

Die biologische Funktion  
der N1-2´O-Methylierung eukaryotischer mRNA  
durch die Methyltransferase CMTr1

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von  
**Steven Wolter (geb. Keßels)**  
aus  
Nettetal

Bonn, 2021

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Martin Schlee
2. Gutachter: Prof. Dr. Waldemar Kolanus

Tag der Promotion: 14.04.2021

Erscheinungsjahr: 2021

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1. Zusammenfassung (deutsch).....	1
1.2. Summary (english) .....	3
<b>2. EINLEITUNG</b> .....	<b>5</b>
2.1. Vom Gen zum Protein – Das zentrale Dogma der Molekularbiologie .....	5
<b>2.2. Der Lebenszyklus der mRNA</b> .....	<b>6</b>
2.2.1. Transkription und Maturierung der mRNA .....	7
2.2.1.1. Chromatin-Modifikation und Transkriptionsfaktor-Bindung .....	9
2.2.1.2. Mediatorkomplex und Präinitiationskomplex .....	9
2.2.1.3. Initiation .....	10
2.2.1.4. Promotor-proximale Pausierung.....	10
2.2.1.5. Übergang in die produktive Elongation .....	11
2.2.1.6. Elongation.....	11
2.2.1.7. Termination und 3'-Prozessierung .....	11
2.2.2. Export reifer mRNA in das Zytosol.....	12
2.2.3. Translation.....	12
2.2.3.1. Die CBC-vermittelte erste Runde der Translation und <i>nonsense mediated decay</i> (NMD) 12	
2.2.3.2. Translation.....	13
2.2.4. Regulation der Translation .....	14
2.2.5. Degradierung der mRNA.....	14
<b>2.3. Die Generierung und Funktion des mRNA-Caps</b> .....	<b>15</b>
2.3.1. Die kotranskriptionale Capping-Reaktion.....	17
2.3.1.1. Das Capping-Enzym (CE) generiert CapG .....	17
2.3.1.2. RNMT generiert Cap0 .....	17
2.3.1.3. CMTr1 generiert Cap1 .....	18
2.3.1.4. CAPAM generiert m7Gpppm6Am .....	19
2.3.2. CMTr2 generiert posttranskriptional Cap2 .....	19
2.3.3. Cap-bindende Proteine .....	20
2.3.3.1. Der cap binding complex (CBC) .....	20
2.3.3.2. eIF4E .....	21

<b>2.4. Die Cap-Struktur und die angeborene Immunantwort gegen körperfremde</b>	
<b>Nukleinsäuren</b> .....	<b>22</b>
2.4.1. <i>RIG-I like receptors</i> erkennen körperfremde RNA im Zytosol .....	23
2.4.1.1. RIG-I .....	24
2.4.1.2. MDA5.....	26
2.4.2. Interferon induziert antivirale Effektorproteine .....	26
2.4.3. antivirale Effektorproteine der IFIT Familie .....	27
<b>2.5. Capping anderer RNA Pol II-Transkripte:</b> .....	<b>28</b>
2.5.1. microRNA .....	28
2.5.2. snRNA .....	29
2.5.3. snoRNA .....	30
2.5.4. scaRNA .....	31
2.5.5. lncRNA .....	31
<b>2.6. Exosom</b> .....	<b>31</b>
2.6.1. MTR4 und das nukleäre Exosom (NEXT/PAXT/TRAMP) .....	32
2.6.2. SKIV2L und das zytosolische Exosom .....	32
<b>2.7. Ribosom</b> .....	<b>33</b>
<b>2.8. Biosynthese von Ribosomen</b> .....	<b>33</b>
<b>2.9. Ziel dieser Arbeit</b> .....	<b>36</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1. Material</b> .....	<b>37</b>
3.1.1. Verbrauchsmaterial und Geräte .....	37
3.1.2. Chemikalien.....	39
3.1.3. Enzyme, Antikörper und biologische Reagenzien .....	40
3.1.4. Medien und Zusätze für die Zellkultur .....	41
3.1.5. Reagenzsysteme und Kits .....	41
3.1.6. Selbsthergestellte Puffer und Lösungen .....	42
3.1.7. Nukleinsäuren .....	45
3.1.7.1. Primer für qPCR und sq-RT-PCR .....	45
3.1.7.2. Klonierungsprimer .....	46
3.1.7.3. Synthetisches NVL2-Gen .....	47
3.1.7.4. Plasmide.....	48
<b>3.1.7.5. TRIPHOSPHORYLIERTE RNA-OLIGONUKLEOTIDE</b> .....	<b>49</b>
3.1.8. Bakterienstämme .....	49
3.1.9. Zelllinien .....	50

3.1.9.1.	HEK293T .....	50
3.1.9.2.	DT40-wt- und DT40-CMTr1-KO-Zellen .....	50
<b>3.2.</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>50</b>
3.2.1.	Klonierungen und Bakterien.....	50
3.2.1.1.	Herstellung chemokompetenter Bakterien .....	50
3.2.1.2.	Transformation chemokompetenter Bakterien .....	51
3.2.1.3.	Präparation von Plasmiden aus LB-Flüssigkulturen .....	51
3.2.1.4.	Klonierung Restriktionsverdau .....	51
3.2.1.5.	Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion. ....	52
3.2.1.6.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) für Klonierungen.....	52
3.2.1.7.	Klonierung Gibson Assembly .....	52
3.2.1.8.	Konventionelle Klonierung.....	53
3.2.1.9.	Sequenzierung von Plasmiden und PCR Produkten .....	53
3.2.1.10.	In dieser Arbeit hergestellte Plasmide.....	53
3.2.2.	Zellkultur und zellbasierte Analysen .....	54
3.2.2.1.	Kultivierung von Zellen .....	54
3.2.2.2.	Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	55
3.2.2.3.	Beschichten von Zellkulturplastik mit poly-L-Ornithin.....	55
3.2.2.4.	Transfektion von Zellen mit Lipofectamin 2000.....	55
3.2.2.5.	Produktion von retroviralen Partikeln .....	56
3.2.2.6.	Transduktion von Zellen mit retroviralen Partikeln .....	56
3.2.2.7.	Produktion von Hühner-IFN- $\alpha$ .....	57
3.2.2.8.	Generierung von Knockout-Zelllinien mit CRISPR/Cas9 .....	57
3.2.2.9.	Messung der Zellviabilität durch MTT-Assay .....	58
3.2.2.10.	Kristallviolett-Assay (Colony-Formation-Assay) .....	58
3.2.3.	Westernblot und Protein basierte Methoden.....	59
3.2.3.1.	Generierung von Protein-Proben .....	59
3.2.3.2.	Generierung von Protein-Proben (SUnSET Assay) .....	60
3.2.3.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	60
3.2.3.4.	Transfer auf Nitrozellulose-Membran (Blotting) .....	60
3.2.3.5.	Ponceau-Färbung.....	60
3.2.3.6.	Antikörperfärbung und Westernblot.....	61
3.2.3.7.	Stripping von Membranen .....	61
3.2.4.	Allgemeines Luciferase-Protokoll.....	62
3.2.5.	Methoden zur Quantifizierung der Zytokinproduktion .....	62
3.2.5.1.	ELISA.....	62
3.2.5.2.	Nachweis von Typ-I IFN mit HEK-Blue IFN- $\alpha/\beta$ Reporterzellen.....	63
3.2.5.3.	Dual-Luciferase-Reporter-Assay (GLuc/Fluc) zur Messung der IFN-Induktion .....	63
3.2.6.	RNA und RNA-basierte Analysen .....	64
3.2.6.1.	RNA-Aufreinigung aus Zellen (Silikat-Säulen) .....	64
3.2.6.2.	RNA-Aufreinigung aus Zellen (TRIzol) .....	64

3.2.6.3.	Generierung von cDNA durch Reverse Transkription .....	65
3.2.6.4.	Quantitative real-time PCR (qPCR).....	65
3.2.6.5.	Semiquantitative RT-PCR .....	66
3.2.6.6.	MTase-Glo basierter Assay zur Bestimmung der Cap-Methylierung.....	67
3.2.6.7.	Terminator-Nuklease-Behandlung zellulärer RNA .....	68
3.2.6.8.	Generierung von m7G-gecappten RNA-Oligonukleotiden .....	68
3.2.6.9.	Generierung von Cap0- und Cap1-modifizierter Reporter-mRNA .....	68
3.2.7.	Transkriptomanalyse (RNA-Seq) .....	69
3.2.7.1.	Analyse der Sequenzierdaten .....	70
3.2.8.	Proteomanalyse .....	71
3.2.9.	Polysomen-Profil-Analyse .....	72
3.2.10.	Durchflusszytometrie (FACS) .....	72
3.2.10.1.	Zellzyklusanalyse durch FACS.....	73
3.2.11.	Statistik .....	73
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>75</b>
<b>4.1.</b>	<b>CMTr1 ist ein konditional essentielles Gen .....</b>	<b>75</b>
<b>4.2.</b>	<b>Generierung humaner CMTr1-<i>knockout</i>-Zelllinien .....</b>	<b>76</b>
<b>4.3.</b>	<b>Die endogene mRNA von CMTr1-KO-Zellen ist Cap0-modifiziert .....</b>	<b>78</b>
<b>4.4.</b>	<b>CMTr1-KO-Zellen zeigen unabhängig von IFIT1 eine verlangsamte Proliferation und eine reduzierte Zellgröße .....</b>	<b>80</b>
<b>4.5.</b>	<b>IFN-abhängige Effekte in CMTr1-KO-Zellen werden durch IFIT1 vermittelt .....</b>	<b>85</b>
<b>4.6.</b>	<b>IFIT1-abhängige Translationsinhibition in CMTr1-KO-Zellen .....</b>	<b>88</b>
4.6.1.	Die Induktion von IFIT1 und RIG-I nach IFN-Behandlung ist in CMTr1-KO-Zellen reduziert	89
<b>4.7.</b>	<b>Effekte der Cap-Struktur auf die Translation von Reporter-mRNA.....</b>	<b>91</b>
<b>4.8.</b>	<b>Untersuchung des RIG-I Signalweges in CMTr1-KO-Zellen.....</b>	<b>95</b>
4.8.1.	Die RIG-I-abhängige Zytokinproduktion und ISG-Expression ist in CMTr1-KO-Zellen verringert .....	95
4.8.2.	Die Aktivierung von RIG-I sowie die RIG-I-abhängige Induktion der Transkription sind in CMTr1-KO-Zellen unverändert.....	98
<b>4.9.</b>	<b>Auch in Hühner-B-Zell-Lymphomzellen führt ein CMTr1-Knockout zu einer translationalen Inhibition nach IFN-Behandlung .....</b>	<b>102</b>
<b>4.10.</b>	<b>Genexpressionsanalyse der CMTr1-KO-Zellen .....</b>	<b>105</b>

4.10.1.	CMTr1 zeigt keinen globalen Effekt auf Spleißeffizienz und Transkriptstabilität.....	106
4.10.2.	Die Expression der mRNA ribosomaler Proteine ist in CMTr1-KO-Zellen reduziert .....	109
4.10.3.	Einfluss von mRNA-Strukturelementen auf die Expression in CMTr1-KO-Zellen.....	111
<b>4.11.</b>	<b>Proteomanalyse der CMTr1-KO-Zellen.....</b>	<b>118</b>
<b>4.12.</b>	<b>CMTr1-abhängige Effekte auf die Expression von NVL2 .....</b>	<b>119</b>
<b>4.13.</b>	<b>Transiente Überexpression von CMTr1 in CMTr1-defizienten Zellen stellt Spleißen und Proteinproduktion von NVL2 wieder her.....</b>	<b>125</b>
<b>4.14.</b>	<b>Die verringerte Expression von NVL2 in CMTr1-defizienten Zellen hat keinen messbaren Effekt auf die rRNA-Prozessierung und die Transkriptlevel von RPs, SNHGs und snoRNA ....</b>	<b>128</b>
<b>4.15.</b>	<b>Die Inhibition von CDKs führt in CMTr1-defizienten Zellen zu verstärkter Zytotoxizität</b>	<b>131</b>
<b>4.16.</b>	<b>Der Einfluss von cMyc und p53 auf den Phänotyp CMTr1-defizienter Zellen.....</b>	<b>133</b>
4.16.1.	cMyc.....	133
4.16.2.	p53 und die nukleoläre Stressantwort .....	134
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>137</b>
<b>5.1.</b>	<b>Analyse der biologischen Relevanz der N1-2´O-Methylierung durch CMTr1-KO-Zellen</b>	<b>137</b>
5.1.1.	Widersprüchliche Hinweise auf die Bedeutung der N1-2´O-Methylierung in publizierten Arbeiten .....	137
5.1.2.	Generierung und Charakterisierung von CMTr1-KO-Zelllinien.....	138
<b>5.2.</b>	<b>IFN-abhängige Effekte von CMTr1 und die antivirale Immunantwort .....</b>	<b>140</b>
5.2.1.	In CMTr1-defizienten Zellen entstehen endogene RIG-I Liganden .....	140
5.2.2.	Cap1-Generierung durch CMTr1 verhindert die Translationsinhibition von endogener mRNA durch IFIT1 .....	142
5.2.3.	Die Substratspezifität von IFIT1 ist komplexer als eine reine Diskriminierung von Cap0 und Cap1	145
5.2.4.	Der Verlust von CMTr1-KO wirkt sich negativ auf zelluläre Mechanismen der antiviralen Abwehr aus .....	146
<b>5.3.</b>	<b>IFN-unabhängige Effekte von CMTr1 auf die Zellphysiologie .....</b>	<b>148</b>
5.3.1.	Zellgröße, Zellteilung und Ribosomenbiogenese werden von CMTr1 beeinflusst .....	149
5.3.2.	CMTr1 beeinflusst die Transkription von Ribosomalen Proteinen (RP) .....	151
5.3.3.	CMTr1 beeinflusst durch einen unbekanntem Mechanismus die Transkription von 5´TOP-RNA, SNHGs und RPs.....	152

5.3.3.1.	Die Verwendung einer alternativen <i>transcription start site</i> (TSS) kann die Prozessierung von 5´TOP-Transkripten beeinflussen.....	153
5.3.4.	Der Einfluss von Cap1 auf Spleißreaktion und Transkriptstabilität.....	155
5.3.4.1.	CMTr1-abhängiges alternatives Spleißen von NVL2 .....	156
5.3.4.2.	Mögliche Mechanismen des NVL2 Exonskipping-Events in CMTr1-defizienten Zellen 157	
5.3.5.	Mögliche Effekte der reduzierten NVL2-Expression in CMTr1-defizienten Zellen.....	158
<b>5.4.</b>	<b>Weitere in der Literatur beschriebene Aspekte der CMTr1-Funktion .....</b>	<b>159</b>
5.4.1.	CMTr1-interagierende Proteine.....	160
5.4.2.	CMTr1 und die DNA-Damage-Response (DDR) .....	162
<b>5.5.</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>163</b>
<b>6.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>167</b>
<b>6.1.</b>	<b>RNA-Seq Ergebnisse.....</b>	<b>167</b>
6.1.1.	RNA-Seq: In CMTr1-defizienten Zellen reduziert exprimierte Transkripte .....	167
6.1.2.	RNA-Seq: In CMTr1-defizienten Zellen verstärkt exprimierte Transkripte .....	170
<b>6.2.</b>	<b>Ergebnisse der Proteomanalyse.....</b>	<b>173</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>175</b>
<b>8.</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>191</b>
<b>9.</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>193</b>



## 1. Zusammenfassung

### 1.1. Zusammenfassung (deutsch)

Eukaryoten modifizieren das 5'-Ende ihrer mRNA mit einem invertierten N7-methyliertem Guanosin (m7G). Diese Cap0 genannte Struktur wird in höheren Eukaryoten durch die Methyltransferase CMTr1 weiter modifiziert: CMTr1 methyliert die 2'-O-Position der Ribose des ersten Nukleotides (N1) der mRNA und generiert so die sogenannte Cap1-Struktur.

Während die m7G-Methylierung (Cap0) essentiell für die Funktion der mRNA ist, ist die Bedeutung der zusätzlichen N1-2'-O-Methylierung (Cap1) weniger gut definiert. Eine N1-2'-O-Methylierung viraler RNA verhindert die Erkennung durch den antiviralen, Typ-I-IFN induzierenden zytosolischen RNA-Rezeptor RIG-I und durch das Cap0-bindende antivirale Effektorprotein IFIT1, das die Translation der gebundenen RNA inhibiert. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Cap1-Struktur als molekulare Selbst-Signatur die endogene mRNA vor Erkennung durch RIG-I und IFIT1 schützt und ob sie noch weitere Funktionen hat.

Dazu wurden in dieser Arbeit CMTr1-Knockout-Zelllinien (CMTr1-KO) generiert und charakterisiert.

Die Hypothese, dass Cap1 benötigt wird, um die endogener RNA vor der Detektion durch RIG-I beziehungsweise vor deren translationaler Inhibition durch IFIT1 zu schützen, konnte bestätigt werden.

In CMTr1-KO-Zellen verursachte eine Typ-I-IFN-Behandlung, die zur Aufregulation von RIG-I und IFIT1 führt, eine Reduktion der Viabilität sowie eine globale Translationsinhibition. Dieser Typ-I-IFN-vermittelte Phänotyp konnte in CMTr1-KO-Zellen durch einen zusätzlichen Knockout des IFIT1-Gens komplett unterdrückt werden.

Unbehandelte CMTr1-KO-Zellen zeigten eine dauerhafte, leichte Aktivierung des antiviral wirkenden RIG-I-Signalweges durch endogene RNA. Eine Stimulation mit exogenen RIG-I-Liganden in CMTr1-KO-Zellen aktivierte unvermindert den RIG-I-Signalweg. Die translationale Inhibition endogener Cap0-mRNA durch IFIT1 führte jedoch zu stark verringerter Typ-I-IFN-Proteinexpression nach RIG-I-Stimulation.

Dies bedeutet, dass ein Verlust von Cap1 (N1-2'O-Methylierung) zu einer reduzierten Funktionalität der antiviralen Immunantwort führt.

Desweiteren zeigten die CMTr1-KO-Zellen in Abwesenheit von Typ-I-IFN einen IFIT1-unabhängigen, zellphysiologisch komplexen Phänotyp. CMTr1-KO-Zellen hatten eine verringerte Zellgröße und proliferierten langsamer. Während keine globalen Effekte von CMTr1 auf die Transkriptstabilität und die Effizienz der Spleißreaktion festgestellt wurden, zeigten sich in CMTr1-KO-Zellen auf Transkriptionsebene eine reduzierte Expression von Komponenten der Translationsmaschinerie. Dieser CMTr1-abhängige Effekt war besonders auffällig bei für ribosomale Proteine (RP) kodierender mRNA, geht aber darüber hinaus und betrifft Transkripte, die das konservierte 5'terminale Oligopyrimidin Motiv (5'TOP) aufweisen und/oder snoRNA Host Genes (SNHGs) sind.

Darüber hinaus konnte ein hochspezifisches, CMTr1-abhängiges alternatives Spleiß-Event von NVL2 identifiziert werden. NVL2 wurde als essentieller Faktor der Ribosomenbiogenese beschrieben. In Abwesenheit von CMTr1 wurde die NVL2-prä-mRNA durch ein bisher nicht beschriebenes Exonskipping-Event des achten Exons alternativ gespleißt, was zur Bildung einer nicht funktionalen Isoform führte. Dadurch ist die Proteinexpression von NVL2 in CMTr1-KO-Zellen um bis zu 88 % reduziert. Dieser Phänotyp konnte durch die Überexpression von wildtyp-CMTr1 kompensiert werden, nicht aber durch eine Methyltransferase-defiziente Mutante. Dies legt die N1-2'O-Methylierung als Voraussetzung für korrektes Spleißen von NVL2 nahe. Trotz starker Reduktion der NVL2-Expression konnte keine Beeinträchtigung der rRNA-Prozessierung festgestellt werden.

Zusammengenommen lässt sich der durch den Verlust von CMTr1 ausgelöste Phänotyp als reduzierte Kapazität der Translations- und Ribosomenbiogenese-Maschinerie der Zellen beziehungsweise als Kompensation der Zellen auf diese Effekte deuten. Während diese Arbeit bisher noch nicht beschriebene, weitreichende Effekte der CMTr1-vermittelten Cap1-Generierung auf die Zellphysiologie nachweist, bedarf der zu Grunde liegende molekulare Mechanismus weitergehender Erforschung.

## 1.2. Summary (english)

Eukaryotes modify the 5' end of their mRNA with an inverted N7-methylated guanosine (m7G). This structure, which is called Cap0, is further modified in higher eukaryotes by the methyltransferase CMTr1: CMTr1 methylates the 2'O position of the ribose of the first nucleotide (N1-2'O) of an mRNA, thus generating the so-called Cap1 structure.

While m7G methyl group (Cap0) is essential for mRNA function, the importance of the additional N1-2'O methyl group (Cap1) is less well defined. N1-2'O methylation of viral RNA prevents recognition by RIG-I, a cytosolic antiviral RNA receptor that induces a type I IFN response, and by the Cap0-binding antiviral effector protein, IFIT1, which inhibits translation of bound RNA.

The aim of this work was to investigate whether the Cap1 structure, as a molecular signature for self-RNA, protects endogenous mRNA from the antiviral effects of RIG-I and IFIT1 and whether it has additional functions. For this purpose, CMTr1 knockout (KO) cell lines were generated and characterized in this work.

It was possible to confirm the hypothesis that the N1-2'O methyl group of Cap1 is required to protect endogenous RNA from detection by RIG-I and from translational inhibition by IFIT1.

In CMTr1 KO cells, type I IFN treatment, leading to upregulation of RIG-I and IFIT1, caused a reduction in viability as well as global translational inhibition. This type I IFN-mediated phenotype could be completely suppressed in CMTr1 KO cells by additional knockout of the IFIT1 gene.

Untreated CMTr1 KO cells showed sustained, mild activation of the antiviral RIG-I pathway by endogenous RNA. Stimulation with exogenous RIG-I ligands in CMTr1 KO cells activated the RIG-I pathway without any inhibition. However, in CMTr1 KO cells, inhibition of the translation of endogenous mRNAs by IFIT1 resulted in greatly reduced protein expression levels of RIG-I target genes after RIG-I stimulation. This implies that the loss of Cap1 generation leads to reduced function of the antiviral immune response.

Furthermore, in the absence of type I IFN, CMTr1 KO cells showed an IFIT1-independent phenotype, which was physiologically complex: CMTr1 KO cells were smaller and slower to proliferate. While no global effects were detected for CMTr1 on

transcript stability or splicing efficiency, CMTr1 KO cells showed reduced transcription of components of the translational machinery. This CMTr1-dependent effect was particularly striking for ribosomal protein (RP) encoding mRNAs, but extended beyond this to transcripts that have the conserved 5'-terminal oligopyrimidine motif (5'TOP) and/or are snoRNA host genes (SNHG5).

In addition, a highly specific CMTr1-dependent alternative splicing event of NVL2 was identified. NVL2 has been described as an essential factor in ribosome biogenesis. In the absence of CMTr1, NVL2 pre-mRNA was alternatively spliced by a previously undescribed exon skipping event of the eighth exon, which resulted in the formation of a nonfunctional isoform. As a result, protein expression of NVL2 was reduced by up to 88% in CMTr1 KO cells. This phenotype could be compensated by overexpression of wild-type CMTr1, but not by overexpression of a methyltransferase-deficient CMTr1 mutant, suggesting that N1-2'O methylation is a prerequisite for the correct splicing of NVL2. Despite a strong reduction of NVL2 expression, no impairment of rRNA processing was detected.

Taken together, the phenotype triggered by the loss of CMTr1 can be interpreted as a reduced capacity of the cellular translation- and ribosome-biogenesis machinery and/or as compensation of the cell for these effects. While this work demonstrates previously undescribed, wide-ranging effects of CMTr1-mediated Cap1 generation on cellular physiology, the underlying molecular mechanism still requires further investigation.

## 2. Einleitung

### 2.1. Vom Gen zum Protein – Das zentrale Dogma der Molekularbiologie

Im Jahr 1956 - kurz nach der Aufklärung der DNA-Struktur (Watson & Crick, 1953) - postulierte Crick erstmalig das „zentrale Dogma“ der Molekularbiologie, welches den gerichteten Fluss von genetischen Informationen von Desoxyribonukleinsäure (DNA) über Ribonukleinsäure (RNA) zum Protein beschreibt (Crick, 1956).

Im ersten Schritt, der Transkription, wird die genetische Information der DNA Sequenz in RNA umgeschrieben. Die gebildete *messenger* RNA (mRNA) kann in einem zweiten Schritt, der Translation, als Matrize zur Biosynthese eines Proteins dienen. Die Arbeiten von Ochoa und Kornberg lieferten erste Belege zu den Mechanismen der Biosynthese von RNA und DNA (Bessman et al., 1956; Grunberg-Manago & Ochoa, 1955). Im Jahre 1961 wurde die Funktion von mRNA als Intermediat der Proteinsynthese erstmalig experimentell bestätigt (Brenner et al., 1961; Gros et al., 1961), zwei Jahre später wurden die Ribosomen als Translationsmaschinerie der Zelle identifiziert (Slayter et al., 1963). Die Übersetzung der Nukleotidsequenz der mRNA in die Aminosäuresequenz eines Proteins wird am Ribosom durch *transfer* RNAs (tRNAs) vermittelt (Holley et al., 1965). Der genetische Code, auf dem diese Übersetzung beruht, besteht aus nicht-überlappenden Dreiergruppen von Basen (Codons) innerhalb der mRNA und wurde im Jahr 1966 vollständig entschlüsselt (R. G. Martin et al., 1962; Nirenberg & Leder, 1964).

In diesen frühen Jahren der Molekularbiologie waren nur die drei für die Proteinsynthese zentralen Arten von RNA bekannt: mRNA, tRNA sowie ribosomale RNA (rRNA), die ein struktureller Bestandteil der Ribosomen ist.

Während RNA ursprünglich als eine passive Intermediärform zwischen DNA und Protein gesehen wurde, entwickelte sich die RNA-Biologie durch die Entdeckung weiterer RNA-Spezies sowie der Aufklärung der komplexen Regulationsmechanismen und Funktionen von RNA zu einem bis heute hochaktiven Forschungsfeld.

## 2.2. Der Lebenszyklus der mRNA

mRNA entsteht durch die Transkription eines proteinkodierenden Gens. Eukaryotische mRNA muss während und nach der Transkription im Zellkern essentielle Prozessierungsschritte durchlaufen. Sie wird am 5'-Ende durch eine Cap-Struktur und am 3'-Ende durch Polyadenylierung modifiziert (Abbildung 1). Außerdem werden durch das Spleißen die kodierenden Sequenzen (Exons) aneinandergesetzt und nicht-kodierende Sequenzen (Introns) entfernt. Die so maturierte mRNA wird aus dem Zellkern exportiert und wird durch Ribosomen translatiert. Schließlich wird mRNA durch die mRNA-Degradations-Maschinerie der Zelle abgebaut (Abbildung 1).

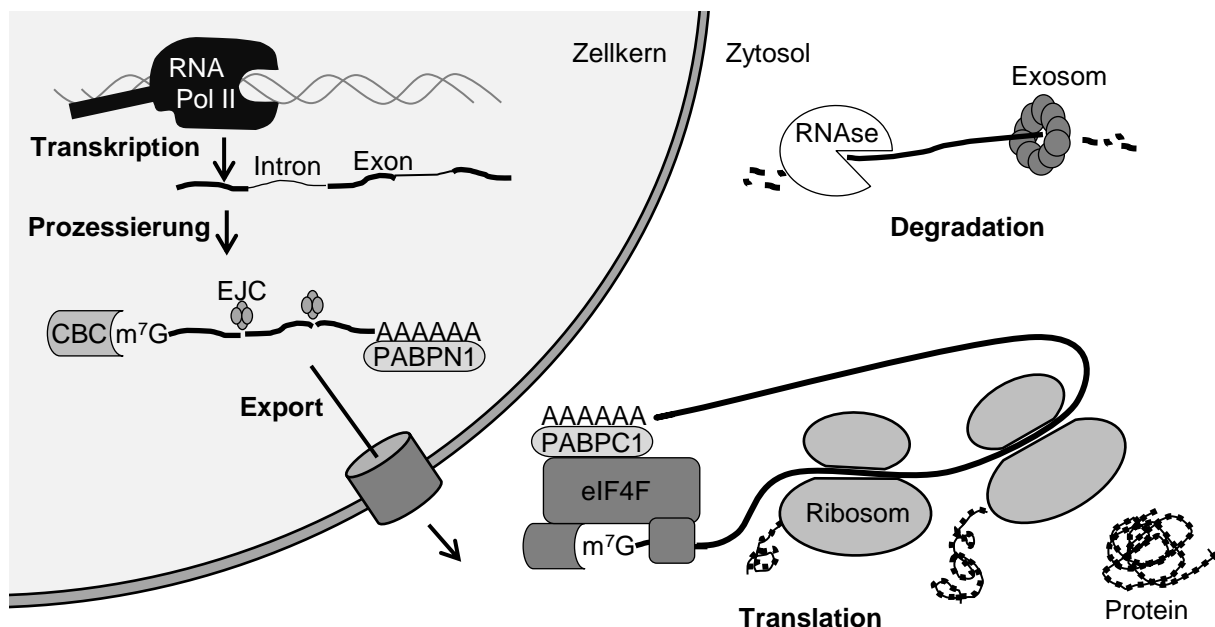


Abbildung 1: Lebenszyklus einer mRNA.

Die RNA-Polymerase II (RNA Pol II) transkribiert die prä-mRNA. Die prä-mRNA erhält ein Cap (m<sup>7</sup>G), das vom *cap binding complex* (CBC) gebunden wird. Spleißen entfernt die Introns, an den Exon-Exon-Übergängen verbleibt der *exon junction complex* (EJC). Das 3'-Ende wird polyadenyliert und vom *polyadenylate binding protein nuclear 1* (PABPN1) gebunden. Die maturierte mRNA wird exportiert, und im Zytosol vom *eukaryotic initiation factor 4F* (eIF4F) am Cap und PABPC1 am poly(A)-Schwanz gebunden und durch Ribosomen translatiert. Die mRNA wird durch RNasen und das Exosom degradiert.

All diese Schritte sind komplex reguliert und erfordern ein koordiniertes Zusammenspiel aller beteiligten Faktoren. Die mRNA-Maturierung beginnt kotranskriptional, also zeitgleich mit der Transkription, und RNA-

Prozessierungsschritte wie die Generierung der Caps (Capping) und Spleißen stehen in komplexer, wechselseitiger Abhängigkeit mit der Transkriptionsmaschinerie (Kachaev et al., 2020; Tellier et al., 2020). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich vorwiegend mit einem Enzym, das in die mRNA-Capping-Reaktion eingebunden ist, der Cap-spezifischen 2´O-Methyltransferase 1 (CMTr1) und dessen Einfluss auf die physiologischen Abläufe der Zelle.

### **2.2.1. Transkription und Maturierung der mRNA**

Die RNA-Polymerase II (RNA Pol II) ist eine der drei DNA-abhängigen RNA-Polymerasen in Eukaryoten. RNA Pol II transkribiert neben mRNA auch nichtkodierende RNA (ncRNA) sowie die kleinen nuklearen und nukleolären RNA (*small nuclear RNA* (snRNA) und *small nucleolar RNA* (snoRNA)) (Cramer et al., 2000; Tan-Wong et al., 2012) (siehe Kapitel 2.5).

RNA Pol II ist ein Enzymkomplex aus zwölf Proteinuntereinheiten. Für die Funktion der Transkriptionsmaschinerie sind außerdem zahlreiche weitere Kofaktoren mit regulatorischer Aktivität nötig (Cramer et al., 2000; M. C. Thomas & Chiang, 2006). Die beiden größten Untereinheiten der RNA Pol II, RPB1 und RPB2, formen das aktive Zentrum. Die C-terminale Domäne (CTD) von RPB1 besteht im Menschen aus 52 Wiederholungen des Heptamer-Peptidmotivs Tyrosin<sub>1</sub>, Serin<sub>2</sub>, Prolin<sub>3</sub>, Threonin<sub>4</sub>, Serin<sub>5</sub>, Prolin<sub>6</sub>, Serin<sub>7</sub> (Y<sub>1</sub>S<sub>2</sub>P<sub>3</sub>T<sub>4</sub>S<sub>5</sub>P<sub>6</sub>S<sub>7</sub>). Fünf der sieben Aminosäuren können durch Kinasen phosphoryliert und Phosphatasen dephosphoryliert werden (Eick & Geyer, 2013).

Während des Transkriptionszyklus (Abbildung 2) ist das Phosphorylierungsmuster der Heptamere einem ständigen Wandel unterzogen. Dabei spielt vor allem die Phosphorylierung der Serine 2,5 und 7 durch die *cyclin dependent kinases* (CDKs) eine wichtige Rolle in der Regulation der Transkription (Buratowski, 2009). Abhängig vom Phosphorylierungsmuster können Kofaktoren dynamisch zur RNA Pol II rekrutiert werden (Eick & Geyer, 2013).

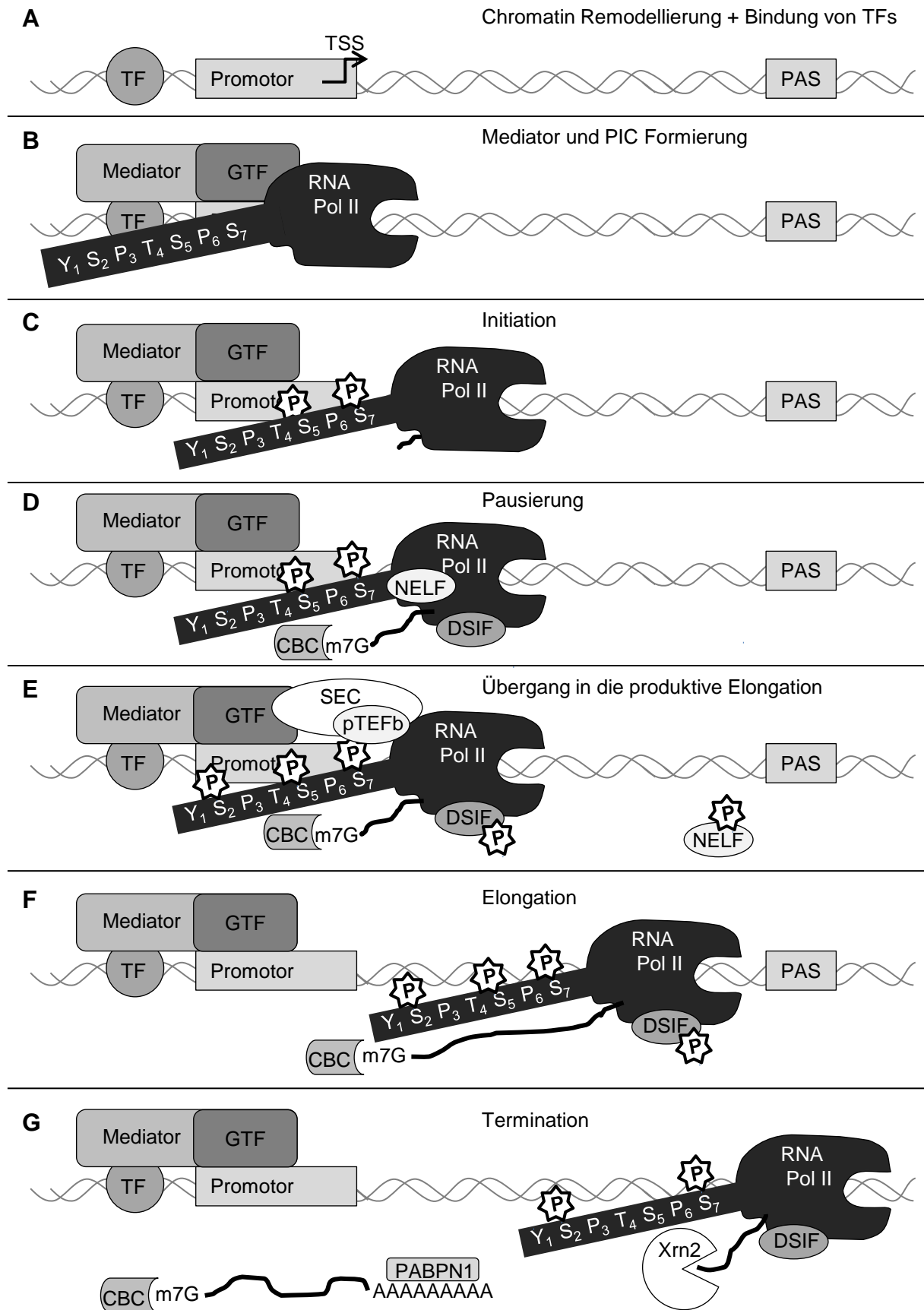




Abbildung 2: Regulation der Transkription.

Transkriptionszyklus der RNA-Polymerase II (RNA Pol II). A) Das Chromatin wird remodelliert und Transkriptionsfaktoren (TF) binden. B) Mediator- und Präinitiationskomplex (PIC) binden und rekrutieren RNA Pol II. C) Initiation. RNA Pol II wird an Serin 5 und 7 der C-terminalen Domäne phosphoryliert und beginnt die Transkription. D) Die mRNA wird gecappt und der cap binding complex (CBC) bindet. Die Transkription pausiert durch die Bindung von *DRB sensitivity inducing factor* (DSIF) und *negative elongation factor* (NELF). E) *positive transcription elongation factor b* (P-TEFb) innerhalb des *super elongation complex* (SEC) bindet und phosphoryliert DSIF, NELF und Serin 2 der RNA Pol II CTD. F) Produktive Elongation und kotranskriptionales Spleißen. G) Termination. Die mRNA wird am Polyadenylierungssignal (PAS) geschnitten und polyadenyliert, *polyadenylate binding nuclear protein 1* (PABPN1) bindet den Poly(A)-Schwanz. 5'3'-Exoribonuklease 2 (Xrn2) baut den an der RNA Pol II verbleibende RNA ab und löst die Dissoziation des Transkriptionskomplex aus.

### 2.2.1.1. Chromatin-Modifikation und Transkriptionsfaktor-Bindung

Eukaryotische DNA ist im Zellkern in Nukleosomen organisiert. In Nukleosomen sind je etwa 146 Basenpaare (bp) der DNA um ein Histon-Oktamer gewunden, ähnlich eines Fadens um eine Spule (Luger et al., 1997). Nukleosomen bestimmen den Zugang der Transkriptionsmaschinerie zur DNA und werden durch Histon-modifizierende Faktoren moduliert (W. K. M. Lai & Pugh, 2017a).

Die Bindung von sequenzspezifischen, DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren (TF) bestimmt, welche Gene in der Zelle exprimiert werden (Lee & Young, 2013). TFs regulieren – durch Aktivierung oder Inhibierung – die koordinierte Expression von Zielgenen (Heinz et al., 2013; Lambert et al., 2018; Mullen et al., 2011). TFs binden in regulatorischen DNA-Regionen um das Gen, der Enhancer- und der Promotor-Region (Lee & Young, 2013).

### 2.2.1.2. Mediatorkomplex und Präinitiationskomplex

Die lokal erhöhte Konzentration von an die DNA gebundenen TF rekrutiert den Mediatorkomplex. Der Mediatorkomplex verändert die lokale DNA-Architektur durch die Bildung von Chromatinschleifen zwischen Enhancer- und Promotor-Regionen (Allen & Taatjes, 2015; Kagey et al., 2010). *Cyclin dependent kinase 8* (CDK8) ist Teil des Mediatorkomplexes und kann Serin 2 und Serin 5 der RNA Pol II CTD phosphorylieren (Fant & Taatjes, 2018).

Anschließend formiert sich der Präinitiationskomplex (*preinitiation complex*, PIC) um die Kernpromotorregion eines Gens. Komponenten des PIC sind neben der RNA Pol II die sogenannten *general RNA polymerase II transcription factors* (GTFs).

Es gibt sechs GTFs (TFIIA, -B, -D, -E, -F, -H) die ihrerseits zum Teil Proteinkomplexe sind (M. C. Thomas & Chiang, 2006). Zuerst bindet TFIID an den Promotor und führt zu einer Konformationsänderung der DNA, danach binden TFIIA und -B und rekrutieren die RNA Pol II, deren CTD zu diesem Zeitpunkt hypophosphoryliert ist. Danach werden TFIID, TFIIE und schließlich TFIIH zum Komplex rekrutiert (Komarnitsky et al., 2000).

### **2.2.1.3. Initiation**

Die Kinase *cyclin-dependent kinase 7* (CDK7) ist eine Untereinheit von TFIIH und phosphoryliert die RNA Pol II CTD an Serin 5 (pS5) und Serin 7 (pS7) (Komarnitsky et al., 2000). pS5 vermittelt die Dissoziation der RNA Pol II vom Mediator Komplex und ermöglicht den Start der Transkription (Wong et al., 2014).

Eine weitere Untereinheit von TFIIH besitzt Helikase-Aktivität und entwindet ein kurzes Stück der DNA, um es für die Transkription zugänglich zu machen (Harlen & Churchman, 2017).

Das aktive Zentrum von RNA Pol II bindet den exponierten DNA-Strang (*template* Strang) und beginnt die RNA-Synthese. Das erste in RNA transkribierte DNA-Nukleotid eines Gens wird als *transcription start site* (TSS) bezeichnet.

An pS5 der CTD werden Enzyme der Capping-Maschinerie rekrutiert und das 5'-Ende der naszierenden mRNA wird gecappt (Rasmussen & Lis, 1993). Der Capping-Prozess wird im Detail in Kapitel 2.3 erläutert.

Der *nuclear cap-binding complex* (CBC) bindet das Cap der naszierenden RNA und bleibt während der gesamten Transkription und Maturierungsphase an die mRNA gebunden (Gonatopoulos-Pournatzis & Cowling, 2014; Narita et al., 2007).

### **2.2.1.4. Promotor-proximale Pausierung**

Nachdem die Polymerase die ersten 20 bis 60 Nukleotide synthetisiert hat, wird die Transkription pausiert (Promotor-proximale Pausierung). *DRB sensitivity inducing factor* (DSIF) wird an den Transkriptionskomplex rekrutiert und bindet an den *negative elongations factor* (NELF), woraufhin die Pausierung ausgelöst wird (Bernecky et al., 2017; Missra & Gilmour, 2010).

Die Promotor-proximale Pausierung spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation der Genexpression und führt entweder zum Abbruch der Transkription (Termination) oder den Übergang in die produktive Elongationsphase (Core & Adelman, 2019).

### 2.2.1.5. Übergang in die produktive Elongation

Durch die Funktion des *positive transcription elongation factor b* (P-TEFb) geht die Transkriptionsmaschinerie in die produktive Elongation über. Die Kinase *cyclin-dependent kinase 9* (CDK9) ist Teil des P-TEFb Komplexes und phosphoryliert unter anderem DSIF und NELF, wodurch NELF dissoziiert und die Pausierung aufgehoben wird (Wada et al., 1998; Sansó et al., 2016). CDK9 phosphoryliert außerdem Serin 2 (pS2) der RNA Pol II CTD (Czudnochowski et al., 2012)

P-TEFb zeigt die höchste Aktivität, wenn es Teil des *super elongation complex* (SEC) ist. SEC interagiert mit dem am Promotor gebundenen Mediatorkomplex und wird so zu aktiv transkribierten Genen rekrutiert (Luo et al., 2012).

### 2.2.1.6. Elongation

In der Elongationsphase bewegt sich die RNA Pol II weiter am Gen entlang, dabei wird die prä-mRNA zum Teil bereits kotranskriptional gespleißt. In dieser Phase weist die RNA Pol II CTD erhöhte Level an Serin 2-Phosphorylierung (pS2) auf, welche sowohl durch CDK9 als auch durch CDK12 vermittelt wird. Die pS5-Level hingegen nehmen im Verlauf der Elongation ab, erhöhen sich aber lokal an aktiv gespleißten Exons (Eick & Geyer, 2013; Herzel et al., 2017).

Für die Transkription werden neben der Transkriptionsmaschinerie die Aktivität verschiedene Chromatin- und Histon-modellierende Faktoren benötigt (W. K. M. Lai & Pugh, 2017; Venkatesh & Workman, 2015).

### 2.2.1.7. Termination und 3'-Prozessierung

Die Termination der Transkription wird bei den meisten mRNAs durch ein Polyadenylierungssignal (PAS), ein kurzes, konserviertes Sequenzmotiv innerhalb des Gens, ausgelöst. 3'-Prozessierungsfaktoren (*cleavage and polyadenylation* (CPA)) erkennen das PAS innerhalb der naszierenden prä-mRNA, setzen die mRNA endonukleolytisch vom Transkriptionskomplex frei und polyadenylieren sie (Casañal et al., 2017).

Das Level der RNA Pol II CTD Serin 2-Phosphorylierung (pS2) erreicht in der fortgeschrittenen Elongationsphase und Terminationsphase seinen Höhepunkt.

Durch pS2 werden die CPA-Faktoren an die CTD rekrutiert (Eick & Geyer, 2013).

Der Komplex *cleavage and polyadenylation specificity factor* (CPSF) bindet an die PAS und schneidet die RNA 3' des PAS. Die Polyadenylat-Polymerase (poly(A)-Polymerase) fügt am 3'-Ende eine Polyadenylat-Sequenz (poly(A)-Schwanz) von bis

zu 250 Nukleotiden an. Das *polyadenylate binding nuclear protein 1* (PABPN1) bindet an den poly(A)-Schwanz und reguliert die Aktivität der poly(A)-Polymerase (Casañal et al., 2017; Eaton & West, 2020).

Die 5'3'-Exoribonuklease 2 (Xrn2) degradiert die ungecappte, noch mit der RNA Pol II verbundene RNA und löst die Termination aus (S. West et al., 2004).

### **2.2.2. Export reifer mRNA in das Zytosol**

Nach Abschluss der Transkription und aller Prozessierungsschritte wird die reife mRNA ins Zytosol transportiert.

Die reifen mRNAs liegen im Komplex mit vielen RNA-bindenden Proteinen (RBPs) vor, diese Komplexe werden *messenger ribonucleoprotein* (mRNP) genannt.

Während der mRNA-Generierung wird die mRNA mit RBPs beladen, die die erfolgreiche Prozessierung eines Transkriptes anzeigen: CBC bindet an das Cap (Gonatopoulos-Pournatzis & Cowling, 2014), der sogenannte *exon junction complex* (EJC) verbleibt nach dem Spleißen an den Exon-Exon-Grenzen (Le Hir et al., 2001), und PABPN1 bindet den poly(A)-Schwanz (Apponi et al., 2010). Bereits während der Elongation wird der *transcription export complex* (TREX) an die Transkriptionsmaschinerie rekrutiert, der die mRNA für den Export vorbereitet (Sträßer et al., 2002). TREX besteht unter anderem aus dem RNA-bindenden THOC-Komplex und dem Adaptor AlyRef, der mit CBC interagiert (Okamura et al., 2015). TREX bindet schließlich an den *nuclear export factor 1* (NXF1) und löst den Export der mRNA durch die Kernporen in das Zytoplasma aus (Carmody & Wente, 2009; Katahira, 2012).

### **2.2.3. Translation**

#### **2.2.3.1. Die CBC-vermittelte erste Runde der Translation und *nonsense mediated decay* (NMD)**

Die erste Translationsrunde einer aus dem Kern exportierten mRNA dient der Qualitätskontrolle des Spleißens (Le et al., 2010). CBC bindet die Translationsinitiationsfaktoren und rekrutiert Ribosomen, die die mRNA translatieren und dabei schrittweise die EJCs von der mRNA entfernen. Wird die Translation durch ein vorzeitiges Stoppcodon terminiert, verbleiben 3' des Stoppcodons EJCs auf der mRNA und lösen die Degradierung der mRNA über den *nonsense mediated decay* (NMD)-Prozess aus. Bei erfolgreicher Translation werden die RBPs CBC, EJC und PABPN1 von der mRNA entfernt und die mRNA kann anschließend durch

zytosolische RBPs gebunden und translatiert werden (Isken & Maquat, 2008; Maquat et al., 2010).

### 2.2.3.2. Translation

Die Initiation ist der geschwindigkeitsbestimmende und am stärksten regulierte Schritt der Translation. Der Translationsinitiationsfaktor-Komplex *eukaryotic initiation factor 4F* (eIF4F) bindet an das 5'-Ende der mRNA. eIF4F besteht aus den Untereinheiten eIF4A, eIF4E und eIF4G. eIF4A ist eine Helikase und entwindet die Sekundärstruktur in der Nähe des Caps, und eIF4E bindet das Cap (Jackson et al., 2010). eIF4G dient als Gerüst des eIF4F-Komplexes, es bindet neben eIF4E und eIF4A auch *cytosolic poly-A-binding protein* (PABPC1) und eIF3. (Gross et al., 2003) Durch die Bindung von eIF4G an PABPC1 kommen 5'-Cap und 3'-poly(A)-Schwanz in räumliche Nähe und die mRNA formt eine geschlossene Schleife („closed loop“) (Jackson et al., 2010).

eIF3 vermittelt die Bindung zwischen eIF4F und dem sogenannten 43S-Präinitiationskomplexes (bestehend aus der ribosomalen Untereinheit 40S und den Initiationsfaktoren eIF1, eIF1A und dem eIF2-ternären Komplex). Der eIF2-ternäre Komplex besteht aus eIF2, GTP und der mit Methionin beladenen tRNA, mit der die Translation beginnt (Jackson et al., 2010).

Der 43S-Präinitiationskomplex scannt die RNA in 5'3'-Richtung nach einem Initiationskodon (AUG) in korrekter Sequenzumgebung (Kozak-Sequenz GCCRCCAUGG, R ist entweder A oder G), woraufhin die ribosomale Untereinheit 60S bindet und nach Austausch von Faktoren den 80S-Initiationskomplex bildet und die Translation beginnt (Jackson et al., 2010; Kozak, 1987).

In der folgenden Elongationsphase synthetisiert das Ribosom das von der mRNA kodierte Protein. Wenn die Synthese durch ein Stoppcodon terminiert wird, wird das Protein freigesetzt und das Ribosom für einen weiteren Translationszyklus recycelt. Der Cap-bindende Initiationsfaktor eIF4E sowie eIF4G bleiben an der mRNA gebunden und initiieren weitere Translationsrunden der mRNA (Gross et al., 2003).

Neben der Cap-abhängigen, durch eIF4E vermittelten Translation gibt es auch die durch *internal ribosomal entry sites* (IRES) vermittelte, Cap-unabhängige Translation. IRES sind RNA-Strukturelemente, welche die Translationsmaschinerie unabhängig vom mRNA Cap rekrutieren und die Translation des Transkriptes initiieren (Y. Yang & Wang, 2019).

#### 2.2.4. Regulation der Translation

Die Translation einzelner, spezifischer Transkripte kann durch RNA-bindende Proteine reguliert werden. Daneben findet, vor allem unter Stressbedingungen, auch eine globale Translationsregulation statt (Gebauer et al., 2012; Hershey et al., 2012):

So kann beispielsweise die Formierung des Präinitiationskomplexes durch EIF2-Kinasen inhibiert werden. EIF2 Kinasen phosphorylieren EIF2 $\alpha$ , einer Komponente des eIF2-ternären Komplex, und inhibieren so die Initiation der Translation. (Adomavicius et al., 2019; Hershey et al., 2012). Es gibt vier humane EIF2-Kinasen, welche durch spezifischen Zellstress aktiviert werden können. Beispielsweise wird die Proteinkinase R (PKR) durch die Anwesenheit von viraler, doppelsträngiger RNA im Zytosol aktiviert (Gal-Ben-Ari et al., 2019; Meurs et al., 1990).

Der *mechanistic target of Rapamycin* (mTOR) Komplex koordiniert Wachstum und Metabolismus der Zellen in Abhängigkeit der äußeren Bedingungen (Brown et al., 1994; Saxton & Sabatini, 2017). Unter anderem reguliert mTOR die Initiation der Translation durch Phosphorylierung von *eIF4E binding protein 1* (4E-BP). 4E-BP bindet und inhibiert im unphosphorylierten Zustand eIF4E. Nach Phosphorylierung durch mTOR dissoziiert 4E-BP von eIF4E, wodurch sich der eIF4F-Komplex bilden und die Cap-abhängige Translation stattfinden kann.

#### 2.2.5. Degradierung der mRNA

Die Degradierung der mRNA ist ein wichtiger Schritt in der Regulation der Genexpression. Die Halbwertszeit einzelner mRNAs hängt von verschiedenen Faktoren ab, unter anderem stabilisierender oder destabilisierender RNA-Sequenzen und der Komposition der RBPs (Schoenberg & Maquat, 2012).

Die Degradierung eines Großteils der mRNA beginnt mit dem Verkürzen des poly(A)-Schwanzes bis auf etwa 10 nt, wodurch die mRNA schrittweise das poly(A)-Bindeprotein PABPC1 verliert, das die Translation aktiviert und das 3'-Ende der mRNA schützt. mRNAs mit so verkürztem poly(A) Schwanz werden dann als oligoadenyliert (oligo(A)) bezeichnet (C.-Y. A. Chen & Shyu, 2011; Łabno et al., 2016; Yi et al., 2018). Deadenylierte Transkripte können anschließend entweder 5'→3' als auch 3'→5' abgebaut werden.

Ein Großteil der deadenylierten mRNA wird 5'→3' abgebaut. Der LSM1-7 Komplex bindet das 3'Ende der oligo(A)-mRNAs und rekrutiert die Decapping-Maschinerie

(Bouveret et al., 2000; Charenton & Graille, 2018; Tharun, 2009). Die Decapping-Maschinerie besteht aus dem *decapping mRNA 2* (DCP2) Enzym, und dessen essentiellm Kofaktor DCP1a (Charenton & Graille, 2018; T. Lai et al., 2012; van Dijk et al., 2002). Nach dem Entfernen des Caps weist die mRNA ein 5'-Monophosphat auf und wird durch die 5'3'-Exonuklease Xrn1 degradiert (Braun et al., 2012).

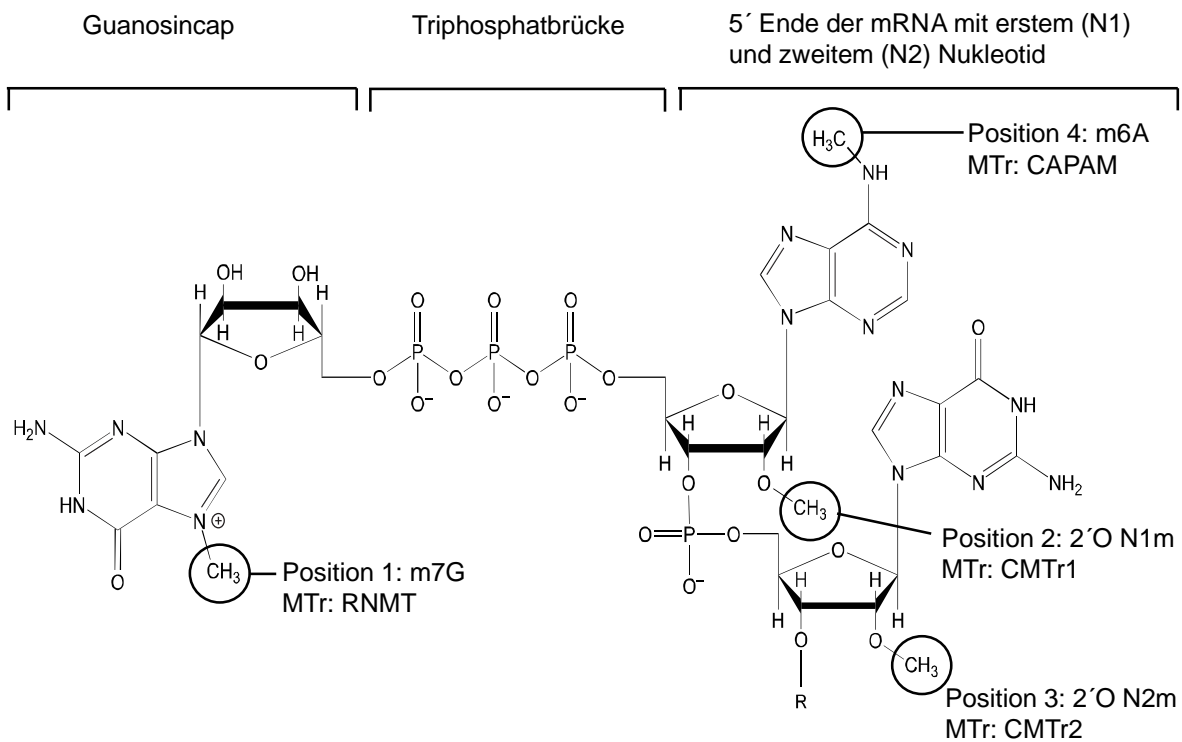
Alternativ findet der Abbau 3'→5' durch zytosolische SKIV-Komplex-Exosomen (siehe auch Kapitel 2.6.2) oder die Exonuklease Dis3L2 statt (Siwaszek et al., 2014). Dis3L2 baut bevorzugt oligo(U)-modifizierte RNAs ab und spielt eine wichtige Rolle beim Abbau aberranter RNA-Spezies (Ustianenko et al., 2016; M. P. Thomas et al., 2015). Beim 3'→5' Abbau bleibt ein kurzes, gecapptes Oligonukleotid über, welches durch *decapping scavenger* (DcpS) abgebaut wird (Milac et al., 2014).

### 2.3. Die Generierung und Funktion des mRNA-Caps

Das mRNA-Cap am 5'-Ende ist ein Charakteristikum von eukaryotischer mRNA und für die Funktion der mRNA von entscheidender Bedeutung. Es schützt das Transkript vor 5'3'-Exonuklease und rekrutiert Faktoren, die Transkription, Prozessierung, Export und Translation vermitteln (Ramanathan et al., 2016).

Die Cap-Struktur besteht aus einem an Position N7-methylierten Guanodin (m7G), welches mit einer invertierten 5' zu 5' Triphosphatbrücke an das erste Nukleotid (N1) der naszierenden RNA verbunden ist (S. A. Martin et al., 1975; Shatkin, 1976). Zunächst wird ein Guanodin auf das 5'-Ende übertragen (CapG (GpppN)), welches anschließend an der Position N7 methyliert wird (m7GpppN). Dieses Cap (m7GpppN) wird auch als Cap0 bezeichnet und wird in niedrigen Eukaryoten wie Hefen gefunden. In höheren Eukaryoten wird die Cap-Struktur durch 2'-O-Methylierung am ersten Nukleotid weiter zu Cap1 modifiziert (m7GpppN1m). Cap1 kann durch weitere Methylierungsschritte außerdem zu Cap2 (m7GpppN1mN2m) sowie – wenn das erste Nukleotid ein Adenosin ist – durch N6-Methylierung am Adenosin zu m7Gpppm6Am modifiziert werden (Banerjee, 1980; Yasuhiro Furuichi, 2015). Alle an der Capping Reaktion beteiligten Methyltransferasen nutzen S-Adenosylmethionin (SAM) als Methyl donor. Die Cap-Struktur und die beteiligten Methyltransferasen werden in Abbildung 3 gezeigt.

## A



## B

	Methyltransferase: Position:	RNMT	CMTr1	CMTr2	CAPAM
		Position 1 m7G	Position 2 N1m	Position 3 N2m	Position 4 m6A
Cap Name:	Cap Struktur:				
CapG	GpppN1N2	H	H	H	H
Cap0	m7GpppN1N2	CH <sub>3</sub>	H	H	H
Cap1	m7GpppN1mN2	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H
Cap2	m7GpppN1mN2m	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
Cap m6Am	m7Gpppm6AmN2	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H / CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>

Abbildung 3: mRNA Cap-Struktur.

A) Cap-Struktur (modifiziert nach Galloway et al, 2020). Dargestellt sind das Guanosincap und die ersten zwei Nukleotide (N1 und N2) der RNA, sowie die durch die Methyltransferasen RNMT, CMTr1, CMTr2 und CAPAM eingebrachten Methylierungen. B) Nomenklatur der Cap-Strukturen abhängig vom Methylierungsstatus des Caps. Angegeben sind Position der Methylierung und die entsprechende Methyltransferase.

Es wurde lange angenommen, dass alle reifen mRNAs mindestens die volle Cap1-Struktur mit N7-methyliertem Guanosin-Cap und 2'O-methyliertem ersten Nukleotid besitzen. Neuere Studien zeigen jedoch, dass durchaus Ausnahmen existieren (Akichika et al., 2019; Galloway et al., 2020; J. Wang et al., 2019).



### 2.3.1. Die kotranskriptionale Capping-Reaktion

Das Capping – die Synthese einer Cap-Struktur am 5'-Ende der naszierenden mRNA – ist der erste Maturierungsschritt einer prä-mRNA (Bentley, 2014). Alle Schritte der Cap1-Synthese finden kotranskriptional im Zellkern statt. Transkription und Capping sind dabei nicht nur zeitlich und räumlich gekoppelt, sondern auch funktionell wechselseitig voneinander abhängig (Kachaev et al., 2020).

Der RNA-Austrittstunnel der RNA Pol II liegt in räumlicher Nähe zur CTD, so dass naszierende Transkripte kurz nach dem Austritt aus der RNA Pol II und ab einer Länge von etwa 25 Nukleotiden gecappt werden (Coppola et al., 1983).

Durch die Serin 5-Phosphorylierung (pS5) der RNA Pol II CTD in der Initiationsphase der Transkription werden die Enzyme der Capping-Maschinerie rekrutiert (Bentley, 2014).

#### 2.3.1.1. Das Capping-Enzym (CE) generiert CapG

Die von RNA Pol II transkribierte RNA trägt ein 5'-Triphosphat (5'pppRNA). Das bifunktionale Capping-Enzym (CE) (auch bekannt als *RNA guanylyltransferase and 5'-phosphatase* (RNGTT)) entfernt zuerst das  $\gamma$ -Phosphat, wodurch ein 5'-Diphosphat-Ende (5'ppRNA) entsteht. Als nächstes überträgt CE ein Guanodinmonophosphat (GMP) an das 5'-Ende (GpppRNA). Dieses unmethylierte Cap wird als CapG bezeichnet.

CE bindet direkt an pS5 CTD und wird dadurch allosterisch aktiviert (Ghosh et al., 2011; Ho & Shuman, 1999; McCracken et al., 1997).

#### 2.3.1.2. RNMT generiert Cap0

Die RNA-Guanosin-N7-Methyltransferase (RNMT) methyliert die N7-Position des Guanosin-Caps (m7Gppp) und generiert so Cap0 (Tsukamoto et al., 1998). Die N-terminale Domäne von RNMT vermittelt die Rekrutierung zu RNA Pol II in Abhängigkeit der pS5 der CTD und wird durch verschiedene Signalwege posttranslational modifiziert, was die Methyltransferase-Aktivität von RNMT beeinflusst (Aregger & Cowling, 2013; Varshney et al., 2018).

RNMT interagiert mit *RNMT activating miniprotein* (RAM), welches die Aktivität von RNMT erhöht, in dem es die Konformation des aktiven Zentrums verändert und die Affinität für den Methyl donor SAM erhöht (Gonatopoulos-Pournatzis et al., 2011; Varshney et al., 2016).

### 2.3.1.3. CMTr1 generiert Cap1

Die Cap-Methyltransferase CMTr1 methyliert die 2'-O-Position des ersten Nukleotids (N1-2'O) von Cap0-modifizierter mRNA und generiert so Cap1 (m7GpppN1m) (Bélanger et al., 2010). Zusätzlich zu Cap0 akzeptiert sie auch unmethyliertes CapG als Substrat und generiert GpppN1m, welches anschließend, durch die Aktivität von RNMT, ebenfalls zu Cap1 umgewandelt werden kann. Da die Methylierungsaktivität von CMTr1 für Cap0 und CapG etwa gleich ist (Bélanger et al., 2010; Smietanski et al., 2014), ist bisher unklar, in welcher Reihenfolge CMTr1 und RNMT ihre Methylierungen vornehmen.

#### Proteindomänen von CMTr1

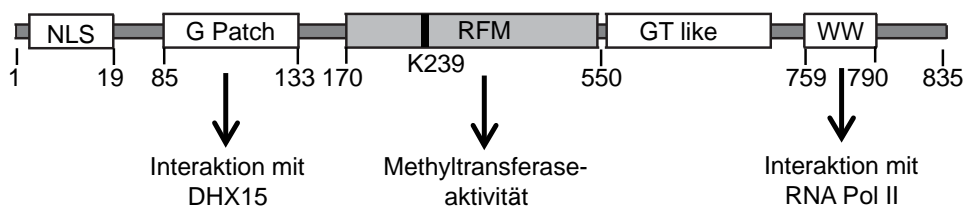


Abbildung 4: Proteindomänen von CMTr1.

CMTr1 besteht aus verschiedenen Domänen: NLS (*nuclear localisation signal*) vermittelt den Transport in den Zellkern. Die glycinreiche Domäne (*G Patch*) vermittelt die Interaktion mit DHX15. Die katalytisch aktive *Rossmann fold methyltransferase domain* (RFM) vermittelt die Methylierungsreaktion. Die Aminosäure Lysin 239 (K239) ist Teil des aktiven Zentrums. Die Bedeutung der katalytisch inaktiven *guanylyltransferase like domain* (GT-like) ist nicht vollständig aufgeklärt. Die WW-Domäne vermittelt die Interaktion mit RNA Pol II.

CMTr1 besteht aus fünf verschiedenen Domänen (Abbildung 4). CMTr1 besitzt N-terminal ein Kernlokalisierungssignal (*nuclear localisation signal* (NLS)) und eine glycinreiche Domäne (*G Patch*). Die katalytische Aktivität wird durch die *Rossmann fold methyltransferase domain* (RFM) vermittelt, die C-terminalen Domänen *guanylyltransferase like domain* (GT-like) und die WW-Domäne erhöhen die Enzymaktivität *in vitro* (Smietanski et al., 2014).

CMTr1 interagiert über die WW-Domäne direkt mit RNA Pol II CTD, in Abhängigkeit der Serin 5-Phosphorylierung (Haline-Vaz et al., 2008; Inesta-Vaquera et al., 2018).

Vor kurzem wurde die *DEAH-box RNA helicase* (DHX15) als Interaktionspartner von CMTr1 identifiziert (Inesta-Vaquera et al., 2018; Toczydlowska-Socha et al., 2018).

Der Effekt der Bindung von DHX15 an CMTr1 ist noch nicht abschließend geklärt. Es wurde einerseits gezeigt, dass DHX15 *in vitro* die Methyltransferaseaktivität von CMTr1 hemmt (Inesta-Vaquera et al., 2018b). Andererseits wird die Methyltransferaseaktivität gegenüber RNAs mit starken Sekundärstrukturen am 5'-Ende erhöht, da diese durch die Helikaseaktivität von DHX15 aufgelöst werden (Toczydlowska-Socha et al., 2018). Interessanterweise wird DHX15 nicht zusammen mit CMTr1 zur RNA Pol II rekrutiert; im Gegenteil, die Bindungen von DHX15 und RNA Pol II pS5 schließen sich gegenseitig aus (Inesta-Vaquera et al., 2018).

#### **2.3.1.4. CAPAM generiert m7Gpppm6Am**

Wenn das erste Nukleotid eines Cap1-Transkriptes ein Adenosin (A) ist, kann es durch die Cap-Adenosin-N6-Methyltransferase (CAPAM) zusätzlich an Position N6 methyliert werden, so dass m7Gpppm6Am entsteht (Akichika et al., 2019; Boulias et al., 2019; Sendinc et al., 2019; Sun et al., 2019). Diese Cap-Modifikation wird auch als m6Am abgekürzt.

Ein Großteil der mit Adenosin beginnenden Transkripte ist N6-methyliert, der Prozentsatz schwankt aber je nach Zelllinie und Organ (Akichika et al., 2019).

Welche Transkripte in der Zelle ein m6Am-Cap tragen, ist reguliert und wurde transkriptomweit ermittelt (Boulias et al., 2019; Linder et al., 2015).

CAPAM hat eine starke Präferenz für Cap1-RNA und methyliert Cap0-RNA *in vitro* nur schlecht (Akichika et al., 2019).

CAPAM bindet abhängig von der Phosphorylierung von Serin 5 an die RNA Pol II CTD, und scheint daher die prä-mRNA kotranskriptional zu methylieren (Akichika et al., 2019; Hirose et al., 2008).

Die Cap-N6-Methylierung ist reversibel und kann durch die Demethylase *fat mass and obesity associated protein* (FTO) wieder entfernt werden (Mauer et al., 2017; Vujovic et al., 2013).

#### **2.3.2. CMTr2 generiert posttranskriptional Cap2**

Die Cap-spezifische mRNA-Methyltransferase 2 (CMTr2) methyliert bei etwa 50% der mRNAs an der 2' O Position des zweiten Nukleotids (N2) (Y Furuichi et al., 1975; Werner et al., 2011). Die entstehende Cap-Struktur wird Cap2 genannt (m7GpppN1mN2m).

Im Gegensatz zu den anderen Capping-Enzymen ist CMTr2 nicht im Zellkern, sondern vor allem im Zytosol lokalisiert. Die Cap2-Generierung erfolgt also nicht kotranskriptional, sondern an fertig prozessierten, reifen mRNAs. Die Bedeutung der Cap2-Generierung ist weitestgehend ungeklärt (Smietanski et al., 2014; Werner et al., 2011).

### 2.3.3. Cap-bindende Proteine

#### 2.3.3.1. Der cap binding complex (CBC)

Der *cap binding complex* (CBC) bindet das Cap kurz nach Abschluss der Cappingreaktion und bleibt an die mRNA gebunden, bis er schließlich durch eIF4E ersetzt wird, um die Translation der mRNA zu ermöglichen (Gonatopoulos-Pournatzis & Cowling, 2014). CBC ist ein Heterodimer aus den Proteinen NCBP1 und NCBP2. NCBP2 vermittelt die Bindung an das Cap, während NCBP1 die Affinität von NCBP1 erhöht und mit mRNA-Maturierungsfaktoren interagiert (Gonatopoulos-Pournatzis & Cowling, 2014; Mazza et al., 2001). Ein alternativer CBC, bei dem NCBP1 das Heterodimer mit NCBP3 statt mit NCBP2 bildet, wurde beschrieben. Dieser alternative CBC hat Effekte auf die antivirale Antwort und zellulären Stress (Gebhardt et al., 2015, 2019).

Die N7-Methylierung des Caps ist für die Affinität der Bindung zwischen Cap und CBC entscheidend: CBC bindet Cap0 mit mehr als hundertfach erhöhter Affinität im Vergleich zu CapG. Die 2'-O-Methylierung des ersten Nukleotides scheint hingegen keine Rolle zu spielen, denn Cap0 und Cap1 binden mit vergleichbarer Affinität (Worch et al., 2005).

Die Bindung von CBC an naszierende RNA hat positive Effekte auf deren Transkription und Maturierung: CBC beeinflusst den durch P-TEFb vermittelten Übergang der Transkriptionsmaschinerie aus der Promotor-proximalen Pausierung in die Elongationsphase. Dafür interagiert CBC direkt mit P-TEFb, was eine notwendige Voraussetzung für die P-TEFb-katalysierte Phosphorylierung von Serin 2 in der RNA Pol II CTD darstellt. CBC scheint außerdem zur Rekrutierung von Spleißfaktoren zum Elongationskomplex beizutragen (Lenasi et al., 2011). CBC bindet direkt an Komponenten des Spleißosoms, rekrutiert es zu der naszierenden mRNA und ermöglicht so ein effizientes kotranskriptionales Spleißen der RNA (Jiao

et al., 2013; Pabis et al., 2013). CBC wird auch für die 3'-Prozessierung benötigt, da es direkt mit den CPA-Faktoren interagiert. In von CBC befreiten Kernextrakten wird die naszierende mRNA an der PAS nur verlangsamt geschnitten und polyadenyliert (Flaherty et al., 1997).

CBC interagiert mit AlyRef des TREX-Komplexes und vermittelt den Export der mRNA aus dem Zellkern (H. Cheng et al., 2006; Chi et al., 2013). Im Zytosol initiiert CBC eine erste, der Qualitätskontrolle dienende Translation der mRNA. Anschließend wird CBC durch eIF4E ersetzt (Maquat et al., 2010).

Weitere Bindungspartner interagieren mit CBC und beeinflussen die Prozessierung der RNA. Die prominentesten sind *arsenid resistance protein 2* (ARS2), *phosphorylated adaptor for RNA export* (PHAX) und *zinc finger CCH-type containing 18* (ZC3H18). Die Bindung von ARS2 und NELF an CBC beeinflusst die Terminierung der Transkription von nicht polyadenylierten mRNAs (J.J Gruber et al., 2012; Narita et al., 2007). Die Bindung von ARS2 und PHAX an CBC beeinflusst außerdem die Prozessierung von gecappten, nicht-kodierenden RNAs (siehe Kapitel 2.5.2 und 2.5.3). ZC3H18 besitzt eine wichtige Funktion beim Abbau aberranter Transkripte (siehe Kapitel 2.6.1).

### **2.3.3.2. eIF4E**

Der Translationsinitiationsfaktor eIF4E ist das zytosolische Cap-bindende Protein und zentral für die Cap-abhängige Translationsinitiation (siehe Kapitel 2.2.3).

Wie CBC weist auch eIF4E eine hohe Affinität für m7G-methylierte Caps (Cap0/ Cap1) auf und bindet kaum an CapG. Die 2'-O-Methylierung des ersten Nukleotids zeigt in Bindungsexperimenten keinen Einfluss auf die Affinität von eIF4E, sodass Cap0 und Cap1 mit vergleichbarer Affinität gebunden werden. Das erste Nukleotid der mRNA beeinflusst die Affinität von eIF4E leicht, Purinbasen (A oder G) werden mit höherer Affinität gebunden (Niedzwiecka et al., 2002; Tamarkin-Ben-Harush et al., 2017; Worch et al., 2005). Es konnte keine unterschiedliche Affinität für m6Am methylierte und -unmethylierte RNAs festgestellt werden (Akichika et al., 2019).

Neben eIF4E gibt es zwei weitere Vertreter der eIF4E Familie, eIF4E2 und eIF4E3. Diese sind bisher nicht gut charakterisiert und haben, verglichen mit eIF4E, eine geringere Affinität für gecappte RNA (Frydryskova et al., 2016; Joshi et al., 2004, 2005).

## 2.4. Die Cap-Struktur und die angeborene Immunantwort gegen körperfremde Nukleinsäuren

Zellen nutzen ein begrenztes Repertoire Keimbahn-kodierter Rezeptoren (*pattern recognition receptor*, PRR), welche evolutionär konservierte, körperfremde Strukturen eindringender Pathogene erkennen. So erkennt zum Beispiel der Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) Lipopolysaccharid, einen integralen Bestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien.

In der Zelle führt die Aktivierung von PRRs zur Induktion und Sezernierung von Zytokinen und Chemokinen. Diese rekrutieren Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems zum Ort der Infektion, wirken autokrin und parakrin auf Zellen und induzieren die Synthese antimikrobieller Effektoren (Janeway et al., 2016).

Die Erkennung von Viren in der Zelle wird dadurch erschwert, dass diese keinen eigenen Stoffwechsel haben, sondern von der infizierten Zelle selbst hergestellt werden. Die Erkennung von Viren beruht vor allem auf Nukleinsäure-Rezeptoren, die ebenfalls zu den PRRs gehören. Dabei ist entscheidend, dass die PRRs nicht durch endogene, also physiologisch in der Zelle vorliegende, Nukleinsäuren aktiviert werden dürfen, dafür aber fremde, virale Nukleinsäuren effizient erkennen müssen.

Die Erkennung viraler Nukleinsäuren folgt dabei drei Prinzipien: der Verfügbarkeit, der Lokalisation und Struktur: Die Verfügbarkeit hängt von der Konzentration eines PRR-Liganden und seiner Stabilität gegenüber Degradation ab; ebenso von bindenden Proteinen, die die Nukleinsäure vor der Erkennung durch PRRs schützen. Die Lokalisation einer Nukleinsäure innerhalb der Zelle ist wichtig für die Erkennung durch PRRs, denn endogene Nukleinsäuren sind an bestimmte Kompartimente der Zelle gebunden. PRRs erkennen falsch lokalisierte Nukleinsäuren, z. B. zytosolische DNA, als körperfremd. Sie erkennen Nukleinsäuren außerdem an definierten Strukturen, welche in endogenen Nukleinsäuren nicht vorkommen, z. B. langen doppelsträngigen RNA (dsRNA) (Schlee & Hartmann, 2016).

Das mRNA-Cap ist eine wichtige molekulare Signatur, um mRNAs als körpereigen zu kennzeichnen. Nicht oder unvollständig gecappte RNAs werden durch zytosolische

PRRs (siehe unten) erkannt, durch antivirale Effektorproteine gebunden und an der Translation gehindert (Leung & Amarasinghe, 2016a).

#### **2.4.1. *RIG-I like receptors* erkennen körperfremde RNA im Zytosol**

Die Familie der *RIG-I like helicases* (RLR) besteht aus drei zytosolischen DExD/H Helikasen: *retinoic acid inducible gene 1* (RIG-I), *melanoma differentiation associated gene 5* (MDA5) und *laboratory of genetics and physiology 2* (LGP2).

RIG-I und MDA5 erkennen über ihre C-terminale Domäne definierte dsRNA-Liganden im Zytosol und lösen die Produktion von Typ-I-Interferon (IFN) aus. Dies geschieht durch die Bindung ihrer CARD-Domäne (*caspase recruitment domain*) an das MAVS (*mitochondrial antiviral signalling protein*) (Schlee & Hartmann, 2016).

Die Rolle von LGP2 ist nicht abschließend geklärt. LGP2 erkennt zwar RNA-Liganden, besitzt jedoch keine CARD und moduliert die RIG-I und MDA5 Signaltransduktion (Quicke et al., 2019; Schlee, 2013).

Während die Expression von vielen PRRs auf bestimmte, spezialisierte Immunzellen begrenzt ist, werden RIG-I und MDA5 ubiquitär exprimiert (Barchet et al., 2008; Kasumba & Grandvaux, 2019; Uhlén et al., 2015).

MAVS besitzt auch eine CARD und wird durch CARD-CARD-Interaktion mit RIG-I oder MDA5 aktiviert. MAVS dient als Adapter für die weitere Signaltransduktion und aktiviert die Transkriptionsfaktoren *nuclear factor kappa-light-chain B* (NF- $\kappa$ B), *interferon regulator factor 3* (IRF3) und IRF7. IRF3 und IRF7 werden durch die Kinasen *TANK binding kinase 1* (TBK1) und *inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase epsilon chain* (IKK- $\epsilon$ ) phosphoryliert und bilden Homo- oder Heterodimere.

NF- $\kappa$ B wird in einem mehrschrittigen Prozess durch den Abbau des Inhibitor of NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) aktiviert. IRF3/7 und NF- $\kappa$ B translozieren daraufhin in den Nukleus und induzieren gemeinsam die Transkription von Typ-I-Interferon (IFN) und dem Chemokin IP10, während NF- $\kappa$ B weitere proinflammatorische Zytokine induziert (Brisse & Ly, 2019; Honda et al., 2006; Sakaguchi et al., 2003). Die Detektion viraler RNA und die Signaltransduktion sind in Abbildung 5A zusammengefasst.

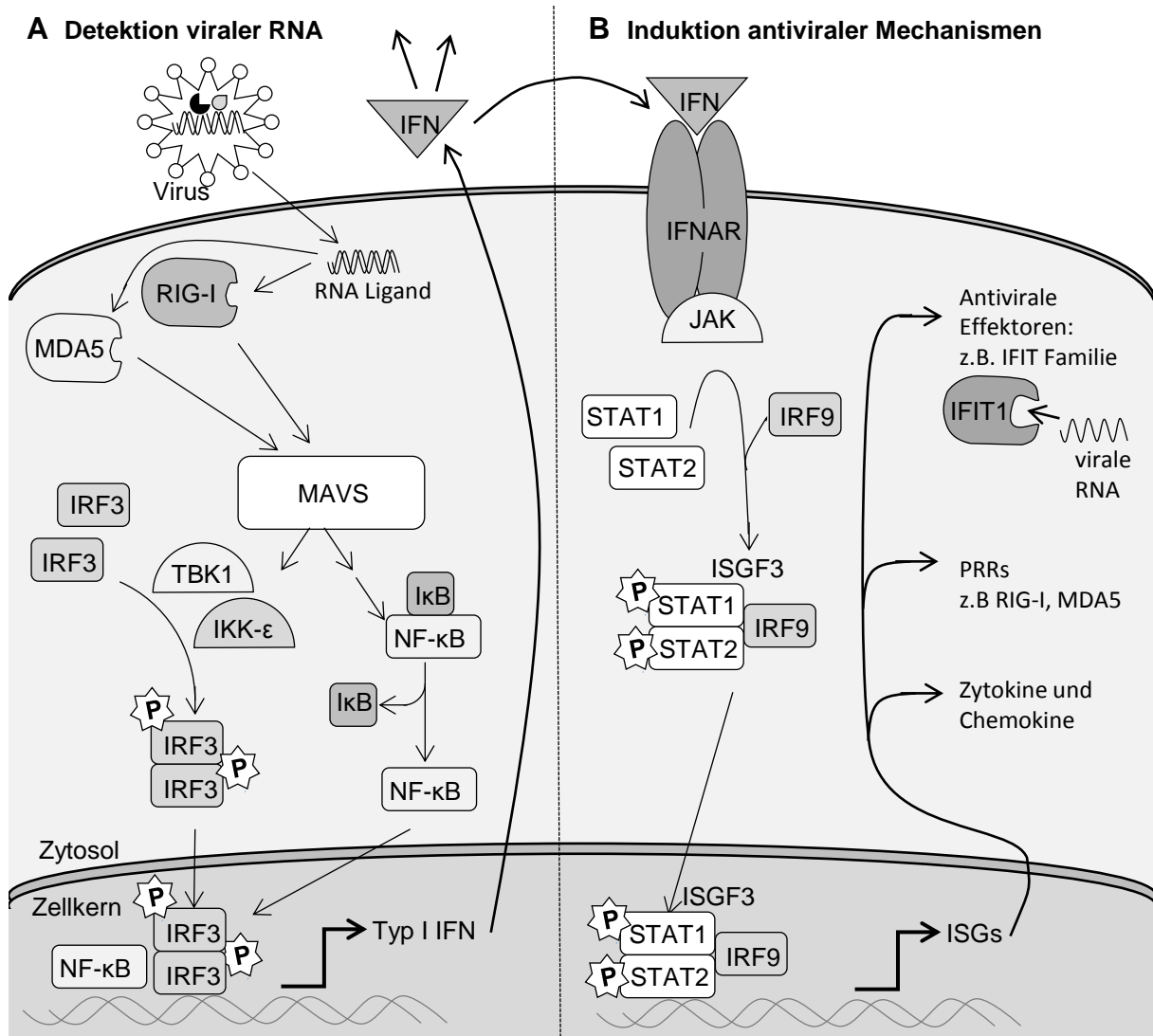


Abbildung 5: RIG-I Signalweg und durch IFN induzierte antivirale Mechanismen.

A) Detektion von viraler RNA. RIG-I und MDA5 werden durch zytosolische RNA-Liganden aktiviert und binden daraufhin das Adapterprotein MAVS. MAVS aktiviert den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B durch Degradierung von I $\kappa$ B. Der Transkriptionsfaktor IRF3 wird durch Phosphorylierung durch TBK1 und IKK- $\epsilon$  aktiviert und dimerisiert. IRF3 und NF- $\kappa$ B induzieren die Expression von Typ-I-IFN. B) Induktion antiviraler Mechanismen. Die Bindung von IFN an den Interferonrezeptor IFNAR aktiviert die Januskinase (JAK1, Tyk2), die STAT1 und STAT2 phosphorylieren. STAT2 und IRF9 bilden zusammen den Transkriptionsfaktor ISGF3, der in den Zellkern transloziert und die Induktion von Interferon-stimulierten Genen (ISG) induziert, wodurch die Zelle in einen antiviralen Zustand versetzt wird. Zu den ISG gehören antivirale Effektorproteine wie z. B. IFIT1, sowie PRRs wie RIG-I sowie Zytokine und Chemokine.

#### 2.4.1.1. RIG-I

Der ideale Ligand von RIG-I ist doppelsträngige RNA (dsRNA), die am 5'-Ende ein Triphosphat aufweist (ppp-dsRNA) (Hornung et al., 2006; Pichlmair et al., 2006; Schlee et al., 2009). Diphosphorylierte dsRNA (pp-dsRNA) wird ebenfalls durch RIG-I



erkannt (Goubau et al., 2014). Dephosphorylierte RNA (OH-dsRNA) oder monophosphorylierte RNA (p-dsRNA) wird dagegen nicht effizient von RIG-I erkannt (Schlee et al., 2009).

