

# Die Rolle von Peter Pan in der Ribosomenbiogenese

Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde des Dr. rer. nat. an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München



vorgelegt von

Bastian Jan Josef Mühl

am 21. Dezember 2011

---

Angefertigt am Helmholtz Zentrum München

Institut für klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik

Abteilung für molekulare Epigenetik

Erstgutachter: Prof. Dr. Dirk Eick

Zweitgutachter: Prof. Dr. Angelika Böttger

Tag der mündlichen Prüfung: 15.06.12

gewidmet meiner Familie, die immer für mich da gewesen ist

## Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere hiermit Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist.

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist. Ich erkläre weiter, dass ich mich anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg **nicht** unterzogen habe.

München, 21 Dezember 2011

-----

Bastian Mühl

## Synopsis

Die Ribosomenbiogenese ist ein komplexer und hoch koordinierter Prozess, der in einem bestimmten Teil des Zellkerns, dem Nukleolus, stattfindet. In Säugern ist der trimere PeBoW-Komplex, bestehend aus den Komponenten Pes1, Bop1 und WDR12 als essentieller Faktor für die 28S-rRNA-Reifung der großen ribosomalen Untereinheit bekannt. Nachdem die Interaktion zwischen PeBoW und dem Tumorsuppressor Peter Pan (Ppan) gezeigt werden konnte, soll in dieser Arbeit dessen Funktion in der Ribosomenbiogenese untersucht werden.

Der *knockdown* von Ppan hemmt die Zellproliferation und verursacht starke Prozessierungsdefekte der RNA für die ribosomale 60S Untereinheit. Während die Synthese des 47S-rRNA Primärtranskripts nur leicht abnimmt, wird die Reifung der 32S- und 12S-Vorläufer-rRNA sowie der 28S- und 5,8S-rRNA stark gehemmt. Die Depletion von Ppan führt außerdem zur Akkumulation eines neuen 25-26S-rRNA Prozessierungsintermediats. Dieses Intermediat beinhaltet die 5,8S-rRNA und ITS2-Sequenz, nicht aber die ITS1-Sequenz, was eine neue Schnittstelle in der 28S-rRNA vermuten lässt. Weiter führt der Ppan-*knockdown* auch zu einer Inhibition der 3'-ETS-Prozessierung. Ppan wird hiermit als wichtiger Faktor für die effiziente Prozessierung der rRNA der 60S ribosomalen Untereinheit beschrieben.

Ppan enthält eine sogenannte Brix (*biogenesis of ribosomes in Xenopus*)-Domäne. Teil dieser Domäne ist ein  $\sigma 70$ -ähnliches Motiv, das für RNA-Bindung wichtig ist. Die Deletion dieses  $\sigma 70$ -ähnlichen Motivs in der Ppan $\Delta\sigma 70$ -Mutante führt zu einer Fehllokalisation in nukleäre Spots. Die Ppan $\Delta\sigma 70$ -Mutante beeinflusst auch die nukleoläre Lokalisation der Proteine NPM, Pes1 und hRrp6. Ppan kommt somit auch eine Rolle bei der Erhaltung der strukturellen Integrität des Nukleolus zu.

Nach zellulärem Stress unterstützt Ppan, ähnlich wie verschiedene andere ribosomale Proteine (z.B. L11), die Inaktivierung der E3-Ubiquitinligase Hdm2. Ppan bindet Hdm2 im Nukleolus und trägt so zur Stabilisierung von p53 bei. Ppan kann als neuer Vermittler zwischen der Ribosomenbiogenese und dem Zellzyklus betrachtet werden. Obwohl *in vitro* Immunpräzipitationsexperimente keine direkte Interaktion zwischen Ppan und Hdm2 zeigen konnten, lassen herkömmliche Immunpräzipitationsexperimente darauf schließen, dass Ppan über einen weiteren Faktor Hdm2 im Nukleolus festhält. Für die Assoziation von Ppan an diesen Komplex erwies sich der N-Terminus von Ppan als essentiell.

## **Inhaltsverzeichnis**

### **Eidesstattliche Versicherung**

### **Synopsis**

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Peter Pan (Ppan) .....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Ppan ist ein c-myc Zielgen.....	1
1.1.2. Ppan ist ein putativer Tumorsuppressor .....	2
1.1.3. Struktur des Ppan-Proteins.....	3
1.1.4. Homologie von Ppan in verschiedenen Spezies.....	4
<b>1.2. Drosophila Ppan.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3. Xenopus laevis Ppan .....</b>	<b>4</b>
<b>1.4. Hefe Ssf1 .....</b>	<b>5</b>
1.4.1. Hefe Ssf1 gehört zur Imp4-Superfamilie.....	5
1.4.2. Das $\sigma 70$ -ähnliche Motiv ist ein eukaryotisches RNA-Bindungsmotiv .....	6
<b>1.5. Ribosomenbiogenese und Tumorentstehung.....</b>	<b>6</b>
1.5.1. Ribosomenbiogenese in Hefe und Säugern .....	7
1.5.2. Regulation der Ribosomenbiogenese.....	12
<b>1.6. Der Nukleolus .....</b>	<b>14</b>
1.6.1. Weitere Funktionen des Nukleolus .....	15
1.6.2. Der Nukleolus als Stresssensor.....	15
<b>1.7. PeBoW und die Verbindung zu Ppan .....</b>	<b>19</b>
<b>1.8. Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>20</b>
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1. Materialien .....</b>	<b>21</b>

## Inhaltsverzeichnis

---

2.1.1. Chemikalien .....	21
2.1.2. Verbrauchsmaterialien und Kits .....	24
2.1.3. Geräte .....	24
2.1.4. Software .....	26
2.1.5. Puffer und Lösungen.....	26
2.1.6. Bakterielle Stämme.....	30
2.1.7. Zelllinien.....	31
2.1.8. Plasmide .....	31
2.1.9. Oligonukleotide .....	32
2.1.10. Antikörper.....	32
<b>2.2. Methoden .....</b>	<b>34</b>
2.2.1. Arbeiten mit DNA .....	34
2.2.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA ( <i>Mini-</i> und <i>Maxiprep</i> ).....	34
2.2.1.2. DNA-Verdau .....	34
2.2.1.3. DNA-Ligation .....	34
2.2.1.4. Transformation von <i>E.coli</i> .....	35
2.2.1.5. Herstellung chemokompetenter <i>E.coli</i> .....	35
2.2.1.6. DNA-Gelelektrophorese und DNA-Gelextraktion .....	35
2.2.1.7. PCR-Mutagenese .....	35
2.2.1.8. Klonierung in pSfiExpress und pRTS .....	36
2.2.1.9. Quantitative <i>Real-Time</i> -PCR (qRT-PCR) .....	37
2.2.2. Zellkultur .....	38
2.2.2.1. Kultivierung von Zellen .....	38
2.2.2.2. Bestimmung der Lebendzellzahl .....	39
2.2.2.3. Auftauen von Zellen.....	39
2.2.2.4. Einfrieren von Zellen.....	39
2.2.2.5. Proliferationsassay .....	39
2.2.3. RNA-Interferenz .....	40

2.2.4. Metabolische Markierung.....	40
2.2.5. Northern Blot.....	41
2.2.5.1. DNA-Oligonukleotid-Design und Markierung.....	42
2.2.6. Immunfluoreszenz.....	44
2.2.6.1. Immunfluoreszenz-Mikroskopie.....	44
2.2.7. <i>In vitro</i> Transkription und Translation.....	45
2.2.8. Western-Analyse.....	46
2.2.8.1. Lyse der Zellen.....	46
2.2.8.2. SDS-PAGE und Transfer.....	46
2.2.8.3. Immunpräzipitation (IP).....	47
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>48</b>
<b>3.1. Ppan ist für die Proliferation von U2OS-Zellen essentiell.....</b>	<b>48</b>
<b>3.2. Ppan ist für die Ribosomenbiogenese notwendig.....</b>	<b>49</b>
3.2.1. Ppan wird für die 28S- und die 5,8S- rRNA-Reifung benötigt.....	49
3.2.2. Ppan wird für die Prozessierung des <i>intergenic transcribed spacers 2</i> (ITS2) benötigt.....	52
3.2.3. Ppan wird für die Prozessierung der 3'-ETS in U2OS- und MEF-Zellen benötigt.....	54
3.2.4. rRNA-Prozessierungsdefekt nach <i>knockdown</i> von Rrp4 und RpL11 .....	56
3.2.5. Das Erscheinen der aberranten 25-26S rRNA nach Ppan- <i>knockdown</i> ist p53-abhängig.....	58
3.2.6. Die Überexpression von Ppan und Ppan-Deletionsmutanten beeinflusst nicht die Ribosomenbiogenese.....	60
<b>3.3. Die Expression und Lokalisation von Ppan- Deletionsmutanten.....</b>	<b>62</b>
3.3.1. Die Überexpression von Ppan $\Delta\sigma 70$ führt zur Fehllokalisierung der nukleolären Proteine Pes1, NPM und hRrp6 in nukleäre Spots .....	64
<b>3.4. Die Interaktion von Ppan mit Hdm2.....</b>	<b>65</b>
3.4.1. <i>In vitro</i> translatiertes Ppan und Hdm2 interagieren nicht direkt miteinander .....	66

3.4.2. Interaktion von Ppan-Deletionsmutanten mit Hdm2-Komplexen .....	67
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>70</b>
<b>4.1. Ppan ist für die Ribosomenbiogenese notwendig.....</b>	<b>70</b>
4.1.1. Ppan wird für die Prozessierung der ITS2- und 3-ETS-Sequenz benötigt.....	70
4.1.2. Die Akkumulation der aberranten 25-26S-rRNA nach Ppan-Depletion ist p53 abhängig .....	73
4.1.3. Charakterisierung des durch Ppan-Depletion verursachten rRNA-Prozessierungsdefekts.....	74
4.1.4. Ppan-Deletionsmutanten zeigen keinen dominant-negativen Phänotyp.....	75
<b>4.2. Ppan<math>\Delta\sigma</math>70 relokalisiert die nukleolären Proteine Pes1, NPM und hRrp6 in nukleäre Spots .....</b>	<b>76</b>
<b>4.3. Bindungspartner von Ppan .....</b>	<b>78</b>
<b>4.4. Ppan als neue Verbindung zwischen Ribosomenbiogenese und Zellzyklus .....</b>	<b>81</b>
4.4.1. Die Assoziation von Ppan mit Hdm2 ist nicht direkt.....	82
4.4.2. Die Assoziation von Ppan mit Hdm2 benötigt den N-Terminus von Ppan.....	82
4.4.3. Die Funktion von Ppan bei der Koordination von Zellzyklus und Ribosomenbiogenese .....	83
<b>4.5. Ausblick .....</b>	<b>85</b>
<b>5. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>86</b>
<b>6. Appendix .....</b>	<b>103</b>
<b>7. Danksagung .....</b>	<b>107</b>

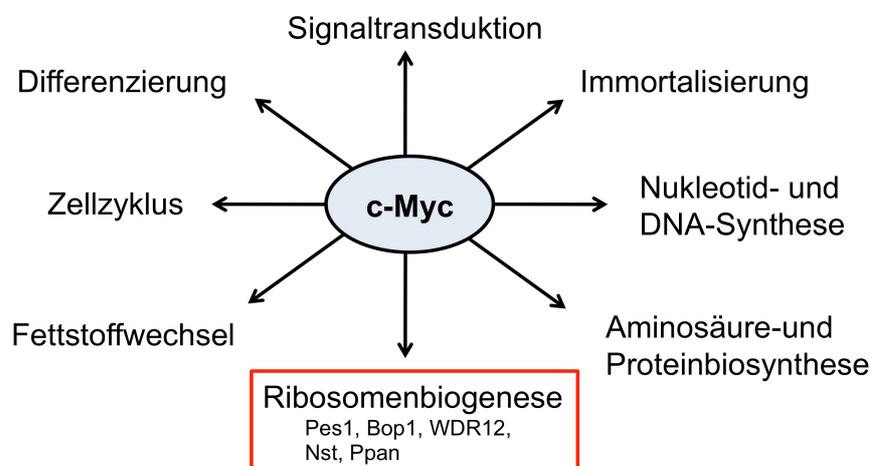
# 1. Einleitung

## 1.1. Peter Pan (Ppan)

### 1.1.1. Ppan ist ein c-myc Zielgen

Das Protoonkogen *c-myc* ist Teil eines Transkriptionsfaktor-Netzwerkes, welches die Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Zellen reguliert (Henriksson und Lüscher, 1996). Die *c-myc* Expression korreliert mit dem Proliferationsstatus der Zelle. Seine Expression wird durch mitogene Faktoren stark aktiviert (Eilers et al., 1991). Anhand von Mausmodellen konnte bewiesen werden, dass die deregulierte *c-myc* Expression in direktem Zusammenhang mit der Tumorentwicklung steht (Adams et al., 1985, Langdon et al 1986).

Um herauszufinden, welche zellulären Prozesse vom c-Myc-Protein gesteuert werden, wurden potentielle c-Myc-Zielgene in einer humanen B-Zelllinie untersucht (Schuhmacher et al., 2001) und mit Hilfe von Oligonukleotid-*Microarrays* auf Ebene der zytoplasmatischen mRNA identifiziert. C-Myc-Zielgene sind an der Aminosäure- und Proteinbiosynthese, der Nukleotid- und DNA-Synthese, am Fettstoffwechsel und der Signaltransduktion beteiligt (Abb. 1). Ein globaler Oligonukleotid-*Genchip Screen* erweiterte die Liste der c-Myc-Zielgene vor allem um Gene mit nukleolärer Funktion (Schlosser et al., 2003). Die homologen Gene in der Hefe spielen fast alle eine Rolle in der Ribosomenbiogenese. Unser Labor hat sich in den letzten Jahren auf die Untersuchung der c-Myc-Zielgene Pes1, Bop1, WDR12, Nukleostemin (Nst) und Peter Pan (Ppan) konzentriert, die alle eine Funktion in der Ribosomenbiogenese innehaben (Abb. 1).



**Abb.1. c-Myc aktiviert die Expression von Genen unterschiedlicher zellulärer Prozesse** Die c-Myc-Zielgene Pes1, Bop1, WDR12, Nukleostemin (Nst) und Peter Pan (Ppan) spielen eine zentrale Rolle in der Ribosomenbiogenese.

Pes1, Bop1 und WDR12 bilden einen stabilen Komplex, den sogenannten PeBoW-Komplex, der für die Reifung der 60S ribosomalen Untereinheit und der Proliferation in Säuger-Zellen unentbehrlich ist (Strezoska et al., 2000; Hölzel et al., 2005; Grimm et al., 2006; Hölzel et al., 2007a; Rohrmoser et al., 2007). Nukleostemin (Nst) ist ebenfalls wichtig für die Ribosomenbiogenese (Romanova et al., 2009). Die Untersuchung der genauen Rolle von Ppan während der Ribosomenbiogenese ist das Ziel dieser Arbeit.

### **1.1.2. Ppan ist ein putativer Tumorsuppressor**

Die Expression einer Bibliothek von *Hairpin*-Ribozymen führte zu der Identifizierung des Ppan-Gens in HF-Zellen (Welch et al., 2000). HF-Zellen sind Varianten von HeLa-Zellen (Cervix-Karzinom-Zellen), die ihre Fähigkeit in Weichagar Kolonien zu bilden verloren haben. Zwei nichttransformierende Revertanten von HeLa-Zellen, HA und HF, wurden mit Hilfe einer Selektionsmethode, die auf der verlängerten Zurückhaltung eines Fluoreszenzfarbstoffes in den Mitochondrien von HeLa-Zellen beruht, isoliert (Boylan et al., 1996). Im Gegensatz zu den parentalen HeLa-Zellen exprimieren die Revertanten eine reduzierte Menge an alkaliner Phosphatase, zeigen eine flache Morphologie und können nicht mehr in Suspension wachsen. Außerdem induzieren HA- und HF-Zellen keine Tumore, wenn sie in immunsupprimierte Mäuse injiziert werden. Es ist bekannt, dass HeLa-Zellen virale Sequenzen für die E6- und E7-Onkogene von Papillomviren integriert haben. Beim Menschen sind Cervix-Karzinome in über 90% der Fälle von einer Infektion mit bestimmten Papillomviren und der konstitutiven Expression der viralen Onkogene E6 und E7 begleitet (Alani et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass die Produkte der E6- und E7-Gene die Tumorsuppressoren p53 und Rb binden und inaktivieren. Somit war eine Inaktivierung der E6- und E7-Onkogene als Ursache für die Reversion der HeLa-Zellen in nicht-tumorbildende Revertanten denkbar. Southern Blot-Analysen zeigten jedoch, dass die in HeLa-Zellen vorhandenen viralen Sequenzen unverändert auch in den Revertanten-Zellen vorkommen (Boylan et al., 1996). Zudem ist die E6- und E7-Expression in HF-Zellen mit der in parentalen HeLa-Zellen vergleichbar. Eine Inaktivierung oder erniedrigte Expression der viralen Onkogene kann somit nicht den Verlust des transformierten Phänotyps der Revertanten erklären.

Die Arbeitsgruppe von Welch postulierte deswegen, dass in HF-Zellen ein Tumorsuppressorgen aktiviert sein könnte, das Wachstum in Weichagar unterdrücken kann (Welch et al., 2000). Mit Hilfe einer Ribozym-Bibliothek sollte das Tumorsuppressorgen

identifiziert werden, dessen Expression zur Reversion von HeLa-Zellen führt. Das Ribozym 568 induzierte Weichagar-Wachstum von HF-Zellen und führte schließlich zur Entdeckung und Klonierung des Ppan-Gens. Die erhöhte Ppan-Expression in HF-Zellen konnte als Ursache für den Verlust des tumorbildenden Phänotyps der Revertanten gezeigt werden. Die Suppression von Ppan um 30-35% erlaubte es den HF-Zellen wieder zu transformieren. Diese nur geringfügig verringerte Ppan-Menge ist offensichtlich ausreichend, um die Wachstumskontrolle in HF-Zellen wieder außer Kraft zu setzen. Für Zellen ist es also sehr entscheidend wieviel Ppan sie exprimieren, um der Entstehung von Tumoren vorzubeugen. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen reduziert die exogene Überexpression von Ppan die Fähigkeit von HeLa-Zellen in Weichagar zu wachsen (Welch et al., 2000). Diese Erkenntnis führte zu der Klassifizierung von Ppan als putativen Tumorsuppressor.

### 1.1.3. Struktur des Ppan-Proteins

Das Ppan-Protein zeichnet sich durch eine große, globuläre Brix (*biogenesis of ribosomes in Xenopus*)-Domäne aus (Aminosäure 30-300) (Abb. 2). Die Brix-Domäne beinhaltet ein  $\sigma$ 70-ähnliches Motiv (Aminosäure 270-285), dessen RNA-Bindungsfähigkeit in Hefe gezeigt werden konnte (Wehner und Baserga, 2002). Ppan besitzt drei putative nukleäre Lokalisierungsdomänen (NLS, *nuclear localization sites*), zwei im N-Terminus (Aminosäure 51-67 und 113-129) und eine im C-Terminus (Aminosäure 449-465). Hinter der Brix-Domäne befindet sich eine *coil-coil*-Domäne (Aminosäure 304-342). *Coil-coil* Domänen vermitteln Protein-Protein-Interaktionen und die Oligomerisierung von Proteinen (Burkhard et al., 2001). Am C-Terminus besitzt Ppan zwei putative *AT-hooks* (Aminosäure 425-435 und 460-470). Diese Domänen kommen in Proteinen vor, die präferentiell die kleine Furche von AT-reichen DNA-Sequenzen binden (Reeves und Nisse, 1990).



**Abb. 2. Schematisches Modell des humanen Ppan.** Ppan besitzt drei nukleäre Lokalisierungsdomänen (NLS; Aminosäure 51-67, 113-129 und 449-465), eine Brix (*biogenesis of ribosomes in Xenopus*)-Domäne (Aminosäure 30-300) mit  $\sigma$ 70-ähnlichem Motiv (Aminosäure 270-285), eine *coil-coil*-(coc)-Domäne (Aminosäure 304-342) und zwei *AT-hooks* (Aminosäure 425-435 und 460-470). NCBI-Sequenz: 0646153.

### 1.1.4. Homologie von Ppan in verschiedenen Spezies

In Tabelle 1 werden die Ppan-Homologe von sechs verschiedenen Spezies verglichen. Alle Proteine besitzen die charakteristische Brix-Domäne. Die Ppan-Homologe in *Drosophila*, *Xenopus* und Hefe wurden bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Im folgenden werden diese Studien vorgestellt.

**Tab. 1. Homologe des humanen Ppan-Proteins**

Spezies	Protein	NCBI-Referenzsequenz-Nummer	identische Aminosäuren (in %)	Proteinlänge (Aminosäuren)
<i>M. musculus</i>	Ppan Homolog	NP_663585.2	73,4	460
<i>R. norvegicus</i>	Ppan Homolog	NP_001011980.1	73,0	460
<i>X. laevis</i>	Ppan Homolog	NP_001191783.1	57,5	600
<i>D. melanogaster</i>	Ppan Homolog	NP_476979.1	33,3	460
<i>A. thaliana</i>	Ppan Homolog	NP_001191783.1	35,7	345
<i>S. cerevisiae</i>	Ssf1	NP_011933.1	25,2	453

## 1.2. Drosophila Ppan

Das Ppan-Gen wurde in *Drosophila* in einem Screen von 353 P-Element-Mutanten als Mutante mit einem ausgeprägten Wachstums-Arrest identifiziert (Migeon et al., 1999). Die homozygote Ppan-Mutante in *Drosophila* zeigt biphasische Lethalität. 45% der Larven sterben in der späten Embryogenese, 55% schlüpfen und leben für 4-8 Tage, wachsen aber nicht und bleiben sehr klein. Das Ppan-Gen wurde in Anlehnung an die berühmte Geschichte über den Jungen der nie erwachsen werden wollte (von M. Barrie), Peter Pan (Ppan) genannt (Migeon et al., 1999).

## 1.3. Xenopus laevis Ppan

In diesem Jahr konnte eine Arbeitsgruppe aus Ulm zeigen, dass Ppan unabhängig von seiner Rolle in der Ribosomenbiogenese, während der frühen Augen- und kraniofazialen Knorpel-Entwicklung in *Xenopus laevis* benötigt wird (Bugner et al., 2011). Mikroinjektion eines Ppan spezifischen Morpholinos (MO) in die Blastomeren von 8-Zell-Stadium-Embryonen führt zu einem deformierten oder stark reduziertem Pigmentepithelium der Retina sowie zu defekter kraniofazialer Knorpelentwicklung. Außerdem führt die Ppan MO Injektion auch zu einer signifikanten Reduktion der 5,8S-rRNA, was die Beteiligung von Ppan an der Ribosomenbiogenese des Krallenfrosches zeigt. Im Gegensatz zu humanen Ppan, welches ein

c-Myc-Zielgen ist (Marinkovic et al, 2004) agiert Ppan in *Xenopus laevis* oberhalb von c-Myc (Bugner et al., 2011). Die Depletion von Ppan resultiert in einer Reduktion von c-Myc im *Xenopus*-Embryo, wohingegen die Depletion von c-Myc nicht zu einer reduzierten Ppan-Expression führt.

## 1.4. Hefe Ssf1

Ssf1 wurde erstmals in einem *Screen* für erhöhte Paarungseffizienz beschrieben (Yu und Hirsch, 1995). Die Lokalisation von Ssf1 im Nukleolus ließ auch eine zusätzliche Funktion in der Ribosomenbiogenese vermuten (Kim und Hirsch, 1998). Tatsächlich konnte die Beteiligung von Ssf1 an der Synthese der großen ribosomalen Untereinheit gezeigt werden (Fatica et al., 2002). Die Ssf1-Depletion führt zu einer Verzögerung der endonukleolytischen Schnitte bei A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> (vergleiche Abb. 4). Stattdessen wird die prä-35S-rRNA vorzeitig an der Stelle A<sub>3</sub> geschnitten, was zum Entstehen einer aberranten 23S-rRNA führt. Außerdem wird im  $\Delta$ Ssf1-Hefestamm die 27SA<sub>2</sub>-rRNA vorzeitig bei C<sub>2</sub> geschnitten, wodurch es zur Akkumulation einer A<sub>2</sub>-C<sub>2</sub>-rRNA-Spezies und zur Reduktion der 7S-rRNA kommt. Normalerweise kommt es zu einer Basenpaarung zwischen der 26S- und 7S-rRNA. Die Präsenz des A<sub>2</sub>-C<sub>2</sub>-Fragments könnte jedoch zur schnellen Degradation der beiden Vorläufer-rRNAs führen, was auch deren Prozessierung zur reifen 25S- und 5,8S-rRNA verhindert.

### 1.4.1. Hefe Ssf1 gehört zur Imp4-Superfamilie

Ssf1 ist ein Mitglied der Imp4-Genfamilie. Die fünf Mitglieder dieser Familie (Imp4, Rpf1, Rpf2, Brx1 und Ssf1/Ssf2) spielen alle eine Rolle in der Ribosomenbiogenese, lokalisieren nukleolär und besitzen ein  $\sigma$ 70-ähnliches RNA-Bindungs-Motiv (Wehner und Baserga, 2002). Imp4 ist eine Komponente der U3-snRNP (*small nuclear ribonucleoprotein particle*) und wird für die Reifung der 18S-rRNA benötigt (Lee et al., 1999). Rpf1, Rpf2, Brx2 und Ssf1/Ssf2 sind dagegen für die Reifung der 5,8S- und 25S-rRNAs essentiell (Eisenhaber et al., 2001). Für alle fünf Mitglieder der Imp4-Familie gibt es menschliche Homologe.

### **1.4.2. Das $\sigma 70$ -ähnliche Motiv ist ein eukaryotisches RNA-Bindungsmotiv**

Das prokaryotische  $\sigma 70$ -Motiv ist ein Helix-Turn-Helix-Motiv der  $\sigma$ -Untereinheit der RNA-Polymerase, welches für die DNA-Bindung der -35-Region von prokaryotischen Promotoren verantwortlich ist (Dombroski et al., 1992). Die Proteine der eukaryotischen Imp4-Familie besitzen ein  $\sigma 70$ -ähnliches Motiv, das sich zwar vom prokaryotischem  $\sigma 70$ -Motiv ableitet (Wehner und Baserga, 2002), jedoch ein Prolin besitzt, welches in Prokaryoten nicht vorkommt. Dieses Prolin unterbricht die Helix-Struktur des Peptids und ist für die bevorzugte Bindung des eukaryotischen  $\sigma 70$ -Motivs an RNA verantwortlich (Wehner und Baserga, 2002).

Da Ppan ein putativer Tumorsuppressor ist und eine wichtige Funktion in der Ribosomenbiogenese besitzt, werden beide Prozesse nachfolgend eingeführt.

## **1.5. Ribosomenbiogenese und Tumorentstehung**

Viele Protoonkogene und Tumorsuppressorgene regulieren unter anderem die Ribosomenbiogenese und die Initiation der Translation (Ruggero und Pandolfi, 2003). Bekannte Beispiele sind die Tumorsuppressorgene p53 und Rb, welche die RNA-Polymerase I- und III-Aktivierung steuern. In mehr als 50% aller menschlicher Tumoren ist p53 deletiert oder mutiert (Toledo et al., 2006). Es stellt sich die Frage, ob auch Veränderungen der Komponenten der Protein-Synthese-Maschinerie eine zelluläre Transformation fördern können. Tatsächlich wurden in den letzten Jahren immer mehr Tumore beschrieben, in denen ursächlich Gene der Ribosomenbiogenese verändert sind. So ist das DKC1 (Dyskerin)- Gen in Patienten mit *Dyskeratosis congenita* mutiert (Heiss et al., 1998; Ruggero et al., 2003). Dyskerin ist eine Pseudo-Uridinsynthase, die posttranskriptionelle Modifizierungen der ribosomalen RNA vermittelt. *Dyskeratosis congenita*-Patienten altern vorzeitig und weisen eine erhöhte Anfälligkeit für Krebs auf. Eine weitere Krankheit mit erhöhtem Krebsrisiko ist die *Diamond-Blackfan* Anämie (DBA), die mit Mutationen des ribosomalen Proteins S19 assoziiert ist (Draptchinskaia et al., 1999). DBA ist eine angeborene Knochenmarksinsuffizienz der erythroiden Linie. Neben S19 können in DBA-Patienten auch andere Gene der kleinen ribosomalen Untereinheit (S7, S17 und S24) sowie Gene der großen ribosomalen Untereinheit (L5, L11 und L35s) mutiert sein (Boria et al., 2008). Eine weitere Ribosomenbiogenese-assoziierte Krankheit ist das 5q-Syndrom, ein Untertyp des

myelodysplastischen Syndroms (MDS). Der Verlust einer bestimmten Region des Chromosoms 5, die für das ribosomale Protein S14 kodiert, führt zu einem Defekt der erythroiden Differenzierung, makrozytischer Anämie und zu einem erhöhten Risiko an akuter myelischer Leukämie (AML) zu erkranken (Ebert et al., 2008). Eine neue Studie zeigt, dass die S14-Expression auch in Zellen von MDS-Patienten ohne 5q<sup>-</sup>Syndrom reduziert ist (Czibere et al., 2009).

Es ist noch unklar warum Krankheiten wie DBA, MDS und andere Defekte der Ribosomenbiogenese ein erhöhtes Tumorrisiko in sich bergen. Möglicherweise sind erhöhte p53-Level in den Knochenmarkszellen die Basis für die Selektion von Zellen mit weiteren genetischen Läsionen (Hölzel et al., 2010b). Die Untersuchung der Ribosomenbiogenese in Eukaryoten ist wichtig, um menschliche Krankheiten besser zu verstehen. Zunächst soll der Prozess der Ribosomenbiogenese dargestellt werden bevor im nächsten Kapitel auf den Nukleolus, dem Ort der Ribosomenbiogenese, und dessen Funktion bei der Regulation der Ribosomenbiogenese genauer eingegangen wird.

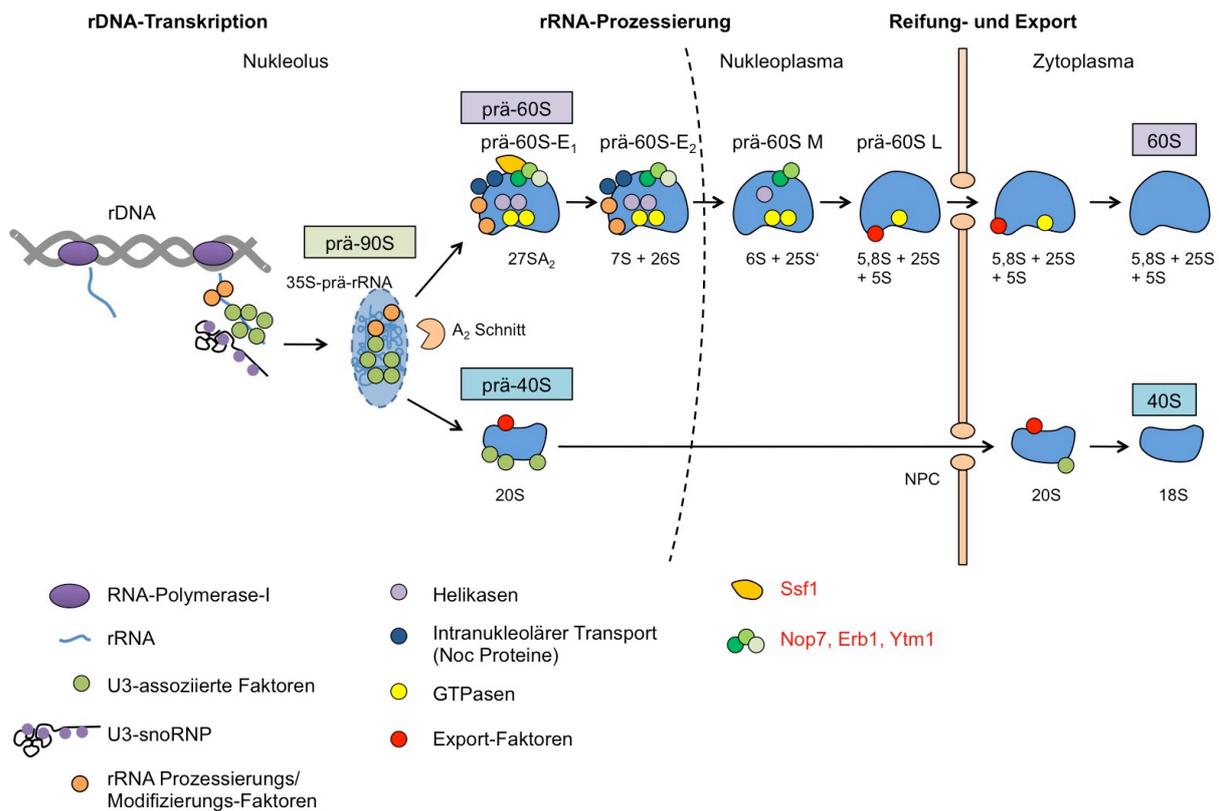
### 1.5.1. Ribosomenbiogenese in Hefe und Säugern

Ribosomenbiogenese ist einer der wichtigsten und energieaufwendigsten Prozesse jeder Zelle (Warner et al., 1999). Sie benötigt die Aktivität aller drei DNA-abhängigen RNA-Polymerasen (Chedin et al., 2007, Leary und Huang 2001). Die RNA-Polymerase-II synthetisiert die mRNA der ribosomalen Proteine und der über 200 an der Ribosomenbiogenese beteiligten Faktoren. Die RNA-Polymerase-III transkribiert den Vorläufer der 5S ribosomalen RNA (rRNA) und die RNA-Polymerase-I die 35S (Hefe)/47S (Mensch)-Vorläufer rRNA. Beim Menschen sind ribosomalen RNA-Gene in der Mitte der kurzen Arme der Chromosomen 13, 14, 15, 21 und 22 in Tandemwiederholungen mit insgesamt ca. 400 Kopien angeordnet. Diese Loci werden auch als nukleoläre Organisationsregionen (NORs) bezeichnet (Thiry und Lafontaine, 2005). Ribosomale RNAs machen ca. 80% der gesamten RNA einer Zelle aus. Dennoch sind in proliferierenden Zellen nicht alle rDNA-Gene aktiv (Lawrence et al., 2004; McStay und Grummt, 2008). DNA- und Histon-Methylierung stellen epigenetische Schalter dar, die rDNA-Gene an- und abstellen können. In Pflanzen wird die Dosis-Kontrolle der rDNA-Gene über den Mechanismus der *nuclear dominance* reguliert (Tucker et al., 2010). Die rDNA-Gene eines Elternteils werden transkribiert während die des anderen Elternteils inaktiv bleiben. Säuger haben einen anderen Mechanismus um rDNA-Gene zu inaktivieren. Intergenische, nichtkodierende Transkripte

werden produziert und zu hoch strukturierten, 200-300 nt langen pRNAs (*promotor associated RNAs*) prozessiert. Die pRNAs erlauben die Bindung des NoRC-Komplexes (*nucleolar remodeling complex*) an den rRNA-Promotor bestimmter rDNA-*Repeats*, wodurch weitere Chromatin-modifizierende Proteine wie DNA-Methyltransferasen (DNMTs) und Histonmethyltransferasen (HMTs) rekrutiert werden (Mayer et al., 2006).

Vorläufer rRNAs werden durch kleine nukleoläre Ribonukleoproteine (snoRNP) chemisch modifiziert (Eichler und Craig, 1994; Ganot et al., 1997; Kiss-László et al., 1996; Tollervey et al., 1996a). Die Methyltransferase Nop1 (Hefe)/ Fibrillarin (Mensch) der Box C/D snoRNPs vermittelt die 2'-O-Methylierung der Ribose, während die Pseudouridinsynthase Cbf5 (Hefe)/ Dyskerin (Mensch) der Box H/ACA snoRNPs die Isomerisierung des Uridins in Pseudouridin vermittelt. Die snoRNP enthalten kleine nukleoläre RNAs (snoRNAs), die als sogenannte *guide RNAs* durch spezifische und komplementäre Basenpaarung mit Vorläufer-rRNA die snoRNP zu einer bestimmten Base dirigieren. Die Nukleotid-Modifikationen treten meist konzentriert in funktionell wichtigen Bereichen der rRNA auf, wie dem Dekodierungs-Zentrum oder dem Peptidyltransferase-Zentrum, was auf eine Rolle während der Peptidsynthese schließen lässt (Bakin et al., 1994; Decatur et al., 2003). Die prä-rRNA wird in 90S Ribonukleoproteinpartikel (prä-RNPs) verpackt, die in der Hefe durch einen Schnitt bei A<sub>2</sub> in die prä-60S- und prä-40S Partikel gespalten werden (Abb. 3). Letztere werden in mehreren Schritten weiter prozessiert bis schließlich die reifen 40S und 60S ribosomalen Untereinheiten gebildet werden. Dabei assoziieren akzessorische Proteine wie rRNA-Prozessierungsfaktoren, Helikasen, Noc-Proteine (für den intranukleolären Transport), GTPasen und Export-Faktoren mit den prä-ribosomalen Partikeln. Nach der Erfüllung ihrer Aufgabe, was ein endonukleolytischer Schnitt, die Entwindung von RNA-Sekundärstrukturen oder nukleolärer Transport sein kann, lösen sich die Proteine wieder ab.

Proteomanalysen von Vorläufer-Partikeln konnten vier verschiedene prä-60S-Partikel mit unterschiedlicher Proteinzusammensetzung definieren (Fatica et al., 2002, Harnpicharnchai et al., 2001; Baßler et al., 2001; Saveanu et al., 2001). Das Ssf1-Protein (Hefehomolog von Ppan) assoziiert dabei nur mit dem prä-60SE<sub>1</sub>-Partikel (Fatica et al., 2002). Ssf1 ist für die Beibehaltung der richtigen Reihenfolge der prä-rRNA-Prozessierung verantwortlich. Nop7, Erb1 und Ytm1 (Hefehomologe des PeBoW-Komplexes) assoziieren mit dem prä-60SE<sub>1</sub>, prä-60SE<sub>2</sub> und Nop7 und Erb1 ebenfalls noch mit dem prä-60S<sub>M</sub>-Partikel (siehe Abb. 3).



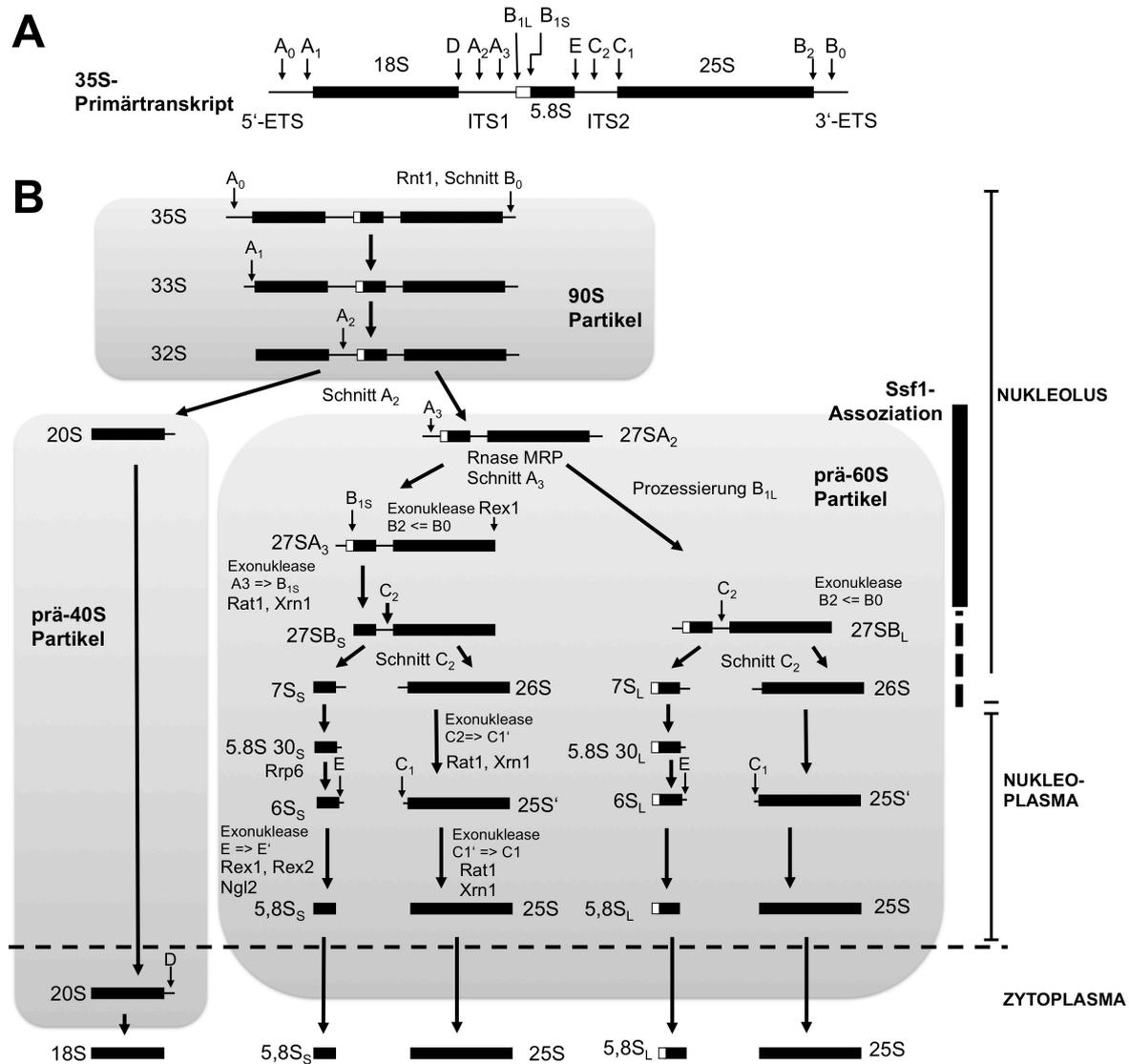
**Abb. 3: Reifung der 40S- und 60S- ribosomalen Untereinheit in der Hefe** (verändert nach Tschochner und Hurt, 2003; Fatica et al., 2002; Henras et al., 2008). Die ersten ribosomalen Vorläufer sind prä-90S-Partikel, die 35S prä-rRNA zusammen mit dem U3 snoRNP-Komplex enthalten. Der Schnitt an der Stelle A<sub>2</sub> trennt die prä-90S-Partikel in prä-40S- und prä-60S-Untereinheiten. Die Mehrheit der Faktoren lagert sich während oder nach dem Schnitt bei A<sub>2</sub> an dem prä-60S-Komplex an. Während der Reifung der 60S Untereinheit dissoziieren viele Faktoren wieder. Den Export durch den *nuclear pore complex* (NPC) übernehmen Export-Faktoren. Anschließend erfolgt die finale Reifung der ribosomalen Untereinheiten im Zytoplasma. Ssf1 (menschliches Homolog: Ppan), Nop7 (Pes1), Erb1 (Bop1) und Ytm1 (WDR12) sind an der 60S-Reifung beteiligt (rot markiert).

