3), 755–760. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812023106>
- Rüegsegger, U., Beyer, K., & Keller, W. (1996). Purification and Characterization of Human Cleavage Factor Im Involved in the 3' End Processing of Messenger RNA Precursors. *Journal of Biological Chemistry*, 271(11), 6107–6113. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.11.6107>

Rüegsegger, U., Blank, D., & Keller, W. (1998). Human Pre-mRNA Cleavage Factor Im Is Related to Spliceosomal SR Proteins and Can Be Reconstituted In Vitro from Recombinant Subunits. *Molecular Cell*, 1(2), 243–253. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80025-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80025-8)

Ruepp, M.-D., Schweingruber, C., Kleinschmidt, N., & Schümperli, D. (2011). Interactions of CstF-64, CstF-77, and symplekin: Implications on localisation and function. *Molecular Biology of the Cell*, 22(1), 91–104. <https://doi.org/10.1091/mbc.e10-06-0543>

Ryan, K., Calvo, O., & Manley, J. L. (2004). Evidence that polyadenylation factor CPSF-73 is the mRNA 3' processing endonuclease. *RNA*, 10(4), 565–573. <https://doi.org/10.1261/rna.5214404>

Sakai, Y., SAIJO, M., COELHO, K., KISHINO, T., NIIKAWA, N., & TAYA, Y. (1995). cDNA Sequence and Chromosomal Localization of a Novel Human Protein, RBQ-1 (RBBP6), That Binds to the Retinoblastoma Gene Product. *Genomics*, 30(1), 98–101. <https://doi.org/10.1006/geno.1995.0017>

Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual* (3rd ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schäfer, P., Tüting, C., Schönemann, L., Kühn, U., Treiber, T., Treiber, N., Ihling, C., Gruber, A., Keller, W., Meister, G., Sinz, A., & Wahle, E. (2018). Reconstitution of mammalian cleavage factor II involved in 3' processing of mRNA precursors. *RNA*, 24(12), 1721–1737. <https://doi.org/10.1261/rna.068056.118>

Schmidt, M., Kluge, F., Sandmeir, F., Kühn, U., Schäfer, P., Tüting, C., Ihling, C., Conti, E., & Wahle, E. (2022). Reconstitution of 3' end processing of mammalian pre-mRNA reveals a central role of RBBP6. *Genes & Development*, 36(3–4), 195–209. <https://doi.org/10.1101/gad.349217.121>

Schönemann, L., Kühn, U., Martin, G., Schäfer, P., Gruber, A. R., Keller, W., Zavolan, M., & Wahle, E. (2014). Reconstitution of CPSF active in polyadenylation: Recognition of the polyadenylation signal by WDR33. *Genes & Development*, 28(21), 2381–2393. <https://doi.org/10.1101/gad.250985.114>

Schreieck, A., Easter, A. D., Etzold, S., Wiederhold, K., Lidschreiber, M., Cramer, P., & Passmore, L. A. (2014). RNA polymerase II termination involves C-terminal-domain tyrosine dephosphorylation by CPF subunit Glc7. *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(2), 175–179. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2753>

Scott, R. E., Giannakouros, T., Gao, S., & Peidis, P. (2003). Functional potential of P2P-R: A role in the cell cycle and cell differentiation related to its interactions with proteins that bind to matrix associated regions of DNA? *Journal of Cellular Biochemistry*, 90(1), 6–12. <https://doi.org/10.1002/jcb.10618>

Sheets, M. D., Ogg, S. C., & Wickens, M. P. (1990). Point mutations in AAUAAA and the poly (A) addition site: Effects on the accuracy and efficiency of cleavage and polyadenylation *in vitro*. *Nucleic Acids Research*, 18(19), 5799–5805. <https://doi.org/10.1093/nar/18.19.5799>

Sheu-Gruttaduria, J., & MacRae, I. J. (2018). Phase Transitions in the Assembly and Function of Human miRISC. *Cell*, 173(4), 946–957.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.051>

- Shi, Y., Di Giammartino, D. C., Taylor, D., Sarkeshik, A., Rice, W. J., Yates, J. R., Frank, J., & Manley, J. L. (2009). Molecular Architecture of the Human Pre-mRNA 3' Processing Complex. *Molecular Cell*, 33(3), 365–376. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.12.028>
- Shin, Y., & Brangwynne, C. P. (2017). Liquid phase condensation in cell physiology and disease. *Science*, 357(6357), eaaf4382. <https://doi.org/10.1126/science.aaf4382>
- Simons, A., Melamed-Bessudo, C., Wolkowicz, R., Sperling, J., Sperling, R., Eisenbach, L., & Rotter, V. (1997). PACT: cloning and characterization of a cellular p53 binding protein that interacts with Rb. *Oncogene*, 14(2), 145–155. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1200825>
- Skaar, D. A., & Greenleaf, A. L. (2002). The RNA Polymerase II CTD Kinase CTDK-I Affects Pre-mRNA 3' Cleavage/Polyadenylation through the Processing Component Pti1p. *Molecular Cell*, 10(6), 1429–1439. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00731-1](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00731-1)
- Sullivan, K. D., Steiniger, M., & Marzluff, W. F. (2009). A Core Complex of CPSF73, CPSF100, and Symplekin May Form Two Different Cleavage Factors for Processing of Poly(A) and Histone mRNAs. *Molecular Cell*, 34(3), 322–332. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.04.024>
- Sun, Y., Zhang, Y., Aik, W. S., Yang, X.-C., Marzluff, W. F., Walz, T., Dominski, Z., & Tong, L. (2020). Structure of an active human histone pre-mRNA 3'-end processing machinery. *Science*, 367(6478), 700–703. <https://doi.org/10.1126/science.aaz7758>
- Sun, Y., Zhang, Y., Hamilton, K., Manley, J. L., Shi, Y., Walz, T., & Tong, L. (2018). Molecular basis for the recognition of the human AAUAAA polyadenylation signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(7). <https://doi.org/10.1073/pnas.1718723115>
- Takagaki, Y., & Manley, J. L. (1992). A human polyadenylation factor is a G protein beta-subunit homologue. *Journal of Biological Chemistry*, 267(33), 23471–23474. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)35861-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)35861-7)
- Takagaki, Y., & Manley, J. L. (2000). Complex Protein Interactions within the Human Polyadenylation Machinery Identify a Novel Component. *Molecular and Cellular Biology*, 20(5), 1515–1525. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.5.1515-1525.2000>
- Takagaki, Y., Manley, J. L., MacDonald, C. C., Wilusz, J., & Shenk, T. (1990). A multisubunit factor, CstF, is required for polyadenylation of mammalian pre-mRNAs. *Genes & Development*, 4(12a), 2112–2120. <https://doi.org/10.1101/gad.4.12a.2112>
- Takagaki, Y., Ryner, L. C., & Manley, J. L. (1989). Four factors are required for 3'-end cleavage of pre-mRNAs. *Genes & Development*, 3(11), 1711–1724. <https://doi.org/10.1101/gad.3.11.1711>
- Tarun, S. Z., & Sachs, A. B. (1996). Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *The EMBO Journal*, 15(24), 7168–7177. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb01108.x>
- Thompson, V. F., Victor, R. A., Morera, A. A., Moinpour, M., Liu, M. N., Kisiel, C. C., Pickrel, K., Springhower, C. E., & Schwartz, J. C. (2018). Transcription-Dependent Formation of Nuclear Granules Containing FUS and RNA Pol II. *Biochemistry*, 57(51), 7021–7032. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b01097>

Tian, B., & Manley, J. L. (2017). Alternative polyadenylation of mRNA precursors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(1), 18–30. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.116>

Tran, D. D. H., Saran, S., Williamson, A. J. K., Pierce, A., Dittrich-Breiholz, O., Wiehlmann, L., Koch, A., Whetton, A. D., & Tamura, T. (2014). THOC5 controls 3'end-processing of immediate early genes via interaction with polyadenylation specific factor 100 (CPSF100). *Nucleic Acids Research*, 42(19), 12249–12260. <https://doi.org/10.1093/nar/gku911>

Vaughn, J. L., Goodwin, R. H., Tompkins, G. J., & McCawley, P. (1977). The establishment of two cell lines from the insectspodoptera frugiperda (lepidoptera; noctuidae). *In Vitro*, 13(4), 213–217. <https://doi.org/10.1007/BF02615077>

Venkataraman, K., Brown, K. M., & Gilmartin, G. M. (2005). Analysis of a noncanonical poly(A) site reveals a tripartite mechanism for vertebrate poly(A) site recognition. *Genes & Development*, 19(11), 1315–1327. <https://doi.org/10.1101/gad.1298605>

Vo, L. T. A., Minet, M., Schmitter, J.-M., Lacroute, F., & Wyers, F. (2001). Mpe1, a Zinc Knuckle Protein, Is an Essential Component of Yeast Cleavage and Polyadenylation Factor Required for the Cleavage and Polyadenylation of mRNA. *Molecular and Cellular Biology*, 21(24), 8346–8356. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.24.8346-8356.2001>

Wahle, E. (1991a). A novel poly(A)-binding protein acts as a specificity factor in the second phase of messenger RNA polyadenylation. *Cell*, 66(4), 759–768. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90119-J](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90119-J)

Wahle, E. (1991b). Purification and characterization of a mammalian polyadenylate polymerase involved in the 3' end processing of messenger RNA precursors. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(5), 3131–3139.

