Biochemische und zellbiologische Untersuchungen zur Rolle der Cajal Bodies bei der Zusammenlagerung spleißosomaler U snRNP Partikel

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Georg-August-Universität zu Göttingen

> vorgelegt von Nina Schaffert aus Bad Hersfeld

Göttingen 2005

D7 Referent: Prof. Dr. Ralf Ficner Korreferent: Prof. Dr. Tomas Pieler Tag der mündlichen Prüfung: 26. April 2005

-MEINER FAMILIE-

I. INHALTSVERZEICHNIS

Ι.	INHALTSVERZEICHNIS	I
II.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
III.	TABELLENVERZEICHNIS	Х
1.	ZUSAMMENFASSUNG	1
2.	EINLEITUNG	3
2.1	Die Zusammensetzung des Spleißosoms	3
2.1.1	U snRNAs, die RNA-Komponenten des Spleißosoms	4
2.1.2	Die gemeinsame Proteine der U snRNP-Partikel	5
2.1.3	Die U snRNP-partikelspezifischen Proteine	6
2.1.4	Die nicht-U snRNP-Spleißfaktoren	8
2.2	Das eukaryontische Prä-mRNA Spleißen	8
2.2.1	Biochemie der Spleißreaktion	8
2.2.2	Die Assemblierung des Spleißosoms auf der Prä-mRNA	10
2.3	Das [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikel	13
2.3.1	[U4/U6.U5] tri-snRNP-spezifische Proteine	13
2.3.2	Die [U4/U5.U6] tri-snRNP-Assemblierung	15
2.4	Die zelluläre Biosynthese der U snRNP-Partikel	17
2.4.1	Reifung der Polymerase II-transkribierten Sm-Core U snRNAs	19
2.4.2	Reifung der Polymerase III-transkribierten U6 snRNA	20
2.5	Ziel der vorliegenden Arbeit	21
3.	MATERIAL UND METHODEN	23
3.1	Material	23
3.1.1	Chemikalien, Feinchemikalien und Medien	23
3.1.2	Antiseren und monoklonale Antikörper	24
3.1.3	Enzyme und Enzyminhibitoren	25
3.1.4	Nukleotide	25

3.1.5	DNA-Oligonukleotide	25
3.1.6	siRNA-Oligonukleotide	26
3.1.7	Plasmide	27
3.1.8	Zelllinien	28
3.1.9	Bakterienstämme	28
3.1.10	Allgemeine Puffer	28
3.1.11	Käufliche Reaktions-Sets (Kits)	28
3.1.12	Arbeitsmaterialien	29
3.1.13	Geräte	29
3.2	Methoden	30
3.2.1	Molekularbiologische Standardmethoden	30
3.2.1.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	30
3.2.1.2	Phenol-Chloroform-Isoamylextraktion	31
3.2.1.3	Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren	31
3.2.1.4	Denaturierende Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	32
3.2.1.5	Elektrotransformation von Plasmiden und deren Isolierung	32
3.2.1.6	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Plasmiden	33
3.2.1.7	Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden	33
3.2.1.8	Northern Blot Analyse	34
3.2.1.9	In vitro Transkription zur Herstellung radioaktiv markierter RNA	35
3.2.2	Proteinbiochemische Standardmethoden	36
3.2.2.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	36
3.2.2.2	Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	36
3.2.3	Immunologische Methoden	37
3.2.3.1	Affinitätsaufreinigung von Antikörpern	37
3.2.3.2	Immunoblot (Western Blot)	38
3.2.3.3	Immunpräzipitation	39
3.2.4	Zellkultur	40
3.2.4.1	Kultivierung von Bakterienzellen	40
3.2.4.2	Kultivierung von HeLa-Zellen	41

3.2.5	Mikroskopische Methoden	42				
3.2.5.1	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung					
3.2.5.2	Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)					
3.2.5.3	RNase-Verdau	44				
3.2.5.4	Fluoreszenzmikroskopie und deren Quantifizierung	45				
3.2.6	Spezielle Methoden	46				
3.2.6.1	RNA-Interferenz	46				
3.2.6.1.1	Design und Vorbereitung von siRNA-Oligonukleotiden	47				
3.2.6.1.2	Transfektion von siRNAs in HeLa Zellen	47				
3.2.6.1.3	Analyse des Zellwachstums nach RNAi-vermittelter					
	Proteindepletion	48				
3.2.6.1.4	Einbringen von siRNAs in HeLa Zellen durch Elektroporation	49				
3.2.6.2	Apoptose-Test (TUNEL-Test)	50				
3.2.6.3	Präparation von spleißaktiven HeLa "Mini"-Zellkernextrakten	51				
3.2.6.4	In vitro Prä-mRNA Spleißanalyse	52				
3.2.6.5	Analyse spleißosomaler Komplexe	53				
4.	ERGEBNISSE	54				
4 . 4.1	ERGEBNISSE Auswirkungen der Depletion des hPrp31- bzw. hPrp6-Proteins	54				
4. 4.1	ERGEBNISSE Auswirkungen der Depletion des hPrp31- bzw. hPrp6-Proteins durch RNA-Interferenz auf das Zellwachstum	54 54				
4.4.1.1	ERGEBNISSE Auswirkungen der Depletion des hPrp31- bzw. hPrp6-Proteins durch RNA-Interferenz auf das Zellwachstum hPrp31- und hPrp6-Proteine sind essentiell für das Zellwachstum	54 54 54				
 4. 4.1.1 4.1.2 	ERGEBNISSE Auswirkungen der Depletion des hPrp31- bzw. hPrp6-Proteins durch RNA-Interferenz auf das Zellwachstum hPrp31- und hPrp6-Proteine sind essentiell für das Zellwachstum Die Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins führt zur	54 54 54				
 4.1 4.1.1 4.1.2 	ERGEBNISSE Auswirkungen der Depletion des hPrp31- bzw. hPrp6-Proteins durch RNA-Interferenz auf das Zellwachstum hPrp31- und hPrp6-Proteine sind essentiell für das Zellwachstum Die Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins führt zur Apoptose	54 54 54 56				
 4. 4.1.1 4.1.2 4.1.3 	ERGEBNISSE Auswirkungen der Depletion des hPrp31- bzw. hPrp6-Proteins durch RNA-Interferenz auf das Zellwachstum hPrp31- und hPrp6-Proteine sind essentiell für das Zellwachstum Die Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins führt zur Apoptose Spezifische Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins <i>in vivo</i>	54 54 54 56 59				
 4.1 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.2 	ERGEBNISSE Auswirkungen der Depletion des hPrp31- bzw. hPrp6-Proteins durch RNA-Interferenz auf das Zellwachstum hPrp31- und hPrp6-Proteine sind essentiell für das Zellwachstum Die Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins führt zur Apoptose Spezifische Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins <i>in vivo</i>	54 54 54 56 59				
 4.1 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.2 	ERGEBNISSE Auswirkungen der Depletion des hPrp31- bzw. hPrp6-Proteins durch RNA-Interferenz auf das Zellwachstum hPrp31- und hPrp6-Proteine sind essentiell für das Zellwachstum Die Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins führt zur Apoptose Spezifische Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins <i>in vivo</i> Funktionelle Charakterisierung der Auswirkungen einer Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins auf die Integrität	54 54 54 56 59				
 4.1.1 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.2 	ERGEBNISSE Auswirkungen der Depletion des hPrp31- bzw. hPrp6-Proteins durch RNA-Interferenz auf das Zellwachstum hPrp31- und hPrp6-Proteine sind essentiell für das Zellwachstum Die Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins führt zur Apoptose Spezifische Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins <i>in viv</i> o Funktionelle Charakterisierung der Auswirkungen einer Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins auf die Integrität des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels	54 54 54 56 59 60				
 4.1.1 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.2 	ERGEBNISSE Auswirkungen der Depletion des hPrp31- bzw. hPrp6-Proteins durch RNA-Interferenz auf das Zellwachstum hPrp31- und hPrp6-Proteine sind essentiell für das Zellwachstum Die Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins führt zur Apoptose Spezifische Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins <i>in vivo</i> Funktionelle Charakterisierung der Auswirkungen einer Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins auf die Integrität des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels Die <i>in vivo</i> Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins	54 54 54 56 59 60				
 4.1 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.2 	ERGEBNISSE Auswirkungen der Depletion des hPrp31- bzw. hPrp6-Proteins durch RNA-Interferenz auf das Zellwachstum hPrp31- und hPrp6-Proteine sind essentiell für das Zellwachstum Die Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins führt zur Apoptose Spezifische Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins <i>in vivo</i> Funktionelle Charakterisierung der Auswirkungen einer Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins auf die Integrität des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels Die <i>in vivo</i> Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins	54 54 54 56 59 60 60				
 4.1 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.2 4.2.1 4.2.2 	ERGEBNISSEAuswirkungen der Depletion des hPrp31- bzw. hPrp6-Proteins durch RNA-Interferenz auf das ZellwachstumhPrp31- und hPrp6-Proteine sind essentiell für das ZellwachstumDie Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins führt zurApoptoseSpezifische Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins <i>in vivo</i> Funktionelle Charakterisierung der Auswirkungen einer Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins auf die Integrifät des [U4/U6.U5] tri-snRNP-PartikelsDie <i>in vivo</i> Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins uf die Bildung des U4/U6.U5 tri-snRNP-PartikelsDie <i>in vivo</i> Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins	54 54 54 56 59 60 60				

4.3	Einfluss der inhibierten [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung auf die					
	Lokalisierung U4/U6 di-snRNP-spezifischer Komponenten im					
	Zellkern	68				
4.3.1	Die Inhibierung der tri-snRNP-Bildung führt zur Akkumulation					
	des hPrp4- und des hPrp3-Proteins in den Cajal Bodies	69				
4.3.2	U6-spezifisches LSm4-Protein akkumuliert nach Inhibierung der					
	[U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung in Cajal Bodies	72				
4.3.3	Der U4/U6 di-snRNP-Assemblierungsfaktor p110 akkumuliert in					
	Cajal Bodies nach Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung	74				
4.3.4	U4- und U6 snRNAs akkumulieren nach Störung der [U4/U6.U5]					
	tri-snRNP-Bildung in den Cajal Bodies	75				
4.3.5	Quantifizierung der Akkumulation U4/U6-spezifischer					
	Bestandteile in den Cajal Bodies	79				
4.3.6	Das intakte U4/U6 di-snRNP-Partikel akkumuliert bei blockierter					
	[U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung in den Cajal Bodies	81				
4.4	Einfluss der Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung in vivo					
	auf die Verteilung von U5 snRNP-Komponenten und anderer					
	Spleißfaktoren im Zellkern	85				
4.4.1	Das U5-spezifische hSnu114-Protein und U5 snRNA					
	akkumulieren nicht in den Cajal Bodies, sondern					
	reorganisieren sich in Spleißfaktor-Kompartimenten	85				
4.4.2	Quantifizierung U5-spezifischer Komponenten in Cajal Bodies					
	nach Inhibierung der tri-snRNP-Bildung	88				
4.4.3	Die Inhibierung der tri-snRNP-Bildung führt zu einer					
	Reorganisation verschiedener Spleißfaktoren in den					
	Spleißfaktor-Kompartimenten	90				
4.5	Analyse des Einflusses der inhibierten [U4/U6.U5] tri-snRNP-					
	Bildung auf das Prä-mRNA Spleißen	94				
4.5.1	Die Inhibierung der tri-snRNP-Bildung führt zur Akkumulation					
	ungespleißter PolyA+-mRNA im Zellkern	95				
4.5.2	Die Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins verhindert die					
	B-Komplex-Bildung während der Spleißsomenassemblierung	96				

IV

5.	DISKUSSION	102
5.1	Bedeutung des U4/U6-hPrp31- und des U5-hPrp6-Proteins für	
	die Zelle	103
5.1.1	Die Proteine hPrp31 und hPrp6 sind essentiell für das Überleben	
	der Zelle	103
5.1.2	Die Rolle des hPrp31- und hPrp6-Proteins bei der Bildung des	
	[U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels	103
5.2	Die Rolle der Cajal Bodies bei der Zusammenlagerung	
	spleißosomaler U snRNP-Partikel	105
5.2.1	Akkumulation funktioneller U4/U6 di-snRNP-Partikel in den Cajal	
	Bodies bei Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung	106
5.2.2	Cajal Bodies sind die Orte der zellulären [U4/U6.U5] tri-snRNP-	
	Bildung	107
5.3	Funktionelle Bedeutung des hPrp31- und hPrp6-Proteins für	
	den Prä-mRNA Spleißprozess	111
5.3.1	Reorganisation von Spleißfaktoren hervorgerufen durch	
	Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung	111
5.3.2	hPrp31- und hPrp6-Proteine sind essentiell für das Prä-mRNA	
	Spleißen in vivo	112
5.4	Mögliches Modellsystem zur Untersuchung der autosomal	
	dominanten Form der Retinitis Pigmentosa	113
5.5	Ausblick	114
6.	LITERATURVERZEICHNIS	117

II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 2.1	Primärsequenzen und postulierte Sekundärsequenzen				
	der humanen U snRNAs.	5			
Abbildung 2.2	Schematische Darstellung der Spleißreaktion.	9			
Abbildung 2.3	Schematische Darstellung der Spleißosomen- assemblierung.	11			
Abbildung 2.4	Schematische Darstellung der Assemblierung des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels.	16			
Abbildung 2.5	Zelluläre Biosynthese der spleißosomalen U snRNP- Partikel.	18			
Abbildung 4.1	Die Spleißfaktoren SF3b14a, hPrp31 und hPrp6 sind essentiell für das Zellwachstum.	55			
Abbildung 4.2	Die siRNA-vermittelte Depletion des hPrp31- oder hPrp6- Proteins führt zu Apoptose.	58			
Abbildung 4.3	Spezifische Depletion spleißosomaler Proteine mittels RNA-Interferenz.	60			
Abbildung 4.4	Die selektive Depletion des hPrp31-Proteins verhindert die Bildung des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels <i>in vivo</i> .	62			
Abbildung 4.5	Durch die Zugabe von rekombinantem His-hPrp31- Protein kann der Defekt bei der [U4/U6.U5] tri-snRNP- Bildung in hPrp31-depletiertem Extrakt komplementiert werden.	63			
Abbildung 4.6	Die selektive Depletion des hPrp6-Proteins verhindert die Bildung des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels <i>in vivo</i> .	64			
Abbildung 4.7	In Abwesenheit des hPrp31- oder hPrp6-Proteins akkumuliert stabiler U4/U6 di-snRNP-Partikel in der Zelle.	67			

Abbildung 4.8	Die Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung führt zu einer Akkumulation des U4/U6 hPrp4-Proteins in den Cajal Bodies.	70
Abbildung 4.9	Die Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung führt zu einer Akkumulation des U4/U6 hPrp3-Proteins in den Cajal Bodies.	71
Abbildung 4.10	Die Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung führt zu einer Akkumulation von U6 LSm4-Protein in den Cajal Bodies.	73
Abbildung 4.11	Die Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung führt zu einer Akkumulation des U4/U6 Assemblierungsfaktors p110 in den Cajal Bodies.	75
Abbildung 4.12	Die Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung führt zu einer Akkumulation von U4 snRNAs in den Cajal Bodies.	76
Abbildung 4.13	Die Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung führt zu einer Akkumulation von U6 snRNA in den Cajal Bodies.	77
Abbildung 4.14	In Abwesenheit des Spleißfaktors U2 SF3b14a kommt es zu keiner Akkumulation von U4 und U6 snRNA in den Cajal Bodies.	78
Abbildung 4.15	Akkumulation U4/U6 di-snRNP-spezifischer Komponenten in den Cajal Bodies nach Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung.	80
Abbildung 4.16	Die Verteilung von U4/U6 hPrp4-Protein im Nukleoplasma und in den Cajal Bodies ist RNA- abhängig.	82
Abbildung 4.17	RNase-Behandlung führt zu einem vollständigen Abbau der U4 snRNA in der Zelle.	83
Abbildung 4.18	Die Verteilung des U4/U6 Assemblierungsfaktors p110 im Nukleoplasma und in den Cajal Bodies ist RNA- unabhängig	٩A
	นาสมาสาขุญ.	04

Abbildung 4.19	Die Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung führt zu einer Reorganisation der U5 snRNA-Verteilung in den Speckles.	86
Abbildung 4.20	Die Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung führt zu einer Reorganisation der U5 hSnu114-Proteinverteilung in den Speckles.	87
Abbildung 4.21	Die Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung führt zu einer Reorganisation der U1 snRNA-Verteilung in den Speckles.	88
Abbildung 4.22	Die Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung hat keinen Einfluss auf die Konzentration U5 snRNP- spezifischer Komponenten in den Cajal Bodies.	90
Abbildung 4.23	Die Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung führt zu einer Reorganisation der U2 snRNA-Verteilung in den Speckles.	91
Abbildung 4.24	Die Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung führt zu einer Reorganisation der Verteilung des U2 snRNP- spezifischen Proteins SF3a120 und des SR-Proteins SC35 in den Speckles.	92
Abbildung 4.25	In Abwesenheit des Spleißfaktors U2 SF3b14a kommt es zu einer Reorganisation der U1, U2 und U5 snRNA- Verteilung in den Speckles.	93
Abbildung 4.26	Die Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung führt zu einer Akkumulation von PolyA+-mRNA im Zellkern.	95
Abbildung 4.27	Analyse des Einflusses der Depletion des U4/U6 hPrp31- oder U5 hPrp6-Proteins auf die Spleißaktivität in vitro.	97
Abbildung 4.28	In Abwesenheit des hPrp31- oder hPrp6-Proteins kann <i>in vit</i> ro kein spleißosomaler B-Komplex gebildet werden.	98

Abbildung 4.29	Der Block in der B-Komplexbildung in hPrp31-				
	depletiertem Extrakt kann durch die Zugabe von				
	rekombinantem His-hPrp31-Protein komplementiert				
	werden.	100			
Abbildung 5.1	Modell der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung im Zellkern.	109			

III. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2.1	Proteinzusammensetzung der humanen U snRNP-Partikel.	7
Tabelle 3.1	Verwendete DNA-Oligonukleotide.	25
Tabelle 3.2	Verwendete siRNA-Oligonukleotide.	26
Tabelle 3.3	Verwendete Plasmide.	27
Tabelle 4.1	Auswirkung der blockierten [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung auf die Konzentration U4/U6-spezifischer Komponenten in den Cajal Bodies.	79
Tabelle 4.2	Auswirkung der blockierten [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung auf die Konzentration U5-spezifischer Komponenten in den Cajal Bodies.	89
		2.

1. ZUSAMMENFASSUNG

Das Spleißosom, welches im Verlauf des eukaryontischen Prä-mRNA Spleißens nicht-codierende Bereiche (Introns) der Prä-mRNA herausschneidet und die codierenden Bereiche (Exons) zur reifen mRNA verknüpft, bildet sich durch die schrittweise Anlagerung der UsnRNP-Partikel (engl. uridine-rich small nuclear ribonucleoproteins) auf der Prä-mRNA. Die spleißosomalen U snRNP-Partikel sind Zellkern auf unterschiedliche subnukleäre Strukturen verteilt: im das Nukleoplasma, die Spleißfaktorkompartimente (Speckles) und die Cajal Bodies. Während die Speckles sehr wahrscheinlich als Lagerstätten dienen, von denen aus Spleißfaktoren zu Orten mit hoher Transkriptionsaktivität rekrutiert werden, wird angenommen, dass die Cajal Bodies eine Rolle bei der intrazellulären Reifung de novo synthetisierter U snRNP-Partikel spielen.

Einen zentralen Bestandteil des Spleißosoms stellt das [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikel dar, das durch die Zusammenlagerung des U4/U6 di-snRNP mit dem U5 snRNP-Monopartikel entsteht und als vorassemblierter Komplex in das Spleißosom integriert wird. Im Verlauf des spleißosomalen Zyklus führen dramatische strukturelle Umlagerungsprozesse innerhalb des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels zur Freisetzung einzelner U4, U5 und U6 snRNP-Partikel aus dem post-spleißosomalen Komplex. Aus diesen einzelnen U snRNP-Partikeln kann dann das tri-snRNP-Partikel für eine weitere Spleißreaktion regeneriert werden. Für die Bildung des U4/U6 disnRNP-Partikels **U6 snRNP-PartikeIn** aus singulären U4 und wird der Assemblierungsfaktor p110 benötigt, der spezifisch an U6 snRNA bindet und sowohl Bestandteil des U6 mono-snRNP als auch des U4/U6 di-snRNP-Partikels ist. Im [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikel und im Spleißosom konnte p110-Protein jedoch nicht nachgewiesen werden. Da das U6 snRNP-Partikel im Gegensatz zu den anderen UsnRNP-Partikeln während seiner Reifung den Zellkern nicht verlässt, geht man davon aus, dass sich das U4/U6 di-snRNP und somit auch das [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikel im Zellkern zusammenlagern.

In welchem subnukleären Kompartiment sich diese Zusammenlagerung vollzieht war bislang unklar. Somit war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Frage nach der Lokalisierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung in der Zelle zu klären. Dazu sollte ein zelluläres System entwickelt werden, in dem spezifisch die [U4/U6.U5] trisnRNP-Bildung in der Zelle blockiert werden kann. In vitro Untersuchungen deuteten darauf hin, dass das U4/U6-spezifische hPrp31- und das U5-spezifische hPrp6-Protein eine essentielle Verbindung zwischen dem U4/U6 di-snRNP und dem U5 snRNP-Partikel im [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikel bilden. Deshalb wurden diese beiden Proteine zur biochemischen Charakterisierung ihrer in vivo Funktion im humanen System durch RNA-Interferenz (RNAi) aus der Zelle entfernt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit der Proteine hPrp31 und hPrp6 die tri-snRNP-Konzentration drastisch reduziert ist und stabile U4/U6 disnRNP- und U5 mono-snRNP-Partikel in der Zelle akkumulieren. Interessanterweise ist dieses U4/U6 di-snRNP-Partikel mit dem p110-Protein assoziiert. Anhand fluoreszenz-mikroskopischer Untersuchungen der Verteilung U4/U6 und U5 snRNPspezifischer Komponenten konnte nun gezeigt werden, dass unter den oben genannten Bedingungen intakte U4/U6 di-snRNP-Partikel in den Cajal Bodies akkumulieren, während U5 mono-snRNP-Partikel in den Speckles verbleiben. Da das mit dem U4/U6 di-snRNP-Partikel assoziierte p110-Protein über ein Lokalisierungssignal für die Cajal Bodies verfügt, ergibt sich folgende Modellvorstellung für die finalen Schritte der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Zusammenlagerung in den Cajal Bodies. Das U4/U6 di-snRNP-Partikel wird durch die Assoziation mit p110-Protein in den Cajal Bodies verankert. Dort bindet das U5 snRNP-Monopartikel an das U4/U6 di-snRNP-Partikel. Gleichzeitig wird das p110-Protein dissoziiert, wodurch das reife [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikel aus den Cajal Bodies freigesetzt wird.

Als ein weiterer wichtiger Befund konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass die hPrp31- und hPrp6-Proteine essentiell für das Zellwachstum sind und *in vivo* eine entscheidende Verbindung zwischen dem U4/U6 di-snRNP- und dem U5 mono-snRNP-Partikel im tri-snRNP-Partikel ausbilden. Daraus folgt, dass die Umwandlung des Prä-Spleißosoms in das reife Spleißosom in Abwesenheit dieser beiden Proteine blockiert wird. Diese Erkenntnis ist vor dem Hintergrund, dass Punktmutationen im hPrp31-codierenden Gen in Patienten mit der autosomal dominanten Form der Augenkrankheit *Retinitis pigmentosa* (adRP) vorliegen, von großem Interesse. Mit Hilfe des in dieser Arbeit entwickelten Systems, können nun die Auswirkungen der hPrp31-Mutanten auf die Zusammenlagerung des reifen Spleißosoms analysiert und dadurch neue Erkenntnisse über molekularen Ursachen der adRP erlangt werden.

2. EINLEITUNG

Die meisten Gene höherer Eukaryonten bestehen aus kurzen Aminosäurecodierenden Sequenzen (Exons), die durch oft lange, nicht-codierende DNA-Sequenzen (Introns) voneinander getrennt sind. Im Verlauf der Genexpression im Zellkern wird diese genetische Information zunächst in ein Primärtranskript (PrämRNA) umgeschrieben, das sowohl Intron- als auch Exonsequenzen enthält. Nach diversen Reifungsprozessen im Zellkern wird eine reife mRNA ins Zytoplasma transportiert, wo sie als Matrize für die Proteinbiosynthese dient. Im letzten Schritt der nukleären Prä-mRNA Reifung werden die nicht-codierenden Introns aus der Prä-mRNA entfernt und die kodierenden Exons präzise miteinander verknüpft. Es entsteht die reife, funktionelle mRNA. Dieser als Prä-mRNA Spleißen bezeichnete Prozess wird von einem großen Ribonukleoprotein-Komplex, dem so genannten Spleißosom, katalysiert.

2.1 Die Zusammensetzung des Spleißosoms

Das Spleißosom entsteht durch das schrittweise Assemblieren kleiner, kernlokalisierter Ribonukleoprotein-Partikel, der U snRNP-Partikel (engl. <u>uridine-rich</u> <u>small nuclear ribonucleoprotein particles</u>), und einer großen Anzahl nicht-U snRNP-Spleißfaktoren auf der Prä-mRNA. In jedem U snRNP-Partikel sind verschiedene Spleißfaktoren um eine, oder wie im Falle des U4/U6 di-snRNP-Partikels um zwei RNA Moleküle organisiert, nach denen sich die Bezeichnung des einzelnen U snRNP-Partikels richtet. Bei den Spleißfaktoren unterscheidet man zwischen den gemeinsamen Proteinen, die in allen U snRNP-Partikeln vorkommen und den spezifischen Proteinen, die ausschließlich mit einem bestimmten U snRNP-Partikel assoziiert sind. Darüber hinaus sind jedoch auch so genannte nicht-U snRNP-Spleißfaktoren an der Assemblierung des Spleißosoms auf der Prä-mRNA und der Katalyse der Spleißreaktion beteiligt.

2.1.1 U snRNAs, die RNA-Komponenten des Spleißosoms

Die RNA-Komponenten des Spleißosoms sind kleine, nukleäre, uridin-reiche RNA Moleküle, die als U snRNAs (engl. <u>uridine-rich-small-n</u>uclear RNAs) bezeichnet werden und durch metabolische Stabilität und eine hohe phylogenetische Konservierung ihrer Primär- und Sekundärstruktur gekennzeichnet sind. Im Verlauf der Spleißreaktion bilden die U snRNAs dynamische komplementäre Basenpaarungen mit dem Prä-mRNA Substrat und untereinander aus, die sowohl für die Erkennung der Spleißstellen als auch die Katalyse der Spleißreaktion essentiell sind.

Aufgrund ihrer Sequenz lassen sich fünf verschiedene U snRNAs unterscheiden: U1, U2, U4, U5 und U6 snRNA, die in ihrer Länge zwischen 106 und 187 Nukleotiden variieren. Mit Ausnahme der U6 snRNA werden alle U snRNAs durch die RNA-Polymerase II (Pol II) transkribiert und besitzen eine 2,2,7-Trimethylguanosin-Kappe (m₃G-Kappe) am 5'-Ende (Mattaj, 1986). Daneben ist auch die konservierte Sm-Bindungsstelle (Konsensussequenz RAU₃₋₆GR; R steht hier für eine Purinbase) ein charakteristisches Strukturmerkmal der Pol II-transkribierten U snRNAs U1, U2, U4 und U5, die in der Regel von Haarnadelschleifen flankiert ist. Dort binden die so genannten Sm-Proteine, die allen U snRNP-Partikeln mit Ausnahme des U6 snRNPs gemeinsam sind (Branlant *et al.*, 1982; Jarmolowski und Mattaj, 1993; Jones und Guthrie, 1990; Raker *et al.*, 1999; Raker *et al.*, 1996). U6 snRNA wird hingegen durch RNA-Polymerase III transkribiert und trägt anstelle der m₃G-Kappe ein γ -Monomethylphosphat an ihrem 5'-Ende (Kunkel *et al.*, 1986; Reddy *et al.*, 1987; Singh und Reddy, 1989).

Viele Nukleotide der UsnRNAs tragen posttranskriptionelle Modifizierungen in Form von Pseudouridinen, 6-Methyladenosinen oder 2'-O-Ribose-Methylierungen (Massenet *et al.*, 1998). Diese Modifizierungen sind vermutlich an der Modulation von RNA-RNA-Interaktionen beteiligt und von Bedeutung bei der Assemblierung spleißaktiver UsnRNP-Komplexe, wie es am Beispiel der U2 snRNA bereits experimentell gezeigt werden konnte (Yu *et al.*, 1998). Darüber hinaus kommt es in allen spleißosomalen UsnRNAs durch die Entstehung zahlreicher Einzel- und Doppelstrangregionen sowie durch Haarnadelschleifen zur Ausbildung komplexer Sekundärstrukturen, die Bindungsstellen für Proteine darstellen können. Abbildung 2.1 zeigt die postulierten Sekundärstrukturen der humanen UsnRNAs U1, U2, U4/U6 und U5 im Überblick. Im Gegensatz zu den übrigen snRNAs bilden die U4 und U6 snRNAs durch komplementäre Basenpaarung untereinander eine charakteristische Interaktionsdomäne.



Abbildung 2.1 Primärsequenzen und postulierte Sekundärsequenzen der humanen U snRNAs. Die Sequenzen der Sm-Bindungsstellen sind grau hinterlegt. (nach Brow und Guthrie, 1988; Burge et al., 1999)

2.1.2 Die gemeinsame Proteine der U snRNP-Partikel

Die sieben allen UsnRNP-Partikeln, mit Ausnahme des U6snRNP-Partikels, gemeinsamen Proteine B/B', D1, D2, D3, E, F und G mit apparenten Molekulargewichten von 9 bis 29 kDa werden aufgrund ihres phylogenetisch konservierten Sequenzmotivs, des Sm-Motivs, auch als Sm-Proteine bezeichnet. Im UsnRNP-Partikel bilden die Sm-Proteine eine ringförmige Struktur auf der Sm-Bindungsstelle der UsnRNAs aus, die so genannte Sm-Core-Domäne (Hermann *et al.*, 1995; Raker *et al.*, 1999; Raker *et al.*, 1996), die unter anderem für die Anlagerung partikelspezifischer Proteine notwendig ist und einen entscheiden

Schritt während der U snRNP-Biosynthese darstellt (Nelissen *et al.*, 1994). Neben den Sm-Proteinen konnte eine weitere Gruppe von Proteinen identifiziert werden, die ebenfalls ein hochkonserviertes Sm-Motiv aufweisen und aufgrund dessen als LSm-Proteine (Like-Sm) bezeichnet werden (Seraphin, 1995). In Analogie zu den Sm-Proteinen bilden die Proteine LSm2-8 einen heteromeren Komplex auf der uridin-reichen Sequenz am 3'-Ende der U6 snRNA (Achsel *et al.*, 1999; Vidal *et al.*, 1999).

2.1.3 Die U snRNP-partikelspezifischen Proteine

Die U snRNP-Partikel enthalten neben den Sm-Proteinen eine Vielzahl partikelspezifischer Proteine, die jeweils nur mit einem bestimmten U snRNP-Partikel assoziiert sind. Diese Proteine vermitteln die spezifische Funktion des betreffenden U snRNP-Partikels im spleißosomalen Zyklus und tragen so unter anderem zur Erkennung des Spleißsubstrates und der Katalyse der Spleißreaktion bei (Will und Lührmann, 1997a). Die anhand biochemischer Studien definierte Proteinzusammensetzung der einzelnen humanen U snRNP-Partikel ist in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

Das 12S **U1 snRNP**-Partikel enthält neben den Sm-Proteinen die drei U1spezifischen Proteine 70K, A und C, die bei der Assemblierung des Spleißosoms auf der Prä-mRNA zur stabilen Assoziation des U1 snRNP-Partikels mit der 5'-Spleißstelle beitragen (Nelissen *et al.*, 1994).

Die funktionelle Form des 17S **U2 snRNP**-Partikels beinhaltet 19 spezifische Proteine, darunter die heteromeren Spleißfaktoren SF3a und SF3b (Behrens *et al.*, 1993; Brosi *et al.*, 1993a; Brosi *et al.*, 1993b; Das *et al.*, 1999; Will *et al.*, 2001). Der SF3a-Komplex setzt sich aus drei Proteinen mit Molekulargewichten von 120, 66 und 60 kDa zusammen, während der SF3b-Komplex aus sieben Untereinheiten mit Molekulargewichten 155, 145, 130, 49, 15 (SF3b14a/p14 und SF3b14b) und 10 kDa besteht (Das *et al.*, 1999; Krämer, 1996; Krämer *et al.*, 1999; Will *et al.*, 2001). Da eine direkte Interaktion dieser Proteine mit Nukleotiden im Bereich der Verzweigungsstelle der Prä-mRNA nachgewiesen werden konnte, geht man davon aus, dass die Interaktion des U2 snRNP-Partikels während der Assemblierung des Prä-Spleißosoms (A-Komplex) durch die beiden Proteinkomplexe SF3a und SF3b vermittelt wird (Brosi *et al.*, 1993a; Gozani *et al.*, 1996).

U snRNP Proteine		app. Mr kDa	12 S U1	17 S U2	20 S U5	13 S U4/U6	25 S U4/U6.U5	
gemeinsame Proteine		B/B' D3 D2 D1 E F G	28/29 18 16.5 16 12 11 9	0000000	0000000	0000000	0000000	0000000
	U1 snRNP	70К А С	70 34 22	000				
spezifische Proteine	U2 snRNP	A' B" SF3a120 SF3a66 SF3a60 SF3b155 SF3b145 SF3b145 SF3b140 SF3b14b SF3b14b SF3b14b SF3b10 hPrp5 SR140 CHERP hPrp43 SPF45 SPF31 SPF30	31 28.5 120 66 60 160 150 120 53 15 15 15 15 9 140 140 130 90 50 33 31					
	U5 snRNP	hPrp8 U5-200K hSnu114 hPrp6 hPrp28 U5-52K U5-40K U5-15K	220 200 116 102 100 52 40 15			00000000		00000000
	U4/U6 snRNP	hPrp3 hPrp31 hPrp4 CypH U4/U6-15.5K Lsm2 Lsm3 Lsm4 Lsm5 Lsm6 Lsm7 Lsm8	90 61 60 20 15.5 10 15 15 10 8 13 13					000000 00000
	U4/U6.U5 tri-snRNP	110K 65K 27K	110 65 27					•••

Tabelle 2.1 Proteinzusammensetzung der humanen U snRNP-Partikel (Kastner, 1998).

Aufgrund der intermolekularen Basenpaarung zwischen der U4 und der U6 snRNA liegen das U4 und das U6 snRNP-Partikel in Form eines Heterodimers, des 13S **U4/U6 di-snRNP**-Partikels vor. Zusammen mit dem 20S **U5 snRNP**-Partikel bildet dieses Partikel das 25S **[U4/U6.U5] tri-snRNP**-Partikel und wird als dessen Bestandteil in das Spleißsom integriert (Black und Pinto, 1989). Da der Assemblierungsweg des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist, wird auf die Proteinzusammensetzung des [U4/U6.U5] trisnRNP-Partikels sowie auf die des U4/U6 di-snRNP- und des U5 snRNP-Partikels in Abschnitt 2.3 im Detail eingegangen.

2.1.4 Die nicht-U snRNP-Spleißfaktoren

Neben den bisher beschriebenen partikelspezifischen Proteinen spielen bei der Assemblierung des Spleißosoms und der katalytischen Spleißreaktion auch andere Spleißfaktoren eine wichtige Rolle. Sie interagieren zum Teil nur transient mit dem Spleißosom (Burge et al., 1999; Staley und Guthrie, 1998; Will und Lührmann, 1997b). Eine wichtige Gruppe dieser so genannten nicht-U snRNP-Spleißfaktoren stellen die SR-Proteine dar, die durch ihre arginin-serin-reiche Domäne (RS-Domäne) charakterisiert sind (Fu, 1995; Graveley, 2000; Mermoud et al., 1994). Alle SR-Proteine besitzen neben einer variablen Anzahl C-terminaler RS-Dipeptide an ihrem N-Terminus ein oder zwei RNA-Bindungsmotive (RRM, engl. RNA recognition motif). Aufgrund dieser modularen Struktur können diese Spleißfaktoren über das RRM direkt an die Prä-mRNA binden und gleichzeitig über das SR-Motiv mit anderen Proteinen interagieren. Ein wichtiger Vertreter dieser SR-Proteinfamilie ist der Spleißfaktor SC35, der eine wichtige Rolle bei der frühen Spleißosomenassemblierung spielt, indem er die Interaktion zwischen dem U1 snRNP- und dem U2 snRNP-Partikel mit der 3'-Spleißstelle der Prä-mRNA vermittelt (Fu und Maniatis, 1990; Fu und Maniatis, 1992a; Fu und Maniatis, 1992b).

2.2 Das eukaryontische Prä-mRNA Spleißen

2.2.1 Biochemie der Spleißreaktion

Die eigentliche Spleißreaktion, d.h. die Entfernung der Intronsequenzen und die

Verknüpfung der beiden Exons, besteht aus zwei nacheinander ablaufenden, stereospezifischen Transesterifizierungsreaktionen (siehe Abbildung 2.2).



Abbildung 2.2 Schematische Darstellung der Spleißreaktion. Im ersten Schritt der Spleißreaktion erfolgt der nukleophile Angriff der 2'-OH-Gruppe des Verzweigungspunktadenosins auf die Phosphodiesterbindung der 5'-Spleißstelle. Die bei dieser Reaktion entstehende freie Hydroxylgruppe am 3'-Ende des Exons 1 spaltet im zweiten Reaktionsschritt die Phosphodiesterbindung der 3'-Spleißstelle. Dadurch werden Exon 1 und Exon 2 zur reifen mRNA verknüpft, und das Intron-Lariat wird freigesetzt.

Um die präzise Erkennung der Spleißstellen und die Genauigkeit der Spleißreaktion zu gewährleisten, haben sich im Evolutionsverlauf streng konservierte Konsensussequenzen in der Primärsequenz der Prä-mRNA entwickelt. Schon das Verfehlen der Spleißstelle um nur ein Nukleotid würde gewöhnlich zur Produktion eines nicht-funktionellen Proteins führen. Man unterscheidet im Kontext der Spleißstellenerkennung vier funktionelle Sequenzabschnitte, wobei die drei letztgenannten Elemente gemeinsam den Bereich der 3'Spleißstelle bilden (Reed, 1989):

(1) Die 5'-Spleißstelle, die durch die Konsensussequenz AG/GURAGU definiert

wird. Die Nukleotide GU repräsentieren hierbei invariabel den Beginn der Intronsequenz, während R einen Purinrest darstellt.

(2) Der Verzweigungspunkt, der sich etwa 20-40 Nukleotide von der 3'-Spleißstelle entfernt befindet und durch die Sequenz YNYUR<u>A</u>C charakterisiert wird. Dabei stellt <u>A</u> das hochkonservierte Verzweigungsadenosin dar, Y einen Pyrimidinrest und N ein beliebiges Nukleotid.

(3) Der Polypyrimidin-Bereich zwischen dem Verzweigungspunkt und der 3'-Spleißstelle bestehend aus 10-15 Pyrimidinen.

(4) Die 3'-Spleißstelle, die durch die Sequenz YAG/G definiert wird.

Im ersten Schritt der Spleißreaktion wird die Phosphodiesterbindung der 5'-Spleißstelle durch einen nukleophilen Angriff der 2'-Hydroxylgruppe der Ribose des hochkonservierten Verzweigungspunktadenosins gespalten. Die dabei entstehende 5'-Phosphatgruppe des ersten Intronnukleotides wird über eine 2'-5'-Phosphosdiesterbindung kovalent mit dem angreifenden Adenosin verbunden. Es entsteht eine lassoähnliche Zwischenform (Lariat). Die auf diese Weise frei gewordene 3'-Hydroxylgruppe des Exons 1 greift im zweiten Schritt der Reaktion nukleophil die Phosphodiesterbindung an der 3'-Spleißstelle an. Dadurch werden die beiden Exons 1 und 2 zur reifen mRNA verknüpft, und das Intron-Lariat wird freigesetzt. Während die reife mRNA ins Zytoplasma transportiert wird, wird das Intron durch eine im Nukleoplasma lokalisierte 2'-5'-Phosphodiesterase vollständig abgebaut (Burge et al., 1999; Green, 1991; Moore et al., 1993; Moore und Sharp, 1993; Nilsen, 1998).