Die prä-rRNA wird durch Endo- und Exonukleasen von sogenannten *external transcribed spacers* (ETS) und *internal transcribed spacers* (ITS) befreit. Dabei wird in Säugern die 47S-rRNA erst in charakteristische Intermediate (41S, 32S, 21S und 12S) und schließlich in die reifen 18S-, 5,8S- und 28S-rRNAs prozessiert (Hadjiolova et al., 1993).

In Hefe ist die rRNA-Prozessierung sehr gut untersucht. Im folgendem wird dieser Prozess, bei dem schrittweise aus der prä-35S-rRNA die reifen 18S-, 5,8S- und 25S-rRNAs gebildet werden, genauer erläutert. Die dabei verwendeten endonukleolytischen Schnittstellen werden durch große, nummerierte Buchstaben gekennzeichnet (Abb. 4A). Der erste Protein-Komplex, der mit prä-rRNA interagiert, ist der sogenannte t-UTP-Komplex (*U three protein complex required for transcription*) (Gallagher et al., 2004), der aus sieben Proteinen besteht. Anschließend erfolgt die Bindung von drei weiteren Protein-Komplexen (PWP2-UTP-B, UTP-C und Mpp10p). Die U3 snoRNA im t-UTP-Komplex katalysiert die Prozessierung der

Schnittstellen  $A_0$ ,  $A_1$  und  $A_2$  (Hughes et al., 1991) (Abb. 4B). Dabei vermittelt die U3 snoRNA als Chaperon die korrekte Faltung der 18S-rRNA durch direkte Basenpaarung mit der 5'-ETS-Sequenz (Borovjagin et al., 2000). Der endonukleolytische Schnitt an der Stelle  $A_2$  trennt prä-90S-Partikel in prä-40S- und prä-60S-Partikel. Die entstehende 27SA<sub>2</sub>-rRNA wird durch zwei alternative Prozessierungswege in die reife 5,8S- und 25S-rRNA überführt (Abb. 4B). Sie kann direkt an der Stelle B<sub>1L</sub>, was dem 5'-Ende der langen Form der 5,8S-rRNA entspricht, prozessiert werden. Dies führt zur Bildung der 27SB<sub>L</sub>-Form. Alternativ kann die 27SA<sub>2</sub>-prä-rRNA durch die Endoribonuklease RNase-MRP an der Stelle  $A_3$  geschnitten werden und anschließend durch die 5'-3'-Exoribonukleasen Rat1 und Xrn1 bis zur B<sub>1S</sub>-Stelle verdaut werden. Die letzten Schritte führen zur Bildung der 27SB<sub>S</sub>-prä-rRNA. Die 27SB<sub>L</sub>- und 27SB<sub>S</sub>-rRNA werden identisch prozessiert. Der Schnitt an der Stelle C<sub>2</sub> in der ITS2-Sequenz führt zur Bildung der 7S- und 26S-rRNA. Anschließend produziert das Exosom aus der 7S-rRNA einen um 30 Nukleotide verlängerten 5,8S-rRNA-Vorläufer, der wiederum durch die Exosomen-assoziierte Rrp6 Exoribonuklease zur prä-6S-rRNA prozessiert wird (Mitchell et al., 1997; Allmang et al., 1999). Während die Exoribonuklease Rex1 für die Produktion des reifen 3'-Endes der 25S-rRNA benötigt wird, gewährleisten die 5'-3'-Exoribonukleasen Rat1 und Xrn1 die Prozessierung des 5'-Endes der 25S-rRNA (van Hoof et al., 2000; Geerlings et al., 2000). In höheren Eukaryoten ist zusätzlich die Box C/D U8 snoRNA, welche in Hefe nicht vorkommt, für die prä-rRNA-Prozessierung der 5,8S- und 28S-rRNA notwendig (Peculis et al., 1993).

Die Prozessierung der prä-40S-Partikel übernehmen Proteine, von denen die meisten auch schon im prä-90S-Partikel vorhanden sind. Die Proteine assemblieren zusammen mit U14 und U17 snoRNA in sogenannte SSUs (*small subunit processome*), welche die Überführung der 20S-rRNA in die reife 18S-rRNA übernehmen (Li et al., 1990; Morrissey et al., 1993; Dragon et al., 2002).



**Abb. 4. Prä-rRNA-Prozessierung in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*** (verändert nach Fatica et al., 2002; Henras et al., 2008). (A) Darstellung des prä-35S-rRNA-Transkripts, welches sich aus internen und externen transkribierten Zwischensequenzen (ETS/ITS), der 18S-, 5,8S-, und 25S rRNA zusammensetzt. Prozessierungsendpunkte und Prozessierungsschnittstellen sind durch große, nummerierte Buchstaben mit Pfeilen gekennzeichnet. (B) Die prä-35S-rRNA wird durch Schnitte bei A<sub>0</sub> und A<sub>1</sub> zunächst in die prä-33S- und anschließend in die prä-32S-rRNA prozessiert. Der endonukleolytische Schnitt an der Stelle A<sub>2</sub> der 32S rRNA trennt das prä-90S-Partikel in prä-40S- und prä-60S-Partikel. Während die entstehende 20S durch einen Schnitt an der Stelle D in die reife 18S-rRNA prozessiert wird, wird die entstehende 27SA<sub>2</sub> rRNA durch zwei alternative Prozessierungswege in die reife 5,8S- und 25S-rRNA überführt. Die vertikale dicke Linie symbolisiert eine starke Assoziation von Ssf1 mit den 27SA<sub>2</sub>- und 27SB-rRNA-Formen und die gestrichelte Linie eine schwache Assoziation von Ssf1 mit der 26S-rRNA-Form.

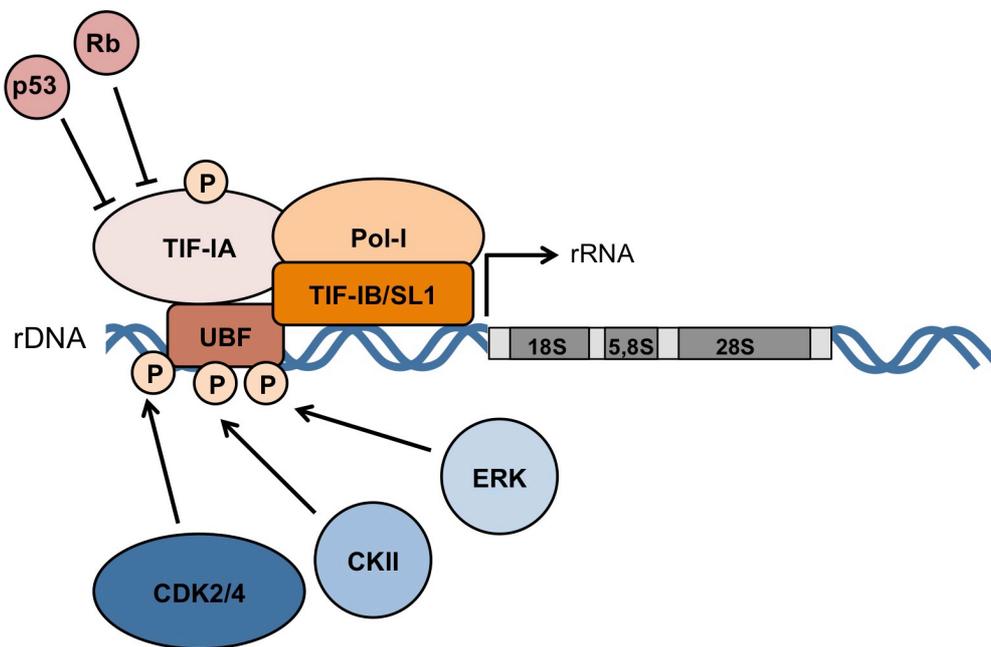
Wenn die Wachstumsbedingungen für die Hefe ideal sind, wird das RNA-Polymerase-I-Transkript kotranskriptionell in der ITS1-Sequenz geschnitten, wodurch sofort und ohne die vorherige Bildung von 90S-Partikel, 40S-Partikel entstehen (Osheim et al., 2004). Mit Hilfe

von hochauflösenden kinetischen Markierungsexperimenten konnten Kos und Tollervey (2010) zeigen, dass ca. 70% der Hefe-Primärtranskripte kotranskriptionell prozessiert werden. Dabei wird das Transkript schon ca. 25-30s (ca. 1200 nt) nachdem die RNA-Polymerase-I die A<sub>2</sub>-Stelle verlassen hat bei A<sub>2</sub> geschnitten. Auch die Methylierung der 18S- sowie einiger 25S-rRNAs kann, entgegen früherer Annahmen, schon während der Transkription erfolgen.

### 1.5.2. Regulation der Ribosomenbiogenese

Die Synthese der ribosomalen rRNA-Vorläufer ist der erste Schritt der Ribosomenbiogenese. Sie benötigt die RNA-Polymerase-I, welche die rDNA transkribiert. Erste Hinweise auf eine Regulation der rRNA-Synthese lieferten Hunger-Experimente, bei denen Zellen eine bestimmte Aminosäure vorenthalten wurde, wodurch es zu einem schnellen Abbruch der rRNA-Synthese kam (Grummt et al., 1976). Seitdem zeigten viele Untersuchungen, dass die rRNA-Transkription eng mit dem Zellzyklus verknüpft ist. Während die rRNA-Synthese in der S- und G<sub>2</sub>-Phase erhöht ist, ist sie in der Mitose reprimiert (Grummt et al., 1999; Klein und Grummt, 1999). Der Transkriptionsfaktor UBF, ein Schlüsselregulator der rRNA-Synthese, bindet den rDNA-Promotor am *upstream control element* (UCE) und der *core*-Promotorsequenz, und kann dadurch die Aktivität der RNA-Polymerase-I-Transkription regulieren (Bell et al., 1988; Jantzen et al., 1990). Während UBF in ruhenden Zellen in einem hypophosphoryliertem, inaktiven Zustand vorliegt, führen in proliferierenden Zellen mitogene Stimuli zur Kinase-abhängigen Phosphorylierung von UBF. Phosphoryliertes UBF bindet verstärkt die rDNA und vermittelt Protein-Protein-Interaktionen, die für die Assemblierung eines aktiven Initiationskomplexes notwendig sind (Kihm et al., 1998; Tuan et al., 1999; Voit und Grummt et al., 2001; Stefanovsky et al., 2001) (Abb. 5). Der Säuger Transkriptions-Initiationsfaktor TIF-IA stellt eine Brücke zwischen der Polymerase-I und dem Prä-Initiationskomplex am rDNA-Promotor dar (Yuan et al., 2002). Im Laufe der Zeit wurden verschiedene Kinasen beschrieben, die UBF phosphorylieren können. Voit und Kollegen identifizierten die Casein Kinase-II (CKII), eine Serin-Threonin-Kinase, die in vielen Tumoren hochexprimiert ist (Voit et al., 1992). Die G<sub>1</sub>-spezifischen Zyklin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK2 phosphorylieren ebenfalls UBF (Voit et al., 1999; Voit und Grummt, 2001). Hierdurch wird die Interaktion zwischen UBF und Polymerase-I verstärkt und die rRNA-Synthese in einer Zellzyklus-abhängigen Art und Weise aktiviert. Außerdem konnte ein direkter Einfluss von extrazellulären Wachstumssignalen auf die ribosomale Transkription gezeigt werden. Der *epidermal growth factor* (EGF) aktiviert die ERK-Kinase

(*extracellular-signal-regulated kinase*), welche wiederum UBF phosphoryliert und die ribosomale Transkription verstärkt (Stefanovsky et al., 2001).



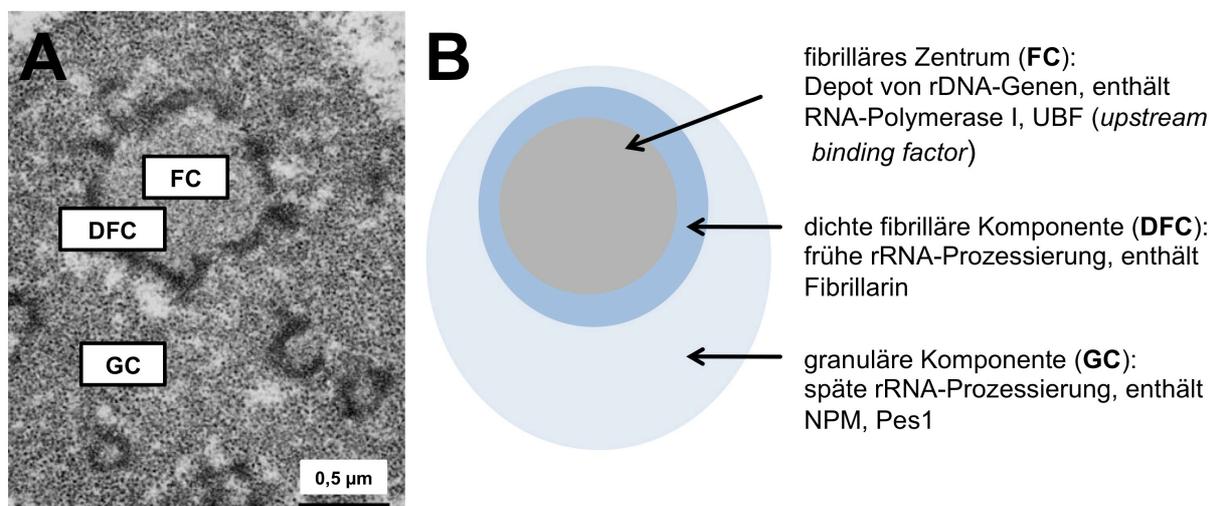
**Abb. 5. Regulation der Polymerase-I-Aktivität** (verändert nach Ruggero und Pandolfi, 2003). Die Transkription der rDNA benötigt 3 basale Transkriptionsfaktoren: Den „Selektivitätskomplex“ (SL1 oder TIF-IB), den *upstream binding factor* (UBF) und die DNA-abhängige RNA-Polymerase-I (Pol-I). UBF bindet zuerst den Promotor, was die Rekrutierung von SL1, TIF-IA (Transkriptions-Initiationsfaktor) und der Polymerase-I erlaubt. Rb und p53 inhibieren die Interaktion zwischen TIF-IB/SL1 und UBF. P53 bindet SL1, was die Interaktion zwischen SL1 und UBF destabilisiert. Rb bindet UBF direkt. Rb und p53 binden auch den TFIIB-Transkriptionsfaktor, wodurch die Polymerase-III-Aktivität reprimiert wird (nicht dargestellt). Die Phosphorylierung von UBF durch die Cyclin-abhängige Kinase 2/4 (CDK2/4) und die Casein-Kinase II (CKII) verstärkt die Bindung zwischen UBF und SL1. Extrazelluläre Wachstumssignale können über den *epidermal growth factor* (EGF) zur Aktivierung der *extracellular-signal-regulated kinase* (ERK-Kinase) führen, die wiederum UBF phosphoryliert.

Des Weiteren kann die Ribosomenbiogenese durch die Tumorsuppressorproteine Rb und p53 reguliert werden. So kann Rb neben der Regulation des Zellzyklus durch die Modulation der transkriptionellen Aktivität von E2F auch das Zellwachstum durch die Hemmung der rRNA-Synthese steuern (Cavanaugh et al., 1995). Rb interagiert mit UBF wodurch die Rekrutierung wichtiger Co-Faktoren für die Polymerase-I-Aktivität, wie z.B. TIF-IB/ SL1, verhindert wird (Voit et al., 1997; Hannan et al., 2000). P53 hemmt die Interaktion zwischen TIF-IB/ SL1 und UBF und inhibiert so die Polymerase-I-Transkription (Zhai und Comai, 2000). Zusätzlich reprimieren Rb und p53 durch die Bindung von TF-IIIIB die Polymerase-III-vermittelte Transkription der 5S-rRNA und der tRNAs (White et al., 1996; Sutcliffe et al., 2000; Cairns

und White, 1998). Der Verlust der Rb- und p53-Funktion in Tumoren verursacht somit eine Aktivierung der Komponenten der Proteinsynthesemaschinerie.

## 1.6. Der Nukleolus

Der Nukleolus ist ein Teil des Nukleus und Ort der Ribosomenbiogenese (Melese und Xue, 1995). Er ist während des Zellzyklus eine dynamische Struktur. In höheren Eukaryoten löst er sich zu Beginn der Mitose auf und die Komponenten des Nukleolus lokalisieren an der Oberfläche der kondensierten Chromosomen in sogenannten perichromosomalen Domänen (Dundr und Olson, 1998; Savino et al., 1999). Die Assemblierung des Nukleolus zu Beginn der G<sub>1</sub>-Phase ist von der Aktivierung der Pol-I-Transkriptions-Maschinerie abhängig, die in sogenannten *prenucleolar bodies* (PNBs) mit rDNA-Genen assoziiert. Auch rRNA-Prozessierungsfaktoren und snoRNAs, die während der Mitose noch in perichromosomalen Domänen lokalisieren, assemblieren zunächst in PNBs, bevor diese zu Nukleoli verschmelzen (Douset et al., 2000; Sirri et al., 2000). Der Nukleolus besteht aus drei Strukturen, die sich bestimmten Reifungsschritten der rRNA zuordnen lassen (Olson et al., 2004) (Abb. 6). Die fibrillären Zentren (FC) sind der Ausgangspunkt der RNA-Polymerase-I-vermittelten Transkription der rDNA-Gene. Das entstehende prä-rRNA-Transkript erscheint an der Grenzregion zwischen FC und DFC (dichte fibrilläre Komponente). Im DFC finden frühe rRNA-Prozessierungsschritte statt, während in der granulären Komponente (GC) späte rRNA-Prozessierungsschritte stattfinden.



**Abb. 6. Nukleolus von Säugerzellen.** (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme des Nukleolus von HeLa-Zellen (Glutaraldehyd- und Osmium-Tetroxyd-Fixierung, verändert nach Sirri et al., 2008). (B) Schematische Darstellung der nukleolären Organisation.

### 1.6.1. Weitere Funktionen des Nukleolus

Lange Zeit dachte man, dass die Ribosomenbiogenese die einzige Funktion des Nukleolus ist. In den letzten zwei Jahrzehnten wurden jedoch weitere Funktionen des Nukleolus beschrieben. Im Nukleolus findet der Zusammenbau von verschiedenen Ribonukleoprotein(RNP)–Komplexen statt, wie z.B. den kleinen nukleolären Partikel der *Splice*-Maschinerie oder der Telomerase. Die Telomerase ist eine Reverse Transkriptase, die Chromosomen stabilisiert und wird durch Nukleolin im Nukleolus sequestriert. Am Ende der S-Phase wird die Telomerase aus dem Nukleolus freigesetzt und repliziert die Telomerenden (Tomlinson et al., 2006).

Außerdem ist der Nukleolus an der Reifung von kleinen RNAs, die durch die Polymerase-III transkribiert werden, wie der 5S-rRNA, Ribonuklease P RNA, der *signal recognition particle* (SRP) RNA, tRNAs und miRNAs, beteiligt (Gerbi et al., 2003). Die Ribonuklease P besteht aus einer RNA und verschiedenen Proteinen und trägt durch das schneiden von RNA-Sequenzen zur tRNA-Reifung bei (Guerrier-Takadu et al., 1983). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die Ribonuklease P außerdem für die effektive Transkription der 5S-rRNA und der SRP-RNA benötigt wird (Reiner et al., 2006). Der SRP-Komplex, bestehend aus sechs Proteinen und einer 300 nt langen RNA, erkennt eine N-terminale Signalpeptid-Sequenz von entstehenden Proteinen und dirigiert diese an die zytoplasmatische Seite des Endoplasmatischen Retikulums (Walter und Johnson, 1994; Jacobson und Pederson, 1998). Es gibt Hinweise die dem Nukleolus eine Rolle bei der Zellzyklusregulation zuschreiben (Visintin et al., 1998; Shou et al., 1999). Während der Interphase wird Cdc14, eine Protein-Phosphatase, die den Austritt aus der Mitose fördert, durch das Ankerprotein Net1 in einem inaktiven Status im Nukleolus gehalten. Beim Eintritt in die Anaphase wird Cdc14 durch die Phosphorylierung von Net1 aus dem Nukleolus freigesetzt und kann dadurch mitotische, Zyklin-abhängige Kinasen (CDKs) aktivieren.

Die Rolle des Nukleolus als zellulärer Stresssensor wird im nächsten Kapitel diskutiert.

### 1.6.2. Der Nukleolus als Stresssensor

In einer bahnbrechenden Studie konnten Rubbi und Milner (2003) dem Nukleolus eine Funktion als zellulären Stresssensor, der die p53-Stabilisierung vermittelt, zuschreiben. UV induzierte Pyrimidindimere stabilisieren p53 nur, wenn der Schaden in nukleärer DNA, nicht aber wenn er in nukleoplasmatischer DNA auftritt. Dies lässt vermuten, dass nicht der DNA-Schaden an sich für die p53-Stabilisierung verantwortlich ist, sondern die gestörte Expression

der rDNA-Gene. Folglich stellt sich die Frage, wie der Prozess der Ribosomenbiogenese die Stabilität von p53 kontrollieren kann.

Der Tumorsuppressor und Transkriptionsfaktor p53, auch „Wächter des Genoms“ genannt, kann als Antwort auf verschiedenste zelluläre Stresse einen Zellzyklusarrest oder Apoptose auslösen. Je nach Stärke des zellulären Schadens unterscheidet sich die Bindungsaktivität von p53 an Promotoren von verschiedenen Zielgenen (Chen et al., 1996; Ludwig et al., 1996; Kruse und Gu, 2009). Wenn der zelluläre Schaden reparierbar ist, bindet p53 bevorzugt Gene, die einen Zellzyklusarrest auslösen, wie z.B. p21. Ist der Schaden stärker, aktiviert p53 Gene, die Apoptose einleiten, wie z.B. Bax und Puma. Unter normalen Bedingungen liegt p53 in sehr geringen Mengen vor, da es durch die E3-Ubiquitinligase Hdm2 (bzw. Mdm2 in Maus) ubiquitiniert wird, was zum proteasomalen Abbau von p53 führt. DNA-Schaden war die erste Stress-Art, die nachweislich p53 stabilisiert (Lane et al., 1992).  $\gamma$ -Strahlung führt zu einer Phosphorylierung des N-terminalen Serin-15 von p53 durch die ATM (*ataxia telangiectasia mutated*)-Kinase (Sakaguchi et al., 1998). Das Serin-15-phosphorylierte p53 kann nicht mehr von Hdm2 gebunden werden, weshalb p53 stabilisiert wird. Es ist erwähnenswert, dass ATM zu den am dritt häufigsten mutierten Kinasen in menschlichen Tumoren zählt (Greenman et al., 2007). Der *knockdown* des PeBoW-Komplex führt zu einer p53 Stabilisierung, nicht jedoch zu einer Serin-15-Phosphorylierung von p53 (Hölzel et al., 2010b). Es muss also neben der posttranskriptionellen Modifikation von p53 noch ein anderer Mechanismus existieren, der in Antwort auf die Hemmung der Ribosomenbiogenese p53 stabilisiert.

Wenn der Zusammenbau von Ribosomen im Nukleolus unterbrochen ist, die Transkription von ribosomalen Proteinen (RPs) aber fortgesetzt wird, resultiert dies in der Akkumulation von freien, nicht eingebauten ribosomalen Proteinen. Die Störung der Ribosomenbiogenese führt zu einer Interaktion der ribosomalen Proteinen L5 (Marechal et al., 1994), L11 (Lohrum et al., 2003; Zhang et al., 2003), L23 (Jin et al., 2004), L26 (Zhang et al., 2010) sowie S7 (Chen et al., 2007), S27 (Xiong et al., 2011) und S27a (Sun et al., 2011) mit Hdm2. Dadurch kann Hdm2 p53 nicht mehr ubiquitinieren, wodurch der proteasomale Abbau von p53 ausbleibt. Ein Beispiel für ribosomalen Stress, der den Hdm2-p53-*feedback-loop* stört, indem er die Freisetzung von ribosomalen Proteinen verursacht, ist 5-FU (Sun et al., 2007; Burger et al., 2010). Während L23, L26, S27 und S27a die saure Domäne von Mdm2 binden (Dai et al., 2004; Jin et al., 2004; Xiong et al., 2011; Zhang et al., 2010), binden im Gegensatz dazu L5, L11 und S7 die dahinterliegende Zink-Finger-Domäne von Mdm2 und sind für die p53-Aktivierung nach ribosomalen Stress unverzichtbar (Bhat et al., 2004; Zhu et al., 2009; Lindström et al., 2007; Macias et al., 2010). Die Bindung von ribosomalen Proteinen an

verschiedene Bereiche der zentralen Domäne von Mdm2 lässt vermuten, dass diese einen Multi-RP-Mdm2-Komplex bilden und gemeinsam die Mdm2-E3-Ubiquitinligase-Aktivität hemmen. Die synergistische Regulation des Mdm2-p53-Kreislaufes durch L5 und L11 konnte bereits gezeigt werden (Horn und Vousden, 2008). Mäuse mit der Krebs assoziierten Mdm2-Mutante C305F (Mdm2<sup>C305F</sup>), die nicht mehr in der Lage ist L5 und L11 zu binden, zeigen nur noch nach DNA-Schädigung, nicht aber nach ribosomalen Stress, eine angemessene p53 Antwort (Lindström et al., 2007; Macias et al., 2010). Dies bestätigt den durch ribosomalen Stress induzierten RPs-Mdm2-p53-Signalweg *in vivo*. Andererseits ubiquitiniert Mdm2 auch die ribosomalen Proteine L26, S7, S27 und S27a (Ofir-Rosenfeld et al., 2008; Xiong et al., 2011; Zhu et al., 2009). Die dadurch vermittelte Reduktion der ribosomalen Proteine könnte für die Erholung der Zellen nach durchgeführter Stressantwort wichtig sein (Sun et al., 2011). Der Nukleolus und die ausgelöste p53-Stabilisierung spielen somit eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der zellulären Antwort auf ribosomalen Stress.

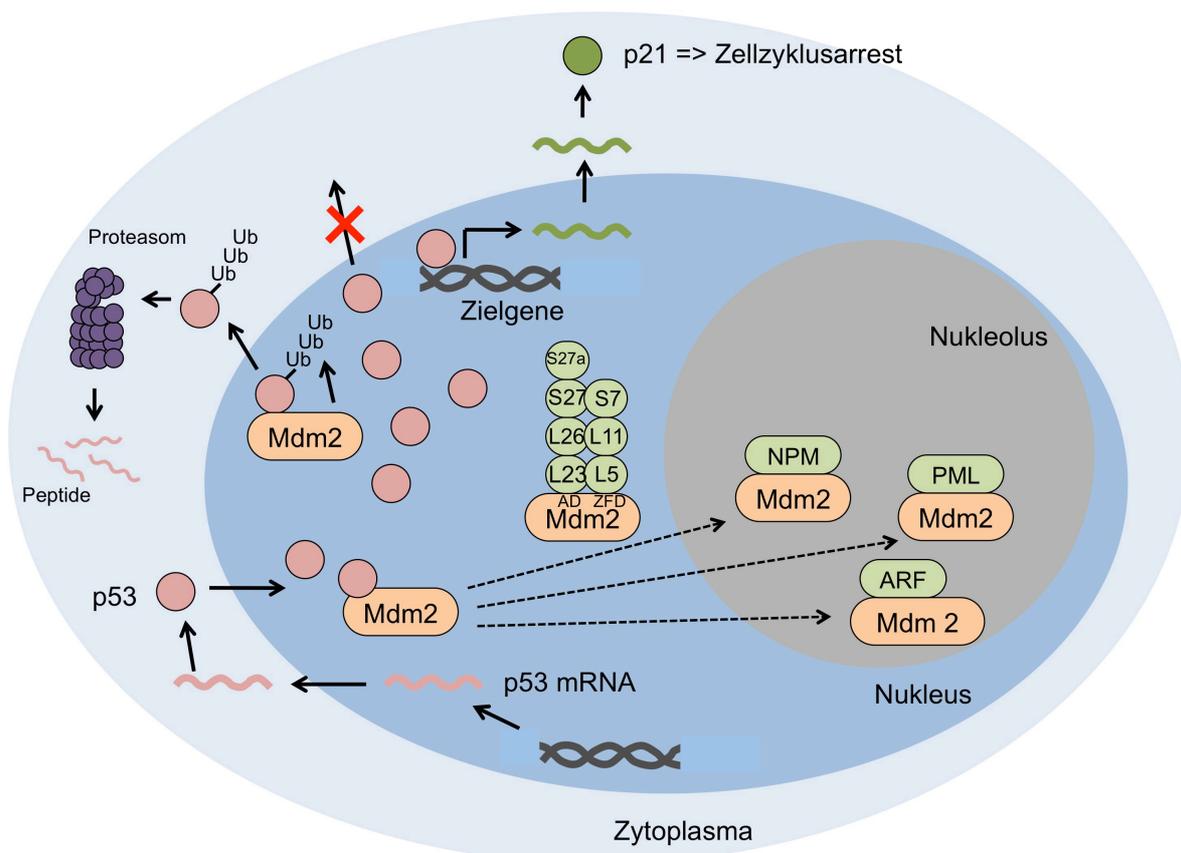
Im Gegensatz zur Störung der 60S Ribosomenbiogenese, führt die Störung der 40S Ribosomenbiogenese nicht zu einer nukleolären Disintegration. Dennoch wird eine L11-abhängige p53-Induktion ausgelöst (Fumagalli et al., 2009). Wie kann es ohne die Freisetzung ribosomaler Proteine aus dem Nukleolus zur L11 vermittelten p53-Induktion kommen? Trotz einer reduzierten globalen Proteinsynthese führt die Störung der 40S Ribosomenbiogenese zu einer Hochregulation der Translation der L11 mRNA, welche durch die Derepression der L11 5'-TOP-Sequenz vermittelt wird (Fumagalli et al., 2009; Hölzel et al., 2010a). Die Translation von ribosomaler L11 mRNA wird durch einen Oligopyrimidin-Trakt an der 5'-translationalen Startstelle (5'-TOP) kontrolliert (Levy et al., 1991). Somit stehen auch im Falle der Hemmung der 40S Ribosomenbiogenese genügend freie L11 Proteine zur Verfügung, um Mdm2 zu binden und zu inaktivieren.

Zusätzlich wird die p53-Aktivität durch verschiedene nukleoläre Proteine wie ARF, Nukleophosmin, Nukleostemin und PML reguliert. Der Tumorsuppressor p14ARF bindet Hdm2, sequestriert es im Nukleolus und hemmt dessen E3-Ubiquitinligase-Aktivität (Weber et al., 1999; Sugimoto et al., 2003; Tao und Levine, 1999). ARF wird durch einen alternativen Leserahmen des INK4a-Lokus kodiert. Nukleophosmin (NPM) ist ein multifunktionelles Protein, welches unter anderem an der Ribosomenbiogenese beteiligt ist (Ithahana et al., 2003). NPM kann Hdm2 binden und inaktivieren (Kurki et al., 2004). Zusätzlich interagiert NPM mit ARF und inaktiviert es im Nukleolus (Korgaonkar et al., 2005). Es wird diskutiert, dass NPM mit Hdm2 um die ARF-Assoziation konkurriert, wodurch NPM unter normalen Bedingungen eine p53-Stabilisierung verhindert.

Nukleostemin (Nst), ein nukleoläres GTP-Bindeprotein, ist ebenfalls ein Regulator des p53-Mdm2-*feedback-loops* (Tsai und McKay, 2005). Die Überexpression von Nst sequestriert Mdm2 und verhindert dadurch den Abbau von p53 (Ma et al., 2008). Die Depletion von Nst fördert die Interaktion der ribosomalen Proteine L5 und L11 mit Mdm2 und führt dadurch ebenfalls zu einer p53-Stabilisierung.

Auch Nukleolin kann Hdm2 binden und dadurch p53 stabilisieren (Daniely und Borowiec, 2000; Saxena et al., 2006). Nukleolin ist ein c-Myc-Zielgen und wird für die rRNA-Prozessierung benötigt.

Ein weiteres Protein, welches die p53-Stabilität reguliert, indem es Mdm2 im Nukleolus hält ist PML (*promyelocytic leukemia protein*) (Bernardi et al., 2004; Bernardi et al 2008). PML ist für den Aufbau einer nukleären Struktur, den sogenannten PML *nuclear bodies* (PML-NBs) essentiell. PML-NBs kontrollieren unter anderem die Apoptose.



**Abb. 7. Rolle des Nukleolus bei der Stabilisierung von p53 nach ribosomalem Stress.** Bestimmte ribosomale Proteine (RPs) wie L5, L11, L23, L26, S7, S27, S27a binden und inaktivieren Mdm2 im Nukleoplasma. ARF, NPM und PML sequestrieren Hdm2 im Nukleolus. Hdm2 kann p53 nicht mehr ubiquitinieren, wodurch dessen proteasomaler Abbau verhindert wird. Stabilisiertes p53 kann an Zielgene binden, die einen Zellzyklusarrest oder Apoptose induzieren. (AD: *acidic domain*; ZFD: *zinc finger domain*)

Das hier vorgestellte Modell, welches die p53-Induktion durch den Verlust der nukleolären Integrität erklärt, ist laut Rubbi und Milner das einzige Modell, das eine einheitliche und schlüssige Erklärung für die Wirkung aller bekannten p53 stabilisierenden Substanzen liefert (Rubbi und Milner, 2003). Im Vergleich zur früheren Sichtweise, bei der man annahm, dass p53 aktiv induziert werden muss, schlägt das Modell eine neue Art der p53-Antwort vor. In ungestressten Zellen muss die p53-Antwort fortwährend durch einen funktionalen Nukleolus, der den p53-Abbau fördert, verhindert werden. Nukleolärer Stress führt zur Auflösung der Nukleolus-Struktur und verursacht eine p53-Stabilisierung. Dieser Mechanismus ist für die Zelle sicherer als ein induktiver Mechanismus, bei dem die Zelle schon bei einer einzigen Mutation nicht mehr auf Stress reagieren könnte. Auch die Zellzyklus-abhängige Variation der p53-Mengen kann durch dieses Modell erklärt werden. Wenn Säuger-Zellen ihre Nukleoli während der Mitose abbauen, sind auch die p53-Mengen der Zellen reduziert. Die volle nukleoläre Funktionalität wird erst in der späten G<sub>1</sub>-Phase erreicht und korreliert mit der maximalen rRNA-Synthese-Rate (Klein and Grummt, 1999; David-Pfeuty, 1999). Dieses Zeitfenster, indem die nukleolären Funktionalität wiederhergestellt wird, ist somit genau die Zeitspanne in der die p53-Level während des Zellzyklus erhöht sind.

### **1.7. PeBoW und die Verbindung zu Ppan**

Pes1, Bop1 und WDR12 sind Komponenten des vor kurzem beschriebenen PeBoW-Komplexes (Hölzel et al., 2005; Rohrmoser et al., 2007). Alle drei Faktoren werden von c-Myc Zielgenen kodiert. Der PeBoW-Komplex wird für die Reifung der 28S-rRNA benötigt (Hölzel et al., 2005; Grimm et al., 2006). Diese Verbindung zwischen Zellzykluskontrolle und Ribosomenbiogenese war auch der Grund für die weitere Charakterisierung dieses Komplexes. Da nichts über Interaktionspartner von PeBoW in Säugern bekannt war, suchten wir nach Interaktionspartnern von Nop7, Erb1 und Ytm1, den Hefehomologen von Pes1, Bop1 und WDR12. Von den 35 gemeinsamen Interaktionspartnern von Nop7, Erb1 und Ytm1 ([www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org); [www.thebiogrid.org](http://www.thebiogrid.org)) sind 13 homolog im Menschen und als c-Myc-Zielgene beschrieben (Guo et al., 2000; Schlosser et al., 2003; Li et al., 2003; Marinkovic et al., 2004), unter anderem Ppan (homolog zum Hefe Ssf1). Ppan konnte in Drosophila und in einer humanen Krebszelllinie Tumorsuppressor-Eigenschaften zugeschrieben werden (Migeon et al., 1999; Welch et al., 2000). Anastassia Malamoussi, eine frühere Mitarbeiterin der AG Eick, konnte in Koimmunpräzipitationsexperimenten die Interaktion von Ppan mit

Pes1, Bop1 und WDR12 nachweisen (Malamoussi, 2008). Zusätzlich konnte die Interaktion zwischen Ppan und Pes1 sowie WDR12 mittels BiFC (*bimolecular fluorescence complementation assay*) (Hu et al., 2002) in den Nukleoli von lebenden HepG2-Zellen bestätigt werden (Malamoussi, 2008).

## 1.8. Zielsetzung der Arbeit

Seit geraumer Zeit widmet sich unser Labor der Erforschung des menschlichen PeBoW-Komplexes um den Zusammenhang zwischen Ribosomenbiogenese und Zellzyklus-Kontrolle besser zu verstehen (Hölzel et al., 2005, Grimm et al., 2006, Rohrmoser et al., 2007). Der PeBoW-Komplex wird für die Reifung der 28S-rRNA der großen ribosomalen Untereinheit benötigt. Anastassia Malamoussi konnte die Interaktion zwischen PeBoW und Ppan zeigen (Malamoussi, 2008). Außerdem lokalisiert Ppan nach ribosomalen Stress genauso wie die E3-Ubiquitinligase Hdm2 nukleolär (Ashcroft et al., 2000). Diese Beobachtungen führten zu der Entdeckung, dass Ppan mit Hdm2 interagiert (Malamoussi, 2008). Ppan spielt somit möglicherweise eine Rolle bei der Zellzyklusregulation. In dieser Arbeit soll überprüft werden, ob es sich bei dieser Assoziation um eine direkte oder indirekte Interaktion handelt. Mit Hilfe von Ppan-Deletionsmutanten soll untersucht werden, welche Bereiche von Ppan für die Assoziation mit Hdm2 notwendig sind. Des Weiteren soll in dieser Arbeit die Rolle von Ppan in der Ribosomenbiogenese genauer charakterisiert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Chemikalien

0,5% Trypsin-EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
1-kb-DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
$\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P] dATP, 3000 $\mu$ Ci/mmol	Hartmann-Analytik, Braunschweig
Agar	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose Ultra Pure	Invitrogen, Karlsruhe
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
Ampicillin	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
Borsäure	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
Bromphenolblau (BPB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Ciprobay 400	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
DMEM Medium	Invitrogen, Karlsruhe
dNTP	Promega, Mannheim
Doxycyclin	Sigma-Aldrich, Hamburg
ECL <sup>TM</sup> Plus Western Blotting Detection Reagent	GE-Healthcare, München
ECL <sup>TM</sup> Western Blot Detection Reagent	GE-Healthcare, München
Ethidiumbromid	Fluka Chemie GmbH, Buchs
Ethanol p.A.	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe

---

Fluorescent Mounting Medium	Dako GmbH, Hamburg
Formaldehyd (37%)	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
Formamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Glycerol 86%	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
HCl	Merck, Darmstadt
HEPES	MP Biomedicals Inc., Eschwege
Hygromycin B	Invitrogen, Karlsruhe
Immersol 518F	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Isopropanol p.A.	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Hamburg
KAPA-Hifi-DNA-Polymerase	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
L-Glutamin 200mM (100x)	Invitrogen, Karlsruhe
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
Methanol p.A.	Merck KGaA, Darmstadt
MOPS 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure	Sigma-Aldrich, Hamburg
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
Neomycin (G418)	Carl Roth, Karlsruhe
Nonidet P-40	Roche, Mannheim
OptiMEM	Invitrogen, Karlsruhe
Orange G	Sigma-Aldrich, Hamburg

---

Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ml	Invitrogen, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	ICN Biomedicals Inc., Fountain Pkwy, USA
Phosphorus-32 [ <sup>32</sup> P]	Hartmann Analytik, Braunschweig
PIPES	ICN Biomedicals Inc., Ohio, USA
Platinum® Pfx DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Polyacrylamid 30% (PAA)	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
Polyfect™	Qiagen, Hilden
Prestained Protein Ladder (PageRuler™)	MBI Fermentas, St. Leon Rot
Proteinase Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, St. Leon Rot New England Biolabs, Frankfurt
RNasin RNase Inhibitor	Promega, Mannheim
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Carl Roth, Karlsruhe
Sparfloxacin	Fluka Chemie GmbH, Buchs
Sucrose	ICN, Northeim
T4-DNA-Ligase	Invitrogen, Karlsruhe
T4-Polynukleotidkinase (PNK)	New England Biolabs
TEMED	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
TNT <i>Quick coupled Transcription/ Translation System</i>	Promega, Mannheim
Tris(hydroxymethyl)aminomethanol	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
Triton-X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypanblaulösung 0,4%	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
Xylen Cyanol	Sigma-Aldrich, Hamburg

### 2.1.2. Verbrauchsmaterialien und Kits

Amersham Hyperfilm™ MP	GE Healthcare, München
Cryoröhrchen 1,5 ml	Nunc GmbH, Wiesbaden
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
Dynabeads® Protein A oder G	Invitrogen, Karlsruhe
ECL™-Kit	GE Healthcare, München
Entwickler-Lösung	Ernst Christiansen GmbH, Planegg
E-Plate 16	ACEA Biosciences, San Diego, USA
Falcon-Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg
Fixierer-Lösung	Ernst Christiansen GmbH, Planegg
Hybond-ECL Nitrocellulose-Membran	GE Healthcare, München
Hybond-N <sup>+</sup> Nylonmembran	GE Healthcare, München
MicroSpin S-200HR columns	GE Healthcare, München
MiniElute Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Oligofectamin	Invitrogen, Karlsruhe
peqGOLD Gel Extraction Kit	Peqlab, Erlangen
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail	Roche Diagnostics, Penzberg
Pipettenspitzen gestopft	Nerbe plus, Germany
Plasmid Mini/Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Polyfect	Invitrogen, Karlsruhe
Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche Diagnostics, Penzberg
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Total RNA Kit PeqLab Gold	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Zellkulturflaschen (50, 250, 650 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschalen (10 cm und 15 cm)	Nunc, Wiesbaden

### 2.1.3. Geräte

Axiovert 200M Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss Jena GmbH, Göttingen
BAS-MS Imaging plate	Fujifilm, Düsseldorf

---

BioScan/ QC4000 XER (Radioisotopen-Zähler)	Bioscan Inc., Wahsington D.C.
BioRad PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Branson Sonifier 250	G.Heinemann Ultraschall- und Labortechnik, Schwäbisch-Gmünd
Cawomat 2000 IR Entwickler-Maschine	CAWO GmbH, Schrobenhausen
Eppendorf Centrifuge 5417R	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Eraser (für Image Plate)	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt
FLA-5100 Phosphorimager	Fujifilm, Düsseldorf
Flow-Hood-Sicherheitswerkbank	BDK Luft-und Reinraumtechnik GmbH, Sonnebühl
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	GLW Gesellschaft für Laborbedarf GmbH, Würzburg
Gel Dryer (Model 543)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
GS Gene Linker <sup>TM</sup> UV Chamber	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Hybridisierungs-ofen	Binder, Tuttlingen
Hypercassette	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Inkubator Heraeus 6000	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode
LB122 berthold ( $\beta$ , $\gamma$ -detection) (Geigerzähler)	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Leica LSCM SP2 (Konvokalmikroskop)	Leica Microsystems GmbH, Heidelberg
Megafuge 2.0	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode
Membran-Vakuumpumpe	Vacuumbrand GmbH & CoKG, Tuttlingen
NanoDrop 1000	Thermo Fischer Scientific, Braunschweig
UV Stratalinker 1800	Stratagene, Amsterdam
Telaval 31 Lichtmikroskop	Carl Zeiss Jena GmbH, Göttingen
Thermo Hybaid Px2	Thermo Scientific, München
Thermomixer 5436	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg

---

xCELLigence System Roche Diagnostics, Penzberg

### 2.1.4. Software

AIDA Version 3.20.116 Raytest Isotopenmessgeräte GmbH,  
Straubenhardt

ImageJ Version 1.44o Wayne Rasband, National Institutes of Health,  
USA

Leica-TCS-confocal-Software 2.61 Leica Microsystems GmbH, Heidelberg

MacVector 12.0.3 MacVector, Inc., Cary, North Carolina, USA

Microsoft Office 2011 Microsoft, Washington, USA

Openlab Version 3.0.8 Improvion, Coventry, England

RTCA Software 1.2 ACEA Biosciences, San Diego, USA

### 2.1.5. Puffer und Lösungen

10xTBE pH 8,0 Tris 89mM  
Borsäure 89 mM  
EDTA 20 mM

2xTris/ SDS pH 8,8 90,72 g Tris/ Base  
10 ml SDS 20%  
ad 1 l H<sub>2</sub>O  
pH-Einstellung mit HCl

2xTris/ SDS pH 6,8 30,24 g Tris/ Base  
10 ml SDS 20%  
ad 1 l H<sub>2</sub>O  
pH-Einstellung mit HCl

---

Agarose-Formaldehyd-Gel (1%)	4 g Agarose 300 ml H <sub>2</sub> O 40 ml MOPS-Puffer (10-fach) 67 ml Formaldehyd (37%)
Church-Puffer	0,5 M Natriumphosphat-Puffer pH 7,2 7% SDS 1 mM EDTA
DNA-Ladepuffer (10x, Orange Dye)	20g Sucrose 100 mg Orange G 50 ml H <sub>2</sub> O
DEPC behandeltes H <sub>2</sub> O	0,1% DEPC in H <sub>2</sub> O über Nacht einwirken lassen, anschließend autoklavieren
Einfriermedium	40% (v/v) DMEM-Medium 50% (v/v) FCS 10% (v/v) DMSO
Hygromycin	50 mg/ml Lösung, bei 4°C lichtgeschützt gelagert, in einer Konzentration von 100µg/ml eingesetzt
IP-Puffer	20 mM Tris/Hcl pH 7,5 125 mM NaCl 0,25% NP40 1,5 mM MgCl <sub>2</sub>

---

Lämmli-Puffer (2x)	2% SDS 100 mM DTT 10 mM EDTA 10% Glycerol 60 mM Tris/HCl pH 6,8 0,01% BPB 1mM PMSF
LB-Medium	1% Casein (Pepton 140) 0,5% Hefeextrakt 0,5% NaCl 0,1% Glucose
MOPS-Puffer (10-fach, pH 7,0)	200 mM MOPS 50 mM NaAc (H <sub>2</sub> O-frei) 10 mM EDTA
Natriumphosphat-Puffer (pH 7,2)	684 ml 1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 316 ml 1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBS (pH 7,2-7,4)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *6H <sub>2</sub> O 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Polyacrylamid-Harnstoff-Gel (12%)	47,5% Acrylamid, 2,5% Bisacrylamid 12 ml 10 M Harnstoff 21 ml 10xTBE 4ml 10% Ammoniumpersulfat 0,4 ml H <sub>2</sub> O 2,6 ml

---

RNA Ladepuffer (2-fach)	50% Formamid 15% Formaldehyd (37%) 1x MOPS pH 7,0 0,1% Bromphenolblau 10µg/ml Ethidiumbromid
RNA Ladepuffer (2-fach) für Polyacrylamid-Harnstoff-Gele	10% Sucrose 90% deionisiertes Formamid 0,05% Bromphenolblau 0,05% Xylene Cyanol
SDS-PAGE Trenngel (10,5%)	14 ml PAA 30% 20ml 2xTris/SDS pH 8,8 5,6 ml H <sub>2</sub> O 334 µl APS 34 µl TEMED
SDS-PAGE Sammelgel (4%)	2 ml PAA 30% 7,5 ml 2xTris/SDS pH 6,8 5,4 ml H <sub>2</sub> O 90 µl APS 20 µl TEMED
SSC (20x)	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat pH 7,0
TBF1 (pH 5,8)	30 mM Kaliumacetat 10 mM CaCl <sub>2</sub> 50 mM MnCl <sub>2</sub> 100 mM RbCl 15% Glycerol pH-Einstellung mit 1 M Essigsäure und filtern

---

TBF2 (pH 6,5)	10 mM PIPES pH 6,5 75 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM RbCl 15 % Glycerol pH-Einstellung mit 1 M KOH und filtern
TBS-Puffer	100 mM NaCl 10 mM Tris/ HCl (pH 7,5)
TBST-Waschpuffer (1-fach)	10% (v/v) TBS 0,1% (v/v) Twen 20 5% (w/v) Magermilchpulver
Western-Laufpuffer (10-fach)	30,24 g Tris 144 g Glycin 50 ml SDS 20% ad 1 l H <sub>2</sub> O
Western-Transferpuffer (10-fach)	30,24 g Tris 144 g Glycin 50 ml SDS 20% 100 ml Methanol ad 1 l H <sub>2</sub> O

### 2.1.6. Bakterielle Stämme

Zur Klonierung der Ppan-Deletionskonstrukte wurde der *Escherichia coli*-Stamm DH10B verwendet. Sein Genotyp lässt sich wie folgt beschreiben: F- *mcrA*  $\Delta(mrr\text{-}hsdRMS\text{-}mcrBC)$   $\phi 80lacZ\Delta M15$   $\Delta lacX74$  *recA1* *endA1* *araD139*  $\Delta(ara, leu)7697$  *galU* *galK*  $\lambda$ - *rpsL* *nupG*.