Wahle, E., & Kühn, U. (2021). mRNA Formation: 3'-End. In John Wiley & Sons, Ltd (Hrsg.), *eLS* (1. Aufl., S. 934–945). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0029243>

Wallace, A. M., Dass, B., Ravnik, S. E., Tonk, V., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., & MacDonald, C. C. (1999). Two distinct forms of the 64,000 M_r protein of the cleavage stimulation factor are expressed in mouse male germ cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(12), 6763–6768. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.12.6763>

Wang, J., Choi, J.-M., Holehouse, A. S., Lee, H. O., Zhang, X., Jahnel, M., Maharana, S., Lemaitre, R., Pozniakovsky, A., Drechsel, D., Poser, I., Pappu, R. V., Alberti, S., & Hyman, A. A. (2018). A Molecular Grammar Governing the Driving Forces for Phase Separation of Prion-like RNA Binding Proteins. *Cell*, 174(3), 688-699.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.006>

Wang, Q., Wei, S., & Xiao, H. (2020). RBBP6 induces non-small cell lung cancer cell proliferation and high expression is associated with poor prognosis. *Oncology Letters*, 19. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11403>

Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2—A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25(9), 1189–1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>

Weitzer, S., & Martinez, J. (2007). The human RNA kinase hClp1 is active on 3' transfer RNA exons and short interfering RNAs. *Nature*, 447(7141), 222–226. <https://doi.org/10.1038/nature05777>

West, S., Gromak, N., & Proudfoot, N. J. (2004). Human 5' → 3' exonuclease Xrn2 promotes transcription termination at co-transcriptional cleavage sites. *Nature*, 432(7016), 522–525. <https://doi.org/10.1038/nature03035>

West, S., & Proudfoot, N. J. (2007). Human Pcf11 enhances degradation of RNA polymerase II-associated nascent RNA and transcriptional termination. *Nucleic Acids Research*, 36(3), 905–914. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm1112>

Witte, M. M., & Scott, R. E. (1997). The proliferation potential protein-related (P2P-R) gene with domains encoding heterogeneous nuclear ribonucleoprotein association and Rb1 binding shows repressed expression during terminal differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(4), 1212–1217. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.4.1212>

Xiang, K., Manley, J. L., & Tong, L. (2012). An unexpected binding mode for a Pol II CTD peptide phosphorylated at Ser7 in the active site of the CTD phosphatase Ssu72. *Genes & Development*, 26(20), 2265–2270. <https://doi.org/10.1101/gad.198853.112>

Xiang, K., Nagaike, T., Xiang, S., Kilic, T., Beh, M. M., Manley, J. L., & Tong, L. (2010). Crystal structure of the human symplekin–Ssu72–CTD phosphopeptide complex. *Nature*, 467(7316), 729–733. <https://doi.org/10.1038/nature09391>

Xiang, K., Tong, L., & Manley, J. L. (2014). Delineating the Structural Blueprint of the Pre-mRNA 3'-End Processing Machinery. *Molecular and Cellular Biology*, 34(11), 1894–1910. <https://doi.org/10.1128/MCB.00084-14>

Xiao, C., Wu, G., Zhou, Z., Zhang, X., Wang, Y., Song, G., Ding, E., Sun, X., Zhong, L., Li, S., Weng, J., Zhu, Z., Chen, J., & Wang, X. (2019). RBBP6, a RING finger-domain E3 ubiquitin ligase, induces epithelial–mesenchymal transition and promotes metastasis of colorectal cancer. *Cell Death & Disease*, 10(11), 833. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2070-7>

Yang, F., Hsu, P., Lee, S. D., Yang, W., Hoskinson, D., Xu, W., Moore, C., & Varani, G. (2017). The C terminus of Pcf11 forms a novel zinc-finger structure that plays an essential role in mRNA 3'-end processing. *RNA*, 23(1), 98–107. <https://doi.org/10.1261/rna.058354.116>

Yang, Q., Coseno, M., Gilmartin, G. M., & Doublie, S. (2011). Crystal Structure of a Human Cleavage Factor CFIm25/CFIm68/RNA Complex Provides an Insight into Poly(A) Site Recognition and RNA Looping. *Structure*, 19(3), 368–377. <https://doi.org/10.1016/j.str.2010.12.021>

Yang, Q., Gilmartin, G. M., & Doublie, S. (2010). Structural basis of UGUA recognition by the Nudix protein CFI_m 25 and implications for a regulatory role in mRNA 3' processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(22), 10062–10067. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000848107>

Yang, W., Hsu, P. L., Yang, F., Song, J.-E., & Varani, G. (2018). Reconstitution of the CstF complex unveils a regulatory role for CstF-50 in recognition of 3'-end processing signals. *Nucleic Acids Research*, 46(2), 493–503. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1177>

Yang, X., Sun, Y., Aik, W. S., Marzluff, W. F., Tong, L., & Dominski, Z. (2020). Studies with recombinant U7 snRNP demonstrate that CPSF73 is both an endonuclease and a 5'-3' exonuclease. *RNA*, 26(10), 1345–1359. <https://doi.org/10.1261/rna.076273.120>

Yang, X.-C., Sabath, I., Dębski, J., Kaus-Drobek, M., Dadlez, M., Marzluff, W. F., & Dominski, Z. (2013). A Complex Containing the CPSF73 Endonuclease and Other Polyadenylation Factors Associates with U7 snRNP and Is Recruited to Histone Pre-mRNA for 3'-End Processing. *Molecular and Cellular Biology*, 33(1), 28–37. <https://doi.org/10.1128/MCB.00653-12>

Yao, C., Choi, E.-A., Weng, L., Xie, X., Wan, J., Xing, Y., Moresco, J. J., Tu, P. G., Yates, J. R., & Shi, Y. (2013). Overlapping and distinct functions of CstF64 and CstF64τ in mammalian mRNA 3' processing. *RNA*, 19(12), 1781–1790. <https://doi.org/10.1261/rna.042317.113>

Yoshitake, Y., Nakatsura, T., Monji, M., Senju, S., Matsuyoshi, H., Tsukamoto, H., Hosaka, S., Komori, H., Fukuma, D., Ikuta, Y., Katagiri, T., Furukawa, Y., Ito, H., Shinohara, M., Nakamura, Y., & Nishimura, Y. (2004). Proliferation Potential-Related Protein, an Ideal Esophageal Cancer Antigen for Immunotherapy, Identified Using Complementary DNA Microarray Analysis. *Clinical Cancer Research*, 10(19), 6437–6448. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0841>

Zhang, H., Rigo, F., & Martinson, H. G. (2015). Poly(A) Signal-Dependent Transcription Termination Occurs through a Conformational Change Mechanism that Does Not Require Cleavage at the Poly(A) Site. *Molecular Cell*, 59(3), 437–448. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.06.008>

Zhang, Y., Sun, Y., Shi, Y., Walz, T., & Tong, L. (2020). Structural Insights into the Human Pre-mRNA 3'-End Processing Machinery. *Molecular Cell*, 77(4), 800-809.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.11.005>

Zhang, Z., Fu, J., & Gilmour, D. S. (2005). CTD-dependent dismantling of the RNA polymerase II elongation complex by the pre-mRNA 3'-end processing factor, Pcf11. *Genes & development*, 19(13), 1572–1580.

Zhu, Y., Wang, X., Forouzmand, E., Jeong, J., Qiao, F., Sowd, G. A., Engelman, A. N., Xie, X., Hertel, K. J., & Shi, Y. (2018). Molecular Mechanisms for CFIm-Mediated Regulation of mRNA Alternative Polyadenylation. *Molecular Cell*, 69(1), 62-74.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.11.031>

Zimmerman, S. B., & Minton, A. P. (1993). Macromolecular Crowding: Biochemical, Biophysical, and Physiological Consequences. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 22(1), 27–65. <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.22.060193.000331>

7.2 Dissertationen und Studienarbeiten

Diplomarbeit M. Loorbeer (2012): Darstellung und Charakterisierung der 3'-Prozessierungsfaktoren CF Im und CstF

Dissertation L. Schönemann (2017): *In vitro-Rekonstitution des 3'-Prozessierungs-faktors CPSF (cleavage and polyadenylation specificity factor)*

Masterarbeit M. Schmidt (2018): Rekombinante Darstellung und Charakterisierung von CstF-Komplexen

Dissertation C. Tüting (2020): Strukturelle und funktionelle Analyse des mRNA-3'-Prozessierungs-Komplexes

Dissertation P. Schäfer (2020): Darstellung und Charakterisierung der humanen 3'-Prozessierungsfaktoren mPSF und CF II

Dissertation F. Kluge (2023): Rekonstitution und funktionelle Analyse des 3'-Prä-mRNA-Prozessierungskomplexes

7.3 Internetquellen

- [1] **ThermoFisher (2020):** Growth and maintenance of insect cell lines, Catalog Numbers B82101, B82501, and B85502, Publication Number MAN0000030, Revision C.0
https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/Insect_Cell_Lines_UG.pdf
(Zugriff: 8.12.2023)
- [2] **Biorad (2011):** TC20™ Automated Cell Counter Instruction Manual, Catalog #145-0101
<https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10024423.pdf>
(Zugriff: 8.12.2023)
- [3] **ThermoFischer (2017):** Cellfectin II Reagent, Cellfectin II Transfection Protocol., Publication number MAN0007821, Revision 2.0
https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0007821_Cellfectin_II_Reagent_UG.pdf
(Zugriff: 8.12.2023)
- [4] **Promega (2023):** FuGENE® HD Transfection Reagent, Instructions for Use of Products, E2311 and E2312
<https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/fugene-hd-transfection-reagent.pdf?rev=305b92ac829b42579f3fe81932285a8e&la=en>
(Zugriff: 8.12.2023)
- [5] **NEB (2023):** SNAP-Surface® 549, Labeling Proteins in vitro (S9112), Protocol
<https://www.neb.com/en/protocols/0001/01/01/labeling-proteins-in-vitro-s9112>
(Zugriff: 10.12.2023)

8 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

8.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Vergleich der 3'-Prozessierungsfaktoren aus dem Menschen und der Bäckerhefe (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	8
Tabelle 2.1: Zusammenfassung der apparenten K_{50} -Werte der 3'-Prozessierungsfaktoren aus Filterbindungsexperimenten	50
Tabelle 5.1: DNA-Sequenzen der Transkriptionsvorlagen	120

