

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biotechnologin Kathrin Simone Kerschgens

aus: Heidelberg

Tag der mündlichen Prüfung: 27.05.2011

Thema

Funktionelle Charakterisierung der potenziellen Rolle des „Nonsense-mediated mRNA Decay“ (NMD)-Proteins „Up-Frameshift 1“ (UPF1) in der Translation.

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. Walter Nickel

2. Prof. Dr. Dr. med. Andreas E. Kulozik

Zusammenfassung

„Nonsense-Mediated mRNA Decay“ (NMD) ist ein translationsabhängiger Qualitätskontrollmechanismus der post-transkriptionalen Genexpression in Eukaryonten. Durch NMD werden mRNAs mit vorzeitigem Stopkodons im offenen Leserahmen (ORF) erkannt und abgebaut, was durch die NMD-Effektorproteine UPF1, UPF2 und UPF3b vermittelt wird. Der Abbau aberranter mRNAs wird durch die vorzeitige Termination der Proteintranslation ausgelöst. Die dieser Funktion zugrundeliegenden molekularen Mechanismen und insbesondere die Rolle der UPF-Proteine sind jedoch noch nicht vollständig geklärt.

Die auf die Interaktion des NMD-Faktors UPF1 mit den Translations-Terminationsfaktoren eRF1 und eRF3 folgende Phosphorylierung von UPF1 durch SMG1 scheint ein Schlüsselereignis zur Auslösung des Degradationsmechanismus zu sein. Es ist jedoch unbekannt, durch welche Abläufe hier zwischen normaler und vorzeitiger Termination unterschieden wird. Eine lange 3'-UTR, sowie ein „Exon-Junction-Complex“ (EJC) mehr als 22 Nukleotide stromabwärts des Terminationskodons dienen als Erkennungskriterien von NMD-Substraten. Daten aus *S. cerevisiae* deuten darauf hin, dass die Termination oder das Recycling der Ribosomen bei der Translation von NMD-Substraten aberrant ist.

Die Grundhypothese der hier vorliegenden Arbeit postuliert, dass UPF1 durch seine Interaktion mit dem Translationsapparat hier im Zentrum eines kinetischen Proofreading-Mechanismus steht, durch den die verschiedenen positiven (Nähe des Terminationsereignisses zum Poly-(A)-Schwanz und PABPC1) und negativen (EJC in der 3'-UTR) Terminationssignale integriert werden. UPF1 könnte also eine generelle Rolle bei der Termination spielen. Außerdem wurde UPF1 in der Literatur eine negative regulatorische Rolle in der Translationsinitiation zugewiesen.

Um die Rolle von UPF1 bei der Translation genauer aufzuschlüsseln, wurde hier ein aus HPLC-gereinigten Faktoren rekonstituiertes *in vitro* Translationssystem adaptiert. Durch Analyse *in vitro* assemblierter Translationskomplexe konnte ich feststellen, dass die Assemblierung von 48S-Initiationskomplexen, die Bindung der ribosomalen 60S-Untereinheit, die Elongation und die Termination der Translation sowie das Recycling der Ribosomen unabhängig von der An- oder Abwesenheit von UPF1 effizient ablaufen.

In einem modifizierten Ansatz modulierte UPF1 in Gegenwart von geringen Mengen an Terminationsfaktoren die Dissoziation von aus Retikulozytenlysate gewonnenen Terminationsin-

termediaten. Die hier vorgestellte Arbeit deutet auf eine Rolle von UPF1 bei der Feinabstimmung der Translationstermination oder dem Recycling der Ribosomen nach der Termination im Kontext des mRNPs hin. Neben diesen Implikationen für den Translationsmechanismus im Allgemeinen könnten die hier gewonnenen Daten einen wichtigen Beitrag zum Verständnis von NMD leisten.

Summary

Nonsense-Mediated mRNA Decay (NMD) in human cells is a translation-dependent mRNA quality control process. NMD recognizes and degrades mRNAs with premature termination codons in the open reading frame (ORF), a process that is mediated by the UPF proteins sensing the correct position of the termination codon relative to the exon-intron structure of the mRNA. Premature termination of protein translation triggers degradation of the respective mRNA. The underlying molecular mechanisms that lead to the translation-dependent recognition of mRNAs with premature termination codons and their subsequent degradation and especially the role of the UPF proteins remain to some extent unclear.

UPF1 (“up-frameshift 1”) represents one of the key NMD proteins that has been shown to interact with the eukaryotic translation initiation factor eIF3 and termination factors eRF1 and eRF3. Following interaction with translation termination factors eRF1 and eRF3, phosphorylation of UPF1 by its kinase SMG1 is thought to be a key event to trigger the degradation mechanism. It is yet unknown which course of events distinguishes between normal and premature termination. Long 3'-UTRs and EJCs more than 22nt downstream of the termination codon are key features of NMD substrates. Data from yeast indicate that translation termination or ribosome recycling of NMD substrates is aberrant.

The central hypothesis of the work presented here postulates that through its interaction with the translation apparatus, UPF1 stands in the center of a kinetic proofreading mechanism that integrates positive (spatial proximity of the termination event to the poly (A)-tail and PABPC1) and negative (EJC in the 3'-UTR) termination signals. UPF1 could thus play a general role in the termination process. Moreover, in the literature, UPF1 has been assigned a negative regulatory function in translation initiation.

To better understand the potential role of UPF1 in translation, I adapted a eukaryotic *in vitro* translation system that is reconstituted from purified components. Through biochemical analysis of *in vitro* assembled translation complexes, I found that the assembly of 48S initiation complexes, 60S subunit joining, elongation, termination and ribosome recycling proceeded efficiently irrespective of the presence or the absence of UPF1.

In a modified approach, UPF1 modulated the dissociation of reticulocyte lysate-purified termination intermediates in the presence of low amounts of termination factors. The work presented here may indicate a role of UPF1 in the finetuning of translation termination or

ribosome recycling in the context of the mRNP. Apart from implications on the mechanism of translation in general, these data might help to elucidate the mechanism of PTC recognition during NMD.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	5
Abkürzungsverzeichnis	15
Abbildungsverzeichnis	17
Tabellenverzeichnis	19
1 Einleitung	21
1.1 Die Schritte der eukaryontischen Genexpression	21
1.2 Der Lebenszyklus einer mRNA.	21
1.3 Translation in Eukaryonten	25
1.3.1 Initiation	28
1.3.2 Elongation	29
1.3.3 Termination	29
1.3.4 Recycling	30
1.4 Eukaryontische translationsabhängige RNA-Qualitätskontrollmechanismen	30
1.4.1 Non-Stop Decay (NSD)	31
1.4.2 No-Go-Decay (NGD)	31
1.4.3 Nonsense-Mediated mRNA Decay (NMD)	31
1.5 NMD-Faktoren	32
1.5.1 Übersicht der NMD-Faktoren	32
1.5.2 Eigenschaften und Funktionen von UPF1	34
1.5.2.1 Enzymatische Aktivitäten von UPF1	36
1.5.2.2 Der Phosphorylierungszyklus von UPF1	36
1.5.2.3 Interaktion von UPF1 mit weiteren NMD-Effektoren	37
1.5.3 UPF2 und UPF3	38
1.6 NMD-Mechanismus	38
1.6.1 Translationsabhängige Definition von PTCs während NMD	38
1.6.2 Endo- und exonukleolytische Abbauewege aberranter mRNAs	42
1.7 Wechselspiel zwischen der Translation, NMD und UPF1	42
1.8 Fragestellung	45
2 Material	47
2.1 Chemikalien	47
2.2 Molekularbiologische und biochemische Reagenzien	48

2.3	Verwendete Puffer, Lösungen und Media	50
2.4	Nährlösungen und Media für die Zellkultur	52
2.5	Instrumente	52
2.6	Säulen und Säulenmaterialien	53
2.7	Kits	54
2.8	Plasmide	54
2.9	Antikörper	56
2.10	Enzyme	57
2.11	DNA-Oligonukleotide	57
2.12	RNA-Oligonukleotide	58
2.13	Bakterienstämme und Zelllinien	58
2.13.1	Bakterienstämme	59
2.13.2	Eukaryontische Zelllinien	59
2.14	Antibiotikakonzentrationen	59
2.15	Kaninchenretikulozytenlysat	60
2.16	Sonstiges	60
3	Methoden	61
3.1	Standard-Methoden	61
3.2	Bioinformatik-Tools	61
3.3	Mikrobiologische Methoden	61
3.3.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	61
3.3.2	Transformation von XL1-Blue Zellen mittels Hitzeschock	61
3.3.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	62
3.4	Gentechnologische Methoden	62
3.4.1	PCR	62
3.4.1.1	Primerdesign	62
3.4.1.2	PCR-Programme und Primer	63
3.4.1.3	PCR-Mutagenese: Standard	63
3.4.1.4	PCR-Mutagenese: UPF1	63
3.4.1.5	PCR-Punktmutagenese: Kit	63
3.4.1.6	Kolonie-PCR	64
3.4.2	Klonierungen	64

3.4.2.1	DNA-Restriktionsverdau	64
3.4.2.2	Ligation	64
3.4.2.3	Plasmidsequenzierung	65
3.5	Zellkulturmethoden	65
3.5.1	Kultur eukaryontischer Zellen	65
3.5.2	Einfrieren eukaryontischer Zellen	65
3.5.3	Transiente Transfektion humaner Zellen	65
3.5.3.1	DNA-Transfektion mit der BBS-Kalziumphosphat-Methode	65
3.5.3.2	DNA-Transfektion mit der HBS-Kalziumphosphat-Methode	66
3.5.3.3	siRNA-Transfektion mit Oligofektamin	66
3.5.4	Stabile Transfektion eukaryontischer Zellen	67
3.6	Gelelektrophoresetechniken	67
3.6.1	Polyacrylamidgelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen	67
3.6.1.1	Harnstoffgele zur Qualitätsanalyse von <i>in vitro</i> synthetisierter RNA	67
3.6.1.2	Toeprinting-Gele (Sequenziergele)	68
3.6.1.3	SDS-PAGE (Proteingele)	68
3.6.2	Polyacrylamidgelelektrophorese unter nativen Bedingungen	68
3.6.3	Agarose-Gelelektrophorese von DNA	68
3.6.3.1	Agarose-Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen	68
3.6.3.2	Agarose-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen	69
3.7	Nachweis- und Färbetechniken	69
3.7.1	Coomassie-Proteinfärbung	69
3.7.2	Silberfärbung von Proteingelen	69
3.7.3	Methylenblau Nukleinsäurefärbung	69
3.7.4	Nachweis und Quantifizierung radioaktiver Signale	69
3.8	Isolierung von zytoplasmatischer RNA und Protein aus eukaryontischen Zellen	70
3.9	Protein-, DNA- und RNA-Messung	70
3.10	FLAG-Pulldown	70
3.11	Immunoblot	71
3.12	Nachweis der differenziellen Phosphorylierung von UPF1	71
3.13	Northern Blot	71
3.14	NMD-Rescue-Experiment	72
3.15	Ex vivo Toeprinting	72
3.15.1	Herstellung von Zellextrakten für <i>ex vivo</i> Toeprinting	72
3.15.2	Primer Labeling	73

3.15.3	Sequenzierreaktionen	73
3.15.4	Toeprinting mit Zellextrakt	73
3.16	Proteinexpressionsmethoden	74
3.16.1	Proteinexpression in <i>E. coli</i>	76
3.16.2	Stabile Expression von UPF1 in Hek 293- Zellen (Flip-In System)	76
3.16.2.1	Klonierung in pcDNA5FRT	76
3.16.2.2	Transfektion und Selektion stabil transfizierter Zellen	76
3.16.2.3	Gewinnung von phosphoryliertem und nicht phosphoryliertem UPF1	77
3.17	Proteinaufreinigungsmethoden	77
3.17.1	Aufreinigung getaggtter rekombinanter Proteine	77
3.17.1.1	His-Tag: EIFs 1,1A, 4A, 4B, 4G, 5, 5B, eRF1, eRF1(G183A), eRF1NM, eRF3a, ΔeRF3a	77
3.17.1.2	FLAG-Tag: Aufreinigung von FLAG-UPF1	78
3.17.2	Aufreinigung von Translationsfaktoren und Aminoacyl-tRNA-Synthetase aus Kaninchenretikulozytenlysate	79
3.17.3	Aufreinigung von Prä-Terminationskomplexen (Pre-TCs)	79
3.17.3.1	Aufreinigung von Prä-Terminationskomplexen aus dem rekonstituierten System	79
3.17.3.2	Aufreinigung von Prä-Terminationskomplexen (Pre-TCs) aus Retikulozytenlysate	80
3.18	Aktivitätsassays zur funktionellen Charakterisierung von UPF1	80
3.18.1	ATPase-Aktivitätsassay	80
3.18.2	Helikase-Aktivitätsassay	80
3.19	In vitro Transkription	81
3.19.1	Transkriptionsvektoren	81
3.19.2	Linearisierung der DNA	82
3.19.3	Standard- <i>in vitro</i> Transkriptionsprotokoll	82
3.19.4	Transkription mittels Kit	82
3.19.5	Transkription der Methionin-Initiator-tRNA _i ^{Met}	82
3.19.6	Herstellung von RNA-Sonden für Northern Blots	83
3.20	Translationsexperimente	83
3.20.1	Translation im rekonstituierten Translationssystem	83
3.20.1.1	Aminoacylierung von tRNAs	83
3.20.1.2	Initiation	83
3.20.1.3	Bindung der 60S-Untereinheit	84
3.20.1.4	Elongation	84
3.20.1.5	Termination	84
3.20.1.6	Recycling	84
3.20.2	Analyse der Translationsprodukte	85
3.20.2.1	Sucrosegradientenzentrifugation	85

3.20.2.2	Primerextensionsinhibierung ("Toeprinting")	85
3.20.2.3	Peptide Release Assay	87
3.20.3	Translation in RRL	87
3.21	Komplementierung des rekonstituierten Systems mit translationskompetentem, zytoplasmatischem HeLa-Zellextrakt	87
4	Ergebnisse	89
4.1	Expression und HPLC-Aufreinigung von FLAG-UPF1 (angereichert für die phosphorylierte oder unphosphorylierte Isoform)	89
4.2	Gereinigtes FLAG-UPF1 ist biochemisch aktiv	91
4.2.1	ATPase-Aktivität von UPF1	92
4.2.2	Helikase-Aktivität von UPF1	92
4.3	Aufbau des rekonstituierten <i>in vitro</i> Translationssystems	93
4.3.1	Aufreinigung von Translationsfaktoren, Aminoacyl-tRNA-Synthetasen und Ribosomen	95
4.3.2	Aufreinigung und Funktionalitätstest von eRF3a voller Länge	95
4.3.3	Aufreinigung und Charakterisierung von Terminationsintermediaten aus RRL	97
4.4	Der Einfluss von gereinigtem FLAG-UPF1 auf die <i>in vitro</i> Translation	99
4.4.1	Initiation und Elongation im rekonstituierten Translationssystem sind unabhängig von UPF1	99
4.4.2	Die Translation einer Luziferase-mRNA in RRL ist unabhängig von UPF1	102
4.4.3	Der Einfluss von UPF1 auf die Termination im rekonstituierten Translationssystem	103
4.4.3.1	Die Kinetik der Freisetzung des Peptids während der Termination wird durch UPF1 nicht beeinflusst	104
4.4.3.2	Die Termination in Gegenwart von UPF1 ist effizient: „Endpoint“-Experiment	106
4.4.3.3	Komplementierung des rekonstituierten Systems mit translationskompetentem, zytoplasmatischem HeLa-Zellextrakt	110
4.4.4	UPF1 fördert die Dissoziation von Terminationskomplexen	112
4.4.4.1	UPF1 beeinflusst die Stabilität von Terminationskomplexen bei reduzierter Menge an Terminationsfaktoren	112
4.4.4.2	Der Einfluss auf die Stabilität von Terminationskomplexen ist reproduzierbar und spezifisch für UPF1	115
4.4.4.3	Der Einfluß von UPF1-Mutanten auf die Termination	117
4.4.5	Das Recycling der Ribosomen wird im rekonstituierten Translationssystem von UPF1 nicht beeinflusst	120
4.4.5.1	Die Dissoziation von post-TCs durch Translationsinitiationsfaktoren ist in Gegenwart von UPF1 effizient	121
4.4.5.2	Durch ABCE1 vermitteltes Recycling wird von UPF1 nicht beeinflusst	124

5	<i>Diskussion</i>	127
5.1	UPF1 beeinflusst die Dissoziation von Terminationskomplexen	127
5.2	Potenzielle Mechanismen für die gesteigerte Termination oder Dissoziation von Terminationskomplexen durch UPF1	130
5.3	Mögliche physiologische Bedeutung der gesteigerten Dissoziation von Terminationskomplexen durch UPF1	131
5.4	UPF1 hat im rekonstituierten System keinen direkten Einfluss auf die Initiation oder Elongation der Translation	131
5.5	Ausblick	134
6	<i>Literaturverzeichnis</i>	137
7	<i>Anhang</i>	147
7.1	Weitere Experimente	147
7.1.1	Die Gegenwart von UPF1 moduliert die Stabilität von Terminationskomplexen aus RRL unabhängig vom Poly-(A)-Schwanz	147
7.2	Publikationen und Poster	149
7.3	Erklärung	149
7.4	Danksagung	151

Abkürzungsverzeichnis

A	adenosine	Adenosin
μ	micro	mikro
A	ampere	Ampere
aa	amino acid	Aminosäure
AMPPNP	5'-adenylyl-imidodiphosphate	5'-Adenylyl-Imidodiphosphate
AP	alcaline phosphatase	Alkaline Phosphatase
ATP	adenosin-triphosphate	Adenosin-Triphosphat
bp	basepairs	Basenpaar
BSA	bovine serum albumin	Rinderserumalbumin
bzw.		beziehungsweise
°C		Grad Celsius
C	cytosine	Zytosin
CBC	cap-binding complex	Cap-bindender Proteinkomplex
cDNA	complementary DNA	komplementäre DNA
cpm	counts per minute	radioaktive Zerfälle pro Minute
CTD	C-terminal domain	C-terminale Domäne
d. h.		das heißt
DNA	deoxyribonucleic acid	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	deoxy-nucleotide-triphosphate	Deoxy-Nukleotid-Triphosphat
DTT	dithiothreitol	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli	Escherichia coli
EDTA	ethylene-diamino-tetraacetate	Ethylendiaminotetraazetat
eEF	eukaryotic elongation factor	Eukaryontischer Elongationsfaktor
eIF	eukaryotic initiation factor	Eukaryontischer Initiationsfaktor
EJC	exon junction complex	Exon Junction Komplex
eRF	eukaryotic release factor	Eukaryontischer Terminationsfaktor
FCS	fetal calf serum	fötales Kälberserum
G	guanosine	Guanosin
g	gram	Gramm
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GFP	green fluorescent protein	grünfluoreszierendes Protein
ggf.		gegebenenfalls
GMPPNP	5'-guanylyl-imidodiphosphate	5'-Guanylyl-Imidodiphosphate
GTP	guanosine-triphosphate	Guanosin-Triphosphat
h	hour	Stunde
<i>H. sapiens</i>	homo sapiens	Homo sapiens
HBB	human beta globin	humanes beta-Globin
HeLa	cervix carcinoma cell line	Zervixkarzinom-Zelllinie
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyle)-Ethansulfonate	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HPLC	high pressure liquid chromatography	
HRP	horseradish peroxidase	Meerrettich-Peroxidase
IP	immunoprecipitation	Immunopräzipitation
kb	kilobases	Kilobasen
kDa	kilodalton	Kilodalton
LB	Luria-Bertani medium	Luria-Bertani Medium
m	milli	milli
min	minute	Minute
MOPS	3-(N-morpholino)-propansulfonate	3-(N-Morpholino)-Propansulfonat
mRNA	messenger ribonucleic acid	Boten-Ribonukleinsäure
mRNP	messenger ribonucleoprotein particle	Komplex aus mRNA und Proteinen
n	nano	nano
NMD	nonsense-mediated mRNA decay	Nonsense-vermittelter mRNA-Abbau
nt(s)	nucleotide(s)	Nukleotid(e)

NTD	N-terminal domain	N-terminale Domäne
NTP	nucleotide-triphosphate	Nukleotid-Triphosphat
ORF	open reading frame	offener Leserahmen
p	pico	pico
PAA	polyacrylamide	Polyacrylamid
PABP	Poly-(A) binding protein	Poly-(A)-bindendes Protein
PABPC	cytoplasmic Poly-(A) binding protein	zytoplasmatisches Poly-(A)-bindendes Protein
PCR	polymerase chain reaction	Polymerasenkettenreaktion
Pol II	polymerase II	Polymerase II
Pre-TC	pre-termination complex	Prä-Terminationskomplex
Post-TC	post-termination complex	Post-Terminationskomplex
PTC	premature translation termination co- don	vorzeitiges Terminationskodon
P-UPF1	phospho-UPF1	Phospho-UPF1
p-Wert	probability value	Signifikanzwert
qPCR	quantitative polymerase chain reaction	quantitative Polymerasekettenreaktion
RNA	ribonucleic acid	Ribonukleinsäure
mRNP	messenger ribonucleoprotein	Boten-Ribonukleoprotein
rpm	rounds per minute	Umdrehungen pro Minute
RRL	rabbit reticulocyte lysate	Kaninchenretikulozytenlysate
RRM	RNA recognition motif	RNA Erkennungsmotiv
RT	room temperature	Raumtemperatur
s.		siehe
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. frugiperda</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SD	standard deviation	Standardabweichung
s	seconds	Sekunde
SMG	suppressor with morphogenetic effect on genitalia protein	Suppressor with morphogenetic effect on genitalia protein
T	thymine	Thymin
TBS	Tris buffered saline	Tris buffered saline
TC	termination complex	Terminationskomplex
TEMED	tetramethyl-ethylendiamine	Tetramethylethylendiamin
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transfer RNA	Transfer-RNA
U	uridine	Uridin
UPF	up-frameshift protein	up-frameshift Protein
UPF1si		siRNA-resistente Version von UPF1
uP-UPF1	underphosphorylated UPF1	unter-phosphoryliertes UPF1
UTR	untranslated region	nicht-translatierte Region
v	volume	Volumen
V	volt	Volt
vgl.		vergleiche
w	weight	Masse
WT	wildtype	Wildtyp
z. B.		zum Beispiel
z.T.		zum Teil
ZF	zink finger	Zinkfinger