2.2.2 Die Assemblierung des Spleißosoms auf der Prä-mRNA

Die Spleißreaktion ist ein koordinierter dynamischer Prozess, der die schrittweise Assemblierung des Spleißosoms auf der Prä-mRNA, die Katalyse der Spleißschritte, sowie die Dissoziation und das Recycling der Spleißfaktoren umfasst (Burge *et al.*, 1999; Nilsen, 1998; Staley und Guthrie, 1998). Die schrittweise Assemblierung des Spleißosoms erfolgt durch die koordinierte Bindung der vorassemblierten U snRNP-Partikel, und zahlreicher nicht-U snRNP-Spleißfaktoren auf der Prä-mRNA. Die einzelnen Stadien der Spleißosomenassemblierung sind in Abbildung 2.3 dargestellt.



Abbildung 2.3 Schematische Darstellung der Spleißosomenassemblierung. Die Assemblierung des Spleißosoms auf der Prä-mRNA wird durch Basenpaarung der U1 snRNA an der 5'-Spleißstelle initiiert. Anschließend bindet das U2 snRNP-Partikel an den Verzweigungspunkt, und es kommt zur Bildung des A-Komplexes. Durch Integration des prä-assemblierten [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels entsteht der B-Komplex. Dessen Umwandlung zum katalytisch aktiven Spleißosom führt in folge struktureller Umwandlungen zur Freisetzung des U1 und des U4 snRNP-Partikels. Im Anschluss an den ersten Katalyseschritt der Spleißreaktion bleibt die Prä-mRNA im C-Komplex mit dem Spleißosom assoziiert. Erst nach dem zweiten Schritt werden das Intron und die reife mRNA freigesetzt und das Spleißosom zerfällt in seine Bestandteile, die somit für einen neuen Spleißzyklus zur Verfügung stehen (Staley und Guthrie, 1998).

Im ersten Schritt kommt es dabei zur Ausbildung des so genannten E-Komplexes (engl. *early complex*), bei dem das U1 snRNP-Partikel unter Ausbildung komplementärer Basenpaarungen zwischen dem 5'-Ende der U1 snRNA und intronischen Sequenzen an die 5'-Spleißstelle der Prä-mRNA bindet (Reed und Palandjian, 1997; Siliciano und Guthrie, 1988; Zhuang und Weiner, 1986). Im Anschluss daran erfolgt die ATP-abhängige Rekrutierung des 17S U2 snRNP-Partikels und es kommt zur Bildung des auch als A-Komplex bezeichneten Prä-Spleißosoms (Reed und Palandjian, 1997). Die sich dabei ausbildenden komplementären Basenpaarungen der U2 snRNA mit der Region des Verzweigungspunktes der Prä-mRNA, führen zu einer Konformationsänderung am Verzweigungspunkt, die das Verzweigungsadenosin in eine sterisch leicht zugängliche Position bringt (Query *et al.*, 1994; Wu und Manley, 1989; Zhuang *et al.*, 1989).

Im entscheidenden Schritt der Spleißosomenassemblierung wird das Prä-Spleißosom durch Integration des vorassemblierten 25S [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels in das präkatalytische Spleißosom (B-Komplex) überführt. Ein Prozess, der durch die tri-snRNP-spezifischen Proteine 65K und 110K (SART1) vermittelt wird (Makarova et al., 2001). In folge dieser Integration kommt es aufgrund veränderter RNA-RNA Wechselwirkungen zu dramatischen Konformationsänderungen innerhalb des präkatalytischen Spleißosoms und zur Bildung des aktivierten Spleißosoms (B*-Komplex) (Staley und Guthrie, 1998). Dabei werden sowohl die Basenpaarungen zwischen der U1 snRNA und der 5'-Spleißstelle als auch die intermolekulare Basenpaarung zwischen den U4 und U6 snRNAs im tri-snRNP-Partikel aufgehoben, was zu einer Dissoziation des U1 snRNP- und des U4 snRNP-Partikels führt (Lamond et al., 1988; Yean und Lin, 1991). Die U4 snRNA, die im tri-snRNP-Partikel die katalytisch aktiven Sequenzen der U6 snRNA blockiert, wirkt als RNA-Chaperon. Wird die inhibitorische Wirkung der U4 snRNAstrukturellen Konformationsänderungen Basenpaarung als Folge der aufgehoben, bildet die U6 snRNA zusammen mit der U2 snRNA das katalytische Zentrum des Spleißosoms (Madhani und Guthrie, 1992; Sun und Manley, 1995; Wu und Manley, 1991). Der im Anschluss an die erste Transesterifizierungsreaktion entstehende spleißosomale Komplex wird als C-Komplex bezeichnet. Im weiteren Verlauf der Spleißreaktion werden die beiden Exons 1 und 2 zur reifen mRNA verknüpft und das Intron-Lariat freigesetzt. Die freigesetzten U snRNP-

Komponenten hingegen können in einen weiteren Spleißzyklus übergehen.

2.3 Das [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikel

2.3.1 [U4/U6.U5] tri-snRNP-spezifische Proteine

Das **[U4/U6.U5] tri-snRNP**-Partikel, das sich in einem Prä-mRNA-unabhängigen Prozess aus dem 20S **U5 snRNP-** und dem 13S **U4/U6 di-snRNP**-Partikel bildet, wird nach der Bindung des U1 snRNP- und U2 snRNP-Partikels an die Prä-mRNA in das Spleißosom eingebaut (siehe Abschnitt 2.2.2). Das tri-snRNP-Partikel bildet die zentrale und mit 16 Proteinen auch die größte funktionelle Einheit des Spleißosoms (Behrens und Lührmann, 1991; Black und Pinto, 1989).

Das 20S **U5 snRNP**-Partikel enthält neben den Sm-Proteinen acht partikelspezifische Proteine mit den apparenten Molekulargewichten 15, 40, 52, 100, 102, 116, 200 und 220 kDa (Bach et al., 1989; Behrens und Lührmann, 1991). Viele dieser Proteine sind essentiell für den Spleißprozess und maßgeblich an der dynamischen Umstrukturierung des Spleißosoms im Verlauf seiner Aktivierung beteiligt (Will und Lührmann, 1997b). So konnte unlängst gezeigt werden, dass das Hefeprotein Snu114p deutliche Homologien zu den Translations-Elongationsfaktoren EF-G bzw. EF-2 aufweist und als putative GTPase (Fabrizio et al., 1997) direkt oder indirekt an der Entwindung der U4/U6 Helix während der Aktivierung des Spleißosoms beteilig ist (Bartels et al., 2002; Bartels et al., 2003). hSnu114 (116K) Protein bildet mit den Proteinen hPrp8 (220K), U5-200K und U5-40K einen RNA-freien, stabilen heterotetrameren Proteinkomplex (Achsel et al., 1998). Während man vom Hefehomolog des hPrp8-Proteins annimmt, dass es einen Cofaktor des katalytischen Zentrums des Spleißosoms darstellt (Collins und Guthrie, 1999; Collins und Guthrie, 2000), besitzt das U5-40K Protein ein WD40-Motiv, das eine klassische Protein-Protein Interaktionsdomäne darstellt (Achsel et al., 1998; Neer et al., 1994).

Von besonderem Interesse für die vorliegende Arbeit ist das U5-Protein hPrp6 (102K), das der Familie der TPR (engl. <u>t</u>etratrico <u>p</u>eptide <u>r</u>epeats) Proteine angehört und über Protein-Protein Interaktionen stabil mit dem humanen

U5 snRNP-Partikel assoziiert ist. Aufgrund dieser stabilen Bindung an das U5 snRNP-Partikel war es bislang auch nicht möglich die Funktion des hPrp6-Proteins eingehender zu untersuchen (Makarov *et al.*, 2000). Allerdings wird, basierend auf Zwei-Hybrid Analysen, angenommen, dass das hPrp6-Protein spezifisch mit dem U4/U6-spezifischen Protein hPrp31 (61K) interagiert und so das U4/U6 disnRNP-Partikel mit dem U5 snRNP-Partikel verbindet (Makarova *et al.*, 2002). Im Gegensatz zum humanen System wurde das Hefehomolog Prp6p als U4/U6spezifisches Protein beschrieben, dass allerdings auch, wie für das humane Homolog postuliert, die Interaktion zwischen dem U4/U6 di-snRNP- und dem U5 snRNP-Partikel vermittelt (Abovich *et al.*, 1990). Im Hefesystem ist Prp6p jedoch weder für die Integrität des U4/U6 di-snRNP-Partikels noch für die des U5 snRNP-Partikels essentiell (Galisson und Legrain, 1993).

Aufgrund der intermolekularen Basenpaarung zwischen der U4 und U6 snRNA bilden das U4 und das U6 snRNP-Partikel ein Heterodimer, das 13S U4/U6 disnRNP-Partikel. Neben den Sm- bzw. LSm-Proteinen beinhaltet dieses Partikel fünf weitere Proteine mit apparenten Molekulargewichten von 15.5, 20, 60, 61 und 90 kDa (siehe Tabelle 2.1). Das kleinste dieser U4/U6-spezifischen Proteine ist das U4/U6-15.5K (NHPX/hSnu13), welches als Nukleationsfaktor für die U4/U6 di-snRNP-Assemblierung bezeichnet werden kann, da die Wechselwirkungen der übrigen U4/U6-spezifischen Proteine mit dem U4/U6-Duplex von dieser zuerst zu erfolgenden Interaktion abhängig sind (Nottrott et al., 1999; Nottrott et al., 2002). Die Proteine Cyclophilin H (CypH/20K), hPrp4 (60K) und hPrp3 (90K) sind Bestandteil eines äußerst salzstabilen heterotrimeren Komplexes (Horowitz et al., 1997; Lauber et al., 1997; Teigelkamp et al., 1997), der als vorassemblierter Proteinkomplex ausschließlich an den U4/U6-Duplex bindet (Nottrott et al., 2002). Von besonderem Interesse für die vorliegende Arbeit wurde als fünftes U4/U6 Protein das hPrp31-Protein (app. MW 61 kDa) identifiziert, von dem gezeigt werden konnte, dass es essentiell für [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung in vitro ist (Makarova et al., 2002).

Das 25S **[U4/U6.U5] tri-snRNP**-Partikel beinhaltet mit Ausnahme des U5-52K Proteins alle 20S U5 snRNP-spezifischen Proteine, alle spezifischen Proteine des U4/U6 di-snRNP-Partikels, darunter auch die LSm-Proteine, sowie die gemeinsamen Sm-Proteine (Behrens und Lührmann, 1991; Laggerbauer *et al.*, 2005). Daneben enthält das [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikel drei partikelspezifische Proteine mit apparenten Molekulargewichten von 110 kDa, 65 kDa und 27 kDa. Die drei letztgenannten Proteine zeichnen sich durch eine für Spleißfaktoren charakteristische arginin-serin-reiche RS-Domäne auszeichnen (siehe auch Abschnitt 2.1.4) und spielen scheinbar eine essentielle Rolle bei der Integration des tri-snRNP-Partikels in das Spleißsom (Fetzer *et al.*, 1997; Makarova *et al.*, 2001).

2.3.2 Die [U4/U5.U6] tri-snRNP-Assemblierung

Basierend auf in vitro Untersuchungen zur molekularen Organisation des humanen U4/U6 di-snRNP-Partikels wurde für dieses Partikel ein hierarchischer Assemblierungsweg gezeigt, der in Abbildung 2.4 schematisch dargestellt ist. Im ersten Schritt wird dabei die 5'-Haarnadelschleife der U4 snRNA durch das U4/U6-15.5K Protein erkannt, gefolgt von der Bindung des hPrp31-Proteins. Die anschließende Integration der Proteine CypH, hPrp4 und hPrp3 in Form eines vorassemblierten heterotrimeren Komplexes erfordert die intakte U4/U6 snRNA Duplex (Nottrott et al., 1999; Nottrott et al., 2002). Für die Bildung des U4/U6 disnRNP-Partikels ist ein weiterer Proteinfaktor notwendig: das Protein p110, das auch als SART3- oder hPrp24-Protein bezeichnet wird und kürzlich als das humane Ortholog des U4/U6 di-snRNP-Assemblierungsfaktors Prp24p der Hefe charakterisiert wurde (Bell et al., 2002; Rader und Guthrie, 2002; Raghunathan und Guthrie, 1998). Das p110-Protein bindet spezifisch an die U6 snRNA und ist auch Bestandteil des U4/U6 di-snRNP-Partikels. Da es aber bislang weder im [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikel noch im Spleißosom nachgewiesen werden konnte, wird angenommen, dass es das tri-snRNP-Partikel in einem späten Stadium der trisnRNP-Assemblierung verlässt (Bell et al., 2002), möglicherweise gleichzeitig mit der oder im Anschluss an die Bindung des U5 snRNP-Partikels an den U4/U6 disnRNP. Ein wichtiges Protein für die molekulare Interaktion zwischen dem U4/U6 di-snRNP- und dem U5 snRNP-Partikel stellt das U4/U6-spezifische hPrp31-Protein dar, das in vitro sowohl essentiell für die tri-snRNP-Bildung als auch die eigentliche Spleißreaktion ist (Makarova et al., 2002). Zwei-Hybrid Analysen zeigen, dass hPrp31-Protein spezifisch an das U5-Protein hPrp6 bindet. Man nimmt daher an, dass beide Proteine eine essentielle Verbindung zwischen dem U4/U6 di-snRNP-



Partikel und dem U5 snRNP-Partikel bilden (Makarov *et al.*, 2000; Makarova *et al.*, 2002).

Abbildung 2.4 Schematische Darstellung der Assemblierung des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels. Zu Beginn des hierarchischen Assemblierungswegs des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels erkennt das U4/U6-15.5K Protein die 5'-Haarnadelschleife der U4 snRNA, gefolgt von der Bindung des hPrp31-Proteins. Die anschließende Basenpaarung zwischen der U4 und U6 snRNA ist die Voraussetzung für die Bindung des heterotrimeren Proteinkomplexes bestehend aus CypH-, hPrp4- und hPrp3-Protein und somit für die Bildung des 13S U4/U6 di-snRNP-Partikels. Der für diesen Assemblierungsprozess benötigte Helferfaktor p110 (hPrp24) bleibt zunächst mit dem fertig assemblierten U4/U6 di-snRNP-Partikel assoziiert. Erst im Anschluss an die Bindung des 20S U5 snRNP-Monopartikels oder gleichzeitig mit dessen Bindung an den U4/U6 di-snRNP-Partikel verlässt p110-Protein den fertig assemblierten [U4/U6.U5] tri-snRNP-Komplex.

Von zentralem Interesse für die vorliegende Arbeit war das Verständnis der Funktion sowohl des hPrp31- als auch des hPrp6-Proteins *in vivo*, weil Mutationen des hPrp31-codierenden Gens (PRPF31) mit der autosomal dominanten Form der *Retinitis pimentosa* (adRP) in Verbindung gebracht werden, einer Augenkrankheit, die zur Degeneration der Photorezeptorzellen führt (Vithana et al., 2001).

Während der Ausbildung des katalytischen Zentrums des Spleißosoms wird die intermolekulare Basenpaarung zwischen der U4 und der U6 snRNA aufgehoben und das U4 snRNP-Partikel freigesetzt. Im Anschluss an die Spleißreaktion zerfallen das Spleißosom und somit auch das [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikel in die molekularen Einzelkomponenten. Man nimmt an, dass sich das tri-snRNP-Partikel aus seinen Einzelkomponenten, den individuellen U4, U5 und U6 snRNP-Partikeln, neu bilden kann und dadurch für eine weitere Spleißreaktion zur Verfügung steht. Dieser Recyclingprozess ist von essentieller Bedeutung für eine effiziente Nutzung der tri-snRNP-Partikel im dynamischen Spleißzyklus. Allerdings ist wenig über den *in vivo* Mechanismus dieses Regenerationsprozesses bekannt.

2.4 Die zelluläre Biosynthese der U snRNP-Partikel

Die de novo Biosynthese spleißosomaler U snRNP-Partikel ist ein hochkomplexer, dynamischer Prozess, der sich in vier Schritte unterteilen lässt: (1) die Synthese langer Vorläufer-U snRNAs (Prä-U snRNAs); (2) die nukleolytische Prozessierung der Prä-U snRNAs in kurze, reife U snRNAs; (3) die spezifische kovalente Modifizierung einzelner Nukleotide; und (4) das Verpacken der U snRNA mit Ribonukleoproteinen zu einem U snRNP-Partikel. Die meisten dieser Schritte der U snRNP-Biosynthese können einem distinkten subzellulären Kompartiment zugeordnet werden. Dabei erstreckt sich die Biosynthese der RNA-Polymerase II transkribierten snRNAs U1, U2, U4 und U5 sowohl auf das Zytoplasma als auch auf subnukleäre Bereiche des Zellkerns, während sich die Reifung der RNA-Polymerase III transkribierten U6 snRNA ausschließlich auf den Zellkern beschränkt. Abbildung 2.5 gibt einen schematischen Überblick über die verschiedenen Stationen beider Reifungsprozesse im Zytoplasma und im Zellkern.



Abbildung 2.5 Zelluläre Biosynthese der spleißosomalen U snRNP-Partikel. Mit Ausnahme der U6 snRNA werden alle spleißosomalen U snRNAs (U1, U2, U4 und U5) im Zellkern durch die RNA-Polymerase II transkribiert und zur anschließenden Reifung ins Zytoplasma exportiert (schwarze Pfeilspitze). Dort erfolgt durch Bindung der Sm-Proteine an die einzelnen U snRNAs in Wechselwirkung mit dem SMN-Komplex die Ausbildung der Sm-Core-Domäne. Im weiteren Verlauf der U snRNP-Reifung werden die U snRNAs am 3'und am 5'-Ende modifiziert und die reifen U snRNP-Reifung werden die U snRNAs am 3'und am 5'-Ende modifiziert werden, bevor sie in Speckles gespeichert und von dort zu den Orten mit hoher Transkriptionsaktivität rekrutiert werden. Im Gegensatz dazu verläuft die Reifung der RNA-Polymerase III transkribierten U6 snRNA ausschließlich im Zellkern (weiße Pfeilspitze). Während dieses Reifungsprozesses bilden die sieben LSm-Proteine einen heteroheptameren Ring am uridin-reichen 3'-Ende der U6 snRNA. Anschließend wird die U6 snRNA im Nukleolus basenmodifiziert, und das reife U6 snRNP-Partikel passiert den Cajal Body auf seinem Weg in die Speckles.

2.4.1 Reifung der Polymerase II-transkribierten Sm-Core U snRNAs

Die RNA-Polymerase II transkribierten snRNAs U1, U2, U4 und U5 sind am 5'-Ende mit einer N7-Monomethylguanosin(m⁷G)-Kappe versehen und an ihrem 3'-Ende durch zusätzliche Nukleotide verlängert. Diese als Prä-UsnRNAs bezeichneten Vorläufermoleküle werden in einen großen Proteinkomplex integriert, der den Export der Prä-U snRNA in das Zytoplasma vermittelt. Im Zytoplasma assemblieren die Sm-Proteine B/B', D3, D2, D1, E, F und G schrittweise auf der Sm-Binderegion der Prä-U snRNAs und bilden so die Sm-Core-Domäne (Paushkin et al., 2002). Während die Assoziation der Sm-Proteine mit der UsnRNA in vitro auch ohne zusätzliche Proteinfaktoren erfolgt (Raker et al., 1999a), ist die Ausbildung der Sm-Core-Domäne in vivo entscheiden von der Wechselwirkung mit dem Protein SMN (survival of motor neurons) sowie den SMN-assoziierten Proteinen Gemin2-7 abhängig (Fischer et al., 1997; Liu et al., 1997; Meister et al., 2001; Pellizzoni et al., 1999). Die Ausbildung der Sm-Core-Domäne stellt einen entscheidenden Schritt für die Biosynthese der UsnRNP-Partikel dar, da sowohl die sich anschließende Hypermethylierung der m⁷G-Kappe zu einer 2,2,7-Trimethylguanosin(m³G)-Kappe als auch die endonukleolytische 3'-Prozessierung dieses Sm-Core erfordern (Mattaj et al., 1986; Seipelt et al., 1999). Die m³G-Kappe und die Sm-Core-Domane fungieren als Kernlokalisierungssignal (engl. <u>n</u>uclear <u>localisation signal;</u> NLS) und sind für den Re-Import des gereiften U snRNP-Partikels in den Zellkern erforderlich (Fischer et al., 1993). Im Anschluss an den Re-Import der U snRNP-Partikel in den Zellkern akkumulieren diese vorübergehend in den Cajal Bodies (Sleeman und Lamond, 1999).

Cajal Bodies wurden lange Zeit auch als Coiled Bodies bezeichnet (Monneron und Bernhard, 1969). Es handelt sich dabei um subnukleäre Strukturen mit einem variablen Durchmesser von 0.15 bis 1.5 µm, die im Jahre 1903 erstmals von Santiago Ramón y Cajal in Neuronen beschrieben wurden (Cajal, 1903). Diese deutlich von übrigen Nukleoplasma abgegrenzten Kernkörperchen, die in einer Vielzahl von Organismen zu finden sind, können anhand des Markerproteins p80-Coilin identifiziert werden, dessen Funktion in der Zelle bislang nicht aufgeklärt werden konnte (Andrade *et al.*, 1991; Raska *et al.*, 1991). Cajal Bodies enthalten darüber hinaus zwar den vollständigen U snRNA-Satz (Carmo-Fonseca *et al.*, 1992; Carmo-Fonseca *et al.*, 1991a; Carmo-Fonseca *et al.*, 1991b; Huang und Spector, 1992; Matera und Ward, 1993), aber nicht alle Spleißfaktoren. So fehlen z.B. das für Speckles charakteristische SC35-Protein und andere SR-Proteine (Gama-Carvalho et al., 1997) sowie hnRNP Partikel oder Poly(A)+-mRNA (Gall, 2000). Aufgrund dessen wird angenommen, dass der Spleißprozess selbst nicht in den Cajal Bodies stattfindet. Obwohl die Rolle der Cajal Bodies bislang noch immer weitestgehend spekulativ ist, nimmt man jedoch an, dass sie eine Rolle bei der intrazellulären Reifung de novo synthetisierter U snRNP-Partikel spielen. Insbesondere, da in den Cajal Bodies die posttranskriptionelle Modifizierung spezifischer Nukleotide der snRNAs U1, U2, U4 und U5, durch kleine, Cajal Bodyspezifische RNAs, so genannte scaRNAs (engl. small Cajal body-specific RNAs), vermittelt wird (Darzacq et al., 2002; Jády et al., 2003; Kiss et al., 2002). Die Biosynthese der UsnRNP-Partikel wird durch die Assoziation mit den UsnRNPspezifischen Proteine komplettiert. Dieser bislang nur wenig verstandene Prozess findet höchstwahrscheinlich auch im Zellkern statt, obwohl es bislang nicht möglich war, ihn einer bestimmten nukleären Struktur zuzuordnen. Allerdings spricht die hohe Konzentration vieler U snRNP-spezifischen Proteine und U snRNAs in Cajal Bodies dafür, dass auch dieser Schritt der UsnRNP-Biosynthese in diesen subnukleären Kompartimenten erfolgen könnte (Carmo-Fonseca et al., 1991b; Makarov et al., 2000; Makarova et al., 2002; Staněk et al., 2003; Will et al., 2002). Kürzlich veröffentlichte Daten zur U2 snRNP- und U4/U6 di-snRNP-Biosynthese in Cajal Bodies unterstützen diese Annahme (Nesic et al., 2004; Staněk und Neugebauer, 2004; Staněk et al., 2003).

Zum Abschluss der UsnRNP-Biosynthese gelangen die reifen UsnRNP-Partikel ins Nukleoplasma und die Spleißfaktorkompartimente, die auch als Interchromatin Granule Clusters (IGCs) oder Speckles bezeichnet werden (Lamond und Spector, 2003). Speckles sind granulös erscheinende nukleäre Domänen, die sehr wahrscheinlich als Speicher dienen, aus denen heraus Spleißfaktoren und UsnRNP-Partikel zu Orten des Nukleoplasmas mit hoher Transkriptionsaktivität und damit auch hoher Spleißaktivität rekrutiert werden (Misteli *et al.*, 1997).

2.4.2 Reifung der Polymerase III-transkribierten U6 snRNA

Im Gegensatz zu den RNA-Polymerase II-transkribierten U snRNAs beschränkt sich die Biosynthese der U6 snRNA ausschließlich auf nukleäre Kompartimente. Die

Synthese der U6 snRNA durch RNA-Polymerase III endet mit einer 3'-terminalen uridin-reichen Sequenz, die vorübergehend mit dem La-Protein assoziiert. Dessen Bindung stabilisiert die U6 snRNA und erleichtert die U6 snRNP-Bildung (Wolin und Cedervall, 2002). Vor Eintritt des Prä-U6 snRNP-Partikels in den Nukleolus wird das La-Protein durch die Bindung eines heteromeren Rings bestehend aus den sieben LSm-Proteinen LSm2-8 ersetzt (Achsel *et al.*, 1999; Ingelfinger *et al.*, 2002). Während sich das U6 snRNP-Partikel im Nukleolus aufhält, erfolgt dort die posttranskriptionelle Modifizierung spezifischer Nukleotide der U6 snRNA durch die dort lokalisierten snoRNAs (Ganot *et al.*, 1999; Lange und Gerbi, 2000). Im Anschluss daran passiert das reife U6 snRNP-Partikel auf seinem Weg in die Speckles aus bislang nicht geklärten Gründen die Cajal Bodies.

2.5 Ziel der vorliegenden Arbeit

Das [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikel ist als zentraler Baustein des Spleißosoms während dessen Lebenszyklus dramatischen strukturellen Umlagerungsprozessen unterworfen, in deren Verlauf die individuellen UsnRNP-Partikel freigesetzt werden. Man nimmt an, dass sich das tri-snRNP-Partikel im Anschluss an einen Spleißzyklus aus seinen Einzelkomponenten neu bilden kann und dadurch für eine weitere Spleißreaktion zur Verfügung steht. Dieser Recyclingprozess ist von enormer Bedeutung für eine effiziente Nutzung des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels im dynamischen Spleißprozess. Obwohl man mittlerweile ein relativ detailliertes Bild die zelluläre Lokalisierung der verschiedenen U snRNPüber Biosyntheseschritte hat, ist über die Lokalisierung des Assemblierungsprozesses sowohl wiederverwerteter als auch de novo synthetisierter tri-snRNP-Partikel im Zellkern noch relativ wenig bekannt. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass verschiedene Reifungsprozesse der UsnRNP-Biosynthese in den Cajal Bodies lokalisiert sein könnten, deren Rolle zu Beginn der vorliegenden Arbeit noch immer weitgehend spekulativ war.

Somit stand im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Frage nach der zellulären Lokalisierung von [U4/U6.U5] tri-snRNP-Assemblierung im Vordergrund des Interesses. Um diese Frage zu beantworten, war es notwendig, ein System zu entwickeln, mit dem spezifisch die tri-snRNP-Bildung in der Zelle blockiert werden kann. Mit Hilfe eines solchen Systems sollte es möglich sein, in Zellen, deren [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung blockiert ist, die Verteilung der Einzelkomponenten U4 snRNP-, U5 snRNP- und U6 snRNP-Partikel zu analysieren und eventuell Rückschlüsse auf den Ort der tri-snRNP-Bildung im Zellkern zu ziehen.

Da angenommen wurde, dass das U4/U6 di-snRNP-spezifische hPrp31- und das U5 snRNP-spezifische hPrp6-Protein möglicherweise eine Brücke zwischen dem U4/U6 di-snRNP-Partikel und dem U5 snRNP-Partikel ausbilden (Makarov et al., 2000; Makarova et al., 2002; Makarova et al., 2002), stellten beide Proteine potentielle Kandidaten für die Entwicklung eines solchen Systems dar. Vorausgesetzt werden musste, dass sich die nach in vitro Analysen postulierte essentielle Funktion bei der Stabilität des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels tatsächlich auch in vivo bestätigen ließe. Dazu sollten hPrp31- und hPrp6-Protein mittels RNA-Interferenz spezifisch aus humanen Zellen entfernt werden. Bei der RNA-Interferenz werden synthetische 21 bis 23 Nukleotide lange, doppelsträngige RNA-Moleküle, so genannte small interfering RNAs (siRNAs), durch Transfektion in humane Zellen eingebracht und führen dort zum sequenzspezifischen posttranskriptionellen Abbau einer mRNA und damit zur Depletion des entsprechenden Proteins aus der Zelle (Elbashir et al., 2001a; Elbashir et al., 2001b; Fire et al., 1998). Im Anschluss daran sollte der Einfluss der Depletion des hPrp31und hPrp6-Proteins auf das Zellwachstum sowie auf die Integrität des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels analysiert Durch diese werden. experimentelle Vorgehensweise sollte es möglich sein, die in vivo Funktion der beiden Proteine hPrp31 und hPrp6 zu charakterisieren. Eine solche Charakterisierung wäre von hohem Interesse, da zum einen über die Funktion des hPrp6-Proteins im humanen System bislang nichts bekannt ist und zum anderen Mutationen des hPrp31-codierenden Genes (PRPF31) mit der autosomal dominanten Form der Augenkrankheit Retinitis Pigmentosa in Verbindung gebracht werden (Vithana et al., 2001). Somit könnte die Charakterisierung der in vivo Relevanz beider Proteine von hohem Wert für die Entwicklung neuer Therapieansätze sein.

Falls sich die essentielle Funktion des hPrp31- und hPrp6-Proteins bei der Stabilität des tri-snRNP-Partikels *in vivo* bestätigen ließe, sollten anschließende fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Zellen, deren [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung durch die Depletion des hPrp31- und hPrp6-Proteins blockiert wurde, Aufschluss über den Ort der tri-snRNP-Bildung im Zellkern geben.

MATERIAL UND METHODEN 3.

3.1 **Material**

3.1.1 Chemikalien, Feinchemikalien und Medien

Acrylamidlösungen gebrauchsfertig

Roth, Karlsruhe Rotiphorese Gel 30 (30 % Acrylamid, 0.8 % Bis-Acrylamid) Rotiphorese Gel 40 (38 % Acrylamid, 2 % Bis-Acrylamid) Agarose (low melting point) Invitrogen, Niederlande Agarose (NuSieve GTG) BioWhittaker, USA Ammoniumperoxodisulfat (APS) Merck, Darmstadt Ampicillin Sigma, Deisenhofen Bradford-Farbstofflösung Bio-Rad, München Bromphenolblau Merck, Darmstadt CASYton (isotonische Kochsalzlösung) Schaerfe System, Reutlingen Dextransulfat, Natriumsalz Roth, Karlsruhe DMSO (Dimethylsulfoxid) Roth, Karlsruhe DNA-Molekulargewichtsmarker (25 bp) GIBCO, Neusseland DNA-Molekulargewichtsmarker (III, VI) Boehringer, Mannheim Dulbecco's Mod. Eagle Medium (DMEM) GIBCO, Neuseeland DTT (Dithiothreitol) Roth, Karlsruhe DTT (Dithiothreitol; 100 mM) Promega, USA EDTA (Dinatriumsalz Dihydrat) Roth, Karlsruhe Ficoll 400 Amersham Pharmacia, Freiburg Fischspermien-DNA (10 mg/ml) Roche, Mannheim Fötales Rinderserum (FBS) GibcoBRL, Karlsruhe Glukose Sigma, Taufkirchen Glykogen Roche, Mannheim Glycin Merck, Darmstadt Glyzerin Merck, Darmstadt Harnstoff Merck, Darmstadt Heparin Sigma, Deisenhofen Hepes (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure) Calbiochem, USA Imidazol Merck, Darmstadt Kreatinphosphat Sigma, Taufkirchen Lachsspermien-DNA (10 mg/ml), sonifiziert Stratagene, USA LB-Agar **BIO 101, USA** LB-Flüssigmedium **BIO 101, USA** Markerproteine für Elektrophorese Bio-Rad, München Magermilchpulver, instant Heirler, Radolfzell 2-Mercaptoethanol Roth, Karlsruhe Mowiol 4-88 Calbiochem, USA Oligofectamine Invitrogen, Niederlande **OptiMEM 1** GIBCO, Neuseeland
Paraformaldehyd Penicillin/Streptomycin PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) Polyvinylpyrrolidon Ponceau S Protein-A-Sepharose CL-4B

Rinderserumalbumin (BSA), acetyliert Roti-Phenol-Chloroform SDS (Natriumdodecylsulfat) SulfoLink Kopplungsgel TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylenethylendiamin) Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) Triton X-100 tRNA *E. coli* Trypsin-EDTA Tween 20 Xylencyanol FF Wasserbadkonservierer Merck, Darmstadt Biochrom, Berlin Roche, Mannheim Roth, Karlsruhe Serva, Heidelberg Amersham Pharmacia, Freiburg Sigma, Taufkirchen Roth, Karlsruhe Serva, Heidelberg Pierce, USA Sigma, Taufkirchen Roth, Karlsruhe Sigma, Taufkirchen Boehringer, Mannheim GIBCO, Neuseeland Sigma, Taufkirchen Fluka, Schweiz Roth, Karlsruhe

Alle hier nicht aufgeführten Standardchemikalien, organischen Substanzen und Lösungsmittel (Reinheitsgrad p.a.) wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma (Taufkirchen), Serva (Heidelberg) oder Fluka (Schweiz) bezogen.

3.1.2 Antiseren und monoklonale Antikörper

monoklonaler Coilin-Antikörper (5P10π)

monoklonaler SC35-Antikörper monoklonaler Sm-Antikörper anti-SF3a120 Kaninchenserum anti-SF3b14a Kaninchenserum ("Bill", Pep24.1) anti-hPrp3 Kaninchenserum ("Berti") anti-hPrp4 Kaninchenserum ("Roy") anti-hPrp31 Kaninchenserum ("Roy") anti-40K Kaninchenserum ("Paul") anti-hPrp6 Kaninchenserum ("Josy") anti-hSnu114 Kaninchenserum ("Stan") anti-hLSm4 Kaninchenserum ("Super Mario") anti-p110 Kaninchenserum ("SART3-C")

Ziege-anti-Kaninchen Antikörper, Peroxidase-gekoppelt M. Carmo-Fonseca, Portugal (Almeida et al., 1998) Sigma, Taufkirchen J.A. Steitz, USA (Lerner et al., 1981) AG Lührmann (Will et al., 2001) AG Lührmann (Will et al., 2001) AG Lührmann (Lauber et al., 1997) AG Lührmann (Makarova et al., 2002a) AG Lührmann (Makarov et al., 2000) AG Lührmann (Makarov et al., 2000) AG Lührmann (Fabrizio et al., 1997) AG Lührmann (Achsel et al., 1997) AG Lührmann (Achsel et al., 1997) AG Lührmann (Schaffert et al., 2004)

Jackson Immunoresearch, USA

Ziege-anti-Maus Antikörper,	Molecular Probes, USA
Alexa 488-gekoppelt	
Ziege-anti-Maus Antikörper,	Molecular Probes, USA
Alexa 647-gekoppelt	
Ziege-anti-Kaninchen Antikörper,	Molecular Probes, USA
Texas Red-gekoppelt	

3.1.3 Enzyme und Enzyminhibitoren

Restriktionsendonukleasen RNase A (1 mg/ml) RNasin (40 U/µl) RQ DNase I (1 U/µl) SP6 RNA Polymerase (20 U/µl) New England Biolabs, Frankfurt Ambion, USA Promega, USA Promega, USA Promega, USA

3.1.4 Nukleotide

Nukleosid-5'-Triphosphate	(ATP, CTP, GTP, UTP; je 100 mM)
m ⁷ G (5′)ppp(5′)G Cap	(7-Monomethyl-diguanosin Triphosphat)

Radionukleotide (alle mit 10 mCi/ml)[α-32P] UTP3000 Ci/mmol[α-32P] dATP3000 Ci/mmol

Alle aufgelisteten Nukleotide und Radionukleotide wurden von der Firma Amersham Pharmacia Biosciences (Freiburg) bezogen.

3.1.5 DNA-Oligonukleotide

Tabelle 3.1 Verwendete DNA-Oligonukleotide.

Oligo	Beschreibung	Sequenz
U1-Cy3	am 5′-Ende mit fluoreszierendem Cyan 3 (Cy3) markiert	5'-CCTTCGTGATCATGGTATCTCCCCTGCCAGGTAAGTAT-3'
U2-Cy3	am 5′-Ende mit fluoreszierendem Cyan 3 (Cy3) markiert	5'-GAACAGATACTACACTTGATCTTAGCCAAAAGGCCGAGAAGC-3'

U4-Cy3	am 5′-Ende mit fluoreszierendem Cyan 3 (Cy3) markiert	5'-TCACGGCGGGGTATTGGGAAAAGTTTTCAATTAGCAATAATCGCGCCT-3'	
U5-Cy3	am 5′-Ende mit fluoreszierendem Cyan 3 (Cy3) markiert	5'-CTCTCCACGGAAATCTTTAGTAAAAGGCGAAAGATTTATACGATTTGAAGAG-3'	
U6-Cy3	am 5′-Ende mit fluoreszierendem Cyan 3 (Cy3) markiert	5'-CACGAAIIIGCGIGICAICCIIGCGCAGGGGCCAIGCIAAIC-3'	
Oligo (dT)	jedes zehnte Nukleotid mit Rhodamin markiert	5′-(dT) ₅₀ -3′	

Die aufgelisteten DNA-Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) hergestellt.

3.1.6 siRNA-Oligonukleotide

Tabelle 3.2 Verwendete siRNA-Oligonukleotide.

siRNA	Beschreibung	Sequenz	
BB1/ Luzif.	siRNA gegen die mRNA des Luziferase-Proteins (X65324) des Leuchtkäfers (Photinus pyralis), Position 153-173 im ORF (Elbashir et al., 2001b)	5'-CACGUACGCGGAAUACUUCGAAA-3'	
AS1/ SF3b14a	siRNA gegen die mRNA des SF3b14a-Proteins (NM_016047), Position 210-232 im ORF	5'-AAGAAUGCAUGUGAUCACCUATC-3'	
AS2/ SF3b14a	siRNA gegen die mRNA des SF3b14a-Proteins (NM_016047), Position 403-425 in 3' UTR	5'-UAAAUCCCACGAAUGACAACUAC-3'	
AS4/ SF3b14a	siRNA gegen die mRNA des SF3b14a-Proteins (NM_016047), Position 405-427 in 3' UTR	5'-AAUCCCACGAAUGACAACUACCA-3'	
EA1/ hPrp31	siRNA gegen die mRNA des hPrp31-Proteins (NM_015629), Position 220-242 im ORF	5'-AAGCCAAAGCUUCAGAAGUGAUG-3'	
EA2/ hPrp31	siRNA gegen die mRNA des hPrp31-Proteins (NM_015629), Position 1648-1706 in 3' UTR	5'-CAGUAUGGGCUAGAGCAGGUCUU-3'	

EA3/ hPrp31	siRNA gegen die mRNA des hPrp31-Proteins (NM_015629), Position 1533-1555 in 3' UTR	5'-AAGGGACACAGAGGUCCAGUCCU-3'
AL5/ hPrp6	siRNA gegen die mRNA des hPrp6-Proteins (NM_012469), Position 969-991 im ORF	5'-AAGCUACAAGUAGCUCGGAACCU-3'
AL6/ hPrp6	siRNA gegen die mRNA des hPrp6-Proteins (NM_012469), Position 2828-2850 in 3' UTR	5'-GAGCGGUUGCCAUGGCCGGUCUC-3'
AL7/ hPrp6	siRNA gegen die mRNA des hPrp6-Proteins (NM_012469), Position 2838-2860 in 3' UTR	5'-CAUGGCCGGUCUCCGUGGGGCAG-3'
AL8/ hPrp6	siRNA gegen die mRNA des hPrp6-Proteins (NM_012469), Position 2858-2880 in 3' UTR	5'-CAGGGUUGGGCCGCAUGUGGAAG-3'
CT1/ hPrp8	siRNA gegen die mRNA des hPrp8-Proteins (NM_006445), Position 5400-5422 im ORF	5'-AAGCCCAUCAACGGAGCCAUCUU-3'

Die aufgeführten siRNA-Oligonukleotide wurden entweder von Markus Hossbach und Heiko Manninga (Abteilung Zelluläre Biochemie, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen) entworfen und synthetisiert oder von der Firma Dharmacon (USA) hergestellt. Die in der Tabelle angegebenen Nummern in Klammern geben den GenBank-Eintrag wieder. Die Positionen der Zielsequenzen sind relativ zur Position des ersten Nukleotids des Startcodons angegeben.

3.1.7 Plasmide

Tabelle 3.3 Verwendete Plasmide.