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der 3'-Prozessierungsreaktion in Metazoa	2
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des humanen 3'-Prozessierungskomplexes	4
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Domänen der CPSF-Untereinheiten	10
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Domänen von CstF	12
Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Domänen von CF I	13
Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der Domänen von CF II	14
Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der Domänen von RBBP6	16
Abbildung 1.8: Veränderung des Phosphorylierungsstatus der CTD während der Transkription	17
Abbildung 2.1: Finaler Reinigungsschritt von mCF3 und mCF4	22
Abbildung 2.2: RBBP6 Nickel-NTA Fraktionen aktivieren Proteinmix	25
Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der C-terminalen RBBP6 Verkürzungen	27
Abbildung 2.4: Resource Q-Reinigungen von RBBP6 ₁₋₃₄₀ und RBBP6 ₁₋₇₈₀	28
Abbildung 2.5: N-terminale RBBP6-Fragmente erlauben die Rekonstitution der Prä-mRNA-Spaltung	29
Abbildung 2.6: Titration weiterer C-terminaler RBBP6-Verkürzungen	31
Abbildung 2.7: DWNN und <i>zinc knuckle</i> von RBBP6 sind essentiell für die Spaltung von Prä-mRNAs	35
Abbildung 2.8: Rekonstitution der Spaltreaktion der 3'-Prozessierung von Vorläufer-mRNAs	38
Abbildung 2.9: CF I ist kein essentieller 3'-Prozessierungsfaktor	39
Abbildung 2.10: mCF3 und mCF4 sind aktiv in der Spaltung der 3'-Prozessierung	40
Abbildung 2.11: CstF64 und CstF64 τ sind aktiv in der 3'-Prozessierung	43

Abbildung 2.12: Einzelkomponenten- und Proteinmix Titration	45
Abbildung 2.13: Essentielle 3'-Prozessierungsfaktoren binden Substrat-RNA mit hoher Affinität	47
Abbildung 2.14: Putative 3'-Prozessierungsfaktoren stimulieren die Prä-mRNA-Spaltung nicht	51
Abbildung 2.15: In Sf21-Zellen produzierte CTD besitzt Phosphorylierungen	53
Abbildung 2.16: Proteinmix spaltet die HMOX-1-Prä-mRNA, aber nicht andere zelluläre mRNA-Vorläufer	56
Abbildung 2.17: Intrinsisch ungeordnete Bereiche der 3'-Prozessierungsfaktoren	60
Abbildung 2.18: <i>Crowder</i> -abhängige Präzipitation von RNA und Proteinen	61
Abbildung 2.19: mPSF und CstF verursachen die Präzipitation der 3'-Prozessierungsfaktoren	64
Abbildung 2.20: mPSF, CF II und eine lange RBBP6-Variante präzipitieren auch als einzelne Proteine	66
Abbildung 2.21: Flussdiagramm der Reversibilitätsexperimente	67
Abbildung 2.22: Präzipitierte Proteine werden erst bei hoher Salzkonzentration wieder löslich	68
Abbildung 2.23: In WDR33 ist nur die WD40-Domäne essentiell für die Spaltung von prä-mRNAs	71
Abbildung 2.24: Ein Proteinmix ohne IDRs präzipitiert selbst bei erhöhten Konzentrationen nicht.	73
Abbildung 2.25: WDR33 E zeigt Phasentrennung, der Spaltkomplex nicht	76
Abbildung 2.26: Ko-Lokalisation von mPSF, RBBP6 und Substrat-RNA in Präzipitaten	78
Abbildung 2.27: Präzipitate mit GFP-CstF besitzen ähnliche Fluoreszenzrückkehr wie WDR33 E	81
Abbildung 2.28: Präparationen von mPSFΔhFip1, mPSFΔCPSF4, hFip und hFip1 Isoform 4	84
Abbildung 2.29: hFip1 und CPSF4 sind nicht essentiell für die 3'-Prozessierung von prä-mRNAs	85
Abbildung 2.30: mPSF ohne hFip1 ist aktiv in der Polyadenylierung	88
Abbildung 4.1: Modell des rekonstituierten Spaltkomplexes in Säugetieren	108
Abbildung 6.1: Schematische Darstellung zur Erstellung von MultiBac-Transfervektoren	129
Abbildung 6.2: Schematische Darstellung der Erzeugung eines Bacmid	131

Abbildung 9.1: Sequenzvergleich des N-Terminus von RBBP6 zwischen dem humanen und dem Bäckerhefe Protein Mpe1	VII
Abbildung 9.2: Heterogenität der Spaltprodukte	VIII
Abbildung 9.3: ResourceQ-Reinigungen von RBBP6 ₁₋₃₄₀ und RBBP6 ₁₋₇₈₀	X
Abbildung 9.4: Titrationen einzelner PM-Komponenten zeigen bei niedriger Konzentration bereits Sättigung der Spaltaktivität	XI
Abbildung 9.5: CF I ist abhängig vom Sequenzmotiv UGUA	XII
Abbildung 9.6: Filterbindungsexperimente von CF I auf L3pre V2 und UGUA-Mutanten	XII
Abbildung 9.7: Western-Blot Analyse der unterschiedlichen CstF Präparationen	XIII
Abbildung 9.8: Proteinmix spaltet die HMOX-1-Prä-mRNA, aber nicht andere zelluläre mRNA-Vorläufer	XIV
Abbildung 9.9: In WDR33 ist für die Polyadenylierung von prä-mRNAs nur die WD40-Domäne essentiell	XV
Abbildung 9.10: PM -IDR ist spaltaktiv auf SV40late auf GAPDH aber nicht	XVI
Abbildung 9.11: WDR33 E zeigt <i>liquid droplet</i> Verhalten und zeigt Ansätze zum Übergang zu <i>solid-states</i>	XVII
Abbildung 9.12: mPSF ohne hFip1 ist aktiv in der Polyadenylierung und kann mit hFip1 Isoform4 komplementiert werden	XVIII

8.3 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
A	ATP
AEBSF	4-(2-Aminoethyl) benzensulfonylfluorid
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARCA Cap Analog	<i>anti-reverse cap analog</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BIK	<i>Bcl-2 Interacting Killer</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Cytosin
CDKs	Cyclin-abhängige Kinasen
CF I	<i>Cleavage factor I</i>

CF IA	<i>Cleavage factor IA</i> (aus Hefe)
CF IB	<i>Cleavage factor IB</i> (aus Hefe)
CF II	<i>Cleavage factor II</i>
CID	CTD-Interaktionsdomane von PCF11
CIP	<i>Calf intestinal phosphatase</i>
CK	Kreatinkinase
CPF	<i>cleavage and polyadenylation factor</i> (aus Hefe)
CPSF	<i>cleavage and polyadenylation specificity factor</i>
CstF	<i>cleavage stimulation factor</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus (von Proteinen)
CTD	C-terminale Domane
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol
DSE	<i>Downstream element</i>
DWNN	<i>domain with no name</i>
FUS	<i>fused in sarcoma</i>
G	Guanin
GFP	grünfluoreszierendes Protein
hFip1	<i>human factor interacting with PAP 1</i>
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMOX1	Häm-Oxygenase-1
IDR	<i>intrinsic disordered region</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i> (-Medium)
LLPS	<i>Liquid-liquid phase separation</i> / Phasentrennung

M	Molar (mol/l)
m7GpppN	7-Methylguanosin-cap
M β L (-Familie)	Metallo- β -Laktamase (-Familie)
mCF	<i>mammalian cleavage factor</i>
min	Minuten
MDa	Mega-Dalton
mPSF	<i>mammalian polyadenylation specificity factor</i>
mRNA	messenger RNA
mRNP	<i>messenger</i> Ribonukleoproteinpertikel
MUT	Mutante
Ni-NTA	Nickel-Nitriloessigsäure
nt	Nukleotide
NTD	N-terminale Domäne
N-Terminus	Amino-Terminus (von Proteinen)
NXT	Hela Kernextrakt (nicht dialysiert)
PABPN1	<i>poly(A) binding protein nuclear 1</i>
PAP	Poly(A)-Polymerase
PEG	Polyethylenglykol
PM (STD/EW)	Standard Proteinmix dieser Arbeit/ Wahle Labor
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP1	Proteinphosphatase 1
Prä-mRNA	mRNA-Vorläufer
PVA	Polyvinylalkohol
RBBP6	<i>Retinoblastoma-binding protein 6</i>
RING	<i>really interesting new gene</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNA Pol II	RNA Polymerase II
rRNA	Ribosomale-RNA
RRM	<i>RNA recognition motif</i>
SB-Medium	<i>Super Broth-medium</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat

(SDS-) PAGE	(SDS-) Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sf21	Zelllinie aus <i>Spodoptera frugiperda</i>
snRNA	<i>small nuclear ribonucleic acid</i>
snoRNA	<i>small nucleolar ribonucleic acid</i>
SOC	<i>super optimal broth</i> -Medium mit 20 mM Glukose
T4-PNK	T4-Polynukleotidkinase
TBE-Lösung	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TEA	Triethanolamin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMAO	Trimethylaminoxid
Tris (-Base)	Trishydroxymethylaminomethan
Tris-HCl	Tris-Lösung, pH mit HCl eingestellt
tRNA	Transfer-RNA
TY	tryptone yeast (-Medium)
U	Uracil
u.a.	und andere
USE	upstream auxiliary element
UTP	Uridintriphosphat
UTR	nicht-translatierte Region
WT	Wildtyp
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Masse pro Volumen
WDR33	WD- <i>repeat protein</i> 33
xg	Einheit für Schwerbeschleunigung
ZF	Zinkfinger Motiv
ZK	CCHC-Zink-Knochen-Motiv