Auch dsRNA, die durch CapG (Gppp-dsRNA) und Cap0 (m7Gppp-dsRNA) modifiziert sind, werden von RIG-I als Ligand akzeptiert. Die 2'-O-Methylierung am ersten Nukleotid in Cap1-dsRNA (m7GpppN1m-dsRNA) hingegen verhindert die RIG-I-Aktivierung (Devarkar et al., 2016; Schuberth-Wagner et al., 2015).

Eine Länge von >19 bp ist für einen starken RIG-I-Liganden ausreichend. 5'- oder 3'-Überhänge reduzieren die Aktivität von RIG-I Liganden (Schlee et al., 2009).

RIG-I erkennt unter anderem die Infektion von Negativstrang-RNA-Viren wie Influenzaviren, Bunyaviren und Rhabdoviren (Brisse & Ly, 2019). Die Erkennung geschieht über ppp-dsRNA-Intermediate, die während der Replikation dieser RNA-Viren im Zytosol der Zelle entstehen (Rehwinkel et al., 2010; Schlee, 2013).

Viren haben eine Vielzahl von Strategien entwickelt, um der Detektion durch RIG-I zu entgehen. So kodieren Flaviviren virale Capping-Enzyme, um Cap1-Strukturen zu generieren (Zhou et al., 2007). Gelbfiebertviren, die durch eine Punktmutation in der viralen 2'-O-Methyltransferase kein Cap1 bilden können, werden verstärkt von RIG-I erkannt, stärker in der Replikation gehemmt und induzieren eine höhere antivirale Immunantwort (Schuberth-Wagner et al., 2015).

Die von RIG-I erkannten 5'-RNA-Modifikationen ppp, pp, CapG, und Cap0 sind Zwischenprodukte der mRNA-Capping-Reaktion (siehe Kapitel 2.3.1). In humanen Zellen lässt sich nahezu keine CapG oder Cap0 RNA detektieren, daher ist davon auszugehen, dass diese unvollständigen Caps eine kurze Halbwertszeit haben (Galloway et al., 2020), und – da der Export von mRNAs aus dem Zellkern mindestens Cap0 und die Bindung von CBC erfordert (siehe Kapitel 2.3.3.1) – nicht im Zytosol auftreten. Somit sind potentielle endogene Liganden räumlich von RIG-I getrennt, während RIG-I nicht durch die im Zytosol vorkommende maturierte Cap1-mRNA aktiviert werden kann.

Die Aminosäure Histidin 830 innerhalb der RNA-Bindungstasche von RIG-I verhindert sterisch die Bindung von Cap1-RNA. Durch eine Aminosäureaustauschmutation von Histidin 830 zu Alanin (H830A) kann RIG-I auch

durch Cap1-RNA stimuliert werden. Eine Überexpression von RIG-I H830A führt in Zellen zur Aktivierung von RIG-I durch endogene RNA. Auch der transiente Knockdown von CMTr1, der für die Cap1-Generierung zuständigen Methyltransferase, führt zur RIG-I Aktivierung durch endogene RNA (Schuberth-Wagner et al., 2015).

Vermutlich kann nur ein kleiner Teil der endogenen RNAs unter diesen experimentellen Bedingungen RIG-I aktivieren, denn die effiziente Aktivierung von RIG-I erfordert neben einer passenden 5'-Modifikation auch, dass die RNA doppelsträngig ist. Die genauen endogenen Liganden wurden bisher nicht identifiziert.

#### **2.4.1.2. MDA5**

Der Ligand für MDA5 ist weniger gut definiert. MDA5 erkennt im Gegensatz zu RIG-I präferentiell lange dsRNA (>300 bp) (Kato et al., 2008). Die Aktivierung von MDA5 ist weniger von Modifikationen der Enden abhängig, sondern von der Bindung an lange Filamente auf der dsRNA (Brisse & Ly, 2019; Peisley et al., 2012; Wu et al., 2013).

Natürliche Liganden für MDA5 sind RNA-Genome von dsRNA-Viren oder dsRNA-Replikationsintermediaten von Positivstrang-RNA-Viren (Brisse & Ly, 2019).

Es wurde gezeigt, dass Coronaviren (Stamm HCoV-229E), die durch eine Punktmutation in der viralen Cap-2'-O-Methyltransferase kein Cap1 herstellen können, eine stärkere, MDA5-abhängige IFN-Antwort auslösen. Der Mechanismus hierfür ist ungeklärt (Züst et al., 2011).

#### **2.4.2. Interferon induziert antivirale Effektorproteine**

Sezerniertes IFN aktiviert auto- und parakrin den IFN $\alpha$ -Rezeptor (IFNAR). IFNAR löst über die Janus-Kinasen (JAK) die Phosphorylierung von *signal transducer and activator of transcription 1* (STAT1) und STAT2 aus.

STAT1 und STAT2 bilden zusammen mit *interferon regulator factor* IRF9 den Transkriptionsfaktorkomplex *interferon-stimulated gene factor 3* (ISGF3).

ISGF3 transloziert in den Nukleus und induziert die Transkription von den sogenannten *interferon stimulated genes* (ISG). ISGs besitzen ein *interferon stimulated response element* (ISRE), das von ISGF3 erkannt wird.

Durch die Expression der ISGs wird die Zelle in einen antiviralen Zustand versetzt (siehe Abbildung 5B, Seite 24).

Zu den ISGs gehören Zytokine, PRRs wie RIG-I und MDA5 sowie antivirale Effektorproteine (Fensterl et al., 2015; Ivashkiv & Donlin, 2014; Samuel, 2001).

### **2.4.3. antivirale Effektorproteine der IFIT Familie**

Die Familie der *interferon-induced proteins with tetratricopeptide repeats* (IFIT) besteht aus IFIT1, IFIT1B, IFIT2, IFIT3 und IFIT5. IFIT Proteine werden durch IFN stark induziert und inhibieren die Translation viraler RNA (Habjan et al., 2013; Leung & Amarasinghe, 2016; Pichlmair et al., 2011).

IFITs binden an das 5'-Ende von viraler ssRNA in Abhängigkeit der 5'-Modifikationen:

IFIT1 bindet *in vitro* mit hoher Affinität an Cap0-, aber kaum an Cap1-modifizierte RNA (Abbas et al., 2017; Habjan et al., 2013; Kumar et al., 2014). Die Bindung von IFIT1 an Cap0-RNA verhindert deren Translation (Kumar et al., 2014).

IFIT2 und IFIT3 bilden mit IFIT1 Heterooligomere. IFIT1:IFIT2 und IFIT1:IFIT2:IFIT3 erhöhen die Affinität von IFIT1 für Cap0 und verstärken die translationale Inhibition von Cap0-RNA (Fleith et al., 2018; Johnson et al., 2018).

IFIT2 und IFIT3 interagieren selbst nicht direkt mit dem 5'-Ende viraler RNAs. IFIT2 besitzt jedoch eine RNA-Bindedomäne und bindet bevorzugt an AU-reiche Sequenzen (Kumar et al., 2014; Z. Yang et al., 2012).

IFIT1B ist ein Paralog von IFIT1. Die Funktionalität der beiden Proteine unterscheidet sich stark zwischen verschiedenen Wirbeltierspezies. Humanes IFIT1B ist schlecht charakterisiert und nach aktuellem Erkenntnisstand nicht funktional (Daugherty et al., 2016). Mäuse und Kaninchen besitzen kein IFIT1, dafür aber funktionales IFIT1B. *In vitro* zeigt IFIT1B von Kaninchen eine hohe Affinität für Cap0-RNA, nicht aber für Cap1-RNA (Kumar et al., 2014a). Murines IFIT1B, nicht aber humanes IFIT1, kann ohne weitere Kofaktoren die Translation von Cap0-RNA inhibieren (Daugherty et al., 2016). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen, dass für die Inhibition 2'-O-Methylierungs-defizienter Viren im Menschen neben IFIT1 auch IFIT3 benötigt wird (Johnson et al., 2018)

Die Rolle von IFIT5 ist nicht hinreichend aufgeklärt. IFIT5 bindet neben triphosphorylierter RNA eine Reihe anderer 5'-Modifikationen und spielt eine Rolle in der Modulierung der RIG-I- und MDA5-abhängigen Immunantwort (Habjan et al., 2013; Katibah et al., 2014; B. Zhang et al., 2013).

## 2.5. Capping anderer RNA Pol II-Transkripte

Neben mRNA produziert RNA Pol II auch andere, nicht proteinkodierende RNA-Spezies (ncRNA). Alle RNA Pol II-Transkripte werden zunächst gecappt, verlieren oder modifizieren ihr Cap jedoch zum Teil während der Prozessierung.

### 2.5.1. microRNA

*MicroRNA* (miRNA) sind 15-25nt kurze ncRNA und stellen die RNA-Komponenten des sogenannten *RNA-induced silencing complex* (RISC) dar. RISC spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Genexpression: komplementäre Sequenzen zwischen miRNA und Ziel-mRNAs rekrutieren RISC und lösen die Inhibition der Translation oder den Abbau der Ziel-mRNA aus. Detaillierte Informationen über die Bedeutung und den Mechanismus der miRNA-vermittelten Genregulation finden sich im Übersichtsartikel von O'Brien (O'Brien et al., 2018).

Ein Großteil der humanen miRNA Sequenzen sind in Introns von Genen lokalisiert. Diese werden durch RNA Pol II transkribiert und anschließend gecappt und polyadenyliert (Cai et al., 2004). Andere miRNAs werden durch RNA Pol III transkribiert (Borchert et al., 2006). miRNA liegen in den Transkripten als etwa 70 nt lange Haarnadelstrukturen vor und werden durch den *microprocessor complex* herausgeschnitten, prozessiert und in den RISC-Komplex geladen (O'Brien et al., 2018).

Reife miRNAs tragen kein Cap. Das Cap spielt jedoch eine wichtige Rolle in der miRNA-Prozessierung. So binden der CBC und sein Bindungspartner ARS2 an das Cap und beeinflussen die weitere Prozessierung der miRNA. Die Depletion von CBC und ARS2 führen zur reduzierten Prozessierung von miRNA und einer verminderten RISC vermittelter Genregulation (Joshua J. Gruber et al., 2009; O'Sullivan et al., 2015).

### 2.5.2. snRNA

*Small nuclear RNA* (snRNA) sind kurze, im Zellkern lokalisierte RNAs und stellen die RNA-Komponenten des Spleißosoms dar. snRNAs bilden zusammen mit einer Vielzahl von Proteinen die *small nuclear ribonucleoprotein* (snRNP) Komplexe. Das *major spliceosom* besteht aus fünf snRNPs (U1, U2, U4, U5 und U6) und katalysiert einen Großteil aller Spleißreaktionen der Zelle (M. T. Bohnsack & Sloan, 2018).

Durch das Spleißosom werden die Introns aus der prä-mRNA entfernt. Dabei bindet zunächst U1 über komplementäre Sequenzen an die *5' splice site* (5'SS) an der Exon-Intron-Grenze, und U2 den *branchpoint* (BP) innerhalb des Introns. Im Folgenden binden weitere Faktoren, die schließlich zunächst zu einer Umesterung der 2'OH-Gruppe des Adenosins am BP an die Phosphodiesterbindung der 5'SS führt, wodurch das Intron zu einer sogenannten Lariat-Struktur zirkualisiert. Die 3'OH-Gruppe am 5'-Exon wird dadurch frei und greift an der Phosphodiesterbindung der 3'SS an, wodurch das Intron freigesetzt und 5'-Exon und 3'-Exon verbunden werden. Eine detaillierte Beschreibung des Spleißosoms und der Spleißreaktion findet sich im Übersichtsartikel von Wilkinson (Wilkinson et al., 2020).

Die meisten snRNA (U1, U2, U4, U4atac, U7, U11 und U12) werden im Gegensatz zu vielen anderen kurzen nicht-kodierenden RNAs durch RNA Pol II als einzelne Transkriptionseinheit transkribiert und gecappt. Regulation und Ablauf der Transkription von snRNA unterscheiden sich zum Teil von der Transkription von mRNA (Jawdekar & Henry, 2008). Für die Reifung der snRNAs müssen sie in einem CBC-abhängigen Prozess aus dem Nukleus exportiert, im Zytosol prozessiert und wieder in den Nukleus importiert werden. Dieser Prozess unterscheidet sich vom Export der mRNA und erfordert die Bindung von CBC, ARS2 und PHAX (Ohno et al., 2000). Im Zytosol bindet der *survival motor neuron* (SMN) Komplex und rekrutiert Trimethylguanosen Synthase 1 (TGS1). TGS1 hypermethyliert das m7G-Cap zu 2,2,7-Trimethylguanosen (TMG) (Kufel & Grzechnik, 2019; Neuman de Vegvar & Dahlberg, 1990). Das Protein *snuportin-1* bindet das TMG Cap und importiert die snRNA zusammen mit Importin  $\beta$  in den Zellkern (Huber et al., 1998; Palacios et al., 1997). Die snRNA werden anschließend in den *cajal bodies* durch scaRNAs (siehe Kapitel 2.5.4) durch interne 2'O-Methylierung und Pseudouridinylierung weiter modifiziert (M. T. Bohnsack & Sloan, 2018).

Die TMG gecappten snRNA U1, U2, U4 und U5 werden – wahrscheinlich durch die Cap-Methyltransferasen CMTr1 und CMTr2 - am ersten und zweiten Nukleotid 2´O-methyliert, was für die Funktion der U2-snRNA und eine effiziente Spleißreaktion notwendig ist (M. T. Bohnsack & Sloan, 2018; Dönmez et al., 2004; Izumikawa et al., 2019; Karijolich & Yu, 2010).

Im Gegensatz dazu werden die snRNA U6 und U6atac von RNA Pol III transkribiert. Das 5´-Ende weist nach der Transkription ein Triphosphat (ppp) auf, welches durch *methylphosphate capping enzyme* (MePCE) zu einem  $\gamma$ -Monomethyl (CH<sub>3</sub>ppp) modifiziert wird (Jeronimo et al., 2007; Reddy et al., 1992).

### 2.5.3. snoRNA

*Small nucleolar RNA* (snoRNA) sind kurze (65-300 nt), vor allem im Nukleolus lokalisierte RNAs, die eine wichtige Rolle in der posttranskriptionalen Modifikation der ribosomalen RNA (rRNA) spielen. Es werden auf Grund von Strukturelementen und Funktion zwei Klassen von snoRNAs unterschieden: die *H/ACA* snoRNA (SNORA) und *C/D Box* snoRNA (SNORD). Beide Klassen sind mit unterschiedlichen Proteinen zu snoRNA Ribonukleoproteinkomplexen assoziiert (snoRNPs). snoRNPs führen Modifikationen in die rRNA ein, indem sie durch komplementäre Sequenzen an eine definierte Stelle der rRNA binden und die Enzyme des snoRNPs daraufhin die Modifikation katalysieren (Liang et al., 2019; Ojha et al., 2020).

C/D Box snoRNPs methylieren RNA an der 2´O-Position durch die Methyltransferase Fibrillarin während H/ACA Box snRNPs Uridin in der RNA zu Pseudouridin Synthetase Dyskerin pseudouridinylieren. (Balakin et al., 1996; Ojha et al., 2020).

Im Menschen sind snoRNA meist in Introns von sowohl proteinkodierenden als auch nicht-kodierenden Genen lokalisiert (sogenannte *snoRNA host genes* (SNHGs)). Nach Transkription des SNHG durch die RNA Pol II wird die Intronsequenz, die die snoRNA-Sequenz enthält, zu reifer snoRNA prozessiert. Daher trägt ein Großteil der snoRNA weder Cap noch poly(A) (Kufel & Grzechnik, 2019).

Einige wenige snoRNA werden nicht im Intron eines SNHG, sondern – ähnlich den snRNAs (siehe 2.5.2) – als einzelne Transkriptionseinheit durch RNA Pol II exprimiert (U3, U8, U13 und Telomerase RNA) (Tyc & Steitz, 1989). Bei diesen snoRNA wird das Cap von TGS1 zu einem TMG-Cap methyliert (Reddy et al., 1972; Tyc & Steitz,

1989). Im Gegensatz zu den snRNA reifen TMG-gecappte snoRNA im Zellkern, und die Bindung von CBC und PHAX wird für intranuklearen Transport benötigt (Boulon et al., 2004).

Der U3 snoRNA kommt eine besondere Bedeutung zu, sie fügt keine Modifizierungen in die rRNA sondern rekrutiert Prozessierungsfaktoren während der frühen rRNA Prozessierung (K. E. Bohnsack & Bohnsack, 2019; Kass et al., 1990; Ojha et al., 2020)

#### **2.5.4. scaRNA**

*Small cajal body associated RNA* (scaRNA) sind in ihrer Funktion und Biogenese eng mit den snoRNAs verwandt, methylieren und pseudouridinylieren jedoch nicht rRNA, sondern snRNA. Wie snoRNA besitzen sie entweder C/D- oder H/ACA-Boxen und formen snoRNPs. C/D scaRNA weisen darüber hinaus lange UG-Wiederholungen auf, H/ACA scaRNA eine zusätzliche CAB-Box (UGAG-Motiv) (Kufel & Grzechnik, 2019). scaRNA sind im Zellkern innerhalb der *cajal bodies* lokalisiert und tragen dort zur Prozessierung der snRNA bei (Darzacq et al., 2002).

#### **2.5.5. lncRNA**

Unter dem Begriff *long non coding RNA* (lncRNA) sind alle nicht-proteinkodierenden RNAs über 200nt zusammengefasst. lncRNA sind in ihrer Funktion und Biogenese sehr heterogen. *mRNA-like intergenetic transcripts* (lincRNA) werden wie mRNA gecappt, gespleißt und polyadenyliert, andere lncRNAs zirkularisieren (ciRNA) oder haben snoRNA-ähnliche Strukturen am 5'- und 3'-Ende und reifen durch die snoRNA-Biosynthese-Enzyme (Wilusz, 2016; Yao et al., 2019; Yin et al., 2012).

### **2.6. Exosom**

Das Exosom ist ein in Eukaryoten hoch konservierter Komplex von 3'5'-Exo- und Endonukleasen, der für die Prozessierung und den Abbau von vielen RNA Spezies von essentieller Bedeutung ist (Ogami et al., 2018) Die Funktion des Exosoms wird maßgeblich von den beiden Exosom-assoziierten RNA-Helikasen MTR4 und SKIV2L gesteuert. Diese Helikasen binden an zu prozessierende RNA, lösen ihre Sekundärstrukturen und führen sie der Prozessierung durch das Exosom zu (Meola et al., 2016; Ogami et al., 2018).

### 2.6.1. MTR4 und das nukleäre Exosom (NEXT/PAXT/TRAMP)

Die RNA-Helikase MTR4 kontrolliert das nukleäre Exosom und bindet abhängig von den Kofaktoren den *nuclear exosome targeting complex* (NEXT), den *poly(A) exosome targeting complex* (PAXT) und den TRAMP Komplex.

NEXT vermittelt über die Kofaktoren ZCCHC8 und RBM7 den Abbau aberranter RNA sowie von Introns, die durch den Spleißvorgang aus einer mRNA entfernt wurden. Darüber hinaus vermittelt NEXT die 3'-Maturierung von snoRNA, snRNA und nicht-polyadenylierter mRNA (Falk et al., 2016; Lubas et al., 2011; Ogami et al., 2018).

PAXT bindet über das CBC-bindende Protein ZC3H18 und PABPN1 gecappte und polyadenylierte mRNA. Der PAXT-abhängige Abbau konkurriert mit der mRNA-Exportmaschinerie und könnte der Qualitätskontrolle dienen, indem RNA, die nicht effizient genug aus dem Zellkern exportiert wird, degradiert wird (Fan et al., 2017; Ogami et al., 2017). PAXT ist außerdem an der Maturierung von snoRNA und anderen Transkripten beteiligt (Meola et al., 2016; Silla et al., 2020).

Der TRAMP-Komplex ist im Nukleolus lokalisiert und an der Prozessierung der rRNA beteiligt. Bei humanen Zellen ist dieser Prozess noch nicht genau aufgeklärt (Delan-Forino et al., 2020; Lubas et al., 2011; Ogami et al., 2018). In Hefen polyadenyliert TRAMP sowohl rRNA- als auch snoRNA-Vorläufer und führt sie der Prozessierung durch das Exosom zu (LaCava et al., 2005). TRAMP interagiert mit an der rRNA-Maturierung beteiligten Kofaktoren wie *Nuclear Valosin-Containing Protein-Like* (NVL2) (Lingaraju et al., 2019). In humanen Zellen führt ein Knockdown von TRAMP-Faktoren zu einem Defekt der rRNA-Prozessierung (Delan-Forino et al., 2020; Lubas et al., 2011).

### 2.6.2. SKIV2L und das zytosolische Exosom

Im Gegensatz zum nukleären Exosom ist das Exosom im Zytosol durch die RNA Helikase SKIV2L im SKI-Komplex reguliert. Der SKI-Komplex besteht in Hefen aus dem Gerüstprotein Ski3 (TTX37) und Ski8 (WDR61) aber ist im humanen System schlecht charakterisiert (Halbach et al., 2013; C. Schmidt et al., 2016).

Das SKI-Komplex-Exosom baut sowohl deadenylierte RNA als auch endonukleolytisch geschnittene RNA ab. Es wird an mRNA mit in der Transkription gestoppten (*stalled*) Ribosomen rekrutiert und spielt eine Rolle in der



Translationskontrolle (Anderson & Parker, 1998; C. Schmidt et al., 2016; Siwaszek et al., 2014; Tuck et al., 2020).

## 2.7. Ribosom

Ribosomen katalysieren die Translation von mRNA in Proteine. Ribosomen sind makromolekulare Komplexe, welche sich aus vier rRNAs und 79 ribosomalen Proteinen (RP) zusammensetzen (Ben-Shem et al., 2010; Klinge et al., 2012). Ribosomen und ihre Untereinheiten werden traditionell nach ihrem Sedimentationskoeffizienten in Svedberg-Einheiten benannt: ein eukaryotisches Ribosom wird 80S, die kleine Untereinheit 40S und die große Untereinheit 60S genannt. Die 40S-Untereinheit besteht aus 32 Proteinen (RPS, *ribosomal protein small subunit*) und der 18S-rRNA. Die 60S-Untereinheit besteht aus 47 Proteinen (RPL, *ribosomal protein large subunit*) und drei rRNAs – 28S, 5.8S und 5S. (Ben-Shem et al., 2010; Klinge et al., 2012)

## 2.8. Biosynthese von Ribosomen

Die Biosynthese von Ribosomen ist ein komplexer Prozess, der die Koordination der Transkription aller drei RNA-Polymerasen (RNA Pol I, II und III) und der Aktivität von hunderten, in die posttranskriptionale Prozessierung involvierten, Proteinen nötig macht (Fatica & Tollervey, 2002).

Die Generierung von Ribosomen ist einer der energetisch aufwändigsten Prozesse für eine Zelle: Bei Hefen im exponentiellem Wachstums nimmt die Produktion der rRNA 60% der gesamten Transkriptionsleistung in Anspruch. Dazu entfällt ein Großteil der mRNA Transkriptions- und Spleißkapazität der Zelle auf die Produktion und Maturierung von für ribosomale Proteine kodierende mRNA (Granneman & Tollervey, 2007; Warner, 1999).

Die Biosynthese der Ribosomen (Abbildung 6) findet im Nukleolus statt. Nukleoli sind dynamische Organellen innerhalb des Zellkerns, die sich durch die Transkriptionsaktivität der RNA Pol I bilden. RNA Pol I generiert prä-rRNA 47S, aus der durch eine Reihe endonukleolytischer Spaltungen in einer definierten Abfolge drei der vier rRNAs (28S, 18S und 5.8S) prozessiert werden. 5S, die vierte rRNA, wird durch RNA Pol III transkribiert (Ciganda & Williams, 2011).

Im prä-rRNA 47S Transkript ist 18S eine 5'-externe transkribierte Region (ETS, *external transcribed spacer*) vorgelagert, zwischen 18S und 5.8S sowie zwischen 5.8S und 28S rRNA liegen zwei interne transkribierte Regionen (ITS1 bzw. ITS2, *internal transcribed spacer*), der 28S ist die 3'-ETS nachgelagert (Abbildung 6). Die Prozessierung der 47S prä-rRNA ist nicht im Detail aufgeklärt. Die rRNA muss posttranskriptional modifiziert und durch Endo- und Exonukleasen geschnitten werden. Prozessierungsfaktoren müssen koordiniert rekrutiert und wieder entfernt werden, die rRNA muss mit RPs beladen und in die korrekte Tertiärstruktur gebracht werden. Eine Vielzahl von Enzymen, unter anderem Nukleasen, Helikasen, Chaperone und GTPasen, regulieren diesen Prozess (K. E. Bohnsack & Bohnsack, 2019). Dazu müssen alle an diesem Prozess beteiligten Proteine nach ihrer Translation im Zytosol in den Nukleolus importiert werden.

Bereits während der Transkription lagern sich im Nukleolus RPs und Prozessierungsfaktoren an die 47S prä-rRNA an und bilden die sogenannten 90S-prä-ribosomalen Partikel. snoRNPs katalysieren die 2'-O-Methylierung und Pseudouridinylierung definierter Basen der prä-rRNA. Durch endonukleolytische Spaltung in der ITS1 entstehen die prä-40S-Partikel und prä-60S Partikel, die separat prozessiert, anschließend in das Zytosol transportiert und erst dort vollständig maturiert werden.

Die Maturierung des prä-40S-Partikels beginnt bereits kotranskriptional durch eine aufeinanderfolgende Bindung von Prozessierungsfaktoren. Eine wichtige Rolle spielt hierbei das U3-snoRNP, welches an Sequenzmotive in der 5'-ETS und 18S-rRNA bindet (K. E. Bohnsack & Bohnsack, 2019; Dragon et al., 2002).

Für die Maturierung des prä-60S-Partikels werden unter anderem AAA-ATPasen wie NVL2 benötigt (Hiraishi et al., 2018; Yoshikatsu et al., 2015). AAA-ATPasen wirken als Chaperone und katalysieren den Austausch von Prozessierungsfaktoren (K. E. Bohnsack & Bohnsack, 2019).

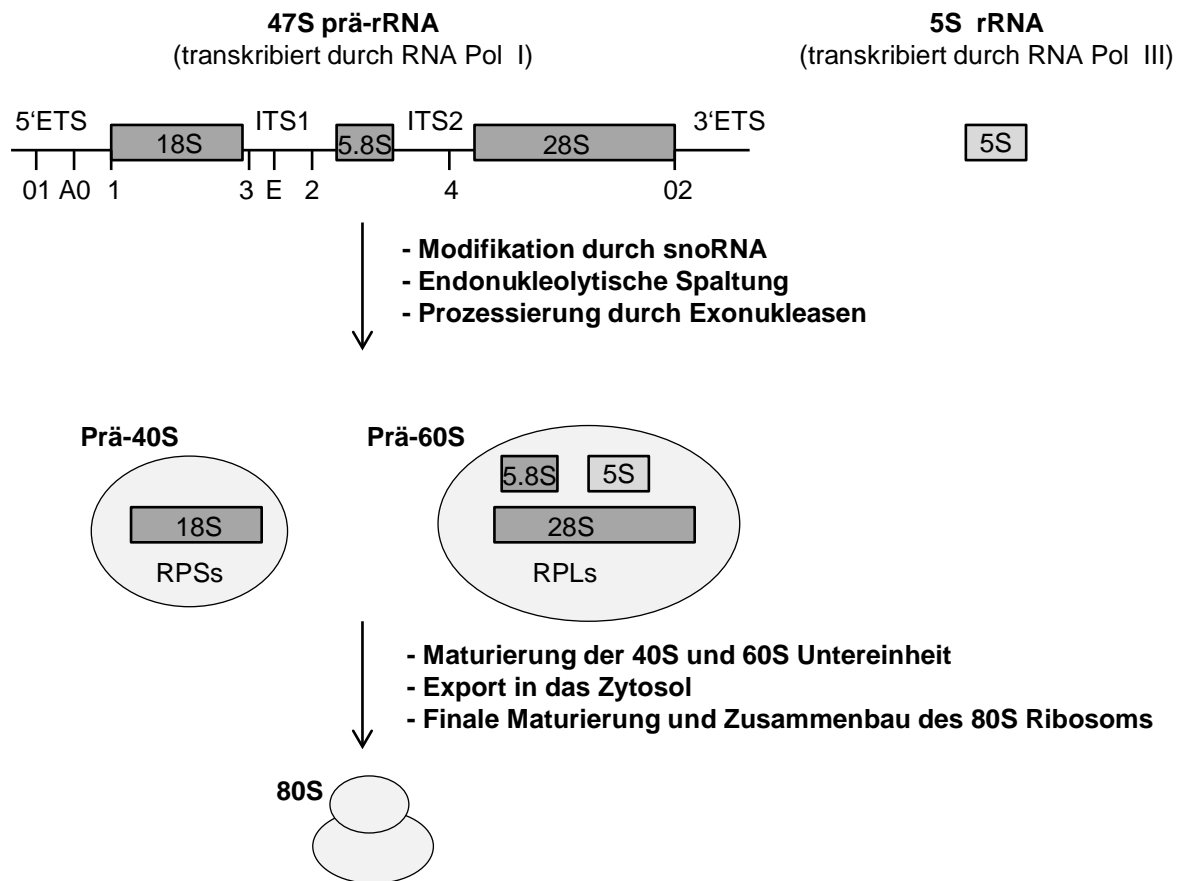


Abbildung 6: Überblick über die Ribosomenbiogenese.

5S wird von RNA Pol III transkribiert. 18S, 5.8S, 28S wird durch Prozessierung des von RNA Pol I transkribierten gemeinsamen Vorläufers 47S prä-rRNA generiert. Die Schnittstellen innerhalb der 47S RNA sind angegeben (01, A0, 1, 3, E, 2, 4, 02). snoRNA modifiziert die rRNA an definierten Positionen durch Pseudouridinylierung und 2'-O-Methylierung. Die ribosomalen Untereinheiten reifen getrennt voneinander. 18S rRNA und RPSs (*ribosomal protein small subunit*) werden zur 40S Untereinheit und 5.8S, 5S und 28S rRNA und RPLs (*ribosomal proteins large subunit*) werden zur 60S Untereinheit zusammengebaut. Die Untereinheiten werden in das Zytosol exportiert und zum 80S Ribosom zusammengebaut.

## 2.9. Ziel dieser Arbeit

Während allgemein anerkannt ist, dass die Cap0-Struktur essentiell für die Funktion eukaryotischer mRNA ist, war weitestgehend unklar, warum höhere Eukaryoten die Cap0-Struktur durch 2´O-Methylierung des ersten Nukleotides weiter zur Cap1-Struktur modifizieren. Diese Methylierung wird durch die Methyltransferase CMTr1 katalysiert.

In dieser Arbeit soll die biologische Funktion von CMTr1 und der durch CMTr1 katalysierten Cap1-Generierung untersucht werden. Um eine vollständige und dauerhafte Deaktivierung der Cap1-Generierung zu erreichen, sollten dazu CMTr1-Knockout-Zellen (KO) generiert und charakterisiert werden.

Zu Beginn dieser Arbeit gab es bereits Hinweise darauf, dass die Cap1 eine Rolle als molekulare Signatur endogener Transkripte in der antiviralen Immunantwort spielt. Sowohl der antivirale PRR RIG-I als auch das antivirale Effektorprotein IFIT1 erkennen doppelsträngige bzw. einzelsträngige RNA als körperfremd, wenn sie eine Cap0-Struktur besitzen; nicht aber, wenn sie ein Cap1 aufweisen.

Durch vorherige Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass nach dem transienten Knockdown von CMTr1 in der Zelle eine leichte RIG-I-Aktivierung durch endogene RNA stattfindet. Die Rolle der RIG-I-Aktivierung durch endogene, Cap0-modifizierte RNA sollte in CMTr1-KO-Zellen verifiziert und weitergehend untersucht werden.

Es war weiterhin bekannt, dass IFIT1 Cap0-modifizierte virale RNA bindet und deren Translation verhindert, während Cap1-modifizierte virale RNA vor der Bindung durch IFIT1 geschützt ist. Dieser Mechanismus von IFIT1 sollte durch Reporter-mRNA verifiziert werden. Weiterhin sollte in dieser Arbeit mit Hilfe der CMTr1-KO-Zellen die Hypothese überprüft werden, ob Cap1 endogene mRNA vor IFIT1-vermittelter Translationsinhibition schützt.

Des Weiteren sollte analysiert werden, ob ein Verlust der Cap1-Generierung über die vermuteten Effekte der antiviralen Immunantwort hinaus weitere Effekte auf die Zellphysiologie ausübt. Da nahezu alle reifen eukaryotischen mRNAs durch Cap1 modifiziert sind, könnte ein Verlust der Cap1-Generierung weitreichende, bisher uncharakterisierte Effekte auf die Genexpression der Zellen haben: Dabei sollten unter anderem die Effekte der Cap-Methylierung auf die Transkription, Maturierung, Stabilität sowie Translation der mRNA untersucht werden.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Verbrauchsmaterial und Geräte

Material / Gerät	Hersteller
Absaugpumpe (Vakuumpumpe)	Gardner Denver (Ilmenau)
Analysewaage TE 601	Sartorius (Göttingen)
Autoklav (VX-150, DX-200)	Linden
Einfrierröhrchen ( <i>cryo vials</i> )	Greiner bio-one (Solingen)
Eismaschine AF-20	Scotsman Ice Systems (Mailand, Italien)
ELISA Platten, <i>high binding</i>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
ELISA-Reader Apollo LB912	Berthold (Bergisch Gladbach)
EnVision Multilabel Plate Reader	Perkin Elmer (Wiesbaden)
Durchflusszytometer FACS LSR-2	BD Bioscience (Franklin Lakes, USA)
Fluoreszenzmikroskop Ax10	Zeiss (Oberkochen)
FPLC-System ÄKTA	GE Healthcare (Chicago, USA)
Glasflaschen mit Gewinde	Schott (Mainz)
Gradienten-Fraktionator BR-184-X	Brandel (Gaithersburg, USA)
Horizontales Agarose Gel System	PEQLAB (Erlangen)
Horizontalschüttler POS-300	Grant-bio (London, UK)
Kolbenhubpipetten	Eppendorf (Hamburg)
Kühlschränke (4°C)	AEG (Frankfurt am Main)
Lumitrack-200, weiße 96well Mikroplatte	Greiner bio-one (Solingen)
Magnetrührer mit Heizplatte	VWR (Radnor, USA)
Mehrkanalpipetten	VWR (Radnor, USA)
Mikroskop Eclipse TS100	Nikon (Minato, Japan)
Mikrotiterplatten 96 well, Flachboden	Greiner bio-one (Solingen)
Mikrotiterplatten 96 well, Rundboden	Greiner bio-one (Solingen)
Mr. Frosty Einfrierbehälter 1°C	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Multikanalpipette	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Nitril-Untersuchungshandschuhe	Meditrade (Kiefersfelden)
Nitrozellulose-Westernblot-Membran 0,45 µm	GE Healthcare (Chicago, USA)
Odyssey FC Imaging System	LI-COR (Lincoln, USA)
Odyssey SA Imaging System	LI-COR (Lincoln, USA)
Optima L-80 XP Ultrazentrifuge	Beckman Coulter (Krefeld)
Parafilm	Merck (Darmstadt)
PCR Reaktionsgefäße 0,2 ml, einzeln	BIOplastics (Landgraaf, Niederlande)
PCR Reaktionsgefäße 8er Streifen 0,2 ml	BIOplastics (Landgraaf, Niederlande)
PCR Reaktionsgefäße 8er Streifen, Flachdeckel	BIOplastics (Landgraaf, Niederlande)
Petrischalen 10cm/15cm	Greiner bio-one (Solingen)
pH Meter	Mettler-Toledo (Gießen)
Pipettenspitzen	Greiner bio-one (Solingen)

<b>Material / Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Pipettenspitzen, mit Filter	Mettler-Toledo (Gießen)
Pipettenspitzen, RNase-frei	Mettler-Toledo (Gießen)
Pipettierhilfe Pipetboy acu 2	Hanna instruments (Woonsocket, USA)
qPCR Maschine QuantStudio 5 Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
qPCR Platte 384well, klar mit Rand	BIOplastics (Landgraaf, Niederlande)
qPCR Platte Abdeckfolie, klar	Sarstedt (Nümbrecht)
qPCR Platte, 384 well	BIOplastics (Landgraaf, Niederlande)
Reagenzreservoir für Mehrkanalpipetten 60ml	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Reagenzreservoir mit 12 Kammern	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Reaktionsgefäße (0,5ml, 1,5ml, 2ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Rotor SW 40 für Ultrazentrifuge	Beckman Coulter (Krefeld)
Scanner CanoScan 4400F	Canon (Ota, Japan)
Schlauchpumpe	Teledyn ISCO (Lincoln, USA)
serologische Auslaufpipetten (5ml, 10ml, 25ml) Stripette	Corning (Amsterdam, Niederlande)
Skalpell, Einweg	PFM medical (Köln)
Spektralphotometer NanoDrop ND-100	PEQLAB (Erlangen)
Sterilwerkbank MSC-Advantage	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Taumelrollenmischer RM 5-40	CAT (Etzenbach)
Thermalcycler C1000 Touch	Bio-Rad (Hercules, USA)
Thermalcycler FlexCycler	Analytik Jena (Jena)
Thermomixer für Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
Tiefkühlschränke (-20°C)	AEG (Frankfurt am Main)
Ultraschallblock	Hielscher (Mont Holly, USA)
Ultrazentrifugationsröhrchen Polypropylen 14x95 mm	Beckman Coulter (Krefeld)
UV Transilluminator UVT-22 BE LED	Herolab (Wiesloch)
Wasserbad	Memmert (Schwabach)
Westernblot Elektrophorese- und Transfersystem	Bio-Rad (Hercules, USA)
Whatman Filterpapier	GE Healthcare (Chicago, USA)
Zellkultur CO <sub>2</sub> Inkubator Heracell 240	Heraeus Instruments (Hanau)
Zellkultur CO <sub>2</sub> Inkubator MCO-20AIC	Sanyo (Osaka, Japan)
Zellkulturflaschen (T25, T75, T175)	BD Bioscience (Franklin Lakes, USA)
Zellkulturplatten (6well, 24well, 96well)	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Zellkulturplatten 10cm, 15cm	Sarstedt (Nümbrecht)
Zentrifuge (5424, 5430T, 5810R, 5415R)	Eppendorf (Hamburg)
Zirkonia Kugeln (1 mm)	Biospec Products (Barlesville, USA)
ZymoSpin III <i>columns</i> für RNA Aufreinigung	Zymo (Irvine, USA)

**3.1.2. Chemikalien**

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth (Karlsruhe)
2-Mercaptoethanol GIBCO	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
4-Thiouridine (4sU)	Carbosynth (Oxford, UK)
Acetyl-CoA	Genaxxon bioscience (Ulm)
Agar Agar	Carl Roth (Karlsruhe)
Ammonium Persulfat (APS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Bakteriennährmedium LB Luria	Carl Roth (Karlsruhe)
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Bromphenol blau	Carl Roth (Karlsruhe)
Camptothecin	Selleck Chemicals Llc (Houston, USA)
Chloroform	Carl Roth (Karlsruhe)
Complete, Protease Inhibitor Cocktail	Roche (Mannheim)
CX-5461	Selleck Chemicals Llc (Houston, USA)
Cycloheximid (CHX) >95% Reinheit	Sigma Aldrich (München)
Desinfektionsmittel Bacillol AF	Hartmann (Heidenheim)
Desoxynukleotide (dNTPs) dATP, dCTP, dGTP und dTTP	Carl Roth (Karlsruhe)
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Carl Roth (Karlsruhe)
Dinacilib (SCH727965)	Selleck Chemicals Llc (Houston, USA)
D-Luciferin, freie Säure	SYNCHEM (Altenburg)
EDTA	Carl Roth (Karlsruhe)
Essigsäure	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethanol, 70% (v/v), vergällt	Otto Fischar (Saarbrücken)
Ethanol, reinst	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethidium Bromid (EtBr)	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth (Karlsruhe)
Flavopiridol (Alvocidib)	Selleck Chemicals Llc (Houston, USA)
Flüssiger Stickstoff	Linde (Wiesbaden)
Glykogen, RNase frei	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Glyzin	Carl Roth (Karlsruhe)
Größenstandard Agarosegel 1kb Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Größenstandard Ultra Low DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Größenstandard Westernblot PageRuler Plus Prestained	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
HEPES	Carl Roth (Karlsruhe)
Kochsalzlösung NaCl 0,9% (w/v)	Fresenius (Bad Homburg)
LB-Medium (Lennox), Granulat	Carl Roth (Karlsruhe)
Magnesiumsulfat	Carl Roth (Karlsruhe)
NaCl	Carl Roth (Karlsruhe)
Nukleotide (NTPs) ATP, TTP, GTP und UTP	Carl Roth (Karlsruhe)
Orange G	Carl Roth (Karlsruhe)
para-Nitrophenylphosphat (pNPP)	Carl Roth (Karlsruhe)
PIPES	Carl Roth (Karlsruhe)
Propidiumiodid (PI)	Carl Roth (Karlsruhe)

Chemikalien	Hersteller
Puffer für RNA-Aufreinigung	Zymo Research (Irvine, USA)
Puromycin-Dihydrochlorid	Carl Roth (Karlsruhe)
Random Hexamer Primer	IDT (Choralville, USA)
Rapamycin (Sirolimus)	Selleck Chemicals Llc (Houston, USA)
RNAse Zap	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
ROTI C/I Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth (Karlsruhe)
ROTIPHORESE Gel 30 (37,5:1) 30%	Carl Roth (Karlsruhe)
ROTIPHORESE NF-AcrylamidGel 30 (29:1) 30%	Carl Roth (Karlsruhe)
Saponin	Carl Roth (Karlsruhe)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth (Karlsruhe)
Spermidine	Sigma Aldrich (München)
TEMED	Carl Roth (Karlsruhe)
Tetramethylethyldiamine (TEMED)	Carl Roth (Karlsruhe)
THZ1	Selleck Chemicals Llc (Houston, USA)
Torin 1	Selleck Chemicals Llc (Houston, USA)
Tricine	Carl Roth (Karlsruhe)
Tris	Carl Roth (Karlsruhe)
Tris HCl Puffer (1M), pH 7,0	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Tris HCl Puffer (1M), pH 8,0	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Triton X-100	Carl Roth (Karlsruhe)
Tween-20	Carl Roth (Karlsruhe)
Ultrareines Wasser Ampuwa	Fresenius (Bad Homburg)
Universal-Agarose peqGold	PEQLAB (Erlangen)

### 3.1.3. Enzyme, Antikörper und biologische Reagenzien

Reagenzien	Hersteller
DreamTaq DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
QPCR-Mix II (ROX) EvaGreen	Bio-Budget (Krefeld)
Restriktionsenzyme FastDigest	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Lipofectamine 2000	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
RiboLock RNAse-Inhibitor	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
muriner RNAse-Inhibitor	NEB (Ipswich, USA)
T7 RNA-Polymerase	NEB (Ipswich, USA)
Yeast Inorganic Pyrophosphatase (YIPP)	NEB (Ipswich, USA)
DNase I, RNAse-frei	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Antikörper Puromycin (12D10), <i>mouse</i> , monoklonal	Merch Millipore (Darmstadt)
Antikörper $\beta$ -Aktin, <i>mouse</i> , monoklonal	LI-COR (Lincoln, USA)
Antikörper $\beta$ -Aktin, <i>rabbit</i> , monoklonal	LI-COR (Lincoln, USA)
Sekundärantikörper IRDye 680RD, <i>goat, anti-mouse</i>	LI-COR (Lincoln, USA)
Sekundärantikörper IRDye 680RD, <i>goat, anti-rabbit</i>	LI-COR (Lincoln, USA)
Sekundärantikörper IRDye 800CW, <i>goat, anti-mouse</i>	LI-COR (Lincoln, USA)



Reagenzien	Hersteller
Sekundäntikörper IRDye 800CW, <i>goat, anti-rabbit</i>	LI-COR (Lincoln, USA)
Antikörper RIG-I (D14G6), <i>rabbit</i> , monoklonal	CST (Danvers, USA)
Antikörper TBK1 (D1B4), <i>rabbit</i> , monoklonal	CST (Danvers, USA)
Antikörper phospho-TBK1 (D52C2), <i>rabbit</i> , monoklonal	CST (Danvers, USA)
Antikörper FLAG Tag / DYKDDDK (9A3), <i>mouse</i> , monoklonal	CST (Danvers, USA)
Antikörper IFIT1 (D2X9Z), <i>rabbit</i> , monoklonal	CST (Danvers, USA)
Antikörper CMT1 / FTSJD2 (ab70386), <i>rabbit</i> , polyklonal	Abcam (Cambridge, UK)
Antikörper NVL/NVL2 (ab241954), <i>rabbit</i> , polyklonal	Abcam (Cambridge, UK)
rekombinantes humanes IFN- $\alpha$ (IFNa2a)	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
rekombinantes Hühner-IFN-A3	Bio-Rad (Hercules, USA)

### 3.1.4. Medien und Zusätze für die Zellkultur

Zellkulturzusätze	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Life Technology (Darmstadt)
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640	Life Technology (Darmstadt)
Trypsin/EDTA (0,05%)	Life Technology (Darmstadt)
Fötales Kälberserum (FCS)	Life Technology (Darmstadt)
Dulbecco's PBS (Zellkultur)	Life Technology (Darmstadt)
Opti-MEM	Life Technology (Darmstadt)
Penicillin/Streptomycin Zellkulturzusatz GIBCO	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Puromycin	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Hühner Serum	Life Technology (Darmstadt)

### 3.1.5. Reagenzsysteme und Kits

Reagenzsysteme	Hersteller
Human IFN- $\beta$ ELISA Set	Antigenix America (Huntington Station, USA)
BD OptEIA IP-10 ELISA Kit	BD Bioscience (San Diego, USA)
Plasmid Maxiprep Kit	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
NukleoSpin Plasmid, Mini Kit for Plasmid DNA	Macherey-Nagel (Düren)
innuPrep Gel Extraction Kit	Analytik Jena (Jena)
Mtase-Glo Methyltransferase Assay	Promega (Madison, USA)

**3.1.6. Selbsthergestellte Puffer und Lösungen**

<b>Puffer/ Lösungen</b>	<b>Rezepte</b>
10% APS	10% w/v Ammoniumperoxiddisulfat in H <sub>2</sub> O, Lagern bei 4°C
10x PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 6 H <sub>2</sub> O 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , auf pH 7,4
10x pNPP Substrat	10 mg/ml pNPP in pNPP Puffer Bei -20°C lagern
10x TBS	200 mM Tris HCl, pH 7,6 1,5 M NaCl
10x Transcription Buffer (Clean Cap)	400 mM Tris/HI, pH 8.0 100 mM DTT 20 mM Spermidin 0,02% Triton X-100 165 mM Magnesium Acetat Aliquotiert bei -80°C gelagert
10x Tris-Glyzin für Transferpuffer (1 l)	2,9 % (w/v) Tris 14,4 % (w/v) Glyzin
1x TBS-T	0,1% w/v Tween-20 in 1x TBS
2x HBS	300 mM NaCl 40 mM HEPES 10 mM KCl 3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH auf 7,1 einstellen und steril filtrieren
2x Lämmli-Puffer	4% (w/v) SDS 200 mM DTT 10 % (v/v) Glyzerin 120 mM Tris/HCl pH6,8 0,01% Orange-G Lagerung bei -20°C in Aliquots.
50x TAE	2 M Tris 50 mM EDTA 5,71% (v/v) Essigsäure
5x Saponin Lyse Puffer	250 mM Tris/HCl pH 7,8 0,1% w/v Saponin 75 mM MgSO <sub>4</sub> 40% v/v Glycerin Aliquotiert gelagert bei -20°C

Puffer/ Lösungen	Rezepte
FCS, Hitze inaktiviert (FCS hi)	56°C für 30min, Lagerung bei -20°C in Aliquots.
Firefly Luciferase Substrat	20 mM Tricine 2,67 mM Magnesiumsulfat 0,1 mM EDTA 33,3 mM DTT 0,53 mM ATP 0,27 mM Acetyl CoA 0,5 mM D-Luciferin 5 mM Natriumhydroxid (NaOH) 0,265 mM Magnesium Carbonat Aliquotiert bei -20°C gelagert
LB Agar	2,5% (w/v) LB Pulver 1,5% (w/v) Agar Kobe I Autoklavieren, auf 55°C abkühlen lassen, mit Antibiotika versetzen und in Petrischalen gießen, bei 4°C lagern
LB Medium (Lennox)	2,5% (w/v) LB Pulver in H <sub>2</sub> O, autoklavieren, Lagerung bei 4°C
MACS Puffer	2 mM EDTA und 2% FCS in PBS
MTase Glo 4x Reaction Buffer	80 mM Tris, pH 8,0 200 mM NaCl 4 mM EDTA 12 mM MgCl <sub>2</sub> 0,4 mg/ml BSA 4 mM DTT Aliquotiert bei -20°C gelagert
PBS-T (ELISA Wasch Puffer)	0,05% Tween-20 in 1x PBS
pNPP Puffer	100 mM Tris/HCl pH 9,5 100 mM NaCl 5 mM MgCl <sub>2</sub> Bei 4°C lagern
Polysomen Chase Lösung	60% Saccharose, eigefärbt mit Bromphenolblau

Puffer/ Lösungen	Rezepte
Polysomen-Gradientenpuffer (10/20/30/40/50 % Saccharose)	10/20/30/40/50 % (w/v) Saccharose 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 5 mM MgCl <sub>2</sub> 100 mM KCl 1 % (v/v) Triton X-100 2 mM DTT 100 µg/ml CHX 1x Protease Inhibitor (PI) Steil filtrieren. Nach dem Gießen werden die Gradienten bei -80°C eingelagert
Polysomen-Lysepuffer	10 mM Tris/HCl, pH 8,0 5 mM MgCl <sub>2</sub> 100 mM KCl 10/20/30/40/50 % (w/v) Saccharose 2 mM DTT 100 µg/ml CHX Nach gießen der Gradienten bei -80°C eingelagert
Ponceau-S Färbelösung	0,1% (w/v) Ponceau S in 5% Essigsäure
TB Puffer zur Herstellung von chemokompetenten Bakterien	250 mM KCl 15 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM PIPES pH auf 6,7 einstellen 55 mM MnCl <sub>2</sub> Steril filtrieren, bei 4°C lagern
Westernblot 10x SDS Laufpuffer	250 mM Tris/HCl 1,92 M Glycin 1 % SDS
Westernblot Laufgel (10%) 10 ml	3,75 ml 1M Tris/HCl, pH8,8 3,33 ml Acrylamid 30% (37,5:1) 2,71 ml H <sub>2</sub> O 0,1 ml 10% SDS 0,1 ml 10% APS 8 µl TEMED
Westernblot Sammelgel (3%) 3,5 ml	0,44 ml 1M Tris/HCl, pH 6,8 0,35 ml Acrylamid 30% (37,5:1) 2,64 ml H <sub>2</sub> O 35 µl 10% SDS 35 µl 10% APS 3,5 µl TEMED

Puffer/ Lösungen	Rezepte
Westernblot <i>Stripping</i> Puffer	15 g/l Glyzin 0,1% (w/v) SDS 1% (v/v) Tween 20 pH auf 2,2 einstellen
Westernblot Transferpuffer (1 l)	100 ml 10x Tris-Glyzin Puffer 200 ml Ethanol 100%, vergällt 700 ml H <sub>2</sub> O

### 3.1.7. Nukleinsäuren

#### 3.1.7.1. Primer für qPCR und sq-RT-PCR

Alle als Primer für qPCR und sq-RT-PCR verwendete Oligonukleotide wurden von Integrated DNA Technologies (IDT) bezogen. Die untenstehende Tabelle zeigt die Namen und die Sequenz der verwendeten Primerpaare, bestehend aus einem *forward* (fwd) und einem *reverse* (rev) Primer.

Primername	Sequenz
qPCR CXCL10 fwd	5'-GAATGCTCTTTACTTCATGGACTTC -3'
qPCR CXCL10 rev	5'-GGTAGCCACTGAAAGAATTTGG -3'
qPCR EEF1A fwd	5'-ACTTGCCCGAATCTACGTGT -3'
qPCR EEF1A rev	5'-TTGCCGCCAGAACACAG -3'
qPCR GAPDH fwd	5'-AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA -3'
qPCR GAPDH rev	5'-AATGAAGGGTCAATGATGG -3'
qPCR IFIT1 fwd	5'-TCCACAAGACAGAATAGCCAGAT -3'
qPCR IFIT1 rev	5'-GCTCCAGACTATCCTTGACCTG -3'
qPCR IFIT2 fwd	5'-AAGAGGAAGATTTCTGAAGAGTGC -3'
qPCR IFIT2 rev	5'-TCTCCAAGGAATTCTTATTGTTCTC -3'
qPCR IFIT3 fwd	5'-GGAACAGCAGAGACACAGAGG -3'
qPCR IFIT3 rev	5'-ACACTGTCTTCCTTGAATAAGTTCC -3'
qPCR IFNB1 fwd	5'-CATTACCTGAAGCCAAGGA -3'
qPCR IFNB1 rev	5'-CAGCATCTGCTGGTTGAADA -3'
qPCR NVL2 Exon 8-9 fwd	5'-GAAGATGTGGGAGGCAATGA -3'
qPCR NVL2 Exon 8-9 rev	5'-GTCCATGAAGGAGAACTCCAC -3'
qPCR NVL2 Exon 9-10 fwd	5'-AGGCTGTGGGAAGACATTAC -3'
qPCR NVL2 Exon 9-10 rev	5'-CCGATACTCCAGACACAATC -3'
qPCR PLCH1 fwd	5'-ATGTGCAAAGGTACTTTCAACC -3'
qPCR PLCH1 rev	5'-GATAACTTTTCAGGATGAGCTGC -3'
qPCR RIGI fwd	5'-GAAAGACTTCTTCAGCAATGTCC -3'
qPCR RIGI rev	5'-GTTCCCTGCAGCTTTTCTTCAA -3'
qPCR RLP13A fwd	5'-GTTGATGCCTTCACAGCGTA -3'
qPCR RLP13A rev	5'-AGATGGCGGAGGTGCAG -3'
qPCR RPL10 fwd	5'-GAAGCGAGACTTTGGGTACG -3'
qPCR RPL10 rev	5'-GTGCCACTGAAGATCCTGGT -3'
qPCR RPLP0 fwd	5'-AGCCCAGAACACTGGTCTC -3'
qPCR RPLP0 rev	5'-ACTCAGGATTTCAATGGTGCC -3'
qPCR RPS12 fwd	5'-TTGGATGCAAGCACACAAAG -3'

Primername	Sequenz
qPCR RPS12 rev	5'-TCTGAAGACTGCCCTCATCC -3'
qPCR RPS23 fwd	5'-GGCTGTGATTTTCTTGCCAT -3'
qPCR RPS23 rev	5'-AAGGAATCGTGCTGGAAAAA -3'
qPCR RPS3A fwd	5'-GCTTCAATCATTGTCTGCCA -3'
qPCR RPS3A rev	5'-TCAGGGTAAAAACTGCCTGA -3'
qPCR RPS8 fwd	5'-TTCACCAGGGTCTTGGTACG -3'
qPCR RPS8 rev	5'-TTCTCCTGGGGCTCAGAGT -3'
qPCR SNHG19 fwd	5'-TTCTTCCCGAATCTCAGGC -3'
qPCR SNHG19 rev	5'-CGGATTGAGGTTTACTTAGGT -3'
qPCR SNHG8 fwd	5'-AAGTTTACAAGCATGCGCGG -3'
qPCR SNHG8 rev	5'-TCAAACGACGGTTCTCGGG -3'
qPCR SNORA24 fwd	5'-TATCTTTGGGACCTGTCAGCC -3'
qPCR SNORA24 rev	5'-ATGTTACTTGTGCAAGTCAGAATC -3'
qPCR SNORA44 fwd	5'-CAGCATGTTTCCAAGGGCTGT -3'
qPCR SNORA44 rev	5'-TATAGGAAAGCTGAGTGGCAGC -3'
qPCR SNORD104 fwd	5'-GGCCTGCTGTGATGACATTC -3'
qPCR SNORD104 rev	5'-CAGGCTCAGACTCCAGTTCG -3'
qPCR SNORD49A fwd	5'-ATGAAATCACTAATAGGAAGTGCCG -3'
qPCR SNORD49A rev	5'-AGACAGGAGTAGTCTTCGTCAGT -3'
qPCR SNORD99 fwd	5'-ACTGGTCCAGGATGAAACCTA' -3'
qPCR SNORD99 rev	5'-GGTCTCAGTCCCATATCCGC -3'
qPCR ZFAS fwd	5'-TCCTGACGAGTTTATTGTTGG -3'
qPCR ZFAS rev	5'-CTACTCAGCCAGGGAAGAC -3'
sqRT-PCR #1 NVL2 fwd	5'-AACCACCTCTTCAACACCACG -3'
sqRT-PCR #1 NVL2 rev	5'-ACCCCTGGCTTTAGCTTTCTTTTGC -3'
sqRT-PCR #2 NVL2 fwd	5'-AACCACCTCTTCAACACCACG -3'
sqRT-PCR #2 NVL2 rev	5'-GACACAATCTCTGGAGCAGCCAC -3'

### 3.1.7.2. Klonierungsprimer

Alle als Klonierungsprimer verwendete DNA-Oligonukleotide wurden von IDT bezogen.

Name	Sequenz
KP#1	5'-CCCAAGCTTACCATGGATTATAAAGATGATGATGATAAAAAGAGGAGAACT -3'
KP#2	5'-TTTAGCGGCCGCTAAGGGCCTAGAGGATTGTGACTCTGGATGAAGGAAA GGACGTCC -3'
KP#3	5'-CATTTCAGGTGTCGTGAGGAATTTTCG -3'
KP#4	5'-GGTGTATGGCGTCTATCTGATCAATGAATATGATACAGGGTGCATTGGAAA -3'
KP#5	5'-TATCATATTCATTGATCAGATAGACGCCATAACACCGAAACGGGAA -3'
KP#6	5'-GGACAAAGTGCATCGACCTGATCGAAAAAATTACACACGGAGCGGAAT -3'
KP#7	5'-CGTGTGTAATTTTTTTCGATCAGGTCGATGCACTTTGTCCTAGGAGGT -3'
KP#8	5'-CGGATCCCGGGCCCGCGGTACCGTCGAC -3'
KP#9	5'-AGCTCAAGCTTCGAAATTTAAATGCGAATTCGCCACCATGGGAGAGAATGCTGATG -3'
KP#10	5'-GTTGGGGATGGGCTTGCCACCCGCCCTCTAGAGAATGCAGGGTTCATTTCCCGAG- 3'

### 3.1.7.3. Synthetisches NVL2-Gen

Zur Klonierung von NVL2 wurde eine Codon-optimierte Version der humanen NVL2-cDNA (Isoform NVL-201) mit C-terminalem V5-Epitoptag entworfen und von IDT als synthetische dsDNA synthetisiert. Der Open-Reading-Frame (ORF) ist fett gedruckt, die Sequenzen am 5'- und 3'-Ende bringen Restriktionsschnittstellen (unterstrichen, von 5' nach 3': Bstb1, Xba1 und Pme1) sowie Homologiearme zur Klonierung ein.

synthetische NVL2-Sequenz:

```

5'GCTAGCGCTACCGACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCGAAATTTAAATGCGAATTCACCGCCA
TCAAACCACGGCCAGCAGGCTTCGTTGACAATAAACTTAAGCAACGAGTCATTAGTATCTGA
CCTCCAACAAGTGTGGTAAATATGTCGACATCGGTGTTTTGGCGTCAGATCTGCAGAGAGTTTA
TAGTATTGACTATGGCCGCAGAAAGCGCAACGCATTCCGAATTCAGGTGGAAAAAGTGTTCCTC
ATAATTAGTTCCGAAAAAGAGTTGAAGAACCTCACTGAGCTGGAAGATGAACATCTGGCTAAG
CGGGCCAGGCAGGGTGAAGAGGATAACGAGTACACGGAAAGCTACTCTGACGATGATAGTTC
TATGGAAGACTACCCGGACCCGCAGAGCGCTAATCACATGAACTCTTCACTTCTTCCCTTAC
AGAAAGGGAAATCCTGACTCCGTCTCTAACACACCAGAAATGGAGCAGAGAGAGACAACCTCC
AGCACGCCCCGCATATCATCAAAAAGTGGTTCAATCCCTCTCAAAAAGTCCAGCTAAGGACAGT
GAAGGCGGGTGGTTCATTGACAAAACGCCATCAGTCAAAAAGACTCTTCTTCTCGATTTGA
GTTGCGAAAAATCCAACCCCAAGAAGCCAATTACCGAGATTCAAGACAGCAAGGACTCTAGCT
TGCTGGAAAGTGATATGAAAAGGAAAGGGAAACTTAAGAATAAAGGCAGCAAGCGAAAGAAG
GAAGACCTCCAGGAGTTCGACGGCGAAATCGAGGCCGTCCTGCAGAAAAAGCAAAAGCTAG
AGGGCTTGAATTCCAGATAAGTAACGTGAAGTTCGAGGATGTGGGTGGGAATGACATGACACT
GAAAGAGGTCTGTAATGCTCATCCACATGAGACATCCTGAAGTGTACCACCACCTCGGAGT
TGTACCGCCGCGAGGGGTACTCCTGCACGGCCACCCGGTTGTGGAAAGACACTGCTCGCAC
ACGCGATAGCTGGAGAGCTCGATCTGCCTATACTTAAAGTCGCCGCACCAGAAATCGTTAGCG
GCGTGTCCGGAGAATCTGAACAAAAGCTTAGGGAGCTTTTTGAACAGGCAGTTTCCAATGCAC
CCTGTATCATATTCATTGATGAAATAGACGCCATAACACCGAAACGGGAAGTTGCCTCTAAGGA
CATGGAACGCCGAATAGTGGCTCAGCTCCTTACGTGTATGGACGACTTGAACAACGTAGCGGC
CACAGCCAGGGTCTTGTTCATTGGGGCGACAAACCGCCCGGACTCACTGGATCCAGCGCTCCG
CAGAGCCGGTCGATTTGACCGGGAGATTTGTTGGGCATACCCGACGAGGCTAGTCGGGAAAG
GATTTTGCAAACGCTGTGCAGGAAACTTCGGCTTCTCAGGCTTTCGACTTTTGCCACCTGGCT
CACCTCACACCTGGCTTCGTGGGGGCTGATCTCATGGCTTTGTGTAGAGAAGCAGCCATGTGT
GCAGTCAATCGCGTTTTGATGAAGTTGCAAGAGCAACAAAAGAAGAATCCTGAGATGGAGGAT
CTCCCGTCAAAGGCGTTCAGGAGGAACGGCTGGGCACGGAACCGACGTCAGAAACTCAAGA
CGAATTGCAGAGACTCTTGGGGCTCTTGCGGGACCAAGATCCCCTCAGCGAGGAACAGATGCA
AGTTTTGTGATTGAGCTGAACGATTTTATTGTGGCTCTCAGTTCGTTCCAACCAAGTGCGAAA
AGAGAAGGTTTCGTAACGTTCCAAATGTGACTTGGGCAGATATCGGCGCACTCGAGGACATA
CGAGAGGAGCTCACAATGGCCATTCTCGCGCTGTCAGAAATCCAGACCAGTTCAAAGCACTG
GGCCTCGTTACGCCGGCCGGAGTCCTTCTGGCTGGACCCCTGGTTGTGGTAAAACCTCCTG

```

```
GCCAAGGCTGTCGCTAATGAGAGCGGACTGAATTTTATATCAGTTAAAGGACCTGAGCTTCTCA
ATATGTATGTAGGTGAAAGTGAAAGGGCTGTCAGGCAAGTATTCCAGCGCGCTAAGAATTCCG
CTCCGTGTGAATTTTTTTTCGATGAGGTCGATGCACTTTGTCCTAGGAGGTCTGACCGGGGAGAC
CGGGGCTTCTGTACGAGTGGTCAATCAACTTCTTACCGAGATGGACGGCTTGGAGGCACGACA
ACAGGTCTTTATCATGGCCGCGACAAATCGACCTGATATTATCGACCCTGCAATTCTGAGGCCA
GGACGACTTGATAAACTCTGTTTCGTAGGCCTTCCACCCCAGCGGATCGCCTTGCCATTTTGA
AAACGATTACAAAAATGGCACTAAACCTCCATTGGACGCGGACGTTAACTTGGAAAGCGATAG
CCGGTGATCTGAGGTGTGACTGCTATACGGGCGCAGATCTCAGTGCTCTCGTACGAGAAGCAA
GCATATGCGCCTTGCGCCAAGAGATGGCCCGGCAAAAAAGTGGCAATGAGAAGGGTGAGCTC
AAAGTTTCTCATAAGCATTTCGAGGAAGCATTAAAAAGGTACGATCCAGTATTAGTAAAAAGG
ATCAAATTATGTACGAGCGCCTCCAGGAGAGCCTTCCAGATCTAGAGGGGGCGGGTGGAAGC
CCATCCCCAACCCCCTGCTGGGCCTGGACAGCACCTAGGTTTAAACCGGTCGACGGTACCGCG
GGCCCGGGATCCGCCCTCTCCCT-3'
```

### 3.1.7.4. Plasmide

Plasmidname	Beschreibung
pRp-Puro	Retroviraler Expressionsvektor zur Expression von einklonierten Transgenen und Puromycinresistenz. Bereitgestellt von Prof. Michael Hölzel (Institut für Experimentelle Onkologie, Bonn)
pRp-GFP	Retroviraler Expressionsvektor zur Expression von GFP und Puromycinresistenz. Bereitgestellt von Prof. Michael Hölzel (Institut für Experimentelle Onkologie, Bonn)
gag-pol	Helferplasmid zur Produktion retroviraler Partikeln, exprimiert retrovirales Group Antigen (gag) und reverse Polymerase (pol). Bereitgestellt von Prof. Michael Hölzel (Institut für Experimentelle Onkologie, Bonn)
pCMV-VSV-G	Helferplasmid zur Produktion retroviraler Partikeln, exprimiert das Hüllprotein VSV-G. Bereitgestellt von Prof. Michael Hölzel (Institut für Experimentelle Onkologie, Bonn)
pLenti-IRES-GFP	Lentiviraler Expressionsvektor zur Expression von einklonierten Transgenen, GFP sowie Blastizidinresistenz. Ursprungsvektor bezogen von Invitrogen, modifiziert von Anna Herzner (Institut für klinische Chemie und klinische Pharmakologie, Bonn)
pEF-FLuc	Konstitutiver Expressionsvektor zur Expression von Firefly Luciferase (FLuc). Teil des GLuc/Fluc-Reportersystems. Bezogen von Thomas Zillinger (Institut für klinische Chemie und klinische Pharmakologie, Bonn).
pIFNb-Gluc	Expressionsvektor für Gaussia Luciferase (FLuc) unter einem artifiziellen Promotor mit Kontrollelementen des IFN- $\beta$ -Promotors (Ablasser et al. 2009). Teil des GLuc/Fluc Reportersystems. Bezogen von Thomas Zillinger (Institut für klinische Chemie und klinische Pharmakologie, Bonn)
pSH-ChIFN-alpha	Konstitutiver Expressionsvektor zur Expression von Hühner IFN- $\alpha$ (chIFN- $\alpha$ ). Erstmalig beschrieben von Xia et al., 2004 und von den Autoren bereitgestellt. (Xia et al., 2004)
pEF-CMTr1-wt	Konstitutiver Expressionsvektor zur Expression von wildtypischer humaner CMTr1 mit N-Terminalem FLAG-Epitoptag. Bereitgestellt von Yuta Tsukamoto (AG Kato, Institute for Cardiovascular Immunology, Bonn)
pEF-CMTr1-KA	Konstitutiver Expressionsvektor zur Expression von einer katalytisch inaktiven Punktmutante (Lysin 239 zu Alanin) humanen CMTr1 mit N-Terminalem FLAG-Epitoptag. Bereitgestellt von Yuta Tsukamoto (AG Kato, Institute for Cardiovascular Immunology, Bonn)
pRp-CMTr1	Retroviraler Expressionsvektor zur Expression von muriner CMTr1 mit C-terminalem FLAG-Epitoptag. Basierend auf pRp puro. In dieser Arbeit hergestellt (Kapitel 3.2.1.9).



Plasmidname	Beschreibung
pLenti-NVL2-wt	Lentiviraler Expressionsvektor zur Expression von humaner NVL2 mit N-terminalem V5-Epitoptag. Basierend auf pLenti-IRES-GFP. In dieser Arbeit hergestellt (Kapitel 3.2.1.9).
pLenti-NVL2-EQ	Lentiviraler Expressionsvektor zur Expression von einer katalytisch inaktiven, zweifachen Punktmutante (Glutaminsäure (E) 365 und 682 zu Glutamin (Q)) von humanem NVL2 mit N-terminalem V5-Epitoptag. Basierend auf pLenti-IRES-GFP. In dieser Arbeit hergestellt (Kapitel 3.2.1.9).
pLenti-IFIT1B	Lentiviraler Expressionsvektor zur Expression von murinem IFIT1B mit N-terminalem V5-Epitoptag. Basierend auf pLenti-IRES-GFP. In dieser Arbeit hergestellt (Kapitel 3.2.1.9).
pCMV-GFP	Konstitutiver Expressionsvektor zur Expression von <i>green fluorescent protein</i> (GFP). Bezogen von Anna Herzner (Institut für klinische Chemie und klinische Pharmakologie, Bonn)
pLenti-EF1a-Cas9/U6-gRNA	Lentiviraler Expressionsvektor, genutzt zur CRISPR/Cas9 Genomeditierung. Expression von Cas9 sowie einer genspezifischen guideRNA (gRNA). Bezogen von Thomas Zillinger (Institut für klinische Chemie und klinische Pharmakologie, Bonn).

### 3.1.7.5. Triphosphorylierte RNA-Oligonukleotide

5´Triphosphorylierte (5´ppp) RNA-Oligonukleotide wurden durch Dr. Janos Ludwig (Institut für klinische Chemie und klinische Pharmakologie, Bonn) chemisch synthetisiert und bereitgestellt (Goldeck et al., 2014). Interne 2´O-Methylierungen am ersten und/oder zweiten Nukleotid (N1m / N2m) wurden bereits während der RNA-Synthese durch Verwendung 2´O-methylierter Nukleotide in das RNA-Oligonukleotid eingefügt.

Name	Sequenz
RNA N1 N2 Oligo	5´-pppGACGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU -3´
RNA N1m N2 Oligo	5´-pppGmACGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU -3´
RNA N1 N2m Oligo	5´-pppGAmCGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU -3´
RNA N1m N2m Oligo	5´-pppGmAmCGCUGACCCUGAAGUUCAUCUU -3´

### 3.1.8. Bakterienstämme

Alle Arbeiten wurden mit dem E.coli K12 Stamm Stbl3 (Invitrogen) durchgeführt.

Genotyp: F<sup>-</sup>*mcrB mrrhsdS20*(r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>) *recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20*(Str<sup>R</sup>) *xyl-5 λ-leumtl-1*.

### 3.1.9. Zelllinien

#### 3.1.9.1. HEK293T

HEK293T ist eine humane Zelllinie, die aus embryonalem Nierengewebe generiert wurde und konstitutiv eine mutierte Version des *SV40 large T antigen* exprimiert. HEK293T-Zellen wurden von Invitrogen bezogen.

#### 3.1.9.2. DT40-wt- und DT40-CMTr1-KO-Zellen

DT40 ist eine Hühner-B-Zelllymphom-Zelllinie. Von der Arbeitsgruppe von Prof. Michael Engelke (Institut für Zelluläre und Molekulare Immunologie, Universität Göttingen) wurde für dieses Projekt eine CMTr1-Knockout-Zelllinie in DT40 durch homologe Rekombination hergestellt und gemeinsam mit der DT40-wt-Zelllinie freundlicherweise bereitgestellt.

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Klonierungen und Bakterien

#### 3.2.1.1. Herstellung chemokompetenter Bakterien

Chemokompetente Bakterien wurden nach einem von Inoue et al. modifizierten Protokoll generiert (Inoue et al., 1990). Eine Verdünnung von *Escherichia coli* K12 (Stbl3) Bakterien wurde im Drei-Ösen-Ausstrich auf eine Antibiotika-freie LB-Agarplatte ausgebracht und über Nacht bei 37°C inkubiert. 200 ml antibiotikafreies LB-Medium wurde mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und bei Raumtemperatur (RT) für 16-20 h in Flaschen mit Schikanen geschüttelt, bis die Kultur eine OD<sub>600nm</sub> von 0,6 aufwies. Alle folgenden Schritte wurden bei 0°C und mit eisgekühlten Puffern durchgeführt. Die Bakterien wurden bei 4000 rcf für 15 min präzipitiert und in 80 ml TB-Puffer vorsichtig resuspendiert und anschließend für 10 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden durch erneute Zentrifugation präzipitiert und in 10 ml TB Puffer mit 8% (v/v) DMSO resuspendiert. Nach 10 min Inkubation bei 0°C wurden die Bakterien in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aliquots wurden bei -80°C gelagert.

### **3.2.1.2. Transformation chemokompetenter Bakterien**

Ein Aliquot chemokompetenter Bakterien wurde auf Eis aufgetaut. Für einen Transformationsansatz wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 50 µl chemokompetente Bakterien für 20 min mit der zu transformierenden DNA inkubiert (2 µl Ligationsreaktion, 1 µl Gibson Assembly Reaktionsansatz oder bis zu 50 ng Plasmid). Der Transformationsansatz wurde für 15 min auf Eis inkubiert, dann einem Hitzeschock für 45 sec bei 42°C ausgesetzt. Nach weiteren 15 min auf Eis und anschließender Zugabe von 1 ml Antibiotika-freiem LB-Medium wurde der Ansatz für 1-2 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Teile des Transformationsansatzes wurden zur Selektion von Einzelklonen auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden einzelne Kolonien entweder durch Kolonie-PCR analysiert oder direkt zum Animpfen von Flüssigkulturen verwendet.

### **3.2.1.3. Präparation von Plasmiden aus LB-Flüssigkulturen**

LB-Medium-Flüssigkulturen wurden mit einzelnen Bakterienkolonien angeimpft und unter Antibiotika-Selektion über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Präparation der Plasmide erfolgte entweder aus 1,5 ml Kulturvolumen (MINI-Präp) mit NukleoSpin Kit, oder – wenn größere Mengen Plasmid benötigt werden – aus 100 bis 200 ml Kulturvolumen (MAXI-Präp) mit PureLink Hi Pure Maxi Kit.

Beide Kits wurden nach Herstellerangaben verwendet und das Plasmid wurde in Wasser eluiert. Die Konzentration und Reinheit der Plasmid-DNA wurde photospektrometrisch bestimmt. Das gewonnene Plasmid wurde durch analytischen Restriktionsverdau und Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

### **3.2.1.4. Klonierung Restriktionsverdau**

Typ II Restriktionsendonukleasen (Restriktionsenzyme) schneiden DNA an definierten DNA-Basensequenzen (Schnittstellen) und sind ein wichtiges Werkzeug zur Klonierung von Plasmiden. Es wurden Fast Digest Restriktionsenzyme (Thermo Fisher) nach Angaben des Herstellers verwendet. Für einen analytischen Restriktionsverdau wurde 500 ng Plasmid verdaut und das Bandenmuster durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Für einen präparativen Restriktionsverdau wurden 1-3 µg Plasmid eingesetzt, nach Agarose-Gelelektrophorese die gewünschten Fragmente ausgeschnitten, und durch Gelextraktion aufgereinigt.

### **3.2.1.5. Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion.**

Durch die Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente abhängig von ihrer Größe aufgetrennt werden. Zur Herstellung von Agarosegelen wurde 1x TAE-Puffer mit 1-1,5% (w/v) Agarose aufgekocht und mit 1:20.000 SybrSafe (Thermo Fisher) versetzt und gegossen. Nach dem Aushärten wurde das Gel in die mit 1x TAE gefüllte Laufkammer überführt und die Taschen wurden mit DNA-Proben beladen, die mit 1x DNA Loading Buffer (Thermo Fisher) versetzt waren. Neben den Proben wurde auch ein Größenstandard (1kb plus DNA Ladder, Thermo Fisher) verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung (120V) für etwa 20 min. Nach der Elektrophorese wurde das Bandenmuster entweder am UV-Tisch oder am Odyssey FC (Wellenlänge 600 nm) dokumentiert. Spezifische DNA-Banden wurden bei Bedarf mit einem Einweg-Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten. Die Präparation von DNA aus Agarosegel erfolgte nach Herstellerangaben mit dem innuPrep Gel Extraction Kit (Analytik Jena).

### **3.2.1.6. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) für Klonierungen**

Durch die Polymerase-Ketten-Reaktion können spezifische DNA-Sequenzen aus einer Donor-DNA (*template*) amplifiziert werden. Es wurde Phusion-Polymerase (NEB) nach Herstellerangaben in 25 µl Reaktionsansätzen verwendet. Die durch PCRs generierten DNA-Sequenzen (Amplikons) wurden durch Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion aufgereinigt und für Klonierungen genutzt. Die Primer wurden manuell unter Zuhilfenahme des Programms ApE (A plasmid Editor) designt. Es wurde eine Schmelztemperatur von 58-62°C und einen GC-Gehalt von 40-60% angestrebt. Durch nicht mit dem Template homologe 5'-Überhänge der Primer können zusätzliche Sequenzen wie z.B. Restriktionsschnittstellen für konventionelle Klonierungen oder Homologie-Arme zur Klonierung mittels Gibson Assembly in die PCR-Produkte eingebracht werden. PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

### **3.2.1.7. Klonierung Gibson Assembly**

Gibson Assembly ist eine Kloniermethode, bei der zwei oder mehr DNA-Fragmente zusammengefügt werden können. Für die Reaktion müssen die DNA-Fragmente terminale, miteinander homologe Sequenzen von etwa 20 bp und einer Schmelztemperatur von 55°-65°C aufweisen. Bei PCR-Produkten können diese Homologiearme durch 5'-Überhänge in den Primern eingebracht werden. Der Gibson

Assembly Mix (NEB) wurde nach Herstellerangaben in einem finalen Reaktionsvolumen von 4  $\mu$ l und äquimolarer Mengen der DNA-Fragmente verwendet. 1  $\mu$ l des Reaktionsansatzes wurde zur Transformation chemokompetenter Bakterien verwendet.

#### **3.2.1.8. Konventionelle Klonierung**

Klassische Kloniermethoden beruhen auf der Generierung von DNA-Fragmenten durch Restriktionsenzyme (Kapitel 3.2.1.4) und dem anschließenden Zusammenfügen durch Ligation. Für eine erfolgreiche Ligation müssen die durch Restriktionsenzyme generierten Enden der DNA-Fragmente kompatibel sein. Zur Klonierung können Restriktionsschnittstellen durch 5'-Überhänge der Primer in PCR-Produkte eingebracht werden. Die Ligation erfolgte mit T4 DNA Ligase (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben. Die Ligationsreaktion erfolgte entweder über Nacht bei 4°C oder bei RT für 1 h. Zur Transformation chemokompetenter Bakterien wurde 2  $\mu$ l der Ligationsreaktion verwendet.

#### **3.2.1.9. Sequenzierung von Plasmiden und PCR Produkten**

Sanger-Sequenzierungen wurden von der Firma Microsynth AG durchgeführt. 700 ng Plasmid oder 100 ng PCR-Produkt sowie 3  $\mu$ l Sequenzierungsprimer (100  $\mu$ M) wurde in einem Gesamtvolumen von 15  $\mu$ l zur Sequenzierung eingeschickt.

#### **3.2.1.10. In dieser Arbeit hergestellte Plasmide**

Folgende Plasmide wurden in dieser Arbeit mit Hilfe der oben beschriebenen Klonierungstechniken hergestellt. Das DNA-Fragment, welches das strukturelle und regulatorische Rückgrat des Plasmides bildet, wird als Backbone bezeichnet. Das in das Backbone einklonierte DNA-Fragment, welches das zu exprimierende Transgen enthält, wird als Insert bezeichnet. Eine Auflistung aller in dieser Arbeit genutzten Klonierungsprimer und Plasmide findet sich in Kapitel 3.1.7.4.

**pRp-CMTr1:** Das Backbone wurde aus dem mit den Restriktionsenzymen Hind3 und Not1 geschnittenen Plasmid pRp-Puro präpariert. Zur Generierung des Inserts wurde eine PCR durchgeführt (Klonierungsprimer #1 und #2, Template murine cDNA von CMTr1) und das PCR-Produkt wurde mit Hind3 und Not1 geschnitten. Klonierungsprimer #2 bringt über einen 5'-Überhang einen C-terminalen FLAG-

Epitoptag in den CMTr1 Open-Reading-Frame ein. Insert und Backbone wurden ligiert und das Plasmid durch Sequenzierung validiert.

**pLenti-NVL2-wt:** Das Backbone wurde aus dem mit den Restriktionsenzymen Bstb1 und Pme1 geschnittenen Plasmid pLenti präpariert. Das synthetische NVL2-Gen diente als Insert und wurde durch Gibson-Assembly inkloniert und das Plasmid wurde durch Sequenzierung validiert.

**pLenti-NVL2-EQ:** Das Backbone wurde aus dem mit den Restriktionsenzymen Bstb1 und Pme1 geschnittenen Plasmid pLenti-NVL2-wt präpariert. Das Insert bestand aus drei einzelnen PCR-Produkten (PCR#1 mit den Klonierungssprimern #3 und #4, PCR#2 mit den Klonierungsprimern #5 und #6, PCR#3 mit den Klonierungsprimern #7 und #8, jeweils mit Template pLenti-NVL2-wt). Das Plasmid wurde durch Gibson-Assembly aus dem Backbone und den drei PCR-Produkten hergestellt und das Plasmid durch Sequenzierung validiert.

**pLenti-mIFIT1B:** Das Backbone wurde aus dem mit den Restriktionsenzymen Bstb1 und Pme1 geschnittenen Plasmid pLenti-NVL2-wt präpariert. Als Insert diente eine aus muriner cDNA amplifizierte Sequenz von mIFIT1B (Klonierungsprimer #9 und #10). Das Plasmid wurde durch Gibson-Assembly aus dem Backbone und dem PCR-Produkt hergestellt und das Plasmid wurde durch Sequenzierung validiert.

### **3.2.2. Zellkultur und zellbasierte Analysen**

#### **3.2.2.1. Kultivierung von Zellen**

Humane HEK293T-Zellen wurden in Nährmedium aus DEM mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) und 1x Penicillin/Streptomycin (Thermo Scientific) kultiviert. Die Zellen wurden bei einer Dichte von etwa 75-90% vorsichtig mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA (Invitrogen) im Zellinkubator bei 37°C für fünf Minuten abgelöst. Nach Zugabe von mindestens einem dreifachen Volumen Nährmedium wurden die Zellsuspension durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt, verdünnt und in frischem Nährmedium ausgesät.

DT40-Zellen wurden in RPMI-1640-Medium mit 10% FCS, 1% Hitze-inaktiviertem Hühner-Serum, 3,5 µl/l 2-Mercaptoethanol und Penicillin/Streptomycin kultiviert.

DT40-Zellen sind Suspensionszellen und wurden vor dem Aussäen gründlich resuspendiert. Für die Präsenzkultur und Versuche wurde die gewünschte Zellzahl in frisches Nährmedium aufgenommen und kultiviert.

### **3.2.2.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen durch Zentrifugation für 5 min bei 500 rpm und 4°C pelletiert und in Einfriermedium (entsprechendes Nährmedium mit 10% DMSO) resuspendiert und in Cryotubes überführt. Die Cryotubes wurden in einen auf Raumtemperatur temperierten Gefrierbehälter (Mr. Frosty) gestellt und anschließend auf -80°C heruntergekühlt. Die Langzeitlagerung von kryokonservierten Proben erfolgte im Stickstofftank. Um die Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden die Proben im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und sofort in warmem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden für 5 min bei 500 rpm pelletiert, in frischem Medium aufgenommen und in Zellkulturschalen ausgesät.

### **3.2.2.3. Beschichten von Zellkulturplastik mit poly-L-Ornithin**

Die Beschichtung von Zellkulturschalen und -Platten erhöht und beschleunigt die Adhärenz von HEK293T-Zellen. Dies verhindert ein Abschwimmen des Zellrasens bei Protokollen, die wiederholte Waschschrte oder Medienwechsel erfordern. Zum Beschichten wurde die Zellkulturschale mit ausreichend Poly-L-Ornithin-Lösung (1 mg/ml in Wasser) für mindestens 1 h bei 37°C im Zellkulturinkubator inkubiert. Die Lösung wurde verworfen und die Zellkulturschale zweimal mit Wasser gespült. Anschließend können die Platten zur Aussaat von Zellen verwendet werden.