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pHU1	pGEM-1-Vektor mit Sequenz der humanen U1 snRNA unter Kontrolle des SP6-Promotors; linearisiert mit Pst1; Amp ^R	Patton et al., 1987
pMRG3U2-27	pGEM-3Zf(+)-Vektor mit Sequenz der humanen U2 snRNA unter Kontrolle des T7-Promotors; linearisiert mit BamHI; Amp ^R	Jacobson et al., 1993
phU4	pUC13-Vektor mit Sequenz der humanen U4 snRNA unter Kontrolle des SP6-Promotors; linearisiert mit Dral; Amp ^R	Wersig und Bindereif, 1990

phU5	pEMBL 8(+)-Vektor mit Sequenz der humanen U5 snRNA unter Kontrolle des T7-Promotors; linearisiert mit <i>Hind</i> III; Amp ^R	A. Bindereif, Gießen
phU6	pUC13-Vektor mit Sequenz der humanen U6 snRNA unter Kontrolle des SP6-Promotors; linearisiert mit BamHI; Amp ^R	Bindereif et al., 1990
pMINX	U2-abhängiges Prä-mRNA Konstrukt (MINX) in pSP65-Vektor unter Kontrolle des SP6-Promotors; linearisiert mit BamHI; Amp ^R	Zillman et al., 1988

3.1.8 Zelllinien

HeLa SS6 ZellenShooter und Gey, 1952(menschliche Cervixkarzinomzellen)

3.1.9 Bakterienstämme

Escherichia coli Stamm XL-1 blue; Tet^R

3.1.10 Allgemeine Puffer

<u>10 x PE</u>	<u>S pH 7.4 oder pH 8.0</u>	<u>10 x TBE</u>	
Lösung) A:	0.89 M	Tris
0.2 M	K ₂ HPO ₄	0.89 M	Borsäure
1.3 M	NaCl	25 mM	EDTA pH 8.0

Lösung B: 0.2 M KH₂PO₄ 1.3 M NaCl

Um den pH-Wert von 7.4 einzustellen, wurde Lösung A mit Lösung B austitriert.

3.1.11 Käufliche Reaktions-Sets (Kits)

ECL Western Blot Detection Kit

In situ Cell Death Detection Kit Prime It II Random Primer Labeling Kit QIAgen Plasmid Mini/Maxi Preparation Kit QIAquick Gel Extraction Kit Amersham Pharmacia, Freiburg Roche, Penzberg Stratagene, USA Qiagen, Hilden Qiagen, Hilden

Stratagene, USA

3.1.12 Arbeitsmaterialien

Dialysemembranen MWCO 6000-8000 Da Einmalpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml) Deckgläschen, rund (12 mm) Elektroporationsküvetten (0.4 cm Elektrodenabstand) Elektroporationsküvetten (0.2 cm Elektrodenabstand) Slide-A-Lyzer Mini-Dialyseeinheiten (MWCO 7000 Da; Volumen max. 0.1 ml) Slide-A-Lyzer Dialysekassetten (MWCO 7000 Da; Volumen max. 0.5 ml) Nylonmembran Hybond XL

Nesco-/Parafilm Pipetten (verstellbar) Pipettierhilfe "pipettus-akku" ProbeQuant™ G-50 Säulen

Protran Nitrozellulose Membran Reaktionsgefäße (verschiedene Größen) Röntgenfilme BioMax MR Magnetrührstäbchen (Länge und Durchmesser 2.5 mm) Objektträger Sterican Kanülen Spinocan Luer Lock Kanülen Spritzen (verschieden Größen) Sterilfilter 0.2 µm, 0.45 µm Whatman 3MM Papier Zellkulturflaschen (verschiedene Größen) Zellkulturplatten (verschiedene Ausführungen) Zellschaber (Rubberpoliceman)

3.1.13 Geräte

Autoklav, Varioklav Dampfsterilisator

Biofuge frescoOberschleißheimBiofuge picoKendro, USABiofuge picoKendro, USACASYcounter TTSchärfe System, ReDampfsterilisatoren, VarioklavH+P Labortechnik,Elektroporationssystem Gene Pulser XCell™ mit CE-ModulBio-Rad, MünchenElektroporationssystem MicroPulserBio-Rad, MünchenGeldokumentationsanlageBio-Rad, MünchenGelelektrophoreseapparaturenBio-Rad, München

Geltrockner Modell 583 "head-over-tail"-Rotor SpektraPor, USA Greiner, Frickenhausen Menzel-Gläser, Marienfeld Bio-Rad, München Bio-Rad, München Pierce, USA

Pierce, USA

Amersham Pharmacia, Freiburg Roth, Karlsruhe Eppendorf, Hamburg Hirschmann, Eberstadt Amersham Pharmacia, Freibura Schleicher & Schüll, Dassel Eppendorf, Hamburg Kodak, USA Schütt, Göttingen Menzel-Gläser, Marienfeld Braun, Melsungen Braun, Melsungen Braun, Melsungen Millipore, Frankreich Whatman Paper, UK Sarstedt, Nürnbrecht Greiner, Frickenhausen Sarstedt, Nürnbrecht

Tecnomara, Schweiz/ H+P Labortechnik, Oberschleißheim Kendro, USA Kendro, USA Schärfe System, Reutlingen H+P Labortechnik, München Bio-Rad, München Bio-Rad, München Bio-Rad, München Bio-Rad, München/ Institutswerkstatt Bio-Rad, München Cole-Parmer, USA Hybridisierungsofen

Megafuge 1.0R

Mikroskope

•

.

pH-Meter

Inkubationsschränke BBD 6220

Inkubationsschüttler, Multitron

Phosphorimager Typhoon 8600

Magnetrührer RCT basic

Sorvall HB-6 Rotor

Sorvall SS-34 Rotor

Sorvall SLA-1500

TRANS-BLOT Cell

Wärmeblöcke

Vortex

UV-Stratalinker 2400

Wasserbad Typ 1012

Röntgenfilmentwickler X-Omat 2000

Sorvall Zentrifuge RC 5B/Evolution

Spektrophotometer Ultrospec 3000 pro

Sterilbank Hera Safe, Klasse 2, Typ H

Speed Vac Konzentrator 5301

Inkubationsschränke BK-600

Hochspannungstransformator EPS 2A 2000

Hochspannungstransformator EPS 3501/XL

Inverses Mikroskop Axiovert 25

Inverses Zeiss LSM 510 META

Laser Scanning Mikroskop Milli-Q-Wasseraufbereitungsanlage

Hoefer Pharmacia Biotech, USA Amersham Pharmacia, Freiburg Hybaid Biometra, UK Kendro, USA Kendro, USA Infors, Schweiz Kendro, USA Zeiss, Jena Inverses Leica DM/IRB Mikroskop/CCD-Kamera Leica, Solms/Visitron Systems Puchheim Zeiss, Jena Millipore, USA Mettler Toledo, Schweiz Amersham Pharmacia, Freiburg Kodak, USA Janke & Kunkel, Staufen i. Br. Kendro, USA Kendro, USA Kendro, USA Kendro, USA Eppendorf, Hamburg Amersham Pharmacia, Freiburg Kendro, USA Beckman/Packard, USA Bio-Rad, München Stratagene, USA Janke & Kunkel, Staufen i. Br. Eppendorf, Hamburg Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel Janke & Kunkel, Staufen i. Br.

Wasserbad HBR4 digital

Szintillationszähler LS 1701

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Standardmethoden

3.2.1.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration wurde die Extinktion einer wässrigen Lösung bei 260 nm gegen einen Referenzwert gemessen. Hierbei gelten die folgenden Umrechnungen (Sambrook et al., 1989):

1 OD₂₆₀ = 50 µg/ml doppelsträngige DNA

- $1 \text{ OD}_{260} = 33 \,\mu\text{g/ml}$ einzelsträngige DNA
- 1 OD₂₆₀ = 40 µg/ml einzelsträngige RNA

3.2.1.2 Phenol-Chloroform-Isoamylextraktion

Die Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (PCA-Extraktion) dient zur Trennung von Proteinen und Nukleinsäuren. Die in wässriger Lösung vorliegende zu extrahierende Probe wurde mit dem gleichen Volumen PCA-Lösung versetzt und intensiv durchmischt. Zur Phasentrennung wurde die Suspension für 5 min zentrifugiert (13 000 U/min, RT). Die obere nukleinsäurehaltige Phase wurden abgenommen und die Nukleinsäuren durch Zugabe von 1/10 Vol. 3 M NaOAc (pH 5.2) und 2.5 Vol. Ethanol in der Anwesenheit von 10 µg Glykogen 1 h bei -80°C oder über Nacht bei -20°C ausgefällt. Die Präzipitate wurden 20 min mit 13 000 U/min abzentrifugiert und die Überstände verworfen. Nachdem die Präzipitate mit kaltem 70% (v/v) Ethanol gewaschen worden waren, wurden sie erneut sedimentiert (13 000 U/min, 20 min, 4°C) und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

PCA-Extraktionslösung 50% (v/v) Phenol 48% (v/v) Chloroform 2% (v/v) Isoamylalkohol, gesättigt mit TE-Puffer <u>TE-Puffer pH 7.5</u> 10 mM Tris/HCl pH 7.5 1 mM EDTA

3.2.1.3 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

Zur Separation von Nukleinsäuren wurde die Agarosegelelektrophorese nach Standardprotokollen durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989). Die Agarosekonzentration innerhalb des Gels wurde abhängig von der Größe der zu trennenden Nukleinsäuren zwischen 0.8% und 4% variiert. Zur Detektion der DNA/RNA wurde den Gelen 0.5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Die DNA/RNA-Proben wurden vor ihrem Auftrag in Probenpuffer aufgenommen und bei 80 -150 V in 1 x TBE Puffer gelelektrophoretisch getrennt. Die Nukleinsäure-Banden wurden im Anschluss mit Hilfe von UV-Licht (365 nm) sichtbar gemacht.

Agarose-DNA Probenpuffer (5 x):	
0.25% (w/v) Bromphenolblau	
0.25% (w/v) Xylencyanol FF	
30% (v/v) Glycerin	

<u>Agarose-RNA Probenpuffer (5 x)</u> 30% (w/v) Sucrose 0.25% (w/v) Xylencyanol FF

3.2.1.4 Denaturierende Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von RNA-Fragmenten bis zu einer Länge von 2000 Nukleotiden wurde die denaturierende Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese eingesetzt. Größe Je nach der zu trennenden Fragmente wurde die Polyacrylamidkonzentration zwischen 8% und 14% variiert (Sambrook et al., 1989). Die zu analysierende RNA wurde in RNA-Probenpuffer gelöst und vor ihrem Auftrag auf das Gel 3 min bei 95°C denaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte unter Verwendung von 0.5 x TBE bei 20 mA. Während radioaktiv-markierte UsnRNA Moleküle durch Autoradiographie detektiert wurden, erfolgte die Charakterisierung aufgetrennter, nicht-markierter U snRNAs durch eine sich anschließende Northern Blot Analyse (siehe 3.2.1.9)

Gellösung	<u>RNA-Probenpuffer</u>
8 M (w/v) Harnstoff	80 % deionisiertes Formamid
8 % -12 % Rotiphorese Gel 40	1 mM EDTA pH 8.0
1 x TBE	0.025 % (w/v) Bromphenolblau
	0.025 % (w/v) Xylencyanol FF
pro 30 ml Gellösung:	
180 µl 10 % (w/v) APS und 18 µl TEMED	Lagerung bei -20 °C

3.2.1.5 Elektrotransformation von Plasmiden und deren Isolierung

Die Präparation elektrokompetenter Bakterienzellen (*E.coli* XL-1 blue) erfolgte nach der von (Dower *et al.*, 1988) beschriebenen Methode unter Verwendung einer zehnprozentigen Glyzerinlösung. Für die Elektrotransformation von Plasmiden wurde ein Aliquot elektrokompetenter Bakterienzellen auf Eis aufgetaut und mit 50 ng Plasmid-DNA versetzt. In einer vorgekühlten Elektroporationsküvette (0.2 cm Elektrodenabstand) wurden die Bakterien dann für 4.8 ms einer elektrischen Spannung von 2.3 kV ausgesetzt und anschließend in 1 ml LB-Medium resuspendiert (Dower *et al.*, 1988; Taketo, 1988). Dazu wurde *E. coli* XL-1 blue Zellen Nach einstündiger Inkubation bei 37°C unter Schütteln wurden 200 µl der Bakterienkultur auf selektiven LB-Nährböden ausplattiert und über Nacht bei 37°C angezogen. Zur präparativen Isolierung von Plasmid-DNA nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) wurden einzelne Bakterienkolonien über Nacht bei 37°C in selektivem LB-Medium angezogen. Die zur Isolierung der Plasmid-DNA verwendeten Reaktions-Sets (Qiagen Kits) wurden entsprechend der Angaben des Herstellers benutzt (siehe 3.1.11).

3.2.1.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Plasmiden

Plasmid-DNA wurde mit sequenzspezifischen Restriktionsendonukleasen wurde nach Standardprotokollen (Sambrook *et al.*, 1989) oder nach den Angaben des Herstellers (New England Biolabs) geschnitten. Die Restriktionsfragmente wurden auf einem präparativen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 3.2.1.3) und anschließend mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen; siehe 3.1.11) aus diesem isoliert.

Die Ethanol-präzipitierte DNA wurde in ddH₂O resuspendiert und ihre Konzentration photometrisch bestimmt (siehe 3.2.1.1).

3.2.1.7 Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden

DNA-Sonden zur Detektion der komplementären U snRNAs in einer Northern Blot Analyse wurden mit Hilfe des *Prime It II Random Primer Labeling Kit* (Stratagene) nach Angaben des Herstellers radioaktiv markiert. Als Matrize dienten 25-50 ng der DNA, die die kodierende Region der entsprechenden U snRNA enthielt. Diese DNA-Matrizen wurden mittels Restriktion aus den entsprechenden Plasmiden herausgeschnitten (siehe 3.2.1.3 und 3.2.1.6) und anschließend nach Protokoll des Herstellers unter Verwendung von [α -³²P] dATP (3000Ci/mmol) radioaktiv markiert. Die radioaktiven DNA-Sonden wurden mittels Gelfiltration (*ProbeQuant*TM *G-50 Säule*) von nicht eingebauten, radioaktiven Nukleotide gereinigt. Um die Aktivität der Sonde zu bestimmen wurde die Cerenkov-Strahlung eines Mikroliters dieses Eluats gemessen. Für Northern Blot Analysen wurden im Schnitt 2 - 3 x 10⁷ cpm einer Sonde eingesetzt.

3.2.1.8 Northern Blot Analyse

Die Northern Blot Analyse ermöglicht die spezifische Detektion eines RNA-Moleküls unter Verwendung einer komplementären, radioaktiv-markierten DNA-Sonde (3.2.1.7). In dem nach Standardprotokollen durchgeführten Verfahren (Sambrook et al., 1989) wurde die zu analysierende RNA im Nassblotverfahren bei 17 V Nacht elektrophoretisch aus einem denaturierenden über Polyacrylamidgel auf eine Nylonmembran transferiert und durch Bestrahlung mit dieser quervernetzt. 120 mJ/cm² UV-Licht kovalent mit Unspezifischen Nylonmembran Bindungsstellen der wurden anschließend durch eine Vorinkubation mit Heringsspermien-DNA enthaltender Prä-Hybridisierungslösung (2 h bei 42°C) abgesättigt. Zur Detektion der RNA-Moleküle wurde die Nylonmembran für 48 - 72 Stunden mit den radioaktiv-markierten DNA-Sonden hybridisiert. Um unspezifisch gebundene Sondenmoleküle zu entfernen, wurde die Membran zweimal 5 min mit 2 x SSC, 0.5% (w/v) SDS, zweimal 5 min mit 2 x SSC, 0.1% (w/v) SDS bei RT und zum Abschluss mit 2 x SSC, 0.1% (w/v) SDS bei 50°C gewaschen, bevor die detektierten RNAs mittels einer Autoradiographie visualisiert wurden.

<u>Prä-Hybridisierungslösung</u> 25 mM Natriumphosphat pH 6.5 6 x SSC 5 x Denhardt 's 0.5% SDS 50% deionisiertes Formamid 0.2 mg/ml denaturierte Heringsspermien-DNA 20 x SSC 300 mM Natriumcitrat 3 M NaCl

100 x Denhardt´s 2% (w/v) Polyvinylpyrrolidon 2% (w/v) BSA 2% (w/v) Ficoll 400

<u>Hybridisierungslösung</u> wie Prä-Hybridisierungslösung plus 2 – 3 x 10⁷ cpm der jeweiligen radioaktivmarkierten Sonde <u>Blotkammerpuffer</u> 25 mM Natriumphosphat pH 6.5

Die Membran konnte zur erneuten Hybridisierung mit anderen Sonden wieder

verwendet werden, wenn die bereits gebundenen Sonden durch zehnminütiges Kochen in einer Lösung, bestehend aus $1 \times SSC$ und 0.1% (w/v) SDS entfernt wurden.

3.2.1.9 In vitro Transkription zur Herstellung radioaktiv markierter RNA

Zur Herstellung radioaktiver RNA-Transkripte wurde eine *in vitro* ("run-off") Transkription von einer DNA-Matrize (Plasmid) in Anwesenheit eines radioaktiv markierten Nukleotids durchgeführt. Dazu wurde Plasmid-DNA zunächst mit Hilfe einer geeigneten Restriktionsendonuklease linearisiert (siehe 3.2.1.6). Die Reaktion zur Herstellung eines radioaktiven Prä-mRNA-Transkriptes (MINX PrämRNA) zur Spleißanalyse erfolgte für 2 Stunden bei 37°C und wurde folgendermaßen angesetzt:

Reaktionsansatz (MINX Prä-mRNA)2 μl linearisiertes Plasmid (1 μg/μl)5 μl 5 x RNA-Transkriptionspuffer1 μl 25 x NTP-Mix2.5 μl DTT (100 mM)1 μl RNasin (40 U/μl)2 μl [α -³²P] UTP (3000 Ci/mmol)1 μl BSA, acetyliert (1 mg/ml)2.5 μl G(5')ppp(5')G Cap (10 mM)2 μl SP6 Polymerase (20 U/μl)ad 25 μl ddH₂O

25 x NTP-Mix 2.5 mM ATP, GTP, CTP 1.25 mM UTP

Im Anschluss an diese Reaktion wurden die Transkripte elektrophoretisch von freien Nukleotiden und unvollständigen Transkripten über ein denaturierendes Polyacrylamidgel (1 mm) getrennt (siehe 3.2.1.4). Das volllange Transkript wurde aus dem Gel ausgeschnitten, zerkleinert und mit 500 µl RNA-Elutionspuffer versetzt. Die Elution erfolgte über Nacht bei 4 °C in einem *"head-over-tail"*-Rotor. Das aus dem Gel eluierte Transkript wurde anschließend durch eine PCA-Extraktion gereinigt und durch Zugabe von Ethanol (abs.) präzipitiert (siehe 3.2.1.2). Das radioaktive MINX Prä-mRNA-Transkript wurde in einem geeigneten Volumen ddH₂O gelöst und die Radioaktivität durch Messung der Cherenkov-Strahlung in einem Szintillationszähler bestimmt. Aus diesem Wert wurde unter Berücksichtigung der eingesetzten Menge an [α -³²P] UTP die spezifische Aktivität

des Transkripts berechnet.

<u>RNA-Elutionspuffer</u> 500 mM NaOAc pH 5.3 1 mM EDTA 2.5% (v/v) 1:1 Phenol/Chloroform

3.2.2 Proteinbiochemische Standardmethoden

3.2.2.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen in wässriger Lösung erfolgte mit Hilfe des Bradford-Assays. Diese Methode beruht auf der Anfärbung von Proteinen mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blau in phosphorsaurer Lösung (Bearden, 1978). Die Proteinprobe wurde mit Wasser auf ein Volumen von 800 µl verdünnt und mit 200 µl der Farbstofflösung (Bio-Rad Protein Assay) versetzt. Anschließend wurde die Extinktion der Lösung bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch bestimmt und die Konzentration durch den Vergleich mit einer Standardkurve (verschiedene bekannte BSA-Konzentrationen) ermittelt.

3.2.2.2 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zur analytischen Trennung von Proteinen wurde nach (Laemmli, 1970) durchgeführt. In Abhängigkeit von dem zu trennenden Proteingemisch wurden der Vernetzungsgrad und die Größe der Gele variiert. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden 13%ige bzw. 8%ige Polyacrylamidgele (37.5 : 1 Acrylamid : Bisacrylamid, 1 mm) mit einer erhöhten TEMED Konzentration (0.33% v/v) verwendet. Die Proteinproben wurden vor dem Auftrag auf das Gel in Proteinprobenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95°C aufgekocht, um eine vollständige Denaturierung der Proteine zu gewährleisten. Anschließend wurden die Proben auf das Gel aufgetragen und die Proteine bei 15 – 25 mA im Sammelgel fokussiert und anschließend bei 30 - 45 mA aufgetrennt. Proteinprobenpuffer 75 mM Tris/HCl pH 6.8 1.25 mM EDTA 2.5% (w/v) SDS 20% (w/v) Glyzerin 0.1% (w/v) Bromphenolblau 50 mM DTT

Sammelgelpuffer (4 x) 500 mM Tris/HCl pH 6.8 0.4% (w/v) SDS Proteinlaufpuffer 25 mM Tris/HCI pH 8.8 192 mM Glycin 0.1% (w/v) SDS

Trenngelpuffer (4 x) 1.5 M Tris/HCl pH 8.8 0.4% (w/v) SDS

5%ige Sammelgellösung

1.7 ml Rotiphorese Gel 30 (30% Acrylamid : 0.8% Bisacrylamid) 1 x Sammelgelpuffer (125 mM Tris/HCl pH 6.8, 0.1% (w/v) SDS) ad 10 ml mit dd H_2O plus 50 µl 10% (w/v) APS und 25 µl TEMED

8%ige Trenngellösung

8 ml Rotiphorese Gel 30 (30 % Acrylamid : 0.8% Bisacrylamid) 1 x Trenngelpuffer (375 mM Tris/HCl pH 8.8, 0.1% (w/v) SDS) ad 30 ml mit dd H₂O plus 110 μ l 10% (w/v) APS und 110 μ l TEMED

13%ige Trenngellösung

13 ml Rotiphorese Gel 30 (30% Acrylamid : 0.8% Bisacrylamid) 1 x Trenngelpuffer (375 mM Tris/HCl pH 8.8, 0.1% (w/v) SDS) ad 30 ml mit dd H_2O plus 110 µl APS und 110 µl TEMED

3.2.3 Immunologische Methoden

3.2.3.1 Affinitätsaufreinigung von Antikörpern

Zur Aufreinigung von Antikörpern aus Immunserum wurden an SulfoLink-Säulenmaterial (Volumen 2 ml) gekoppelte Peptide benutzt. Dabei handelte es sich jeweils um das Peptid, gegen das der Antikörper ursprünglich generiert worden war. Vor Beginn der Aufreinigung wurde die Peptidsäule viermal mit je 10 ml 1 x PBS (pH 8.0) gewaschen. Anschließend wurden 9 ml Immunserum mit 1 ml 10 x PBS (pH 8.0) versetzt, sterilfiltriert und komplett auf das Säulenmaterial aufgetragen. Nach einstündiger Inkubation in einem *"head-over-tail"*-Rotor bei Raumtemperatur wurde die Säule fünfmal mit je 10 ml 1 x PBS (pH 8.0) gewaschen und der Antikörper durch Zugabe von 10 x 500 µl 100 mM Glycin (pH 2.7) von der Säule eluiert. Zur Neutralisation wurde das Eluat sofort mit 25 µl 1 M Tris/HCI (pH 9.5) versetzt. Im Anschluss an die Proteinbestimmung der einzelnen Fraktionen (siehe Abschnitt 3.2.21) wurden die proteinreichsten Fraktionen vereinigt und über Nacht bei 4°C gegen 1 I 1 x PBS (pH 8.0) dialysiert. Die aliquotierten Antikörper wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Peptidsäule wurde durch viermaliges Waschen mit jeweils 10 ml 1 x PBS (pH 8.0) und zweimaliges Waschen mit 1 x PBS (pH 8.0)/0.05 % NaN₃ regeneriert und anschließend in 10 ml 1 x PBS (pH 8.0)/0.05 % NaN₃ bei 4°C gelagert.

3.2.3.2 Immunoblot (Western Blot)

Bei der Western Blot Analyse werden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine nach Standardprotokollen im Nassblotverfahren elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Burnette, 1981; Towbin et al., 1979). Der Transfer erfolgte entweder 2 Stunden bei 60 V oder über Nacht bei 20 V und wurde durch eine reversible Anfärbung der Proteine mit Ponceau S überprüft. Hierzu wurde die Membran auf dem Rotationsschüttler mit der Farbstofflösung inkubiert (1 min bei RT) und anschließend bis zum gewünschten Kontrast mit ddH₂O entfärbt. Vor der Inkubation mit den spezifischen Antikörpern wurden unspezifische Bindungsstellen der Membran zunächst durch Inkubation mit Magermilch-Lösung (5 % (w/v) Magermilchpulver in 1 x TBS-Tween) abgesättigt. Zum spezifischen Nachweis der transferierten Proteine wurde die Membran 1 Stunde bei RT mit in 1 x TBS-Tween / 1 % Milchpulver verdünnten Antiseren inkubiert (primärer Antikörper). Die jeweilige Konzentration der Antiseren variierte mit der Empfindlichkeit des Serums. Anschließend wurde die Membran zunächst mit 1 x TBS-Tween gewaschen (1 x 15 min und 2 x 5 min) und im nächsten Schritt mit dem sekundären Peroxidase-gekoppelten anti-Kaninchen IgG Antikörper inkubiert, der in einer Verdünnung von 1:50 000 in 1% Milchpulver /1 x TBS-Tween eingesetzt wurde. Zur Entfernung ungebundener Antikörper wurde die Membran viermal mit 1 x TBS-Tween gewaschen. Die Detektion der durch den primären Antikörper erkannten Proteine erfolgte durch ECL (enhanced <u>chemiluminescence</u>) laut Herstellerprotokoll.

Zur Vorbereitung der Membran für eine erneute ECL-Detektion wurden die zuvor verwendeten Antikörper durch eine 30-minütige Inkubation (50°C) in StrippingPuffer entfernt. Im Anschluss daran konnte die Membran erneut mit Blockierlösung abgesättigt und zur Inkubation mit anderen spezifischen Antikörpern verwendet werden.

<u>Blotkammerpuffer</u>	<u>SLAB 4</u>
1.5 I SLAB 4	50 mM Tris/HCI pH 8.5
0.6 l Methanol	380 mM Glycin
0.9 l ddH2O	0.1% (w/v) SDS
<u>IBS-Tween</u>	Stripping Puffer
20 mM Tris/HCI pH 7.5	100 mM 2-Mercaptoethanol
150 mM NaCl	2% (w/v) SDS
0.05% (v/v) Tween	62.5 mM Tris/HCl pH 6.7
Ponceau S	
0.2% (w/v) Ponceau S	
Verdünnungen der eingesetzten Antikörner	
anti-SE3b14a Kaninchenserum Bill" Pep24 1	1· 1 000
anti-hPro4 Kaninchenserum "Rov"	1: 500
anti-hPrp31 Kaninchenserum 4825"	1. 100
anti-hPrp6 Kaninchenserum "Josv"	1: 2 000
anti-p110 Kaninchenserum "SART3-C"	1: 10 000

3.2.3.3 Immunpräzipitation

Immunpräzipitationsstudien ermöglichen durch die spezifische Antigen-Antikörper-Interaktion die Präzipitation von Protein-Protein- und Protein-RNA-Komplexen, die das spezifische Antigen des Antikörpers enthalten. Die in dieser Arbeit durchgeführten Immunpräzipitationen dienten vor allem der Analyse der U snRNP-Partikel in Zellen, die mit unterschiedlichen siRNAs behandelt worden waren. In den gezeigten Experimenten wurden vorwiegend die U4/U6 di-snRNPund [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikel der Extrakte unter Verwendung polyklonaler, spezifischer Antikörper (hier anti-40K, anti-hPrp4, anti-hPrp31 und anti-p110) untersucht (siehe 3.1.2).

Im ersten Reaktionsschritt wurden 50 µl des polyklonalen Antiserums in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß an 10 µl Protein-A-Sepharose (PAS) gekoppelt. Dazu wurde die Protein-A-Sepharose zunächst mit PBS (pH 7.4) äquilibriert und nach Zugabe des Antikörpers in einem Volumen von 250 µl (aufgefüllt mit 4 %

BSA/1 x PBS) auf einem "head-over-tail"-Rotor bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde das Konjugat kurz abzentrifugiert, 3 x mit je 1 ml IPP₁₅₀ Puffer gewaschen und auf die einzelnen Reaktionsansätze verteilt. In der folgenden Immunpräzipitation wurden jeweils 100 µg Gesamtprotein der verschiedenen Kernextrakte pro Reaktion eingesetzt. Diese wurden mit den an die Protein-A-Sepharose gekoppelten Antikörpern für 1.5 Stunden bei 4 °C in einem "head-over-tail"-Rotor inkubiert. Im Anschluss an diese Inkubation wurden die Ansätze insgesamt 5 x mit IPP₁₅₀ gewaschen, wobei der komplette Reaktionsansatz in der dritten Waschung in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde, um den Hintergrund, verursacht durch unspezifische Bindung von U snRNP-Partikeln an die Wände des Reaktionsgefäßes, zu minimieren. Die präzipitierten UsnRNP-Partikel wurden durch Zugabe eines SDS-haltigen Elutionspuffers und anschließendes Erhitzen auf 90°C von der Protein-A-Sepharose getrennt und die RNA-Komponenten der Präzipitate mittels einer PCA-Extraktion isoliert und in Ethanol (abs.) präzipitiert (siehe 3.2.1.2). Die getrockneten RNA-Pellets wurden in 8 µl RNA-Probenpuffer aufgenommen und auf einem denaturierenden 10 % Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt (siehe 3.2.1.4). Die Identifikation und Visualisierung der einzelnen UsnRNAs erfolgte durch eine Northern Blot Analyse unter Verwendung der entsprechenden radioaktiv markierten DNA-Sonden mit anschließender Autoradiographie (siehe 3.2.1.7 und 3.2.1.8).

Immunpräzipitationspuffer 150 (IPP ₁₅₀)	<u>Elutionspuffer</u>
20 mM Tris/HCl pH 7.4	200 mM NaOAc, pH 5.2
150 mM NaCl	1 mM EDTA
0.1% Triton X-100	0.2% (w/v) SDS

3.2.4 Zellkultur

3.2.4.1 Kultivierung von Bakterienzellen

Die E.coli Bakterienzellen wurden unter Standardbedingungen in LB-Flüssigmedium bzw. auf LB-Agar Platten kultiviert (Sambrook *et al.*, 1989). In Abhängigkeit von der Antibiotikaresistenz des in die Bakterienzellen transformierten Plasmids wurde dem Medium 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt. Für die Langzeitlagerung der Bakterien wurden DMSO-Kulturen aus 1 ml Bakterienkultur versetzt mit 70 µl DMSO erstellt, die vor ihrer Lagerung bei -80 °C in Flüssigstickstoff schockgefroren wurden.

<u>LB-Medium</u> 1% (w/v) Bacto-Trypton 0.5% (w/v) Hefeextrakt 1% (w/v) NaCl 1.5% (w/v) Bacto-Agar (nur in LB-Agar-Platten)

3.2.4.2 Kultivierung von HeLa-Zellen

HeLa SS6-Zellen wurden unter adhärenten Wachstumsbedingungen in Zellkulturflaschen bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Bei einer zu etwa 70% konfluent gewachsenen Fläche wurde zunächst das verbrauchte Medium entfernt, die Zellen einmal mit 1 x PBS (pH 7.4) gewaschen und anschließend mit 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der Flasche gelöst (3-5 min bei RT). Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 7 ml Zellkulturmedium abgestoppt und die Zellen gut resuspendiert. Um sicherzustellen, dass sich die Zellen permanent in der exponentiellen Wachstumsphase befinden, wurden sie entsprechend in 12 ml Zellkulturmedium verdünnt und in neue Zellkulturflaschen (75 cm²) ausplattiert.

Zellkulturmedium Dulbecco's Mod. Eagle Medium (DMEM) 10% (v/v) Fötales Rinderserum (FBS) 100 U/ml Penicillin/Streptomycin

Um den Fortbestand der verwendeten Zelllinie zu sichern, wurden in regelmäßigen Abständen Zellen aus der Kultur eingefroren. Dazu wurden Zellen einer etwa 80% dicht bewachsenen Zellkulturflasche (75 cm²) oben beschrieben geerntet und für 3 min bei 800 rpm abzentrifugiert. Das überstehende Medium wurde verworfen, die Zellen in 3 ml Einfriermedium resuspendiert und in 1 ml Aliquots aufgeteilt. Über Nacht wurden diese Zellaliquots dann langsam auf -80°C heruntergekühlt und am nächsten Tag zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Einfriermedium Dulbecco's Mod. Eagle Medium (DMEM) 20% (v/v) FBS 10% (v/v) DMSO

Um die Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden sie schnell in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und tropfenweise mit vorgewärmtem Zellkulturmedium versetzt. Anschließend wurden die Zellen für 3 min bei 800 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 12 ml Zellkulturmedium resupendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Nach Absetzen der Zellen am Boden der Zellkulturflasche, wurde das Medium gewechselt, und die Zellen wurden bis zu einer Dichte von etwa 70% kultiviert.

3.2.5 Mikroskopische Methoden

3.2.5.1 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Zur Untersuchung der Lokalisierung spleißosomaler Proteine in HeLa-Zellen wurde eine indirekte Immunfluoreszenzanalyse mit spezifischen Antikörpern durchgeführt, die mit fluoreszenz-markierten Antikörpern visualisiert wurden. Dazu wurden die adhärent auf Deckgläschen (Durchmesser 12 mm) gewachsenen Zellen einmal in 1 x PBS (pH 7.4) gewaschen und dann für 20 min bei Raumtemperatur in 4% (w/v) Paraformaldehyd/1 x PBS (pH 7.4) fixiert. Anschließend wurden die Zellen einmal in 1 x PBS (pH 7.4) gewaschen und die Zellmembran durch zwanzigminütige Inkubation in 0.2% (v/v) Triton X-100/1 x PBS (pH 7.4) permeabilisiert. Bevor die Zellen mit Protein-spezifischen Antikörpern (siehe 3.1.2) inkubiert wurden, erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen durch 10% (v/v) FBS/1 x PBS (pH 7.4) für 30 min. Erst dann wurden die Deckgläschen mit der zellbewachsenen Seite nach unten auf einen 25 µl Tropfen des in 10 % (v/v) FBS/1 x PBS (pH 7.4) verdünnten Antikörpers gelegt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen viermal je 15 min bei RT mit PBS (pH 7.4) gewaschen. Die Detektion des spezifisch gebundenen Primärantikörpers erfolgte durch einstündige Inkubation mit einem fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper (1:500 verdünnt in 10 % (v/v) FBS/1 x PBS (pH 7.4)), der gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichtet war. Um die lichtempfindlichen Fluoreszenzfarbstoffe nicht zu zerstören, erfolgten dieser und die nachfolgenden Reaktionsschritte im Dunkeln. Zum Abschluss wurden die Zellen erneut viermal für je 15 min bei RT in 1 x PBS (pH 7.4) gewaschen, die Deckgläschen kurz in ddH₂O und in Ethanol (abs.) gespült und getrocknet. Die Montage der Deckgläschen auf Objektträgern erfolgte mit der zellbewachsenen Seite nach unten mittels Mowiol 4-88.

monoklonaler SC35-Antikörper1: 50monoklonaler Coilin-Antikörper (5P10π)1: 20affinitätsaufgereinigter SF3a120-Antikörper1: 40affinitätsaufgereinigter hPrp3-Antikörper ("Berti")1: 10affinitätsaufgereinigter hPrp4-Antikörper ("Roy")1: 200affinitätsaufgereinigter hSnu114-Antikörper ("Stan")1: 200affinitätsaufgereinigter hLSm4-Antikörper ("Super Mario")1: 200	<u>Verdünnungen der eingesetzten Antikörper:</u>		
monoklonaler Coilin-Antikörper (5P10π)1: 20affinitätsaufgereinigter SF3a120-Antikörper1: 40affinitätsaufgereinigter hPrp3-Antikörper ("Berti")1: 10affinitätsaufgereinigter hPrp4-Antikörper ("Roy")1: 200affinitätsaufgereinigter hSnu114-Antikörper ("Stan")1: 200affinitätsaufgereinigter hLSm4-Antikörper ("Super Mario")1: 200affinitätsaufgereinigter hLSm4-Antikörper ("Super Mario")1: 200	monoklonaler SC35-Antikörper	1:	500
affinitätsaufgereinigter SF3a120-Antikörper1: 40affinitätsaufgereinigter hPrp3-Antikörper ("Berti")1: 10affinitätsaufgereinigter hPrp4-Antikörper ("Roy")1: 2 00affinitätsaufgereinigter hSnu114-Antikörper ("Stan")1: 2 00affinitätsaufgereinigter hLSm4-Antikörper ("Super Mario")1: 2 00	monoklonaler Coilin-Antikörper (5Ρ10π)	1:	200
affinitätsaufgereinigter hPrp3-Antikörper ("Berti")1: 10affinitätsaufgereinigter hPrp4-Antikörper ("Roy")1: 2 00affinitätsaufgereinigter hSnu114-Antikörper ("Stan")1: 2 00affinitätsaufgereinigter p110-Antikörper ("SART3-C")1: 1 00affinitätsaufgereinigter hLSm4-Antikörper ("Super Mario")1: 2 00	affinitätsaufgereinigter SF3a120-Antikörper	1:	400
affinitätsaufgereinigter hPrp4-Antikörper ("Roy")1: 2 00affinitätsaufgereinigter hSnu114-Antikörper ("Stan")1: 20affinitätsaufgereinigter p110-Antikörper ("SART3-C")1: 1 00affinitätsaufgereinigter hLSm4-Antikörper ("Super Mario")1: 20	affinitätsaufgereinigter hPrp3-Antikörper ("Berti")	1:	100
affinitätsaufgereinigter hSnu114-Antikörper ("Stan")1: 20affinitätsaufgereinigter p110-Antikörper ("SART3-C")1: 1 00affinitätsaufgereinigter hLSm4-Antikörper ("Super Mario")1: 20	affinitätsaufgereinigter hPrp4-Antikörper ("Roy")	1: 2	000
affinitätsaufgereinigter p110-Antikörper ("SART3-C")1:100affinitätsaufgereinigter hLSm4-Antikörper ("Super Mario")1:200	affinitätsaufgereinigter hSnu114-Antikörper ("Stan")	1:	200
affinitätsaufgereinigter hLSm4-Antikörper ("Super Mario") 1: 20	affinitätsaufgereinigter p110-Antikörper ("SART3-C")	1: 1	000
	affinitätsaufgereinigter hLSm4-Antikörper ("Super Mario")	1:	200

3.2.5.2 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Die Verteilung spleißosomaler U snRNAs in HeLa-Zellen wurde unter Verwendung fluoreszenz-markierter DNA-Oligonukleotide, die eine zu den U snRNAs U1, U2, U4, U5 oder U6 komplementäre Sequenz aufweisen (siehe Abschnitt 3.1.5), untersucht. Diese als Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) bezeichnete Methode wurde, wie im Folgenden beschrieben, basierend auf einem Protokoll von (Taneja *et al.*, 1992) durchgeführt. Adhärent auf Deckgläschen (Durchmesser 12 mm) gewachsene Zellen wurden dreimal in 1 x PBS (pH 7.4) gewaschen, dann für 20 min bei RT in 4% (w/v) Paraformaldehyd/1 x PBS (pH 7.4) fixiert und weitere dreimal mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen. In Ethanol ist es möglich, die Zellen über mehrere Tage bei 4°C zu lagern.

Zu Beginn des eigentlichen Experiments wurden die Zellen 10 min bei RT in 1 x PBS (pH 7.4)/5 mM MgCl₂ rehydriert und anschließend für mindestens 10 min bei RT in 15% (v/v) Formamid/2 x SSC/10 mM Natriumphosphat (pH 7.0) prähybridisiert. Für die Hybridisierung wurden pro Deckgläschen 10 ng des entsprechenden DNA-Oligonukleotids (siehe Abschnitt 3.1.5) mit 10 μ g tRNA und 10 μ g sonifizierter Lachspermien-DNA in einer Vakuumzentrifuge eingedampft und anschließend in 30% (v/v) Formamid/20 mM NaPO₄ (pH 7.0) gelöst. Die auf diese Weise präparierte Sonde wurde mit 10 μ l Hybridisierungslösung versetzt und die

zellbewachsene Oberfläche des Deckgläschens auf einen 20 µl Tropfen dieser Lösung gelegt. Die Hybridisierung erfolgte für mindestens 4 Stunden bei 37°C im Inkubationsschrank (5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit). Um die lichtempfindlichen Fluoreszenzfarbstoffe nicht zu zerstören, erfolgten dieser und die nachfolgenden Reaktionsschritte im Dunkeln. Zum Abschluss wurden die Zellen zweimal 30 min mit 15% (v/v) Formamid/2 x SSC/10 mM Natriumphosphat (pH 7.0) bei 37°C, zweimal 15 min mit 2 x SSC/0.1% (v/v) Triton X-100 bei RT und zweimal 15 min mit 1 x SSC/0.1% (v/v) Triton X-100 bei RT gewaschen. Vor der Montage der Deckgläschen auf Objektträgern mit Mowiol 4-88 wurden die Deckgläschen kurz in ddH₂O und Ethanol (abs.) gespült und getrocknet.