9 Anhang

9.1 Zusätzliche Abbildungen

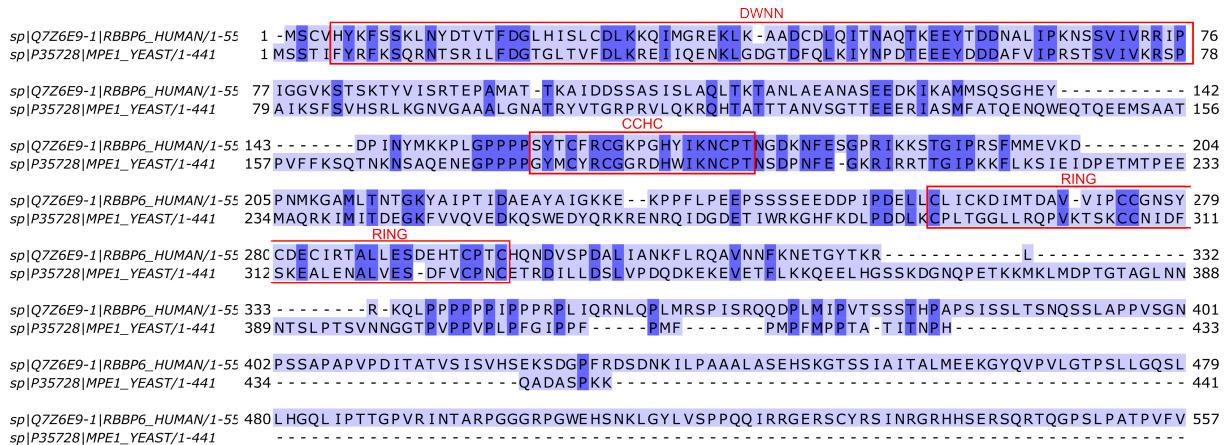


Abbildung 9.1: Sequenzvergleich des N-Terminus von RBBP6 zwischen dem humanen und dem Bäckerhefe Protein Mpe1

Dargestellt ist der Aminosäure-Sequenzvergleich des N-Terminus von RBBP6 und dem Homolog aus Hefe Mpe1. Identische Aminosäuren dunkelblau unterlegt. Die drei strukturierten Domänen DWNN, CCHC zinc knuckle und RING-Finger sind rot umrandet. Erstellt mit Jalview.

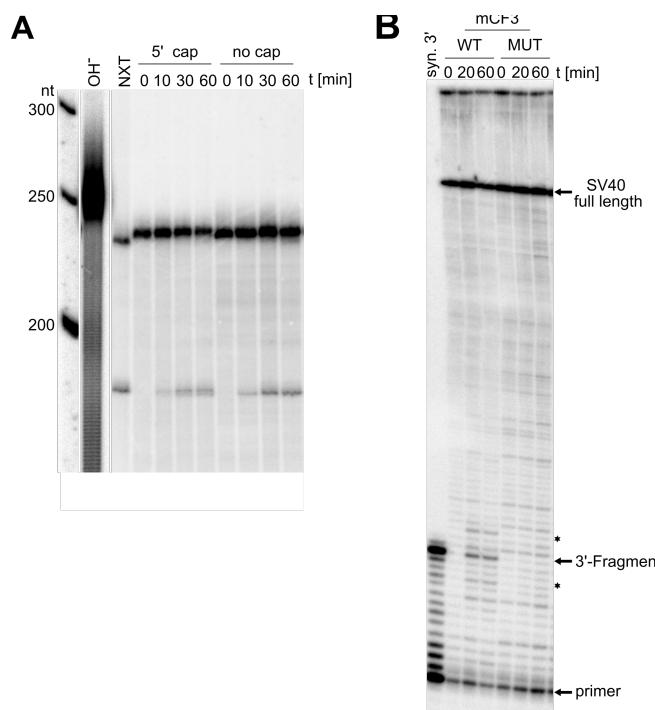
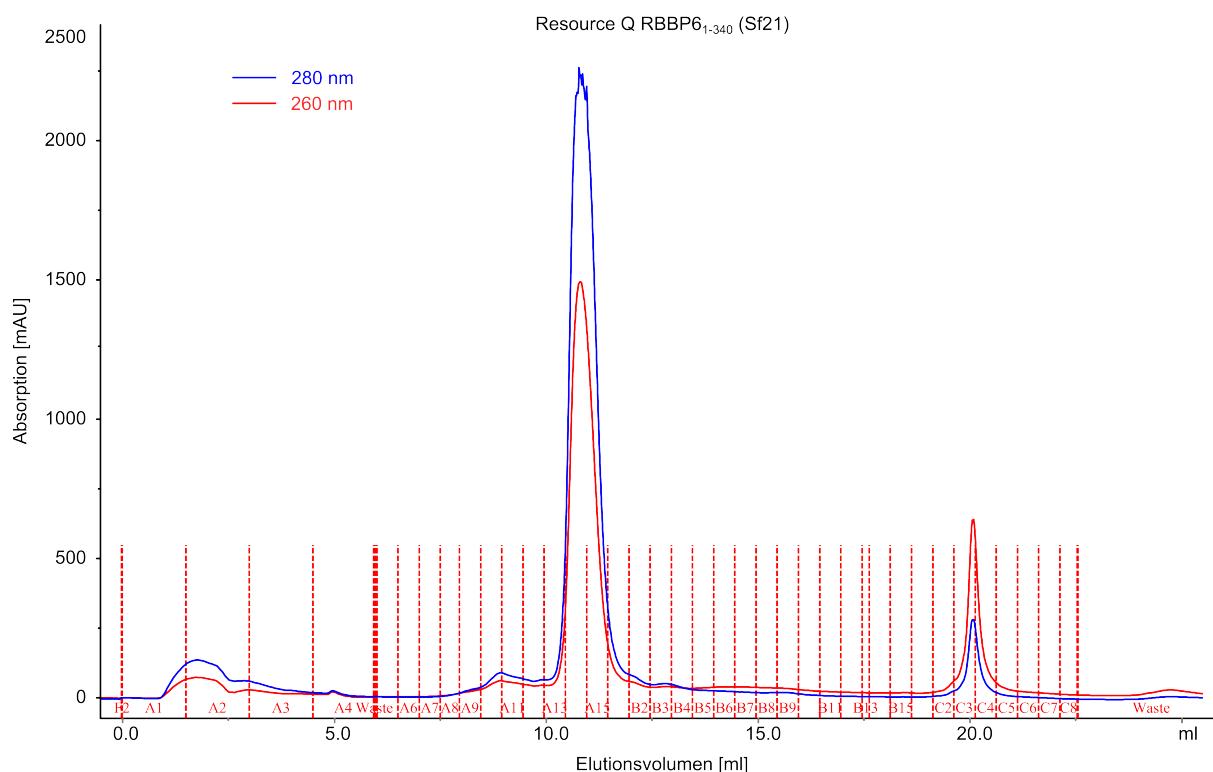
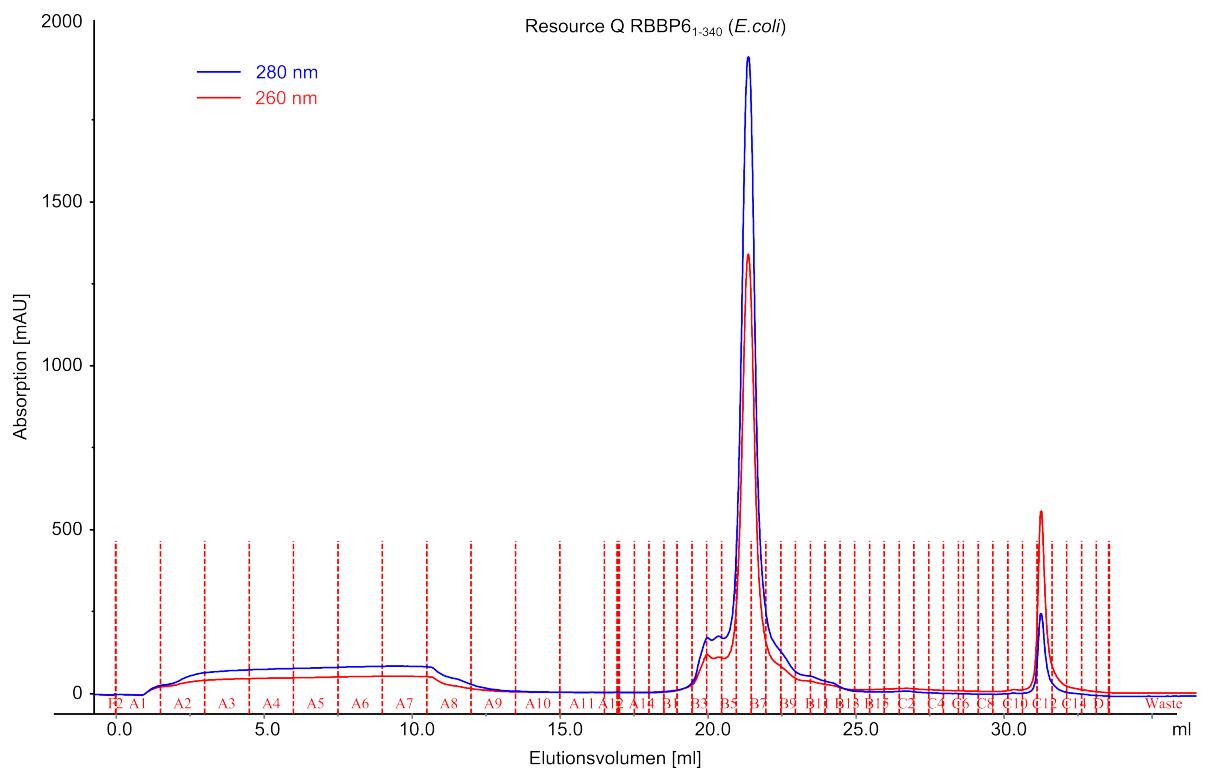


Abbildung 9.2 Heterogenität der Spaltprodukte

(A) Vergleich der Spaltkinetik mit einer SV40/late Substrat-RNA mit und ohne 5'-Cap-Struktur. HeLa-Kernextrakt (NXT) diente als Positivkontrolle und eine partiell hydrolysierte RNA (5'-markiert; OH-) als Demonstration zur Auflösung einzelner Nukleotide. Experiment von Florian Kluge. **(B)** Spaltkinetik zur Analyse des 3'-Spaltfragments. Die Reaktionen wurden entweder mit einer Wildtyp (WT) oder mutiertem (MUT) mCF3-Präparation und unmarkierter Substrat-RNA durchgeführt. Zum Vergleich des 3'-Fragments ist ein synthetisches Fragment geladen worden. Die Spaltung wurde mit Hilfe einer primer extension Reaktion dargestellt. Experiment von Florian Kluge.