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Die Schritte der eukaryontischen Genexpression.....	24
Abbildung 2	Funktionsweise des Ribosoms.	26
Abbildung 3	Translationszyklus bei Eukaryonten.	27
Abbildung 4	UPF Proteine: Eigenschaften & Funktionen.....	35
Abbildung 5	Interaktionsnetz von UPF1.....	38
Abbildung 6	NMD Modell.....	41
Abbildung 7	Aufreinigung rekombinanter, His-getaggtter Translationsfaktoren.	78
Abbildung 8	Aufreinigung nativer Translationsfaktoren, Aminoacyl-tRNA-Synthetasen und ribosomaler Untereinheiten aus Kaninchenretikulozytenlysat.	79
Abbildung 9	Schematische Darstellung von Toeprinting.....	86
Abbildung 10	Anreicherung und Aufreinigung von phosphoryliertem P-UPF1 und nicht phosphoryliertem uP-UPF1.....	90
Abbildung 11	P-UPF1 und uP-UPF1 sind unter den Bedingungen des rekonstituierten Translationssystems biochemisch aktiv.	91
Abbildung 12	Schematische Darstellung des rekonstituierten Translationssystems.	94
Abbildung 13	Coomassie-Färbung der gereinigten Translationsfaktoren.....	95
Abbildung 14	Aufreinigung von funktionellem eRF3a voller Länge (fleRF3a).	96
Abbildung 15	Aufreinigung von Terminationskomplexen direkt aus Kaninchenretikulozytenlysat.	98
Abbildung 16	Initiation und Elongation sind unabhängig von UPF1.....	101
Abbildung 17	Die Translation einer Luziferase-mRNA in RRL wird durch UPF1 nicht beeinflusst.....	103
Abbildung 18	Schematische Darstellung der Termination.....	104
Abbildung 19	UPF1 hat keinen Einfluss auf die Kinetik der Termination, wenn eRFs im Überschuss über Pre-TCs vorliegen.....	106

Abbildung 20	Die Termination und die Stabilität von Post-TCs wird durch UPF1 nicht beeinflusst.	108
Abbildung 21	Bei Vorinkubation von UPF1 mit eRFs wird die Stabilität der Post-TCs durch UPF1 nicht beeinflusst.	109
Abbildung 22	Die Stabilität von Post-TCs wird in Gegenwart von HeLa-Extrakt durch UPF1 nicht beeinflusst.....	111
Abbildung 23	Die Gegenwart von UPF1 stimuliert die Termination oder die Dissoziation von Terminationskomplexen bei reduzierter Menge an eRFs.	114
Abbildung 24	Die Stimulation der Termination oder der Dissoziation von Terminationskomplexen ist UPF1-spezifisch und eRF3-abhängig.....	116
Abbildung 25	Effekt der UPF1 Mutanten auf die Termination.....	119
Abbildung 26	Recycling-Modell.....	121
Abbildung 27	Durch die Initiationsfaktoren eIFs 1, 1A, 3, 3j vermitteltes Recycling ist in Gegenwart von UPF1 effizient.	123
Abbildung 28	Durch ABCE1 vermitteltes Recycling wird durch UPF1 nicht beeinflusst. ..	125
Abbildung 29	Die Gegenwart von UPF1 moduliert die Stabilität von Terminationskomplexen aus RRL unabhängig vom Poly-(A)-Schwanz.	148

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Eigenschaften, Funktion und Lokalisation von NMD-Faktoren bei <i>H. sapiens</i>	33
Tabelle 2	Chemikalien.....	47
Tabelle 3	Molekularbiologische und biochemische Reagenzien.....	48
Tabelle 4	Puffer, Lösungen und Media	50
Tabelle 5	Nährlösungen und Media für die Zellkultur.....	52
Tabelle 6	Instrumente.....	52
Tabelle 7	Säulen und Säulenmaterialien	53
Tabelle 8	Kits.....	54
Tabelle 9	Plasmide.....	54
Tabelle 10	Antikörper	56
Tabelle 11	Enzyme.....	57
Tabelle 12	DNA-Oligonukleotide	57
Tabelle 13	RNA-Oligonukleotide und siRNAs	58
Tabelle 14	Zelllinien und Bakterienstämme	58
Tabelle 15	Antibiotikakonzentrationen	59
Tabelle 16	Sonstiger Laborbedarf.....	60
Tabelle 17	Bioinformatik-Tools	61
Tabelle 18	Richtlinien beim Primerdesign.....	62
Tabelle 19	PCR-Programme.....	63
Tabelle 20	Proteinexpression und Aufreinigung	74
Tabelle 21	<i>In vitro</i> Transkription: Restriktionsenzyme, Polymerasen	81

1 Einleitung

1.1 Die Schritte der eukaryontischen Genexpression

Die eukaryontische Genexpression dient der Synthese von RNA und Proteinen mithilfe der im Zellkern gespeicherten genetischen Information. Die in der Nukleotidsequenz der DNA gespeicherte Erbinformation wird während der Transkription auf die Boten-RNA (mRNA) übertragen. Nach ihrer Prozessierung und dem Transport ins Zytoplasma dient die mRNA dann als Anleitung zur Synthese von Proteinen im Zuge der Translation (Maniatis & Reed, 2002; Moore & Proudfoot, 2009). Die Genexpression ist ein auf vielen Ebenen regulierter und kontrollierter Prozess, einschließlich der Transkription, der RNA-Prozessierung, des mRNA-Exports und der mRNA-Lokalisation (Fasken & Corbett, 2005), der Translation (Gebauer & Hentze, 2004), Proteinfaltung, Proteinlokalisierung (Besse & Ephrussi, 2008) und letztendlich des Abbaus der Genprodukte (Garneau et al., 2007). So ermöglicht die zellspezifische Regulation der Genexpression erst das Entstehen eines vielzelligen Organismus mit seinen verschiedenen Zellarten und Gewebetypen.

1.2 Der Lebenszyklus einer mRNA

Schon während der Transkription eines Gens durch RNA Polymerase II (Brueckner et al., 2009) wird die hierbei gebildete Prä-mRNA post-transkriptionell prozessiert (Proudfoot et al., 2002) (Abbildung 1). Beim „Capping“ wird an das 5'-Triphosphatende der Prä-mRNA eine Guanosin-Gruppe angehängt und diese anschließend methyliert. So entsteht die m⁷GpppN „Cap“-Struktur am 5'-Ende der Prä-mRNA, die die mRNA später vor Abbau durch Nukleasen und Phosphatasen schützt und ihre Translation stimuliert. Auch die darauf folgende Polyadenylierung des 3'-Endes stabilisiert die mRNA, fördert die Translation und außerdem den Export aus dem Zellkern ins Zytoplasma. Dabei wird das Transkript an seinem 3' Ende zuerst gespalten und danach eine ca. 200 Nukleotide lange Adenosin-Kette am 3' Ende angefügt (Shatkin & Manley, 2000). Durch alternative Polyadenylierung können Transkripte mit unterschiedlich langen 3'-Enden entstehen. Auf diese Weise werden über die Hälfte aller humanen Transkripte reguliert. Die meisten eukaryontischen Gene bestehen aus Exons und Introns. In einem weiteren Prozessierungsschritt, dem Spleißen, werden die Introns entfernt und die beiden angrenzenden Exons fusioniert. Hierbei bleibt ein Proteinkomplex, der „Exon Junction Complex“ (EJC), auf der mRNA zurück, ungefähr 22 Nukleotide (nt) stromaufwärts des Fusi-

onspunktes der beiden Exons (Le Hir et al., 2000a; Le Hir et al., 2000b; Le Hir et al., 2001). Das Spleißen wird durch das Spleißosom katalysiert und ist ein sehr genau regulierter Prozess. Durch alternatives Spleißen (Smith et al., 1989; Luco et al., 2011) der Prä-mRNA können von einem Gen ausgehend durch die Verknüpfung unterschiedlicher Exons verschiedene mRNAs gebildet werden, wodurch die Protein-Diversität erheblich erhöht wird.

Vollständig prozessierte mRNAs werden ins Zytoplasma exportiert (Conti & Izaurralde, 2001; Kohler & Hurt, 2007) und dort in Proteine translatiert (Abschnitt 1.3). Sie sind noch mit vielen Proteinen aus dem Zellkern assoziiert, die während der Prozessierung an sie binden und die Funktion sowie das weitere Schicksal der mRNAs entscheidend beeinflussen. Ein gutes Beispiel hierfür ist der schon erwähnte EJC, der sowohl den Transport, die Translation, als auch die regulierte Degradation mancher mRNAs fördert (Le Hir et al., 2003). Das Ensemble aus mRNA und den verschiedenen gebundenen Proteinen oder auch weiteren RNAs wird als „Messenger Ribonucleoprotein Particle“ (mRNP) bezeichnet. Die Komposition des mRNPs steht im dynamischen Gleichgewicht von Assoziation und Dissoziation seiner gebundenen Faktoren. Schon im Laufe der Prozessierung und des Exports der mRNA, aber auch noch während der Translation (Maquat, 2004), findet ein Umbau des mRNPs statt: So wird z. B. der nukleäre „Cap“-bindende Komplex („Cap-Binding Complex“, CBC), ein Heterodimer aus den beiden „Cap“-Binde-Proteinen CBP20 und CBP80, nach dem Export ins Zytoplasma durch das zytoplasmatische „Cap“-Binde-Protein eIF4E ersetzt und EJCs innerhalb des offenen Leserahmens („Open Reading Frame“, ORF) werden, vermutlich in der ersten Translationsrunde, durch die elongierenden Ribosomen und den damit assoziierten Faktor PYM dissoziiert (Gehring et al., 2009b).

Die erste Runde der Translation bietet die Chance, neu synthetisierte mRNAs erst einmal auf ihre Qualität zu prüfen, bevor sie weiter translatiert werden (Maquat et al., 2010). Wenn sich EJCs innerhalb des ORF befinden, werden sie während der Translation durch die Ribosomen und den Faktor PYM von der mRNA abgestreift (Gehring et al., 2009b). Wenn ein ORF aufgrund einer Nonsense-Mutation (bei einer Nonsense-Mutation entsteht aus einem Aminosäure-Kodon ein STOP-Kodon) verkürzt ist, kann sich ein EJC in der 3' nicht-translatierten Region befinden, wo er als Marker für die vorzeitige Termination die rasche Degradation der mRNA auslöst. Der zugrundeliegende Prozess zur Erkennung vorzeitiger Stopkodons wird als Nonsense-vermittelter mRNA-Abbau („Nonsense-Mediated mRNA Decay“, NMD) bezeichnet. Der

physiologische Nutzen von NMD liegt darin, die Zelle durch den Abbau von Nonsens-mRNAs vor C-terminal verkürzten Proteinen mit potenziell dominant negativer Wirkung zu schützen. Der Mechanismus wird außerdem dazu verwendet, die Abundanz natürlicher (d. h. nicht mutierter) Transkripte zu regulieren (Mitrovich & Anderson, 2000; Sureau et al., 2001). Dieser und weitere translationsabhängige mRNA-Qualitätskontrollmechanismen sind unter Abschnitt 1.4 näher beschrieben.

Die Degradation einer (aberranten) RNA kann schon während ihrer Prozessierung im Nukleus oder ihrer anschließenden Translation im Zytoplasma im Zuge der Qualitätskontrolle durch RNA-Überwachungssysteme eingeleitet werden (Doma & Parker, 2006; Reznik & Lykke-Andersen, 2010). Letztendlich wird aber jede mRNA nach einer gewissen Zeitspanne, die für jede mRNA unterschiedlich sein und der Regulation durch RNA-bindende Proteine unterliegen kann, durch Degradationsenzyme abgebaut. Exonukleasen bauen die mRNA entweder vom 5'- oder 3'-Ende ab, Endonukleasen schneiden innerhalb des Transkripts. Der vorherrschende Abbauweg kann je nach mRNA oder Organismus unterschiedlich sein (Beelman & Parker, 1995; Garneau et al., 2007).

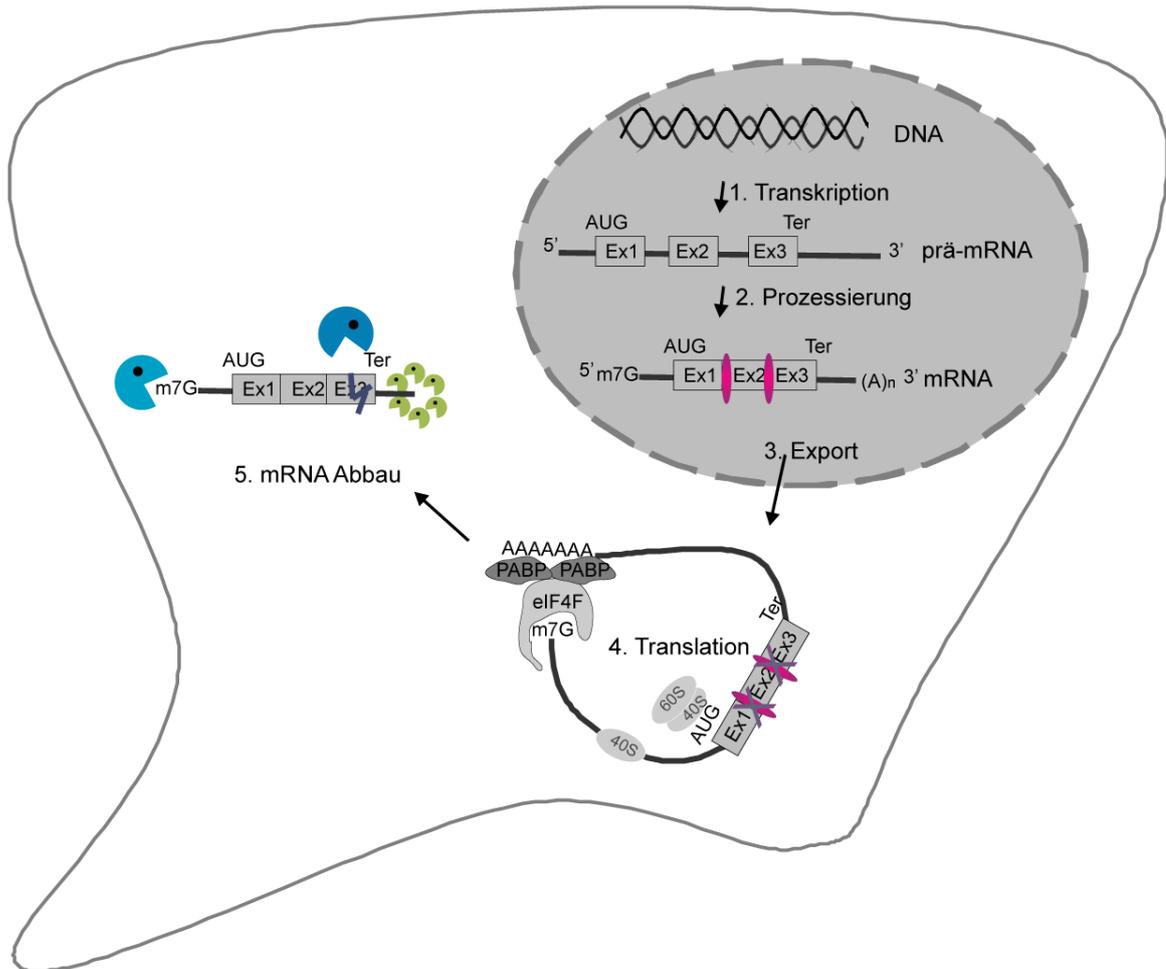


Abbildung 1 Die Schritte der eukaryotischen Genexpression.

Dargestellt ist der Lebenszyklus einer eukaryotischen mRNA von der (1) Transkription, über die (2) Prozessierung, den (3) Export aus dem Zellkern, die (4) Translation bis zum (5) Abbau. (1) Bei der Transkription entsteht eine Prä-mRNA, die weiter modifiziert wird. (2) Die Prozessierung beinhaltet das „Capping“, das Spleißen und die Polyadenylierung der mRNA. Während des Spleißvorgangs bindet der Exon Junction Komplex (pink). (3) Die reife mRNA kann nun aus dem Zellkern exportiert werden. (4) Durch die Translation im Zytoplasma wird der EJC wieder entfernt. (5) Die mRNA wird am Ende ihrer „Lebenszeit“ durch Endo- oder Exonukleasen abgebaut. Alle hier dargestellten Schritte der Genexpression unterliegen der Regulation durch endogene oder exogene Faktoren. Durch Qualitätskontrollmechanismen wird nach jedem Schritt die Integrität der mRNA validiert. Abkürzungen: eIF4F = Initiationsfaktor 4F, bestehend aus eIF4A, 4G, 4E; PABP = Poly-(A)-bindendes Protein; m⁷G = mRNA-„Cap“-Struktur; (A)_n = Poly-(A)-Schwanz; Ex = Exon; AUG = Startkodon; Ter = Terminationskodon.

1.3 Translation in Eukaryonten

Die Übersetzung der in der mRNA in Form der Nukleotidsequenz gespeicherten genetischen Information in eine Aminosäuresequenz bezeichnet man als Translation. Die Translation dient der Biosynthese von Proteinen und ist ein komplexer Vorgang, der von Ribosomen und Translationsfaktoren koordiniert wird (Abbildung 3).

Das Ribosom ist einer der größten zellulären Protein-RNA-Komplexe und besteht aus einer großen und einer kleinen Untereinheit, die nach ihrem Sedimentationskoeffizienten in Eukaryonten als 60S- und 40S-Untereinheit bezeichnet werden (Abbildung 2, Ben-Shem et al., 2010). Die große Untereinheit besitzt eine Peptidyltransferaseaktivität und verknüpft während der Proteinbiosynthese einzelne Aminosäuren, die Bausteine von Proteinen, zur Peptidkette. Die kleine Untereinheit ist für die Bindung der mRNA verantwortlich. Beide Untereinheiten bilden zusammen die Exit-(E-), Peptidyl-(P-), und Akzeptor-(A-) Bindestellen für die Transfer-RNAs (tRNAs) (Steitz, 2008). tRNAs sind Adaptermoleküle, die über ihren Antikodon-Arm ein bestimmtes komplementäres mRNA-Kodon erkennen können und über einen anderen Arm mit einer Aminosäure verknüpft sind. Die Beladung der tRNA mit einer spezifischen Aminosäure erfolgt über Aminoacyl-tRNA-Synthetasen. Über eine Kodon-Antikodon Basenpaarung mit der mRNA sorgen tRNAs für den Einbau der korrekten Aminosäure in die neu zu synthetisierenden Proteine.

Die Translation kann in vier Teile gegliedert werden (zusammengefasst in (Rodnina & Wintermeyer, 2009)): Die Initiation, die Elongation, die Termination und das Recycling. Jeder dieser Schritte benötigt zusätzlich zum Ribosom ein bestimmtes Set an Translationsfaktoren, die sog. eukaryontischen Initiations- („eukaryotic Initiation Factors“, eIFs), Elongations- („eukaryotic Elongation Factors“, eEFs) und Terminationsfaktoren („eukaryotic Release Factors“, eRFs).