<u>Hybridisierungslösung</u> 20% (w/v) Dextransulfat 4 x SSC 0.4% (w/v) BSA

Im Falle der gleichzeitigen Durchführung einer Immunfluoreszenzanalyse (siehe Abschnitt 3.2.5.1) und einer Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung zur Visualisierung spleißosomaler Proteine und U snRNAs wurden unspezifische Bindungsstellen vor Durchführung der Antikörperinkubation statt mit fötalem Rinderserum (FBS) mit 4% (w/v) BSA/1 x PBS (pH 7.4) abgesättigt, um RNase-Kontaminationen zu vermeiden. Im Anschluss an die Immunfluoreszenzanalyse wurden die auf den Zellen gebundenen Antikörper durch zehnminütige Inkubation mit eiskaltem 100% Methanol fixiert. Anschließend wurde ein weiteres Mal für 3 min mit 4% (w/v) Paraformaldehyd/1 x PBS (pH 7.4) fixiert, und die Zellen wurden anschließend dreimal mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Die weitere Durchführung der Fluoreszenz*in situ* Hybridisierung erfolgte wie bereits beschrieben.

3.2.5.3 RNase-Verdau

Zur Untersuchung der RNA-abhängigen Verteilung spleißosomaler Proteine im Zellkern wurden die Zellen vor der Immunfluoreszenzanalyse einer RNase A-Behandlung unterzogen, die nach einem Standardprotokoll durchgeführt wurde (Spector *et al.*, 1991). Dazu wurden die Zellen einmal mit 1 x PBS (pH 7.4) gewaschen, mit eiskaltem 100% Methanol für 2 min auf Eis fixiert und anschließend ein weiteres Mal mit 1 x PBS (pH 7.4) gewaschen. Zum Abbau der zellulären RNAs wurden die Deckgläschen mit der zellbewachsenen Seite nach unten auf einen 30 µl Tropfen 100 µg/ml RNase A/1 x PBS (pH 7.4) gelegt und 2 h bei 25°C auf einem Heizblock inkubiert. Nach viermaligem Waschen der Zellen mit 1 x PBS (pH 7.4) für 15 min wurden die Zellen 20 min in 4% (w/v) Paraformaldehyd/1 x PBS (pH 7.4) fixiert und, wie unter Abschnitt 3.2.5.1 beschrieben, einer Immunfluoreszenzanalyse unterzogen. Zur Verifizierung des RNA-Abbaus wurde als Kontrolle eine Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung durchgeführt (siehe Abschnitt 3.2.5.2).

3.2.5.4 Fluoreszenzmikroskopie und deren Quantifizierung

Die durch Immunfluoreszenzanalyse und Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung generierten Präparate wurden mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops (Zeiss LSM 510 META) analysiert. Bei allen in dieser Arbeit gezeigten Bildern handelt es sich um einzelne konfokale Schnittbilder (Pinhole-Durchmesser 106 µm, 1.12 Airy Einheiten entsprechend einer Schichtdicke von ungefähr 0.8 µm), die unter Verwendung eines 63 x/1.4 Ölobjektivs mit jeweils denselben Parametern für kontrolltransfizierte und RNAi-depletierte Zellen aufgenommen wurden. Bei der Wahl der entsprechenden Parameter wurde darauf geachtet, dass kein Pixel des Bildes überexponiert war.

Um die Fluoreszenzintensität in den verschiedenen nukleären Kompartimenten zu messen, wurde zuerst der Hintergrund der Bilder basierend auf dem maximalen Hintergrundwert des entsprechenden Histogramms, subtrahiert. Anschließend wurde jeder Zellkern des Bildes manuell definiert. Anhand der Gegenfärbung der Cajal Bodies durch einen Antikörper gegen das Markerprotein Coilin wurde eine Maske erstellt, die es ermöglichte, die Lage der Cajal Bodies in dem zu quantifizierenden Bild exakt zu bestimmen. Dazu wurde die unabhängig generierte "Cajal-Body-Maske" über das entsprechende Bild der durch Immunfluoreszenzfärbung visualisierten spleißosomalen Proteine oder der durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung visualisierten UsnRNAs gelegt und die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der untersuchten spleißosomalen Proteine oder Zeine oder UsnRNAs in den Cajal Bodies präzise bestimmt. Zur Auswertung der Ergebnisse wurde die durchschnittliche Fluoreszenzintensität in den Cajal Bodies

zu derjenigen im Nukleoplasma desselben Zellkerns ins Verhältnis gesetzt. Die Quantifizierung erfolgte unter Zuhilfenahme der Khoros Software (Kohral Inc., New Mexico) und mit intensiver Unterstützung durch Dr. Rainer Heintzmann (Abteilung Molekulare Biologie am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen).

3.2.6 Spezielle Methoden

3.2.6.1 RNA-Interferenz

RNA-Interferenz wurde zuerst als ein antiviraler Mechanismus der Zelle zum Schutz vor RNA-Viren beschrieben (Waterhouse *et al.*, 2001) und bezeichnet den sequenzspezifischen posttranskriptionellen Abbau von mRNAs in der Zelle durch 21 bis 23 Nukleotide lange, doppelsträngige RNA-Moleküle (Elbashir *et al.*, 2001b; Elbashir *et al.*, 2001c; Fire *et al.*, 1998), so genannte <u>small interfering RNAs</u> (siRNAs). Dabei können neben RNA-Viren auch Transposons und andere bidirektional transkribierte repetitive Sequenzen und Gene die Quelle natürlich vorkommender siRNAs sein(Matzke und Birchler, 2005).

Die Reifung von siRNA im Cytoplasma der Zelle ist ein schrittweiser Prozess, bei dem lange doppelsträngige (ds) RNA-Moleküle durch die dsRNA-spezifische Endonuklease Dicer in 21 Nukleotide lange dsRNA-Moleküle prozessiert und in einen funktionellen Ribonukleoprotein-Komplex (RNP-Komplex) eingebaut werden, der als *RNA-induced silencing Complex* (RISC) bezeichnet wird. Innerhalb des RISC-Komplexes kommt es durch die Aktivität verschiedener Proteine zur Auflösung der RNA-Duplexstruktur und zum Abbau der zur Sequenz der siRNA komplementären mRNA (Dykxhoorn *et al.*, 2003; McManus und Sharp, 2002; Meister und Tuschl, 2004). Dadurch kann das in dieser mRNA codierte Protein nicht mehr synthetisiert werden.

Dieser für eine Vielzahl unterschiedlicher eukaryontischer Organismen beschriebene Mechanismus (Baulcombe, 2004; Tijsterman et al., 2002; Ullu et al., 2004) kann aufgrund des gezielten Abbaus einer mRNA zur funktionellen Charakterisierung neuer Gene insbesondere im humanen System eingesetzt werden. Dazu können synthetische 21-23-mere siRNA-Duplices durch Transfektion in humane Zellen eingebracht werden, die wie die natürlich vorkommenden siRNAs in den RISC-Komplex eingebaut werden und so zum Abbau der mRNA und zur spezifischen Depletion des entsprechenden Proteins aus der Zelle führen (Elbashir et al., 2001a; Elbashir et al., 2002).

3.2.6.1.1 Design und Vorbereitung von siRNA-Oligonukleotiden

Alle hier verwendeten 21-meren siRNA-Oligonukleotide (siehe Abschnitt 3.1.6) wurden mit einem 3'-dTdT Überhang synthetisiert und nach den von Elbashir *et al.* (2002) beschriebenen Regel entworfen. Die ausgewählten Zielsequenzen wurden BLAST-Suchen (<u>Basic Local Alignment Search Tool</u>) gegen die humane Genomsequenz unterworfen (NCBI UniGene Datenbank, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/), um die Wahrscheinlichkeit zu minimieren, eine andere als die mRNA des gewünschten Gens anzugreifen.

Die für die Analysen benötigten siRNA-Duplices wurden aus zwei zueinander komplementären, einzelsträngigen siRNA-Oligonukleotiden generiert. Dazu wurden die einzelsträngigen siRNA-Oligonukleotide in Annealing-Puffer auf eine Endkonzentration von 20 µM verdünnt, für 1 min bei 90°C denaturiert und dann bei 37°C für 1 h hybridisiert (Elbashir *et al.* 2002). Die fertigen siRNA-Doppelstränge wurden auf einem 4% NuSieve GTG Agarosegel (siehe 3.2.1.3) überprüft und bei -20°C gelagert.

2 x Annealing-Puffer 200 mM KOAc 4 mM MgOAc 60 mM Hepes/KOH pH 7.4 siRNA-Duplexlösung 20 µM sense Oligonukleotid 20 µM antisense Oligonukleotid 1 x Annealing-Puffer ddH₂O

3.2.6.1.2 Transfektion von siRNAs in HeLa Zellen

Einen Tag vor der Transfektion mit siRNA-Oligonukleotiden wurden 15 000 Zellen/Kavität einer 24 er-Zellkulturplatte ausplattiert, in die zuvor autoklavierte Deckgläschen (Durchmesser 12 mm) gelegt wurden, auf denen die Zellen für mikroskopische Analysen wachsen sollten. Für die effiziente Transfektion wurde dem Medium kein Antibiotikum zugefügt. Die Transfektion erfolgte mit dem Transfektionsreagenz Oligofectamine (Invitrogen) nach den Vorgaben des Herstellers. Dazu wurden pro Kavität 3 µl Oligofectamine mit 12 µl serumfreien Medium (OptiMEM) verdünnt und für exakt 7 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden pro Kavität 3 µl einer siRNA-Duplex-Lösung (20 µM; siehe Abschnitt 3.1.6) in 50 µl serumfreien Medium verdünnt. Beide Lösungen wurden vereinigt und für weitere 20 min bei RT inkubiert. Die dabei entstehenden Oligofectamine/siRNA-Komplexe wurden anschließend mit weiteren 38 µl serumfreien Medium verdünnt und tropfenweise auf die in der Kavität wachsenden Zellen gegeben. Die siRNA-transfizierten Zellen wurden für 48 h bei 37°C im Inkubationsschrank kultiviert.

Als Kontrolle wurde standardmäßig eine siRNA gegen das Luziferase-Protein des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* verwendet. Da dieses Protein im humanen System nicht existiert, sollte diese siRNA keinen Effekt auf die Zelle haben und die Differenzierung zwischen spezifischen und unspezifischen Effekten der siRNAs erlauben.

3.2.6.1.3 Analyse des Zellwachstums nach RNAi-vermittelter Proteindepletion

Da angenommen wird, dass sich die Depletion eines essentiellen Proteins negativ auf das Wachstum der Zelle auswirken sollte und somit einen ersten Hinweis auf die Bedeutung des Proteins geben kann, wurde der Einfluss der Depletion verschiedener spleißosomaler Proteine auf das Zellwachstum untersucht, indem 24 Stunden, 48 Stunden bzw. 72 Stunden nach der siRNA-Transfektion die Anzahl lebender Zellen bestimmt wurde. Dazu wurde das Zellkulturmedium jeder einzelnen Kavität in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gesammelt, die adhärent wachsenden Zellen durch Zugabe von 200 µl Trypsin/EDTA vorsichtig vom Boden der Zellkulturschale abgelöst und die Enzymreaktion durch Zugabe von 350 µl des Wachstumsmediums gestoppt. Nach mehrmaligem Resuspendieren wurden diese 550 µl Zellsuspension in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und ein Aliquot von 200 µl mit Hilfe eines speziellen Zellzählgeräts (CASYcounter TT) ausgezählt. Dadurch wurde die Anzahl lebender Zellen pro Kavität und pro siRNA bestimmt. Anschließend wurde der Mittelwert aus der Lebendzellzahl der mit derselben siRNA-transfizierten Zellen gebildet und der Effekt auf das Zellwachstum kalkuliert. Dazu wurde die Anzahl der überlebenden Zellen 24 h, 48 h und 72 h nach der Transfektion mit siRNAs gegen spleißosomale Proteine gegen die Anzahl überlebender Zellen 72 h nach der Transfektion mit der gegen das Luziferase-Protein gerichteten siRNA normalisiert.

3.2.6.1.4 Einbringen von siRNAs in HeLa Zellen durch Elektroporation

Zur Durchführung von 24 Elektroporationsansätzen war es notwendig, 12 Zellkulturflaschen mit einer Fläche von je 175 cm² vorzubereiten, die am Tag des Experiments eine Zelldichte von 70-80 % aufwiesen. Eine so bewachsene Zellkulturflasche enthält in der Regel zwischen 1.5 und 1.8 x 10⁷ Zellen. Diese Zellen wurden einmal mit 1 x PBS (pH 7.4) gewaschen und durch Zugabe von 6 ml Trypsin/EDTA-Lösung pro Flasche für 3-5 min vorsichtig vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und in kaltem serumfreien Medium (OptiMEM) gut resuspendiert und in ein Zentrifugationsröhrchen überführt. Während einer fünfminütigen Zentrifugation der Zellsuspension bei 4°C mit 1000 rpm wurden die Zellen pelletiert und der Überstand anschließend vorsichtig abgegossen. Jedes Zellpellet wurde nun in 1 ml 1 x PBS (pH 7.4) resuspendiert, alle Zellpellets in einem Zentrifugationsröhrchen vereinigt und mit 1 x PBS (pH 7.4) auf ein Volumen von 20 ml aufgefüllt. Ein Aliquot dieser Zellsuspension wurde zur Bestimmung der Zellzahl eingesetzt und die restlichen Zellen erneut für 5 min bei 4°C mit 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in einer Konzentration von 1.4 x 10⁷ Zellen/ml in serumfreien Mediums aufgenommen. Während der vorangegangenen Prozedur wurden in Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand 0.4 cm) bereits 10 µl der entsprechenden siRNA-Duplex (20 µM) mit 300 µl OptiMEM verdünnt und auf Eis vorgekühlt. Pro siRNA wurden 8 Elektroporationsansätze benötigt um 48 Stunden später eine genügend große Anzahl an Zellen (~0.5 - 1 x 10⁸) für eine "Mini"-Kernextraktpräparation zu erhalten (siehe Abschnitt 3.2.6.3). Die vorgekühlten Elektroporationsansätze wurden nun mit jeweils 500 µl der auf eine Konzentration von 1.4 x 107 Zellen/ml eingestellten Zellsuspension gemischt und für weitere fünf bis zehn Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit Hilfe eines speziellen Elektroporationssystems (Gene Pulser XCell™ mit CE-Modul) mit 260 V und 950 µF für etwa 25-30 ms behandelt, um die Zellmembran kurzzeitig durchlässig für die siRNA-Moleküle zu machen. Nach etwa fünfminütiger Regeneration der Zellen bei RT wurden die Elektroporationsansätze mit 1 ml vorgewärmten

Zellkulturmedium (siehe Abschnitt 3.2.4.2) versetzt, gut resuspendiert und anschließend die mit derselben siRNA-transfizierten Ansätze in 25 ml Zellkulturmedium vereinigt. Diese Zellsuspension wurde gleichmäßig auf fünf Zellkulturschalen (Durchmesser 14.5 cm) verteilt und die Zellen für insgesamt 48 h bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach Absetzen der Zellen am Boden der Zellkulturplatte wurde das Wachstumsmedium ausgewechselt, um die toten Zellen aus der Kultur zu entfernen.

3.2.6.2 Apoptose-Test (TUNEL-Test)

Der TUNEL-Test (Gorczyca et al., 1993) dient zur Identifizierung einzelner apoptotischer Zellen in einer Population und basiert auf der Erkennung von Einzelstrangbrüchen in der DNA, die ein zentrales Ereignis im Verlauf der Apoptose darstellen. Die terminale <u>D</u>esoxynukleotidyl-<u>T</u>ransferase (TdT), Bestandteil des hier verwendeten In situ Cell Death Detection Kits (Roche), verknüpft die dabei entstehenden freien 3'-OH Enden mit fluoreszenz-markierten Desoxynukleotid-5'-Triphosphaten (dNTPs) und macht sie dadurch sichtbar. Die auf Deckgläschen (Durchmesser 12 mm) gewachsenen Zellen wurden für diese Reaktion 4 min mit eiskaltem Methanol (abs.) auf Eis fixiert und anschließend mit 1 x PBS (pH 7.4) gewaschen. Nachdem die Zellen durch zweiminütige Inkubation mit 0.2 % (v/v) Triton X-100/1 x PBS (pH 7.4) auf Eis permeabilisiert worden waren, wurden sie dreimal mit 1 x PBS (pH 7.4) gewaschen und überschüssiger Puffer mit Filterpapier vorsichtig von den Deckgläschen entfernt. Zur Herstellung der Markierungslösung wurde 1 Volumen der TdT-Enzymlösung mit 9 Volumen der fluoreszenz-markierte dNTPs enthaltenden Lösung gemischt und 30 µl dieser Lösung pro Deckgläschen aufgebracht. Die eigentliche Markierungsreaktion erfolgt für 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer im Inkubationsschrank. Zum Abschluss wurden die Zellen viermal für 10 min bei RT mit 1 x PBS (pH 7.4) gewaschen und dann mit Mowiol 4-88 auf Objektträgern montiert. Die Auswertung der Untersuchung erfolgte mit Hilfe eines inversen Fluoreszenzmikroskops.

3.2.6.3 Präparation von spleißaktiven HeLa "Mini"-Zellkernextrakten

Zur biochemischen Analyse der RNAi-behandelten HeLa-Zellen war es notwendig, eine Methode zu etablieren, mit der man spleißaktiven Kernextrakt aus einer geringen Anzahl Zellen präparieren kann. Die im Folgenden beschriebene Methode basiert auf dem von (Lee und Green, 1990) entwickelten Protokoll zur Herstellung spleißaktiver HeLa-Kernextrakte. Die Zellen von jeweils fünf Zellkulturplatten (Durchmesser 14.5 cm, entspricht je nach depletiertem Protein ~0.5 - 1 x 10⁸ Zellen) wurden mit eiskaltem 1 x PBS (pH 7.4) gewaschen und mit Hilfe eines Zellschabers vorsichtig von der Zellkulturschale gelöst, resuspendiert und auf zwei Zentrifugationsgefäße verteilt, die jeweils mit 1 x PBS (pH 7.4) auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt wurden. Durch fünfminütige Zentrifugation bei 4°C mit 1000 rpm wurden die Zellen anschließend pelletiert und der Überstand vorsichtig abgegossen. Die beiden Zellpellets wurden in je 1 ml eiskaltem 1 x PBS (pH 7.4) resuspendiert, vereinigt und mit 1 x PBS (pH 7.4) auf ein Volumen von 20 ml aufgefüllt. Davon wurden 100 µl entnommen, 1:10 mit 1 x PBS (pH 7.4) verdünnt und mit Hilfe eines Zellzählers (CASYcounter TT) gezählt. Die restlichen Zellen wurden für 5 min bei 4°C mit 1000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 ml 1 x PBS (pH 7.4) resuspendiert, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, erneut für 5 min bei 4°C mit 2000 rpm in einer Tischzentrifuge pelletiert und der Überstand verworfen. Das gepackte Zellvolumen der mit einer siRNA gegen das Luziferase-Protein transfizierten Zellen wurde abgeschätzt und die Zellen in einem Volumen hypoosmolaren Puffer A sorgfältig resuspendiert. Die Anzahl der mit einer siRNA gegen ein spleißosomales Protein transfizierten Zellen wurde gegen die Anzahl der Kontrollzellen normalisiert und in ein der Zellzahl entsprechendes kleineres Volumen Puffer A aufgenommen. Die in Puffer A resuspendierten Zellen wurden für 15 min auf Eis inkubiert, damit sie anschwellen, und anschließend durch sieben- bis zehnmaliges Aufziehen mit einer 1 ml Spritze durch eine 25 5/8g Kanüle aufgeschlossen. Durch 30 s Zentrifugation bei 4°C mit 13 000 rpm in einer Tischzentrifuge wurden die Zellkerne pelletiert. Der zytoplasmatische Überstand wurde verworfen und das Zellkernpellet in 2/3 des dem gepackten Zellvolumens Puffer C entsprechenden Volumen resuspendiert, mit einem Mini-Magnetrührstäbchen (Länge und Durchmesser 2.5 mm) versehen und für 30 min bei 4°C auf Eis gerührt. Zellkernfragmente wurden anschließend durch

Zentrifugation (5 min bei 4°C mit 13 000 rpm in einer Tischzentrifuge) entfernt. Der Überstand (= Kernextrakt) wurde für 2 x 1 h bei 4°C gegen 500 ml Puffer D dialysiert und die Proteinkonzentration bestimmt (siehe Abschnitt 3.2.2.1), bevor er in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert wurde. 1 x 10⁸ Zellen ergeben etwa 400 µl spleißaktiven Kernextrakt.

<u>Puffer A</u> 10 mM Hepes/KOH pH 8.0 1.5 mM MgCl₂ 10 mM KCl 1.0 mM DTT (vor Gebrauch zusetzen) Puffer C 20 mM Hepes/KOH pH 5.2 25% (v/v) Glyzerin 420 mM NaCl 1.5 mM MgCl₂ 0.2 mM EDTA 0.5 mM PMSF (vor Gebrauch zusetzen) 1.0 mM DTT (vor Gebrauch zusetzen)

Puffer D 20 mM Hepes/KOH pH 8.0 10% (v/v) Glyzerin 100 mM KCI 0.2 mM EDTA 1.5 mM MgCl₂ 0.5 mM DTT (vor Gebrauch zusetzen)

3.2.6.4 In vitro Prä-mRNA Spleißanalyse

Als Substrate für *in vitro* Spleißreaktionen dienten 18 fmol radioaktiv markierter *in vitro* transkribierter Prä-mRNAs mit einer spezifischen Aktivität von 1.7 x 10⁶ cpm/pmol (siehe Absatz 3.2.1.9), die ein U2-abhängiges Intron (Zillmann *et al.*, 1988) enthielten. Standardspleißreaktionen mit einem Volumen von 12,5 µl enthielten 60% "Mini"-Kernextrakt (40 mM KCI Endkonzentration), 2 mM ATP, 3 mM MgCl₂ und 20 mM Kreatinphosphat. Alle Komponenten wurden auf Eis wie folgt zusammenpipettiert und für 1 h bei 30°C inkubiert.

0.3 µl MgCl₂ (100mM) 0.25 µl ATP (100 mM) 0.25 µl Kreatinphosphat (1 M) 1 µl MINX Prä-mRNA (30 000 cpm/ml) 7.5 µl "Mini"-Kernextrakt (dialysiert gegen Puffer D) 3.2 µl ddH₂O

Im Anschluss daran wurde die Reaktion durch Zugabe von 350 µl 1 x PK-Puffer abgestoppt und die RNAs durch eine PCA-Extraktion und anschließender Ethanol-Präzipitation isoliert (siehe 3.2.1.2). Die RNA-Pellets wurden in 10 µl RNA-Probenpuffer aufgenommen, 3 min bei 95°C aufgekocht und anschließend auf einem 14 % denaturierenden Polyacrylamidgel (0.5 mm) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Positionen der radioaktiv markierten Prä-mRNAs, Intermediate und Spleißprodukte im Gel wurden anschließend mittels Autoradiographie detektiert.

3.2.6.5 Analyse spleißosomaler Komplexe

Für die gleichzeitige Analyse spleißosomaler Komplexe und Spleißprodukte wurde eine Standardspleißreaktion (siehe 3.2.6.4) mit einem 15-fachen Volumen (187.5 µl) bei 30°C für insgesamt 60 min inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten (0, 2, 5, 10, 20, 40 und 60 min) wurden 12 µl des Reaktionsansatzes für die Analyse der spleißosomalen Komplexe entnommen, mit 3 µl nativem 5 x RNA-Probenpuffer versetzt und bis zum Auftrag auf ein natives 1.5 % (w/v) Agarosegel auf Eis gelagert. Kurz vor dem Auftrag auf das Gel wurden die Proben für 1 min auf 30°C erhitzt und direkt auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur in 0.5 x TBE für 4 h bei 120 V. Anschließend wurde das Gel für etwa 30 min in 10 %Methanol/10 % Essigsäure fixiert und unter Vakuum bei 60°C für 5 Stunden getrocknet. Die Analyse der spleißosomalen Komplexe erfolgte durch Autoradiographie.

Parallel dazu wurden auch die Spleißprodukte, wie unter Abschnitt 3.2.6.4 beschrieben, analysiert.

<u>Agarosegellösung</u> 1 x TBE 1.5% (w/v) Agarose (low melting point) Nativer RNA-Probenpuffer (5 x): 1 x TBE 30% (v/v) Glyzerin 0.625 g/l Heparin 0.25% (w/v) Xylencyanol FF

4. ERGEBNISSE

4.1 Auswirkungen der Depletion des hPrp31- bzw. hPrp6-Proteins durch RNA-Interferenz auf das Zellwachstum

4.1.1 hPrp31- und hPrp6-Proteine sind essentiell für das Zellwachstum

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit nahm man an, dass die beiden Proteine U4/U6-hPrp31 und U5-hPrp6 im [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikel eine für dessen Stabilität essentielle Verbindung zwischen dem U4/U6 di-snRNP- und dem U5 mono-snRNP-Partikel ausbilden. Während diese Funktion für hPrp31-Protein durch Immundepletion in vitro belegt werden konnte (Makarova et al., 2002), war es aufgrund der starken Bindung des hPrp6-Proteins an das U5 snRNP-Partikel bislang nicht möglich, die Funktion des hPrp6-Proteins zu untersuchen. Um die Funktion des hPrp31- und hPrp6-Proteins bei der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung aufzuklären, sollten beide Proteine durch RNA-Interferenz (RNAi) selektiv depletiert werden. Dazu wurden small-interfering RNA (siRNA) Duplexe mit einer Länge von 21 Nukleotiden synthetisiert, die entweder gegen die 3' UTR (untranslated region) oder den codierende Bereich der mRNA des hPrp31- bzw. hPrp6-Proteins gerichtet waren. Als Kontrollen wurden siRNAs gegen den Spleißfaktor U2 SF3b14a, der nicht zum tri-snRNP-Partikel gehört, und gegen das Luziferase-Enzym des Leuchtkäfers Photinus pyralis verwendet, das keine Homologien zu menschlichen Proteinen aufweist. Um den Einfluss der Depletion der beiden Proteine auf das Zellwachstum zu untersuchen, wurde eine identische Anzahl an HelaSS6 Zellen mit dem entsprechenden siRNA Doppelstrang transfiziert. 24 Stunden, 48 Stunden bzw. 72 Stunden nach der Transfektion wurden die adhärent wachsenden Zellen geerntet und die Zahl der überlebenden Zellen bestimmt. Ein spezifischer Effekt auf das Zellwachstum wurde durch eine Normalisierung gegen die Anzahl überlebender Zellen 72 Stunden nach der Transfektion mit siRNA gegen das Leuchtkäfer Luziferase-Protein kalkuliert. Eine weitere Kontrolle bestand in der Verwendung einer siRNA gegen den codierenden Bereich der mRNA des U5 hPrp8-Proteins, dessen Depletion bereits in vorangegangenen Experimenten einen stark hemmenden Einfluss auf das Zellwachstum gezeigt hatte.



Abbildung 4.1 Die Spleißfaktoren SF3b14a, hPrp31 und hPrp6 sind essentiell für das Zellwachstum. Dieselbe Anzahl HeLa-Zellen wurden mit siRNAs transfiziert, die gegen unterschiedliche Bereiche der mRNA (A) des U2 SF3b14a-, (B) des U4/U6 hPrp31- oder (C) des U5 hPrp6-Proteins gerichtet waren. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde die Anzahl lebender Zellen bestimmt. Um den Effekt auf das Zellwachstum zu quantifizieren, wurde die Anzahl lebender Zellen nach 72 Stunden in allen Ansätzen gegen die Anzahl lebender Zellen nach 72 Stunden in einem Kontrollansatz, der mit einer siRNA gegen das Luziferase-Protein (BB1) transfiziert wurde, normalisiert. Als Kontrolle wurde in allen Experimenten auch eine siRNA gegen das U5 hPrp8-Protein (CT1) transfiziert, die bereits in Vorversuchen einen starken Einfluss auf das Zellwachstum hatte.

Abbildung 4.1 zeigt, dass ein Effekt auf das Zellwachstum nach Depletion des SF3b14a-, hPrp31-, hPrp6- und auch des hPrp8-Proteins erst 24 Stunden nach der Transfektion sichtbar wird; bis dahin verläuft das Zellwachstum ähnlich wie in Kontrollzellen, die mit Luziferase siRNA transfiziert waren. Nach 72 Stunden ist das Wachstum hPrp31-Protein depletierter Zellen (Abb. 4.1 B) im Vergleich zu den kontrolltransfizierten Zellen (BB1/Luziferase) auf durchschnittlich etwa 40 % der lebenden Zellen reduziert, wobei die Stärke dieses Effektes zwischen den verschiedenen siRNA Duplexen variiert. EA1, die gegen den codierenden Bereich der hPrp31-mRNA gerichtete siRNA, erwies sich mit einer Reduktion des

Zellwachstums auf etwa 20 % als effektivstes Oligonukleotid. Auch das Wachstum hPrp6-depletierter Zellen (Abb. 4.1 C) ist im Vergleich zu den kontrolltransfizierten Zellen (BB1/Luziferase) auf durchschnittlich etwa 40 % der lebenden Zellen reduziert. Zwei der untersuchten siRNA Oligonukleotide (AL6 und AL7) haben keinerlei Effekt auf das Zellwachstum, was darauf hinweist, dass sie nicht in der Lage sind, den Abbau der hPrp6-codierenden mRNA zu initiieren. Den stärksten Effekt auf das Zellwachstum hat die gegen den codierenden Bereich der hPrp6-mRNA gerichtete siRNA AL5, die das Zellwachstum auf etwa 35 % reduziert. Insgesamt zeigt die Depletion der beiden Proteine SF3b14a und hPrp8 (Abb. 4.1), mit einer Reduktion des Zellwachstums nach 72 Stunden auf etwa 20-30 %, den stärksten Effekt aller untersuchten Spleißfaktoren auf das Zellwachstum.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl die untersuchten Spleißfaktoren SF3b14a und hPrp8, als auch die für die vorliegende Arbeit besonders interessanten Proteine hPrp31 und hPrp6 für das Überleben von HeLa-Zellen essentiell sind. In den folgenden Experimenten wurden ausschließlich die siRNA Duplexe gegen die Proteine SF3b14a, hPrp31 und hPrp6, die den stärksten Effekt auf das Zellwachstum zeigen, verwendet, da angenommen wurde, dass diese siRNAs auch die effektivste Depletion der entsprechenden Proteine bewirken. Im Detail handelte es sich dabei um die folgenden siRNAs: AS1 (SF3b14a), EA1 (hPrp31) und AL5 (hPrp6).

4.1.2 Die Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins führt zur Apoptose

Da das vorangegangene Experiment zeigt, dass die zu untersuchenden Proteine hPrp31 und hPrp6 essentiell für das Überleben der Zellen sind, mussten im Folgenden artifizielle Phänotypen, die durch Apoptose- oder Nekrose hervorgerufen sein könnten, ausgeschlossen werden. Während Nekrose auch als "zufälliger Zelltod" bezeichnet und durch chemischen oder physikalischen Stress hervorgerufen werden kann, handelt es sich bei der Apoptose um den so genannten "programmierten Zelltod". Dieser von der Zelle selbst hervorgerufene und gesteuerte physiologische Prozess führt zum Absterben bestimmter Zellen z. B während der Embryonalentwicklung. Wird Apoptose ausgelöst, kommt es zur Aktivierung einer intrazellulären Kaskade von Cysteinproteasen, so genannten Caspasen (Cysteinyl-Aspartat-spezifische Proteinasen), die wiederum nukleäre Endonukleasen aktivieren. Dies führt zum zentralen biochemischen Ereignis der Apoptose, der Fragmentierung genomischer DNA und dadurch zum Zelltod. Die während der DNA-Fragmentierung entstehenden Einzelstrangbrüche mit ihren freien 3'-OH Enden können durch die terminale <u>D</u>eoxynucelotidyltransferase (TdT) mit fluoreszenz-markierten Deoxynucleotid-Phosphaten sichtbar gemacht werden, eine Methode, die auch als TUNEL Test bezeichnet wird und die Grundlage des in dieser Arbeit verwendeten In situ Cell Death detection Kits (Roche) bildet (Gorczyca et al., 1993). Mit Hilfe dieser Methode sollte zunächst das optimale Zeitfenster für die folgenden biochemischen und zellbiologischen Experimente bestimmt werden. In diesem Zeitfenster sind die Proteine hPrp31 bzw. hPrp6 bereits vollständig depletiert, aber weder Apoptose- noch Nekrose-Reaktionen sind ausgelöst. Die jeweils gleiche Anzahl an HeLa Zellen wurde mit den entsprechenden siRNA-Duplexen transfiziert, und die Zellen wurden nach 48 sowie 72 Stunden einem Apoptose-Test unterzogen, der anschließend mittels Fluoreszenz-Lichtmikroskopie analysiert wurde. Aus Abbildung 4.2 ist zu erkennen, dass Zellen, die nicht mit einer siRNA-Duplex (Abb. 4.2, Bild A nach 48 Stunden) oder der Kontrollduplex gegen das Luziferase-Protein des Leuchtkäfers (Abb. 4.2, Bild C nach 48 Stunden) behandelt wurden, 48 Stunden nach der Transfektion keinerlei Fluoreszenz zeigen und somit keine durch Apoptose ausgelösten DNA-Einzelstrangbrüche aufweisen. Alle Zellen hingegen, die nicht mit einer siRNA, stattdessen aber mit einer DNase behandelt wurden (Abb. 4.2, Bild B nach 48 und nach 72 Stunden), zeigen eine deutliche Fluoreszenz. Eine Depletion der Spleißfaktoren SF3b14a, hPrp31 oder hPrp6 führte, wie die fehlende Fluoreszenz der behandelten Zellen zeigt (Abb. 4.2, Bilder D-F nach 48 Stunden), 48 Stunden nach der Transfektion mit den entsprechenden siRNAs

nicht zur Induktion von Einzelstrangbrüchen der genomischen DNA. Auch die Phasenkontrastaufnahmen zeigen mit Ausnahme der geringen Zelldichte nach Depletion des SF3b14a-Proteins (Abb. 4.2, Bild J) keine Unterschiede in der Zellmorphologie RNAi-behandelter, unbehandelter oder kontrollbehandelter Zellen (Abb. 4.2, Bilder G-L nach 48 Stunden). Übereinstimmend mit der beobachteten deutlichen Reduktion des Zellwachstums (siehe Abschnitt 4.1.1), fluoresziert jedoch ein großer Teil der Zellen, denen das Protein SF3b14a, hPrp31 oder hPrp6 fehlt, 72 Stunden nach der Transfektion mit den entsprechenden siRNAs (Abb. 4.2, Bilder D-F nach 72 Stunden).





Abbildung 4.2 Die siRNA-vermittelte Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins führt zu Apoptose. HeLa-Zellen wurden mit siRNAs gegen die mRNAs des Luziferase-Proteins (C, I), des U2 SF3b14a-Proteins (D, J), des U4/U6 hPrp31-(E, K) oder des U5 hPrp6-Proteins (F, L) transfiziert. 48 und 72 Stunden später wurde untersucht, ob diese Zellen Merkmale von Apoptose aufwiesen. Dazu wurden in einem TUNEL-Test die bei der Apoptose entstehenden freien 3'OH-Enden der DNA durch Addition fluoreszenzmarkierter Deoxynukleotid-Phosphate sichtbar gemacht. Anschließend wurden die Zellen mittels eines Fluoreszenz-Lichtmikroskops aufgenommen (A-F), das die gleichzeitige Aufnahme eines Phasenkontrastbildes ermöglicht (G-L). Als Kontrollen wurden unbehandelte Zellen (A, G) und Zellen verwendet, die zuvor mit DNase behandelt worden waren (B, H). Die somit nachgewiesene DNA-Fragmentierung lässt auf eine Induktion der Apoptose-Kaskade in SF3b14a-, hPrp31- oder hPrp6-depletierten Zellen schließen. Die Abwesenheit der Proteine SF3b14a, hPrp31 oder hPrp6 führt 72 Stunden nach der Transfektion mit siRNAs zu einer gegenüber unbehandelten oder kontrollbehandelten Zellen deutlich veränderten Morphologie der behandelten Zellen (Abb. 4.2, Bilder G-L). Unbehandelte oder mit einer siRNA gegen das Leuchtkäfer Luziferase-Gen transfizierte Zellen zeigen selbst nach 72 Stunden keine fluoreszenz-markierten DNA-Einzelstrangbrüche.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Proteine SF3b14a, hPrp31 und hPrp6 essentiell für das Überleben der Zelle sind und ihre Abwesenheit nach einem Zeitraum von mehr als 48 Stunden zur Apoptose führt. Die folgenden biochemischen Experimente zur funktionellen Charakterisierung der Wirkung der Depletion der Proteine hPrp31 oder hPrp6 wurden daher genau 48 Stunden nach der Transfektion mit siRNAs durchgeführt, um unspezifische Effekte zu vermeiden.

4.1.3 Spezifische Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins in vivo

Um zu zeigen, dass durch die Verwendung spezifischer siRNAs die Konzentration der U snRNP-Proteine SF3b14a, hPrp31 und hPrp6 in der Zelle tatsächlich stark gesenkt werden kann, wurden Western Blot Analysen mit spezifischen Antikörpern gegen die zu untersuchenden Proteine durchgeführt.

Abbildung 4.3 zeigt, dass die Konzentration der Proteine hPrp31 und hPrp6 in siRNA-behandelten Zellen (Spuren 2 bzw. 4) 48 Stunden nach der Transfektion im Vergleich zu den mit einer siRNA das Luziferase-Protein gegen kontrolltransfizierten Zellen (Spuren 1 bzw. 2) um etwa 95 % reduziert ist. SF3b14a-Protein ist im Vergleich zu den kontrolltransfizierten Zellen in siRNA-behandelten Zellen um 85 % reduziert (Spuren 5 und 6). Die zelluläre Konzentration anderer U4/U6-spezifischer Proteine wie hPrp4 oder p110 wurde weder durch die Depletion des hPrp31- noch durch die des hPrp6-Proteins beeinflusst. Darüber hinaus hatte die Depletion des hPrp31-Proteins keinen Einfluss auf die Konzentration des hPrp6-Proteins und umgekehrt (Spuren 2, 4 und 6). Dadurch konnte gezeigt werden, dass mittels der siRNA Oligonukleotide gegen die mRNA des SF3b14a-, hPrp31- oder hPrp6-Proteins die entsprechenden Proteine spezifisch und nahezu vollständig aus der Zelle entfernt werden können.


Abbildung 4.3 Spezifische Depletion spleißosomaler Proteine mittels RNA-Interferenz. Gleiche Proteinmengen HeLa-Kernextrakts, der aus Zellen gewonnen wurde, die 48 h zuvor mit Luziferase- (Δ Luzif.), hPrp31- (EA1, Δ hPrp31), hPrp6- (AL5, Δ hPrp6) oder SF3b14asiRNA (AS1, Δ SF3b14a) transfiziert worden waren, wurden gelelektrophoretisch auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Detektion der Proteine hPrp31, hPrp6, hPrp4, p110 und SF3b14a erfolgte mittels spezifischer Antikörper in einer Western Blot Analyse. Relative Proteinverteilung von hPrp31-, hPrp6, hPrp4- und p110-Protein in (A) hPrp31-depletiertem Extrakt oder (B) hPrp6-depletiertem Extrakt. (C) Proteinkonzentration von SF3b14a-, hPrp31- und hPrp6-Protein in SF3b14a-depletiertem Extrakt.

4.2 Funktionelle Charakterisierung der Auswirkungen einer Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins auf die Integrität des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels

Vorangegangene *in vitro* Untersuchungen hatten gezeigt, dass U4/U6 hPrp31-Protein für die Stabilität des tri-snRNP-Partikels essentiell ist (Makarova *et al.*, 2002). Aufgrund der Ergebnisse aus Zwei-Hybrid Analysen wurde angenommen, dass hPrp31-Protein im [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikel spezifisch mit U5 hPrp6-Protein interagiert und so eine stabile Verbindung zwischen dem U4/U6 di-snRNP- und dem U5 snRNP-Partikel entsteht. Mit der Etablierung eines RNA-Interferenz-Ansatzes für die spezifische Depletion von Spleißfaktoren, insbesondere von hPrp31- und hPrp6-Protein, war es nun möglich, die Rolle dieser beiden Proteine bei der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung *in vivo* zu untersuchen.