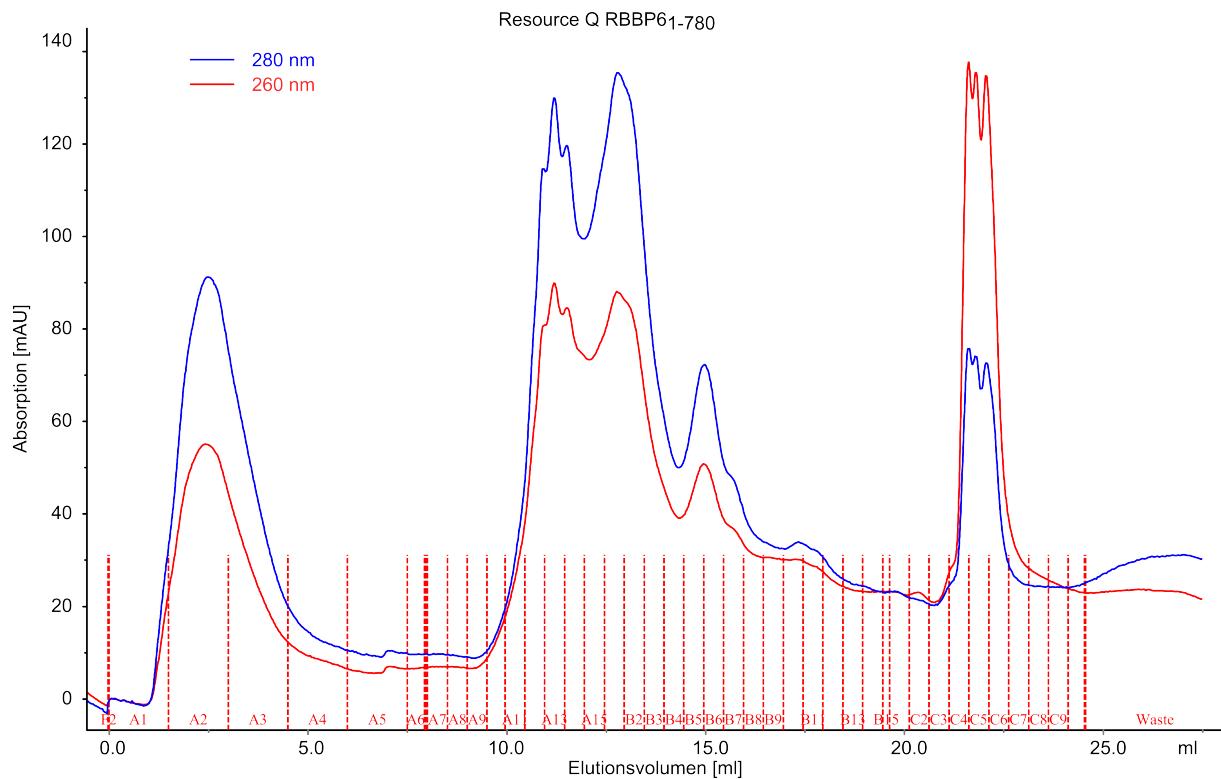


Abbildung 9.3: ResourceQ-Reinigungen von RBBP6₁₋₃₄₀ und RBBP6₁₋₇₈₀

Gezeigt sind die Chromatogramme der Resouce Q Anionenaustauschchromatographien von RBBP6₁₋₃₄₀ aus *E. coli* und Sf21-Zellen sowie RBBP6₁₋₇₈₀. Die Anionenaustauschchromatographie stellte den zweiten und letzten Schritt der Reinigungen aller RBBP6-Varianten dar. Die Absorption in mAU wurde für eine Wellenlänge von 280 nm in blau und für eine Wellenlänge von 260 nm in rot abgebildet.

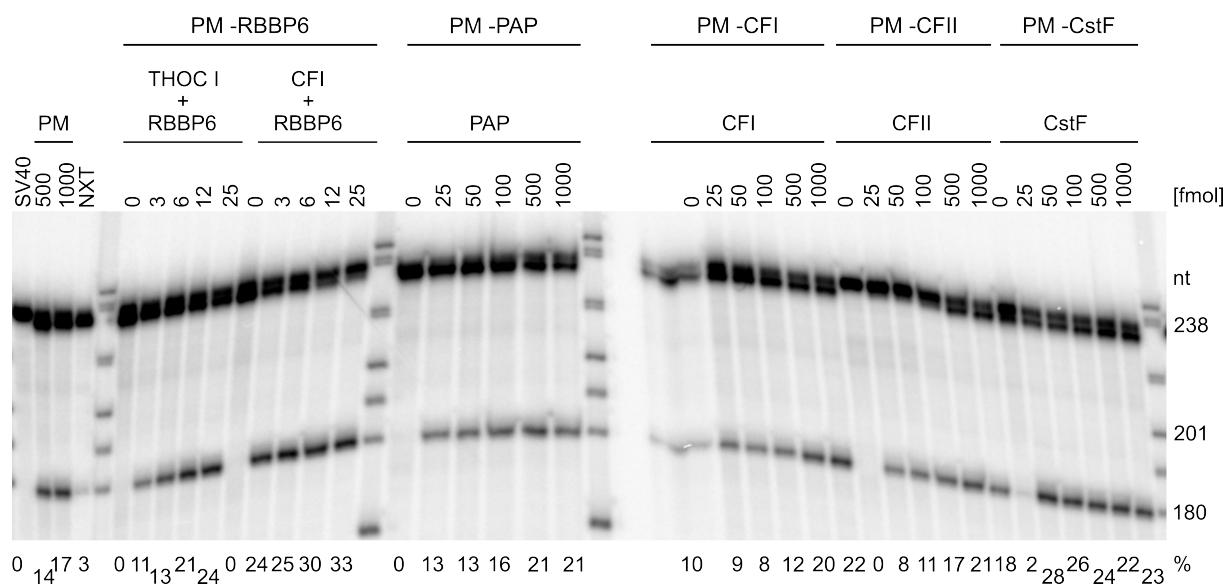


Abbildung 9.4: Titrationen einzelner PM-Komponenten zeigen bei niedriger Konzentration bereits Sättigung der Spaltaktivität

Spaltanalyse der Titration von 3'-Prozessierungsfaktoren (außer mPSF und mCF3) auf SV40/late, dargestellt in einem Autoradiogramm einer 6%igen denaturierenden PAGE. Für RBBP6 sind die ko-exprimierten Präparationen mit ThoCl und CF I verwendet worden. Der Proteinmix (PM) ist konstant bei 1000 fmol und beinhaltet neben den kanonischen Komponenten 100 fmol CTD, die Ni-NTA-Fraktion der ko-gereinigten RBBP6-Variante mit ThoCl (ca. 20 fmol) und 100 ng Kreatinkinase. Als Kontrollen wurden zwei verschiedene Mengen des vollständigen Proteinmixes (PM; 500 und 1000 fmol) sowie HeLa-Kernextrakt (NXT) verwendet worden. Die Größen der Markerbanden sind rechts aufgeführt. Die Spalteffizienz ist unterhalb des Autoradiogramms angegeben.

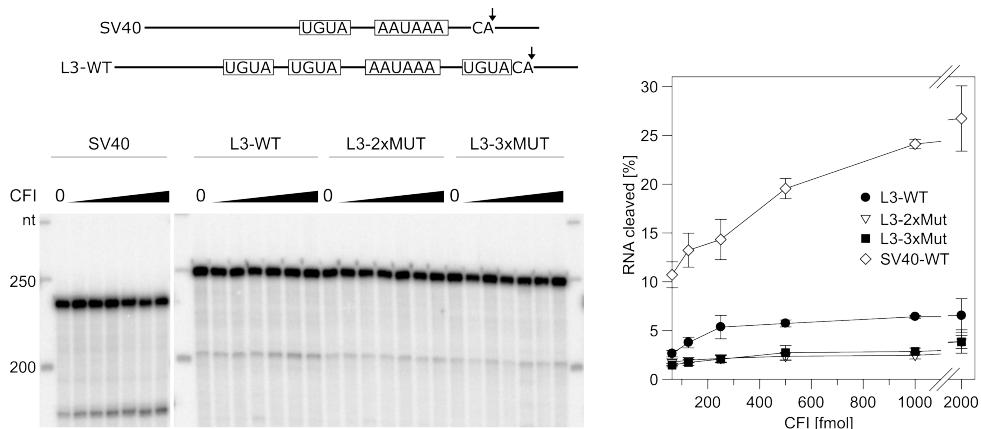


Abbildung 9.5: CF I ist abhängig vom Sequenzmotiv UGUA

Analyse von CF I Titrationen mit unterschiedlichen Substrat-RNAs, dargestellt in einem Autoradiogramm einer 6%igen PAGE. Als Substrat-RNAs wurden SV40late, L3 WT und zwei in den UGUA-Bindungsstellen mutierten L3-Varianten verwendet. Die Punktmutationen führen zu einem G nach C (UcUA) Basenaustausch und 2x bzw. 3x MUT gibt die Anzahl der mutierten Bindungssequenzen an. CF I wurde von 0 bis 2000 fmol titriert. Die Quantifizierung der Reaktion ist rechts graphisch dargestellt.