### **3.2.2.4. Transfektion von Zellen mit Lipofectamin 2000**

Durch Komplexierung mit Lipofectamin 2000 (Thermo Scientific) können Nukleinsäuren in Lipidvesikel eingeschlossen und so in das Zytosol von Zielzellen eingebracht werden. Zur transienten Expression von Transgenen wurden HEK293T-Zellen mit Expressionsplasmiden oder Reporter-mRNA transfiziert. Zur Stimulation wurden Zellen mit dem RIG-I-Liganden IVT4, einer triphosphorylierten, doppelsträngigen RNA (5'ppp-dsRNA), transfiziert (Schuberth, 2011).

Die Transfektion wurde nach Herstellerangaben im Verhältnis von 1 µl Lipofectamin 2000 zu 500 ng Nukleinsäure durchgeführt. Zur Transfektion im 96-well-Format wurde bis zu 100 µg Nukleinsäure in 25 µl Opti-MEM vorgelegt. Pro Ansatz wurden 0,2 µl Lipofectamin mit 25 µl Opti-MEM vermischt und nach 5 min bei

Raumtemperatur zu der vorgelegten Nukleinsäure-Opti-MEM gegeben. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Transfektionsmix auf die Zellen gegeben. Für andere Zellkulturschalen wurde der Lipofektionsansatz entsprechend skaliert.

### **3.2.2.5. Produktion von retroviralen Partikeln**

$5 \times 10^6$  HEK293T-Zellen wurden in mit Poly-L-Ornithin beschichteten 10 cm-Schalen ausgesät. Sobald die Zellen 50% Konfluenz erreichten, wurde das Medium gewechselt und die Kalzium-Phosphat-Transfektion vorbereitet. Die verwendeten retroviralen Expressionsplasmide basierten auf dem Plasmid pRp-Puro. Als Kontrolle wurde das GFP-exprimierende retrovirale Expressionskonstrukt pRp-GFP verwendet. Zur Produktion wurden zusätzlich die Helferplasmide gag-pol und pCMV-VSV-G benötigt.

Für die Produktion von retroviralen Partikeln wurden zunächst ein Plasmidmix von 5 µg retroviralem Expressionsplasmid (pRp oder pRp-GFP), 4 µg gag-pol und 1 µg pCMV-VSV-G in 450 µl Wasser in einem 2 ml Reaktionsgefäß vorbereitet:

Zu dem Plasmidmix wurde 50 µl 2,5 M  $\text{CaCl}_2$  zugegeben und sofort durch mehrmaliges invertieren gemischt. Anschließend wurde in einem Stoß 500 µl 2x HBS pH 7,4 zugegeben und sofort für 20 sec durch Schütteln vermischt. Nach 20 min Inkubation bei RT wurde der Transfektionsmix tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt. 72 h nach Transfektion wurde das nun Viruspartikel-haltige Medium abgenommen. Dieses wurde durch Zentrifugation für 10 min bei 800 rpm von größeren Zellbruchstücken befreit, der Überstand wurde durch einen 0,45 µm Spritzenfilter filtriert und entweder sofort zur Transduktion von Zielzellen verwendet oder aliquotiert bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### **3.2.2.6. Transduktion von Zellen mit retroviralen Partikeln**

Zur Generierung von stabil transduzierten Zelllinien wurden die Zellen mit retroviralen Partikeln transduziert und anschließend selektioniert. Durch die verwendeten retroviralen Vektoren (pRp-Puro und pRpGFP) wird eine Puromycinresistenz zur Selektion in die transduzierten Zellen eingebracht.

$1 \cdot 5 \times 10^5$  Zielzellen wurden in 6-well-Platten in 1 ml des entsprechenden Zellkulturmediums ausgesät. Zur Kontrolle der Selektion wurde ein weiteres well ausgesät, aber nicht transduziert. Nach Zugabe von 1 ml unverdünntem retrovirale Partikel-haltigem Medium wurden die Zellen für 72 h kultiviert. Das Medium wurde gegen Selektionsmedium ausgetauscht (Zellkulturmedium mit 1-5 µg/ml Puromycin).



Die Zellen wurden über einen Zeitraum von zwei Wochen selektioniert und danach für Experimente verwendet.

### 3.2.2.7. Produktion von Hühner-IFN- $\alpha$

Hühner-IFN- $\alpha$  (chIFN- $\alpha$ ) wurde durch Transfektion des Plasmides pSH-ChIFN-alpha in HEK293T-Zellen hergestellt (Xia et al., 2004). Da mit dem Plasmid transfizierte HEK293T-Zellen chIFN- $\alpha$  in hoher Konzentration in das Zellkulturmedium sezernierten, wurde das konditionierte Medium der Produzentenzellen abgenommen und in Aliquots eingefroren. Als Kontrolle diente konditioniertes Medium von pCMV-GFP-transfizierten HEK293T-Zellen. Produktion und Aufreinigung des chIFN- $\alpha$  war identisch mit der Produktion von retroviralen Vektoren, statt retrovirale Expressionsplasmid und Helferplasmiden wurden die Zellen mit 10  $\mu$ g pSH-ChIFN-alpha transfiziert. Die Aktivität des so hergestellten chIFN- $\alpha$  wurde anhand des inhibitorischen Effekts auf DT40 im Vergleich zu kommerziell erhältlichem chIFN-A3 (Bio-Rad) ermittelt. chIFN- $\alpha$  wurde aliquotiert bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.2.2.8. Generierung von Knockout-Zelllinien mit CRISPR/Cas9

Durch die CRISPR/Cas9 (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)-Methode kann das Genom von Zielzellen editiert werden. In dieser Arbeit wurde CRISPR/Cas9 eingesetzt, um Zielgene auszuschalten und somit Knockout-Zelllinien zu herzustellen. Dazu wurde das Plasmid pLenti-EF1a-Cas9/U6-gRNA verwendet. Dieses Plasmid exprimiert in Zellen das DNA-schneidende Enzym Cas9 und eine guideRNA (gRNA). Die gRNA besteht aus einem Cas9-bindenden Teil und einer mit der Zielsequenz im Genom homologen Region (Targetsequenz). Spezifische Targetsequenzen für Zielgene wurden als Oligonukleotide bei IDT bestellt und in pLenti-EF1A-Cas9/U6-gRNA inkloniert. Dazu wurde die Oligonukleotide der Targetsequenzen durch Gibson Assembly in das mit dem Restriktionsenzym SwaI (Thermo Fisher) geöffnete pLenti-EF1a-Cas9/U6-gRNA Plasmid-*backbone* inkloniert. Die verwendeten genspezifischen Targetsequenzen waren AGGCATTTTCATCGTCATCAATGG zur Generierung von IFIT1-KO-Zellen und GGGTCGGAAGGACATCGTTGAGG zur Generierung von CMTr1-KO-Zellen.

Es wurden 20.000/well HEK293T-Zellen in 96-well-Zellkulturplatten ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit 100 ng pLenti-EF1A-Cas9/U6-gRNA transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen durch Trypsin/EDTA abgelöst und durch

Pipettieren vereinzelt. Um Einzelzellklone zu generieren, wurden die Zellen in 96-*well*-Platten mit einer Konzentration von 0,5 Zellen/*well* ausgesät und im Zellkulturinkubator inkubiert, bis Zellkolonien in den *wells* sichtbar wurden (1-2 Wochen). Leere *wells* und *wells* mit mehr als einer Zellkolonie wurden verworfen. Die Einzelzellklone wurden trypsiniert und weiter in Zellkulturplatten expandiert. Die Einzelzellklone wurden durch Westernblot und Sanger-Sequenzierung analysiert. Klone, die keine Proteinexpression des Zielgens im Westernblot aufwiesen und bei denen beide Allele des Zielgens durch CRISPR/Cas9 Genomeditierung Leserastermutationen aufwiesen, wurden weiter expandiert und für die Experimente verwendet.

### **3.2.2.9. Messung der Zellviabilität durch MTT-Assay**

Der kolorimetrische MTT-Assay misst die metabolische Aktivität von Zellen. Der Assay beruht auf der Reduktion von Thiazolylblau (MTT) zu violetterm Formazan-Kristallen in intakten Zellen (Berridge & Tan, 1993; Mosmann, 1983). Der Umsatz von MTT ist dabei von der metabolischen Aktivität der einzelnen Zellen und der Gesamtzahl der Zellen im *well* abhängig und kann je nach Anwendung als Indikator der Zellviabilität, der Zytotoxizität oder der Proliferation eingesetzt werden. Die Zellen wurden in 96-*well*-Zellkulturplatten in 100 µl Zellkulturmedium kultiviert.

Zur Bestimmung der Zellviabilität / Zytotoxizität wurden die Zellen mit Zytokinen oder Inhibitoren behandelt und zu dem angegebenen Zeitpunkt analysiert. 20 µl MTT Substrat (5 mg/ml MTT in PBS) wurde zu den Zellen gegeben und die Zellen im Inkubator inkubiert, bis eine deutliche Färbung der unbehandelten Zellen sichtbar war (30 bis 120 min). Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 10% SDS abgestoppt. Nach 16 bis 24 h wurde der Assay photospektrometrisch bei OD<sub>584nm</sub> im Epoch Plattenspektrometer analysiert.

Zur Messung der Zellproliferation wurden unbehandelte Zellen zu mehreren Zeitpunkten für genau 1 h mit 20 µl MTT-Substrat inkubiert und dann mit 100 µl 10% SDS lysiert und wie oben beschrieben analysiert.

### **3.2.2.10. Kristallviolett-Assay (Colony-Formation-Assay)**

Der Colony-Formation-Assay misst das klonogene Potential von Zellen, also der Fähigkeit von Einzelzellen zu Zellkolonien auszuwachsen. Die zu analysierenden

Zellen werden dazu stark verdünnt ausgesät. Nachdem sich Kolonien ausgebildet haben, werden diese mit Kristallviolett angefärbt und es kann optisch die Anzahl und Größe der Kolonien gemessen werden.

$0,5\text{-}5 \times 10^5$ /well HEK293T-Zellen wurden in poly-L-Ornithin beschichteten 6-well-Zellkulturplatten ausgesät und sofort mit Zytokinen oder Inhibitoren behandelt. Nach etwa 7-10 d wurde das Zellkulturmedium abgenommen, die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und für 30 min bei Raumtemperatur mit 1 ml 4% Formaldehyd in PBS fixiert. Die Fixierlösung wurde abgenommen und die Zellen mit 1 ml 0,05% Kristallviolettlösung für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Färbelösung wurde abgenommen und die Platten wurden durch wiederholte Waschschriffe mit Wasser gewaschen, bis ein guter Kontrast zwischen Kolonien und Hintergrund erreicht wurde. Anschließend wurde das Wasser vollständig abgenommen und die Platten bei Raumtemperatur getrocknet. Die Platten wurden entweder mit einem Flachbettscanner (Canon) oder Odyssey SA bei 700 nm eingelesen.

Durch anschließendes Solubilisieren des Farbstoffes kann die relative Menge der Zellen im well photometrisch quantifiziert werden (Franken et al., 2006). Dazu wurden die Platten mit 1 ml/well 10% SDS für 24 h bei 37°C im Zellkulturinkubator inkubiert. 200 µl wurde in eine 96-well-Mikrotiterplatte überführt und die Absorption bei OD<sub>584nm</sub> im Epoch Plattenspektrometer gemessen.

### **3.2.3. Westernblot und Protein basierte Methoden**

Der Westernblot beruht auf der Auftrennung von Proteinproben abhängig von ihrem Molekulargewicht, gefolgt vom Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Blotting) und von Nachweis und Quantifizierung der Proteine durch spezifische Antikörper.

#### **3.2.3.1. Generierung von Protein-Proben**

Zellen wurden nach Abnahme des Kulturmediums und einmaligen Waschen mit PBS direkt in der Zellkulturschale mit 1x Lämmli-Puffer lysiert. Das Lysat wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und im Ultraschallblock für 120 s homogenisiert. Zur effektiveren Homogenisierung wurden dem Lysat 2-5 Zirkonia-Kugeln zugegeben. Die Ultraschallbehandlung wurde nach Bedarf wiederholt, bis die Proben gut pipettierbar waren. Die Lysate wurden unmittelbar vor dem Beladen für 5 min bei 95°C denaturiert und dann auf Eis gelagert. Die Lagerung der Lysate erfolgte bei -20°C.

### **3.2.3.2. Generierung von Protein-Proben (SUnSET Assay)**

Der SUnSET (*surface sensing of translation*) Assay erlaubt die Quantifizierung der Translationsaktivität der Zellen (Goodman & Hornberger, 2013; E. K. Schmidt et al., 2009). Der SUnSET Assay beruht auf der Inkorporation von Puromycin in naszierende Proteine, welche anschließend im Immunoblot durch einen anti-Puromycin-Antikörper nachgewiesen und quantifiziert werden können.

Die Zellen wurden für 20 min mit Puromycin (finale Konzentration 1 µg/ml) versetzt und für 20 min bei 37°C inkubiert, anschließend einmal mit PBS gewaschen und danach sofort, wie in Kapitel 3.2.3.1 beschrieben, lysiert und verarbeitet und im Westernblot analysiert.

### **3.2.3.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dies beruht auf der Denaturierung der Proteine durch SDS, wodurch die Proteine linearisiert und mit negativer Ladung versehen werden. Die denaturierten Proteine werden nach Anlegen von elektrischer Spannung durch das Gel aufgetrennt.

Polyacrylamid-Gele bestehen aus Trenngel und Sammelgel. Zunächst wurde das Trenngel gegossen und mit 70% Ethanol überschichtet. Nach dem Aushärten des Trenngels wurde das Ethanol entfernt, das Sammelgel gegossen und ein Probenkamm eingesetzt. Nach dem Aushärten wurde das Gel in die Westernblot-Kammer eingesetzt und die Kammer mit 1x SDS Laufpuffer gefüllt. Die Proteinproben sowie ein Größenstandard wurden geladen (Page Ruler). Die Elektrophorese erfolgte bei 30 mA/Gel für 90 min.

### **3.2.3.4. Transfer auf Nitrozellulose-Membran (Blotting)**

Die durch das SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden durch Elektrotransfer aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,45 µm) übertragen (Blotting). Zunächst wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel in 1x Transferpuffer äquilibriert, Zusammenbau und Ablauf der Transferreaktion erfolgte nach Herstellerangaben (450 mA für 90 min).

### **3.2.3.5. Ponceau-Färbung**

Nach dem Transfer auf die Nitrozellulosemembran wurde die Membran für 2 min mit Ponceau-S-Lösung gefärbt, gefolgt von mehreren Waschschritten mit Wasser. Die

gefärbte Membran wurde mit einem Scanner (Canon) in Graustufen dokumentiert. Anschließend wurde die Membran durch mehrmaliges Waschen mit 1x TBS-T vollständig entfärbt.

Durch die reversible Ponceau-Färbung werden die transferierten Proteine angefärbt, dies ermöglicht einerseits eine optische Einschätzung des Erfolgs der Elektrotransfers und andererseits die Quantifizierung der geladenen Proteinmengen. Zur Quantifikation der Gesamtproteinmengen je Probe wurden die Signalintensität der eingescannten Bilder mit dem Image Studio Lite quantifiziert.

### **3.2.3.6. Antikörperfärbung und Westernblot**

Die Membran wurde in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und für mindestens 1 h mit 5% (w/v) BSA in TBS-T auf einem Taumelrollenmischer geblockt, um die unspezifische Bindung von Antikörpern zu verhindern. Im Anschluss wurde die Membran mit 6 ml Erstantikörper-Lösung über Nacht auf einem Taumelrollenmischer bei 4°C inkubiert. Die Erstantikörper-Lösung bestand – je nach erwarteter Intensität des Signales – aus einer 1:1.000 bis 1:10.000 Verdünnung des proteinspezifischen Erstantikörpers in Odyssey PBS Blocking Buffer. Nach der Inkubation wurde die Antikörperlösung abgenommen, bei 4°C gelagert und konnte bei Bedarf über den Zeitraum von zwei Wochen wiederverwendet werden.

Die Membran wurde anschließend bei Raumtemperatur dreimal für je 5 min gewaschen, beginnend mit TBS, dann TBS-T und TBS. Anschließend wurde die Membran mit 6 ml Zweitantikörperlösung auf einem Taumelrollenmischer für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zweitantikörper-Lösung bestand aus 1:20.000, mit IRDye 680nm- oder IRDye 800nm-gekoppelten Detektionsantikörper in Odyssey PBS-T Blocking Buffer. Anschließend wurde die Membran fünfmal für je 5 min gewaschen, beginnend mit TBS, TBS-T, TBS-T, TBS und schließlich TBS. Zur Detektion wurde die Membran im Odyssey Fc (Wellenlängen 700nm und 800nm) eingelesen. Die Proteinmengen wurden mit dem Programm Image Studio Lite quantifiziert.

### **3.2.3.7. Stripping von Membranen**

Durch Stripping werden Erst- und Zweitantikörper von einer Nitrozellulose-Membran entfernt. Anschließend kann die Membran erneut geblockt und mit anderen Antikörpern inkubiert werden. Die Membran wurde dazu mit 20 ml Stripping-Puffer für je 20 min auf dem Taumelrollenmischer bei Raumtemperatur inkubiert, dieser Schritt

wurde einmal mit frischem Stripping-Puffer wiederholt. Anschließend wurde die Membran fünfmal für je 5 min mit TBS-T gewaschen und anschließend wie in Kapitel 3.2.3.6 beschrieben geblockt und weiter behandelt.

### 3.2.4. Allgemeines Luciferase-Protokoll

Luciferasen sind Enzyme, die durch den Umsatz ihres Substrates Lumineszenz erzeugen. In dieser Arbeit wurden Renilla-Luciferase (RLuc), Firefly-Luciferase (FLuc) und Gaussia-Luciferase (GLuc) als Reportergene eingesetzt. Die Lumineszenz wurde im 96-*well*-Format in LumiTrack2000-Platten im EnVision 2104 Multilable Reader gemessen.

GLuc wird von den Zellen in das Kulturmedium sezerniert. 25 µl Überstand wurde in eine LumiTrack2000-Platte vorgelegt. 25 µl Substrat (1 µg/ml Coelenterazin) wurde zugegeben und sofort die Lumineszenz gemessen.

RLuc und FLuc werden nicht sezerniert und müssen in Zelllysat gemessen werden. Das Medium der Zellen wurde abgenommen und die Zellen durch Zugabe von 80 µl 1x SAP pro *well* einer 96-*well*-Platte für 30 min bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschüttler lysiert. 25 µl Zelllysat wurde in LumiTrack2000-Platten vorgelegt. Zur Messung von RLuc wurden 25 µl Substrat (1 µg/ml Coelenterazin) zugegeben und die Lumineszenz sofort gemessen.

Zur Messung von FLuc wurden 25 µl Firefly-Luciferase-Substrat zugegeben und die Lumineszenz nach 1 min gemessen.

### 3.2.5. Methoden zur Quantifizierung der Zytokinproduktion

#### 3.2.5.1. ELISA

Von Zellen sezernierte Zytokine können durch ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) nachgewiesen und quantifiziert werden. ELISA beruht auf der Immobilisierung von Zielproteinen durch einen *Coating*-Antikörper in einer *Microwell*-Platte und deren Detektion durch einen zweiten, Enzym-gekoppelten Antikörper (Detektions-Antikörper).

In dieser Arbeit wurden HEK293T-basierte Zelllinien für 24 h stimuliert, das Zellkulturmedium abgenommen und darin durch ELISA die Konzentrationen von IP10 und IFN-β gemessen. IP10 ELISA (BD OptEIA, BD) und IFN-β ELISA (human IFN-β ELISA Kit, Antigenix America) wurde mit dem vom Hersteller vorgegebenen Protokoll und Puffern, aber mit halbierten Mengen von *Coating*-Antikörper, Detektionsantikörper und Detektionslösung durchgeführt. Zur Quantifizierung wurde

neben den Proben nach Herstellerangaben eine Standardreihe rekombinantem IP-10 und IFN- $\beta$  gemessen. Hochkonzentrierte Proben wurden im Probenpuffer vorverdünnt, um im Konzentrationsbereich der Standardreihe zu bleiben.

Die Platten wurden durch Zugabe von TBM-Substrat (BD) nach Herstellerangaben entwickelt, die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 M Schwefelsäure abgestoppt. Die Platten wurden kolorimetrisch im Epoch Plattenspektrometer (OD<sub>570nm</sub>, OD<sub>450nm</sub>) ausgelesen. Die Bestimmung der Probenkonzentrationen erfolgte mittels einer linearen Standardkurve anhand der Werte der Standardreihe in Excel (Microsoft).

### **3.2.5.2. Nachweis von Typ-I IFN mit HEK-Blue IFN- $\alpha/\beta$ Reporterzellen**

Alternativ zu ELISA können einige Zytokine auch durch Reporterzellen quantifiziert werden. In dieser Arbeit wurden HEK-Blue IFN- $\alpha/\beta$  Reporterzellen (Invivogen) zur Quantifizierung von Typ-I-IFN im Überstand stimulierter Zellen verwendet. HEK-Blue IFN- $\alpha/\beta$  Reporterzellen induzieren nach Behandlung mit Typ-I-IFN die Expression des Reporters *secreted embryonic alkaline phosphatase* (SEAP).

Pro *well* wurden 50.000 HEK-Blue IFN- $\alpha/\beta$  in 180  $\mu$ l Medium in 96-*well*-Zellkulturplatten ausgesät und 6 h im Zellkulturinkubator inkubiert. 20  $\mu$ l zu testender Überstand und eine Standardreihe von rekombinantem IFN- $\alpha$  (Milteny) wurden zugegeben und die Zellen für 16 h bei 37°C inkubiert.

Zum Auslesen der SEAP-Produktion wurden 40  $\mu$ l Überstand in eine 96 -*well*-Mikrotiterplatte überführt und mit 40  $\mu$ l 1x pNPP-Substrat (10x pNPP-Substrat verdünnt in pNPP-Puffer). Die Platte wurde für 40 min bei 37°C inkubiert und kolorimetrisch im Epoch Plattenspektrometer (OD<sub>405nm</sub>) ausgelesen. Die Probenkonzentration wurde in GraphPad Prism mit einer nicht-linearen Standardkurve ermittelt.

### **3.2.5.3. Dual-Luciferase-Reporter-Assay (GLuc/FLuc) zur Messung der IFN-Induktion**

Alternativ zur Messung von sezernierten Zytokinen im ELISA lässt sich die Aktivierung des RIG-I-Signalweges mit dem Dual-Luciferase-Reporter-Assay (GLuc/FLuc) messen (Ablasser et al., 2009).

Dazu wurden neben dem RIG-I Stimulus IVT4 zwei Plasmide (pEF-FLuc und pIFNb-GLuc) in die Zellen transfiziert. Die Expression der Gaussia-Luciferase (GLuc) von pIFNb-GLuc wird durch regulatorische Elemente des IFN- $\beta$ -Gens reguliert und nach RIG-I-Stimulation in den Zellen induziert. Die Expression von Firefly-Luciferase

(FLuc) durch pEF-FLuc erfolgt durch einen konstitutiven Promotor (EF1 $\alpha$ ) und dient der Normalisierung des GLuc-Signals.

$2 \cdot 10^5$  Zellen/*well* der HEK293T-basierten Zelllinien wurden in 96-*well*-Platten ausgesät. Nach 16 h wurden pro *well* 15 ng pFNB-GLuc, 15 ng pEF-FLuc und die angegebene Menge IVT4 (50 ng, 10 ng, 2 ng oder 0 ng) durch Lipofektion mit Lipofectamin 2000 transfiziert (Kapitel 3.2.2.4). 24 h nach Transfektion wurde die Lumineszenz von GLuc und FLuc wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben eingelesen.

### **3.2.6. RNA und RNA-basierte Analysen**

#### **3.2.6.1. RNA-Aufreinigung aus Zellen (Silikat-Säulen)**

Für die Analyse der Genexpression durch quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR) wurde die RNA aus Zellen durch ein Silikat-Säulen-basiertes Protokoll aufgereinigt. Die Zellen wurden in 6-*well*- oder 12-*well*-Zellkulturplatten kultiviert und nach Abnahme des Zellkulturmediums durch Zugabe von 350  $\mu$ l RLT-Puffer (Zymo) für 5 min bei Raumtemperatur lysiert und anschließend für mindestens 10 min bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Nach dem Auftauen wurde dem Lysat 350  $\mu$ l 70% Ethanol zugegeben. Der Ansatz wurde durch Pipettieren gründlich gemischt und auf eine Silikat-Säule geladen. Die Säulen wurden für 1 min bei 10.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen. Es folgten zwei Waschschrte mit 350  $\mu$ l RW1 (Zymo) und 350  $\mu$ l Zymo RNA-Waschpuffer (Zymo). Die Säule wurde anschließend durch Zentrifugation für 2 min bei 18.000 rpm getrocknet, um Pufferreste zu entfernen. Danach wurde die Säule in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 30  $\mu$ l Wasser direkt auf die Silikatmembran, nach 2 min Inkubation wurde die RNA durch Zentrifugation für 2 min bei 10.000 rpm eluiert. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde photospektrometrisch im Nanodrop bestimmt.

#### **3.2.6.2. RNA-Aufreinigung aus Zellen (TRizol)**

Für TRizol-basierte RNA-Extraktionen wurden die Zellen in 6-*well*-Zellkulturplatten durch die Zugabe von 1 ml TRizol lysiert. Zur Extraktion von RNA aus anderen Formaten wurden die verwendeten Mengen entsprechend angepasst. Durch wiederholtes Pipettieren wurden die Zellen homogenisiert und das Lysat dann in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 200  $\mu$ l Chloroform wurde der Ansatz durch mehrmaliges Invertieren gründlich durchmischt und anschließend für 15 min bei 12.000 g und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Durch



die Zentrifugation trennt sich der Ansatz in drei Phasen auf. Die obere, farblose wässrige Phase enthält die RNA und wurde abgenommen und in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl Isopropanol und 1 µl Glykogen-Lösung versetzt und durch mehrmaliges Invertieren durchmischt. Nach 10 min bei Raumtemperatur wurde der Ansatz für 10 min bei 12.000 g bei 4°C zentrifugiert. Durch die Zentrifugation wurde die RNA pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 7.500 g bei 4°C wurde der Überstand gründlich abgenommen und das Pellet für 10 min bei geöffnetem Deckel des Reaktionsgefäßes trocknen gelassen. Das Pellet wurde anschließend in 30-50 µl Wasser aufgenommen. Die Konzentration und Reinheit wurde photospektrometrisch im Nanodrop bestimmt.

### **3.2.6.3. Generierung von cDNA durch Reverse Transkription**

Reverse Transkription bezeichnet das Umschreiben von einzelsträngiger RNA in sogenannte komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA). Zur cDNA-Synthese wurden 4,6 µl RNA-Verdünnung (500-1.000 ng RNA pro Ansatz) in PCR Reagenzgefäßen vorgelegt. Die anderen Komponenten wurden als Mastermix vorbereitet und je 3,4 µl Mastermix pro Ansatz zugegeben. Der Mastermix besteht aus 1,6 µl 5x RT-Puffer, 0,8 µl dNTPs (10 mM), 0,4 µl Random Hexamer Primern (100 µM), 0,4 µl RevertAid Reverse Transkriptase, 0,2 µl RiboLock RNase Inhibitor.

Die cDNA-Synthese erfolgte im Thermalzykler mit folgendem Programm: 10 min 25°C, 42°C für 60 min, 85°C für 5 min und anschließender Kühlung auf 4°C. Die cDNA wurde durch Zugabe von 72 µl Wasser verdünnt und entweder sofort für qPCR verwendet oder bei -20°C gelagert.

### **3.2.6.4. Quantitative real-time PCR (qPCR)**

Durch qPCR können die Transkriptlevel innerhalb der Zelle quantifiziert werden. Dazu muss die RNA zunächst durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben werden, in der qPCR werden dann einzelne Transkripte durch spezifische Primer amplifiziert. Die Quantifizierung der Transkripte beruht auf der Messung der Änderung der Fluoreszenzintensität während der PCR-Reaktion. Der Reaktionsmix enthält Fluoreszenz-Farbstoffe, die in die während der PCR-Reaktion entstehende doppelsträngige DNA interkalieren. Somit korreliert die gemessene Fluoreszenzintensität mit der Menge der in der PCR entstehenden dsDNA PCR-Produkte. Zur Auswertung wird der Schwellenwert-Zyklus bestimmt (*threshold cycle*,

Ct), bei dem die Fluoreszenz signifikant über die Hintergrundwerte ansteigt und sich das PCR-Produkt von Zyklus zu Zyklus exponentiell vermehrt. Damit korreliert der Ct mit der initialen Menge des Transkriptes im Ansatz.

Durch qPCR wurde die relative Expression von Transkripten (Zielgenen) in den Zellen ermittelt. Dazu wurde die Expression des Zielgens auf die eines *Housekeeping* Gens normalisiert. Im Gegensatz zu den Zielgenen, deren Regulation gemessen werden soll, ist ein sogenanntes Housekeeping-Gen unter den Versuchsbedingungen nicht reguliert und möglichst konstitutiv exprimiert. Wenn nicht anders angegeben, wurde in dieser Arbeit Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Housekeeping-Gen verwendet.

Die genutzten qPCR-Primer sind in Kapitel 3.1.7.1 aufgelistet. Alle Primer wiesen eine gute Amplifikationseffizienz auf und generierten keine unspezifischen Nebenprodukte (Schmelzkurvenanalyse). Die Primer wurden falls möglich so designt, dass das erwartete PCR-Produkt eine Exon-Exon-Grenze im Transkript überspannt. Dadurch kann verhindert werden, dass kontaminierende Fragmente genomischer DNA in der cDNA als Template für die qPCR dienen.

Die qPCR wurde in 384-well-Platten in technischen Duplikaten oder Triplikaten in 10 µl Ansätzen durchgeführt. Es wurde 8 µl Mastermix bestehend aus 5,4 µl Wasser, 2 µl Evagreen und je 0,3 µl *forward* (fwd) und *reverse* (rev) Primer (je 10 mM) vorgelegt. Anschließend wurde 2 µl cDNA (Kapitel 3.2.6.3) zugegeben und die Platte mit Abdeckfolie verschlossen und kurz zentrifugiert. Die qPCR wurde mit QuantStudio 5 und folgendem Programm durchgeführt: Initiale Denaturierung bei 95°C für 10 min, 40 Amplifikationszyklen bestehend aus 10 sec bei 95°C (Denaturierung), 20 sec bei 60°C (Annealing), und 20 sec bei 72°C (Elongation). Darauf folgte die finale Extension für 30 sec bei 54°C und die Erstellung einer Schmelzkurvenanalyse nach Herstellerangaben. Die relative Expression von Zielgenen wurde durch die Formel  $2^{Ct(\text{Zielgen})}/2^{Ct(\text{GAPDH})}$  berechnet.

### 3.2.6.5. Semiquantitative RT-PCR

Semiquantitative Reverse Transkriptase-PCR (sqRT-PCR) beruht, wie die qPCR, auf der Amplifikation und dem Nachweis von Transkripten durch spezifische Primer in cDNA. Im Gegensatz zur qPCR wird das PCR-Produkt nach Abschluss der Reaktion durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Während in der qPCR die Amplikons auf etwa 200 bp begrenzt sind, kann die sqRT-PCR für größere PCR-Produkte optimiert werden.

sqRT-PCR wurde in 25 µl Ansätzen mit DreamTaq DNA-Polymerase durchgeführt. Der Ansatz, bestehend aus 2,5 µl 10x DreamTaq Green Buffer, 21,2 µl Wasser, je 0,2 µl *forward* (fwd) und *reverse* (rev) Primer (10 mM), 0,2 µl DreamTaq DNA-Polymerase und 0,5 µl cDNA (Kapitel 3.2.6.3), wurde auf Eis pipettiert. Die PCR-Reaktion wurde im Thermalzykler mit folgendem Programm durchgeführt: 2 min 95°C (initiale Denaturierung), 30x Amplifikationszyklen bestehend aus 15 sec 95°C, 15 sec 59°C und 45 sec 72°C. Nach weiteren 10 min bei 72°C (finale Elongation) wurde der Reaktionsmix auf 4°C gekühlt und durch Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 3.2.1.5) aufgetrennt und im Odyssey Fc analysiert.

#### **3.2.6.6. MTase-Glo basierter Assay zur Bestimmung der Cap-Methylierung**

Um den Cap-Methylierungsstatus von RNA bestimmen zu können, wurde in dieser Arbeit ein Assay entwickelt, um Cap0-modifizierte RNA nachzuweisen

Dazu wurde die enzymatische Aktivität der rekombinanten Vaccinia-Virus-Methyltransferase mRNA 2'-O-Methyltransferase (VMTr1) genutzt. Diese Methyltransferase benötigt Cap0-RNA als Substrat und generiert Cap1 (Barbosa & Moss, 1978; Lockless et al., 1998), wobei der Methyl donor S-Adenosyl-Methionin (SAM) verbraucht und in S-Adenosyl-Homocystein (SAH) umgewandelt wird. SAH kann durch den MTase-Glo Assay (Promega) quantifiziert werden. Die Quantifizierung beruht auf der Umwandlung von SAH zu Adenosindiphosphat (ADP), welches in einem zweiten Schritt ein Lumineszenzsignal generiert (Hsiao et al., 2016).

Die Signale des MTase-Glo Assay unterlagen unabhängig von der RNA-Aufreinigungsmethode starken Schwankungen zwischen den Proben, dies kann unter anderem durch kontaminierende RNA-Nukleotide in den RNA-Proben verursacht werden. Daher wurde statt einer absoluten Quantifizierung der SAH-Konzentration der relative SAM-Verbrauch als Quotient der Lumineszenz zwischen einer Reaktion mit Methyltransferase und einer *mock* Reaktion (ohne Enzym) ermittelt.

Je Probe wurden zwei *wells* mit 10 µl RNA Verdünnung in einer 96-*well*-PCR-Platte vorgelegt. Abhängig von der Zusammensetzung der RNA-Probe mussten verschiedene RNA-Mengen pro Ansatz eingesetzt (2.000 ng TRIzol-aufgereinigte RNA aus Zellen, 500 ng Terminator-Nuklease-behandelte RNA aus Zellen, 25 ng gecappte RNA-Oligonukleotide).

Je Probe wurde ein *well* mit 10  $\mu$ l Enzym-Mastermix sowie ein weiteres *well* mit 10  $\mu$ l *mock* Mastermix versetzt und die Proben für 1 h bei 37°C inkubiert. Der Enzym-Mastermix bestand aus 5  $\mu$ l MTase Glo 4x Reaction Buffer, 2  $\mu$ l SAM (100  $\mu$ M), 0,2  $\mu$ l VMTr1 und 2,8  $\mu$ l Wasser. Der *mock* Mastermix war von identischer Zusammensetzung, aber ohne Methyltransferase.

Anschließend wurde je *well* 5  $\mu$ l 5x MTase Glo reagent (Promega) zugegeben. Nach 60 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde 25  $\mu$ l MTa-Glo Detection Solution (Promega) zugegeben und weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, danach wurden 45  $\mu$ l der Proben in eine LumiTrack-200 96-*well*-Platte übertragen und die Lumineszenz im EnVision 2104 Multilabel reader eingelesen.

### **3.2.6.7. Terminator-Nuklease-Behandlung zellulärer RNA**

Der Großteil (ca. 80%) der zellulären RNA besteht aus ribosomaler RNA (J. Wu et al., 2014). rRNA weist ein 5'-Monophosphat auf und kann durch die Behandlung mit Terminator-5'-Phosphat-abhängiger Exonuklease (Epicentre) aus RNA-Präparationen entfernt werden. Eine Terminator-Behandlung der RNA erhöht die Konzentration gecappter RNA-Spezies in einer RNA-Präparation.

10  $\mu$ g RNA wurde nach Herstellerangaben mit Terminator-Nuklease verdaut (30 min bei 37°C), die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml TRIzol beendet und die RNA wie in Kapitel 3.2.6.2 beschrieben aufgereinigt.

### **3.2.6.8. Generierung von m7G-gecappten RNA-Oligonukleotiden**

Um m7G-gecappte RNA-Oligonukleotide herzustellen, wurden 5'-triphosphorylierte (5'ppp) RNA-Oligonukleotide (Kapitel 3.1.7.5) enzymatisch mit dem Vaccinia Capping Enzym (NEB) nach Herstellerangaben gecappt. Nach Abschluss der Reaktion wurde die RNA durch TRIzol-Aufreinigung (Kapitel 3.2.6.2) präpariert.

### **3.2.6.9. Generierung von Cap0- und Cap1-modifizierter Reporter-mRNA**

Im Rahmen einer Kooperation wurden von der Firma Trilink Bioscience Reagenzien zur *in vitro* Produktion von Cap0- und Cap1-modifizierter mRNA bereitgestellt (CleanCap). Die CleanCap Technologie beruht auf einem Cap0- oder Cap1-modifiziertem Dinukleotid (m7GpppAG oder m7GpppAmG), welches kotranskriptional in *in vitro* Transkripte (IVT) integriert werden kann. Im Gegensatz zum enzymatischen Capping oder der Verwendung von Cap-Analogen kann so mit hoher

Effizienz Reporter-mRNA mit nativen Cap-Strukturen mit definiertem Methylierungsstatus generiert werden.

Es wurde Cap0- und Cap1-modifizierte Reporter-mRNA generiert, die für Renilla-Luciferase und Firefly-Luciferase kodieren. Die entsprechenden DNA-Templates wurden von TriLink Bioscience gestellt.

Die Reaktion wurde in 50 µl Ansätzen auf Eis vorbereitet, die Reagenzien wurden in folgender Reihenfolge zugegeben: 10,25 µl Wasser, 2,5 µl ATP (100 mM), 2,5 µl CTP (100 mM), 2,5 µl GTP (100 mM), 2,5 µl UTP (100 mM) und 5 µl 10 x Transcription Buffer. Der Ansatz wurde durch Pipettieren gemischt und 2 µl Cap0 oder Cap1 CleanCap-Dinukleotid (100 mM) und 12,5 µl DNA Template (100 ng/µl) zugegeben. Nach erneutem Mischen wurden 1,25 µl muriner RNase-Inhibitor (NEB), 1 µl Yeast Inorganic Pyrophosphatase (NEB) und 8 µl T7 RNA Polymerase (NEB) zugegeben. Der Ansatz wurde 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend in 1 ml TRIzol aufgenommen und wie in Kapitel 3.2.6.2 beschrieben aufgereinigt. Konzentration und Reinheit wurden photospektrometrisch im Nanodrop bestimmt. Die Reporter mRNA wurde durch analytische Agarose-Gelelektrophorese analysiert und zeigt spezifische Produkte in der korrekten Größe, ohne Anzeichen von Degradation oder kontaminierenden Nebenprodukten.

### **3.2.7. Transkriptomanalyse (RNA-Seq)**

Zur Transkriptomanalyse durch RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) wurden neben der Gesamt-RNA (total-RNA) auch neusynthetisierte RNA (4sU-RNA) durch kotranskriptionale Markierung der RNA mit 4-Thiouridin (4sU) präpariert. 4sU-RNA und total-RNA wurde aus wt-HEK293T-Zellen, sowie aus den CMTr1-defizienten Zellen (CMTr1-KO#1, CMTr1-KO#2) und den durch pRp-CMTr1 rekonstituierten Zelllinien (CMTr1-KO#1-pRp-CMTr1 und CMTr1-KO#2-pRp-CMTr1) isoliert und durch RNA-Seq analysiert.

Die Zellen wurden 2 d vor der 4sU-Markierung in 15 cm Zellkulturschalen ausgesät. Die eingesetzte Zellzahl wurde je nach Wachstumsgeschwindigkeit der jeweiligen Zelllinie angepasst, um zu Beginn der 4sU-Markierung eine Zelldichte zwischen 50 und 75% zu gewährleisten. Die Zellen wurden mit einer finalen Konzentration von 500 µM 4sU (Carbosynth) versetzt und für 1 h im Zellkulturinkubator bei 37°C inkubiert. Das 4sU-haltige Medium wurde anschließend vollständig abgenommen und die Zellen durch Zugaben von 7,5 ml TRIzol lysiert. Zur vollständigen Lyse wurde wiederholt mit einer Pipette resuspendiert, das Lysat dann für 5 min bei RT inkubiert

und anschließend in 15 ml Reaktionsgefäße überführt, erneut resuspendiert und bei -80°C eingelagert.

Die weitere Probenvorbereitung für die Transkriptomanalyse (RNA-Seq) wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Lars Dölken (Institut für Virologie und Immunbiologie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg) von Thomas Henning nach deren internen Protokoll ausgeführt (Dölken et al., 2008; Rutkowski et al., 2015):

Die RNA wurde nach Herstellerangaben aus dem TRIzol aufgereinigt, ein Teil der aufgereinigten Gesamt-RNA wurde für die RNA-Seq abgenommen (total-RNA).

Zur Präparation der 4sU-RNA wurde zunächst die 4sU-haltige RNA einer Sulfhydryl-spezifischen Biotinylierung mit EZ-Link Biotin-HPDP (Pierce) unterzogen und anschließend durch Streptavidin-*beads* mit dem  $\mu$ MACS Streptavidin Kit (Miltenyi) aufgereinigt.

Die so präparierten 4sU-RNA- und total-RNA-Proben wurden durch den Sequenzierdienstleister BGI zur *library*-Produktion (BGI eukaryotic long non coding RNA sequencing, lncRNA library) aufbereitet und sequenziert (HiSeq 4000, 5PE100).

### 3.2.7.1. Analyse der Sequenzierdaten

Die Rohdaten des RNA-Seq wurden durch Prof. Dr. Caroline Friedel (Lehr- und Forschungseinheit Bioinformatik, Institut für Informatik, Ludwig-Maximilians-Universität München) ausgewertet.

Die differentiellen Genexpressionsanalysen wurden mit DESeq2 durchgeführt (Love et al., 2014). Dabei wurden nur Transkripte berücksichtigt, die in beiden der zu vergleichenden Konditionen mindestens 25 *reads* aufwiesen.

Zur Ermittlung von differentiellen, alternativen Spleißevents wurde eine Analyse der differentiellen Exon-Expression durch DEXSeq durchgeführt (Anders et al., 2012).

Die Effizienz der Spleißreaktion einzelner Zelllinien und Konditionen wurde durch Ermittlung des globalen „Splicing index“ quantifiziert. Dazu werden die die Spleißstelle überspannenden *reads* zunächst, basierend auf deren Sequenzinformation, in „Exon-Exon“ *reads* (welche eine abgeschlossene Spleißreaktion der RNA anzeigen) und „Exon-Intron“ *reads* (welche unprozessierte Spleißstellen in der RNA anzeigen) eingeteilt. Der Splicing index wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Splicing index} = \frac{\text{reads}(\text{Exon-Exon})}{\text{reads}(\text{Exon-Exon}) + \text{reads}(\text{Exon-Intron})}$$

Der gemittelte Splicing index aller Spleißstellen eines Gens ergab den Splicing index des Gens, von welchem der Durchschnitt über die Replikate ermittelt wurde. Der globale Splicing index der Zelllinie ergibt sich wiederum aus dem Mittelwert des Splicing index aller gemessenen Gene.

Zur Analyse der Transkriptstabilitäten wurden für alle detektierten Transkripte der Quotient der Transkriptexpression in FPKM (*fragments per kilobase of exon model per million reads mapped*) zwischen neusynthetisierter RNA (4sU) und Gesamt-RNA (total) gebildet. Der Mittelwert der Replikate wurde gebildet und zum Vergleich der Transkriptstabilitäten zwischen verschiedenen Zelllinien die 4sU/total–Quotienten aller detektierten Transkripte gegeneinander aufgetragen.

Basierend auf den von Prof. Dr. Caroline Friedel erstellten differentiellen Genexpressionsanalysen wurden weitere, eigene Analysen durchgeführt:

Durch GO Enrichment wurde analysiert, welche Klassen von Genen zwischen CMTr1-defizienten und CMTr1-kompetenten Zellen differentiell exprimiert werden. Dazu wurde eine Liste von Transkripten, die als differentiell exprimiert definiert wurden, mittels der PANTHER Webapplikation (Overrepresentation Test, <http://pantherdb.org>) analysiert.

Volcanoplots wurden mit dem Programm R (R Version 3.6.1) mit dem grafischen Interface R Studio (Version 1.0) und ggplot2 erstellt.

### **3.2.8. Proteomanalyse**

Die Arbeitsgruppe von Prof. Andreas Pichlmair führte für dieses Projekt eine Proteomanalyse zwischen CMTr1-kompetenten und CMTr1-defizienten Zellen durch. Die differentiellen Proteinlevel zwischen den Zelllinien CMTr1-KO#2-pRp-CMTr1 und CMTr1-KO#2 wurden durch Massenspektrometrie mit *label free quantification* (LFQ) nach einem internen Protokoll durchgeführt.

$3 \times 10^5$  Zellen wurden in technischen Tetraplikaten in 6-*well*-Platten ausgesät, nach 24 h wurden die Zellkulturplatten zweimalig mit eiskaltem PBS gewaschen. Die weiteren Schritte erfolgten bei 0°C. Der Zellrasen wurde nach Zugabe von 1 ml PBS durch mehrmaliges Pipettieren abgelöst und durch Zentrifugation bei 500 rpm für 5min in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß pelletiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurde das Zellpellet in flüssigem Stickstoff eingefroren und zur Massenspektrometrieanalyse verschickt. Die Analyse wurde von Alexey Stukalov (AG Pichlmair, Institut für Virologie, TU München) durchgeführt.

Der Volcanoplot wurden mit dem Programm R (R Version 3.6.1) mit dem grafischen Interface R Studio (Version 1.0) und ggplot2 erstellt.

### 3.2.9. Polysomen-Profil-Analyse

Durch die Erstellung eines Polysomen-Profiles kann die Translationsaktivität von Zellen beurteilt werden (Ingolia et al., 2009, 2011, 2019). Die Technik beruht auf der Auftrennung eines zytosolischen Zelllysates durch Ultrazentrifugation durch einen Saccharose-Dichtegradienten und anschließender Detektion von RNA und Translationskomplexen.

Polysomen-Gradientenpuffer mit 10%, 20%, 30%, 40% und 50% Saccharose wurden vorbereitet und auf Eis gelagert. Das Ultrazentrifugationsröhrchen wurde auf Trockeneis gestellt und beginnend mit 50% Saccharose wurde schrittweise je 2ml Saccharose-Puffer hineinpipettiert. Dabei wurde nach jedem Schritt gewartet, bis der Gradient vollständig gefroren war. Die Gradienten wurden bei -80°C gelagert. 24 h vor Verwendung wurden die Gradienten bei 4°C aufgetaut und inkubiert, damit sich ein gleichmäßiger Gradient ausbilden konnte.

$2 \times 10^7$  Zellen wurden durch Pipettieren vereinzelt und mit eiskaltem PBS mit 100 µg/ml Cycloheximid gewaschen und durch Zentrifugation bei 500 rpm und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und die Zellen in 1ml Polysomen-Lysepuffer aufgenommen, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 4°C für 30 min auf dem Taumelrollenschüttler inkubiert. Durch Zentrifugation für 8 min bei 1.300 RCF und 4°C wurden Zellkerne und größere Zelltrümmer pelletiert. Der auf diese Weise gereinigte Überstand wurde abgenommen und vorsichtig auf die vorbereiteten Saccharosegradienten überschichtet. Die Gradienten wurden in der Ultrazentrifuge mit SW41 Ti Rotor für 100 min bei 35.000 rcf zentrifugiert. Die Gradienten wurden in den Fraktionator (Brandel) geladen und der Gradient durch Einleiten von Polyribosomen-Chase-Lösung verdrängt und durch den UV-Detektor der FPLC geleitet. Während des Laufes wurde die UV-Absorption bei 254nm wurde mit dem Programm UNICORN aufgenommen.

### 3.2.10. Durchflusszytometrie (FACS)

Durch Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting* (FACS)) kann die Größe, Granularität und Proteinenexpression von Zellen analysiert werden. Die Zellen passieren einen Lichtstrahl und erzeugen spezifische Signale, die durch Detektoren gemessen werden. Das Signal des Vorwärtsstreuung (*forward scatter*



(FSC)) korreliert mit der Größe der Zelle, während das Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter* (SSC)) von der Granularität der Zelle abhängt. Im FACS kann auch die Fluoreszenzintensität von Zellen, die entweder Fluoreszenzproteine wie GFP exprimieren, mit Fluoreszenzfarbstoffen inkubiert oder mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gefärbt wurden, gemessen werden.

Die Messungen wurden mit LSR II (BD) durchgeführt und mit dem Programm FlowJo 8.7 analysiert. Vor der Messung wurden die Zellen einmalig mit PBS gewaschen und in MACS Puffer aufgenommen und auf Eis gelagert. Für die Analyse wurden im FSC und SSC die die Population von intakten Einzelzellen ausgewählt, Zellfragmente wurden ausgeschlossen.

#### **3.2.10.1. Zellzyklusanalyse durch FACS**

Im Laufe des Zellzyklus müssen Zellen ihren Chromosomensatz verdoppeln. Durch interkalierende DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe wie Propidiumiodid (PI) können im FACS Zellzyklusphasen anhand des DNA-Gehalts der Zellen unterschieden werden.

$1-5 \times 10^5$  Zellen wurden vereinzelt, einmal mit PBS gewaschen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 400 RCF pelletiert und zweimal mit MACS Puffer gewaschen. Die Zellen wurden erneut pelletiert und in 100  $\mu$ l MACS Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 1 ml eiskaltem 100% Ethanol wurden die Ansätze sofort durch mehrmaliges Invertieren vermischt und für mindestens 16 h bei 4°C inkubiert. Die durch Ethanol fixierten Zellen wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 800 RCF zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml MACS Puffer resuspendiert und erneut durch Zentrifugation pelletiert. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt, danach wurde das Pellet in 100  $\mu$ l MACS Puffer mit 100  $\mu$ g/ml RNase A und 10  $\mu$ g/ml PI resuspendiert und für 30 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde im FACS die Fluoreszenzintensität des PI Kanals gemessen.

#### **3.2.11. Statistik**

Bei qPCR-Versuchen, allen Techniken zur Quantifikation der Zytokinproduktion, MTT-Assay und Versuchen mit mRNA-Reportern (CleanCap) wurden technische Duplikate eingemessen und deren Mittelwert für die Auswertung genutzt. Die statistische Analyse beruhte auf den biologischen Replikaten und wurde mit GraphPad Prism oder Excel durchgeführt.

Zum Vergleich eines Parameters zwischen verschiedenen Konditionen (z.B. Vergleich von verschiedenen KO-Zellen mit wt-Zellen, oder Vergleich von verschiedenen Behandlungen mit der unbehandelten Kondition innerhalb einer Zelllinie) wurden eine einfache Varianzanalyse (1-way Anova) verwendet.

Zum Vergleich zweier Parameter – beispielsweise dem Vergleich der Effekte einer Behandlung zwischen zwei Zelllinien – wurde die zweifache Varianzanalyse (2-way Anova) verwendet. Bei multiplen Varianztests wurde ein Post-hoc-Test nach Tukey bzw. Bonferroni durchgeführt. Die Signifikanzwerte (p-Werte) werden in Abbildungen durch folgende Notation dargestellt:

pWert Notation	Bedeutung und Wertebereich
ns	nicht signifikant, p-Wert >0,05
*	signifikant, p-Wert $\leq 0,05$
**	signifikant, p-Wert $\leq 0,01$
***	signifikant, p-Wert $\leq 0,001$
****	signifikant, p-Wert $\leq 0,0001$

## 4. Ergebnisse

### 4.1. CMTr1 ist ein konditional essentielles Gen

Um die biologische Bedeutung der N1-2´O-Methylierung für die Zellphysiologie untersuchen zu können, sollten zunächst CMTr1-Knockout (KO) Zelllinien hergestellt werden. Da die Generierung von Cap1 durch CMTr1 ein evolutionär konservierter Bestandteil der mRNA-Prozessierungsmaschinerie ist, bestand die Möglichkeit, dass das Ausschalten von CMTr1 zu einem letalen Phänotyp führen und somit die Generierung lebensfähiger KO-Zellen verhindert werden könnte.

Die Bedeutung einzelner Gene für das Zellüberleben lässt sich durch Gen-Inaktivierungs-Experimente, typischerweise durch die Analyse der Effekte von genomweiten CRISPR- und RNAi-Bibliotheken, einschätzen. Ist der Knockout oder Knockdown eines Gens letal, gilt das Gen als essentiell. Essentielle Gene sind besonders häufig an fundamentalen Prozessen wie der Replikation, Transkription und Translation beteiligt (T. Wang et al., 2015). Die Definition essentieller Gene wird dadurch erschwert, dass die meisten Gene konditional essentiell sind, also abhängig von Zelltyp, experimentellem Aufbau oder der Behandlung notwendig für das Überleben der Zelle sind.

Mithilfe der Datenbank *Online Gene Essentiality* wurden Informationen aus publizierten Datensätzen über die Essentialität der an der mRNA-Cap-Synthese beteiligten Enzyme (CE, RNMT, CMTr1, CAPAM und CMTr2) im humanen System in Tabelle 1 zusammengestellt (W.-H. Chen et al., 2017). Die Datensätze wurden, je nach verwendeter Methodik, in CRISPR/Cas9- und RNAi-basierende Ansätze unterteilt. Analysen deuten darauf hin, dass CRISPR/Cas9-basierte Ansätze bei der Identifikation von essentiellen Genen RNAi-basierten Ansätzen generell überlegen sind (Evers et al., 2016; T. Wang et al., 2015).

Die an der Cap0-Herstellung beteiligten Enzyme CE und RNMT werden in 7 von 8 Datensätzen als essentiell definiert. Auch das für die Cap1-Herstellung benötigte CMTr1 wird mehrheitlich als essentiell bewertet (5/8 Datensätze), CMTr1 kann also als konditional essentielles Gen gelten.

Die Cap2-Methyltransferase CMTr2 und die m6Am-Methyltransferase CAPAM werden vorwiegend als nicht essentielle Gene identifiziert (2/7 bzw. 0/8 Datensätze).

Proteinname	Genname	Funktion	Datensätze (essentiell/ gesamt)		
			RNAi-basierte Screens	CRISPR/Cas9-basierte Screens	alle Screens
<b>CE</b>	RNGTT	G-Capping	2/3	5/5	<b>7/8</b>
<b>RNMT</b>	RNMT	m7-Methyltransferase	2/3	5/5	<b>7/8</b>
<b>CMTr1</b>	FTSJD2	N1-2'O-Methyltransferase	2/4	3/4	<b>5/8</b>
<b>CAPAM</b>	PCIF1	m6Am-Methyltransferase	0/3	0/5	<b>0/8</b>
<b>CMTr2</b>	FTSJD2	N2 2'O-Methyltransferase	1/3	1/4	<b>2/7</b>

Tabelle 1: Analyse der Essentialität von an der Cap-Generierung beteiligten Genen

Metaanalyse der Gen-Essentialität der an der Cap-Generierung beteiligten Gene aus publizierten Datensätzen (OGEE (<http://ogee.medgenius.info>)). Angegeben sind Protein- und Gennamen sowie Funktion des Gens sowie die Zahl und Art der Datensätze (Screens), in denen das entsprechende Enzym als essentielles Gen identifiziert wurde (essentiell) bzw. die Gesamtzahl der Datensätze, in denen das Gen untersucht wurde (gesamt).

## 4.2. Generierung humaner CMTr1-Knockout-Zelllinien

Die KO-Zelllinien wurden durch CRISPR/Cas9-Technologie hergestellt. Die Zielzellen wurden mit einem Plasmid, welches Cas9 und eine genspezifische guideRNA exprimiert, transfiziert; anschließend wurden durch Einzelzellklone generiert und charakterisiert.

In HEK293T-Zellen konnten zwei CMTr1-KO-Einzelzellklone (CMTr1-KO#1 und CMTr1-KO#2) generiert werden. Der Verlust der CMTr1-Expression wurde durch Westernblot und Sanger-Sequenzierung validiert (Daten nicht gezeigt).

In anderen getesteten Zelllinien (HeLa, Flp-In T-Rex 293 und THP-1) konnten keine CMTr1-KO-Einzelzellklone generiert werden. Da in diesen Zelllinien aber heterozygote Einzelzellklone, mit einem editierten und einem intakten Allel des CMTr1-Gens isoliert werden konnten, ist anzunehmen, dass das verwendete Protokoll zwar initial zu einer effizienten Genom-Editierung führt, der Verlust von CMTr1 auf beiden Allelen in diesen Zelllinien jedoch letal ist.

Weiterhin wurde in den HEK293T-CMTr1-KO-Zellen – als Kontrolle für mögliche Klon-spezifische Effekte – die Expression von CMTr1 durch einen retroviralen Vektor (pRp-CMTr1) wieder rekonstituiert. Da die Transgene durch retrovirale Vektoren stark und konstitutiv exprimiert werden, wurden als zusätzliche Kontrolle außerdem HEK293T-wt-Zellen mit pRp-CMTr1 transduziert, um mögliche Effekte der CMTr1-Transgen-Überexpression ausschließen zu können.

IFIT1 ist ein antivirales Effektorprotein, welches virale RNA mit hypomethylierten Cap-Strukturen wie Cap0 bindet und ihre Translation inhibiert (Kapitel 2.4.3).

IFIT1 weist in unbehandelten Zellen eine sehr geringe basale Expression auf und wird durch Typ-I-IFN stark induziert. Um den Einfluss von IFIT1 auf CMTr1-defiziente Zellen zu überprüfen, wurden zusätzliche Zelllinien generiert: IFIT1 wurde sowohl in HEK293T-wt-Zellen als auch in CMTr1-KO#1 und -#2 mittels CRISPR/Cas9 ausgeknockt. Zellen, in denen sowohl CMTr1 als auch IFIT1 deletiert sind werden im Folgenden als CMTr1/IFIT1 Doppel-Knockout (DKO) bezeichnet.

In Abbildung 7 sind alle generierten Zelllinien zusammengestellt. Basierend auf dem Genotyp werden die Zellen in Text und Abbildungen teilweise in Gruppen zusammengefasst, beispielsweise „CMTr1-defiziente Zellen“ (bestehend aus CMTr1-KO#1 und #2, CMTr1/IFIT1-DKO#1.1, #1.2, #2.1 und #2.2) und „CMTr1-kompetente Zellen“ (wt, IFIT-KO#1 und #2, wt-pRp-CMTr1, CMTr1-KO#1/#2 pRp-CMTr1). Sofern nicht explizit anders angegeben, wurden stets diese HEK293T-basierten Zelllinien genutzt.

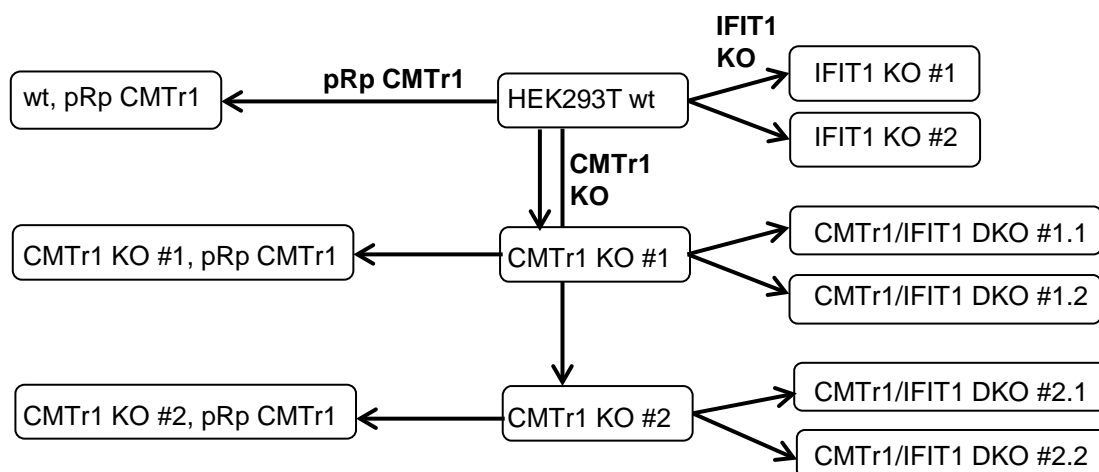


Abbildung 7: Generierte Zelllinien.

Alle in dieser Arbeit generierten Zelllinien stammen von der Zelllinie HEK293T (HEK293T Wildtyp (wt)) ab. Durch CRISPR/Cas9 wurden CMTr1- und IFIT1-KO-Zellen generiert. Durch Transduktion mit dem retroviralen Vektor pRp-CMTr1 wurden Zellen generiert, die CMTr1 als Transgen überexprimieren.

### 4.3. Die endogene mRNA von CMTr1-KO-Zellen ist Cap0-modifiziert

Es sollte überprüft werden, ob die endogene mRNA in CMTr1-defizienten Zellen am ersten Nukleotid (N1) nicht 2´O-methyliert ist, also nicht Cap1-, sondern Cap0-modifiziert ist. Es wurde ein *in vitro* Assay etabliert, um den Cap-Methylierungsstatus der Zelllinien zu ermitteln (MTase-Glo).

Der MTase-Glo Assay weist durch eine Kaskade enzymatischer Schritte Cap0-modifizierte RNAs nach, indem die Methylierung von Cap0-RNA durch rekombinante Cap-Methyltransferase des Vaccinia-Virus (VMTr) (NEB) anhand des Umsatzes des Methyl donor S-Adenosyl-Methionin (SAM) gemessen wird (Hsiao et al., 2016). Die Funktionsweise des Assays ist in Abbildung 8A schematisch dargestellt.

Der Assay wurde zunächst mit kurzen synthetischen RNA-Oligonukleotiden validiert (Abbildung 8B). m7G-gecappte RNA, die am ersten Nukleotid (N1) unmethyliert ist, erzeugt einen hohen SAM-Umsatz. Ungecappte oder N1-2´O-methylierte RNA hingegen erzeugt kein Signal. Die Signalstärke ist vom 2´O-Methylierungsstatus des zweiten Nukleotides (N2) unabhängig (Abbildung 8B).

Als nächstes wurde der Methylierungsstatus der RNA bestimmt, die aus wt-, CMTr1-KO- und pRp-CMTr1-Zellen extrahiert wurde. RNA aus CMTr1-KO-Zellen zeigte einen signifikant höheren, VMTr-abhängigen SAM-Verbrauch im Vergleich zu den anderen getesteten RNA-Extrakten (Abbildung 8C).

Durch die Behandlung mit Terminator-Exonuklease können gecappte RNA-Spezies angereichert werden, indem die abundante, 5´p-modifizierte rRNA enzymatisch aus der RNA-Präparation entfernt wird. Auf diese Weise vorbehandelte RNA aus wt-, CMTr1-KO- und rekonstituierten Zellen wurde im MTase-Glo Assay getestet. Die RNA aus den CMTr1-KO-Zellen generierte, verglichen mit den anderen RNA-Extrakten, ein signifikant höheres Signal (Abbildung 8D).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass die endogene RNA in CMTr1-KO-Zellen nicht Cap1, sondern Cap0-modifiziert ist. Die Rekonstitution dieser Zellen mit dem retroviralen Expressionsvektor pRp-CMTr1 war ausreichend, um die Cap1-Generierung wieder auf das Level von wt-Zellen anzuheben.

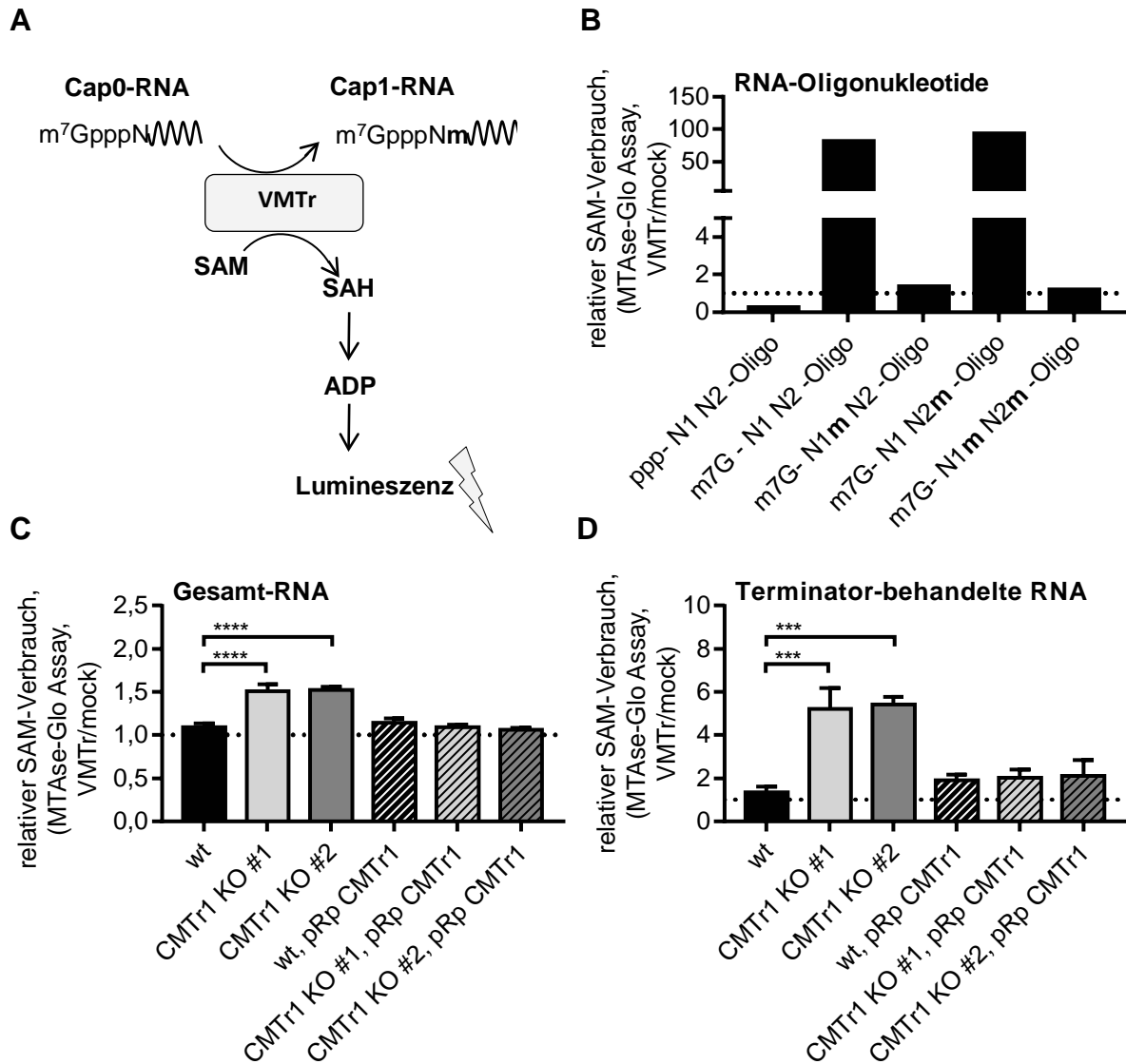


Abbildung 8: Bestimmung des Capmethylierungsstatus der endogenen RNA.

A) Schematische Darstellung des MTase-Glo Assay. Der Assay beruht auf der Substratspezifität von rekombinanter Methyltransferase (2'-O-MTr) für Cap0. Cap0 wird zu Cap1 methyliert, der Umsatz des Methylierungsdonors SAM wird durch MTase-Glo Assay system (Promega) durch Messung der relativen Lichteinheiten (RLU, relative light units) gemessen. B-D): Der relative SAM-Verbrauch wurde als Quotient der RLU der CMT1-Reaktion und der *mock*-Reaktion berechnet. B) MTase-Glo Assay mit 25 ng RNA-Oligonukleotiden (Oligo). Die Oligonukleotide weisen 5'ppp oder m7G-Cap auf und sind am ersten Nukleotid (N1), am zweiten Nukleotid (N2) oder an N1 und N2 unmethyliert oder 2'-O-methyliert (N1m bzw. N2m). C-D) MTase-Glo Assay mit 2000 ng Gesamt-RNA aus Zelllinien (C) beziehungsweise 500 ng Terminator-Exonuklease-behandelte RNA aus Zelllinien (D). Durch Terminator-Behandlung wird die abundante rRNA aus der RNA-Präparation depletiert (D). (B: repräsentatives Experiment; C+D: n=4, mean + SEM).

#### 4.4. CMTr1-KO-Zellen zeigen unabhängig von IFIT1 eine verlangsamte Proliferation und eine reduzierte Zellgröße

Im Folgenden wurden die generierten Zelllinien näher charakterisiert.

Die Zellwachstumskinetik der Zelllinien wurde durch einen MTT-Assay quantifiziert. Hierfür wurde bei unbehandelten Zellen an verschiedenen Zeitpunkten die metabolische Aktivität als Surrogatparameter für die Gesamtzahl der viablen Zellen im *well* gemessen. CMTr1-KO-Zellen und CMTr1/IFIT1-DKO-Zelllinien zeigten verglichen mit pRp-CMTr1-rekonstituierten, wt- und IFIT1-KO-Zellen eine verlangsamte Proliferation (Abbildung 9). Dieser Effekt hängt nur vom CMTr1-Status der Zelle ab, nicht aber vom IFIT1-Status.

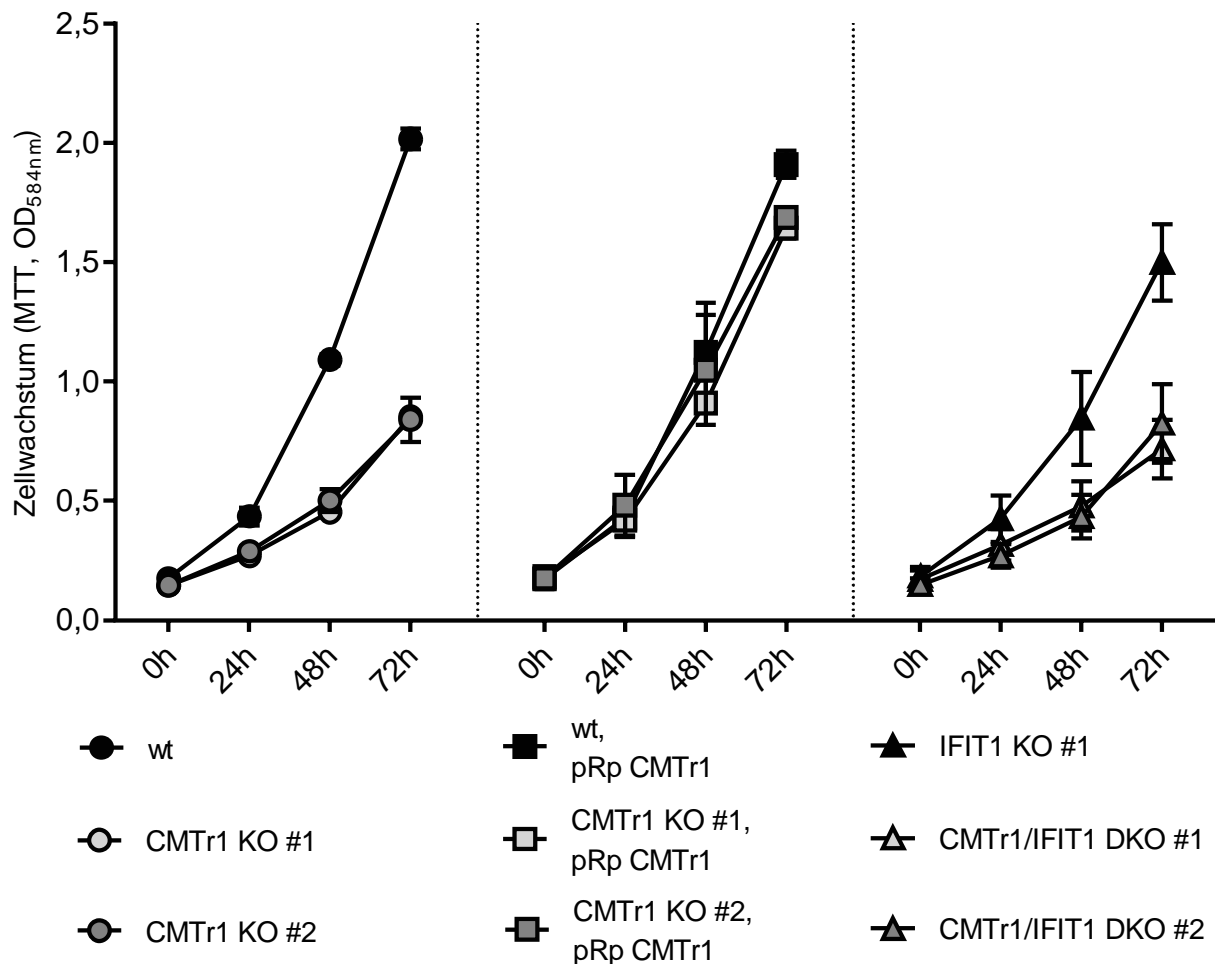


Abbildung 9: Messung der Zellproliferation.

In 96-*well* Platten wurden 5.000 Zellen/*well* ausgesät und nach 0 h, 24 h, 48 h und 72 h für je 1h mit MTT-Substrat versetzt, danach wurde die Reaktion abgestoppt. Der Umsatz von MTT wurde durch Messung von OD<sub>584nm</sub> quantifiziert (n=5, Mittelwert + SEM).



Durchflusszytometrische Untersuchungen mit einem Lebend/Tot-Farbstoff ergaben keine Unterschiede bei der Viabilität zwischen den Zelllinien (Daten nicht gezeigt). Es zeigte sich jedoch eine verringerte Zellgröße der CMTr1-defizienten Zellen. Dies äußerte sich in einer Verschiebung der Zellpopulation innerhalb des FSC-A (*forward scatter-area*). FSC-A korreliert mit dem Durchmesser der Zelle und beschreibt die Streuung des Lichtes beim Durchtritt der Zelle durch den Detektor (Givan, 2013). Die Zellpopulation der Zelllinien CMTr1-KO#1 und -#2 sowie CMTr1/IFIT1-DKO#1 und -#2 weisen, verglichen mit den anderen Zelllinien, eine signifikant verringerte Zellgröße auf (Abbildung 10).

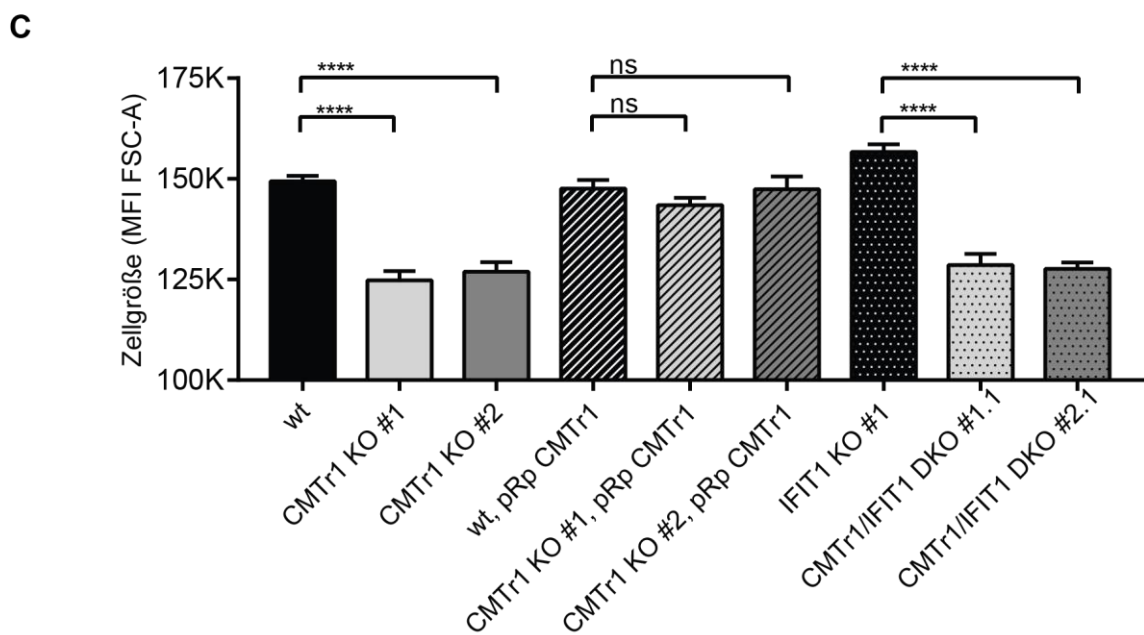
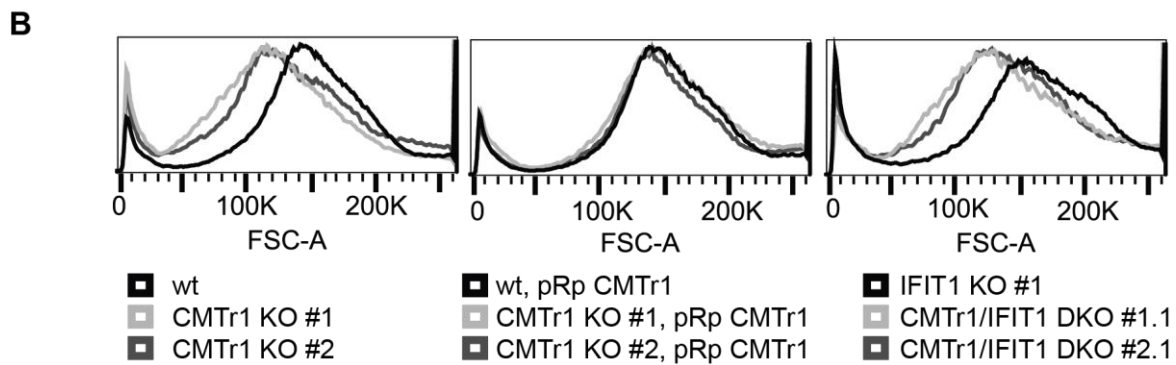
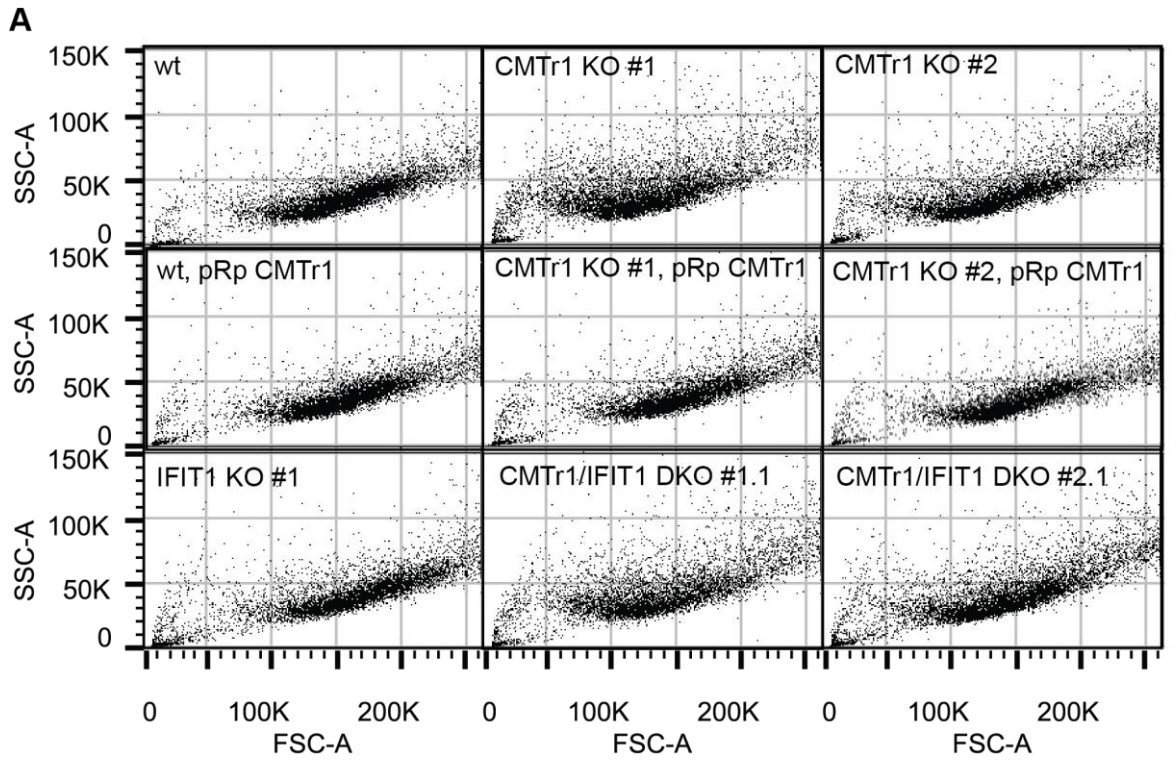


Abbildung 10: Durchflusszytometrische Analyse der Zellgröße.

Durchflusszytometrische Analyse von lebenden Zellen. Repräsentative Messungen von Zelllinien, dargestellt als Zellpopulation in SSC-A / FSC-A Scatterplots (A) und FSC-A Histogramm (B). C) Statistische Analyse der *mean fluorescence intensity* (MFI) von FSC-A (n=16, Mittelwert + SEM).

Da die beobachteten Unterschiede in der Wachstumskinetik und der Zellgröße auf eine Veränderung des Zellzyklus hindeuten könnten, wurde anschließend der Zellzyklus der generierten Zelllinien untersucht.

Verschiedene Zellzyklusphasen können anhand des DNA-Gehalts der Zelle im Durchflusszytometer durch DNA-färbende Farbstoffe wie Propidiumiodid (PI) unterschieden werden. Zellen weisen in der G1-Phase einen doppelten Chromosomensatz (2N) auf, duplizieren ihr Genom in der S-Phase und weisen in der G2-Phase einen vierfachen Chromosomensatz (4N) auf. Nach der Zellteilung enthalten beide Tochterzellen schließlich wieder 2N (Alberts et al., 2014). Der Zellzyklus kann abhängig von äußeren Bedingungen an Kontrollpunkten beim Übergang von G1 zu S und von G2 in die Mitose arretiert werden. Dies führt zu Verschiebungen des Zellzyklusprofils im FACS (Kim & Sederstrom, 2015).

Es konnte keine Veränderung des Zellzyklusprofils in den getesteten Zelllinien festgestellt werden (Abbildung 11). Es ist bekannt, dass sich die Zellgröße während der Progression durch den Zellzyklus ändert (Björklund, 2019; Lloyd, 2013). In den getesteten Zelllinien korreliert die Zellgröße daher leicht mit dem DNA-Gehalt der Zelle (Abbildung 11A), Änderungen der Zellgröße in den getesteten Zellen ließen sich jedoch nicht auf Verschiebungen des Zellzyklusprofils zurückführen. CMTr1-defiziente Zellen waren, unabhängig von der Zellzyklusphase, von signifikant kleinerer Zellgröße. Dieser Effekt war unabhängig vom IFIT1-Status der Zelle (Abbildung 11B)

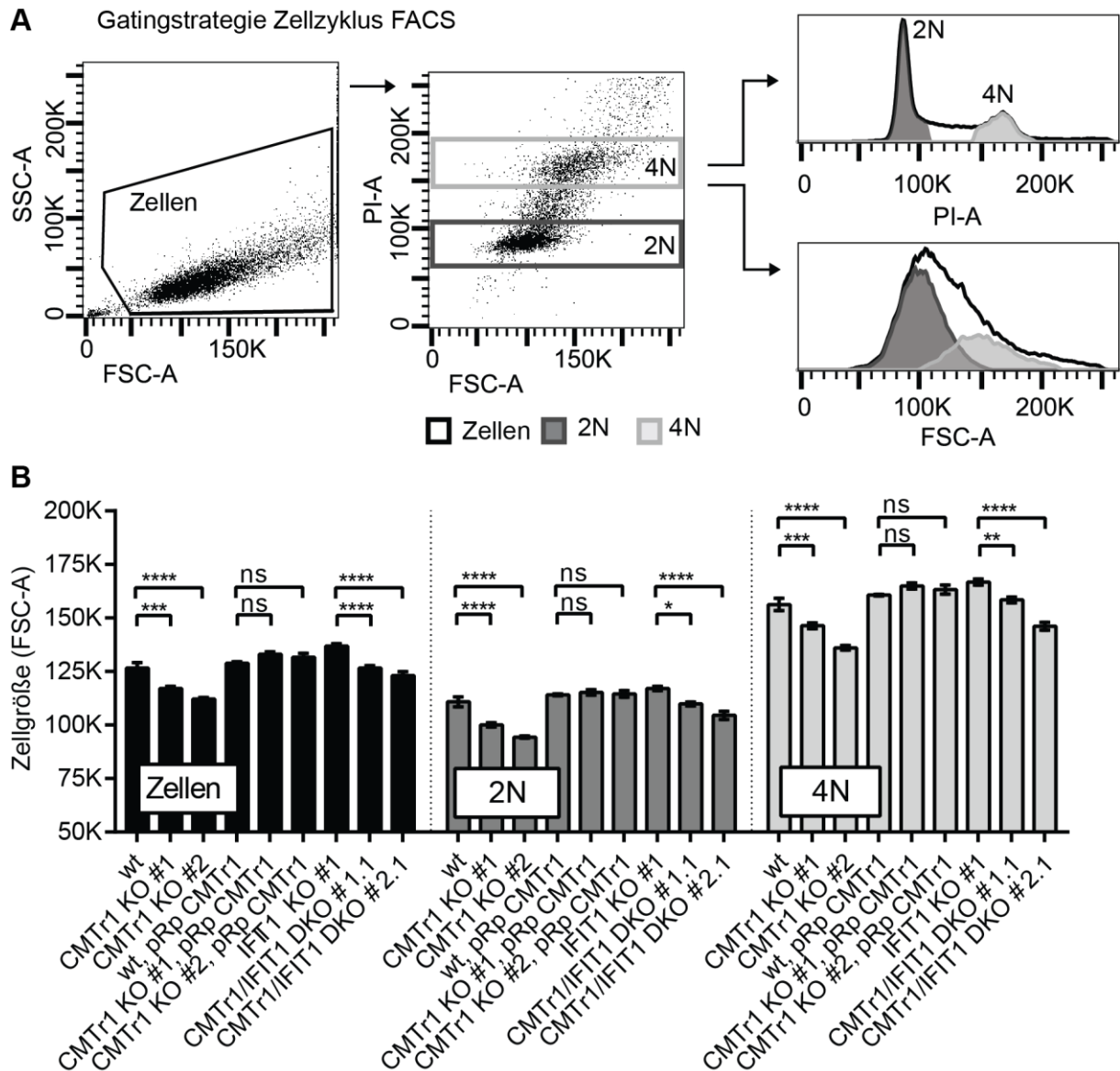


Abbildung 11: Durchflusszytometrische Analyse der Zellzyklusphasen und Zellgröße.