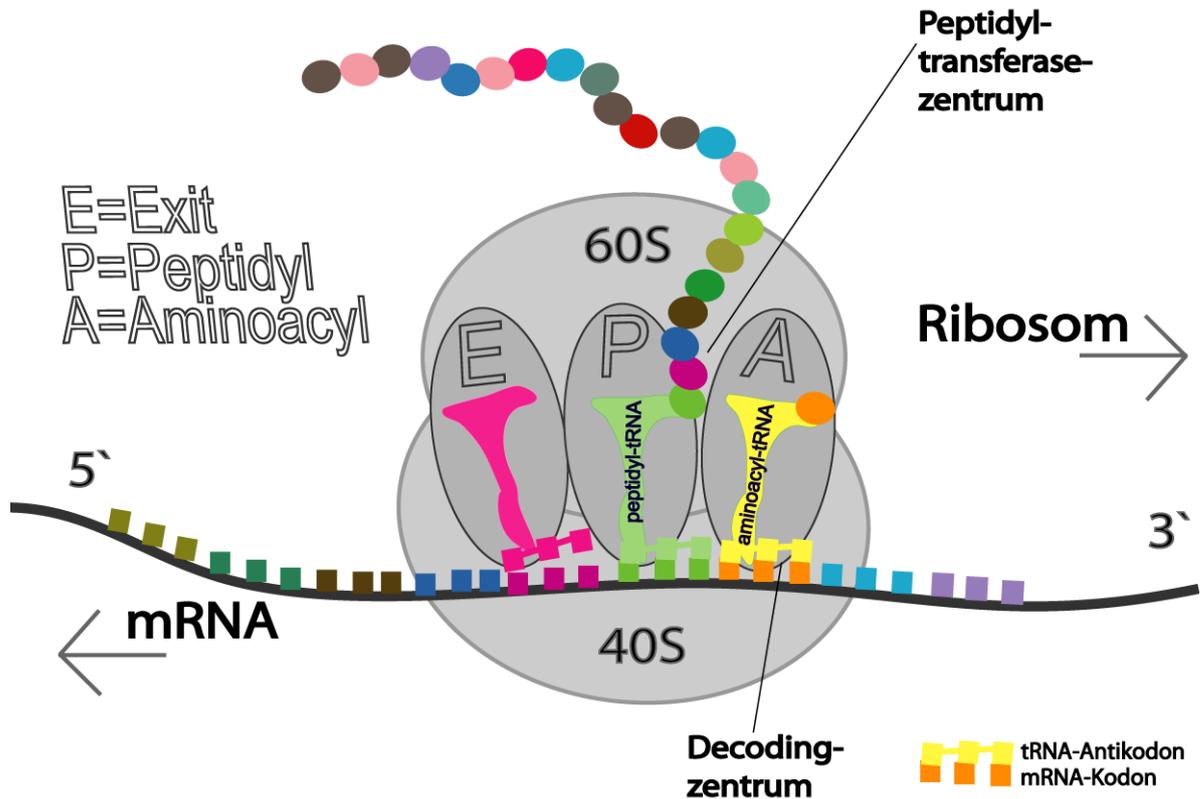


Abbildung 2 Funktionsweise des Ribosoms.

Während der Proteinbiosynthese „liest“ das Ribosom in 5`-3`-Richtung die Basensequenz der mRNA. Ein Basentriplett, also je drei Basen, kodieren eine Aminosäure. Das Basentriplett bezeichnet man als Kodon. tRNAs dienen als Vermittler, um die in den Basentriplets kodierte Information in eine Aminosäuresequenz zu übersetzen. Dabei erkennt ein bestimmter Bereich der tRNA, das Antikodon, durch Basenpaarung mit der mRNA spezifisch das jeweilige mRNA-Kodon. Dieser Prozess findet im dekodierenden Zentrum („Decoding-Zentrum“) des Ribosoms statt. Im nächsten Schritt katalysiert das Peptidyltransferasezentrum der 60S-Untereinheit die Trennung des Carboxy-Endes der Polypeptidkette von der in der P-Stelle liegenden Peptidyl-tRNA und die Ausbildung einer neuen Peptidbindung an die Aminosäure der in der A-Stelle gebundenen Aminoacyl-tRNA. Im nächsten Schritt, der Translokation, bewegt sich das Ribosom weiter zum nächsten Kodon. 60S = große ribosomale Untereinheit, 40S = kleine ribosomale Untereinheit.

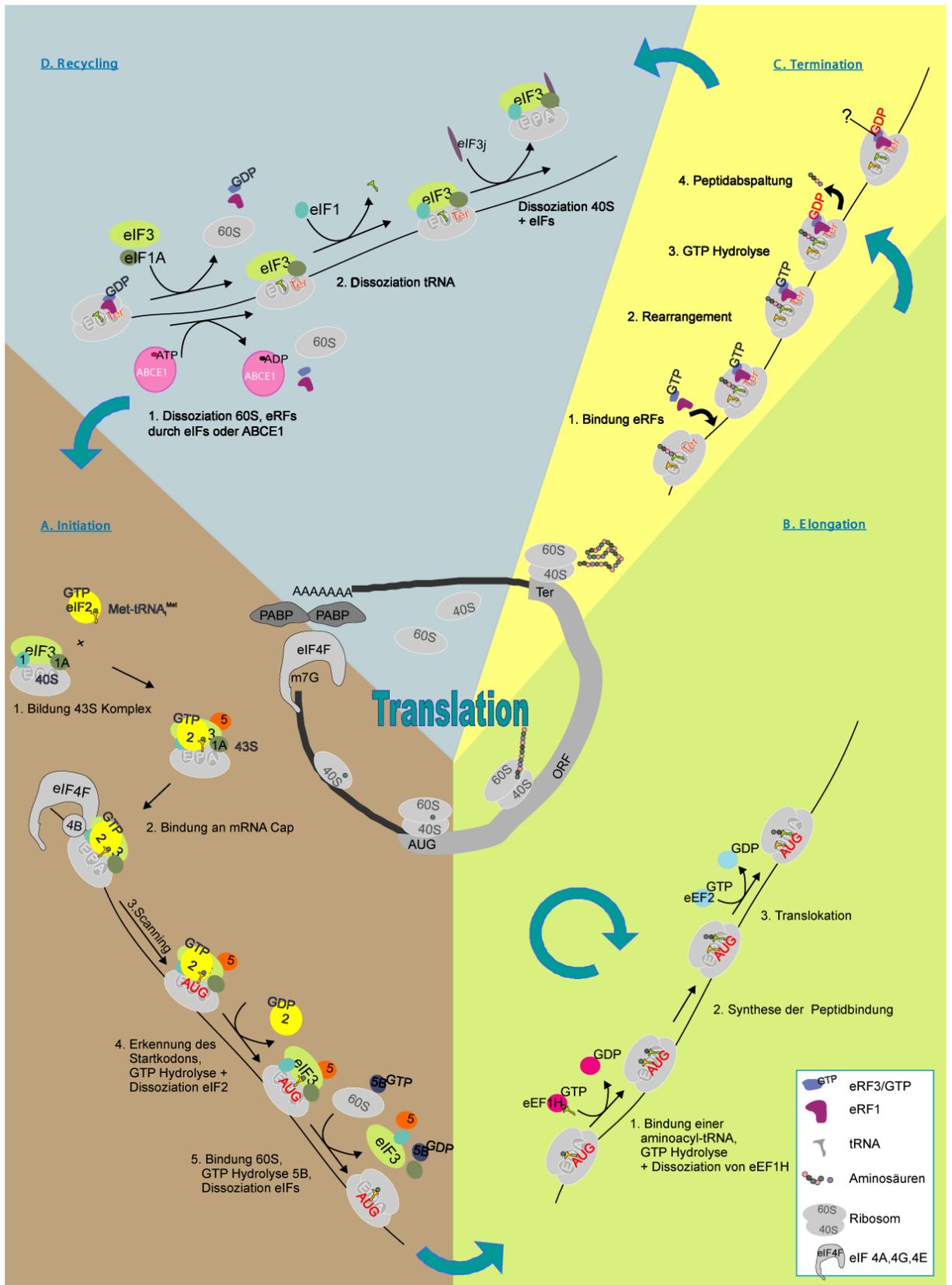


Abbildung 3 Translationszyklus bei Eukaryonten.

Dargestellt sind die 4 Schritte der Proteinbiosynthese, (A) Initiation, (B) Elongation, (C) Termination und (D) Recycling. (A) **Initiation**. 43S-Prä-Initiationskomplexe aus eIFs 1, 1A, 3, dem ternären Komplex eIF2 / GTP / Met-tRNA_i^{Met} und der 40S-Untereinheit des Ribosoms erkennen die mRNA durch Bindung von eIF3 an eIF4G.

eIF4G ist eine Untereinheit von eIF4F, eines zytoplasmatischen Proteinkomplexes, der –analog zum nukleären CBC- an die 5'-Kappe der mRNA gebunden ist. Daraufhin scannt dieser Prä-Initiationskomplex die mRNA, bis ein AUG-Kodon gefunden wird. Dort wird ein 48S-Initiationskomplex gebildet, der im nächsten Schritt mit einer 60S-Untereinheit assoziiert, die Initiationsfaktoren dissoziiert. **(B) Elongation.** Elongationsfaktor 1A bringt eine neue aminoacylierte tRNA (Aminoacyl-tRNA) zur A-Stelle, woraufhin die neugebildete Peptidkette, assoziiert mit einer Peptidyl-tRNA in der P-Stelle, durch das Ribosom auf die Aminosäure dieser tRNA übertragen wird. Daraufhin wird durch eEF2 die Peptidyl-tRNA von der A in die P-Stelle und die deacylierte tRNA von der P in die E-Stelle verschoben. **(C) Termination.** Terminationsfaktoren (eRFs) bewirken die Hydrolyse der Esterbindung und Freisetzung des neugebildeten Polypeptids. eRF1 (und evtl. auch eRF3, daher das Fragezeichen) bleibt nach der Termination noch mit den sog. Post-Terminationskomplexen assoziiert. **(D) Recycling.** Die ribosomalen Untereinheiten, tRNAs und die mRNA werden voneinander getrennt, um für die nächste Translationsrunde zur Verfügung zu stehen, eRF1 dissoziiert. Abkürzungen: tRNA = Transfer-RNA, ORF = offener Leserahmen, AUG = Startkodon, Ter = Terminationskodon, PABP = Poly-(A)-bindendes Protein, 1 = eIF1, 1A = eIF1A, 2 = eIF2, 3 = eIF3, 4B = eIF4B, 5 = eIF5, 5B = eIF5B, ABCE1 = „ATP-Binding Cassette, Sub-Family E Member 1“.

1.3.1 Initiation

Die Initiation (Abbildung 3A) ist der wahrscheinlich am genauesten regulierte Schritt der Proteintranslation, in dessen Verlauf das Initiationskodon erkannt und ein elongationskompetentes 80S-Ribosom assembliert wird (Jackson, 2005; Sonenberg & Hinnebusch, 2009; Jackson et al., 2010). Sie beginnt mit der Bildung eines 43S-Prä-Initiationskomplexes aus einer 40S-Untereinheit, dem ternären Komplex eIF2 / GTP / Met-tRNA_i^{Met}, eIF3, eIF1 und eIF1A. Die 43S-Prä-Initiationskomplexe binden nahe des 5'-Endes an die mRNA und suchen die 5' nicht-translatierte Region mithilfe der Faktoren eIF4A (eine DEAD-Box RNA-Helikase), 4B (erhöht die Helikase-Aktivität von eIF4A), und 4F nach einem Initiationskodon (AUG) ab. eIF4F ist ein zytoplasmatischer Proteinkomplex, der –analog zum nukleären CBC- an die 5'-Kappe der mRNA gebunden ist und aus eIF4E (das zytoplasmatische „Cap“-Bindepotein), eIF4A und eIF4G besteht. eIF4G dient als molekulares Gerüst für eIF4E, eIF3 und eIF4A und fördert durch die Interaktion mit PABPC1, welches in mehreren Kopien an den Poly-(A)-Schwanz gebunden ist, die Zirkularisierung der mRNA, wodurch deren Translation gefördert und die Degradation inhibiert wird.

Wird ein Initiationskodon erreicht, geht dieses in der ribosomalen P-Bindestelle eine Basenpaarung mit dem Antikodon-Arm der Initiator-Met-tRNA_i^{Met} ein, es entstehen 48S-Initiationskomplexe mit etablierter Kodon-Antikodon Basenpaarung. eIF5 und eIF5B bewirken die Dissoziation der meisten eIFs und die Bindung der 60S-Untereinheit. Der hiermit

assemblierte 80S-Initiationskomplex mit der Initiator-Met-tRNA_i^{Met} in der P-Bindestelle ist nun in der Lage, die Bildung der ersten Peptidbindung zu katalysieren.

1.3.2 Elongation

Die Elongation (Abbildung 3B) dient der Verlängerung der Polypeptidkette und wird von den Elongationsfaktoren eEF1H und eEF2 in einem GTP-abhängigen Prozess katalysiert. Im ersten Schritt bindet eine mit eEF1H und GTP assoziierte Aminoacyl-tRNA durch Kodon- / Antikodonbasenpaarung an die mRNA in der noch leeren A-Bindestelle des Ribosoms. Durch GTP-Hydrolyse wird eEF1H entlassen. Im nächsten Schritt katalysiert das Peptidyltransferasezentrum (Abbildung 2) der 60S-Untereinheit die Trennung des Carboxy-Endes der Polypeptidkette von der in der P-Stelle liegenden tRNA und die Ausbildung einer neuen Peptidbindung an die Aminosäure der in der A-Stelle gebundenen Aminoacyl-tRNA. Im letzten Schritt, der Translokation, bewegt sich das Ribosom weiter zum nächsten Kodon. Hierbei wird die Peptidyl-tRNA, in einem durch eEF2 und GTP katalysierten Prozess, von der A- in die P-Stelle und die deacylierte tRNA von der P- in die E-Stelle verschoben. Die A-Stelle des Ribosoms wird also frei für einen neuen Elongationszyklus (Pestova & Hellen, 2003, 2005; Rodnina & Wintermeyer, 2009).

1.3.3 Termination

Während der Elongation binden Aminoacyl-tRNAs in der A-Bindestelle des Ribosoms an die mRNA. Am Ende des ORF befindet sich jedoch ein spezielles Kodon, das Terminationskodon (UGA, UAA, UAG), das im Allgemeinen nicht durch eine komplementäre tRNA erkannt wird, sondern durch den Terminationsfaktor eRF1. So kommt es zur Termination der Translation (Abbildung 3C). Ribosomale Komplexe mit einem Terminationskodon in der A-Bindestelle, die noch keine Terminationsfaktoren gebunden haben, werden daher Prä-Terminationskomplexe (kurz „Pre-TC“, von „Pre-Termination Complex“) genannt. Anstelle einer neuen Aminoacyl-tRNA bindet eRF1, dessen dreidimensionale Struktur Ähnlichkeit mit der Faltung einer tRNA aufweist und der alle drei Stopkodons erkennt, in einem ternären Komplex aus eRF1, der GTPase eRF3 und GTP, in die A-Stelle dieses Prä-Terminationskomplexes. Die Bindung von eRF1 / eRF3-GTP bewirkt eine Konformationsänderung des Ribosoms, die die GTP-Hydrolyse durch eRF3 induziert. Durch die Hydrolyse von GTP wird das GGQ-Motiv von eRF1 so im Peptidyltransferasezentrum des Ribosoms positioniert, dass die Hydrolyse der Esterbindung

der Peptidyl-tRNA und damit die Freisetzung des Proteins katalysiert werden kann (Alkalaeva et al., 2006). Nach der Termination dissoziieren die jetzt als Post-Terminationskomplexe („Post-TCs“) bezeichneten 80S-Komplexe teilweise von der mRNA.

1.3.4 Recycling

Für die Initiation der Translation werden separate 40S- und 60S-Untereinheiten benötigt. Diese stammen aus dem Recycling von Post-TCs (Abbildung 3D), die aus einem 80S-Ribosom bestehen, welches noch mit der mRNA, der deacylierten tRNA und eRF1 (und eventuell auch eRF3) assoziiert ist.

Die Dissoziation der 60S-Untereinheit kann *in vitro* durch die eIFs 1, 1A, und eIF3 mit seiner schwach gebundenen eIF3j-Untereinheit erfolgen. Dann bewirkt eIF1 die Freisetzung der tRNA, gefolgt von eIF3j, welcher die mRNA von der verbleibenden 40S-Untereinheit löst. eIF3, eIF1 und eIF1A bleiben an die recycelten 40S-Untereinheiten gebunden und verhindern deren Reassoziierung mit 60S-Untereinheiten (Pisarev et al., 2007a). Alternativ kann die Reassoziierung der 60S-Untereinheit durch eIF6 verhindert werden.

Neben dem oben beschriebenen, energiefreien Mechanismus zur Dissoziation von Post-TCs, kann die NTPase ABCE1 das Recycling der Post-TCs (Pisarev et al., 2010) vermitteln. ABCE1 bindet an die noch mit eRF1 assoziierten Post-TCs und fördert nach Hydrolyse von ATP deren Dissoziation in freie 60S-Untereinheiten sowie noch an die tRNA und mRNA gebundene 40S-Untereinheiten. Durch die eIFs 1 / 1A / 3 / 3j können die tRNA und mRNA nun von der 40S-Untereinheit freigesetzt werden. Durch Bindung von eIF2 / GTP / Met-tRNA_i^{Met} an die recycelten 40S-Untereinheiten können neue 43S-Komplexe für die Initiation entstehen.

1.4 Eukaryontische translationsabhängige RNA-Qualitätskontrollmechanismen

Wie in Abschnitt 1.1 bereits erwähnt, werden eukaryontische mRNAs während der Translation auf ihre Qualität geprüft und abgebaut, falls sie Fehler aufweisen.

1.4.1 Non-Stop Decay (NSD)

Durch „Non-Stop-Decay“ (NSD) werden mRNAs mit fehlenden Terminationskodons abgebaut, die sonst zur Bildung von potenziell toxischen Proteinen mit verlängertem C-Terminus führen würden. In *S. cerevisiae* translatieren Ribosomen mRNAs -wenn sie kein Terminationskodon finden- bis zum 3'-Ende und arretieren dort, bis Ski-7, ein Teil des zytoplasmatischen Exo-

soms, den Abbau des aberranten Transkripts einleitet und die Ribosomen freisetzt (zusammengefasst in (Isken & Maquat, 2007)).

Beim „Ribosome-Extension-Mediated Decay“ (REMD) wird das normale Terminationskodon nicht erkannt und die Translation terminiert in der 3'UTR (Kong & Liebhaber, 2007), der unterliegende Mechanismus ist jedoch unabhängig von UPF1.

1.4.2 No-Go-Decay (NGD)

Wenn Ribosomen während der Translation einer mRNA durch Hindernisse -wie z. B. starke Sekundärstrukturen- an der Elongation gehindert werden, werden diese Komplexe aufgelöst und die mRNA degradiert. In *S. cerevisiae* binden Dom34 und Hbs1 an arretierte Ribosomen und führen die Auflösung der Komplexe sowie den Abbau der aberranten mRNA herbei (Doma & Parker, 2006; Shoemaker et al., 2010).

1.4.3 Nonsense-Mediated mRNA Decay (NMD)

„Nonsense-Mediated mRNA Decay“ (NMD) ist ein Schlüsselmechanismus zur Kontrolle der Expression normaler und aberranter mRNAs in Eukaryonten. Durch NMD werden Transkripte mit vorzeitigen Terminationskodons („Premature Termination Codons“, PTCs) erkannt und abgebaut. PTCs können durch Mutationen, Fehler bei der Transkription oder beim Spleißen entstehen. Auch etwa 3-10 % natürlicher (also nicht mutierter) Transkripte werden durch NMD abgebaut. Hier wird also ein natürliches Terminationskodon als vorzeitig interpretiert (Lelivelt & Culbertson, 1999; Mendell et al., 2004; Mitrovich & Anderson, 2005; Rehwinkel et al., 2006). NMD verhindert also nicht nur die Anhäufung verkürzter Proteine, sondern reguliert auch die Abundanz vieler physiologischer Transkripte (Maquat, 2004; Neu-Yilik & Kulozik, 2008; Rebbapragada & Lykke-Andersen, 2009; Nicholson et al., 2010).

Die medizinische Relevanz von NMD wird an den phänotypischen Unterschieden von Nonsense-Mutationen desselben Gens deutlich, die einmal NMD auslösen und einmal nicht (Holbrook et al., 2004; Bhuvanagiri et al., 2010): Die β -Thalassämie ist eine Blutkrankheit, bei der die Menge an funktionellem Hämoglobin A im Blut reduziert ist. Hämoglobin A ist ein Hetero-Tetramer aus je zwei α - und zwei β -Globin-Untereinheiten, die nicht-kovalent aneinander gebunden sind. Bei heterozygoten Trägern einer Nonsense-Mutation im β -Globin gibt es verschiedene Ausprägungen der Krankheit: Bei NMD-sensitiven Mutationen wird die mRNA des

mutierten Allels abgebaut, das gesunde Allel kann dies kompensieren und schützt so den heterozygoten Träger. Bei NMD-insensitiven Mutationen wirken die gebildeten verkürzten β -Globinketten jedoch dominant negativ. Sie bilden Präzipitate in den Vorläuferzellen der roten Blutkörperchen, was zu einer symptomatischen Ausprägung der Krankheit führt. NMD kann also der Bildung von möglicherweise schädlichen, dominant negativ wirkenden, C-terminal verkürzten Proteinen entgegenwirken. Andererseits kann auch die Expression teils aktiver, verkürzter Proteine durch NMD verhindert werden, die noch einen positiven Nutzen für die Zelle hätten (z. B. bei zystischer Fibrose). Ein genaues Verständnis des zugrundeliegenden Mechanismus ist daher sowohl für die Molekularbiologie als auch die Medizin von Nutzen.

1.5 NMD-Faktoren

1.5.1 Übersicht der NMD-Faktoren

Die ersten NMD-Faktoren wurden durch genetische Screens in *S. cerevisiae* (UPF Proteine, von „UP-Frameshift suppressor“, (Culbertson et al., 1980)) und *C. elegans* (SMG Proteine, von „Suppressor with Morphological effect on Genitalia“) gefunden. Durch Sequenzhomologie, Interaktions-, Überexpressions- und Depletionsstudien wurden mittlerweile die in Tabelle 1 aufgelisteten NMD-Faktoren beim Menschen identifiziert und näher charakterisiert (besprochen in (Muhlemann et al., 2008; Bhuvanagiri et al., 2010; Nicholson et al., 2010)). Dies sind UPF1, UPF2, UPF3a + b, SMG1, SMG5, SMG6, SMG7, SMG8, SMG9, NAG und DHX34. Ferner spielt der EJC, bestehend aus MAGOH, BTZ (Barentz), Y14 und eIF4A3 eine Rolle beim NMD (Le Hir et al., 2000a; Le Hir et al., 2001; Gehring et al., 2003; Gehring et al., 2005). Homologe von UPF1, UPF2 und UPF3b wurden in allen vier näher untersuchten Modellorganismen (*D. melanogaster*, *H. sapiens*, *S. cerevisiae*, *C. elegans*) gefunden, dies sind somit die am besten konservierten NMD-Faktoren. Wenn sie 3' vom normalen Terminationskodon an eine mRNA „getethert“ (d. h. artifiziell gebunden) werden, können diese Faktoren NMD auslösen, und durch ihre Depletion werden Transkripte mit PTCs stabilisiert (Lykke-Andersen et al., 2000; Gehring et al., 2003; Kunz et al., 2006).