### 2.1.7. Zelllinien

Name	Zelltyp
U2OS	Humane Osteosarkom-Zelllinie, p53 Wildtyp
H1299 p53-/-	Humane nicht-kleinzellige Lungenkarzinom Zelllinie; die Zellen haben eine homozygote Teildeletion von p53 und exprimieren kein p53;
Saos-2 p53-/-	Humane p53 defiziente Osteosarkom-Zelllinie
293	HEK-293 humane Adenoviren-transformierte Epithelzellen
MEF	<i>Mouse embryonic fibroblasts</i>

### 2.1.8. Plasmide

Name	Beschreibung
pUC18-PpanHA	mit C-Terminalen HA-tag
pSfiExpress-Luc	kann für die transiente Transfektion von 293-Zellen eingesetzt werden; trägt ein Gen, welches Kanamycin-Resistenz in <i>E.coli</i> verleiht
pRTS-Luc	kann für die stabile Transfektion in U2OS-Zellen eingesetzt werden; trägt ein Gen, welches Ampicilin-Resistenz in <i>E.coli</i> verleiht; Doxycyclin-induzierbarer bidirektionaler Promotor, der die Expression von eGFP und einem zweiten Gen der Wahl kontrolliert (Bornkamm et al., 2005)
pUC18-PpanHA	von Anastassia Malamoussi
pRTS-Hdm2Flag	von Anastassia Malamoussi
pRTS-p53wt	von Anastassia Malamoussi
pRTS-PpanHA	von Anastassia Malamoussi
pRTS-M1 $\Delta$ 1-30	von Anastassia Malamoussi
pRTS-M2 $\Delta$ 31-171	von Anastassia Malamoussi
pRTS-M3 $\Delta$ 30-300	diese Arbeit (M3-Ppan $\Delta$ Brix-fwd, M3-Ppan $\Delta$ Brix-rev)
pRTS-M4 $\Delta$ 172-301	von Anastassia Malamoussi
pRTS-M5 $\Delta$ 270-285	diese Arbeit (M5-Ppan $\Delta$ $\sigma$ 70-fwd, M5-Ppan $\Delta$ $\sigma$ 70-rev)
pRTS-M6 $\Delta$ 304-342	von Anastassia Malamoussi
pRTS-M7 $\Delta$ 271-473	diese Arbeit (M7-Ppan $\Delta$ $\sigma$ 70-C-fwd, M7-Ppan $\Delta$ $\sigma$ 70-C-rev)
pRTS-M8 $\Delta$ 343-473	von Anastassia Malamoussi

### 2.1.9. Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von Eurofins synthetisiert und in H<sub>2</sub>O gelöst (100 µM). Bei der Verwendung von überhängenden Primern ist der an die *Template*-DNA bindende Bereich unterstrichen. Die angegebene Schmelztemperatur bezieht sich nur auf den *Template* bindende Sequenz.

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')	T <sub>m</sub> °C
M3-PpanΔBrix-fwd	Phos- GTGAGCAAGACGGAGGAGGAGC	65,8
M3-PpanΔBrix-rev	Phos- CGGGTTCGCGGCATAGGCCT	65,5
M5-PpanΔσ70-fwd	Phos-GTCCAGGAGGGCGTCGGGGAGG	73,0
M5-PpansΔσ70-rev	Phos-TGCACTCTGCTGGGCCCCGCATG	70,0
M7-PpanΔσ70-C-fwd	Phos-ATCGGTTACCTTATGATGTGCCAGATTATG	65,5
M7-PpanΔσ70-C-rev	Phos-TGCACTCTGCTGGGCCCCGCAT	65,7
T7-PpanHafwd	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAACAGCCACCATG <u>GGACAGTCAGG</u>	63,4
T7-PpanHArev	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGGCATAATCT <u>GGCACATCATAAGGG</u>	63,7
T7-MycHdm2fwd	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAACAGCCACCATG ATCCTTAAAAAAGCCACAGCATAACATCCTGGGCGGCGTG <u>AGGAGCAGGCAAATGTGCAATACCAACA</u>	59,3
T7-MycHdm2rev	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAGGGGAAATA <u>AGTTAGCACAATCATTTG</u>	60,4
T7-p53Hafwd	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAACAGCCACCATG <u>GAGGAGCCGCAGTCAG</u>	61,0
T7-p53HArev	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCAGGCATAATCT <u>GGCACATCATAAGGGTAGTCTGAGTCAGGCCCTTCTG</u>	61,4

### 2.1.10. Antikörper

Für die Produktion des Ppan (1C3)-Antikörpers wurde ein synthetisches Peptid der Sequenz MGQSGRSRHQKRA, welches den Aminosäuren 1-13 des N-Terminus von menschlichen Ppan entspricht, verwendet um Ratten zu immunisieren (Elisabeth Kremmer, Helmholtz Zentrum München). Die Peptidsynthese erfolgte im Labor von Dr. Hans-Richard Rackwitz (*Peptide Speciality Laboratories GmbH, Heidelberg*).

<b>Primärantikörper Zielprotein</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Alpha-Tubulin	Maus	1:20000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Deisenhofen
Fibrillarin (ab5821)	Kaninchen	1:500-1:2000	Abcam, Cambridge, UK
HA (3F10)	Ratte	1:10-1:1000	Roche Diagnostics, Penzberg
Hdm2 (SMP14)	Maus	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz/USA
hRrp6 (PM-Scl, Exosc10)	Kaninchen	1:1000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Deisenhofen
NPM (Clone FC82291)	Maus	1:1000-1:2500	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Deisenhofen
p53 (DO-1, sc-126)	Maus	1:2000	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Heidelberg
Ppan (1C3)	Ratte	1:1000- 1:20000	Elisabeth Kremmer, Helmholtz Zentrum München
Pes1 (8E9)	Ratte	1:1000	Elisabeth Kremmer, Helmholtz Zentrum München
<b>Sekundärantikörper</b>		<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Alexa Fluor 488 Ziege Anti-Maus IgG		1:400	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor 488 Ziege Anti-Ratte IgG		1:400	Invitrogen, Karlsruhe
Cy <sup>TM</sup> 3-conjugated AffiniPure Ziege Anti-Maus IgG		1:300	Jackson ImmunoResearch, Newmarket, Suffolk, UK
Cy <sup>TM</sup> 3-conjugated AffiniPure Ziege Anti-Kaninchen IgG		1:300	Jackson ImmunoResearch, Newmarket, Suffolk, UK
Cy <sup>TM</sup> 3-conjugated AffiniPure Ziege Anti-Ratte IgG		1:500	Jackson ImmunoResearch, Newmarket, Suffolk, UK
Cy <sup>TM</sup> 5-conjugated AffiniPure Ziege Anti-Maus IgG		1:500	Jackson ImmunoResearch, Newmarket, Suffolk, UK
$\alpha$ -IgG Kaninchen, HRP-gekoppelt		1:2500	Promega, Mannheim
$\alpha$ -IgG Maus, HRP-gekoppelt		1:5000	Promega, Mannheim
$\alpha$ -IgG Ratte, HRP-gekoppelt		1:10000	Promega, Mannheim

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Arbeiten mit DNA

#### 2.2.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA (*Mini-* und *Maxiprep*)

Die *Miniprep* Plasmid-Isolierung erfolgte mit dem Qiagen Plasmid-Mini-Kit. Hierzu wurden zunächst einzelne *E. coli* Kolonien in 2 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum inokuliert und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Nach der 10 minütigen Zentrifugation bei 10000 g wurde das Bakterien-Pellet in 300 µl P1 Resuspensionspuffer gelöst und anschließend mit 300 µl P2 Lysispuffer bei RT lysiert (5 min). Es folgte die Zugabe von 300 µl P3 Neutralisationspuffer, eine sanfte Durchmischung und eine 10 minütige Zentrifugation bei 16400 g. Der die Plasmid-DNA-enthaltende Überstand wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde durch eine Isopropanolfällung (70%), eine 10 minütige Inkubation auf Eis und der anschließenden 30 minütigen Zentrifugation bei 4°C (16400 g) isoliert. Das DNA-Pellet wurde mit 1 ml 70%-Ethanol gewaschen (10 min Zentrifugation, 16400 g, 4°C), an der Luft getrocknet und schließlich in 50 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst. Für die *Maxiprep* wurde das Qiagen Plasmid-Maxi-Kit verwendet. Es wurden 200 ml Bakteriensuspension über Nacht herangezüchtet und bei 5000 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Die weitere Plasmidisolierung mit Hilfe des Qiagen Plasmid-Maxi-Kits erfolgte nach Protokoll des Herstellers.

#### 2.2.1.2. DNA-Verdau

Der Restriktionsverdau wurde für die Kontrolle von neuklonierten Plasmiden (siehe 2.2.1.7.) sowie bei der Umklonierung von Genen (siehe 2.2.1.8.) benötigt. 1 µg Plasmid-DNA wurde mit 5-10 U Restriktionsenzym und dem empfohlenen Puffer bei optimaler Reaktionstemperatur in einem Volumen von 10-20 µl für 1 h inkubiert.

#### 2.2.1.3. DNA-Ligation

Für die Ligation von geschnittenen DNA-Fragmenten mit kompatiblen, überhängenden Enden wurden Vektor und Insert in einem Verhältnis von 3:1 in die Ligationsreaktion eingesetzt. Der Ansatz wurde zusammen mit T4-DNA-Ligase und Ligase-Puffer in 10 µl Volumen über Nacht bei 16°C inkubiert.

#### **2.2.1.4. Transformation von *E.coli***

50 µl auf Eis aufgetaute chemokompetente *E.coli*-Zellen wurden mit der zu transformierenden DNA (50-100 ng) vermengt und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation durch einen Hitzeschock von 42°C für ca. 40 s. Nach 2 min Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz mit 1 ml LB-Medium vermischt und 1 h bei 37°C geschüttelt. 100 µl Bakteriensuspension wurden abgenommen, auf LB-Platten (mit entsprechendem Selektionsantibiotikum wie z.B. Ampicillin (Endkonzentration 100 µg/ml) oder Kanamycin (Endkonzentration 50 µg/ml)) ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Der Rest der Zellen wurde abzentrifugiert (20 s, 10000 g), in ca. 100 µl Medium resuspendiert und ebenfalls auf LB-Amp-Platten ausplattiert, was auch bei geringeren Transformationseffizienzen Koloniewachstum gewährleistet.

#### **2.2.1.5. Herstellung chemokompetenter *E.coli***

Eine Übernachtskultur von *E.coli* DH10B wurde für 2-3 h in 400 ml LB-Medium inkubiert bis die Kultur eine OD<sub>600</sub> von 0,4-0,6 erreicht hatte. Nach der Zentrifugation der Bakteriensuspension (5 min, 4500 g, 4°C) wurden die Zellen mit 80 ml eiskaltem TBF1 gewaschen, in 8 ml eiskaltem TBF2 resuspendiert und für 15-60 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden in 200 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

#### **2.2.1.6. DNA-Gelelektrophorese und DNA-Gelextraktion**

Plasmid-DNA bzw. DNA-Fragmente aus Restriktionsverdau wurden auf einem 1%-Agarosegel (mit 1µg/ml Ethidiumbromid) in 1xTBE-Puffer aufgetrennt. Für die Klonierung wurden gewünschte DNA-Fragmente mit einem sterilen Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten und laut Protokoll des Qiagen Gel-Extraktions-Kit aus dem Gel extrahiert.

#### **2.2.1.7. PCR-Mutagenese**

Die sequenzspezifische Mutagenese wurde verwendet um bestimmte DNA-Sequenzen des Ppan-Gens zu deletieren. Als Ausgangsplasmid diente dafür pUC18-PpanHA, in dem die interne *SfiI*-Restriktionsschnittstelle von Ppan bereits durch eine stille Mutation (von GCC zu GCT) mutiert wurde. Die PCR-Reaktion mit spezifischen und phosphorylierten Primern (siehe 2.1.9.) und KAPA-Hifi-Polymerase erfolgte unter folgenden Bedingungen im Px2

Thermo Hybaid. Der GC-Puffer wird für DNA-*Templates* mit hohem GC-Gehalt (wie dem Ppan-Gen mit 60,4% GC-Gehalt) empfohlen.

Plasmid DNA- <i>Template</i> (10 ng/μl)	1 μl
5xKapa-Hifi-DNA-Poylmerase	1 μl
Kapa-Hifi-GC-Puffer	5 μl
dNTP-Mix (10 mM)	1,5 μl
Primer fwd (10 μM)	1,5 μl
Primer rev (10 μM)	1,5 μl
H <sub>2</sub> O	25,5 μl

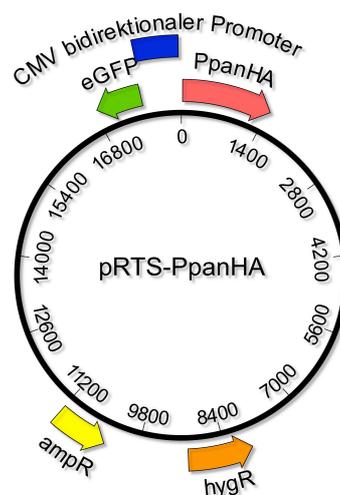
94°C Denaturierung	2 min	
94°C Denaturierung	30 s	} 25x
63°C <i>Annealing</i>	30 s	
68°C Verlängerung	4,5 min	
<hr/>		
72°C finale Verlängerung	10 min	

Nach der PCR wurde das DNA-*Template* durch den enzymatischen Verdau mit *DpnI* entfernt. *DpnI* schneidet nur bakterielle DNA, die durch die Dam-Methylase methyliert wurde. Das mutierte Plasmid bleibt verschont, da es *in vitro* amplifiziert wurde und somit unmethyliert vorliegt. Alle Ppan-Deletionskonstrukte wurden durch Restriktionsenzymverdau (siehe 2.2.1.2.) und Sequenzierung überprüft.

### 2.2.1.8. Klonierung in pSfiExpress und pRTS

Die im bakteriellen Ausgangsplasmids pUC18 durch PCR-Mutagenese hergestellten Ppan-Deletionskonstrukte wurden in die eukaryotischen Expressionsplasmide pSfiExpress-Luc und pRTS-Luc umklontiert. Dies erfolgte mit Hilfe eines *SfiI*-Restriktionsenzymverdau, wodurch das jeweilige Ppan-Deletionskonstrukt aus dem pUC18-Ausgangsvektor ausgeschnitten wurde. Auch die pSfiExpress-Luc- und pRTS-Luc-Plasmide wurde jeweils einem *SfiI*-Restriktionsverdau unterzogen um das enthaltende Luziferase-Gen zu entfernen. Das

erhaltene Insert des Ppan-Deletionskonstrukts wurde anschließend mit dem offenen pSfiExpress- bzw. pRTS-Leervektor ligiert. Im pSfiExpress-Vektor wird die Expression der Ppan-Deletionskonstrukte durch den Cytomegalovirus (CMV) Promotor, der in Säugerzellen konstitutiv aktiv ist, kontrolliert. Der pSfiExpress-Vektor eignet sich für transiente Transfektionen in 293-Zellen. Es konnte schnell überprüft werden, ob die auf dem pSfiExpress-Vektor kodierte Ppan-Deletionsmutante korrekt exprimiert wird. Der pSfiExpress-Vektor trägt ein Gen, welches *E.coli* eine Kanamycin-Resistenz verleiht. Der pRTS-Vektor wurde für die stabile Transfektion von humanen Zellen verwendet (Bornkamm et al., 2005). pRTS besitzt für die Selektion in Bakterien ein Ampicillin-Resistenz-Gen und für die Selektion in menschlichen Zellen ein Hygromycin-Resistenz-Gen (Abb. 8). Der durch Doxycyclin induzierbare bidirektionale CMV-Promotor kontrolliert die Expression von eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) und der Ppan-Deletionskonstrukte bzw. PpanHA (Abb. 8). Mit Hilfe der eGFP-Expression konnte unter dem Mikroskop schnell überprüft werden, ob die stabile Transfektion der Zellen funktioniert hat.



**Abb. 8. Expressionsvektor für pRTS-PpanHA.** Der bidirektionale CMV-Promotor kontrolliert gleichzeitig die Expression von eGFP und PpanHA. Das Plasmid trägt ein Ampicillin-Resistenzgen für die Selektion von transformierten Bakterien und ein Hygromycin-Resistenzgen für die Selektion von stabil transfizierten Säuger-Zellen.

### 2.2.1.9. Quantitative *Real-Time*-PCR (qRT-PCR)

Bei dieser Technik wurde zuerst mRNA in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde 0,5 µg totale RNA mit Oligo(dT)<sub>12-18</sub> (500 µg/ml)-Primern und einem dNTP Mix (jeweils 10 mM) für 5 min bei 65°C erhitzt. Die kurz gekühlte Probe wurde anschließend mit 5x*First-Strand Buffer*, 0,1 M DTT (oder β-ME) und RNasin (1 µl) versetzt, gemischt und für 2 min bei 42°C

inkubiert. Nach der Zugabe von SuperScript II Reverser Transkriptase (200 U/ $\mu$ l; 1  $\mu$ l) wurde der Ansatz 50 min bei 42°C inkubiert. Schließlich wurde die Reaktion durch eine 15 minütige Inkubation bei 70°C inaktiviert.

Mit Hilfe der *Universal Probe Library* (Roche) wurden spezifische Ppan (NM\_020230.5) Primerpaare entworfen (*forward* Primer: 5'-CCATCAACGTGCACAAGG-3', *reverse* Primer: 5'-GAGTCGGGGTTGTAGTCGAT-3'). Die RT-PCR amplifiziert mit diesem Primerpaar ein 70 bp langes PCR-Produkt. Als Kontrolle wurde ein für das Strukturprotein  $\beta$ -Aktin spezifisches Primerpaar verwendet (*forward* Primer: 5'-CTACGAGGGCTATGCTCTCCC-3, *reverse* Primer: 5'-CCGGACTCATCGTACTCCTGC-3').

Die RT-PCR erfolgte mit dem LightCycler-System von Roche. Dazu wurden die zuvor synthetisierte cDNA, die spezifischen mRNA Primerpaare sowie dNTPs, Cybergreen und die Polymerase in einer Glaskapillare pipettiert. Nach dem Einstellen eines für die Primerpaare optimierten PCR-Programms konnte die Amplifikation der PCR-Produkte im LightCycler erfolgen. Die vom Gerät ermittelten CP-Werte geben Aufschluss über die Menge an mRNA die in der ursprünglich isolierten RNA-Probe vorhanden war. Anhand von Schmelzkurvenanalysen lässt sich die Spezifität der Primerpaare kontrollieren. Zusätzlich kann die Spezifität der Primerpaare auch über die Größenkontrolle des PCR-Produkts in einem 2%-Agarosegel überprüft werden.

## 2.2.2. Zellkultur

### 2.2.2.1. Kultivierung von Zellen

Es wurden folgende humane, adhärent wachsende Zellen bei 37°C in einer 5-8% CO<sub>2</sub>-haltigen und wasserdampfgesättigten Atmosphäre in Zellkulturschalen oder Zellkulturflaschen im Inkubator kultiviert: U2OS, H1299, Saos-2, 293 und MEF. Um ein optimales Wachstum zu gewährleisten wurden die Zellen alle drei Tage (wenn sie ca. 80% konfluent gewachsen sind) mit Trypsin vom Boden der Zellkulturschale gelöst und ca. 1:10 mit frischem DMEM-Medium (10% FCS, 100 U Penicillin/ml, 100  $\mu$ g Streptomycin/ml und 2 mM L-Glutamin) verdünnt. Zur Vorbeugung vor bzw. zur Behandlung von Mycoplasmen-Infektionen der Zellen wurde dem Medium abwechselnd die bakteriostatisch wirksamen Antibiotika Ciprofloxacin (Handelsname Ciprobay 400; 400 mg/ml, 1:200) oder Sparfloxacin (10 mg/ml in 0,1 M NaOH gelöst; 1 zu 2000) zugesetzt.

### 2.2.2.2. Bestimmung der Lebendzellzahl

Um die Lebendzahl einer Zellkultur zu bestimmen wurden 40 µl Zellsuspension mit 40 µl 1:10 Trypanblaulösung (0,4% w/v in PBS) vermischt und in der Fuchs-Rosenthal-Kammer ausgezählt. Die toten Zellen nehmen über ihre Membran die Trypanblaulösung auf und sind somit von den lebendigen, farblos erscheinenden Zellen unterscheidbar. Nach der Auszählung von vier Großquadraten wurde die Zellzahl pro ml folgendermaßen bestimmt: Zellzahl/ml = Mittelwert der Zellen pro Großquadrat  $\times 10^4$ . Die Zahl  $10^4$  ergibt sich aus dem Faktor 5000, mit dem man die Zellzahl multiplizieren muss, um das Volumen eines Großquadrates (0,2 mm<sup>3</sup>) auf einen Milliliter umzurechnen und aus dem Faktor zwei, da die Zellen mit der Trypanblaulösung 1:1 verdünnt wurden.

### 2.2.2.3. Auftauen von Zellen

Die eingefrorenen Zellen wurden im 37°C-Wasserbad aufgetaut, sofort in DMEM-Medium überführt und abzentrifugiert (1200 g, 4 min). Danach wurde das Zellpellet mit PBS gewaschen und anschließend zentrifugiert (1200 g, 4 min; zweimal) um das für die aufgetauten Zellen schädliche DMSO zu entfernen. Anschließend wurde das Zellpellet in DMEM-Medium (+20% FCS) aufgenommen.

### 2.2.2.4. Einfrieren von Zellen

Das Einfrieren von Zellen sollte durchgeführt werden, wenn die laufende Kultur ca. 80% konfluent ist und dient der Lagerung von Zellkulturen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit Trypsin von der Zellkulturschale gelöst und in DMEM-Medium abzentrifugiert (1200 g, 4 min). Danach wurde das Zellpellet mit PBS gewaschen und zentrifugiert (1200 g, 4 min; zweimal). Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium (40% (v/v) DMEM-Medium, 50% (v/v) FCS, 10% (v/v) DMSO) aufgenommen und in ein 1,5 ml Cryoröhrchen überführt. Um ein Schockgefrieren der Zellen zu vermeiden, wurden die Cryoröhrchen mit einigen Lagen Zellstoff umwickelt, bevor sie bei -80°C eingefroren wurden.

### 2.2.2.5. Proliferationsassay

Die Proliferationsrate von adhärennten Zellen wurde mit Hilfe des xCELLigence-System von Roche bestimmt. Dabei wurden 3000-4000 U2OS-Zellen je E-Plate ausplattiert und mittels

Goldelektroden die Impedanz der Zellen in Echtzeit alle 15 Minuten gemessen. Das xCELLigence-System zeichnet den Zellindex für 120 h auf. Der Zellindex ist eine dimensionslose Größe die vom Widerstand der ausplattierten Zellen abhängt.

### 2.2.3. RNA-Interferenz

Am Tag vor der Transfektion werden  $8 \times 10^4$  Zellen in 6-Loch-Platten ausgesät. 100 nM *short interfering RNA* (siRNA) Oligonukleotide (Eurofins) wurden in 150  $\mu$ l OptiMEM verdünnt. Zusätzliche 150  $\mu$ l OptiMEM werden mit 3  $\mu$ l Oligofectamin versetzt, dem Ansatz hinzugefügt und für 20 min inkubiert. Schließlich wurde der Ansatz zusammen mit 600  $\mu$ l Opti-MEM für 6 h auf die Zellen gegeben. Die ausplattierten Zellen wurden an zwei aufeinander folgenden Tagen mit siRNA transfiziert. 24 h bzw. 48 h nach der 2ten Transfektion wurden die Zellen lysiert. Tabelle 1 fasst die verwendeten siRNA-Sequenzen (*sense*) zusammen. Die siRNA-Sequenzen die nicht aus Veröffentlichungen übernommen wurden, wurden mit dem siDesign-Center von Dharmacon entworfen.

**Tab. 1. Verwendete siRNA-Sequenzen.** (dT steht für Deoxyribosylthymine).

siRNA	Sequenz
siPpan-ORF2	5'-GGACGAUGAUGAACAGGAAdT-3'
siPes1 (Hölzel et al., 2010a)	5'-AGGUCUCCUGUCCAUCAAdT-3'
siPpan-ORF1-mm	5'-GCAGAGGCCUGGUAUAAdT-3'
siRpL11 (Fumagalli et al., 2009)	5'-AAGGUGCGGGAGUAUGAGUUAdT-3'
siRrp4 (van Dijk et al., 2007)	5'-GUUGAUCUGUGUGAAAGCUdT-3'

### 2.2.4. Metabolische Markierung

Beim metabolischen Markierungsexperiment wurden die ausplattierten Zellen (ca.  $1-2 \times 10^5$  Zellen/6-Loch) zunächst für 1 h in phosphatfreiem DMEM (mit 10% dialysiertem FCS) inkubiert. Das Medium wurde dann durch phosphatfreies DMEM (mit 10% dialysiertem FCS) mit 15  $\mu$ Ci [ $^{32}$ P]-Orthophosphat ersetzt. Nachdem die Zellen 1 h lang markiert wurden, wurden die Zellen für die angegebenen Zeitintervalle in normalem DMEM-Medium inkubiert. Alle Inkubationsschritte erfolgten dabei bei 37°C/ 8% CO<sub>2</sub>.

Nach der Lyse mit Lysispuffer (ca. 350  $\mu$ l Lysispuffer/ 1 Mio. Zellen) wurde die RNA mit einem PeqLab Gold total RNA-Kit isoliert. Die Elution der RNA erfolgte mit 35-50  $\mu$ l DEPC-Wasser. Anschließend wurde die Konzentration der RNA mittels NanoDrop ermittelt.

1 µg der RNA wurde zum Nachweis der hoch molekularen RNA auf einem 1%-Agarose-Formaldehyd-Gel in 1xMOPS-Puffer (100V für ca. 5 h) bzw. zum Nachweis der niedrig molekularen RNA auf einem 12%-Polyacrylamid-Harnstoff-Gel in 1xTBE-Puffer (500V für ca. 3 h) aufgetrennt. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel auf einem Whatmanpapier platziert und für 2 h bei 80°C und dem Anschluss an eine Vakuum-Pumpe getrocknet. Es folgte die Exposition des getrockneten Agarosegels auf einen Autoradiographiefilm in einer Entwicklerkassette für ca. 3 h bei -80°C. Die Quantifizierung der während des metabolischen Markierungsexperiments gebildeten rRNA-Formen erfolgte durch die Detektion der Signale mit Hilfe eines Phosphorimagers auf einer *Image Plate*. Mit der Software Photoshop wurde das detektierte Tiff-Bild invertiert sowie die Auto-Kontrast-Funktion aktiviert. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der rRNA-Formen mit dem Programm Aida.

### 2.2.5. Northern Blot

Die ausplattierten Zellen ( $1-2 \times 10^5/6$ -Loch) wurden lysiert (ca. 350 µl Lysispuffer/ 1 Mio. Zellen). Anschließend erfolgte die RNA-Isolation mit Hilfe des PeqLab Gold total RNA-Kit. Für die Northern Blot-Analyse wurden 2-3 µg RNA auf einem 1%-Agarose-Formaldehyd-Gel aufgetrennt (100V für ca. 5 h). Nachdem die Ethidiumbromid gefärbte 28S-rRNA fotografiert wurde, wurde die RNA über Nacht auf eine Hybond-N<sup>+</sup>Membran gebロットet. Beim Northern Blot-Transfer wurde das Agarosegel auf eine mit Whatmanpapier bedeckte Glasplatte gelegt, die zwei Glasreservoirs, die mit jeweils 1 l 10xSSC-Puffer gefüllt sind, verbindet. Das Whatmanpapier umspannte die komplette Glasplatte und reicht in die Pufferflüssigkeit hinein. Auf das Agarosegel wurde eine Hybond-N<sup>+</sup>Membran, ein Whatmanpapier, einige Lagen Zellstoffpapier und ein Gewicht von ca. 500-1000g plaziert. Die freie Fläche um die Membran wurde dabei mit durchsichtiger Saran-Folie bedeckt. Die RNA wurde aufgrund von Kapillarkräften über Nacht vom Gel auf die Membran gesogen.

Die RNA der getrockneten Membran wird mit Hilfe des UV Stratalinkers 1800 (Einstellung: Autocrosslink 120 mJ) an die Membran *gecrosslinked*. Nach einer einstündigen prä-Inkubation der Membran in 20 ml warmen Church-Puffer wurde die Membran in 10 ml Church-Puffer mit einer spezifischen und [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP-markierten DNA-Oligonukleotidsonde (siehe 2.2.5.1.) über Nacht bei 65°C im Hybridisierungsöfen inkubiert. Die verwendete Hybridisierungstemperatur hängt dabei von der Länge und dem GC-Gehalt der Sonden ab und erfolgte in diesem Fall bei 65°C, da die verwendeten DNA-Oligonukleotidsonde alle recht lang und GC-reich waren (Länge: 36 nt – 50 nt; GC-Gehalt: 60-80%). Zuvor wird die DNA-

Oligonukleotidsonde für 5 min bei 95°C denaturiert. Am nächsten Tag wird die Membran 10 min mit 2xSSC, 1% SDS und 10 min mit 0,1xSSC, 0,1% SDS bei 65°C gewaschen. Anschließend wurde die Membran in eine Entwicklerkassette gelegt und es konnte die Detektion der RNA mit Hilfe eines Autoradiographiefilms erfolgen. Die Filmexpositionszeit variierte je nach Stärke der markierte Oligonukleotidsonde zwischen 1 bis 7 Tage bei -80°C. Teilweise wurden Northern Blot-Membranen gestrippt um sie anschließend mit neuen Northern-Sonden zu markieren. Dazu wurde die entsprechende Northern Blot-Membran mit 0,5% SDS für eine Stunde bei 60°C inkubiert. Vor der Wiederverwendung wurde die Membran einmal 10 min mit 2xSSC/ 1% SDS und einmal 10 min mit 0,1xSSC/ 0,5% SDS jeweils bei 65°C gewaschen.

### 2.2.5.1. DNA-Oligonukleotid-Design und Markierung

Insgesamt wurden 37 DNA-Oligonukleotidsonden mit Hilfe der rDNA-Lokus-Sequenz und MacVector entworfen (siehe Tab. 2). Dabei wurde darauf geachtet, dass die Sonden die reverse und komplementäre Sequenz des rDNA-Lokus aufweisen um an die geblottete RNA binden zu können. Außerdem wurden nur Sonden entworfen, deren GC-Gehalt nicht über 80% betrug. Die Sonden wurden von Eurofins synthetisiert und in der Northern Blot-Analyse verwendet, um die verschiedenen rRNA-Formen sichtbar zu machen.

Die DNA-Oligonukleotide (1 pmol/ µl; 1 µl) werden mit T4-Polynukleotid-Kinase (10000 U/ µl; 1 µl), PNK Buffer A (1 µl), [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (3000 µCi/ mmol; 5 µl) und H<sub>2</sub>O (5 µl) für ca. 60 min bei 37°C inkubiert. Bei dieser Reaktion katalysiert die T4-Polynukleotid-Kinase den Transfer des radioaktiven  $\gamma$ -Phosphats des ATPs an das freie 5'-Hydroxylende der DNA-Oligonukleotidsonde. Der DNA-Oligonukleotidansatz (10 µl) wird mit 40 µl TE-Puffer versetzt und auf eine *MicroSpin*-Säule (mit geöffneter Kappe und abgebrochenen Durchlauf; die Säule wurde zuvor gevortext und für 1 min bei 3000 g zentrifugiert) pipettiert und für 3 min bei 3000 g zentrifugiert. Der im Eppendorfreaktionsgefäß aufgefangene Durchfluss enthält die [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP-markierte DNA-Oligonukleotidsonde, die von uneingebautem [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP befreit wurde.

**Tab 2. Northern-Sonden**, die gegen die rRNA vom Menschen (GI:555853) bzw. Maus (GI: 38176281; mm\* steht für *mus musculus*) gerichtet sind.

Name	rRNA- Position	Sequenz
1. ITS1	6382-6417	5'-AGCGCGACACCACCCACAGCGCCCGGGGTTCC-3'
2. ITS1	6550-6597	5'-TCCCGACGACGCACCGGGAGGAGGCCCTTCCTGGCGGGCAGTCCCC -3'
3. ITS1/5.8S	6613-6660	5'-ATCGACGCACGAGCCGAGTGATCCACCGCTAAGAGTCGTACGAGGTCG-3'
4. 5.8S/ITS2	6770-6817	5'-CGAGGAGCCCGGAGGCACCCCCGGGGCGATTGATCGGCAAGCGACGCT-3'
4b. ITS2	6866-6913	5'-GCGGCGCAAGAGGAGGGCGGACGCCCGGGTCTGCGCTTAGGGGGA-3'
5. ITS2	7000-7047	5'-CTCTCTTTCCCTCTCCGTCTTCCGGCGGCGGCCGCCCTCCCGTCT-3'
6. ITS2	7162-7197	5'-GCGCGACGACGACGACGACGGGCACGGGACCTTCCA-3'
7. ITS2	7400-7442	5'-TACGCGCGGGGAGGGCGAGGAGGACGGCGGGGCTCGGAGGA-3'
8. ITS2	7800-7847	5'-CCCGCGAGGGGAGAGGGCAGGGAGAGAGAGCGCGGGCCGACGGC-3'
9. 3'-ETS	13170-13209	5'-CTCCAAACCACGCTCCCGGACCCCGTCCCGCCCGGAG-3'
10. 5.8S	6653-6700	5'-CTGCAATTCACATTAATTCTCGAGCTAGCTGCGTTCTTCATCGACGC-3'
11. 3'-ETS	13101-13148	5'-ACGGGGAGGAGGCGGAACCGAAGAAGCGGGCGGCCGACCGGGGTC-3'
12. 3'-ETS mm*	13150-13197	5'-ACGGACGCGCCGAGGATGGGGATCCACCGTCGGTACCGGCCCGGGT -3'
13. 5'-ETS	1-50	5'-CGGAGGCCAACCTCTCCGACGACAGGTCGCCAGAGGACAGCGTGTACG-3'
14. 5'-ETS	1399-1446	5'-CGGTACCCCAAGGCACGCCTCTCAGATCGTAGAGAAGGCTTTTCTC-3'
15. 5'-ETS/18S	3630-3677	5'-ACTGGCAGGATCAACCAGGTAGGTAAGGTAGAGCGCGGCGAGCCCCCG-3'
16. 18S	4000-4047	5'-GGTAGGCACGGCGACTACCATCGAAAAGTTGATAGGGCAGACGTTTCGAA-3'
17. 18S	4253-4295	5'-GGAGCTGGAATTACCGCGGCTGCTGGCACCAGACTTGCCCTCC-3'
18. 18S	4800-4847	5'-GTTTCAGCTTTGCAACCATACTCCCCCGGAACCCAAAGACTTTGGTT-3'
19. 18S	5200-5247	5'-GGTTCACGGGTTACCCGCGCTGCCGGCGTAGGGTAGGCACACGTCG-3'
20. 18S/ITS1	5524-5547	5'-CGGCGCGGCGGCGGCCCGCCGCGGGCTCGCCCTCCGGGCTCCGTTAAT-3'
21. ITS1	5528-5559	5'-CGCCCGCGGGCCTCGCCCTCCGGGCTCCGT-3'
22. ITS1	5650-5697	5'-TTCTCGGCTCTCGGCGGCGGGGCGGGCGGCAACGAACGAGCGAG-3'
23. ITS1	5836-5879	5'-ACGCCCGCGAGAACC GCCCCGCGCCCGCCGACACCCACGTCGT-3'
24. ITS1	5952-5991	5'-GCGGAGGCGACGGGAATCCGGCCGCCCCGAAGACGGGGA-3'
25. ITS1	6150-6197	5'-ACCGCCCCGACCCACGGGCGGACGGGCGATCCCCCAAGGGGTCTTT-3'
26. ITS1	6450-6497	5'-ACAGCAAACGGGACCGGACTCCGGAGAGGGGTCGGAAGGTTTACACC-3'
27. ITS1	6502-6547	5'-TCCCGACGACGCACCGGGAGGAGGCCCTTCCTGGCGGGCAGTCCCC -3'
28. ITS1	6575-6622	5'-TACGAGGTCGATTTGGCGAGGGCGCTCCCGACGACGACCGGGAGGAG-3'
29. ITS2/28S	7925-7972	5'-TAAATTCAGCGGGTCGCCACGTCTGATCTGAGGTGCGCTTCGGAGGG-3'
30. 28S	7950-7997	5'-CTTTCTCCGCTGACTAATATGCTTAAATTCAGCGGGTCGCCACGTC-3'
31. 28S	8000-8047	5'-TGGGCTTTCCCTGTTCACTCGCCGTTACTGAGGGAATCCTGGTTAGT-3'
32. 28S	8409-8444	5'-GCGGAAAGATCCGCCGGGCGCCGACACGGCCGGA-3'
33. 28S	9000-9047	5'-GGGGGCGCGGGGAGGAGGGGTGGGAGAGCGGTGCGCCCGTGGGAGGGG-3'
34. 28S	9159-9195	5'-TCGCTCCGCCGTCCCCCTCTCGGGGGACGCGCGCGT-3'
35. 28S	9400-9447	5'-CTTTCGGGTCCTAACACGTGCGCTCGTCTCCACCTCCCCGGCGCGGC-3'
36. 28S	10800-10847	5'-GCTTCGCGCCCCAGCCGACCGACCCAGCCCTTAGAGCCAATCCTTAT-3'
37. 28S	11769-11816	5'-TTCCCCGCTGATTCGCCAAGCCCGTTCCCTTGCTGTGGTTTCGCT-3'

### 2.2.6. Immunfluoreszenz

Die Deckgläser wurden nach dem Einbringen in die 6-Loch-Platten zur Sterilisation im GS Genelinker (Programm Str: Sterilisation 90 s) mit UV bestrahlt. Danach wurden pro Deckglas  $2 \times 10^5$  Zellen ausplattiert und über Nacht bei 37°C und 8% CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Immunfluoreszenz-Protokoll lautet wie folgt:

1. Adhärente Zellen mit PBS waschen (in 6-Loch-Platten)
2. Fixierung in 2% PFA für 10 min
3. Dreimal waschen mit PBS
4. Permeabilisierung mit 0,5% Triton X-100 in PBS für 10 min
5. mit PBS waschen
6. Blocken mit PBS/ 10% FCS für 45 min
7. Inkubation in 90 µl Primärantikörper-Verdünnung in PBS/1,5% FCS über Nacht bei 4°C auf Folie in einer feuchten Kammer
8. Dreimal je 5 min mit 0,5% Triton X-100 in PBS waschen
9. Inkubation in 90 µl Sekundärantikörperverdünnung in PBS/ 1,5% FCS für 45 min bei Raumtemperatur im Dunkeln

Alle nachfolgenden Schritte wurden bei Schwachlicht durchgeführt, um das Ausbleichen der fluoreszenzmarkierten Proben zu vermeiden.