Zellen wurden mit Ethanol fixiert, die DNA mit Propidiumiodid (PI) angefärbt und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. A) Gating-Strategie, dargestellt für ein repräsentatives Experiment. Im FSC/SSC wurde die Population „Zellen“ definiert, innerhalb dieser Population wurden auf Basis der PI-Färbung die Populationen 4N und 2N definiert. B) Statistische Analyse der Zellgröße in *mean fluorescence intensity* (MFI) von FSC-A je Population (Zellen, 2N und 4N) (n=4, Mittelwert + SEM).

#### 4.5. IFN-abhängige Effekte in CMTr1-KO-Zellen werden durch IFIT1 vermittelt

Es wurde bereits gezeigt, dass die N1-2'-O-Methylierung eine wichtige Rolle im Kontext der antiviralen Immunantwort spielt. Virale RNA, die unvollständig methylierte Cap-Strukturen wie Cap0 aufweist, kann durch PRRs wie RIG-I erkannt und durch antivirale Effektorproteine wie IFIT1 gebunden und an der Translation gehindert werden.

Cap1 dient als molekulare Signatur endogener mRNA und schützt sie vor der Erkennung durch RIG-I und IFIT1 (Kapitel 2.4). Da die endogene mRNA von CMTr1-defizienten Zellen diese molekulare Signatur nicht besitzt, sollten die Zellen im Kontext einer antiviralen Immunantwort untersucht werden. Dazu wurden die Zellen mit Typ-I-Interferon (IFN) behandelt, wodurch u. a. die Expression der RNA-Rezeptoren RIG-I und IFIT1 induziert wurde und die Zellen so in einen antiviralen Zustand versetzt wurden.

Zunächst wurde der Effekt einer IFN-Behandlung auf die Viabilität der Zelllinien ermittelt. Das Wachstum und die metabolische Aktivität der Zelllinien wurden durch einen MTT-Assay bestimmt.

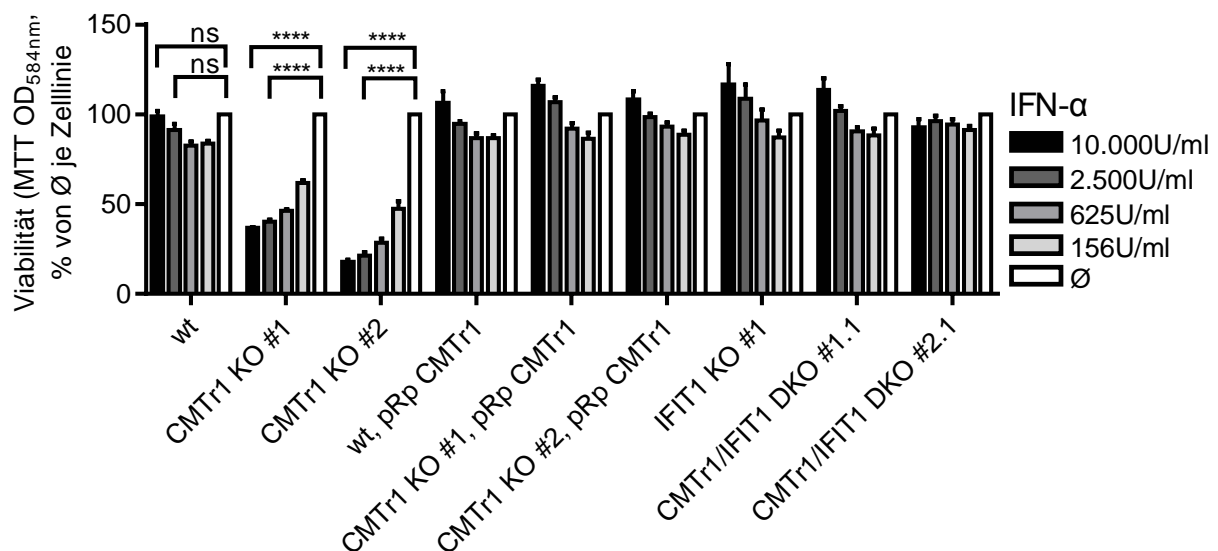


Abbildung 12: Messung der Viabilität nach IFN-Behandlung.

In 96-well-Platten wurden 5.000 Zellen/well ausgesät, mit verschiedenen Konzentrationen IFN-α behandelt und nach 7 d im MTT-Assay analysiert. Die OD<sub>584nm</sub> Werte sind in % der unbehandelten Kontrolle (Ø) je Zelllinie angegeben (n=6, Mittelwert + SEM).

7 Tage nach der IFN- $\alpha$ -Zugabe konnte eine signifikante, IFN-dosisabhängige Reduktion des MTT-Umsatzes in CMTr1-KO-Zellen gemessen werden (Abbildung 12). Dass dieser Effekt nur in den CMTr1-KO-Zellen, nicht aber in den CMTr1/IFIT1-DKO-Zellen beobachtet wurde, lässt auf einen IFIT1-vermittelten Effekt schließen.

Die Effekte von IFN- $\alpha$  auf die Zelllinien wurden zusätzlich im Kristallviolett-Assay bestimmt (Abbildung 13). Durch Kristallviolett, das vor allem die genomische DNA von fixierten Zellen anfärbt, kann der Bewuchs von Zellkulturplatten sichtbar gemacht werden. So kann die Kapazität von Einzelzellen, zu neuen Zellkolonien heranzuwachsen, dargestellt werden. Neben visueller Einschätzung der Kolonienzahl und -größe kann das gebundene Kristallviolett *in vitro* solubilisiert und als Parameter für die relative Zellzahl photometrisch quantifiziert werden (Franken et al., 2006).

Die Größe der einzelnen Kolonien ist in unbehandelten CMTr1-KO-Zellen und CMTr1/IFIT1-DKO-Zellen reduziert. Dies steht im Einklang zu der beobachteten reduzierten Wachstumskinetik von CMTr1-defizienten Zellen (siehe Kapitel 4.4). Die IFN-Behandlung reduziert die Größe der Kolonien in CMTr1-KO-Zellen zusätzlich. Bei CMTr1/IFIT1-DKO-Zellen ist dies jedoch nicht der Fall (Abbildung 13A).

Die Messung der photometrisch quantifizierten Kristallviolett-Absorption der unbehandelten Zellen zeigt eine im Vergleich zu den anderen Zelllinien signifikant reduzierte Zellzahl von CMTr1-KO- und CMTr1/IFIT1-DKO-Zellen (Abbildung 13B). Um den von IFN- $\alpha$  vermittelten Effekt zu quantifizieren, wurde je Zelllinie der Quotient der Kristallviolett-Absorption zwischen IFN-behandelten und unbehandelten Zellen gebildet. CMTr1-KO-Zellen zeigten, verglichen mit pRp-CMTr1 rekonstituierten Zellen und CMTr1/IFIT1-DKO-Zellen einen signifikanten, negativen Effekt von IFN- $\alpha$  auf die Zellzahl (Abbildung 13C).

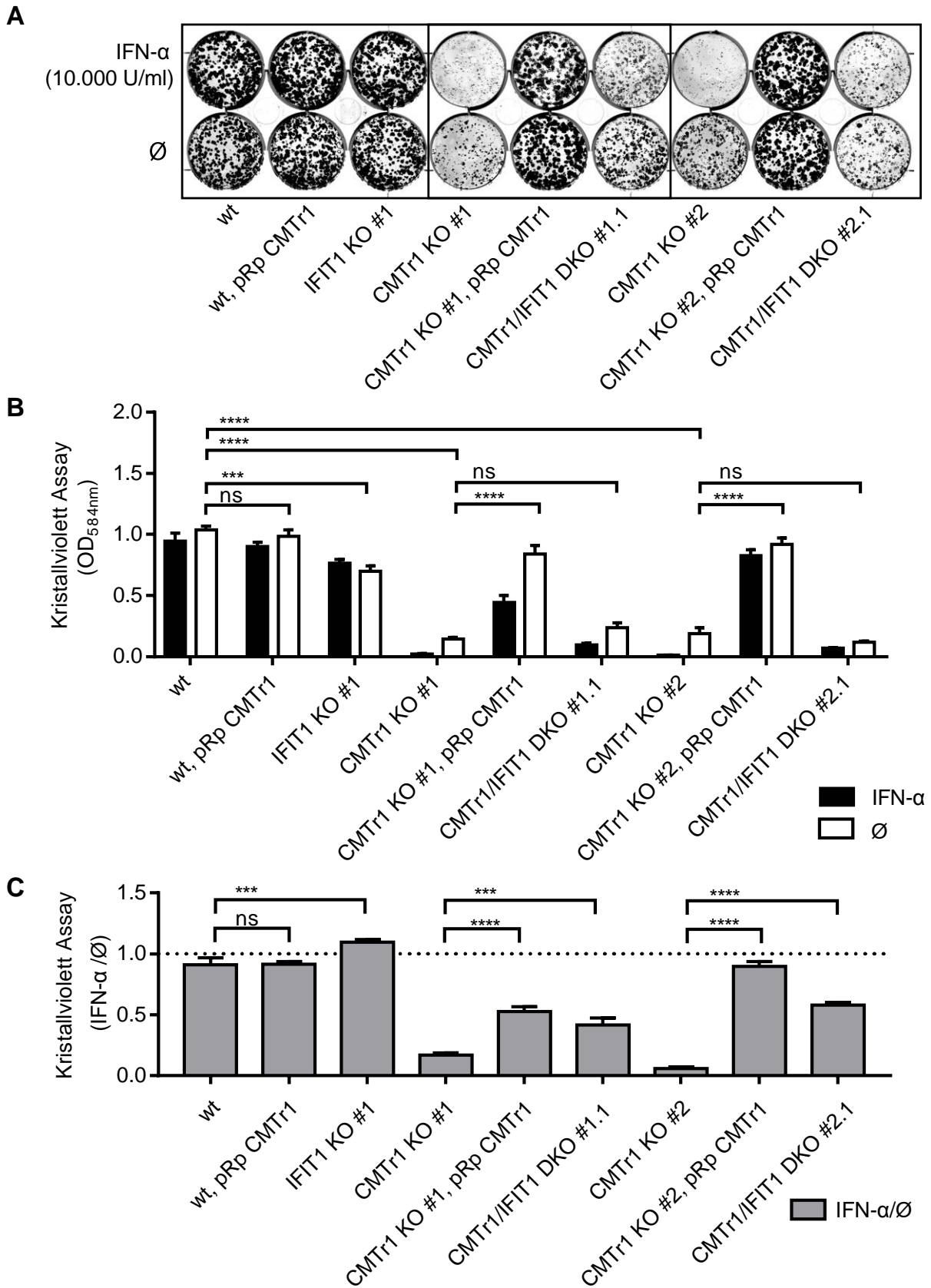


Abbildung 13: Kristallviolett-Assay.

In 6-well-Platten wurden 5.000 Zellen/well ausgesät. Die Zellen wurden unbehandelt gelassen (Ø) oder mit 10.000 U/ml IFN-α behandelt. Nach 10 Tagen wurde ein Kristallviolett-Assay durchgeführt (n=6, Mittelwert + SEM). A) Scan von einem repräsentativen Experiment

bei 700nm im Odyssey Fc. B) Photometrische Quantifizierung ( $OD_{584nm}$ ) des gelösten Kristallvioletts je *well* zur Bestimmung der relativen Zellzahl. C) Berechnung des IFN- $\alpha$ -vermittelten Effekts je Zelllinie (IFN- $\alpha/\emptyset$ ) basierend auf B (B+C: n=4, Mittelwert +SEM).

#### 4.6. IFIT1-abhängige Translationsinhibition in CMTr1-KO-Zellen

In den vorhergehenden Kapiteln wurde gezeigt, dass CMTr1-defiziente Zellen durch IFN- $\alpha$ -Behandlung in ihrem Wachstum inhibiert werden und dieser Effekt von IFIT1 abhängig ist. Da der Mechanismus von IFIT1 auf der Bindung an Cap0-modifizierte RNA und deren Translationsinhibition beruht (Kumar et al., 2014), wurden die Effekte von IFN-Behandlung auf die Translationsaktivität der Zelllinien untersucht.

Der SUnSET Assay ist eine nicht-radioaktive Methode zur Quantifizierung der globalen Translationsaktivität von Zellen. Der Assay beruht auf einer Inkubation der Zellen mit Puromycin, welches durch die Ribosomen in naszierende Polypeptide inkorporiert wird. Die Translationsaktivität wird anschließend durch die Quantifizierung der Puromycin-haltigen Polypeptide im Westernblot nachgewiesen (Goodman & Hornberger, 2013; E. K. Schmidt et al., 2009).

Die Zelllinien wurden für 72 h mit IFN- $\alpha$  behandelt, anschließend wurde die Translationsaktivität bestimmt (Abbildung 14). Die Translationsaktivität von CMTr1-KO-Zellen, nicht aber von wt, IFIT1-KO- und CMTr1/IFIT1-DKO-Zellen, wurde durch IFN- $\alpha$ -Behandlung dosisabhängig signifikant reduziert. Mit pRp-CMTr1 rekonstituierte Zellen wurden von der Analyse ausgeschlossen, da der retrovirale Vektor neben CMTr1 ein Puromycinresistenzgen in die Zellen einbringt, welches eine Analyse im SUnSET-Blot verhindert.

Die Daten zeigen, dass die Translationsaktivität von CMTr1-defizienten Zellen nach IFN- $\alpha$  Behandlung durch IFIT1 inhibiert wird.



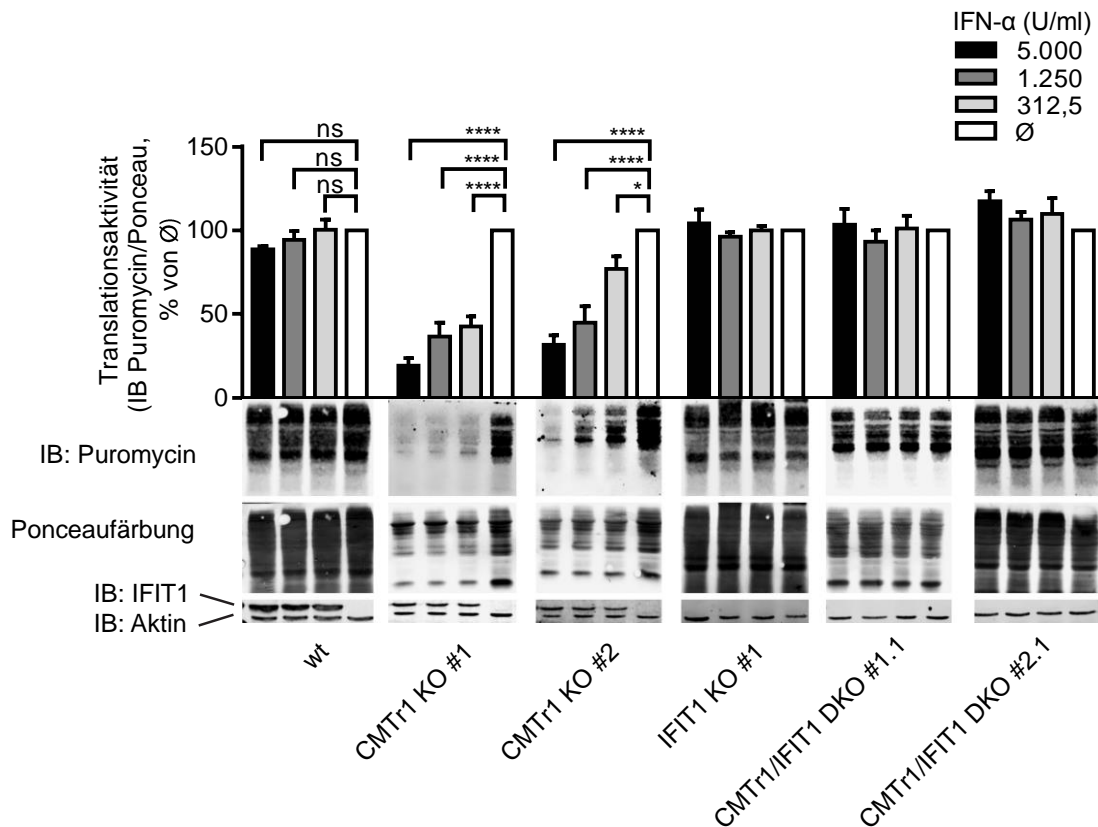


Abbildung 14: Bestimmung der globalen zellulären Translationsaktivität (SUnSET).

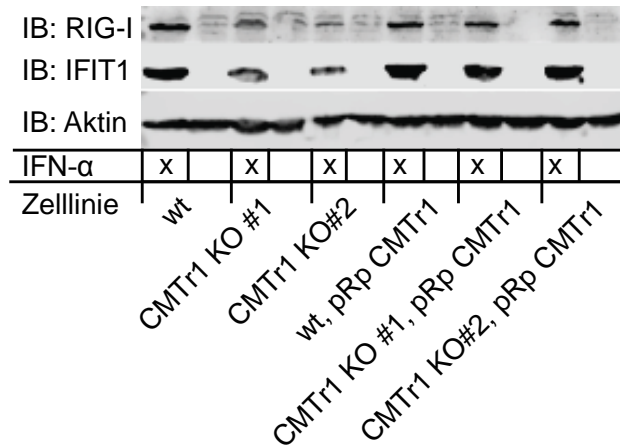
Die Zellen wurden für 72h mit IFN- $\alpha$  behandelt und im SUnSET-Assay analysiert. Die Translationsaktivität wurde als Quotient aus den Intensitäten des Puromycin-Immunooblots (IB) und der Ponceaufärbung berechnet (n=4, Mittelwert + SEM). Puromycin-, IFIT1- und Aktin-IB sowie Ponceaufärbung von einem repräsentativen Experiment.

#### 4.6.1. Die Induktion von IFIT1 und RIG-I nach IFN-Behandlung ist in CMT1-KO-Zellen reduziert

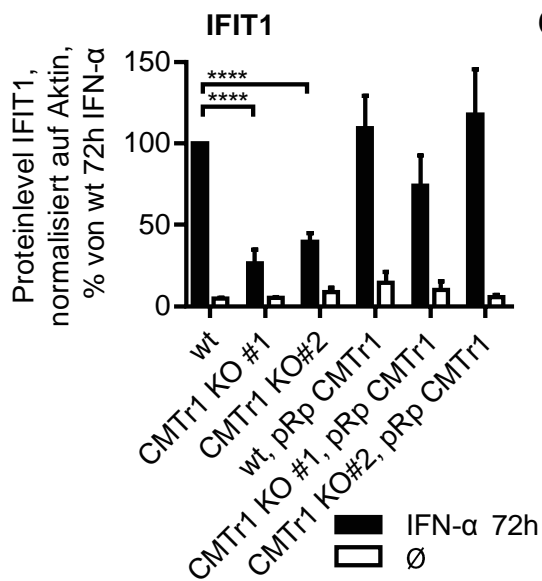
Nach der Untersuchung der Effekte von IFN- $\alpha$  auf die globale Translationsaktivität sollte die Induktion der Proteine RIG-I und IFIT1 in den Zelllinien analysiert werden.

Die Zellen wurden für 72 h mit IFN- $\alpha$  behandelt und anschließend durch Westernblot analysiert. Die Expression von IFIT1 und RIG-I nach IFN- $\alpha$ -Behandlung ist in CMT1-KO-Zellen verglichen mit wt-Zellen signifikant reduziert (Abbildung 15).

A



B



C

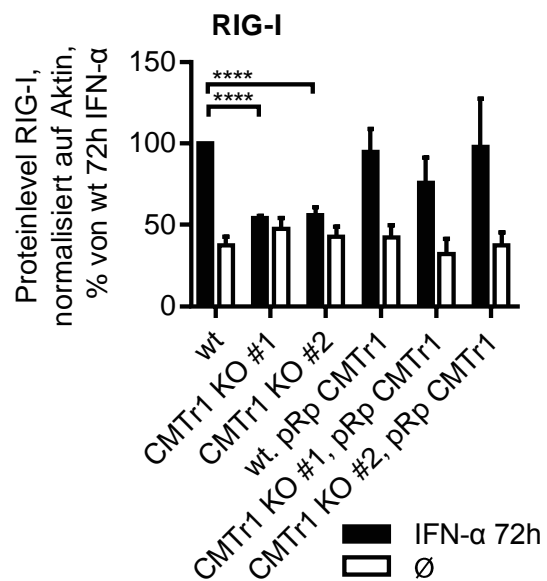


Abbildung 15: Effekt von IFN auf die Expression von RIG-I und IFIT-1.

Zellen wurden für 72 h mit IFN-α (5.000U/ml) behandelt oder unbehandelt gelassen und im Westernblot analysiert. A) Repräsentatives Experiment. B+C) Quantifizierung der relativen Proteinlevel von IFIT1 (B) und RIG-I (C), normalisiert auf Aktin (n=3, Mittelwert + SEM).

#### 4.7. Effekte der Cap-Struktur auf die Translation von Reporter-mRNA

Die im vorherigen Kapitel beschriebenen Ergebnisse deuten auf eine IFIT1-vermittelte Inhibition der Translation in CMTr1-defizienten Zellen hin. Da der Verlust von CMTr1 neben der Translation auch frühere Schritte der Genexpression, wie Transkription und Maturierung der mRNA, beeinflussen könnte, kann die Translationsaktivität von endogener mRNA nicht vollständig isoliert betrachtet werden.

Um die Effekte der Cap-Struktur auf die Translationsaktivität unter kontrollierten Bedingungen zu messen, wurde die Translation von exogener Reporter-mRNA analysiert. Im Rahmen einer Kooperation wurden von der Firma Trilink Bioscience Reagenzien zur *in vitro* Produktion von Cap0- und Cap1-modifizierter mRNA bereitgestellt (CleanCap™). Die CleanCap-Technologie beruht auf einem Cap0- oder Cap1-modifizierten Dinukleotid (m7GpppAmG oder m7GpppAG), welches in einer *in vitro* Transkriptionsreaktionen (IVT) am 5'-Ende kotranskriptional in Transkripte eingebaut wird. Auf diese Weise wurde Cap0- oder Cap1-modifizierte Reporter-mRNA generiert, die für Renilla-Luciferase (RLuc) kodiert.

Die Zellen wurden für 24 h mit IFN- $\alpha$  behandelt und anschließend mit Cap0- oder Cap1-modifizierter RLuc-mRNA transfiziert. 24h nach der Transfektion wurde die Expression luminometrisch bestimmt. Um den Effekt der Cap-Methylierung darzustellen, wurde die relative Luciferaseaktivität Cap0/Cap1 als Quotient der durch Cap0- zu der durch Cap1- generierten Signalstärke (*relative light units* (RLU)) gebildet.

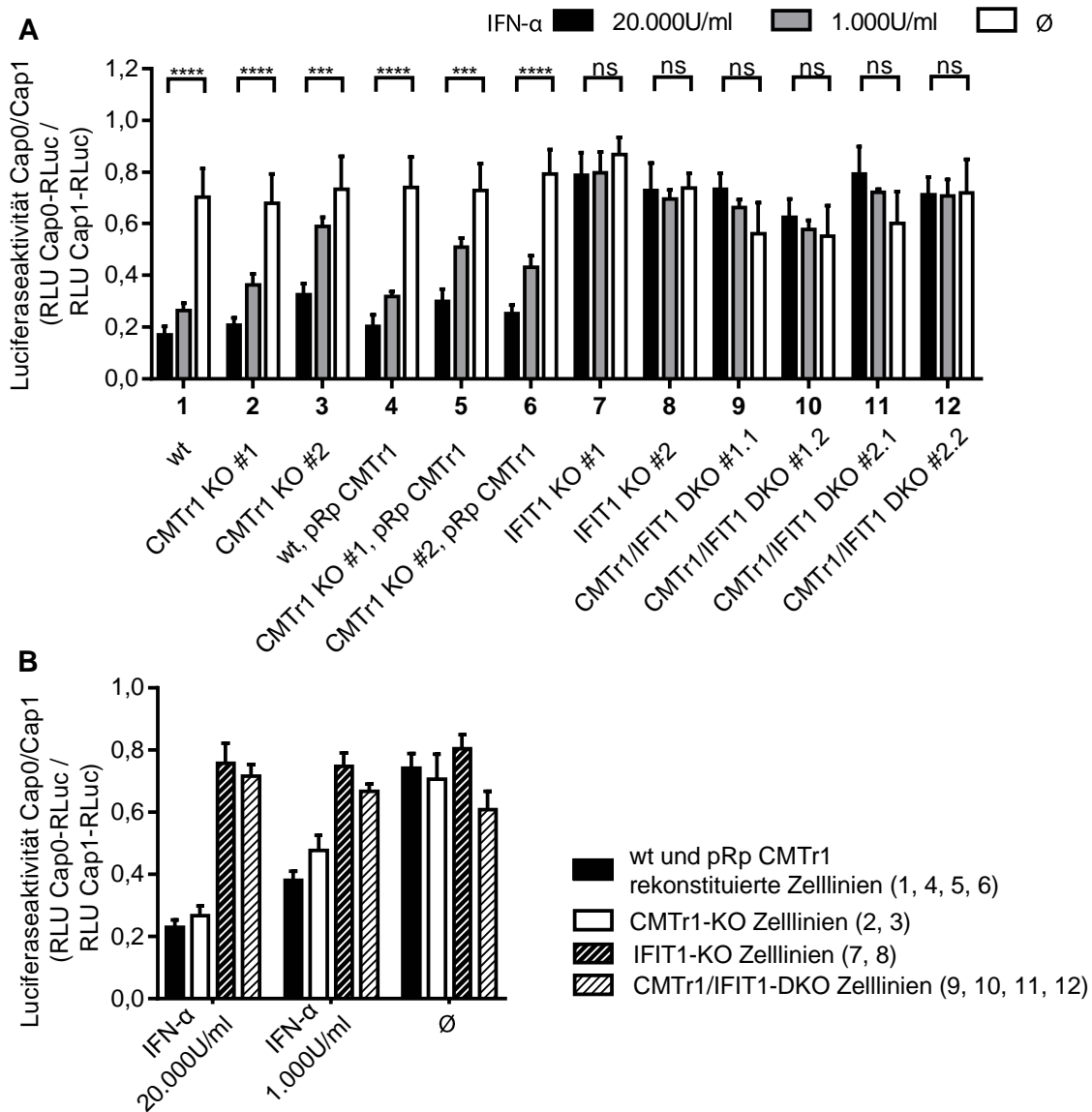


Abbildung 16: Effekt von IFN auf die Translation von Cap0/Cap1 Reporter-mRNA.

Zellen wurden für 24 h mit IFN behandelt und anschließend mit 20 ng Reporter-mRNA transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde die Luciferaseaktivität bestimmt. A) Relative Luciferaseaktivität von Cap0/Cap1 RLuc je Zelllinie. B) Ergebnisse von A, Zelllinien wurden nach CMT1- und IFIT1-Status in Gruppen zusammengefasst.

Nach Behandlung mit IFN- $\alpha$  war die relative Luciferaseaktivität Cap0/Cap1 in allen IFIT1-kompetenten Zellen, nicht jedoch in IFIT1-defizienten Zellen, stark und signifikant verringert (Abbildung 16A+B). Dieser Effekt war nicht vom CMT1-Status der Zelle abhängig.

Interessanterweise war die relative Luciferaseaktivität Cap0/Cap1 in unbehandelten Zellen nicht vom Genotyp der Zelllinie abhängig. Die Transfektion von Cap0-RLUC-mRNA generiert in unbehandelten Zellen – gemittelt über alle Zelllinien – 70% (+/-

9% SD) des Signals von Cap1-RLuc (Abbildung 16). Dies zeigt, dass CMTr1-KO-Zelllinien keine kompensatorischen genetischen Veränderungen erworben haben, die die Translation von Cap0-RNA begünstigen.

Als nächstes sollte getestet werden, wie die relative Luciferaseaktivität Cap0/Cap1 durch transiente Überexpression von IFIT1 beeinflusst wird und ob es dabei Unterschiede zwischen den Zelllinien gibt. Dazu wurde murines IFIT1B (mIFIT1B) verwendet, da in der Literatur die Translationsinhibition von Cap0-RNA von mIFIT1B in Abwesenheit weiterer Faktoren gezeigt wurde, während die Affinität von humanem IFIT1 für Cap0-RNA in Zellen von der Interaktion mit IFIT2 und IFIT3 moduliert zu werden scheint (siehe Kapitel 2.4.2).

Die relative Luciferaseaktivität Cap0/Cap1 wurde in Zellen ermittelt, die transient mIFIT1B oder GFP überexprimieren. In allen getesteten Zellen wurde die relative Cap0/Cap1-Luciferaseaktivität signifikant durch die Expression von mIFIT1B verringert (Abbildung 17A+B). Dieser Effekt war nicht vom Genotyp der Zelle abhängig und wurde weder vom CMTr1- noch vom IFIT1-Status der Zelle beeinflusst.

Zusammengefasst zeigten die mit Reporter-mRNA durchgeführten Experimente eine deutliche translationale Inhibition von Cap0-modifizierter mRNA, die von der Induktion von endogenem IFIT1 nach IFN-Behandlung beziehungsweise der Überexpression von mIFIT1B ausgelöst wurde.

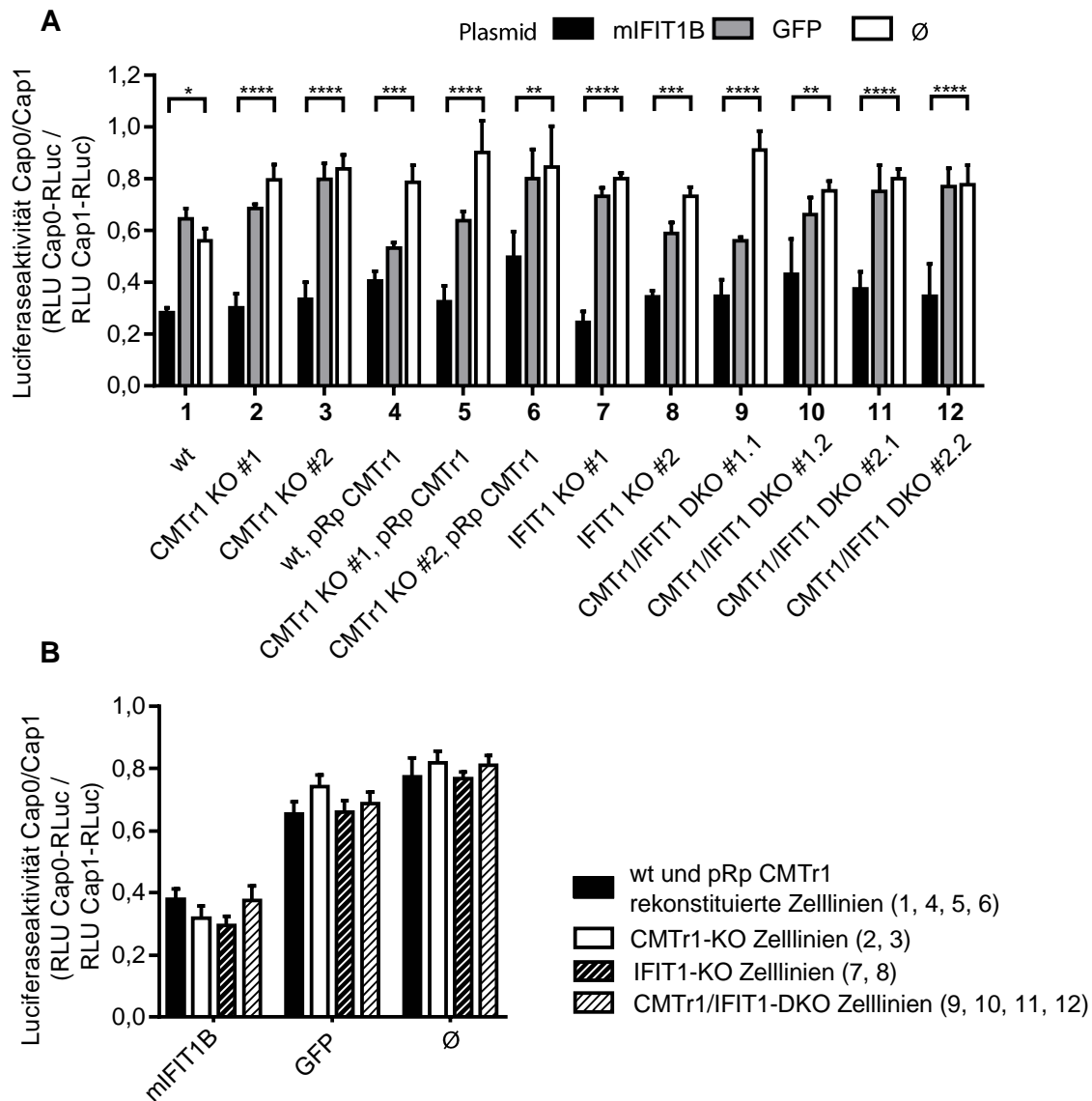


Abbildung 17: Effekt von mIFIT1B auf die Translation von Cap0/Cap1-Reporter-mRNA.

Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für murines IFIT1B oder GFP transfiziert oder unbehandelt gelassen. Nach 48 h wurde die Cap0- oder Cap1-modifizierte Reporter-mRNA transfiziert und 24 h später wurde die Luciferaseaktivität bestimmt. A) Relative Luciferaseaktivität von Cap0/Cap1-RLuc je Zelllinie. B) Ergebnisse von A, Zelllinien sind nach CMT1- und IFIT1-Status in Gruppen zusammengefasst.

## 4.8. Untersuchung des RIG-I Signalweges in CMTr1-KO-Zellen

In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass RIG-I nicht nur durch 5´ppp-, sondern auch durch Cap0-methylierte dsRNA-Liganden aktiviert werden kann. Cap1-modifizierte dsRNA hingegen verursacht keine Aktivierung von RIG-I. Der transiente Knockdown von CMTr1 führt in A549-Zellen zu einer RIG-I-Aktivierung durch endogene RNA und somit zur Induktion von Typ-I-IFN Transkripten (Schuberth-Wagner et al., 2015).

Die in dieser Arbeit generierten Zelllinien sollten auf mögliche Unterschiede in der Aktivierung des RIG-I-Signalweges untersucht werden.

Dazu sollte einerseits geklärt werden, ob in CMTr1-KO-Zellen eine dauerhafte Aktivierung des RIG-I-Signalweges durch endogene Liganden vorliegt. Andererseits sollte die Funktion des RIG-I-Signalweges durch exogene Stimuli untersucht werden. Als exogener RIG-I-Stimulus wurde eine durch *in vitro* Transkription generierte, triphosphorylierte *hairpin*-dsRNA (IVT4) verwendet (Schuberth, 2011).

### 4.8.1. Die RIG-I-abhängige Zytokinproduktion und ISG-Expression ist in CMTr1-KO-Zellen verringert

Die Aktivierung des RIG-I Signalweges resultiert in der Produktion von Typ-I-IFN und Chemokinen wie IP10. Das sezernierte IFN induziert in der Zelle daraufhin die Expression von ISGs (Kapitel 2.4.1-2).

Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen IVT4 stimuliert und nach 24 h wurde die RIG-I-Aktivierung durch drei unabhängige Assays untersucht: Die Produktion des Chemokins IP10 wurde mittels ELISA, sowie die Typ-I-IFN-Produktion mittels HEK-Blue-IFN- $\alpha/\beta$  Reporterzellen quantifiziert. Außerdem wurde die Aktivierung des GLuc/FLuc-Reportersystems gemessen. Das GLuc/Fluc-Reportersystem beruht auf der Transfektion zweier Luciferase-kodierender Expressionsplasmide: pIFNb-Gluc exprimiert Gaussia-Luciferase (GLuc) unter der Kontrolle eines Promotors mit regulatorischen Elementen des IFN- $\beta$ -Gens. Das zweite Plasmid pEF1-FLuc exprimiert konstitutiv Firefly-Luciferase (FLuc) und wird zur Normalisierung des GLuc-Signals genutzt (Gluc/Fluc).

In den Zelllinien konnte eine dosisabhängige RIG-I-Aktivierung durch IVT4 induziert werden. Eine RIG-I-Aktivierung in unstimulierten Zellen konnte auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden (Abbildung 18).

Verglichen mit CMTr1-kompetenten Zelllinien wurde in CMTr1-KO-Zellen nach IVT4-Stimulation eine deutlich verringerte Aktivierung des GLuc/Fluc-Reporters und sowie verringerte Konzentrationen von Typ-I-IFN und IP10 gemessen (Abbildung 18).

Da CMTr1/IFIT1-DKO-Zellen in allen drei Assays stärker auf die RIG-I-Stimulation reagieren als die CMTr1-KO-Zellen, wird der Effekt sehr wahrscheinlich durch IFIT1 vermittelt.

Die CMTr1/IFIT1-DKO-Zellen produzieren moderat weniger IP10 und Typ-I-IFN als CMTr1-kompetente Zellen. Interessanterweise ist dies bei der Aktivierung von GLuc/FLuc nicht der Fall (Abb. 18A). Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt ist die in Kapitel 4.4 dargestellte reduzierte Wachstumsgeschwindigkeit von CMTr1-defizienten Zellen. Während der GLuc/Fluc-Assay ein normalisiertes Signal liefert, hängen die gemessenen, absoluten Konzentrationen von Zytokinen wie IP-10 und Typ-I IFN auch von der Gesamtzahl der Zellen im *well* ab.



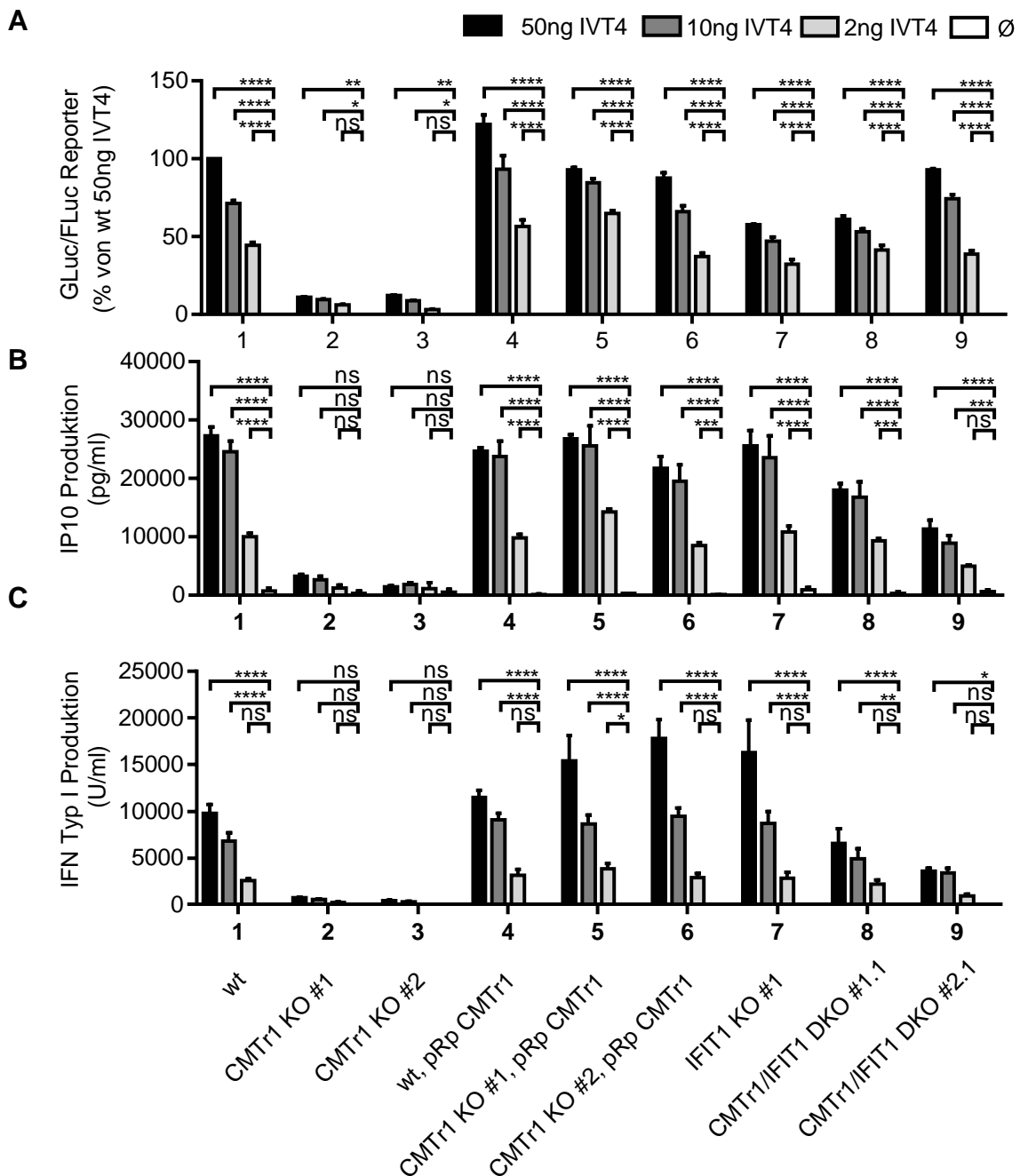


Abbildung 18: Analyse der RIG-I-Stimulation durch GLuc/FLuc-Reporter-Aktivierung und Produktion von IP10 und Typ-I IFN.

Zellen wurden, wie in Kapitel 3.2.5.3 beschrieben, mit den angegebenen Konzentrationen IVT4 sowie den Plasmiden des GLuc/FLuc Assays transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde die Aktivierung des GLuc/FLuc Assays (A) und die Produktion von IP10 (B) und Typ-I IFN (C) gemessen. (A+C: n=4, Mittelwert + SEM, B: n=3, Mittelwert + SEM).

Durch die Aktivierung von RIG-I und der daraus resultierenden Typ-I-IFN-Produktion werden in den Zellen ISGs induziert. Die Induktion von IFIT1 und RIG-I wurde 24h nach Stimulation mit IVT4 im Westernblot gemessen.

Die relativen Proteinlevel sowohl von RIG-I als auch von IFIT1 sind in CMT1-KO-Zellen verglichen mit wt-Zellen signifikant vermindert.

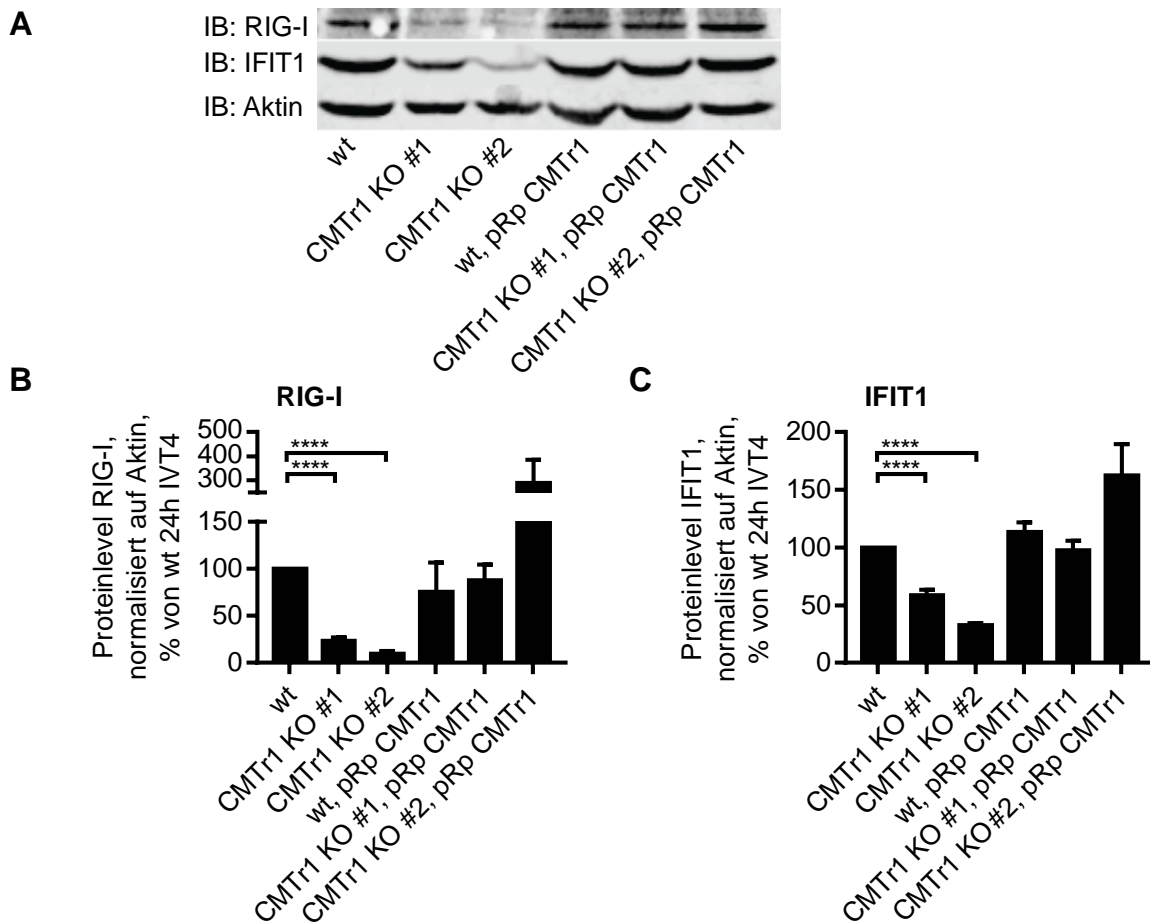


Abbildung 19: Proteinexpression von RIG-I und IFIT1 nach RIG-I-Stimulation.

$5 \times 10^5$  Zellen wurden in einer 6-well-Platte ausgesät und nach 24 h mit 1  $\mu\text{g/ml}$  IVT4 stimuliert. 24 h nach Stimulation wurden die Zellen durch Westernblot analysiert. A) Repräsentatives Experiment, Immunoblot (IB) von RIG-I, IFIT1 und Aktin. B+C) Quantifizierung der relativen Proteinlevel von IFIT1 (B) und RIG-I (C), normalisiert auf Aktin ( $n=3$ , Mittelwert + SEM).

#### 4.8.2. Die Aktivierung von RIG-I sowie die RIG-I-abhängige Induktion der Transkription sind in CMT1-KO-Zellen unverändert

Wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben, resultiert die Aktivierung von RIG-I in CMT1-defizienten Zellen in einer verringerten Produktion von IP10, Typ-I-IFN und einer Aktivierung von GLuc/Fluc. Da diese Effekte nicht in CMT1/IFIT1-DKO-Zellen auftreten, scheinen sie auf der Aktivität von IFIT1 zu beruhen. Nun sollte überprüft

werden, ob dieser Effekt ausschließlich auf translationaler Inhibition durch IFIT1 beruht, oder ob bereits zu einem früheren Zeitpunkt des RIG-I-Signalweges CMTr1-abhängige Unterschiede auftreten.

TBK1 spielt eine wichtige Rolle im RIG-I-Signalweg (Kapitel 2.4.1). Nach der Bindung von aktiviertem RIG-I an MAVS wird TBK1 durch Autophosphorylierung aktiviert und phosphoryliert die Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7, die dadurch aktiviert werden (Kishore et al., 2002; Ma et al., 2012).

Die Zellen wurden mit IVT4 stimuliert und nach 6 h die Aktivierung von TBK1 mit einem phosphospezifischen TBK-Antikörper (pTBK) quantifiziert.

In allen getesteten Zelllinien ist eine Phosphorylierung von TBK nach der Stimulation messbar. Es konnten aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zelllinien detektiert werden (Abbildung 20).

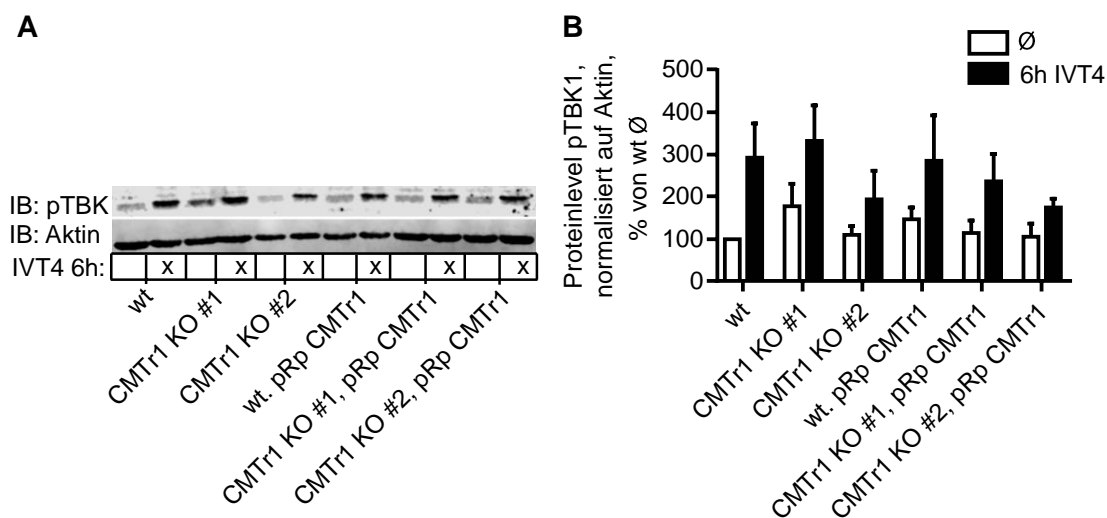


Abbildung 20: Analyse der TBK1-Phosphorylierung nach RIG-I-Stimulation.

Zellen wurden mit IVT4 (1 µg/ml) für 6 h stimuliert, anschließend wurde die Phosphorylierung von TBK1 (pTBK1) durch Westernblot quantifiziert. A) repräsentatives Experiment, IB von RIG-I, IFIT1 und Aktin. B+C) Quantifizierung der relativen Menge phosphoryliertem TBK1 (pTBK1), normalisiert auf Aktin (n=6, Mittelwert + SEM).

Im Folgenden wurde die durch RIG-I-Aktivierung ausgelöste Induktion der Transkription gemessen.

6 h und 24h nach IVT4-Stimulation wurde die Transkriptlevel der Zytokinen IP10 und IFN- $\beta$  sowie von der ISGs RIG-I und IFIT1 durch qPCR analysiert.

Die IVT4-Stimulation induziert die Expression der getesteten mRNA (Abbildung 21A-D). Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den getesteten Zelllinien beobachtet werden (Abbildung 21E).

Interessanterweise zeigen sich jedoch subtile Unterschiede in der Expression von IFN- $\beta$  und IP10 in unstimulierten Zellen. Dazu wurden die Zelllinien nach ihrem CMTr1- und IFIT1-Status in die Gruppen zusammengefasst und analysiert. Die Expression von IFN $\beta$  und IP10 ist in unstimulierten CMTr1-KO-Zellen und CMTr1/IFIT1-DKO-Zellen, verglichen mit CMTr1-kompetenten Zelllinien, leicht, aber signifikant erhöht (Abbildung 21E). Dies ist vermutlich auf eine dauerhafte, leichte Induktion von RIG-I in CMTr1-defizienten Zellen durch endogene Cap0-RNA zurückzuführen. Dieser Effekt führt jedoch zu keiner messbaren Proteinproduktion von Typ-I-IFN (siehe Kapitel 4.8.1) und keiner Induktion der ISGs IFIT1 und RIG-I auf Transkriptebeine (Abbildung 21E).

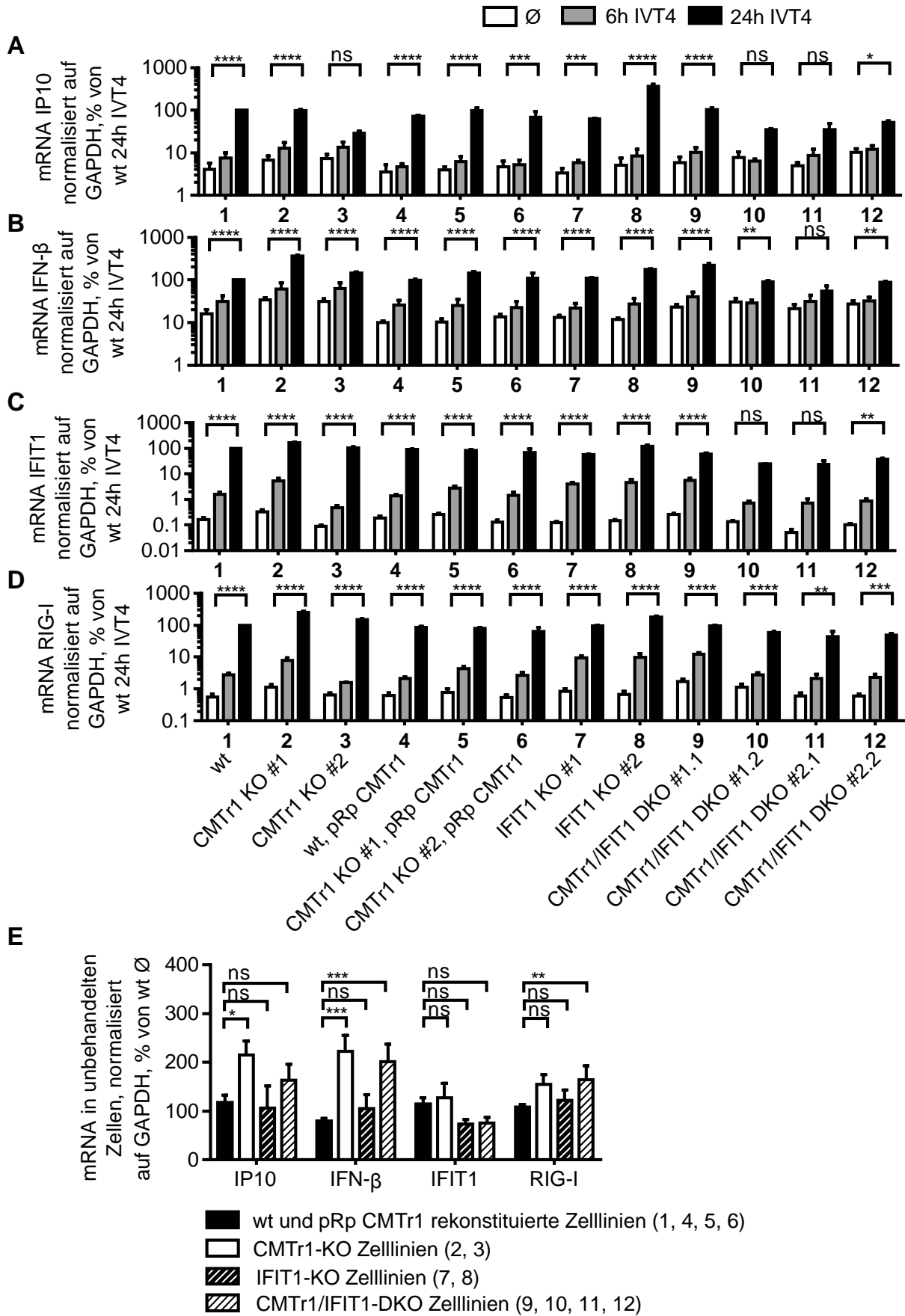


Abbildung 21: Analyse der Induktion der mRNA von IP10, IFN- $\beta$ , IFIT1 und RIG-I nach RIG-I Stimulation.

qPCR-Analyse von Zellen, die mit IVT4 (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ) für 6h oder 24h stimuliert oder unbehandelt gelassen wurden. A-D) Die relative mRNA-Expression von IP10 (A), IFN- $\beta$  (B), IFIT1(C) und RIG-I (D), normalisiert auf GAPDH, wurde durch qPCR analysiert (n=6, Mittelwert + SEM). E) Ergebnisse von A-D aus der unbehandelten Kondition ( $\emptyset$ ).

#### 4.9. Auch in Hühner-B-Zell-Lymphomzellen führt ein CMTr1-Knockout zu einer translationalen Inhibition nach IFN-Behandlung

Die Arbeitsgruppe von Professor Michael Engelke (Institut für Zelluläre und Molekulare Immunologie, Universität Göttingen) generierte für dieses Projekt durch homologe Rekombination einen CMTr1-KO-Einzelzellklon in DT40-Zellen, einer Hühner-B-Zell-Lymphomzelllinie.

Die Effekte von IFN-Stimulation auf das Wachstum und die Translation von DT40-wt- und DT40-CMTr1-KO-Zellen wurden untersucht. Dazu wurde Hühner IFN- $\alpha$  (chIFN- $\alpha$ ) hergestellt und verwendet. Um eventuelle Einzelklon-spezifische Effekte auszuschließen, wurden die Zellen mit einem retroviralen Vektor rekonstituiert, der entweder CMTr1 (pRp-CMTr1) oder GFP (pRp-GFP) exprimiert.

DT40-CMTr1-KO-Zellen zeigen eine signifikante, starke und dosisabhängige Reduktion der metabolischen Aktivität nach 72 h IFN-Behandlung (Abbildung 22). Dieser Effekt war durch Rekonstitution mit pRp-CMTr1 wieder aufhebbar.

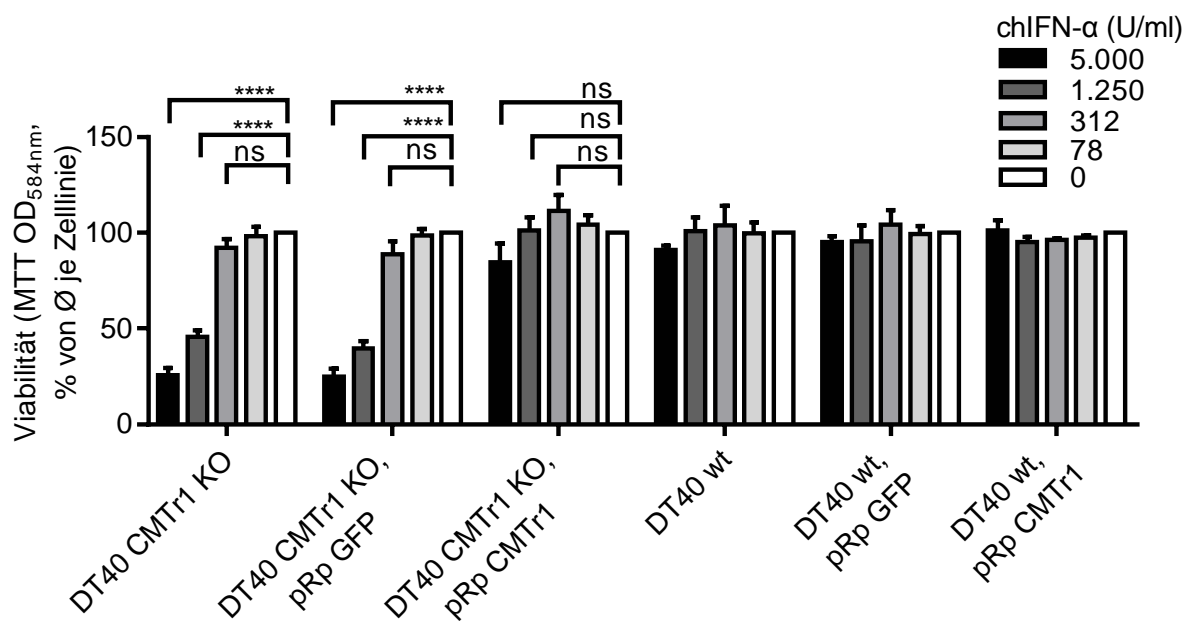


Abbildung 22: Messung der Viabilität von DT40-Zelllinien nach chIFN- $\alpha$  Behandlung.

In 96-*well*-Platten wurden 50.000 Zellen/*well* ausgesät, mit verschiedenen Konzentrationen chIFN- $\beta$  behandelt und nach 72 h durch MTT-Assay analysiert. Die OD<sub>584nm</sub>-Werte sind in % der unbehandelten Kontrolle ( $\emptyset$ ) je Zelllinie angegeben (n=4, Mittelwert + SEM).

Des Weiteren wurde der Einfluss von chIFN- $\alpha$  auf die globale Translationsaktivität der Zellen durch Polysomen-Profil-Analyse untersucht (Ingolia et al., 2009, 2011, 2019).

Die Zellen wurden für 16 h mit chIFN- $\alpha$  inkubiert, anschließend wurde ein zytosolisches Lysat hergestellt und auf einen Saccharose-Dichtegradienten überschichtet. Das Lysat wurde durch Ultrazentrifugation aufgetrennt und anschließend durch einen UV-Sensor geleitet.

Während RNA, die nicht an Ribosomen gebunden ist, nicht in den Gradienten einwandert, sedimentieren die ribosomalen Untereinheiten 40S und 60S und einzelne 80S-Ribosomen (Monosomen) abhängig von ihrem Sedimentationskoeffizienten in den Gradienten ein. Tiefer als die Monosomen migriert mRNA, an die zwei oder mehr Ribosomen gebunden sind (Polysomen). Polysomen ergeben ein typisches Profil mit mehreren Absorptionsmaxima, deren Position abhängig von der Zahl der an die mRNA gebundenen Ribosomen sind (Abbildung 23A, Kapitel 3.2.9). Hohe Absorptionssignale in den Polysomenfraktionen sind ein Kennzeichen hoher Translationsaktivität der Zelle.

Im Polysomen-Profil von DT40-CMTr1-KO-Zellen war ein deutlicher Abfall der Polysomenfraktion nach chIFN- $\alpha$  Behandlung sichtbar. IFN induzierte also eine starke Inhibition der globalen Translationsaktivität (Abbildung 23B). Im Polysom-Profil von DT40-wt-Zellen war kein Effekt der IFN-Behandlung sichtbar (Abbildung 23C).

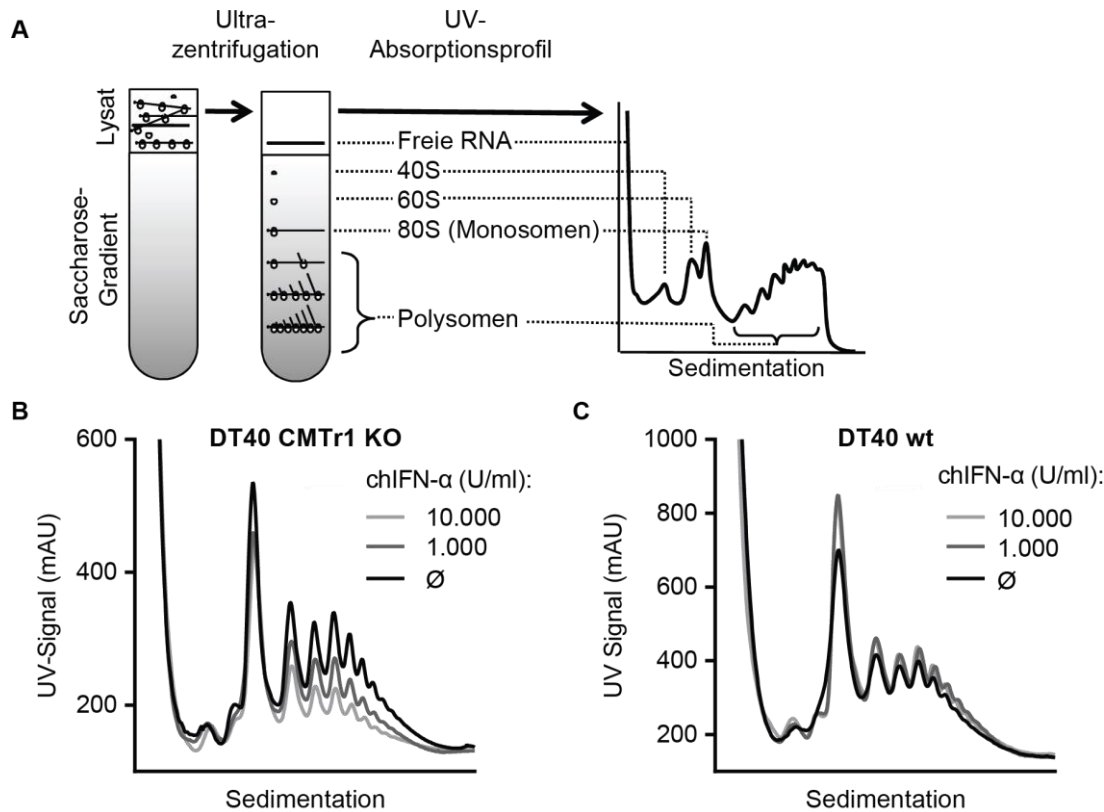


Abbildung 23: Polysom-Profil-Analyse.

A) Schematische Darstellung der Polysomen-Profil-Analyse. In Kapitel 3.2.9 findet sich eine detaillierte Beschreibung des Ablaufs. B+C) DT40-CMTr1-KO (B) und DT40-wt (C) wurden für 16 h mit den angegebenen Konzentrationen chIFN- $\alpha$  behandelt, anschließend wurde eine Polysomen-Profil-Analyse durchgeführt.

Zusammengefasst zeigen DT40-CMTr1-KO-Zellen nach chIFN- $\alpha$ -Behandlung eine deutliche Reduktion der Viabilität und Inhibition der globalen Translationsaktivität. Diese Effekte sind vergleichbar mit den in humanen HEK293T-CMTr1-defizienten Zellen generierten Ergebnissen (siehe Kapitel 4.5 und 4.6).

Bezüglich der Mechanismen, die für eine mögliche Detektion und Restriktion von Cap0 verantwortlich sein könnten, ist die Datenlage in Hühnern deutlich schlechter als im humanen System. Nach bisherigen Analysen verfügen Hühner nur über ein einziges IFIT-Protein, ein Ortholog vom humanen IFIT5. IFIT5 wird in Hühnern durch IFN induziert, bindet unvollständige Cap-Strukturen und inhibiert die Replikation von RNA-Viren (Santhakumar et al., 2018). Im Genom des Huhns sind Orthologe der RIG-I-like Helikasen MDA5 und LPG2, nicht aber von RIG-I gefunden worden (Barber et al., 2010; Sarkar et al., 2008)

Daher wurden für alle weiteren Experimente die humanen, HEK293T-basierten Zelllinien verwendet.



#### 4.10. Genexpressionsanalyse der CMTr1-KO-Zellen

Während die gezeigten Typ-I-IFN-abhängigen Effekte in humanen CMTr1-KO-Zellen, wie in den vorhergehenden Kapiteln dieser Arbeit gezeigt, mit der Aktivität von IFIT1 zusammenhängen, gibt es bisher in der Literatur keine klaren Hinweise auf einen IFN- und IFIT1-unabhängigen Mechanismus, der das verlangsamte Zellwachstum und die reduzierte Zellgröße in CMTr1-defizienten Zellen erklären würde.

Um Unterschiede in der Transkriptexpression zwischen CMTr1-defizienten und CMTr1-kompetenten Zellen zu ermitteln, wurde eine Transkriptomanalyse durch transkriptomweite RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) durchgeführt.

RNA-Seq beruht auf der Herstellung und Sequenzierung einer cDNA-Bibliothek aus kurzen Fragmenten der zu analysierenden RNA-Präparation. Die so erhaltenen kurzen Sequenzen (*reads*) werden einer bestimmten Position des Referenzgenoms zugeordnet, welches mit Geninformationen annotiert ist. Die normalisierte Anzahl der *reads* innerhalb eines Gens (quantifiziert als *fragments per kilobase of exon model per million reads mapped* (FPKM)) dient als Maß für die relative Transkriptmenge des Gens in der eingesetzten RNA-Präparation. Basierend auf FPKM kann die differentielle Transkriptexpression zwischen zwei Konditionen verglichen werden.

Da CMTr1 womöglich auch einen Effekt auf die Neusynthese-, Prozessierungs- oder Degradationsraten der Transkripte hat, wurde neben der Gesamt-RNA auch neusynthetisierte RNA analysiert.

Zur Präparation von neusynthetisierter RNA wurden die Zellen 1h vor der RNA-Extraktion mit 4-Thiouridine (4sU) versetzt. 4sU wird in diesem Zeitraum durch die RNA-Polymerasen in entstehende Transkripte inkorporiert. Aus der Gesamt-RNA-Präparation (total-RNA) wurde die durch 4sU metabolisch markierte RNA (4sU-RNA) durch 4sU-spezifische Biotinylierung aufgereinigt (Dölken et al., 2008; Garibaldi et al., 2017) (Abbildung 24A). Es wurden total-RNA und 4sU-RNA aus fünf der generierten Zelllinien analysiert: wt wurde in biologischen Quadruplikaten, CMTr1-KO#1, CMTr1-KO#2, CMTr1-KO#1-pRp-CMTr1 und CMTr1-KO#2-pRp-CMTr1 in biologischen Triplikaten aufgereinigt.

Die Aufreinigung von total- und 4sU-RNA wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Thomas Henning (AG Dölken, Institut für Virologie und Immunbiologie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg) durchgeführt. Die weitere Probenvorbereitung sowie die Sequenzierung wurde durch den Sequenzierdienstleister BGI (Beijing Genomics Institute) übernommen. Die Auswertung der Sequenzierdaten wurde durch Prof. Dr. Caroline Friedel (Lehr- und Forschungseinheit Bioinformatik, Institut für Informatik, Ludwig-Maximilians-Universität München) durchgeführt und durch eigene Analysen ergänzt.

#### **4.10.1. CMTr1 zeigt keinen globalen Effekt auf Spleißeffizienz und Transkriptstabilität**

Zunächst sollte anhand der durch RNA-Seq generierten Daten getestet werden, ob CMTr1 globale Effekte auf die Transkriptstabilität und die Spleißeffizienz hat.

Zur Ermittlung der Transkriptstabilität einer Zelllinie wurde für alle detektierten Transkripte der Quotient der FPKM zwischen 4sU-RNA und total-RNA gebildet (4sU/total). Der Quotient 4sU/total ist für instabile Transkripte hoch, für stabile Transkripte niedrig. Um eine mögliche durch CMTr1 vermittelte Änderung der Transkriptstabilitäten zu visualisieren, wurden die 4sU/total Quotienten aller Transkripte aus CMTr1-kompetenten Zelllinien gegen die Quotienten aus CMTr1-defizienten Zelllinien aufgetragen. In allen getesteten Vergleichen zeigte sich eine hohe Übereinstimmung der Transkriptstabilitäten zwischen CMTr1-kompetenten und -defizienten Zelllinien, in Abbildung 24B ist der Vergleich von CMTr1-KO#2-pRp-CMTr1 zu CMTr1-KO#2 dargestellt. CMTr1 hat somit keinen offensichtlichen Effekt auf die globale Transkriptstabilität.

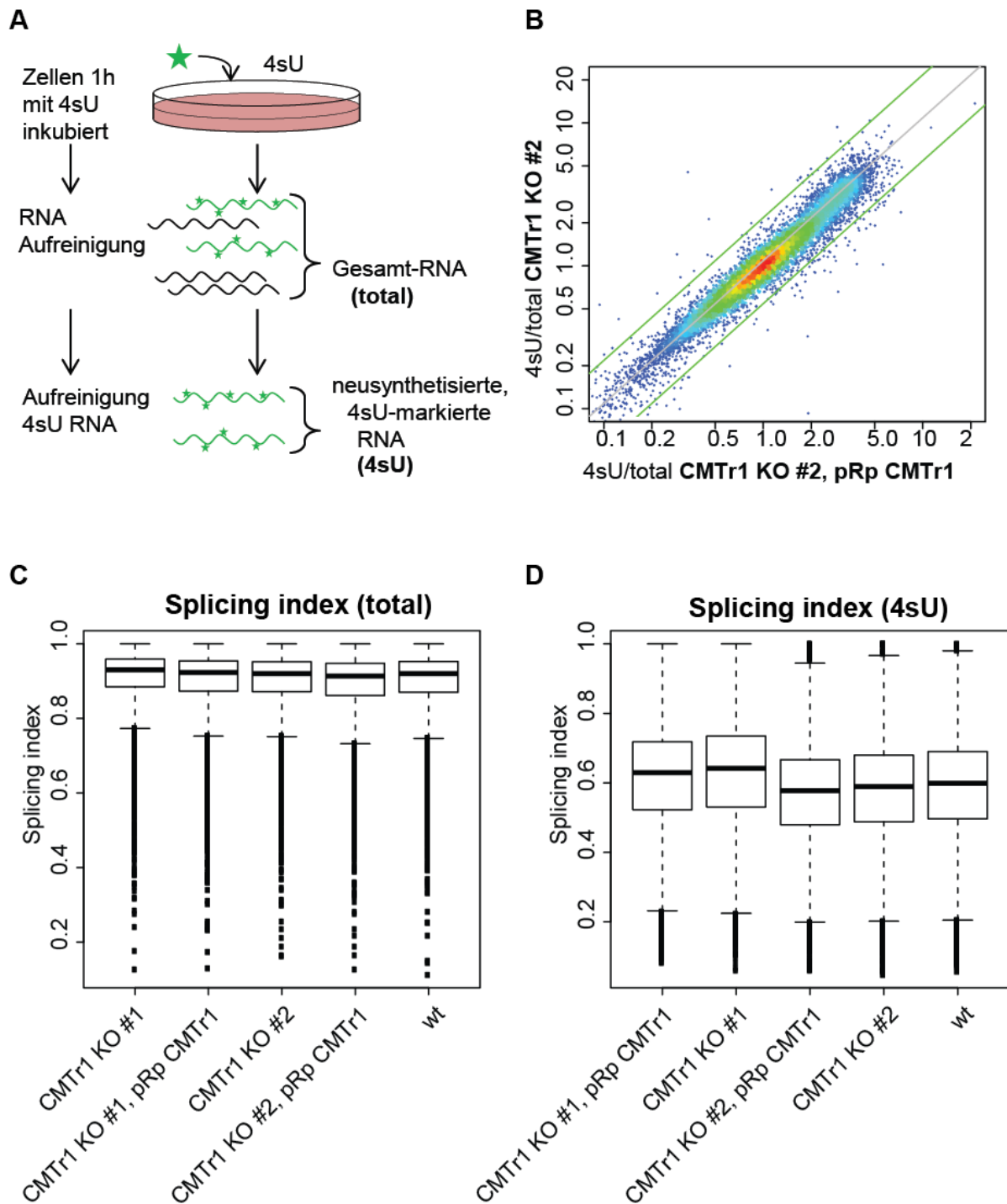


Abbildung 24: Transkriptomanalyse durch RNA-Seq.

A) Schematische Darstellung der transkriptionalen Markierung von neusynthetisierter RNA mit 4sU und der anschließenden Aufreinigung der Gesamt-RNA (total) und neusynthetisierten RNA (4sU). B) Analyse der Effekte von CMTr1 auf die globale Transkriptstabilität (4su/total) am Beispiel des Vergleiches der Transkriptstabilität zwischen den Zelllinien „CMTr1-KO#2“ und „CMTr1-KO#3-pRp-CMTr1“. C,D) Analyse der globalen Spleißeffizienz (Splicing index) für total-RNA (C) und 4sU-RNA (D). Die Analysen wurden von Prof. Dr. Caroline Friedel durchgeführt.

Aus den RNA-Seq-Daten lassen sich Rückschlüsse auf die Effizienz der Spleißreaktion in den Zelllinien treffen. Dazu werden die Sequenzen der reads, welche eine annotierte Spleißstelle überspannen, in gespleißte (Exon-Exon reads) und ungespleißte (Intron/Exon und Exon/Intron reads) Sequenzen unterteilt. Der Quotient der Zahl der Exon-Exon reads zu der Gesamtzahl der reads wird „Splicing index“ genannt und ist ein Maß der Effizienz der Spleißreaktion an dieser Spleißstelle. Um die globale Spleißeffizienz zu ermitteln, wurde der Splicing index aller analysierten Spleißstellen gemittelt (Abbildung 24C+D). Der gemittelte Splicing index ist wie erwartet in total-RNA sehr hoch (Abbildung 24C) und in der neusynthetisierten, zum Teil nicht vollständig prozessierten 4sU-RNA-Präparation (Abbildung 24D) deutlich niedriger. Zwischen den getesteten Zelllinien ließen sich aber weder in total-RNA noch in 4sU-RNA Unterschiede des Splicing index feststellen. Somit hat CMTr1 keinen messbaren Effekt auf die globale Spleißeffizienz.

Im Folgenden sollten die differentiell exprimierte Transkripte zwischen CMTr1-kompetenten und CMTr1-defizienten Zelllinien ermittelt werden. Dazu wurden die in Tabelle 2 aufgelisteten Konditionen verglichen. Die Veränderung der Expression eines Transkriptes zwischen zwei Konditionen werden durch  $\log_2(\text{FC})$  und  $p\text{Val.adj}$  beschrieben.  $\log_2(\text{FC})$  ist der  $\log_2$ -transformierte Wert des *fold change* (der x-fachen Veränderung der Expression zwischen den Konditionen),  $p\text{Val.adj}$  der für multiple Vergleiche korrigierte Signifikanzwert (*adjusted p value*).

#	CMTr1-kompetente Zelllinie	/	CMTr1-defiziente Zelllinie	RNA	Transkripte mit $p\text{Val.adj} \leq 0,001$ $\log_2\text{FC} \geq 1$	Transkripte mit $p\text{Val.adj} \leq 0,001$ $\log_2\text{FC} \leq -1$
1	CMTr1-KO#1-pRP-CMTr1	/	CMTr1-KO#1	total	103	142
2	CMTr1-KO#1-pRP-CMTr1	/	CMTr1-KO#1	4sU	113	117
3	wt	/	CMTr1-KO#1	total	586	519
4	wt	/	CMTr1-KO#1	4sU	744	1246
5	CMTr1-KO#2-pRP-CMTr1	/	CMTr1-KO#2	total	104	109
6	CMTr1-KO#2-pRP-CMTr1	/	CMTr1-KO#2	4sU	112	50
7	wt	/	CMTr1-KO#2	total	535	208
8	wt	/	CMTr1-KO#2	4sU	460	197

Tabelle 2: Vergleich der angegebenen Zelllinien zur Ermittlung differentiell exprimierter Transkripte.

Es wurden insgesamt 8 Vergleiche der Transkriptexpression zwischen den angegebenen CMTr1-kompetenten und CMTr1-defizienten Zelllinien vorgenommen. Die Anzahl der in CMTr1 signifikant vermindert exprimierten Transkripte ( $p\text{Val.adj} < 0,001$   $\log_2\text{FC} > 1$ ) und signifikant erhöht exprimierten Transkripte ( $p\text{Val.adj} < 0,001$   $\log_2\text{FC} < -1$ ) ist angegeben.

Die Analyse der Transkriptstabilität, des Splicing index und die Ermittlung der differentiell exprimierten Gene wurde von Prof. Caroline Friedel durchgeführt.

Basierend auf den Vergleichen der differentiellen Transkriptexpression wurden im Folgenden Unterschiede zwischen CMTr1-kompetenten und CMTr1-defizienten Zellen durch eigene Analysen ergänzt.

#### **4.10.2. Die Expression der mRNA ribosomaler Proteine ist in CMTr1-KO-Zellen reduziert**

Basierend auf den differentiell exprimierten Transkripten sollte der Einfluss von CMTr1 auf die biologischen Prozesse der Zelle identifiziert werden. Dazu wurde ein *Geneontology Enrichment* (GO Enrichment) durchgeführt. GO Enrichment ist eine statistische Methode, die die Über- oder Unterrepräsentation von bestimmten Klassen von Genen innerhalb der differentiell regulierten Genen analysiert.

GO Enrichment wurde für die differentiell exprimierten Gene zwischen CMTr1-kompetenten und CMTr1-defizienten Zelllinien durchgeführt (siehe Tabelle 2). Dazu wurden Transkripte, die mindestens um den Faktor 1,5 ( $\log_2FC > 0,58$  oder  $< -0,58$ ) verändert waren und  $pVal.adj < 0,05$  aufwiesen, als differentiell exprimiert angenommen.

Bei allen getesteten Vergleichspaaren zeigte sich, dass Gene aus der Genfamilie (GO term) des zytosolischen Ribosoms (*cytosolic ribosome*, GO term: GO:0022626) stark und hochsignifikant reguliert waren (Tabelle 3). Weitere als signifikant identifizierte GO terms überlappten eng mit dem GO term „zytosolisches Ribosom“ und sind daher nicht gesondert aufgeführt (Daten nicht gezeigt).

Die GO Enrichment Analysen zeigten somit, dass die Expressionslevel von mRNA, die für ribosomalen Proteine (RP) kodiert, in CMTr1-KO-Zellen vermindert sind (Tabelle 3). Dieses Ergebnis ist überraschend, da die mRNA von RPs weitestgehend konstitutiv exprimiert und kaum auf transkriptionaler Ebene reguliert ist. Die Regulation der RP-Produktion wird vor allem translational durch ein konserviertes Sequenzmotiv, dem 5'-terminalen Oligo-Pyrimidin-Trakt (5' TOP) reguliert (Caracausi et al., 2017; Meyuhas & Kahan, 2015).

CMTr1-kompetente Zelllinie	CMTr1-defiziente Zelllinie	RNA	Ergebnisse des GO Enrichment für "zytosolisches Ribosom" (GO term GO:0022626)			
			fold enrichment	+/-	pVal	FDR
CMTr1-KO#1-pRp-CMTr1	CMTr1-KO#1	total	20,86	+	1,86E-36	3,74E-33
		4sU	6,25	+	4,85E-07	0,000974
wt	CMTr1-KO#1	total	7,27	+	8,19E-24	1,65E-20
		4sU	3,77	+	7,31E-09	2,94E-06
CMTr1-KO#2-pRp-CMTr1	CMTr1-KO#2	total	21,71	+	6,65E-43	1,33E-39
		4sU	6,75	+	9,79E-09	1,97E-05
wt	CMTr1-KO#2	total	7,61	+	7,63E-26	1,53E-22
		4sU	6,92	+	8,69E-19	1,75E-15

Tabelle 3: GO Enrichment Ergebnisse für „zytosolisches Ribosom“.

GO Enrichment basiert auf der Klassifizierung der Gene durch Protein Analysis Through Evolutionary Relationships (PANTHER). Einzelne GO Enrichments für differentiell regulierte Gene (Kriterien  $\log_2(FC) > 0,586$  oder  $< -0,586$ ;  $pVal.adj < 0,05$ ) zwischen den angegebenen Zelllinien (jeweils CMTr1-kompetente Zelllinie/CMTr1-defiziente Zelllinie) wurden durchgeführt und die Ergebnisse der Genfamilie „zytosolisches Ribosom“ (GO Term 0022626) aufgeführt. Angegeben sind die x-fache Überrepräsentation (fold enrichment), Richtung der Regulation (Überrepräsentation/Unterrepräsentation (+/-)), sowie die Signifikanz (pVal (p-Wert) und FDR (*false discovery rate*)). Die Analyse wurde mit der PANTHER Webapplikation (<http://www.pantherdb.org>) durchgeführt.

Daraufhin wurde die differentielle Transkriptexpression der RPs durch Volcanoplots visualisiert (Abbildung 25). Dabei ist horizontal  $\log_2FC$  und vertikal  $-\log_{10}(pVal.adj)$  aufgetragen. Abbildung 25 zeigt einen Volcanoplot des Vergleichspaares CMTr1-KO#2-pRp-CMTr1 und CMTr1-KO#2. Gene, die für RPs kodieren, sind farblich hervorgehoben. Sowohl in total-RNA als auch in der 4sU-RNA ist die überwiegende Mehrheit der RP-Transkripte in CMTr1-defizienten Zellen reduziert.