4.2.1 Die *in vivo* Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins verhindert die Bildung des U4/U6.U5 tri-snRNP-Partikels

Zur biochemischen Analyse des Effekts der RNAi-induzierten hPrp31- oder hPrp6-Depletion auf die Stabilität des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels *in vivo* war es zunächst notwendig, die RNAi-Transfektion aus dem Mikroliter-Bereich in den Millilitermaßstab umzusetzen. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde hierzu die Elektroporation zum Einbringen von siRNAs in HeLa Zellen etabliert. Auf diese Art und Weise ist es möglich, ausreichende Mengen RNAi-depletierter Zellen zu erhalten, aus denen im kleinen Maßstab ein Kernextrakt präpariert wird, der anschließend in biochemischen Analysen eingesetzt werden kann. Um die angenommene Funktion der beiden Proteine hPrp31 und hPrp6 bei der Bildung des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels aufzuklären, wurde mittels Immunpräzipitation der Einfluss der Depletion beider Proteine auf die Stabilität der mono-snRNP-Partikel, des U4/U6 di- und des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels untersucht. Für diese Immunpräzipitationsexperimente wurde ein polyklonaler Antikörper verwendet, der gegen die rekombinante Form des U5-40K Proteins gerichtet ist (Antiserum "Paul", siehe Abschnitt 3.1.2). Im Rahmen dieser Untersuchungen durchgeführte Vorversuche hatten gezeigt, dass mit Hilfe dieses Antikörpers U5 snRNP- und [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikel aus HeLa Kernextrakt präzipitiert werden können (Daten hier nicht gezeigt). Des Weiteren wurde ein monoklonaler Antikörper verwendet, der gegen die Sm-Proteine gerichtet ist (a-Sm). Er erkennt den Sm-Ring aller U snRNP-Partikel mit Ausnahme des U6 snRNP-Partikels, das stattdessen einen LSm-Ring enthält. Kernextrakte aus Zellen, die zuvor für 48 Stunden mit siRNAs gegen das Luziferase-, das SF3b14a- oder das hPrp31-Protein behandelt worden waren, wurden mit Protein-A-Sepharose inkubiert, an die zuvor die Immunglobuline des a-40K Antiserums bzw. des a-Sm Anitkörpers gekoppelt worden waren. Die präzipitierten UsnRNP-Partikel wurden mit einem 150 mM NaCl enthaltenden Puffer gewaschen. Anschließend wurden die UsnRNA-Komponenten mittels Phenol-Chloroform Extraktion von den Proteinkomponenten getrennt und durch eine Northern Blot Analyse identifiziert.

In Abbildung 4.4 ist zu erkennen, dass die Transfektion mit siRNA gegen das hPrp31-Protein (Spur 3) die Konzentration von U1, U2, U4, U5 und U6 snRNA im Vergleich zu den Luziferase- oder den U2 SF3b14a-siRNA-behandelten Zellen nicht beeinflusst (Spuren 1 und 2). Die Immunpräziptation mit Antikörpern gegen den Sm-Ring (a-Sm), der in U1, U2, U4/U6 und U5 snRNP-Partikeln vorkommt, zeigt gleiche Mengen dieser U snRNPs in hPrp31- oder SF3b14a-depletierten Zellen (Spuren 5 und 6) und solchen Zellen, die lediglich mit einer siRNA gegen das Luziferase-Protein behandelt wurden (Spur 4). Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass durch den Einfluss von RNAi die Stabilität, genauer gesagt, die Assoziation der Sm-Proteine mit den entsprechenden U snRNAs nicht beeinträchtigt wird. Erst die Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen das U5 snRNP-spezifische 40K-Protein (a-40K) erhellt die Wirkung der Depletion des hPrp31-Proteins in der Zelle. Aus Kernextrakten von Zellen, die mit siRNA gegen das nicht-humane Luziferaseoder das U2-spezifische SF3b14a-Protein transfiziert wurden, präzipitiert der 40K-Antikörper intaktes [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikel, was in Abb. 4.4 in den Spuren 7 und 8 durch den Nachweis von U4, U5 und U6 snRNAs deutlich wird. In Abwesenheit des hPrp31-Proteins wird aus Kernextrakten jedoch hauptsächlich U5 snRNP-Monopartikel präzipitiert (Spur 9).



Abbildung 4.4 Die selektive Depletion des hPrp31-Proteins verhindert die Bildung des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels *in vivo*. U snRNP-Partikel wurden mit Hilfe von Protein-A-Sepharose gekoppelten Antikörpern gegen den Sm-Ring (α -Sm) oder das U5-40K-Protein (α -40K) aus Kernextrakt immunpräzipitiert. Dieser Extrakt wurde aus Zellen gewonnen, die 48 h zuvor mit siRNA gegen die mRNAs des Luziferase- (Δ Luzif.), SF3b14a- (AS1, Δ SF3b14a) oder hPrp31-Proteins (EA1, Δ hPrp31) transfiziert worden waren. Jeweils 20% des eingesetzten Ausgangsmaterials (Spuren 1-3) und 100% der kopräzipitierten RNAs (Spuren 4-10) wurden im Anschluss an die Immunpräzipitation auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und durch eine Northern Blot Analyse charakterisiert. Die Positionen von U1, U2, U4, U5 und U6 snRNA sind am rechten Rand markiert. NIS: Prä-Immunserum des Antikörpers gegen das U5-40K Protein. Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass die Abwesenheit des hPrp31-Proteins in der Zelle die Interaktion zwischen dem U4/U6 di-snRNP- und dem U5 snRNP-Partikel verhindert, so dass kein [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikel gebildet werden kann. Um sicherzustellen, dass der Stabilitätsverlust des [U4/U6.U5] trisnRNP-Partikels spezifisch auf den Verlust des hPrp31-Proteins zurückzuführen ist, wurde ein Komplementierungsexperiment durchgeführt. Dabei wurden gleiche Mengen Extrakt aus Zellen, die mit siRNA gegen das nicht-humane Luziferase-Protein oder gegen das hPrp31-Protein behandelt worden waren, mit einem achtfachen Überschuss an aufgereinigtem, rekombinantem His-hPrp31-Protein (freundlicherweise von E. Makarov aus unserer Arbeitsgruppe bereitgestellt) versetzt. Anschließend wurde der Extrakt für auf Eis vorinkubiert und anschließend wie oben beschrieben einer Immunpräzipitation unterzogen.



Abbildung 4.5 Durch die Zugabe von rekombinantem His-hPrp31-Protein kann der Defekt bei der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung in hPrp31-depletiertem Extrakt komplementiert werden. HeLa Kernextrakte wurden aus Zellen präpariert, die 48 h zuvor mit siRNAs gegen das Luziferase- (Δ Luzif.) oder das hPrp31-Protein (EA1, Δ hPrp31) behandelt worden waren. Aliquots dieser beider Extrakte wurden nach Zugabe von rekombinantem His-Prp31-Protein (Endkonzentration 0.32 µM) in Puffer D oder demselben Volumen Puffer D versetzt und auf Eis vorinkubiert. Im Anschluss daran erfolgte die Präzipitation der U snRNP-Partikel mit Hilfe von an Protein-A-Sepharose gekoppelten Antikörpern gegen den Sm-Ring (α -Sm) oder das U5 40K-Protein (α -40K). Jeweils 20 % des eingesetzten Ausgangsmaterials (Spuren 1-2) und 100 % der kopräzipitierten RNAs (Spuren 3-10) wurden im Anschluss an die Immunpräzipitation auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und durch eine Northern Blot Analyse charakterisiert. Die Positionen von U4, U5 und U6 snRNA sind am rechen Rand markiert. Die Analyse der Präzipitate ist in Abb. 4.5 dargestellt und zeigt, dass nach Zugabe von rekombinantem hPrp31-Protein (Spur 10) deutlich mehr U4 und U6 snRNA mit U5 snRNA durch den U5-spezifischen 40K-Antikörper kopräzipitiert werden kann als aus hPrp31-depletiertem Extrakt (Spur 9). Dies macht deutlich, dass die Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung spezifisch auf die Depletion des hPrp31-Proteins und nicht auf eine unspezifische Depletion anderer Spleißfaktoren zurückzuführen ist.

Dieses Resultat bestätigt zum einen die bereits für das hPrp31-Protein beschriebene Funktion als essentieller Bestandteil des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels (Makarova et al., 2002), zum anderen ermöglicht diese Methode die Untersuchung der Frage, ob dem U5-Protein hPrp6 dieselbe wichtige Funktion bei der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung zukommt. Um dies zu analysieren, wurden wie oben beschrieben Immunpräzipitationen mit spezifischen Antikörpern gegen den Sm-Ring und das U5-40K Protein aus hPrp6-depletiertem Kernextrakt durchgeführt.



Abbildung 4.6 Die selektive Depletion des hPrp6-Proteins verhindert die Bildung des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels in vivo. HeLa-Kernextrakte aus Zellen, die 48 h zuvor mit siRNAs gegen das Luziferase- (Δ Luzif.) oder hPrp6-Protein (AL5, Δ hPrp6) behandelt worden waren, wurden anschließend für die Präzipitation von U snRNP-Partikeln mittels an Protein-A-Sepharose gekoppelter Antikörper gegen den Sm-Ring (α -Sm) oder das U5-40K Protein (α -40K) eingesetzt. Jeweils 20 % des eingesetzten Ausgangsmaterials (Spuren 1-2) und 100 % der kopräzipitierten RNAs (Spuren 3-6) wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch eine Northern Blot Analyse charakterisiert. Die Positionen von U1, U2, U4, U5 und U6 snRNA sind am rechen Rand markiert. Aus Abb. 4.6 wird deutlich, dass die Abwesenheit von hPrp6-Protein im Vergleich zu Luziferase-behandelten Zellen keinerlei Einfluss auf die Konzentration der einzelnen snRNAs U1, U2, U4, U5 oder U6 hat (Spuren 1 und 2) und dass darüber hinaus auch die Stabilität der einzelnen snRNP-Partikel U1, U2, U4/U6 und U5 nicht beeinträchtigt wird (Spuren 3 und 4). Allerdings wurde mit dem U5-spezifischen 40K-Antikörper auch aus hPrp6-depletiertem Kernextrakt deutlich weniger U4 und U6 snRNA kopräzipitiert als U5 snRNA (Spur 6 im Vergleich zu Spur 5). Dieses Ergebnis zeigt, dass auch die Depletion von hPrp6-Protein in einer Zelle die Bildung des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels verhindert.

Zusammenfassend demonstrieren diese Resultate zum ersten Mal *in vivo*, dass die Anwesenheit des hPrp31-Proteins für das Vorhandensein eines intakten trisnRNP-Partikels in der Zelle erforderlich ist. Darüber hinaus geben sie Aufschluss über die Funktion des hPrp6-Proteins und beweisen, dass es tatsächlich auch essentiell für Stabilität des [U4/U6.U5] tri-snRNPs *in vivo* ist. Beide Proteine könnten demnach im tri-snRNP-Partikel eine essentielle Brücke zwischen dem U4/U6 disnRNP- und dem U5 snRNP-Partikel bilden. Die hier vorliegenden Ergebnisse lassen allerdings offen, ob es sich bei der hPrp31-hPrp6 Protein-Interaktion, um die einzige Verbindungsstelle zwischen dem U4/U6 und dem U5 snRNP-Partikel handelt. Vielmehr könnte das Fehlen dieser Brücke auch die Destabilisierung anderer Proteininteraktionen zwischen dem U4/U6 und U5 snRNP-Partikel zur Folge haben, eine Situation, die mit den hier durchgeführten Experimenten nicht differenziert werden kann.

4.2.2 Die *in vivo* Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins führt zur Akkumulation von stabilen U4/U6 di-snRNP-Partikeln

Weiterhin unklar bleibt jedoch die Frage, ob die Abwesenheit des hPrp31- oder des hPrp6-Proteins zu einer vollständigen Auflösung des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels in seine Einzelkomponenten U4, U5 und U6 snRNP-Partikel führt und dadurch die Bildung des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels unmöglich gemacht wird, oder ob die [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung ausschließlich im Stadium der Bindung des U5 snRNP-Partikels an das U4/U6 di-snRNP-Partikel gestört ist und U4/U6 disnRNP- und U5 mono-snRNP Partikel in der Zelle vorliegen? In letzterem Szenario wäre es von besonderem Interesse herauszufinden, welche Proteine trotz der inhibierten [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung noch mit dem U4/U6 di-snRNP-Partikel assoziiert sind.

Von den bisherigen Ergebnissen der Immunpräzipitation aus Extrakten hPrp31oder hPrp6-depletierter Zellen mit Antikörpern, die spezifisch die Sm-Proteine erkennen, wissen wir bereits, dass die Sm-Proteine in diesen Zellen noch stabil mit dem U4 snRNP-Partikel assoziiert sind. Da aber U4 und U6 snRNA mit dem Sm-Antikörper kopräzipitiert werden, muss man davon ausgehen, dass das U6 snRNP-Partikel stabil mit dem U4 snRNP-Partikel assoziiert ist, denn das U6 snRNP-Partikel besitzt keinen Sm-Ring (vergleiche Abschnitt 2.1.2). Um zu klären, welche weiteren Proteine neben den Sm-Proteinen in hPrp31- oder hPrp6-Zellen mit diesem U4/U6-Partikel assoziiert depletierten sind, wurden Immunpräzipitationsexperimente mit Antikörpern gegen U4/U6-spezifische Proteine durchgeführt. Dazu wurden polyklonale Antikörper gegen das U4/U6 hPrp4-Protein (Antiserum "Roy", siehe Abschnitt 3.1.2), das U4/U6 hPrp31-Protein (Antiserum "4825", siehe Abschnitt 3.1.2) und gegen den U4/U6 Recycling- und Assemblierungsfaktor p110 (Antiserum "SART3-C", siehe Abschnitt 3.1.2) an Protein-A-Sepharose gekoppelt, die anschließend mit Kernextrakten Luziferase-, hPrp31- oder hPrp6-siRNA behandelter Zellen inkubiert wurden. Nachdem die kopräzipitierten UsnRNP-Partikel mit einem 150 mM NaCl enthaltenden Puffer gewaschen worden waren, wurden die UsnRNA-Komponenten mittels Phenol-Chloroform Extraktion von den Proteinkomponenten getrennt und wie in Abb. 4.7 gezeigt durch eine Northern Blot Analyse identifiziert.

Aus Abb. 4.7 geht hervor, dass nicht nur U4 und U6 snRNAs und Sm-Proteine in hPrp31- oder hPrp6-depletierten Zellen miteinander interagieren, sondern dass diese U4/U6 di-snRNP-Partikel auch stabil mit U4/U6-spezifischen Proteinen assoziiert sind. Dies spiegelt sich in der Koimmunpräzipitation von U4 und U6 snRNAs mit Antikörpern gegen das U4/U6-Protein hPrp4 wider (Spuren 7 und 8). Von diesem U4/U6-spezifischen Protein ist bekannt, dass es als Teil des präassemblierten Komplexes aus CypH/hPrp4/hPrp3 ausschließlich an die basengepaarte U4/U6-Duplex-Struktur bindet und nicht an singuläre U4 oder U6 snRNPs (siehe auch Einleitung). Außerdem ist in Abbildung 4.7 zu erkennen, dass hPrp31-Protein in Abwesenheit des hPrp6-Proteins stabil an den U4/U6 di-snRNP-Partikel gebunden ist (Spur 9), obwohl die unveränderte Stabilität des U4/U6 disnRNP-Partikels auch bei fehlendem hPrp31-Protein (Spur 7) zeigt, dass die Bindung des hPrp31-Proteins keine notwendige strukturelle Voraussetzung für die Stabilität des di-snRNP-Partikels ist.



Abbildung 4.7 In Abwesenheit des hPrp31- oder hPrp6-Proteins akkumuliert stabiler U4/U6 di-snRNP-Partikel in der Zelle. Aus HeLa Zellen, die 48 h zuvor mit siRNAs gegen das Luziferase- (Δ Luzif.), das hPrp31- (EA1, Δ hPrp31) oder das hPrp6-Protein (AL5, Δ hPrp6) behandelt worden waren, wurde Kernextrakt präpariert. Aus diesen Extrakten wurden anschließend verschiedene U snRNP-Partikel mittels an Protein-A-Sepharose gekoppelter spezifischer Antikörper gegen das U5-40K Protein (α -40K), das U4/U6-hPrp4 Protein (α hPrp4), das U4/U6-hPrp31 Protein (α -hPrp31) und den Recyclingfaktor p110 (α -p110) präzipitiert. Jeweils 20 % des eingesetzten Ausgangsmaterials (Spuren 1-3) und 100 % der kopräzipitierten RNAs (Spuren 4-13) wurden im Anschluss an die Immunpräzipitation auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und durch eine Northern Blot Analyse charakterisiert. Die Positionen von U4, U5 und U6 snRNA sind mittig und am rechen Rand markiert. NIS: Prä-Immunserum des Antikörpers gegen das Prp4-Protein.

Des Weiteren zeigen die hier präsentierten Ergebnisse, dass das sich in der Zelle durch die Störung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung anreichernde U4/U6 di-snRNP-Partikel offensichtlich nicht nur mit U4/U6-spezifischen Proteinen assoziiert ist, sondern auch mit dem U4/U6-Assemblierungsfaktor p110. Während spezifische Antikörper gegen das p110-Protein aus Extrakten Luziferase-siRNA transfizierter Zellen hauptsächlich freies U6 Monopartikel präzipitieren und nur geringe Mengen U4/U6 di-snRNP-Partikel (siehe Abb. 4.7, Spur 10), wurden mit dem selben Antikörper deutlich größere Mengen U4/U6 di-snRNP-Partikel aus Extrakten hPrp31- oder hPrp6-depletierter Zellen präzipitiert (Spuren 11 und 12), die also nicht mehr in der Lage sind, [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikel zu bilden. Aus diesen Daten ergibt sich das folgende Bild der Zusammensetzung des U4/U6 di-snRNP-Partikels in Zellen, deren [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung durch die siRNAvermittelte Depletion des U4/U6-hPrp31- oder des U5-hPrp6-Proteins gestört wird. Das sich unter den oben beschriebenen Umständen anreichernde U4/U6 snRNP-Partikel besteht neben der U4/U6 snRNA-Duplex aus den Proteinen CypH, hPrp4 und hPrp3, die als vorassemblierter Proteinkomplex ausschließlich an die U4/U6 snRNA-Duplexstruktur binden können (Nottrott *et al.*, 2002). Des Weiteren ist dieses U4/U6 di-snRNP-Partikel mit dem Recyclingfaktor p110 assoziiert. Da p110-Protein ausschließlich im U6 Monopartikel und dem U4/U6 di-snRNP-Partikel aber nicht im [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikel nachgewiesen werden kann (Bell *et al.*, 2002), deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass sich das akkumulierende U4/U6 di-snRNP-Partikel in einem Stadium befindet, in dem es in Anwesenheit von hPrp31- oder hPrp6-Protein jederzeit mit dem U5 snRNP-Partikel interagieren könnte, um den [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikel zu bilden.

4.3 Einfluss der inhibierten [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung auf die Lokalisierung U4/U6 di-snRNP-spezifischer Komponenten im Zellkern

Durch die erfolgreiche Depletion des U4/U6 hPrp31- und des U5 hPrp6-Proteins aus HeLa-Zellen mittels RNA-Interferenz konnten bislang nicht nur neue Erkenntnisse über die Funktion dieser beiden Proteine bei der tri-snRNP-Bildung *in* vivo gewonnen werden, vielmehr wurde auf diese Weise auch eine Methode etabliert, mit der man spezifisch die tri-snRNP-Bildung *in vivo* verhindern kann. Dadurch war es nun möglich, die sub-nukleäre Lokalisierung von Spleißfaktoren mittels indirekter Immunfluoreszenz und Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung in Zellen, die aufgrund der Abwesenheit von hPrp31- oder hPrp6-Protein keinen [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikel mehr bilden können, zu untersuchen. Spleißfaktoren sind im Nukleus auf verschiedene Sub-Kompartimente verteilt, wie das Nukleoplasma, die Cajal Bodies und die Spleißfaktorkompartimente, auch Speckles genannt (vergleiche Absatz 2.4 der Einleitung). Während Speckles sehr wahrscheinlich als Lagerstätten dienen, von denen aus Spleißfaktoren zu Orten mit hoher Transkriptionsaktivität im Nukleoplasma rekrutiert werden (Misteli *et al.*, 1997), ist die Funktion von Cajal Bodies noch weitestgehend spekulativ. Käme es aufgrund der Blockade der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung zu einer Reorganisation von U4, U5 und U6 snRNP-Partikeln im Zellkern, ließen sich daraus möglicherweise Rückschlüsse auf den Ort der tri-snRNP-Assemblierung ziehen.

4.3.1 Die Inhibierung der tri-snRNP-Bildung führt zur Akkumulation des hPrp4und des hPrp3-Proteins in den Cajal Bodies

Die beiden U4/U6-spezifischen Proteine hPrp4 und hPrp3 binden als Teil eines präassemblierten Proteinkomplexes ausschließlich an die U4/U6 snRNA-Duplex und nicht an die individuelle U4 oder U6 snRNA (Nottrott *et al.*, 2002). Um mögliche Veränderungen in der Verteilung dieser beiden U4/U6-spezifischen Proteine in Zellen mit inhibierter [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen, die auf kleinen Glasträgern kultiviert wurden, wie in Abschnitt 3.2.6.1.2 beschrieben mit siRNAs gegen das Luziferase-, hPrp31- bzw. hPrp6-Protein transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die zelluläre Verteilung der beiden Proteine hPrp4 bzw. hPrp3 durch Immunfluoreszenzuntersuchungen unter Verwendung spezifischer Antikörpern gegen hPrp4- bzw. hPrp3-Protein sichtbar gemacht (indirekte Immunfluoreszenz, siehe Abschnitt 3.2.5.1) und mit Hilfe eines Laser-Scanning-Mikroskops (LSM) konfokale Schnittbilder dieser Präparate angefertigt, die in den Abbildungen 4.8 und 4.9 zusammengefasst sind.

hPrp4-Protein lokalisiert wie viele andere Spleißfaktoren im Kern sowohl in Cajal Bodies (Abb. 4.8 A, gelber Pfeil) als auch in subnukleären Strukturen, den so genannten Spleißfaktor-Kompartimenten oder Speckles, und dem Nukleoplasma (Abb. 4.8 A, roter Pfeil; siehe auch Absatz 2.4). Es kommt hingegen nicht in den Nukleoli vor (Abb. 4.8 A, weißer Pfeil). Die siRNA-vermittelte Depletion des hPrp31-Proteins führt im Zellkern zu einer starken Akkumulation des hPrp4-Proteins in definierten Bereichen (Abb. 4.8 D), die durch die Überlagerung einer weiteren Immunfluoreszenz gegen das Markerprotein der Cajal Bodies, Coilin, als Cajal Bodies identifiziert werden konnten (Abb. 4.8 E und F). Bei der Überlagerung zweier unterschiedlicher Immunfluoreszenzfärbungen ist die Kolokalisierung beider Signale durch die Farbe Gelb gekennzeichnet (Abb. 4.8 C). Gleichzeitig nimmt die Konzentration des hPrp4-Proteins im Nukleoplasma deutlich ab (Abb. 4.8 D). Derselbe Effekt trat auch bei Depletion des hPrp6-Proteins auf: hPrp4-Protein akkumuliert in den Cajal Bodies, während seine Konzentration im Nukleoplasma deutlich abnimmt (Abb. 4.8 G-I).



Abbildung 4.8 Die Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung führt zu einer Akkumulation des U4/U6 hPrp4-Proteins in den Cajal Bodies. HeLa-Zellen wurden mit siRNAs gegen das Luziferase- (ΔLuziferase), das U4/U6 hPrp31- (ΔhPrp31) oder das U5 hPrp6-Protein (ΔhPrp6) transfiziert. 48 Stunden später wurde die Verteilung des hPrp4-Proteins und Coilin durch Immunfluoreszenzanalyse mit spezifischen Antikörpern untersucht. hPrp4-Protein (A, D, G) wurde durch die Verwendung unterschiedlich fluoreszenzgekoppelter Sekundärantikörper von Coilin (B, E, H) unterschieden (rot: hPrp4 und grün: Coilin). Beide Signale wurden mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops unabhängig voneinander aufgenommen und für die Überlagerungsbilder (C, F, I) miteinander kombiniert. Die exakte Überlagerung der beiden Signale ist in gelb wiedergegeben. Die Pfeile in Bild A weisen auf die unterschiedlichen Kompartimente des Zellkerns hin (gelb: Cajal Bodies; rot: Nukleoplasma und Speckles; weiß: Nukleoli).

Abbildung 4.9 zeigt, dass auch das U4/U6 hPrp3-Protein, welches in Leuchtkäfer Luziferase siRNA-behandelten Zellen in Cajal Bodies, Speckles und im Nukleoplasma detektiert wird (A-C), nach Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung aufgrund der Abwesenheit von hPrp31- (D-F) bzw. hPrp6-Protein (G-I) in den Cajal Bodies akkumuliert, während sein Signal im Nukleoplasma fast vollständig verschwindet.

Diese Akkumulation von hPrp4- und hPrp3-Protein in den Cajal Bodies hPrp31oder hPrp6-depletierter Zellen liefert den ersten Hinweis darauf, dass U4/U6 disnRNP-Partikel in den Cajal Bodies akkumulieren, wenn die [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung in der Zelle blockiert wird.



Abbildung 4.9 Die Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung führt zu einer Akkumulation des U4/U6 hPrp3-Proteins in den Cajal Bodies. In HeLa Zellen, die 48 Stunden zuvor mit siRNAs gegen das Luziferase- (ΔLuziferase), das U4/U6 hPrp31-(ΔhPrp31) oder das U5 hPrp6-Protein (ΔhPrp6) transfiziert worden waren, wurde die Verteilung des hPrp3-Proteins und Coilin durch Immunfluoreszenzanalyse mit spezifischen Antikörpern untersucht. Durch die Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenz-Marker wurde hPrp3-Protein (A, D, G) von Coilin (B, E, H) differenziert (rot: hPrp3 und grün: Coilin). Beide Signale wurden mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops unabhängig voneinander aufgenommen und für die Überlagerungsbilder (C, F, I) miteinander kombiniert. Die exakte Überlagerung der beiden Signale ist in gelb wiedergegeben.

4.3.2 U6-spezifisches LSm4-Protein akkumuliert nach Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung in Cajal Bodies

Um herauszufinden, ob neben den U4/U6-spezifischen Proteinen hPrp4 und hPrp3 auch U6-spezifische Proteine in den Cajal Bodies akkumulieren, wenn die [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung in der Zelle verhindert wird, wurden hPrp31- oder hPrp6-depletierte Zellen in einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung mit spezifischen Antikörpern gegen das LSm4-Protein inkubiert. In eukaryontischen Zellen bildet hLSm4 mit den Proteinen LSm2, LSm3 und LSm5-8 einen heteroheptameren Komplex, der an das 3'-oligo(U)-Ende der U6 snRNA bindet (Achsel et al., 1999). Allerdings ist LSm4-Protein darüber hinaus auch Teil eines Proteinkomplexes der LSm-Proteine 1-3 und 5-7, der eine wichtige Rolle beim $5' \rightarrow 3'$ mRNA-Abbau im Cytoplasma spielt (Ingelfinger et al., 2002). Offensichtlich gibt es in der Zelle zwei unterschiedliche LSm4-Populationen, die entsprechend ihrer Funktion in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle zu finden sind. Die beteiligten LSm4-Proteine am mRNA-Abbau sind ausschließlich in cytoplasmatischen Domänen angereichert (Pfeile in Abb. 4.10 A), die durch das gleichzeitige Vorhandensein des ausschließlich am mRNA-Abbau beteiligten Proteins LSm1 charakterisiert sind. Die im Zellkern, genauer gesagt im Nukleoplasma und den Cajal Bodies, vorkommenden LSm4-Proteine sind hingegen Teil des spleißosomalen U6-spezifischen LSm-Ringes, der durch das Vorhandensein von LSm8-Protein charakterisiert ist (Abb. 4.10 A-C).

Wie bereits für die U4/U6 spezifischen Proteine hPrp4 und hPrp3 beobachtet wurde, akkumuliert auch LSm4-Protein verstärkt in Cajal Bodies, wenn die [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung in der Zelle durch die Depletion des hPrp31-(Abb. 4.10 D-F) bzw. hPrp6-Proteins (Abb. 4.10 G-I) verhindert wird. Aufgrund dieses Ergebnisses wird die Annahme aus den vorangegangen Untersuchungen der Verteilung des hPrp4- bzw. hPrp3-Proteins unterstützt, dass U4/U6 di-snRNP-Partikel möglicherweise in den Cajal Bodies akkumulieren, wenn die [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung blockiert ist.

Die Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins wirkt sich darüber hinaus jedoch auch auf die cytoplasmatischen LSm4-Domänen aus, deren Anzahl in Zellen mit inhibierter [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung im Vergleich zu Zellen, die mit einer siRNA gegen das Luziferase-Protein transfiziert wurden, deutlich geringer ist (Abb. 4.10 D und G). Außerdem erscheinen die einzelnen cytoplasmatischen Domänen in hPrp31- oder hPrp6-depletierten Zellen größer.



Abbildung 4.10 Die Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung führt zu einer Akkumulation von U6 LSm4-Protein in den Cajal Bodies. HeLa Zellen wurden mit siRNAs gegen das Luziferase- (ΔLuziferase), das U4/U6 hPrp31- (ΔhPrp31) oder das U5 hPrp6-Protein (ΔhPrp6) transfiziert. Nach 48 Stunden wurde die Verteilung des LSm4-Proteins und Coilin durch indirekte Immunfluoreszenzanalyse mit spezifischen Antikörpern untersucht. LSm4-Protein (A, D, G) und Coilin (B, E, H) wurden durch die Verwendung unterschiedlich fluoreszenz-gekoppelter Sekundärantikörper differenziert (rot: hLSm4 und grün: Coilin). Beide Signale wurden mit Hilfe eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops unabhängig voneinander aufgenommen und für die Überlagerungsbilder (C, F, I) miteinander kombiniert. Die exakte Überlagerung der beiden Signale ist in gelb (C, F, I) wiedergegeben. Der weiße Pfeil in Bild A weist auf die zytoplasmatischen Domänen hin, in denen mRNA-Abbaufaktoren wie der LSm1-7-Ring lokalisieren.

Dieses Ergebnis lässt sich derart interpretieren, dass Zellen deren [U4/U6.U5] trisnRNP-Bildung durch die Abwesenheit der Proteine hPrp31 oder hPrp6 verhindert wird, nicht mehr in der Lage sind zu spleißen. Bei Vorliegen eines Spleißdefekts kann ungespleißte Prä-mRNA nicht aus dem Nukleus heraustransportiert werden. Somit fehlen aber mRNA-Substrate für den $5' \rightarrow 3'$ mRNA-Abbau im Cytoplasma, wodurch es zu einer starken Anreicherung der mRNA-Abbaufaktoren und damit auch des LSm1-7 Ringes in wenigeren und größeren cytoplasmatischen Domänen kommt.

4.3.3 Der U4/U6 di-snRNP-Assemblierungsfaktor p110 akkumuliert in Cajal Bodies nach Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung

Aus den vorangegangenen Immunpräzipitationsexperimenten (siehe Abschnitt 4.2.2) war bereits bekannt, dass der Assemblierungsfaktor p110 mit dem U4/U6 disnRNP-Partikel assoziiert ist, der in Folge der blockierten [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung in der Zelle akkumuliert. Ein weiteres wichtiges Experiment musste daher die zelluläre Verteilung von p110-Protein in Abwesenheit von hPrp31- oder hPrp6-Protein analysieren, um so weitere Hinweise auf den Ort der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Assemblierung zu erhalten. Das Ergebnis dieser Untersuchung mit spezifischem p110-Antikörper ist in Abbildung 4.11 dargestellt, zusammen mit dem Kontrollexperiment, in dem die Zellen mit einer siRNA gegen das Leuchtkäfer Luziferase-Protein transfiziert wurden. P110-Protein ist in den Kontrollzellen (ALuziferase) gleichmäßig im Nukleoplasma verteilt. Im Gegensatz zu den U4/U6spezifischen Proteinen hPrp4 und hPrp3 befindet sich ein Großteil des nukleären p110-Proteins auch in den Cajal Bodies (Abb. 4.11 A-C). In Abwesenheit der Proteine hPrp31 oder hPrp6 akkumuliert auch p110-Protein in nukleären Domänen (Abb. 4.11 D und G). Allerdings ist die Abnahme der p110-Konzentration im Nukleoplasma nach Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins deutlich weniger prägnant als für die Proteine hPrp4- oder hPrp3- beobachtet (siehe Abschnitt 4.3.1). Durch die Überlagerung der Bilder der Immunfluoreszenz mit p110-Antikörpern mit denen der Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen das Coilin Markerprotein der Cajal Bodies können diese Domänen als Cajal Bodies identifiziert werden (Abb. 4.11 E und F, H und I).



Abbildung 4.11 Die Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung führt zu einer Akkumulation des U4/U6 Assemblierungsfaktors p110 in den Cajal Bodies. In HeLa Zellen, die zuvor mit siRNAs gegen das Luziferase- (Δ Luziferase), das U4/U6 hPrp31- (Δ hPrp31) oder das U5 hPrp6-Protein (Δ hPrp6) transfiziert worden waren, wurde 48 Stunden später die Verteilung des p110-Proteins und Coilin durch indirekte Immunfluoreszenzanalyse mit spezifischen Antikörpern untersucht. P110-Protein (A, D, G) wurde von Coilin (B, E, H) durch die Verwendung unterschiedlich fluoreszenz-gekoppelter Sekundärantikörper differenziert (rot: p110 und grün: Coilin). Beide Signale wurden mit Hilfe eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops unabhängig voneinander aufgenommen und für die Überlagerungsbilder (C, F, I) miteinander kombiniert. Die exakte Überlagerung der beiden Signale ist in gelb wiedergegeben.

4.3.4 U4- und U6 snRNAs akkumulieren nach Störung der [U4/U6.U5] trisnRNP-Bildung in den Cajal Bodies

Aufgrund der Akkumulation U6- und U4/U6-spezifischer Proteine in den Cajal Bodies hPrp31- bzw. hPrp6-depletierter Zellen, stellte sich nun die Frage, ob sich die Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung gleichermaßen auch auf die U snRNA-Komponenten des U4/U6 di-snRNP-Partikels auswirkt. Deshalb wurde als nächstes die Verteilung von U4 und U6 snRNAs mittels Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) untersucht. Dazu wurden Zellen, die mit einer siRNA gegen das nicht-humane Luziferase-, das hPrp31- oder das hPrp6-Protein transfiziert worden waren, mit fluoreszenz-markierten DNA-Oligonukleotiden hybridisiert, deren Sequenzen komplementär zu denen der U4- bzw. der U6 snRNA sind. Anschließend wurde die Verteilung der UsnRNAs mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie analysiert.



Abbildung 4.12 Die Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung führt zu einer Akkumulation von U4 snRNAs in den Cajal Bodies. HeLa Zellen wurden mit siRNAs gegen das Luziferase- (ΔLuziferase), das U4/U6 hPrp31- (ΔhPrp31) oder das U5 hPrp6-Protein (ΔhPrp6) transfiziert. 48 h später wurde die Verteilung von U4 snRNAs durch Fluoreszenz*in situ*-Hybridisierung untersucht. Anschließend wurden in denselben Zellen die Cajal Bodies durch Immunfluoreszenz mit spezifischen Antikörpern gegen Coilin visualisiert. Die Signale der (A, D, G) U4 snRNAs (rot) und (B, E, H) Coilin (grün) wurden mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops unabhängig voneinander aufgenommen und für die Überlagerungsbilder (C, F, I) miteinander kombiniert. Die exakte Überlagerung der beiden Signale ist in gelb wiedergegeben.



Abbildung 4.13 Die Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung führt zu einer Akkumulation von U6 snRNA in den Cajal Bodies. HeLa Zellen wurden mit siRNAs gegen das Luziferase- (ΔLuziferase), das U4/U6 hPrp31- (ΔhPrp31) oder das U5 hPrp6-Protein (ΔhPrp6) transfiziert. 48 Stunden später wurde die Verteilung von U6 snRNAs durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung untersucht. In denselben Zellen wurden die Cajal Bodies in einer anschließenden indirekten Immunfluoreszenzanalyse mit spezifischen Antikörpern gegen Coilin visualisiert. Durch die Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenz-Markierungen konnte Coilin (B, E, H) von der U6 snRNA (A, D, G) in der Zelle differenziert werden. Beide Signale (rot: U6 snRNA und grün: Coilin) wurden mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops unabhängig voneinander aufgenommen und für die Überlagerungsbilder (C, F, I) miteinander kombiniert. Die exakte Überlagerung der beiden Signale ist in gelb wiedergegeben.

Abbildung 4.12 A und Abbildung 4.13 A zeigen, dass U4 snRNA und U6 snRNA unter Kontrolltransfektionsbedingungen wie alle U snRNAs ausschließlich in Speckles und in den Cajal Bodies angereichert sind. Ein geringer Teil der U4 und U6 snRNAs ist jedoch auch im Nukleoplasma vorhanden. Die RNAi-vermittelte Depletion sowohl des hPrp31- als auch des hPrp6-Proteins führt in HeLa Zellen zu einer dramatischen Zunahme von U4 snRNAs und U6 snRNAs in nukleären Domänen und einer deutlichen Abnahme der U4 bzw. U6 snRNA-Konzentration im Nukleoplasma und in den Speckles (Abb. 4.12 D und G, Abb. 4.13 D und G). Die Überlagerung der Bilder mit der gleichzeitigen Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen Coilin demonstriert, dass es sich bei diesen Domänen um Cajal Bodies handelt (Abb. 4.12 E und F, H und I; Abb. 4.13 E und F, H und I).

Dass diese Akkumulation von U4 und U6 snRNAs in den Cajal Bodies spezifisch auf die Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung in der Zelle zurückzuführen ist, belegt die Depletion eines Kontrollspleißfaktors U2 SF3b14a in Abbildung 4.14. Dessen Abwesenheit hat nur eine leichte Akkumulation von U4 snRNA in den Cajal Bodies zur Folge (Abb. 4.14 B), während die Verteilung von U6 snRNA unverändert bleibt (Abb. 4.14 D).



Abbildung 4.14 In Abwesenheit des Spleißfaktors U2 SF3b14a kommt es zu keiner Akkumulation von U4 und U6 snRNA in den Cajal Bodies. In HeLa Zellen, die zuvor mit siRNAs gegen das Luziferase-Protein (Δ Luziferase) oder das U2 snRNP-Protein SF3b14a (Δ SF3b14a) transfiziert worden waren, wurde 48 Stunden später die Verteilung von U4 snRNA (A, B) und U6 snRNA (C, D) durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung untersucht. Dazu wurden zur jeweiligen U snRNA komplementäre, fluoreszenz-gekoppelte DNA-Oligonukleotide verwendet, deren Signal anschließend mit Hilfe eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops aufgenommen wurde.

78

4.3.5 Quantifizierung der Akkumulation U4/U6-spezifischer Bestandteile in den Cajal Bodies

Die vorangegangen Experimente zeigen, dass in Abwesenheit des hPrp31- oder hPrp6-Proteins die Fluoreszenzintensität, d.h. die Konzentration aller untersuchten U4/U6-spezifischen Komponenten, in den Cajal Bodies im Vergleich zum Nukleoplasma deutlich zunimmt. Um diese Zunahme im Vergleich zum Nukleoplasma quantitativ zu erfassen, wurden konfokale Serienschnitte der in den Abschnitten 4.3.1, 4.3.3 und 4.3.4 beschriebenen Immunfluoreszenzen und Fluoreszenz-in situ-Hybridisierungen hPrp31- oder hPrp6-depletierter Zellen und den entsprechend mit Luziferase-siRNA transfizierten Zellen aufgenommen. Dies erfolgte bei einer niedrigen Exposition, um die Sättigung einzelner Signale zu vermeiden. Zur eindeutigen Identifizierung der Cajal Bodies wurde in allen Analysen eine Doppelfärbung mit Antikörpern gegen das Markerprotein der Cajal Bodies, Coilin, gemacht. Anschließend wurde für alle U4/U6-spezifischen Komponenten die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der Cajal Bodies und des restlichen Zellkerns inklusive Nukleoplasma und Nucleoli mit Hilfe einer speziellen Quantifizierungssoftware in jeder einzelnen Zelle ermittelt. Die beiden Werte wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt.