Tabelle 1 **Eigenschaften, Funktion und Lokalisation von NMD-Faktoren bei *H. sapiens***

NMD-Faktor	zelluläre Lokalisation	Charakteristika	Funktionen im NMD	Weitere Funktionen	Interaktion
UPF1	hauptsächl. zytoplasmatisch	RNA-/ DNA-Helikase, Nukleinsäure-abhängige ATPase, RNA-Bindeprotein, Phosphoprotein	vermittelt die Erkennung von PTCs, mRNA-Degradation, Recycling von NMD-Faktoren	fördert Translation, Abbau von Histon mRNAs, Stufen-vermittelter mRNA-Abbau, DNA-Replikation, Telomerintegrität	SMG1, UPF2, eRF1, eRF3, eIF3, CBP80, SMG5, SMG6, SMG7, PP2A
UPF2	Perinukleär	RNA-Bindeprotein, Phosphoprotein	EJC Adapterprotein: Interaktion mit UPF1 und UPF3, fördert Phosphorylierung von UPF1	fördert die Translation, Telomerintegrität	UPF1, UPF3b, CBP80, INT6/ eIF3e, SUI1/eIF1 eIF4A1
UPF3a + b	hauptsächl. nukleär	RNA-Bindeprotein	EJC-Protein, Interaktion mit UPF2, fördert Phosphorylierung von UPF1	fördert die Translation, Telomerintegrität	UPF2, Y14, BTZ, Magoh, eIF4A3
SMG1	zytoplasmatisch und nukleär	Ser-/ Thr-Kinase der PIKK-Familie, ATPase, Phosphoprotein	Phosphoryliert UPF1	Genomstabilität, Stressantwort, DNA-Reparatur	SMG8, SMG9, UPF1, UPF2
SMG5	hauptsächl. zytoplasmatisch	PIN-Domäne	Interagiert mit PP2A, fördert Dephosphorylierung von UPF1		UPF1, SMG7, PP2A
SMG6	hauptsächl. zytoplasmatisch	PIN-Domäne, Endonuklease	Endonukleaseaktivität, fördert Dephosphorylierung von UPF1		UPF1
SMG7	hauptsächl. zytoplasmatisch	TPR Repeats	fördert Dephosphorylierung von UPF1		UPF1, SMG5
SMG8	unbekannt	Phosphoprotein	Inhibiert Kinase-Aktivität von SMG1		SMG1
SMG9	unbekannt	Phosphoprotein	Komplex mit SMG1		SMG1
NAG	unbekannt	β -Propeller Domäne	essenziell für NMD		
DHX34	unbekannt	RNA-Helikase, ATPase	essenziell für NMD		

Die in dieser Tabelle zusammengefassten Daten zur Funktion, Lokalisation und den Interaktionspartnern von NMD-Faktoren wurden Review-Artikeln entnommen (Bhuvanagiri et al., 2010; Nicholson et al., 2010), dort finden sich auch die Original-Referenzen der jeweiligen Studien.

1.5.2 Eigenschaften und Funktionen von UPF1

UPF1, ein ca. 124 kDa großes, hauptsächlich zytoplasmatisches Protein, ist der am stärksten konservierte NMD Faktor, und spielt auch funktionell eine wichtige Rolle beim NMD. Es ist ein Schlüsselprotein, das mit wechselnden Interaktionspartnern an vielen NMD-Schritten beteiligt ist, vom Erkennen eines NMD-Substrats, über seine Markierung, bis hin zu dessen Abbau. Die unterschiedlichen Domänen von UPF1 (Abbildung 4A) sind bei verschiedenen NMD-Schritten von funktioneller Bedeutung: Die Phosphorylierung von UPF1 am C-Terminus wird bei der Erkennung eines NMD-Substrates eingeleitet (1.5.2.2), wohingegen die ATPase- und DNA- / RNA-Helikase-Aktivität (1.5.2.1) für spätere NMD-Schritte benötigt werden, beispielsweise für die De-Assemblierung des mRNPs und das Recycling der NMD-Faktoren (Franks et al., 2010). UPF1 spielt außerdem eine Rolle im „Staufen-mediated mRNA Decay“ (SMD) (Kim et al., 2005; Kim et al., 2007; Gong et al., 2009), im Histon-mRNA Decay (Kaygun & Marzluff, 2005), bei der DNA-Replikation und DNA-Reparatur (Azzalin & Lingner, 2006a, b; Azzalin et al., 2007) und wurde mit „small RNA-mediated Silencing“ in Verbindung gebracht (Jin et al., 2009) (besprochen in (Isken & Maquat, 2008)).

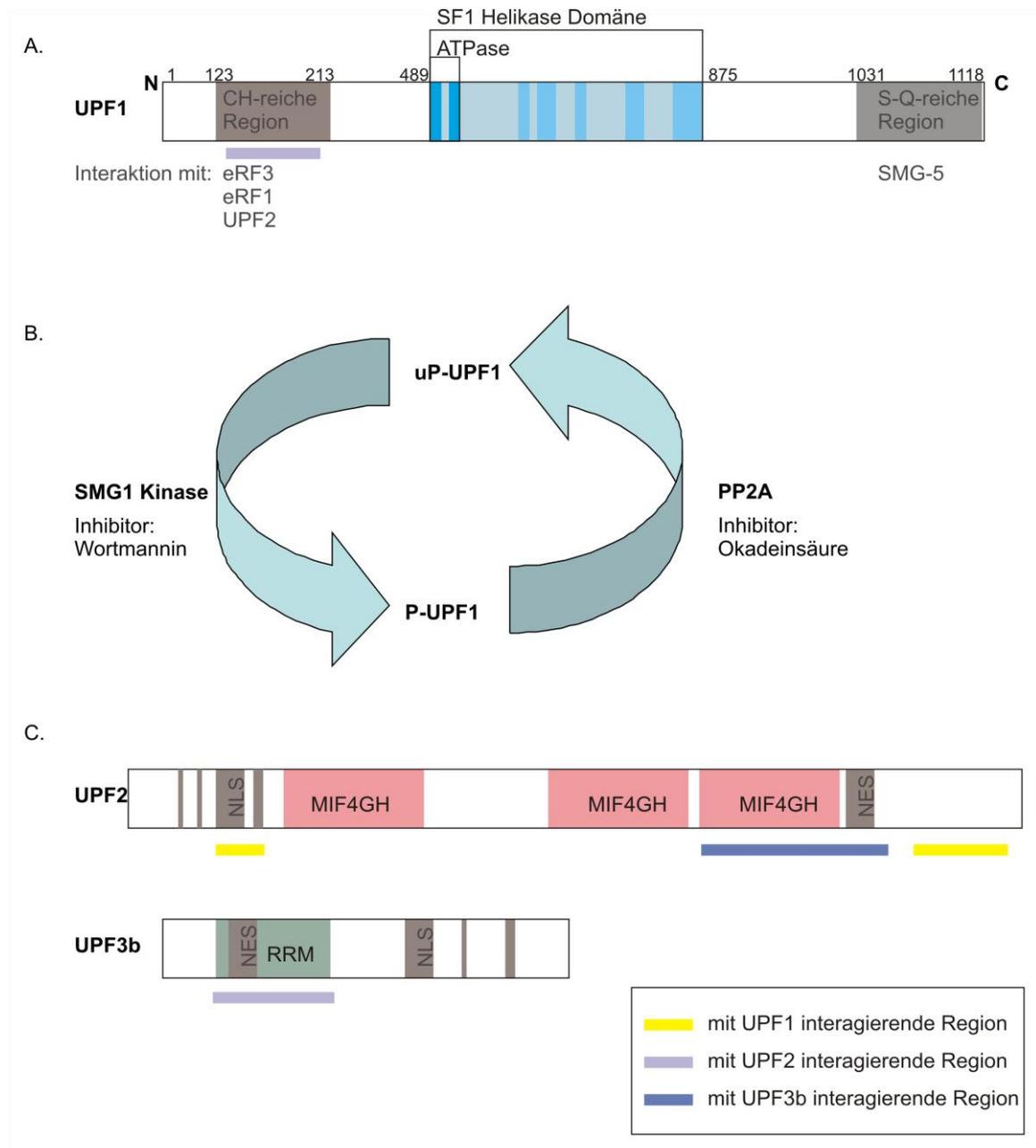


Abbildung 4 UPF Proteine: Eigenschaften & Funktionen.

(A) Domänen von UPF1 und direkte Interaktionspartner. (B) Der Phosphorylierungszyklus von UPF1 ist essenziell für NMD. Durch Wortmannin, einen Inhibitor der Kinase SMG1, kann die Phosphorylierung von nicht phosphoryliertem UPF1 (uP-UPF1) verhindert werden. Okadaic acid, ein Inhibitor der Protein Phosphatase 2A, verhindert die Dephosphorylierung von phosphoryliertem UPF1 (P-UPF1). (C) Domänen von UPF2 und UPF3b. Bindestellen von UPF1, UPF2 und UPF3 sind farblich gekennzeichnet. RRM = "RNA Recognition Motif", MIF4GH = "Middle of Initiation Factor 4G Homology"-Domäne, NES = nukleäres Exportsignal, NLS = nukleäres Lokalisationssignal.

1.5.2.1 Enzymatische Aktivitäten von UPF1

UPF1 ist eine Upf1-ähnliche Superfamily 1-Helikase (Fairman-Williams et al., 2010; Jankowsky et al., 2010; Jankowsky, 2010; Jankowsky & Putnam, 2010) und Nukleinsäure-abhängige ATPase mit sieben Helikasemotiven im mittleren Teil des Proteins. UPF1 besitzt ATPase- und 5' nach 3' RNA- / DNA-Helikase-Aktivität (Bhattacharya et al., 2000; Kashima et al., 2006; Cheng et al., 2007; Chamieh et al., 2008). Der Phosphorylierungsgrad von UPF1 beeinflusst die Aktivität von UPF1 als ATPase jedoch nicht ((Kashima et al., 2006), suppl. Fig. 4). Die ATP-Hydrolyse liefert die Energie zum Rearrangement der Struktur von RNA- oder Protein- / RNA-Komplexen. Bereits seit Langem war bekannt, dass die ATPase-Aktivität von UPF1 wichtig für NMD ist (Weng et al., 1996b, a, 1998; Kashima et al., 2006). Vor Kurzem wurde auch gezeigt, dass UPF1 seine ATPase-Aktivität dazu einsetzt, während des Abbaus von NMD-Substraten das mRNP so umzubauen, dass die NMD Faktoren dissoziieren und somit für neue NMD-Zyklen recycelt werden können (Franks et al., 2010), sodass die mRNA durch Exonukleasen vollständig abgebaut werden kann.

1.5.2.2 Der Phosphorylierungszyklus von UPF1

Am C-Terminus von UPF1 befindet sich eine S / T-Q (Serin / Tyrosin-Glutamin)-reiche, unstrukturierte Region, in der sich einige der insgesamt 28 potenziellen S / T-Q Phosphorylierungsstellen von UPF1 befinden (Abbildung 4A). Der Phosphorylierungszyklus von UPF1 (Abbildung 4B) ist bei *C. elegans* und *H. sapiens* essenziell für NMD, da er zum Umbau des mRNPs beiträgt: Beim Erkennen eines NMD-Substrats wird UPF1 *in vivo* an mindestens 2 Stellen der S / T-Q-reichen Region von der PI3-Kinase-ähnlichen Kinase (PI3KK) SMG1 phosphoryliert (Pal et al., 2001; Yamashita et al., 2001; Ohnishi et al., 2003). Dies geschieht wahrscheinlich in einem Komplex mit den Translationsterminationsfaktoren eRF1 und eRF3 (SMG1, UPF1, „Release Factors“ = SURF Komplex). Außerdem werden hierfür UPF2 und / oder UPF3b benötigt (Kashima et al., 2006; Ivanov et al., 2008). Da die Überexpression einer inaktiven SMG1-Mutante die Ko-Immunopräzipitation von UPF1 mit eRF3 verstärkt, geht man davon aus, dass durch die Phosphorylierung wahrscheinlich eRF3 von UPF1 dissoziiert (Kashima et al., 2006). Phosphoryliertes UPF1 interagiert mit SMG5, SMG6 und SMG7, die wiederum die Dephosphorylierung von UPF1 durch Protein-Phosphatase 2 A (PP2A) herbeiführen. Durch Inhibition der Kinase SMG1 oder der Phosphatase PP2A mit den spezifischen Inhibitoren Wortmannin und Okadeinsäure, kann der Phosphorylierungszyklus von UPF1 unterbrochen

und NMD inhibiert werden ((Pal et al., 2001; Yamashita et al., 2001; Ohnishi et al., 2003), schematisch dargestellt in Abbildung 4B). Diese Inhibitoren können daher bei der Aufreinigung von UPF1 zur Anreicherung von phosphoryliertem (P-UPF1) oder unphosphoryliertem (uP-UPF1) eingesetzt werden (4.1).

1.5.2.3 Interaktion von UPF1 mit weiteren NMD-Effektoren

Die Interaktion von UPF1 mit UPF2, eRF1 und eRF3a ist in Abbildung 4 dargestellt. Sie erfolgt über die Cystein-Histidin (CH)-reiche Region am N-Terminus. Die CH-reiche Region besteht aus 3 Zink-Binde-Motiven, die in 2 Modulen angeordnet sind (Kadlec et al., 2006). Wie in Strukturstudien genauer untersucht wurde, bindet UPF2 die CH-reiche Region von UPF1 (Clerici et al., 2009) und vermittelt über UPF3b (Kadlec et al., 2004) die Interaktion mit dem EJC (Buchwald et al., 2010). Interessanterweise inhibieren Mutationen in dieser Region die Interaktion mit UPF2 und NMD bei *H. sapiens*, jedoch nicht in *S. cerevisiae*, wo sie trotzdem einen Einfluss auf die Termination haben (Weng et al., 1996b; Kashima et al., 2006; Ivanov et al., 2008). Desweiteren besteht eine Interaktion zwischen UPF1 und SMG1 (Kashima et al., 2006). Das phosphorylierte UPF1 interagiert außerdem mit SMG5, SMG6 und SMG7 (Ohnishi et al., 2003).

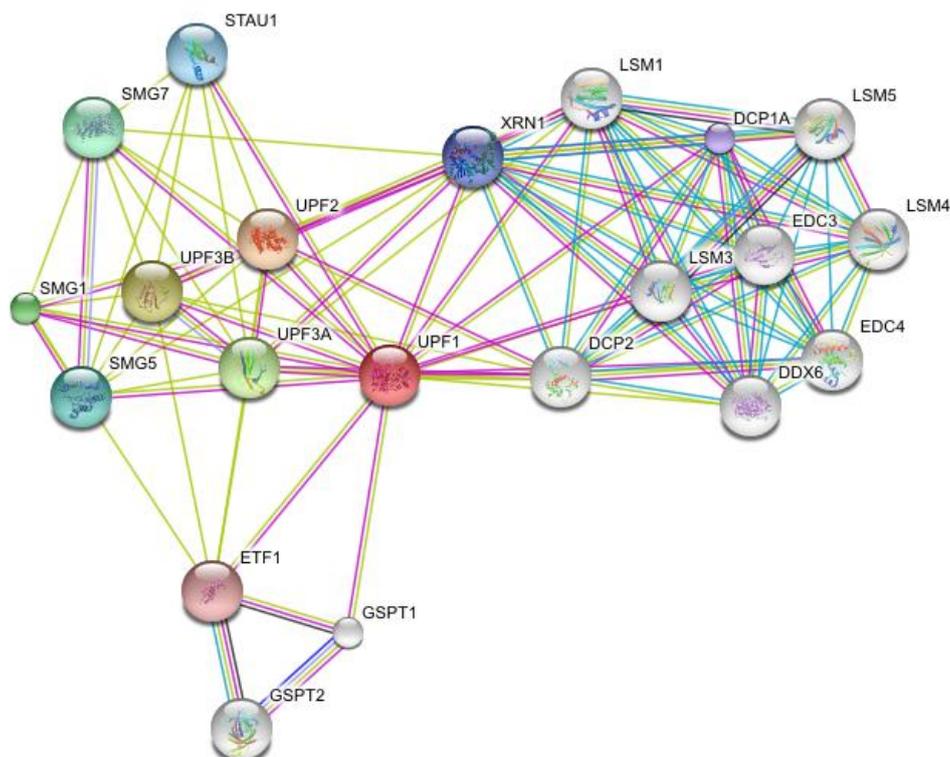


Abbildung 5 Interaktionsnetz von UPF1.

Nach string-db.org. Die Farbe der Verbindungslinie steht für die Art eines Hinweises auf eine Interaktion. Rosa: Interaktion belegt durch Experimente. Gelb: Assoziation durch Textmining. Hellblau: Assoziation in Datenbanken. Dunkelblau: Ko-Konservierung in verschiedenen Genomen. eTF1 = eRF1, GSPT1,2 = eRF3a, eRF3b, STAU1 = Stau1.

1.5.3 UPF2 und UPF3

UPF2 und UPF3b sind mit dem EJC assoziiert. UPF2 ist ein ca. 148 kDa großes, hauptsächlich zytoplasmatisches Phosphoprotein mit einem putativen NLS („Nuklear Localisation Signal“) am C-Terminus (Lykke-Andersen et al., 2000). UPF2 vermittelt die Interaktion von UPF1 mit UPF3b (Abbildung 4), die Interaktion mit UPF1 erfolgt am C-Terminus und N-Terminus (Clerici et al., 2009). UPF2 enthält 3 „Middle of Initiation Factor 4G Homology“- (MIF4GH-) Domänen, die homolog zu eIF4G sind (Mendell et al., 2000). Über negativ geladene Aminosäuren der letzten MIF4GH-Domäne interagiert UPF2 mit einem größtenteils positiv geladenen Bereich der RNA-Bindedomäne von UPF3b (Kadlec et al., 2004). Die Rolle der beiden ersten MIF4GH-Domänen ist unklar. MIF4GH-Domänen finden sich in einer großen Anzahl von Proteinen mit Funktion in der Translation oder im mRNP Metabolismus, wie z.B. PAIP1, p97 / DAP5, CBP80 und CTIF. Im „Yeast-Two-Hybrid“-System interagierte die zweite MIF4GH-Domäne mit Sui1 / eIF1 und eIF4A1, was eine funktionelle Verbindung dieses Proteins mit der Translationsinitiation oder dem Recycling nahelegt (Mendell et al., 2000).

UPF3 ist das kleinste (ca. 57 kDa) und am wenigsten konservierte UPF-Protein. Es ist hauptsächlich nukleär (Lykke-Andersen et al., 2000). In *H. sapiens* existieren 2 Gene, die für die Isoformen UPF3a (Chromosom 13) und UPF3b (X-Chromosom, daher auch UPF3X genannt) kodieren. Beide Gene generieren je zwei alternativ gespleißte, unterschiedlich lange Proteine, sodass es insgesamt 4 verschiedene UPF3-Isoformen gibt. UPF3b ist jedoch effektiver beim Auslösen von NMD (Kunz et al., 2006). UPF3 ist Teil des EJC und interagiert mit diesem über den C-Terminus (Buchwald et al., 2010).

1.6 NMD-Mechanismus**1.6.1 Translationsabhängige Definition von PTCs während NMD**

Um vorzeitige Terminationskodons („premature Termination Codons“, PTCs) von normalen Terminationskodons zu unterscheiden, bedient sich der NMD-Mechanismus der zytoplasma-

tischen Translation und der Proteine in der 3'-UTR des mRNPs, die teilweise schon im Nukleus und auch noch später im Zytoplasma an die mRNA binden (siehe auch 1.1).

Neuere NMD-Modelle (besprochen in (Muhlemann, 2008; Muhlemann et al., 2008; Rebbapragada & Lykke-Andersen, 2009)) postulieren, dass die 3'-UTR von NMD-Substraten aberrant ist und dadurch NMD ausgelöst wird. Kriterien zur Erkennung einer aberranten 3'-UTR sind deren Länge und Proteinkomposition (Abbildung 6A). So stimuliert ein relativ zum PTC stromabwärts gelegener „Exon Junction Complex“, EJC (ein Multiproteinkomplex mit den Hauptfaktoren Magoh, Y14, eIF4A3 und BTZ, der durch den Spleißvorgang an Exon-Exon-Verbindungen gebunden wird) NMD bei höheren Eukaryonten (Abbildung 6A (1)). Der EJC dient als räumlicher Referenzpunkt, um ein Terminationskodon als „vorzeitig“ zu definieren (Kataoka et al., 2000; Le Hir et al., 2001; Kashima et al., 2006; Gehring et al., 2009a): Terminationskodons, die mindestens 50 nt stromaufwärts einer Exon-Exon-Verbindung liegen, werden als „vorzeitig“ erkannt und die betroffene mRNA wird abgebaut (Nagy & Maquat, 1998; Thermann et al., 1998; Zhang et al., 1998; Brocke et al., 2002).