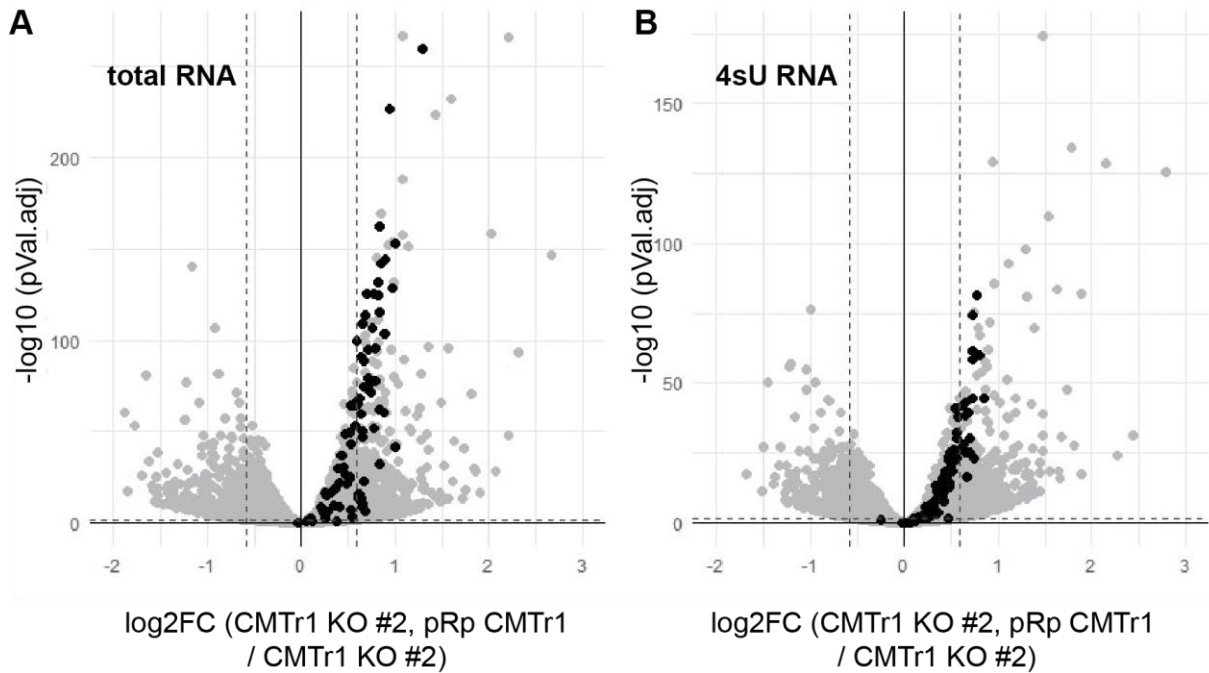


Abbildung 25: RP-Transkriptlevel sind in CMTr1-KO-Zellen reduziert

Volcanoplots. Vergleich der Transkriptexpression von CMTr1-KO#2-pRp-CMTr1 und CMTr1-KO#2 in total-RNA (A) und 4sU-RNA (B). RP-Transkripte sind als schwarze Punkte, alle übrigen Transkripte als graue Punkte dargestellt. Die gestrichelten Hilfslinien markieren  $\log_2\text{FC} = -0,586$  und  $0,586$  sowie  $-\log_{10}(\text{pVal. adj}) = 1,311$  (entspricht  $\text{pVal. adj}$  von  $0,05$ ).

#### 4.10.3. Einfluss von mRNA-Strukturelementen auf die Expression in CMTr1-KO-Zellen

Die Mechanismen der Regulation der RP-mRNA sollten im Folgenden genauer charakterisiert werden.

Verglichen mit anderen Genen weisen RP-kodierende Gene zwei gut charakterisierte Besonderheiten auf: Erstens kodieren RP-Gene für sogenannte 5' TOP-Transkripte, enthalten also ein definiertes 5'-terminales Sequenzmotiv. Zweitens sind RP-Gene, sowie auch andere Vertreter der 5' TOP-RNA kodierenden Gene, überdurchschnittlich häufig *snoRNA host genes* (SNHGs), kodieren also in ihren Intronssequenzen snoRNA (Meyuhas & Kahan, 2015).

Es sollte nun untersucht werden, ob neben RP-mRNA auch andere 5' TOP- und SNHG-Transkripte in Abhängigkeit von CMTr1 differentiell exprimiert werden. Die entsprechenden Transkripte wurden dazu anhand von publizierten Daten annotiert (siehe unten).

5' TOP-RNA definiert sich einerseits über das 5' TOP-Motiv (das erste Nukleotid der mRNA ist ein C, gefolgt von 4-15 Pyrimidinen (C/U)), und andererseits funktionell

über ihre translationale Regulation durch den mTOR-Signalweg. Die Inhibition von mTOR führt zu einer 4E-BP-abhängigen Inhibition der Translation, wodurch vor allem die Translation von 5' TOP-mRNA inhibiert wird. Etwa 100 Gene erfüllen sowohl die strukturelle als auch die funktionelle Definition von 5' TOP-RNA („validierte 5' TOP-RNA“), darunter vor allem Proteine der Translationsmaschinerie (79 RPs sowie verschiedene Initiationsfaktoren (EIF3A, EIF3E, EIF3H, EIF4B, PABPC1) und Elongationsfaktoren (EEF1A1, EEF1B2, EEF1D, EEF1G und EEF2)). Die validierten 5' TOP-Gene wurden annotiert und in ribosomale 5' TOP (RP) und nicht-ribosomale 5' TOP (non-RP) unterteilt (Meyuhas & Kahan, 2015; Philippe et al., 2020).

Neben diesen etablierten 5' TOP-Genen gibt es weitere Gene, deren Transkripte strukturell das 5' TOP-Motiv oder ein 5' TOP-ähnliches (5' TOP like) Motiv aufweisen, bei denen eine translationale Regulation durch mTOR aber nicht nachgewiesen ist. Mit Hilfe der von Philippe et al. genutzten Formel, die 5' TOP-Motive bewertet (TOP Score), wurden alle Gene, die keine etablierten 5' TOP-Gene sind, aber einen TOP Score >3 aufweisen, als 5' TOP-like definiert (Philippe et al., 2020).

SNHG's sind sowohl proteinkodierende als auch nicht-kodierende Gene in deren Transkripten eine oder mehrere snoRNA lokalisiert sind. snoRNA wird nach dem Spleißen des SNHG-Transkriptes aus dem Intronsequenz maturiert (Kufel & Grzechnik, 2019). 5' TOP-Gene sind überdurchschnittlich häufig SNHG's. SNHG's wurden nach der Datenbank snoDB annotiert (Bouchard-Bourelle et al., 2020).

Neben den proteinkodierenden RP-Genen gibt es im Menschen etwa 2000 nicht-kodierende, zum Teil aber transkribierte ribosomale Pseudogene (Pseudo-RPs). Pseudo-RPs wurden ebenfalls annotiert (Z. Zhang et al., 2002).



Basierend auf den beschriebenen Kriterien wurden die Gene hierarchisch in nicht-überlappende Gruppen eingeteilt:

- 1) **RP**: proteinkodierende Gene, die für ribosomale Proteine kodieren
- 2) **non-RP 5' TOP**: proteinkodierende Gene mit validiertem 5' TOP, die nicht-ribosomale Proteine kodieren
- 3) **ncSNHG 5' TOP-like**: nicht-kodierende SNHGs mit TOP Score >3
- 4) **ncSNHG non-5' TOP**: nicht-kodierende SNHGs mit TOP Score <3
- 5) **5' TOP-like**: kodierende und nicht kodierende Gene mit einem TOP Score >3, die nicht bereits in Gruppe 1-5 erfasst sind
- 6) **pseudo-RP**: nicht-kodierende ribosomale Pseudogene, die nicht bereits in Gruppe 1-6 erfasst sind
- 7) **snoRNA**: Transkripte des Biotypes „snoRNA“

Die differentielle Expression dieser Transkript-Gruppen wurde am Beispiel des Vergleichspaars CMTr1-KO#2-pRp-CMTr1 / CMTr1-KO#2 durch Volcanoplots visualisiert (Abbildung 26).

Alle getesteten Gruppen wiesen eine verringerte Expression in CMTr1-defizienten Zellen auf. Für die CMTr1-abhängige Änderung der Transkriptlevel spielen offenbar sowohl 5' TOP- und 5' TOP-like-Motive, als auch die Zugehörigkeit zu den SNHGs eine Rolle. Der Vergleich von ncSNHG-5' TOP-like und ncSNHG non-5' TOP suggeriert einen additiven Effekt von 5' TOP-Motiv und SNHG-Status eines Transkriptes (Abbildung 26E+F).

Interessanterweise sind auch die Transkripte von RP-Pseudogenen herunterreguliert (Abbildung 26G).

Auch die Expressionslevel der snoRNA sind in CMTr1-defizienten Zellen reduziert (Abbildung 26E+F). Dies ergibt sich nicht zwangsläufig aus der reduzierten SNHG-Expression, denn der Literatur nach korrelieren die Expressionslevel von snoRNA nur bedingt mit den entsprechenden SNHGs (Kufel & Grzechnik, 2019).

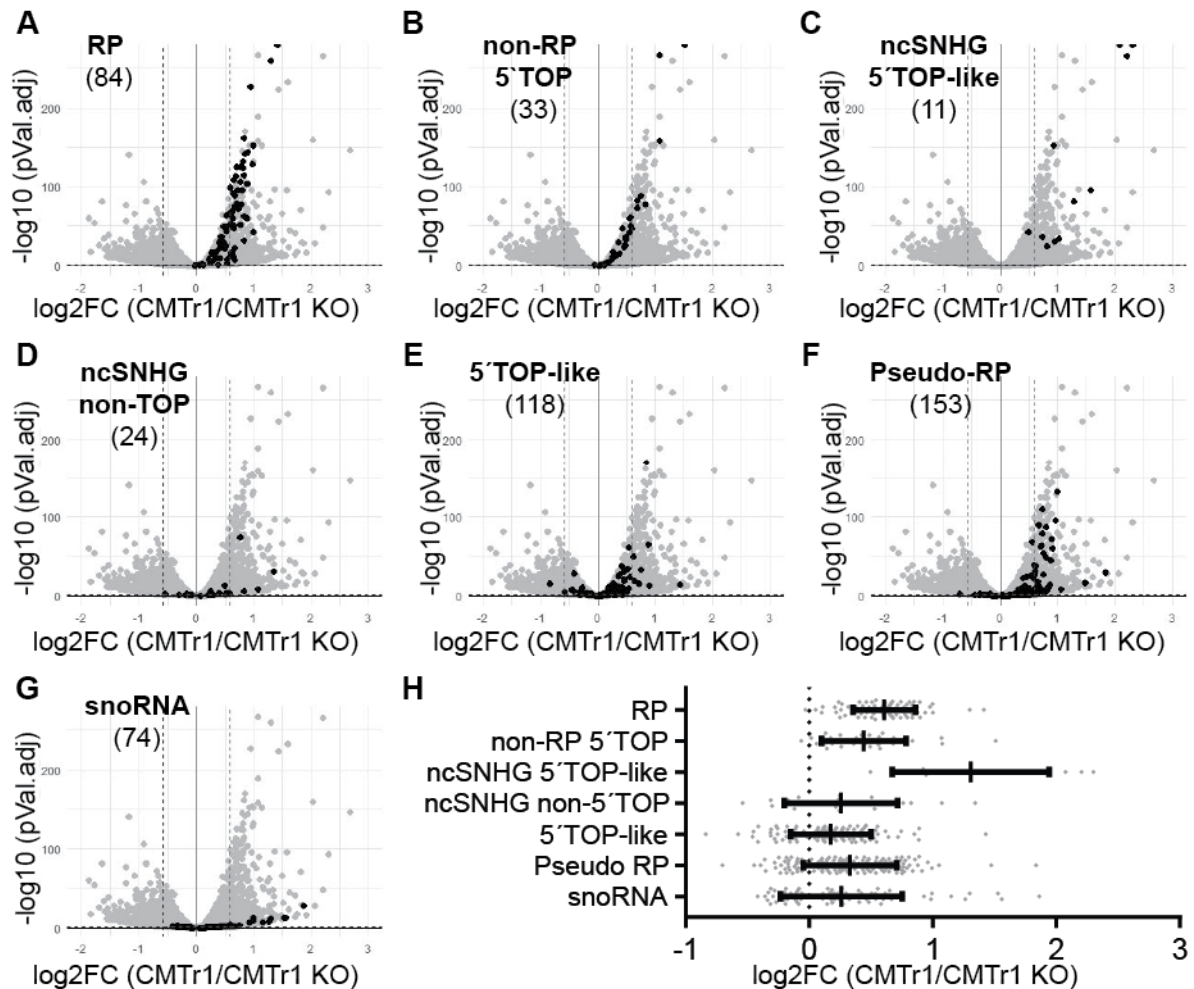


Abbildung 26: RP-RNA, 5' TOP-RNA, SNHG und snoRNA sind in CMTr1-KO-Zellen herunterreguliert.

Differentielle Transkriptexpression zwischen „CMTr1-KO#2-pRp-CMTr1“ und „CMTr1-KO#2“ in total-RNA (abgekürzt als CMTr1/CMTr1-KO). A-H), dargestellt als Volcanoplots. Die Transkripte wurden, basierend auf publizierten Daten, in nicht überlappenden Gruppen geordnet und analysiert. Die Gruppen sind mRNA ribosomaler Proteine (RP) (A), nicht-RP mRNA mit 5' TOP-Motiv (non-RP 5' TOP) (B), nicht-kodierende SNHG mit TOP-Score >3 (ncSNHG 5' TOP) (C) und mit TOP-Score <3 (ncSNHG non-TOP) (D), andere Transkripte mit TOP-Score >3 (5' TOP like) (E), Transkripte von ribosomalen Pseudogenen (pseudo-RP) (F) und snoRNA (snoRNA) (G). Transkripte der Gruppe sind als schwarze Punkte, alle übrigen Transkripte als graue Punkte dargestellt. Die Anzahl der Transkripte der Gruppe ist in Klammern unter dem Gruppennamen angegeben. Die Hilfslinien markieren  $\log_2\text{FC} = -0,586$  und  $0,586$  sowie  $-\log_{10}(\text{pVal.adj}) = 1,311$  (entspricht  $\text{pVal.adj}$  von 0,05). H) Darstellung des  $\log_2\text{FC}$  der Gruppen als Scatter Dot Plot (Median mit Interquartilsabstand).

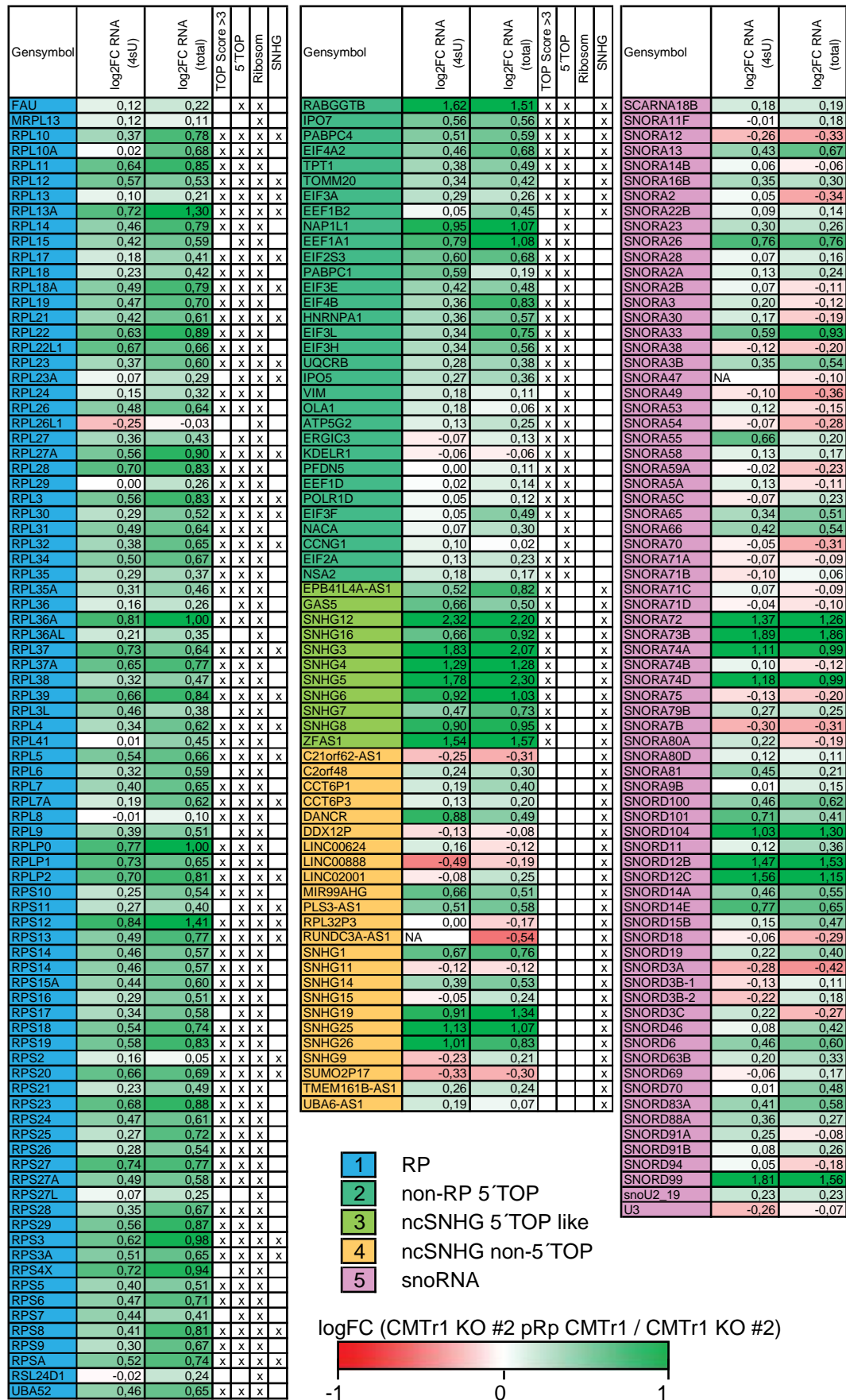


Abbildung 27: Überblick der Regulation der einzelnen Transkripte der Gruppen RP, non-RP 5'TOP, ncSNHG.

Differentielle Expression ausgewählter Transkripte zwischen „CMTr1-KO#2-pRp-CMTr1“ und „CMTr1-KO-#2“ in total-RNA und 4sU-RNA. Angegeben ist die log<sub>2</sub>FC einzelner Transkripte in 4sU und total-RNA, dies ist zusätzlich durch eine Farbskala visualisiert. Die Transkripte sind nach Zugehörigkeit der zuvor definierten Gruppen in RP, non-RP 5'TOP, ncSNHG 5'TOP, ncSNHG non 5'TOP und snoRNA eingeteilt. Für die einzelnen Transkripte ist angegeben, ob es folgende Kriterien erfüllt: Errechneter 5'TOP-Score >3, Mitglied der validierten 5'TOP (5'TOP), Mitglied der Proteinfamilie „Ribosom“ (Ribosom), Mitglied der SNHG (SNHG).

Abbildung 27 zeigt die differentielle Transkriptexpression von einzelnen Transkripten der Gruppen RP, non-RP 5'TOP, ncSNHG 5'TOP, ncSNHG non-5'TOP und snoRNA. Da einzelne Attribute (z. B. 5'TOP und SNHG) häufig gemeinsam auftreten, sind für die einzelnen Transkripte neben der Gruppenzugehörigkeit die Attribute „5'TOP-Score>3“, „5'TOP“, „SNHG“ und „Ribosom“ separat angegeben. Nahezu alle Transkripte der Gruppen RP- und ncSNHGs 5'TOP-Transkripte sind in CMTr1-KO-Zellen gleichförmig reduziert. Innerhalb der Mitglieder der RP-Gruppe gibt es keine offensichtlichen Unterschiede basierend auf dem Attribut „SNHG“. Die anderen Gruppen zeigen im Durchschnitt die gleiche Tendenz wie RPs, sind aber weniger stark uniform reguliert.

Zur Validierung der Ergebnisse wurden die relativen Expressionslevel von ausgewählten Zielgenen durch qPCR analysiert. In RNA aus unbehandelten Zelllinien wurde die relative Transkriptexpression von ribosomalen Proteinen (RPS12, RPL13A, RPL10, RPS8, RPS23, RPLP10), Elongationsfaktoren (EEF1A), nicht-kodierenden SNHGs (SNHG8, SNHG19, SNHG12), snoRNAs (SNORA24, SNORD99) sowie Phospholipase C Eta 1 (PLCH1) bestimmt (Abbildung 28). PLCH1 wurde durch RNA-Seq als ein in CMTr1-defizienten Zellen reduziertes Transkript identifiziert. PLCH1 ist nicht, wie die anderen getesteten Gene, unmittelbar an der Translationsmaschinerie beteiligt und ist weder 5'TOP noch ein SNHG. Alle getesteten Gene sind in CMTr1-KO-Zellen verglichen mit wt-Zellen signifikant reduziert.

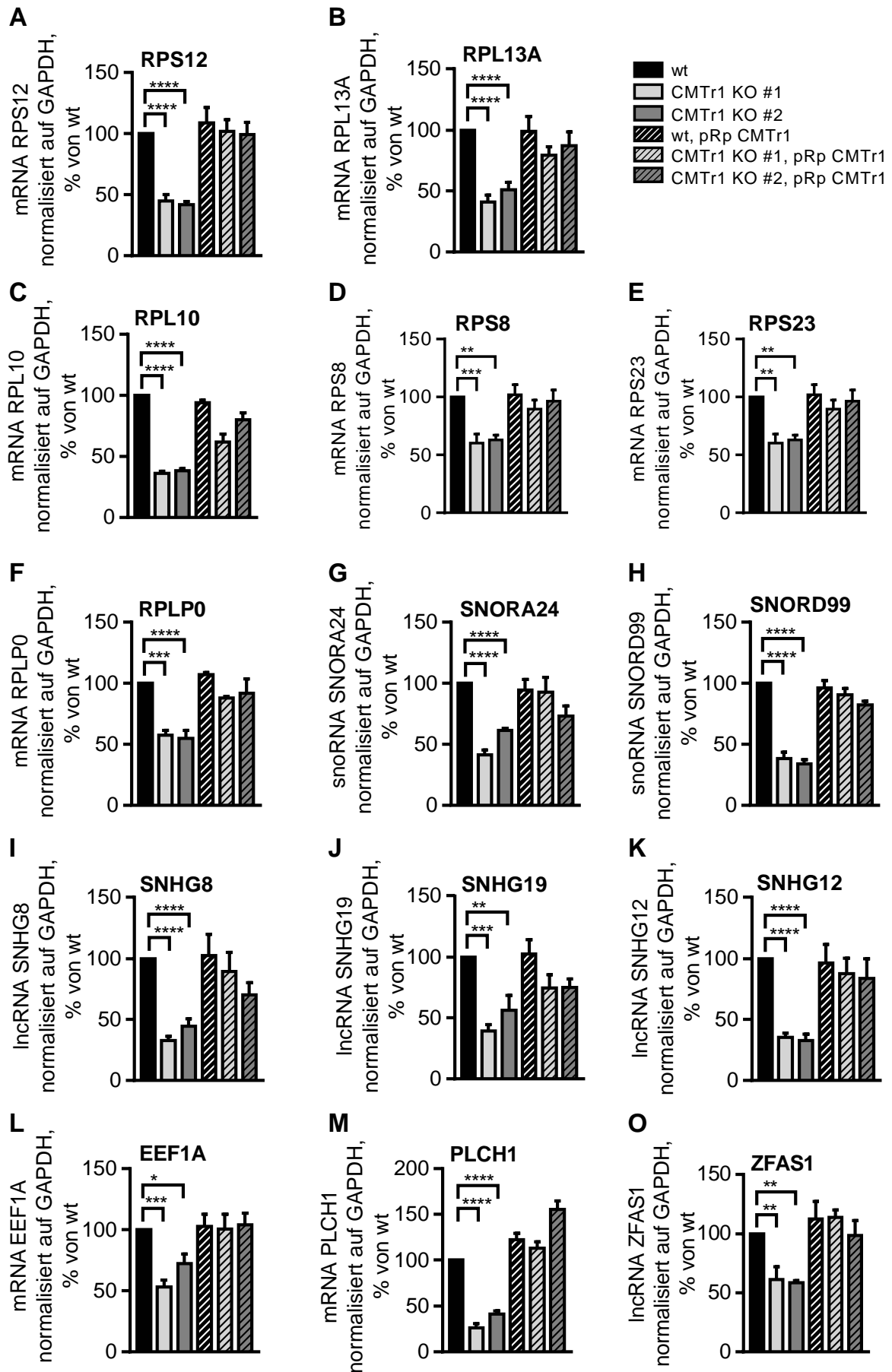


Abbildung 28: Validierung der differentiell regulierten Gene.

qPCR-Analyse von RNA aus unbehandelten Zellen. Die relativen Transkriptmengen von RPS12 (A), RPL13A (B), RPL10 (C), RPS8 (D), RPS23 (E), RPLP0 (F), SNORA24 (G), SNORD99 (H), SNHG8 (I), SNHG19 (J), SNHG12 (K), EEF1A (L), PLCH1 (M) und ZFAS1 (O), jeweils normalisiert auf GAPDH, wurden durch qPCR ermittelt. (n=4, Mittelwert + SEM).

#### 4.11. Proteomanalyse der CMTr1-KO-Zellen

Neben der oben beschriebenen Transkriptomanalyse durch RNA-Seq sollten auch die durch CMTr1 vermittelten Effekte auf die Proteinexpressions-Landschaft analysiert werden (Proteomanalyse). Dazu wurden die relativen Proteinlevel proteomweit durch Massenspektrometrie quantifiziert (*label free quantification* (LFQ)). Die Massenspektrometrie und bioinformatische Auswertung wurde von Alexey Stukalov (AG Pichlmair, Institut für Virologie, TU München) durchgeführt.

Dazu wurde die differentielle Proteinexpression zwischen den Zelllinien CMTr1-KO#2-pRp-CMTr1 und CMTr1-KO#2 ermittelt. Von den insgesamt 7590 durch LFQ identifizierten und quantifizierten Proteinen waren 48 Proteine differentiell ( $p_{\text{Val.adj}} < 0,05$ ,  $\text{Log}_2\text{FC} > 1$  oder  $< -1$ ) reguliert (Anhang 6.2)

Durch GO-Enrichment der Proteomanalyse-Daten konnten keine differentiell regulierten Proteinfamilien identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Unter den differentiell exprimierten Proteinen waren keine RPs. Im Volcanoplot zeigte sich jedoch eine geringe, aber uniforme Reduktion der RPs in CMTr1-KO-Zellen (Abbildung 29).

Wie erwartet wurde CMTr1 als das am stärksten differentiell exprimierte Protein identifiziert (Abbildung 29). Darüber hinaus wurde in CMTr1-KO-Zellen eine starke Reduktion der Proteinexpression von *Nuclear Valosin-Containing Protein-Like 2* (NVL2) gemessen.

NVL2 spielt eine wichtige Rolle in der Ribosomenbiogenese (Hiraishi et al., 2018b; LaCava et al., 2005; Yoshikatsu et al., 2015). Daher war NVL2 ein hochinteressanter Kandidat für die CMTr1-vermittelten Effekte auf die Transkriptlevel von RPs, SNHGs und snoRNA (siehe Kapitel 4.10) und wurde im Folgenden näher untersucht.

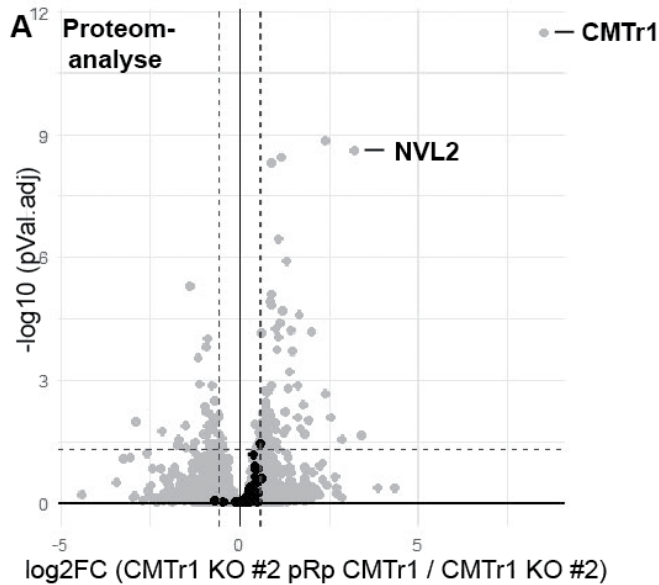


Abbildung 29: Proteomanalyse durch Massenspektrometrie (LFQ).

Analyse der differentiellen Proteinexpression von „CMTr1-KO#2-pRp-CMTr1“ und „CMTr1-KO#2“ durch Massenspektrometrie (LFQ). Ribosomale Proteine (RP) sind als schwarze Punkte, alle übrigen Transkripte als graue Punkte dargestellt. Die Datenpunkte der Proteine CMTr1 und NVL2 sind gekennzeichnet. Die gestrichelten Hilfslinien markieren  $\log_2FC = -0,586$  und  $0,586$  sowie  $-\log_{10}(pVal.adj) = 1,311$  (entspricht  $pVal.adj$  von  $0,05$ ).

#### 4.12. CMTr1-abhängige Effekte auf die Expression von NVL2

Um die Ergebnisse der Proteomanalyse zu validieren, wurde die relative Proteinexpression von NVL2 im Westernblot bestimmt. In CMTr1-defizienten Zellen waren die relativen Proteinlevel von NVL2 stark und signifikant reduziert (Abbildung 30).

Daraufhin wurde die Expression von NVL2 auf Transkriptebene in den RNA-Seq Daten genauer analysiert: Im Gegensatz zu der starken Regulation auf Proteinebene zeigte NVL2 in total-RNA eine signifikante, vergleichsweise aber nur moderate Reduktion in CMTr1-defizienten Zellen. Interessanterweise war NVL2 in neusynthetisierter RNA (4sU) weniger stark verändert. Der Unterschied zwischen total- und 4sU-RNA Expressionsleveln von NVL2 zeigt eine reduzierte Halbwertszeit der NVL2-Transkripte in CMTr1-defizienten Zellen.

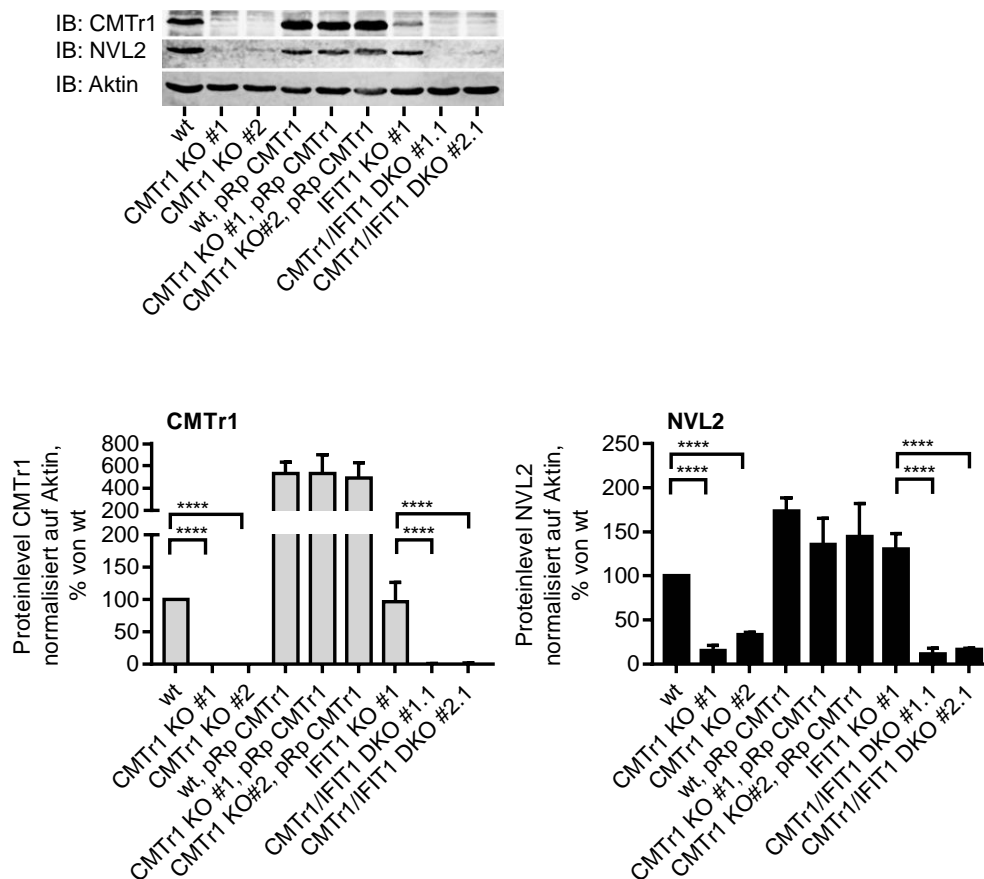


Abbildung 30: Relative Proteinexpression von NVL2 und CMT1.

Unbehandelte Zellen wurden im Westernblot auf die Expression von CMT1 und NVL2 untersucht. A) Repräsentatives Experiment. B+C) Quantifizierung der relativen Proteinlevel von CMT1 (B) und NVL2 (C), normalisiert auf Aktin, in % von wt (n=4, Mittelwert + SEM).

NVL2 Expression					
CMT1-kompetente Zelllinie	/	CMT1-defiziente Zelllinie	RNA	log2FC	pVal.adj
CMT1-KO#1-pRp-CMT1	/	CMT1-KO#1	total	0,9695697	2,742E-102
			4sU	0,0793311	0,39717554
wt	/	CMT1-KO#1	total	0,9429434	2,2072E-46
			4sU	0,2192651	0,01532404
CMT1-KO#2-pRp-CMT1	/	CMT1-KO-#2	total	0,6890537	4,5889E-46
			4sU	-0,134074	0,01891839
wt	/	CMT1-KO-#2	total	0,5296395	1,9141E-14
			4sU	-0,221963	0,01576853

Tabelle 4: Differentielle Expression von NVL2 zwischen verschiedenen CMT1-kompetenten und -defizienten Zelllinien.

RNA-Seq Daten der differentiellen Transkriptexpression von NVL2 zwischen den angegebenen Vergleichspaaren (siehe Kapitel 4.10.1, Tabelle 2).



Um mögliche Ursachen der veränderten Transkriptlevel und Stabilität von NVL2 aufzuklären, wurde der NVL2-Genlocus näher untersucht. Es sind zwei proteinkodierende Isoformen von NVL2 beschrieben (Nagahama et al., 2004). Die dominante, 858 Aminosäuren lange NVL2-Isoform wird durch das Transkript *NVL-201* kodiert und hat 23 Exons. Damit entspricht die Isoform *NVL-201* der im Westernblot detektierten Proteingröße und wird im Folgenden als Grundlage der Nomenklatur der Intron-Exon-Struktur von NVL2 genutzt.

Das zweite proteinkodierende Transkript *NVL-203* kodiert für die kürzere Isoform von NVL2 (750 Aminosäuren). *NVL-201* und *NVL-203* unterscheiden sich durch eine alternative Inkorporation von Exon 2. In *NVL-203* wird Exon 1 direkt an Exon 3 gespleißt, Exon 2 wird übersprungen (Exonskipping).

Die Analyse der *read*-Lesedichte über den genomischen Locus von NVL2 zeigte keine CMTr1-abhängige Veränderung der Inkorporation von Exon 2 (Daten nicht gezeigt), interessanterweise aber von Exon 8. Die Lesedichte von Exon 8 war in CMTr1-defizienten Zellen verglichen mit den CMTr1-kompetenten Zellen sowohl in total-RNA als auch in der 4sU-RNA deutlich reduziert (

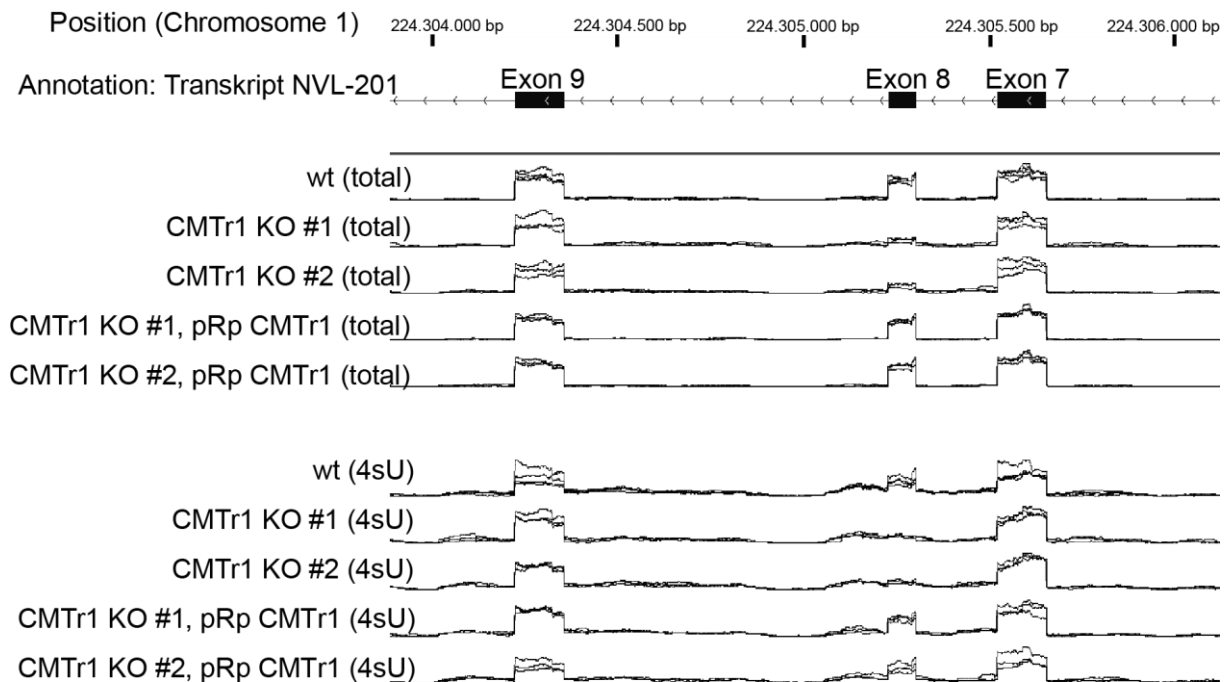


Abbildung 31).

Ein NVL2-Transkript mit Exonskipping von Exon 8 – im Folgenden *NVL2-Δ8* genannt – ist in der Literatur bislang nicht beschrieben. In der Annotation von NVL2 durch

ENSEMBLE-Annotierung wird allerdings eine hypothetische, nicht experimentell bestätigte Spleißvariante mit Exon 8 Exonskipping vorausgesagt (*NVL-208*).

Basierend auf der Sequenz von *NVL-201* würde ein Exonskipping von Exon 8 zu einer Leserasterverschiebung und einem vorzeitigen Stopkodon führen, was in einem 296 Aminosäuren langem, trunziertem Proteinprodukt resultieren würde. Da das *NVL2-Δ8*-Transkript 3' des Stopkodons weitere Spleißstellen aufweist, könnte es durch *non-sense mediated decay* (NMD, siehe Kapitel 2.2.3.1) degradiert werden. Dies steht im Einklang mit der in RNA-Seq beobachteten reduzierten Stabilität der *NVL2*-Transkripte in *CMTr1*-KO-Zellen (siehe Tabelle 4).

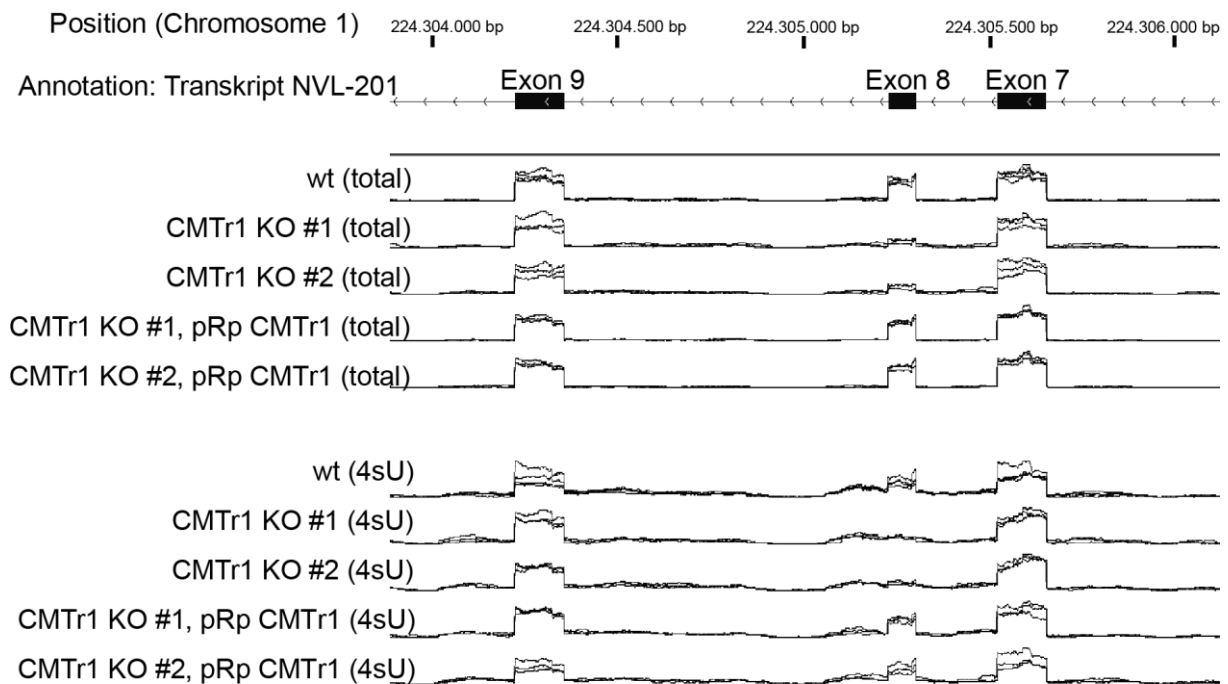


Abbildung 31: Analyse der *read*-Lesedichte im *NVL2*-Genlokus.

Darstellung der *read*-Lesedichte eines Teilstücks des *NVL2*-Genlokus (Chromosom 1, 224.304.000-224.306.000, annotiert mit Transkript *NVL-201* Exon 7-9) basierend auf den RNA-Seq Daten. Die Abbildung wurde mit Integrated Genome Viewer (IGV) erstellt, gezeigt ist die überlagerte *read*-Lesedichte aller Replikate je Zelllinie und Kondition (total und 4sU).

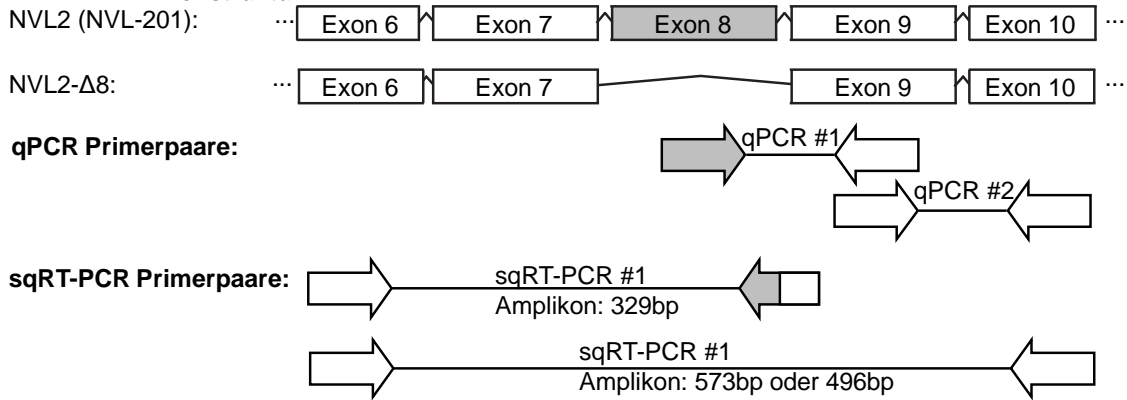
Das *NVL2*-Exonskipping wurde durch qPCR und semiquantitative RT-PCR (sqRT-PCR) in RNA von unbehandelten Zellen bestätigt. In der qPCR wurden Primerpaare verwendet, deren Amplikon entweder in Exon 8-9 oder Exon 9-10 liegt (Abbildung 32A). Die qPCR auf Exon 8-9 weist dabei nur korrekt gespleißtes *NVL2* (*NVL-201*)

nach, während die qPCR auf Exon 9-10 – unabhängig von Exon 8 – alle NVL2 Transkripte nachweist (Gesamt-NVL2). Während die Transkriptlevel von korrekt gespleißtem NVL2 in CMTr1-KO-Zellen verglichen mit wt-Zellen signifikant und stark reduziert war, war die Gesamt-NVL2-Transkriptlevel nur moderat reduziert (Abbildung 32B).

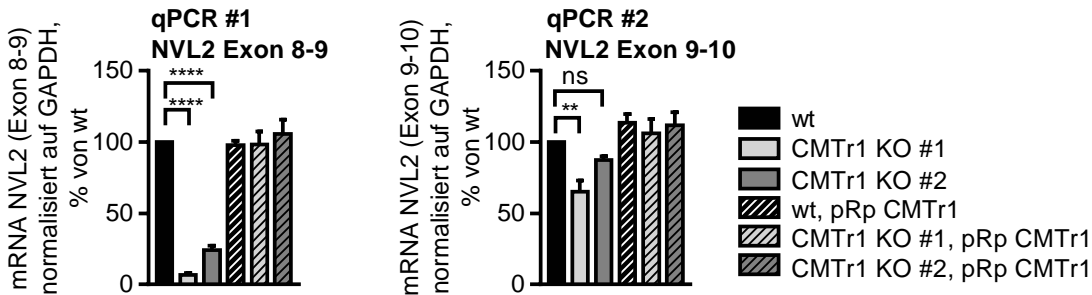
Die Ergebnisse wurden durch sqRT-PCR bestätigt. Mit dem Primerpaar sqRT-PCR#1 wurde eine Reduktion von korrekt gespleißtem NVL2 nachgewiesen.

In sqRT-PCR #2 wurden Primer in Exon 6 und 10 genutzt, um sowohl korrekt gespleißtes NVL2 als auch NVL2- $\Delta$ 8 nachzuweisen und anhand unterschiedlicher Amplikongrößen zu unterscheiden. Dadurch wurde eine Reduktion von korrekt gespleißtem NVL2 (Amplikon 573 bp) und das vermehrte Auftreten von NVL2- $\Delta$ 8 (Amplikon 496 bp) in CMTr1-defizienten Zellen nachgewiesen (Abbildung 32C).

**A NVL2 Exonstruktur:**



**B**



**C**

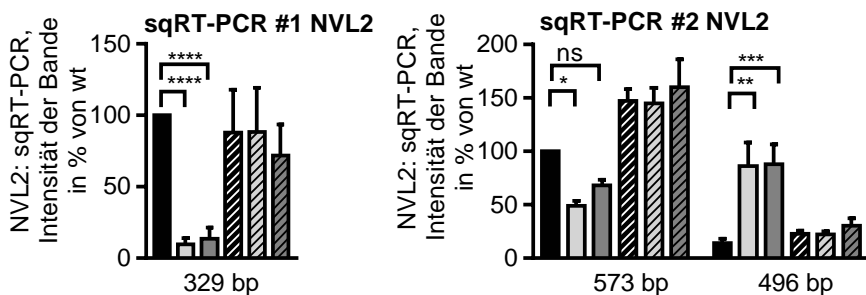
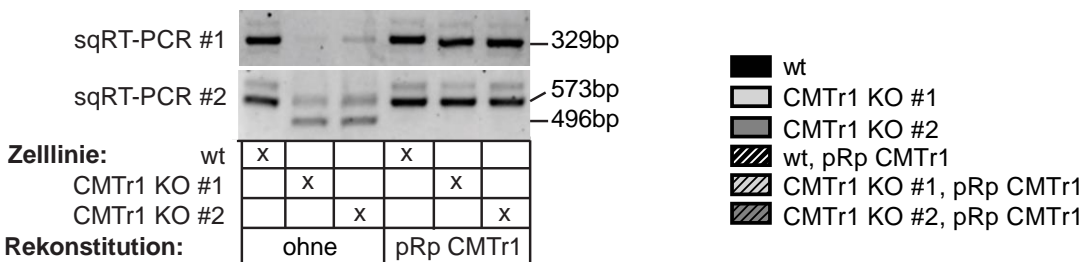


Abbildung 32: Exonskipping von NVL2 Exon 8 in CMTr1-defizienten Zellen.

Detektion von NVL2 Exon 8 Exonskipping in RNA unbehandelter Zellen. A) Schematische Darstellung der NVL2-Spleißvarianten und des Designs der genutzten qPCR und sqRT-PCR-Primer. B) Bestimmung der relativen Transkriptlevel durch qPCR, normalisiert auf GAPDH, in % von wt (n=4, Mittelwert + SEM). C) Repräsentatives Experiment und Auswertung der sqRT-PCR. Dargestellt ist die relative Intensität der Banden in % von wt (n=4, Mittelwert + SEM).

### **4.13. Transiente Überexpression von CMTr1 in CMTr1-defizienten Zellen stellt Spleißen und Proteinproduktion von NVL2 wieder her**

CMTr1 ist ein Multidomänenprotein und interagiert dynamisch mit anderen Proteinen wie RNA Pol II und DHX15 (Inesta-Vaquera et al., 2018; Simabuco et al., 2019; Toczydlowska-Socha et al., 2018). Durch den Verlust von CMTr1 könnten also unabhängig von der Enzymfunktion Interaktionskomplexe gestört und zelluläre Prozesse beeinflusst werden.

Um den Einfluss der Enzymfunktion von CMTr1 auf den beobachteten Phänotyp zu analysieren, wurde eine Mutante von CMTr1 verwendet, die durch einen Aminosäureaustausch von Lysin 239 zu Alanin katalytisch inaktiviert ist (CMTr1-KA) (Bélanger et al., 2010).

Wildtypisches CMTr1 (CMTr1-wt), CMTr1-KA sowie GFP wurden durch Lipofektion mit entsprechenden Expressionsplasmiden (pEF-CMTr1-wt, pEF-CMTr1-KA und pCMV-GFP) in den Zellen transient überexprimiert. 48 h nach der Transfektion wurde die Expression von NVL2 auf Transkript- und Proteinebene ermittelt.

Um den durch die Überexpression vermittelten Effekt zwischen den Zelllinien zu vergleichen, wurden die Daten je Zelllinie auf die GFP-exprimierende Kondition normalisiert. Nur die Überexpression von CMTr1-wt, nicht aber von CMTr1-KA führt zu einem signifikanten Anstieg von korrekt gespleißtem NVL2, Gesamt-NVL2-Transkript sowie NVL2-Protein in CMTr1-KO-Zellen verglichen mit wt-Zellen (Abbildung 33).

Die Proteinlevel von transient überexprimiertem CMTr1-wt und CMTr1-KA waren vergleichbar (Abbildung 33G).

Dies zeigt, dass nur die Überexpression von enzymatisch aktivem CMTr1 in CMTr1-defizienten Zellen das korrekte Spleißen von NVL2 wiederherstellen kann.

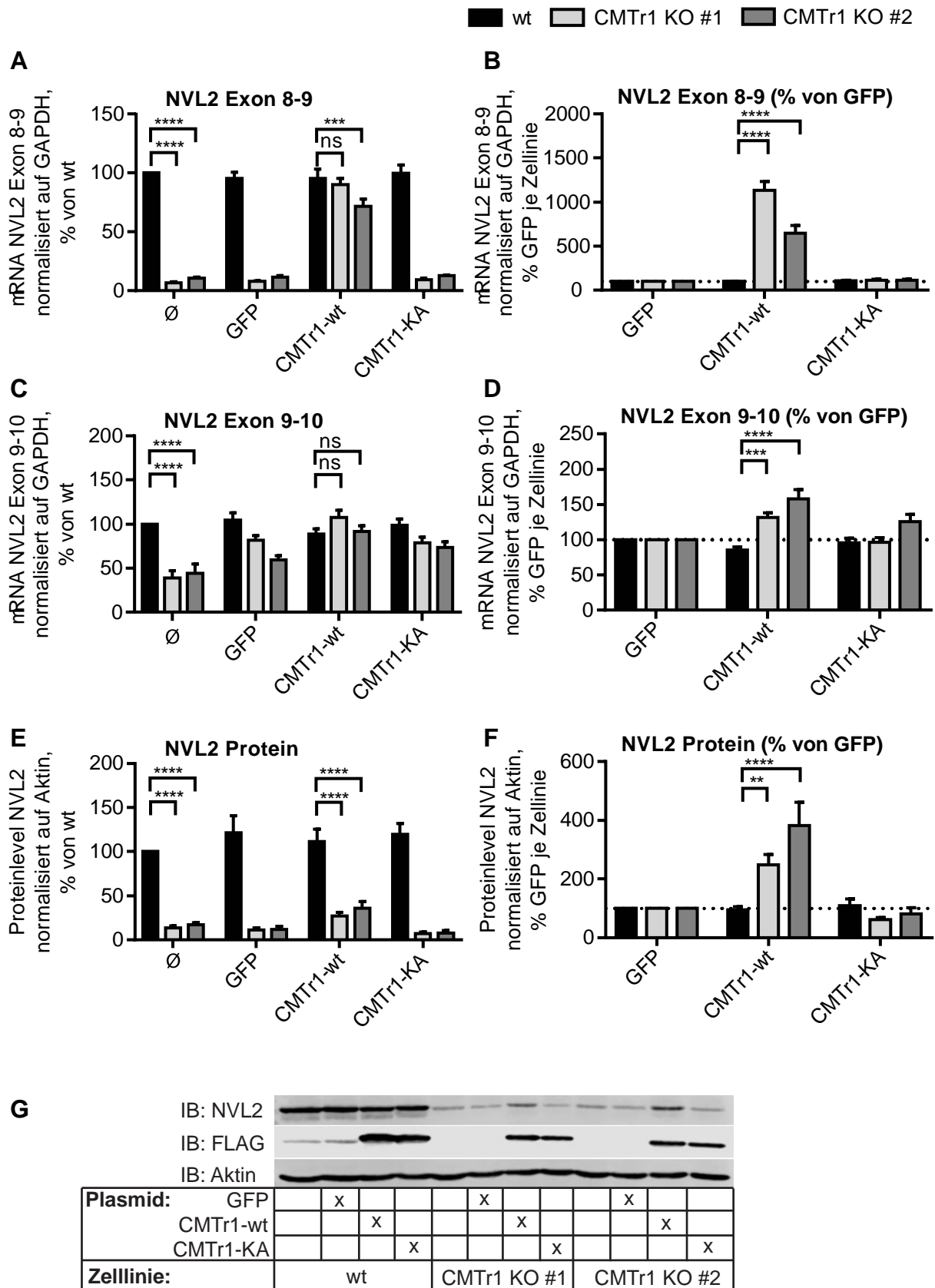


Abbildung 33: Effekt von transienter CMT1-wt- und CMT1-KA-Expression auf NVL2.

Die Zelllinien wt, CMT1-KO#1 und -#2 wurden mit Expressionsplasmiden für CMT1-wt, CMT1-KA und GFP transfiziert und nach 48 h durch qPCR (A-D) sowie Westernblot (E-G) analysiert. Die Daten sind in % von ∅ wt (A, C, E) bzw. in % von GFP je Zelllinie (B, D, F)

dargestellt. A+B) relative Transkriptlevel von korrekt gespeißtem NVL2 (NVL2 Exon 8-9), normalisiert auf GAPDH (n=4, Mittelwert +SEM). C+D) relative Transkriptlevel von Gesamt-NVL2 (NVL2 Exon 9-10), normalisiert auf GAPDH (n=4, Mittelwert +SEM). E+F) relative Proteinlevel von NVL2, normalisiert auf Aktin (n=4, Mittelwert +SEM). G) repräsentativer Immunoblot (IB). Transient überexprimiertes CMTr1-wt und CMTr1-KA besitzen einen FLAG-Epitoptag und wurden durch anti-FLAG IB nachgewiesen. Unspezifische Banden in den ersten zwei Proben im FLAG IB resultieren aus unvollständigem Stripping der Membran nach Detektion von NVL2.

Als Nächstes sollte getestet werden, ob die transiente Überexpression von CMTr1 einen Effekt auf den Cap-Methylierungsstatus der endogenen RNA von CMTr1-KO-Zellen hat. Dazu wurde die RNA der Zellen im MTase-Glo-Assay analysiert.

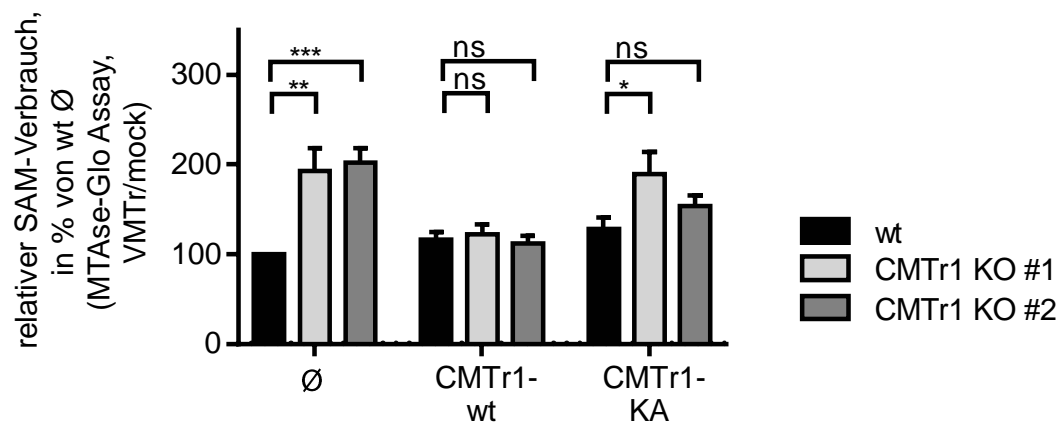


Abbildung 34: Effekt von transienter CMTr1-wt- und CMTr1-KA-Expression auf den Cap-Methylierungsstatus.

Der relative SAM-Verbrauch wurde durch MTase-Glo Assay gemessen (siehe Kapitel 3.2.6.6) und in % von wt Ø angegeben. Es wurden je 2000 ng zelluläre RNA aus unbehandelten Zellen und aus transient CMTr1-wt und CMTR1-KA überexprimierenden Zellen eingesetzt (n=3, Mittelwert + SEM).

Während ein signifikant höherer SAM-Verbrauch in unbehandelten CMTr1-defizienten Zellen im Vergleich zu wt-Zellen gemessen wurde, war nach der Überexpression von CMTr1-wt kein Unterschied detektierbar (Abbildung 34).

Die transiente Überexpression von katalytisch aktivem CMTr1 scheint also ausreichend zu sein, um die Cap1-Generierung in CMTr1-defizienten Zellen wiederherzustellen.

#### **4.14. Die verringerte Expression von NVL2 in CMTr1-defizienten Zellen hat keinen messbaren Effekt auf die rRNA-Prozessierung und die Transkriptlevel von RPs, SNHGs und snoRNA**

Im Folgenden sollten die Effekte der verringerten Expression von NVL2 in CMTr1-defizienten Zellen untersucht werden. In CMTr1-KO#1 und -#2 ist die Menge von korrekt gespleißten NVL2-Transkripten um 93% bzw. 89% und die NVL2-Proteinmenge um 88% bzw. 84% gegenüber wt-Zellen drastisch reduziert (Daten aus Abbildung 33).

NVL2 ist im Nukleolus lokalisiert und spielt als Mitglied der AAA-ATPase-Genfamilie eine wichtige Rolle bei der Biogenese von Ribosomen (Kressler et al., 2012).

NVL2 interagiert mit dem nukleolären Exosom und reguliert so die Prozessierung von rRNA und snoRNA (Hiraishi et al., 2018; LaCava et al., 2005; Yoshikatsu et al., 2015). Von Nahagama et al. wurde die NVL2-Funktion mittels katalytisch inaktiven NVL2-Mutanten untersucht (Nagahama et al., 2004). Die Expression von katalytisch inaktivem NVL2 führt zu Defekten in der Maturierung der 60S ribosomalen Untereinheit und einer verlangsamten Prozessierung der 47S prä-rRNA in 18S, 28S und 5S rRNA (Yoshikatsu et al., 2015). Es konnte von Hiraishi et al. gezeigt werden, dass katalytisch inaktives NVL2 die Spaltung der 47S RNA an der Position (ITS1) inhibiert, wodurch sich die Kinetik der Prozessierung verändert und veränderte Zwischenprodukte auftraten (Hiraishi et al., 2018).

Daher sollte als nächstes die rRNA-Maturierung in den CMTr1-defizienten Zellen durch Northernblot analysiert werden. Im Northernblot werden die entstehenden Zwischen- und Endprodukte der rRNA-Prozessierung nach ihrer Größe aufgetrennt und durch radioaktive Sonden detektiert und quantifiziert. RNA aus unbehandelten wt-, CMTr1-defizienten sowie von pRp-CMTr1-rekonstituierten Zellen wurde isoliert und von Volker Böhm (AG Gehring, Institut für Genetik, Universität Köln) mittels Northernblot analysiert. Es konnte kein Unterschied in der rRNA-Maturierung zwischen den getesteten Zellen detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Dieser Befund deutet darauf hin, dass CMTr1-defizienten Zellen trotz stark verringerten endogenen NVL2-Proteinleveln unter normalen Wachstumsbedingungen keinen Defekt der rRNA-Prozessierung aufweisen.



In Kapitel 4.10 wurde bereits gezeigt, dass CMTr1-defiziente Zellen eine reduzierte Expression von an der Translationsmaschinerie und Ribosomenbiogenese beteiligten Transkripten wie RPs, snoRNAs und SNHGs aufwiesen. Nun sollte getestet werden, ob dieser Effekt direkt durch den Verlust von CMTr1 oder indirekt durch die verringerte Expression von NVL2 vermittelt ist. Dazu wurde der Effekt von transienter CMTr1- bzw. NVL2-Überexpression in den Zellen untersucht.

Neben wildtypischen NVL2 (NVL2-wt) wurde auch eine katalytisch inaktive NVL2-Mutante (NVL2 mit zwei Aminosäureaustauschen von zwei Glutaminsäuren (E365 und E682) zu Glutamin (Q) (NVL2-EQ) eingesetzt (Hiraishi et al., 2018). Zur Überexpression wurden die Expressionsplasmide pLenti-NVL2-wt und pLenti-NVL2-EQ verwendet.

GFP, CMTr1-wt, CMTr1-KA, NVL2-wt oder NVL2-EQ wurde für 48 h transient in Zellen überexprimiert. Anschließend wurde die relative Transkriptmengen verschiedener Transkripte analysiert, deren verringerte Expression in CMTr1-KO-Zellen zuvor beobachtet wurde (Kapitel 4.10.3) (Abbildung 35).

Die GFP-exprimierende Kondition wurde für die Normalisierung verwendet, und die Änderung der relativen Transkriptmengen konnte zwischen den Zelllinien innerhalb der Überexpressionskonditionen verglichen werden. Die transiente Überexpression von CMTr1-wt führt zu einem signifikanten Anstieg der relativen Transkriptmengen von RPS12, PLCH1 und snoRNA24 in CMTr1-defizienten Zellen verglichen mit wt-Zellen (Abbildung 35)

Der relative Effekt von katalytisch aktivem zu inaktivem CMTr1 bzw. NVL2 auf die Transkriptlevel in CMTr1-KO-Zellen im Vergleich zu wt-Zellen wurde ermittelt. In den meisten getesteten Transkripten war ein moderater Effekt von CMTr1, nicht aber von NVL2 messbar (Abbildung 35 G). Die kombinierten Ergebnisse aller getesteten Transkripte zeigen einen statistisch signifikanten Effekt auf deren Expression durch Überexpression von CMTr1 verglichen mit NVL2 (Abbildung 35H).

Zusammengefasst kann die Expression von Transkripten, die in CMTr1-KO-Zellen reduziert sind, durch die transiente Überexpression von CMTr1, nicht aber von NVL2, zu einem gewissen Grad rekonstituiert werden.

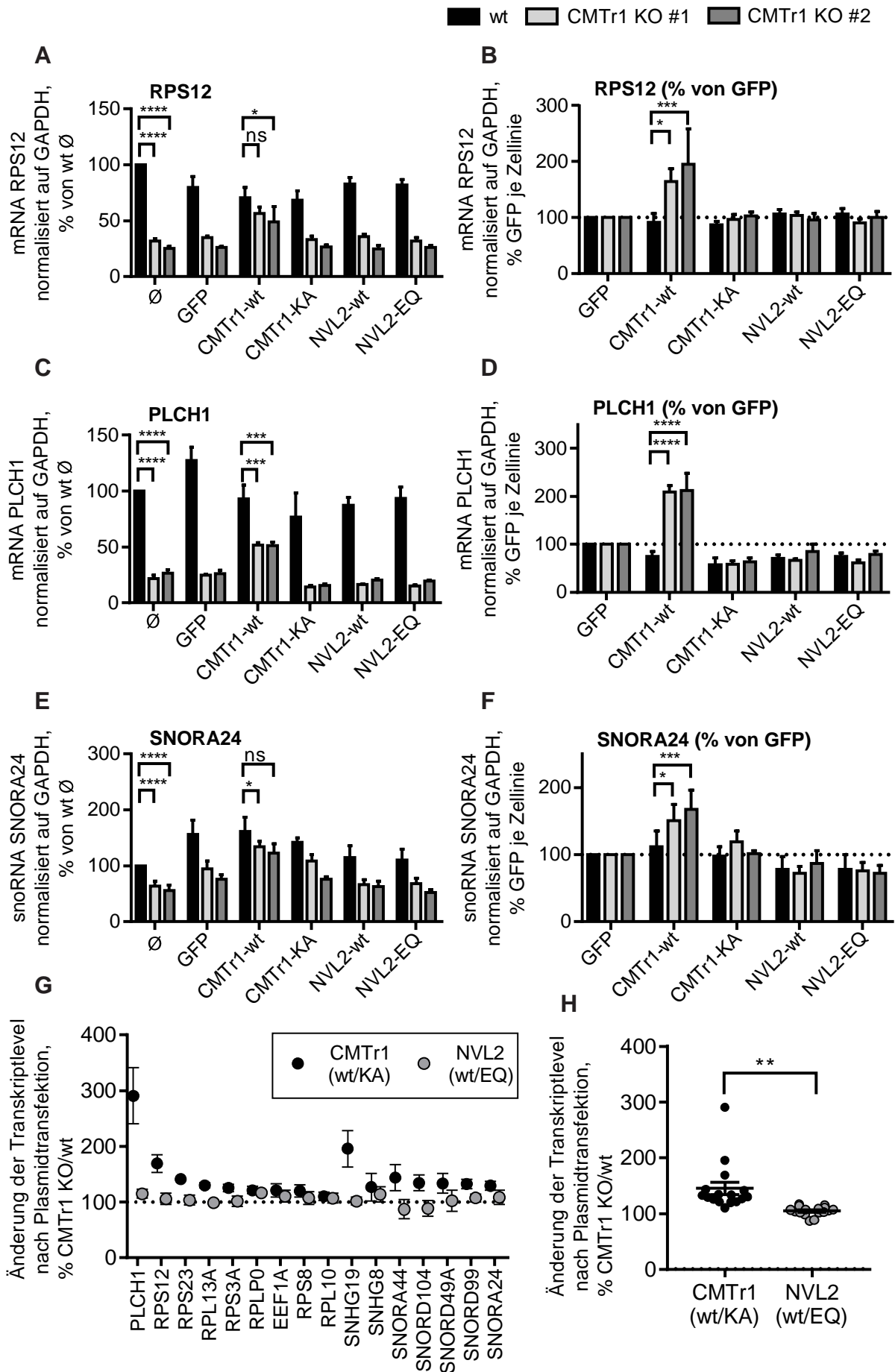


Abbildung 35: Effekt von transienter CMTr1- und NVL2-Expression auf die Expression von Transkripten, die in CMTr1-defizienten Zellen reduziert sind.

Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für CMTr1-wt, CMTr1-KA, NVL2-wt, NVL2-EQ und GFP transfiziert. Nach 48 h wurde die RNA extrahiert und die relative Expression der angegebenen Transkripte durch qPCR analysiert und auf GAPDH normalisiert (n=4, Mittelwert + SEM). Die Daten sind in % von  $\emptyset$  wt (A, C, E) bzw. in % von GFP je Zelllinie (B, D, F) angegeben. G) Analyse der relativen Änderung der Transkriptlevel durch CMTr1- und NVL2-Überexpression in Abhängigkeit vom CMTr1-Status der Zelle. Dargestellt ist der Quotient der relativen Transkriptlevel zwischen katalytisch aktivem und inaktivem Transgen (CMTr1-wt/CMTr1-KA bzw. NVL2-wt/NVL2-EQ) in CMTr1-defizienten Zellen (CMTr1-KO #1 und #2) in % von wt-Zellen. H) Statistische Analyse der Effekte von CMTr1 und NVL2 über alle in G getesteten Transkripte.

#### **4.15. Die Inhibition von CDKs führt in CMTr1-defizienten Zellen zu verstärkter Zytotoxizität**

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die Regulation der mRNA-Transkriptionsmaschinerie in CMTr1-defizienten Zellen verändert ist. Dazu wurde die Zytotoxizität von verschiedenen CDK-Inhibitoren gemessen.

CDKs regulieren den Transkriptionszyklus durch dynamische Phosphorylierung der Serine 2, 5 und 7 in der RNA Pol II CTD. Von besonderem Interesse waren dabei CDK7 und CDK9, die katalytischen Komponenten des TFIIH- beziehungsweise des P-TEFb-Komplexes. Durch die von CDK7 katalysierte Serin 5 Phosphorylierung wird die Transkription initiiert und die Cappingmaschinerie an RNA Pol II rekrutiert. Durch Phosphorylierung von Serin 2 durch CDK9 wird die Promotor-proximale Pausierung gelöst und die Translation geht in die Elongationsphase über (siehe Kapitel 2.2.1). Die CDK-Inhibitoren THZ1, Flavopiridol und Dinacilib wurden zur Testung in CMTr1-defizienten Zellen ausgewählt.

THZ1, ein selektiver Inhibitor von CDK7, inhibiert das Capping von Transkripten und verursacht Defekte in der Promotor-proximalen Pausierung, wodurch auch jene Transkripte in die Elongationsphase übergehen, die kein m7G-Cap besitzen (Nilson et al., 2015). Im Gegensatz dazu führt die Inhibition von CDK9 durch Inhibitoren wie Flavopiridol zur Arretierung des Transkriptionskomplexes in der Promotor-proximalen Pausierung und blockiert dadurch die Transkription (S.-H. Chao & Price, 2001). Flavopiridol hat die höchste Spezifität für CDK9, inhibiert daneben aber auch andere CDKs (R. D. Martin et al., 2020). Dinacilib ist ein hochpotenter Inhibitor von verschiedenen CDKs, unter anderem CDK7 und CDK9 (Paruch et al., 2010).

Die Zellen wurden direkt nach dem Aussäen mit Inhibitoren versetzt und nach 7 Tagen die Zellviabilität durch einen MTT-Assay ausgelesen. CMTr1-defiziente Zellen reagieren sensibler auf die Inhibition der CDKs, insbesondere durch die Inhibition von CDK7 durch THZ1 (Abbildung 36).

Es liegt daher nahe zu spekulieren, dass der Verlust von CMTr1 einen negativen Einfluss auf die Transkriptionsregulation hat.

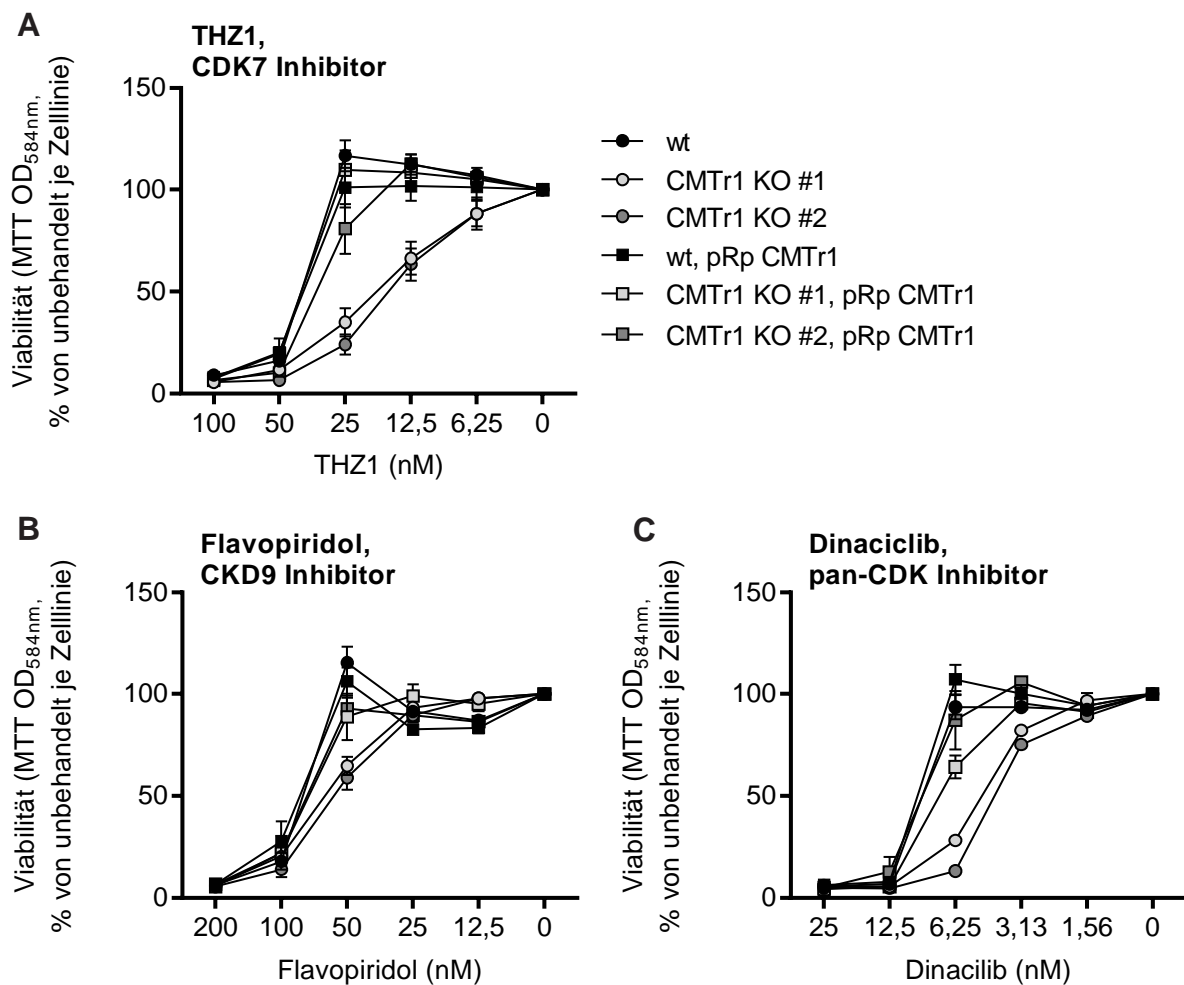


Abbildung 36: Analyse der Zytotoxizität von CDK-Inhibitoren.

In 96-*well*-Platten wurden 5.000 Zellen pro *well* ausgesät, mit verschiedenen Konzentrationen der angegebenen Inhibitoren behandelt und nach 7 d mittels MTT-Assay analysiert. Die OD<sub>584nm</sub> Werte sind in % der unbehandelten Kontrolle je Zelllinie angegeben (n=3-6, Mittelwert + SEM).

## 4.16. Der Einfluss von cMyc und p53 auf den Phänotyp CMTr1-defizienter Zellen

Da die transiente Überexpression von NVL2 in CMTr1-defizienten Zellen nicht ausreichte, um die reduzierten Transkriptlevel von z. B. RP-mRNA wiederherzustellen, wurde nach möglichen anderen Ursachen für diesen Effekt gesucht. Aus der Literatur wurden die Gene cMyc und p53 als mögliche Kandidaten identifiziert.

### 4.16.1. cMyc

Der Transkriptionsfaktor cMyc ist ein positiver Regulator der Ribosomenbiogenese und der Proteinsyntheserate. cMyc hat einen positiven Einfluss auf Transkription und mRNA-Capping (Cole & Cowling, 2009; Dunn & Cowling, 2015; Lombardi et al., 2016). Viele der von cMyc induzierten Zielgene sind an der Ribosomenbiogenese beteiligt, darunter RPs, snoRNAs und rRNA (Campbell & White, 2014; Romano et al., 2017; van Riggelen et al., 2010). Die Expression von cMyc ist sowohl auf transkriptionaler als auch auf translationaler Ebene streng reguliert (Kalkat et al., 2017; Wall et al., 2008).

Die Analyse der differentiellen Expression von cMyc im RNA-Seq Datensatz zeigt, dass cMyc in CMTr1-defizienten Zellen weniger stark exprimiert ist (Tabelle 5). Dieser Effekt konnte durch eine qPCR in RNA aus unbehandelten Zellen nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Es konnte daher keine klare Aussage zu der Bedeutung von cMyc auf den Phänotyp der CMTr1-defizienten Zellen abgeleitet werden.

cMyc Expression					
CMTr1-kompetente Zelllinie	/	CMTr1-defiziente Zelllinie	RNA	log2FC	pVal.adj
CMTr1-KO#1-pRp-CMTR1	/	CMTr1-KO#1	total	0,3972553	5,0986E-15
			4sU	0,538549	4,5851E-11
wt	/	CMTr1-KO#1	total	1,0552828	3,0162E-65
			4sU	0,7694007	0,00010557
CMTr1-KO#2-pRP-CMTr1	/	CMTr1-KO#2	total	0,5460895	2,7229E-41
			4sU	0,4716666	5,6234E-07
wt	/	CMTr1-KO#2	total	0,4276925	2,5231E-13
			4sU	0,4279498	0,04119564

Tabelle 5: Differentielle Expression von cMyc zwischen verschiedenen CMTr1-kompetenten und -defizienten Zelllinien.

RNA-Seq-Daten der differentiellen Transkriptexpression von cMyc zwischen den angegebenen Vergleichspaaren (siehe Kapitel 4.10, Tabelle 2).

#### **4.16.2. p53 und die nukleoläre Stressantwort**

Die Funktion des Tumorsuppressors p53 ist zentral für die DNA-Reparatur, der Induktion des Zellzyklusarrestes und der Apoptose.

Auch die Inhibition der Ribosomenbiogenese führt zur Aktivierung von p53 (Golomb et al., 2014). Der Nukleolus ist nicht nur Ort der Ribosomenbiogenese, sondern eine zentrale Schaltstelle der Zelle für die Reaktion auf verschiedene Arten von Zellstress. Die sogenannte nukleoläre Stressantwort führt zur Auflösung des Nukleolus und damit einem Stopp der Ribosomenbiogenese, dadurch wird schlussendlich die durch MDM2 vermittelte Degradation von p53 inhibiert.

Die erhöhten Level von p53 führen zu Zellzyklus-Arrest und Induktion von Apoptose (Golomb et al., 2014). Die nukleare Stressantwort kann durch die direkte Störung der Ribosomenbiogenese, z. B. durch Defekte der an der rRNA-Transkription, -Prozessierung oder -Maturierung beteiligten Faktoren, andererseits auch durch eine große Bandbreite anderer Stressarten, wie DNA-Schäden, Inhibition der Transkription, Translation oder metabolischem Stress ausgelöst werden (Golomb et al., 2014; Takagi et al., 2005; K. Yang et al., 2018).

Während die p53-Menge in der Zelle vor allem auf Proteinebene reguliert ist, kann durch Zellstress die Expression von p53 auch auf Transkriptebene erhöht werden (Golomb et al., 2014; Haronikova et al., 2019; Reisman et al., 2012).

In den durch RNA-Seq generierten Daten zeigte sich keine differentielle Expression von p53 zwischen den Zelllinien (Daten nicht gezeigt).

Die relative Transkriptexpression von p53 wurde durch qPCR in unbehandelten Zellen untersucht. Die Transkriptlevel von p53 waren in CMTr1-KO-Zellen im Vergleich zu wt-Zellen signifikant erhöht.

Darüber hinaus konnten in unbehandelten Zellen keine erhöhten Proteinlevel von p53 und mikroskopisch keine Veränderung der Nukleolusmorphologie nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Ebenso zeigen CMTr1-defiziente Zellen unter normalen Wachstumsbedingungen zwar ein verlangsamtes Wachstum, aber keine Anzeichen von Zellzyklusarrest (Kapitel 4.4).

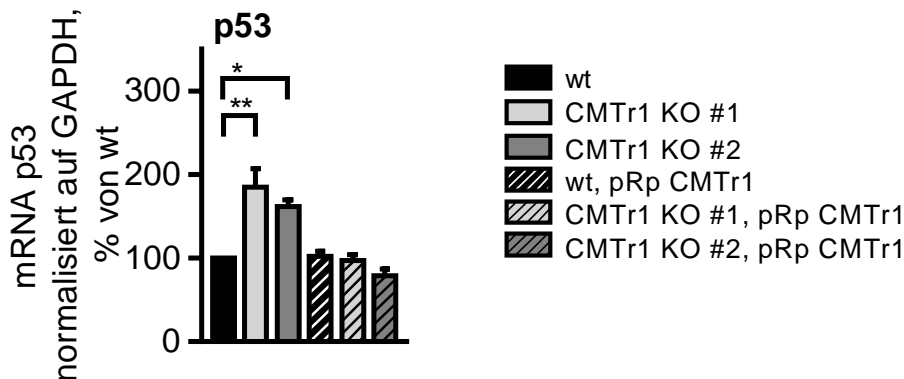


Abbildung 37: Relative Transkriptexpression von p53.

qPCR-Analyse der relativen Transkriptexpression von p53, normalisiert auf GAPDH in % von wt in RNA von unbehandelten Zellen. p53 normalisiert auf GAPDH wurde durch qPCR analysiert (n=4, Mittelwert + SEM).

Abschließend sollte getestet werden, ob CMTr1-defiziente Zellen sensitiver auf Inhibitoren reagieren, die eine nukleoläre Stressantwort auslösen. Dazu wurden der spezifische RNA Pol I Inhibitor CX-5461 zur Inhibition der rRNA-Synthese und der Topoisomerase I Inhibitor Camptothecin zur Induktion von DNA-Schäden eingesetzt.

Die Zellen wurden direkt nach dem Aussäen mit CX-5461 und Camptothecin versetzt und nach 7 Tagen wurde die Zellviabilität durch einen MTT-Assay ausgelesen. Es konnten keine Unterschiede der Sensitivität der Zelllinien auf die Inhibitoren festgestellt werden.

Somit konnte keine klare Beteiligung von p53 und der von p53 gesteuerten nukleolären Stressantwort auf den Phänotyp der CMTr1-defizienten Zellen festgestellt werden.

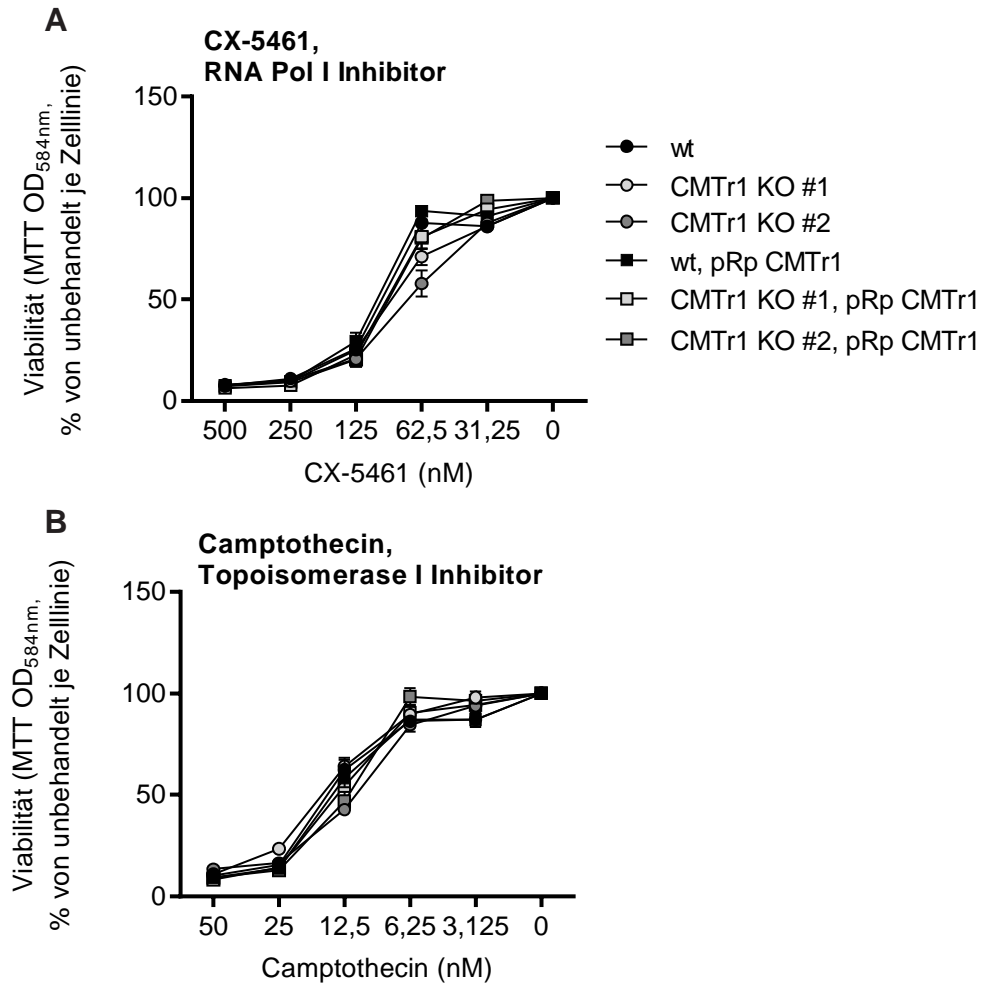


Abbildung 38: Analyse der Zytotoxizität von CX-5461 und Camptothecin.