	Intensitätsverhältnis von Cajal Bodies vs. Nukleoplasma $^{a} \pm s.d.^{b}$ (n ^c)		
Protein oder	ΔLuziferase	∆hPrp31	∆hPrp6
snRNA		•	ľ
hPrp4	4.1 ± 0.4 (23)	13.6 ± 3.6 (23)	19.8 ± 7.3 (15)
hPrp3	3.0 ± 0.4 (23)	12.4 ± 3.8 (24)	10.6 ± 2.1 (23)
p110	4.3 ± 1.1 (23)	11.6 ± 3.5 (24)	11.1 ± 2.6 (23)
U4 snRNA	3.6 ± 0.4 (24)	14.0 ± 5.8 (26)	13.0 ± 6.9 (25)
U6 snRNA	3.4 ± 0.2 (23)	19.0 ± 5.4 (23)	21.6 ± 5.7 (24)

Tabelle 4.1 Auswirkung der blockierten [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung auf die Konzentration U4/U6-spezifischer Komponenten in den Cajal Bodies.

^a Verhältnis der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität pro Pixel in den Cajal Bodies zum Nukleoplasma.

^b Standardabweichung zufällig ausgewählter Zellen (alle Zellen auf allen Bildern wurden benutzt).

^c n = Anzahl ausgewerteter Zellen (mit durchschnittlich 2-3 Cajal Bodies pro Zelle).

Die Ergebnisse dieser Quantifizierung, die in Tabelle 4.1 zusammengefasst und in Abb. 4.15 anschaulich dargestellt sind, zeigen, dass sich das Verhältnis der Fluoreszenzintensität des hPrp4-, hPrp3- und p110-Proteins (Cajal Bodies zu Nukleoplasma) in Zellen, deren [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung durch die Depletion der Proteine hPrp31 oder hPrp6 blockiert ist, im Vergleich zu Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA behandelt wurden, verdreifacht bis verfünffacht. Genauso deutlich ist auch der Anstieg des Verhältnisses der Fluoreszenzintensität von U4 und U6 snRNAs in Cajal Bodies bzw. Nukleoplasma.



Abbildung 4.15 Akkumulation U4/U6 di-snRNP-spezifischer Komponenten in den Cajal Bodies nach Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung. Bilder der in den Abbildungen 4.8, 4.9, 4.11, 4.12 und 4.13 dargestellten Experimente wurden benutzt, um mit Hilfe einer speziellen Quantifzierungssoftware (Khoros, Khoral Inc.) die durchschnittliche Intensität des Fluoreszenzsignals in den Cajal Bodies und im Nukleoplasma zu bestimmen. Das Diagramm zeigt das Verhältnis der durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten für die untersuchten U4/U6 Komponenten (hPrp4-, hPrp3- und p110-Protein, U4 und U6 snRNA) in den Cajal Bodies zum Nukleoplasma in Abwesenheit der Proteine hPrp31 (orange Säule) oder hPrp6 (rote Säule) im Vergleich zu Zellen, die mit einer siRNA gegen das Luziferase-Protein (gelbe Säule) transfiziert wurden. Die detaillierten Ergebnisse dieser Analyse können Tabelle 4.1 entnommen werden.

Bezieht man bei der Interpretation der Ergebnisse auch die Analyse der Proteinkonzentrationen von hPrp4, hPrp3 und p110 mit ein (siehe Abb. 4.3 A und B), die wie die Konzentrationen der U4 und U6 snRNAs (Abb. 4.4 Spuren 1-3; Abb. 4.6 Spuren 1-2) in Abwesenheit des hPrp31- oder hPrp6-Proteins unverändert bleiben, wird deutlich, dass hier tatsächlich eine Umverteilung vorliegt, das heißt eine Akkumulation von U4/U6 snRNP-Komponenten in den Cajal Bodies, und keine Degradation der einzelnen Proteine oder U snRNAs im Nukleoplasma.

4.3.6 Das intakte U4/U6 di-snRNP-Partikel akkumuliert bei blockierter [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung in den Cajal Bodies

Bei der Untersuchung von Zellen mit inhibierter [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung stellte sich nun die Frage, ob es sich bei den in den Cajal Bodies akkumulierenden Faktoren um isolierte U4 snRNP- und U6 snRNP-Partikel und den assemblierten CypH/hPrp4/hPrp3 Komplex handelt oder aber um das intakte U4/U6 di-snRNP-Partikel. Aufschluss darüber sollte eine Untersuchung der molekularen Grundlagen der Lokalisierung des hPrp4- und p110-Proteins in den Cajal Bodies hPrp31- oder hPrp6-depletierter Zellen geben. Dazu wurden die Zellen vor der bereits in Abschnitt 4.3.1 und 4.3.3 beschriebenen Untersuchung der Verteilung des hPrp4- und p110-Proteins mit RNase A behandelt. Durch diese Behandlung werden zelluläre RNAs zerstört und die an sie gebundenen Proteine freigesetzt, wenn sie nicht durch andere Proteine in der Zelle verankert sind (Spector et al., 1991). Zellen die nicht mit RNase A behandelt wurden, zeigen nach Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung in Abwesenheit des hPrp31- oder hPrp6-Proteins die bereits beschriebene Akkumulation des hPrp4-Proteins in den Cajal Bodies (Abb. 4.16 A-C). Nach RNase A Behandlung hingegen ist Prp4 vollständig sowohl aus dem Nukleoplasma und den Cajal Bodies solcher Zellen, deren hPrp31- oder hPrp6-Protein depletiert wurde (Abb. 4.16 E und F), als auch aus Kontrollzellen, die mit einer siRNA gegen das Luziferase-Protein behandelt wurden (Abb. 4.16 D), verschwunden. Eine Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen das Cajal Body Markerprotein Coilin in RNase A-behandelten und -unbehandelten Zellen zeigt, dass die Verteilung des Coilins durch RNase A nicht beeinträchtigt wird und die Cajal Bodies als nukleäre Kompartimente in der Zelle weiterhin vorhanden sind. Um sicherzustellen, dass die RNA in diesem Experiment vollständig verdaut ist, wurde U4 snRNA in der Zelle durch eine Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung sichtbar gemacht. Nach RNase A Behandlung ist U4 snRNA in der Zelle nicht mehr nachzuweisen (Abb. 4.17).



Abbildung 4.16 Die Verteilung von U4/U6 hPrp4-Protein im Nukleoplasma und in den Cajal Bodies ist RNA-abhängig. HeLa-Zellen wurden mit siRNAs gegen das Luziferase-(ΔLuziferase), das U4/U6 hPrp31- (ΔhPrp31) oder das U5 hPrp6-Protein (ΔhPrp6) transfiziert. Nach 48 Stunden wurden diese Zellen mit **(D-F, J-L)** oder ohne RNase A **(A-C, G-I)** behandelt. Anschließend wurde die Verteilung des hPrp4-Proteins und Coilin, dem Markerprotein der Cajal Bodies, durch Immunfluoreszenzanalyse mit spezifischen Antikörpern visualisiert. hPrp4-Protein **(A-F)** wurde von Coilin **(G-L)** durch die Verwendung unterschiedlich fluoreszenzgekoppelter Antikörper differenziert. Beide Signale wurden mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops aufgenommen. Die dabei verwendeten Parameter für die Aufnahme RNase-behandelter und RNase-unbehandelter Zellen waren identisch.



Abbildung 4.17 RNase-Behandlung führt zu einem vollständigen Abbau der U4 snRNA in der Zelle. In HeLa Zellen, die zuvor mit (B) oder ohne RNase A (A) behandelt worden waren, wurde durch die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung mit einem zur U4 snRNA komplementären fluoreszenz-markierten DNA-Oligonukleotides die Gegenwart von U4 snRNA überprüft. Das Signal wurde anschließend mit Hilfe eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops aufgenommen. Die dabei verwendeten Parameter für die Aufnahme RNase-behandelter und RNase-unbehandelter Zellen waren identisch.

Dasselbe Experiment wurde auch für den Assemblierungsfaktor p110 und U6 snRNA wiederholt. Abbildung 4.18 zeigt, dass durch die Behandlung mit snRNA RNase A U6 Zelle in der vollständig zerstört wird (J-L). Überraschenderweise wurde die Verteilung des p110-Proteins im Nukleoplasma und in Cajal Bodies hPrp31- oder hPrp6-depletierter Zellen und solcher Zellen, die mit siRNA gegen das nicht-humane Luziferase-Protein transfiziert wurden (D-F), durch den Abbau der zellulären RNA nicht verändert. Das Protein p110 lokalisiert somit im Gegensatz zu hPrp4-Protein RNA-unabhängig in den Cajal Bodies.

Zieht man in Betracht, dass der vorassemblierte CypH/hPrp4/hPrp3 Komplex in vitro und in vivo ausschließlich an den U4/U6 snRNA Duplex bindet und nicht an monomere U4 oder U6 snRNAs (Gonzalez-Santos *et al.*, 2002; Nottrott *et al.*, 2002), lassen die hier vorliegenden Ergebnisses den Schluss zu, dass U4 und U6 snRNAs sowie die U4/U6-spezifischen Proteine als intaktes U4/U6-di-snRNP-Partikel assoziiert mit dem Asssemblierungsfaktor p110 in den Cajal Bodies von Zellen mit inhibierter [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung vorliegen.



Abbildung 4.18 Die Verteilung des U4/U6 Assemblierungsfaktors p110 im Nukleoplasma und in den Cajal Bodies ist RNA-unabhängig. HeLa Zellen wurden mit siRNAs gegen das Luziferase- (ΔLuziferase), das U4/U6 hPrp31- (ΔhPrp31) oder das U5 hPrp6 Protein (ΔhPrp6) transfiziert. Nach 48 Stunden wurden diese Zellen fixiert und mit (D-F, J-L) oder ohne RNase A (A-C, G-I) behandelt. Die Verteilung des p110-Proteins wurde anschließend durch Immunfluoreszenzanalyse mit spezifischen Antikörpern untersucht, die durch einen sekundären fluoreszenz-gekoppelten Antikörper visualisiert wurden (A-F). Durch die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung mit einem zur U6 snRNA komplementären fluoreszenzmarkierten DNA-Oligonukleotides (G-L) wurde die Gegenwart von U6 snRNA in RNase A behandelten und unbehandelten Zellen überprüft. Beide Signale wurden mit Hilfe eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops aufgenommen. Die dabei verwendeten Parameter für die Aufnahme RNase-behandelter und RNase-unbehandelter Zellen waren identisch.

- 4.4 Einfluss der Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung *in vivo* auf die Verteilung von U5 snRNP-Komponenten und anderer Spleißfaktoren im Zellkern
- 4.4.1 Das U5-spezifische hSnu114-Protein und U5 snRNA akkumulieren nicht in den Cajal Bodies, sondern reorganisieren sich in Spleißfaktor-Kompartimenten

Außer mit dem hPrp6-Protein ist die U5 snRNA im 20S U5 snRNP-Partikel mit weiteren acht partikelspezifischen Proteinen assoziiert. Darunter auch mit dem hSnu114-Protein, das deutliche Sequenzhomologien mit dem ribosomalen Elongationsfaktor EF-2 aufweist und möglicherweise direkt oder indirekt an der Entwindung der basengepaarten Interaktionsdomäne zwischen der U4 snRNA und der U6 snRNA beteiligt ist (Bartels *et al.*, 2002; Bartels *et al.*, 2003). Somit spielt das U5-Monopartikel als Bestandteil des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels eine wichtige Rolle bei der Umwandlung des Prä-Spleißosoms in seine aktivierte Form. Um herauszufinden, ob und auf welche Weise sich die Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung auf die Verteilung von U5 snRNA und U5-spezifischen Proteinen im Zellkern auswirkt, wurde deren Verteilung im Zellkern im Folgenden mittels Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung und Immunfluoreszenzanalyse untersucht.

Wie alle anderen UsnRNAs ist auch U5 snRNA in nukleären Spleißfaktor-Kompartimenten (Speckles), dem Nukleoplasma und in Cajal Bodies zu finden (Abb. 4.19 A-C). Im Gegensatz zu der für das U4/U6 di-snRNP-Partikel beobachteten Situation (vergleiche Abschnitt 4.3), führte die Depletion von hPrp31- oder hPrp6-Protein nicht zu einer signifikanten Akkumulation von U5 snRNA in den Cajal Bodies. Abbildung 4.19 D-I demonstriert vielmehr, dass sich bei inhibierter [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung U5 snRNA in wenigeren, dafür jedoch deutlich größeren, abgerundeten einzelnen Speckles reorganisiert. Ein mit diesem Ergebnis für U5 snRNA übereinstimmendes Bild konnte durch Immunfluoreszenz mit einem spezifischen Antikörper auch für das U5 hSnu114 Protein bestätigt werden. hSnu114-Protein, das normalerweise eine für Spleißfaktoren typische Verteilung in Speckles, Nukleoplasma und Cajal Bodies zeigt (Abb. 4.20 A-C), akkumuliert nach Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins nicht in den Cajal Bodies, sondern reorganisiert sich in den Speckles, die aber deutlich größer und abgerundet erscheinen und deren Anzahl deutlich reduziert ist.



Abbildung 4.19 Die Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung führt zu einer Reorganisation der U5 snRNA-Verteilung in den Speckles. HeLa Zellen, die zuvor mit siRNAs gegen das Luziferase- (ΔLuziferase), das U4/U6 hPrp31- (ΔhPrp31) oder das U5 hPrp6-Protein (ΔhPrp6) transfiziert worden waren, wurden 48 Stunden später fixiert. Zuerst wurde in diesen Zellen durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung die Verteilung von U5 snRNA untersucht. In denselben Zellen wurden anschließend die Cajal Bodies durch Immunfluoreszenzanalyse mit spezifischen Antikörpern gegen Coilin visualisiert. Durch die Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenzmarker konnte Coilin (B, E, H) von der U5 snRNA (A, D, G) in der Zelle differenziert werden. Beide Signale (rot:U5 snRNA und grün: Coilin) wurden mit Hilfe eines Konfokalen Mikroskops unabhängig voneinander aufgenommen und für die Überlagerungsbilder (C, F, I) miteinander kombiniert. Die exakte Überlagerung beider Signale ist in gelb wiedergegeben.



Abbildung 4.20 Die Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung führt zu einer Reorganisation der U5 hSnu114-Proteinverteilung in den Speckles. HeLa Zellen wurden mit siRNAs gegen das Luziferase-Protein (ΔLuziferase), das U4/U6 snRNP-Protein hPrp31 (ΔhPrp31) oder das U5 snRNP-Protein hPrp6 (ΔhPrp6) transfiziert. 48 Stunden später wurden diese Zellen fixiert und die Verteilung von hSnu114-Protein und Coilin durch indirekte Immunfluoreszenzanalyse untersucht. Die dazu benutzten spezifischen Antikörper gegen das hSnu114-Protein (A, D, G) und gegen Coilin (B, E, H) wurden mittels unterschiedlich fluoreszenzgekoppelter Sekundärantikörper differenziert. Beide Signale (rot: hSnu114 und grün: Coilin) wurden anschließend mit Hilfe eines Konfokalen Laser Scanning Mikroskops unabhängig voneinander aufgenommen und für die Überlagerungsbilder (C, F, I) miteinander kombiniert wurden. Die exakte Überlagerung beider Signale ist in gelb wiedergegeben.

Interessanterweise führt die Abwesenheit des hPrp31- oder hPrp6-Proteins auch zu einer Reorganisation von U1 snRNA in den Speckles, welche mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten komplementären DNA-Oligonukleotids visualisiert werden konnte (Abb. 4.21 D-I).



Abbildung 4.21 Die Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung führt zu einer Reorganisation der U1 snRNA-Verteilung in den Speckles. HeLa Zellen, die zuvor mit siRNAs gegen das Luziferase- (ΔLuziferase), das U4/U6 hPrp31- (ΔhPrp31) oder das U5 hPrp6-Protein (ΔhPrp6) transfiziert worden waren, wurden 48 Stunden später fixiert. Durch Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung wurde zuerst die Verteilung von U1 snRNA untersucht. In denselben Zellen wurden die Cajal Bodies durch anschließende Immunfluoreszenzanalyse mit spezifischen Antikörpern gegen Coilin visualisiert. Durch die Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenzmarker konnte Coilin (B, E, H) von der U1 snRNA (A, D, G) in der Zelle differenziert werden. Beide Signale (rot: U1 snRNA und grün: Coilin) wurden mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops unabhängig voneinander aufgenommen und für die Überlagerungsbilder (C, F, I) miteinander kombiniert. Die exakte Überlagerung beider Signale ist in gelb wiedergegeben.

4.4.2 Quantifizierung U5-spezifischer Komponenten in Cajal Bodies nach Inhibierung der tri-snRNP-Bildung

Um quantitativ zu belegen, dass die Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung in Abwesenheit des hPrp31- oder hPrp6-Proteins keinen Einfluss auf die Konzentration des hSnu114-Proteins und der snRNAs U5 und U1 in den Cajal Bodies hat, wurden wie in Abschnitt 4.3.5 beschrieben, entsprechend gefärbte Zellen mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop aufgenommen und anschließend mit Hilfe einer speziellen Quantifizierungssoftware analysiert. Die Gegenfärbung mit einem Antikörper gegen Coilin diente zur eindeutigen Identifizierung und Lokalisierung der Cajal Bodies.

	Intensitätsverhältnis Cajal Bodies vs. Nukleoplasma ^a ± s.d. ^b (n ^c)		
Protein oder	Aluziferase	AhPrn31	AhPrn6
snRNA		Zmipoi	Дштро
hSnu114	1.4 ± 0.2 (37)	1.5 ± 0.2 (31)	1.2 ± 0.1 (29)
U5 snRNA	3.6 ± 0.7 (37)	4.7 ± 1.5 (26)	5.1 ± 2.1 (23)
U1 snRNA	2.7 ± 0.3 (23)	2.8 ± 0.2 (23)	2.8 ± 0.2 (23)

Tabelle 4.2 Auswirkung der blockierten [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung auf die Konzentration U5-spezifischer Komponenten in den Cajal Bodies.

^a Verhältnis der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität pro Pixel in den Cajal Bodies zum Nukleoplasma.

^b Standardabweichung zufällig ausgewählter Zellen (alle Zellen auf allen Bildern wurden benutzt). ^c n = Anzahl ausgewerteter Zellen (mit durchschnittlich 2-3 Cajal Bodies pro Zelle).

Tabelle 4.2 und Abbildung 4.22 verdeutlichen durch das Verhältnis der durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten in den Cajal Bodies im Vergleich zum Nukleoplasma, dass die Abwesenheit des hPrp31- oder hPrp6-Proteins keinen Einfluss auf die Menge des hSnu114-Proteins und die Menge der snRNAs U5 und U1 in den Cajal Bodies hat. Somit handelt sich bei der Akkumulation von U4/U6 snRNP-Komponenten in den Cajal Bodies tatsächlich um einen spezifischen Effekt, der sich ausschließlich auf Bestandteile des U4/U6 di-snRNP-Partikels beschränkt.



Abbildung 4.22 Die Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung hat keinen Einfluss auf die Konzentration U5 snRNP-spezifischer Komponenten in den Cajal Bodies. Bilder der in den Abbildungen 4.19, 4.20 und 4.21 dargestellten Experimente wurden benutzt, um mit Hilfe einer speziellen Quantifzierungssoftware (Khoros, Khoral Inc.) die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der Signale in den Cajal Bodies und im Nukleoplasma zu bestimmen. Das Diagramm zeigt das Verhältnis der durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten von hSnu114-Protein sowie der snRNAs U5 und U1 in den Cajal Bodies zum Nukleoplasma in Abwesenheit der Proteine hPrp31 (orange Säule) oder hPrp6 (rote Säule) im Vergleich zu Zellen, die mit einer siRNA gegen das Luziferase-Protein (gelbe Säule) transfiziert wurden. Die detaillierten Ergebnisse dieser Analyse können Tabelle 4.2 entnommen werden.

4.4.3 Die Inhibierung der tri-snRNP-Bildung führt zu einer Reorganisation verschiedener Spleißfaktoren in den Spleißfaktor-Kompartimenten

Die hier dargestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung ausschließlich zu einer Akkumulation von U4/U6 disnRNP-spezifischen Proteinen oder di-snRNP-spezifischen U snRNAs in den Cajal Bodies führt, während U5 snRNA, U5-spezifsche Proteine und U1 snRNA sich in größeren, abgerundeten Speckles reorganisieren. Diese Beobachtung warf die Frage auf, ob die Reorganisation von U snRNA in solchen veränderten Speckles ein genereller Effekt für alle nicht di-snRNP-spezifischen U snRNAs ist, sobald in Abwesenheit von hPrp31- oder hPrp6-Protein die [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung in der Zelle verhindert wird. Die *in situ*-Hybridisierung mit einem fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid, das komplementär zur U2 snRNA ist, sollte Aufschluss über die Situation für U2 snRNA geben. In Zellen, die unter Kontrollbedingungen kultiviert wurden, ist U2 snRNA im Nukleoplasma und den SpleißfaktorKompartimenten (Speckles) vertreten. Ein beträchtlicher Anteil an U2 snRNA ist allerdings auch in Cajal Bodies angereichert (Abb. 4.23 A-C). Weder hPrp31noch hPrp6-Depletion führt zu einer Veränderung der Konzentration von U2 snRNA in Cajal Bodies. Abbildung 4.23 zeigt hingegen, dass sich auch U2 snRNA in wenigeren, größeren abgerundeten Speckles reorganisiert (Bilder D-I).



Abbildung 4.23 Die Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung führt zu einer Reorganisation der U2 snRNA-Verteilung in den Speckles. HeLa Zellen wurden mit siRNAs gegen das Luziferase- (ΔLuziferase), das U4/U6 hPrp31- (ΔhPrp31) oder das U5 hPrp6-Protein (ΔhPrp6) transfiziert. 48 Stunden später wurde in diesen Zellen die Verteilung von U2 snRNA mittels Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung untersucht. Dieselben Zellen wurden anschließend für eine Immunfluoreszenzanalyse benutzt, um mit spezifischen Antikörpern gegen Coilin die Cajal Bodies zu identifizieren. Durch die Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenzmarker konnte Coilin (B, E, H) von der U2 snRNA (A, D, G) in der Zelle differenziert werden. Beide Signale (rot: U2 snRNA und grün: Coilin) wurden mit Hilfe eines Konfokalen Laser Scanning Mikroskops unabhängig voneinander aufgenommen und für die Überlagerungsbilder (C, F, I) miteinander kombiniert. Die exakte Überlagerung der beiden Signale ist in gelb wiedergegeben. Aufgrund dieses Ergebnisses stellte sich im Folgenden die Frage, was mit der Verteilung nicht-di-snRNP-spezifischer Proteine wie dem U2 Protein SF3a120 oder von nicht-U snRNP-Spleißfaktoren wie dem SR-Protein SC35 passiert, wenn das [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikel in der Zelle nicht gebildet werden kann, da das U4/U6-Protein hPrp31 oder das U5-Protein hPrp6 fehlen? Die Immunfluoreszenz mit spezifischen Antikörpern gegen SF3a120- oder SC35-Protein ergab für die mit siRNA gegen das Luziferase-Protein kontrolltransfizierten Zellen eine für Spleißfaktoren typische Verteilung der beiden Proteine in den Speckles (Abb. 4.24 A und D). Wie in Abb. 4.24 dargestellt, akkumulierten nach Depletion des U4/U6-Proteins hPrp31 oder des U5-Proteins hPrp6 sowohl SF3a120-Protein als auch SC35-Protein in wenigeren, dafür jedoch größeren, abgerundeten Speckles (Bilder B-C und E-F).



Abbildung 4.24 Die Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung führt zu einer Reorganisation der Verteilung des U2 snRNP-spezifischen Proteins SF3a120 und des SR-Proteins SC35 in den Speckles. HeLa Zellen, die zuvor mit siRNAs gegen das Luziferase-(ΔLuziferase), das U4/U6-hPrp31 (ΔhPrp31) oder das U5-hPrp6 Protein (ΔhPrp6) transfiziert worden waren, wurden 48 Stunden später fixiert. Anschließend wurde in einer indirekten Immunfluoreszenzanalyse die Verteilung von SF3a120 (A-C) und SC35 (D-F) mit spezifischen Antikörpern untersucht. Beide Proteine wurden durch die Verwendung fluoreszenzgekoppelter Sekundärantikörper sichtbar gemacht und die Signale mit Hilfe eines Konfokalen Laser Scanning Mikroskops aufgenommen. Zur Kontrolle wurde auch der U2-spezifische Spleißfaktor SF3b14a depletiert. Auch dessen Depletion hatte eine Reorganisation sowohl von U1 snRNA U2 snRNA als auch U5 snRNA in größeren, abgerundeten Speckles zur Folge (Abb. 4.25). Darüber hinaus führte die Depletion des U2-spezifischen Proteins SF3b14a durch siRNAs auch dazu, dass U2 snRNA die Cajal Bodies verlässt (Abb. 4.25 C und D).



Abbildung 4.25 In Abwesenheit des Spleißfaktors U2 SF3b14a kommt es zu einer Reorganisation der U1, U2 und U5 snRNA-Verteilung in den Speckles. HeLa Zellen wurden mit siRNAs gegen das Luziferase-Protein (Δ Luziferase) oder das U2 snRNP-Protein SF3b14a (Δ SF3b14a) transfiziert. 48 Stunden später wurden sie fixiert und mittels Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung die Verteilung von U1 snRNA (A, B), U2 snRNA (C, D) und U5 snRNA (E, F) untersucht. Dazu wurden zur jeweiligen snRNA komplementäre fluoreszenz-gekoppelte DNA-Oligonukleotide verwendet, deren Signal anschließend mit Hilfe eines Konfokalen Laser Scanning Mikroskops aufgenommen wurde.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die Depletion des hPrp31- oder

hPrp6-Proteins zu einer spezifischen Reorganisation von nicht-U4/U6 di-snRNP-Komponenten, wie U2 snRNA, SF3a120 oder SC35, in den Speckles führt. Da dieser Phänotyp bereits im Zusammenhang mit einer spezifischen Blockade des Spleißprozesses beschrieben wurde (O'Keefe *et al.*, 1994) und auch nach Depletion eines tri-snRNP-unabhängigen Spleißfaktors beobachtet wird, lag hier der Verdacht nahe, dass auch die Depletion der beiden Protein hPrp31 bzw. hPrp6 zu einer Blockade des Spleißprozess in der Zelle führt, was wiederum die Reorganisation nicht benötigter Spleißfaktoren in größeren, abgerundeten Speckles zur Folge hat.

4.5 Analyse des Einflusses der inhibierten [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung auf das Prä-mRNA Spleißen

Wie bereits in der Einleitung beschrieben (siehe Absatz 2.4) handelt es sich bei den Speckles um nukleäre Sub-Kompartimente, auch Spleißfaktorkompartimente genannt, die höchstwahrscheinlich als Depots dienen, aus denen Spleißfaktoren zu Orten des Nukleoplasmas mit hoher Transkriptionsaktivität rekrutiert werden können (Misteli et al., 1997). Wird der Spleißprozess in der Zelle jedoch durch Oligonukleotide oder Antikörper spezifisch inhibiert, wurde bereits eine Reorganisation von Spleißfaktoren in wenigeren, aber dafür größeren, runderen Speckles beschrieben (O'Keefe et al., 1994). Da das [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikel eine zentrale Komponente des Spleißosoms darstellt und seine Integration in das Prä-Spleißosoms eine Schlüsselrolle bei der Entstehung eines aktivierten, funktionsfähigen Spleißosoms einnimmt, würde man erwarten, dass Zellen deren [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung durch die Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins inhibiert ist, nicht mehr in der Lage sind zu spleißen. Deshalb legte die hier verschiedener beobachtete Reorganisation nicht-di-snRNP-spezifischer Spleißfaktoren in wenigeren, dafür jedoch größeren und abgerundeten Speckles den Verdacht nahe, dass durch die Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins nicht nur die [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung, sondern in dessen Folge auch der gesamte Spleißprozess inhibiert wird.

4.5.1 Die Inhibierung der tri-snRNP-Bildung führt zur Akkumulation ungespleißter PolyA⁺-mRNA im Zellkern

Das Prä-mRNA Spleißen ist eine vom Spleißosom katalysierte Reaktion. Bei einer Störung dieser Reaktion kommt es zur Anreicherung der Prä-mRNA im Zellkern, da ungespleißte Prä-mRNAs nicht aus dem Zellkern ins Cytoplasma exportiert werden können (Luo und Reed, 1999; Proudfoot *et al.*, 2002). Die Polyadenylierung des 3'-Endes der Prä-mRNA und das Spleißen sind voneinander unabhängige zelluläre Prozesse. Infolgedessen sind die bei einer Störung der Spleißreaktion akkumulierenden Prä-mRNAs polyadenyliert und können so mit Hilfe eines fluoreszenz-markierten Poly(dT)-Oligonukleotids in der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung visualisiert werden. Eine Akkumulation von Poly(A)⁺-mRNAs im Kern solcher Zellen, deren [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung durch die Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins inhibiert ist, könnte ein weiteres Indiz für einen möglichen Spleißdefekt in diesen Zellen liefern.



Abbildung 4.26 Die Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung führt zu einer Akkumulation von PolyA+-mRNA im Zellkern. HeLa Zellen wurden mit siRNAs gegen das **(A)** Luziferase- (ΔLuziferase), **(B)** das U4/U6-hPrp31 (ΔhPrp31) oder **(C)** das U5-hPrp6 Protein (ΔhPrp6) transfiziert. 48 Stunden später wurden sie fixiert und mittels Fluoreszenz*in situ*-Hybridisierung durch fluoreszenz-gekoppelte Poly(dT)-Oligonukleotide die Verteilung der PolyA+-mRNA in der Zelle untersucht. Anschließend wurde das Fluoreszenzsignal mit Hilfe eines Konfokalen Laser Scanning Mikroskops unter Einstellung derselben Parameter aufgenommen.

Abbildung 4.26 A zeigt, das Poly(A)+-mRNAs in Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA gegen das Luziferase-Protein behandelt wurden, gleichmäßig sowohl im Cytoplasma als auch in Domänen des Zellkern vorkommen. Interessanterweise führt die Abwesenheit der Spleißfaktoren hPrp31 oder hPrp6 zu einer starken Akkumulation von Poly(A)+-mRNA im Zellkern (Abb. 4.26 B und C). Dieses Ergebnis
stellt einen indirekten Hinweis auf einen möglichen Spleißdefekt dar, der durch die Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins und die damit verbundene Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung hervorgerufen sein könnte.

4.5.2 Die Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins verhindert die B-Komplex-Bildung während der Spleißosomenassemblierung

Ob hPrp31- und hPrp6-Protein neben ihrer Bedeutung für die Stabilität bzw. Bildung des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels auch essentiell für den Spleißprozess in der Zelle sind, wurde im Folgenden durch eine Analyse der Spleißaktivitäten in Abwesenheit des hPrp31- oder hPrp6-Proteins eingehender untersucht. Dazu wurden in vitro Spleißreaktionen in HeLa-Zellkernextrakten durchgeführt, die aus hPrp31- oder hPrp6-depletierten bzw. mit Luziferase-siRNA kontrolltransfizierten Zellen gewonnen wurden. Diese Spleißreaktionen wurden durch Zugabe von radioaktiv markierter MINX Prä-mRNA und ATP gestartet. Im Verlauf einer 60 Minuten dauernden Inkubation bei 30°C wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (20, 40 und 60 Minuten) jeweils Aliquots der entsprechenden Spleißreaktion entnommen. Die Spleißprodukte dieser Reaktionen wurden auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel analysiert und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Abbildung 4.27 zeigt, dass es keinen signifikanten Unterschied in der Menge der Spleißprodukte zwischen hPrp31-(Spuren 7 - 9) oder hPrp6-depletierten Extrakten (Spuren 10 - 12) und Extrakten unbehandelter (Spuren 1-3) oder mit siRNA gegen das Luziferase-Protein (Spuren 4 – 6) behandelter Zellen gibt. Betrachtet man allerdings die Menge an ungespleißter Prä-mRNA, so zeigt sich, das diese in Extrakten kontrollbehandelter Zellen schneller umgesetzt wird, d.h. nach einer 60 Minuten Spleißreaktion wird deutlich weniger nicht umgesetzte Prä-mRNA detektiert als in Extrakten hPrp31oder hPrp6-depletierter Zellen (Spur 6 im Vergleich zu den Spuren 9 und 12).

Der geringe Unterschied der Konzentration an Spleißprodukten in Zellen, deren tri-snRNP-Bildung durch die Abwesenheit von hPrp31- bzw. hPrp6-Protein blockiert ist, im Vergleich zu kontrolltransfizierten Zellen, könnte auf die verbleibende Menge an hPrp31- oder hPrp6-Protein (~5-10 %, vergleiche Abschnitt 4.1.3) in der Zelle zurückzuführen sein. Diese Proteinmenge reicht vielleicht aus, um genügend [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikel (vergleiche Abschnitt



4.2) zu bilden, so dass das MINX Prä-mRNA Substrat in einem *in vitro* Experiment mit ähnlicher Kinetik wie in einem Kontrollextrakt gespleißt werden kann.

Abbildung 4.27 Analyse des Einflusses der Depletion des U4/U6 hPrp31- oder U5 hPrp6-Proteins auf die Spleißaktivität in vitro. Der in dieser in vitro Spleißreaktion eingesetzte HeLa-Kernextrakt wurde aus Zellen gewonnen, die 48 Stunden zuvor mit keiner siRNA (Wildtyp) oder siRNAs gegen das Luziferase- (ΔLuziferase), das U4/U6 hPrp31- (ΔhPrp31) oder das U5 hPrp6-Protein (ΔhPrp6) transfiziert worden waren. Die anschließenden in vitro Spleißreaktionen wurden durch die Zugabe von radioaktiv markierter MINX Prä-mRNA initiiert. Der gesamte Reaktionsansatz wurde für 60 Minuten bei 30°C inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten (nach 20, 40 und 60 Minuten) wurden den Spleißreaktionen Proben entnommen. Die darin enthaltenden, radioaktiv markierten Spleißprodukte wurden isoliert, auf einem 14 % denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Spuren 1-3: Standardspleißreaktion eines Wildtyp Extrakts. Spuren: 4-6: Standardspleißreaktion eines mit siRNA gegen Luziferase behandelten Extrakts. Spuren 7-9: Standardspleißreaktion eines hPrp31-depletierten Extrakts. Spuren 10-12: Standardspleißreaktion eines hPrp6-depletierten Extrakts. Die Positionen der Prä-mRNA, der Spleißintermediate und der gespleißten mRNA sind auf der rechten Seite schematisch gekennzeichnet. Von oben nach unten: Lariat-Exon 2, Intron-Lariat, Prä-mRNA, gespleißte mRNA, Exon 1.

Um die Frage eines Spleißdefektes in hPrp31- oder hPrp6-depletierten Zellen differenzierter beantworten zu können, sollte durch die Analyse spleißosomaler Komplexe geklärt werden, welcher Schritt der Spleißosomenassemblierung durch die spezifische Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung betroffen ist. Dazu wurden *in vitro* Spleißreaktionen mit Extrakten aus hPrp31- oder hPrp6depletierten Zellen, unbehandelten Zellen oder Zellen, die mit einer siRNA gegen das Leuchtkäfer Luziferase-Protein behandelt worden waren, durchgeführt. Die Ausbildung spleißosomaler Komplexe zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde mittels nativer Gelelektrophorese analysiert und anschließend durch Autoradiographie visualisiert.



Abbildung 4.28 In Abwesenheit des hPrp31- oder hPrp6-Proteins kann in vitro kein spleißosomaler B-Komplex gebildet werden. HeLa-Kernextrakt wurde aus Zellen gewonnen, die 48 Stunden zuvor mit keiner siRNA (Wildtyp) oder siRNAs gegen das Luziferase- (ΔLuziferase), das U4/U6 hPrp31- (ΔhPrp31) oder das U5 hPrp6-Protein (ΔhPrp6) transfiziert worden waren. Diese Extrakte wurden anschließend in eine in vitro Spleißreaktion mit radioaktiv markierter MINX Prä-mRNA eingesetzt. Der gesamte Reaktionsansatz wurde für 10 Minuten bei 30°C inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten (nach 0, 2, 5 und 10 Minuten) wurden den Spleißreaktionen Proben entnommen, die anschließend mittels nativer Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Autoradiographie visualisiert wurden. Spuren 1-4: Standardspleißreaktion eines Wildtyp-Extraktes. Spuren: 5-8: Standardspleißreaktion eines mit siRNA gegen Luziferase behandelten Extrakts. Spuren 9-Standardspleißreaktion eines hPrp31-depletierten 12: Extrakts. Spuren 13-16: Standardspleißreaktion eines hPrp6-depletierten Extrakts. Die Positionen der spleißosomalen Komplexe H, A und B sind am linken Rand markiert. Aufgrund der hohen Geschwindigkeit der katalytischen Schritte der Spleißreaktion an MINX Prä-mRNA ist es nicht möglich den C-Komplex zu detektieren.

Abbildung 4.28 veranschaulicht die Kinetik der gebildeten Komplexe in An- bzw. Abwesenheit des hPrp31- bzw. hPrp6-Proteins. In diesen gelelektrophoretisch auftrennbaren Komplexen ist die Prä-mRNA entweder mit hnRNP (<u>heterogenous</u> <u>nuclear RNP</u>) Proteinen (H-Komplex), dem U1 und U2 snRNP-Partikel (A-Komplex) oder bereits mit dem [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikel assoziiert (B-Komplex; Konarska und Sharp, 1987). Der C-Komplex, also der spleißosomale Komplex, in dem der erste katalytische Schritt des Spleißens bereits vollzogen ist, und der somit weder das U1 noch das U4 snRNP-Partikel enthält (siehe auch Abschnitt 2.2.2 der Einleitung), ist hier nicht zu sehen, da die katalytischen Schritte der Spleißreaktion an MINX Prä-mRNA so schnell vollzogen werden, dass es schwierig ist, den C-Komplex als diskrete Bande zu detektieren.

Vergleicht man die Kinetik der spleißosomalen Komplexe, die sich in Anwesenheit der Proteine hPrp31 und hPrp6 in Luziferase siRNA kontrolltransfizierten Extrakten ausbilden, mit der Kinetik solcher Extrakte, denen entweder das hPrp31- oder hPrp6-Protein fehlt (Abb. 4.28 Spuren 5-8 verglichen mit den Spuren 9-12 und Spuren 13-16), so wird deutlich, dass durch die Abwesenheit des hPrp31- (Spuren 9-12) oder hPrp6-Proteins die Bildung des B-Komplexes inhibiert wird. Gleichzeitig ist eine Akkumulation des A-Komplexes zu beobachten. Während der B-Komplex in Anwesenheit des hPrp31- und hPrp6-Proteins bereits nach zwei Minuten Inkubationszeit auf der Prä-mRNA assembliert und seine Konzentration im Laufe der Zeit zunimmt (Spur 6), assembliert in Abwesenheit der Proteine hPrp31 oder hPrp6 (Spuren 11 und 15) eine deutlich geringere Menge B-Komplex nach fünf Minuten. A-Komplex wird in Anwesenheit des hPrp31- und hPrp6-Proteins (Spuren 6-8) innerhalb von zehn Minuten Inkubationszeit nahezu vollständig zu B-Komplex umgesetzt, während A-Komplex in Abwesenheit des hPrp31- oder hPrp6-Proteins (Spuren 10-12 und Spuren14-16) akkumuliert. Diese Daten zeigen, dass die beiden Protein hPrp31 und hPrp6 essentiell für die B-Komplex Bildung in der Zelle sind.

Um festzustellen, ob es sich bei der Inhibition der B-Komplex Bildung um einen spezifisch durch die Depletion des hPrp31-Proteins hervorgerufenen Effekt handelt, wurde versucht, den Block bei der B-Komplex-Bildung in Abwesenheit des hPrp31-Proteins durch die Zugabe von rekombinantem His-hPrp31-Protein aufzuheben. Dazu wurden, wie bereits beschrieben, *in vitro* Spleißreaktionen

durchgeführt. Allerdings wurde vor Beginn der Reaktion der hPrp31-depletierte Extrakt entweder mit rekombinantem His-hPrp31-Protein (freundlicherweise von E. Makarov zur Verfügung gestellt) in Puffer D oder mit demselben Volumen Puffer D versetzt.



Abbildung 4.29 Der Block in der B-Komplexbildung in hPrp31-depletiertem Extrakt kann durch die Zugabe von rekombinantem His-hPrp31-Protein komplementiert werden. HeLa Kernextrakt aus Zellen, die 48 Stunden zuvor mit siRNAs gegen das U4/U6 snRNP-Protein hPrp31 (ΔhPrp31) transfiziert worden waren, wurde vor Beginn der hier gezeigten in vitro Spleißreaktion rekombinantes His-hPrp31-Protein in Puffer D oder dasselbe Volumen Puffer D zugesetzt. Anschließend wurde durch die Zugabe radioaktiv markierter MINX PrämRNA die Spleißreaktion initiiert. Der gesamte Reaktionsansatz wurde für 10 Minuten bei 30°C inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten (nach 0, 2, 5 und 10 Minuten) wurden den beiden Spleißreaktionen Proben entnommen, die anschließend mittels nativer Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht wurden. Standardspleißreaktion Wildtyp-Extrakts. Spuren 1-4: eines Spuren 5-8: Standardspleißreaktion eines hPrp31-Protein depletierten Extrakts versetzt mit einem zusätzlichen Volumen Puffer D. Spuren: 9-12: Standardspleißreaktion eines hPrp31-Protein depletierten Extrakts in Gegenwart von 0.32 µM rekombinantem His-hPrp31-Protein in Puffer D. Die Positionen der spleißosomalen Komplexe H, A und B sind am linken Rand markiert. Aufgrund der hohen Geschwindigkeit der katalytischen Schritte der Spleißreaktion an MINX Prä-mRNA ist es häufig schwierig den C-Komplex zu detektieren.