10. Dreimal je 5 min waschen mit 0,5% Triton X-100 in PBS
11. Inkubation in DAPI (1 mg/ml 1:10 000 in PBS) für 2 min
12. Waschen mit PBS
13. 1 Tropfen *Mounting Medium* auf die auf dem Deckglas fixierten Zellen geben, das Deckglas mit dem Objektträger verbinden und mit Nagellack versiegeln

#### 2.2.6.1. Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Die Betrachtung der fluoreszenzmarkierten Zellpräparate erfolgte mit Hilfe des Zeiss Axiovert 200M Immunfluoreszenz-Mikroskop (Objektiv 100x PH3). Zur Bildbearbeitung wurde die Openlab Software benutzt. Außerdem wurde zur Aufnahme der Präparate das Konvokalmikroskop Leica LSCM SP2 (Objektiv 63x Lambda blue APO 1.4) verwendet. Es wurde ein 405 nm Diodenlaser sowie ein Argon-Helium-Laser-Array zur Farbexcitation verwendet. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit der Software Leica-TCS 2.61. Zur

Markierung der verschiedenen Proteine in einer Zelle wurden je nach Spezies der Primärantikörper unterschiedliche Sekundärantikörper verwendet, die verschiedene Anregungs- und Emissionswellenlängen haben (Tab. 3). Zur Vermeidung der Überstrahlung wurden für die Laser die exakten Aufnahmebereiche definiert.

**Tab. 3: Anregungs- und Emissionsmaxima der Sekundärantikörper**

<b>Sekundärantikörper (Fluorochrom)</b>	<b>Anregungsmaximum</b>	<b>Emissions- Maximum</b>	<b>gemessener Emissionsbereich</b>
Alexa Fluor 488	488 nm	520 nm	520-546 nm
Cy3	543 nm	568 nm	560-610 nm
Cy5	633 nm	670 nm	649-705 nm
DAPI	405 nm	461 nm	420-470 nm

### 2.2.7. *In vitro* Transkription und Translation

Mit Hilfe des TNT *Quick coupled Transcription/Translation* System erfolgte die zellfreie Proteinexpression. Dabei wurden das Retikulozyten-Lysat, Aminosäuren, T7-RNA-Polymerase und ein spezifisches PCR-Produkt, welches für das zu transkribierende Gen kodiert, gemixt. Die Reaktion erfolgte für 60-90 min bei 30°C. Retikulozyten sind junge, noch kernhaltige Erythrozyten und entwickeln sich durch die Entfernung des Endoplasmatischen Retikulums innerhalb von 4 Tagen zu einem reifen Erythrozyten. Das verwendete Retikulozyten-Lysat wird standardmäßig mit Mikrokokken-Nuklease behandelt um zelleigene mRNAs zu entfernen und damit auch deren Translation zu unterdrücken. Die exprimierten Proteine können im Western-Blot und in der Immunpräzipitation analysiert werden.

Die PCR-Produkte wurden mit selbst entworfenen Oligonukleotiden (siehe 2.1.9.) mittels PCR-Reaktion hergestellt. Dabei wurden die Vektoren pUC18-PpanHA, pRTS-Hdm2Flag und pRTS-p53wt (siehe 2.1.8.) als Ausgangs-*Template* verwendet. Beim Entwurf der Primer wurde darauf geachtet, dass die PCR-Produkte später im 5'-Bereich einen T7-Promotor (für die Expression) und im 3'-Bereich einen Poly-A-Schwanz (zur mRNA-Stabilisierung) enthalten. Abbildung 9 erklärt als Beispiel die Zusammensetzung der *forward*- und *reverse*-Primer, die für die Amplifikation des PpanHA-PCR-Produkts verwendet wurden.

*Forward (fwd)- Primer*

Abstands- halter	T7-Promoter	Abstands- halter	Kozak mit Startcodon	PpanHA- Sequenzbeginn
5'-GGATCC	TAATACGACTCACTATAGGG	AACAG	<u>CCACCATGG</u>	<u>GGACAGTCAGG</u> -3'

*Reverse (rev)- Primer*

Poly(A) <sub>30</sub> Schwanz	Stop- codon	PpanHA- Sequenzende
5'-T <sub>30</sub>	<u>TTA</u>	<u>GGCATAATCTGGCACATCATAAGGG</u> -3'

**Abb. 9: Forward- und reverse-Primer zur Amplifikation des PpanHA-PCR-Produkts.** Die Primer binden jeweils nur an die unterstrichene Sequenz des pUC18-PpanHA-PCR-Template.

## 2.2.8. Western-Analyse

### 2.2.8.1. Lyse der Zellen

Adhärente, ca. 80% konfluente Zellen ( $4 \times 10^5$ ) wurden nach dem Waschen mit PBS in 100  $\mu$ l Lämmli-Puffer mit Hilfe eines Zellschabers lysiert. Die Proben wurden 1 min bei 95°C aufgeköcht und anschließend zur Aufbewahrung bei -20°C eingefroren.

### 2.2.8.2. SDS-PAGE und Transfer

Die Zelllysate wurden sonifiziert (*Duty Cycle*: 50%, *Output Control*: 5, *Timer*: 5 Klicks), 3 min bei 95°C aufgeköcht und 3 min bei 13000 g abzentrifugiert. 10-20  $\mu$ l Lysat wurden pro Geltasche geladen. Als Marker wurden 4  $\mu$ l PageRuler aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine im 10,5%-Polyacrylamidgel (PAA-SDS-Gel) erfolgte bei 30 mA pro Gel in 1-fach Western-Laufpuffer für ca. 2 h. Anschließend wurden die Proteine in einer Transferkammer bei 450 mA für 90 min auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die Membran wurde für 30-45 min in 5%iger Milchlösung bzw. 2%-Blocking-*Reagent*-Lösung (bei Verwendung des Ppan-Antikörpers) geblockt und in 5 ml 1xTBST mit 5% (w/v)-BSA bzw. 2%-Blocking-*Reagent*-Lösung mit dem entsprechenden Primärantikörper im 50 ml-Falcon-Reaktionsgefäß auf dem Roller bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal in 1xTBST (je 5 min) gewaschen und mit einem entsprechenden HRP- (*horseradish peroxidase*; Merretichperoxidase) markierten Sekundärantikörper in 5%-iger Milchlösung bei Raumtemperatur für ein bis zwei Stunden inkubiert. Nach dem erneuten Waschen (dreimal 5

min in 1xTBST) der Membran erfolgte die Proteindetektion mit Hilfe von ECL-(*enhanced chemiluminescence*)-Lösungen auf einem Chemilumineszenzfilm.

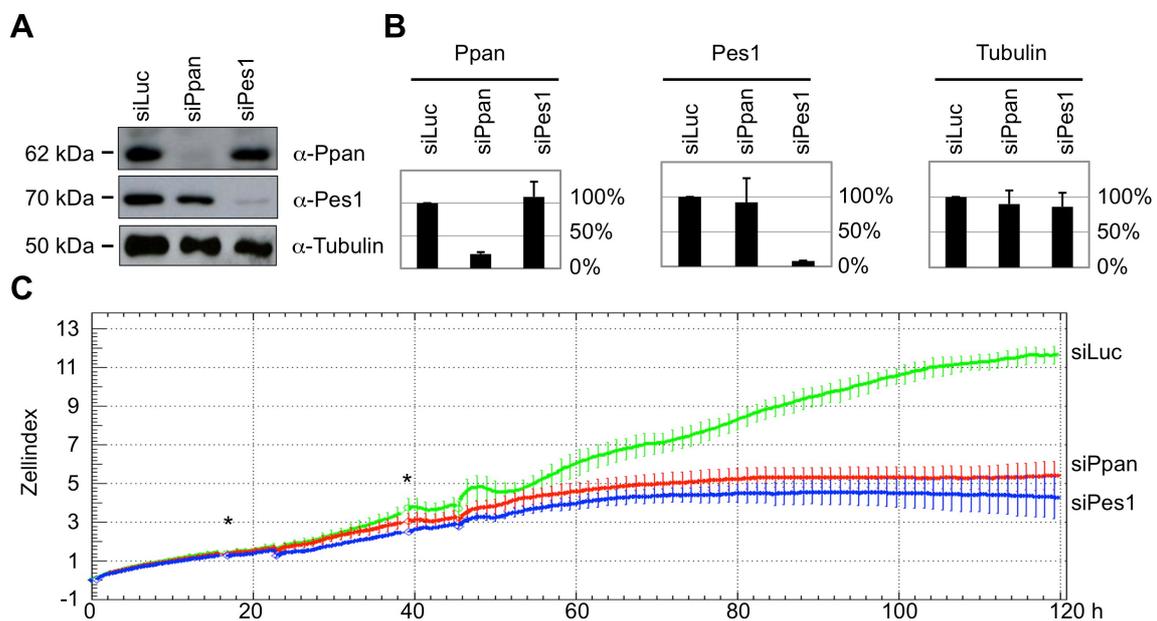
### 2.2.8.3. Immunpräzipitation (IP)

Die adhärenen Zellen von zwei 15cm-Zellkulturschalen wurden abtrypsiniert, ausgezählt, zweimal mit PBS gewaschen (im 50er bzw. 15er Falcon, jeweils mit 1200 g 4 min zentrifugiert) und anschließend in Lysispuffer (100 µl/ 3x10<sup>6</sup>-Zellen) resuspendiert. Es wurden 1,5 Mio. Zellen pro IP eingesetzt. Im Input wurde das Zellysate von 300 000 Zellen aufgetragen. Es erfolgte ein 20-30 minütiger Inkubationsschritt auf Eis, wobei die Probe sporadisch jeweils für ca. 5 s gevortext wurde. Die Lysate wurden 15 mal sonifiziert (*Duty Cycle* 50%, *Output* 4), 1 min auf Eis gestellt und nochmals 15 mal sonifiziert. Anschließend wurden die Lysate in einem Eppendorfreaktionsgefäß bei 16400 g (10 min, 4°C) zentrifugiert um das unlösliche Material zu präzipitieren. 50 µl Lysat wurden mit 50 µl 2xLämmli-Puffer gemischt und als *Input*-Kontrolle verwendet. Jeweils ca. 150-300 µl des Lysats wurde über Nacht im IP-Überkopfroller, mit Antikörper gekoppelten *Dynabeads* inkubiert. Für die Kopplung der Antikörper an die *Dynabeads* wurden jeweils 50 µl *Dynabeads* mit Lysispuffer gewaschen. Danach wurden die Proben in eine magnetische Halterung gesetzt, in der sich die *Dynabeads* am Rand der Eppendorfreaktionsgefäße sammeln. Jetzt kann der Überstand abgenommen werden und es erfolgt eine Inkubation (2-3 h, 4°C) der *Dynabeads* mit 500 µl Antikörper-Überstand (des Ppan- bzw. Pes1-Antikörpers, siehe 2.1.10.) bzw. mit 500 µl Lysispuffer, der mit 1-10 µl kommerziellen Antikörper (siehe 2.1.10.) versetzt wurde, im IP-Überkopfroller. Vor der Inkubation der *Dynabeads* mit den Lysaten wurden die *Dynabeads* noch zweimal mit Lysispuffer gewaschen. Nach der Inkubation der *Dynabeads* mit den Lysaten wurde der IP-Überstand abgenommen und die *Dynabeads* dreimal mit Lysispuffer gewaschen. Anschließend wurden die *Dynabeads* in 50 µl Lysispuffer und 50 µl zweifach Lämmli-Puffer aufgenommen, unter Schütteln aufgeköcht (5 min, 95°C) und zentrifugiert. Der Überstand wurde auf einem PAA-SDS-Gel aufgetragen. Alternativ können die Proben bei -20°C bis zu ihrer Verwendung gelagert werden.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Ppan ist für die Proliferation von U2OS-Zellen essentiell

Drosophila Larven einer rezessiven P-Element-Mutante von Ppan zeigen ein stark vermindertes Wachstum als Phänotyp (Migeon et al., 1999). Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*), die die Ppan Homologe Ssf1/Ssf2 deletiert haben, sind nicht lebensfähig (Fatica et al., 2002). Um zu testen, ob Ppan in menschlichen U2OS (Osteosarkom)-Zellen für die Proliferation notwendig ist, wurde ein *knockdown* von Ppan mit siRNA durchgeführt und die Proliferationsrate mit Zellen verglichen, die mit Kontroll-siRNA (siLuc) bzw. mit Pes1-siRNA (siPes1) behandelt wurden. Das Pes1-Protein wird für die 28S-rRNA-Synthese benötigt (Lapik et al., 2004; Hölzel et al., 2005). Der *knockdown* von Ppan und Pes1 wurde im Westernblot kontrolliert (Abb. 10A). 24 h nach der zweiten Transfektion war die Menge von Ppan auf ca. 25% und die von Pes1 auf ca. 5% reduziert (Abb. 10B). Die Signalstärke des Kontrollproteins alpha-Tubulin blieb hingegen weitgehend unbeeinflusst.



**Abb. 10. Ppan ist für die Proliferation von U2OS-Zellen essentiell.** U2OS-Zellen wurden am Tag 1 und 2 mit spezifischer Luziferase, Ppan und Pes1 siRNA transfiziert. (A) Die endogenen Ppan- bzw. Pes1-Level wurden einen Tag nach der zweiten Transfektion bestimmt. (B) Quantifizierung der Ppan-, Pes1- und alpha-Tubulin-Mengen von zwei unabhängigen Experimenten. (C) Für die Proliferationsmessung wurden jeweils 3000 U2OS-Zellen ausplattiert und deren Wachstum alle 15 Minuten im xCELLigence-Gerät gemessen. Die Kurven stellen Mittelwerte von mindestens 3 Versuchsdurchführungen dar. Die Sterne (\*) kennzeichnen den Zeitpunkt der 1. bzw. 2. Transfektion.

Der *Ppan-knockdown* reduziert die Zellproliferation von U2OS-Zellen deutlich (Abb. 10C). Die Zellen zeigen eine verlangsamte Proliferation bis ca. 30 h nach der zweiten Transfektion und gehen anschließend in eine stationäre Phase über. Der *knockdown* von *Pes1* verursacht eine vergleichbare Hemmung der Proliferationsrate.

### 3.2. Ppan ist für die Ribosomenbiogenese notwendig

Das Hefehomolog von *Ppan* (*Ssf1*) ist essentiell für die Synthese der großen ribosomalen Untereinheit (Fatica et al., 2002). Im Folgenden wird die Rolle von *Ppan* in der Ribosomenbiogenese untersucht.

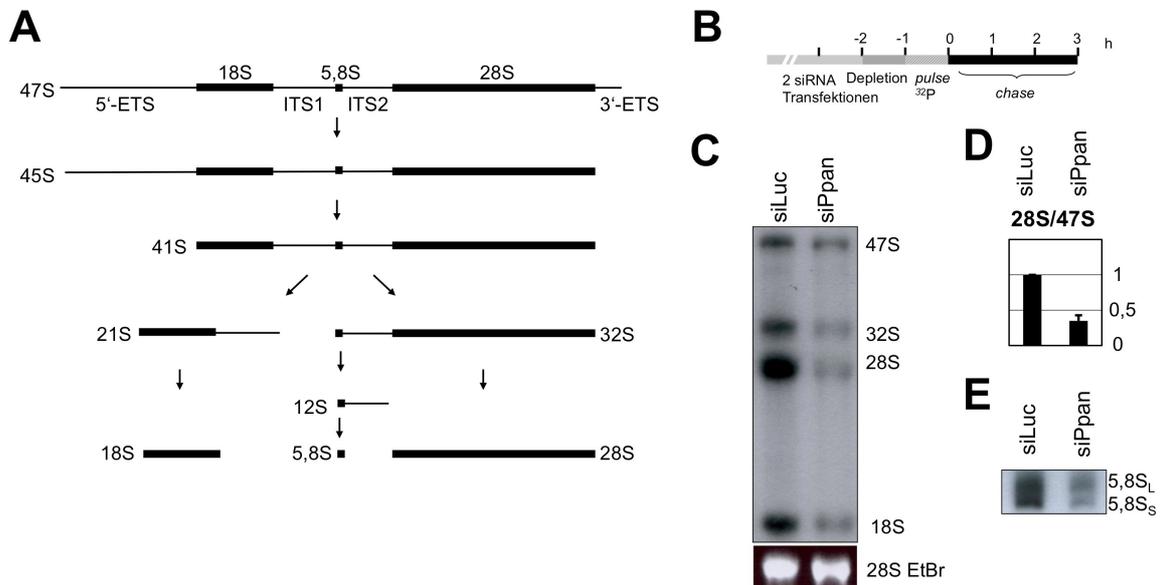
#### 3.2.1. Ppan wird für die 28S- und die 5,8S- rRNA-Reifung benötigt

Das 47S-rRNA Primärtranskript wird durch nukleolytische Schnitte in intermediäre rRNA-Formen und schließlich in die reifen 18S-, 5,8S- und 28S-rRNA-Produkte prozessiert (Abb. 11A). Mit Hilfe von metabolischen Markierungsexperimenten kann die Reifung ribosomaler rRNA sichtbar gemacht werden. Die mit *siLuc*, *siPpan* bzw. *siPes1* transfizierten U2OS-Zellen werden eine Stunde in phosphatfreiem Medium inkubiert, eine Stunde mit [<sup>32</sup>P]-Orthophosphat-haltigem Medium markiert und schließlich für drei Stunden in DMEM-Medium (*chase*) inkubiert (Abb. 11B). Das radioaktive Phosphat wird zunächst in ribosomale Vorläufer-rRNA eingebaut, welche anschließend in die reifen rRNA-Formen prozessiert werden.

Die Analyse der hoch molekularen RNA im Agarose-Formaldehyd-Gel zeigte, dass in den mit *siLuc* behandelten U2OS-Zellen die 47S-prä-rRNA schnell in 32S-prä-rRNA und anschließend in die reifen 28S- und 18S-rRNA prozessiert wurde (Abb. 11C). Der *knockdown* von *Ppan* reduzierte die Signalintensitäten der 32S- und 28S-rRNA stark. Im Gegensatz dazu war die Synthese der 47S-Vorläufer-rRNA nur leicht betroffen. Das Verhältnis der 28S- zur 47S-rRNA-Intensität zeigt, dass nach *Ppan-knockdown* vor allem die 28S-rRNA-Reifung reduziert ist (Abb. 11D).

Um die Auswirkungen der Depletion von *Ppan* auf die kleine 5,8S-rRNA zu studieren, wurde nach dem [<sup>32</sup>P]-Markierungsexperiment Gesamtzell-RNA auf ein Polyacrylamid-Harnstoff-Gel aufgetrennt. Nach der *Ppan*-Depletion zeigte sich eine im Vergleich zu der mit *siLuc* behandelten Probe verminderte Signalintensität der 5,8S<sub>L</sub>- sowie 5,8S<sub>S</sub>-rRNA-Form (Abb. 11E). Genauso wie in Hefe (siehe Abb. 4) wird auch die 12S-Vorläufer-rRNA

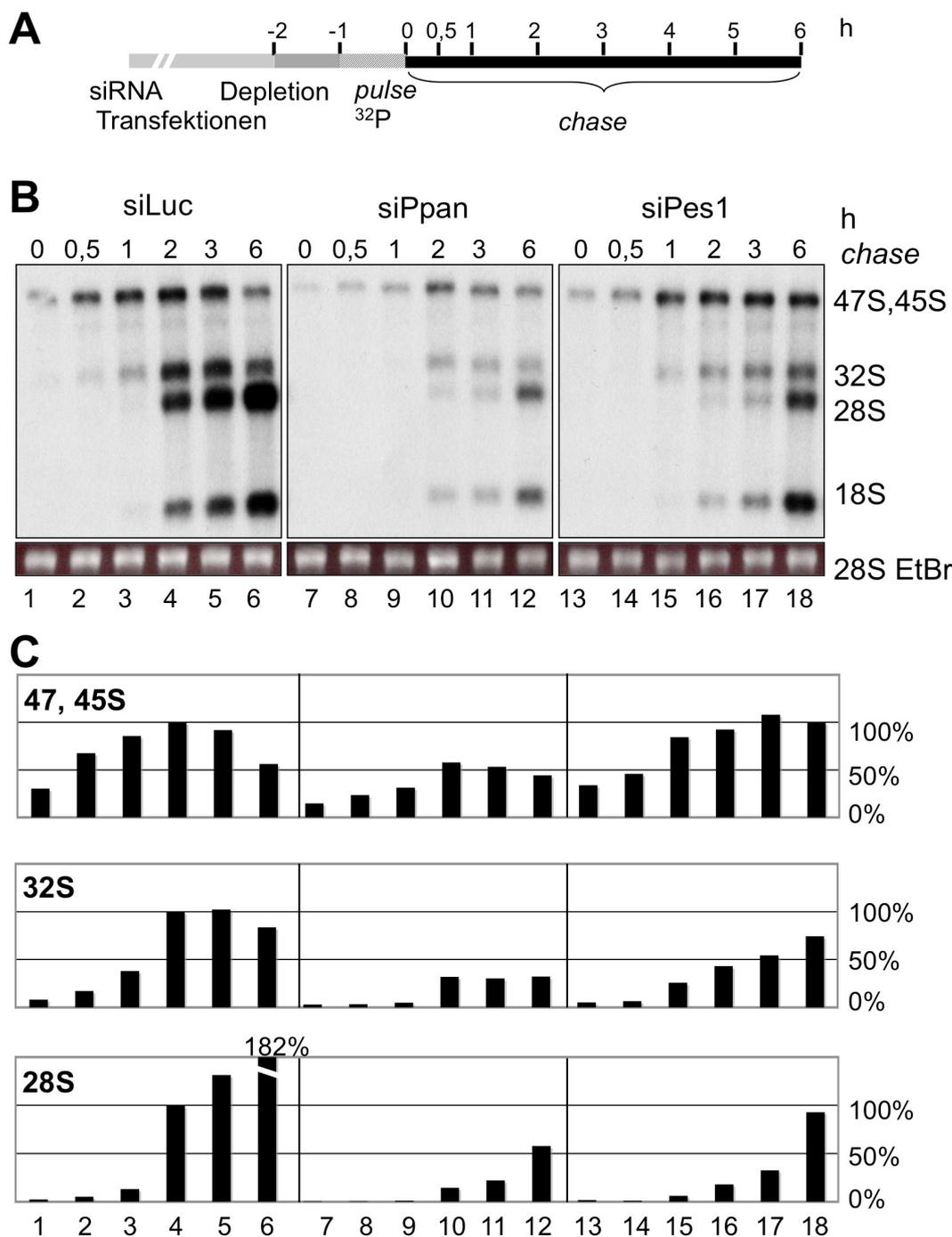
der Säuger (entspricht der 7S-prä-rRNA in Hefe) durch zwei alternative Prozessierungswege in die reife 5,8S<sub>L</sub>-(*long*, lange Form) bzw. 5,8S<sub>S</sub>-(*short*, kurze Form) rRNA überführt. Durch den *knockdown* von Ppan sind beide Prozessierungswege betroffen.



**Abb. 11. Ppan wird für die 28S- und 5,8S-rRNA-Reifung benötigt.** (A) Prä-rRNA-Prozessierungsschema in HeLa-Zellen (verändert nach Hadjiolova et al., 1993). (B) Schematische Darstellung des metabolischen Markierungsexperiments. U2OS-Zellen wurden einen Tag nach der zweiten Transfektion eine Stunde mit radioaktivem [<sup>32</sup>P]-Orthophosphat inkubiert (*pulse*). Anschließend wurden die Zellen für 3 h in normalem DMEM-Medium inkubiert (*chase*). (C) 1 µg totale RNA des Markierungsexperiments wurde auf einem 1%-igen Agarose-Formaldehyd-Gel aufgetragen. Die Autoradiographie zeigt die markierten rRNA-Formen. Als Ladekontrolle diente die Ethidiumbromid (EtBr)-gefärbte 28S-rRNA. (D) Quantifizierung der 28S/47S-Verhältnisse von zwei unabhängigen Experimenten. Die Luziferasekontrolle wurde auf 1 normiert. (E) 3 µg totale RNA des Markierungsexperiments wurde auf einem 12%-Polyacrylamid-Harnstoff-Gel aufgetragen. Die Autoradiographie zeigt die kleine 5,8S<sub>L</sub>- und 5,8S<sub>S</sub>-rRNA.

Um den Effekt des Ppan-*knockdowns* auf die rRNA-Prozessierung genauer zu charakterisieren, wurde zusätzlich eine Zeitkinetik des metabolischen Markierungsexperiments 48 h nach der siPpan-Doppeltransfektion durchgeführt. Die Markierung erfolgte erneut mit [<sup>32</sup>P]-Orthophosphat für 1 h. Die darauffolgenden *chase*-Zeiten von einer halben bis sechs Stunden stellen die Zeitkinetik dar (Abb. 12A). Die Bildung der ribosomalen RNA beginnt mit der Transkription der 47S-Vorläufer-RNA (Abb. 12B, Spur 1, 2). Nach einer Stunde *chase* hatte die Prozessierung der 7S-Vorläufer-rRNA in die 32S-rRNA bereits begonnen (Abb. 12B, Spur 3). Nach zwei Stunden stiegen die Signalintensitäten der 32S- und 28S-rRNA deutlich an (Abb. 12B, Spur 4). Die Prozessierung der 47S- in die 32S-rRNA und der 32S- in die reife 28S-rRNA findet statt.

Nach sechs Stunden war eine Abnahme der 47S- sowie des 32S-rRNA-Vorläufers zu erkennen (Abb. 12B, Spur 6). Der in die verschiedenen rRNA-Formen geflossene [ $^{32}$ P]-Orthophosphat-Pool erschöpft sich langsam.



**Abb. 12. Der knockdown von Ppan inhibiert die rRNA-Prozessierung.** (A) U2OS-Zellen wurden 48 h nach einer siRNA-Doppeltransfektion eine Stunde mit [ $^{32}$ P]-Orthophosphat markiert. Anschließend wurden die Zellen verschieden lang in normalem DMEM-Medium inkubiert. (B) Autoradiographie der in einem 1%-igen Agarose-Formaldehyd-Gel aufgetrennten rRNAs. Die Ethidiumbromid (EtBr)-gefärbte 28S-rRNA diente als Ladekontrolle. (C) Quantifizierung der relativen Signalintensitäten der rRNAs mittels Phosphorimager. Die Normierung auf 100% erfolgte jeweils auf den zwei Stunden chase-Wert der Luziferasekontrolle (Spur 4).

Der *knockdown* von Ppan führte zu einer Hemmung der 47S-rRNA-Bildung um ca. 50% (Abb. 12B, C, vergleiche Spur 4 und 10). Die Hemmung der reifen 28S-rRNA war jedoch deutlich stärker ausgeprägt. Nach Ppan-*knockdown* waren nur noch 15% der normalerweise gebildeten 28S-rRNA nachweisbar (Abb. 12B, C, vergleiche Spur 4 und 10). Dies veranschaulicht, dass die Depletion von Ppan vor allem die Prozessierung des 47S-rRNA in die reife 28S-rRNA hemmt. Zum Vergleich wurde auch für den rRNA-Prozessierungsfaktor Pes1 ein *knockdown* durchgeführt. Hier war die 47S-rRNA-Bildung nicht betroffen (Abb. 12B, vergleiche Spur 4 und 16). Die 28S-rRNA-Reifung war aber stark beeinträchtigt (Abb. 12B, C, Spur 16). So erreicht die Signalintensität der 28S-rRNA nach zwei Stunden *chase* nur 25% der siLuc-28S-rRNA Signalintensität. Die metabolischen Markierungsexperimente lassen sich folgendermaßen zusammenfassen. Die Depletion von Ppan hemmte besonders die Reifung der 28S- und 5,8S-rRNA, hatte aber auch einen messbaren negativen Effekt auf die Synthese des 47S-rRNA-Vorläufer.

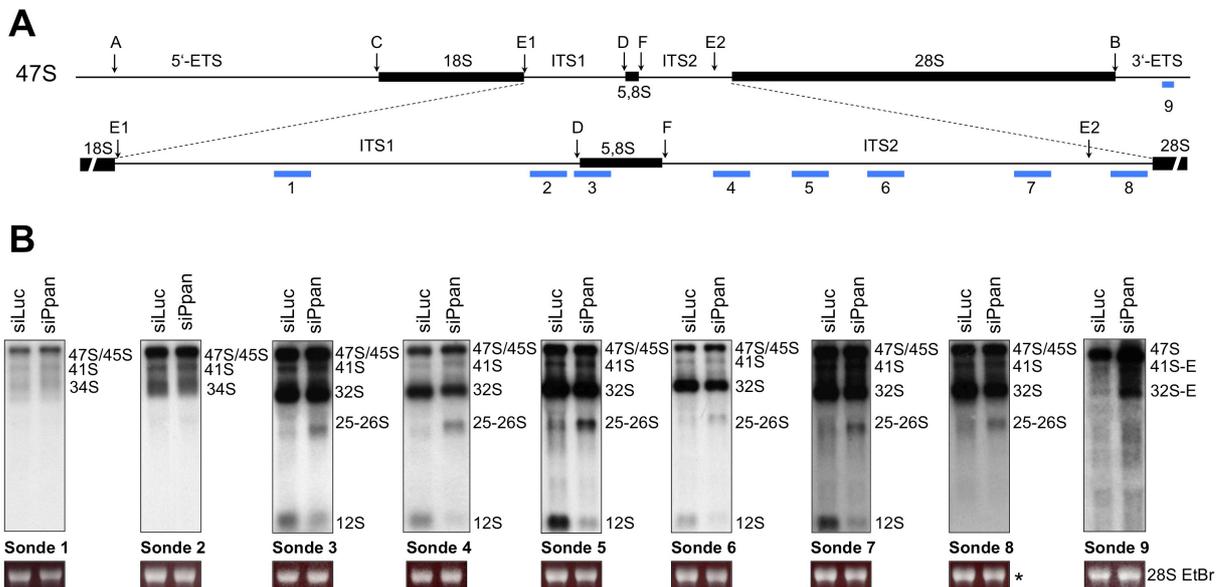
### **3.2.2. Ppan wird für die Prozessierung des *intergenic transcribed spacers 2 (ITS2)* benötigt**

Um den Einfluss des *knockdowns* von Ppan auf den *steady state* Level der ribosomalen RNAs zu untersuchen, wurden Northern Blot-Analysen durchgeführt. U2OS-Zellen wurden mit siLuc bzw. siPpan an Tag 1 und Tag 2 transfiziert. Die Gesamt-RNA wurde 24 h später isoliert. Die verschiedenen Prozessierungsintermediate wurden mit neun verschiedenen Northern Blot-Sonden untersucht (Abb. 13A). Es wurden zwei ITS1-, eine 5,8S-, fünf ITS2- und eine 3'-ETS-spezifische Sonde(n) verwendet.

Die 47S/45S-, 41S- und 34S-Vorläufer-rRNAs konnten durch spezifische ITS1-Sonden detektiert werden (Abb. 13B, Sonde 1 und 2) (Bowman et al., 1981). Die mit siPpan behandelten Zellen zeigten die identischen rRNA-Prozessierungsformen. Ein aberrantes Prozessierungsintermediat, welches ITS1-Sequenzen beinhaltet, konnte nicht detektiert werden. Zusätzlich wurden noch acht weitere spezifische ITS1-Sonden verwendet, die ebenfalls keine abweichende rRNA-Prozessierungsintermediate feststellen konnten (Appendix Abb. A1, Sonden 21-28).

Die Hybridisierung mit einer spezifischen 5,8S-rRNA-Sonde zeigte in den siLuc behandelten Kontrollzellen die 47S/45S-, 41S-, 32S- und 12S-prä-rRNAs (Abb. 13B, Sonde 3). In siPpan behandelten Zellen war das Signal der 12S-prä-rRNA deutlich reduziert. Interessanterweise führte der *knockdown* von Ppan gleichzeitig zur Akkumulation eines

neuen 25-26S-rRNA- Prozessierungsintermediats. Diese aberrante rRNA-Form konnte in den Kontrollzellen nicht oder nur in sehr geringen Mengen detektiert werden.



**Abb. 13. Der knockdown von Ppan führt zur Akkumulation einer aberranten 25-26S-rRNA, die 5,8S- und ITS2- Sequenzen beinhaltet.** (A) Schema der 47S-Vorläufer-rRNA. Die Vorläufer-rRNA enthält die Sequenzen der reifen 18S-, 5,8S- und 28S-rRNAs, die durch zwei interne transkribierte Sequenzen ITS1 und ITS2 (*internal transcribed spacer*) getrennt sind und durch zwei externe transkribierte Sequenzen 5'-ETS und 3'-ETS (*external transcribed spacer*) flankiert werden. Die Position der bei der Northern Blot-Hybridisierung verwendeten Oligonukleotidsonden (siehe Tab. 2) ist durch blaue Rechtecke markiert. Die großen Buchstaben zeigen Prozessierungsereignisse an. (B) Northern Blot-Analyse von Gesamt-RNA von U2OS-Zellen, die mit Luc- oder Ppan- siRNA transfiziert wurden. Gleiche Mengen RNA wurden mit spezifischen ITS1 (Sonde 1 und 2), 5,8S (Sonde 3), ITS2 (Sonde 4-8) und 3'-ETS (Sonde 9) Sonden hybridisiert. Ethidiumbromid (EtBr)-gefärbte 28S-rRNA diente als Ladekontrolle. (\*) Die Ladekontrolle von Sonde 7 war mit der von Sonde 8 identisch. Die Sonde 8 wurde mit der gestriipten Membran von Sonde 7 inkubiert.

Um mehr Information über die Sequenz und die Größe des 25-26S-rRNA-Prozessierungsintermediats zu bekommen, wurden fünf verschiedene ITS2-Sonden getestet (Abb. 13A, Sonden 4-8). Alle ITS2-Sonden konnten das 25-26S-rRNA-Prozessierungsintermediat in siPpan-behandelten Zellen nachweisen. Die vier ITS2 Sonden, die mit der 12S-rRNA hybridisieren, zeigten zusätzlich, dass die Ppan-Depletion die 12S-rRNA Reifung hemmt (Abb. 13B, Sonden 4-7). Die ITS2-Sonde 8 hybridisiert mit der rRNA-Sequenz, die sich 3' von der endonukleolytischen Schnittstelle E2 befindet (Abb. 13A, Sonde 8). Dieser rRNA Sequenzabschnitt ist nicht Teil der 12S-rRNA. Trotzdem detektierte diese Sonde die Akkumulation des 25-26S-rRNA-Intermediats (Abb. 13B, Sonde 8). Dies deutet darauf hin, dass der Ppan-knockdown die ITS2-rRNA-Prozessierung an der Schnittstelle E2 inhibiert.

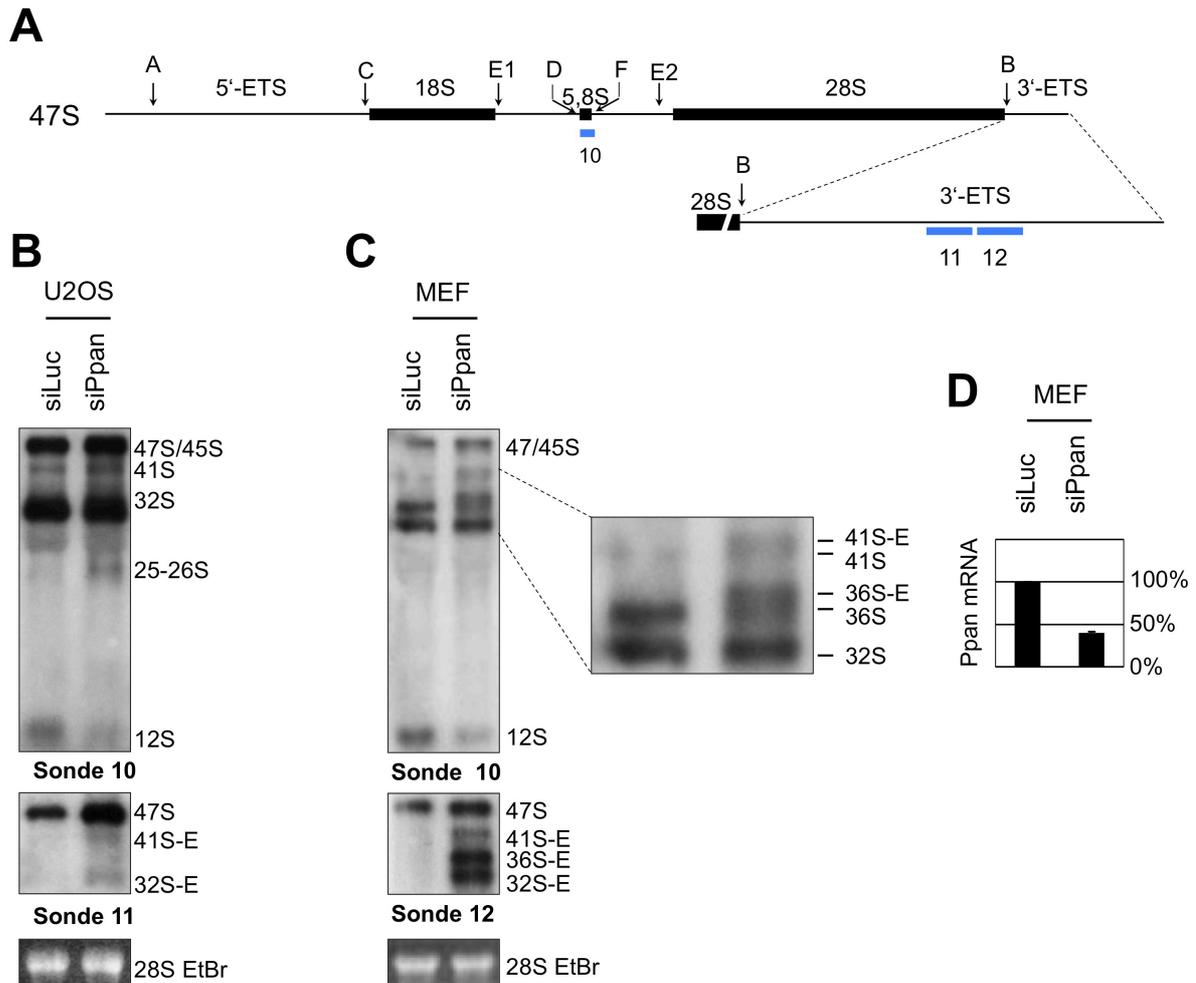
Die genauere Kartierung des 25-26S-rRNA-Intermediats erfolgte mit Hilfe von spezifischen 28S- und 3'-ETS-rRNA Sonden. 28S-rRNA spezifische Sonden zeigten keine Veränderung der Gesamt 28S-rRNA-Menge nach der Ppan-Depletion (Abb. A1 des Appendix, Sonde 30-37). Im Gegensatz dazu reduziert der *knockdown* von Ppan die Menge der neu synthetisierten Menge an 28S-rRNA stark (Abb. 11C). Die große Menge der in Zellen vorkommender 28S-rRNA ließ es nicht zu, dass mögliche 3'-Ende des 25-26S-Prozessierungsintermediats innerhalb der 28S-rRNA zu kartieren. Die Verwendung einer spezifischen 3'-ETS Sonde zeigt keine Akkumulation des 25-26S-rRNA Prozessierungsintermediats (Abb. 13B, Sonde 9). Interessanterweise zeigte sich jedoch eine Anreicherung der 47S-prä-rRNA, sowie der 3'-ETS-verlängerten 41S-rRNA (41S-E-rRNA) und 32S-rRNA (32S-E-rRNA) (siehe Kapitel 3.2.3.).

Zusammenfassend lässt sich das 25-26S-rRNA-Prozessierungsintermediat wie folgt beschreiben. Es enthält die 5,8S-rRNA, aber keine ITS1 Sequenzen. Dies lässt vermuten, dass das 5'-Ende der 25-26S-rRNA am 5'-Ende der 5,8S-rRNA liegt. Zusätzlich beinhaltet die 25-26S-rRNA die gesamte ITS2-Sequenz. Das genaue 3'-Ende der 25-26S-rRNA bleibt unklar. Eine mögliche Erklärung wäre eine neue Schnittstelle innerhalb der 28S-rRNA, welche ihr 3'-Ende definiert.

### **3.2.3. Ppan wird für die Prozessierung der 3'-ETS in U2OS- und MEF-Zellen benötigt**

Der bereits mit Sonde 9 beschriebene 3'-ETS-Prozessierungsdefekt wurde im Folgenden in U2OS- und MEF (*mouse embryonic fibroblasts*)- Zellen genauer untersucht. Zunächst wurde die rRNA-Prozessierung mit Hilfe der 5,8S-rRNA-spezifischen Sonde 10, die sowohl die 5,8S-rRNA des Menschen und der Maus binden kann, untersucht (Abb. 14A). Anschließend wurde mit Sonde 11 und 12 hybridisiert, um den 3'-ETS-Bereich der rRNA von U2OS- bzw. MEF-Zellen nachzuweisen (Abb. 14A).

Die spezifische 5,8S-rRNA Sonde detektierte in den siLuc-behandelten U2OS-Zellen die 47/45S-, 41S-, 32S-, 28S- und 12S-rRNAs (Abb. 14B, Sonde 10). Nach der Ppan-Depletion zeigte sich eine Reduktion der 12S-rRNA und eine Akkumulation der 25-26S-rRNA (Abb. 14B, Sonde 10, vergleiche mit Abb. 13B, Sonde 3-7). 3'-ETS verlängerte rRNA-Spezies konnten jedoch nicht detektiert werden (Abb. 14B, Sonde 10). Dies liegt wahrscheinlich an ihrer im Verhältnis zu den anderen rRNA-Intermediaten geringen Abundanz.