In 96-*well*-Platten wurden 5.000 Zellen/*well* ausgesät, mit verschiedenen Konzentrationen der angegebenen Inhibitoren behandelt und nach 7 d mittels MTT-Assay analysiert. Die OD<sub>584nm</sub> Werte sind in % der unbehandelten Kontrolle je Zelllinie angegeben (n=6, Mittelwert +SEM).



## **5. Diskussion**

Die Generierung von Cap0-modifizierter endogener mRNA ist in allen Eukaryoten konserviert und stellt eine Grundvoraussetzung für Transkription, Maturierung und Translation dar. Höhere Eukaryoten modifizieren Cap0 weiter zu Cap1. Dies geschieht durch die Enzymfunktion von CMTr1, welche eine Methylierung an der 2´O Position des ersten Nukleotides einfügt. Die Bedeutung der Cap1-Generierung ist – abgesehen von deren Funktion in der antiviralen Immunantwort – weitestgehend ungeklärt.

In dieser Arbeit konnten erstmalig CMTr1-KO-Zelllinien generiert und umfangreich charakterisiert werden. Zudem wurde experimentell bestätigt, dass der Knockout von CMTr1 zu einem Verlust der Cap1-Generierung führt.

Die CMTr1-KO-Zellen zeigen einen komplexen Phänotyp, der sich aus allgemeinen Effekten auf die Zellphysiologie (IFN-unabhängige Effekte) und aus Effekten, die durch Komponenten der antiviralen Immunantwort ausgelöst werden (IFN-abhängige Effekte), zusammensetzt.

Die IFN-abhängigen Effekte werden hauptsächlich durch das IFN-induzierte, antivirale Effektorprotein IFIT1 vermittelt, welches die Cap0-modifizierte, endogene RNA bindet und deren Translation inhibieren kann. Auch eine Aktivierung des PRR RIG-I durch endogene RNA-Spezies in CMTr1-KO-Zellen konnte bestätigt werden.

Die dominantesten IFN-unabhängigen Effekte sind die verringerte Zellgröße und das verlangsamte Wachstum von CMTr1-KO-Zellen. Darüber hinaus konnte in CMTr1-KO-Zellen eine reduzierte Transkriptexpression von Komponenten der Translationsmaschinerie festgestellt werden.

### **5.1. Analyse der biologischen Relevanz der N1-2´O-Methylierung durch CMTr1-KO-Zellen**

#### **5.1.1. Widersprüchliche Hinweise auf die Bedeutung der N1-2´O-Methylierung in publizierten Arbeiten**

Die Effekte des mRNA-Caps sind vor allem durch die Cap-bindenden Faktoren CBC und eIF4E vermittelt. Die Bindung von CBC erfolgt unmittelbar nach der Cappingreaktion und ermöglicht den Übergang in die Elongationsphase der

Transkription, rekrutiert Komponenten der Spleiß- und Polyadenylierungsmaschinerie und vermittelt den Export der maturierten mRNA aus dem Zellkern. Im Zytosol ermöglicht die Bindung des Cap-Bindeproteins eIF4E die Translation der mRNA (siehe Kapitel 2.3.3).

Während die Cap0-Modifikation die Voraussetzung für die Interaktion einer mRNA sowohl mit CBC als auch mit eIF4E ist, zeigen weder CBC noch eIF4E deutliche Unterschiede in der Affinität zwischen Cap0- und Cap1-modifizierter mRNA (Niedzwiecka et al., 2002; Sikorski et al., 2020; Tamarkin-Ben-Harush et al., 2017; Worch et al., 2005).

In einzelnen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Cap1-mRNA verglichen mit Cap0-mRNA zu erhöhter Ribosomen-Bindung und Translation führt (Muthukrishnan et al., 1976, 1978). Die systematische Analyse der Proteinproduktion verschiedener Cap0- und Cap1-modifizierter Reporter-mRNA durch Sikorski et al. zeigt jedoch, dass die Unterschiede in der Proteinproduktion zwischen Cap0- und Cap1-Reporter-mRNA vor allem durch die Art der Zelllinie bestimmt wird. Da Cap0- und Cap1-modifizierte RNA in der Cervixkarzinomzelllinie HeLa keine Unterschiede in ihrer Translation zeigen, Cap1 verglichen mit Cap0 jedoch in immortalisierten dendritischen Zellen (JAWS II) zu einer deutlich erhöhten Proteinproduktion führt, postulieren die Autoren, dass diese Unterschiede auf den Einfluss und die Aktivität von Faktoren zurückzuführen sein könnten, die an der antiviralen Immunantwort beteiligt sind (Sikorski et al., 2020).

### **5.1.2. Generierung und Charakterisierung von CMTr1-KO-Zelllinien**

In der vorliegenden Arbeit konnten in HEK293T-Zellen erfolgreich CMTr1-KO-Einzelzellklone generiert werden. Dies zeigt, dass die N1-2´O-Methylierung, zumindest in HEK293T-Zellen, keine absolut essentielle Rolle für das Überleben spielt. In anderen Zelllinien hingegen schlug die Generierung von lebensfähigen CMTr1-KO-Zellen fehl. Dies erhärtet die Vermutung, dass CMTr1 als konditional essentielles Gen gelten kann.

Warum CMTr1 in HEK293T-Zellen nicht essentiell für das Überleben ist, wurde nicht systematisch untersucht. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass HEK293T-Zellen konstitutiv eine mutierte Form des *SV40 Large T* Antigens (SV40 T-Ag) exprimieren. SV40 T-Ag ist ein Onkogen, das die Aktivität des Tumorsuppressors p53 inhibiert (Ahuja et al., 2005; Jiang et al., 2014).

Da die für die vorliegende Arbeit generierten CMTr1-KO-Zellen eine reduzierte Expression von Komponenten der Translationsmaschinerie aufwiesen, wurde ein CMTr1-abhängiger Effekt auf die p53-abhängige nukleoläre Stressantwort vermutet, der jedoch nicht nachgewiesen werden konnte (Kapitel 4.16.2). Die Inhibition der Funktion von p53 durch SV40 T-Ag in HEK293T-Zellen könnte dennoch dazu beitragen, dass diese den Knockout von CMTr1 überleben.

Weitere Faktoren, die über die Essentialität von CMTr1 entscheiden, könnten Zelllinien-spezifische Expressionsmuster und die Aktivität der Signalwege von Faktoren wie IFIT1 und RIG-I sein, die an der Cap0-Restriktion beteiligt sind. So liegt die Vermutung nahe, dass sich in Zelllinien, die auf die Anwesenheit von Cap0-mRNA mit einer starken RIG-I-Aktivierung reagieren, keine viablen CMTr1-KO-Klone generieren lassen.

Um stabile, monoklonale Knockout-Zelllinien zu generieren, müssen die Zellen nach Transfektion des CRISPR/Cas9-Plasmides vereinzelt werden.

Jede Genomeditorung kann ungeplante Effekte außerhalb der Zielregion auslösen (*off target* Effekte) (X.-H. Zhang et al., 2015). Es ist außerdem beschrieben, dass die Einzelzellkultivierung zur Selektion genetischer Varianten führen kann, die das Zellüberleben begünstigen (Haapaniemi et al., 2018). Insbesondere wenn essentielle Gene ausgeschaltet werden sollen, besteht darüber hinaus ein Selektionsdruck, den Verlust durch kompensatorische, sekundäre Mutationen auszugleichen (Peretz et al., 2018).

Aufgrund dieser Mechanismen können Daten aus Einzelzellklonen nicht vorbehaltlos betrachtet werden und müssen immer kritisch hinterfragt werden. Demgegenüber steht jedoch der enorme Vorteil, dass das Genprodukt dauerhaft und restlos ausgeschaltet wird.

Um Einflüsse potentieller Einzelzellklon-Artefakte zu vermindern, wurden in dieser Arbeit, wo möglich, stets beide generierten CMTr1-KO-Klone in Experimenten eingesetzt. Als weitere Kontrolle wurde die CMTr1-Expression in den KO-Zelllinien durch einen retroviralen Expressionsvektor rekonstituiert. Alle beschriebenen CMTr1-abhängigen Effekte konnten in beiden CMTr1-KO-Klonen gleichermaßen nachgewiesen werden und durch Rekonstitution wieder aufgehoben werden. Auch

die transiente Überexpression von wildtypischen CMTr1, nicht aber von katalytisch inaktivem CMTr1, rekonstituiert den CMTr1-Phänotyp.

In der Literatur wurde die Funktion von CMTr1 bislang vor allem mittels siRNA-basiertem Knockdown (KD) untersucht. Der Phänotyp des CMTr1-KD wurde allerdings bisher nicht umfassend charakterisiert. Diese Studien werden an den entsprechenden Stellen im Kontext der in dieser Arbeit generierten Ergebnisse mit CMTr1-KO-Zellen diskutiert. Allgemein bietet die Nutzung von KD-Strategien eine größere Flexibilität, hat aber aufgrund der begrenzten Effizienz und zeitlich beschränkten Wirkung auch Nachteile.

## **5.2. IFN-abhängige Effekte von CMTr1 und die antivirale Immunantwort**

### **5.2.1. In CMTr1-defizienten Zellen entstehen endogene RIG-I Liganden**

Vorherige Arbeiten unserer Arbeitsgruppe untersuchten die Rolle der Cap1-Struktur für die Erkennung von RNA-Liganden durch den zytosolischen Nukleinsäurerezeptor RIG-I: Während der ideale Ligand für RIG-I triphosphorylierte, doppelsträngige RNA ist, erkennt RIG-I auch Cap0-modifizierte, nicht aber Cap1-modifizierte dsRNA (Schuberth-Wagner et al., 2015; Devarkar et al., 2016). Gelbfieber-Viren, die durch eine Mutation der viralen Methyltransferase nicht in der Lage sind, ihre Transkripte mit Cap1 zu versehen, werden durch den RIG-I-Signalweg verstärkt detektiert und in ihrer Replikation gehemmt (Schuberth-Wagner et al., 2015).

Die Aminosäure Histidin 830 verhindert sterisch die Bindung von RIG-I an Cap1-modifizierte RNA. Eine Mutation dieser Aminosäure erlaubt die Erkennung von endogener Cap1-modifizierter RNA und führt zur Aktivierung des RIG-I-Signalweges. Es konnte gezeigt werden, dass der siRNA-basierte Knockdown von CMTr1 (CMTr1-KD) zu einer leichten RIG-I-Stimulation durch endogene RNA führt (Schuberth-Wagner et al., 2015). Während Li et al. in polyklonalen CMTr1-KO-Experimenten mit A549-Zellen ebenfalls eine leichte RIG-I-abhängige Induktion von IFN- $\beta$ -Transkripten detektieren konnten, zeigte sich in den Versuchen von Williams et al., in denen wiederum ein CMTr1-KD vorgenommen wurde, keine Änderung der basalen Expression von IFN- $\beta$  (Li et al., 2020; Williams et al., 2020).

Analog zu diesen Daten wurden die in der vorliegenden Arbeit generierten monoklonalen CMTr1-KO-Zelllinien ebenfalls auf eine mögliche Aktivierung des RIG-I-Signalweges durch endogene RNA untersucht.

Dabei konnte nur eine leichte Induktion der durch den RIG-I-Signalweg induzierten Transkripte IP10 und IFN- $\beta$  festgestellt werden, die sich aber nicht auf Proteinebene nachweisen ließ. Passend zu diesen Ergebnissen waren die relativen Transkriptlevel der IFN-induzierten Gene (ISGs) wie RIG-I und IFIT1 in CMTr1-defizienten Zellen nicht erhöht. In der Transkriptomanalyse konnte ebenfalls keine Induktion von ISGs nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Somit liegt in unbehandelten CMTr1-KO-Zellen eine dauerhafte, leichte Aktivierung des RIG-I-Signalweges durch endogene RNA vor, die jedoch nicht stark genug ist, um eine messbare IFN-Produktion und infolgedessen eine Induktion von ISGs in den Zellen zu verursachen.

Bisher konnte nicht identifiziert werden, welche endogenen RNA-Spezies in CMTr1-KO-Zellen die RIG-I-Stimulation verursachen. Da endogene mRNA einzelsträngig (ss) ist und RIG-I prinzipiell nicht durch ssRNA aktiviert wird, führt ein Verlust der Cap1-Generierung nicht unmittelbar zur Entstehung von potenten RIG-I-Liganden. Ein möglicher Mechanismus wäre, dass endogene mRNA in CMTr1-defizienten Zellen durch Sekundärstrukturen teilweise doppelsträngige (ds) Sequenzen ausbildet, welche gemeinsam mit der Cap0-Struktur ausreichend sind, um als RIG-I-Ligand zu wirken.

Die Daten in dieser Arbeit und der Literatur zeigen zwar nur eine geringe RIG-I-Stimulation durch endogene RNA in CMTr1-defizienten Zellen; dennoch zeigt dies, dass der Verlust von CMTr1 zu einer Verminderung oder sogar Aufhebung der Selbst-Toleranz von RIG-I gegenüber endogener RNA und somit klinisch zu autoinflammatorischen Krankheitsbildern führen könnte. Ein Beispiel für eine IFN-vermittelte autoinflammatorische Pathologie ist das Aicardi-Goutières-Syndrom, welches unter anderem durch aktivierende Mutationen von MDA5 oder deaktivierende Mutationen von Enzymen wie TREX1, welche zu einer Akkumulation von endogenen Liganden in der Zelle führen, ausgelöst wird. Durch diese Mutationen

wird jeweils eine dauerhafte Produktion von Typ-I-IFN in Abwesenheit von exogenen Liganden ausgelöst (de Jesus et al., 2015).

Im Gegensatz zu den oben erwähnten früheren Arbeiten, die CMTr1 durch polyklonalen Knockout mittels CRISPR/Cas9, beziehungsweise transient durch siRNA-vermittelten Knockdown inaktivieren, sind die Daten in dieser Arbeit in verifizierten CMTr1-KO-Einzelzellklonen entstanden. Dadurch ist sichergestellt, dass CMTr1 dauerhaft ausgeschaltet und keine Cap1-modifizierte endogene RNA mehr in der Zelle vorhanden ist.

Da während der Einzelzellklon-Generierung höchstwahrscheinlich eine negative Selektion das Anwachsen von Klonen, die eine hohe und dauerhafte RIG-I-Aktivierung aufweisen, verhindern würde, wurde die Funktionalität des RIG-I-Signalweges in den generierten Zelllinien mithilfe des exogenen RIG-I-Liganden IVT4 überprüft.

Während keine Unterschiede in der RIG-I-Aktivierung (gemessen als Phosphorylierung von TBK1) und den Transkriptionsleveln der durch RIG-I induzierten Gene festgestellt wurden, zeigten die CMTr1-KO-Zellen im Vergleich zu den wt-Zellen eine deutlich verringerte Translation der durch den RIG-I-Signalweg induzierten Gene: Die Proteinlevel von IP10 und IFN- $\beta$ , sowie der ISGs RIG-I und IFIT1 waren nach RIG-I-Stimulation in CMTr1-KO-Zellen stark reduziert (siehe Kapitel 4.8).

Durch die Nutzung von CMTr1/IFIT1-DKO-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass die verminderte Proteinproduktion nach RIG-I Stimulation in CMTr1-KO-Zellen von IFIT1 vermittelt ist. Die durch IFIT1 vermittelten Effekte werden im folgenden Kapitel diskutiert.

### **5.2.2. Cap1-Generierung durch CMTr1 verhindert die Translationsinhibition von endogener mRNA durch IFIT1**

Der allgemein anerkannte Mechanismus des antiviralen Effektorproteins IFIT1 ist die Bindung und Restriktion der Translation von Cap0-modifizierter viraler RNA. Endogene Cap1-RNA hingegen wird nicht durch IFIT1 gebunden oder in der

Translation beeinflusst (Bartok & Hartmann, 2020; Daffis et al., 2010; Kumar et al., 2014).

Viren nutzen verschiedene Strategien, um der translationalen Inhibition durch IFIT1 zu entgehen. Beschrieben sind unter anderem die Übertragung von Cap1-Strukturen von endogenen Transkripten auf virale Transkripte (Cap-Snatching), die Nutzung viraler 2'-O-Methyltransferasen, virale Proteine, die die Cap0-Struktur der viralen Transkripte maskieren und Sekundärstrukturelemente am 5'-Ende der viralen RNA, die die Bindung von IFIT1 verhindern (Decroly et al., 2011; Fensterl & Sen, 2015; Reynaud et al., 2015a; Szretter et al., 2012).

Die Eingangshypothese, dass CMTr1-defizienten Zellen sensitiv auf die Aktivität von IFIT1 reagieren würde, konnte in dieser Arbeit experimentell bestätigt werden. CMTr1-KO-Zellen zeigen eine dosisabhängige Reduktion der Viabilität nach Behandlung mit IFN. Dieser Effekt ist vollständig von IFIT1 abhängig und tritt in CMTr1/IFIT1-DKO-Zellen nicht auf. Auch die Messung der Translationsaktivität zeigt, dass die IFN-Behandlung eine dosisabhängige, globale Translationsinhibition in CMTr1-KO-Zellen, jedoch nicht in CMTr1/IFIT1-DKO-Zellen, verursacht (siehe Kapitel 4.5 und 4.6).

Durch die Nutzung von Cap0- und Cap1-modifizierter Reporter-RNA konnte gezeigt werden, dass die Translation von Cap0-modifizierter RNA im Vergleich zu Cap1-modifizierter RNA durch IFN-Behandlung in Abhängigkeit von endogenem IFIT1 reduziert wird. Ein vergleichbarer Effekt konnte unabhängig vom IFIT1-Status der Zelle durch Überexpression von murinem IFIT1B erzielt werden (siehe Kapitel 4.7).

Eine kürzlich von Williams et al. publizierte Studie untersuchte den siRNA-vermittelten KD von CMTr1 und dessen Effekte auf die Genexpression von einzelner ISGs. Nach IFN-Behandlung konnten nach 6 h keine Veränderungen in der Transkriptmenge, nach 24 h aber zum Teil reduzierte Proteinlevel der getesteten ISGs in den CMTr1-KD-Zellen nachgewiesen werden. Da die Proteinlevel der getesteten ISGs unterschiedlich stark reduziert waren, postulierten die Autoren einen Einfluss der 5'-Region der Transkripte auf die Translationsinhibition durch IFIT1, dies wurde jedoch nicht experimentell nachgewiesen. Die Autoren konnten keine CMTr1-

abhängigen Effekte auf den nuklearen Export, die RNA-Stabilität und die Polysom-Assoziation der getesteten ISGs feststellen (Williams et al., 2020).

Während der dafür verantwortliche Mechanismus von Williams et al. noch nicht geklärt werden konnte, wurden in der vorliegenden Arbeit zu einem späteren Zeitpunkt die CMTr1-abhängigen, globalen Effekte auf die Viabilität (nach 7 d) und der Translationsaktivität der Zellen (nach 72 h) nachgewiesen und gezeigt, dass diese von IFIT1 vermittelt werden.

Mögliche Effekte der IFN-Behandlung auf einzelne Transkripte wurden in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Nur die Expression von IFIT1 und RIG-I nach IFN-Behandlung wurde ermittelt. Die relativen Proteinlevel von RIG-I und IFIT1 sind nach 72 h IFN-Behandlung in CMTr1-KO-Zellen reduziert. Unter den gleichen experimentellen Bedingungen konnte zu diesem Zeitpunkt eine starke IFN-induzierte, IFIT1-abhängige Translationsinhibition in CMTr1-defizienten Zellen nachgewiesen werden.

Die wahrscheinlichste Erklärung für die reduzierte Proteinexpression von IFIT1 und RIG-I in CMTr1-defizienten Zellen ist, dass durch IFN-Behandlung die Proteinexpression von ISGs wie IFIT1 initial stark induziert wird, steigende IFIT1-Proteinlevel in der Zelle aber anschließend die weitere Translation endogener mRNA, darunter auch der IFIT1-mRNA, inhibieren.

Demnach unterlägen CMTr1-defiziente Zellen einer durch IFN induzierten globalen, aber selbstlimitierenden Translationsinhibition, deren Ausmaß von der IFIT1-Konzentration in der Zelle abhängt, wobei IFIT1 seine eigene Expression durch negative Rückkopplung limitiert. Darüber hinaus könnten mögliche CMTr1-abhängige Effekte der Transkriptionsregulation sowie die Sensitivität einzelner Transkripte auf die IFIT1-vermittelte Translationsinhibition eine Rolle spielen, dies wurde aber nicht gezielt untersucht.

Eine selbstlimitierende Translationsinhibition würde erklären, warum die gemessenen Effekte auf die Translationsaktivität und Viabilität erst zu einem vergleichsweise späten Zeitpunkt (Translationsinhibition nach 72 h, Effekt auf die Viabilität nach 7 d) messbar waren, während eine pharmakologische Inhibition der Translation, beispielsweise durch Cycloheximid, einen sofortigen, vollständigen Stopp der



Translation auslöst und deutlich schneller zytotoxisch wirkt (E. K. Schmidt et al., 2009; Chan et al., 2017).

### **5.2.3. Die Substratspezifität von IFIT1 ist komplexer als eine reine Diskriminierung von Cap0 und Cap1**

Unabhängig von den in Kapitel 5.2.2 dargestellten globalen Effekten von IFIT1 auf die Translation in CMTr1-defizienten Zellen ist es sehr wahrscheinlich, dass die IFIT1-abhängige Translationsinhibition nicht alle mRNA gleichermaßen beeinflusst. Dabei könnten z. B. 5'-Sekundärstrukturen eine Rolle spielen. Die Cap0-modifizierten Alphaviren beispielsweise nutzen eine definierte 5'-Sekundärstruktur, welche die Bindung von IFIT1 verhindert (Reynaud et al., 2015b; Y. Zhang et al., 2007).

Die Tatsache, dass IFIT1 in der Lage ist, zwischen Cap0- und Cap1-modifizierten RNA-Spezies zu unterscheiden, ist in der Literatur allgemein akzeptiert und zur Interpretation der in dieser Arbeit präsentierten Daten weitestgehend ausreichend. Detaillierte Analysen der Substratspezifitäten von IFIT1 zeigen jedoch ein komplexeres Bild.

Abbas et al. konnte zeigen, dass die Affinität von IFIT1 vom Methylierungsstatus der ersten beiden Nukleotide abhängig ist: Eine einzelne 2'-O-Methylierung von N1 (durch CMTr1) oder N2 (durch CMTr2) reduziert die Bindung von IFIT1 stark, eine Methylierung von N1 und N2 (Cap2) verhindert die IFIT1-Bindung sogar vollständig. Ebenso vermuten die Autoren aufgrund der Kristallstrukturdaten einen negativen Einfluss der durch CAPAM katalysierten m6Am-Cap-Methylierung. Dies wurde jedoch nicht experimentell getestet. Die durch RNMT eingebrachte Methylierung des Guanosincaps (m7G) hat dagegen keinen Effekt auf die Affinität von IFIT1 (Abbas et al., 2017).

Neben der durch CMTr1 katalysierten N1-2'-O-Methylierung können also auch weitere Capmodifikationen die Affinität von IFIT1 zu einer RNA beeinflussen. Die Kristallstruktur von IFIT1 zeigt, dass die Bindestelle die ersten vier Nukleotide einer gebundenen RNA umfasst. Daher könnte auch die Sequenz der RNA Einfluss auf die Affinität zu IFIT1 haben.

Zusammengefasst hat IFIT1 eine hohe Affinität für hypomethylierte Caps, die nicht ausschließlich von der fehlenden N1-2'-O-Methylierung der RNA abhängig ist.

In der Zelle bildet IFIT1 Heterooligomere mit IFIT2 und IFIT3. Diese Komplexbildung ist für die volle antivirale Aktivität von IFIT1 nötig (Pichlmair et al., 2011). Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung von IFIT3 und IFIT2 an IFIT1 dessen Affinität und die translationale Inhibition von Cap0 erhöht und für die Restriktion von 2´O-Methylierungs-defizienter Viren benötigt wird (Fleith et al., 2018; Johnson et al., 2018).

Dies steht im Einklang mit der Arbeit von Daugherty et al., in der gezeigt wird, dass die alleinige Überexpression von humanen IFIT1 im Gegensatz zu murinem IFIT1B nicht ausreicht, um die Replikation von Methyltransferase-defizientem Vaccinia-Virus (Cap0-virale RNA) zu inhibieren. Interessanterweise ist jedoch umgekehrt humanes IFIT1, nicht aber murines IFIT1B in der Lage, die Replikation von Cap1-modifiziertem Vesicular-Stomatitis-Virus zu inhibieren (Daugherty et al., 2016).

Während murines IFIT1B ohne weitere Kofaktoren eindeutig zwischen Cap0- und Cap1-RNA diskriminiert, sind die antiviralen Effekte von humanem IFIT1 offenbar weniger stark von der N1-2´O-Methylierung der RNA abhängig, beziehungsweise wird in dessen Substratspezifität durch Interaktion mit IFIT2 und IFIT3 moduliert.

Weitere Forschung ist nötig, um die Effekte von IFIT1 auf verschiedene modifizierte RNA-Spezies aufzuklären. Prinzipiell ist es also vorstellbar, dass bestimmte Cap0-modifizierte mRNA in CMTr1-defizienten Zellen der translationalen Inhibition entgeht. Andererseits könnte auch in wildtyp-Zellen bestimmte RNA trotz Cap1 durch IFIT1 inhibiert werden.

#### **5.2.4. Der Verlust von CMTr1-KO wirkt sich negativ auf zelluläre Mechanismen der antiviralen Abwehr aus**

PRR wie RIG-I werden durch virale RNA-Liganden aktiviert und lösen die Produktion von IFN aus. IFN induziert die Induktion von ISGs und versetzt die Zellen so in einen antiviralen Zustand. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die durch IFN-Behandlung ausgelöste Proteinproduktion der ISGs sowie die globale Translation in den CMTr1-defizienten Zellen abhängig von IFIT1 reduziert wurde.

Daher stellt sich die Frage, ob in CMTr1-defizienten Zellen die antivirale Immunantwort negativ beeinflusst ist.

Tatsächlich wurde durch Williams et al. gezeigt, dass die Virusreplikation des Zika Virus und des Dengue-Virus in CMTr1-KD-Zellen erhöht ist. Weitere Experimente mit Vesicular-Stomatitis-Virus in IFN-vorbehandelten Zellen zeigten ebenfalls eine erhöhte Virusreplikation nach CMTr1-KD in wildtyp-Zellen, nicht aber nach CMTr1-KD in Zellen, deren IFN-Signalweg defizient ist. Die Autoren interpretieren diesen Effekt als einen durch den CMTr1-KD verursachten Defekt der Induktion des antiviralen Zustands, ohne einen Mechanismus zu formulieren (Williams et al., 2020).

Da alle von Williams et al. getesteten Viren für virale Cap1-Methyltransferasen kodieren und somit Cap1-modifizierte virale RNA besitzen, sind diese keine klassischen Liganden für IFIT1-abhängige Translationsinhibition. Basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann spekuliert werden, dass die Ergebnisse von Williams et al. indirekt dennoch IFIT1-vermittelt sein könnten, indem eine IFIT1-vermittelte globale Translationsinhibition der endogenen RNA ausgelöst wird, von der die Cap1-modifizierte virale RNA nicht oder weniger stark betroffen ist.

Im Gegensatz dazu zeigt die Arbeit von Li et al, dass CMTr1 ein wichtiger Wirtsfaktor für die erfolgreiche Infektion mit Influenza A ist (Li et al., 2020). Dies beruht auf zwei unterschiedlichen Effekten:

Erstens nutzt Influenza A die Cap1-Strukturen endogener mRNA, um virale Transkripte zu cappen (Cap-Snatching). Die Effizienz des Cap Snatchings ist von der Vollständigkeit der Cap1-Struktur abhängig und daher in CMTr1-KO-Zellen reduziert (Li et al., 2020; Bouloy et al., 1980; Wakai et al., 2011).

Zweitens konnten Li et al. in polyklonalen CMTr1-KO-Zellen eine erhöhte Expression von IFN- $\beta$  nach viraler Infektion feststellen. Dieser Effekt ist vom RIG-I-Signalweg abhängig und tritt nicht auf, wenn zusätzlich zu CMTr1 auch RIG-I oder andere Komponenten des Signalweges (IRF3, MAVS) ausgeschaltet werden (Li et al., 2020). Der genaue Mechanismus sowie ein möglicher Einfluss von IFIT1 auf die Infektion mit Influenza A wurde von den Autoren nicht untersucht.

Basierend auf den Erkenntnissen aus der vorliegenden Arbeit ist es aber wahrscheinlich, dass unter den von Li et al. genutzten experimentellen Bedingungen in den CMTr1-KO-Zellen sowohl endogene als auch virale RNA durch IFIT1 translational inhibiert werden würde. Die schlussendliche Auswirkung von IFIT1-

abhängigen Effekten auf die Virusreplikation lässt sich aus den vorhandenen Daten nicht abschätzen.

### **5.3. IFN-unabhängige Effekte von CMTr1 auf die Zellphysiologie**

Abgesehen von der Rolle innerhalb der antiviralen Immunantwort ist in der Literatur wenig über die biologische Bedeutung von CMTr1 und der durch CMTr1 katalysierten Generierung von Cap1 bekannt.

Die Funktion von CMTr1 wurde 2011 erstmalig von Bélanger et al. beschrieben. Die Autoren stellten nach siRNA-basiertem KD von CMTr1 eine Reduktion von Cap1-modifizierter RNA, jedoch keine Änderung der globalen Translationsaktivität fest (Bélanger et al., 2010). Dabei ist jedoch unklar, wie effizient der Knockdown war und wie viel CMTr1 in der Zelle zurückbleibt.

Die Daten von Inesta-Vaquera et al. zeigen ein verlangsamtes Zellwachstum nach siRNA-basiertem CMTr1-KD (Inesta-Vaquera et al., 2018a). Williams et al. untersuchten in CMTr1-KD-Zellen den nuklearen Export, die RNA-Stabilität und die Polysom-Assoziation am Beispiel einzelner Transkripte, konnten aber keinen CMTr1-abhängigen Effekt feststellen (Williams et al., 2020).

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte in der vorliegenden Arbeit in CMTr1-defizienten Zellen der Verlust von Cap1-modifizierter endogener RNA und ein verlangsamtes Zellwachstum nachgewiesen werden.

Durch die Transkriptomanalyse von gesamt- und neusynthetisierter RNA konnte gezeigt werden, dass CMTr1 keinen globalen Einfluss auf die Stabilität der RNA und die Effizienz der Spleißreaktion hat.

Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von CDKs in CMTr1-defiziente Zellen verstärkt zytotoxisch wirkt. Da CDKs den Ablauf des Transkriptionszyklus steuern, deutet dies auf CMTr1-Effekte in der Regulation der Transkription hin.

Es fanden sich keine direkten Hinweise auf eine reduzierte globale Translationsaktivität in unbehandelten CMTr1-defizienten Zellen. Dennoch kann dies aufgrund der Komplexität des CMTr1-KO-Phänotyps nicht völlig ausgeschlossen werden: CMTr1-defiziente Zellen weisen eine verringerte Zellgröße sowie eine reduzierte Expression von Komponenten der Translationsmaschinerie wie

ribosomalen Proteinen (RP) auf. Ein möglicher Mechanismus für diese CMTr1-abhängigen Effekte soll im Folgenden diskutiert werden.

### **5.3.1. Zellgröße, Zellteilung und Ribosomenbiogenese werden von CMTr1 beeinflusst**

Die auffälligsten hier festgestellten Effekte, die durch den Verlust von CMTr1 vermittelt werden, sind eine verkleinerte Zellgröße, verlangsamte Proliferation und Veränderungen in der Ribosomenbiogenese (verminderte Expression von RPs und des Ribosomenbiogenese-Faktors NVL2).

Diese Effekte stehen in einem direkten Zusammenhang, der sich vereinfacht so darstellen lässt:

Die Proliferation erfordert das Erreichen einer kritischen Zellgröße, damit die Zelle in den Zellzyklus eintreten und es zur Zellteilung kommen kann. Damit die Zellgröße zunimmt, muss sie in erster Linie die Rate der Proteinbiosynthese steigern. Die Proteinbiosynthese-Kapazität ist abhängig von den Ribosomen pro Zelle – eine vergrößerte Zellgröße erfordert somit verstärkte Ribosomenbiogenese (Kaldis, 2016; Rudra & Warner, 2004).

Die Annahme einer kritischen Zellgröße ist dabei konzeptionell zu verstehen. Es ist nicht geklärt, ob beispielsweise Zellvolumen, Protein-, RNA- oder Ribosomengehalt der Zelle ausschlaggebend sind und wie die Zelle dies detektiert.

Die Proliferation der Zellen wird durch die Zellzyklusprogression reguliert. Suboptimale Wachstumsbedingungen führen zu transientem Zellzyklusarrest, der abhängig von der Situation entweder wieder aufgehoben wird oder zur Induktion der Apoptose führt. Es gibt zwei sogenannte *cellcycle check points*, an denen der Zellzyklus arretiert werden kann. Der G1 *check point* kontrolliert den Übergang in die Synthese-Phase (S-Phase), der G2/M *check point* kontrolliert den Übergang in die Mitose (H. X. Chao et al., 2017).

Interessanterweise finden sich in CMTr1-defizienten Zellen keine Hinweise auf Veränderungen des Zellzyklusprofils durch Zellzyklusarretierung – die CMTr1-defizienten Zellen scheinen die Zellzyklusphasen lediglich langsamer zu durchlaufen und dadurch eine höhere Verdopplungszeit als CMTr1-kompetente Zellen zu haben.

Es besteht grundsätzlich die Annahme, dass die Zunahme der Zellgröße und der Proteinsynthese die Zellzyklusprogression fördern. Gleichzeitig erfordert die Zellzyklusprogression die koordinierte Expression von Zielgenen durch transkriptionale und translationale Regulation spezifischer mRNAs.

Es ist wenig darüber bekannt, wie die Homöostase der Zellgröße mechanistisch reguliert wird. In der Arbeit von Jorgensen et al. konnte in Hefen gezeigt werden, dass die Kopplung zwischen Zellgröße und Zellzyklusprogression direkt durch Regulation der Ribosomenbiogenese vermittelt wird: Nachdem die Zellen die kritische Zellgröße für den Übergang aus der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus erreichen, wird die Transkription von RP-mRNA induziert. Infolgedessen tritt die Zelle in den Zellzyklus ein. Die kritische Zellgröße ist dabei nicht konstant, sondern abhängig von äußeren Faktoren (Jorgensen et al., 2004).

Es gibt Hinweise darauf, dass in Hefen die Rate der aktuellen Ribosomenbiogenese – unabhängig von der aktuellen Gesamtzahl der maturierten Ribosomen in der Zelle – detektiert wird und einen direkten Einfluss auf den Eintritt in den Zellzyklus hat (Bernstein et al., 2007).

Auch in Säugetier-Zelllinien konnte eine kritische Zellgröße für den Übergang von der G1- in die S-Phase ermittelt werden (Son et al., 2012). Die Zellen zeigen eine Kopplung zwischen Zellgröße und Zellzyklus, der Mechanismus ist jedoch nicht aufgeklärt (Amodeo & Skotheim, 2016).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass CMTr1-defiziente Zellen unabhängig von der Zellzyklusphase eine reduzierte Zellgröße aufweisen. Dies deutet darauf hin, dass die für den Eintritt in den Zellzyklus kritische Zellgröße in CMTr1-defizienten Zellen reduziert ist.

Die Steuerung der Zellgröße und der Zellzyklusprogression wird in Säugetierzellen vor allem mit dem mTOR-Signalweg in Verbindung gebracht. mTOR steuert in Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren, Nährstoffangebot und Energiehaushalt die Genexpression der Zelle. Die Inhibition von mTOR führt zu einer translationalen Inhibition von 5' TOP-RNA und hemmt so vor allem die Neusynthese von Komponenten der Translationsmaschinerie.

Die prominentesten durch mTOR regulierten Effektoren sind 4E-BP, welches durch die Bindung von eIF4E die Cap-abhängige Translation reguliert, und die durch mTOR aktivierte ribosomale Protein-S6-Kinase I (S6K1), welche durch Phosphorylierung von beispielsweise RPS6 die Translation von 5´TOP-Transkripten fördert (Fingar et al., 2004; Saxton & Sabatini, 2017; Thoreen et al., 2012). Sowohl die Inaktivierung von 4E-BP als auch von S6K1 resultieren in einer verringerten Zellgröße (Fingar et al., 2002; Pollizzi et al., 2015; Ruvinsky et al., 2005).

Die translationale Regulation von 5´TOP-RNA wie z. B. RP-mRNA ist ausführlich charakterisiert und wird neben 4E-BP und S6K1 vor allem durch das mTOR-regulierte Effektorprotein *La-related protein 1* (LARP1) vermittelt (Philippe et al., 2020).

Direkte Effekte des mTOR-Signalweges auf die Transkription von 5´TOP-RNA sind nicht bekannt. Andererseits ist beschrieben, dass der mTOR-Signalweg die Translation des Transkriptionsfaktors cMyc beeinflusst, der die Proliferation und die Ribosomenbiogenese fördert. Außerdem vermittelt der mTOR-Signalweg die Phosphorylierung weiterer Effektorproteine, welche ihrerseits die rRNA-Transkription durch RNA Pol I und RNA Pol III modulieren (Mayer et al., 2004; Shi et al., 2005; Shor et al., 2010; M. J. West et al., 1998).

Es konnten keine CMTr1-abhängigen Effekte auf den mTOR-Signalweg festgestellt werden. CMTr1-defiziente Zellen zeigen keine veränderte Phosphorylierung von 4E-BP und S6K1 und keine erhöhte Toxizität durch mTOR-Inhibition (Daten nicht gezeigt). Dennoch ist es auffällig, dass dieselben mRNA-Spezies (5´TOP), die spezifisch durch mTOR translational inhibiert werden, in CMTr1-defizienten Zellen transkriptional herunterreguliert sind.

CMTr1-Defizienz und mTOR-Inhibition scheinen durch völlig unterschiedliche Mechanismen einen ähnlichen Phänotyp hervorzurufen: eine verkleinerte Zellgröße und die Inhibition der Genexpression von 5´TOP-RNA.

### **5.3.2. CMTr1 beeinflusst die Transkription von Ribosomalen Proteinen (RP)**

Die GO-Enrichment-Analyse hat gezeigt, dass in CMTr1-defizienten Zellen die Expression von ribosomalen Proteinen (RP) reduziert war. Auffällig ist, dass alle RP-mRNAs ähnlich stark herunterreguliert sind. Die Proteomanalyse zeigte ebenfalls eine leichte Reduktion ribosomaler Proteine in CMTr1-KO-Zellen.

Veränderungen der Transkriptlevel von RPs sind ungewöhnlich: RPs sind im Normalfall stark und konstitutiv exprimiert, was einige von ihnen zu häufig genutzten *house-keeping*-Genen für qPCR-basierte Analysen macht (Caracausi et al., 2017; Meyuhas & Kahan, 2015).

Da zur Ribosomenbiogenese alle Bestandteile in der korrekten Stöchiometrie vorliegen müssen, nutzt die Zelle bisher negative Rückkopplungsmechanismen, die nicht im Detail aufgeklärt sind, aber wahrscheinlich darauf beruhen, dass freie RPs die Expression der eigenen mRNA sowie anderer RP-mRNA inhibieren (Khajuria et al., 2018; O'Leary et al., 2013).

Die Deregulation der RP-Produktion führt zu einer nukleolären Stressantwort über p53, welche zu Ribosomenbiogenese-Stopp, Zellzyklusarrest und Induktion der Apoptose führt (Golomb et al., 2014). Im Menschen führen heterozygote Mutationen verschiedener RPs zu Krankheitsbildern wie der Diamond-Blackfan-Anämie (DBA).

Die Pathogenese solcher Ribosomenbiogenese-basierten Krankheitsbilder ist nicht vollständig aufgeklärt, beruht aber mechanistisch zum Teil auf der p53-abhängigen Induktion der nukleolären Stressantwort und einer dadurch verringerten Anzahl von Ribosomen pro Zelle (Golomb et al., 2014; Khajuria et al., 2018). In den CMTr1-defizienten Zellen wurde ein ähnlicher Mechanismus vermutet. Es konnten jedoch, abgesehen von leicht erhöhten Transkriptleveln von p53, keine hinreichenden Hinweise auf die Induktion einer p53-abhängigen nukleolären Stressantwort gefunden werden.

### **5.3.3. CMTr1 beeinflusst durch einen unbekanntem Mechanismus die Transkription von 5' TOP-RNA, SNHG3 und RPs**

Da im untersuchten Zellsystem weder der mTOR-Signalweg noch die p53-vermittelte nukleoläre Stressantwort signifikant vom CMTr1-Status der Zelle beeinflusst war, wurde nach möglichen Mechanismen gesucht, mittels denen CMTr1 die Transkription von RPs beeinflussen könnte.

Ein charakteristisches Merkmal der RP-mRNA ist das *5'-terminale Oligopyrimidin-Motiv* (5'TOP). Der strukturellen Definition nach besitzt 5'TOP-RNA ein C als erstes Nukleotid, gefolgt von 4 bis 15 Pyrimidinen (C/U), denen meist eine GC-reiche Region folgt (Perry, 2005). 5'TOP-RNA kodiert vor allem für Proteine der



Translationsmaschinerie, darunter die Gene für alle 79 ribosomalen Proteine, sowie verschiedene Initiationsfaktoren und Elongationsfaktoren der Translation (Meyuhas & Kahan, 2015). 5´TOP-mRNA ist stark exprimiert und kann in Zellen bis zu 20% der gesamten mRNA-Menge ausmachen (Gentilella & Thomas, 2012).

Des Weiteren sind 5´TOP-Gene überdurchschnittlich häufig SNHG. Es ist nicht geklärt, ob dies eine funktionelle Kopplung der Herstellung von snoRNA und Proteinen der Translationsmaschinerie darstellt oder nur darauf beruht, dass SNHGs in den Introns stark exprimierter Gene liegen (Balakin et al., 1996; Ojha et al., 2020).

Interessanterweise zeigen CMTr1-defiziente Zellen neben verringerten RP-Transkriptleveln auch eine verringerte Expression von nicht-ribosomalen SNHG und 5´TOP-RNA. Dabei scheinen sowohl 5´TOP- als auch SNHG-Status eines Gens einen negativen Einfluss auf dessen Transkriptlevel in CMTr1-defizienten Zellen auszuüben. Auch die Expression von snoRNA war in CMTr1-defizienten Zellen reduziert. Im folgenden Kapitel wird eine Hypothese für einen möglichen Mechanismus dieser Transkriptionsveränderungen diskutiert.

#### **5.3.3.1. Die Verwendung einer alternativen *transcription start site* (TSS) kann die Prozessierung von 5´TOP-Transkripten beeinflussen**

Das erste Nukleotid einer mRNA wird durch die von der RNA Pol II genutzte *transcription start site* (TSS) innerhalb der Kernpromotorsequenz vorgegeben. Laut Annotation in RefSeq weist 70% der humanen mRNA ein A oder G, 19% ein C und 11% U auf (Meyuhas & Kahan, 2015). Da je nach Promotor, Zelllinie und Wachstumsbedingungen alternative TSS genutzt werden, gibt dies nur die dominanten TSS der Gene an. Die tatsächlich genutzten TSS müssen experimentell durch spezialisierte Sequenziermethoden wie die *cap analysis gene expression* (CAGE) ermittelt werden (Roy et al., 2015; The FANTOM Consortium, 2014).

Grob lassen sich Promotoren anhand der dominanten TSS in kanonische und nicht-kanonische Promotoren einteilen: Kanonische Promotoren nutzen ein Purin (A/G) als TSS und das Nukleotid vor der TSS (Position -1) ist ein Pyrimidin. Diese Initiation wird als YR-Initiation bezeichnet. Nicht-kanonische Promotoren nutzen vorwiegend C als TSS, ebenfalls mit einem Pyrimidin an Position -1. Dies wird als YC-Initiation bezeichnet (Carninci et al., 2006; Nepal et al., 2020; Perry, 2005).

Der beobachtete CMTr1-abhängige Effekt auf die Transkriptlevel von 5´TOP-Genen könnte damit zusammenhängen, dass diese Gene nicht-konventionelle Promotoren nutzen, die aufgrund des 5´TOP-Motivs der Definition nach stets ein C als TSS nutzen.

In der Vergangenheit wurde möglichen alternativen TSS der 5´TOP-Gene kaum Beachtung beigemessen. Nur von einzelnen 5´TOP-klassifizierten Genen war bekannt, dass sie organspezifisch alternative TSS nutzen können und daher nicht immer 5´TOP-Transkripte produzieren (Philippe et al., 2020).

Eine kürzlich publizierte Studie zeigt überraschenderweise, dass ein Großteil der als 5´TOP-klassifizierten Gene sogenannte Duale Initiations (DI)-Promotoren nutzen, die sowohl eine YC- als auch eine YR-abhängige Initiation erlauben. Wie zu erwarten ist, ist dabei meist die YC-initiierte TSS dominant, je nach Zelllinie und Behandlung kann sich das Verhältnis zwischen YC- und YR-Initiation aber auch ändern (Nepal et al., 2020).

Es konnte bereits früher gezeigt werden, dass die Prozessierung von snoRNA von einer YC-Initiation (5´TOP) abhängig ist. Die Expression des gleichen Konstruktes durch einen Promotor mit YR-Initiation führte zu einer normalen mRNA-Produktion bei stark reduzierter Produktion der snoRNA (de Turrís et al., 2004). Die Daten von Nepal et al. zeigten, dass dieser Effekt auch in der Natur auftritt und generalisierbar zu sein scheint: YC-Initiation führt verglichen zu YR-Initiation zu verstärkter snoRNA-Prozessierung. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Art der Initiation reguliert ist: Die Inhibition der Translation führt zu verstärkter YC-Initiation (Nepal et al., 2020). Die biologische Bedeutung dieser Beobachtung ist bisher weitgehend unklar.

Es lässt sich spekulieren, dass die Cap-Methylierungsstatus je nach genutzter Initiation differentielle Effekte auf die Prozessierung der 5´TOP-RNA ausübt und so zu der verringerten Expression von 5´TOP-RNA, SNHG-RNA und snoRNA in CMTr1-defizienten Zellen führt. Es ist darüber hinaus vorstellbar, dass in CMTr1-defizienten Zellen die Verhältnisse zwischen YC- und YR-vermittelter Initiation verändert sein könnten. Um dies nachzuweisen, müssten die tatsächlich genutzten TSS durch CAGE-Sequenzierung ermittelt werden.

Es ist bekannt, dass die CAPAM-abhängige m<sup>6</sup>-Methylierung von mit Adenosin initiierten Transkripten (m<sup>6</sup>A) von der N<sup>1</sup>-2'-O-Methylierung abhängig ist (Akichika et al., 2019). Daher ist es denkbar, dass CMTr1-defiziente Zellen eine verringerte m<sup>6</sup>A-Capmethylierung aufweisen.

Interessanterweise zeigte die transkriptomweite Analyse der m<sup>6</sup>Am-Methylierungslevel, dass auffällig viele RP-mRNAs m<sup>6</sup>Am-modifizierte Caps aufweisen (Boulias et al., 2019; Linder et al., 2015). Dies unterstreicht einerseits die Beobachtung, dass 5'-TOP-klassifizierte Gene alternative TSS nutzen und wirft andererseits die Frage auf, wie m<sup>6</sup>Am-Capping die Prozessierung der RP-Transkripte beeinflusst.

Weitere Forschung ist nötig, um diese Fragen zu klären. Generell ist unbekannt, wie die ersten Nukleotide einer mRNA die Prozessierung beeinflussen. Es ist bislang nicht gezeigt worden, ob an der Cappingreaktion beteiligte Enzyme, CBC oder Decappingenzyme wie DXO differentielle Substratspezifitäten abhängig von den ersten Nukleotiden der mRNA aufweisen.

#### **5.3.4. Der Einfluss von Cap1 auf Spleißreaktion und Transkriptstabilität**

In der Literatur finden sich verschiedene Mechanismen, durch die ein Verlust der N<sup>1</sup>-2'-O-Methylierung das Spleißen und die Stabilität von prä-mRNA beeinflussen könnte:

Zum einen wird die Transkriptmaturierung vor allem durch die Bindung des CBC an die Cap-Struktur koordiniert (Gonatopoulos-Pournatzis & Cowling, 2014). Eine Inaktivierung des Capping-Enzyms (CE) verhindert die Cap-Generierung und dadurch auch die Bindung des CBC und führt zu reduziertem Spleißen der prä-mRNA (Schwer & Shuman, 1996). Da CBC ähnliche Affinitäten für Cap0- und Cap1-Strukturen zeigt, ist nicht klar, ob die Cap1-Generierung einen direkten Einfluss auf das Spleißen hat (Worch et al., 2005).

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Bindung von CBC die Cap-Strukturen vor der Degradation durch das Decapping-Enzym DXO schützt, und dass DXO bevorzugt Cap0-modifizierte RNA degradiert (Kramer & McLennan, 2019; Picard-Jean et al., 2018). Der Knockout von DXO führt zu einer Zunahme von nicht vollständig gespleißter prä-mRNA in der Zelle (Jiao et al., 2013b).

Zum anderen ist snRNA, die die RNA-Komponenten des Spleißosoms darstellt, womöglich direkt vom Verlust der N<sup>1</sup>-2'-O-Methylierung betroffen: Die meisten

snRNAs werden durch RNA Pol II transkribiert und gecappt. Reife snRNA weist ein 2,2,7-Trimethylguanosin (TMG)-Cap auf und ist zum Teil am ersten und zweiten Nukleotid 2´O-methyliert (M. T. Bohnsack & Sloan, 2018; Karijolic & Yu, 2010). Es ist wahrscheinlich, dass die 2´O-Methylierungen durch CMTr1 und CMTr2 eingebracht werden. Für die snRNA U2 konnte *in vitro* experimentell bestätigt werden, dass diese Methylierungen für die Spleißreaktion relevant sind (Dönmez et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde durch RNA-Seq von gesamt- und neusynthetisierter RNA aus CMTr1-defizienten und CMTr1-kompetenten Zelllinien der Einfluss von CMTr1 auf die Spleißeffizienz und Transkriptstabilität ermittelt.

Die Stabilität einzelner Transkripte wurde aus dem Verhältnis der Expressionslevel neusynthetisierter RNA im Vergleich zu gesamt-RNA berechnet. Die Effizienz der Spleißreaktion einer Spleißstelle wurde als Quotient der *reads* der gespleißten Sequenz zu der Gesamtzahl der Spleißstellen-überspannenden *reads* errechnet (Splicing index). Die Analyse zeigte keinen globalen Effekt von CMTr1, weder auf die globale Transkriptstabilität noch auf die Effizienz der Spleißreaktion (siehe Kapitel 4.10.1).

#### **5.3.4.1. CMTr1-abhängiges alternatives Spleißen von NVL2**

Durch alternative Formen des Spleißens, wie beispielsweise Exonskipping, können aus einem einzelnen Gen verschiedene Transkript-Isoformen generiert werden. Dies ist einerseits ein wichtiger Mechanismus der Kontrolle der Genexpression, andererseits werden aber auch viele Pathologien durch eine fehlerhafte Spleißregulation ausgelöst (E. Wang & Aifantis, 2020).

Die Regulation des alternativen Spleißens wird einerseits von *cis*-Elementen in der prä-mRNA wie der Sequenz der Spleißstelle, *Enhancer*- sowie *Silencer*-Motiven, sowie andererseits von *trans*-agierenden Faktoren wie RNA-Bindeproteinen und den Komponenten des Spleißosoms vermittelt (Y. Wang et al., 2015). Die Regulation ist komplex und bisher nur schlecht verstanden. Tejedor et al. zeigten durch Hochdurchsatz-Methoden, dass die Regulation eines einzelnen Exonskipping-Events von mehreren Hundert Proteinen direkt und indirekt beeinflusst wird (Tejedor et al., 2015).

Überraschenderweise zeigte die Untersuchung der CMTr1-defizienten Zellen in der vorliegenden Arbeit ein hochspezifisches Exonskipping-Event von Exon 8 des Gens NVL2 (NVL2- $\Delta$ 8).

Dieses Exonskipping-Event ist in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. Die betroffenen Spleißstellen im NVL2-Gen und deren genomischer Kontext wurden mit dem Programm Splice Port (Dogan et al., 2007) analysiert, wiesen aber keine Besonderheiten auf.

Es konnte nicht aufgeklärt werden, wie der CMTr1-Status der Zelle die alternative Inkorporation dieses Exons steuert. Mögliche Mechanismen werden im folgenden Kapitel diskutiert.

#### **5.3.4.2. Mögliche Mechanismen des NVL2 Exonskipping-Events in CMTr1-defizienten Zellen**

Es ist beschrieben, dass Mutationen innerhalb oder in der Nähe eines Exons zu dessen Exonskipping führen können. Dies beruht zum Teil auf dem NMD-vermittelten Abbau von Transkripten, die vorzeitige Stoppcodons enthalten (Liu et al., 2001; Okubo et al., 2020).

Da die transiente Rekonstitution mit CMTr1 in CMTr1-defizienten Zellen das wildtypische Spleißmuster von NVL2 wiederherstellt, können Mutationen im NVL2-Gen als Auslöser für das Exonskipping in CMTr1-defizienten Zellen ausgeschlossen werden.

Auch die Transkriptionsgeschwindigkeit der RNA Pol II und die epigenetischen Modifikationen eines Gens haben einen Einfluss auf alternatives Spleißen (Fong et al., 2014; Luco et al., 2010). Interessanterweise führen sowohl Mutationen der RNA Pol II, die die Elongationsgeschwindigkeit erhöhen, als auch solche, die sie verlangsamen, zu erhöhtem Exonskipping – es scheint also eine für die Transkriptmaturierung optimale Elongationsgeschwindigkeit zu geben (Fong et al., 2014).

Es ist vorstellbar, dass der Verlust von CMTr1 einen Einfluss auf die Elongationsgeschwindigkeit des Transkriptionskomplexes hat. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass CMTr1-defiziente Zellen eine erhöhte Sensitivität für die Inhibition der den Transkriptionszyklus regulierenden CDKs hat. CDKs sind

jedoch neben der RNA Pol II-Regulation auch an der Regulation des Zellzyklus beteiligt (Bregman et al., 2000).

Insbesondere die Inhibition von CDK7 durch THZ1 ist toxisch für CMTr1-defiziente Zellen. THZ1 führt zu einer reduzierten Promotor-proximalen Pausierung, wodurch die Elongation von nicht vollständig gecappten Transkripten ermöglicht wird. Die Transkriptionsgeschwindigkeit der RNA Pol II wird durch THZ1-Behandlung reduziert (Nilson et al., 2015; Sampathi et al., 2019).

Gegen einen allgemeinen, CMTr1-abhängigen Effekt auf die Elongationsgeschwindigkeit der Transkriptionsmaschinerie spricht, dass kein globaler Anstieg von Exonskipping-Events beobachtet wurde. Weitere Forschung ist nötig, um den CMTr1-vermittelten Effekt auf das Spleißen von NVL2 aufzuklären.

### **5.3.5. Mögliche Effekte der reduzierten NVL2-Expression in CMTr1-defizienten Zellen**

NVL2 ist in der Literatur als Faktor der Ribosomenbiogenese beschrieben und ist in der Prozessierung der rRNA involviert (Hiraishi et al., 2018b; Nagahama et al., 2004; Yoshikatsu et al., 2015). Die Analyse der Gen-Essentialität zeigt, dass NVL2 mit großer Wahrscheinlichkeit essentiell für die Zelle ist (W.-H. Chen et al., 2017).

Während die NVL2-Proteinexpression in CMTr1-defizienten Zellen drastisch reduziert war, konnte keine Veränderung der rRNA-Prozessierung im Northernblot festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Anscheinend sind die NVL2-Proteinlevel in CMTr1-defizienten Zellen trotz starker Reduktion dennoch ausreichend, um die Ribosomenbiogenese unter normalen Wachstumsbedingungen aufrecht zu erhalten.

Neben des NVL2-Exonskippings zeigten CMTr1-defiziente Zellen eine reduzierte Expression anderer Komponenten der Ribosomenbiogenese, wie RPs, SNHG3 und snoRNAs. Während die transiente Überexpression von CMTr1 in CMTr1-defizienten Zellen die Expression von korrekt gespleißtem NVL2 sowie die Transkriptlevel von RPs, SNHG3 und snoRNA wiederherstellt, zeigte die Überexpression von NVL2 keinen vergleichbaren Effekt. Somit ist es unwahrscheinlich, dass die reduzierte

Proteinexpression von NVL2 in CMTr1-defizienten Zellen einen direkten Einfluss auf die veränderten Transkriptlevel von RPs, SNHGs und snoRNA hat.

Generell gilt es zu bedenken, dass in dieser Arbeit stabile CMTr1-KO-Zellklone untersucht werden. Dies bedeutet zwangsläufig, dass die beobachteten CMTr1-abhängigen Effekte unter normalen Wachstumsbedingungen nicht das Zellüberleben verhindern können. Während ein transients Knockdown somit potentiell drastische und toxische Effekte von CMTr1 sichtbar machen würde, zeigen die CMTr1-KO-Zellen vermutlich einen Gleichgewichtszustand zwischen potentiell negativen Effekten und Kompensationen der Zelle, die das Zellüberleben ermöglichen.

Die Gesamtheit der CMTr1-abhängigen Effekte – verringerte Zellgröße, verlangsamte Proliferation und reduzierte Expression von Komponenten der Translationsmaschinerie – lassen sich als Kompensation der Zelle auf eine verringerte Effizienz der Ribosomenbiogenese deuten. Aufgrund der in der Literatur beschriebenen Funktion ist NVL2 ein vielversprechender Kandidat, der diesen Effekten verursachen könnte.

Folgt man dieser These, verwundert es nicht, dass CMTr1-defiziente Zellen verglichen mit CMTr1-kompetenten Zellen keine verstärkte Toxizität der pharmakologischen Inhibition der rRNA-Synthese zeigten (Kapitel 4.16.2), da ein möglicher Engpass durch NVL2 erst zu einem späteren Zeitpunkt, nämlich während der rRNA-Maturierung, auftreten würde. Bedauerlicherweise sind in der Literatur keine Inhibitoren der Ribosom-Maturierung beschrieben. Es wäre hochinteressant, in CMTr1-defizienten Zellen pharmakologisch oder durch Transgenexpression eine erhöhte Ribosomenbiogenese zu erzwingen und zu untersuchen, ob die reduzierten NVL2-Proteinmengen in CMTr1-defizienten Zellen unter diesen Bedingungen zu einem Zusammenbruch der rRNA-Prozessierung und erhöhter Toxizität führen.

#### **5.4. Weitere in der Literatur beschriebene Aspekte der CMTr1-Funktion**

Der Fokus der vorliegenden Arbeit war vor allem die Funktion von CMTr1 in der Cap1-Generierung – in der Literatur sind darüber hinaus weitere Funktionen von CMTr1 und ihren Interaktionspartnern beschrieben. Diese Aspekte wurden hier nicht

explizit untersucht, werden aber im Folgenden vorgestellt und im Kontext dieser Arbeit diskutiert.

#### **5.4.1. CMTr1-interagierende Proteine**

2018 wurde unabhängig von zwei Gruppen die Helikase DHX15 als Interaktionspartner von CMTr1 identifiziert. Während nach Toczydlowska-Socha et al. die Helikaseaktivität von DHX15 die 2´O-Methylierung von RNA-Substraten mit starken Sekundärstrukturen durch CMTr1 ermöglicht, zeigen die Daten von Inesta-Vaquera eine vorwiegend negative Regulation der CMTr1-Aktivität durch DHX15 (Toczydlowska-Socha et al., 2018; Inesta-Vaquera et al., 2018).

DHX15 ist eine ATP-abhängige Helikase, die neben CMTr1 auch mit weiteren G-Patch-Proteinen interagiert und – gesteuert vom jeweiligen Kofaktor – an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt ist (Heininger et al., 2016). DHX15 ist so unter anderem am Spleißen, der Ribosomenbiogenese und der angeborenen Immunantwort beteiligt (Y.-L. Chen et al., 2014; Mosallanejad et al., 2014; Yoshimoto et al., 2009).

Inesta-Vaquera et al. untersuchten den Einfluss von CMTr1 auf die Lokalisation von DHX15. DHX15 ist in wildtyp-Zellen gleichmäßig im Zellkern verteilt. In CMTr1-Knockout oder –Knockdown-Zelllinien kolokalisiert DHX15 teilweise mit Komponenten der Spleißingmaschinerie in granulären Strukturen innerhalb des Zellkerns. Die Autoren deuten diese Änderung der Lokalisation als Konkurrenz verschiedener Prozesse um DHX15 (Inesta-Vaquera et al., 2018a).

Inesta-Vaquera et al. zeigten durch den Vergleich der Überexpression von CMTr1-wt und einer CMTr1-Mutante, die nicht an DHX15 bindet, dass der Verlust der CMTr1/DHX15 Interaktion keinen negativen Effekt auf die globale Genexpression hat.

Es konnten jedoch einzelne Transkripte (v.a. von Zellzyklus-assoziierten Faktoren) identifiziert werden, deren Ribosom-Assoziation durch den Verlust der DHX15/CMTr1-Interaktion negativ beeinflusst wird. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wiesen CMTr1-KD-Zellen eine verlangsamte Proliferation auf (Inesta-Vaquera et al., 2018).

Auch die Charakterisierung der für die vorliegende Arbeit generierten CMTr1-KO-Zellen zeigte, dass CMTr1-defiziente Zellen ein verlangsamtes Zellwachstum



aufweisen. In der Transkriptomanalyse zeigten die Zellen keine differentielle Expression der von Inesta-Vaquera beschriebenen durch CMTr1/DHX15-Interaktion regulierten Gene. Aufgrund der Beteiligung von DHX15 an einer Vielzahl zellulärer Prozesse kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die CMTr1/DHX15-Interaktion auch in den hier getesteten Zellen von Bedeutung ist.

Simabuco et al. identifizierten durch Immunopräzipitation ein Protein-Interaktom von CMTr1. Dabei wurden verschiedene 5'- und 3'-mRNA-Prozessierungsfaktoren, Proteine der *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein* (HNRNP) Familie, sowie Spleiß- und Translationsfaktoren als Interaktionspartner von CMTr1 identifiziert.

Simabuco et al. zeigten, dass einige der gefundenen Interaktionen indirekt durch die mRNA vermittelt werden, konnten aber auch einzelne Interaktionspartner identifizieren, die direkte Protein-Protein-Interaktionen mit CMTr1 eingehen (Simabuco et al., 2019).

Besonders interessant erscheinen dabei die Interaktionen von CMTr1 mit der Protein-Arginin-Methyltransferase 5 (PRMT5), der Proteinphosphatase 1B (PPM1B) sowie Nucleophosmin 1B (NPM1). Während die biologische Bedeutung dieser Interaktionen nicht untersucht wurde, zeigen die in der Literatur beschriebenen Funktionen der Interaktionspartner interessante Verbindungen zu den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen CMTr1-abhängigen Effekten auf die Zellphysiologie:

Die Proteinmethyltransferase PRMT5 ist in die Transkriptionsregulation involviert und methyliert unter anderem Elongationsfaktoren der Transkriptionsmaschinerie, Histone und p53 (Azzouz et al., 2005; Kwak et al., 2003; Ren et al., 2010).

PPM1B ist ebenfalls an der Transkriptionsregulation beteiligt und reguliert die Aktivität der CDKs durch Dephosphorylierung (A. Cheng et al., 2000; Y. Wang et al., 2008).

NPM1 ist in viele zelluläre Prozesse involviert: NPM1 spielt eine Rolle in der Ribosomenbiogenese, indem es den Export von RPs aus dem Nukleus vermittelt, außerdem ist es an der Chromatinmodifikation sowie der cMyc-abhängigen Transkriptionsregulation beteiligt.

#### 5.4.2. CMTr1 und die DNA-Damage-Response (DDR)

Bevor die Funktion der CMTr1 für die Cap1-Generierung im Jahr 2011 durch die Arbeit von Bélanger et al. aufgeklärt wurde, wurde durch die Dissertationsschrift von Khosravi eine mögliche Rolle von CMTr1 in der Reaktion der Zelle auf DNA-Schäden (DNA-Damage-Response, DDR) beschrieben (Bélanger et al., 2010; Khosravi, 2010).

Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) ist einer der Sensoren für DNA-Schäden. Die Aktivierung von ATM löst die DDR aus und führt zur Reparatur der DNA-Schäden. Zentral für die DDR ist die Stabilisierung von p53, wodurch zunächst ein Zellzyklusarrest ausgelöst wird. Defekte in Komponenten der DDR führen zu fehlerhafter DNA-Reparatur und dadurch zu genomischer Instabilität, und verursachen Krankheitsbilder wie Immundefizienz, neurologische Degradation, vorzeitiges Altern und begünstigen die Entstehung von Krebserkrankungen (Gigliamari et al., 2011; Hoeijmakers, 2009).

Nach seiner Aktivierung phosphoryliert ATM viele verschiedene Zielproteine, darunter auch CMTr1 (Bennetzen et al., 2010; Khosravi, 2010). Khosravi konnte zeigen, dass CMTr1 nach DNA-Schäden direkt mit ATM interagiert und ein Knockdown von CMTr1 die Effizienz der DDR vermindert. Der Mechanismus hierfür wurde nicht aufgeklärt (Khosravi, 2010).

DNA-Schäden werden zum Teil auch direkt durch die Transkriptionsmaschinerie detektiert: Trifft RNA Pol II auf einen lokalen DNA-Schaden, wird die Transkriptionsmaschinerie lokal arretiert und rekrutiert die DNA-Reparaturmaschinerie *transcription-coupled nucleotide excision repair* (TC-NER). Dadurch wird eine globale Transkriptionshemmung ausgelöst (Fousteri et al., 2006; Gaillard & Aguilera, 2013). Ausgelöst durch DNA-Schäden ändert sich das Interaktom der RNA Pol II stark. Interessanterweise dissoziiert CMTr1, im Gegensatz zu anderen Enzymen der Capping-Maschinerie, nach DNA-Schädigungen von RNA Pol II (Boeing et al., 2016).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von CMTr1 in der DDR nicht gezielt untersucht. Transkriptom- und Proteomanalysen lieferten keinen Hinweis auf eine dauerhafte Aktivierung von DDR in den CMTr1-defizienten Zellen. In CMTr1-

defizienten Zellen wurde eine leichte Induktion von p53 auf Transkriptebene, nicht aber auf Proteinebene festgestellt.

## 5.5. Ausblick

Diese Arbeit untersuchte die Rolle der durch CMTr1 katalysierten Generierung von Cap1 als molekulare Signatur endogener mRNA in der antiviralen Immunantwort.

In CMTr1-defizienten Zellen kann endogene RNA zu einer RIG-I-Stimulation führen. Dies legt nahe, dass die durch CMTr1 katalysierte N1-2´O-Methylierung eine wichtige Rolle in der Toleranz endogener RNA spielt und der Verlust von Cap1 potentiell autoinflammatorische Pathologien verursachen kann. Weitere Forschung ist nötig, um die in CMTr1-defizienten Zellen vorhandenen, RIG-I-stimulatorischen RNA-Spezies zu charakterisieren.

Es konnte in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass die Cap1-Generierung nötig ist, um die IFIT1-vermittelte Translationsinhibition von endogener mRNA zu verhindern. Da IFIT1 eine über den N1-2´O-Methylierungsstatus hinausgehende, komplexe Substratspezifität aufweist, können zum jetzigen Zeitpunkt keine Aussagen über die IFIT1-vermittelte Inhibition einzelner endogener Transkripte getroffen werden.

Um endogene RIG-I- beziehungsweise IFIT1-Liganden zu charakterisieren, könnten RIG-I- bzw. IFIT1-bindende RNA-Spezies durch Immunpräzipitation des entsprechenden Proteins aufgereinigt, durch Sequenzierung identifiziert und anschließend validiert werden.

Die Erforschung endogener RIG-I- und IFIT1-Liganden ist auch über den Kontext der CMTr1-defizienten Zellen hinaus bedeutsam: Erst vor kurzem konnte durch neu entwickelte Methoden gezeigt werden, dass nicht sämtliche reife mRNA die volle Cap1-Struktur mit N7-methyliertem Guanodin-Cap und 2´O-methyliertem ersten Nukleotid aufweist (Akichika et al., 2019; Galloway et al., 2020; J. Wang et al., 2019). Durch diese Erkenntnisse ist die Regulation der Cap-Methylierung endogener RNA aktuell ein aktives Forschungsfeld.

Neben der m7G- und N1-2´O-Methylierung, die als essentiell für die Funktion der endogenen RNA eingeschätzt wird, kann mRNA zusätzlich modifiziert werden, wobei die biologische Bedeutung dieser Methylierungen und deren Regulation

weitestgehend unbekannt ist. Die Forschung wird dadurch erschwert, dass bislang keine Techniken zur Verfügung stehen, den Cap-Methylierungsstatus einzelner Transkripte zu ermitteln.

CMTr1-defiziente Zellen zeigten über die IFN-vermittelten Effekte hinaus einen komplexen Phänotyp, der sich unter anderem in verringerten Transkriptleveln von Komponenten der Translationsmaschinerie darstellt. Bedingt durch den auf Zellkultur zentrierten Versuchsaufbau in dieser Arbeit war es nicht möglich zu ermitteln, welche Effekte direkt durch den Verlust der N1-2´O-Methylierung vermittelt werden und welche eine Kompensation der Zelle darstellen. Für die weiteren Untersuchungen wäre es daher hilfreich, die in der Zellkultur festgestellten Effekte isoliert *in vitro* zu betrachten:

So würde sich für die Untersuchung der CMTr1-abhängigen Effekte der Transkriptionsregulation ein System anbieten, durch welches die Transkription in Zellkernextrakten analysiert werden kann. Ein solches System erlaubt durch kotranskriptionale radioaktive Markierung eine dynamische Quantifizierung der mRNA-Prozessierung und kann pharmakologisch, durch Zugabe rekombinanter Proteine oder Depletierung endogener Faktoren manipuliert werden (Adamson et al., 2003; Nilson et al., 2015).

Des Weiteren könnten mögliche Effekte der Cap-Methylierung auf die Translation in einem *in vitro* Translationssystem untersucht werden. Ein solcher Versuchsaufbau würde vereinfachte Manipulationen der Reaktionsbedingungen z. B. durch Hinzufügen von rekombinantem IFIT1-Protein ermöglichen (Fleith et al., 2018). Dadurch könnten Cap-Methylierungs-abhängige Effekte auf die globale sowie die Transkript-spezifische Translationsaktivität von RNA-Präparationen verglichen werden. Interessant wäre beispielweise, die Translationsaktivität von mRNA aus CMTr1-defizienten Zellen, die entweder unbehandelt eingesetzt oder zuvor *in vitro* durch rekombinante Methyltransferase Cap1-methyliert wurde, direkt zu vergleichen.

Die Mechanismen der in dieser Arbeit festgestellten differentiellen Genexpression zwischen CMTr1-defizienten und CMTr1-kompetenten Zellen könnten durch verschiedene Techniken tiefergehend erforscht werden. Beispielsweise kann Chromatin-Immunopräzipitation von RNA Pol II mit anschließender Sequenzierung (ChIP-Seq) eingesetzt werden, um die Verteilung der Genom-assoziierten

Transkriptionsmaschinerie innerhalb des Genoms zu ermitteln. Globale und genspezifische Veränderungen der Transkriptionskinetik können so durch eine charakteristische Verschiebung der RNA Pol II-Bindungsprofile innerhalb der Genloci detektiert werden (Gaertner & Zeitlinger, 2014).

In dieser Arbeit wurde in CMTr1-KO-Zellen eine reduzierte Transkriptexpression von 5´TOP-Genen und SNHG<sub>s</sub> festgestellt. Wie bereits im Kapitel 5.3.3.1 diskutiert, zeigt eine aktuelle Studie, dass diese Transkripte durch alternative TSS initiiert werden können und dies deren Prozessierung beeinflusst (Nepal et al., 2020). Daher wäre es höchst interessant, durch Techniken wie CAGE zu erforschen, ob es einen CMTr1-abhängigen Effekt auf die TSS-Nutzung dieser Transkripte gibt (Roy et al., 2015).

In dieser Arbeit wurde in CMTr1-defizienten Zellen eine stark reduzierte Proteinexpression des Ribosomenbiogenese-Faktors NVL2 ermittelt. Ein dadurch verursachter Defekt der Ribosomenbiogenese stünde im Einklang mit dem in CMTr1-defizienten Zellen beobachteten Phänotyp aus reduzierter Zellgröße, verlangsamter Proliferation und reduzierter Expression von Komponenten der Translationsmaschinerie. Diese Effekte scheinen aber nicht unmittelbar oder nicht allein von der verringerten NVL2-Expression abzuhängen.

Während CMTr1 keinen Einfluss auf die globale Spleißreaktion hat, konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der NVL2-Expression auf einem hochspezifischen, CMTr1-abhängigen Spleiß-Mechanismus beruht. Das in CMTr1-defizienten Zellen durch Exonskipping entstehende Transkript NVL2- $\Delta$ 8 wurde bisher nicht in der Literatur beschrieben. Es wäre interessant zu untersuchen, wie CMTr1 mechanistisch das NVL2-Exonskipping reguliert.

Dazu könnten sogenannte Mini-Gen-Reporter verwendet werden. Das sind Expressionsplasmide, in welche genomische Intron- und Exon-Sequenzen eingefügt und analysiert werden können. Durch Einfügen von Mutationen in die Sequenz kann der Einfluss einzelner Sequenzelemente auf die Effizienz und Regulation der Spleißreaktion analysiert werden (Cooper, 2005). Somit könnte man herausfinden, ob das beschriebene Exonskipping neben dem Knockout von CMTr1 auch von anderen Faktoren, beispielweise pharmakologischer Inhibition der Transkriptionsmaschinerie, verursacht werden kann.

Während die Grundlagen der Transkription und RNA-Maturierung bereits lange bekannt sind, bleibt deren genaue Kinetik und Regulation ein hochaktives Forschungsfeld. Langsam wird ein Verständnis dafür entwickelt, wie komplex, eng und wechselseitig Transkription und RNA-Prozessierungsschritte wie Capping und Spleißen miteinander gekoppelt sind (Kachaev et al., 2020; Tellier et al., 2020). Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse geben neue Einblicke in die komplexe Rolle der N1-2´O-Methylierung in der Genexpression in höheren Eukaryoten.

## 6. Anhang

### 6.1. RNA-Seq Ergebnisse

Auszug aus den Ergebnissen der differentiellen Genexpressionsanalyse (siehe Kapitel 4.10 und Tabelle 2).

#### 6.1.1. RNA-Seq: In CMTr1-defizienten Zellen reduziert exprimierte Transkripte

In Tabelle 6 sind in CMTr1-defizienten Zellen verringert exprimierte Transkripte dargestellt. Die Transkripte sind basierend auf der differentiellen Transkriptexpression (log2FC) zwischen den Zelllinien CMTr1-KO#2-pRp-CMTr1 und CMTr1-KO#2 (Vergleichspaar 6) sortiert.