Abbildung 4.29 gibt die Kinetik für diese beiden Spleißreaktionen wieder. Es zeigt

sich, dass in Abwesenheit des hPrp31-Proteins (Spur 8) nach zehnminütiger Spleißreaktion deutlich weniger B-Komplex gebildet wird als bei Zugabe von rekombinantem His-hPrp31-Protein zu hPrp31-depletiertem Extrakt (Spur 12). Vergleicht man die Kinetik dieser beiden Spleißreaktionen, fällt auf, dass in Abwesenheit von hPrp31-Protein erst nach fünf Minuten eine nur geringe Menge Prä-mRNA assembliert (Spur 7), B-Komplex auf der während im Komplementierungsexperiment mit rekombinantem His-hPrp31-Protein B-Komplex bereits nach zweiminütiger Inkubationszeit deutlich sichtbar ist (Spur 10). Außerdem kommt es in Abwesenheit des hPrp31-Proteins wie bereits im vorangegangen Experiment beobachtet zu einer Akkumulation von A-Komplex im Verlauf der zehnminütigen Inkubationszeit (Spuren 5-8), während der A-Komplex bei Zugabe von rekombinantem His-hPrp31-Protein im Verlauf der Inkubationszeit deutlich schneller zu B-Komplex umgesetzt wird (Spuren 9 - 12).

Zusammenfassend demonstrieren diese Ergebnisse, dass die siRNA vermittelte Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Protein und die dadurch hervorgerufene Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung spezifisch auch die B-Komplex-Bildung und damit auch den Spleißprozess in der Zelle verhindert. Die beobachtete geringe Konzentration an B-Komplex (Abb. 4.28) in Abwesenheit des hPrp31- oder hPrp6-Proteins bestätigt außerdem die Vermutung, dass die verbleibenden Mengen des hPrp31- bzw. hPrp6-Proteins in den hier dargestellten Experimenten ausreichen, um eine geringe Menge [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels (vergleiche Abschnitt 4.2) und damit auch aktiven Spleißosoms zu bilden. Das MINX Prä-mRNA Substrat wird in einem *in vit*ro Experiment daher mit ähnlicher Kinetik wie in einem Kontrollextrakt gespleißt (vergleiche Abb. 4.27).

5. DISKUSSION

Ein zentraler Baustein des Spleißosoms ist das [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikel, das als vorassemblierter Komplex in das Spleißosom eingebaut wird. Obwohl für dieses Partikel ein hierarchischer Assemblierungsweg gezeigt werden konnte, in dessen Verlauf sich das [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikel aus dem U4/U6 di-snRNP- und dem U5 mono-snRNP-Partikel bildet, war bislang nicht bekannt, in welchem nukleären Kompartiment sich diese Zusammenlagerung vollzieht. Als ein möglicher Kandidat wurden in diesem Zusammenhang die Cajal Bodies diskutiert, kleine subnukleäre Strukturen, die zwar den vollständigen U snRNA-Satz, aber nicht alle Spleißfaktoren enthalten und somit nicht am Spleißprozess selbst beteiligt sein können, möglicherweise jedoch eine Rolle bei der intrazellulären Reifung spleißosomaler U snRNP-Partikel spielen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch die Entwicklung eines Systems, in dem spezifisch die [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung in der Zelle inhibiert werden kann, den Ort der zellulären tri-snRNP-Bildung zu identifizieren. Dazu sollte, basierend auf in vitro Untersuchungen zur Funktion des U4/U6-spezifischen Proteins hPrp31, die zeigen, dass das hPrp31-Protein essentiell für die Stabilität des [U4/U6.U5] trisnRNP-Partikels ist, hPrp31-Protein unter Verwendung von RNA-Interferenz (RNAi) spezifisch aus der Zelle entfernt und infolgedessen die [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung in der Zelle verhindert werden. Da angenommen wurde, dass das hPrp31-Protein das tri-snRNP-Partikel stabilisiert, indem es spezifisch mit dem U5spezifischen hPrp6-Protein interagiert, wurde auch das hPrp6-Protein in die vorliegende Untersuchung mit einbezogen. Dabei war es zunächst notwendig, die in vivo Funktion der beiden Proteine hPrp31 und hPrp6 biochemisch zu charakterisieren, indem die RNAi-vermittelte Depletion beider Proteine in einem Maßstab etabliert wurde, der genügend Zellen zur Präparation eines spleißaktiven Kernextraktes liefert. Da es im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang, RNAi in einem Maßstab zu etablieren, der eine solche biochemische Analyse erlaubt, konnte nun gezeigt werden, dass das hPrp31- und hPrp6-Protein für die Stabilität des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels in vivo essentiell sind. Darüber hinaus konnte durch RNAi-vermittelte Depletion des hPrp31- und hPrp6-Proteins auch ein System entwickelt werden, mit dem spezifisch die tri-snRNP-Bildung in

der Zelle verhindert werden kann und das die Identifizierung der Cajal Bodies als Orte der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung im Zellkern ermöglichte.

5.1 Bedeutung des U4/U6-hPrp31- und des U5-hPrp6-Proteins für die Zelle

5.1.1 Die Proteine hPrp31 und hPrp6 sind essentiell für das Überleben der Zelle

Zur Charakterisierung der *in vivo* Funktion von hPrp31- und hPrp6–Protein im humanen System wurden beide Proteine durch RNA-Interferenz selektiv aus der Zelle entfernt. In einer ersten Untersuchung wurde der Effekt der Depletion von hPrp31- und hPrp6-Protein auf das Zellwachstum humaner Zellen analysiert, in Abwesenheit sowohl des hPrp31- als auch des hPrp6-Proteins war die Anzahl lebender Zellen nach mehr als 48 Stunden im Vergleich zur Anzahl lebender Zellen, die nach Transfektion mit einer Kontroll-siRNA beobachtet wurden, deutlich reduziert und die Zellen gingen in die Apoptose über. (siehe Absatz 4.1). Diese Beobachtungen demonstrieren die essentielle Bedeutung der Proteine hPrp31 und hPrp6 für das humane System und stimmen mit unabhängigen Studien in der Bäckerhefe Saccharomyces cerevisiae überein, die belegen, dass die Abschaltung der für die orthologen Proteine des hPrp31 und hPrp6, Prp31p bzw. Prp6p, codierenden Gene eine letale Wirkung auf die Zellen hat (Legrain *et al.*, 1991; Weidenhammer *et al.*, 1996).

5.1.2 Die Rolle des hPrp31- und hPrp6-Proteins bei der Bildung des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels

Zur weiteren funktionellen Charakterisierung der Proteine hPrp31 und hPrp6 wurden die spezifisch gegen die mRNA des entsprechenden Proteins gerichteten siRNAs durch Elektroporation in die Zelle eingebracht. Dadurch ist es im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals gelungen eine ausreichende Menge RNAi-depletierte Zellen zur Herstellung eines spleißaktiven Kernextraktes zu generieren. Anschließend konnte dann durch Co-Präzipitations-Analysen von U snRNP-Partikeln aus hPrp31- bzw. hPrp6-Protein depletierten Kernextrakten die Auswirkungen der Proteindepletion auf die Integrität der UsnRNP-Partikel und insbesondere des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikel analysiert werden.

Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass in Abwesenheit des U4/U6-Proteins hPrp31 U4/U6 di-snRNP-Partikel und U5 snRNP-Monopartikel in der Zelle akkumulieren, da sich das [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikel nicht bilden kann (siehe Abbildung 4.4 und Abbildung 4.5). Dadurch konnte zum ersten Mal demonstriert werden, dass das U4/U6-Protein hPrp31 essentiell für die Interaktion zwischen dem U4/U6 di-snRNP-Partikel und dem 20S U5 snRNP-Partikel in vivo ist, eine Rolle, die für hPrp31-Protein aufgrund von in vitro Analysen im humanen System bereits früher postuliert wurde (Makarova et al., 2002). Im Rahmen der von Makarova et al. (2002) präsentierten Untersuchungen wurde das hPrp31-Protein durch Immunodepletion aus HeLa-Kernextrakt entfernt, was zur Folge hatte, dass sich das [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikel nicht mehr bilden konnte und U4/U6 di-snRNPund U5 snRNP-Partikel akkumulierten. Allerdings ergaben Untersuchungen der Funktion des Prp31p-Proteins in S. cerevisiae mittels temperatursensitiver prp31-1-Mutanten im Gegensatz dazu, dass Prp31p keine Rolle für die Stabilität des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels spielt, stattdessen aber entscheidend an der Integration des tri-snRNP-Partikels in das Prä-Spleißosom beteiligt ist (Weidenhammer et al., 1997). Auf der Basis solcher Untersuchungen an temperatursensitiven prp31-1-Mutanten kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass eine vollständige Depletion des Prp31p auch in Hefe negative Auswirkung auf die Stabilität des tri-snRNP-Partikels hätte, während eine mutierte Form des Prp31p-Protein, wie gezeigt, durchaus noch in der Lage ist, den Kontakt zwischen dem U4/U6 di-snRNP- und dem U5 snRNP-Partikel zu vermitteln. Es wäre auch vorstellbar, dass das mutierte Prp31p-Protein unter nicht-permissiven Bedingungen eine Konformationsänderung des tri-snRNP-Partikels bewirkt, die die Integration des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels in das Prä-Spleißosom nicht mehr unterstützt. Um allerdings abschließend klären zu können, ob wirklich ein mechanistischer Unterschied der Orthologen hPrp31-Protein und Prp31p im humanen und im Hefesystem vorliegt, sind vergleichbare Experimente im Hefesystem notwendig, die bislang noch ausstehen.

Die hier präsentierten Daten zeigen eindeutig, dass hPrp31-Protein eine entscheidende Rolle in einem früheren Stadium der Spleißosomenassemblierung,

der Bildung des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels, spielt. Eine sehr ähnliche Funktion bei der Bildung des tri-snRNP-Partikels in vivo muss aufgrund der hier vorliegenden Daten nun auch dem U5-spezifschen Protein hPrp6 zugeschrieben werden. In Abwesenheit des hPrp6-Proteins akkumulieren, ebenso wie im Falle einer hPrp31-Depletion, U4/U6 di-snRNP-Partikel und U5 snRNP-Monopartikel, da sich das [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikel nicht bilden kann (siehe Abbildung 4.6). Somit ist auch hPrp6-Protein ein essentieller Faktor, der die Stabilität des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels in vivo gewährleistet. Die Integrität des 20S U5 snRNP-Monopartikels hingegen wurde durch die Abwesenheit des hPrp6-Proteins in der Zelle nicht beeinträchtigt. Diese Ergebnisse sind von besonderer Bedeutung, da die funktionelle Charakterisierung des hPrp6-Proteins im humanen System durch Immundepletion bisher aufgrund der starken Bindung des hPrp6-Proteins an das 20S U5 snRNP-Partikel selbst in Gegenwart einer Salzkonzentration von 500 mM nicht möglich war (Makarov et al., 2000). Die hier dargestellten Ergebnisse bezüglich der Funktion des hPrp6-Proteins als essentiellem Bestandteil des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels sind konsistent mit unabhängigen Untersuchungen zur Funktion des Hefehomologs Prp6p, die zeigen, dass in Abwesenheit von Prp6p die tri-snRNP-Bildung in der Bäckerhefe S. cerevisae verhindert wird und U4/U6 di-snRNP-Partikel und U5 snRNP-Monopartikel in der Zelle akkumulieren (Galisson und Legrain, 1993).

Die hier vorliegenden Daten zur essentiellen Funktion des hPrp31- und hPrp6-Proteins bei der Stabilisierung des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels *in vivo*, legen die Vermutung nahe, das die hPrp31- und hPrp6-Proteine zwischen dem U4/U6 disnRNP-Partikel und dem 20S U5 snRNP-Partikel eine Brücke ausbilden, die zumindest diese beiden Proteine beinhaltet. Insbesondere da aus Zwei-Hybrid Analysen bekannt ist, dass hPrp31- und hPrp6-Protein spezifisch miteinander interagieren (Makarova *et al.*, 2002).

5.2 Die Rolle der Cajal Bodies bei der Zusammenlagerung spleißosomaler U snRNP-Partikel

Durch die im Abschnitt 5.1 diskutierte funktionelle in vivo Charakterisierung der

Proteine hPrp31 und hPrp6 durch RNAi-vermittelte Depletion ist es im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit nicht nur gelungen, die Rolle dieser beiden Proteine bei der Ausbildung des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels *in vivo* aufzuklären, sondern darüber hinaus auch ein System zu entwickeln, mit dem spezifisch die [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung in der Zelle blockiert werden kann. Durch Kombination mit fluoreszenzmikroskopischen Analysen wurde dieses System nach seiner Validierung zur Identifizierung der zellulären [U4/U6.U5] tri-snRNP-Assemblierungszentren herangezogen.

5.2.1 Akkumulation funktioneller U4/U6 di-snRNP-Partikel in den Cajal Bodies bei Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung

Fluoreszenzbasierte mikroskopische Untersuchungen verschiedener spleißosomaler Proteine und U snRNAs, die sich normalerweise im Nukleoplasma, den Speckles und in den Cajal Bodies befinden, ergaben eine dramatische Reorganisation dieser Spleißfaktoren im Zellkern, hervorgerufen durch die spezifische Blockade der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung. In Abwesenheit des hPrp31- oder hPrp6-Proteins, d.h. unter Bedingungen, unter denen sich das [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikel nicht bilden kann, akkumulieren U4/U6-spezifische Proteine und U4 und U6 snRNAs in den Cajal Bodies (siehe Absatz 4.3). Man darf sogar schließen, dass in Abwesenheit von hPrp31- und hPrp6-Protein intakte U4/U6 di-snRNP-Partikel in den Cajal Bodies akkumulieren, da das U4/U6spezifische hPrp4-Protein, dass als Teil des prä-assemblierten heterotrimeren Komplexes der Proteine CypH, hPrp4 und hPrp3 nur an eine intakte U4/U6 Doppelstrangstruktur binden kann (Nottrott et al., 2002), nach Behandlung der Zellen mit RNase A vollständig aus den Cajal Bodies verschwand (siehe Abschnitt 4.3.6). Obwohl diese Behandlung keinerlei Auswirkungen auf die Integrität der Cajal Bodies hatte. Die Annahme intakter U4/U6 di-snRNP-Partikel wird auch durch die biochemische Analyse des sich in hPrp31- oder hPrp6-depletierten Zellen anreichernden U4/U6 di-snRNP-Partikels unterstützt, der in Abwesenheit des U4/U6-Proteins hPrp31 stabil erhalten bleibt. Immunpräzipitationen mit spezifischen Antikörpern aus Kernextrakt, der aus diesen Zellen gewonnen wurde, zeigen, dass das sich anreichernde U4/U6 di-snRNP Partikel stabil mit dem heterotrimeren CypH/hPrp4/hPrp3-Proteinkomplex und dem

Assemblierungsfaktor p110 assoziiert ist (siehe Abschnitt 4.2.2).

Von Protein p110 ist bekannt, dass es zwar Bestandteil des U4/U6 di-snRNP, aber nicht des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels ist (Bell *et al.*, 2002; Makarov *et al.*, 2002). Daher geht man davon aus, dass p110-Protein das fertig assemblierte tri-snRNP-Partikel verlässt oder zeitgleich das U4/U6 di-snRNP-Partikel verlässt, wenn das 20S U5 snRNP-Partikel bindet. Somit akkumulieren in Abwesenheit von hPrp31- oder hPrp6-Protein intakte, mit p110-Protein assoziierte U4/U6 di-snRNP-Partikel in den Cajal Bodies, die sich in einem Stadium befinden, das der Bindung an den 20S U5 snRNP-Partikel unmittelbar vorausgeht.

5.2.2 Cajal Bodies sind die Orte der zellulären [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Abwesenheit des hPrp31- oder hPrp6-Proteins sich qualitativ unterschiedlich auf die Verteilung von U4/U6 di-snRNP-Partikeln und U5 snRNP-Monopartikeln im Zellkern auswirkt. Im Gegensatz zu U5 snRNP-Monopartikeln akkumulieren U4/U6 di-snRNP-Partikel in den Cajal Bodies. Die Frage nach dem Mechanismus dieser selektiven Akkumulation kann im Augenblick noch nicht vollständig beantwortet werden, ebenso wenig wie die Frage, warum das U4/U6 di-snRNP-Partikel im Gegensatz zum U5 snRNP-Monopartikel überhaupt einen speziellen Mechanismus benötigt, um in den Cajal Bodies verankert zu werden. Allerdings scheint es, als ob der Assemblierungsfaktor p110 entscheidend an der Lokalisierung des U4/U6 disnRNP-Partikels beteiligt ist. P110-Protein ist für die di-snRNP-Bildung in der Zelle erforderlich. Es bindet an das U6 snRNP-Monopartikel und somit auch an das U4/U6 di-snRNP-Partikel, allerdings ist p110-Protein kein Bestandteil des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels und des Spleißosoms (Bell et al., 2002). Signifikante Mengen p110-Proteins wurden bereits im Nukleoplasma und in den Cajal Bodies nachgewiesen (Staněk et al., 2003). Dies konnte anhand der hier präsentierten Immunfluoreszenzanalysen bestätigt werden. Die Lokalisierung von p110-Protein in den Cajal Bodies ist abhängig von einer aus sieben TPR-Motiven (engl. tetratricopeptide repeats) bestehenden Proteindomäne am N-Terminus des p110-Proteins, die auch als HAT-Domäne (HAT: half a TPR) bezeichnet wird (Staněk et al., 2003).

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit eines der beiden Proteine hPrp31 oder hPrp6 die Brücke zwischen dem U4/U6 di-snRNP-Partikel und dem U5 snRNP-Monopartikel nicht gebildet werden kann. Unter diesen Bedingungen wird kein [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikel in der Zelle mehr gebildet, und U4/U6 di-snRNP-Partikel assoziiert mit p110-Protein akkumulieren in den Cajal Bodies. Diese Beobachtung legt die Annahme nahe, dass das U4/U6 di-snRNP-Partikel in den Cajal Bodies durch die HAT-Domäne des p110-Proteins zurückgehalten wird, da die Voraussetzungen für die Bildung des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels nicht gegeben sind. Unterstützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, dass die Behandlung mit RNaseA zu keiner Veränderung in der Verteilung des p110-Proteins im Zellkern führt. Das bedeutet, dass das Vorkommen des p110-Proteins in den Cajal Bodies RNA-unabhängig erfolgt, und es weist auf einen bislang nicht identifizierten Interaktionspartner des p110-Proteins in den Cajal Bodies hin.

Für die Retention des U4/U6 di-snRNP-Partikels in den Cajal Bodies sind mindestens zwei unterschiedliche Szenarien denkbar. Zum einen wäre es möglich, dass auch die U4/U6 di-snRNP-Bildung in den Cajal Bodies stattfindet, wie bereits von Staněk *et al.* (2003; 2004) postuliert wurde. Dabei würde das p110-Protein im Nukleoplasma an das U6 snRNP-Monopartikel binden. Anschließend würde das U6 snRNP-Partikel in den Cajal Body gelangen und dort aufgrund seiner Assoziation mit dem Protein p110 verankert werden. Alternativ und in Übereinstimmung mit der großen Menge p110-Proteins im Nukleoplasma, könnte die U4/U6 di-snRNP-Bildung im Nukleoplasma stattfinden, und erst das fertig assemblierte U4/U6 di-snRNP-Partikel würde anschließend im Cajal Body verankert werden.

Die hier präsentierten Daten weisen auf eine zentrale Rolle der Cajal Bodies in den finalen Assemblierungsschritten der Biosynthese des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels hin, bevor dieser in das Spleißosom integriert wird. Des Weiteren unterstützen sie die Hypothese verschiedener, unabhängiger Studien, dass Cajal Bodies eine wichtige Rolle bei der Reifung der U snRNP-Partikel im Zellkern spielen (siehe Einleitung, Absatz 2.4). Basierend auf den hier gezeigten Ergebnissen ist folgende Modellvorstellung für die [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung im Zellkern denkbar (siehe Abbildung 5.1). Das U4/U6 di-snRNP-Partikel wird, im Anschluss an eines der oben für die U4/U6 di-snRNP-Bildung diskutierten Szenarien, durch die Bindung von p110-Protein an eine bislang unidentifizierte Struktur in den Cajal Bodies verankert. In den Cajal Bodies bindet das U5 snRNP-Partikel an das U4/U6 di-snRNP-Partikel. Als Folge dessen dissoziiert das p110-Protein, und das fertig assemblierte [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikel kann aus den Cajal Bodies freigesetzt werden.



Abbildung 5.1 Modell der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung im Zellkern. Der Assemblierungsfaktor p110 bindet im Nukleoplasma an das U6 snRNP-Monopartikel. Anschließend gelangt das U6 snRNP-Partikel in den Cajal Body und wird dort durch seine Assoziation mit p110-Protein an eine bislang unidentifizierte Struktur verankert. Wie von Staněk et al. (2003, 2004) postuliert würde sich im Cajal Body die U4/U6 di-snRNP-Bildung vollziehen. Alternativ dazu könnte sich das U4/U6 di-snRNP-Partikel jedoch auch im Nukleoplasma bilden und erst anschließend in den Cajal Body gelangen. Das fertig assemblierte U4/U6 di-snRNP-Partikel wird durch seine Assoziation mit p110-Protein solange im Cajal Body zurückgehalten werden, bis es durch Bindung des U5 snRNP Monopartikels an das U4/U6 di-snRNP-Partikel zu dessen Dissoziation kommt und das fertig assemblierte [U4/U6.U5] trisnRNP-Partikel den Cajal Body verlassen kann. Es stellt sich die Frage, welche Vorteile es der Zelle bietet, verschiedene zelluläre Prozesse auf dynamische, nicht membranumgebene Kernkompartimente zu begrenzen. Dies um so mehr, da die Bindung des U4/U6 di-snRNP-Partikels an das U5 snRNP-Monopartikel in dem hier entworfenen Szenario lediglich als eine Art Kollision dargestellt wird, die eine proteinvermittelte Katalyse überflüssig machen würde. Es gibt zudem Zellen, denen morphologisch definierte Cajal Bodies per se fehlen. Cajal Bodies und wie Untersuchungen an Coilin Knockout Mäusen zeigen auch Coilin sind somit nicht essentiell für das Überleben der Zelle (Tucker et al., 2001). Insbesondere da die Abwesenheit von Cajal Bodies darüber hinaus auch keinerlei Einfluss auf die Basenmodifikation der U snRNAs (Jády et al., 2003) sowie die Bildung spleißosomaler Komplexe hat, wie der Nachweis von U4/U6 di-snRNP-Partikeln im Nukleoplasma von Coilin-Knockout-Zellen zeigt (Staněk und Neugebauer, 2004). Es wäre jedoch vorstellbar, dass durch die Kompartimentalisierung zellulärer Prozesse wie der UsnRNP-Biosynthese die entsprechenden Partikel in räumliche Nähe zueinander gebracht werden, durch die eine Interaktion der Partikel erst ermöglicht wird. Es wäre auch möglich, dass in diesen Kompartimenten ein für die UsnRNP-Kopplung essentieller Helferfaktor bereitgestellt wird, der kompartimentgebunden ist. Kompartimentalisierung könnte auch verhindern, dass z.B. noch nicht fertig gereifte U snRNP-Partikel oder noch nicht in Komplexe eingebaute UsnRNP-Partikel einer unkontrollierten Wanderung im Kern unterliegen und dadurch den Spleißprozess stören.

Zum jetzigen Zeitpunkt lässt sich noch nicht differenzieren, ob in der Zelle unterschiedliche Wege für die *de novo* Synthese und das Recycling des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels existieren und ob nur eines dieser beiden Ereignisse in den Cajal Bodies stattfindet oder beide. Es ist auch möglich, dass das p110-Protein ausschließlich für den Recyclingprozeß des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels zuständig ist und U6 snRNP-Monopartikel, die bereits einen Spleißzyklus durchlaufen haben, zur tri-snRNP-Regeneration in den Cajal Bodies bringt. Um alle diese Fragen zu klären, werden weitere Experimente notwendig sein.

5.3 Funktionelle Bedeutung des hPrp31- und hPrp6-Proteins für den Prä-mRNA Spleißprozess

5.3.1 Reorganisation von Spleißfaktoren hervorgerufen durch Inhibierung der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung

Im Gegensatz zu der vorangehend beschriebenen Situation für das U4/U6 disnRNP-Partikel, akkumulieren U5 snRNP-Partikel nicht in den Cajal Bodies, wenn die [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung in der Zelle durch die Depletion der Proteine hPrp31 oder hPrp6 verhindert wird. Allerdings führt die Abwesenheit dieser beiden Proteine dazu, dass U5 snRNAs sowie das U5-spezifische Protein hSnu114, die beide normalerweise in Speckles, dem Nukleoplasma und den Cajal Bodies vorkommen, sich in größeren, abgerundeten Speckles reorganisieren (siehe Abschnitt 4.4.1). Auch andere nicht-di-snRNP-spezifische Spleißfaktoren, wie U1 und U2 snRNAs, SF3a120-Protein und das SR-Protein SC35 reorganisieren sich in wenigeren, dafür jedoch größeren Speckles, wenn die [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung in der Zelle blockiert ist (siehe Abschnitt 4.4.1 und 4.4.3). Da dieser Phänotyp bereits in früheren Studien bei Blockade des Spleißprozesses durch Antikörper oder Oligonukleotide beschrieben wurde (Carmo-Fonseca et al., 1992; O'Keefe et al., 1994), gibt diese Reorganisation nicht di-snRNP-spezifischer Spleißfaktoren bei Blockade der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung Grund zu der Annahme, dass es sich bei den beiden Proteine hPrp31 und hPrp6 um essentielle Spleißfaktoren handelt. Diese Annahme wird durch weitere, im Folgenden diskutierte, morphologische Beobachtungen unterstützt.

In Abwesenheit des hPrp31- oder hPrp6-Proteins akkumulieren PolyA+-mRNAs im (siehe Abschnitt 4.5.1). Da bekannt ist, Zellkern dass ungespleißte, polyadenylierte Prä-mRNAs nicht aus dem Zellkern ins Cytoplasma transportiert werden können (Luo und Reed, 1999; Proudfoot et al., 2002), handelt es sich bei unter diesen Bedingungen im Kern akkumulierenden Prä-mRNAs den höchstwahrscheinlich um ungespleißte PolyA+-mRNAs. Aufgrund des Fehlens von [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikeln werden Prä-mRNAs nicht gespleißt und können somit auch nicht aus dem Kern exportiert werden. Diese Art der Untersuchung der PolyA+-mRNA-Verteilung in der Zelle wird bereits in Drosophila melanogaster kernmembranständigen mRNA-Exportfaktoren zur Analyse von in der Kernmembran eingesetzt, bei denen eine Funktionsstörung ebenfalls zu einer

Akkumulation von PolyA+-mRNA im Zellkern führt (Herold et al., 2001).

Des Weiteren beeinflusst die Abwesenheit des hPrp31- oder hPrp6-Proteins auch Proteine 1-7 (Ingelfinger et al., 2002). In Zellen, deren [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung blockiert ist, akkumuliert LSm4-Protein in wenigeren, dafür jedoch größeren cytoplasmatischen Domänen. Ein Effekt, der auch nach Inhibierung der Polymerase II-Transkription durch α -Amanitin beschrieben wurde (Ingelfinger, 2003). Sowohl die Inhibierung der Transkription durch α -Amanitin als auch die Inhibierung des Spleißprozesses haben zur Folge, dass das Substrat des $5' \rightarrow 3'$ mRNA-Abbaus im Cytoplasma fehlt. Dadurch reichern sich die mRNA-Abbaufaktoren in den cytoplasmatischen Domänen die an, höchstwahrscheinlich als Speicherzentren von mRNA-Abbaufaktoren fungieren und nicht als Orte des aktiven mRNA-Abbaus (Ingelfinger, 2003). Somit unterstützt auch die beobachtete Akkumulation von LSm-Proteinen in wenigeren und größeren cytoplasmatischen Domänen die Annahme eines Spleißdefekts aufgrund der Depletion des hPrp31- oder hPrp6-Proteins.

5.3.2 hPrp31- und hPrp6-Proteine sind essentiell für das Prä-mRNA Spleißen in vivo

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit durchgeführte biochemische Analysen, die zeigen, dass sowohl hPrp31- als auch hPrp6-Protein notwendig für die Bildung des spleißosomalen B-Komplexes sind, bestätigen eindrucksvoll die auf zellbiologischen Beobachtungen basierende Annahme, dass hPrp31- und hPrp6-Protein essentielle Spleißfaktoren sind. In *in vitro* Spleißreaktionen, die mit Kernextrakt aus Zellen deren [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung durch die Abwesenheit von hPrp31- oder hPrp6-Protein verhindert wird durchgeführt wurden, akkumuliert A-Komplex, der aufgrund des Fehlens des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels nicht zu B-Komplex umgesetzt werden kann (siehe Abschnitt 4.5.2). In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis wurde in unabhängigen Studien im humanen *in vitro* System sowie im Hefesystem bereits gezeigt, dass hPrp31-Protein bzw. Prp31p essentielle Spleißfaktoren sind, in deren Abwesenheit sich der spleißosomale B-Komplex (Mensch) bzw. das aktivierte Spleißosom (Hefe) nicht bilden können (Makarova *et al.*, 2002; Weidenhammer *et al.*, 1997; Weidenhammer *et al.*, 1996). Über das zum hPrp6-Protein homologe Hefeprotein Prp6p war bislang aus Untersuchungen an *S. cerevisiae* nur bekannt, dass es essentiell für den Spleißprozess ist (Galisson und Legrain, 1993). Unbekannt war allerdings, welcher Mechanismus dieser Blockade des Spleißprozesses zugrunde liegt.

Im Rahmen einer biochemischen Analyse der Spleißaktivität konnte jedoch außer einer leichten Akkumulation ungespleißter Prä-mRNA kein Unterschied zwischen hPrp31- bzw. hPrp6-Protein depletierten Extrakten und Extrakten aus Zellen, die nur mit einer Kontroll-siRNA transfiziert wurden, beobachtet werden (siehe Abschnitt 4.5.2). Die Diskrepanz dieser Ergebnisse und der spleißosomalen Komplexanalyse lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass hPrp31- und hPrp6-Proteine durch RNA-Interferenz nicht vollständig aus der Zelle entfernt werden konnten. Etwa 5-10 % der Proteine und damit auch das [U4/U6.U5] trisnRNP-Partikel sind immer noch in der Zelle vorhanden. Geht man basierend von einer in der Literatur beschriebenen (Hall und Konarska, 1992) zellulären tri-snRNP-Konzentration von 30-60 nM aus, entsprechen 5-10 % des tri-snRNP-Partikels in der Zelle einer Konzentration von 1.5 nM-3 nM. Vergleicht man diese Konzentration mit der zur Spleißanalyse eingesetzten Menge MINX Prä-mRNA von 1.44 nM, wird deutlich, dass die nach RNAi in der Zelle verbleibende Menge tri-snRNP-Partikel ausreicht, um die vorliegende Menge an Prä-mRNA zu spleißen. Vorstellbar wäre jedoch, dass die Reduktion der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Konzentration in der Zelle auf 5-10 % dramatische Konsequenzen für einige speziellere Prä-mRNAs in der Zelle haben könnte oder solche Prä-mRNAs, die zelltypspezifisch vorhanden sind, wie z.B. die Opsin-Prä-mRNA in den Photorezeptoren des Auges. Der Einfluss einer solchen [U4/U6.U5] tri-snRNP-Reduktion auf die Opsin-Prä-mRNA ist insbesondere deshalb von großem Interesse, da Mutationen in dem für das hPrp31-Protein codierenden Gen PRPF31 die Ursache der autosomal, dominanten Form der Retinitis Pigmentosa (adRP) darstellen (Deery et al., 2002; Vithana et al., 2001).

5.4 Mögliches Modellsystem zur Untersuchung der autosomal dominanten Form der Retinitis Pigmentosa

Bei der autosomal dominanten Form der Retinitis Pigmentosa handelt es sich um

eine Augenkrankheit, die zur Nachtblindheit, einem eingeschränkten Sichtfeld und schließlich aufgrund des Absterbens der Photorezeptoren auch zur Erblindung führt (van Soest et al., 1999). Das Opsin-Protein ist neben dem Retinol Hauptbestandteil des Photopigments Rhodopsin in den für das Sehen bei Nacht verantwortlichen Stäbchenzellen der Retina (Netzhaut). Rhodopsin befindet sich in hohen Konzentrationen in den Membranscheibchen des Außensegments der Stäbchen und wird im Verlaufe eines Tages verstärkt umgesetzt. Die ständige Neusynthese des Rhodopsins und die dazu erforderliche verstärkte Spleißaktivität in den Stäbchenzellen könnten der Grund sein, warum sich Mutationen in PRPF31, die u.a. zu verkürzten Varianten des hPrp31-Proteins führen und dadurch die Abnahme funktionellen [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels zur Folge haben, nur auf die Photorezeptoren und nicht auf alle somatischen Körperzellen auswirken. Die reduzierte Menge an tri-snRNP-Partikeln in solchen Zellen würde nicht mehr ausreichen, um die erforderliche Menge der Opsin-Prä-mRNA zu spleißen, es käme zu einem Mangel an Rhodopsin in den Photorezeptoren. Eine vollständige Depletion des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels würde sich hingegen wahrscheinlich auf alle Körperzellen auswirken und zu deren Absterben führen, wie es für HeLa-Zellen nach nahezu vollständiger Depletion des hPrp31-Proteins bereits beobachtet wurde (siehe Absatz 4.1). Da die tatsächlichen molekularen Ursachen der Retinitis Pigmentosa noch unklar sind, könnte das im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelte System aus einer Kombination von RNAivermittelter Depletion des hPrp31-Proteins und biochemischer Analyse vielleicht zu Aufklärung dieser Krankheit und der Entwicklung neuer Therapieansätze beitragen.

5.5 Ausblick

Durch die Identifizierung der Cajal Bodies als Orte der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung liefert die vorliegende Arbeit erstmals Daten, die die postulierte Rolle der Cajal Bodies im Verlauf der U snRNP-Reifung unterstützen. Ein Ziel weiterführender Studien wird somit sein, die Rolle der Cajal Bodies im Reifungsprozess anderer U snRNP-Partikel zu analysieren. Darüber hinaus könnte das andersartige Verhalten des U5 snRNP-Partikels, das im Gegensatz zu U4/U6 di-snRNP-Partikeln nicht in den Cajal Bodies akkumuliert, wenn die tri-snRNP-Bildung in der Zelle blockiert ist, durch die funktionelle Analyse des U5-52K Proteins aufgeklärt werden. Für dieses Protein, das nicht Bestandteil des [U4/U6.U5] tri-snRNP-Partikels ist, wurde bereits eine ähnliche Funktion bei der tri-snRNP-Bildung postuliert wie für das p110-Protein (Laggerbauer *et al.*, 2005).

Ein weiteres Ziel zukünftiger Studien wird zudem sein, herauszufinden in welchem nukleären Kompartiment der Assemblierungsfaktor p110 an das U6 snRNP-Monopartikel bindet und in welchem Stadium der [U4/U6.U5] tri-snRNP-Bildung er sich wieder löst. Ebenso soll in diesem Zusammenhang auch die Frage nach dem Interaktionspartner des p110-Proteins in den Cajal Bodies geklärt werden.

Durch die hier vorliegende Arbeit wurde ein sehr viel versprechendes System zur Untersuchung der Mutanten des hPrp31-Proteins erarbeitet, die in Patienten mit autosomal, dominanter Form der Retinitis Pigmentosa (adRP) vorliegen (Vithana et al., 2001). Aufgrund der erreichten deutlich reduzierten Konzentration endogenen hPrp31-Proteins in diesem RNAi-basierten System können zukünftig die molekularen Ursachen der adRP charakterisiert werden, in dem die mutierten hPrp31-Proteine wie in den Photorezeptoren von adRP-Patienten mit dem endogenen Protein kompetiert werden. Durch Komplementation hPrp31depletierter Extrakte mit rekombinanten adRP-Proteinmutanten des hPrp31-Proteins in vitro soll zum einen deren Wirkung auf die Stabilität des [U4/U6.U5] trisnRNP-Partikels durch Immunpräzipitationen und zum anderen ihr Effekt auf die Assemblierung spleißosomaler Komplexe auf dem Prä-mRNA-Substrat durch in vitro Spleißreaktionen analysiert werden. Des weiteren soll durch die gleichzeitige Transfektion von Plasmiden, die (a) eine siRNA gegen die 3' UTR des hPrp31-Proteins (so genannte short hairpin (sh)RNAs) und (b) eine HA-markierte (humanes Influenza Hämagglutinin (HA) Protein) Form des hPrp31 Wildtyp- oder Mutanten-Proteins exprimieren, die zellbiologische aber auch biochemische in vivo Analyse der unterschiedlichen adRP-Mutanten vorangebracht werden. So ließe sich beispielsweise analysieren, ob die Akkumulation des U4/U6 di-snRNP-Partikels in den Cajal Bodies durch die Wirkung exogener Proteine aufgehoben werden kann.

Generell hat die vorliegende Arbeit die methodischen Voraussetzungen zur

funktionellen *in vivo* Analyse von Spleißfaktoren geschaffen, die derzeit bereits von verschiedenen Mitgliedern der Arbeitsgruppe durchgeführt wird. Neben der vollständigen Depletion einzelner Proteine bietet sich nun auch die Möglichkeit im humanen System wie im Hefesystem Mutanten zu erzeugen, in denen Spleißdefekte *in vivo* untersucht werden können. Es wäre z.B. denkbar, durch Komplementation mit Mutanten des depletierten Proteins, Proteindomänen zu identifizieren, die für die Spleißfunktion des jeweiligen Proteins in der Zelle essentiell sind. In Anbetracht der großen Bedeutung, die Spleißfaktoren für die Genese einer Reihe von Krankheiten haben, - neben der bereits angesprochenen autosomal dominanten Form der *Retinitis Pigmentosa* (adRP) z.B. auch für die Spinale Muskelatrophie (SMA)-, ist dies auch für die Entwicklung potentieller Therapieansätze von Interesse.

6. LITERATURVERZEICHNIS

A

- Abovich, N., Legrain, P. & Rosbash, M. (1990) The yeast PRP6 gene encodes a U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein particle (snRNP) protein, and the PRP9 gene encodes a protein required for U2 snRNP binding. Mol Cell Biol, 10, 6417-6425.
- Achsel, T., Ahrens, K., Brahms, H., Teigelkamp, S. & Lührmann, R. (1998) The human U5-220kD protein (hPrp8) forms a stable RNA-free complex with several U5-specific proteins, including an RNA unwindase, a homologue of ribosomal elongation factor EF-2, and a novel WD-40 protein. *Mol. Cell. Biol.*, 18, 6756-6766.
- Achsel, T., Brahms, H., Kastner, B., Bachi, A., Wilm, M. & Lührmann, R. (1999) A doughnutshaped heteromer of human Sm-like proteins binds to the 3'-end of U6 snRNA, thereby facilitating U4/U6 duplex formation in vitro. *EMBO J.*, 18, 5789-5802.
- Almeida, F., Saffrich, R., Ansorge, W. & Carmo-Fonseca, M. (1998) Microinjection of anticoilin antibodies affects the structure of coiled bodies. *J Cell Biol*, 142, 899-912.
- Andrade, L.E., Chan, E.K., Raska, I., Peebles, C.L., Roos, G. & Tan, E.M. (1991) Human autoantibody to a novel protein of the nuclear coiled body: immunological characterization and cDNA cloning of p80-coilin. *J Exp Med*, 173, 1407-1419.

В

Bach, M., Winkelmann, G. & Lührmann, R. (1989) 20S small nuclear ribonucleoprotein U5 shows a surprisingly complex protein composition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 6038-6042.

Bartels, C., Klatt, C., Lührmann, R. & Fabrizio, P. (2002) The ribosomal translocase homologue Snu114p is involved in unwinding U4/U6 RNA during activation of the spliceosome. *EMBO Rep*, 3, 875-880.