Es gibt aber auch Fälle, bei denen kein „downstream“ EJC für NMD notwendig ist (Abbildung 6A (2)). So können auch sehr lange 3'-UTRs, unabhängig vom EJC, NMD auslösen (Buhler et al., 2006; Eberle et al., 2008; Singh et al., 2008). Es wird vermutet, dass sich das Terminationskodon bei langen 3'-UTRs nicht im richtigen räumlichen Abstand zum zytoplasmatischen Poly-(A)-Bindeprotein (PABPC1) befindet, das die Termination fördern und NMD inhibieren soll (Amrani et al., 2004; Eberle et al., 2008; Ivanov et al., 2008; Singh et al., 2008). Auch bindet der essenzielle NMD-Faktor UPF1 nicht nur an den EJC (Chamieh et al., 2008), sondern ist auch mit der 3'-UTR sehr langer mRNAs verstärkt assoziiert und könnte dadurch NMD fördern (Hogg & Goff, 2010).

Für die meisten mRNAs kann man davon ausgehen, dass NMD-fördernde (Assoziation mit UPF1 oder dem EJC, lange 3'-UTR) und NMD-inhibierende (PABPC1, kurze 3'-UTR) Faktoren im dynamischen Gleichgewicht miteinander stehen (Abbildung 6B) (Singh et al., 2008) und im Laufe der Translation eine Entscheidung zum Auslösen von NMD gefällt werden muss. Wie diese Entscheidung getroffen wird, ist bislang unklar. Im Folgenden wird das geläufigste Modell (besprochen in (Muhlemann, 2008; Muhlemann et al., 2008; Rebbapragada & Lykke-Andersen, 2009), siehe auch Abbildung 6C) näher erläutert. Alternative Modelle werden beispielsweise von Brogna & Wen (Brogna & Wen, 2009) vorgestellt.

Während der Termination der Translation (1.3.3) erkennt eRF1 das Stopkodon und bindet zusammen mit eRF3 in die A-Bindestelle des Ribosoms. Der C-Terminus von PABPC1 interagiert mit dem N-Terminus von eRF3, stimuliert wahrscheinlich die Termination und inhibiert dadurch NMD (Ivanov et al., 2008; Singh et al., 2008). Im Falle einer aberranten 3'-UTR ist die Interaktion mit PABPC1 gestört. UPF1 wird durch Interaktion mit eRF3 zur Terminationsstelle rekrutiert, möglicherweise um dort eine modulierende Funktion auf die Termination auszuüben (Amrani et al., 2004; Ivanov et al., 2008). UPF1 bildet am Terminationskodon einen Komplex mit eRF1, eRF3 und SMG1 (SURF-Komplex) (Kashima et al., 2006). Durch UPF2 und / oder UPF3b wird die Phosphorylierung von UPF1 durch SMG1 gefördert (1.5.2.2). Phosphoryliertes UPF1 führt zur Repression der Translation (Isken et al., 2008) und letztendlich zum Abbau des Transkripts (1.6.2).

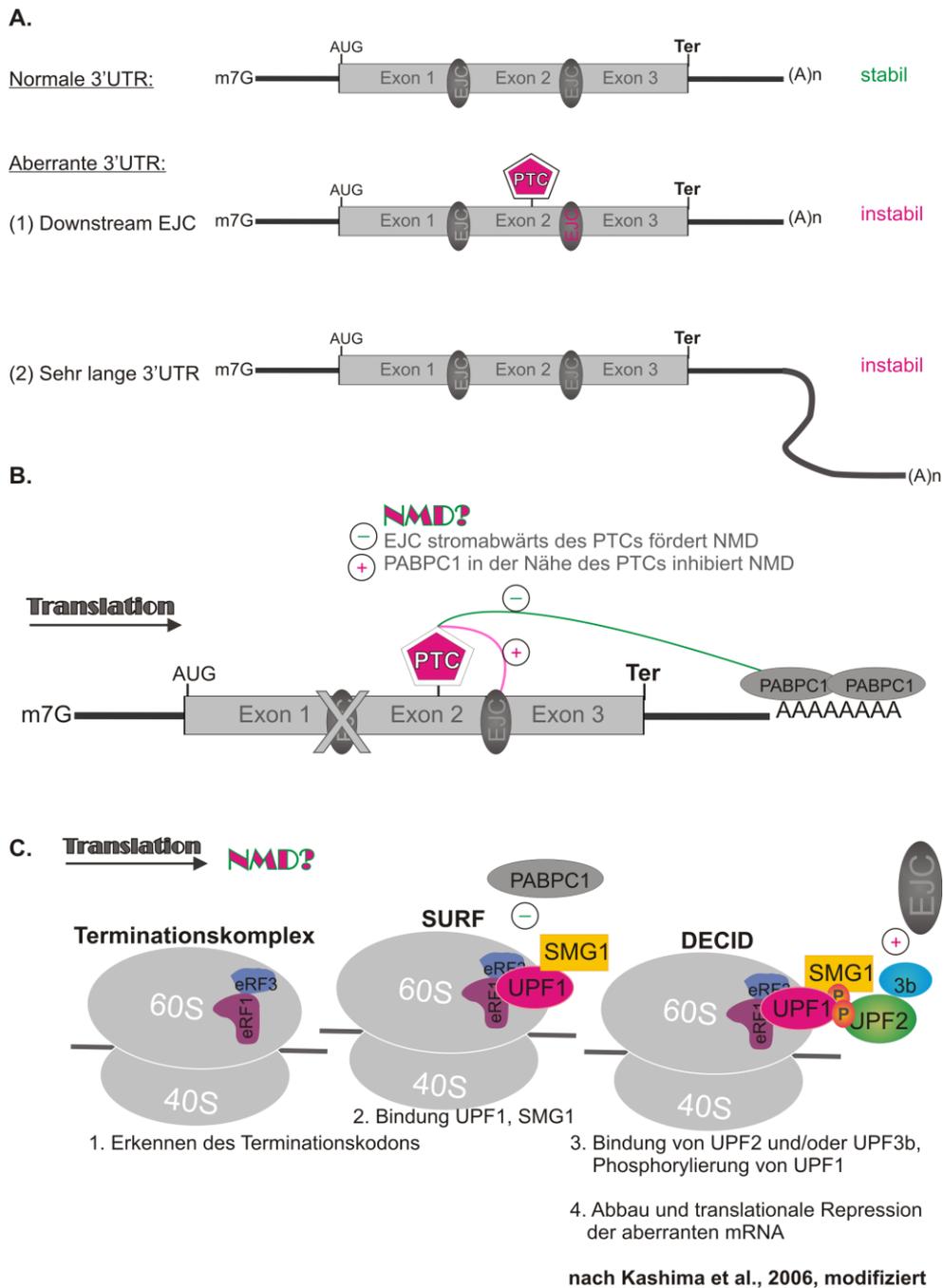


Abbildung 6 NMD-Modell.

(A) Eigenschaften eines NMD-Substrats. mRNAs werden als NMD-Substrate erkannt, wenn die 3'-UTR aberrant ist, d.h. wenn (1) sich ein EJC stromabwärts des Terminationskodons befindet, oder (2) die 3'UTR zu lang bzw. die Distanz zu PABPC1 zu groß ist. (B) Die Definition von PTCs erfolgt während der Translation. Durch die translatierenden Ribosomen werden innerhalb des ORF gebundene Proteine, wie z. B. ein EJC, entfernt. Wahrscheinlich während der Termination oder Reinitiation werden dann positive (EJC, UPF1) und negative (PABPC1) NMD-Signale in der 3'-UTR integriert, und die Entscheidung zum Auslösen von NMD gefällt. (C) NMD-Modell, nach (Kashima et al., 2006), modifiziert mit Elementen aus (Muhlemann, 2008). Abkürzungen: PABP = Poly-(A)-bindendes Protein, m⁷G = mRNA-„Cap“-Struktur, (A)_n = Poly-(A)-Schwanz, AUG = Startkodon, Ter = Terminationskodon.

1.6.2 Endo- und exonukleolytische Abbauwege aberranter mRNAs

Nach der Erkennung des PTCs und der durch SMG1 vermittelten Phosphorylierung von UPF1, werden aberrante mRNAs auf endo- oder exonukleolytischem Weg abgebaut. Beim endonukleolytischen Weg interagiert phosphoryliertes UPF1 mit der Endonuklease SMG6, die Phosphatase 2A (PP2A) wird rekrutiert und UPF1 dephosphoryliert. Beim exonukleolytischen Weg erfolgt der Abbau, wahrscheinlich vermittelt durch SMG5 und SMG7, durch Deadenylierung und / oder „Decapping“ (besprochen in (Muhlemann et al., 2008)).

1.7 Wechselspiel zwischen der Translation, NMD und UPF1

Durch Inhibierung der Translation einer mRNA wird auch ihr Abbau durch NMD verhindert (Belgrader et al., 1993; Carter et al., 1996; Thermann et al., 1998). Man vermutet daher, dass ein vorzeitiges Terminationskodon erst im Zusammenspiel der NMD-Faktoren mit dem Translationsapparat erkannt werden kann (1.6.1). Es wurde postuliert, dass das Schlüsselereignis zur Auslösung von NMD ein ineffizientes Terminationsereignis ist, weil bei NMD-Substraten die Interaktion des Ribosoms mit terminationsfördernden, 3'-UTR-assoziierten Faktoren (wie z. B. PABPC1) fehlt und dieses zur Bildung eines Proteinkomplexes führt, der den Abbau der PTC-haltigen mRNA begünstigt (Muhlemann, 2008).

Assoziationen zwischen Translationsfaktoren und NMD-Faktoren sind durch zahlreiche (meist Immunopräzipitations-) Studien belegt (Tabelle 1): UPF1 interagiert mit Translationsinitiationsfaktor 3 (Isken et al., 2008), mit CBP80 (Hwang et al., 2010) und den Terminationsfaktoren eRF1 und eRF3 (Czaplinski et al., 1998; Kashima et al., 2006; Ivanov et al., 2008). Auch besteht zwischen UPF2, eIF4A1 und SUI1 / eIF1 eine genetische Interaktion (Mendell et al., 2000), und UPF2 interagiert mit INT6 / eIF3e (Morris et al., 2007). Einige dieser Interaktionen sind für NMD (Kashima et al., 2006; Morris et al., 2007; Isken et al., 2008; Ivanov et al., 2008; Hwang et al., 2010) und die Aktivität von UPF1 (in *S. cerevisiae*, (Czaplinski et al., 1998)) von Bedeutung. Umgekehrt bleibt die Signifikanz dieser Interaktionen für den Mechanismus der Translation vage:

UPF1 wurde bisher sowohl mit der Initiation (Isken et al., 2008), der Termination (Weng et al., 1996b; Amrani et al., 2004; Ivanov et al., 2008), als auch mit dem Recycling und der Reinitiation (Ghosh et al., 2010) in Verbindung gebracht. Phosphoryliertes UPF1 verhinderte in Retikulozytenlysat während der Initiation die Bindung der 60S-Untereinheit an 48S-Komplexe

(Isken et al., 2008). Dieses Phänomen war nicht auf NMD-Substrate beschränkt und deutet daher auf eine generelle Bedeutung von UPF1 in der Translation hin. Bei Versuchen in *S. cerevisiae* führte die Abwesenheit von UPF1 zu verminderter Translation eines Nicht-NMD-Substrats (Amrani et al., 2004). Außerdem beeinflusste UPF1 die Reinitiation eines NMD-Substrats (Amrani et al., 2004; Ghosh et al., 2010) sowie translationalen Readthrough (Weng et al., 1996b, a; Wang et al., 2001). Darunter versteht man das Durchlesen des Terminationskodons: Anstatt zu terminieren, baut das Ribosom eine „near-cognate“ Aminosäure ein. In Zellkulturexperimenten wurde gezeigt, dass auch bei *H. sapiens* die Depletion von UPF1 oder PABPC1 translationalen Readthrough beeinflusst (Ivanov et al., 2008). Daraus wurde dann ein (NMD-) Modell entwickelt, bei dem PABPC1 die Termination fördert und UPF1 diese inhibiert (Ivanov et al., 2008; Muhlemann, 2008; Singh et al., 2008; Rebbapragada & Lykke-Andersen, 2009). In Hefeextrakt wurde UPF1 für die effiziente Termination und das Recycling von Ribosomen an PTCs benötigt (Ghosh et al., 2010).

Durch die Komplexität der bisher verwendeten experimentellen Systeme bleibt die genaue Bedeutung von UPF1 für die Translation, sowie die mögliche Verbindung zwischen dieser potenziellen Funktion von UPF1 in der Translation mit dem Mechanismus von NMD jedoch weiter im Dunkeln.

UPF1 könnte seinen Einfluss auf die Translation *in vivo* auch auf gänzlich indirekte Weise ausüben: In Anbetracht der unterschiedlichen Funktionen von UPF1 (1.5.2) in wahrscheinlich stark miteinander vernetzten intrazellulären Signalnetzen, könnte in Zellkulturexperimenten (Ivanov et al., 2008) eine indirekte Wirkung der Depletion von UPF1 detektiert worden sein. So führte die Depletion von UPF1 in menschlichen Zellen zur Erhöhung der Abundanz von SUI1 / eIF1 ((Viegas et al., 2007), suppl. Data), ein Translationsfaktor, der an der Auswahl des korrekten Startkodons (Cheung et al., 2007) und am Recycling der Ribosomen (Pisarev et al., 2007a; Pisarev et al., 2010) beteiligt ist. Es gibt zwei Isoformen von eIF1, die durch genotoxischen Stress differenziell reguliert werden (Sheikh et al., 1999). ASTD1.1, eine Datenbank für alternatives Spleißen (Le Texier et al., 2006; Stamm et al., 2006), sagt eine weitere Isoform von eIF1 voraus, die ein direktes NMD-Target sein könnte.

Die Inhibierung von NMD moduliert außerdem die Abundanz von weiteren Faktoren, die die Translation direkt oder indirekt beeinflussen könnten. So kontrolliert NMD in *S. cerevisiae* die intrazelluläre Magnesiumkonzentration und stellt so die Genauigkeit der Translation sicher.

Die verringerte Terminationseffizienz in NMD-defizienten Hefezellen könnte man der erhöhten Expression des Magnesiumtransporters und NMD-Targets Alr1p zuschreiben, der die intrazelluläre Magnesiumkonzentration erhöht (Johansson & Jacobson, 2010). NMD könnte auch beim Menschen die Konzentration von Magnesium und somit die Genauigkeit der Translation regulieren, da NIPA1 -ein menschlicher Magnesiumtransporter- laut ASTD1.1 (Le Texier et al., 2006; Stamm et al., 2006) in einer alternativ gespleißten, PTC-haltigen Version existieren könnte.

Man schätzt, dass über ein Drittel der menschlichen Gene für alternativ gespleißte mRNA-Isoformen kodieren, die potenziell von NMD betroffen sind (Lewis et al., 2003). Unter diesen befinden sich einige Translationsfaktoren und Translationsregulatoren, die *bona fide* NMD-Targets sind, so z. B. die ribosomalen Strukturproteine rpL3 und rpL12, deren alternativ gespleißte Isoformen bei *H. sapiens* (Cuccurese et al., 2005) und *C. elegans* (Mitrovich & Anderson, 2000) durch NMD abgebaut werden. Der Effekt dieser Isoformen auf die Translation in NMD-defizienten Zellen wurde in diesen beiden Studien nicht untersucht. Man kann jedoch vermuten, dass sie die Genauigkeit der Translation beeinflussen: Rpl3 ist ein Bestandteil des Ribosoms und befindet sich in der Nähe des Peptidyltransferasezentrums der großen ribosomalen Untereinheit. Mutanten von Rpl3 wurden in Hefe mit „-1 Frameshifting“, also der Verschiebung des offenen Leserahmens um ein Nukleotid, in Zusammenhang gebracht (Peltz et al., 1999). Mutationen der RNA-Komponenten des Ribosoms können translationalen Readthrough beeinflussen (Chernoff et al., 1994; Velichutina et al., 2000; Velichutina et al., 2001). Mutationen der Proteinkomponenten des Ribosoms könnten ähnliche Auswirkungen haben, wie für bakterielle Ribosomen gezeigt wurde (Inaoka et al., 2001).

Somit könnten speziesspezifische Unterschiede in den zellulären Prozessen, die von NMD betroffen sind (Rehwinkel et al., 2005) erklären, warum die Ergebnisse der Untersuchungen zum Einfluss von UPF1 auf die Termination zwischen Hefe und Mensch voneinander abweichen, und warum diese selbst in Hefe vom jeweiligen Stamm und Sequenzkontext abhängen (Weng et al., 1996b, a; Bidou et al., 2000; Wang et al., 2001; Harger & Dinman, 2004; Keeling et al., 2004; Wang et al., 2006).

1.8 Fragestellung

UPF1, UPF2 und UPF3 sind für NMD von essenzieller Bedeutung (Applequist et al., 1997; Lykke-Andersen et al., 2000; Gehring et al., 2003). Zusätzliche Funktionen dieser Proteine in der Translation, und mögliche Verbindungen dieser Funktionen mit dem Mechanismus von NMD, sind jedoch unklar: Gängige NMD-Modelle (vgl. 1.6) gehen davon aus, dass die Translation von NMD-Substraten aberrant ist. Jedoch beziehen sich diese Modelle meist auf Immunopräzipitation von Komplexen zwischen NMD- und Translationsfaktoren oder auf Translationsexperimente in komplexen Systemen wie Hefeextrakt, Retikulozytenlysat oder Zellen (vgl. 1.7), sodass indirekte Effekte nicht auszuschließen sind. Die bisherigen Studien zum Einfluss der NMD-Faktoren auf die Translation (Weng et al., 1996b; Wang et al., 2001; Amrani et al., 2004; Isken et al., 2008; Ivanov et al., 2008; Ghosh et al., 2010) haben UPF1 (und weitere NMD-Faktoren) mit (fast allen) Stadien der Translation in Verbindung gebracht. Die beschriebenen Effekte könnten aber auch indirekt sein (1.7), und es fehlt bislang ein auch System für detaillierte mechanistische Untersuchungen dieser Vorgänge.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher die Hypothese geprüft werden, dass UPF1 direkt an den einzelnen Schritten der Translation beteiligt ist. Technisch wurde dafür ein kürzlich entwickeltes eukaryontisches *in vitro* Translationssystem (Alkalaeva et al., 2006; Pisarev et al., 2007a; Pisarev et al., 2007b; Pisarev et al., 2010) adaptiert (näher beschrieben unter Abschnitt 4.3). In diesem aus gereinigten Komponenten rekonstituierten System wurde der potentiell direkte Einfluß von UPF1 auf die einzelnen Schritte der eukaryontischen Translation von mir biochemisch charakterisiert.

2 Material

2.1 Chemikalien

Tabelle 2 Chemikalien

Reagenz	Abkürzung	Hersteller / Lieferant
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure	HEPES	Sigma
2-Methyl-Diformamid		Roth
2-Propanol / Isopropanol		Roth
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure	MOPS	Sigma
5M Natriumazetat, pH 5.5		Sigma
6-Aminohexansäure		Merck
Acetonitril		Roth
Ammoniumpersulfat	APS	Sigma
Ammoniumsulfat		Sigma
Bis-(2-hydroxyethyl)-2-amino-ethansulfonsäure		Sigma
Borsäure		Roth
Bromphenolblau		Serva
Chloroform		Roth
Essigsäure		Roth
Ethanol		Roth
Ethidiumbromid		Roth
Ethylendiamintetraessigsäure	EDTA	Roth
Formaldehyd 37 %		Sigma
Formamid		Sigma
G-250 Brilliant Blau		Roth
Glycin		Roth
Harnstoff / Urea		Roth
Imidazol		Roth
Lithiumchlorid		Sigma
Magnesiumchloridlösung (1M)		Sigma
Methanol		Roth
Methylenblau		Roth
Natriumdodecylsulfat	SDS	Serva
Natriumfluorid		Sigma
Natriumhydroxyd	NaOH	Roth
Natriumorthovanadat		Sigma
Natriumpyruvat		Sigma
Nonidet		Fluka
Phenylmethylsulfonyl-Fluorid	PMSF	Sigma
PLUS One Repel Silane ES		Amersham Biosciences
PN Puffer		Quiagen
Polyethylenglycol 8000	PEG8000	Sigma
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)		Roth

Rotiphorese Gel 40 (19:1)		Roth
Rotizint eco plus		Roth
Salzsäure		Roth
Saures Casein-Hydrolysat, vitaminfrei		Sigma
β-Mercaptoethanol		Sigma
Sucrose		Roth
Tetramethylethyldiamin	TEMED	Roth
Tri [®] Reagent LS	Trizol	Sigma
Trichloressigsäure	TCA	Roth
Trichlormethan / Chloroform		Roth
Trinatriumzitat		Sigma
Tris-Base		Sigma
TritonX100	TX100	Sigma
Trypsin-EDTA		PAA
Tween 20		Gerbu
Xylencyanolblau		Roth

Weitere Standardchemikalien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe, Deutschland), Merck und Sigma bezogen.