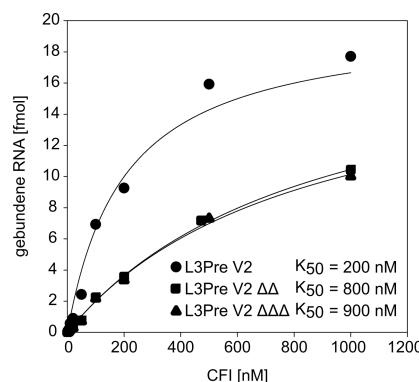


Abbildung 9.6: Filterbindungsexperimente von CF I auf L3pre V2 und UGUA-Mutanten

Filterbindungsexperiment von CF I mit L3Pre V2 (●) sowie den UGUA-Mutanten. Die Mutante mit zwei mutierten UGUA-Bindungsmotiven ist mit ΔΔ (■) und die Dreifach Mutante mit ΔΔΔ (▲) gekennzeichnet. Die Stoffmenge der RNAs wurde auf 20 fmol (0,5 nM) erhöht. Die ermittelten Bindungsaaffinitäten (K₅₀) sind im Graphen angegeben.

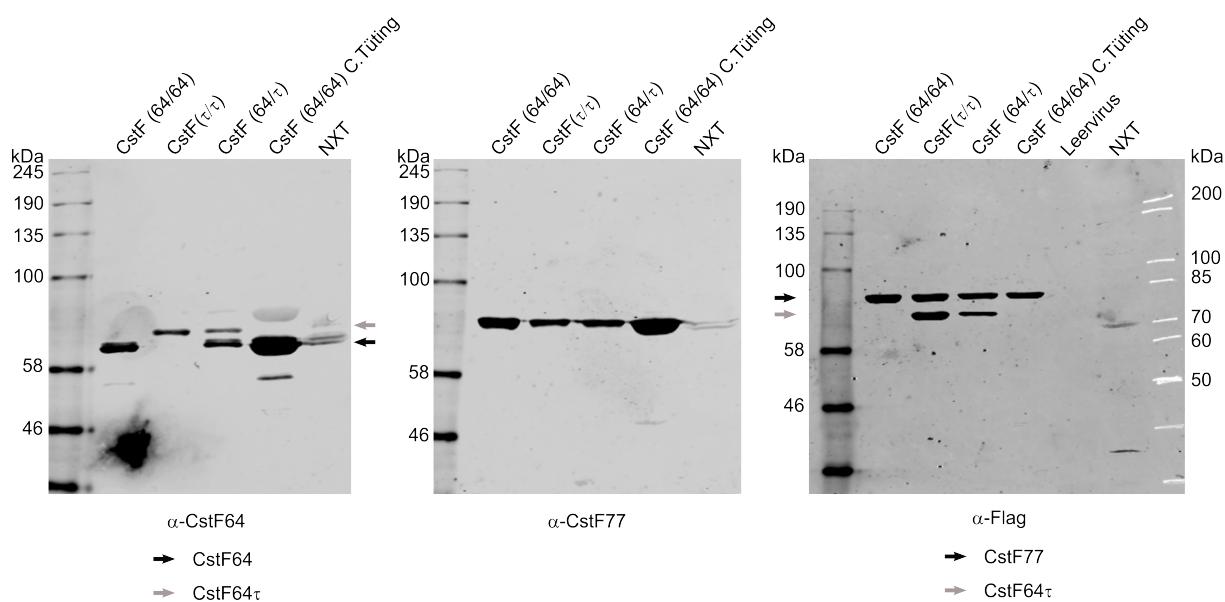


Abbildung 9.7: Western-Blot Analyse der unterschiedlichen CstF Präparationen

Analyse der CstF (64/64), (τ/τ) und (64/ τ) in einem Fluoreszenz-Western. CstF77 bzw. CstF64 sind mit einem schwarzen und CstF64 τ mit einem grauen Pfeil markiert. Die Inkubation mit dem primären α -Flag Antikörper (Sigma) wurde nach der Inkubation mit α -CstF77 (Abnova) und dem Strippen der Membran durchgeführt. Die Molekulargewichte der Markerproteine sind links bzw. rechts der Membran angegeben. Als sekundärer Antikörper wurde ein α -Maus (Detektion bei 800 nm) verwendet.

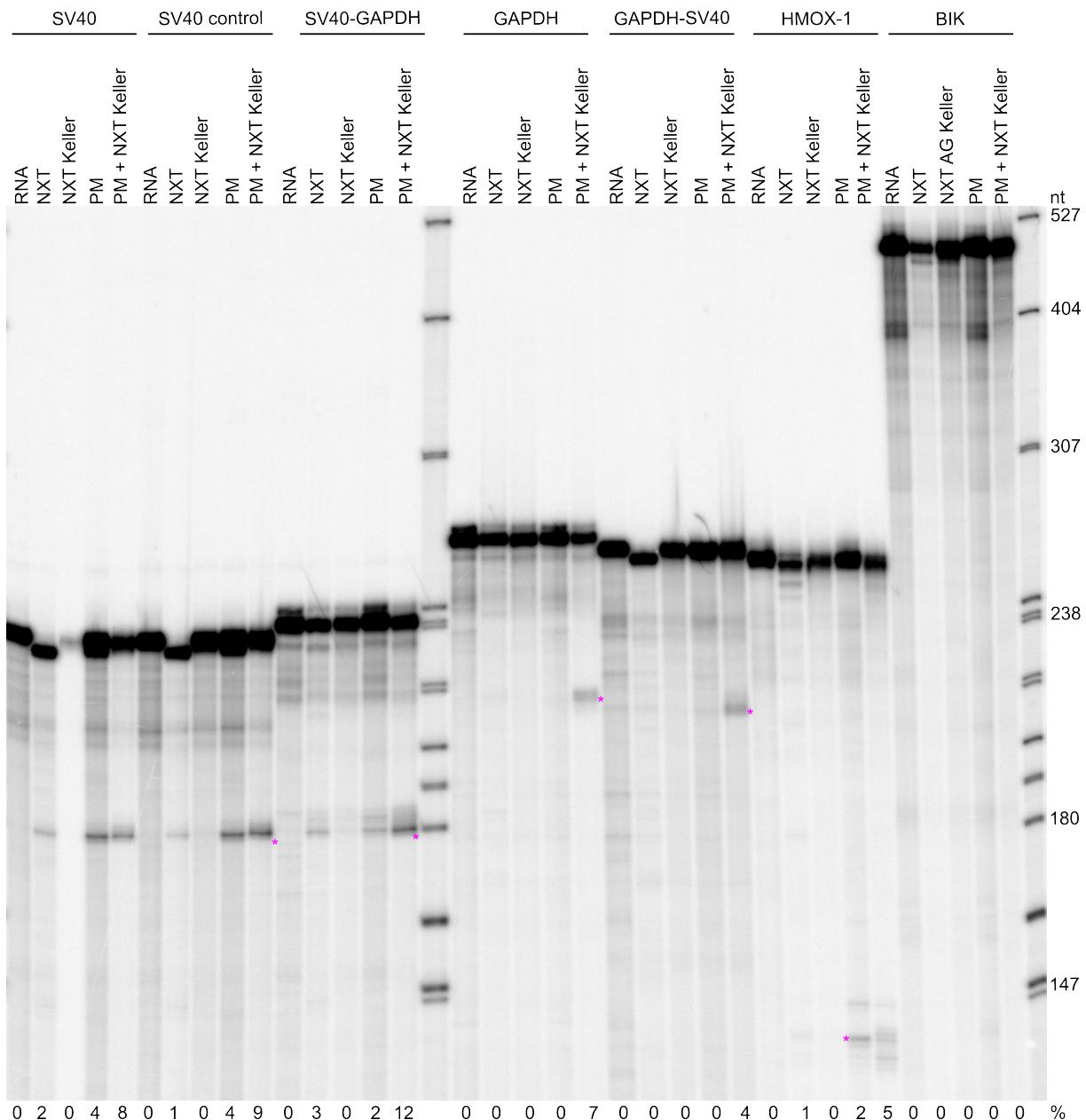


Abbildung 9.8: Proteinmix spaltet die HMOX-1-Prä-mRNA, aber nicht andere zelluläre mRNA-Vorläufer

Analysen der Spaltaktivität des Standard-Proteinmixes (PM) auf verschiedenen Substrat-RNAs. Die RNAs wurden auf einem 5%igen PA-Harnstoff-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert. Neben der viralen SV40late RNA wurde eine SV40late Kontrolle (s. Haupttext), GAPDH-3'-UTR, zwei chimäre RNAs aus SV40 und GAPDH, HMOX1 und BIK als Substrate verwendet. Als Kontrollen wurde ein kommerzieller HeLa-Kernextrakt (NXT; Ipracell) und ein weiterer NXT (NXT Keller; Präparation 4.5.01) von der AG Keller (Basel) verwendet. Zusätzlich wurde in der jeweils letzten Spur der verschiedenen Substrat-RNAs eine Komplementation aus PM und dem NXT Keller verwendet. Die 5'-Spaltprodukte sind mit einem Stern gekennzeichnet. In diesem Experiment wurde TMAO als *crowding*-Reagenz verwendet. Die Größen der Markerbanden sind rechts aufgeführt.