**Abb. 14. Ppan wird für die Prozessierung der 3'-ETS in U2OS- und MEF-Zellen benötigt.** (A) Schema der 47S-Vorläufer-rRNA. Die Position der bei der Northern Blot-Hybridisierung verwendeten Oligonukleotidsonden ist durch blaue Rechtecke markiert (siehe Tab. 2). Die großen Buchstaben zeigen rRNA-Prozessierungsstellen an. Northern Blot-Analyse der Gesamt-RNA von U2OS- (B) und MEF- Zellen (C) nach der Transfektion mit Luc-oder Ppan-siRNA. Gleiche Mengen RNA wurden mit einer spezifischen 5,8S- (Sonde 10) und einer 3'-ETS- (Sonde 11, 12) Sonde hybridisiert. Ethidiumbromid (EtBr)-gefärbte 28S-rRNA diente als Ladekontrolle. (D) Quantifizierung der Ppan-mRNA-Menge mittels *Real-Time PCR*. Dargestellt ist der Mittelwert von zwei unabhängigen Experimenten.

Die spezifische 3'-ETS-Sonde hybridisierte in der siLuc behandelten Probe erwartungsgemäß nur mit der 47S-rRNA (Abb. 14B, Sonde 11), da die 3'-ETS-Sequenz sehr früh durch einen endonukleolytischen Schnitt (Abb. 14A, Schnitt B) aus der 47S-rRNA entfernt wird. In U2OS-Zellen konnte nach Ppan-Depletion eine beträchtliche Akkumulation der 47S-rRNA festgestellt werden (Abb. 14B, Sonde 11). Außerdem konnten Prozessierungsintermediate nachgewiesen werden, in denen die 3'-ETS noch enthalten war, 41S-E und 32S-E (Abb. 14B, Sonde 11). Die Ergebnisse zeigen, dass nach dem *knockdown*

von Ppan der endonukleolytische Schnitt für die 3'-ETS-Abspaltung inhibiert oder stark verzögert wird.

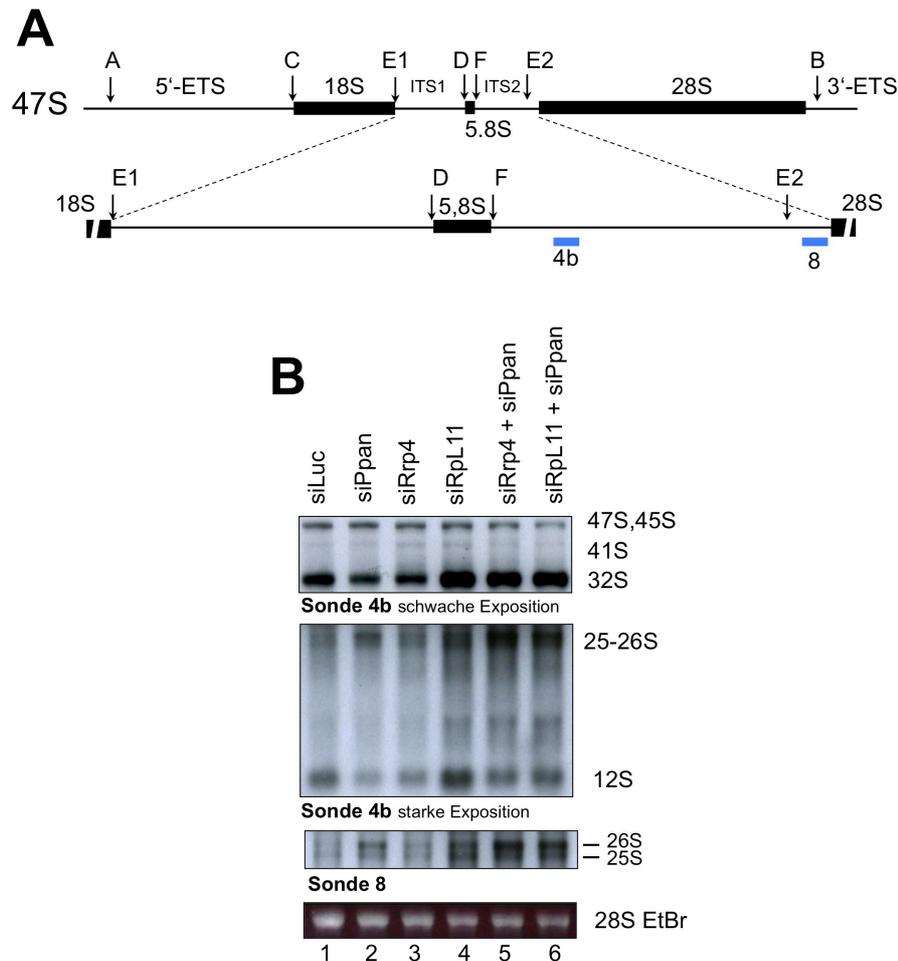
Die siLuc-behandelten MEF-Zellen beinhalten ebenfalls die 47S/45S-, 41S-, 32S-, 28S- und 12S-rRNA-Formen (Abb. 14C, Sonde 10). Die spezifische 5,8S-Sonde hybridisiert jedoch zusätzlich mit der in MEF-Zellen vorkommenden 36S-rRNA-Spezies (siehe Lapik et al., 2004). Die Transfektion mit siRNA, die gegen den *open reading frame* von muriner Ppan-mRNA gerichtet ist, führte zu einer reduzierten 12S-rRNA-Menge (Abb. 14C, Sonde 10). Dieser rRNA-Prozessierungsdefekt wurde auch in U2OS-Zellen festgestellt (vergleiche Abb. 14B, C, Sonde 10). In MEF-Zellen lies sich jedoch keine signifikante Akkumulation der 25-26S-rRNA-Spezies nachweisen (Abb. 14C, Sonde 10). Die spezifische 3'-ETS-Sonde zeigte eine Akkumulation der aberranten rRNA-Formen, 41S-E, 36S-E und 32S-E (Abb. 14C, Sonde 12). Diese rRNAs enthalten noch die 3'-ETS Sequenz, während ihr 5'-Bereich bereits prozessiert ist. Da für murines Ppan kein Antikörper zur Verfügung stand, wurde in MEF-Zellen der Ppan-*knockdown* anhand von quantitativer *Real-Time* PCR mit spezifischen Ppan Primern überprüft. In Ppan-depletierten Zellen wurde 60% weniger Ppan mRNA nachgewiesen, als in siLuc-behandelten Zellen (Abb. 14D). Somit inhibiert der Ppan-*knockdown* auch in MEF-Zellen die korrekte 3'-ETS-Prozessierung.

#### 3.2.4. rRNA-Prozessierungsdefekt nach *knockdown* von Rrp4 und RpL11

Um den Prozessierungsdefekt nach der Ppan-Depletion weiter zu charakterisieren, wurde die Fragestellung entwickelt, ob dieser durch den *knockdown* von Faktoren des Exosoms verstärkt werden kann. Das Exosom ist zum einen an der rRNA-Prozessierung beteiligt, wird aber auch benötigt um aberrante rRNAs abzubauen (Schilders et al., 2007, van Dijk et al., 2007). Es konnte gezeigt werden, dass der *knockdown* der Rrp4-Komponente des Exosoms auch zu einer Depletion der anderen Untereinheiten des Exosoms führt. In der Hefe besitzt die Rrp4-Komponente des Exosoms eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität und ist für die Entstehung des 3'-Endes der 5,8S-rRNA verantwortlich.

Für die Northern Blot-Analyse wurden zwei verschiedene ITS2-Sonden verwendet, um den Effekt von siPpan und siRrp4, bzw. die Kombination von beiden auf die rRNA-Prozessierung zu untersuchen (Abb. 15A). Die Sonden erlaubten die Detektion der 47S/45S-, 41S-, 32S- und 12S-rRNA in siLuc-behandelten U2OS-Zellen (Abb. 15A, Spur 1). Ppan-depletierte Zellen zeigten eine Akkumulation der 25-26S-rRNA, sowie eine Abnahme der 12S-rRNA (Abb. 15B, Spur 2). Auch die Rrp4-depletierten Zellen zeigten

eine verringerte 12S-rRNA-Menge und eine leichte Akkumulation der 25-26S-rRNA (Abb. 15B, Spur 3). Die Doppeltransfektion der Zellen mit siPpan und siRrp4 führte zu einer im Vergleich zu den Einzeltransfektionen verstärkten Akkumulation der aberranten 25-26S-rRNA (Abb. 15B, vergleiche Spur 2, 3 und 5). Diese Akkumulation könnte dadurch hervorgerufen werden, dass die aberrante 25-26S-rRNA durch das Exosom nur noch bedingt abgebaut werden kann.



**Abb. 15. Der *knockdown* von Rrp4 verstärkt die durch den *knockdown* von Ppan verursachte Akkumulation der 25-26S-rRNA.** (A) Schema der 47S-Vorläufer-rRNA. Die Position der bei der Northern Blot Hybridisierung verwendeten Oligonukleotidsonden (siehe Tab. 2) ist durch blaue Rechtecke markiert. (B) Northern Blot-Analyse der Gesamt-RNA von U2OS-Zellen, die mit den angegebenen siRNAs transfiziert wurden. Gleiche Mengen RNA wurden mit zwei spezifischen ITS2- Sonden (Sonde 4b, 8) markiert. Ethidiumbromid (EtBr)- gefärbte 28S-rRNA diente als Ladekontrolle.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob auch durch den *knockdown* von Rpl11 ein rRNA-Prozessierungsdefekt ausgelöst werden kann und ob dieser dem von Ppan-depletierten Zellen ähnelt. Das Protein Rpl11 der großen ribosomalen Untereinheit ist für

die Ribosomenbiogenese essentiell (Zhang et al., 2007). Der *knockdown* von RpL11 führte zu einer Inhibierung der rRNA-Prozessierung. Die 41S-, 32S- und 12S-Vorläufer-rRNAs, sowie die aberrante 25-26S-rRNA akkumulierten (Abb. 15B, Spur 4). Auch die gleichzeitige Depletion von Ppan und RpL11 inhibierte die rRNA-Prozessierung stark (Abb. 15B, Spur 6). Allerdings akkumulierte die 25-26S-rRNA Spezies nur marginal stärker, als durch die Depletion von RpL11 allein (vergleiche Abb. 15B Spur 2,4 und 6). Die Effekte des Ppan-, sowie des RpL11-*knockdowns* auf die 12S-rRNA-Bildung, nämlich die 12S-rRNA-Verminderung und die 12S-rRNA-Akkumulation, hoben sich bei der siRNA-Doppeltransfektion gegenseitig auf (vergleiche Abb. 15B Spur 2, 4 und 6). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die durch den Ppan-*knockdown* induzierte Akkumulation der aberranten 25-26S-rRNA auch durch den *knockdown* der Exosom-Komponente Rrp4 und dem ribosomalen RpL11-Protein verursacht werden kann. Auf den möglichen Zusammenhang von Ppan mit dem Exosom bzw. RpL11 wird in der Diskussion genauer eingegangen (siehe 4.3. und 4.4.3.).

### **3.2.5. Das Erscheinen der aberranten 25-26S rRNA nach Ppan-*knockdown* ist p53-abhängig**

Sowohl die Ppan-Depletion (Appendix Abb. A5), als auch die Überexpression von Ppan (Malamoussi, 2008) induzieren den Tumorsuppressor p53. Es stellte sich daher die Frage, ob humane Krebszellen ohne p53 einen abweichenden rRNA-Prozessierungsdefekt nach einer Ppan-Depletion zeigen. Hierzu wurden zwei p53-defiziente Zelllinien, H1299 (kleinzellige Lungenkarzinom-Zelllinie) sowie Saos-2 (Osteosarkom-Zelllinie), mit siLuc oder siPpan transfiziert. Die Ppan-Menge konnte in beiden Zelllinien merklich reduziert werden (Abb. 16A). Das als Kontrolle verwendete Pes1-Protein blieb hingegen unbeeinflusst. Gleichzeitig wurde von Zellen die Gesamt-RNA isoliert und mittels Northern Blot-Hybridisierung mit einer spezifischen 5,8S-rRNA- und ITS2- Sonde untersucht. Sowohl in H1299-, als auch in Saos-2-Zellen konnte keine 25-26S-rRNA-Akkumulation nach Ppan-*knockdown* festgestellt werden (Abb. 16B). Die Hemmung der 12S-rRNA-Reifung, die sich bereits in U2OS- und MEF-Zellen beobachtet lies, konnte in H1299- und Saos-2-Zellen jedoch bestätigt werden (vergleiche Abb. 14B, C und 15B).



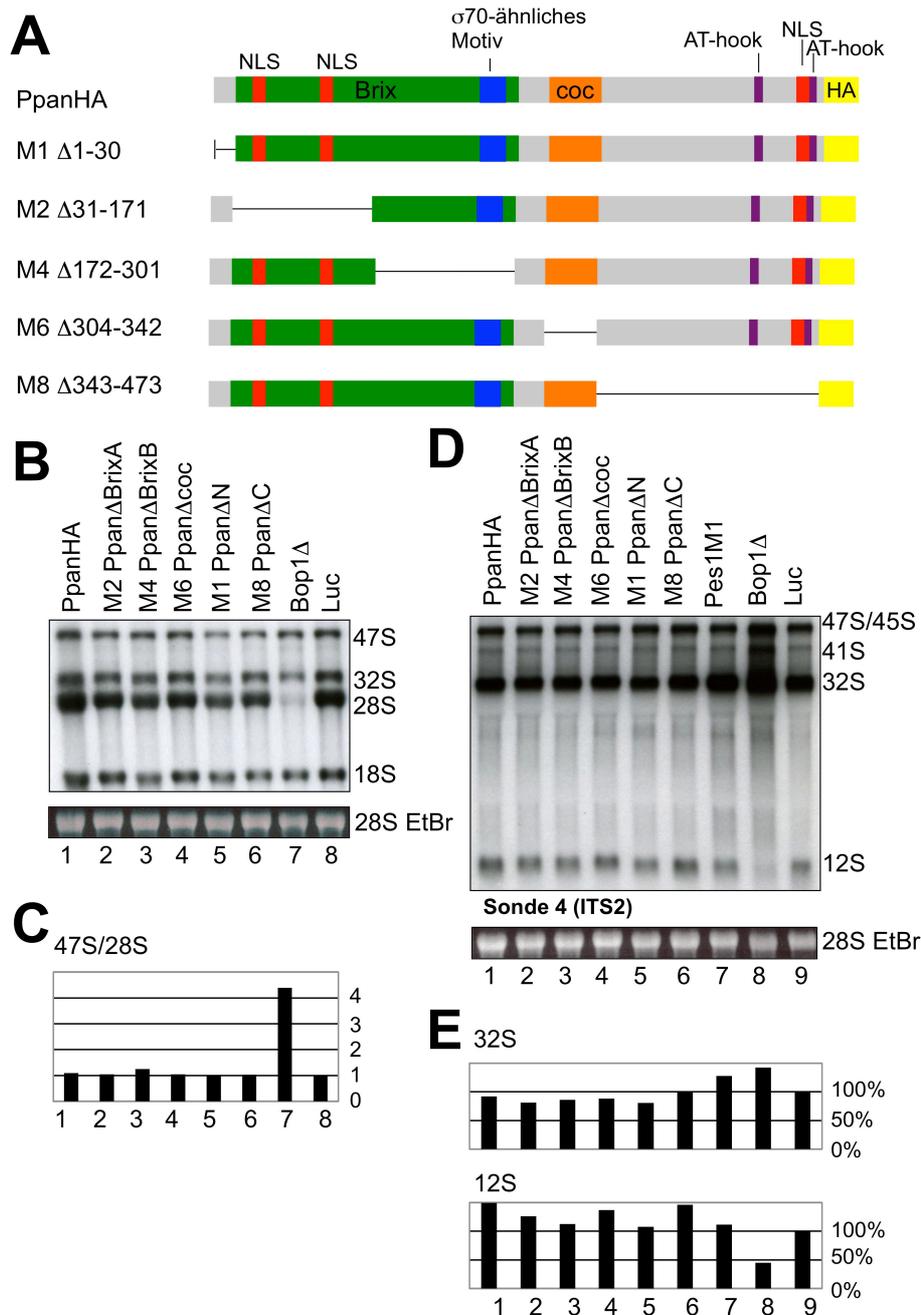
an die 5,8S-rRNA scheint somit nicht die Ursache für das Auftreten des 25-26S-rRNA-Prozessierungsintermediats zu sein.

### **3.2.6. Die Überexpression von Ppan und Ppan-Deletionsmutanten beeinflusst nicht die Ribosomenbiogenese**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Ppan für die Ribosomenbiogenese essentiell ist, stellte sich die Frage, ob die Überexpression von Ppan die Ribosomenbiogenese stören kann. Des Weiteren sollte der Einfluss der Überexpression verschiedener Ppan-Deletionsmutanten auf die rRNA-Prozessierung untersucht werden.

Die Überexpression von Ppan und von Ppan-Deletionsmutanten (M2, M4, M6, M8 und M1) führte nicht zu einer Hemmung der rRNA-Prozessierung (Abb. 17B, C, Spur 1-6). Die Prozessierung der 47S-rRNA-Vorläufer, wie auch von intermediären rRNAs war nicht betroffen. Als Positivkontrolle diente eine dominant-negative Bop1-Mutante (Bop1 $\Delta$ ), deren Expression die 28S-rRNA-Reifung hemmt (Strezoska et al., 2002). Tatsächlich inhibierte die Mutante Bop1 $\Delta$  auch in meinen Händen die Bildung der 28S-rRNA stark (Abb. 17B, C, Spur 7).

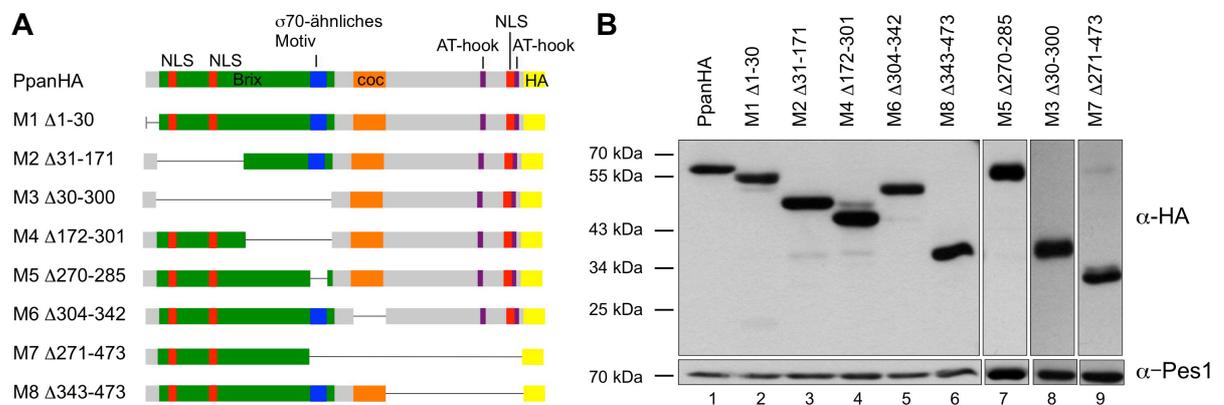
Die Northern Blot-Analyse detektiert mit der spezifischen ITS2-Sonde 4 die 47S/45S-, 41S-, 32S- und 12S-rRNA in den Kontrollzellen (Abb. 17D, Spur 9). PpanHA- und Ppan-Deletionsmutanten exprimierende Zellen zeigten die selben rRNA-Formen in vergleichbaren Mengen (Abb. 17D, E, Spur 1-6). In Bop1 $\Delta$  exprimierenden Zellen wurde die Synthese der 12S-rRNA dagegen gehemmt (Abb. 17D, E, Spur 8). Zudem akkumulierte in diesen Zellen auch die 32S-rRNA. Als weitere Positivkontrolle wurde die Pes1-Mutante M1 (Grimm et al., 2006) exprimiert, die ebenfalls zu einer Akkumulation der 32S-rRNA führte (Abb. 17D, E, Spur 7).



**Abb. 17. Die Überexpression von Ppan und Ppan-Deletionsmutanten hat keinen Einfluss auf die rRNA-Prozessierung.** (A) Schema von PpanHA und Ppan-Deletionsmutanten. NLS: nukleäre Lokalisierungsdomäne; Brix: *Biogenesis of ribosomes in Xenopus*; coc: *coil-coil*-Domäne. (B) Metabolisches Markierungsexperiment von PpanHA- und Ppan-Deletionsmutanten exprimierenden U2OS-Zellen. Die Expression der rekombinanten Proteine wurde für 24 h induziert und anhand der GFP-Expression unter dem Mikroskop kontrolliert (ca. 95% GFP-positive Zellen; Daten nicht gezeigt). Als Negativkontrolle wurden Luziferase- und als Positivkontrolle Bop1 $\Delta$  exprimierende Zellen verwendet. Ethidiumbromid (EtBr)-gefärbte 28S-rRNA diente als Ladekontrolle. (C) Die Phosphorimager Quantifizierung des 47S/28S-rRNA-Verhältnis wurde gegen die Luziferasekontrolle (Spur 8) normalisiert. (D) Northern Blot-Analyse der Gesamt-RNA von PpanHA und Ppan-Deletionsmutanten exprimierenden U2OS-Zellen. Die Expression der rekombinanten Proteine wurde für 48 h induziert. Als Negativkontrolle wurden Luziferase (Luc)- und als Positivkontrolle Bop1 $\Delta$ - sowie Pes1M1 exprimierende Zellen verwendet. Ethidiumbromid (EtBr)-gefärbte 28S-rRNA diente als Ladekontrolle. (E) Die 32S- und 12S-rRNA Mengen wurden mit dem Phosphorimager quantifiziert. Das Signal der Luziferasekontrolle (Spur 9) wurde auf 100% gesetzt.

### 3.3. Die Expression und Lokalisation von Ppan-Deletionsmutanten

Zur Zeit ist nicht bekannt, welche Domänen von Ppan für die Lokalisation im Nukleolus notwendig sind. Um diese Frage näher zu untersuchen wurden acht Deletionsmutanten von Ppan hergestellt (Abb. 18A). Die Expression der Mutanten erfolgte in stabil transfizierten U2OS-Zellen und wurde im Westernblot mit einem  $\alpha$ -HA-Antikörper überprüft (Abb. 18B). Alle Mutanten wurden ähnlich stark exprimiert und zeigten das zu erwartende Molekulargewicht. Als Ladekontrolle wurde das nukleoläre Pes1-Protein verwendet.

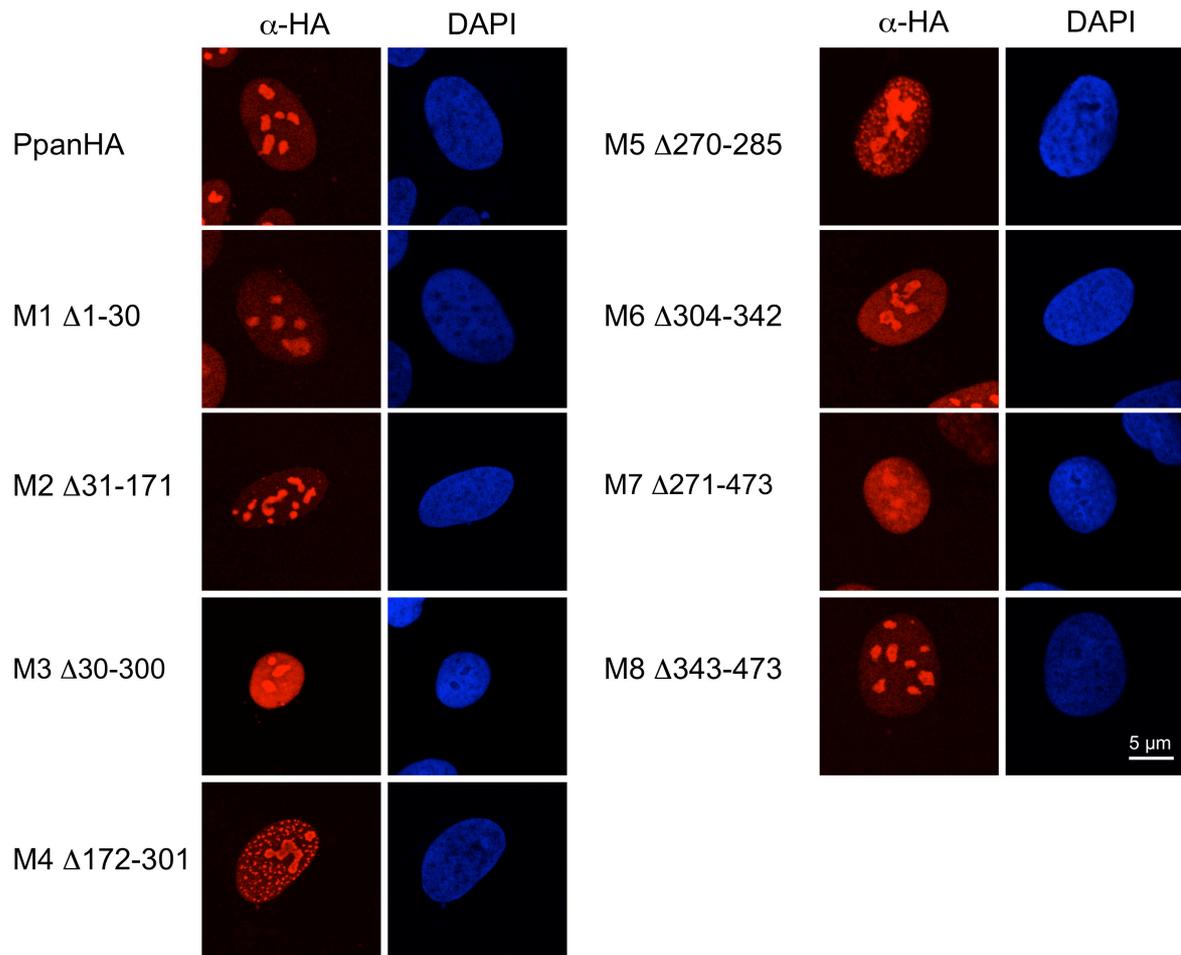


**Abb. 18. Expression von Ppan und Ppan-Deletionsmutanten.** (A) Schematische Darstellung der Ppan-Deletionsmutanten. NLS: Nukleäre Lokalisierungsdomäne; Brix: *Biogenesis of ribosomes in Xenopus*; coc: *coil-coil*-Domäne. (B) Die Expression der Deletionsmutanten wurde für 48 h in U2OS-Zellen induziert. Die PpanHA und Ppan-Deletionsmutanten-Level wurden mit dem  $\alpha$ -HA-Antikörper überprüft. Pes1 diente als Ladekontrolle.

Die untersuchten Deletionen beeinflussten die zelluläre Lokalisation von Ppan auf sehr unterschiedliche Art und Weise. Die Mutanten M1 und M2 mit N-terminalen Deletionen von Ppan, wie auch die Deletion des C-Terminus (M8) zeigten eine unveränderte Lokalisation im Nukleolus (Abb. 19). Deletionen im zentralen Teil von Ppan verursachten zwei unterschiedliche Phänotypen. Die Mutanten M4 und M5 zeigten zusätzlich zur nukleolären Färbung eine gespottete Färbung im Nukleoplasma. Dieses Färbemuster unterscheidet sich eindeutig vom Färbemuster der Mutanten M3, M6 und M7, die eine starke, aber recht gleichmäßige Färbung des Nukleoplasma zeigten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Deletion des N-Terminus (M1), einschließlich des N-terminalen Teils der Brix-Domäne (M2), sowie der C-Terminus (M8) keine Rolle für die nukleoläre Lokalisation von Ppan spielen. Im Gegensatz dazu ist der C-terminale Teil der Brix-Domäne (M4) und insbesondere das darin enthaltende  $\sigma$ 70-ähnliche

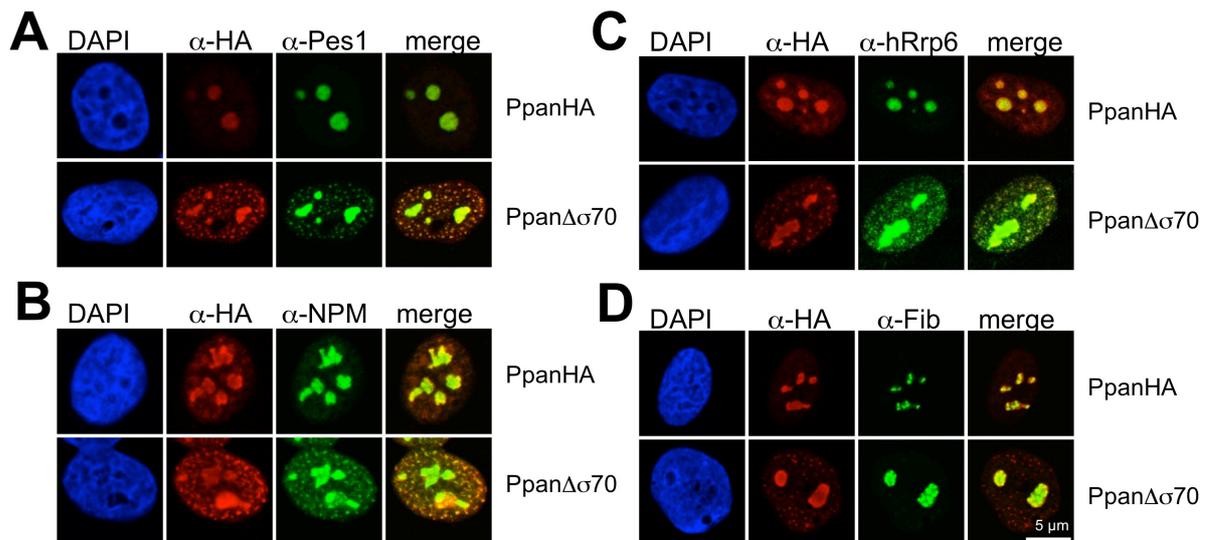
Motiv (M5) für die nukleoläre Lokalisation von Ppan wichtig. Die Mutante M5 wurde aufgrund ihres Phänotyps genauer untersucht (siehe Kapitel 3.4). Auch die *coil-coil*-Domäne, die in Mutante M6 deletiert ist, scheint für die nukleoläre Lokalisation von Ppan von Bedeutung zu sein.



**Abb. 19. Zelluläre Lokalisation von Ppan und Deletionsmutanten.** U2OS-Zellen wurden stabil mit Plasmiden für PpanHA und Ppan-Deletionsmutanten transfiziert und für 48 h induziert. Die Zellen wurden mit 2%-Paraformaldehyd fixiert (10 min). Ppan wurde mit dem  $\alpha$ -HA-Antikörper nachgewiesen.

### 3.3.1. Die Überexpression von Ppan $\Delta\sigma$ 70 führt zur Fehllokalisierung der nukleolären Proteine Pes1, NPM und hRrp6 in nukleäre Spots

Die Analyse der Ppan-Deletionsmutanten zeigte die Wichtigkeit des  $\sigma$ 70-ähnlichen Motivs für die nukleoläre Lokalisation von Ppan. Während Ppan vor allem in den Nukleoli lokalisiert, zeigte Ppan $\Delta\sigma$ 70 (M5  $\Delta$ 270-285) Ansammlungen in nukleoplasmatische (nukleäre) Spots. Das  $\sigma$ 70-ähnliche Motiv ist Teil der Brix-Domäne und wurde als RNA-Bindungsmotiv beschrieben (Wehner und Baserga, 2002). Unbekannt ist, ob Ppan durch das  $\sigma$ 70-ähnliche Motiv im Nukleolus verankert wird und so andere Proteine im Nukleolus festhält. Daher wurde untersucht, ob in den nukleären Spots neben Ppan $\Delta\sigma$ 70 noch andere nukleoläre Proteine fehllokalisieren. Im einzelnen wurden die nukleolären Proteine Pes1, NPM und hRrp6 untersucht. Das nukleoläre Protein Pes1 wird für die 28S-rRNA-Reifung benötigt (Hölzel et al., 2005; Grimm et al., 2006). Nach Expression von PpanHA lokalisierte Pes1 unverändert im Nukleolus (Abb. 20A). Die Expression von Ppan $\Delta\sigma$ 70 führte jedoch zu einer Fehllokalisierung von Pes1 in nukleäre Spots (Abb. 20A). Nukleophosmin, ein sehr abundantes Protein der granulären Komponenten der Nukleoli ist ein für die rRNA-Prozessierung benötigter Faktor (Itahana et al., 2003). NPM lokalisierte in PpanHA exprimierenden Zellen nukleolär (Abb. 20B). Auch NPM assoziierte nach der Expression von Ppan $\Delta\sigma$ 70 in nukleäre Spots (Abb. 20B). In Hefe und im Menschen existieren nukleäre sowie zytoplasmatische Exosomenkomplexe, die sich durch das Vorhandensein der Rrp6 Untereinheit im nukleären Komplex unterscheiden (Allmang et al., 1999). HRrp6 (PM-Scl-100) lokalisierte in Ppan exprimierenden Zellen ausschließlich nukleolär (Abb. 20C). Die Expression der Ppan $\Delta\sigma$ 70-Mutante veränderte die Lokalisation von hRrp6 in nukleäre Spots (Abb. 20C). Schließlich wurde noch eine Komponente vom DFC (*dense fibrillar component*) des Nukleolus untersucht, der frühe rRNA-Prozessierungsfaktor Fibrillarin (Fib). Fibrillarin ist eine Methylase der C/D-snoRNP (*small nucleolar ribonucleoprotein*)-Klasse, welche die Methylierung von prä-rRNA vermittelt (Tollervey et al., 1991; Jansen et al., 1991). In Ppan exprimierenden Zellen zeigte Fibrillarin eine nukleoläre Färbung (Abb. 20D). Nach der Expression der Ppan $\Delta\sigma$ 70-Mutante verblieb Fibrillarin im Nukleolus und lokalisierte nicht in nukleäre Spots (Abb. 20D).



**Abb. 20.** Die Ppan $\Delta\sigma70$ -Expression führt zur Fehllokalisierung von Pes1, NPM und hRrp6 nicht aber von Fibrillarin in diskrete nukleare Spots. Mit PpanHA bzw. Ppan $\Delta\sigma70$  stabil transfizierte U2OS Zellen wurden für 48 h induziert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit Antikörpern gegen HA (A-D), Pes1 (A), NPM (B), hRrp6 (C) und Fibrillarin (Fib) (D) gefärbt.

Die nukleolären Proteine Pes1, NPM und hRrp6 fehllokalisierten mit Ppan $\Delta\sigma70$  in nukleäre Spots. Dies lässt darauf schließen, dass endogenes Ppan an der nukleären Lokalisation dieser Faktoren beteiligt ist. Zusammenfassend kann Ppan eine Rolle bei der Erhaltung der strukturellen Integrität des Nukleolus zugeschrieben werden.

### 3.4. Die Interaktion von Ppan mit Hdm2

Das Hdm2-Protein ist ein wichtiger Regulator des Tumorsuppressors p53. Hdm2 bindet p53 am N-Terminus und vermittelt so die Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau von p53 (Haupt et al., 1997; Kubbutat et al., 1997; Ljungman, 2000). In Reaktion auf Stress steigen die p53-Level, da die Menge der an p53-bindenden Hdm2-Proteine abnimmt. Warum binden unter Stress weniger Hdm2-Proteine an p53? Gestörte Ribosomenbiogenese führt zur Freisetzung bestimmter ribosomaler Proteine, wie zum Beispiel L5, L11, L23 und S7, die Hdm2 binden und so die Interaktion mit p53 verhindern (Marechal et al., 1994; Lohrum et al., 2003; Jin et al., 2004; Chen et al., 2007). Ob Ppan für die nukleoläre Stressantwort eine ähnliche Rolle spielt, ist nicht bekannt.

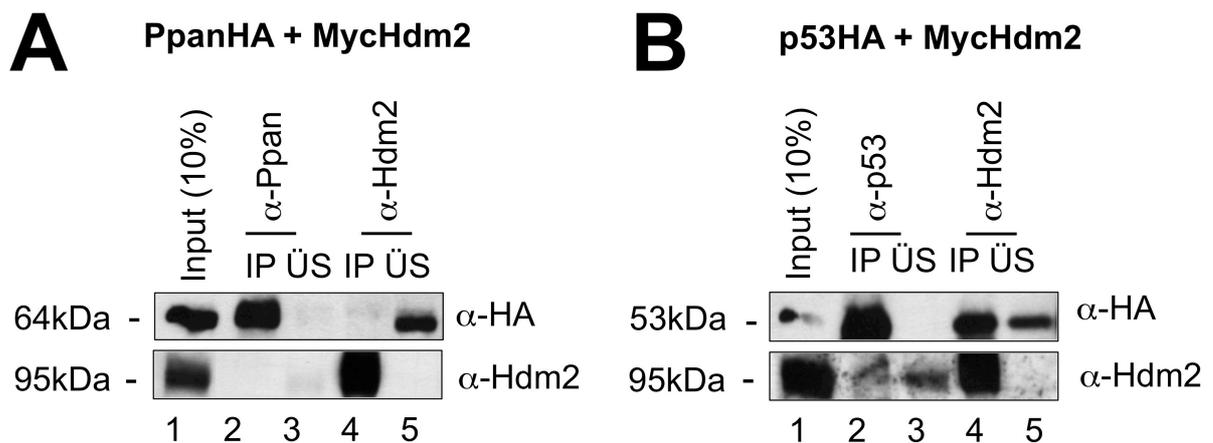
In Vorexperimenten konnte Anastassia Malamoussi jedoch eine Interaktion von Ppan mit Hdm2 beobachten (Malamoussi, 2008). Die Interaktion von Ppan mit Hdm2 konnte sowohl in Immunpräzipitationsexperimenten wie auch mittels *Bimolecular Fluorescence*

*Complementation Assay* (BiFC) gezeigt werden. Zur genaueren Charakterisierung dieser Interaktion sollte in weiteren Experimenten herausgefunden werden, ob die Assoziation zwischen Ppan und Hdm2 direkt ist und welcher Bereich von Ppan für die Assoziation mit Hdm2 benötigt wird.

### **3.4.1. *In vitro* translatiertes Ppan und Hdm2 interagieren nicht direkt miteinander**

Nachdem die Interaktion zwischen Ppan und Hdm2 gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage, ob diese Interaktion direkt ist. Um diese Frage zu beantworten, wurden die Proteine PpanHA und MycHdm2 mittels Retikulozyten-Lysat und entsprechender PCR-*Templates in vitro* transkribiert und translatiert. Nach der Translation ist PpanHA bzw. MycHdm2 im Input mit dem HA-Antikörper (erkennt PpanHA besser als der Ppan-Antikörper) bzw. dem Hdm2-Antikörper nachweisbar (Abb. 21A, Spur 1). Die Intensität der PpanHA- und der MycHdm2-Bande war ähnlich stark, was auf eine vergleichbare Expression der *in vitro* translatierten Proteine schließen lässt. Die Präzipitation von PpanHA erfolgte trotz des HA-tags mit  $\alpha$ -Ppan, da dieser Antikörper PpanHA besser präzipitieren konnte. Der Ppan-Antikörper präzipitierte Ppan gut, nicht jedoch Hdm2 (Abb. 21A, Spur 2 und 4). MycHdm2 ließ sich mit dem Hdm2-Antikörper besser präzipitieren wie mit einem Myc-Antikörper. Der Hdm2-Antikörper präzipitierte Hdm2 gut, nicht jedoch Ppan (Abb. 21A, Spur 2 und 4). Somit ist *in vitro* translatiertes Ppan nicht in der Lage *in vitro* translatiertes Hdm2 zu präzipitieren und umgekehrt. Dies deutet auf eine indirekte Interaktion von Ppan und Hdm2 hin.

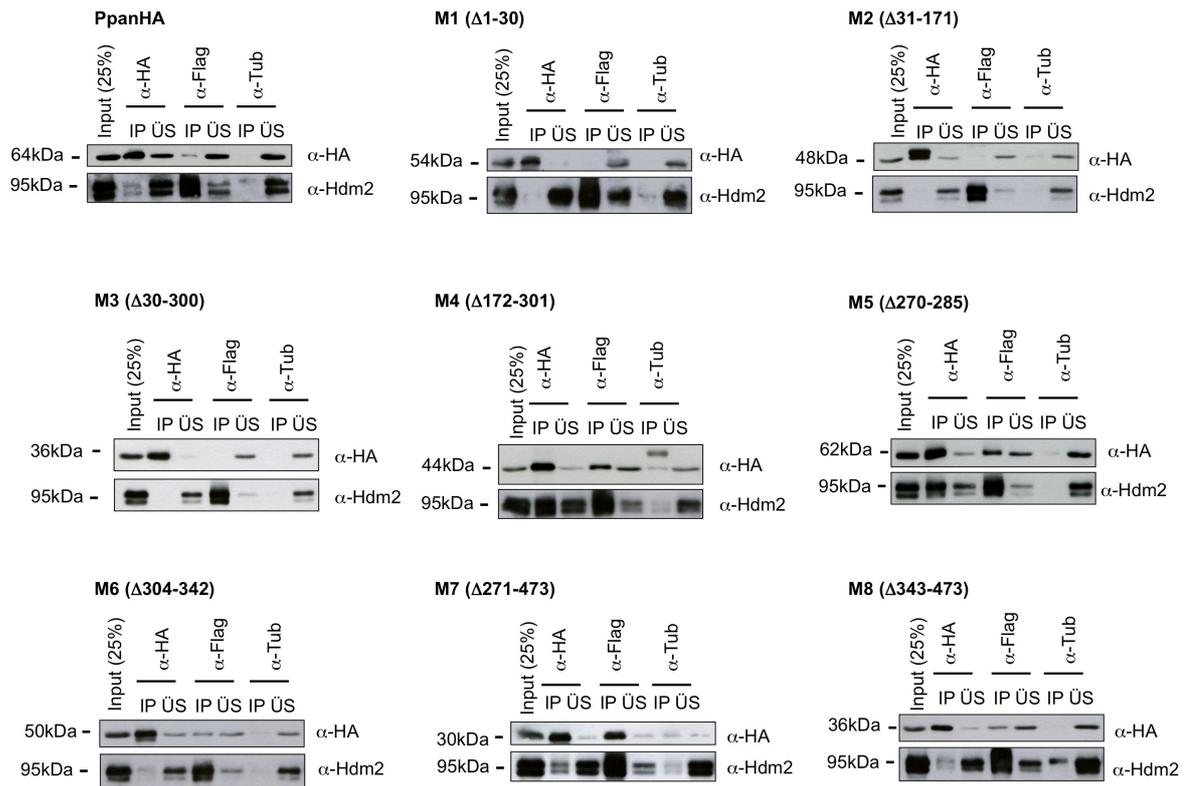
Die in der Literatur bekannte Interaktion von p53 mit Hdm2 diene als Positivkontrolle um zu zeigen, dass zellfrei translatierte Proteine tatsächlich miteinander interagieren können (Honda et al., 1997; Fuchs et al., 1998; Kussie et al., 1996; Lai et al., 2000; Schon et al., 2002). *In vitro* translatiertes p53HA bzw. MycHdm2 ist im Input nachweisbar (Abb. 21B, Spur 1). P53 präzipitierte sich selbst und auch Hdm2, Hdm2 präzipitierte p53 und sich selbst (Abb. 21B, Spur 2 und 4). Somit kann die direkte Interaktion von p53 und Hdm2 mit Hilfe der *in vitro* translatierten Proteine bestätigt werden. Auffallend ist jedoch, dass der p53-Antikörper nur schwach Hdm2 kopräzipitiert. Der p53-Antikörper (DO-1) bindet p53 am N-Terminus (Aminosäure 11-25). Auch Hdm2 bindet p53 am N-Terminus (Aminosäure 1-93) (Yu et al., 2006). Somit könnte die Bindung des p53-Antikörpers mit der p53-Hdm2-Interaktion interferieren.