- Bartels, C., Urlaub, H., Lührmann, R. & Fabrizio, P. (2003) Mutagenesis suggests several roles of Snu114p in pre-mRNA splicing. *J Biol Chem*, 278, 28324-28334.
- Baulcombe, D. (2004) RNA silencing in plants. Nature, 431, 356-363.
- Bearden, J.C., Jr. (1978) Quantitation of submicrogram quantities of protein by an improved protein-dye binding assay. Biochim Biophys Acta, 533, 525-529.

- Behrens, S.E. & Lührmann, R. (1991) Immunoaffinity purification of a [U4/U6.U5] tri-snRNP from human cells. Genes Dev, 5, 1439-1452.
- Behrens, S.E., Tyc, K., Kastner, B., Reichelt, J. & Lührmann, R. (1993) Small nuclear ribonucleoprotein (RNP) U2 contains numerous additional proteins and has a bipartite RNP structure under splicing conditions. *Mol Cell Biol*, 13, 307-319.
- Bell, M., Schreiner, S., Damianov, A., Reddy, R. & Bindereif, A. (2002) p110, a novel human U6 snRNP protein and U4/U6 snRNP recycling factor. EMBOJ, 21, 2724-2735.
- Bindereif, A., Wolff, T. & Green, M.R. (1990) Discrete domains of human U6 snRNA required for the assembly of U4/U6 snRNP and splicing complexes. *EMBOJ*, 9, 251-255.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7, 1513-1523.
- Black, D.L. & Pinto, A.L. (1989) U5 small nuclear ribonucleoprotein: RNA structure analysis and ATP-dependent interaction with U4/U6. *Mol Cell Biol*, 9, 3350-3359.
- Branlant, C., Krol, A., Ebel, J.P., Lazar, E., Haendler, B. & Jacob, M. (1982) U2 RNA shares a structural domain with U1, U4, and U5 RNAs. *EMBOJ*, 1, 1259-1265.
- Brosi, R., Groning, K., Behrens, S.E., Lührmann, R. & Krämer, A. (1993a) Interaction of mammalian splicing factor SF3a with U2 snRNP and relation of its 60-kD subunit to yeast PRP9. Science, 262, 102-105.
- Brosi, R., Hauri, H.P. & Kramer, A. (1993b) Separation of splicing factor SF3 into two components and purification of SF3a activity. *J Biol Chem*, 268, 17640-17646.
- Burge, C.B., Tuschl, T. & Sharp, P.A. (1999) Splicing of precursors to mRNAs by the spliceosomes. In Gesteland, R.F., Cech, T.R. and Atkins, J.F. (eds.), *The RNA world*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 525-560.
- 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. *Anal Biochem*, 112, 195-203.

С

- Cajal, S. (1903) Coloracion seletiva del reticulo protoplasmatico y sus efectos en los diversos organos nerviosos de vertebrados e invertebrados. Trab. Lab. Invest. Biol, 2, 129-221.
- Carmo-Fonseca, M., Pepperkok, R., Carvalho, M.T. & Lamond, A.I. (1992) Transcriptiondependent colocalization of the U1, U2, U4/U6, and U5 snRNPs in coiled bodies. *J Cell Biol*, 117, 1-14.

Carmo-Fonseca, M., Pepperkok, R., Sproat, B.S., Ansorge, W., Swanson, M.S. & Lamond, A.I. (1991a) In vivo detection of snRNP-rich organelles in the nuclei of mammalian cells. *EMBOJ*, 10, 1863-1873.

Carmo-Fonseca, M., Tollervey, D., Pepperkok, R., Barabino, S.M., Merdes, A., Brunner, C., Zamore, P.D., Green, M.R., Hurt, E. & Lamond, A.I. (1991b) Mammalian nuclei contain foci which are highly enriched in components of the pre-mRNA splicing machinery. *EMBOJ*, 10, 195-206.

- Collins, C.A. & Guthrie, C. (1999) Allele-specific genetic interactions between Prp8 and RNA active site residues suggest a function for Prp8 at the catalytic core of the spliceosome. Genes Dev, 13, 1970-1982.
- Collins, C.A. & Guthrie, C. (2000) The question remains: is the spliceosome a ribozyme? . Nat Struct Biol, 7, 850-854.

D

- Darzacq, X., Jady, B.E., Verheggen, C., Kiss, A.M., Bertrand, E. & Kiss, T. (2002) Cajal bodyspecific small nuclear RNAs: a novel class of 2'-O-methylation and pseudouridylation guide RNAs. *EMBOJ*, 21, 2746-2756.
- Das, B.K., Xia, L., Palandjian, L., Gozani, O., Chyung, Y. & Reed, R. (1999) Characterization of a protein complex containing spliceosomal proteins SAPs 49, 130, 145, and 155. *Mol Cell Biol*, 19, 6796-6802.
- Deery, E.C., Vithana, E.N., Newbold, R.J., Gallon, V.A., Bhattacharya, S.S., Warren, M.J., Hunt, D.M. & Wilkie, S.E. (2002) Disease mechanism for retinitis pigmentosa (RP11) caused by mutations in the splicing factor gene PRPF31. *Hum Mol Genet*, 11, 3209-3219.
- Dower, W.J., Miller, J.F. & Ragsdale, C.W. (1988) High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res*, 16, 6127-6145.
- Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D. & Sharp, P.A. (2003) Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. Nat Rev Mol Cell Biol, 4, 457-467.

Ε

- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. & Tuschl, T. (2001a) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411, 494-498.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W. & Tuschl, T. (2001b) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. Genes Dev., 15, 188-200.

Elbashir, S.M., Harborth, J., Weber, K. & Tuschl, T. (2002) Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods*, 26, 199-213.

F

- Fabrizio, P., Laggerbauer, B., Lauber, J., Lane, W.S. & Lührmann, R. (1997) An evolutionarily conserved U5 snRNP-specific protein is a GTP-binding factor closely related to the ribosomal translocase EF-2. *EMBO J.*, 16, 4092-4106.
- Fetzer, S., Lauber, J., Will, C.L. & Lührmann, R. (1997) The [U4/U6.U5] tri-snRNP-specific 27K protein is a novel SR protein that can be phosphorylated by the snRNP-associated protein kinase. RNA, 3, 344-355.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. & Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. *Nature*, 391, 806-811.
- Fischer, U., Liu, Q. & Dreyfuss, G. (1997) The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. *Cell*, 90, 1023-1029.
- Fischer, U., Sumpter, V., Sekine, M., Satoh, T. & Lührmann, R. (1993) Nucleo-cytoplasmic transport of U snRNPs: definition of a nuclear location signal in the Sm core domain that binds a transport receptor independently of the m3G cap. *EMBO J.*, 12, 573-583.
- Fu, X.D. (1995) The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors. *RNA*, 1, 663-680.
- Fu, X.D. & Maniatis, T. (1990) Factor required for mammalian spliceosome assembly is localized to discrete regions in the nucleus. *Nature*, 343, 437-441.
- Fu, X.D. & Maniatis, T. (1992a) The 35-kDa mammalian splicing factor SC35 mediates specific interactions between U1 and U2 small nuclear ribonucleoprotein particles at the 3' splice site. Proc Natl Acad Sci U S A, 89, 1725-1729.
- Fu, X.D. & Maniatis, T. (1992b) Isolation of a complementary DNA that encodes the mammalian splicing factor SC35. Science, 256, 535-538.

G

- Galisson, F. & Legrain, P. (1993) The biochemical defects of prp4-1 and prp6-1 yeast splicing mutants reveal that the PRP6 protein is required for the accumulation of the [U4/U6.U5] tri-snRNP. Nucleic Acids Res, 21, 1555-1562.
- Gall, J.G. (2000) Cajal bodies: the first 100 years. Annu Rev Cell Dev Biol, 16, 273-300.

- Gama-Carvalho, M., Krauss, R.D., Chiang, L., Valcarcel, J., Green, M.R. & Carmo-Fonseca, M. (1997) Targeting of U2AF65 to sites of active splicing in the nucleus. *J Cell Biol*, 137, 975-987.
- Ganot, P., Jady, B.E., Bortolin, M.L., Darzacq, X. & Kiss, T. (1999) Nucleolar factors direct the 2'-O-ribose methylation and pseudouridylation of U6 spliceosomal RNA. *Mol Cell Biol*, 19, 6906-6917.
- Gonzalez-Santos, J.M., Wang, A., Jones, J., Ushida, C., Liu, J. & Hu, J. (2002) Central region of the human splicing factor Hprp3p interacts with Hprp4p. *J Biol Chem*, 277, 23764-23772.
- Gorczyca, W., Gong, J. & Darzynkiewicz, Z. (1993) Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res*, 53, 1945-1951.
- Gozani, O., Feld, R. & Reed, R. (1996) Evidence that sequence-independent binding of highly conserved U2 snRNP proteins upstream of the branch site is required for assembly of spliceosomal complex A. Genes Dev, 10, 233-243.
- Graveley, B.R. (2000) Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA*, 6, 1197-1211.
- Green, M.R. (1991) Biochemical mechanisms of constitutive and regulated pre-mRNA splicing. Annu Rev Cell Biol, 7, 559-599.

Η

- Hall, K.B. & Konarska, M.M. (1992) The 5' splice site consensus RNA oligonucleotide induces assembly of U2/U4/U5/U6 small nuclear ribonucleoprotein complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 10969-10973.
- Hermann, H., Fabrizio, P., Raker, V.A., Foulaki, K., Hornig, H., Brahms, H. & Lührmann, R. (1995) snRNP Sm proteins share two evolutionarily conserved sequence motifs which are involved in Sm protein-protein interactions. *EMBO J.*, 14, 2076-2088.
- Herold, A., Klymenko, T. & Izaurralde, E. (2001) NXF1/p15 heterodimers are essential for mRNA nuclear export in Drosophila. *RNA*, 7, 1768-1780.
- Horowitz, D.S., Kobayashi, R. & Krainer, A.R. (1997) A new cyclophilin and the human homologues of yeast Prp3 and Prp4 form a complex associated with U4/U6 snRNPs. *RNA*, 3, 1374-1387.
- Huang, S. & Spector, D.L. (1992) U1 and U2 small nuclear RNAs are present in nuclear speckles. Proc Natl Acad Sci U S A, 89, 305-308.

I

- Ingelfinger, D. (2003) Untersuchungen zur intrazellulären Organisation und Funktion der humanen Sm-ähnlichen Proteine LSm1-7. Dissertation, Fachbereich Biologie, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Ingelfinger, D., Arndt-Jovin, D.J., Lührmann, R. & Achsel, T. (2002) The human LSm1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrnl in distinct cytoplasmic foci. *RNA*, 8, 1489-1501.

J

Jacobson, M.R., Rhoadhouse, M. & Pederson, T. (1993) U2 small nuclear RNA 3' end formation is directed by a critical internal structure distinct from the processing site.

Mol Cell Biol, 13, 1119-1129.

- Jády, B.E., Darzacq, X., Tucker, K.E., Matera, A.G., Bertrand, E. & Kiss, T. (2003) Modification of Sm small nuclear RNAs occurs in the nucleoplasmic Cajal body following import from the cytoplasm. *EMBOJ*, 22, 1878-1888.
- Jarmolowski, A. & Mattaj, I.W. (1993) The determinants for Sm protein binding to Xenopus U1 and U5 snRNAs are complex and non-identical. *EMBOJ*, 12, 223-232.
- Jones, M.H. & Guthrie, C. (1990) Unexpected flexibility in an evolutionarily conserved protein-RNA interaction: genetic analysis of the Sm binding site. *EMBOJ*, 9, 2555-2561.

Κ

- Kastner, B. (1998) Purification and Electron Microscopy of spliceosomal snRNPs. In Schenkel, J. (ed.), RNP particles, Splicing and Autoimmune Diseases. Springer Lab manual. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 95-140.
- Kiss, A.M., Jády, B.E., Darzacq, X., Verheggen, C., Bertrand, E. & Kiss, T. (2002) A Cajal body-specific pseudouridylation guide RNA is composed of two box H/ACA snoRNA-like domains. *Nucleic Acids Res*, 30, 4643-4649.
- Krämer, A. (1996) The structure and function of proteins involved in mammalian premRNA splicing. Annu Rev Biochem, 65, 367-409.
- Krämer, A., Gruter, P., Groning, K. & Kastner, B. (1999) Combined biochemical and electron microscopic analyses reveal the architecture of the mammalian U2 snRNP. *J Cell Biol*, 145, 1355-1368.
- Kunkel, G.R., Maser, R.L., Calvet, J.P. & Pederson, T. (1986) U6 small nuclear RNA is transcribed by RNA polymerase III. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 8575-8579.

L

- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685.
- Laggerbauer, B., Liu, S., Makarov, E., Vornlocher, H.P., Makarova, O., Ingelfinger, D., Achsel, T. & Lührmann, R. (2005) The human U5 snRNP 52K protein (CD2BP2) interacts with U5-102K (hPrp6), a U4/U6.U5 tri-snRNP bridging protein, but dissociates upon tri-snRNP formation. *RNA*, im Druck.
- Lamond, A.I., Konarska, M.M., Grabowski, P.J. & Sharp, P.A. (1988) Spliceosome assembly involves the binding and release of U4 small nuclear ribonucleoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 411-415.
- Lamond, A.I. & Spector, D.L. (2003) Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. Nat Rev Mol Cell Biol, 4, 605-612.
- Lange, T.S. & Gerbi, S.A. (2000) Transient nucleolar localization Of U6 small nuclear RNA in Xenopus Laevis oocytes. Mol. Biol. Cell, 11, 2419-2428.
- Lauber, J., Plessel, G., Prehn, S., Will, C.L., Fabrizio, P., Groning, K., Lane, W.S. & Lührmann, R. (1997) The human U4/U6 snRNP contains 60 and 90kD proteins that are structurally homologous to the yeast splicing factors Prp4p and Prp3p. *Rna*, 3, 926-941.
- Lee, K.A. & Green, M.R. (1990) Small-scale preparation of extracts from radiolabeled cells efficient in pre-mRNA splicing. *Methods Enzymol*, 181, 20-30.
- Legrain, P., Chapon, C., Schwob, E., Martin, R., Rosbash, M. & Dujon, B. (1991) Cloning of the two essential yeast genes, PRP6 and PRP9, and their rapid mapping, disruption and partial sequencing using a linker insertion strategy. *Mol Gen Genet*, 225, 199-202.
- Lerner, E.A., Lerner, M.R., Janeway, C.A., Jr. & Steitz, J.A. (1981) Monoclonal antibodies to nucleic acid-containing cellular constituents: probes for molecular biology and autoimmune disease. Proc Natl Acad Sci U S A, 78, 2737-2741.
- Liu, Q., Fischer, U., Wang, F. & Dreyfuss, G. (1997) The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins. *Cell*, 90, 1013-1021.
- Luo, M.J. & Reed, R. (1999) Splicing is required for rapid and efficient mRNA export in metazoans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 14937-14942.

Μ

Madhani, H.D. & Guthrie, C. (1992) A novel base-pairing interaction between U2 and U6 snRNAs suggests a mechanism for the catalytic activation of the spliceosome. *Cell*, 71, 803-817.

- Makarov, E.M., Makarova, O.V., Achsel, T. & Lührmann, R. (2000) The human homologue of the yeast splicing factor prp6p contains multiple TPR elements and is stably associated with the U5 snRNP via protein-protein interactions. *J Mol Biol*, 298, 567-575.
- Makarov, E.M., Makarova, O.V., Urlaub, H., Gentzel, M., Will, C.L., Wilm, M. & Lührmann, R. (2002) Small nuclear ribonucleoprotein remodeling during catalytic activation of the spliceosome. *Science*, 298, 2205-2208.
- Makarova, O.V., Makarov, E.M. & Lührmann, R. (2001) The 65 and 110 kDa SR-related proteins of the U4/U6.U5 tri-snRNP are essential for the assembly of mature spliceosomes. *EMBO J.*, 20, 2553-2563.
- Makarova, O.V., Makarov, E.M., Liu, S., Vornlocher, H.P. & Luhrmann, R. (2002) Protein 61K, encoded by a gene (PRPF31) linked to autosomal dominant retinitis pigmentosa, is required for U4/U6*U5 tri-snRNP formation and pre-mRNA splicing. *EMBOJ*, 21, 1148-1157.
- Massenet, S., Mougin, A. & Branlant, C. (1998) Posttranscriptional modifications in the U small nuclear RNAs. In Grosjean, H., Benner, R. (ed.), *The Modification and Editing of RNA*. ASM Press, Washington DC, pp. 201-227.
- Matera, A.G. & Ward, D.C. (1993) Nucleoplasmic organization of small nuclear ribonucleoproteins in cultured human cells. *J Cell Biol*, 121, 715-727.
- Mattaj, I.W. (1986) Cap trimethylation of U snRNA is cytoplasmic and dependent on U snRNP protein binding. *Cell*, 46, 905-911.
- Mattaj, I.W., Habets, W.J. & van Venrooij, W.J. (1986) Monospecific antibodies reveal details of U2 snRNP structure and interaction between U1 and U2 snRNPs. *EMBOJ*, 5, 997-1002.
- Matzke, M.A. & Birchler, J.A. (2005) RNAi-mediated pathways in the nucleus. Nat Rev Genet, 6, 24-35.
- McManus, M.T. & Sharp, P.A. (2002) Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. Nat Rev Genet, 3, 737-747.
- Meister, G., Buhler, D., Pillai, R., Lottspeich, F. & Fischer, U. (2001) A multiprotein complex mediates the ATP-dependent assembly of spliceosomal U snRNPs. *Nat Cell Biol*, 3, 945-949.
- Meister, G. & Tuschl, T. (2004) Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 431, 343-349.
- Mermoud, J.E., Cohen, P.T. & Lamond, A.I. (1994) Regulation of mammalian spliceosome assembly by a protein phosphorylation mechanism. *EMBOJ*, 13, 5679-5688.

- Misteli, T., Caceres, J.F. & Spector, D.L. (1997) The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature*, 387, 523-527.
- Monneron, A. & Bernhard, W. (1969) Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. J Ultrastruct Res, 27, 266-288.
- Moore, M.J., Query, C.C. & Sharp, P.A. (1993) Splicing of precursors to mRNA by the spliceosome. In Gesteland, A. (ed.), *RNA World*. Cold Spring Harbor Labratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 303-357.
- Moore, M.J. & Sharp, P.A. (1993) Evidence for two active sites in the spliceosome provided by stereochemistry of pre-mRNA splicing. *Nature*, 365, 364-368.

Ν

- Neer, E.J., Schmidt, C.J., Nambudripad, R. & Smith, T.F. (1994) The ancient regulatoryprotein family of WD-repeat proteins. *Nature*, 371, 297-300.
- Nelissen, R.L., Will, C.L., van Venrooij, W.J. & Lührmann, R. (1994) The association of the U1-specific 70K and C proteins with U1 snRNPs is mediated in part by common U snRNP proteins. *EMBO J.*, 13, 4113-4125.
- Nesic, D., Tanackovic, G. & Krämer, A. (2004) A role for Cajal bodies in the final steps of U2 snRNP biogenesis. J Cell Sci, 117, 4423-4433.
- Nilsen, T.W. (1998) RNA-RNA interactions in nuclear pre-mRNA splicing. In Simons, R.W.a.G.-M., M (ed.), RNA Structure and Function. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 279-308.
- Nottrott, S., Hartmuth, K., Fabrizio, P., Urlaub, H., Vidovic, I., Ficner, R. & Lührmann, R. (1999) Functional interaction of a novel 15.5kD [U4/U6.U5] tri-snRNP protein with the 5' stem-loop of U4 snRNA. *EMBO J.*, 18, 6119-6133.
- Nottrott, S., Urlaub, H. & Lührmann, R. (2002) Hierarchical, clustered protein interactions with U4/U6 snRNA: a biochemical role for U4/U6 proteins. *EMBOJ*, 21, 5527-5538.

0

O'Keefe, R.T., Mayeda, A., Sadowski, C.L., Krainer, A.R. & Spector, D.L. (1994) Disruption of pre-mRNA splicing in vivo results in reorganization of splicing factors. *J Cell Biol*, 124, 249-260.

Ρ

Patton, J.R., Patterson, R.J. & Pederson, T. (1987) Reconstitution of the U1 small nuclear ribonucleoprotein particle. Mol Cell Biol, 7, 4030-4037.

- Paushkin, S., Gubitz, A.K., Massenet, S. & Dreyfuss, G. (2002) The SMN complex, an assemblyosome of ribonucleoproteins. *Curr Opin Cell Biol*, 14, 305-312.
- Pellizzoni, L., Charroux, B. & Dreyfuss, G. (1999) SMN mutants of spinal muscular atrophy patients are defective in binding to snRNP proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 11167-11172.
- Proudfoot, N.J., Furger, A. & Dye, M.J. (2002) Integrating mRNA processing with transcription. Cell, 108, 501-512.

Q

Query, C.C., Moore, M.J. & Sharp, P.A. (1994) Branch nucleophile selection in pre-mRNA splicing: evidence for the bulged duplex model. Genes Dev, 8, 587-597.

R

- Rader, S.D. & Guthrie, C. (2002) A conserved Lsm-interaction motif in Prp24 required for efficient U4/U6 di-snRNP formation. *RNA*, 8, 1378-1392.
- Raghunathan, P.L. & Guthrie, C. (1998) A spliceosomal recycling factor that reanneals U4 and U6 small nuclear ribonucleoprotein particles. *Science*, 279, 857-860.
- Raker, V.A., Plessel, G. & Lührmann, R. (1996) The snRNP core assembly pathway: identification of stable core protein heteromeric complexes and an snRNP subcore particle in vitro. *EMBO J.*, 15, 2256-2269.
- Raker, V.A., Hartmuth, K., Kastner, B. & Lührmann, R. (1999) Spliceosomal U snRNP core assembly: Sm proteins assemble onto an Sm site RNA nonanucleotide in a specific and thermodynamically stable manner. *Mol Cell Biol*, 19, 6554-6565.
- Raska, I., Andrade, L.E., Ochs, R.L., Chan, E.K., Chang, C.M., Roos, G. & Tan, E.M. (1991) Immunological and ultrastructural studies of the nuclear coiled body with autoimmune antibodies. *Exp Cell Res*, 195, 27-37.
- Reddy, R., Henning, D., Das, G., Harless, M. & Wright, D. (1987) The capped U6 small nuclear RNA is transcribed by RNA polymerase III. *J Biol Chem*, 262, 75-81.
- Reed, R. (1989) The organization of 3' splice-site sequences in mammalian introns. Genes Dev, 3, 2113-2123.
- Reed, R. and Palandjian, L. (1997) Spliceosome assembly. In Krainer, A.R. (ed.), Eukaryotic mRNA processing. Oxford IRL Press, Oxford, pp. 103-129.

S

- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) Molecular cloning-A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.
- Schaffert, N., Hossbach, M., Heintzmann, R., Achsel, T. & Lührmann, R. (2004) RNAi knockdown of hPrp31 leads to an accumulation of U4/U6 di-snRNPs in Cajal bodies. EMBO J, 23, 3000-3009.
- Seipelt, R.L., Zheng, B., Asuru, A. & Rymond, B.C. (1999) U1 snRNA is cleaved by RNase III and processed through an Sm site- dependent pathway. *Nucleic Acids Res*, 27, 587-595.
- Seraphin, B. (1995) Sm and Sm-like proteins belong to a large family: identification of proteins of the U6 as well as the U1, U2, U4 and U5 snRNPs. *EMBO J.*, 14, 2089-2098.
- Shooter, R.A. and Gey, G.O. (1952) Studies of the mineral requirements of mammalian cells. Br J Exp Pathol, 33, 98-103.
- Siliciano, P.G. & Guthrie, C. (1988) 5' splice site selection in yeast: genetic alterations in base-pairing with U1 reveal additional requirements. Genes Dev, 2, 1258-1267.
- Singh, R. & Reddy, R. (1989) Gamma-monomethyl phosphate: a cap structure in spliceosomal U6 small nuclear RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 8280-8283.
- Sleeman, J.E. & Lamond, A.I. (1999) Newly assembled snRNPs associate with coiled bodies before speckles, suggesting a nuclear snRNP maturation pathway. *Curr Biol*, 9, 1065-1074.
- Spector, D.L., Fu, X.D. & Maniatis, T. (1991) Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus. *EMBOJ*, 10, 3467-3481.
- Staley, J.P. & Guthrie, C. (1998) Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell*, 92, 315-326.
- Staněk, D. & Neugebauer, K.M. (2004) Detection of snRNP assembly intermediates in Cajal bodies by fluorescence resonance energy transfer. *J Cell Biol*, 166, 1015-1025.
- Staněk, D., Rader, S.D., Klingauf, M. & Neugebauer, K.M. (2003) Targeting of U4/U6 small nuclear RNP assembly factor SART3/p110 to Cajal bodies. *J Cell Biol*, 160, 505-516.
- Sun, J.S. & Manley, J.L. (1995) A novel U2-U6 snRNA structure is necessary for mammalian mRNA splicing. Genes Dev, 9, 843-854.

Т

- Taketo, A. (1988) DNA transfection of Escherichia coli by electroporation. Biochim Biophys Acta, 949, 318-324.
- Taneja, K.L., Lifshitz, L.M., Fay, F.S. & Singer, R.H. (1992) Poly(A) RNA codistribution with microfilaments: evaluation by in situ hybridization and quantitative digital imaging microscopy. *J Cell Biol*, 119, 1245-1260.
- Teigelkamp, S., Mundt, C., Achsel, T., Will, C.L. & Lührmann, R. (1997) The human U5 snRNP-specific 100-kD protein is an RS domain-containing, putative RNA helicase with significant homology to the yeast splicing factor Prp28p. RNA, 3, 1313-1326.
- Tijsterman, M., Ketting, R.F. & Plasterk, R.H. (2002) The genetics of RNA silencing. Annu Rev Genet, 36, 489-519.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 4350-4354.
- Tucker, K.E., Berciano, M.T., Jacobs, E.Y., LePage, D.F., Shpargel, K.B., Rossire, J.J., Chan, E.K., Lafarga, M., Conlon, R.A. & Matera, A.G. (2001) Residual Cajal bodies in coilin knockout mice fail to recruit Sm snRNPs and SMN, the spinal muscular atrophy gene product. J. Cell Biol., 154, 293-307.

U

Ullu, E., Tschudi, C. & Chakraborty, T. (2004) RNA interference in protozoan parasites. *Cell Microbiol*, 6, 509-519.

۷

- van Soest, S., Westerveld, A., de Jong, P.T., Bleeker-Wagemakers, E.M. & Bergen, A.A. (1999) Retinitis pigmentosa: defined from a molecular point of view. Surv Ophthalmol, 43, 321-334.
- Vidal, V.P., Verdone, L., Mayes, A.E. & Beggs, J.D. (1999) Characterization of U6 snRNAprotein interactions. *RNA*, 5, 1470-1481.
- Vithana, E.N., Abu-Safieh, L., Allen, M.J., Carey, A., Papaioannou, M., Chakarova, C., Al-Maghtheh, M., Ebenezer, N.D., Willis, C., Moore, A.T., Bird, A.C., Hunt, D.M. & Bhattacharya, S.S. (2001) A human homolog of yeast pre-mRNA splicing gene, PRP31, underlies autosomal dominant retinitis pigmentosa on chromosome 19q13.4 (RP11).
 Mol Cell, 8, 375-381.

W

Waterhouse, P.M., Wang, M.B. & Lough, T. (2001) Gene silencing as an adaptive defence against viruses. Nature, 411, 834-842.

- Weidenhammer, E.M., Singh, M., Ruiz-Noriega, M. & Woolford, J.L., Jr. (1996) The PRP31 gene encodes a novel protein required for pre-mRNA splicing in Saccharomyces cerevisiae. *Nucleic Acids Res*, 24, 1164-1170.
- Weidenhammer, E.M., Ruiz-Noriega, M. & Woolford, J.L., Jr. (1997) Prp31p promotes the association of the U4/U6 x U5 tri-snRNP with prespliceosomes to form spliceosomes in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol*, 17, 3580-3588.
- Wersig, C. & Bindereif, A. (1990) Conserved domains of human U4 snRNA required for snRNP and spliceosome assembly. Nucleic Acids Res, 18, 6223-6229.
- Will, C.L. & Lührmann, R. (1997a) Protein functions in pre-mRNA splicing. *Curr Opin Cell Biol*, 9, 320-328.
- Will, C.L. and Lührmann, R. (1997b) snRNP structure and function. IRL Press, Oxford.
- Will, C.L., Schneider, C., MacMillan, A.M., Katopodis, N.F., Neubauer, G., Wilm, M., Lührmann, R. & Query, C.C. (2001) A novel U2 and U11/U12 snRNP protein that associates with the pre-mRNA branch site. *EMBO J.*, 20, 4536-4546.
- Will, C.L., Urlaub, H., Achsel, T., Gentzel, M., Wilm, M. & Lührmann, R. (2002) Characterization of novel SF3b and 17S U2 snRNP proteins, including a human Prp5p homologue and an SF3b DEAD-box protein. EMBO J, 21, 4978-4988.
- Wolin, S.L. & Cedervall, T. (2002) The La protein. Annu Rev Biochem, 71, 375-403.
- Wu, J. & Manley, J.L. (1989) Mammalian pre-mRNA branch site selection by U2 snRNP involves base pairing. Genes Dev, 3, 1553-1561.
- Wu, J.A. & Manley, J.L. (1991) Base pairing between U2 and U6 snRNAs is necessary for splicing of a mammalian pre-mRNA. *Nature*, 352, 818-821.

Х

Y

- Yean, S.L. & Lin, R.J. (1991) U4 small nuclear RNA dissociates from a yeast spliceosome and does not participate in the subsequent splicing reaction. *Mol Cell Biol*, 11, 5571-5577.
- Yu, Y.T., Shu, M.D. & Steitz, J.A. (1998) Modifications of U2 snRNA are required for snRNP assembly and pre-mRNA splicing. *EMBOJ*, 17, 5783-5795.

- Zhuang, Y. & Weiner, A.M. (1986) A compensatory base change in U1 snRNA suppresses a 5' splice site mutation. *Cell*, 46, 827-835.
- Zhuang, Y.A., Goldstein, A.M. & Weiner, A.M. (1989) UACUAAC is the preferred branch site for mammalian mRNA splicing. Proc Natl Acad Sci U S A, 86, 2752-2756.
- Zillmann, M., Zapp, M.L. & Berget, S.M. (1988) Gel electrophoretic isolation of splicing complexes containing U1 small nuclear ribonucleoprotein particles. *Mol Cell Biol*, 8, 814-821.

7. ANHANG

Abkürzungsverzeichnis

α	anti
A	Adenosin
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
Amp.	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
BP	branchpoint
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
С	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
СВ	Cajal Body/Coiled Body
cDNA	complementary DNA
C. elegans	Caenorhabditis elegans
Ci	Curie
cm	Zentimeter
cpm	counts per minute (Zerfälle pro Minute)
Δ	delta, steht hier für: depletiert
d	desoxy
Da	Dalton
dd	bi-destilliert (als Präfix)
d.h.	das heißt
D. melanogaster	Drosophila melanogaster
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
Ds	doppelsträngig
DTE	1,4-Dithioerythrol
------------------	---
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminiscence
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	englisch
EtOH	Ethanol
et al.	et alii (lateinisch für: und andere)
f	femto
G	Guanosin
g	Gramm/Zentrifugalkraft
h	Stunden/ human (als Präfix)
HCI	Salzsäure
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
His	Histidin
hn	heterogenous nuclear
k	kilo (als Präfix)
kDa	Kilodalton
I	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
Lsg.	Lösung
Μ	molar
m	milli (als Präfix)
μ	mikro (als Präfix)
MG/MW	Molekulargewicht/molecular weight
m₃G	N ² ,N ² ,N ⁷ -Trimethylguanosin
m ⁷ G	N ⁷ -Monomethylguanosin
min	Minuten
mM	millimolar
mRNA	messenger RNA
ms	Millisekunden
n	nano (als Präfix)
NIS	Non-Immunserum/Präimmunserum
nts	Nukleotide

NTPs	Nukleosid-5′-Triphosphate
OAc	Acetat
OD	Optische Dichte
Oligo	Oligonukleotid
ORF	open reading frame
Р	Phosphat
р	pico (als Präfix)
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCA	Mischung aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol
PFA	Paraformaldehyd
pers.	persönlich
рН	negativer dekadischer Logarithmus der H+-Ionen-Konzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Prä-mRNA	Vorläufer-mRNA
Prp	pre-mRNA processing
%	Prozent
Ру	Pyrimidinbase
R	Purinbase
RBD	RNA-Bindungsdomäne
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
RNasin	Ribonuklease-Inhibitor
RNP	Ribonukleoprotein
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RRM	RNA recognition motif
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg-Einheit (10 ⁻¹³ s)
S	Sekunde
S. cerevisiae	Saccharomyces cerevisiae
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
s.d.	Standardabweichung (standard deviation)
siRNA	small interfering RNA
sn	small nuclear
sno	small nucleolar
S. O.	siehe oben
SR	serin-arginin-reich

SS	einzelsträngig
SS	Spleißstelle
s. u.	siehe unten
т	Thymidin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Lösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris/HCI	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid
tRNA	transfer RNA
U	Uracil/Unit (Finheit der Enzymaktivität)
UK UK	United Kingdom
USA	United States of America
U snRNA	uridine-rich small nuclear RNA
U snRNP	uridine-rich small nuclear ribonucleoprotein
UTP	Uridintriphosphat
UTR	untranslated region
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
WT	Wildtyp
Y	Pyrimidinbase
z.B.	zum Beispiel

Nicht angegebene Abkürzungen für physikalische Größen und deren Einheiten entsprechen dem SI-System.

DANKESCHÖN!!!

An dieser Stelle möchte ich all jenen ein großes "Dankeschön" aussprechen, die mich im Verlauf der letzten Jahre auf die unterschiedlichste Weise unterstützt haben und so zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt hierbei Herrn Prof. Dr. Reinhard Lührmann dafür, dass er mir die Bearbeitung eines äußerst interessanten Projektes ermöglicht und mich stets durch seine rege Diskussionsbereitschaft und zahlreiche wertvolle Ratschläge unterstützt hat. Insbesondere möchte ich mich jedoch für das in mich gesetzte Vertrauen bedanken, dass er mir bei der Präsentation meiner Daten vor der *RNA-Society* in Wien entgegengebracht hat.

Herrn Prof. Dr. Ralf Ficner danke ich für die spontane Übernahme der universitären Betreuung meiner Doktorarbeit und Herrn Prof. Dr. Tomas Pieler für die Übernahme der Korreferentschaft.

Dem Boehringer Ingelheim Fonds möchte ich für die finanzielle Unterstützung danken. Dabei gilt mein ganz besonderer Dank Herrn Dr. Hermann Fröhlich, Frau Monika Beutelspacher und Frau Dr. Claudia Walther für ihr unermüdliches Engagement bei der Stipendiatenbetreuung und die zahlreichen Diskussionen am Titisee, die den Entscheidungsfindungsprozess für meine Zukunftspläne deutlich vorangebracht haben.

Bei Tilmann Achsel möchte ich mich herzlich für den guten Start bei den "Lührmännern" bedanken und für sein stets offenes Ohr und die Einführung in die Geheimnisse der Fluoreszenzmikroskopie.

Dierk Ingelfinger und Maria-Alexandra Andrei danke ich für eine schöne Zeit im Labor 115b.

Den Mitgliedern des "Zellbiologischen Seminars" Ira Lemm, Dierk Ingelfinger, Nick Watkins, Markus Hoßbach, Annemarie Schulz und Patrizia Fabrizio sei gedankt für ihre rege Diskussionsbereitschaft und die vielen Anregungen und Ideen im Verlauf meiner Arbeit.

Genia Makarov und Olga Makarova danke ich für diverse affigereinigte Antikörper und rekombinantes His-hPrp31-Protein zur Durchführung der in Abbildung 4.5 und 4.29 dargestellten Experimente.

Rainer Heintzmann danke ich für die unermüdliche Unterstützung bei der Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten.

Bei Regina Hecker möchte ich mich für die Bereitstellung ihrer Ergebnisse des Cell Survival Assays SF3b14a-depletierter Zellen bedanken.

Markus Hoßbach sei gedankt für Design und Synthese der siRNAs und das Korrekturlesen des Material & Methoden-Teils.

Für das fleißige Korrekturlesen meiner Arbeit und die vielen hilfreichen Kommentare sowie die Bereitstellung von Tabelle 2.2 möchte ich mich ganz herzlich bei Reinhard Rauhut bedanken. Ebenso sei jedoch auch Ira Lemm und Eva Kühn-Hölsken herzlich für fleißiges Korrekturlesen der Arbeit gedankt.

Bei Cindy L. Will möchte ich mich für die kritische Durchsicht verschiedener Abstrakts und meines Manuskripts bedanken, sowie das Verfassen des Antwortschreibens an die Gutachter meiner Publikation.

Nele Bartels danke ich ganz herzlich für die nahe und ferne Unterstützung in allen Lebenslagen, unsere gemeinsamen Mittagessen mit Kartoffeln und Kräuterquark, sowie die eine oder andere Abbildung.

Irene Öchsner und Gabi Heyne sei herzlich für den "Rund-um-Service" arbeitstechnischer und privater Natur gedankt.

Den Heinzelmännchen aus der "Hexenküche" Uschi Drössler und Gertrud Nowak sei für ihre Arbeit und für die eine oder andere "Sitzung auf der Wasserkiste" herzlich gedankt.

Bei Juliane Moses möchte ich mich für die Hilfe bei allen organisatorische Fragen und insbesondere beim Paket versenden bedanken.

Den übrigen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Abteilung 100 und der Arbeitsgruppen 103, 104 und 105 danke ich für zahlreiche Tipps und Hilfestellungen und das nette Arbeitsklima.

Mein ganz besonderer Dank geht an Stefan, der immer an mich geglaubt und mir in allen Höhen und Tiefen der letzten Jahre zur Seite gestanden hat.

Mein ganz besonderer Dank gilt natürlich ebenfalls meiner Mutter Christa und meiner Schwester Ann-Kristin, die zwar nie mein Interesse an Naturwissenschaften nachvollziehen konnten, mich aber trotzdem immer bei der Umsetzung meiner Pläne unterstützt haben.

LEBENSLAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Schaffert, geb. Dobriczikowski
Vorname	Nina
Geburtsdatum	23.September 1976
Geburtsort	Bad Hersfeld
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet

SCHULBILDUNG

1983-1987	Wilhelm-Neuhaus-Schule, Bad Hersfeld
1987-1993	Konrad-Duden-Schule, Bad Hersfeld
1993-1996	Modellschule Obersberg, Bad Hersfeld Abitur im Juni 1996
STUDIUM	
1996-1998	Grundstudium der Biologie Carl-von-Ossietzky-Universität, Oldenburg
1998	Diplom-Vorprüfung in den Fächern Zoologie, Botanik, Mikrobiologie, Anorganische Chemie und Mathematik
1998-2001	Haupstudium der Biologie Georg-August-Universität, Göttingen
2000	Diplom-Hauptprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Biochemie und Immunologie
2001	Diplomarbeit am Institut Biochemie und Molekulare Zellbiologie bei Prof. Dr. Kurt Jungermann
	Thema: "Lokalisierung der Expression von Rezeptoren der Glucagonrezeptor-Familie im Dünndarm der Ratte"
2001-2005	Dissertation am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen in der Abteilung Zelluläre Biochemie unter Leitung von Prof. Dr. Reinhard Lührmann

	Thema: "Biochemische und zellbiologische Untersuchungen zur Rolle der Cajal Bodies bei der Zusammenlagerung spleißosomaler U snRNP Partikel"
2002-2004	Stipendiatin des Boehringer Ingelheim Fonds, Stiftung für medizinische Grundlagenforschung
BEITRÄGE ZU KO	DNFERENZEN
2003	8 th Annual Meeting of the RNA Society Wien/Österreich
	Plenarvortrag: "RNAi knockdown of either 61K or 102K protein leads to U4/U6.U5 tri-snRNP dissociation and accumulation of U4/U6 and U5 in Cajal bodies"
	International Symposium: Structure, function and dynamics of RNA-protein complexes Göttingen
	Posterpräsentation: "RNAi knockdown of either 61K or 102K protein leads to U4/U6.U5 tri-snRNP dissociation and accumulation of U4/U6 and U5 in Cajal bodies"
2004	Dynamic organization of nuclear function Cold Spring Harbour/USA
	Posterpräsentation: "U4/U6 di-snRNPs accumulate in Cajal bodies upon RNAi knockdown of hPrp31, indicating a role of Cajal bodies in U4/U6.U5 tri- snRNP assembly"
PUBLIKATIONEN	
2004	Schaffert, N., Hossbach, M., Heintzmann, R., Achsel, T. and Lührmann, R. RNAi knockdown of hPrp31 leads to an accumulation of U4/U6 di-snRNPs in Cajal bodies. The EMBO Journal, 23 , 3000-3009.