	Vergleich: Zelllinie/ Zelllinie Kondition	1		2		3		4		5		6		7		8	
		CMTr1 KO#1- pRpCMTr1/ CMTr1-KO#1		CMTr1 KO#1- pRpCMTr1/ CMTr1-KO#1		wt/ CMTr1-KO#1		wt/ CMTr1-KO#1		CMTr1-KO#2- pRpCMTr1/ CMTr1-KO#2		CMTr1-KO#2- pRpCMTr1/ CMTr1-KO#2		wt/ CMTr1-KO#2		wt/ CMTr1-KO#2	
		4sU		total		4sU		total		4sU		total		4sU		total	
		log2FC	adj.pv	log2FC	adj.pv	log2FC	adj.pv	log2FC	adj.pv	log2FC	adj.pv	log2FC	adj.pv	log2FC	adj.pv	log2FC	adj.pv
1	PLCH1	2,58	5E-102	2,46	3E-68	3,32	2E-166	3,16	6E-107	2,67	3E-147	2,78	2E-126	2,71	2E-131	2,73	5E-89
2	CMTr1	2,92	3E-290	2,48	9E-299	1,80	2E-136	0,30	0,004	2,52	0	1,79	0	1,20	3E-73	-0,10	0,3979
3	SNHG5	2,25	0	1,61	2E-76	2,39	2E-160	1,67	3E-31	2,30	0	1,78	4E-135	2,56	1E-171	1,84	8E-36
4	AP003392.4	2,22	1E-47	1,39	3E-21	2,53	1E-52	1,48	4E-15	2,21	7E-49	1,68	3E-31	2,49	3E-55	1,85	2E-23
5	SNHG12	1,96	5E-231	1,97	4E-114	2,01	3E-86	1,97	7E-24	2,20	2E-266	2,32	0	2,17	3E-95	2,28	4E-37
6	SNHG3	2,06	0	1,82	5E-159	2,35	6E-222	2,18	7E-80	2,07	0	1,83	0	2,17	8E-184	1,95	9E-75
7	FRK	1,52	3E-17	1,92	2E-17	2,14	1E-30	2,96	3E-23	2,07	1E-28	2,44	5E-32	2,61	2E-38	3,27	7E-33
8	SNORA73B	2,27	5E-105	1,91	2E-59	2,13	4E-30	2,10	1E-31	1,86	4E-29	1,89	1E-82	1,81	3E-17	1,97	8E-32
9	RPL13AP25	1,14	2E-07	0,63	0,0005	1,99	3E-12	0,83	0,0051	1,84	3E-30	1,34	2E-14	2,38	1E-19	1,54	4E-08
10	AP001486.2	1,40	2E-36	0,91	5E-12	1,07	8E-16	1,14	4E-07	1,73	1E-41	1,17	4E-27	1,67	2E-30	1,04	1E-06
11	LGALS3BP	0,61	0,0003	-0,02	0,9462	3,17	2E-154	1,31	5E-10	1,61	1E-23	0,59	0,0106	3,70	2E-160	1,91	1E-15
12	CA2	1,54	9E-167	1,85	7E-77	3,55	0	3,45	4E-143	1,60	4E-233	1,39	3E-70	2,54	0	1,98	8E-56
13	ZFAS1	1,28	2E-69	1,40	1E-73	1,74	8E-84	1,64	8E-59	1,57	2E-96	1,54	2E-110	1,90	2E-95	1,65	3E-56
14	SNORD99	1,53	2E-13	1,68	3E-20	2,00	2E-16	2,01	3E-15	1,56	9E-14	1,81	3E-28	1,91	5E-15	2,07	8E-18
15	SNORD12B	1,16	2E-08	1,24	6E-17	1,81	2E-15	1,41	4E-15	1,53	9E-14	1,47	2E-26	1,92	1E-16	1,66	7E-21
16	EYA1	0,68	7E-06	0,76	3E-06	2,35	9E-71	2,69	5E-54	1,52	2E-32	1,73	3E-48	2,46	4E-75	2,59	5E-53
17	RABGGTB	1,44	0	1,47	1E-99	1,82	5E-199	2,09	8E-192	1,51	0	1,62	0	1,54	3E-127	1,73	4E-132
18	KIF5C	0,93	1E-46	0,89	4E-15	1,00	3E-33	0,91	3E-11	1,49	1E-66	1,47	1E-39	2,01	5E-107	1,77	2E-33
19	RPL13AP7	1,58	1E-22	0,52	0,0804	2,05	2E-30	0,67	0,1314	1,47	3E-17	NA	NA	2,12	2E-29	NA	NA
20	LRRC75A- AS1	1,46	0	1,10	6E-39	1,89	6E-127	1,44	1E-16	1,44	3E-224	1,11	9E-94	1,94	1E-121	1,64	9E-23
21	RIN2	1,11	6E-07	0,89	0,0002	2,39	3E-25	2,07	1E-15	1,43	4E-15	1,35	8E-13	1,50	2E-13	1,51	7E-11
22	RPS12	1,47	0	0,85	2E-28	1,37	6E-62	0,90	3E-12	1,41	0	0,84	2E-45	1,52	1E-71	1,06	5E-16
23	AC093484.5	1,30	3E-17	1,03	1E-12	1,76	2E-26	1,42	3E-14	1,38	4E-17	1,15	4E-25	1,97	1E-29	1,77	2E-28
24	AP001324.1	1,44	4E-100	0,92	3E-08	1,35	7E-45	1,09	3E-09	1,36	2E-97	0,88	8E-08	1,35	2E-46	1,21	6E-10
25	HSPG2	1,48	6E-60	1,26	7E-17	1,44	4E-24	0,14	0,5748	1,35	1E-40	1,21	9E-20	1,64	6E-29	0,83	1E-05
26	AC012313.8	0,85	0,0002	1,20	1E-06	1,40	1E-08	1,55	3E-08	1,35	1E-10	0,94	2E-05	1,44	3E-09	1,01	0,0002
27	SNHG19	1,20	6E-24	0,71	6E-07	1,88	1E-46	0,80	0,0004	1,34	6E-31	0,91	9E-19	1,67	4E-35	1,01	4E-06
28	CITED1	0,94	4E-31	0,97	4E-10	0,69	1E-10	0,23	0,4003	1,34	2E-49	1,16	2E-19	0,99	3E-17	0,45	0,0899
29	LINC01619	1,64	1E-24	1,62	4E-23	2,21	3E-41	2,42	4E-41	1,31	7E-21	1,47	3E-32	1,19	8E-14	1,40	3E-16
30	SNORD104	1,27	4E-10	0,81	6E-05	2,10	2E-22	1,25	2E-07	1,30	5E-12	1,03	4E-09	1,63	3E-15	1,42	1E-09
31	RPL13A	1,26	0	0,68	9E-13	1,53	1E-87	0,70	0,0007	1,30	2E-260	0,72	5E-59	1,65	2E-90	0,91	2E-06
32	PIR	1,04	6E-17	0,90	2E-06	1,41	4E-27	0,83	0,0005	1,29	2E-19	1,09	3E-08	2,10	3E-51	1,57	7E-12
33	SNHG4	1,25	8E-77	1,11	4E-46	1,45	5E-79	1,49	3E-44	1,28	2E-82	1,29	1E-98	1,25	2E-59	1,36	2E-39
34	AFG1L	1,60	8E-43	1,28	1E-25	1,40	4E-26	1,12	8E-20	1,27	5E-29	1,22	4E-28	1,06	5E-16	1,08	4E-17
35	SULF1	1,54	3E-22	1,45	1E-14	3,23	2E-90	3,26	3E-53	1,27	6E-25	1,19	3E-21	2,07	3E-46	2,03	2E-32
36	PLAGL1	1,64	5E-118	1,63	7E-64	1,94	1E-105	2,06	3E-84	1,26	2E-63	1,63	4E-84	1,59	2E-68	1,95	3E-72
37	SNORA72	1,26	2E-09	1,03	4E-06	0,97	0,0009	1,72	5E-08	1,26	7E-09	1,37	1E-14	1,08	0,0003	1,21	2E-05
38	SPATA17	1,01	3E-07	0,72	0,0051	1,41	1E-11	1,70	1E-11	1,24	2E-10	1,20	7E-09	1,30	1E-09	1,51	2E-10
39	ZNF76	1,09	2E-35	0,81	3E-12	1,34	1E-42	0,71	3E-07	1,24	7E-60	0,82	1E-18	1,07	3E-27	0,38	0,0099
40	PCYT1B	0,90	4E-07	0,62	0,0167	0,99	5E-08	0,56	0,0518	1,23	3E-09	0,66	0,008	2,07	5E-23	1,22	6E-05
41	MATR3	0,93	1E-12	1,22	1E-17	1,29	4E-24	1,74	3E-35	1,19	1E-21	1,36	4E-27	1,32	3E-25	1,54	2E-30
42	HHIPL2	1,18	2E-07	NA	NA	1,40	1E-06	NA	NA	1,17	1E-07	NA	NA	1,04	0,0001	NA	NA
43	MIR222HG	1,22	4E-60	1,14	5E-58	1,31	2E-34	1,33	1E-28	1,17	2E-50	1,03	6E-18	0,99	9E-20	0,97	1E-13
44	NABP1	1,14	3E-63	1,30	4E-61	0,95	6E-28	1,21	6E-16	1,16	7E-53	1,31	1E-81	1,29	5E-45	1,41	6E-23

	Vergleich:	1	2	3	4	5	6	7	8								
45	SNORD12C	1,03	5E-06	1,27	4E-11	1,47	3E-08	1,42	1E-08	1,15	3E-07	1,56	3E-19	1,46	2E-08	1,76	2E-14
46	AC091153.1	1,44	9E-37	-0,27	0,2032	1,23	7E-16	-0,43	0,0512	1,14	2E-18	-0,13	0,6054	1,22	3E-13	0,02	0,9659
47	LINC01719	0,99	4E-08	0,81	8E-05	1,12	2E-08	0,60	0,0037	1,13	7E-12	0,68	9E-05	0,91	3E-06	0,38	0,0782
48	TSC22D3	1,19	1E-79	1,64	2E-67	2,95	2E-170	3,09	1E-57	1,13	2E-152	1,35	4E-43	1,28	8E-36	1,39	6E-14
49	AC234772.3	1,19	1E-09	1,31	2E-15	1,22	2E-06	1,72	7E-20	1,13	5E-09	1,17	5E-20	0,89	0,0006	1,04	1E-08
50	ZBED5-AS1	1,08	7E-09	0,77	0,0029	0,89	5E-05	0,43	0,2657	1,12	3E-08	0,59	0,0125	1,19	9E-08	0,35	0,3577
51	MIR34AHG	1,78	4E-44	2,10	2E-65	1,09	5E-11	1,15	2E-12	1,10	1E-11	1,25	2E-21	0,98	1E-06	1,30	7E-19
52	EEF1A1P13	0,95	1E-45	0,82	1E-06	1,35	2E-37	0,80	0,0029	1,10	1E-61	0,55	0,0004	1,47	4E-42	0,95	9E-05
53	APIS2	0,83	3E-51	0,84	4E-14	0,90	2E-35	1,41	2E-17	1,10	7E-90	0,90	2E-36	0,93	5E-39	0,71	1E-05
54	LINC00467	0,86	3E-15	0,63	0,0002	0,89	3E-14	0,89	7E-05	1,08	4E-24	0,95	9E-12	0,98	1E-15	0,81	0,0002
55	EEF1A1P5	1,25	0	0,84	7E-27	1,23	4E-63	0,80	6E-05	1,08	4E-189	0,67	2E-37	1,22	3E-53	0,92	1E-06
56	CDKN1A	2,10	1E-99	2,19	1E-60	1,87	6E-50	1,65	3E-24	1,08	2E-19	0,74	2E-06	1,85	2E-44	1,57	2E-23
57	EEF1A1	1,24	0	0,95	1E-27	1,16	9E-73	0,80	1E-06	1,08	2E-158	0,79	3E-70	1,19	1E-57	0,98	6E-10
58	SNHG25	1,02	4E-07	1,01	3E-06	2,04	3E-24	1,52	2E-08	1,07	6E-09	1,13	2E-09	1,62	3E-17	1,52	9E-10
59	NAP1L1	1,13	0	1,11	2E-56	1,06	3E-88	1,62	2E-28	1,07	1E-267	0,95	3E-86	1,05	4E-91	0,99	1E-11
60	AC046158.3	0,87	4E-06	0,43	0,1154	0,87	0,0001	0,56	0,0531	1,07	4E-09	0,54	0,0147	0,86	0,0002	0,43	0,1289
61	TIMP1	0,68	4E-13	0,42	0,0865	0,60	5E-07	0,21	0,41	1,07	1E-20	0,59	0,0112	1,37	3E-26	0,90	0,0004
62	RPL5P12	0,81	4E-05	NA	NA	1,03	4E-07	NA	NA	1,05	3E-08	NA	NA	1,13	5E-08	NA	NA
63	HSDL2	0,91	1E-62	0,56	3E-07	0,97	2E-38	0,76	1E-12	1,03	2E-76	0,69	6E-12	1,15	2E-55	0,70	3E-09
64	SNHG6	1,19	2E-33	0,69	2E-06	1,75	8E-52	1,60	3E-31	1,03	4E-34	0,92	2E-22	0,91	2E-14	0,84	8E-12
65	BRINP3	1,20	5E-11	1,17	2E-07	1,90	2E-28	2,18	1E-24	1,03	1E-05	NA	NA	3,18	2E-48	3,75	7E-47
66	U1	1,44	8E-29	0,33	0,2869	1,06	3E-13	-0,72	0,0296	1,01	5E-12	0,24	0,2232	0,92	6E-09	-0,16	0,6599
67	SLC7A11	0,67	3E-28	0,62	4E-06	1,81	4E-12	2,18	3E-25	1,01	2E-43	0,82	2E-16	2,41	1E-21	2,40	1E-35
68	EEF1A1P12	1,19	9E-09	NA	NA	1,40	3E-09	NA	NA	1,00	2E-06	NA	NA	1,22	2E-07	NA	NA
69	RPLP0	1,01	0	0,75	1E-18	1,21	1E-84	0,76	1E-05	1,00	2E-153	0,77	3E-82	1,34	7E-81	1,06	3E-11
70	RPL36A	0,94	7E-46	0,71	2E-16	1,20	2E-47	1,03	2E-22	1,00	1E-42	0,81	1E-60	1,29	5E-52	1,13	3E-40
71	ADAMTS3	1,24	1E-38	1,41	4E-43	0,84	2E-16	0,81	1E-11	0,99	2E-25	1,09	2E-24	0,98	1E-21	1,03	4E-16
72	SNORA74D	1,11	3E-16	1,13	6E-11	1,41	5E-18	1,43	4E-10	0,99	6E-14	1,18	7E-15	1,19	1E-12	1,39	3E-11
73	RPL13AP5	1,12	0	0,69	4E-12	1,18	4E-83	0,81	8E-06	0,99	2E-132	0,65	8E-17	1,14	8E-68	0,97	1E-08
74	EEF1A1P22	0,84	0,0004	NA	NA	1,34	2E-06	NA	NA	0,99	1E-05	NA	NA	1,03	0,0003	NA	NA
75	EEF1A1P6	1,29	7E-89	0,89	1E-07	1,30	1E-51	0,79	0,0004	0,99	2E-43	0,56	0,0002	1,24	2E-36	0,99	6E-06
76	TRIB1	0,60	7E-10	0,44	1E-07	1,54	3E-63	1,13	8E-15	0,99	8E-44	0,87	2E-58	0,91	2E-25	0,72	7E-07
77	SNORA74A	1,09	6E-13	1,00	6E-07	1,05	5E-08	1,38	3E-07	0,99	3E-10	1,11	1E-09	0,95	1E-06	1,37	9E-08
78	NAP1L1P3	0,89	1E-06	NA	NA	0,95	2E-05	NA	NA	0,98	2E-08	NA	NA	0,89	3E-05	NA	NA
79	RPS3	0,99	4E-237	0,62	1E-17	1,10	1E-28	0,69	4E-09	0,98	1E-129	0,62	7E-43	1,08	1E-25	0,73	1E-10
80	AC008038.1	0,90	5E-238	0,44	0,0224	0,63	3E-16	0,08	0,7742	0,98	2E-154	0,43	0,0031	1,05	1E-38	0,83	0,0002
81	HSPBAP1	0,63	3E-08	0,73	8E-06	0,93	3E-15	1,30	1E-13	0,97	7E-24	0,97	2E-18	0,61	4E-07	0,80	4E-07
82	RPLP0P6	0,75	6E-53	0,38	0,1987	1,22	2E-53	0,73	0,0421	0,96	1E-95	0,35	0,1259	1,46	5E-75	0,90	0,007
83	SNHG8	1,24	5E-53	0,98	1E-19	1,61	4E-46	1,37	7E-12	0,95	9E-31	0,90	2E-21	1,57	2E-42	1,57	1E-16
84	RPS4X	1,03	1E-286	0,77	1E-34	1,10	3E-61	0,97	3E-18	0,94	2E-227	0,72	3E-62	1,42	1E-93	1,24	4E-30
85	AL590867.2	0,84	7E-30	NA	NA	1,08	3E-25	NA	NA	0,94	5E-51	NA	NA	1,02	1E-22	NA	NA
86	FAS	1,36	2E-22	0,93	6E-07	1,20	6E-15	0,66	0,0007	0,94	6E-07	0,50	0,0287	1,87	4E-28	1,31	1E-10
87	SNHG16	0,93	3E-141	0,50	6E-12	1,47	2E-146	1,03	2E-17	0,92	3E-153	0,66	5E-46	1,27	2E-117	0,78	5E-11
88	SLC1A3	1,01	4E-52	0,75	2E-15	1,18	3E-27	1,01	2E-19	0,92	6E-40	0,70	1E-18	1,03	6E-20	0,92	2E-17
89	RPSAP15	0,91	9E-55	0,81	1E-05	1,23	2E-58	1,21	1E-05	0,91	7E-61	0,84	7E-06	1,15	2E-47	1,26	4E-06
90	AC093157.1	0,93	3E-06	1,40	4E-14	0,66	5E-05	1,20	2E-05	0,91	3E-08	1,31	2E-13	1,03	1E-09	1,27	1E-06
91	RPL27A	0,70	4E-224	0,52	2E-12	0,98	5E-31	0,71	8E-11	0,90	7E-145	0,56	5E-31	0,94	1E-26	0,73	3E-12
92	RPL22	0,77	1E-150	0,55	7E-12	0,80	4E-24	0,87	2E-25	0,89	2E-104	0,63	9E-29	0,85	9E-24	0,70	7E-14
93	CRTAP	0,65	8E-38	0,60	4E-07	1,27	2E-98	1,01	1E-14	0,89	1E-65	0,88	5E-23	1,39	1E-124	1,17	1E-28
94	ATG10	0,87	5E-14	0,93	2E-13	0,86	4E-11	1,12	1E-15	0,88	8E-13	0,80	1E-13	0,98	4E-13	0,84	9E-10
95	ACSL4	0,66	7E-42	0,90	8E-21	0,72	3E-23	1,44	7E-46	0,88	3E-62	1,09	9E-39	1,10	1E-49	1,51	5E-51
96	LRRCT75A	0,75	2E-19	1,03	1E-37	1,41	3E-66	1,44	1E-30	0,88	2E-25	1,10	4E-52	1,40	3E-60	1,55	2E-38
97	RPS23	0,82	4E-163	0,66	2E-20	0,92	5E-30	1,00	6E-19	0,88	5E-104	0,68	3E-40	1,06	1E-35	0,85	3E-14
98	E1F4BP7	0,71	9E-29	0,33	0,0342	0,92	4E-33	0,31	0,1221	0,87	3E-33	0,46	0,0016	1,07	9E-37	0,50	0,0179
99	RPS29	0,73	3E-44	0,38	6E-08	0,96	5E-26	0,75	5E-23	0,87	5E-61	0,56	1E-23	0,92	1E-20	0,68	1E-19
100	ZNF804A	0,81	0,0002	0,97	5E-06	2,20	1E-28	2,50	2E-45	0,87	0,0003	1,14	9E-08	2,96	4E-42	3,12	7E-63
101	EEF1A1P11	1,22	3E-18	0,57	0,0444	1,33	2E-17	0,81	0,0315	0,87	1E-09	NA	NA	1,11	6E-12	0,83	0,0163
102	MIR3936HG	0,89	4E-06	0,80	0,0008	0,81	0,0002	0,28	0,4169	0,87	3E-05	0,75	0,0006	1,06	3E-06	0,70	0,0071
103	UROS	0,75	1E-45	0,81	1E-19	0,75	9E-22	0,80	2E-18	0,86	5E-46	0,92	2E-33	1,11	2E-41	1,03	1E-27
104	RPS23P8	0,96	3E-14	NA	NA	0,96	7E-08	NA	NA	0,86	3E-14	NA	NA	0,94	2E-07	NA	NA
105	LGMN	0,91	4E-55	0,42	0,0006	0,77	4E-26	0,16	0,1475	0,85	2E-44	0,39	6E-05	0,76	2E-24	0,39	0,0009
106	AC084824.1	0,77	2E-09	0,50	0,0031	0,89	3E-11	0,62	0,0078	0,85	2E-14	0,31	0,0343	0,85	1E-13	0,31	0,213
107	AMOT	1,28	0	1,42	6E-132	1,14	2E-105	1,13	1E-31	0,85	2E-170	0,94	4E-130	0,74	4E-50	0,81	1E-17
108	EEF1A1P9	1,27	1E-19	0,83	0,0019	1,36	1E-19	1,00	0,0025	0,85	8E-09	NA	NA	1,06	2E-12	0,78	0,0147
109	RPL11	0,77	9E-183	0,54	2E-14	0,95	2E-31	0,90	4E-16	0,85	1E-142	0,64	8E-44	0,88	1E-24	0,76	2E-11
110	AC007182.2	0,80	4E-26	0,46	0,0609	0,92	2E-20	1,12	1E-05	0,84	5E-29	0,48	0,019	0,86	3E-17	0,72	0,0048
111	HDDC2	0,82	2E-86	0,44	9E-08	0,64	1E-16	0,38	0,0001	0,84	2E-67	0,43	1E-10	0,84	2E-24	0,53	2E-08
112	E1F4B	0,72	2E-154	0,26	0,0013	0,95	3E-50	0,42	2E-05	0,83	6E-79	0,36	2E-16	1,10	1E-50	0,49	1E-06
113	RPL28	0,81	3E-49	0,60	2E-12	1,07	1E-31	0,48	0,0066	0,83	8E-33	0,70	4E-26	0,90	4E-18	0,85	2E-07
114	RPS19	0,90	2E-206	0,67	8E-19	0,87	6E-28	0,64	3E-06	0,83	1E-115	0,58	4E-27	1,05	9E-37	0,84	1E-10
115	RPL3	0,78	4E-128	0,51	4E-12	1,20	2E-131	0,57	0,0008	0,83	8E-163	0,56					



	Vergleich:	1	2	3	4	5	6	7	8								
124	SEMA3E	0,64	0,0003	0,59	0,0293	1,51	9E-20	1,58	5E-10	0,81	2E-05	0,63	0,0069	1,65	1E-19	1,50	2E-11
125	RPLP2	0,74	2E-99	0,43	9E-07	0,84	2E-38	0,55	0,0025	0,81	4E-125	0,70	8E-31	0,96	2E-46	0,94	3E-08
126	RAB39B	0,65	3E-05	0,33	0,1554	1,56	3E-23	0,90	7E-06	0,81	3E-08	0,58	0,0013	1,26	6E-15	0,78	3E-05
127	QARS	0,69	2E-51	0,02	0,8832	1,32	2E-106	0,07	0,7362	0,81	4E-95	0,12	0,0771	0,96	7E-62	0,20	0,3035
128	RPL10P16	0,85	5E-84	0,61	1E-06	1,46	2E-128	1,26	6E-12	0,81	4E-88	0,81	1E-12	1,39	2E-101	1,35	3E-14
129	AC074033.1	0,62	0,001	0,12	0,7265	0,93	7E-06	0,50	0,0855	0,80	4E-35	0,54	0,0201	0,80	1E-08	0,63	0,0329
130	AC116533.1	0,67	2E-98	0,70	7E-19	0,93	2E-28	1,12	2E-17	0,80	6E-146	0,95	3E-46	1,21	1E-45	1,41	9E-27
131	RPL3P4	0,88	2E-81	0,63	0,0003	1,29	2E-42	0,92	3E-06	0,79	2E-49	0,50	0,0009	0,77	5E-14	0,90	4E-05
132	RPL18A	0,82	4E-123	0,34	0,0765	0,97	9E-40	0,25	0,2829	0,79	2E-78	0,49	3E-15	1,03	3E-40	0,74	0,0004
133	AL683813.1	0,67	0,0002	0,62	0,0005	1,23	1E-12	1,24	2E-10	0,79	2E-06	0,68	2E-06	1,07	3E-12	0,94	5E-07
134	GYG2	0,94	1E-20	0,92	1E-06	1,25	8E-36	1,27	2E-12	0,79	2E-08	0,89	6E-06	2,04	3E-68	1,62	3E-17
135	LINC01515	0,70	1E-16	1,02	2E-20	1,65	4E-83	2,21	8E-52	0,79	6E-30	1,19	2E-45	0,98	9E-32	1,41	2E-22
136	RPL10	0,74	8E-135	0,31	4E-05	1,45	7E-183	0,88	2E-08	0,78	4E-126	0,37	2E-12	1,32	1E-145	0,84	8E-08
137	PZP	0,97	4E-06	1,18	1E-07	1,34	5E-09	1,43	5E-07	0,78	0,0002	1,22	7E-10	0,95	3E-05	1,15	2E-05
138	RPS3AP26	0,69	4E-45	0,41	0,0035	0,67	8E-17	0,64	0,0002	0,78	8E-08	0,51	0,0003	1,12	2E-29	1,06	8E-10
139	TRPV1	1,34	2E-25	1,08	2E-13	1,50	4E-32	1,21	2E-14	0,78	3E-11	1,00	2E-16	0,77	5E-11	1,01	6E-13
140	AC005912.1	0,99	5E-161	0,95	3E-16	0,92	3E-29	1,23	3E-13	0,78	5E-48	0,89	9E-18	0,91	2E-23	1,21	6E-13
141	INTS3	0,90	1E-72	0,75	7E-23	0,76	5E-23	0,39	0,0003	0,77	5E-62	0,60	7E-29	0,75	2E-22	0,43	9E-05
142	EIF4BP6	0,72	1E-35	0,12	0,4287	1,00	1E-33	0,23	0,2307	0,77	4E-39	0,28	0,0458	1,09	2E-43	0,61	0,0015
143	UNC5C	0,98	1E-34	0,79	1E-14	0,84	2E-11	0,40	0,0022	0,77	3E-19	0,53	9E-09	0,80	5E-10	0,42	0,0031
144	RPS27	1,01	2E-140	0,59	1E-08	0,97	2E-20	0,76	3E-06	0,77	8E-53	0,74	6E-24	0,88	6E-15	0,92	1E-09
145	AC079944.1	0,68	0,0006	NA	NA	1,01	9E-08	NA	NA	0,77	9E-06	NA	NA	0,63	0,0008	NA	NA
146	RPL37A	0,65	1E-118	0,55	6E-11	0,72	5E-17	0,63	2E-08	0,77	4E-126	0,65	3E-39	0,87	6E-23	0,72	1E-12
147	RPS13	0,69	2E-98	0,42	7E-07	0,74	2E-19	0,60	6E-05	0,77	4E-107	0,49	5E-19	0,90	1E-26	0,71	2E-06
148	SNHG1	0,72	3E-105	0,70	3E-14	0,67	3E-21	0,76	7E-07	0,76	7E-75	0,67	1E-15	0,76	2E-23	0,80	1E-07
149	RPL18AP3	0,73	1E-56	0,14	0,6392	1,13	4E-68	0,51	0,11	0,75	3E-54	0,35	0,1594	1,21	5E-74	0,91	0,0024
150	AC073861.1	0,62	1E-28	0,06	0,8113	1,04	3E-26	0,44	0,0066	0,75	2E-47	0,11	0,4553	0,76	3E-14	-0,01	0,9451
151	EIF3L	0,86	3E-122	0,34	3E-05	1,24	3E-141	0,72	2E-11	0,75	2E-89	0,34	8E-10	0,83	4E-55	0,41	0,0002
152	RPL10AP6	0,77	4E-31	0,09	0,7007	1,04	2E-32	0,51	0,0377	0,75	9E-28	0,13	0,4836	0,92	7E-23	0,47	0,046
153	MYH3	1,56	1E-21	1,39	3E-15	1,95	3E-33	1,31	3E-12	0,75	4E-06	1,30	1E-17	1,01	4E-10	1,02	2E-08
154	C6orf48	0,73	1E-29	0,54	2E-11	1,09	3E-38	1,04	1E-22	0,75	2E-33	0,47	1E-13	0,91	8E-27	0,77	8E-13
155	A2M	0,68	5E-05	1,17	1E-09	0,76	1E-05	1,11	2E-07	0,74	2E-05	0,94	3E-07	0,95	9E-08	0,92	2E-05
156	RPS18	0,74	1E-195	0,47	4E-09	1,06	4E-38	0,83	2E-06	0,74	3E-77	0,54	2E-23	0,76	4E-17	0,66	0,0002
157	RPL39P3	0,67	8E-107	0,56	3E-10	0,77	5E-18	0,87	2E-07	0,74	1E-110	0,60	7E-15	1,02	5E-28	0,99	1E-08
158	EEF2	0,75	3E-170	0,29	0,0009	1,02	5E-100	0,24	0,2962	0,74	3E-174	0,32	2E-16	0,91	8E-83	0,52	0,0146
159	RPSA	0,74	3E-166	0,53	3E-09	1,17	4E-70	0,89	2E-11	0,74	4E-72	0,52	5E-27	1,04	1E-44	0,81	3E-10
160	LINC01359	0,84	4E-06	1,18	9E-10	1,52	4E-12	1,98	2E-13	0,73	5E-06	1,31	1E-18	0,83	0,0002	1,33	9E-08
161	ASMTL	0,66	0,0002	0,52	0,0644	0,87	1E-07	0,70	0,0476	0,73	2E-05	0,35	0,1917	1,08	1E-10	0,59	0,1009
162	AC010468.1	0,62	2E-11	0,34	0,2016	0,77	2E-11	0,58	0,0488	0,73	8E-14	0,38	0,1224	1,21	9E-23	0,99	0,0003
163	AC113935.1	0,64	7E-53	0,35	0,0254	0,69	7E-12	0,66	7E-05	0,72	4E-48	0,34	0,0045	0,70	3E-11	0,44	0,0041
164	SLC25A6	1,18	3E-11	0,28	0,1149	1,36	2E-43	0,65	0,1353	0,72	2E-15	0,51	0,0026	1,27	1E-29	0,92	0,013
165	RPS25	0,81	1E-116	0,18	0,0812	0,77	2E-17	0,29	0,0673	0,72	9E-96	0,27	3E-05	0,79	7E-18	0,46	0,004
166	AC091429.1	0,87	1E-08	NA	NA	1,11	2E-10	NA	NA	0,71	2E-05	NA	NA	0,97	1E-06	0,25	0,5667
167	SEMA3A	0,70	6E-07	1,02	1E-11	1,12	8E-19	0,97	3E-07	0,71	4E-05	0,78	2E-05	1,83	5E-37	1,32	7E-10
168	CCND1	1,56	4E-134	1,44	2E-56	1,70	1E-53	1,39	5E-16	0,71	7E-30	0,66	4E-21	0,92	1E-16	0,81	2E-06
169	C8orf34	0,59	0,0006	0,65	0,0004	1,57	4E-23	1,69	1E-25	0,71	2E-06	0,88	3E-10	0,89	2E-07	0,98	3E-08
170	AC104563.1	0,66	1E-07	NA	NA	0,92	7E-07	NA	NA	0,71	4E-07	NA	NA	1,08	3E-08	NA	NA
171	RPSAP58	0,84	8E-19	0,74	1E-10	1,13	6E-65	0,97	2E-06	0,71	5E-10	0,62	4E-19	1,11	5E-36	1,11	2E-09
172	AC012313.5	0,64	0,0008	0,64	0,0004	1,11	3E-08	0,64	0,0013	0,71	0,0002	0,80	4E-06	1,02	1E-06	1,02	2E-07
173	RPL19	0,69	1E-111	0,38	2E-05	0,85	2E-30	0,50	0,0022	0,70	4E-126	0,47	4E-15	0,93	3E-35	0,73	1E-06
174	NUCKS1	0,62	1E-104	1,34	7E-89	0,59	9E-26	1,40	4E-18	0,69	1E-103	1,48	4E-175	0,62	4E-25	1,41	2E-19
175	AC099336.2	0,66	3E-07	0,53	0,0383	1,04	3E-13	0,79	0,006	0,68	1E-07	0,76	0,0005	1,13	1E-14	0,89	0,0016
176	RPL10A	0,75	2E-168	0,10	0,4125	1,05	2E-49	0,45	0,0346	0,68	2E-114	0,02	0,7919	0,87	4E-33	0,32	0,1677
177	GABPB2	0,70	2E-20	0,31	0,0251	0,87	2E-18	0,50	0,0005	0,68	7E-19	0,31	0,0073	0,77	2E-13	0,41	0,0032
178	CD109	0,69	9E-12	0,87	6E-08	0,83	6E-09	1,12	7E-09	0,68	1E-11	1,30	4E-22	0,77	1E-07	1,22	1E-10
179	RPS28	0,67	2E-07	0,25	0,0256	0,91	5E-13	0,10	0,6731	0,67	5E-07	0,35	0,0004	0,86	3E-10	0,47	0,0277
180	RPS9	0,69	9E-132	0,26	0,0096	0,82	8E-30	0,27	0,1452	0,67	1E-75	0,30	6E-08	0,82	1E-26	0,47	0,0096
181	HMCN1	0,89	2E-15	0,71	2E-09	0,80	7E-09	0,44	0,0017	0,67	9E-06	0,89	3E-08	1,63	8E-29	1,95	2E-34
182	RPL34	0,73	9E-127	0,48	2E-08	0,70	5E-17	0,63	2E-07	0,67	2E-75	0,50	1E-20	0,95	6E-28	0,90	4E-14
183	EIF4BP3	0,83	2E-06	NA	NA	1,30	7E-13	NA	NA	0,66	2E-05	NA	NA	1,28	1E-15	NA	NA
184	RPL5	0,64	2E-141	0,52	5E-17	0,75	8E-25	0,78	3E-27	0,66	2E-89	0,54	8E-42	0,72	2E-20	0,70	2E-22
185	RPL22L1	0,75	2E-22	0,72	4E-10	0,99	2E-24	1,53	2E-21	0,66	4E-23	0,67	7E-17	1,03	3E-26	0,83	7E-08
186	DPH5	0,59	1E-19	0,35	0,0019	0,71	7E-20	0,62	1E-07	0,66	2E-19	0,45	1E-07	0,76	1E-18	0,42	8E-05
187	EIF3FP3	0,76	3E-09	-0,10	0,7801	0,79	5E-09	NA	NA	0,66	3E-06	NA	NA	0,65	2E-05	NA	NA
188	PHC2	0,61	1E-37	0,71	5E-17	0,69	3E-24	0,55	0,0003	0,66	2E-37	0,73	8E-30	0,74	5E-26	0,93	1E-11
189	AKR7A2P1	0,84	8E-09	0,88	1E-12	1,17	2E-17	1,15	1E-13	0,66	2E-06	0,52	4E-06	0,59	4E-05	0,28	0,1012
190	DACH2	0,64	0,0002	1,11	1E-07	0,77	1E-05	1,62	9E-13	0,65	0,0006	1,03	2E-07	0,93	4E-07	1,61	3E-14
191	RPL10P9	0,77	5E-17	0,68	0,0051	1,44	1E-53	1,44	3E-10	0,65	4E-10	0,43	0,0706	1,25	5E-31	1,26	3E-08
192	RPS3A	0,60	6E-105	0,29	0,0036	0,67	6E-17	0,53	0,0001	0,65	2E-09	0,51	5E-19	1,22	8E-38	1,11	1E-17
193	RPLP1	0,76	3E-73	0,64	1E-18	0,97	1E-29	0,72	4E-06	0,65	6E-51	0,73	2E-45	0,			

	Vergleich:	1		2		3		4		5		6		7		8	
204	ELOVL6	0,59	7E-13	0,49	4E-05	0,95	2E-19	0,83	4E-09	0,62	1E-14	0,61	4E-11	0,98	1E-22	1,02	2E-15
205	VDR	0,82	7E-11	0,66	9E-05	0,68	1E-06	0,30	0,1542	0,62	9E-05	0,35	0,0902	1,14	2E-14	0,79	0,0002
206	RPL4	0,62	8E-162	0,32	2E-05	0,84	6E-32	0,49	0,0007	0,62	3E-69	0,34	4E-14	0,76	2E-23	0,52	0,0003
207	RPL4P4	0,71	3E-78	0,18	0,1637	0,90	1E-36	0,37	0,0218	0,61	6E-38	0,33	0,002	0,72	6E-21	0,60	0,0002
208	COL13A1	1,23	7E-17	1,34	1E-19	1,01	7E-09	0,65	0,0023	0,61	0,0003	0,76	4E-07	0,75	0,0001	0,69	0,0005
209	COL4A1	0,59	5E-20	0,49	0,0004	1,11	6E-57	1,08	6E-13	0,61	8E-18	0,79	8E-12	1,05	1E-40	1,14	2E-14
210	RPS24	0,59	2E-90	0,42	2E-11	0,70	1E-19	0,66	7E-18	0,61	8E-66	0,47	2E-23	0,60	3E-13	0,53	5E-10
211	CCDC3	0,86	2E-08	0,74	0,0023	1,19	3E-16	0,48	0,0874	0,61	0,0007	0,51	0,041	1,17	3E-13	0,88	0,0011
212	FDXR	1,10	3E-46	0,54	9E-06	0,84	2E-20	0,04	0,8551	0,60	5E-13	0,24	0,0469	0,69	1E-12	-0,05	0,829
213	MARCH1	0,87	2E-18	0,77	5E-16	0,85	6E-09	1,10	7E-07	0,59	2E-09	0,79	9E-26	0,72	4E-07	0,91	3E-05
214	POLN	0,81	9E-13	1,14	2E-13	0,68	2E-08	0,44	0,0342	0,59	8E-06	1,04	2E-12	0,81	7E-11	0,83	0,0001
215	EPHB2	0,91	2E-25	0,68	7E-07	1,17	5E-40	0,44	0,0025	0,59	5E-10	0,66	8E-08	1,12	5E-35	0,69	4E-07

Tabelle 6 In CMTr1-defizienten Zellen vermindert exprimierte Transkripte.

Ergebnisse des RNA-Seq: Dargestellt sind alle Transkripte, welche in CMTr1-defizienten Zellen als vermindert exprimiert ermittelt wurden. Die aufgelisteten Transkripte erfüllen folgende Kriterien: p-Wert (adj.p) von <0,001 und eine mindestens 1,5-fach erhöhte Expression in CMTr1-kompetenten Zellen ( $\log_2FC > 0,586$ ) in den Vergleichspaaren (1,3,5,7).

### 6.1.2. RNA-Seq: In CMTr1-defizienten Zellen verstärkt exprimierte Transkripte

In Tabelle 7 sind die in CMTr1-defizienten Zellen verstärkt exprimierten Transkripte dargestellt. Die Transkripte sind basierend auf der differentiellen Transkriptexpression ( $\log_2FC$ ) zwischen den Zelllinien CMTr1-KO#2 pRp-CMTr1 und CMTr1-KO#2 (Vergleichspaar 6) sortiert.

	Vergleich:	1		2		3		4		5		6		7		8	
		Zelllinie/		CMTr1-KO#1-		wt/		wt/		CMTr1-KO#2-		CMTr1-KO#2-		wt/		wt/	
		pRpCMTr1/		pRpCMTr1/		CMTr1-KO#1		CMTr1-KO#1		CMTr1-KO#2-		CMTr1-KO#2-		CMTr1-KO#2		CMTr1-KO#2	
		CMTr1-KO#1		CMTr1-KO#1		CMTr1-KO#1		CMTr1-KO#1		CMTr1-KO#2		CMTr1-KO#2		CMTr1-KO#2		CMTr1-KO#2	
Kondition	4sU		total		4sU		total		4sU		total		4sU		total		
	log2FC	adj.pv	log2FC	adj.pv	log2FC	adj.pv	log2FC	adj.pv	log2FC	adj.pv	log2FC	adj.pv	log2FC	adj.pv	log2FC	adj.pv	
1	C1orf228	-1,54	6E-13	-0,90	0,0005	-1,82	3E-11	-1,95	7E-09	-1,85	6E-18	-1,14	5E-07	-1,92	1E-12	-1,93	4E-11
1	AC136475.1	-1,30	2E-10	-1,54	5E-16	-1,91	5E-12	-3,19	7E-39	-1,22	2E-07	-1,52	4E-12	-1,07	0,0006	-1,52	6E-09
2	SORCS1	-2,08	8E-55	-1,96	3E-44	-1,52	6E-22	-1,21	3E-12	-1,78	3E-54	-1,50	8E-28	-1,48	1E-24	-0,93	2E-07
3	AL136379.1	-1,51	4E-37	-1,19	3E-30	-1,80	3E-34	-2,07	2E-64	-1,62	9E-35	-1,45	7E-61	-1,60	2E-25	-1,38	2E-40
4	DHRS2	-2,14	4E-111	-2,06	7E-67	-3,66	4E-148	-4,25	3E-128	-1,43	5E-21	-1,40	3E-14	-1,84	5E-24	-1,85	2E-18
5	AL359510.2	-1,19	6E-10	-1,21	1E-13	-1,35	5E-08	-1,92	5E-19	-1,08	5E-08	-1,26	1E-14	-1,21	2E-06	-1,50	3E-12
6	SEMA3B	-1,63	5E-45	-1,48	5E-25	-2,43	2E-57	-2,59	3E-45	-1,55	2E-25	-1,24	2E-13	-1,62	4E-21	-1,54	4E-15
7	METRn	-0,84	4E-41	-1,21	3E-25	-1,14	3E-39	-2,08	2E-21	-0,98	9E-44	-1,23	1E-56	-0,85	1E-20	-1,30	4E-11
8	ACP5	-1,35	9E-17	-1,58	5E-25	-1,51	8E-18	-1,69	8E-27	-1,21	9E-13	-1,22	6E-18	-1,47	6E-16	-1,38	5E-19
9	Z99129.3	-1,15	7E-11	-1,13	2E-13	-1,97	2E-22	-1,88	8E-20	-1,38	7E-14	-1,22	1E-13	-1,61	2E-16	-1,54	6E-14
10	SLC34A3	-1,19	1E-21	-1,00	5E-10	-1,70	9E-31	-2,03	1E-19	-1,45	2E-28	-1,20	2E-16	-1,64	1E-26	-1,39	3E-13
11	U73166.1	-1,21	5E-24	-1,05	2E-13	-2,01	3E-33	-2,47	2E-35	-1,37	4E-18	-1,17	5E-17	-1,23	2E-10	-1,37	2E-16
12	GGT1	-1,47	2E-19	-1,13	2E-10	-1,33	7E-13	-1,60	6E-16	-1,42	4E-19	-1,16	2E-11	-1,35	9E-13	-1,34	2E-11
13	C1orf228	-1,54	6E-13	-0,90	0,0005	-1,82	3E-11	-1,95	7E-09	-1,85	6E-18	-1,14	5E-07	-1,92	1E-12	-1,93	4E-11
14	SYTL5	-0,62	5E-11	0,03	0,8851	-2,85	3E-82	-1,91	1E-18	-1,54	3E-39	-1,09	1E-08	-1,91	6E-33	-1,04	8E-06
15	FAM57B	-1,86	1E-20	-1,41	3E-09	-2,63	4E-25	-2,56	5E-15	-1,53	2E-11	-1,07	4E-06	-1,55	1E-07	NA	NA
16	PYGM	-1,10	5E-09	-1,15	3E-13	-0,66	0,001	-1,12	5E-08	-0,86	1E-05	-1,05	4E-13	-0,75	0,0002	-0,86	5E-06
17	AC092117.1	-0,71	3E-14	-0,87	3E-06	-0,83	1E-16	-1,34	1E-08	-0,81	3E-17	-1,05	2E-55	-0,83	9E-16	-0,86	8E-05
18	ANKRD31	-1,24	4E-21	-1,02	3E-11	-1,56	8E-28	-1,32	8E-16	-1,39	1E-20	-1,04	3E-12	-1,15	2E-14	-0,94	4E-09
19	AC106820.2	-1,20	2E-18	-0,97	5E-17	-1,46	9E-22	-1,64	1E-17	-1,25	1E-16	-1,04	7E-20	-1,33	1E-17	-0,98	3E-07
20	AC127496.7	-1,25	1E-09	-1,13	2E-06	-0,86	0,0001	-0,47	0,1003	-1,31	8E-12	-1,04	5E-07	-1,31	3E-10	-0,65	0,0142
21	LINC00638	-1,20	3E-13	-0,71	8E-06	-1,72	2E-19	-1,52	3E-17	-1,36	2E-15	-1,03	9E-12	-1,69	3E-18	-1,17	1E-12
22	ODF3B	-0,76	8E-08	-1,01	3E-20	-0,70	3E-06	-1,30	2E-13	-0,97	7E-14	-1,02	2E-26	-1,03	1E-13	-1,09	5E-11
23	SCT	-1,48	1E-32	-0,95	3E-09	-1,24	2E-24	-1,24	3E-11	-1,21	2E-21	-1,02	5E-12	-1,17	7E-19	-1,25	1E-11
24	TMEM198	-0,75	3E-13	-0,57	0,0033	-1,09	3E-20	-1,52	8E-12	-1,03	7E-18	-1,01	2E-08	-0,91	4E-13	-1,40	5E-11
25	AL133367.1	-0,79	1E-07	-0,91	3E-12	-1,29	3E-15	-2,03	2E-20	-1,11	3E-13	-0,99	5E-17	-1,37	1E-16	-1,44	5E-12
26	RIBC2	-0,81	2E-07	-0,60	0,0027	-0,73	3E-06	-0,82	6E-05	-1,14	9E-14	-0,96	2E-08	-0,94	5E-10	-0,95	4E-06
27	CLMP	-1,22	1E-26	-1,07	1E-14	-1,33	2E-27	-1,38	6E-12	-0,88	2E-11	-0,96	1E-17	-0,99	8E-14	-1,30	1E-11
28	MYO1F	-0,79	4E-07	-0,66	7E-05	-1,10	1E-10	-0,99	2E-07	-1,29	1E-21	-0,96	2E-11	-1,78	3E-28	-0,93	4E-07
29	AL645608.1	-0,91	2E-72	-0,70	4E-13	-0,71	4E-18	-1,24	2E-09	-1,17	2E-141	-0,96	8E-51	-1,19	1E-48	-1,07	3E-08
30	WDR31	-1,20	3E-13	-0,69	0,0021	-1,50	1E-10	-0,93	0,019	-1,26	2E-11	-0,93	2E-05	-1,14	5E-06	-0,58	0,1305
31	GRIK5	-0,95	2E-07	-0,87	0,0003	-1,73	7E-13	-1,56	3E-08	-1,53	6E-16	-0,93	7E-05	-1,76	1E-13	-0,98	0,0014

	Vergleich:	1	2	3	4	5	6	7	8								
32	MMP25	-0,65	0,0007	-0,73	6E-05	-0,73	0,0006	-1,28	2E-10	-0,94	1E-06	-0,93	7E-07	-0,92	2E-05	-1,00	6E-07
33	SNAI3	-1,04	3E-12	-0,93	1E-06	-1,36	9E-18	-1,58	1E-14	-1,06	3E-12	-0,91	1E-06	-1,24	9E-14	-0,93	1E-05
34	RNF224	-0,95	1E-08	-0,88	8E-06	-1,69	5E-19	-1,72	6E-11	-1,38	3E-14	-0,90	3E-06	-1,58	7E-15	-1,04	2E-05
35	PSD4	-0,96	4E-11	-0,94	6E-08	-0,84	8E-07	-1,34	5E-13	-1,37	6E-20	-0,90	3E-07	-0,81	1E-06	-0,88	4E-06
36	CD72	-1,39	4E-14	-1,09	1E-06	-1,83	2E-17	-1,55	5E-09	-1,20	2E-09	-0,90	3E-06	-1,51	8E-11	-1,18	3E-06
37	AC084125.2	-1,18	7E-27	-0,98	2E-13	-1,12	4E-24	-1,40	5E-13	-1,14	3E-25	-0,89	1E-14	-1,06	2E-21	-0,83	2E-05
38	HAGHL	-1,01	1E-34	-1,22	2E-22	-1,03	6E-27	-1,53	6E-11	-1,03	2E-27	-0,88	5E-15	-0,71	3E-11	-0,62	0,0123
39	HDDC3	-0,79	1E-27	-0,83	5E-12	-0,78	1E-14	-1,25	1E-10	-0,96	2E-39	-0,86	3E-26	-0,86	2E-17	-1,06	1E-09
40	AL645608.3	-0,78	7E-10	-0,90	2E-08	-0,63	1E-06	-1,50	6E-12	-1,08	4E-22	-0,86	2E-08	-1,20	2E-24	-1,18	2E-08
41	TBC1D10C	-0,80	6E-11	-0,80	5E-09	-1,43	2E-25	-1,99	3E-18	-1,04	6E-12	-0,86	1E-08	-0,97	2E-10	-0,72	0,0032
42	AC145098.2	-0,75	6E-05	-0,86	2E-05	-1,19	5E-09	-1,08	2E-07	-1,10	1E-09	-0,85	1E-06	-1,42	3E-13	-1,09	2E-08
43	ARHGAP30	-0,67	7E-05	-0,75	7E-08	-1,12	6E-09	-1,09	1E-10	-0,77	6E-06	-0,84	3E-11	-1,09	2E-08	-0,90	5E-08
44	MEI3	-0,76	1E-11	-0,40	0,0836	-0,67	1E-07	-0,84	0,0003	-1,32	3E-33	-0,83	5E-06	-0,97	6E-16	-1,17	2E-08
45	NR1H3	-0,93	2E-20	-0,78	1E-08	-1,02	4E-23	-1,07	9E-16	-1,07	4E-23	-0,82	1E-10	-0,94	4E-18	-0,86	8E-11
46	PAN2	-0,82	5E-65	-0,65	6E-16	-1,02	3E-40	-1,07	2E-23	-0,89	3E-82	-0,82	1E-44	-1,10	2E-43	-1,06	7E-26
47	CCDC78	-1,22	5E-75	-1,10	5E-22	-1,20	2E-48	-1,22	4E-07	-1,05	2E-48	-0,82	3E-24	-0,95	3E-30	-0,40	0,1164
48	ARID5B	-0,91	2E-55	-0,71	9E-17	-0,94	2E-37	-0,86	1E-18	-0,78	3E-41	-0,80	3E-44	-1,19	3E-62	-1,05	7E-29
49	RRNAD1	-0,86	2E-31	-0,77	3E-18	-0,78	2E-14	-0,96	3E-16	-0,93	2E-36	-0,80	1E-25	-0,70	1E-11	-0,64	4E-08
50	CUEDC2	-1,28	9E-105	-0,78	2E-10	-1,14	1E-40	-0,96	8E-10	-1,08	3E-66	-0,79	1E-11	-0,81	9E-20	-0,63	8E-05
51	AC002128.1	-0,73	6E-09	-0,77	3E-12	-0,82	1E-09	-0,99	9E-10	-0,74	5E-08	-0,77	1E-15	-0,68	3E-06	-0,74	3E-06
52	HOXD8	-0,70	3E-08	-0,56	7E-05	-1,01	7E-13	-1,18	4E-12	-0,87	5E-11	-0,77	2E-07	-0,88	2E-09	-0,80	5E-05
53	PSD	-0,64	0,0001	-0,84	7E-06	-0,71	3E-05	-1,31	5E-08	-0,66	8E-05	-0,77	3E-05	-0,77	1E-05	-0,96	3E-05
54	KAZALD1	-1,17	1E-50	-0,90	1E-13	-1,66	5E-75	-2,12	4E-28	-0,90	1E-19	-0,76	5E-13	-1,03	5E-24	-1,10	4E-10
55	ANKRD34A	-0,81	4E-07	-0,71	9E-07	-1,25	2E-14	-1,96	4E-27	-0,92	2E-08	-0,76	9E-07	-1,06	1E-10	-1,28	3E-12
56	MMP25-AS1	-0,61	0,0002	-0,60	0,0002	-0,84	2E-06	-1,01	1E-09	-1,01	3E-10	-0,76	5E-06	-1,03	2E-09	-0,69	0,0002
57	LCAT	-0,75	1E-11	-0,58	2E-06	-1,16	6E-21	-1,29	3E-13	-1,00	1E-18	-0,75	7E-12	-1,18	1E-21	-0,86	4E-07
58	GPT	-1,16	5E-53	-0,85	2E-05	-1,28	4E-32	-1,65	3E-10	-1,05	3E-37	-0,75	7E-15	-0,94	6E-17	-0,63	0,0167
59	CYSRT1	-0,96	5E-11	-0,86	5E-06	-1,52	1E-19	-1,58	2E-11	-1,02	4E-11	-0,74	4E-05	-1,37	9E-16	-0,98	2E-05
60	SNAI3-AS1	-1,58	9E-63	-1,03	4E-14	-1,77	7E-66	-1,54	1E-27	-1,21	7E-30	-0,74	1E-07	-1,31	2E-31	-0,73	9E-07
61	GRIN1	-1,80	1E-21	-2,39	4E-28	-1,11	2E-09	-1,89	1E-09	-1,13	3E-10	-0,74	0,0006	-1,05	1E-08	-0,80	0,0103
62	TAPT1-AS1	-0,71	9E-05	-0,48	0,0143	-0,93	3E-06	-0,71	0,0048	-0,73	4E-06	-0,73	2E-06	-1,36	6E-14	-1,05	4E-06
63	AL138781.1	-0,95	5E-10	-0,58	0,0089	-1,75	4E-24	-1,58	2E-10	-1,53	9E-20	-0,73	0,0005	-1,57	2E-19	-1,16	8E-07
64	TNFRSF12A	-0,80	1E-12	-0,81	9E-10	-1,18	3E-13	-1,72	1E-14	-0,73	5E-11	-0,72	4E-09	-1,00	9E-10	-1,14	9E-08
65	C10QNF6	-0,77	4E-19	-0,52	4E-07	-1,17	1E-18	-1,45	1E-25	-1,04	2E-22	-0,72	8E-17	-0,87	1E-08	-0,78	3E-09
66	CARMIL3	-0,97	5E-13	-0,87	1E-07	-1,38	9E-19	-1,53	7E-18	-0,81	2E-07	-0,72	3E-05	-0,70	0,0001	-0,80	1E-05
67	FIZ1	-0,63	2E-07	-0,70	1E-07	-0,75	4E-10	-1,09	2E-09	-0,72	2E-08	-0,71	2E-11	-0,79	3E-10	-0,88	1E-07
68	BNIP1	-0,81	1E-05	-0,69	4E-05	-0,97	9E-07	-0,86	1E-07	-0,70	0,0001	-0,71	6E-06	-1,08	3E-08	-0,70	4E-05
69	C8G	-0,79	0,0004	-1,17	5E-07	-1,33	5E-07	-1,64	2E-08	-0,78	0,0008	-0,71	0,0027	-1,18	1E-05	-0,85	0,0071
70	TCAM1P	-1,01	1E-11	-0,65	0,0007	-1,75	1E-21	-1,77	3E-15	-0,60	0,0005	-0,70	0,0001	-1,19	5E-09	-1,37	3E-10
71	SAMD11	-0,75	3E-62	-0,63	2E-08	-0,82	3E-15	-1,31	8E-08	-0,82	1E-57	-0,69	1E-33	-0,91	2E-17	-0,92	8E-05
72	FAM66C	-1,23	5E-25	-0,63	1E-05	-1,13	1E-17	-0,84	7E-06	-1,15	2E-22	-0,68	1E-07	-1,22	4E-21	-0,76	7E-05
73	ZNF425	-0,88	7E-21	-0,82	1E-14	-1,81	3E-30	-1,94	4E-49	-0,65	2E-07	-0,67	7E-07	-0,98	6E-08	-0,98	1E-09
74	HIC1	-1,04	6E-09	-0,22	0,3487	-1,13	2E-09	-0,78	0,0002	-0,88	2E-06	-0,67	0,0004	-0,93	1E-06	-0,68	0,0017
75	NTN3	-1,02	1E-11	-1,21	5E-16	-1,11	4E-10	-1,63	2E-14	-1,20	8E-16	-0,66	6E-06	-1,08	2E-11	-0,84	0,0001
76	FMNL1	-0,69	5E-05	-0,76	3E-05	-0,85	1E-06	-1,93	1E-13	-0,65	0,0003	-0,66	0,0002	-0,67	0,0002	-1,11	1E-05
77	FBXL19-AS1	-0,61	4E-08	-0,65	4E-07	-0,78	7E-11	-0,75	6E-06	-0,77	2E-12	-0,66	3E-07	-0,96	1E-16	-0,55	0,0043
78	TM7SF2	-1,18	8E-93	-0,91	2E-18	-1,10	4E-55	-1,20	1E-08	-0,78	2E-36	-0,65	7E-19	-0,82	2E-28	-0,64	0,0023
79	AC026471.4	-0,95	3E-09	-0,80	0,0001	-1,18	5E-11	-1,93	7E-06	-1,28	7E-13	-0,64	0,0021	-1,01	6E-08	-0,57	0,0135
80	MAP4K1	-0,87	9E-07	-0,66	0,0037	-1,22	2E-09	-1,19	1E-05	-0,84	4E-06	-0,64	0,0025	-1,17	7E-09	-0,88	0,0006
81	CYB5D2	-0,85	5E-32	-0,70	9E-08	-0,96	1E-19	-1,01	8E-11	-0,87	4E-29	-0,64	5E-08	-0,80	1E-12	-0,62	2E-05
82	AC025171.1	-0,59	0,0003	-0,78	9E-06	-1,05	8E-10	-1,27	1E-07	-0,70	0,0001	-0,63	0,0001	-0,82	7E-06	-0,83	0,0006
83	CLSTN2	-1,77	2E-26	-1,00	8E-05	-1,66	3E-22	-0,97	0,0004	-1,24	2E-14	-0,63	0,0083	-1,64	7E-21	-0,78	0,0085
84	LBX2	-0,91	1E-10	-0,62	0,0002	-1,21	3E-16	-1,08	1E-07	-0,70	3E-06	-0,62	0,0001	-0,86	3E-08	-0,62	0,0035
85	UNC13A	-0,93	1E-07	-1,07	5E-12	-0,95	1E-07	-1,31	1E-13	-0,75	1E-05	-0,62	6E-05	-0,99	4E-08	-0,52	0,0079
86	SRP14-AS1	-1,11	1E-12	-0,91	9E-06	-1,20	5E-13	-1,36	1E-08	-0,93	4E-09	-0,62	0,0002	-0,96	1E-08	-0,99	2E-05
87	INTS6-AS1	-1,10	6E-09	-0,51	0,0118	-1,43	6E-12	-0,93	5E-06	-1,26	9E-11	-0,61	0,0007	-1,38	5E-11	-0,83	1E-05
88	PPM1N	-0,74	4E-07	-0,70	0,0044	-1,18	4E-11	-1,55	1E-08	-0,83	2E-07	-0,60	0,0103	-0,83	1E-05	-1,16	2E-05
89	MYO15B	-0,67	4E-09	-0,50	0,0001	-0,60	0,0004	-0,79	2E-05	-0,85	3E-17	-0,60	1E-10	-0,78	3E-06	-0,65	1E-04
90	ACE	-0,72	0,0006	-0,65	0,0054	-0,79	0,0005	-0,94	0,0003	-0,92	1E-05	-0,60	0,0037	-1,05	1E-06	-1,00	2E-05
91	C9orf172	-0,99	7E-18	-1,06	3E-14	-1,39	3E-19	-1,73	3E-10	-0,85	2E-12	-0,60	2E-06	-1,10	3E-11	-0,81	0,0034
92	AC010997.4	-0,81	4E-06	-0,83	2E-07	-0,75	7E-05	-0,64	2E-05	-0,68	4E-05	-0,60	1E-05	-0,98	7E-08	-0,77	1E-06
93	ADAMTS13	-0,65	1E-13	-0,54	7E-07	-0,60	5E-05	-1,13	3E-14	-1,09	7E-22	-0,59	1E-09	-0,96	5E-11	-0,93	1E-10
94	TMEM59L	-0,77	5E-08	-0,93	3E-07	-2,57	1E-54	-3,41	4E-39	-1,07	8E-08	-0,58	0,0201	-0,75	0,0003	NA	NA
95	HSD17B6	-0,89	3E-12	-0,72	0,0022	-1,05	5E-14	-1,07	1E-05	-0,77	6E-09	-0,58	0,0051	-0,88	6E-10	-1,14	3E-06
96	ZSWIM4	-0,64	1E-06	-0,60	0,0003	-1,08	1E-13	-1,28	5E-13	-0,66	3E-06	-0,58	0,0007	-0,94	5E-10	-0,91	1E-05
97	LINC01521	-0,66	2E-09	-0,56	4E-05	-0,78	2E-12	-1,24	5E-10	-0,68	5E-09	-0,57	3E-07	-0,78	4E-12	-0,76	2E-05
98	SLC2A11	-0,85	2E-27	-0,60	8E-07	-1,53	1E-45	-1,44	6E-23	-0,84	7E-16	-0,55	0,0001	-0,73	4E-09	-0,69	2E-05
99	LCP1	-1,38	7E-17	-0,40	0,1418	-1,95	1E-24	-1,18	4E-05	-1,58	9E-19	-0,55	0,0233	-1,80	1E-19	-1,00	0,0012
100	THBS3	-0,90	2E-20	-0,67	3E-07	-1,23	3E-15	-1,53	3E-18	-1,04	2E-25	-0,54	3E-06	-1,04	1E-10	-0,97	3E-10
101	NKAIN2	-1,12	3E-09	-0,05	0,8802	-1,01	3E-07	-0,37	0,2502	-1,21	2E-12	-0,53	0,0153	-1,63	1E-19	-0	

	Vergleich:	1	2	3	4	5	6	7	8								
111	LRRC23	-0,88	2E-07	-0,46	0,0746	-1,25	3E-14	-1,43	1E-06	-1,11	1E-10	-0,46	0,0716	-0,83	2E-06	-0,56	0,0664
112	MXRA8	-0,96	4E-22	-0,76	2E-07	-1,22	2E-25	-1,38	1E-06	-0,75	5E-12	-0,45	0,0029	-0,79	2E-10	-0,64	0,0351
113	PDE4C	-1,20	4E-08	-0,71	0,0071	-1,40	4E-07	-1,27	6E-05	-0,95	2E-05	-0,45	0,0864	-1,22	1E-05	NA	NA
114	HSD17B1P1	-0,72	0,0004	-0,75	2E-05	-0,76	0,0002	-1,02	2E-05	-0,71	0,0009	-0,44	0,0145	-0,78	0,0009	-0,61	0,0156
115	FTCD	-0,86	5E-05	-0,94	6E-05	-0,94	0,0004	-1,07	7E-06	-0,74	6E-05	-0,44	0,065	-1,51	3E-10	-0,86	0,0005
116	AL356019.2	-0,71	2E-05	-0,37	0,1478	-0,71	4E-05	-0,08	0,7862	-0,67	1E-05	-0,44	0,0289	-0,97	3E-09	-0,39	0,1195
117	LRRK1	-1,31	1E-21	-0,98	8E-14	-1,02	4E-09	-1,11	2E-16	-1,00	3E-12	-0,42	0,0024	-0,87	2E-06	-0,53	0,0003
118	SIRT5	-0,99	1E-30	-0,56	6E-05	-0,68	4E-09	-0,31	0,1116	-0,96	4E-34	-0,42	0,0002	-1,06	6E-21	-0,66	0,0002
119	DDX55P1	-1,31	3E-09	-0,74	0,007	-1,27	8E-07	-0,06	0,881	-0,80	0,0004	-0,39	0,1378	-1,18	4E-06	-0,02	0,9621
120	BICDL2	-0,96	6E-08	-0,63	0,0002	-0,92	6E-07	-0,81	0,0002	-0,72	9E-05	-0,39	0,0236	-0,83	1E-05	-0,30	0,2315
121	NUP50-AS1	-0,90	4E-12	-0,77	2E-07	-0,78	5E-08	-0,66	8E-06	-0,59	8E-08	-0,37	0,0026	-1,22	4E-19	-1,12	3E-18
122	AL513318.2	-0,78	4E-07	-0,29	0,2855	-0,78	1E-06	-0,39	0,0763	-0,63	0,0001	-0,36	0,0904	-0,66	9E-05	-0,51	0,0231
123	AL359265.3	-1,28	1E-10	-0,44	0,1027	-1,35	4E-10	-0,74	0,0214	-1,26	1E-09	-0,34	0,1484	-1,29	4E-09	-0,72	0,0108
124	SGMS1-AS1	-0,78	5E-08	-0,39	0,0294	-0,94	3E-07	-0,75	0,0154	-0,81	2E-07	-0,29	0,0506	-0,91	8E-07	-0,77	0,009
125	HTR7P1	-0,67	3E-06	-0,25	0,1943	-0,95	2E-08	-1,33	1E-10	-0,64	1E-05	-0,29	0,0827	-0,84	2E-06	-0,91	1E-06
126	C5	-0,80	8E-08	-0,17	0,5451	-1,47	9E-17	-1,14	5E-05	-0,74	2E-05	-0,28	0,278	-1,03	5E-08	-0,81	0,009
127	MST1	-0,79	2E-20	-0,48	6E-05	-0,87	5E-18	-0,57	0,0045	-0,64	4E-16	-0,27	0,0006	-0,85	4E-20	-0,20	0,3636
128	TRPM4	-0,84	3E-20	-0,23	0,2291	-0,82	1E-16	-0,97	3E-07	-0,89	2E-26	-0,22	0,1402	-1,08	5E-30	-0,93	3E-07
129	SEMA3C	-0,86	1E-49	-0,25	0,0246	-1,14	4E-60	-0,48	0,0009	-0,67	2E-21	-0,20	0,0607	-0,67	3E-20	-0,19	0,2791
130	CARMIL2	-0,71	3E-09	-0,62	2E-05	-1,71	1E-34	-1,56	6E-13	-0,59	9E-05	-0,17	0,3097	-0,85	4E-08	-0,45	0,0479
131	CCDC183	-0,84	2E-06	-0,99	3E-07	-1,13	2E-09	-1,56	2E-12	-0,77	2E-05	-0,13	0,6195	-0,99	3E-07	-0,59	0,0183
132	CCDC183-AS1	-0,69	8E-08	-0,48	0,0012	-0,96	2E-12	-0,95	0,0008	-0,68	2E-07	-0,04	0,8572	-0,98	6E-12	-0,47	0,125

Tabelle 7: In CMTr1-defizienten Zellen verstärkt exprimierte Transkripte.

Ergebnisse des RNA-Seq: Dargestellt sind alle Transkripte, welche in CMTr1-defizienten Zellen als verstärkt exprimiert ermittelt wurden. Die aufgelisteten Transkripte erfüllen folgende Kriterien: p-Wert (adj.p) von  $<0,001$  und eine mindestens 1,5-fache verringerte Expression in CMTr1-kompetenten Zellen ( $\log_2FC < -0,586$ ) in den Vergleichspaaren (1,3,5,7).

## 6.2. Ergebnisse der Proteomanalyse

Auszug aus den Ergebnissen der differentiellen Proteinexpressionsanalyse (siehe Kapitel 4.11)

In Tabelle 8 sind die 48 zwischen den Zelllinien CMTr1-KO#2 pRp-CMTr1 und CMTr1-KO#2 differentiell exprimierte Proteine aufgelistet (pVal.adj <0,01 und log2FC>1 oder <-1).

#	Proteinname	UniProt ID	log2FC (CMTr1-KO#2-pRp-CMTr1 / CMTr1-KO#2)	adj.pVal
1	CMTR1	Q8N1G2	8,47935	3,1914E-12
2	FAM193B	Q96PV7	3,40895	0,02221978
3	NVL	O15381	3,213025	2,3638E-09
4	DGCR2	P98153	2,85065	0,02791003
5	PCNT	O95613	2,561075	0,00808847
6	SPG7	Q9UQ90	2,405075	0,0021565
7	SLC1A3	P43003	2,39135	1,3795E-09
8	HSDL2	Q6YN16	2,01225	6,4883E-05
9	ACSL4	O60488	1,935825	0,00924968
10	CCNL2	Q96S94	1,80045	0,02081924
11	ANKRD52	Q8NB46	1,773675	0,00396042
12	ESPL1	Q14674	1,702275	0,01472518
13	FAHD2A	Q96GK7	1,671875	2,4755E-05
14	GPRASP2	Q96D09	1,6143	0,00800812
15	PIR	O00625	1,61	0,00137528
16	AASS	Q9UDR5	1,473275	0,00019534
17	CXorf57	Q6NSI4	1,4388	5,9486E-05
18	AGTPBP1	Q9UPW5	1,381275	0,00062654
19	PRR3	P79522	1,348725	0,0015898
20	SKIV2L	Q15477	1,296625	1,2581E-06
21	RBM3	P98179	1,296	0,01471076
22	HMOX1	P09601	1,261575	0,00578781
23	TST	Q16762	1,247175	0,01929449
24	HEATR5A	Q86XA9	1,23835	0,01869956
25	GGCT	O75223	1,20935	1,9481E-05
26	CISD1	Q9NZ45	1,1678	3,5544E-09
27	GLA	P06280	1,097975	3,9826E-05
28	FDXR	P22570	1,075425	8,885E-05

#	Proteinname	UniProt ID	log2FC (CMTr1-KO#2-pRp-CMTr1 / CMTr1-KO#2)	adj.pVal
29	CA2	P00918	1,065575	3,629E-07
30	ATAD3B	Q5T9A4	1,059775	0,04676632
31	CDK5RAP3	Q96JB5	1,0366	0,00017655
32	LRRC41	Q15345	1,026775	0,03231732
33	GCFC2	P16383	1,018425	0,01671984
34	AMOT	Q4VCS5	1,014025	5,7124E-05
35	BAP18	Q8IXM2	-1,033925	0,00335216
36	TRNT1	Q96Q11	-1,119075	0,0105618
37	SIRT5	Q9NXA8	-1,142825	0,00121148
38	EYA3	Q99504	-1,174475	0,00028412
39	DSN1	Q9H410	-1,229475	0,03291008
40	TM7SF2	O76062	-1,31355	0,04749539
41	DVL2	O14641	-1,393875	5,0195E-06
42	ACY1	Q03154	-1,494925	0,04331288
43	KLF16	Q9BXX1	-1,5296	0,01264184
44	RYBP	Q8N488	-1,600875	0,01747531
45	MYEF2	Q9P2K5	-1,694375	0,02809416
46	LIN37	Q96GY3	-1,742825	0,03693321
47	AKIRIN2	Q53H80	-2,164225	0,01704725
48	ATP1A3	P13637	-2,891	0,0099501

Tabelle 8: Proteomanalyse: differentiell exprimierte Proteine

Es wurden durch Massenspektrometrie (LFQ) zwischen CMTr1-KO#2-pRp-CMTr1 und CMTr1-KO#2 differentiell exprimierte Proteine ermittelt. Die aufgelisteten Proteine weisen eine adjustierten p-Wert (adj.pVal) von <0,001 und eine log2FC>1 oder <-1 auf.

## 7. Literaturverzeichnis

- Abbas, Y. M., Laudenbach, B. T., Martínez-Montero, S., Cencic, R., Habjan, M., Pichlmair, A., Damha, M. J., Pelletier, J., & Nagar, B. (2017). Structure of human IFIT1 with capped RNA reveals adaptable mRNA binding and mechanisms for sensing N1 and N2 ribose 2'-O methylations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(11), E2106–E2115. <https://doi.org/10.1073/pnas.1612444114>
- Ablasser, A., Bauernfeind, F., Hartmann, G., Latz, E., Fitzgerald, K. A., & Hornung, V. (2009). RIG-I dependent sensing of poly(dA-dT) via the induction of an RNA polymerase III transcribed RNA intermediate. *Nature immunology*, *10*(10). <https://doi.org/10.1038/ni.1779>
- Adamson, T. E., Shore, S. M., & Price, D. H. (2003). Analysis of RNA polymerase II elongation in vitro. *Methods in Enzymology*, *371*, 264–275. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(03\)71019-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(03)71019-2)
- Adomavicius, T., Guaita, M., Zhou, Y., Jennings, M. D., Latif, Z., Roseman, A. M., & Pavitt, G. D. (2019). The structural basis of translational control by eIF2 phosphorylation. *Nature Communications*, *10*(1), 2136. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10167-3>
- Ahuja, D., Sáenz-Robles, M. T., & Pipas, J. M. (2005). SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. *Oncogene*, *24*(52), 7729–7745. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209046>
- Akichika, S., Hirano, S., Shichino, Y., Suzuki, T., Nishimasu, H., Ishitani, R., Sugita, A., Hirose, Y., Iwasaki, S., Nureki, O., & Suzuki, T. (2019). Cap-specific terminal N6-methylation of RNA by an RNA polymerase II-associated methyltransferase. *Science (New York, N.Y.)*, *363*(6423). <https://doi.org/10.1126/science.aav0080>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2014). *Molecular Biology of the Cell* (6th Aufl.). Garland Science.
- Allen, B. L., & Taatjes, D. J. (2015). The Mediator complex: A central integrator of transcription. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *16*(3), 155–166. <https://doi.org/10.1038/nrm3951>
- Amodeo, A. A., & Skotheim, J. M. (2016). Cell-Size Control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *8*(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019083>
- Anders, S., Reyes, A., & Huber, W. (2012). Detecting differential usage of exons from RNA-seq data. *Genome Research*, *22*(10), 2008–2017. <https://doi.org/10.1101/gr.133744.111>
- Anderson, J. S., & 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. *The EMBO Journal*, *17*(5), 1497–1506. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.5.1497>
- Apponi, L. H., Leung, S. W., Williams, K. R., Valentini, S. R., Corbett, A. H., & Pavlath, G. K. (2010). Loss of nuclear poly(A)-binding protein 1 causes defects in myogenesis and mRNA biogenesis. *Human Molecular Genetics*, *19*(6), 1058–1065. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp569>
- Aregger, M., & Cowling, V. H. (2013). Human cap methyltransferase (RNMT) N-terminal non-catalytic domain mediates recruitment to transcription initiation sites. *The Biochemical Journal*, *455*(1), 67–73. <https://doi.org/10.1042/BJ20130378>
- Azzouz, T. N., Pillai, R. S., Däpp, C., Chari, A., Meister, G., Kambach, C., Fischer, U., & Schümperli, D. (2005). Toward an assembly line for U7 snRNPs: Interactions of U7-specific Lsm proteins with PRMT5 and SMN complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(41), 34435–34440. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505077200>
- Balakin, A. G., Smith, L., & Fournier, M. J. (1996). The RNA world of the nucleolus: Two major families of small RNAs defined by different box elements with related functions. *Cell*, *86*(5), 823–834. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80156-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80156-7)
- Banerjee, A. K. (1980). 5'-terminal cap structure in eucaryotic messenger ribonucleic acids. *Microbiological Reviews*, *44*(2), 175–205.
- Barber, M. R. W., Aldridge, J. R., Webster, R. G., & Magor, K. E. (2010). Association of RIG-I with innate immunity of ducks to influenza. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(13), 5913–5918. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001755107>
- Barchet, W., Wimmenauer, V., Schlee, M., & Hartmann, G. (2008). Accessing the therapeutic potential of immunostimulatory nucleic acids. *Current Opinion in Immunology*, *20*(4), 389–395. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.07.007>
- Bartok, E., & Hartmann, G. (2020). Immune Sensing Mechanisms that Discriminate Self from Altered Self and Foreign Nucleic Acids. *Immunity*, *53*(1), 54–77. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.06.014>
- Bélanger, F., Stepinski, J., Darzynkiewicz, E., & Pelletier, J. (2010). Characterization of hMTr1, a human Cap1 2'-O-ribose methyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(43), 33037–33044. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.155283>
- Bennetzen, M. V., Larsen, D. H., Bunkenborg, J., Bartek, J., Lukas, J., & Andersen, J. S. (2010). Site-specific phosphorylation dynamics of the nuclear proteome during the DNA damage response. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, *9*(6), 1314–1323. <https://doi.org/10.1074/mcp.M900616-MCP200>
- Ben-Shem, A., Jenner, L., Yusupova, G., & Yusupov, M. (2010). Crystal structure of the eukaryotic ribosome. *Science (New York, N.Y.)*, *330*(6008), 1203–1209. <https://doi.org/10.1126/science.1194294>
- Bentley, D. L. (2014). Coupling mRNA processing with transcription in time and space. *Nature reviews. Genetics*, *15*(3), 163–175. <https://doi.org/10.1038/nrg3662>

- Bernecky, C., Plitzko, J. M., & Cramer, P. (2017). Structure of a transcribing RNA polymerase II-DSIF complex reveals a multidentate DNA-RNA clamp. *Nature Structural & Molecular Biology*, 24(10), 809–815. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3465>
- Bernstein, K. A., Bleichert, F., Bean, J. M., Cross, F. R., & Baserga, S. J. (2007). Ribosome Biogenesis Is Sensed at the Start Cell Cycle Checkpoint. *Molecular Biology of the Cell*, 18(3), 953–964. <https://doi.org/10.1091/mbc.E06-06-0512>
- Berridge, M. V., & Tan, A. S. (1993). Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303(2), 474–482. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1311>
- Bessman, M. J., Kornberg, A., Lehman, I. R., & Simms, E. S. (1956). Enzymic synthesis of deoxyribonucleic acid. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 21(1), 197–198. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(56\)90127-5](https://doi.org/10.1016/0006-3002(56)90127-5)
- Björklund, M. (2019). Cell size homeostasis: Metabolic control of growth and cell division. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1866(3), 409–417. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.10.002>
- Boeing, S., Williamson, L., Encheva, V., Gori, I., Saunders, R. E., Instrell, R., Aygün, O., Rodriguez-Martinez, M., Weems, J. C., Kelly, G. P., Conaway, J. W., Conaway, R. C., Stewart, A., Howell, M., Snijders, A. P., & Svestrup, J. Q. (2016). Multiomic Analysis of the UV-Induced DNA Damage Response. *Cell Reports*, 15(7), 1597–1610. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.047>
- Bohnsack, K. E., & Bohnsack, M. T. (2019). Uncovering the assembly pathway of human ribosomes and its emerging links to disease. *The EMBO Journal*, 38(13). <https://doi.org/10.15252/embj.2018100278>
- Bohnsack, M. T., & Sloan, K. E. (2018). Modifications in small nuclear RNAs and their roles in spliceosome assembly and function. *Biological Chemistry*, 399(11), 1265–1276. <https://doi.org/10.1515/hsz-2018-0205>
- Borchert, G. M., Lanier, W., & Davidson, B. L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature Structural & Molecular Biology*, 13(12), 1097–1101. <https://doi.org/10.1038/nsmb1167>
- Bouchard-Bourelle, P., Desjardins-Henri, C., Mathurin-St-Pierre, D., Deschamps-Francoeur, G., Fafard-Couture, É., Garant, J.-M., Elela, S. A., & Scott, M. S. (2020). snoDB: An interactive database of human snoRNA sequences, abundance and interactions. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D220–D225. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz884>
- Boulias, K., Toczyłowska-Socha, D., Hawley, B. R., Liberman, N., Takashima, K., Zaccara, S., Guez, T., Vasseur, J.-J., Debart, F., Aravind, L., Jaffrey, S. R., & Greer, E. L. (2019). Identification of the m6Am Methyltransferase PCIF1 Reveals the Location and Functions of m6Am in the Transcriptome. *Molecular Cell*, 75(3), 631–643.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.06.006>
- Boulon, S., Verheggen, C., Jady, B. E., Girard, C., Pescia, C., Paul, C., Ospina, J. K., Kiss, T., Matera, A. G., Bordonné, R., & Bertrand, E. (2004). PHAX and CRM1 Are Required Sequentially to Transport U3 snoRNA to Nucleoli. *Molecular Cell*, 16(5), 777–787. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.013>
- Bouloy, M., Plotch, S. J., & Krug, R. M. (1980). Both the 7-methyl and the 2'-O-methyl groups in the cap of mRNA strongly influence its ability to act as primer for influenza virus RNA transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(7), 3952–3956.
- Bouveret, E., Rigaut, G., Shevchenko, A., Wilm, M., & Séraphin, B. (2000). A Sm-like protein complex that participates in mRNA degradation. *The EMBO Journal*, 19(7), 1661–1671. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.7.1661>
- Braun, J. E., Truffault, V., Boland, A., Huntzinger, E., Chang, C.-T., Haas, G., Weichenrieder, O., Coles, M., & Izaurralde, E. (2012). A direct interaction between DCP1 and XRN1 couples mRNA decapping to 5' exonucleolytic degradation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(12), 1324–1331. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2413>
- Bregman, D. B., Pestell, R. G., & Kidd, V. J. (2000). Cell cycle regulation and RNA polymerase II. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 5, D244–257. <https://doi.org/10.2741/bregman>
- Brenner, S., Jacob, F., & Meselson, M. (1961). An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature*, 190, 576–581. <https://doi.org/10.1038/190576a0>
- Brisse, M., & Ly, H. (2019). Comparative Structure and Function Analysis of the RIG-I-Like Receptors: RIG-I and MDA5. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01586>
- Brown, E. J., Albers, M. W., Shin, T. B., Ichikawa, K., Keith, C. T., Lane, W. S., & Schreiber, S. L. (1994). A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature*, 369(6483), 756–758. <https://doi.org/10.1038/369756a0>
- Buratowski, S. (2009). Progression through the RNA polymerase II CTD cycle. *Molecular cell*, 36(4), 541–546. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.10.019>
- Cai, X., HAGEDORN, C. H., & CULLEN, B. R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*, 10(12), 1957–1966. <https://doi.org/10.1261/rna.7135204>
- Campbell, K. J., & White, R. J. (2014). MYC Regulation of Cell Growth through Control of Transcription by RNA Polymerases I and III. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(5), a018408. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018408>
- Caracausi, M., Piovesan, A., Antonaros, F., Strippoli, P., Vitale, L., & Pelleri, M. C. (2017). Systematic identification of human housekeeping genes possibly useful as references in gene expression studies. *Molecular Medicine Reports*, 16(3), 2397–2410. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6944>
- Carmody, S. R., & Wenthe, S. R. (2009). mRNA nuclear export at a glance. *Journal of Cell Science*, 122(12), 1933–1937. <https://doi.org/10.1242/jcs.041236>



- Casañal, A., Kumar, A., Hill, C. H., Easter, A. D., Emsley, P., Degliesposti, G., Gordiyenko, Y., Santhanam, B., Wolf, J., Wiederhold, K., Dornan, G. L., Skehel, M., Robinson, C. V., & Passmore, L. A. (2017). Architecture of eukaryotic mRNA 3'-end processing machinery. *Science (New York, N.Y.)*, 358(6366), 1056–1059. <https://doi.org/10.1126/science.aao6535>
- Chan, C., Martin, P., Liptrott, N. J., Siccardi, M., Almond, L., & Owen, A. (2017). Incompatibility of chemical protein synthesis inhibitors with accurate measurement of extended protein degradation rates. *Pharmacology Research & Perspectives*, 5(5). <https://doi.org/10.1002/prp2.359>
- Chao, H. X., Poovey, C. E., Privette, A. A., Grant, G. D., Chao, H. Y., Cook, J. G., & Purvis, J. E. (2017). Orchestration of DNA Damage Checkpoint Dynamics across the Human Cell Cycle. *Cell Systems*, 5(5), 445–459.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2017.09.015>
- Chao, S.-H., & Price, D. H. (2001). Flavopiridol Inactivates P-TEFb and Blocks Most RNA Polymerase II Transcription in Vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 276(34), 31793–31799. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102306200>
- Charenton, C., & Graille, M. (2018). mRNA decapping: Finding the right structures. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 373(1762), 20180164. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0164>
- Chen, C.-Y. A., & Shyu, A.-B. (2011). Mechanisms of deadenylation-dependent decay. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 2(2), 167–183. <https://doi.org/10.1002/wrna.40>
- Chen, W.-H., Lu, G., Chen, X., Zhao, X.-M., & Bork, P. (2017). OGEE v2: An update of the online gene essentiality database with special focus on differentially essential genes in human cancer cell lines. *Nucleic Acids Research*, 45(Database issue), D940–D944. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1013>
- Chen, Y.-L., Capeyrou, R., Humbert, O., Mouffok, S., Kadri, Y. A., Lebaron, S., Henras, A. K., & Henry, Y. (2014). The telomerase inhibitor Gno1p/PINX1 activates the helicase Prp43p during ribosome biogenesis. *Nucleic Acids Research*, 42(11), 7330–7345. <https://doi.org/10.1093/nar/gku357>
- Cheng, A., Kaldis, P., & Solomon, M. J. (2000). Dephosphorylation of human cyclin-dependent kinases by protein phosphatase type 2C alpha and beta 2 isoforms. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(44), 34744–34749. <https://doi.org/10.1074/jbc.M006210200>
- Cheng, H., Dufu, K., Lee, C.-S., Hsu, J. L., Dias, A., & Reed, R. (2006). Human mRNA export machinery recruited to the 5' end of mRNA. *Cell*, 127(7), 1389–1400. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.044>
- Chi, B., Wang, Q., Wu, G., Tan, M., Wang, L., Shi, M., Chang, X., & Cheng, H. (2013). Aly and THO are required for assembly of the human TREX complex and association of TREX components with the spliced mRNA. *Nucleic Acids Research*, 41(2), 1294–1306. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1188>
- Ciganda, M., & Williams, N. (2011). Eukaryotic 5S rRNA biogenesis. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, 2(4), 523–533. <https://doi.org/10.1002/wrna.74>
- Cooper, T. A. (2005). Use of minigene systems to dissect alternative splicing elements. *Methods (San Diego, Calif.)*, 37(4), 331–340. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.07.015>
- Coppola, J. A., Field, A. S., & Luse, D. S. (1983). Promoter-proximal pausing by RNA polymerase II in vitro: Transcripts shorter than 20 nucleotides are not capped. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(5), 1251–1255. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.5.1251>
- Core, L., & Adelman, K. (2019). Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: A nexus of gene regulation. *Genes & Development*, 33(15–16), 960–982. <https://doi.org/10.1101/gad.325142.119>
- Cramer, P., Bushnell, D. A., Fu, J., Gnatt, A. L., Maier-Davis, B., Thompson, N. E., Burgess, R. R., Edwards, A. M., David, P. R., & Kornberg, R. D. (2000). Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science (New York, N.Y.)*, 288(5466), 640–649. <https://doi.org/10.1126/science.288.5466.640>
- Crick, F. (1956). Central dogma of molecular biology. *Nature*, 227(5258), 561–563. <https://doi.org/10.1038/227561a0>
- Czudnochowski, N., Bösken, C. A., & Geyer, M. (2012). Serine-7 but not serine-5 phosphorylation primes RNA polymerase II CTD for P-TEFb recognition. *Nature Communications*, 3, 842. <https://doi.org/10.1038/ncomms1846>
- Daffis, S., Szretter, K. J., Schriewer, J., Li, J., Youn, S., Errett, J., Lin, T.-Y., Schneller, S., Zust, R., Dong, H., Thiel, V., Sen, G. C., Fensterl, V., Klimstra, W. B., Pierson, T. C., Buller, R. M., Gale Jr, M., Shi, P.-Y., & Diamond, M. S. (2010). 2'-O methylation of the viral mRNA cap evades host restriction by IFIT family members. *Nature*, 468(7322), 452–456. <https://doi.org/10.1038/nature09489>
- Darzacq, X., Jády, B. E., Verheggen, C., Kiss, A. M., Bertrand, E., & Kiss, T. (2002). Cajal body-specific small nuclear RNAs: A novel class of 2'-O-methylation and pseudouridylation guide RNAs. *The EMBO Journal*, 21(11), 2746–2756. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.11.2746>
- Daugherty, M. D., Schaller, A. M., Geballe, A. P., & Malik, H. S. (2016). Evolution-guided functional analyses reveal diverse antiviral specificities encoded by IFIT1 genes in mammals. *eLife*, 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.14228>
- de Jesus, A. A., Canna, S. W., Liu, Y., & Goldbach-Mansky, R. (2015). Molecular Mechanisms in Genetically Defined Autoinflammatory Diseases: Disorders of Amplified Danger Signaling. *Annual review of immunology*, 33, 823–874. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112227>
- de Turrís, V., Di Leva, G., Caldarola, S., Loreni, F., Amaldi, F., & Bozzoni, I. (2004). TOP Promoter Elements Control the Relative Ratio of Intron-encoded snoRNA Versus Spliced mRNA Biosynthesis. *Journal of Molecular Biology*, 344(2), 383–394. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.09.049>
- Decroly, E., Ferron, F., Lescar, J., & Canard, B. (2011). Conventional and unconventional mechanisms for capping viral mRNA. *Nature Reviews. Microbiology*, 10(1), 51–65. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2675>
- Delan-Forino, C., Spanos, C., Rappsilber, J., & Tollervy, D. (2020). Substrate specificity of the TRAMP nuclear surveillance complexes. *Nature Communications*, 11. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16965-4>

- Devarkar, S. C., Wang, C., Miller, M. T., Ramanathan, A., Jiang, F., Khan, A. G., Patel, S. S., & Marcotrigiano, J. (2016). Structural basis for m7G recognition and 2'-O-methyl discrimination in capped RNAs by the innate immune receptor RIG-I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(3), 596–601. <https://doi.org/10.1073/pnas.1515152113>
- Dogan, R. I., Getoor, L., Wilbur, W. J., & Mount, S. M. (2007). SplicePort—An interactive splice-site analysis tool. *Nucleic Acids Research*, *35*(Web Server issue), W285–W291. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm407>
- Dölken, L., Ruzsics, Z., Rädle, B., Friedel, C. C., Zimmer, R., Mages, J., Hoffmann, R., Dickinson, P., Forster, T., Ghazal, P., & Koszinowski, U. H. (2008). High-resolution gene expression profiling for simultaneous kinetic parameter analysis of RNA synthesis and decay. *RNA*, *14*(9), 1959–1972. <https://doi.org/10.1261/rna.1136108>
- Dönmez, G., HARTMUTH, K., & LÜHRMANN, R. (2004). Modified nucleotides at the 5' end of human U2 snRNA are required for spliceosomal E-complex formation. *RNA*, *10*(12), 1925–1933. <https://doi.org/10.1261/rna.7186504>
- Dragon, F., Gallagher, J. E. G., Compagnone-Post, P. A., Mitchell, B. M., Porwancher, K. A., Wehner, K. A., Wormsley, S., Settlage, R. E., Shabanowitz, J., Osheim, Y., Beyer, A. L., Hunt, D. F., & Baserga, S. J. (2002). A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature*, *417*(6892), 967–970. <https://doi.org/10.1038/nature00769>
- Eaton, J. D., & West, S. (2020). Termination of Transcription by RNA Polymerase II: BOOM! *Trends in Genetics*. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2020.05.008>
- Eick, D., & Geyer, M. (2013). The RNA Polymerase II Carboxy-Terminal Domain (CTD) Code. *Chemical Reviews*, *113*(11), 8456–8490. <https://doi.org/10.1021/cr400071f>
- Evers, B., Jastrzebski, K., Heijmans, J. P. M., Grenrum, W., Beijersbergen, R. L., & Bernards, R. (2016). CRISPR knockout screening outperforms shRNA and CRISPRi in identifying essential genes. *Nature Biotechnology*, *34*(6), 631–633. <https://doi.org/10.1038/nbt.3536>
- Falk, S., Finogenova, K., Melko, M., Benda, C., Lykke-Andersen, S., Jensen, T. H., & Conti, E. (2016). Structure of the RBM7–ZCCHC8 core of the NEXT complex reveals connections to splicing factors. *Nature Communications*, *7*. <https://doi.org/10.1038/ncomms13573>
- Fan, J., Kuai, B., Wu, G., Wu, X., Chi, B., Wang, L., Wang, K., Shi, Z., Zhang, H., Chen, S., He, Z., Wang, S., Zhou, Z., Li, G., & Cheng, H. (2017). Exosome cofactor hMTR4 competes with export adaptor ALYREF to ensure balanced nuclear RNA pools for degradation and export. *The EMBO Journal*, *36*(19), 2870–2886. <https://doi.org/10.15252/embj.201696139>
- Fant, C. B., & Taatjes, D. J. (2018). Regulatory functions of the Mediator kinases CDK8 and CDK19. *Transcription*, *10*(2), 76–90. <https://doi.org/10.1080/21541264.2018.1556915>
- Fatica, A., & Tollervey, D. (2002). Making ribosomes. *Current Opinion in Cell Biology*, *14*(3), 313–318. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(02\)00336-8](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(02)00336-8)
- Fensterl, V., Chattopadhyay, S., & Sen, G. C. (2015). No Love Lost Between Viruses and Interferons. *Annual Review of Virology*, *2*(1), 549–572. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-100114-055249>
- Fensterl, V., & Sen, G. C. (2015). Interferon-Induced Ifit Proteins: Their Role in Viral Pathogenesis. *Journal of Virology*, *89*(5), 2462–2468. <https://doi.org/10.1128/JVI.02744-14>
- Fingar, D. C., Richardson, C. J., Tee, A. R., Cheatham, L., Tsou, C., & Blenis, J. (2004). mTOR Controls Cell Cycle Progression through Its Cell Growth Effectors S6K1 and 4E-BP1/Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(1), 200–216. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.1.200-216.2004>
- Fingar, D. C., Salama, S., Tsou, C., Harlow, E., & Blenis, J. (2002). Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes & Development*, *16*(12), 1472–1487. <https://doi.org/10.1101/gad.995802>
- Flaherty, S. M., Fortes, P., Izaurralde, E., Mattaj, I. W., & Gilmartin, G. M. (1997). Participation of the nuclear cap binding complex in pre-mRNA 3' processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*(22), 11893–11898.
- Fleith, R. C., Mears, H. V., Leong, X. Y., Sanford, T. J., Emmott, E., Graham, S. C., Mansur, D. S., & Sweeney, T. R. (2018). IFIT3 and IFIT2/3 promote IFIT1-mediated translation inhibition by enhancing binding to non-self RNA. *Nucleic Acids Research*, *46*(10), 5269–5285. <https://doi.org/10.1093/nar/gky191>
- Fong, N., Kim, H., Zhou, Y., Ji, X., Qiu, J., Saldi, T., Diener, K., Jones, K., Fu, X.-D., & Bentley, D. L. (2014). Pre-mRNA splicing is facilitated by an optimal RNA polymerase II elongation rate. *Genes & Development*, *28*(23), 2663–2676. <https://doi.org/10.1101/gad.252106.114>
- Fousteri, M., Vermeulen, W., van Zeeland, A. A., & Mullenders, L. H. F. (2006). Cockayne syndrome A and B proteins differentially regulate recruitment of chromatin remodeling and repair factors to stalled RNA polymerase II in vivo. *Molecular Cell*, *23*(4), 471–482. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.06.029>
- Franken, N. A. P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., & van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, *1*(5), 2315–2319. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>
- Frydryskova, K., Masek, T., Borcin, K., Mrvova, S., Venturi, V., & Pospisek, M. (2016). Distinct recruitment of human eIF4E isoforms to processing bodies and stress granules. *BMC Molecular Biology*, *17*(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s12867-016-0072-x>
- Furuichi, Y., Morgan, M., Shatkin, A. J., Jelinek, W., Salditt-Georgieff, M., & Darnell, J. E. (1975). Methylated, blocked 5' termini in HeLa cell mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *72*(5), 1904–1908.
- Furuichi, Yasuhiro. (2015). Discovery of m7G-cap in eukaryotic mRNAs. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, *91*(8), 394–409. <https://doi.org/10.2183/pjab.91.394>