**Abb. 21.** *In vitro* translatiertes Ppan und Hdm2 interagieren nicht miteinander. PpanHA und MycHdm2 (A) bzw. p53HA (B) wurden in unterschiedlichen Ansätzen jeweils *in vitro* transkribiert und translatiert, gemischt und mittels Immunpräzipitation untersucht. IP: Immunpräzipitation, ÜS: Überstand.

### 3.4.2. Interaktion von Ppan-Deletionsmutanten mit Hdm2-Komplexen

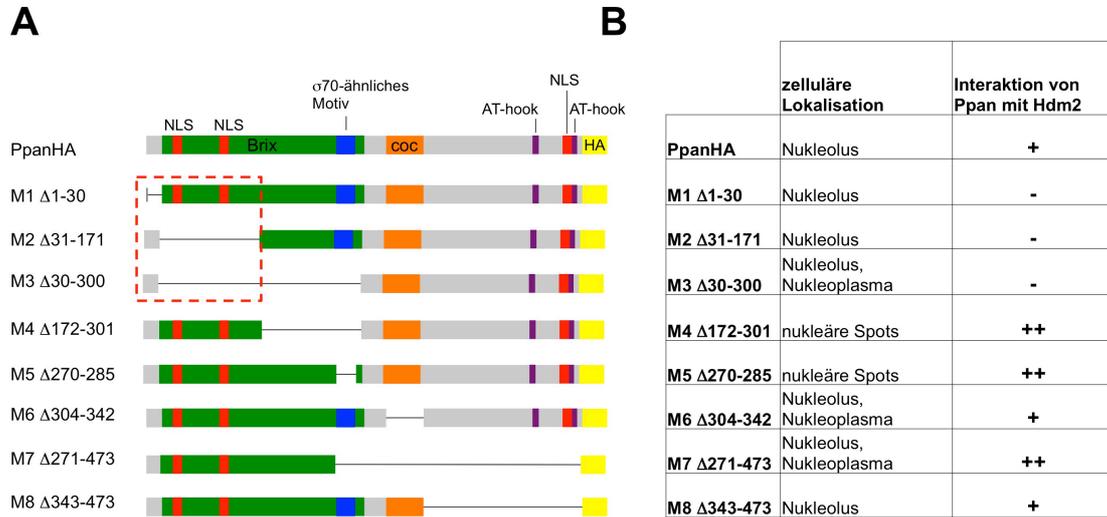
Es ist noch nicht bekannt, welche Domänen von Ppan für die Assoziation mit Hdm2 wichtig sind. Folglich bot es sich an, die schon für die Lokalisationsanalyse verwendeten Ppan-Deletionsmutanten (Abb. 18 und 19), auf die Interaktion mit Hdm2-Komplexen zu untersuchen. Wenn im Folgenden die Interaktion von Hdm2 mit Ppan beschrieben wird, ist damit immer ein Hdm2-enthaltender Komplex gemeint. Die für die Immunpräzipitation verwendeten Antikörper sind gegen die *Tags* der rekombinant exprimierten Proteine (PpanHA, Hdm2Flag) gerichtet und in der Lage diese gut zu präzipitieren. Für die Detektion der Ppan-Deletionsmutanten wurde der HA-Antikörper und für die von Hdm2 der Hdm2-Antikörper verwendet. Der Hdm2-Antikörper weist letztlich vorwiegend rekombinantes Hdm2 nach, da die Mengen an endogenem Hdm2 sehr gering sind. Die Ergebnisse zeigen, dass nach Überexpression von Ppan und Hdm2 ein signifikanter Anteil beider Proteine miteinander interagiert (Abb. 22). Die IP der Mutanten M1, M2 und M3 zeigte keine Interaktion mit Hdm2. Im Gegensatz dazu konnte eine starke Interaktion der Mutanten M4, M5 und M7 mit Hdm2 festgestellt werden. Die Deletionsmutanten M6 und M8 zeigten lediglich eine schwache, aber reproduzierbare Interaktion mit Hdm2.



**Abb. 22. Interaktionsstudie von Ppan-Deletionsmutanten (M1-M8) mit Hdm2Flag.** Mit PpanHA bzw. Ppan-Deletionsmutanten (M1-M8) und Hdm2Flag stabil transfizierte U2OS-Zellen wurden für 48 h induziert. 25% des Lysats wurde als Input aufgetragen. Jede IP-Spur enthält das Lysat von ca. 1,5 Mio. U2OS-Zellen. Die IP erfolgte mit Antikörpern gegen das HA- und Flag-Tag. Als Negativkontrolle diente der gegen alpha-Tubulin gerichtete Antikörper ( $\alpha$ -Tub). Die Westernblot-Analyse von PpanHA und der Ppan-Deletionsmutanten erfolgte mit dem HA-Antikörper, die von Hdm2Flag mit dem Hdm2-Antikörper. IP: Immunpräzipitation, ÜS: Überstand.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Deletionsmutanten M1, M2 und M3 nicht mit Hdm2 interagieren können (siehe Tab. 4). Dies zeigt, dass der N-Terminus bzw. der vordere Teil der Brix-Domäne für die Assoziation von Ppan mit Hdm2 wichtig ist. Die Ppan-Mutanten M4 und M5 interagieren sehr stark mit Hdm2. Somit wird der hintere Teil der Brix-Domäne, aber auch das  $\sigma$ 70-ähnliche Motiv alleine nicht für eine Interaktion mit Hdm2 benötigt. Interessanterweise zeigen die Proteine M4 und M5 auch eine veränderte Lokalisation und Anreicherung in nukleäre Spots (vergleiche Abb. 19 und Tab. 4), was aufgrund der räumlichen Nähe zum nukleoplasmatisch vorliegendem Hdm2 die Ursache für die verstärkte Assoziation mit Hdm2 sein könnte (siehe 4.4.2.). Die Deletionsmutante M6 interagiert ebenfalls mit Hdm2. Somit scheint die *coil-coil*-Domäne, die für Protein-Protein-Interaktionen benötigt wird, nicht die Interaktion mit Hdm2 zu vermitteln.

**Tab. 4. Zusammenfassung der Phänotypen der Ppan-Deletionsmutanten.** (A) Schematische Darstellung von Ppan und Ppan-Deletionsmutanten. Das rot gestrichelte Rechteck markiert die deletierten Bereiche von den drei Ppan-Deletionsmutanten, die nicht mit Hdm2 interagieren. (B) Zelluläre Lokalisation von Ppan und Ppan-Deletionsmutanten, sowie deren Interaktionsstärke mit überexprimiertem Hdm2 (- keine Interaktion, + leichte Interaktion, ++ starke Interaktion).



## 4. Diskussion

In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde das nukleoläre Ssf1-Protein sehr genau untersucht (Fatica et al., 2002). Als Teil der prä-ribosomalen 60S-Untereinheit ist es an der Reifung der Ribosomen beteiligt. In meiner Arbeit habe ich die Funktion von Ppan, dem homologen Protein von Ssf1 in Säugerzellen näher untersucht. Folgende Fragen standen dabei im Mittelpunkt: (i) Führt die Depletion von Ppan zu einer Hemmung der rRNA-Prozessierung? (ii) Besitzt Ppan ein RNA-bindendes  $\sigma 70$ -ähnliches Motiv und wenn ja, inwieweit wird dieses Motiv für die Funktion von Ppan benötigt? und (iii) wie kann die Tumorsuppressor Eigenschaft von Ppan (Welch et al., 2000) erklärt werden? Eine Verbindung zwischen Ribosomenbiogenese und p53-Stabilisierung konnte bereits für zahlreiche ribosomale Proteine gezeigt werden, die unter Stress das Hdm2-Protein binden und inaktivieren (Zhang und Lu, 2009). Durch verschiedene Formen zellulären Stress wird Hdm2 im Nukleolus sequestriert, wodurch die Ubiquitinierung und der proteasomale Abbau von p53 verhindert wird. Auch Ppan interagiert unter Stressbedingungen im Nukleolus mit Hdm2. Kann Ppan bei der Stressantwort also eine Funktion bei der Hdm2-Inaktivierung zugeschrieben werden?

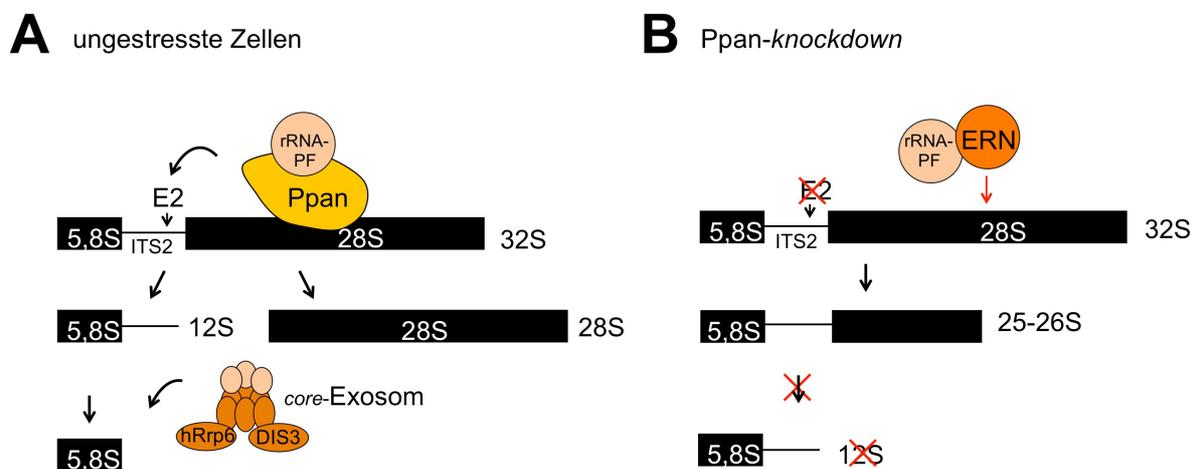
### 4.1. Ppan ist für die Ribosomenbiogenese notwendig

Die Depletion von Ppan durch siRNA-Technologie führte in menschlichen U2OS-Zellen zu einer verminderten Zellproliferation. Ein ähnlicher Phänotyp lässt sich in *Drosophila*-Larven beobachten, die mit einem mutierten Ppan nicht wachsen (Migeon et al., 1999). Der *knockdown* von Ppan inhibierte die Reifung ribosomaler RNA. Metabolische Markierungsexperimente zeigten eine deutliche Einschränkung bei der Reifung der 28S- und 5,8S-rRNA. Im folgendem wird die Rolle von Ppan für die Prozessierung ribosomaler RNA diskutiert.

#### 4.1.1. Ppan wird für die Prozessierung der ITS2- und 3-ETS-Sequenz benötigt

Der *knockdown* von Ppan beeinträchtigte den endonukleolytischen Schnitt in der ITS2-Sequenz. Dieser Prozessierungsschritt wird für die Reifung der 5,8S- und 28S-rRNA benötigt (siehe Abb. 23A). Es kam zur Akkumulation einer aberranten 25-26S-rRNA, die 5,8S-rRNA

und ITS2- nicht aber ITS1-Sequenzen beinhaltet (Abb. 23B). Das 3'-Ende dieser rRNA liegt möglicherweise in der 28S-rRNA-Sequenz. Mit Hilfe von 3'-RACE-Experimenten könnte das genaue 3'-Ende dieser aberranten rRNA eventuell ermittelt werden. Bis jetzt konnte für Ppan keine endonukleolytische Aktivität beschrieben werden. Möglicherweise kann Ppan eine solche Aktivität über Protein-Protein-Interaktionen rekrutieren. Es ist bekannt, dass das Exosom und die mit dem Exosom assoziierten Faktoren hRrp6 und Dis3 an der 3'-Prozessierung der 5,8S-rRNA beteiligt sind (Callahan et al., 2008; Dziembowski et al., 2007) (siehe Abb. 23A). Möglicherweise wird Ppan auch für die Rekrutierung des Exosoms an die rRNA benötigt (siehe 4.3.). Für die Entstehung der 25-26S-rRNA kann auf Grundlage meiner Ergebnisse folgendes Modell entwickelt werden. In Abwesenheit von Ppan wird eine endonukleolytische Schnittstelle in der 28S-rRNA freigesetzt (Abb. 23B). Es kommt zum aberranten Schnitt in der 28S-rRNA-Sequenz. Da das Exosom nicht rekrutiert werden kann, wird die gebildete 25-26S-rRNA nicht abgebaut. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch die normale rRNA-Prozessierung zum Teil zur Bildung von aberranter 25-26S-rRNA führt, diese jedoch schnell vom Exosom erkannt und abgebaut wird. Fehlt Ppan kommt es nicht zu einer Rekrutierung des Exosoms und die aberranten rRNA-Prozessierungsintermediate akkumulieren.

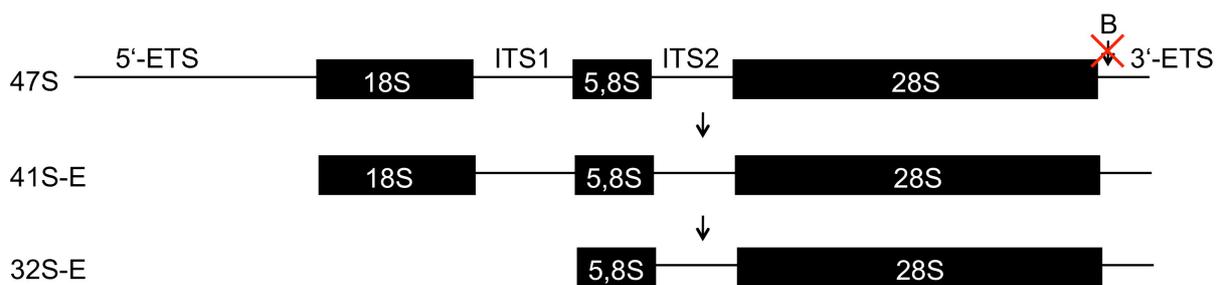


**Abb. 23. Modell zur Entstehung der aberranten 25-26S-rRNA nach Ppan-knockdown.** (A) In ungestressten Zellen läuft die durch rRNA-Prozessierungsfaktoren vermittelte ITS2-Prozessierung ungestört ab. Das *core*-Exosome mit den assoziierten Faktoren hRrp6 und DIS3 trägt zur 5,8S-rRNA-Reifung bei (B) Fehlt Ppan erfolgt ein endonukleolytischer Schnitt in der 28S-rRNA-Sequenz was zur Akkumulation der 25-26S-rRNA führt. Die Rekrutierung des Exosoms ist inhibiert, was den Abbau der aberranten rRNAs verhindert. rRNA-PF: rRNA-Prozessierungsfaktoren. ERN: Endonuklease.

Während man in Säugerzellen Hinweise dafür hat, dass die ITS2-Prozessierung durch NPM vermittelt wird (Itahana et al., 2003; Savkur und Olson, 2008; siehe Kapitel 4.3.), ist in der

Hefe die für den korrespondierenden Schnitt bei C<sub>2</sub> (siehe Abb. 4) zuständige Endoribonuklease nicht bekannt. Wenn man die rRNA-Prozessierung des Ssf1-depletierten Hefestamms (Fatica et al., 2002) mit der von Ppan-depletierten U2OS-Zellen vergleicht, zeigen sich deutliche Unterschiede. Der Ssf1-depletierte Hefestamm akkumuliert eine aberrante 23S-rRNA, welche 5'-ETS-, 18S-rRNA- und ITS1-Sequenzen enthält. Dies deutet auf einen direkten Schnitt an der Stelle A<sub>3</sub> hin, während die Schnitte bei A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub> verzögert werden (siehe Abb. 4). Außerdem akkumuliert eine A<sub>2</sub>-C<sub>2</sub>- rRNA-Spezies, welche ITS1-, 5,8S-rRNA- und ITS2-Sequenzen beinhaltet. Die nach Ppan-*knockdown* entstehende aberrante 25-26S-rRNA enthielt keine ITS1- und 5'-ETS- sondern 5,8S-rRNA- und ITS2-Sequenzen (siehe Abb. 23B).

Der *knockdown* von Ppan führte außerdem zur Akkumulation von 3'-ETS verlängerten rRNAs. Die Prozessierung der ribosomalen RNA von Säugern beginnt mit einem Schnitt der 47S-prä-rRNA in der 5'-ETS. Dabei geht die U3 snoRNA mit spezifischen Regionen des prä-rRNA-Transkripts eine Basenpaarung ein und dirigiert die Schnitte in der 5'-ETS-, sowie der ITS1-Sequenz, um die 18S-rRNA zu bilden (Beltrame et al., 1992; Borovjagin et al., 2005). Anschließend erfolgt die 3'-ETS-Prozessierung. Fehlt Ppan kann der endonukleolytische Schnitt bei B nicht erfolgen und es kommt zur Akkumulation der 41S-E- und 32S-E-rRNA (Abb. 24). Da Mauszellen eine von humanen Zellen leicht unterschiedliche rRNA-Prozessierung haben (siehe Srivastava et al., 2010), akkumuliert in MEF-Zellen zusätzlich eine 36S-E-rRNA-Form.



**Abb. 24. Schematische Darstellung der nach Ppan-*knockdown* auftretenden 3'-verlängerten (*extended*) rRNA-Vorläufer.** Die 47S-rRNA ist normalerweise die einzige 3'-ETS-beinhaltende Vorläufer-rRNA. Der *knockdown* von Ppan inhibiert den endonukleolytischen Schnitt bei B und führt zur Akkumulation von 41S-E- und 32S-E-rRNAs.

In der Hefe wird für die 3'-ETS-Prozessierung die Endoribonuklease Rnt1 (RNase III) benötigt (Elela et al., 1996; Kufel et al., 1999). Da Rnt1 mit den rDNA-Transkriptionsstellen kolokalisiert, geht man von einer kotranskriptionellen Prozessierung des 35S-Vorläufers aus

(Henras et al., 2004). Anschließend wird das 5'-Ende durch die 5'-3'-exonukleolytische Aktivität von Rat1 und Xrn1 erzeugt (Geerlings et al., 2000). Fatica und Kollegen (2002) zeigen in ihrer Arbeit keine Daten zur 3'-ETS-Prozessierung (Fatica et al., 2002). Es wäre jedoch interessant zu wissen, ob der Ssf1-depletierte Hefe-Stamm, ähnlich wie die Ppan-depletierten U2OS-Zellen, einen Defekt in der 3'-ETS-Prozessierung aufweist.

Im Gegensatz zur 5'-ETS-Prozessierung, unterscheidet sich die 3'-ETS-Prozessierung in niederen und höheren Eukaryoten. Die menschliche RNase III ist nicht für die 3'-ETS-Prozessierung, sondern für die Prozessierung der 12S-rRNA notwendig (Wu et al., 2000). Während die Hefe keine snoRNA für ihre 3'-ETS-Prozessierung benötigt, bedarf *Xenopus laevis* die Hilfe der U8 snoRNA (Peculis et al., 1993; Venema et al., 1999). Die Depletion von U8 führt zur Akkumulation von abnormalen 28S-Vorläufer-rRNAs mit 3'-ETS-Verlängerung, was die Bildung der reifen 5,8S- und 28S-rRNA verhindert (Peculis et al., 1994; Peculis et al., 1997). Neuere Studien zeigen die Beteiligung des DEAD-Box Protein Ddx51 an der 3'-End-Reifung der 28S-rRNA (Srivastava et al., 2010). Diese RNA-Helikase wird für die Freisetzung der U8 snoRNA von der prä-rRNA benötigt. Auch die Depletion von Ddx51 führt zur Akkumulation der 3'-ETS verlängerten 41S-, 36S- und 32S-rRNA-Spezies. Zusammenfassend benötigt die 3'-ETS-Prozessierung von Säugern die snoRNA U8, die RNA Helikase Ddx51 und Ppan. Dabei bleiben einige Fragen ungeklärt: Welche Endoribonuklease ist an der 3'-ETS-Prozessierung in menschlichen Zellen beteiligt? Wird Ppan für die Bindung der U8 snoRNA an die prä-rRNA benötigt? Ist Ppan an der Rekrutierung von Ddx51 beteiligt?

#### **4.1.2. Die Akkumulation der aberranten 25-26S-rRNA nach Ppan-Depletion ist p53 abhängig**

Die Ppan-Depletion hemmte sowohl in p53 positiven U2OS-Zellen, als auch in p53-negativen H1299- bzw. Saos-2-Zellen die rRNA-Prozessierung. Es kam zu einer reduzierten Synthese der 12S-rRNA, dem Vorläufer der 5,8S-rRNA. Zu einer Akkumulation der aberranten 25-26S-rRNA kam es hingegen nur in den p53-positiven U2OS-Zellen. Die Kartierung zeigte, dass die 5,8S-rRNA-Sequenz Teil der 25-26S-rRNA ist. Außerdem ist eine kovalente Bindung von p53 an die 157 nt lange 5,8S-rRNA beschrieben worden (Fontoura et al., 1992). Die Experimente deuten auf einen Ribonuklein-Komplex aus 5S- und 5,8S-rRNA mit dem L5-, Mdm2- und dem p53-Protein hin (Marechal et al., 1994). Der Komplex könnte eine Rolle bei der Ribosomenbiogenese bzw. dem Transport von p53 aus dem Nukleolus ins

Zytoplasma spielen. Deshalb stellte ich mir die Frage, ob p53 durch eine kovalente Bindung an die aberrante 25-26S-rRNA bindet und dadurch dessen Abbau durch das Exosom verhindert wird. Die p53-Immunpräzipitation von mit siPpan behandelten U2OS-Zellen kopräzipitierte jedoch keine 5,8S-rRNA. Im Gegensatz dazu konnte die Arbeitsgruppe von Fontoura (1992) in ihren Zelllysaten in der p53-IP 5,8S-rRNA nachweisen. In den dabei verwendeten Rattenfibroblasten wurde Ras und die Maus-A1-135-Val p53-Mutante überexprimiert. Somit kommt die kovalente Bindung von p53 an die 5,8S-rRNA nicht als Ursache für die Stabilisierung der 25-26S-rRNA in Frage.

#### **4.1.3. Charakterisierung des durch Ppan-Depletion verursachten rRNA-Prozessierungsdefekts**

Um den rRNA-Prozessierungsdefekt nach Ppan-Depletion weiter zu charakterisieren, fragte ich mich, ob durch den *knockdown* des Exosoms aberrante rRNA-Formen akkumulieren. Exemplarisch untersuchte ich die Rolle der gut charakterisierten Exosomenkomponente Rrp4. Das Exosom wurde für seine Funktion bei der 5,8S-rRNA-Prozessierung entdeckt, spielt aber auch eine Rolle beim zytoplasmatischen 3'-5'-Abbau von deadenylierten mRNAs (Mitchell et al., 1997; Anderson und Parker, 1998). Von den neun im Zytoplasma vorkommenden Kernkomponenten des Exosoms sind sechs mit der bakteriellen RNase PH verwandt (hRrp41p, hRrp42p, hMtr3p, OIP2, hRrp46p und PM/Sc1-75) und bilden einen hexameren Ring, drei besitzen eine S1-RNA-Bindedomäne (hRrp4p, hRrp40p und hCs14p) und sind oberhalb des Rings positioniert. Während ein Exosom-ähnlicher Komplex von Archaeen und Bakterien (Polynukleotid Phosphorylase) phosphorolytische Aktivität besitzt, ist das menschliche *core* Exosom katalytisch inaktiv (Liu et al., 2006; Dziembowski et al., 2007). In Hefe und im Menschen wird die katalytische Aktivität des Exosoms durch die assoziierten Faktoren DIS3p (Rrp44) bzw. hDIS3p und Rrp6 bzw. hRrp6 (PM/SCL-100) vermittelt (Mitchell et al., 1997; Allmang et al., 1999). Interessanterweise gibt es im Menschen zwei hDIS3 Faktoren, die in unterschiedlichen intrazellulären Bereichen lokalisieren, hDIS3, die einzige Komponente des Exosoms mit endonukleolytischer Aktivität, lokalisiert hauptsächlich nukleolär, während hDIS3L strikt zytoplasmatisch vorliegt (Tomecki et al., 2010). Die Verteilung in unterschiedliche Kompartimente reflektiert die unterschiedlichen Substratspezifität der Komplexe *in vivo*.

Der *knockdown* von Rrp4 depletiert auch die anderen Exosom-Komponenten (van Dijk et al., 2007). Rrp4-depletierte U2OS-Zellen zeigten eine verringerte 12S-rRNA-Menge sowie eine

leichte Akkumulation des 25-26S-rRNA-Prozessierungsintermediats. Dies bestätigt die Beteiligung des Exosoms an der rRNA-Prozessierung. Die Doppeltransfektion der Zellen mit siPpan und siRrp4 verstärkte die Akkumulation der aberranten 25-26S-rRNA. Daraus kann man schließen, dass sowohl die Depletion von Ppan als auch die Inaktivierung des Exosoms zu einer Störung der rRNA-Reifung führt und eine aberrante rRNA-Spezies entstehen lässt.

Das RpL11-Protein (L11) ist ein integraler Bestandteil der großen ribosomalen Untereinheit des Ribosoms. Während früher prä-rRNP-Assemblierungsschritte in der Hefe rekrutieren Rpf2 und Rrs1 die ribosomalen Proteine L11, L5 und die 5S-rRNA in die entstehenden Ribosomen (Zhang et al., 2007). Dabei verhindert die Depletion eines dieser vier Proteine (Rpf2, Rrs1, L5 und L11) den Einbau der anderen drei Proteine sowie der 5S-rRNA in das prä-RNP-Partikel. Die defekten 66S-prä-RNPs werden frühzeitig vom Nukleolus ins Nukleoplasma freigesetzt, und der Export ins Zytoplasma findet nicht mehr statt. Somit ist es nicht verwunderlich, dass der RpL11-*knockdown* die rRNA-Prozessierung stark inhibierte. Es kam zu einer Akkumulation der 41S-, 32S- und 12S-Vorläufer-rRNA sowie der aberranten 25-26S-rRNA.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der Ppan-*knockdown* zu einer gestörten rRNA-Prozessierung führte und mit dem Phänotyp von Rrp4- und RpL11-depletierten Zellen vergleichbar ist.

#### **4.1.4. Ppan-Deletionsmutanten zeigen keinen dominant-negativen Phänotyp**

Diese Arbeit konnte zeigen, dass die Ppan-Depletion zu einer Inhibition der Synthese der 28S-rRNA führt. Es stellte sich die Frage ob eine Überexpression von Ppan und von Ppan-Deletionsmutanten ebenfalls zu einer Störung der Ribosomenbiogenese führen kann. Die konditionale Expression von PpanHA sowie von sechs verschiedenen Ppan-Deletionsmutanten führte nicht zu einer Beeinträchtigung der 28S-rRNA-Reifung. Auch die Untersuchung der Ppan-Deletionsmutanten anhand von Northern Blot-Analysen konnte keine abweichende rRNA-Prozessierung feststellen. Als Positivkontrolle wurde die dominant-negative Bop1 $\Delta$ -Mutante exprimiert, welche zu einer 32S-rRNA-Akkumulation und einer 28S- sowie 12S-rRNA-Reduktion führte. Die Bop1 $\Delta$ -Mutante stört durch ihren Einbau in den PeBoW-Komplex die Ribosomenbiogenese (Strezoska et al., 2002; Grimm et al., 2006). Es bilden sich sogenannte *dead-end*-Komplexe, die nicht mehr mit anderen für die Prozessierung wichtigen Faktoren interagieren können.

Ppan $\Delta\sigma70$  (M5  $\Delta270-285$ ) führte zum Teil zu einer Relokalisation von drei für die rRNA-Prozessierung wichtigen Proteinen (NPM, Pes1 und hRrp6) in nukleäre Spots (siehe 4.2.). Trotzdem zeigte auch diese Mutante in Bezug auf die rRNA-Prozessierung keinen veränderten Phänotyp. Die Menge der im Nukleolus verbleibenden NPM-, Pes1- und hRrp6-Proteine scheint ausreichend zu sein um zu keiner Funktionseinschränkung zu führen. Sämtliche Ppan-Deletionsmutanten zeigten somit keinen dominant-negativen Phänotyp. Dies bedeutet jedoch nicht automatisch, dass die deletierten Bereiche nicht essentiell für die Funktion von Ppan sind, da endogenes Ppan in den Zellen exprimiert wird, welches seine Funktion in der Ribosomenbiogenese auch in Anwesenheit von überexprimierten Ppan-Mutanten erfüllen konnte. Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass exogen exprimierte Ppan-Mutanten nicht die Funktion von Ppan bei der prä-60S-Reifung stören. Entweder werden die Mutanten nicht in die im entstehen begriffenen 60S-Partikel eingebaut oder die jeweilige Bindung ist nur sehr transient und dadurch wenig oder gar nicht störend für die Zelle. Wäre die Interaktion der Ppan-Mutanten mit den prä-60S-Partikel irreversibel würde man zumindest bei den Mutanten mit veränderter nukleolärer Lokalisation (wie z.B. der Mutante M4  $\Delta172-301$  oder M5  $\Delta270-285$ ) einen dominant-negativen Phänotyp erwarten. Ob bestimmte Deletionsmutanten von Ppan funktional sind oder nicht könnte in einem *knock-down-knock-in*-Experiment überprüft werden (siehe Hölzel et al., 2007b). Dabei sollte getestet werden, ob der durch Ppan-*knockdown* verursachte rRNA-Prozessierungsdefekt durch die Expression von Ppan-Deletionsmutanten aufgehoben werden kann.

#### **4.2. Ppan $\Delta\sigma70$ relokalisiert die nukleolären Proteine Pes1, NPM und hRrp6 in nukleäre Spots**

Der Nukleolus ist ein Teil des Nukleus ohne dabei von einer Membran umgeben zu sein. Im Nukleolus lokalisieren NORs (*nuclear organizing regions*) an denen die rDNA-Transkription stattfindet und Vorläufer-rRNA gebildet wird. Zudem wurden über 700 Proteine nachgewiesen, die spezifisch im Nukleolus lokalisieren (Boisvert et al., 2007). Diese werden durch ein komplexes Netzwerk von Protein-Protein-Interaktionen festgehalten, z.B. benötigt das Protein Bop1 für seine stabile Assoziation mit dem Nukleolus seinen Bindepartner Pes1 (Rohrmoser et al., 2007). Des Weiteren spielen RNA-Bindeproteine und ihre Bindung an die rRNA eine wichtige Rolle. Eine wesentliche Domäne in Ssf1 ist die Brix-Domäne mit dem  $\sigma70$ -ähnlichen Motiv, welches RNA-Bindung vermittelt (Wehner und Baserga, 2002). Das prokaryotische  $\sigma70$ -Motiv wurde als ein Helix-Turn-Helix-Motiv der  $\sigma$ -Untereinheit der

RNA-Polymerase in Prokaryoten beschrieben und ist für die DNA-Bindung der -35-Region von Promotoren verantwortlich (Dombrowski et al., 1992). Das  $\sigma 70$ -ähnliche Motiv in Ssf1 ist in den homologen Proteinen anderer Spezies stark konserviert. 10 der insgesamt 16 Aminosäuren (darunter das Glutamat an Position 5, das Glycin an Position 7 sowie das Prolin an Position 8) des  $\sigma 70$ -ähnlichen Motivs des menschlichen Ppan-Proteins stimmen mit denen des Hefehomologs Ssf1 überein (Appendix Abb. A4). Das  $\sigma 70$ -ähnliche Motiv der Eukaryoten besitzt an der Position 8 ein konserviertes Prolin, welches bei Prokaryoten nicht vorkommt. Dieses Prolin unterbricht die Helix-Struktur des Peptids und ist für die bevorzugte RNA-Bindungs-fähigkeit des eukaryotischen  $\sigma 70$ -ähnlichen Motivs verantwortlich. In Hefe wurde überprüft, ob das  $\sigma 70$ -ähnliche Motiv von Rpf1/Rpf2 für die RNA-Bindungs-fähigkeit wichtig ist. Tatsächlich zeigten Luziferase- $\sigma 70$ -Fusionsproteine eine erhöhte RNA-Bindungs-fähigkeit im Vergleich zur Luziferasekontrolle. Dies zeigt, dass die 16 Aminosäuren des  $\sigma 70$ -ähnlichen Motivs RNA-Bindungsaktivität vermitteln können (Wehner und Baserga, 2002). Besitzt Ppan auch ein RNA-Bindungsmotiv? Wenn ja, ist dieses Motiv ebenfalls für die RNA-Bindung notwendig? In welcher Weise ist die RNA-Bindungs-fähigkeit von Ppan für dessen Funktion von Bedeutung? Um diese Fragen zu beantworten, habe ich das annotierte  $\sigma 70$ -ähnliche Motiv in Ppan deletiert (Mutante M5). Tatsächlich zeigte die Mutante M5 ( $\Delta 270-285$ ), genauso wie die Mutante M4 ( $\Delta 172-301$ ) eine Fehllokalisierung in nukleäre Spots. Diese Beobachtung belegt die Wichtigkeit des  $\sigma 70$ -ähnlichen Motivs für die nukleoläre Lokalisation von Ppan. Das  $\sigma 70$ -ähnliche Motiv ermöglicht die Verankerung von Ppan, wahrscheinlich durch die Bindung von ribosomaler RNA im Nukleolus. Außerdem führte die Mutante M5 auch zu einer Fehllokalisierung anderer nukleolärer Proteine wie Pes1, NPM und hRrp6 in nukleäre Spots. Der frühe rRNA-Prozessierungsfaktor Fibrillarin hingegen lokalisierte weiterhin nukleolär. Somit spielt Ppan eine wichtige Rolle für die nukleoläre Lokalisation von mindestens drei an der rRNA-Prozessierung beteiligten Faktoren. Besonders interessant ist, dass die Expression von  $Ppan\Delta\sigma 70$  auch zur Fehllokalisierung von hRrp6 führte, einem exonukleolytisch aktiven Cofaktor des Exosoms (siehe 4.3.). Ppan dient offensichtlich als Plattform für die Interaktion sehr verschiedener Proteine. Zur Zeit ist noch ungeklärt an welche RNA Ppan bindet. Studien mit Ssf1 in Hefe zeigen eine Assoziation mit der 27S-rRNA (Fatica et al., 2002). Um zu klären ob Ppan die korrespondierende 32S-rRNA bindet sind weitere RNA-Immünpräzipitationsstudien notwendig. Mutante M6, der die *coil-coil*-Domäne fehlt, zeigte eine verstärkte nukleoplasmatische Lokalisation. Die für Protein-Protein-Interaktionen wichtige *coil-coil*-Domäne ist somit ebenfalls für die korrekte nukleoläre Lokalisation von Ppan wichtig. Die Regulation der nukleolären Lokalisation von

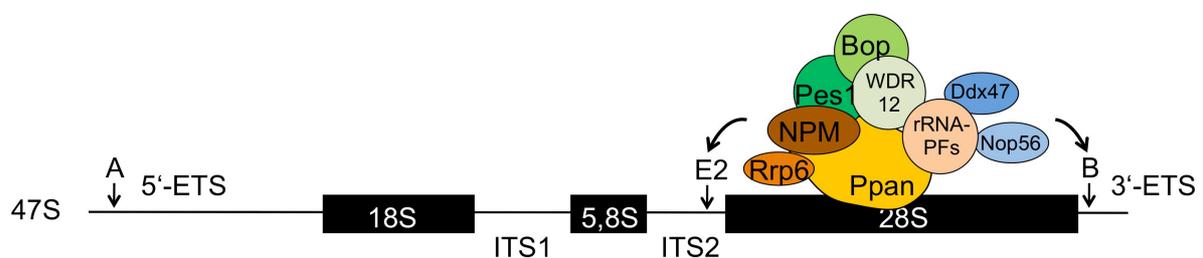
Ppan ist komplex, da neben der RNA-Bindung offensichtlich auch Protein-Protein-Interaktionen eine Rolle spielen.

### 4.3. Bindungspartner von Ppan

Die Analyse des Hefeproteoms liefert eine Liste von 66 mit Ssf1 interagierenden Proteinen (Gavin et al., 2002; Ho et al., 2002; Krogan et al., 2004; Lebreton et al., 2006). 33 dieser Proteine sind an der Ribosomenbiogenese beteiligt, 23 sind ribosomale Proteine der großen Untereinheit und die restlichen 10 Proteine erfüllen andere Funktionen in der Zelle. Die Datenbank BioGrid listet sogar 182 mit Ssf1 assoziierte Faktoren auf ([www.thebiogrid.org](http://www.thebiogrid.org)). Tatsächlich ist in der Hefe jedoch nur ein direkter Bindungspartner im *Yeast-two-Hybrid* nachgewiesen worden, nämlich Rrp15 (Yu et al., 2008). Die prä-60S-Komponente Rrp15 wird genauso wie Ssf1 und Npa1 für die Qualitätskontrolle benötigt, um die richtige Reihenfolge der 27SA<sub>2</sub>-rRNA-Prozessierung zu garantieren (Fatica et al., 2002; Dez et al., 2004; De Marchis et al., 2005).

Im Menschen ist weit weniger über Ppan assoziierte Faktoren bekannt. In Hefe konnte gezeigt werden, dass Ssf1 mit Nop7, Erb1 und Ytm1 interagiert (Fatica et al., 2002). Anlehnend an diese Daten konnte Anastassia Malamoussi die Interaktion von Ppan mit Pes1, Bop1 und WDR12 nachweisen (Malamoussi, 2008). Außerdem wurde die Interaktion von Ppan mit Nop56 und DDX47 beschrieben (Hayano et al., 2003; Sekiguchi et al., 2006). Nop56 ist eine Komponente des Box C/D *small nuclear ribonucleoprotein complex*, welcher die 2'-O-Methylierung der prä-rRNA vermittelt (Gautier et al., 1997). DDX47 ist eine RNA-Helikase der DEAD-box-Familie und ist wahrscheinlich an der Prozessierung des rRNA-Primärtranskripts beteiligt (Strausberg et al., 2002; Sekiguchi et al., 2006). Ppan interagiert also mit mindestens fünf Proteinen (Pes1, Bop1, WDR12, Nop56 und DDX47), die alle eine wichtige Rolle bei der Reifung der 28S-rRNA spielen. Außerdem zeigt diese Arbeit eine Assoziation zwischen Ppan und Nukleophosmin (NPM). Das rekombinant exprimierte Ppan $\Delta\sigma 70$ -Protein kolokalisierte mit NPM in nukleäre Spots. NPM (früher oft B23 genannt) ist ein abundant vorkommendes nukleoläres Protein. Der *knockdown* von NPM inhibiert die prä-rRNA-Prozessierung und induziert Zelltod (Itahana et al., 2003). Savkur und Olson entdeckten 1998 in *in vitro* Versuchen, dass NPM bevorzugt die ITS2-Sequenz 250 nt *downstream* des 3'-Endes der 5,8S-rRNA schneidet (Savkur und Olson, 1998). Unterstützende Daten liefern Vorhersagen der Sekundärstruktur, die für diese Region einen Einzelstrang-*loop* anzeigen (Michot et al., 1983). Bis heute fehlen jedoch *in vivo* Daten, die

NPM als verantwortliche Endoribonuklease für den ITS2-Schnitt bestätigen. Der *knockdown* von Ppan behinderte den endonukleolytischen Schnitt in der ITS2-Sequenz. Des Weiteren blieb der zu Beginn der RNA-Prozessierung erfolgende Schnitt in der 3'-ETS-Sequenz aus. Durch die Interaktion mit rRNA-Prozessierungsfaktoren liefert Ppan einen wichtigen Beitrag für den korrekten Ablauf der rRNA-Prozessierung. Es ist denkbar, dass Ppan Prozessierungsfaktoren an die entsprechenden Stellen der rRNA dirigiert, damit dort endonukleolytische Schnitte erfolgen können (Abb. 25). So dient die Assoziation von Ppan mit NPM möglicherweise der Rekrutierung von NPM an die zu prozessierende rRNA-Sequenz. In Ppan-depletierten Zellen können bestimmte rRNA-Prozessierungsfaktoren wie NPM ihre Funktion aufgrund von Fehllokalisierung nicht mehr erfüllen. Es kommt zu einer gestörten und verzögerten rRNA-Prozessierung. Ob Ppan im gesamten Prozess der Ribosomenbiogenese an die rRNA gebunden bleibt bzw. mit anderen Proteinen im prä-Ribonukleoproteinkomplex vorliegt bleibt ungeklärt. Die Untersuchung des Sedimentationsverhaltens von Ppan ergibt erste Aufschlüsse. Ppan assoziierte mit prä-40S- und prä-60S- sowie zu einem geringeren Teil auch mit prä-80S- ribosomalen Partikeln (Daten nicht gezeigt). Die dabei beobachtete hohe Abundanz an frei vorliegendem Ppan ist unerwartet und sollte weiter untersucht werden.



**Abb. 25. Modell der Funktionsweise von Ppan bei der rRNA-Prozessierung.** Ppan wird für die ITS2 und 3'-ETS-Prozessierung benötigt. Ppan könnte durch Bindung an die ribosomale RNA die für die Prozessierung benötigten Faktoren an die richtige Stelle dirigieren. Die Schnitte bei A und B der 47S-rRNA stellen die ersten Schritte der rRNA-Prozessierung dar und verkürzen die 47S- zur 45S-rRNA. Der Schnitt bei E2 in ITS2 trennt die 5,8S- von der 28S-rRNA. ETS steht für *external transcribed spacer*, ITS steht für *internal transcribed spacer* und rRNA-PFs für rRNA-Prozessierungsfaktoren.

Lum und Kollegen entdeckten 2004 erste Hinweise für einen Zusammenhang von Ssf1 mit dem Exosom (Lum et al., 2004). In einem genomweiten *Screen* in *Saccharomyces cerevisiae* für 5-Fluorouracil (5-FU)-sensitive Gene fanden sie neben *ssf1*, *nop4*, *mak21* und *rrp15* auch vier Gene, die für Komponenten des Exosoms kodieren. Ssf1 assoziiert mit Nop4, Mak21 und Rrp15 in einem Komplex, der in Hefe für die Reifung und Prozessierung der großen

ribosomalen Untereinheit benötigt wird (Gavin et al., 2002; Fatica et al., 2002; Krogan et al., 2004). In Hefe scheint Ssf1 somit für das Überleben nach 5-FU-Behandlung wichtig zu sein. 5-FU inhibiert die prä-rRNA-Prozessierung, da es sehr schnell in ribosomale RNA eingebaut wird (Ghoshal und Jacob, 1994; Burger et al., 2010). Außerdem hindert 5-FU das Exosom am Abbau akkumulierter polyadenylierter rRNAs (Fang et al., 2004). Gibt es auch in Säugerzellen eine erhöhte Sensitivität für 5-FU nach Depletion von Ppan?