2.2 Molekularbiologische und biochemische Reagenzien

Tabelle 3 Molekularbiologische und biochemische Reagenzien

Reagenz	Abkürzung	Hersteller/ Lieferant
100 bp DNA Marker		New England BioLabs
1 kb DNA Marker		New England BioLabs
4-12 % Bis/ Tris NuPAGE Gel System		Invitrogen
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside	X-Gal	Roth
7-Methyl-GTP Sepharose 4B		GE Healthcare Life Sciences
Adenosin 5´triphosphat ($\gamma^{32}\text{P}$)	ATP ($\gamma^{32}\text{P}$)	PerkinElmer
Adenosin-5'-(γ -thio-)Triphosphat	ATP ($\gamma^{35}\text{S}$)	PerkinElmer
Ampicillin	Amp	Grünenthal
AMV Reverse Transkriptase		Promega
Anti-Flag M2 Affinity Gel		Sigma
Aqua		Braun
Bacto Yeast Extrakt		Difco, Detroit, USA
Bacto-Agar		Difco, Detroit, USA
Bacto-Trypton		Difco, Detroit, USA
BIO-RAD Bradford Reagens		Bio Rad
Bovines Serumalbumin	BSA	Roth
Cellfectin Reagent		Invitrogen
Complete Protease Inhibitor		Roche
Cycloheximid	CHX	Sigma
Cystein ($\gamma^{35}\text{S}$)		PerkinElmer

DEAE Zellulose (Whatman DE52)		Fischer Scientific
Deoxynukleotide	dNTPs	Roth
Dithiothreitol	DTT	Promega
ECL PLUS Western Blot Detektionsreagenz	ECL PLUS	Amersham Biosciences
ECL Western Blot Detektionsreagenz	ECL	Amersham Biosciences
Flag® Peptid		Sigma
Geneticin		GIBCO
Glykogen		Roche
GMPPNP, AMPPNP		Roche
Guanosin 5'-triphosphat ($\gamma^{32}\text{P}$)	GTP ($\gamma^{32}\text{P}$)	PerkinElmer
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	IPTG	Roth
Kanamycin	Kan	Roth
LE Agarose		Biozym
Lipofectamine Reagent		Invitrogen
Methionin ($\gamma^{35}\text{S}$)		PerkinElmer
Milchpulver		Sucofin
native calf liver tRNA		EMD Biosciences
NiNTA-Agarose		Quiagen
Nuklease-behandeltes Retikulozytenlysat	RRL	Promega
Nukleotide	NTPs	Roche
Nytran N Nitrozellulose Membran		NeoLab Laborbedarf Vertriebs-GmbH
Okadeinsäure	OA	Calbiochem
Oligofectamine Reagent		Invitrogen
Pefabloc Protease Inhibitor		Roche
PEI Zellulose F Dünnschichtchromatographie-Platten		Merck
Phosphozellulose (Whatman P11)		Fischer Scientific
Phosstop Phosphatase Inhibitor		Roche
Platinum® Tac DNA Polymerase High Fidelity		Invitrogen
Protein Marker, Prestained		Fermentas
qPCR Mastermix for SYBR Green		Roche
Kaninchenretikulozytenlysate	RRL	Green Hectares (Oregon, WI)
Recombinant RNasin		Promega
RevertAid[TM]H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase		Fermentas
RNasin®		Promega
Spermidin		Sigma
T4 DNA Ligase		Promega
Taq DNA Polymerase		New England BioLabs
Tetrazyklin		Roth
Westran S PVDF Membran		Schleicher & Schuell Bioscience GmbH
Whatman 3mm Papier		Fischer Scientific
Wortmannin	W	Calbiochem

2.3 Verwendete Puffer, Lösungen und Media

Tabelle 4 Puffer, Lösungen und Media

Bezeichnung	Zusammensetzung
20 x SSC	3M NaCl, 0,3M Trinatriumzitat pH 7
ATPase Puffer	20 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM KCl, 2.5 mM MgCl ₂
BBS (2x), pH 6,96	50 mM BES, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ , steril filtriert, bei -20 °C gelagert
Coomassie-Entfärbelösung	10 % Methanol, 10 % Essigsäure
Coomassie-Färbelösung	40 % Methanol, 10 % Essigsäure, 2.5g Coomassie Blau (R-250)
denaturierendes Acrylamidgel (für RNA / DNA)	1 x TBE, 5-12 % (w / v) Acrylamid / Bisacrylamid (19:1), Urea, 0,05 % APS, 0,001 % TEMED
DNA-Probenpuffer (Agarosegele)	50 % Glycerin, 1 mM EDTA, 0.25 % Bromphenolblau
Duplex Annealing-Puffer	Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM KAc, 2 mM MgCl ₂
Fixierlösung Protein- / RNA-Gele	10 % Essigsäure, 10 % Methanol
FLAG Pulldown Lyse- / Waschpuffer	1 x TBS, 2-10 mM MgCl ₂ , 0,05 % TritonX100, 100 µg / ml CHX, 1 x Protease Inhibitor Complete, RNase A 10 µg / ml
HPLC Puffer A0	20 mM Tris (für MonoQ) oder Hepes (für MonoS) pH 7.5, 5 % Glycerol, 2 mM DTT, 0.1 mM EDTA.
HPLC Puffer A100	20 mM Tris(für MonoQ)oder Hepes (für MonoS) pH 7.5, 100 mM KCl, 5 % Glycerol, 2 mM DTT, 0.1 mM EDTA.
HPLC Puffer A50	20 mM Tris(für MonoQ)oder Hepes (für MonoS) pH 7.5, 50 mM KCl, 5 % Glycerol, 2 mM DTT, 0.1 mM EDTA.
HPLC Puffer B 500	20 mM Tris(für MonoQ)oder Hepes (für MonoS) pH 7.5, 500 mM KCl, 5 % Glycerol, 2 mM DTT, 0.1 mM EDTA.
Lämmli-puffer (5x), pH 6.8	1,5 % (w / v) Tris, 7,2 % (w / v) Glycin, 0,5 % (w / v) SDS
Laufpuffer Dünnschichtchromatographie	0.4M LiCl, 0.8M Essigsäure
LB-Agarplatten (mit Amp)	10 g NaCl, 10 g Bacto Tryptone, 5 g yeast extract, 15 g Agar in 1 l dd H ₂ O gelöst, autoklaviert und 1,2 g Ampicillin Natriumsalz dazugeben
Luria-Bertani Medium	5 g NaCl, 5 g Bacto Tryptone, 2,5 g yeast extract in 500 ml H ₂ O gelöst, autoklaviert
Lysepuffer für HeLa-Zellen (RNA / Protein)	10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM NaCl, 8 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 1.5 mM PMSF, 0,1 % Deoxycholat, 0,5 % NP-40
Lysepuffer, zytoplasmatisch	10 mM Tris-Cl, 8 mM MgCl ₂ , 10 mM NaCl, 1 mM DTT, 5 mM Vanadyl-Ribosyl-Complex RNaseinhibitor, 0,5 % NP-40, 1,5 mM PMSF Proteinaseinhibitor, pH einstellen auf 7.5
Methylenblau Nukleinsäurefärbelösung	0,05 % Methylenblau, 0,3M Natriumazetat pH 5,5
MOPS Puffer, 10x	0,2 M MOPS, 80 mM MaOAc, 10 mM EDTA pH 7, lichtgeschützt gelagert
native STOP (nativer Probenlaufpuffer für Helikase-Experimente)	100 mM Tris-HCl, 50 % Glycerol, ph 7.5, 0.5 % SDS, 5 mM EDTA, 0.05 % Bromphenolblau, 0.05 % Xylencyanolblau, 0.1 % NP-40
natives Acrylamidgel (für RNA / DNA)	1 x TBE, 5-12 % (w / v) Acrylamid / Bisacrylamid (19:1), 0,05 % APS, 0,001 % TEMED
NiNTA-Elutionspuffer	wie NiNTA Waschpuffer 1 mit 300 mM Imidazol, ggf. Phosphatase-inhibitor
NiNTA-Lysepuffer	20 mM Tris / Cl pH 8, 150 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 0,2 % NP-40, ggf. Phosphataseinhibitor

NiNTA-Waschpuffer 1	wie NiNTA Lysepuffer ohne NP-40, ggf. Phosphataseinhibitor
NiNTA-Waschpuffer 2	wie NiNTA Waschpuffer 1 mit 1M NaCl, ggf. Phosphataseinhibitor
NiNTA-Waschpuffer 3	wie NiNTA Waschpuffer 1 mit 30 mM Imidazol, ggf. Phosphataseinhibitor
NiNTA-Waschpuffer 4	wie NiNTA Waschpuffer 1 mit 80 mM Imidazol, ggf. Phosphataseinhibitor
Northern Agarosegel	2,5g Agarose, 42 ml Formaldehyd, 18 ml 10 x MOPS
Northern Hybridisierungspuffer (Church)	0,5M Di-Natriumhydrogenphosphat, 1 mM EDTA, 7 % SDS, pH-Einstellung auf 7,2
Northern RNA-Ladepuffer	50 % Glycerol, 1 mM EDTA, 0,25 % Bromphenolblau
Northern RNA-Probenpuffer	500 µl Formamid, 200 µl Formaldehyd, 100 µl 10 x MOPS, 1 µl Ethidiumbromid
Northern Waschpuffer I	2 x SSC, 0,1 % SDS
Northern Waschpuffer II	0,2 x SSC, 0,1 % SDS
PBS (10x)	85 mM Na ₂ HPO ₄ -15 mM K ₂ HPO ₄ pH 7.4, 1.37 M NaCl, 30 mM KCl, autoklavieren
Phosphataseinhibitor	25 mM Natriumfluorid, 1 mM Natriumorthovanadat, 2 mM Natrium-pyruvat
Proteingel SDS-PAGE: Sammelgel	5 % (w / v) Acrylamid / Bisacrylamid (37,5:1), 125 mM TrisHCl pH 6,8, 1 % SDS, 0,05 % APS (w / v), 0,0012 % TEMED
Proteingel SDS-PAGE: Trenngel	6-12 % (w / v) Acrylamid / Bisacrylamid (37,5:1), 380 mM TrisHCl, pH 8,8, 1 % SDS, 0,05 % APS (w / v), 0,0006 % TEMED
Proteinladepuffer SDS-PAGE (6x)	0,35 M Tris-Cl, 36 % Glycerin, 10 % (w / v) SDS, 9,3 % (w / v) DTT, 0,5 % Bromphenolblau
STOP Solution (Probenladepuffer Toeprinting)	0,05 % Bromphenolblau, 0,05 % Xylencyanolblau, 95 % Formamid, 20 mM EDTA, pH 8
TBE	90 mM Tris, 80 mM Borsäure, 5 mM EDTA pH 8
TBS (1x)	10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4, autoklaviert
TBS-Tween	TBS mit 0.5 % Tween
TCA Mix	5 % Trichloressigsäure, 0,75 % Casein-Hydrolysat. Referenz: Zavalov und Ehrenberg, 2001
TE-Puffer	10 mM Tris-Cl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0
Toeprinting-Lysepuffer	10 mM TrisHCl pH 7,6, 6 mM MgOAc, 1 mM DTT, 50 mM KOAc, 1 x Complete Protease Inhibitor, VRC, 100 µg / µl CHX
Toeprinting-Mix rekonstituiertes System	1 µl 400 mM MgCl ₂ , 4 µl 5 mM dNTPs, 0,5 µl AMV RT, 2 µl Primer
Toeprinting-RT Mix	50 mM Tris-CL pH 7,6, 40 mM KCl, 6 mM MgOAc, 5 mM DTT, 625 µM dNTPs, 1 µl Reverse Transkriptase (Fermentas) pro 200 µl
Translationspuffer	20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM KCl, 2.5 mM MgCl, 2 mM DTT, 2.5 mM Spermidin, -20 °C gelagert
UPF1 Aufreinigung Elutionspuffer	20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM KCl, 200 µg / ml FLAG Peptid. Nach Elution Zugabe von 2 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 5 % Glycerol
UPF1 Aufreinigung Lysepuffer	20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM KCl, 0.05 % NP-40, 10 µg / ml RNase A, Protease Inhibitor Cocktail 'Complete', ggf. Phosphataseinhibitor
UPF1 Aufreinigung Waschpuffer	20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 400 mM KCl, 0.05 % NP-40, Proteaseinhibitor 'Complete', ggf. Phosphataseinhibitor
Immunoblot Anodenpuffer	25 mM Tris

Immunoblot Kathodenpuffer	25 mM Tris, 40 mM 6 Amino-hexansäure, 0,01 % SDS
XGal Stammlösung	20 mg / ml, gelöst in 2-Methyl-Diformamid

Weitere gebräuchliche Rezepte für Puffer, Lösungen und Media wurden allgemein gebräuchlichen Laborhandbüchern (z. B. Sambrook et al., 1989) entnommen.

2.4 Nährlösungen und Media für die Zellkultur

Tabelle 5 Nährlösungen und Media für die Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller / Lieferant	Abkürzung
Dimethylsulfoxid	Serva	DMSO
Dulbecco's modified eagle Medium	Gibco	DMEM
Fötales Kälberserum	Gibco	FCS
Optimem	Gibco	
Penicillin-Streptomycin Lösung	PAA	P / S
Phosphate buffered saline	PAA	PBS
Sf-900II SFM	Invitrogen	Sf-900II
Trypsin	PAA	

2.5 Instrumente

Tabelle 6 Instrumente

Gerät	Verwendung
ABI StepOnePlus	qPCR
Aktapurifizier chromatography System, GE Healthcare Life Sciences	HPLC
Aqilent 2100 Bioanalyzer	Quantifizierung
BDK-Zellkulturbank	Zellkultur
Beckman L8-M Zentrifuge	Ultrazentrifugation
Beckman SW28 Rotor	Ultrazentrifugation
Beckman Ti50.2 Rotor	Ultrazentrifugation
Biometra Elektrophoresekammer G44	Elektrophorese
Biometra Elektrophoresekammern klein-lang, vertikal	Elektrophorese
Biorad Semi-Dry Blotter	Elektrophorese
Branson S-450D Ultraschall-Stab System	Zellyse
Certomat BS-1 mit Kühlung	Bakterienkultur
Eppendorf-Zentrifugen 5415R (Kühl)	Zentrifugation
Feinwaage	Wiegen
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 50 Zeiss	Mikroskopie
Geldokumentationanlage (UV-Schirm, Haube, Monitor, Printer, ICU-1)	Herolab Elektrophorese
Geltrockner, BIO-RAD 583	Elektrophorese
Höfer SG Gradientenmacher	Sucrosegradienten
Hybridisierungsöfen OV5 Biometra	Northern Blot

HyperCassette Film-Kassette, Amersham Biosciences	Exposition Radioaktivität	
Inkubator Heraeus	Bakterienkultur	
LightCycler Roche	quantitative PCR	
Magnetrührer Heidolph MR3001 (Heizung)	Mischen / Erhitzen	
Mikroskop Olympus CK30	Mikroskopie	
Mikrowelle	Erhitzen	
Mini-Spin Eppendorf Zentrifuge	Zentrifugation	
Mini-Vac E1	Trocknen	
PCR Cycler Biometra	PCR	
Peqlab Elektrophoresekammer 40-0911	Elektrophorese	
pH-Meter	pH-Messung	
Phosphorimager System (Eraser, FLA-3000, Computer)	Phosphorimaging / Quantifikation	
Photometer Eppendorf , Thermodrucker DPU414	Konzentrationsmessung (Protein, RNA, DNA)	
Power Supply E802	Elektrophorese	
Power Supply E833	Elektrophorese	
Rocking Platform Biometra	Mischen	
Sequenziergelkammern, Owl separation systems	Elektrophorese	
Sorvall RC-5C Plus Zentrifuge	Zentrifugation	
Sorvall SS34 Rotor	Zentrifugation	
Speedvac Eppendorf Condensator 5301	Trocknen	
Stickstofftank ARPEGE 40	Zellkultur	
SW41 Rotor	Ultrazentrifugation	
SW55 Rotor	Ultrazentrifugation	
Thermomixer compact Eppendorf	Inkubation	
UV-Stratalinker, Stratagene	UV-Crosslink	
Vakuumpumpe Biometra	Zellkultur	
Vortexer IKA Works	Mischen	
Waage	Wiegen	
Wasserbad	Erwärmen	

2.6 Säulen und Säulenmaterialien

Tabelle 7 Säulen und Säulenmaterialien

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller / Lieferant
7-Methyl-GTP Sepharose 4B	Affinitätsaufreinigung	GE Healthcare life sciences
Centricon YM100 Filtereinheiten	Zentrifugation / Konzentration	Millipore
DEAE Zellulose (Whatman DE52)	Ionenaustauschchromatographie (+ geladen, Anion Exchange)	Fischer Scientific
FPLC MonoQ HR5 / 5 Säule	HPLC	Amersham Pharmacia
FPLC MonoS HR5 / 5 Säule	HPLC	Amersham Pharmacia
FPLC Superdex G200	HPLC	Amersham Pharmacia

FPLC Superdex G75	HPLC	Amersham Pharmacia
Microcon YM30 Filtereinheiten	Zentrifugation / Konzentration	Millipore
NiNTA-Agarose	Affinitätsaufreinigung	Quiagen
PEI-Zellulose-F-Dünnschichtchromatographieplatten	DC	Merck
Phosphozellulose (Whatman P11)	Ionenaustauschchromatographie (negativ geladen, Kation Exchange)	Fischer Scientific
Polyprep chromatography columns	Affinitätsaufreinigung / Pulldowns	BioRad
Quick Spin Columns	Aufreinigung von RNA-Sonden	Roche
Sephadex G-50 spin-50 mini Säulen	Nukleinsäureaufreinigung	USA Scientific

2.7 Kits

Tabelle 8 Kits

Kit	Anwendung	Bezug
Biorad Protein Assay	Proteinbestimmung nach Bradford	Biorad
mMESSAGE mMACHINE®	<i>In vitro</i> Synthese gecappter mRNA	Ambion
Precellys Keramik Kit	<i>ex vivo</i> Toeprinting	Peqlab
QIAprep™(mini, midi) Kit	DNA-Aufreinigung aus <i>E. coli</i>	Quiagen
QIAquick Gel Extraction	DNA-Aufreinigung nach Gelelektrophorese, PCR oder enzymatischem Verdau	Quiagen
Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit	Sequenzierreaktion	USB
SilverQuest™	Silberfärbung	Invitrogen

2.8 Plasmide

Tabelle 9 Verwendete Plasmide

Name	Eigenschaften	Typ	konstruiert / erhalten von
pCIneo	Ausgangsvektor	mammalian	Promega
pCIneo (FLAG- UPF1si)	Vektor zur Expression einer siRNA-resistenten Mutante von UPF1	mammalian	Niels Gehring
pCIneo (FLAG- UPF1si S->A)	Ausgangsvektor: FLAG-UPF1si, mutagenisiert	mammalian	Kathrin Kerschgens
pCIneo (FLAG- UPF1si S->E)	Ausgangsvektor: FLAG-UPF1si, mutagenisiert	mammalian	Kathrin Kerschgens
pcDNA5 FRT	Ausgangsvektor zur Herstellung stabiler FlpIn-Zelllinien, enthält die FlpIn-Stellen	mammalian	Invitrogen
pOG44	Helferplasmid zur Herstellung stabiler FlpIn-Zelllinien, kodiert für die Integrase	mammalian	Invitrogen

pCIneo (β - globin WT)	Plasmid zur Expression von Wildtyp β - globin mRNAs in Säugerzellen	mammalian	Rolf Thermann (Thermann et al., 1998)
pCIneo (β - globin NS39)	Plasmid zur Expression von Nonsense- mutierten (PTC in Position +39) β - globin mRNAs in Säugerzellen	mammalian	Rolf Thermann (Thermann et al., 1998)
FlucA70	In vitro Transcription von Glühwürmchen- Luziferase mRNA mit einem 70nt Poly-(A)- Schwanz	bacterial	Aurelie Rakotondrafara (EMBL Heidelberg)
pET28 (EIF1A)	Zur Expression von His- getagtem eIF1A	bacterial	Tatyana Pestova (Alkalaeva et al., 2006, und Referenzen)
pET28 (EIF5B)	Zur Expression von His- getagtem eIF5B	bacterial	Tatyana Pestova (Alkalaeva et al., 2006, und Referenzen)
pET15 (eIF4B)	Zur Expression von His- getagtem eIF4B	bacterial	Tatyana Pestova (Alkalaeva et al., 2006, und Referenzen)
pET15b (eRF3a)	Zur Expression von His- getagtem eRF3a	bacterial	Pavel Ivanov
pET21 (deRF3)	Zur Expression von His- getagtem, N-terminal trunziertem deRF3	bacterial	Tatyana Pestova (Alkalaeva et al., 2006, und Referenzen)
pET19b (eIF5)	Zur Expression von His- getagtem eIF5	bacterial	Tatyana Pestova (Alkalaeva et al., 2006, und Referenzen)
pQE (eIF1)	Zur Expression von His- getagtem eIF1	bacterial	Tatyana Pestova (Alkalaeva et al., 2006, und Referenzen)
eIF4A	Zur Expression von His- getagtem eIF4A	bacterial	Tatyana Pestova (Alkalaeva et al., 2006, und Referenzen)
eIF4G	Zur Expression von His- getagtem eIF4G	bacterial	Tatyana Pestova (Alkalaeva et al., 2006, und Referenzen)
p(β - globin exonIII)	Zur Generierung von radioaktiv markierten Sonden zur Detektion von β -globin mRNA in Northern Blots	mammalian	Rolf Thermann
pCIneo-Flag	Insertion der FLAG Sequenz in die NheI / XhoI Schnittstellen von pCIneo.	mammalian	Niels Gehring (Gehring et al., 2003)
pCIneo-lambdaN-V5	Insertion der lambdaN/ V5 Sequenz in die NheI / XhoI Schnittstellen von pCIneo.	mammalian	Niels Gehring
pCIneo-V5	Insertion der V5 Sequenz in die NheI / XhoI Schnittstellen von pCIneo.	mammalian	Niels Gehring

pCI-neo-V5-eRF3a	Insertion der homo sapiens eRF3a Sequenz (NM_002094) in pCIneo-V5	mammalian	Ivanov et al., 2008
pCI-neo-V5-eRF3a aa1-450		mammalian	Ivanov et al., 2008
pCI-neo-lambdaN-V5-eRF3a	Umklonierung von eRF3a aus pCIneo-V5-eRF3a mittels der NheI / NotI Schnittstellen	mammalian	Kathrin Kerschgens
pCI-neo-lambdaN-V5-eRF3a aa1-450	Umklonierung von eRF3a aa1-450 aus pCIneo-V5-eRF3a mittels der NheI / NotI Schnittstellen	mammalian	Kathrin Kerschgens
pCI-neo-FLAG-UPF1-dCHR		mammalian	Ivanov et al., 2008
pQE(eRF1AGQ)	Zur Expression von His-getagtem eRF1AGQ	bacterial	Tatyana Pestova (Alkalaeva et al., 2006, und Referenzen)
pcDNA5-FRT-FLAG-UPF1-WT, pcDNA5-FRT-FLAG-UPF1-dCHR, pcDNA5-FRT-FLAG-UPF1-SA, pcDNA5-FRT-FLAG-UPF1-SE	Konstrukte wurden mittels NheI / NotI Schnittstellen aus pCI-neo-FLAG-UPF1 ausgeschnitten und in pcDNA5-FRT einkloniert	mammalian	Kathrin Kerschgens