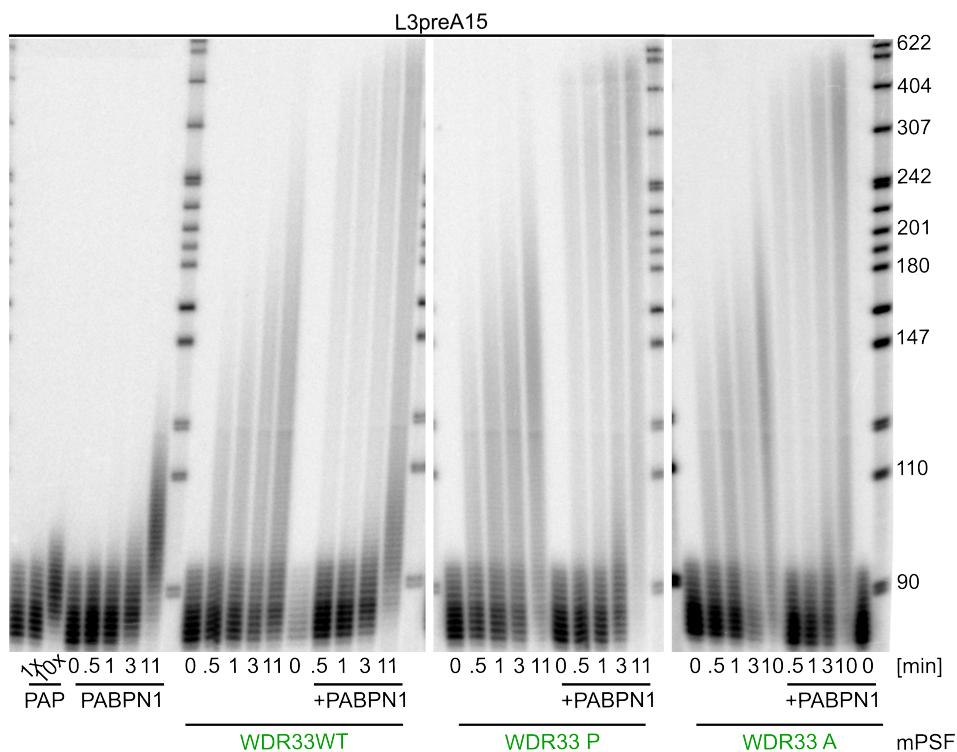


Abbildung 9.9: In WDR33 ist für die Polyadenylierung von prä-mRNAs nur die WD40-Domäne essentiell

Darstellung der Polyadenylierungskinetik von drei GFP-mPSF-Präparationen mit unterschiedlichem WDR33 (WT, P, A) in An- und Abwesenheit von PABPN1 in einem Autoradiogramm einer 8%igen PA-Harnstoff-PAGE. Die Kinetik wurde zwischen 0 und 10 bzw. 11 Minuten durchgeführt. Als Substrat-RNA wurden 4 nM L3preA15, mPSF in äquimolaren Mengen (4 nM), 0,2 nM PAP (1x), und 50 nM PABPN1 eingesetzt. Die 10x PAP Reaktion wurden mit 2 nM PAP durchgeführt. Mit Ausnahme der RNA allein und 10x PAP wurden die Reaktionen mit 0,2 nM PAP (1x PAP) für 11 Minuten inkubiert. GFP-markierte Proteine sind in grün dargestellt. Die Kinetik mit der mPSF-Präparation, welche WDR33 A enthält stammt von einer separaten Reaktion. Die Größen der Markerbanden sind rechts aufgeführt.

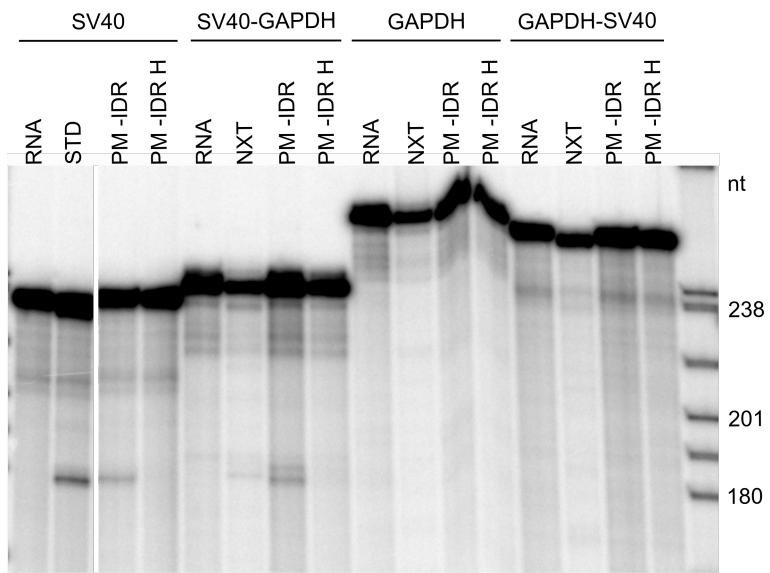


Abbildung 9.10: PM -IDR ist spaltaktiv auf SV40/late auf GAPDH aber nicht

Autoradiogramm einer 6%igen PA-Harnstoff-PAGE zur Analyse des Proteinmixes ohne intrinsisch ungeordnete Regionen auf SV40/late und GAPDH sowie den zwei chimeren RNAs. Dabei wurden Standardkonzentrationen (-IDR) oder Konzentrationen aus Boreikaite et al., 2022 (-IDR H) verwendet. Als Kontrolle diente der kanonische Proteinmix (PM). Die Größen der Markerbanden sind rechts angegeben.

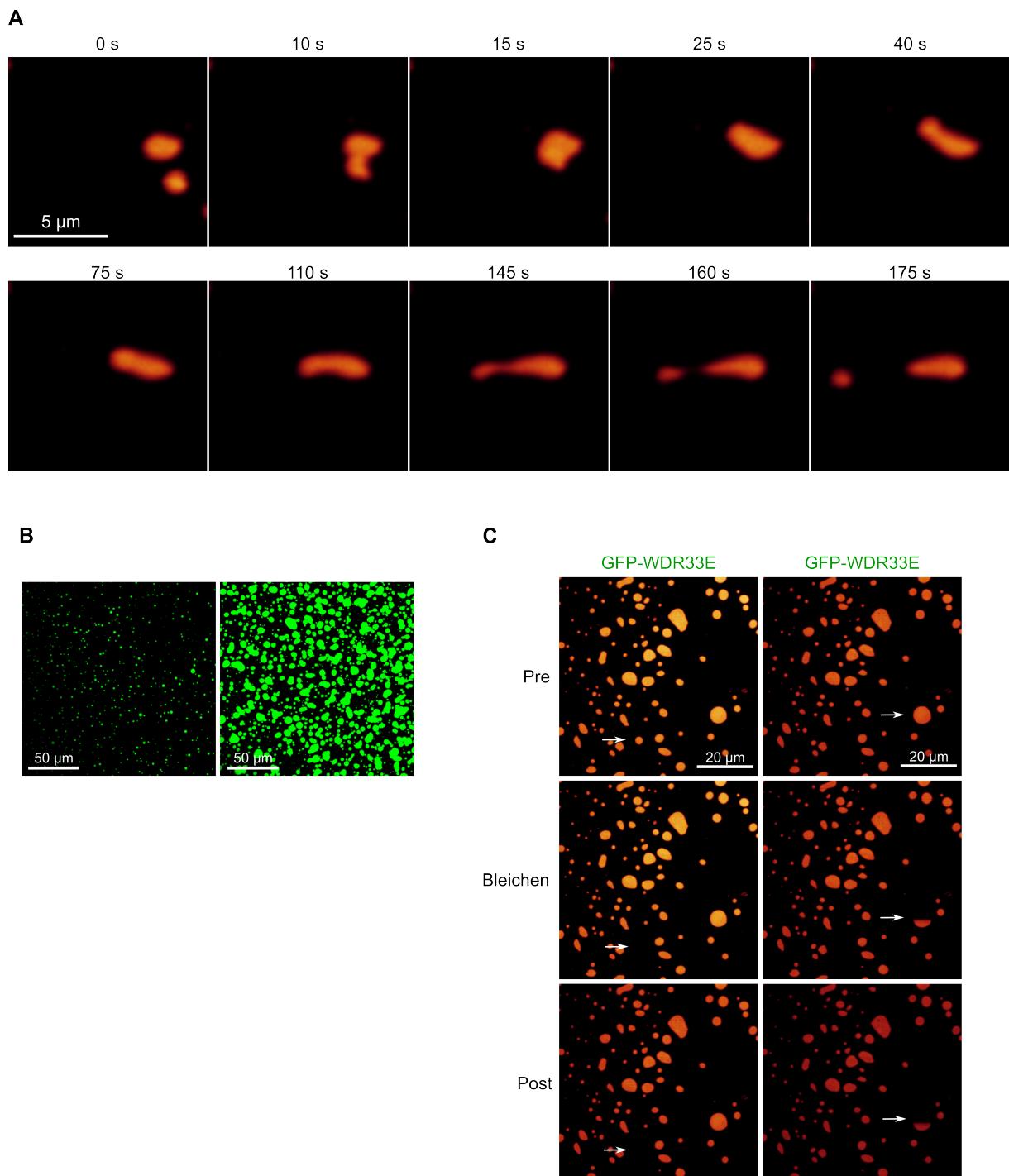


Abbildung 9.11: WDR33 E zeigt *liquid droplet* Verhalten und Ansätze zum Übergang zu *solid-states*