Die 5-FU-Behandlung von U2OS-Zellen führte ähnlich wie die Ppan-Depletion zu einem Prozessierungsdefekt. Die 28S- und 12S-rRNA-Synthese war inhibiert und es kam zu einer Akkumulation der aberranten 25-26S-rRNA-Spezies (Appendix Abb. A3). Der *knockdown* von Ppan bei gleichzeitiger 5-FU-Behandlung verstärkte die Inhibition der 28S-rRNA-Reifung leicht, die Akkumulation der 25-26S-rRNA wurde hingegen nicht verstärkt (Appendix Abb. A3). Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass 5-FU-Behandlung und Ppan-Depletion zwar den Abbau von aberranten rRNAs durch das Exosom und Exosom-assoziierte Faktoren in ähnlicher Weise beeinträchtigen können, die Hemmung der rRNA-Prozessierung jedoch nicht oder in nur sehr geringem Maße gegenseitig verstärkt werden kann.

In dieser Arbeit wurde eine weitere Verbindung zwischen Ppan und dem Exosom gefunden. Die Fehllokalisierung von Ppan $\Delta\sigma70$  in nukleäre Spots führte auch zu einer Fehllokalisierung von hRrp6. Somit spielt Ppan eine wichtige Rolle für die nukleoläre Lokalisation von hRrp6. hRrp6 ist neben hDIS3 und hDIS3L einer der mit dem Exosom assoziierten Faktoren mit exoribonukleolytischer Aktivität (van Dijk et al., 2007). Das Exosom ist an der Reifung der rRNA, tRNA, snRNA und snoRNA beteiligt und generell beim Abbau von RNA. Wie aber erkennt das Exosom so viele verschiedene Substrate? Die Beantwortung dieser Frage ist das Ziel intensiver Forschungen. Es wird angenommen, dass die Spezifität durch akzessorische Faktoren, wie dem nukleolären TRAMP-Komplex (Trf4/5-, Air1/2-, Mtr4-Polyadenylierungs-Komplex) sowie den zytoplasmatischen Ski7p GTPase/SKI Komplex vermittelt wird (Araki et al., 2001; LaCava et al., 2005; Orban und Izaurralde, 2005; Vasiljeva und Buratowski, 2006). Dabei trägt der TRAMP-Komplex bei Bedarf zum tRNA-Abbau bei, während der Ski-7-Komplex den NMD-*(nonsense mediated decay)* und *non-stop decay* mRNA-Überwachungs-Signalweg kontrolliert (Vanacova et al., 2005; Kadaba et al., 2004; Takahashi et al., 2003; Mitchell et al., 2003). Für die Rekrutierung des Exosoms zur prä-rRNA hingegen schlagen Schilders und Kollegen eine Beteiligung des Exosom-assoziierten Proteins MPP6 (M-Phase Phosphoprotein 6) vor (Schilders et al., 2005). MPP6 bindet Oligopyrimidin-Bereiche in der ITS2-RNA und rekrutiert das Exosom, hRrp6 und hMtr4

(mRNA *transporter protein 4*) an die ribosomale RNA. HMtr4 entwindet als ATP-abhängige RNA-Helikase und Cofaktor des Exosoms die Sekundärstruktur von prä-rRNAs, welche ansonsten zu einer Behinderung der 3'-5'-Prozessierung führen würde (de la Cruz et al., 1998). In einem zwei Stufen Prozess sorgt das *core* Exosom zusammen mit hDIS3 zunächst für die 3'-5'-Trimmung der 5,8S-rRNA. Anschließend entfernt Rrp6 die verbleibenden Nucleotide. Zellen ohne Rrp6 akkumulieren poly(A+) rRNA-Degradations-Intermediate (Callahan et al., 2008).

Der *knockdown* von Ppan führte zur Akkumulation einer aberranten 25-26S-rRNA. In nicht gestressten Zellen werden diese aberranten RNAs polyadenyliert und vom Exosom abgebaut (Fang et al., 2004; Slomovic et al., 2006; Shcherbik et al., 2010). Da Ppan für die Rekrutierung der nukleolären Exosomenkomponente hRrp6 zur rRNA benötigt wird, können aberrante rRNAs in Abwesenheit von Ppan nicht sofort abgebaut werden. Dabei bleiben jedoch weitere Fragen unaufgeklärt. Bindet Ppan hRrp6 direkt oder findet die Interaktion über Komponenten des *core* Exosoms oder durch andere, Exosom-assoziierte Faktoren wie hCIS3 statt?

#### **4.4. Ppan als neue Verbindung zwischen Ribosomenbiogenese und Zellzyklus**

Viele nukleoläre Proteine wie Nukleophosmin (NPM) und Nukleolin translozieren nach Stress ins Nukleoplasma (Chen und Huang, 2001; Shav-Tal et al., 2005). Im Gegensatz dazu bleibt Ppan nach Stress im Nukleolus. Hdm2, ein wichtiger Regulator des Tumorsuppressors p53 wird nach Stress induziert und lokalisiert ebenfalls im Nukleolus (Ashcroft et al., 2000; Mekhail et al., 2005). Diese Beobachtung ließ einen Zusammenhang zwischen Ppan und Hdm2 vermuten. Tatsächlich konnte Anastassia Malamoussi in Vorexperimenten in unserer Arbeitsgruppe eine Assoziation von Ppan mit Hdm2 mittels Immunpräzipitationsexperimenten sowie *Biomolecular Fluorescence Complementation* (BiFC)-*Assay* zeigen (Malamoussi, 2008). Zur genaueren Charakterisierung dieser Assoziation sollte in weiteren Experimenten herausgefunden werden, ob die Interaktion direkt ist und welcher Bereich von Ppan für die Assoziation mit Hdm2 benötigt wird.

#### 4.4.1. Die Assoziation von Ppan mit Hdm2 ist nicht direkt

Um herauszufinden ob die Assoziation zwischen Ppan und Hdm2 direkt oder indirekt ist verwendete ich die Methode der TNT *Quick Coupled Transcription/Translation* und führte anschließend eine Immunpräzipitation durch. Dabei erfolgte die zellfreie Proteinexpression von PpanHA und MycHdm2 mit Hilfe von Retikulozyten-Lysat, T7-RNA-Polymerase und dem jeweiligen spezifischen PCR-*Template*, welches für das zu transkribierende Gen kodiert. In *vitro* translatiertes Ppan war nicht in der Lage in *vitro* translatiertes Hdm2 zu präzipitieren und umgekehrt, was auf eine indirekte Assoziation von Ppan und Hdm2 hindeutet. Wahrscheinlich benötigt die Assoziation von Ppan mit Hdm2 die Anwesenheit von anderen Faktoren, die im *in vitro* Ansatz fehlen, im zellulären System jedoch vorhanden sind. Um allerdings auszuschließen, dass die Bedingungen des *in vitro* Translationsansatzes zu künstlich sind, um eine direkte Interaktion der Proteine zu erlauben sollte die Assoziation von Ppan mit Hdm2 noch mit einer unabhängigen Methode wie dem *Yeast-Two-Hybrid-Assay* untersucht werden. Es sind bisher fünf rRNA-Prozessierungsfaktoren bekannt, die mit Ppan assoziieren: Pes1, Bop1, WDR12, DDX47 und Nop56. Doch auch hier stellt sich die Frage, ob diese Proteine direkte Interaktionspartner von Ppan sind oder nicht. Um dies herauszufinden sollten IP-Experimente mit *in vitro* translatiertem Ppan und Pes1, Bop1 und WDR12 durchgeführt werden. Um weitere Proteine zu identifizieren, die mit Ppan interagieren, ist auch ein *GST-Pulldown* mit anschließender massenspektrometrischer Untersuchung denkbar.

#### 4.4.2. Die Assoziation von Ppan mit Hdm2 benötigt den N-Terminus von Ppan

Diese Arbeit hatte unter anderem zum Ziel, die in Vorexperimenten herausgefundene Assoziation zwischen Ppan und Hdm2 zu kartieren. Dazu wurde die Assoziation von überexprimierten Ppan-Deletionsmutanten mit überexprimiertem Hdm2Flag in U2OS-Zellen untersucht. Der N-Terminus von Ppan (Aminosäure 1-171) erwies sich für die Bindung an Hdm2 als essentiell. Um herauszufinden welcher Bereich des N-Terminus von Ppan die Assoziation mit Hdm2 vermittelt, bieten sich Experimente mit weiteren Ppan-Deletionsmutanten an, in denen der N-Terminus detaillierter untersucht wird.

Die Mutante M6 ( $\Delta$ 304-342), der die *coil-coil*-Domäne fehlt, ist in der Lage mit Hdm2 zu assoziieren. Somit ist diese Protein-Protein-Interaktion-vermittelnde Domäne nicht für die Assoziation von Ppan mit Hdm2 wichtig. In Folgeexperimenten gilt es zu klären ob diese

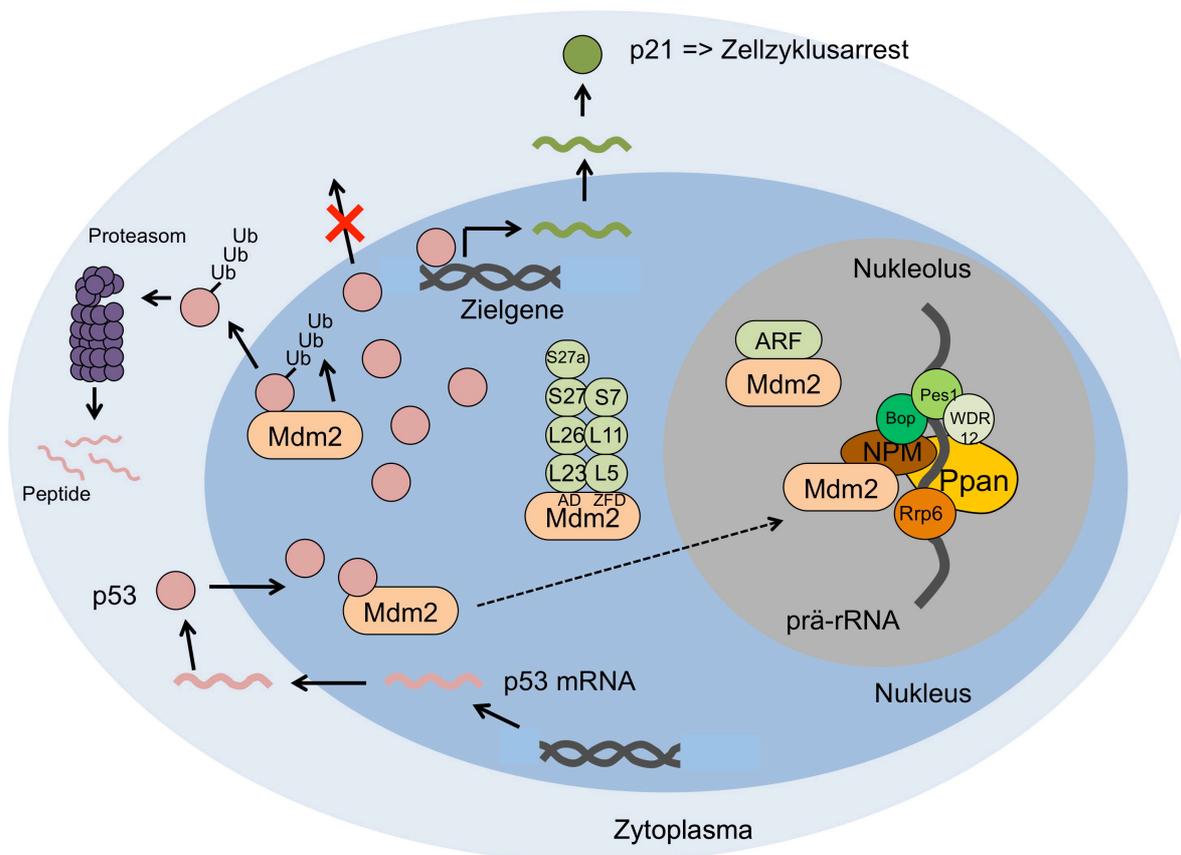
Domäne z.B. für die Assoziation mit PeBoW-Komponenten benötigt wird, oder ob andere Bereiche von Ppan für eine Assoziation mit PeBoW wichtig sind.

Interessanterweise zeigte die Interaktionsstudie der Ppan-Deletionsmutanten M4 ( $\Delta 172-302$ ) und M5 ( $\Delta 270-285$ ) eine verstärkte Assoziation mit Hdm2. Nuklei- und Nukleolipräparationen zeigten, dass Hdm2 ebenfalls vor allem im Nukleoplasma von ungestressten Zellen lokalisiert (Malamoussi, 2008). Somit könnte die räumliche Nähe der Mutanten M4 und M5 zu Hdm2 die Ursache für die verstärkte Assoziation dieser Proteine sein.

#### **4.4.3. Die Funktion von Ppan bei der Koordination von Zellzyklus und Ribosomenbiogenese**

Die Hemmung der Ribosomenbiogenese durch Stress führt zur Aktivierung des Tumorsuppressors p53. Die p53-Stabilisierung stellt eine wichtige Verbindung zwischen der Störung der Ribosomenbiogenese und der Zellzykluskontrolle dar. Eine funktionierende Ribosomenbiogenese ist die Voraussetzung für zellphysiologisch normale p53-Level. Aber wie führt der ribosomale Stress zu einer p53-Aktivierung? Ein guter Überblick wird von der Arbeitsgruppe von Lamond (Boulon et al., 2010) gegeben, die die 3 bekannten Arten der nukleolären Stressantwort zusammenfasst. Das Modell mit der längsten Tradition ist das „*Riding-the-Ribosome*“-Modell. Hierbei geht man davon aus, dass p53 und Hdm2 durch den Export der ribosomalen Untereinheiten vom Nukleolus ins Zytoplasma mitgenommen werden (Fontoura et al., 1992; Riley und Maher, 2007; Zhang und Lu, 2009). Dies verhindert zum einen die Interaktion von p53 mit seinen Zielgenen im Nukleoplasma und fördert zum anderen seine Ubiquitin vermittelte Degradation im Zytoplasma. Wenn Stress die Produktion und den Export ribosomaler Untereinheiten reduziert, werden p53 und Hdm2 nicht mehr ins Zytoplasma transportiert, weshalb p53 die Transkription seiner Zielgene im Nukleoplasma aktivieren kann. Der zweite Mechanismus der p53-Induktion ist die Translations-vermittelte p53-Induktion. Fumagalli und Kollegen (2009) fanden heraus, dass die Störung der 40S-Ribosomenbiogenese auch ohne die Disintegration des Nukleolus zu einer p53-Induktion führt (Fumagalli et al., 2009; Hölzel et al., 2010a). Die 5'-TOP-(5'-terminal oligopyrimidine) Sequenz der L11-mRNA erlaubt deren Translation auch bei einer Störung der 40S-Ribosomenbiogenese, also Bedingungen, bei denen die globale Proteinsynthese gehemmt ist (Caldarola et al., 2009). Dadurch stehen auch ohne die Disintegration des Nukleolus genügend freie L11-Proteine zur Verfügung um eine Hdm2-vermittelte p53-Induktion

auszulösen. Der in letzter Zeit am meisten diskutierte Mechanismus der p53-Induktion ist die Stress-induzierte Freisetzung ribosomaler Proteine wie L5, L11, L23 und S7 (Marechal et al., 1994; Lohrum et al., 2003; Zhang et al., 2003; Jin et al., 2004; Chen et al., 2007; Zhang et al., 2010; Xiong et al., 2011; Sun et al., 2011). Die ribosomalen Proteine binden Hdm2 und verhindern die Ubiquitin-vermittelte Degradation von p53. Auch nicht-ribosomale Proteine wie p14ARF können in Reaktion auf onkogenen Stress (wie überexprimiertes Myc) Mdm2 binden und dessen Interaktion mit p53 verhindern (Kruse und Gu, 2009).



**Abb. 26. Modell der Funktionsweise von Ppan bei der nukleolären Stressantwort.** In Reaktion auf nukleolären Stress binden freie ribosomale Proteine wie L5, L11, L23, L26, S7, S27 und S27a Hdm2 und inaktivieren dieses. Hdm2 kann p53 nicht mehr ubiquitinieren, wodurch dessen proteasomale Degradation verhindert wird. Stabilisiertes p53 kann Zielgene binden, die einen Zellzyklusarrest oder Apoptose induzieren. (AD: *acidic domain*; ZFD: *zinc finger domain*).

Ppan ist einer der wenigen Faktoren die nach nukleolärem Stress nicht aus dem Nukleolus ins Nucleoplasm transloziert (Malamoussi, 2008). Dies war ein entscheidender Hinweis, dass auch Ppan eine Rolle bei der nukleolären Stressantwort spielen könnte. Tatsächlich führt die Hemmung der rRNA-Prozessierung durch den Proteasominhibitor MG-132 (Stavreva et al.,

2006; Burger et al., 2010) zu einer Assoziation von Ppan mit Hdm2 in Nukleoli (Malamoussi, 2008). P53 wird aus dem nukleoplasmatischen p53-Hdm2-Komplex befreit, was zur p53-Aktivierung führt. Anhand dieser Daten konnte folgendes Modell entwickelt werden, welches die Stress-induzierte nukleoläre Sequestrierung von Hdm2 durch Ppan zeigt (Abb. 26). Um dieses Modell zu bestätigen gilt es weitere Fragen zu klären. Welcher Bereich von Hdm2 wird für die Assoziation mit Ppan benötigt? Kann Ppan auch mit den ribosomalen Proteinen L5, L11, L23 und S7 interagieren?

#### 4.5. Ausblick

Diese Arbeit beschreibt Ppan als für die Ribosomenbiogenese wichtigen Faktor in menschlichen Zellen. Dabei konnte der rRNA-Prozessierungsdefekt, der durch eine Ppan-Depletion verursacht wird genau beschrieben werden. Ppan interagiert mit mindestens fünf an der rRNA-Prozessierung beteiligten Faktoren (Pes1, Bop1, WDR12, Nop56 und DDX47) (Hayano et al., 2003; Gautier et al., 1997; Sekiguchi et al., 2006) und besitzt ein für die nukleoläre Lokalisation wichtiges RNA-Bindemotiv. Die Ppan $\Delta\sigma70$ -Mutante führte zu einer Fehllokalisierung in nukleoplasmatische Spots und dirigierte weitere nukleoläre Faktoren wie Pes1, NPM und hRrp6 ebenfalls in diese Spots. Somit lässt sich Ppan als nukleoläre Plattform für an der rRNA-Prozessierung beteiligten Faktoren beschreiben. Doch es gibt weitere wichtige Fragen zu klären. Sind NPM und hRrp6 direkte Bindepartner von Ppan? Wird Ppan benötigt um das Exosom an bestimmte Stellen der RNA zu positionieren um den Abbau der aberranten 25-26S-rRNA-Spezies zu gewährleisten?

Diese Arbeit konnte zeigen, dass der N-Terminus von Ppan (Aminosäure 1-171) für die Interaktion mit Hdm2 wichtig ist. Um herauszufinden, welcher Bereich von Hdm2 die Interaktion mit Ppan vermittelt, bieten sich Experimente mit verschiedenen Hdm2-Deletionsmutanten an.

## 5. Literaturverzeichnis

### A

Adams, J.M., Harris, A.W., Pinkert, C.A., Corcoran, L.M., Alexander, W.S., Cory, S., Palmiter, R.D., and Brinster, R.L. (1985). The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* *318*, 533-538.

Alani, R.M., and Munger, K. (1998). Human papillomaviruses and associated malignancies. *J Clin Oncol* *16*, 330-337.

Allmang, C., Petfalski, E., Podtelejnikov, A., Mann, M., Tollervey, D., and Mitchell, P. (1999). The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3' → 5' exonucleases. *Genes Dev* *13*, 2148-2158.

Anderson, J.S., and Parker, R.P. (1998). The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J* *17*, 1497-1506.

Ansel, K.M., Pastor, W.A., Rath, N., Lapan, A.D., Glasmacher, E., Wolf, C., Smith, L.C., Papadopoulou, N., Lamperti, E.D., Tahiliani, M., *et al.* (2008). Mouse Eri1 interacts with the ribosome and catalyzes 5.8S rRNA processing. *Nat Struct Mol Biol* *15*, 523-530.

Araki, Y., Takahashi, S., Kobayashi, T., Kajihō, H., Hoshino, S., and Katada, T. (2001). Ski7p G protein interacts with the exosome and the Ski complex for 3'-to-5' mRNA decay in yeast. *EMBO J* *20*, 4684-4693.

Ashcroft, M., Taya, Y., and Vousden, K.H. (2000). Stress signals utilize multiple pathways to stabilize p53. *Mol Cell Biol* *20*, 3224-3233.

Athanassiou, M., Hu, Y., Jing, L., Houle, B., Zarbl, H., and Mikheev, A.M. (1999). Stabilization and reactivation of the p53 tumor suppressor protein in nontumorigenic revertants of HeLa cervical cancer cells. *Cell Growth Differ* *10*, 729-737.

### B

Bakin, A., Lane, B.G., and Ofengand, J. (1994). Clustering of pseudouridine residues around the peptidyltransferase center of yeast cytoplasmic and mitochondrial ribosomes. *Biochemistry* *33*, 13475-13483.

Bassler, J., Grandi, P., Gadai, O., Lessmann, T., Petfalski, E., Tollervey, D., Lechner, J., and Hurt, E. (2001). Identification of a 60S preribosomal particle that is closely linked to nuclear export. *Mol Cell* *8*, 517-529.

Bell, S.P., Learned, R.M., Jantzen, H.M., and Tjian, R. (1988). Functional cooperativity between transcription factors UBF1 and SL1 mediates human ribosomal RNA synthesis. *Science* *241*, 1192-1197.

Beltrame, M., and Tollervey, D. (1992). Identification and functional analysis of two U3 binding sites on yeast pre-ribosomal RNA. *EMBO J* *11*, 1531-1542.

- Bernardi, R., Papa, A., and Pandolfi, P.P. (2008). Regulation of apoptosis by PML and the PML-NBs. *Oncogene* 27, 6299-6312.
- Bernardi, R., Scaglioni, P.P., Bergmann, S., Horn, H.F., Vousden, K.H., and Pandolfi, P.P. (2004). PML regulates p53 stability by sequestering Mdm2 to the nucleolus. *Nat Cell Biol* 6, 665-672.
- Bhat, K.P., Itahana, K., Jin, A., and Zhang, Y. (2004). Essential role of ribosomal protein L11 in mediating growth inhibition-induced p53 activation. *EMBO J* 23, 2402-2412.
- Boisvert, F.M., van Koningsbruggen, S., Navascues, J., and Lamond, A.I. (2007). The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 574-585.
- Boria, I., Quarello, P., Avondo, F., Garelli, E., Aspesi, A., Carando, A., Campagnoli, M.F., Dianzani, I., and Ramenghi, U. (2008). A new database for ribosomal protein genes which are mutated in Diamond-Blackfan Anemia. *Hum Mutat* 29, E263-270.
- Bornkamm, G.W., Berens, C., Kuklik-Roos, C., Bechet, J.M., Laux, G., Bachl, J., Korndoerfer, M., Schlee, M., Holzelt, M., Malamoussi, A., *et al.* (2005). Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system. *Nucleic Acids Res* 33, e137.
- Borovjagin, A.V., and Gerbi, S.A. (2000). The spacing between functional Cis-elements of U3 snoRNA is critical for rRNA processing. *J Mol Biol* 300, 57-74.
- Borovjagin, A.V., and Gerbi, S.A. (2005). An evolutionary intra-molecular shift in the preferred U3 snoRNA binding site on pre-ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* 33, 4995-5005.
- Boulon, S., Westman, B.J., Hutten, S., Boisvert, F.M., and Lamond, A.I. (2010). The nucleolus under stress. *Mol Cell* 40, 216-227.
- Bowman, L.H., Rabin, B., and Schlessinger, D. (1981). Multiple ribosomal RNA cleavage pathways in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 9, 4951-4966.
- Boylan, M.O., Athanassiou, M., Houle, B., Wang, Y., and Zarbl, H. (1996). Activation of tumor suppressor genes in nontumorigenic revertants of the HeLa cervical carcinoma cell line. *Cell Growth Differ* 7, 725-735.
- Bugner, V., Tecza, A., Gessert, S., and Kuhl, M. (2011). Peter Pan functions independently of its role in ribosome biogenesis during early eye and craniofacial cartilage development in *Xenopus laevis*. *Development* 138, 2369-2378.
- Burger, K., Muhl, B., Harasim, T., Rohrmoser, M., Malamoussi, A., Orban, M., Kellner, M., Gruber-Eber, A., Kremmer, E., Holzelt, M., *et al.* (2010). Chemotherapeutic drugs inhibit ribosome biogenesis at various levels. *J Biol Chem* 285, 12416-12425.
- Burkhard, P., Stetefeld, J., and Strelkov, S.V. (2001). Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. *Trends Cell Biol* 11, 82-88.

**C**

Cairns, C.A., and White, R.J. (1998). p53 is a general repressor of RNA polymerase III transcription. *EMBO J* 17, 3112-3123.

Caldarola, S., De Stefano, M.C., Amaldi, F., and Loreni, F. (2009). Synthesis and function of ribosomal proteins--fading models and new perspectives. *FEBS J* 276, 3199-3210.

Callahan, K.P., and Butler, J.S. (2008). Evidence for core exosome independent function of the nuclear exoribonuclease Rrp6p. *Nucleic Acids Res* 36, 6645-6655.

Cavanaugh, A.H., Hempel, W.M., Taylor, L.J., Rogalsky, V., Todorov, G., and Rothblum, L.I. (1995). Activity of RNA polymerase I transcription factor UBF blocked by Rb gene product. *Nature* 374, 177-180.

Challagundla, K.B., Sun, X.X., Zhang, X., DeVine, T., Zhang, Q., Sears, R.C., and Dai, M.S. (2011). Ribosomal protein L11 recruits miR-24/miRISC to repress c-Myc expression in response to ribosomal stress. *Mol Cell Biol* 31, 4007-4021.

Chedin, S., Laferte, A., Hoang, T., Lafontaine, D.L., Riva, M., and Carles, C. (2007). Is ribosome synthesis controlled by pol I transcription? *Cell Cycle* 6, 11-15.

Chen, D., and Huang, S. (2001). Nucleolar components involved in ribosome biogenesis cycle between the nucleolus and nucleoplasm in interphase cells. *J Cell Biol* 153, 169-176.

Chen, D., Zhang, Z., Li, M., Wang, W., Li, Y., Rayburn, E.R., Hill, D.L., Wang, H., and Zhang, R. (2007). Ribosomal protein S7 as a novel modulator of p53-MDM2 interaction: binding to MDM2, stabilization of p53 protein, and activation of p53 function. *Oncogene* 26, 5029-5037.

Chen, X., Ko, L.J., Jayaraman, L., and Prives, C. (1996). p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev* 10, 2438-2451.

Czibere, A., Bruns, I., Junge, B., Singh, R., Kobbe, G., Haas, R., and Germing, U. (2009). Low RPS14 expression is common in myelodysplastic syndromes without 5q- aberration and defines a subgroup of patients with prolonged survival. *Haematologica* 94, 1453-1455.

**D**

Dai, M.S., Zeng, S.X., Jin, Y., Sun, X.X., David, L., and Lu, H. (2004). Ribosomal protein L23 activates p53 by inhibiting MDM2 function in response to ribosomal perturbation but not to translation inhibition. *Mol Cell Biol* 24, 7654-7668.

Daniely, Y., and Borowiec, J.A. (2000). Formation of a complex between nucleolin and replication protein A after cell stress prevents initiation of DNA replication. *J Cell Biol* 149, 799-810.

David-Pfeuty, T. (1999). Potent inhibitors of cyclin-dependent kinase 2 induce nuclear accumulation of wild-type p53 and nucleolar fragmentation in human untransformed and tumor-derived cells. *Oncogene* 18, 7409-7422.

de la Cruz, J., Kressler, D., Tollervey, D., and Linder, P. (1998). Dob1p (Mtr4p) is a putative ATP-dependent RNA helicase required for the 3' end formation of 5.8S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 17, 1128-1140.

De Marchis, M.L., Giorgi, A., Schinina, M.E., Bozzoni, I., and Fatica, A. (2005). Rrp15p, a novel component of pre-ribosomal particles required for 60S ribosome subunit maturation. *RNA* 11, 495-502.

Decatur, W.A., and Fournier, M.J. (2003). RNA-guided nucleotide modification of ribosomal and other RNAs. *J Biol Chem* 278, 695-698.

Dez, C., Froment, C., Noaillac-Depeyre, J., Monsarrat, B., Caizergues-Ferrer, M., and Henry, Y. (2004). Npa1p, a component of very early pre-60S ribosomal particles, associates with a subset of small nucleolar RNPs required for peptidyl transferase center modification. *Mol Cell Biol* 24, 6324-6337.

Dombroski, A.J., Walter, W.A., Record, M.T., Jr., Siegele, D.A., and Gross, C.A. (1992). Polypeptides containing highly conserved regions of transcription initiation factor sigma 70 exhibit specificity of binding to promoter DNA. *Cell* 70, 501-512.

Dousset, T., Wang, C., Verheggen, C., Chen, D., Hernandez-Verdun, D., and Huang, S. (2000). Initiation of nucleolar assembly is independent of RNA polymerase I transcription. *Mol Biol Cell* 11, 2705-2717.

Dragon, F., Gallagher, J.E., Compagnone-Post, P.A., Mitchell, B.M., Porwancher, K.A., Wehner, K.A., Wormsley, S., Settlege, R.E., Shabanowitz, J., Osheim, Y., *et al.* (2002). A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature* 417, 967-970.

Draptchinskaia, N., Gustavsson, P., Andersson, B., Pettersson, M., Willig, T.N., Dianzani, I., Ball, S., Tchernia, G., Klar, J., Matsson, H., *et al.* (1999). The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nat Genet* 21, 169-175.

Dundr, M., and Olson, M.O. (1998). Partially processed pre-rRNA is preserved in association with processing components in nucleolus-derived foci during mitosis. *Mol Biol Cell* 9, 2407-2422.

Dziembowski, A., Lorentzen, E., Conti, E., and Seraphin, B. (2007). A single subunit, Dis3, is essentially responsible for yeast exosome core activity. *Nat Struct Mol Biol* 14, 15-22.

## E

Ebert, B.L., Pretz, J., Bosco, J., Chang, C.Y., Tamayo, P., Galili, N., Raza, A., Root, D.E., Attar, E., Ellis, S.R., *et al.* (2008). Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature* 451, 335-339.

Eichler, D.C., and Craig, N. (1994). Processing of eukaryotic ribosomal RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 49, 197-239.

Eilers, M., Schirm, S., and Bishop, J.M. (1991). The MYC protein activates transcription of the alpha-prothymosin gene. *EMBO J* 10, 133-141.

Eisenhaber, F., Wechselberger, C., and Kreil, G. (2001). The Brix domain protein family -- a key to the ribosomal biogenesis pathway? *Trends Biochem Sci* 26, 345-347.

Elela, S.A., Igel, H., and Ares, M., Jr. (1996). RNase III cleaves eukaryotic preribosomal RNA at a U3 snoRNP-dependent site. *Cell* 85, 115-124.

## F

Fang, F., Hoskins, J., and Butler, J.S. (2004). 5-fluorouracil enhances exosome-dependent accumulation of polyadenylated rRNAs. *Mol Cell Biol* 24, 10766-10776.

Fatica, A., Cronshaw, A.D., Dlakic, M., and Tollervey, D. (2002). Ssf1p prevents premature processing of an early pre-60S ribosomal particle. *Mol Cell* 9, 341-351.

Fontoura, B.M., Sorokina, E.A., David, E., and Carroll, R.B. (1992). p53 is covalently linked to 5.8S rRNA. *Mol Cell Biol* 12, 5145-5151.

Fuchs, S.Y., Adler, V., Buschmann, T., Wu, X., and Ronai, Z. (1998). Mdm2 association with p53 targets its ubiquitination. *Oncogene* 17, 2543-2547.

Fumagalli, S., Di Cara, A., Neb-Gulati, A., Natt, F., Schwemberger, S., Hall, J., Babcock, G.F., Bernardi, R., Pandolfi, P.P., and Thomas, G. (2009). Absence of nucleolar disruption after impairment of 40S ribosome biogenesis reveals an rpL11-translation-dependent mechanism of p53 induction. *Nat Cell Biol* 11, 501-508.

## G

Gallagher, J.E., Dunbar, D.A., Granneman, S., Mitchell, B.M., Osheim, Y., Beyer, A.L., and Baserga, S.J. (2004). RNA polymerase I transcription and pre-rRNA processing are linked by specific SSU processome components. *Genes Dev* 18, 2506-2517.

Ganot, P., Bortolin, M.L., and Kiss, T. (1997). Site-specific pseudouridine formation in preribosomal RNA is guided by small nucleolar RNAs. *Cell* 89, 799-809.

Gautier, T., Berges, T., Tollervey, D., and Hurt, E. (1997). Nucleolar KKE/D repeat proteins Nop56p and Nop58p interact with Nop1p and are required for ribosome biogenesis. *Mol Cell Biol* 17, 7088-7098.

Gavin, A.C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.M., Cruciat, C.M., *et al.* (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415, 141-147.

Geerlings, T.H., Vos, J.C., and Raue, H.A. (2000). The final step in the formation of 25S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae* is performed by 5'-->3' exonucleases. *RNA* 6, 1698-1703.

Gerbi, S.A., Borovjagin, A.V., and Lange, T.S. (2003). The nucleolus: a site of ribonucleoprotein maturation. *Curr Opin Cell Biol* 15, 318-325.

Ghoshal, K., and Jacob, S.T. (1994). Specific inhibition of pre-ribosomal RNA processing in extracts from the lymphosarcoma cells treated with 5-fluorouracil. *Cancer Res* 54, 632-636.

Greenman, C., Stephens, P., Smith, R., Dalgliesh, G.L., Hunter, C., Bignell, G., Davies, H., Teague, J., Butler, A., Stevens, C., *et al.* (2007). Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 446, 153-158.

Gregory, M.A., and Hann, S.R. (2000). c-Myc proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway: stabilization of c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. *Mol Cell Biol* 20, 2423-2435.

Grimm, T., Holzel, M., Rohrmoser, M., Harasim, T., Malamoussi, A., Gruber-Eber, A., Kremmer, E., and Eick, D. (2006). Dominant-negative Pes1 mutants inhibit ribosomal RNA processing and cell proliferation via incorporation into the PeBoW-complex. *Nucleic Acids Res* 34, 3030-3043.

Grummt, I. (1999). Regulation of mammalian ribosomal gene transcription by RNA polymerase I. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 62, 109-154.

Grummt, I., Smith, V.A., and Grummt, F. (1976). Amino acid starvation affects the initiation frequency of nucleolar RNA polymerase. *Cell* 7, 439-445.

Guo, Q.M., Malek, R.L., Kim, S., Chiao, C., He, M., Ruffy, M., Sanka, K., Lee, N.H., Dang, C.V., and Liu, E.T. (2000). Identification of c-myc responsive genes using rat cDNA microarray. *Cancer Res* 60, 5922-5928.

## H

Hadjiolova, K.V., Nicoloso, M., Mazan, S., Hadjiolov, A.A., and Bachellerie, J.P. (1993). Alternative pre-rRNA processing pathways in human cells and their alteration by cycloheximide inhibition of protein synthesis. *Eur J Biochem* 212, 211-215.

Hannan, K.M., Kennedy, B.K., Cavanaugh, A.H., Hannan, R.D., Hirschler-Laszkiewicz, I., Jefferson, L.S., and Rothblum, L.I. (2000). RNA polymerase I transcription in confluent cells: Rb downregulates rDNA transcription during confluence-induced cell cycle arrest. *Oncogene* 19, 3487-3497.

Harnpicharnchai, P., Jakovljevic, J., Horsey, E., Miles, T., Roman, J., Rout, M., Meagher, D., Imai, B., Guo, Y., Brame, C.J., *et al.* (2001). Composition and functional characterization of yeast 66S ribosome assembly intermediates. *Mol Cell* 8, 505-515.

Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., and Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387, 296-299.

Hayano, T., Yanagida, M., Yamauchi, Y., Shinkawa, T., Isobe, T., and Takahashi, N. (2003). Proteomic analysis of human Nop56p-associated pre-ribosomal ribonucleoprotein complexes. Possible link between Nop56p and the nucleolar protein treacle responsible for Treacher Collins syndrome. *J Biol Chem* 278, 34309-34319.

Heiss, N.S., Knight, S.W., Vulliamy, T.J., Klauck, S.M., Wiemann, S., Mason, P.J., Poustka, A., and Dokal, I. (1998). X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions. *Nat Genet* 19, 32-38.

Henras, A.K., Bertrand, E., and Chanfreau, G. (2004). A cotranscriptional model for 3'-end processing of the *Saccharomyces cerevisiae* pre-ribosomal RNA precursor. *RNA* 10, 1572-1585.

Henras, A.K., Soudet, J., Gerus, M., Lebaron, S., Caizergues-Ferrer, M., Mougin, A., and Henry, Y. (2008). The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. *Cell Mol Life Sci* 65, 2334-2359.

Henriksson, M., and Luscher, B. (1996). Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation. *Adv Cancer Res* 68, 109-182.

Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G.D., Moore, L., Adams, S.L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K., *et al.* (2002). Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* 415, 180-183.

Holzel, M., Orban, M., Hochstatter, J., Rohrmoser, M., Harasim, T., Malamoussi, A., Kremmer, E., Langst, G., and Eick, D. (2010a). Defects in 18 S or 28 S rRNA processing activate the p53 pathway. *J Biol Chem* 285, 6364-6370.

Holzel, M., Burger, K., Muhl, B., Orban, M., Kellner, M., and Eick, D. (2010b). The tumor suppressor p53 connects ribosome biogenesis to cell cycle control: a double-edged sword. *Oncotarget* 1, 43-47.

Holzel, M., Grimm, T., Rohrmoser, M., Malamoussi, A., Harasim, T., Gruber-Eber, A., Kremmer, E., and Eick, D. (2007a). The BRCT domain of mammalian Pes1 is crucial for nucleolar localization and rRNA processing. *Nucleic Acids Res* 35, 789-800.

Holzel, M., Rohrmoser, M., Orban, M., Homig, C., Harasim, T., Malamoussi, A., Gruber-Eber, A., Heissmeyer, V., Bornkamm, G., and Eick, D. (2007b). Rapid conditional knock-down-knock-in system for mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 35, e17.

Holzel, M., Rohrmoser, M., Schlee, M., Grimm, T., Harasim, T., Malamoussi, A., Gruber-Eber, A., Kremmer, E., Hiddemann, W., Bornkamm, G.W., *et al.* (2005). Mammalian WDR12 is a novel member of the Pes1-Bop1 complex and is required for ribosome biogenesis and cell proliferation. *J Cell Biol* 170, 367-378.

Honda, R., Tanaka, H., and Yasuda, H. (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* 420, 25-27.

Horn, H.F., and Vousden, K.H. (2008). Cooperation between the ribosomal proteins L5 and L11 in the p53 pathway. *Oncogene* 27, 5774-5784.

Hu, C.D., Chinenov, Y., and Kerppola, T.K. (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell* 9, 789-798.

Hughes, J.M., and Ares, M., Jr. (1991). Depletion of U3 small nucleolar RNA inhibits cleavage in the 5' external transcribed spacer of yeast pre-ribosomal RNA and impairs formation of 18S ribosomal RNA. *EMBO J* 10, 4231-4239.

## I

Itahana, K., Bhat, K.P., Jin, A., Itahana, Y., Hawke, D., Kobayashi, R., and Zhang, Y. (2003). Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Mol Cell* 12, 1151-1164.

**J**

Jacobson, M.R., and Pederson, T. (1998). Localization of signal recognition particle RNA in the nucleolus of mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7981-7986.

Jansen, R.P., Hurt, E.C., Kern, H., Lehtonen, H., Carmo-Fonseca, M., Lapeyre, B., and Tollervey, D. (1991). Evolutionary conservation of the human nucleolar protein fibrillarin and its functional expression in yeast. *J Cell Biol* 113, 715-729.

Jantzen, H.M., Admon, A., Bell, S.P., and Tjian, R. (1990). Nucleolar transcription factor hUBF contains a DNA-binding motif with homology to HMG proteins. *Nature* 344, 830-836.

Jin, A., Itahana, K., O'Keefe, K., and Zhang, Y. (2004). Inhibition of HDM2 and activation of p53 by ribosomal protein L23. *Mol Cell Biol* 24, 7669-7680.

**K**

Kadaba, S., Krueger, A., Trice, T., Krecic, A.M., Hinnebusch, A.G., and Anderson, J. (2004). Nuclear surveillance and degradation of hypomodified initiator tRNA<sup>Met</sup> in *S. cerevisiae*. *Genes Dev* 18, 1227-1240.

Kihm, A.J., Hershey, J.C., Haystead, T.A., Madsen, C.S., and Owens, G.K. (1998). Phosphorylation of the rRNA transcription factor upstream binding factor promotes its association with TATA binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14816-14820.

Kim, J., and Hirsch, J.P. (1998). A nucleolar protein that affects mating efficiency in *Saccharomyces cerevisiae* by altering the morphological response to pheromone. *Genetics* 149, 795-805.

Kiss-Laszlo, Z., Henry, Y., Bachellerie, J.P., Caizergues-Ferrer, M., and Kiss, T. (1996). Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs. *Cell* 85, 1077-1088.

Klein, J., and Grummt, I. (1999). Cell cycle-dependent regulation of RNA polymerase I transcription: the nucleolar transcription factor UBF is inactive in mitosis and early G1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6096-6101.

Korgaonkar, C., Hagen, J., Tompkins, V., Frazier, A.A., Allamargot, C., Quelle, F.W., and Quelle, D.E. (2005). Nucleophosmin (B23) targets ARF to nucleoli and inhibits its function. *Mol Cell Biol* 25, 1258-1271.

Kos, M., and Tollervey, D. (2010). Yeast pre-rRNA processing and modification occur cotranscriptionally. *Mol Cell* 37, 809-820.

Krogan, N.J., Peng, W.T., Cagney, G., Robinson, M.D., Haw, R., Zhong, G., Guo, X., Zhang, X., Canadien, V., Richards, D.P., *et al.* (2004). High-definition macromolecular composition of yeast RNA-processing complexes. *Mol Cell* 13, 225-239.

Kruse, J.P., and Gu, W. (2009). Modes of p53 regulation. *Cell* 137, 609-622.

Kubbutat, M.H., Jones, S.N., and Vousden, K.H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387, 299-303.