2.9 Antikörper

Tabelle 10 **Verwendete Antikörper**

Bezeichnung	Zweitantikörper	Zielprotein	Verdünnung	Hersteller / Referenz
α-Rabbit IgG HRP	-	-	1:10.000	Sigma
α-Goat / Sheep IgG HRP	-	-	1:10.000	Sigma
α-Mouse IgG HRP	-	-	1:5.000	Sigma
α-Flag	α-Rabbit IgG HRP	Flag-Peptid	1:10.000	Sigma
α-V5	α-Rabbit IgG HRP	V5-Peptid	1:5.000	Sigma
α-eRF1	α-Rabbit IgG HRP	eRF1	1:2.000	Abcam
α-eRF3	α-Rabbit IgG HRP	eRF3	1:3.000	Abcam
α-Hupf1	α-Rabbit IgG HRP	UPF1 (N-Terminus)	1:5.000	Applequist et al., 1997
α-Hupf2	α-Rabbit IgG HRP	UPF2	1:2.000	Lykke-Andersen et al., 2001
α-Hupf3b	α-Rabbit IgG HRP	UPF3b	1:4.000	Lykke-Andersen et al., 2001
α-PABPC1	α-Rabbit IgG HRP	PABPC1	1:100	Christian Thoma
α-phospho-ATM / ATR	α-Rabbit IgG HRP	S / T-Q Phosphorylierungsstellen	1:5.000	Cell Signaling
α-Rentl	α-Goat IgG HRP	UPF1 ORF (C-Terminus)	1:2.000	Cell Signaling
α-β-Actin	α-Mouse IgG HRP	β-Actin	1:10.000	Sigma

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Antikörper in 5 % (w / v) Milch in TBS-T inkubiert. Der ATM / ATR Antikörper wurde in 0,2 % BSA inkubiert.

2.10 Enzyme

Enzyme wurden von den in Tabelle 11 aufgelisteten Herstellern und Lieferanten bezogen. Alle Restriktionsenzyme wurden vom Hersteller New England Biolabs bezogen. Aminoacyl-tRNA Synthetasen wurden selbst aus Retikulozytenlysat aufgereinigt (3.17.2).

Tabelle 11 Enzyme

Bezeichnung	Abkürzung	Hersteller / Lieferant
Alkaline Phosphatase	AP	Roche Diagnostics
AMV Reverse Transkriptase	AMV RT	Promega
DNase I		Roche Diagnostics
Phusion DNA-Polymerase		Finnzymes
Restriktionsenzyme	RE	New England Biolabs
RevertAid[™]H Minus M-MuLV RT	M-MuLV RT	Fermentas
RNase A		Roche Diagnostics
RNase-Inhibitor RNasin		Promega
SP6 RNA-Polymerase	SP6 RNA Pol	Roche Diagnostics
T3 RNA-Polymerase	T3 RNA Pol	Roche Diagnostics
T4 DNA-Ligase		Promega
T4 Polynukleotid-Kinase	T4 PNK	Fermentas
T7 RNA-Polymerase	T7 RNA Pol	Roche Diagnostics
Taq DNA-Polymerase	Taq DNA Pol	New England BioLabs

2.11 DNA-Oligonukleotide

DNA-Oligonukleotide dienten als Primer für PCR-Reaktionen, Sequenzierungen und Toeprinting. DNA-Oligonukleotide wurden von Biomers oder Sigma bezogen.

Tabelle 12 DNA-Oligonukleotide

Name	Sequenz	Funktion
β-globin2504	5'- agatgctcaaggcccttcata -3'	Toeprinting-Primer für ex vivo Toeprinting
β-globinTP1	5'- gcaatgaaaataaatttcc -3'	Toeprinting-Primer für MVHC-STOP und MVHL-STOP mRNA
β-globinTP2	5'- gcatttgagaggacagg -3'	Toeprinting-Primer für MVHC-STOP-P(A) mRNA
pcisII	5'- ggtgtccactcccagttca -3'	UPF1 Mutagenese
pciasII	5'- tgattctagttgtggtttgtc -3'	UPF1 Mutagenese

UPF1s1(S1073A/ S1078A)	5'- agatgagccagcccggcctc- gcccagccggagctggcccagg- acagttaccttg -3'	UPF1 Mutagenese: Ala	Ser ->
UPF1s2(S1096A/ S1116A)	5'- tcacaaatcgacgtggcgctcgc- acaggactccacgtaccagggagagc- gggcttaccagcatggcgggtgac- ggggctggcccagtattaa -3'	UPF1 Mutagenese: Ala	Ser ->
UPF1s1(S1073E/ S1078E)	5'- agatgagccagcccggcctc- gaacagccggagctggaacaggacagttaccttg-3'	UPF1 Mutagenese: Glu	Ser ->
UPF1s2(S1096E/ S1116E)	5'- tcacaaatcgacgtggcgctcgaacaggactc- cacgtaccagggagagcgggcttaccagcatggc- ggggtgacggggctggaacagtattaa -3'	UPF1 Mutagenese: Glu	Ser ->

2.12 RNA-Oligonukleotide

RNA-Oligonukleotide als Substrate im Helikase-Experiment sowie siRNAs sind in Tabelle 13 aufgeführt. Unmodifizierte RNA-Oligonukleotide wurden von Biomers bezogen, 21mer-siRNAs von Quiagen oder Dharmacon.

Tabelle 13 RNA-Oligonukleotide und siRNAs

Name	Funktion	Sequenz
13down	Helikase-Substrat	5'- CGUAAGUCCUCAG -3'
38up	Helikase-Substrat	5'- (CAAAA)5CUGAGGACUACG -3'
siLuc GL2	siRNAs	5`-AACGTACGCGGAATACTTCGA-3`
siUPF1-2	siRNAs	5`-AAGATGCAGTTCCGCTCCATT-3`

2.13 Bakterienstämme und Zelllinien

Tabelle 14 Zelllinien und Bakterienstämme

Bezeichnung	Organismus	Lieferant
BL-21 (DE3)	<i>E. coli</i>	Invitrogen
BL-21 Star (DE3)	<i>E. coli</i>	Invitrogen
BL21(DE3) Codon +	<i>E. coli</i>	Stratagene
DH10Bac	<i>E. coli</i>	Invitrogen
DH5α	<i>E. coli</i>	Invitrogen
M15	<i>E. coli</i>	Quiagen
XL-1Blue	<i>E. coli</i>	Stratagene
Hek 293 Flip-In	<i>H. sapiens</i>	Invitrogen
HeLa	<i>H. sapiens</i>	erhalten von N. Gehring
Sf 9	<i>S. frugiperda</i>	Invitrogen

2.13.1 Bakterienstämme

Genotypen der verwendeten Bakterien sind in Tabelle 14 zusammengefasst. Für die Präparation und Klonierung von rekombinanten Plasmiden wurde der *E. coli* Bakterienstamm XL1-Blue eingesetzt. *E. coli*-Bakterien des Stamms BL21(DE3), BL21 (DE) Codon +, BL21 Star (DE3), DH5 α wurden zur Proteinexpression verwendet. *E. coli* DH10Bak-Zellen wurden zur Herstellung und Isolierung rekombinanter Bakmid-DNA eingesetzt.

2.13.2 Eukaryontische Zelllinien

Humane, epitheliale Zervixkarzinomzellen (HeLa-Zellen) wurden für *ex vivo* Toeprinting, Pulldown-Experimente und NMD-Experimente eingesetzt.

HEK 293-FlipIn-Zellen (Invitrogen) wurden als Ausgangszellen zur Etablierung stabiler transgener Zelllinien für die Proteinexpression verwendet. Es handelt sich hierbei um Adenovirus-transformierte humane, embryonische Nierenzellen (Hek293) mit stabil ins Genom integrierten FlipIn-Stellen (Invitrogen).

2.14 Antibiotikakonzentrationen

Tabelle 15 **Antibiotikakonzentrationen**

Antibiotikum	Konzentration
Ampicillin	100 μg / ml
Gentamicin	7 μg / ml
Hygromycin	200 μg / ml
IPTG	40 μg / ml
Kanamycin	50 μg / ml
Tetrazyklin	10 μg / ml

2.15 Kaninchenretikulozytenlysate

Das Kaninchenretikulozytenlysate zur Aufreinigung von Translationsfaktoren stammte von der Firma Green Hectares (Oregon). Zur *in vitro* Translation bei der Aufreinigung von Terminationsintermediaten wurde Micrococcal-Nuklease-behandeltes Retikulozytenlysate verwendet (Promega).

2.16 Sonstiges

Sämtliche Kunststoffwaren für Zellkultur, Bakteriologie, PCR, Biochemie und Molekularbiologie wurden von den Firmen Sarstedt, Falcon, Nalgene, TPP Europe, Nunc, Greiner Bio One, Biozym und Eppendorf bezogen.

Weitere Laborbedarfsartikel sind in Tabelle 16 beschrieben.

Tabelle 16 **Sonstiger Laborbedarf**

Bezeichnung	Anwendung	Hersteller / Lieferant
Beckman Coulter Polyallomer Zentrifugenröhrchen	Ultrazentrifugation	Beckman Coulter
Centricon YM100 Filtereinheiten	Zentrifugation / Konzentration	Millipore
Hyperfilm™ ECL	Filme für chemilumineszierende Signale	Amersham
Hyperfilm™ MP	Filme für radioaktive Signale	Amersham
Membranfilter RC 58, Porengröße 0,2 µm	Sterilfiltration	Schleicher & Schüll
Microcon YM30 Filtereinheiten	Zentrifugation / Konzentration	Millipore
Phosphorimager-Screens	Quantifizierung radioaktiver Signale	Molecular Dynamics, Fuji
Polyprep chromatography columns	Affinitätsaufreinigung / Pulldowns	BioRad
Sephadex G-50 spin-50 mini Säulen	Nukleinsäureaufreinigung	USA Scientific
Spectrum Spektrapor 3RC 25mm	Dialyseschlauch	Fischer Scientific
Zellschaber	Zellkultur	Greiner Bio-One

3 Methoden

3.1 Standard-Methoden

Die Protokolle für grundlegende Methoden, wie z.B. Ethanol- oder Isopropanol-Fällung oder Phenol-Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren, wurden allgemein gebräuchlichen Laborhandbüchern (z. B. Sambrook et al., 1989) entnommen.

3.2 Bioinformatik-Tools

Verwendete Programme und Websites sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 17 Bioinformatik-Tools

Programm	Funktion / Nutzung	Referenz
Clustalw2	Multiple Alignments	Larkin et al., 2007
Oligocalc	Primerdesign	Kibbe et al. 2007
Serial cloner	Planung von Klonierungen	www.serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html
Blast	DNA- und Protein-Sequenzanalyse / Alignments	Altschul et al., 1990
Finch TV	DNA-Sequenzanalyse	
BAS Reader	Phosphoimaging	
Aida Image analyzer V 3.28	Auswertung von Phosphoimager-Daten	
PaxDB	Proteinabundanzen anhand Shotgun-Proteomics Daten	www.pax-db.org
ASTD 1.1	Alternatives Spleißen und Transkript-diversitätsdatenbank	www.ebi.ac.uk/astd/main.html

3.3 Mikrobiologische Methoden

3.3.1 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Kompetente XL-1 blue *E. coli*-Zellen wurden von N. Echner nach Protokollen aus allgemein gebräuchlichen Laborhandbüchern hergestellt.

3.3.2 Transformation von XL1-Blue Zellen mittels Hitzeschock

Kompetente *E. coli*-Zellen (0) wurden auf Eis aufgetaut. 100 µl *E. coli*-Zellen wurden bei einer Retransformation mit 100ng DNA, bei einer Ligation mit 10 µl Ligationsansatz vermischt. Nach Zugabe der DNA wurden die Zellen für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Es folgten der Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42 °C und eine erneute Inkubation für 2 Minuten auf Eis. Nach Zugabe von 600 µl LB-Medium wurden die Zellen für weitere 45 Minuten bei 37 °C kul-

tiviert. Bei einer Retransformation wurden 100 µl dieses Ansatzes auf LB-Agarplatten, mit einem der Antibiotikaresistenz der eingesetzten Plasmide entsprechendem Antibiotikum (2.8) in der vorgesehenen Konzentration (2.14) ausplattiert. Bei einer Ligation (3.4.2.2) wurde der gesamte Ansatz durch dreiminütige Zentrifugation bei 3000 rpm in einer Tischzentrifuge sedimentiert und ausgestrichen. Es folgte eine Kultivierung bei 37 °C über Nacht. Die entstehenden Bakterienkolonien wurden dann für DNA-Preps im Mini oder Midi-Maßstab verwendet.

3.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Einzelkolonien wurden mit einer Pipettenspitze genommen und in 2 ml (Miniprep) oder 100 ml (Midiprep) LB-Medium über Nacht kultiviert. Zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus Übernachtskulturen wurden entsprechende Mini- oder Midiprep Kits nach Herstellerangaben verwendet (Marchery und Nagel).

3.4 Gentechnologische Methoden

3.4.1 PCR

Auf PCR basierende Techniken wurden zur Mutagenese, zur Verifizierung von Inserts bei Klonierungen und zur Quantifizierung der Abundanz von bestimmten mRNAs herangezogen.

3.4.1.1 Primerdesign

PCR- und Toeprinting-Primer wurden möglichst nach den Kriterien in Tabelle 18 ausgewählt. Zur Analyse von PCR-Primern wurde das Online-Tool Oligocalc verwendet.

Tabelle 18 **Richtlinien beim Primerdesign**

Sequenzierungen, Klonierungen
Vermeidung von Sekundärstruktur (Hairpins)
Vermeidung von Primer-Dimeren
Schmelztemperatur über 50 °C
Länge zwischen 18 und 21 Nukleotiden
Zwei Pyrimidinbasen am 3`-Ende
zusätzlich bei Toeprinting-Primern:
Abstand zum Initiations- / Terminationskodon 70-150 bp

3.4.1.2 PCR-Programme und Primer

Eine Übersicht über die verwendeten PCR-Programme wird in Tabelle 19 gegeben. Primer siehe (2.11).

Tabelle 19 PCR-Programme

Arbeitsschritt	Programm 1: Kolonie-PCR		Programm 2: Standard	
	Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit
Zellaufschluss / Denaturierung	98 °C	2 min	98 °C	2 min
Denaturierung	98 °C	30 s	98 °C	30 s
Annealing	55 °C	30 s	55 °C-65 °C	30 s
Elongation	72 °C	1 min / kb	72 °C	1 min / kb
Endelongation	72 °C	10 min	72 °C	10 min
Anzahl Zyklen		25x		25-40x

3.4.1.3 PCR-Mutagenese: Standard

Für PCR-Reaktionen zur Herstellung von DNA-Fragmenten für Klonierungen oder zur Verifizierung von Inserts wurden 100ng Vektor-DNA, je 0,4 µM Sens- und Antisens-Primer, 0,4 mM dNTPs, 1 Einheit Phusion High Fidelity Polymerase (Finnzymes), 1 x Phusion HF-Puffer in einem Volumen von 50 µl angesetzt. PCR-Programm: Standard.

3.4.1.4 PCR-Mutagenese: UPF1

Zur Mutagenese von UPF1 (FLAG-UPF1-4SA, FLAG-UPF1-4SE) wurde wie unter (3.4.1.3) beschrieben verfahren, jedoch wurde anstelle von HF-Puffer der GC-Puffer verwendet und pro Ansatz 10 µl Betain zugegeben. pCneo-FLAG-UPF1 oder pCneo-FLAG-UPF1si wurden mit den Primern pClantisens II, UPF1sens1 und UPF1sens2 amplifiziert (2.11), das Amplifikationsprodukt wurde dann in einer zweiten PCR als Antisens-Primer, in Kombination mit pClisensII, eingesetzt. Das entstandene PCR-Fragment wurde mit NheI / NotI verdaut und in pCneo oder pcDNA5-FRT einkloniert.

3.4.1.5 PCR-Punktmutagenese: Kit

Einfache Punktmutagenesen wurden mit dem GeneTailor Site-directed Mutagenesis Kit (Invitrogen) nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.4.1.6 Kolonie-PCR

Zur schnellen Identifizierung positiver Klone wurde bei schwierigen Klonierungen Kolonie-PCR durchgeführt. Hierbei wurde zuerst ein Mastermix aus je 0,4 μM der beiden Primer, 1 μl Taq Polymerase, Taq Polymerase Puffer, 0,4 mM dNTPs hergestellt und zu je 20 μl in 0,5 μl PCR-Gefäße aliquotiert. Dann wurde je ein Teil der zu überprüfenden Kolonie mit einer Pipettenspitze in den PCR-Ansatz gegeben. Der verbleibende Rest wurde auf eine LB-Agar Platte gestrichen. Zum Zellaufschluss wurde der PCR-Ansatz zuerst für 5 Minuten auf 98 °C erhitzt. Daraufhin wurde PCR-Programm 1 gewählt (3.4.1.2). Im Anschluss an die PCR wurde Agarosegelelektrophorese (3.6.3.1) durchgeführt.

3.4.2 Klonierungen

Ausgangsvektoren, Restriktionsenzyme und Inserts für die verschiedenen Plasmide sind Tabelle 9 zu entnehmen. Durch PCR hergestellte Inserts sind unter (3.4.1) beschrieben.

3.4.2.1 DNA-Restriktionsverdau

Die Reaktionsbedingungen für Restriktionsverdau (Temperatur, Puffer, Zugabe von BSA) entsprachen den Angaben des Herstellers (NEB). Beim präparativen Restriktionsverdau wurden zwischen 3 μg und 10 μg Vektor-DNA in einem Gesamtvolumen von 40 μl über einen Zeitraum von ungefähr 4 Stunden bei 37 °C geschnitten. Je nach Pufferkompatibilität der verwendeten Restriktionsenzyme wurden Einzel- oder Doppelverdau durchgeführt. Um die Religation unvollständig geschnittener Vektor-DNA zu verhindern, wurde diese mittels alkaliner Phosphatase (Roche) dephosphoryliert. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden dann durch Gelelektrophorese aufgetrennt und über Gelextraktion (Gel extraction and PCR Purification Kit, Marchery & Nagel) aufgereinigt und in 50 μl H_2O eluiert.

3.4.2.2 Ligation

In einem 20 μl Ligationsansatz wurden 2 μl 10 x Puffer, 1 Einheit T4 DNA-Ligase (Promega), 0,5 μl geschnittener Vektor und 8 μl Insert eingesetzt. Die Ligation wurde für mindestens eine Stunde oder alternativ über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

3.4.2.3 Plasmidsequenzierung

Die Sequenzierung neuer Konstrukte wurde von GATC Biotech (Konstanz, Deutschland) durchgeführt. Zur Sequenzanalyse wurde sowohl das Programm Finch TV, als auch die online Tools BLAST (für genomweite Alignments) und CLUSTALW2 (für multiple Alignments) verwendet. Die Erstellung von Plasmid-Grafiken erfolgte mit Serial cloner 2.1 (3.2).

3.5 Zellkulturmethoden

Verwendete Nährlösungen und Zellkulturmedia sind in (2.4), Antibiotikakonzentrationen sind in (2.14) beschrieben.

3.5.1 Kultur eukaryontischer Zellen

HeLa- und Hek 293-Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂-Sättigung inkubiert. DMEM-Medium, supplementiert mit 10 % fötalem Kälberserum (Gibco), 100 U / ml Penicillin und 100 µg / ml Streptomycin (PAA) diente als Zellkulturmedium. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage nach Erreichen von ca. 90 % Konfluenz trypsinisiert und in einer 1 / 5 oder 1 / 10 Verdünnung neu ausgesät. Nach 20-30 Passagen wurden neue Zellen aufgetaut.