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von WDR33 E in TMAO-haltigen Spaltpuffer (2,5 μ M). (A) Zeitliche Abfolge einer reversiblen *liquid droplet* Fusion. GFP ist in der Falschfarbe rot dargestellt. (B) Vergleich zweier WDR33 E Reaktionen zu unterschiedlichen Zeitpunkten (10 min (links) vs. > 1 h (rechts)). (C) FRAP- (links) und *half* FRAP (rechts)-Experimente von WDR33 E nach ca. 30 Minuten Reaktionszeit, dargestellt in der Falschfarbe rot. Die gebleichte Stelle ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

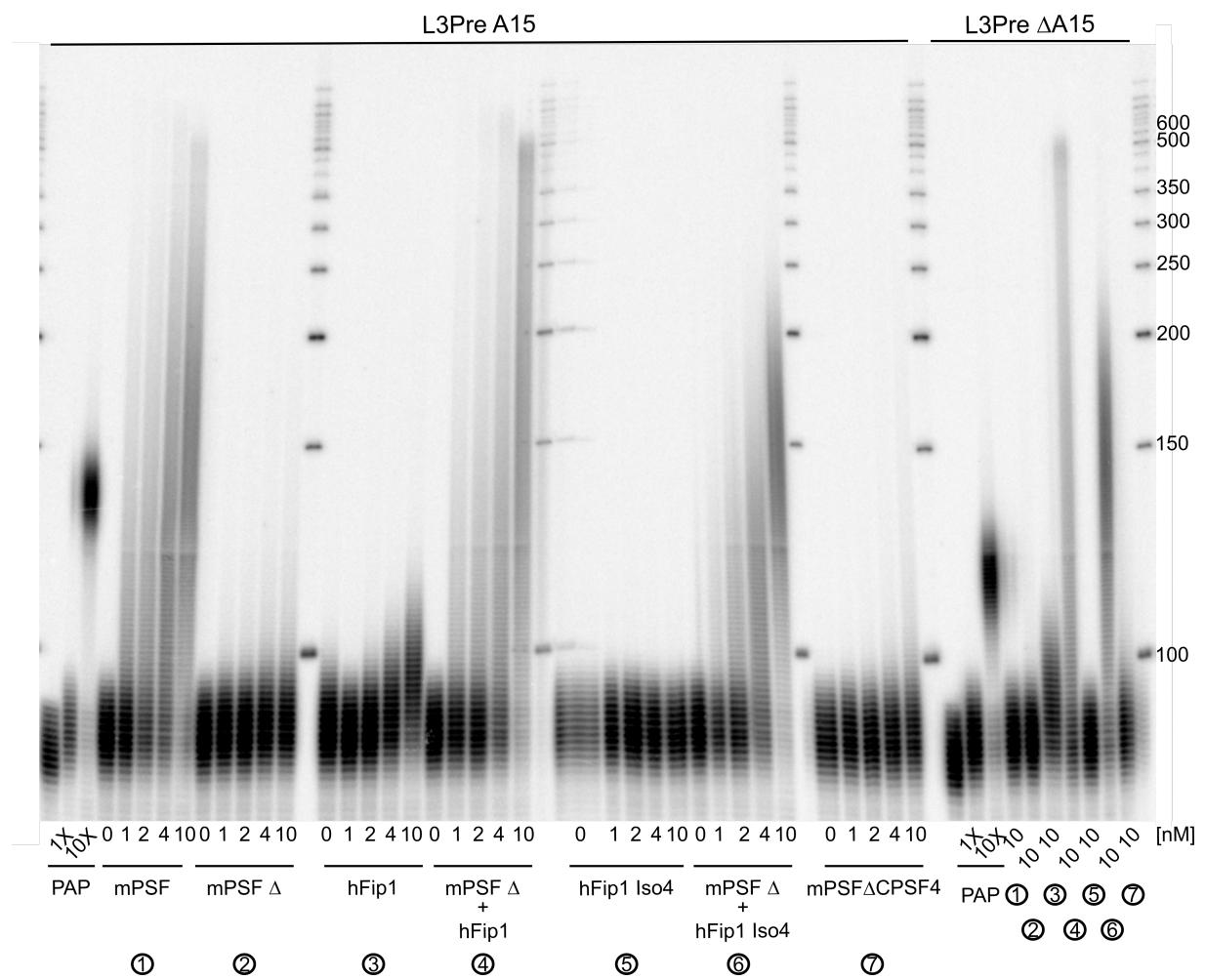


Abbildung 9.12: mPSF ohne hFip1 ist aktiv in der Polyadenylierung und kann mit hFip1 Isoform4 komplementiert werden

Analyse einer Titration (0-10 nM) verschiedener mPSF-Präparationen in einem Polyadenylierungsassay, dargestellt in einem Autoradiogramm einer 8%igen denaturierenden PAGE. Als Substrat-RNA wurden 4 nM L3preA15, 0,2 nM PAP (1x) eingesetzt. Die 10x PAP Reaktion wurde mit 2 nM PAP durchgeführt. Mit Ausnahme der RNA allein und 10x PAP, wurden die Reaktionen mit 0,2 nM PAP (1x PAP) für 11 Minuten inkubiert.

9.2 Curriculum vitae

Persönliche Daten

Moritz Schmidt; M. Sc.
06110 Halle (Saale)

Berufliche Erfahrung

- 04/2018 – 02/2023 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**
Promotion
- *Abteilung:* allgemeine Biochemie (Prof. Dr. Elmar Wahle)
 - *Aufgaben:* Anfertigung einer Promotionsarbeit zur Rekonstitution der 3'-Prozessierung von Prä-mRNAs; Betreuung von Lehrpraktika (Bachelor und Master), Arbeiten mit radioaktiven Isotopen (β -Strahlern ^{32}P , ^{35}S)
- 08/2016 – 11/2016 Wissenschaftliche Hilfskraft**
- *Abteilung:* allgemeine Biochemie (Prof. Dr. Elmar Wahle)
 - *Aufgaben:* verschiedene Klonierungen, Proteinexpression- und Reinigungen

Ausbildung und Schule

- 10.2015 – 02.2018 Masterstudium Biochemie,
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**
- *Abschluss:* Master of Science, Note: 1,5
 - *Schwerpunkte:* Nukleinsäurebiochemie, Bioorganik/Enzymologie, Molekulare Medizin
- 10.2012 – 09.2015 Bachelorstudium Biochemie,
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**
- *Abschluss:* Bachelor of Science, Note: 2,9
- 08.2003 – 06.2012 Erftgymnasium Bergheim**
- *Abschluss:* Abitur

Fort- und Weiterbildung

- 03. – 08. 2023 ATV Life Science Management**
- Zusatzqualifikation für eine Karriere in der pharmazeutischen Industrie und der Biotechnologie
 - Inhalt: u. a. QM/ QS in der Life Science Industrie; Projektmanagement; Klinische Studien; Regulatory Affairs; Biotechnologie; Team und Führungstraining
- 07.2022 GMP-Grundlagenkurs**
- *Anbieter:* Dipl. Biol. Thomas Beer
 - *Inhalt:* Einführung in die GMP-Richtlinien

9.3 Publikationen

- 02.2022 **Schmidt M, Kluge F, Sandmeir F, Kühn U, Schäfer P, Tüting C, Ihling C, Conti E, Wahle E.** Reconstitution of 3' end processing of mammalian pre-mRNA reveals a central role of RBBP6. *Genes Dev.* 2022 Feb 1;36(3-4):210-224. doi: 10.1101/gad.349223.121. Epub 2022 Feb 17.

9.4 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die eingereichte schriftliche Fassung der Arbeit entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Weiterhin versichere ich, dass die vorliegende Arbeit noch nicht als Abschlussarbeit an anderer Stelle eingereicht wurde.

Halle (Saale), 18.12.2023

Moritz Schmidt

9.5 Danksagung

Zu aller erst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Elmar Wahle für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, Betrauung des spannenden Themas der 3'-Prozessierung und die stetige Betreuung bedanken. Durch die konstruktiven Diskussionen und kritische Hinterfragen der Ergebnisse wurde diese Arbeit und die Publikation erst möglich gemacht.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Milton Stubbs und Prof. Sutapa Chakrabarti für die Erstellung des Zweit- und Drittgutachten bedanken.

Besonderer Dank gilt Dr. Uwe Kühn, der mich seit der Bachelorarbeit in dieser Arbeitsgruppe begleitet hat. Stetiger Rat sowie weitreichende und inspirierende Diskussionen sorgten stets für neuen Ansporn und lehrreiche Momente. Zusätzlich gilt ihm der Dank für die jahrelange fleißige Planung und Ausführung der Klonierungsarbeiten des gesamten 3'-Prozessierungs-themas, die so manche Last von meinen Schultern genommen hat.

Großer Dank gilt auch Dr. Nadine Bley für die Übernahme der Mikroskopie und der langen Stunden vor dem Mikroskop.

Natürlich möchte ich mich auch bei Anne-Katrin Hoffmeister für die fleißigen Stunden in der Zellkultur bedanken, um mir die Zeit und Konzentration für die anderen Experimente zu geben. Auch den anderen, ehemaligen Mitgliedern unserer AG möchte ich als letzter Doktorand meinen Dank für Diskussion, Rat und lustige Kaffeepausen aussprechen. Von diesen gilt es besonders Dr. Florian Kluge herauszuheben, durch den es als parallelen Mitstreiter dieser Arbeit ermöglicht wurde viele Bereiche der 3'-Prozessierung abzudecken und zu ergründen. Seine täglichen Motivationsreden hinterließen so manches Schmunzeln.

Zudem möchte ich Silke, meiner Schwiegermutter in spe, für das fleißige Korrekturlesen herzlichst danken.

Meiner Familie, meinen Freunden und dem KC Pin Ab gilt besonderer Dank. Sie haben mich immer unterstützt, motiviert und angespornt. Bei ihnen wusste ich immer, dass sie meinen Rücken freihalten werden. Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Freundin Marieke bedanken. Du hast mich täglich unterstützt und mir zum Glück den ein oder anderen Motivationsschub verpasst.