Kufel, J., Dichtl, B., and Tollervey, D. (1999). Yeast Rnt1p is required for cleavage of the pre-ribosomal RNA in the 3' ETS but not the 5' ETS. *RNA* 5, 909-917.

Kurki, S., Peltonen, K., Latonen, L., Kiviharju, T.M., Ojala, P.M., Meek, D., and Laiho, M. (2004). Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation. *Cancer Cell* 5, 465-475.

Kussie, P.H., Gorina, S., Marechal, V., Elenbaas, B., Moreau, J., Levine, A.J., and Pavletich, N.P. (1996). Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science* 274, 948-953.

## L

LaCava, J., Houseley, J., Saveanu, C., Petfalski, E., Thompson, E., Jacquier, A., and Tollervey, D. (2005). RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell* 121, 713-724.

Lai, Z., Auger, K.R., Manubay, C.M., and Copeland, R.A. (2000). Thermodynamics of p53 binding to hdm2(1-126): effects of phosphorylation and p53 peptide length. *Arch Biochem Biophys* 381, 278-284.

Lane, D.P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15-16.

Langdon, W.Y., Harris, A.W., Cory, S., and Adams, J.M. (1986). The c-myc oncogene perturbs B lymphocyte development in E-mu-myc transgenic mice. *Cell* 47, 11-18.

Lapik, Y.R., Fernandes, C.J., Lau, L.F., and Pestov, D.G. (2004). Physical and functional interaction between Pes1 and Bop1 in mammalian ribosome biogenesis. *Mol Cell* 15, 17-29.

Lawrence, R.J., Earley, K., Pontes, O., Silva, M., Chen, Z.J., Neves, N., Viegas, W., and Pikaard, C.S. (2004). A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. *Mol Cell* 13, 599-609.

Leary, D.J., and Huang, S. (2001). Regulation of ribosome biogenesis within the nucleolus. *FEBS Lett* 509, 145-150.

Lebreton, A., Saveanu, C., Decourty, L., Rain, J.C., Jacquier, A., and Fromont-Racine, M. (2006). A functional network involved in the recycling of nucleocytoplasmic pre-60S factors. *J Cell Biol* 173, 349-360.

Lee, J.T., and Gu, W. (2010). The multiple levels of regulation by p53 ubiquitination. *Cell Death Differ* 17, 86-92.

Lee, S.J., and Baserga, S.J. (1999). Imp3p and Imp4p, two specific components of the U3 small nucleolar ribonucleoprotein that are essential for pre-18S rRNA processing. *Mol Cell Biol* 19, 5441-5452.

Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643-649.

Levy, S., Avni, D., Hariharan, N., Perry, R.P., and Meyuhas, O. (1991). Oligopyrimidine tract at the 5' end of mammalian ribosomal protein mRNAs is required for their translational control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3319-3323.

Li, H.D., Zagorski, J., and Fournier, M.J. (1990). Depletion of U14 small nuclear RNA (snR128) disrupts production of 18S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 10, 1145-1152.

Li, Z., Van Calcar, S., Qu, C., Cavenee, W.K., Zhang, M.Q., and Ren, B. (2003). A global transcriptional regulatory role for c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8164-8169.

Lindstrom, M.S., Jin, A., Deisenroth, C., White Wolf, G., and Zhang, Y. (2007). Cancer-associated mutations in the MDM2 zinc finger domain disrupt ribosomal protein interaction and attenuate MDM2-induced p53 degradation. *Mol Cell Biol* 27, 1056-1068.

Liu, Q., Greimann, J.C., and Lima, C.D. (2006). Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome. *Cell* 127, 1223-1237.

Ljungman, M. (2000). Dial 9-1-1 for p53: mechanisms of p53 activation by cellular stress. *Neoplasia* 2, 208-225.

Lohrum, M.A., Ludwig, R.L., Kubbutat, M.H., Hanlon, M., and Vousden, K.H. (2003). Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11. *Cancer Cell* 3, 577-587.

Ludwig, R.L., Bates, S., and Vousden, K.H. (1996). Differential activation of target cellular promoters by p53 mutants with impaired apoptotic function. *Mol Cell Biol* 16, 4952-4960.

Lum, P.Y., Armour, C.D., Stepaniants, S.B., Cavet, G., Wolf, M.K., Butler, J.S., Hinshaw, J.C., Garnier, P., Prestwich, G.D., Leonardson, A., *et al.* (2004). Discovering modes of action for therapeutic compounds using a genome-wide screen of yeast heterozygotes. *Cell* 116, 121-137.

## M

Ma, H., and Pederson, T. (2008). Nucleophosmin is a binding partner of nucleostemin in human osteosarcoma cells. *Mol Biol Cell* 19, 2870-2875.

Macias, E., Jin, A., Deisenroth, C., Bhat, K., Mao, H., Lindstrom, M.S., and Zhang, Y. (2010). An ARF-independent c-MYC-activated tumor suppression pathway mediated by ribosomal protein-Mdm2 Interaction. *Cancer Cell* 18, 231-243.

Malamoussi, A. (2008). Peter Pan, a new link between ribosome biogenesis and cell cycle control. Dissertation, LMU München: Fakultät für Biologie; Signatur der gedruckten Ausgabe: 0001/UMC 19169

Marechal, V., Elenbaas, B., Piette, J., Nicolas, J.C., and Levine, A.J. (1994). The ribosomal L5 protein is associated with mdm-2 and mdm-2-p53 complexes. *Mol Cell Biol* 14, 7414-7420.

Marinkovic, D., Marinkovic, T., Kokai, E., Barth, T., Moller, P., and Wirth, T. (2004). Identification of novel Myc target genes with a potential role in lymphomagenesis. *Nucleic Acids Res* 32, 5368-5378.

Mayer, C., Schmitz, K.M., Li, J., Grummt, I., and Santoro, R. (2006). Intergenic transcripts regulate the epigenetic state of rRNA genes. *Mol Cell* 22, 351-361.

McStay, B., and Grummt, I. (2008). The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24, 131-157.

Mekhail, K., Khacho, M., Carrigan, A., Hache, R.R., Gunaratnam, L., and Lee, S. (2005). Regulation of ubiquitin ligase dynamics by the nucleolus. *J Cell Biol* 170, 733-744.

Melese, T., and Xue, Z. (1995). The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. *Curr Opin Cell Biol* 7, 319-324.

Michot, B., Bachellerie, J.P., and Raynal, F. (1983). Structure of mouse rRNA precursors. Complete sequence and potential folding of the spacer regions between 18S and 28S rRNA. *Nucleic Acids Res* 11, 3375-3391.

Migeon, J.C., Garfinkel, M.S., and Edgar, B.A. (1999). Cloning and characterization of *peter pan*, a novel *Drosophila* gene required for larval growth. *Mol Biol Cell* 10, 1733-1744.

Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M., and Tollervey, D. (1997). The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases. *Cell* 91, 457-466.

Mitchell, P., and Tollervey, D. (2003). An NMD pathway in yeast involving accelerated deadenylation and exosome-mediated 3'→5' degradation. *Mol Cell* 11, 1405-1413.

Morrissey, J.P., and Tollervey, D. (1993). Yeast snR30 is a small nucleolar RNA required for 18S rRNA synthesis. *Mol Cell Biol* 13, 2469-2477.

## O

Ofir-Rosenfeld, Y., Boggs, K., Michael, D., Kastan, M.B., and Oren, M. (2008). Mdm2 regulates p53 mRNA translation through inhibitory interactions with ribosomal protein L26. *Mol Cell* 32, 180-189.

Olson, M.O. (2004). Sensing cellular stress: another new function for the nucleolus? *Sci STKE* 2004, pe10.

Orban, T.I., and Izaurralde, E. (2005). Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *RNA* 11, 459-469.

Osheim, Y.N., French, S.L., Keck, K.M., Champion, E.A., Spasov, K., Dragon, F., Baserga, S.J., and Beyer, A.L. (2004). Pre-18S ribosomal RNA is structurally compacted into the SSU processome prior to being cleaved from nascent transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* 16, 943-954.

## P

Peculis, B.A. (1997). The sequence of the 5' end of the U8 small nucleolar RNA is critical for 5.8S and 28S rRNA maturation. *Mol Cell Biol* 17, 3702-3713.

Peculis, B.A., and Steitz, J.A. (1993). Disruption of U8 nucleolar snRNA inhibits 5.8S and 28S rRNA processing in the *Xenopus* oocyte. *Cell* 73, 1233-1245.

Peculis, B.A., and Steitz, J.A. (1994). Sequence and structural elements critical for U8 snRNP function in *Xenopus* oocytes are evolutionarily conserved. *Genes Dev* 8, 2241-2255.

## R

Reeves, R., and Nissen, M.S. (1990). The A.T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide motif for recognizing DNA structure. *J Biol Chem* 265, 8573-8582.

Riley, K.J., and Maher, L.J., 3rd (2007). p53 RNA interactions: new clues in an old mystery. *RNA* 13, 1825-1833.

Rohrmoser, M., Holzel, M., Grimm, T., Malamoussi, A., Harasim, T., Orban, M., Pfisterer, I., Gruber-Eber, A., Kremmer, E., and Eick, D. (2007). Interdependence of Pes1, Bop1, and WDR12 controls nucleolar localization and assembly of the PeBoW complex required for maturation of the 60S ribosomal subunit. *Mol Cell Biol* 27, 3682-3694.

Romanova, L., Grand, A., Zhang, L., Rayner, S., Katoku-Kikyo, N., Kellner, S., and Kikyo, N. (2009). Critical role of nucleostemin in pre-rRNA processing. *J Biol Chem* 284, 4968-4977.

Rubbi, C.P., and Milner, J. (2003). Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. *EMBO J* 22, 6068-6077.

Ruggero, D., Grisendi, S., Piazza, F., Rego, E., Mari, F., Rao, P.H., Cordon-Cardo, C., and Pandolfi, P.P. (2003). Dyskeratosis congenita and cancer in mice deficient in ribosomal RNA modification. *Science* 299, 259-262.

Ruggero, D., and Pandolfi, P.P. (2003). Does the ribosome translate cancer? *Nat Rev Cancer* 3, 179-192.

## S

Sakaguchi, K., Herrera, J.E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C.W., and Appella, E. (1998). DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev* 12, 2831-2841.

Saveanu, C., Bienvenu, D., Namane, A., Gleizes, P.E., Gas, N., Jacquier, A., and Fromont-Racine, M. (2001). Nog2p, a putative GTPase associated with pre-60S subunits and required for late 60S maturation steps. *EMBO J* 20, 6475-6484.

Savino, T.M., Bastos, R., Jansen, E., and Hernandez-Verdun, D. (1999). The nucleolar antigen Nop52, the human homologue of the yeast ribosomal RNA processing RRP1, is recruited at late stages of nucleologenesis. *J Cell Sci* 112 (Pt 12), 1889-1900.

- Savkur, R.S., and Olson, M.O. (1998). Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease. *Nucleic Acids Res* 26, 4508-4515.
- Saxena, A., Rorie, C.J., Dimitrova, D., Daniely, Y., and Borowiec, J.A. (2006). Nucleolin inhibits Hdm2 by multiple pathways leading to p53 stabilization. *Oncogene* 25, 7274-7288.
- Scheffner, M. (1998). Ubiquitin, E6-AP, and their role in p53 inactivation. *Pharmacol Ther* 78, 129-139.
- Schilders, G., Raijmakers, R., Raats, J.M., and Pruijn, G.J. (2005). MPP6 is an exosome-associated RNA-binding protein involved in 5.8S rRNA maturation. *Nucleic Acids Res* 33, 6795-6804.
- Schilders, G., van Dijk, E., and Pruijn, G.J. (2007). C1D and hMtr4p associate with the human exosome subunit PM/Sc1-100 and are involved in pre-rRNA processing. *Nucleic Acids Res* 35, 2564-2572.
- Schlosser, I., Holzel, M., Murnseer, M., Burtscher, H., Weidle, U.H., and Eick, D. (2003). A role for c-Myc in the regulation of ribosomal RNA processing. *Nucleic Acids Res* 31, 6148-6156.
- Schon, O., Friedler, A., Bycroft, M., Freund, S.M., and Fersht, A.R. (2002). Molecular mechanism of the interaction between MDM2 and p53. *J Mol Biol* 323, 491-501.
- Schuhmacher, M., Kohlhuber, F., Holzel, M., Kaiser, C., Burtscher, H., Jarsch, M., Bornkamm, G.W., Laux, G., Polack, A., Weidle, U.H., *et al.* (2001). The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc. *Nucleic Acids Res* 29, 397-406.
- Sekiguchi, T., Hayano, T., Yanagida, M., Takahashi, N., and Nishimoto, T. (2006). NOP132 is required for proper nucleolus localization of DEAD-box RNA helicase DDX47. *Nucleic Acids Res* 34, 4593-4608.
- Shav-Tal, Y., Blechman, J., Darzacq, X., Montagna, C., Dye, B.T., Patton, J.G., Singer, R.H., and Zipori, D. (2005). Dynamic sorting of nuclear components into distinct nucleolar caps during transcriptional inhibition. *Mol Biol Cell* 16, 2395-2413.
- Shcherbik, N., Wang, M., Lapik, Y.R., Srivastava, L., and Pestov, D.G. Polyadenylation and degradation of incomplete RNA polymerase I transcripts in mammalian cells. *EMBO Rep* 11, 106-111.
- Shou, W., Seol, J.H., Shevchenko, A., Baskerville, C., Moazed, D., Chen, Z.W., Jang, J., Charbonneau, H., and Deshaies, R.J. (1999). Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. *Cell* 97, 233-244.
- Sirri, V., Roussel, P., and Hernandez-Verdun, D. (2000). In vivo release of mitotic silencing of ribosomal gene transcription does not give rise to precursor ribosomal RNA processing. *J Cell Biol* 148, 259-270.

Sirri, V., Urcuqui-Inchima, S., Roussel, P., and Hernandez-Verdun, D. (2008). Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochem Cell Biol* 129, 13-31.

Slomovic, S., Laufer, D., Geiger, D., and Schuster, G. (2006). Polyadenylation of ribosomal RNA in human cells. *Nucleic Acids Res* 34, 2966-2975.

Srivastava, L., Lapik, Y.R., Wang, M., and Pestov, D.G. Mammalian DEAD box protein Ddx51 acts in 3' end maturation of 28S rRNA by promoting the release of U8 snoRNA. *Mol Cell Biol* 30, 2947-2956.

Stavreva, D.A., Kawasaki, M., Dundr, M., Koberna, K., Muller, W.G., Tsujimura-Takahashi, T., Komatsu, W., Hayano, T., Isobe, T., Raska, I., *et al.* (2006). Potential roles for ubiquitin and the proteasome during ribosome biogenesis. *Mol Cell Biol* 26, 5131-5145.

Stefanovsky, V.Y., Pelletier, G., Hannan, R., Gagnon-Kugler, T., Rothblum, L.I., and Moss, T. (2001). An immediate response of ribosomal transcription to growth factor stimulation in mammals is mediated by ERK phosphorylation of UBF. *Mol Cell* 8, 1063-1073.

Strausberg, R.L., Feingold, E.A., Grouse, L.H., Derge, J.G., Klausner, R.D., Collins, F.S., Wagner, L., Shenmen, C.M., Schuler, G.D., Altschul, S.F., *et al.* (2002). Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 16899-16903.

Strezoska, Z., Pestov, D.G., and Lau, L.F. (2000). Bop1 is a mouse WD40 repeat nucleolar protein involved in 28S and 5. 8S rRNA processing and 60S ribosome biogenesis. *Mol Cell Biol* 20, 5516-5528.

Strezoska, Z., Pestov, D.G., and Lau, L.F. (2002). Functional inactivation of the mouse nucleolar protein Bop1 inhibits multiple steps in pre-rRNA processing and blocks cell cycle progression. *J Biol Chem* 277, 29617-29625.

Sugimoto, M., Kuo, M.L., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. (2003). Nucleolar Arf tumor suppressor inhibits ribosomal RNA processing. *Mol Cell* 11, 415-424.

Sun, X.X., Dai, M.S., and Lu, H. (2007). 5-fluorouracil activation of p53 involves an MDM2-ribosomal protein interaction. *J Biol Chem* 282, 8052-8059.

Sun, X.X., DeVine, T., Challagundla, K.B., and Dai, M.S. (2011). Interplay between ribosomal protein S27a and MDM2 protein in p53 activation in response to ribosomal stress. *J Biol Chem* 286, 22730-22741.

Sutcliffe, J.E., Brown, T.R., Allison, S.J., Scott, P.H., and White, R.J. (2000). Retinoblastoma protein disrupts interactions required for RNA polymerase III transcription. *Mol Cell Biol* 20, 9192-9202.

## T

Takahashi, S., Araki, Y., Sakuno, T., and Katada, T. (2003). Interaction between Ski7p and Upf1p is required for nonsense-mediated 3'-to-5' mRNA decay in yeast. *EMBO J* 22, 3951-3959.

Tao, W., and Levine, A.J. (1999). P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6937-6941.

Thiry, M., and Lafontaine, D.L. (2005). Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. *Trends Cell Biol* 15, 194-199.

Toledo, F., and Wahl, G.M. (2006). Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer* 6, 909-923.

Tollervey, D. (1996). Small nucleolar RNAs guide ribosomal RNA methylation. *Science* 273, 1056-1057.

Tollervey, D., Lehtonen, H., Carmo-Fonseca, M., and Hurt, E.C. (1991). The small nucleolar RNP protein NOP1 (fibrillarin) is required for pre-rRNA processing in yeast. *EMBO J* 10, 573-583.

Tomecki, R., Kristiansen, M.S., Lykke-Andersen, S., Chlebowski, A., Larsen, K.M., Szczesny, R.J., Drazkowska, K., Pastula, A., Andersen, J.S., Stepien, P.P., *et al.* (2010). The human core exosome interacts with differentially localized processive RNases: hDIS3 and hDIS3L. *EMBO J* 29, 2342-2357.

Tomlinson, R.L., Ziegler, T.D., Supakorndej, T., Terns, R.M., and Terns, M.P. (2006). Cell cycle-regulated trafficking of human telomerase to telomeres. *Mol Biol Cell* 17, 955-965.

Tsai, R.Y., and McKay, R.D. (2005). A multistep, GTP-driven mechanism controlling the dynamic cycling of nucleostemin. *J Cell Biol* 168, 179-184.

Tschochner, H., and Hurt, E. (2003). Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol* 13, 255-263.

Tuan, J.C., Zhai, W., and Comai, L. (1999). Recruitment of TATA-binding protein-TAFI complex SL1 to the human ribosomal DNA promoter is mediated by the carboxy-terminal activation domain of upstream binding factor (UBF) and is regulated by UBF phosphorylation. *Mol Cell Biol* 19, 2872-2879.

Tucker, S., Vitins, A., and Pikaard, C.S. (2010). Nucleolar dominance and ribosomal RNA gene silencing. *Curr Opin Cell Biol* 22, 351-356.

## V

van Dijk, E.L., Schilders, G., and Pruijn, G.J. (2007). Human cell growth requires a functional cytoplasmic exosome, which is involved in various mRNA decay pathways. *RNA* 13, 1027-1035.

van Hoof, A., Lennertz, P., and Parker, R. (2000). Yeast exosome mutants accumulate 3'-extended polyadenylated forms of U4 small nuclear RNA and small nucleolar RNAs. *Mol Cell Biol* 20, 441-452.

Vanacova, S., Wolf, J., Martin, G., Blank, D., Dettwiler, S., Friedlein, A., Langen, H., Keith, G., and Keller, W. (2005). A new yeast poly(A) polymerase complex involved in RNA quality control. *PLoS Biol* 3, e189.

Vasiljeva, L., and Buratowski, S. (2006). Nrd1 interacts with the nuclear exosome for 3' processing of RNA polymerase II transcripts. *Mol Cell* 21, 239-248.

Venema, J., and Tollervey, D. (1999). Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* 33, 261-311.

Visintin, R., Craig, K., Hwang, E.S., Prinz, S., Tyers, M., and Amon, A. (1998). The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Mol Cell* 2, 709-718.

Voit, R., and Grummt, I. (2001). Phosphorylation of UBF at serine 388 is required for interaction with RNA polymerase I and activation of rDNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13631-13636.

Voit, R., Hoffmann, M., and Grummt, I. (1999). Phosphorylation by G1-specific cdk-cyclin complexes activates the nucleolar transcription factor UBF. *EMBO J* 18, 1891-1899.

Voit, R., Schafer, K., and Grummt, I. (1997). Mechanism of repression of RNA polymerase I transcription by the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* 17, 4230-4237.

Voit, R., Schnapp, A., Kuhn, A., Rosenbauer, H., Hirschmann, P., Stunnenberg, H.G., and Grummt, I. (1992). The nucleolar transcription factor mUBF is phosphorylated by casein kinase II in the C-terminal hyperacidic tail which is essential for transactivation. *EMBO J* 11, 2211-2218.

## W

Walter, P., and Johnson, A.E. (1994). Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol* 10, 87-119.

Warner, J.R. (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci* 24, 437-440.

Weber, J.D., Taylor, L.J., Roussel, M.F., Sherr, C.J., and Bar-Sagi, D. (1999). Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol* 1, 20-26.

Wehner, K.A., and Baserga, S.J. (2002). The sigma(70)-like motif: a eukaryotic RNA binding domain unique to a superfamily of proteins required for ribosome biogenesis. *Mol Cell* 9, 329-339.

Welch, P.J., Marcusson, E.G., Li, Q.X., Beger, C., Kruger, M., Zhou, C., Leavitt, M., Wong-Staal, F., and Barber, J.R. (2000). Identification and validation of a gene involved in anchorage-independent cell growth control using a library of randomized hairpin ribozymes. *Genomics* 66, 274-283.

White, R.J., Trouche, D., Martin, K., Jackson, S.P., and Kouzarides, T. (1996). Repression of RNA polymerase III transcription by the retinoblastoma protein. *Nature* 382, 88-90.

Wu, H., Xu, H., Miraglia, L.J., and Crooke, S.T. (2000). Human RNase III is a 160-kDa protein involved in preribosomal RNA processing. *J Biol Chem* 275, 36957-36965.

**X**

Xiong, X., Zhao, Y., He, H., and Sun, Y. (2011). Ribosomal protein S27-like and S27 interplay with p53-MDM2 axis as a target, a substrate and a regulator. *Oncogene* 30, 1798-1811.

**Y**

Yu, G.W., Rudiger, S., Veprintsev, D., Freund, S., Fernandez-Fernandez, M.R., and Fersht, A.R. (2006). The central region of HDM2 provides a second binding site for p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1227-1232.

Yu, H., Braun, P., Yildirim, M.A., Lemmens, I., Venkatesan, K., Sahalie, J., Hirozane-Kishikawa, T., Gebreab, F., Li, N., Simonis, N., *et al.* (2008). High-quality binary protein interaction map of the yeast interactome network. *Science* 322, 104-110.

Yu, Y., and Hirsch, J.P. (1995). An essential gene pair in *Saccharomyces cerevisiae* with a potential role in mating. *DNA Cell Biol* 14, 411-418.

Yuan, X., Zhao, J., Zentgraf, H., Hoffmann-Rohrer, U., and Grummt, I. (2002). Multiple interactions between RNA polymerase I, TIF-IA and TAF(I) subunits regulate preinitiation complex assembly at the ribosomal gene promoter. *EMBO Rep* 3, 1082-1087.

**Z**

Zhai, W., and Comai, L. (2000). Repression of RNA polymerase I transcription by the tumor suppressor p53. *Mol Cell Biol* 20, 5930-5938.

Zhang, J., Harnpicharnchai, P., Jakovljevic, J., Tang, L., Guo, Y., Oeffinger, M., Rout, M.P., Hiley, S.L., Hughes, T., and Woolford, J.L., Jr. (2007). Assembly factors Rpf2 and Rrs1 recruit 5S rRNA and ribosomal proteins rpL5 and rpL11 into nascent ribosomes. *Genes Dev* 21, 2580-2592.

Zhang, Y., and Lu, H. (2009). Signaling to p53: ribosomal proteins find their way. *Cancer Cell* 16, 369-377.

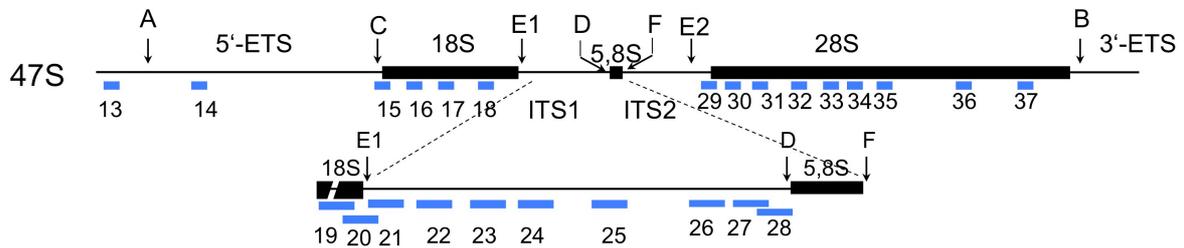
Zhang, Y., Wang, J., Yuan, Y., Zhang, W., Guan, W., Wu, Z., Jin, C., Chen, H., Zhang, L., Yang, X., *et al.* (2010). Negative regulation of HDM2 to attenuate p53 degradation by ribosomal protein L26. *Nucleic Acids Res* 38, 6544-6554.

Zhang, Y., Wolf, G.W., Bhat, K., Jin, A., Allio, T., Burkhart, W.A., and Xiong, Y. (2003). Ribosomal protein L11 negatively regulates oncoprotein MDM2 and mediates a p53-dependent ribosomal-stress checkpoint pathway. *Mol Cell Biol* 23, 8902-8912.

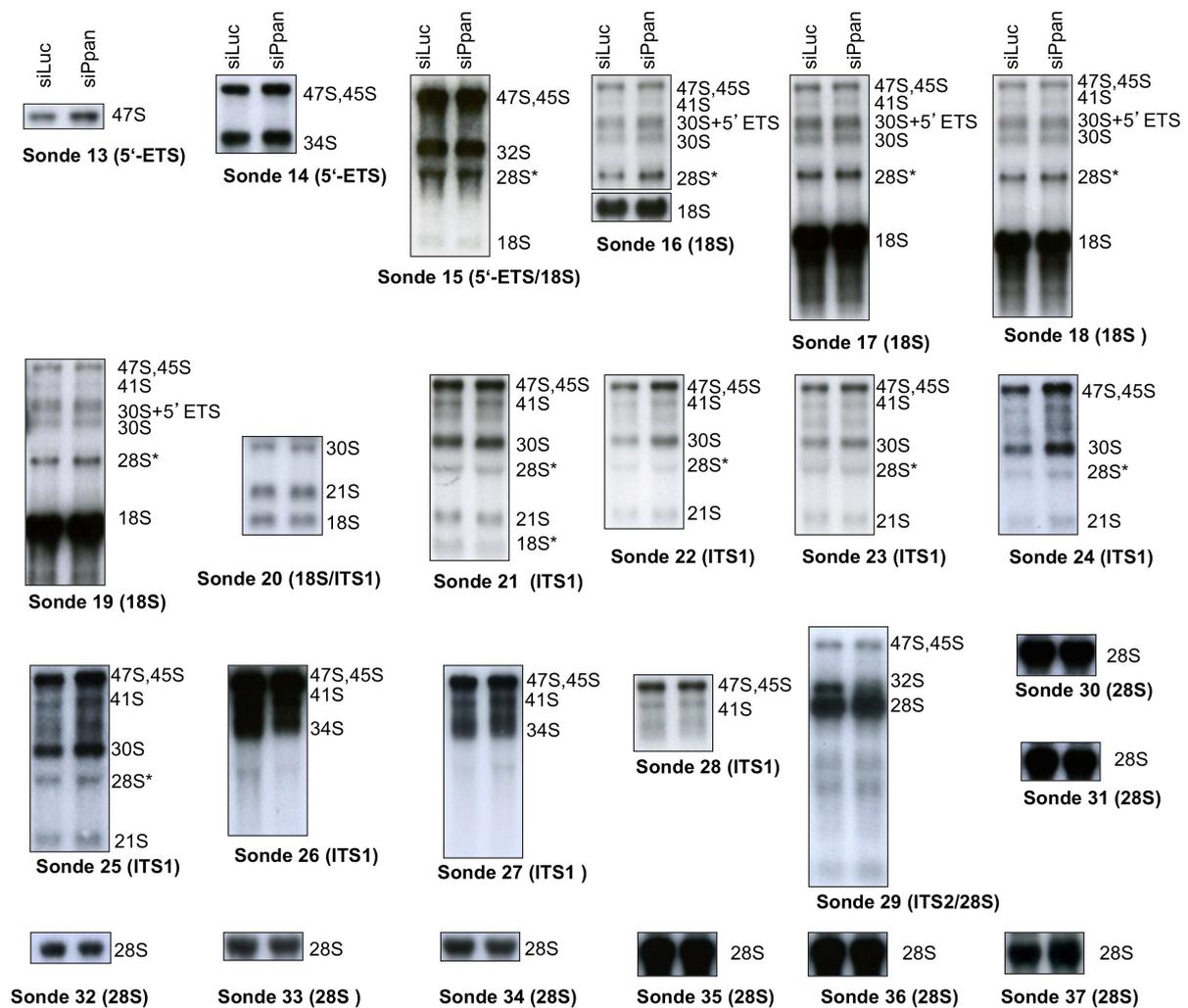
Zhu, Y., Poyurovsky, M.V., Li, Y., Biderman, L., Stahl, J., Jacq, X., and Prives, C. (2009). Ribosomal protein S7 is both a regulator and a substrate of MDM2. *Mol Cell* 35, 316-326.

## 6. Appendix

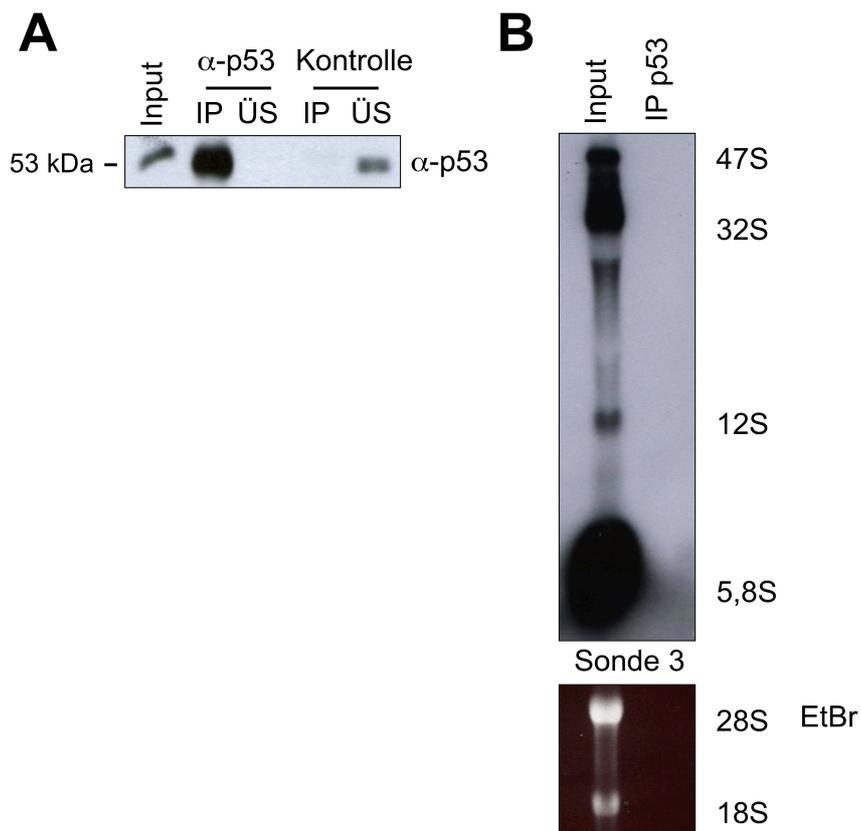
A



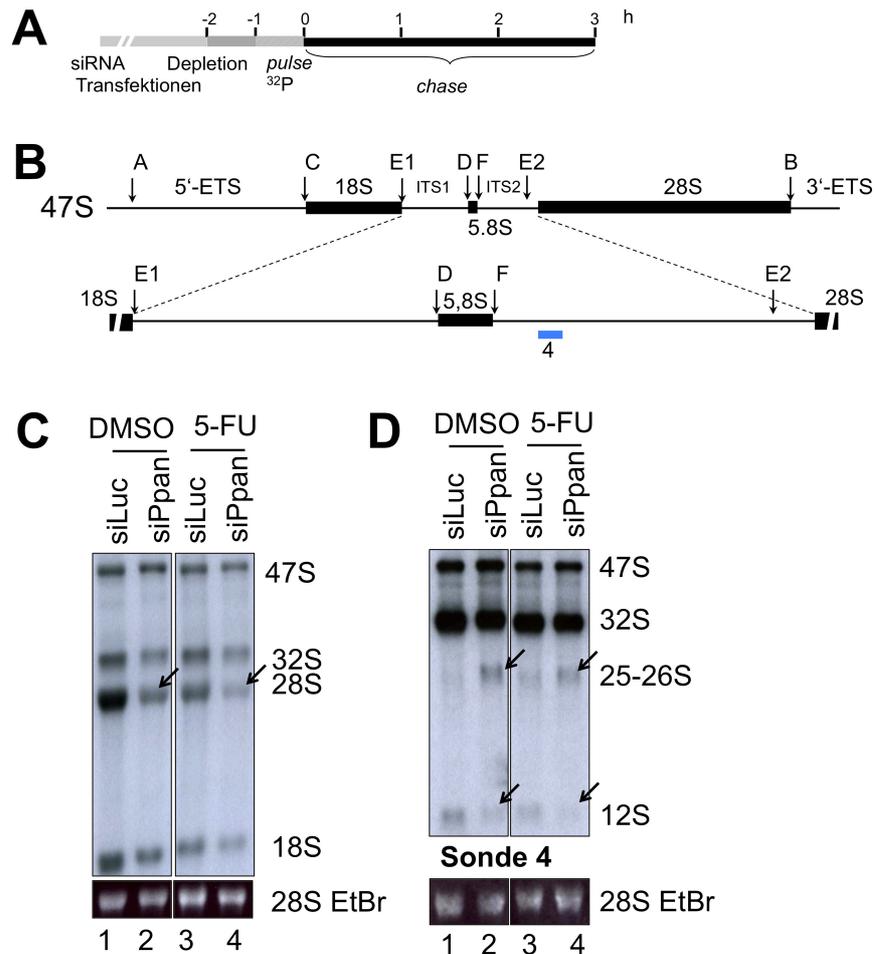
B



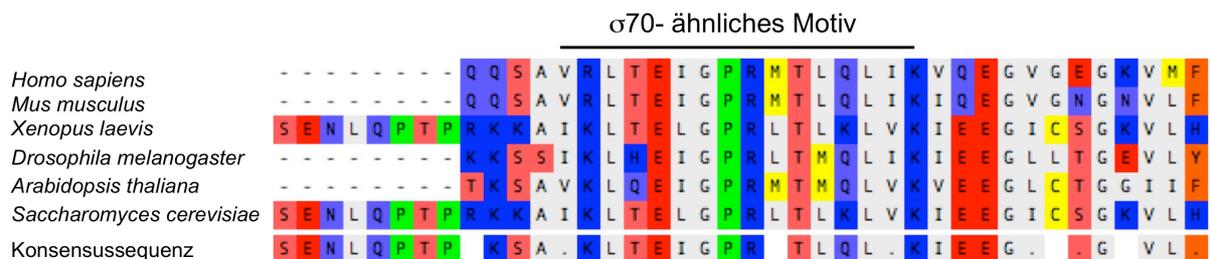
**Abb. A1. Northern-Blot-Analyse der rRNA von Ppan-depletierten U2OS-Zellen.** (A) Schema der 47S-Vorläufer-rRNA. Die Position der bei der Northern Blot-Hybridisierung verwendeten Oligonukleotidsonden (siehe Tab. 2) ist durch blaue Rechtecke markiert. Die großen Buchstaben zeigen Prozessierungsereignisse an. ITS steht für *internal transcribed spacer*, ETS für *external transcribed spacer*. (B) Northern Blot-Analyse von Gesamt-RNA von U2OS-Zellen, die mit Luc- oder Ppan- siRNA transfiziert wurden. Gleiche Mengen RNA wurden mit 5'-ETS- (Sonde 13-14), 18S- (Sonde 15-20), ITS1- (Sonde 21-28) und 28S- (Sonde 29-37) spezifischen Sonden hybridisiert (für die Sequenz der verwendeten Sonden siehe Tab. 2). (\*) unspezifische Hybridisierungsbanden.



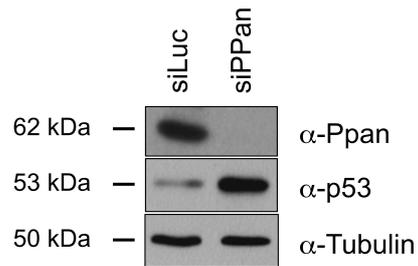
**Abb. A2. P53-Antikörper präzipitiert keine 5,8S rRNA.** (A) Mit U2OS-Zellen durchgeführte p53-IP (DO-1 Antikörper) präzipitiert p53. Als Kontrolle wurde mit dem  $\alpha$ -HA(3F10)-Antikörper präzipitiert. (B) 2 Mio. U2OS-Zellen wurden für die IP verwendet. Isolierte Gesamtzell-RNA wurde mit einer 5,8S-spezifischen Sonde (Sonde 3, siehe Tab. 2) untersucht. Es wurde der p53 DO-1 Antikörper verwendet.



**Abb. A3. 5-FU-Behandlung verstärkt den durch Ppan-knockdown verursachten rRNA-Prozessierungsdefekt.** (A) Schematische Darstellung des metabolischen Markierungsexperiments. Die U2OS-Zellen wurden 24 h nach einer siRNA-Doppeltransfektion 1 h mit [ $^{32}\text{P}$ ]-Orthophosphat markiert und anschließend 3 h lang in normalem DMEM-Medium inkubiert. (B) Schema der 47S-Vorläufer-rRNA. (C) Autoradiographie des metabolischen Markierungsexperiments. Die 28S-Ethidiumbromidbande dient als Ladekontrolle. (D) Northern Blot-Analyse von Gesamt-RNA. Gleiche Mengen RNA wurden mit einer ITS2-spezifischen Sonde (Sonde 4) markiert. Ethidiumbromid (EtBr)-gefärbte 28S-rRNA dient als Ladekontrolle.



**Abb. A4. Das eukaryotische σ70-ähnliche Motiv von Ppan ist konserviert.** Sequenz-Vergleich des σ70-ähnlichen Motivs. Die NCBI-Sequenz-Nummern für die Peptid-Sequenzen sind: *H. sapiens*, NP\_064615.3; *M. musculus*, NP\_663585.2; *X. laevis*, NP\_001191782.1; *D. melanogaster* NP\_476979.1; *A. thaliana*: NP\_851242.1; *S. cerevisiae*: NP\_011933.1.



**Abb. A5. Der *knockdown* von Ppan induziert p53.** Lysate von U2OS-Zellen nach siLuc bzw. siPpan-Transfektion wurden im Western-Blot untersucht. Es wurden die Antikörper  $\alpha$ -Ppan (1C3),  $\alpha$ -p53 (DO-1) und  $\alpha$ -Tubulin verwendet.

---

## 7. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Dirk Eick bedanken. Er gab mir die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu forschen und stand mir in aufschlussreichen wissenschaftlichen Diskussionen stets offen gegenüber.

Besonderer Dank gilt Dr. Anastassia Malamoussi, die mich in das Ppan-Projekt einführte, das Klonieren lehrte und für Fragen und Probleme immer ein offenes Ohr hatte. Ein herzliches Dankeschön auch an Kaspar Burger, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Außerdem danke ich allen Angehörigen und ehemaligen Angehörigen der AG-Eick, die mir sowohl bei technischen Problemen als auch bei wissenschaftlichen Fragestellungen weiterhalfen: Dr. Michaela Rohrmoser, Markus Kellner, Dr. Thomas Harasim, Mathias Orban, Svenja Groeneveld, Anita-Gruber-Eber, Dr. Martin Heidemann, Corinna Hintermair, Roland Schüller und Kirsten Voß. Danke für die schöne Zeit und gute Zusammenarbeit!

Frau Dr. Elisabeth Kremmer und Andrew Flatley danke ich für die Herstellung der Antikörper, die das Projekt ermöglicht haben.

Dankeschön auch an Dr. Gerhard Laux für die Hilfe bei radioaktiven Arbeiten und Dr. Manuel Deutsch, Dr. Bin Hu und Ilias Masouris für die Einführung in die Konfokalmikroskopie.

---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Vor- und Zuname: Bastian Mühl

Geburtsdatum: 14. Mai 1982

Geburtsort: Ebersberg

Familienstand: ledig

### Promotion

März 2008- Dez. 2011      Promotion am Institut für Klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik (AG Eick), Helmholtz Zentrum München  
Dissertation: „Die Rolle von Ppan in der Ribosomenbiogenese“

### Studium

Sept. 2002- Dez. 2007      Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Hauptfach: Genetik; Nebenfächer: Biochemie, Mikrobiologie  
Diplomarbeit im Fach Genetik in der AG Eick  
Abschluss: Diplom, Note: sehr gut (1,3)  
Diplomarbeit: „Wirkung von Chemotherapeutika auf die Ribosomenbiogenese“, Note: sehr gut (1,0)

### Wehrersatzdienst

Sept. 2001- Juni 2002      Zivildienst im OP-Bereich der Kreisklinik Ebersberg

### Hochschulreife

Sept. 1992- Aug. 2001      Gymnasium Grafing  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife, gut (2,1)

**Veröffentlichungen** Hölzel, M., Burger, K., **Mühl, B.**, Orban, M., Kellner, M., Eick, D. (2010b), The tumor suppressor p53 connects ribosome biogenesis to cell cycle control: a double-edged sword , Oncotarget 1, 43-7

Burger, K., **Mühl, B.\***, Harasim T., Rohrmoser, M., Malamoussi A., Orban, M., Kellner M., Gruber-Eber, A., Kremmer E., Hölzel, M., Eick, D. (2010) Chemotherapeutic drugs inhibit ribosome biogenesis at various levels, J Biol Chem 285, 16-25  
(\*= geteilte Erstautorenschaft)

Mühl, B., Malamoussi, A., Burger, K., Rohrmoser, M., Kellner, M., Harasim T., Orban, M., Gruber-Eber, A., Kremmer E., Eick, D. (2012) Ppan is required for cell proliferation and ribosome biogenesis, in Vorbereitung

### Präsentationen/Vorträge

- |           |  |
|-----------|--|
| 2008-2011 | Institutsinterne Vorträge zum Thema der Dissertation, Helmholtz Zentrum, München                                     |
| 2010      | Poster für: SFB 684 Symposium, Molekular Mechanisms of Normal and Malignant Hematopoiesis                            |
| 2009      | Organisation des SFB 684 Workshops für Doktoranden, Gastdozenten: Prof. Dr. Stefan Bohlander, Prof. Dr. Robert Slany |
| 2009      | Poster für: EMBO Conference Series, Ribosome Synthesis, Regensburg   |