- Gaertner, B., & Zeitlinger, J. (2014). RNA polymerase II pausing during development. *Development*, 141(6), 1179–1183. <https://doi.org/10.1242/dev.088492>
- Gaillard, H., & Aguilera, A. (2013). Transcription coupled repair at the interface between transcription elongation and mRNP biogenesis. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1829(1), 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.09.008>
- Gal-Ben-Ari, S., Barrera, I., Ehrlich, M., & Rosenblum, K. (2019). PKR: A Kinase to Remember. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00480>
- Galloway, A., Atrih, A., Grzela, R., Darzynkiewicz, E., Ferguson, M. A. J., & Cowling, V. H. (2020). CAP-MAP: Cap analysis protocol with minimal analyte processing, a rapid and sensitive approach to analysing mRNA cap structures. *Open Biology*, 10(2). <https://doi.org/10.1098/rsob.190306>
- Garibaldi, A., Carranza, F., & Hertel, K. J. (2017). Isolation of Newly Transcribed RNA Using the Metabolic Label 4-thiouridine. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1648, 169–176. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7204-3\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7204-3_13)
- Gebauer, F., Preiss, T., & Hentze, M. W. (2012). From Cis-Regulatory Elements to Complex RNPs and Back. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(7), a012245. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012245>
- Gebhardt, A., Bergant, V., Schnepf, D., Moser, M., Meiler, A., Togbe, D., Mackowiak, C., Reinert, L. S., Paludan, S. R., Ryffel, B., Stukalov, A., Staeheli, P., & Pichlmair, A. (2019). The alternative cap-binding complex is required for antiviral defense in vivo. *PLoS Pathogens*, 15(12). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008155>
- Gebhardt, A., Habjan, M., Benda, C., Meiler, A., Haas, D. A., Hein, M. Y., Mann, A., Mann, M., Habermann, B., & Pichlmair, A. (2015). mRNA export through an additional cap-binding complex consisting of NCBP1 and NCBP3. *Nature Communications*, 6, 8192. <https://doi.org/10.1038/ncomms9192>
- Ghosh, A., Shuman, S., & Lima, C. D. (2011). Structural insights to how mammalian capping enzyme reads the CTD code. *Molecular cell*, 43(2), 299–310. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.001>
- Giglia-Mari, G., Zotter, A., & Vermeulen, W. (2011). DNA damage response. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(1), a000745. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000745>
- Givan, A. L. (2013). *Flow Cytometry: First Principles*. John Wiley & Sons.
- Goldeck, M., Tuschl, T., Hartmann, G., & Ludwig, J. (2014). Efficient solid-phase synthesis of pppRNA by using product-specific labeling. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 53(18), 4694–4698. <https://doi.org/10.1002/anie.201400672>
- Golomb, L., Volarevic, S., & Oren, M. (2014). p53 and ribosome biogenesis stress: The essentials. *FEBS Letters*, 588(16), 2571–2579. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.04.014>
- Gonatopoulos-Pournatzis, T., & Cowling, V. H. (2014). Cap-binding complex (CBC). *Biochemical Journal*, 457(Pt 2), 231–242. <https://doi.org/10.1042/BJ20131214>
- Gonatopoulos-Pournatzis, T., Dunn, S., Bounds, R., & Cowling, V. H. (2011). RAM/Fam103a1 Is Required for mRNA Cap Methylation. *Molecular Cell*, 44(4), 585–596. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.041>
- Goodman, C. A., & Hornberger, T. A. (2013). Measuring protein synthesis with SUnSET: A valid alternative to traditional techniques? *Exercise and sport sciences reviews*, 41(2), 107–115. <https://doi.org/10.1097/JES.0b013e3182798a95>
- Goubau, D., Schlee, M., Deddouch, S., Pruijssers, A. J., Zillinger, T., Goldeck, M., Schuberth, C., Van der Veen, A. G., Fujimura, T., Rehwinkel, J., Iskarpatyoti, J. A., Barchet, W., Ludwig, J., Dermody, T. S., Hartmann, G., & Reis e Sousa, C. (2014). Antiviral immunity via RIG-I-mediated recognition of RNA bearing 5'-diphosphates. *Nature*, 514(7522), 372–375. <https://doi.org/10.1038/nature13590>
- Granneman, S., & Tollervey, D. (2007). Building ribosomes: Even more expensive than expected? *Current Biology: CB*, 17(11), R415–417. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.04.011>
- Gros, F., Hiatt, H., Gilbert, W., Kurland, C. G., Risebrough, R. W., & Watson, J. D. (1961). Unstable Ribonucleic Acid Revealed by Pulse Labelling of Escherichia Coli. *Nature*, 190(4776), 581–585. <https://doi.org/10.1038/190581a0>
- Gross, J. D., Moerke, N. J., von der Haar, T., Lugovskoy, A. A., Sachs, A. B., McCarthy, J. E. G., & Wagner, G. (2003). Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E. *Cell*, 115(6), 739–750. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00975-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00975-9)
- Gruber, J. J., Olejniczak, S. H., Yong, J., Rocca La, G., Dreyfuss, G., & Thompson, C. B. (2012). Ars2 promotes proper replication-dependent histone mRNA 3' end formation. *Molecular Cell*, 45(1), 87–98. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.12.020>
- Gruber, Joshua J., Zatechka, D. S., Sabin, L. R., Yong, J., Lum, J. J., Kong, M., Zong, W.-X., Zhang, Z., Lau, C.-K., Rawlings, J., Cherry, S., Ihle, J. N., Dreyfuss, G., & Thompson, C. B. (2009). Ars2 links the nuclear cap binding complex to RNA interference and cell proliferation. *Cell*, 138(2), 328–339. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.046>
- Grunberg-Manago, M., & Ochoa, S. (1955). ENZYMATIC SYNTHESIS AND BREAKDOWN OF POLYNUCLEOTIDES; POLYNUCLEOTIDE PHOSPHORYLASE1. *Journal of the American Chemical Society*, 77(11), 3165–3166. <https://doi.org/10.1021/ja01616a093>
- Haapaniemi, E., Botla, S., Persson, J., Schmierer, B., & Taipale, J. (2018). CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nature Medicine*, 24(7), 927–930. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0049-z>
- Habjan, M., Hubel, P., Lacerda, L., Benda, C., Holze, C., Eberl, C. H., Mann, A., Kindler, E., Gil-Cruz, C., Ziebuhr, J., Thiel, V., & Pichlmair, A. (2013). Sequestration by IFIT1 Impairs Translation of 2'O-unmethylated Capped RNA. *PLoS Pathogens*, 9(10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003663>
- Halbach, F., Reichelt, P., Rode, M., & Conti, E. (2013). The yeast ski complex: Crystal structure and RNA channeling to the exosome complex. *Cell*, 154(4), 814–826. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.017>

- Haline-Vaz, T., Silva, T. C. L., & Zanchin, N. I. T. (2008). The human interferon-regulated ISG95 protein interacts with RNA polymerase II and shows methyltransferase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 372(4), 719–724. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.05.137>
- Harlen, K. M., & Churchman, L. S. (2017). The code and beyond: Transcription regulation by the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(4), 263–273. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.10>
- Haronikova, L., Olivares-Illana, V., Wang, L., Karakostis, K., Chen, S., & Fähræus, R. (2019). The p53 mRNA: An integral part of the cellular stress response. *Nucleic Acids Research*, 47(7), 3257–3271. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz124>
- Heininger, A. U., Hackert, P., Andreou, A. Z., Boon, K.-L., Memet, I., Prior, M., Clancy, A., Schmidt, B., Urlaub, H., Schleiff, E., Sloan, K. E., Deckers, M., Lührmann, R., Enderlein, J., Klostermeier, D., Rehling, P., & Bohnsack, M. T. (2016). Protein cofactor competition regulates the action of a multifunctional RNA helicase in different pathways. *RNA Biology*, 13(3), 320–330. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1142038>
- Heinz, S., Romanoski, C. E., Benner, C., Allison, K. A., Kaikkonen, M. U., Orozco, L. D., & Glass, C. K. (2013). Effect of natural genetic variation on enhancer selection and function. *Nature*, 503(7477), 487–492. <https://doi.org/10.1038/nature12615>
- Hershey, J. W. B., Sonenberg, N., & Mathews, M. B. (2012). Principles of Translational Control: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(12), a011528. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011528>
- Herzel, L., Ottoz, D. S. M., Alpert, T., & Neugebauer, K. M. (2017). Splicing and transcription touch base: Co-transcriptional spliceosome assembly and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(10), 637–650. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.63>
- Hiraishi, N., Ishida, Y.-I., Sudo, H., & Nagahama, M. (2018a). WDR74 participates in an early cleavage of the pre-rRNA processing pathway in cooperation with the nucleolar AAA-ATPase NVL2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 495(1), 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.10.148>
- Hiraishi, N., Ishida, Y.-I., Sudo, H., & Nagahama, M. (2018b). WDR74 participates in an early cleavage of the pre-rRNA processing pathway in cooperation with the nucleolar AAA-ATPase NVL2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 495(1), 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.10.148>
- Hirose, Y., Iwamoto, Y., Sakuraba, K., Yunokuchi, I., Harada, F., & Ohkuma, Y. (2008). Human phosphorylated CTD-interacting protein, PCIF1, negatively modulates gene expression by RNA polymerase II. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 369(2), 449–455. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.02.042>
- Ho, C. K., & Shuman, S. (1999). Distinct roles for CTD Ser-2 and Ser-5 phosphorylation in the recruitment and allosteric activation of mammalian mRNA capping enzyme. *Molecular Cell*, 3(3), 405–411. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80468-2](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80468-2)
- Hoeijmakers, J. H. J. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *The New England Journal of Medicine*, 361(15), 1475–1485. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0804615>
- Holley, R. W., Apgar, J., Everett, G. A., Madison, J. T., Marquisee, M., Merrill, S. H., Penswick, J. R., & Zamir, A. (1965). STRUCTURE OF A RIBONUCLEIC ACID. *Science (New York, N.Y.)*, 147(3664), 1462–1465. <https://doi.org/10.1126/science.147.3664.1462>
- Honda, K., Takaoka, A., & Taniguchi, T. (2006). Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity*, 25(3), 349–360. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.08.009>
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzózka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K.-K., Schlee, M., Endres, S., & Hartmann, G. (2006). 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science (New York, N.Y.)*, 314(5801), 994–997. <https://doi.org/10.1126/science.1132505>
- Hsiao, K., Zegzouti, H., & Goueli, S. A. (2016). Methyltransferase-Glo: A universal, bioluminescent and homogenous assay for monitoring all classes of methyltransferases. *Epigenomics*, 8(3), 321–339. <https://doi.org/10.2217/epi.15.113>
- Huber, J., Cronshagen, U., Kadokura, M., Marshallsay, C., Wada, T., Sekine, M., & Lührmann, R. (1998). Snurportin1, an m3G-cap-specific nuclear import receptor with a novel domain structure. *The EMBO Journal*, 17(14), 4114–4126. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.14.4114>
- Inesta-Vaquera, F., Chaugule, V. K., Galloway, A., Chandler, L., Rojas-Fernandez, A., Weidlich, S., Pegg, M., & Cowling, V. H. (2018a). DHX15 regulates CMTR1-dependent gene expression and cell proliferation. *Life Science Alliance*, 1(3). <https://doi.org/10.26508/lsa.201800092>
- Inesta-Vaquera, F., Chaugule, V. K., Galloway, A., Chandler, L., Rojas-Fernandez, A., Weidlich, S., Pegg, M., & Cowling, V. H. (2018b). DHX15 regulates CMTR1-dependent gene expression and cell proliferation. *Life Science Alliance*, 1(3). <https://doi.org/10.26508/lsa.201800092>
- Ingolia, N. T., Ghaemmaghami, S., Newman, J. R. S., & Weissman, J. S. (2009). Genome-Wide Analysis in Vivo of Translation with Nucleotide Resolution Using Ribosome Profiling. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5924), 218–223. <https://doi.org/10.1126/science.1168978>
- Ingolia, N. T., Hussmann, J. A., & Weissman, J. S. (2019). Ribosome Profiling: Global Views of Translation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 11(5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032698>
- Ingolia, N. T., Lareau, L. F., & Weissman, J. S. (2011). Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. *Cell*, 147(4), 789–802. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.002>
- Inoue, H., Nojima, H., & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96(1), 23–28. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90336-p](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90336-p)

- Isken, O., & Maquat, L. E. (2008). The multiple lives of NMD factors: Balancing roles in gene and genome regulation. *Nature reviews. Genetics*, 9(9), 699–712. <https://doi.org/10.1038/nrg2402>
- Ivashkiv, L. B., & Donlin, L. T. (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nature reviews. Immunology*, 14(1), 36–49. <https://doi.org/10.1038/nri3581>
- Izumikawa, K., Nobe, Y., Ishikawa, H., Yamauchi, Y., Taoka, M., Sato, K., Nakayama, H., Simpson, R. J., Isobe, T., & Takahashi, N. (2019). TDP-43 regulates site-specific 2'-O-methylation of U1 and U2 snRNAs via controlling the Cajal body localization of a subset of C/D scaRNAs. *Nucleic Acids Research*, 47(5), 2487–2505. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz086>
- Jackson, R. J., Hellen, C. U. T., & Pestova, T. V. (2010). THE MECHANISM OF EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION AND PRINCIPLES OF ITS REGULATION. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(2), 113–127. <https://doi.org/10.1038/nrm2838>
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. J., Jr, C. A. J., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (2016). *Immunobiology* (9th Aufl.). Garland Science.
- Jawdekar, G. W., & Henry, R. W. (2008). Transcriptional regulation of human small nuclear RNA genes. *Biochimica et biophysica acta*, 1779(5), 295–305. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2008.04.001>
- Jeronimo, C., Forget, D., Bouchard, A., Li, Q., Chua, G., Poitras, C., Thérien, C., Bergeron, D., Bourassa, S., Greenblatt, J., Chabot, B., Poirier, G. G., Hughes, T. R., Blanchette, M., Price, D. H., & Coulombe, B. (2007). Systematic Analysis of the Protein Interaction Network for the Human Transcription Machinery Reveals the Identity of the 7SK Capping Enzyme. *Molecular Cell*, 27(2), 262–274. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.027>
- Jiang, Q., Zhang, Z., Hu, Y., & Ma, Y. (2014). Function of Hsf1 in SV40 T-antigen-transformed HEK293T cells. *Molecular Medicine Reports*, 10(6), 3139–3144. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2619>
- Jiao, X., Chang, J. H., Kilic, T., Tong, L., & Kiledjian, M. (2013a). A mammalian pre-mRNA 5'-end capping quality control mechanism and an unexpected link of capping to pre-mRNA processing. *Molecular cell*, 50(1), 104–115. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.02.017>
- Jiao, X., Chang, J. H., Kilic, T., Tong, L., & Kiledjian, M. (2013b). A mammalian pre-mRNA 5'-end capping quality control mechanism and an unexpected link of capping to pre-mRNA processing. *Molecular cell*, 50(1), 104–115. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.02.017>
- Johnson, B., VanBlargan, L. A., Xu, W., White, J. P., Shan, C., Shi, P.-Y., Zhang, R., Adhikari, J., Gross, M. L., Leung, Daisy. W., Diamond, M. S., & Amarasinghe, G. K. (2018). Binding of IFIT1 by IFIT3 modulates protein stability and RNA binding specificity. *Immunity*, 48(3), 487–499.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.01.014>
- Jorgensen, P., Rupeš, I., Sharom, J. R., Schnepfer, L., Broach, J. R., & Tyers, M. (2004). A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. *Genes & Development*, 18(20), 2491–2505. <https://doi.org/10.1101/gad.1228804>
- Joshi, B., Cameron, A., & Jagus, R. (2004). Characterization of mammalian eIF4E-family members. *European Journal of Biochemistry*, 271(11), 2189–2203. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04149.x>
- Joshi, B., Lee, K., Maeder, D. L., & Jagus, R. (2005). Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. *BMC Evolutionary Biology*, 5, 48. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-5-48>
- Kachae, Z. M., Lebedeva, L. A., Kozlov, E. N., & Shidlovskii, Y. V. (2020). Interplay of mRNA capping and transcription machineries. *Bioscience Reports*, 40(1). <https://doi.org/10.1042/BSR20192825>
- Kagey, M. H., Newman, J. J., Bilodeau, S., Zhan, Y., Orlando, D. A., van Berkum, N. L., Ebmeier, C. C., Goossens, J., Rahl, P. B., Levine, S. S., Taatjes, D. J., Dekker, J., & Young, R. A. (2010). Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature*, 467(7314), 430–435. <https://doi.org/10.1038/nature09380>
- Kaldis, P. (2016). Quo Vadis Cell Growth and Division? *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00095>
- Kalkat, M., De Melo, J., Hickman, K. A., Lourenco, C., Redel, C., Resetca, D., Tamachi, A., Tu, W. B., & Penn, L. Z. (2017). MYC Deregulation in Primary Human Cancers. *Genes*, 8(6). <https://doi.org/10.3390/genes8060151>
- Karijolich, J., & Yu, Y.-T. (2010). Spliceosomal snRNA modifications and their function. *RNA biology*, 7(2), 192–204.
- Kass, S., Tyc, K., Steitz, J. A., & Sollner-Webb, B. (1990). The U3 small nucleolar ribonucleoprotein functions in the first step of preribosomal RNA processing. *Cell*, 60(6), 897–908. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90338-f](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90338-f)
- Kasumba, D. M., & Grandvaux, N. (2019). Therapeutic Targeting of RIG-I and MDA5 Might Not Lead to the Same Rome. *Trends in Pharmacological Sciences*, 40(2), 116–127. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.12.003>
- Katahira, J. (2012). mRNA export and the TREX complex. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1819(6), 507–513. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.12.001>
- Katibah, G. E., Qin, Y., Sidote, D. J., Yao, J., Lambowitz, A. M., & Collins, K. (2014). Broad and adaptable RNA structure recognition by the human interferon-induced tetratricopeptide repeat protein IFIT5. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(33), 12025–12030. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412842111>
- Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, T. S., Fujita, T., & Akira, S. (2008). Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(7), 1601–1610. <https://doi.org/10.1084/jem.20080091>
- Khajuria, R. K., Munschauer, M., Ulirsch, J. C., Fiorini, C., Ludwig, L. S., McFarland, S. K., Abdulhay, N. J., Specht, H., Keshishian, H., Mani, D. R., Jovanovic, M., Ellis, S. R., Fulco, C. P., Engreitz, J. M., Schütz,

- S., Lian, J., Gripp, K. W., Weinberg, O. K., Pinkus, G. S., ... Sankaran, V. G. (2018). Ribosome Levels Selectively Regulate Translation and Lineage Commitment in Human Hematopoiesis. *Cell*, 173(1), 90–103.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.036>
- Khosravi, R. (2010). *Functional Characterization of the FTSJD2 Protein and its Role in the ATM-mediated DNA Damage Response* [TEL AVIV UNIVERSITY SACKLER SCHOOL OF MEDICINE DEPARTMENT OF MOLECULAR GENETICS AND BIOCHEMISTRY]. <http://primage.tau.ac.il/libraries/theses/lifemed/free/2336935.pdf>
- Kim, K. H., & Sederstrom, J. M. (2015). Assaying cell cycle status using flow cytometry. *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]*, 111, 28.6.1-28.6.11. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb2806s111>
- Kishore, N., Huynh, Q. K., Mathialagan, S., Hall, T., Rouw, S., Creely, D., Lange, G., Caroll, J., Reitz, B., Donnelly, A., Boddupalli, H., Combs, R. G., Kretzmer, K., & Tripp, C. S. (2002). IKK-i and TBK-1 are enzymatically distinct from the homologous enzyme IKK-2: Comparative analysis of recombinant human IKK-i, TBK-1, and IKK-2. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(16), 13840–13847. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110474200>
- Klinge, S., Voigts-Hoffmann, F., Leibundgut, M., & Ban, N. (2012). Atomic structures of the eukaryotic ribosome. *Trends in Biochemical Sciences*, 37(5), 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.02.007>
- Komarnitsky, P., Cho, E.-J., & Buratowski, S. (2000). Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes & Development*, 14(19), 2452–2460.
- Kozak, M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Research*, 15(20), 8125–8148.
- Kramer, S., & McLennan, A. G. (2019). The complex enzymology of mRNA decapping: Enzymes of four classes cleave pyrophosphate bonds. *WIREs RNA*, 10(1), e1511. <https://doi.org/10.1002/wrna.1511>
- Kressler, D., Hurt, E., Bergler, H., & Baßler, J. (2012). The power of AAA-ATPases on the road of pre-60S ribosome maturation—Molecular machines that strip pre-ribosomal particles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1823(1), 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.06.017>
- Kufel, J., & Grzechnik, P. (2019). Small Nucleolar RNAs Tell a Different Tale. *Trends in Genetics: TIG*, 35(2), 104–117. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.11.005>
- Kumar, P., Sweeney, T. R., Skabkin, M. A., Skabkina, O. V., Hellen, C. U. T., & Pestova, T. V. (2014a). Inhibition of translation by IFIT family members is determined by their ability to interact selectively with the 5'-terminal regions of cap0-, cap1- and 5'ppp- mRNAs. *Nucleic Acids Research*, 42(5), 3228–3245. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1321>
- Kumar, P., Sweeney, T. R., Skabkin, M. A., Skabkina, O. V., Hellen, C. U. T., & Pestova, T. V. (2014b). Inhibition of translation by IFIT family members is determined by their ability to interact selectively with the 5'-terminal regions of cap0-, cap1- and 5'ppp- mRNAs. *Nucleic Acids Research*, 42(5), 3228–3245. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1321>
- Kwak, Y. T., Guo, J., Prajapati, S., Park, K.-J., Surabhi, R. M., Miller, B., Gehrig, P., & Gaynor, R. B. (2003). Methylation of SPT5 regulates its interaction with RNA polymerase II and transcriptional elongation properties. *Molecular Cell*, 11(4), 1055–1066. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00101-1](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00101-1)
- Łabno, A., Tomecki, R., & Dziembowski, A. (2016). Cytoplasmic RNA decay pathways—Enzymes and mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(12), 3125–3147. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.023>
- LaCava, J., Houseley, J., Saveanu, C., Petfalski, E., Thompson, E., Jacquier, A., & Tollervey, D. (2005). RNA Degradation by the Exosome Is Promoted by a Nuclear Polyadenylation Complex. *Cell*, 121(5), 713–724. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.04.029>
- Lai, T., Cho, H., Liu, Z., Bowler, M. W., Piao, S., Parker, R., Kim, Y. K., & Song, H. (2012). Structural Basis of the PNR2-Mediated Link between mRNA Surveillance and Decapping. *Structure*, 20(12), 2025–2037. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.09.009>
- Lai, W. K. M., & Pugh, B. F. (2017a). Understanding nucleosome dynamics and their links to gene expression and DNA replication. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 18(9), 548–562. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.47>
- Lai, W. K. M., & Pugh, B. F. (2017b). Understanding nucleosome dynamics and their links to gene expression and DNA replication. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 18(9), 548–562. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.47>
- Lambert, S. A., Jolma, A., Campitelli, L. F., Das, P. K., Yin, Y., Albu, M., Chen, X., Taipale, J., Hughes, T. R., & Weirauch, M. T. (2018). The Human Transcription Factors. *Cell*, 172(4), 650–665. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.029>
- Le Hir, H., Gatfield, D., Izaurralde, E., & Moore, M. J. (2001). The exon–exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. *The EMBO Journal*, 20(17), 4987–4997. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.17.4987>
- Le, M., Wy, T., & O, I. (2010, Juni 8). *The Pioneer Round of Translation: Features and Functions*. Cell; Cell. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.07.022>
- Lee, T. I., & Young, R. A. (2013). Transcriptional Regulation and its Misregulation in Disease. *Cell*, 152(6), 1237–1251. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.014>
- Lenasi, T., Peterlin, B. M., & Barboric, M. (2011). Cap-binding Protein Complex Links Pre-mRNA Capping to Transcription Elongation and Alternative Splicing through Positive Transcription Elongation Factor b (P-TEFb). *The Journal of Biological Chemistry*, 286(26), 22758–22768. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.235077>

- Leung, D. W., & Amarasinghe, G. K. (2016a). When your cap matters: Structural insights into self vs non-self recognition of 5' RNA by immunomodulatory host proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, *36*, 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.02.001>
- Leung, D. W., & Amarasinghe, G. K. (2016b). When your cap matters: Structural insights into self vs non-self recognition of 5' RNA by immunomodulatory host proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, *36*, 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.02.001>
- Li, B., Clohisey, S. M., Chia, B. S., Wang, B., Cui, A., Eisenhaure, T., Schweitzer, L. D., Hoover, P., Parkinson, N. J., Nachshon, A., Smith, N., Regan, T., Farr, D., Gutmann, M. U., Bukhari, S. I., Law, A., Sangesland, M., Gat-Viks, I., Digard, P., ... Hacohen, N. (2020). Genome-wide CRISPR screen identifies host dependency factors for influenza A virus infection. *Nature Communications*, *11*. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13965-x>
- Liang, J., Wen, J., Huang, Z., Chen, X., Zhang, B., & Chu, L. (2019). Small Nucleolar RNAs: Insight Into Their Function in Cancer. *Frontiers in Oncology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00587>
- Lim, J., Ha, M., Chang, H., Kwon, S. C., Simanshu, D. K., Patel, D. J., & Kim, V. N. (2014). Uridylation by TUT4 and TUT7 Marks mRNA for Degradation. *Cell*, *159*(6), 1365–1376. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.055>
- Linder, B., Grozhik, A. V., Olarerin-George, A. O., Meydan, C., Mason, C. E., & Jaffrey, S. R. (2015). Single-nucleotide resolution mapping of m6A and m6Am throughout the transcriptome. *Nature methods*, *12*(8), 767–772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3453>
- Lingaraju, M., Johnsen, D., Schlundt, A., Langer, L. M., Basquin, J., Sattler, M., Heick Jensen, T., Falk, S., & Conti, E. (2019). The MTR4 helicase recruits nuclear adaptors of the human RNA exosome using distinct arch-interacting motifs. *Nature Communications*, *10*(1), 3393. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11339-x>
- Liu, H.-X., Cartegni, L., Zhang, M. Q., & Krainer, A. R. (2001). A mechanism for exon skipping caused by nonsense or missense mutations in BRCA1 and other genes. *Nature Genetics*, *27*(1), 55–58. <https://doi.org/10.1038/83762>
- Lloyd, A. C. (2013). The Regulation of Cell Size. *Cell*, *154*(6), 1194–1205. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.053>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, *15*(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Lubas, M., Christensen, M. S., Kristiansen, M. S., Domanski, M., Falkenby, L. G., Lykke-Andersen, S., Andersen, J. S., Dziembowski, A., & Jensen, T. H. (2011). Interaction profiling identifies the human nuclear exosome targeting complex. *Molecular Cell*, *43*(4), 624–637. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.028>
- Luco, R. F., Pan, Q., Tominaga, K., Blencowe, B. J., Pereira-Smith, O. M., & Misteli, T. (2010). Regulation of alternative splicing by histone modifications. *Science (New York, N.Y.)*, *327*(5968), 996–1000. <https://doi.org/10.1126/science.1184208>
- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, *389*(6648), 251–260. <https://doi.org/10.1038/38444>
- Luo, Z., Lin, C., & Shilatifard, A. (2012). The super elongation complex (SEC) family in transcriptional control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *13*(9), 543–547. <https://doi.org/10.1038/nrnm3417>
- Ma, X., Helgason, E., Phung, Q. T., Quan, C. L., Iyer, R. S., Lee, M. W., Bowman, K. K., Starovasnik, M. A., & Dueber, E. C. (2012). Molecular basis of Tank-binding kinase 1 activation by transautophosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(24), 9378–9383. <https://doi.org/10.1073/pnas.1121552109>
- Maquat, L. E., Tarn, W.-Y., & Isken, O. (2010). The Pioneer Round of Translation: Features and Functions. *Cell*, *142*(3), 368–374. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.07.022>
- Martin, R. D., Hébert, T. E., & Tanny, J. C. (2020). Therapeutic Targeting of the General RNA Polymerase II Transcription Machinery. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(9). <https://doi.org/10.3390/ijms21093354>
- Martin, R. G., Matthaei, J. H., Jones, O. W., & Nirenberg, M. W. (1962). Ribonucleotide composition of the genetic code. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *6*, 410–414. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(62\)90365-0](https://doi.org/10.1016/0006-291x(62)90365-0)
- Martin, S. A., Paoletti, E., & Moss, B. (1975). Purification of mRNA guanylyltransferase and mRNA (guanine-7-) methyltransferase from vaccinia virions. *The Journal of Biological Chemistry*, *250*(24), 9322–9329.
- Mauer, J., Luo, X., Blanjoie, A., Jiao, X., Grozhik, A. V., Patil, D. P., Linder, B., Pickering, B. F., Vasseur, J.-J., Chen, Q., Gross, S. S., Elemento, O., Debart, F., Kiledjian, M., & Jaffrey, S. R. (2017). Reversible methylation of m6Am in the 5' cap controls mRNA stability. *Nature*, *541*(7637), 371–375. <https://doi.org/10.1038/nature21022>
- Mayer, C., Zhao, J., Yuan, X., & Grummt, I. (2004). MTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes & Development*, *18*(4), 423–434. <https://doi.org/10.1101/gad.285504>
- Mazza, C., Ohno, M., Segref, A., Mattaj, I. W., & Cusack, S. (2001). Crystal structure of the human nuclear cap binding complex. *Molecular Cell*, *8*(2), 383–396. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00299-4](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00299-4)
- McCracken, S., Fong, N., Rosonina, E., Yankulov, K., Brothers, G., Siderovski, D., Hessel, A., Foster, S., Program, A. E., Shuman, S., & Bentley, D. L. (1997). 5'-Capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Genes & Development*, *11*(24), 3306–3318.

- Meola, N., Domanski, M., Karadoulama, E., Chen, Y., Gentil, C., Pultz, D., Vitting-Seerup, K., Lykke-Andersen, S., Andersen, J. S., Sandelin, A., & Jensen, T. H. (2016). Identification of a Nuclear Exosome Decay Pathway for Processed Transcripts. *Molecular Cell*, 64(3), 520–533. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.025>
- Meurs, E., Chong, K., Galabru, J., Thomas, N. S., Kerr, I. M., Williams, B. R., & Hovanessian, A. G. (1990). Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell*, 62(2), 379–390. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90374-n](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90374-n)
- Meyuhas, O., & Kahan, T. (2015). The race to decipher the top secrets of TOP mRNAs. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1849(7), 801–811. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.08.015>
- Milac, A. L., Bojarska, E., & Wypijewska del Nogal, A. (2014). Decapping Scavenger (DcpS) enzyme: Advances in its structure, activity and roles in the cap-dependent mRNA metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1839(6), 452–462. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.04.007>
- Missra, A., & Gilmour, D. S. (2010). Interactions between DSIF (DRB sensitivity inducing factor), NELF (negative elongation factor), and the Drosophila RNA polymerase II transcription elongation complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(25), 11301–11306. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000681107>
- Mosallanejad, K., Sekine, Y., Ishikura-Kinoshita, S., Kumagai, K., Nagano, T., Matsuzawa, A., Takeda, K., Naguro, I., & Ichijo, H. (2014). The DEAH-Box RNA Helicase DHX15 Activates NF- $\kappa$ B and MAPK Signaling Downstream of MAVS During Antiviral Responses. *Science Signaling*, 7(323), ra40–ra40. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004841>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Mullen, A. C., Orlando, D. A., Newman, J. J., Lovén, J., Kumar, R. M., Bilodeau, S., Reddy, J., Guenther, M. G., DeKoter, R., & Young, R. A. (2011). Master Transcription Factors Determine Cell-Type-Specific Responses to TGF- $\beta$  Signaling. *Cell*, 147(3), 565–576. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.050>
- Muthukrishnan, S., Morgan, M., Banerjee, A. K., & Shatkin, A. J. (1976). Influence of 5'-terminal m7G and 2'-O-methylated residues on messenger ribonucleic acid binding to ribosomes. *Biochemistry*, 15(26), 5761–5768. <https://doi.org/10.1021/bi00671a012>
- Muthukrishnan, S., Moss, B., Cooper, J. A., & Maxwell, E. S. (1978). Influence of 5'-terminal cap structure on the initiation of translation of vaccinia virus mRNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 253(5), 1710–1715.
- Nagahama, M., Hara, Y., Seki, A., Yamazoe, T., Kawate, Y., Shinohara, T., Hatsuzawa, K., Tani, K., & Tagaya, M. (2004). NVL2 is a nucleolar AAA-ATPase that interacts with ribosomal protein L5 through its nucleolar localization sequence. *Molecular Biology of the Cell*, 15(12), 5712–5723. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-08-0692>
- Narita, T., Yung, T. M. C., Yamamoto, J., Tsuboi, Y., Tanabe, H., Tanaka, K., Yamaguchi, Y., & Handa, H. (2007). NELF Interacts with CBC and Participates in 3' End Processing of Replication-Dependent Histone mRNAs. *Molecular Cell*, 26(3), 349–365. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.04.011>
- Nepal, C., Hadzhiev, Y., Balwierz, P., Tarifeño-Saldivia, E., Cardenas, R., Wragg, J. W., Suzuki, A.-M., Carninci, P., Peers, B., Lenhard, B., Andersen, J. B., & Müller, F. (2020). Dual-initiation promoters with intertwined canonical and TCT/TOP transcription start sites diversify transcript processing. *Nature Communications*, 11(1), 168. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13687-0>
- Neuman de Vegvar, H. E., & Dahlberg, J. E. (1990). Nucleocytoplasmic transport and processing of small nuclear RNA precursors. *Molecular and Cellular Biology*, 10(7), 3365–3375.
- Niedzwiecka, A., Marcotrigiano, J., Stepinski, J., Jankowska-Anyszka, M., Wyslouch-Cieszyńska, A., Dadlez, M., Gingras, A.-C., Mak, P., Darzynkiewicz, E., Sonenberg, N., Burley, S. K., & Stolarski, R. (2002). Biophysical studies of eIF4E cap-binding protein: Recognition of mRNA 5' cap structure and synthetic fragments of eIF4G and 4E-BP1 proteins. *Journal of Molecular Biology*, 319(3), 615–635. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00328-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00328-5)
- Nilson, K. A., Guo, J., Turek, M. E., Brogie, J. E., Delaney, E., Luse, D. S., & Price, D. H. (2015). THZ1 reveals roles for Cdk7 in co-transcriptional capping and pausing. *Molecular cell*, 59(4), 576–587. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.06.032>
- Nirenberg, M., & Leder, P. (1964). RNA Codewords and Protein Synthesis: The Effect of Trinucleotides upon the Binding of sRNA to Ribosomes. *Science*, 145(3639), 1399–1407. <https://doi.org/10.1126/science.145.3639.1399>
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>
- Ogami, K., Chen, Y., & Manley, J. L. (2018). RNA Surveillance by the Nuclear RNA Exosome: Mechanisms and Significance. *Non-Coding RNA*, 4(1). <https://doi.org/10.3390/ncrna4010008>
- Ogami, K., Richard, P., Chen, Y., Hoque, M., Li, W., Moresco, J. J., Yates, J. R., Tian, B., & Manley, J. L. (2017). An Mtr4/ZFC3H1 complex facilitates turnover of unstable nuclear RNAs to prevent their cytoplasmic transport and global translational repression. *Genes & Development*, 31(12), 1257–1271. <https://doi.org/10.1101/gad.302604.117>
- Ohno, M., Segref, A., Bachi, A., Wilm, M., & Mattaj, I. W. (2000). PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation. *Cell*, 101(2), 187–198. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80829-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80829-6)
- Ojha, S., Malla, S., & Lyons, S. M. (2020). snoRNPs: Functions in Ribosome Biogenesis. *Biomolecules*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/biom10050783>



- Okamura, M., Inose, H., & Masuda, S. (2015). RNA Export through the NPC in Eukaryotes. *Genes*, 6(1), 124–149. <https://doi.org/10.3390/genes6010124>
- Okubo, M., Noguchi, S., Hayashi, S., Nakamura, H., Komaki, H., Matsuo, M., & Nishino, I. (2020). Exon skipping induced by nonsense/frameshift mutations in DMD gene results in Becker muscular dystrophy. *Human Genetics*, 139(2), 247–255. <https://doi.org/10.1007/s00439-019-02107-4>
- O'Leary, M. N., Schreiber, K. H., Zhang, Y., Duc, A.-C. E., Rao, S., Hale, J. S., Academia, E. C., Shah, S. R., Morton, J. F., Holstein, C. A., Martin, D. B., Kaeberlein, M., Ladiges, W. C., Fink, P. J., Mackay, V. L., Wiest, D. L., & Kennedy, B. K. (2013). The ribosomal protein Rpl22 controls ribosome composition by directly repressing expression of its own paralog, Rpl221. *PLoS Genetics*, 9(8), e1003708. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003708>
- O'Sullivan, C., Christie, J., Pienaar, M., Gambling, J., Nickerson, P. E. B., Alford, S. C., Chow, R. L., & Howard, P. L. (2015). Mutagenesis of ARS2 Domains To Assess Possible Roles in Cell Cycle Progression and MicroRNA and Replication-Dependent Histone mRNA Biogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 35(21), 3753–3767. <https://doi.org/10.1128/MCB.00272-15>
- Pabis, M., Neufeld, N., Steiner, M. C., Bojic, T., Shav-Tal, Y., & Neugebauer, K. M. (2013). The nuclear capping complex interacts with the U4/U6·U5 tri-snRNP and promotes spliceosome assembly in mammalian cells. *RNA*, 19(8), 1054–1063. <https://doi.org/10.1261/rna.037069.112>
- Palacios, I., Hetzer, M., Adam, S. A., & Mattaj, I. W. (1997). Nuclear import of U snRNPs requires importin beta. *The EMBO Journal*, 16(22), 6783–6792. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.22.6783>
- Paruch, K., Dwyer, M. P., Alvarez, C., Brown, C., Chan, T.-Y., Doll, R. J., Keertikar, K., Knutson, C., McKittrick, B., Rivera, J., Rossman, R., Tucker, G., Fischmann, T., Hruza, A., Madison, V., Nomeir, A. A., Wang, Y., Kirschmeier, P., Lees, E., ... Guzi, T. J. (2010). Discovery of Dinaciclib (SCH 727965): A Potent and Selective Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinases. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 1(5), 204–208. <https://doi.org/10.1021/ml100051d>
- Peisley, A., Jo, M. H., Lin, C., Wu, B., Orme-Johnson, M., Walz, T., Hohng, S., & Hur, S. (2012). Kinetic mechanism for viral dsRNA length discrimination by MDA5 filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(49), E3340–E3349. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208618109>
- Peretz, L., Besser, E., Hajbi, R., Casden, N., Ziv, D., Kronenberg, N., Gigi, L. B., Sweetat, S., Khawaled, S., Aqeilan, R., & Behar, O. (2018). Combined shRNA over CRISPR/cas9 as a methodology to detect off-target effects and a potential compensatory mechanism. *Scientific Reports*, 8(1), 93. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18551-z>
- Philippe, L., Elzen, A., Watson, M., & Thoreen, C. (2020). Global analysis of LARP1 translation targets reveals tunable and dynamic features of 5' TOP motifs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117, 201912864. <https://doi.org/10.1073/pnas.1912864117>
- Picard-Jean, F., Brand, C., Tremblay-Létourneau, M., Allaire, A., Beaudoin, M. C., Boudreault, S., Duval, C., Rainville-Sirois, J., Robert, F., Pelletier, J., Geiss, B. J., & Bisailon, M. (2018). 2'-O-methylation of the mRNA cap protects RNAs from decapping and degradation by DXO. *PLoS ONE*, 13(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193804>
- Pichlmair, A., Lassnig, C., Eberle, C.-A., Gónna, M. W., Baumann, C. L., Burkard, T. R., Bürckstümmer, T., Stefanovic, A., Krieger, S., Bennett, K. L., Rüllicke, T., Weber, F., Colinge, J., Müller, M., & Superti-Furga, G. (2011). IFIT1 is an antiviral protein that recognizes 5'-triphosphate RNA. *Nature Immunology*, 12(7), 624–630. <https://doi.org/10.1038/ni.2048>
- Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C. P., Näslund, T. I., Liljeström, P., Weber, F., & Reis e Sousa, C. (2006). RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science (New York, N.Y.)*, 314(5801), 997–1001. <https://doi.org/10.1126/science.1132998>
- Pollizzi, K. N., Waickman, A. T., Patel, C. H., Sun, I. H., & Powell, J. D. (2015). Cellular Size as a Means of Tracking mTOR Activity and Cell Fate of CD4+ T Cells upon Antigen Recognition. *PLOS ONE*, 10(4), e0121710. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121710>
- Quicke, K. M., Kim, K. Y., Horvath, C. M., & Suthar, M. S. (2019). RNA Helicase LGP2 Negatively Regulates RIG-I Signaling by Preventing TRIM25-Mediated Caspase Activation and Recruitment Domain Ubiquitination. *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 39(11), 669–683. <https://doi.org/10.1089/jir.2019.0059>
- Ramanathan, A., Robb, G. B., & Chan, S.-H. (2016). mRNA capping: Biological functions and applications. *Nucleic Acids Research*, 44(16), 7511–7526. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw551>
- Rasmussen, E. B., & Lis, J. T. (1993). In vivo transcriptional pausing and cap formation on three Drosophila heat shock genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(17), 7923–7927. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.17.7923>
- Reddy, R., Ro-Choi, T. S., Henning, D., Shibata, H., Choi, Y. C., & Busch, H. (1972). MODified nucleosides of nuclear and nucleolar low molecular weight ribonucleic acid. *The Journal of Biological Chemistry*, 247(22), 7245–7250.
- Reddy, R., Singh, R., & Shimba, S. (1992). Methylated cap structures in eukaryotic RNAs: Structure, synthesis and functions. *Pharmacology & Therapeutics*, 54(3), 249–267. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(92\)90002-h](https://doi.org/10.1016/0163-7258(92)90002-h)
- Rehwinkel, J., Tan, C. P., Goubau, D., Schulz, O., Pichlmair, A., Bier, K., Robb, N., Vreede, F., Barclay, W., Fodor, E., & Reis e Sousa, C. (2010). RIG-I detects viral genomic RNA during negative-strand RNA virus infection. *Cell*, 140(3), 397–408. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.020>

- Reisman, D., Takahashi, P., Polson, A., & Boggs, K. (2012, Juli 11). *Transcriptional Regulation of the p53 Tumor Suppressor Gene in S-Phase of the Cell-Cycle and the Cellular Response to DNA Damage* [Review Article]. *Biochemistry Research International*; Hindawi. <https://doi.org/10.1155/2012/808934>
- Ren, J., Wang, Y., Liang, Y., Zhang, Y., Bao, S., & Xu, Z. (2010). Methylation of ribosomal protein S10 by protein-arginine methyltransferase 5 regulates ribosome biogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(17), 12695–12705. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.103911>
- Reynaud, J. M., Kim, D. Y., Atasheva, S., Rasaloukaya, A., White, J. P., Diamond, M. S., Weaver, S. C., Frolova, E. I., & Frolov, I. (2015a). IFIT1 Differentially Interferes with Translation and Replication of Alphavirus Genomes and Promotes Induction of Type I Interferon. *PLoS Pathogens*, *11*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004863>
- Reynaud, J. M., Kim, D. Y., Atasheva, S., Rasaloukaya, A., White, J. P., Diamond, M. S., Weaver, S. C., Frolova, E. I., & Frolov, I. (2015b). IFIT1 Differentially Interferes with Translation and Replication of Alphavirus Genomes and Promotes Induction of Type I Interferon. *PLoS Pathogens*, *11*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004863>
- Romano, G., Veneziano, D., Acunzo, M., & Croce, C. M. (2017). Small non-coding RNA and cancer. *Carcinogenesis*, *38*(5), 485–491. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgx026>
- Roy, S., Schmeier, S., Arner, E., Alam, T., Parihar, S. P., Ozturk, M., Tamgue, O., Kawaji, H., de Hoon, M. J. L., Itoh, M., Lassmann, T., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Forrest, A. R. R., Bajic, V. B., Guler, R., Consortium, F., Brombacher, F., & Suzuki, H. (2015). Redefining the transcriptional regulatory dynamics of classically and alternatively activated macrophages by deepCAGE transcriptomics. *Nucleic Acids Research*, *43*(14), 6969–6982. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv646>
- Rudra, D., & Warner, J. R. (2004). What better measure than ribosome synthesis? *Genes & Development*, *18*(20), 2431–2436. <https://doi.org/10.1101/gad.1256704>
- Rutkowski, A. J., Erhard, F., L'Hernault, A., Bonfert, T., Schilhabel, M., Crump, C., Rosenstiel, P., Efstathiou, S., Zimmer, R., Friedel, C. C., & Dölken, L. (2015). Widespread disruption of host transcription termination in HSV-1 infection. *Nature Communications*, *6*. <https://doi.org/10.1038/ncomms8126>
- Ruvinsky, I., Sharon, N., Lerer, T., Cohen, H., Stolovich-Rain, M., Nir, T., Dor, Y., Zisman, P., & Meyuhas, O. (2005). Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes & Development*, *19*(18), 2199–2211. <https://doi.org/10.1101/gad.351605>
- Sakaguchi, S., Negishi, H., Asagiri, M., Nakajima, C., Mizutani, T., Takaoka, A., Honda, K., & Taniguchi, T. (2003). Essential role of IRF-3 in lipopolysaccharide-induced interferon-beta gene expression and endotoxin shock. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *306*(4), 860–866. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)01049-0](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)01049-0)
- Sampathi, S., Acharya, P., Zhao, Y., Wang, J., Stengel, K. R., Liu, Q., Savona, M. R., & Hiebert, S. W. (2019). The CDK7 inhibitor THZ1 alters RNA polymerase dynamics at the 5' and 3' ends of genes. *Nucleic Acids Research*, *47*(8), 3921–3936. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz127>
- Samuel, C. E. (2001). Antiviral Actions of Interferons. *Clinical Microbiology Reviews*, *14*(4), 778–809. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.778-809.2001>
- Sansó, M., Levin, R. S., Lipp, J. J., Wang, V. Y.-F., Greifenberg, A. K., Quezada, E. M., Ali, A., Ghosh, A., Larochelle, S., Rana, T. M., Geyer, M., Tong, L., Shokat, K. M., & Fisher, R. P. (2016). P-TEFb regulation of transcription termination factor Xrn2 revealed by a chemical genetic screen for Cdk9 substrates. *Genes & Development*, *30*(1), 117–131. <https://doi.org/10.1101/gad.269589.115>
- Santhakumar, D., Rohaim, M. A. M. S., Hussein, H. A., Hawes, P., Ferreira, H. L., Behboudi, S., Iqbal, M., Nair, V., Arns, C. W., & Munir, M. (2018). Chicken Interferon-induced Protein with Tetratricopeptide Repeats 5 Antagonizes Replication of RNA Viruses. *Scientific Reports*, *8*(1), 6794. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24905-y>
- Sarkar, D., Desalle, R., & Fisher, P. B. (2008). Evolution of MDA-5/RIG-I-dependent innate immunity: Independent evolution by domain grafting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(44), 17040–17045. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804956105>
- Saxton, R. A., & Sabatini, D. M. (2017). MTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, *168*(6), 960–976. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004>
- Schlee, M. (2013). Master sensors of pathogenic RNA - RIG-I like receptors. *Immunobiology*, *218*(11), 1322–1335. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2013.06.007>
- Schlee, M., Hartmann, E., Coch, C., Wimmenauer, V., Janke, M., Barchet, W., & Hartmann, G. (2009). Approaching the RNA ligand for RIG-I? *Immunological Reviews*, *227*(1), 66–74. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00724.x>
- Schlee, M., & Hartmann, G. (2016). Discriminating self from non-self in nucleic acid sensing. *Nature Reviews. Immunology*, *16*(9), 566–580. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.78>
- Schmidt, C., Kowalinski, E., Shanmuganathan, V., Defenouillère, Q., Braunger, K., Heuer, A., Pech, M., Namane, A., Berninghausen, O., Fromont-Racine, M., Jacquier, A., Conti, E., Becker, T., & Beckmann, R. (2016). The cryo-EM structure of a ribosome-Ski2-Ski3-Ski8 helicase complex. *Science (New York, N.Y.)*, *354*(6318), 1431–1433. <https://doi.org/10.1126/science.aaf7520>
- Schmidt, E. K., Clavarino, G., Ceppi, M., & Pierre, P. (2009). SUNSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nature Methods*, *6*(4), 275–277. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1314>
- Schoenberg, D. R., & Maquat, L. E. (2012). Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nature Reviews. Genetics*, *13*(4), 246–259. <https://doi.org/10.1038/nrg3160>
- Schuberth, C. (2011). *Untersuchung der molekularen Interaktion endogener und synthetischer RNA mit dem zytosolischen Immunrezeptor RIG-I* [PhD Thesis, Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn]. <http://hss.ulb.uni-bonn.de/2011/2729/2729.htm>

- Schuberth-Wagner, C., Ludwig, J., Bruder, A. K., Herzner, A.-M., Zillinger, T., Goldeck, M., Schmidt, T., Schmid-Burgk, J. L., Kerber, R., Wolter, S., Stümpel, J.-P., Roth, A., Bartok, E., Drosten, C., Coch, C., Hornung, V., Barchet, W., Kümmerer, B. M., Hartmann, G., & Schlee, M. (2015). A Conserved Histidine in the RNA Sensor RIG-I Controls Immune Tolerance to N1-2'-O-Methylated Self RNA. *Immunity*, *43*(1), 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.06.015>
- Schwer, B., & Shuman, S. (1996). Conditional inactivation of mRNA capping enzyme affects yeast pre-mRNA splicing in vivo. *RNA*, *2*(6), 574–583.
- Sendinc, E., Valle-Garcia, D., Dhall, A., Chen, H., Henriques, T., Navarrete-Perea, J., Sheng, W., Gygi, S. P., Adelman, K., & Shi, Y. (2019). PCIF1 Catalyzes m6Am mRNA Methylation to Regulate Gene Expression. *Molecular Cell*, *75*(3), 620-630.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.05.030>
- Shatkin, A. J. (1976). Capping of eucaryotic mRNAs. *Cell*, *9*(4 PT 2), 645–653. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(76\)90128-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(76)90128-8)
- Shi, Y., Sharma, A., Wu, H., Lichtenstein, A., & Gera, J. (2005). Cyclin D1 and c-myc internal ribosome entry site (IRES)-dependent translation is regulated by AKT activity and enhanced by rapamycin through a p38 MAPK- and ERK-dependent pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(12), 10964–10973. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407874200>
- Shor, B., Wu, J., Shakey, Q., Toral-Barza, L., Shi, C., Follettie, M., & Yu, K. (2010). Requirement of the mTOR kinase for the regulation of Maf1 phosphorylation and control of RNA polymerase III-dependent transcription in cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(20), 15380–15392. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.071639>
- Sikorski, P. J., Warminski, M., Kubacka, D., Ratajczak, T., Nowis, D., Kowalska, J., & Jemielity, J. (2020). The identity and methylation status of the first transcribed nucleotide in eukaryotic mRNA 5' cap modulates protein expression in living cells. *Nucleic Acids Research*, *48*(4), 1607–1626. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa032>
- Silla, T., Schmid, M., Dou, Y., Garland, W., Milek, M., Imami, K., Johnsen, D., Polak, P., Andersen, J. S., Selbach, M., Landthaler, M., & Jensen, T. H. (2020). The human ZC3H3 and RBM26/27 proteins are critical for PAXT-mediated nuclear RNA decay. *Nucleic Acids Research*, *48*(5), 2518–2530. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1238>
- Simabuco, F. M., Pavan, I. C. B., Pestana, N. F., Carvalho, P. C., Basei, F. L., Granato, D. C., Leme, A. F. P., & Zanchin, N. I. T. (2019). Interactome analysis of the human Cap-specific mRNA (nucleoside-2'-O)-methyltransferase 1 (hMTr1) protein. *Journal of Cellular Biochemistry*, *120*(4), 5597–5611. <https://doi.org/10.1002/jcb.27843>
- Siwaszek, A., Ukleja, M., & Dziembowski, A. (2014). Proteins involved in the degradation of cytoplasmic mRNA in the major eukaryotic model systems. *RNA Biology*, *11*(9), 1122–1136. <https://doi.org/10.4161/rna.34406>
- Slyater, H. S., Warner, J. R., Rich, A., & Hall, C. E. (1963). The visualization of polyribosomal structure. *Journal of Molecular Biology*, *7*(6), 652-655. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(63\)80112-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(63)80112-6)
- Smietanski, M., Werner, M., Purta, E., Kaminska, K. H., Stepinski, J., Darzynkiewicz, E., Nowotny, M., & Bujnicki, J. M. (2014). Structural analysis of human 2'-O-ribose methyltransferases involved in mRNA cap structure formation. *Nature Communications*, *5*. <https://doi.org/10.1038/ncomms4004>
- Son, S., Tzur, A., Weng, Y., Jorgensen, P., Kim, J., Kirschner, M. W., & Manalis, S. R. (2012). Direct observation of mammalian cell growth and size regulation. *Nature Methods*, *9*(9), 910–912. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2133>
- Sträßer, K., Masuda, S., Mason, P., Pfannstiel, J., Oppizzi, M., Rodriguez-Navarro, S., Rondón, A. G., Aguilera, A., Struhl, K., Reed, R., & Hurt, E. (2002). TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature*, *417*(6886), 304–308. <https://doi.org/10.1038/nature746>
- Sun, H., Zhang, M., Li, K., Bai, D., & Yi, C. (2019). Cap-specific, terminal N6-methylation by a mammalian m6Am methyltransferase. *Cell Research*, *29*(1), 80–82. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0117-4>
- Szretter, K. J., Daniels, B. P., Cho, H., Gainey, M. D., Yokoyama, W. M., Gale, M., Virgin, H. W., Klein, R. S., Sen, G. C., & Diamond, M. S. (2012). 2'-O Methylation of the Viral mRNA Cap by West Nile Virus Evades Ifit1-Dependent and -Independent Mechanisms of Host Restriction In Vivo. *PLoS Pathogens*, *8*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002698>
- Takagi, M., Absalon, M. J., McLure, K. G., & Kastan, M. B. (2005). Regulation of p53 Translation and Induction after DNA Damage by Ribosomal Protein L26 and Nucleolin. *Cell*, *123*(1), 49–63. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.07.034>
- Tamarkin-Ben-Harush, A., Vasseur, J.-J., Debart, F., Ulitsky, I., & Dikstein, R. (2017). Cap-proximal nucleotides via differential eIF4E binding and alternative promoter usage mediate translational response to energy stress. *eLife*, *6*. <https://doi.org/10.7554/eLife.21907>
- Tan-Wong, S. M., Zaugg, J. B., Camblong, J., Xu, Z., Zhang, D. W., Mischo, H. E., Ansari, A. Z., Luscombe, N. M., Steinmetz, L. M., & Proudfoot, N. J. (2012). Gene loops enhance transcriptional directionality. *Science (New York, N.Y.)*, *338*(6107), 671–675. <https://doi.org/10.1126/science.1224350>
- Tejedor, J. R., Papasaikas, P., & Valcárcel, J. (2015). Genome-Wide Identification of Fas/CD95 Alternative Splicing Regulators Reveals Links with Iron Homeostasis. *Molecular Cell*, *57*(1), 23–38. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.10.029>
- Tellier, M., Maudlin, I., & Murphy, S. (2020). Transcription and splicing: A two-way street. *WIREs RNA*, *11*(5), e1593. <https://doi.org/10.1002/wrna.1593>
- Tharun, S. (2009). Lsm1-7-Pat1 complex: A link between 3' and 5'-ends in mRNA decay? *RNA Biology*, *6*(3), 228–232. <https://doi.org/10.4161/rna.6.3.8282>
- The FANTOM Consortium. (2014). A promoter-level mammalian expression atlas. *Nature*, *507*(7493), 462–470. <https://doi.org/10.1038/nature13182>

- Thomas, M. C., & Chiang, C.-M. (2006). The general transcription machinery and general cofactors. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 41(3), 105–178. <https://doi.org/10.1080/10409230600648736>
- Thomas, M. P., Liu, X., Whangbo, J., McCrossan, G., Sanborn, K. B., Basar, E., Walch, M., & Lieberman, J. (2015). Apoptosis Triggers Specific, Rapid, and Global mRNA Decay with 3' Uridylated Intermediates Degraded by DIS3L2. *Cell Reports*, 11(7), 1079–1089. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.026>
- Thoreen, C. C., Chantranupong, L., Keys, H. R., Wang, T., Gray, N. S., & Sabatini, D. M. (2012). A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature*, 485(7396), 109–113. <https://doi.org/10.1038/nature11083>
- Toczydlowska-Socha, D., Zielinska, M. M., Kurkowska, M., Astha, Almeida, C. F., Stefaniak, F., Purta, E., & Bujnicki, J. M. (2018). Human RNA cap1 methyltransferase CMTr1 cooperates with RNA helicase DHX15 to modify RNAs with highly structured 5' termini. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 373(1762). <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0161>
- Tsukamoto, T., Shibagaki, Y., Niikura, Y., & Mizumoto, K. (1998). Cloning and Characterization of Three Human cDNAs Encoding mRNA (Guanine-7)-methyltransferase, an mRNA Cap Methylase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 251(1), 27–34. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9402>
- Tuck, A. C., Rankova, A., Arpat, A. B., Liechti, L. A., Hess, D., Iesmantavicius, V., Castelo-Szekely, V., Gatfield, D., & Bühler, M. (2020). Mammalian RNA Decay Pathways Are Highly Specialized and Widely Linked to Translation. *Molecular Cell*, 77(6), 1222–1236.e13. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.01.007>
- Tyc, K., & Steitz, J. A. (1989). U3, U8 and U13 comprise a new class of mammalian snRNPs localized in the cell nucleolus. *The EMBO Journal*, 8(10), 3113–3119.
- Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., Olsson, I., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Sztybel, C. A.-K., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J. O., Hober, S., ... Pontén, F. (2015). Tissue-based map of the human proteome. *Science*, 347(6220). <https://doi.org/10.1126/science.1260419>
- Ustianenko, D., Pasulka, J., Feketova, Z., Bednarik, L., Zigackova, D., Fortova, A., Zavolan, M., & Vanacova, S. (2016). TUT-DIS3L2 is a mammalian surveillance pathway for aberrant structured non-coding RNAs. *The EMBO Journal*, 35(20), 2179–2191. <https://doi.org/10.15252/embj.201694857>
- van Dijk, E., Cougot, N., Meyer, S., Babajko, S., Wahle, E., & Séraphin, B. (2002). Human Dcp2: A catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *The EMBO Journal*, 21(24), 6915–6924. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf678>
- van Riggelen, J., Yetil, A., & Felsher, D. W. (2010). MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis. *Nature Reviews Cancer*, 10(4), 301–309. <https://doi.org/10.1038/nrc2819>
- Varshney, D., Lombardi, O., Schweikert, G., Dunn, S., Suska, O., & Cowling, V. H. (2018). mRNA Cap Methyltransferase, RNMT-RAM, Promotes RNA Pol II-Dependent Transcription. *Cell Reports*, 23(5), 1530–1542. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.004>
- Varshney, D., Petit, A.-P., Bueren-Calabuig, J. A., Jansen, C., Fletcher, D. A., Pegg, M., Weidlich, S., Scullion, P., Pisiakov, A. V., & Cowling, V. H. (2016). Molecular basis of RNA guanine-7 methyltransferase (RNMT) activation by RAM. *Nucleic Acids Research*, 44(21), 10423–10436. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw637>
- Venkatesh, S., & Workman, J. L. (2015). Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 16(3), 178–189. <https://doi.org/10.1038/nrm3941>
- Vujovic, P., Stamenkovic, S., Jasnic, N., Lacic, I., Djurasevic, S. F., Cvijic, G., & Djordjevic, J. (2013). Fasting Induced Cytoplasmic Fto expression in Some Neurons of Rat Hypothalamus. *PLoS ONE*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063694>
- Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Watanabe, D., & Handa, H. (1998). Evidence that P-TEFb alleviates the negative effect of DSIF on RNA polymerase II-dependent transcription in vitro. *The EMBO Journal*, 17(24), 7395–7403. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.24.7395>
- Wakai, C., Iwama, M., Mizumoto, K., & Nagata, K. (2011). Recognition of Cap Structure by Influenza B Virus RNA Polymerase Is Less Dependent on the Methyl Residue than Recognition by Influenza A Virus Polymerase. *Journal of Virology*, 85(15), 7504–7512. <https://doi.org/10.1128/JVI.02375-10>
- Wall, M., Poortinga, G., Hannan, K. M., Pearson, R. B., Hannan, R. D., & McArthur, G. A. (2008). Translational control of c-MYC by rapamycin promotes terminal myeloid differentiation. *Blood*, 112(6), 2305–2317. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-111856>
- Wang, E., & Aifantis, I. (2020). RNA Splicing and Cancer. *Trends in Cancer*, 6(8), 631–644. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.04.011>
- Wang, J., Alvin Chew, B. L., Lai, Y., Dong, H., Xu, L., Balamkundu, S., Cai, W. M., Cui, L., Liu, C. F., Fu, X.-Y., Lin, Z., Shi, P.-Y., Lu, T. K., Luo, D., Jaffrey, S. R., & Dedon, P. C. (2019). Quantifying the RNA cap epitranscriptome reveals novel caps in cellular and viral RNA. *Nucleic Acids Research*, 47(20), e130–e130. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz751>
- Wang, T., Birsoy, K., Hughes, N. W., Krupczak, K. M., Post, Y., Wei, J. J., Lander, E. S., & Sabatini, D. M. (2015). Identification and characterization of essential genes in the human genome. *Science (New York, N.Y.)*, 350(6264), 1096–1101. <https://doi.org/10.1126/science.aac7041>
- Wang, Y., Dow, E. C., Liang, Y.-Y., Ramakrishnan, R., Liu, H., Sung, T.-L., Lin, X., & Rice, A. P. (2008). Phosphatase PPM1A Regulates Phosphorylation of Thr-186 in the Cdk9 T-loop. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(48), 33578–33584. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807495200>

- Wang, Y., LIU, J., HUANG, B., XU, Y.-M., LI, J., HUANG, L.-F., LIN, J., ZHANG, J., MIN, Q.-H., YANG, W.-M., & WANG, X.-Z. (2015). Mechanism of alternative splicing and its regulation. *Biomedical Reports*, 3(2), 152–158. <https://doi.org/10.3892/br.2014.407>
- Warner, J. R. (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(11), 437–440. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(99\)01460-7](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(99)01460-7)
- Watson, J. D., & Crick, F. H. C. (1953). Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*, 171(4356), 737–738. <https://doi.org/10.1038/171737a0>
- Werner, M., Purta, E., Kaminska, K. H., Cymerman, I. A., Campbell, D. A., Mittra, B., Zamudio, J. R., Sturm, N. R., Jaworski, J., & Bujnicki, J. M. (2011). 2'-O-ribose methylation of cap2 in human: Function and evolution in a horizontally mobile family. *Nucleic Acids Research*, 39(11), 4756–4768. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr038>
- West, M. J., Stoneley, M., & Willis, A. E. (1998). Translational induction of the c-myc oncogene via activation of the FRAP/TOR signalling pathway. *Oncogene*, 17(6), 769–780. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201990>
- West, S., Gromak, N., & Proudfoot, N. J. (2004). Human 5' → 3' exonuclease Xrn2 promotes transcription termination at co-transcriptional cleavage sites. *Nature*, 432(7016), 522–525. <https://doi.org/10.1038/nature03035>
- Wilkinson, M. E., Charenton, C., & Nagai, K. (2020). RNA Splicing by the Spliceosome. *Annual Review of Biochemistry*, 89(1), 359–388. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-091719-064225>
- Williams, G. D., Gokhale, N. S., Snider, D. L., & Horner, S. M. (2020). The mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase CMTR1 Regulates the Expression of Certain Interferon-Stimulated Genes. *MSphere*, 5(3). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00202-20>
- Wilusz, J. E. (2016). Long noncoding RNAs: Re-writing dogmas of RNA processing and stability. *Biochimica et biophysica acta*, 1859(1), 128–138. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2015.06.003>
- Wong, K. H., Jin, Y., & Struhl, K. (2014). TFIIF phosphorylation of the Pol II CTD stimulates mediator dissociation from the preinitiation complex and promoter escape. *Molecular Cell*, 54(4), 601–612. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.024>
- Worch, R., Niedzwiecka, A., Stepinski, J., Mazza, C., Jankowska-Anyszka, M., Darzynkiewicz, E., Cusack, S., & Stolarski, R. (2005). Specificity of recognition of mRNA 5' cap by human nuclear cap-binding complex. *RNA*, 11(9), 1355–1363. <https://doi.org/10.1261/rna.2850705>
- Wu, B., Peisley, A., Richards, C., Yao, H., Zeng, X., Lin, C., Chu, F., Walz, T., & Hur, S. (2013). Structural basis for dsRNA recognition, filament formation, and antiviral signal activation by MDA5. *Cell*, 152(1–2), 276–289. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.048>
- Xia, C., Liu, J., Wu, Z. G., Lin, C. Y., & Wang, M. (2004). The interferon-alpha genes from three chicken lines and its effects on H9N2 influenza viruses. *Animal Biotechnology*, 15(1), 77–88. <https://doi.org/10.1081/ABIO-120037900>
- Yang, K., Yang, J., & Yi, J. (2018). Nucleolar Stress: Hallmarks, sensing mechanism and diseases. *Cell Stress*, 2(6), 125–140. <https://doi.org/10.15698/cst2018.06.139>
- Yang, Y., & Wang, Z. (2019). IRES-mediated cap-independent translation, a path leading to hidden proteome. *Journal of Molecular Cell Biology*, 11(10), 911–919. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjz091>
- Yang, Z., Liang, H., Zhou, Q., Li, Y., Chen, H., Ye, W., Chen, D., Fleming, J., Shu, H., & Liu, Y. (2012). Crystal structure of ISG54 reveals a novel RNA binding structure and potential functional mechanisms. *Cell Research*, 22(9), 1328–1338. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.111>
- Yao, R.-W., Wang, Y., & Chen, L.-L. (2019). Cellular functions of long noncoding RNAs. *Nature Cell Biology*, 21(5), 542–551. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0311-8>
- Yi, H., Park, J., Ha, M., Lim, J., Chang, H., & Kim, V. N. (2018). PABP Cooperates with the CCR4-NOT Complex to Promote mRNA Deadenylation and Block Precocious Decay. *Molecular Cell*, 70(6), 1081–1088.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.05.009>
- Yin, Q.-F., Yang, L., Zhang, Y., Xiang, J.-F., Wu, Y.-W., Carmichael, G. G., & Chen, L.-L. (2012). Long noncoding RNAs with snoRNA ends. *Molecular Cell*, 48(2), 219–230. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.033>
- Yoshikatsu, Y., Ishida, Y., Sudo, H., Yuasa, K., Tsuji, A., & Nagahama, M. (2015). NVL2, a nucleolar AAA-ATPase, is associated with the nuclear exosome and is involved in pre-rRNA processing. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 464(3), 780–786. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.07.032>
- Yoshimoto, R., Kataoka, N., Okawa, K., & Ohno, M. (2009). Isolation and characterization of post-splicing lariatintron complexes. *Nucleic Acids Research*, 37(3), 891–902. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn1002>
- Zhang, B., Liu, X., Chen, W., & Chen, L. (2013). IFIT5 potentiates anti-viral response through enhancing innate immune signaling pathways. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 45(10), 867–874. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmt088>
- Zhang, X.-H., Tee, L. Y., Wang, X.-G., Huang, Q.-S., & Yang, S.-H. (2015). Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 4, e264. <https://doi.org/10.1038/mtna.2015.37>
- Zhang, Y., Burke, C. W., Ryman, K. D., & Klimstra, W. B. (2007). Identification and Characterization of Interferon-Induced Proteins That Inhibit Alphavirus Replication. *Journal of Virology*, 81(20), 11246–11255. <https://doi.org/10.1128/JVI.01282-07>
- Zhang, Z., Harrison, P., & Gerstein, M. (2002). Identification and Analysis of Over 2000 Ribosomal Protein Pseudogenes in the Human Genome. *Genome Research*, 12(10), 1466–1482. <https://doi.org/10.1101/gr.331902>
- Zhou, Y., Ray, D., Zhao, Y., Dong, H., Ren, S., Li, Z., Guo, Y., Bernard, K. A., Shi, P.-Y., & Li, H. (2007). Structure and Function of Flavivirus NS5 Methyltransferase. *Journal of Virology*, 81(8), 3891–3903. <https://doi.org/10.1128/JVI.02704-06>

- Züst, R., Cervantes-Barragan, L., Habjan, M., Maier, R., Neuman, B. W., Ziebuhr, J., Szretter, K. J., Baker, S. C., Barchet, W., Diamond, M. S., Siddell, S. G., Ludewig, B., & Thiel, V. (2011). Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5. *Nature Immunology*, *12*(2), 137–143. <https://doi.org/10.1038/ni.1979>

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lebenszyklus einer mRNA.....	6
Abbildung 2: Regulation der Transkription.....	9
Abbildung 3: mRNA Cap-Struktur.....	16
Abbildung 4: Proteindomänen von CMTr1.....	18
Abbildung 5: RIG-I Signalweg und durch IFN induzierte antivirale Mechanismen. ...	24
Abbildung 6: Überblick über die Ribosomenbiogenese. ....	35
Abbildung 7: Generierte Zelllinien.....	77
Abbildung 8: Bestimmung des Capmethylierungsstatus der endogenen RNA. ....	79
Abbildung 9: Messung der Zellproliferation.....	80
Abbildung 10: Durchflusszytometrische Analyse der Zellgröße.....	83
Abbildung 11: Durchflusszytometrische Analyse der Zellzyklusphasen und Zellgröße. .....	84
Abbildung 12: Messung der Viabilität nach IFN-Behandlung.....	85
Abbildung 13: Kristallviolett-Assay.....	87
Abbildung 14: Bestimmung der globalen zellulären Translationsaktivität (SUnSET). 89	
Abbildung 15: Effekt von IFN auf die Expression von RIG-I und IFIT-1.....	90
Abbildung 16: Effekt von IFN auf die Translation von Cap0/Cap1 Reporter-mRNA. 92	
Abbildung 17: Effekt von mIFIT1B auf die Translation von Cap0/Cap1-Reporter- mRNA.....	94
Abbildung 18: Analyse der RIG-I-Stimulation durch GLuc/FLuc-Reporter-Aktivierung und Produktion von IP10 und Typ-I IFN.....	97
Abbildung 19: Proteinexpression von RIG-I und IFIT1 nach RIG-I-Stimulation. ....	98
Abbildung 20: Analyse der TBK1-Phosphorylierung nach RIG-I-Stimulation.....	99
Abbildung 21: Analyse der Induktion der mRNA von IP10, IFN- $\beta$ , IFIT1 und RIG-I nach RIG-I Stimulation.....	102
Abbildung 22: Messung der Viabilität von DT40-Zelllinien nach chIFN- $\alpha$ Behandlung. .....	103
Abbildung 23: Polysom-Profil-Analyse.....	104
Abbildung 24: Transkriptomanalyse durch RNA-Seq. ....	107
Abbildung 25: RP-Transkriptlevel sind in CMTr1-KO-Zellen reduziert.....	111
Abbildung 26: RP-RNA, 5' TOP-RNA, SNHGs und snoRNA sind in CMTr1-KO-Zellen herunterreguliert. ....	114

Abbildung 27: Überblick der Regulation der einzelnen Transkripte der Gruppen RP, non-RP 5´TOP, ncSNHG.....	115
Abbildung 28: Validierung der differentiell regulierten Gene.....	118
Abbildung 29: Proteomanalyse durch Massenspektrometrie (LFQ). ....	119
Abbildung 30: Relative Proteinexpression von NVL2 und CMTr1.....	120
Abbildung 31: Analyse der <i>read</i> -Lesedichte im NVL2-Genlocus. ....	122
Abbildung 32: Exonskipping von NVL2 Exon 8 in CMTr1-defizienten Zellen.....	124
Abbildung 33: Effekt von transienter CMTr1-wt- und CMTr1-KA-Expression auf NVL2. .....	126
Abbildung 34: Effekt von transienter CMTr1-wt- und CMTr1-KA-Expression auf den Cap-Methylierungsstatus.....	127
Abbildung 35: Effekt von transienter CMTr1- und NVL2-Expression auf die Expression von Transkripten, die in CMTr1-defizienten Zellen reduziert sind. ....	131
Abbildung 36: Analyse der Zytotoxizität von CDK-Inhibitoren.....	132
Abbildung 37: Relative Transkriptexpression von p53. ....	135
Abbildung 38: Analyse der Zytotoxizität von CX-5461 und Camptothecin. ....	136



## 9. Abkürzungsverzeichnis

18S	rRNA	cPCR	colony-PCR
2'O	2' Position der Ribose eines Nukleotides	CPSF	Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor
28S	rRNA	CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
3'SS	3' Splice Site	Ct	Threshold Cycle (qPCR)
40s	kleine ribosomale Untereinheit	CTD	C-terminale Domäne
47S	rRNA	CTP	Cytidintriphosphat (CTP)
4E-BP	EIF4E-Binding Protein	d	Tag(e)
5.8S	rRNA	dATP	Desoxyadenosintriphosphat (dATP)
5'SS	5' Splice Site	dC	Desoxyribocytidin
5'TOP	5' terminales Oligopyrimidin Motiv	DCP1a	Decapping mRNA 1a
5S	rRNA	DCP2	Decapping mRNA 2
60s	große ribosomale Untereinheit	DcpS	Decapping Scavenger
80s	einzelnes Ribosom	dCTP	Desoxycytidintriphosphat (dCTP)
A	Adenosin (Nukleotid)	DDR	DNA damage response
A	Ampere	dG	Desoxyriboguanosin
AIM2	Absent In Melanoma 2	dGTP	Desoxyguanosintriphosphat (dGTP)
AlyRef	Aly/REF Export Factor	DHX15	DEAH-box Helicase
APS	Ammoniumperoxodisulfat	Dis3L2	DIS3 Like 3'-5' Exoribonuclease 2
ARS2	Arsenate Resistance Protein 2	DKO	Doppel-Knockout
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated	DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ATP	Adenosintriphosphat (ATP)	DMSO	Dimethylsulfoxid
ATR	Ataxia Telangiectasia And Rad3 Related	DNA	Desoxyribonukleinsäure
AUG	Initiationscodon der Translation	DNase	Desoxyribonuklease
b	Base(n)	dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
bp	Basenpaare	dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
bp	Basenpaar(e)	dsDNA	Doppelstrang-DNA
BP	Branch Point (Splicing)	DSIF	DRB Sensitivity Inducing Factor
BSA	bovines Serum-Albumin	dsRNA	Doppelstrang-RNA
C	Cytidin (Nukleotid)	dT	Desoxyribothymidin
CAPAM	Cap-Adenosin-N6-Methyltransferase	DTT	Dithiothreitol
CARD	Caspase activation and recruitment Domäne	dTTP	Desoxythymidintriphosphat (dTTP)
CBC	nuclear Cap Binding Complex	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
CDK	Cyclin Dependet Kinase	EF1a	Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 Alpha 1
cDNA	complementary DNA	eIF	Eukaryotic Initiation Factor
CE	Capping Enzyme	EIF4E	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E
CH3ppp	γ-Monomethyl Cap	eIF4F	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4F-Komplex
CHX	Cycloheximid	EJC	Exon Junction Komplex
CMTr1	Cap Methyltransferase 1	ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
CMTr2	Cap Methyltransferase 2	ETS	External Transcribed Spacer (rRNA)
CPA	3' Prozessierungsfaktoren, Cleavage and Polyadenylation	FACS	Fluorescence activated cell sorting

FCS	Fötales Bovines Serum	MAVS	Mitochondrial Antiviral Signaling Protein
FLuc	Firefly luciferase	MDA-5	Melanoma Differentiation-Associated Protein 5
FSC	Forward Scatter (FACS)	MePCE	Methylphosphate Capping Enzyme
FTO	Fat Mass and Obesity Associated Protein	min	Minute(n)
fwd	forward Primer	miRNA	Micro RNA
G	Guanosin (Nukleotid)	mRNA	Messenger RNA
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase	mRNP	Komplex aus mRNA mit RNA-bindenden Proteinen
GFP	Green Fluorescent Protein	mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
GLuc	Gaussia luciferase	MTR4	Mtr4 Exosome RNA Helicase
GpppN	Guanosin Cap (CapG)	MTT	Thiazolylblau
gRNA	guideRNA (für CRISPR/Cas9 Genomeditierung)	N1	das erste Nukeotid einer RNA
GTF	General RNA Polymerase II Transcription Factors	N2	das zweite Nukleotid einer RNA
GTP	Guanosintriphosphat (GTP)	NCBP1/2/3	Komponenten des CBC
h	Stunde(n)	ncRNA	non-coding RNA
H830A	RIG-I Aminosäureaustauschmutante Histidin 830 zu Alanin	NELF	Negative Elongation Factor
HBS	HEPES Buffered Saline	NEXT	Nuclear Exosome Targeting Complex
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	NFX1	Nuclear Transcription Factor, X-Box Binding 1
HNRNP	Heterogenous Nuclear Ribonucleoprotein	NF-κB	Nuclear Factor Kappa-Light-Chain B
HPLC	High-performance liquid chromatography	NLS	Nuclear Localisation Signal
HRP	Horseradish Peroxidase	NMD	Nonsense Mediated Decay
IFIT1/-2/-3/-5/-1B	Interferon Induced Protein With Tetratricopeptide Repeats 1/-2/-3/-5/-1B	NPM1	Nucleophosmin 1B
IFN	Interferon	nt	Nukleotide (Länge)
IFNR1	Interferon Receptor 1	NTD	N-terminale Domäne
IKK-ε	Inhibitor of NF-κB	NTP	Ribonukleosidtriphosphate
IP10	10 KDa Interferon Gamma-Induced Protein	NVL2	Nuclear VCP-Like Protein
IRES	Internal Ribosomal Entry Site	OD	Optical Density
IRF1/3/7	Interferon Regulatory Factor 1/3/7	OH-	Hydroxygruppe
ISG	Interferon-induziertes Gen	oligo(A)	oligoadenyliertes 3' Ende einer RNA
ITS	Internal Transcribed Spacer (rRNA)	oligo(U)	oligouridinyliertes 3' Ende einer RNA
IVT	In-Vitro-Transkription/Transkript	PABPC1	Polyadenylat Binding Protein cytosolic 1
JAK1	Januskinase	PABPN1	Polyadenylat Binding Protein nuclear 1
kb	Kilobasen	PAS	Polyadenylierungssignal
KO	Knockout	PAXT	Poly(A) Exosome Targeting Complex
LB	Luria Broth	PCR	Polymerase Chain Reaction
LFQ	Lable Free Quantification	PHAX	Phosphorylated Adaptor For RNA Export
LGP2	Laboratory of Genetics and Physiology 2	PI	Propidiumiodid
LPS	Lipopolysaccharid	PIC	Präinitiationskomplex
m6A	Position 6 von Adenosin	PKR	Protein Kinase R
m6Am-Cap	m7Gpppm6Am, durch CAPAM generierte Cap1 Struktur mit N6 methyliertem Adenosin	pNPP	para-Nitrophenylphosphat
m7G	N7 methyliertes Guanosin Cap-Struktur	poly(A)	poly-adenyliertes 3' Ende einer RNA

pp	Diphosphat	TF	Transkriptionsfaktor
PPM1B	Proteinphosphatase 1B	TFIIA, -B, -D, -E, -F, -H	Komponenten der GTFs (General RNA Polymerase II Transcription Factors)
ppp	Triphosphat	TGS1	Trimethylguanosin Synthase 1
pppRNA	5'triphosphorylierte RNA	TLR	Toll Like Receptor
PRMT5	Protein Arginine Methyltransferase 5	TMG	2,2,7-Trimethylguanosin Cap
PRR	Pattern Recognition Receptor	TREX	Transcription Export Complex
pS2/5/7	phosphoryliertes Serin an Position 2/5/7 der RNA Pol II CTD	tRNA	Transfer RNA
P-TEFb	Positive Transcription Elongation Factor b	TSS	Transcription Start Site
qPCR	Quantitative Real-Time PCR	TUT	Terminal Uridyltransferase
RAM	RNMT Activating Miniprotein	U	Uridin (Nukleotid)
RBM7	RNA Binding Motif Protein	U1/2/4/5/6	snRNAs des major spliceosome
RBP	RNA-bindende Proteine	U3/U8/U13	snoRNAs mit TMG Cap
RCF	Relative Centrifugal Force (g-Force)	U4atac/U6atac/U7/U11/U12	snRNA
rev	reverse Primer	UTP	Uridintriphosphat (UTP)
RIG-I	Retinoic Acid Inducible Gene I	V	Volt
RISC	RNA Induced Silencing Complex	Xrn1	5'3'-Exoribonuklease 1
RNA	Ribonukleinsäure	Xrn2	5'3'-Exoribonuklease 2
RNA Pol I/II/III	DNA-abhängige RNA-Polymerase I/II/III	YC	nicht-kanonische Initiation (-1 Pyrimidin, +1 Cytidin)
RNA-Seq	RNA Sequenzierung	YR	kanonische Initiation (-1 Pyrimidin, +1 Purin)
RNMT	RNA-Guanosin-N7-Methyltransferase	ZC3H18	Zinc Finger CCCH-Type Containing 18
RPB	RNA Pol II Untereinheit	ZCCHC8	Zinc Finger CCHC-Type 8
RPM	Revolutions per Minute		
rRNA	Ribosomale RNA		
RT	Raumtemperatur		
SAM	S-Adenosylmethionin		
scaRNA	Small cajal body associated RNA		
SEAP	Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase		
SEC	Super Elongation Complex		
sec	Sekunde(n)		
SKIV2L	Ski2 Like RNA Helicase		
SMN	Survival Motor Neuron		
SNHG	snoRNA Host Gene		
SNORA	H/ACA box snoRNA		
SNORD	C/D box snoRNA		
snoRNA	Small Nucleolar RNA		
snoRNP	snoRNA Ribonukleoprotein Komplex		
snRNA	Small Nuclear RNA		
snRNP	snRNA Ribonukleoprotein Komplex		
sqRT-PCR	semiquantitative Reverse-Transkriptase PCR		
SSC	Sideward Scatter (FACS)		
STAT1/2	Signal Transducer and Activator of Transkription 1/2		
SUnSET	Surface Sensing of Translation		