3.5.2 Einfrieren eukaryontischer Zellen

Die Zellen wurden durch Trypsinisieren oder Abschlagen gelöst und nach Zugabe von 10 ml kaltem Medium bei 500 rpm 4 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in eiskaltem FCS mit 10 % DMSO resuspendiert und langsam, durch Einwickeln in Papiertücher, auf -80 °C abgekühlt. Die langfristige Aufbewahrung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

3.5.3 Transiente Transfektion humaner Zellen

Am Vortag der Transfektion wurden unabhängig von der gewählten Transfektionsmethode 1×10^6 HeLa- oder 2×10^6 Hek293-Zellen in 10 cm-Zellkulturschalen in DMEM-Medium ausgesät. Für Experimente in 6-Well-Platten wurden Zellzahl und Reagenzienmenge im Maßstab eins zu fünf verringert.

3.5.3.1 DNA-Transfektion mit der BBS-Kalziumphosphat-Methode

Das Kulturmedium wurde 2-4 Stunden vor der Transfektion gewechselt. Pro Transfektion wurden auf eine 10 cm Schale 30 µg DNA eingesetzt. Diese bestand aus einem oder mehreren Reporterplasmiden und 1 µg YFP-Expressionsvektor, um die Qualität der Transfektion

unter einem Fluoreszenzmikroskop einschätzen zu können. Bei NMD-Experimenten wurde zur Kontrolle der Transfektionseffizienz ein weiteres Plasmid (+ 300) kotransfiziert, welches in Northern Blots detektierbar ist. Die DNA wurde auf 450 µl Gesamtvolumen aufgefüllt, dann wurden zuerst 50 µl einer 2,5M Kalziumchloridlösung und dann 500 µl einer 2 x BBS-Stammlösung zugegeben und durch Vortexen gemischt. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz tropfenweise auf die Zellen gegeben und gut vermischt. Nach 20 Stunden Inkubation bei 3 % CO₂, wurde zweimal mit 1 x TBS gewaschen. Nach weiteren 24 Stunden bei 5 % CO₂, um die Expression der transfizierten Konstrukte zu ermöglichen, konnten die Zellen durch Trypsinisieren oder Abschaben geerntet werden (3.8).

3.5.3.2 DNA-Transfektion mit der HBS-Kalziumphosphat-Methode

Die HBS-Transfektion wurde durchgeführt, da die Zellen hierdurch im Vergleich zur BBS-Methode lichtmikroskopisch weniger gestresst aussahen, geringere Schwankungen in der Transfektionseffizienz auftraten und kein 3 % CO₂-Inkubator benötigt wurde. Das Kulturmedium wurde 2-4 Stunden vor der Transfektion gewechselt. Zur Transfektion mit HBS wurden 30 µg DNA, in einem Gesamtvolumen von 30 µl, eingesetzt. Zum Auffüllen der DNA-Menge auf 30 µg wurde der pGem4Z-Vektor verwendet, da dieser keinen eukaryontischen Promoter besitzt. Es erfolgte die Zugabe von 500 µl HBS und 30 µl 2.5M Kalziumchlorid, dann wurde der Ansatz nach kräftigem Vermischen 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf die Zellen pipettiert. Nach 24 h Inkubation bei 5 % CO₂, wurde zweimal mit TBS gewaschen, am nächsten Tag erfolgte die Zellernte.

3.5.3.3 siRNA-Transfektion mit Oligofektamin (Invitrogen)

Für die siRNA-vermittelte Reduktion von UPF1, wurden $1,2 \times 10^5$ HeLa- Zellen 24 h vor der Behandlung mit den siRNAs in 6-Well-Zellkulturplatten in DMEM-Medium ausgesät. Die siRNA-Transfektion erfolgte mit Oligofektamin Transfektionsreagenz in OptiMEM Medium ohne Serum und Antibiotika (beides von Invitrogen). UPF1 und Luziferase-siRNAs (2.12) wurden bei Quiagen bestellt. Pro Well wurden 3 µl Oligofektamin mit 15 µl OptiMEM gemischt. Desweiteren wurden 5 µl UPF1 siRNA (20 µM Stammlösung, für eine Finalkonzentration von 100nM) mit 180 µl OptiMEM gemischt und beides für 5 min bei RT inkubiert. Dann wurden beide Ansätze durch Vortexen gemischt und für 15 min bei RT inkubiert, in der Zwischenzeit wurden die Zellen zweimal mit OptiMEM Medium gewaschen. Dann wurden 800 µl Opti-

MEM / 6-Well zugegeben, vorsichtig gemischt und je 1 ml dieses Ansatzes auf ein 6-Well gegeben. Nach 4 h wurde 1 ml DMEM mit 20 % FCS, 2 % P / S zugegeben. Nach weiteren 16 h wurden die Zellen einmal mit DMEM gewaschen und in DMEM für 24-48 h weiterkultiviert. Für NMD Rescue-Experimente (3.14) wurden die Zellen in 1 ml DMEM für 4 h bis zur DNA-Transfektion mit BBS (3.5.3.1) weiterkultiviert. Die Ernte von RNA und Protein erfolgte nach weiteren 48 h.

3.5.4 Stabile Transfektion eukaryontischer Zellen

Zur Herstellung stabiler Zelllinien wurde 48 h nach der Kalziumphosphat-Transfektion mit der Antibiotika-Selektion mit 200 µg / ml Hygromycin (Hek 293- FlipIn-Zellen) oder Geneticin (HeLa-Zellen) begonnen. Das Absterben der nicht stabil transfizierten Zellen setzte nach weiteren 2 bis 3 Tagen ein. Zur Entfernung toter Zellen wurde daraufhin ein Mediumwechsel durchgeführt, danach wurden die Zellen für 2-3 Wochen, bis zum Aufwachsen der stabilen Zellklone, selektioniert. Diese positiven Klone wurden nun zuerst vereinzelt und expandiert, dann wurde die Proteinexpression im Immunoblot (3.11) überprüft. Da das Zielgen beim FlipIn-System immer an gleicher Stelle ins Genom integriert wird, konnten die positiven Klone zur schnelleren Expansion gepoolt werden. Die Proteinexpression wurde daraufhin durch einen FLAG-Pulldown und SDS-PAGE validiert.

3.6 Gelelektrophoretetechniken

Durch Gelelektrophorese können RNA, DNA und Proteine entsprechend ihrer Größe und Ladung aufgetrennt werden. Rezepturen für Polyacrylamidgele sind in Tabelle 4 beschrieben.

3.6.1 Polyacrylamidgelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen

Als Ladepuffer diente STOP solution (2.3), zur Denaturierung der Nukleinsäuren enthält dieser Puffer Formamid.

3.6.1.1 Harnstoffgele zur Qualitätsanalyse von *in vitro* synthetisierter RNA

Je 1 µl *in vitro* synthetisierter RNA wurde in STOP solution auf ein 12 % natives Acrylamidgel aufgetragen und bei 300 V für 30 min aufgetrennt (Laufpuffer: 1 x TBE). Durch Methylenblaufärbung (3.7.3) wurde die RNA (und evtl. vorhandene Degradationsprodukte) sichtbar gemacht.

3.6.1.2 Toeprinting-Gele (Sequenziergele)

Die Auftrennung der radioaktiven (in STOP Solution resuspendierten) Proben aus dem Primerextensionsinhibitions- (Toeprinting-) Experiment (3.20.2.2) erfolgte auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel (für RNA / DNA, s. 2.3) mit 1 x TBE als Laufpuffer bei 32 mA, je nach Primer für 1 h 15 min bis 2 h (Sequenziergelkammern, Owl separation systems). Zur Darstellung der Position der verschiedenen cDNA-Fragmente wurde auch eine Sequenzierreaktion geladen (3.15.3). Danach wurde das Gel mit Fixierlösung fixiert, getrocknet (Geltrockner, BIO-RAD 583) und exponiert (3.7.4).

3.6.1.3 SDS-PAGE (Proteingele)

SDS-Proteingele bestanden aus einem 5 % Sammel- und einem (je nach Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine) 6-12 % Trenngel. Die Proben wurden mit Proteinladepuffer (6x) versetzt. Durch 2-minütiges Erhitzen auf 95 °C wurden die Proteine denaturiert. Durch das im Puffer und Gel enthaltene SDS sind sie negativ geladen. Sie wurden dann in 1 x Lämmli-puffer für ca. 1 h bei 45 mA nach ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch aufgetrennt. Hierbei diente das Sammelgel zur Fokussierung der Probe, die Auftrennung erfolgte im Trenngel.

3.6.2 Polyacrylamidgelelektrophorese unter nativen Bedingungen

Zur Auftrennung von einzel- bzw. doppelsträngiger RNA im Helikaseassay wurden native Polyacrylamidgele (2.3) und als Ladepuffer native STOP solution verwendet. Die verschiedenen RNA-Spezies wurden für 2 h bei 15 mM bei 4 °C getrennt. Das Gel wurde in Fixierlösung fixiert, getrocknet und exponiert (3.7.4).

3.6.3 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

3.6.3.1 Agarose-Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Überprüfung / präparativen Gewinnung von Midipreps, PCR-Produkten und Restriktionen eingesetzt. Zur Herstellung eines Agarosegels wurde eine entsprechende Agarosemenge eingewogen und in 1 x TBE Puffer aufgekocht, dann mit Ethidiumbromid (35 µg / 100 ml) versetzt und in einen Gelschlitten gegossen. Die verwendeten Agarosekonzentrationen lagen zwischen 0,8 % (w / v) für große (>2 kb) und 1,6 % für kleinere Fragmente. Nach Festwerden der Agarose wurde das Gel in eine mit 1 x

TBE gefüllte Biometra Elektrophoresekammer gelegt. Nach Laden des Längenmarkers (100 bp oder 1 kb Marker, NEB) und der Proben in DNA-Probenpuffer erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung bei 150 V, wobei die negativ geladene DNA zur Anode läuft. Unter UV-Licht wurde die mit Ethidiumbromid markierte DNA in einer Geldokumentationsanlage (Herolab) sichtbar gemacht.

3.6.3.2 Agarose-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen

Beim Northern Blotting wurden zur Denaturierung der RNA Formamidgele verwendet. 2,5 g Agarose wurden in 130 ml H₂O aufgeköcht, dann wurden 42 ml Formaldehyd und 18 ml 10 x MOPS zugegeben. Die Vorbereitung der Proben ist unter (3.13) beschrieben. Als Laufpuffer diente 1 x MOPS, die Elektrophorese erfolgte bei 42 V über Nacht.

3.7 Nachweis- und Färbetechniken

3.7.1 Coomassie-Proteinfärbung

100 ml Coomassie-Färbelösung wurden in der Mikrowelle erhitzt, dann wurde das Polyacrylamidgel darin für 10 Minuten auf einem Schüttler inkubiert. Die Entfärbelösung wurde erhitzt und alle 10 Minuten gewechselt, bis die Proteinbanden deutlich erkennbar waren.

3.7.2 Silberfärbung von Proteingelen

Die Silberfärbung von Proteingelen wurde mit dem Silver Quest Kit von Invitrogen nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.7.3 Methylenblau Nukleinsäurefärbung

Nach der Gelelektrophorese wurden die DNA- oder RNA-Polyacrylamidgele mit Methylenblau-Färbelösung für 10 min auf einem Schüttler inkubiert. Nach Entfärbung mit H₂O werden die Nukleinsäuren erkennbar.

3.7.4 Nachweis und Quantifizierung radioaktiver Signale

Zur Detektion radioaktiver Signale wurden Röntgenfilme (Amersham Hyperfilm MP) benutzt. Zur Quantifizierung der Signale wurde ein Phosphorimager (FLA-3000, FUJIFILM) verwendet und die Daten mit der Software BASreader, Aida Image Analyzer V.3.28, ausgewertet.

3.8 Isolierung von zytoplasmatischer RNA und Protein aus eukaryontischen Zellen

Zur Isolierung zytoplasmatischer RNA aus 6-Well-Platten wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen nach Zugabe von 250 µl eiskaltem zytoplasmatischem Lysepuffer (2.3) von der Oberfläche der Zellkulturschalen mit einem sterilen Zellschaber (Greiner) abgeschabt. Diese und alle weiteren Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Durch Pipettieren wurden die Zellen vereinzelt und zur vollständigen Lyse für 10 Minuten in 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen auf Eis inkubiert. Dann wurden die unlöslichen Bestandteile, vor allem also Membranen und Zellorganelle, für 10 min bei 10.000 rpm abzentrifugiert. Vom Überstand wurden 50 µl für Proteinanalysen abgetrennt und bei -20 °C weggefroren, die restlichen 200 µl wurden in ein neues Gefäß überführt, mit 750 µl Trizol LS nach Herstellerangaben extrahiert, nach Isopropanolfällung in 12 µl H₂O resuspendiert und zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Für 10 cm Schalen kann man die Reaktion im Maßstab 1 / 5 „upscalen“.

3.9 Protein-, DNA- und RNA-Messung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Zellextrakten erfolgte mit dem Bio-Rad Protein-Assay. Aus der Messung der Absorption bei 595 nm in einem Beckmann Spektrophotometer ergab sich unter Verwendung einer BSA-Eichkurve die Proteinkonzentration der Probe.

Zur Bestimmung der RNA- oder DNA-Konzentration wurde die Absorption einer 1:100 Verdünnung der Probe bei 260 nm gemessen.

3.10 FLAG-Pulldown

Für die Interaktionsstudien zwischen Terminationsfaktoren und UPF1 wurden HeLa-Zellen in 10 cm Schalen mit je 10 µg der FLAG- und V5-getaggten Konstrukte transfiziert (3.5.3.2). Die Zellernte erfolgte durch Abschaben in 1 ml FLAG Pulldown Lysepuffer (2.3). Nach 10-minütigem RNAse A-Verdau bei 4 °C, unter ständiger Rotation, wurden unlösliche Zellbestandteile abzentrifugiert und der Überstand mit 30 µl Anti-FLAG M2 Agarose Affinity Gel (Sigma) unter Rotation für 2 h bei 4 °C inkubiert. Daraufhin wurden die Agarosebeads mit den gebundenen Proteinen 5 min bei 3000 rpm sedimentiert und der Überstand abgenommen. Es folgten drei Waschschriffe für je 10 min mit 1000 µl Lysepuffer, der letzte Waschschriff wurde auf Bio-Rad-Chromatographiesäulen gegeben, um durch 30 s Zentrifuga-

tion bei 10.000 rpm möglichst alle Flüssigkeit zu entfernen. Durch Zugabe von 60 µl 1 x Lämmli-Ladepuffer wurden die gebundenen Proteine dann von der Säule eluiert und für Immunoblot-Analysen eingesetzt (3.11).

3.11 Immunoblot

Im Immunoblot lassen sich Proteine mit Antikörpern spezifisch nachweisen. Es wurden 20 µg Gesamtproteinlysat (3.8) oder die Hälfte der Ko-Immunopräzipitation (3.10) eingesetzt. Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE (3.6.1.3) wurden die Proteine in einem Semi-Dry-Blotter (Bio-RAD) durch Elektrophorese aus dem Gel heraus und auf eine PVDF Membran übertragen. Verwendete Anoden- und Kathodenpuffer sind in Abschnitt 2.3 beschrieben. Im Anschluss wurde die Membran mit 5 % Magermilch oder 0,5 % BSA in 1 x TBS-T für 2 x 20 min geblockt und dann über Nacht mit dem Erstantikörper (2.9) bei 4 °C auf einem Schüttler (Biometra) inkubiert. Dann wurde die Membran für 2 x 10 min mit TBS-T gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur mit einem geeigneten HRP-konjugierten Zweitantikörper (2.9) inkubiert. Nach 4 x 10 min Waschen in TBS-T wurde ECL oder ECL PLUS für 2 min auf die Membran gegeben. Das Enzym HRP katalysiert die Umsetzung des Substrates Luminol und ermöglicht die chemilumineszente Detektion des Signals mithilfe eines geeigneten Films (Hyperfilm ECL, Amersham).

3.12 Nachweis der differentiellen Phosphorylierung von UPF1 und Phosphatase-Behandlung

Die verschiedenen Phosphorylierungsgrade von Okadeinsäure- oder Wortmannin-behandeltem UPF1 wurden im Immunoblot (3.11) detektiert. Als Kontrolle wurde ein Teil der Proben mit alkaliner Phosphatase (Roche) für 3 h bei 37 °C in Translationspuffer dephosphoryliert. Ein α-ATM / ATR-Antikörper (Cell Signaling) wurde dann im Immunoblot, zum Nachweis von phosphoryliertem UPF1, eingesetzt. Der Antikörper erkennt die S / T-Q Phosphorylierungsstellen von UPF1. Als Ladekontrolle wurde ein α-UPF1 Antikörper eingesetzt, der auch nicht-phosphoryliertes UPF1 detektiert.

3.13 Northern Blot

5 µg zytoplasmatische RNA wurden mit 16 µl Northern RNA-Probenpuffer im Heizblock für 10 min bei 65 °C denaturiert, sofort auf Eis mit 2 µl Northern-Ladepuffer versetzt, und auf

einem 1,4 % Formamid-Agarosegel (3.6.3.2) in 1 x MOPS Puffer über Nacht bei 42 V aufgetrennt. Danach wurde die RNA für 4 h oder über Nacht durch Kapillartransfer in 20 x SSC-Puffer auf eine Nylonmembran (Nytran N45, Schleicher & Schüll) übertragen. Dann wurde die RNA durch UV-Bestrahlung ($120\text{mJ} / \text{cm}^2$) in einem Stratalinker kovalent an die Membran gebunden. Nach der einstündigen Prä-Hybridisierung in Church-Puffer, wurde eine radioaktiv markierte RNA-Sonde (Abschnitt 3.19.6) dann ebenfalls in Church Puffer bei $65\text{ }^\circ\text{C}$ über Nacht an die β -Globin RNA gebunden. Die Membran wurde dann bei $65\text{ }^\circ\text{C}$ gewaschen (2 x 15 min Northern Waschpuffer 1, dann 2 x 15 min Northern Waschpuffer 2). Die Membran wurde daraufhin getrocknet und das radioaktive Signal mit einem Phosphorimager quantifiziert (3.7.4) und durch Röntgenfilm-Autoradiographie dokumentiert.

3.14 NMD-Rescue-Experiment

Zur funktionellen Charakterisierung der mutanten UPF1-Isoformen wurde ein NMD-Rescue-Experiment durchgeführt (Gehring et al., 2003). Durch Knockdown von endogenem UPF1 mit siRNAs (3.5.3.3) ist NMD inhibiert und endogene NMD-Targets oder NMD-Reporter-mRNAs sind hochreguliert, wie man durch qPCR oder Northern Blot (3.13) nachweisen kann. Durch Ko-Expression einer siRNA-resistenten Variante von UPF1 (durch Mutation der siRNA-Bindestelle unter Beibehaltung der Wildtyp-Aminosäuresequenz), kann die ursprüngliche NMD-Effizienz wieder hergestellt werden. Hierzu wurden die Zellen 24 h nach der siRNA-Transfektion mit $0,2\text{ }\mu\text{g}$ YFP, $2\text{ }\mu\text{g}$ flag-UPF1si (Wildtyp oder Mutanten), $1\text{ }\mu\text{g}$ pCI-NS39 oder -WT NMD-Reporter DNA und $0,3\text{ }\mu\text{g}$ + 300-Kontrollvektor transfiziert und nach weiteren 48 h geerntet (3.8). Die Analyse der mRNA-Expression erfolgte mittels Northern Blot (3.13).

3.15 Ex vivo Toeprinting

3.15.1 Herstellung von Zellextrakten für *ex vivo* Toeprinting

Je Konstrukt wurden zwei 10 cm-Zellkulturschalen mit HeLa-Zellen mit je $20\text{ }\mu\text{g}$ Reporter-DNA und $1\text{ }\mu\text{g}$ YFP mit BBS transfiziert (3.5.3.1). Die Zellen wurden zur Ernte einmal mit 5 ml eiskaltem PBS mit $100\text{ }\mu\text{g} / \text{ml}$ CHX auf Eis gewaschen. Dann wurden die Zellen in 1 ml mit $100\text{ }\mu\text{g} / \text{ml}$ CHX abgeschabt, in ein vorgekühltes 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und durch 4 min Zentrifugation bei 500 rpm sedimentiert. Der Zellpellet wurde dann in $200\text{ }\mu\text{l}$ Toeprinting-Lysepuffer resuspendiert und in ein vorgekühltes Precellys-Röhrchen (Precellys Keramik Kit, Peqlab) mit $1,4\text{ mm}$ Keramikkügelchen gegeben. Durch 40 s Vortexen auf höchster

Stufe, wurden die Zellen aufgebrochen, Zellbruchstücke und Zellkerne wurden durch Zentrifugation (1 min bei 14000 rpm) entfernt. Der Extrakt wurde dann in kleinen Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.15.2 Primer Labeling

Zum Primer-Labeling wurden 2 µl T4-Polynukleotidkinase, 2 µl 10 x T4-PNK Puffer, 0,5 µl Primer (10 µM) und 4,5 µl ATP ($\gamma^{32}\text{P}$) bei 37 °C für 30 min inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl PN-Puffer (Quiagen) wurde der Primer zum Entfernen von nicht eingebautem ($\gamma^{32}\text{P}$)-ATP für 1 min bei 5000 rpm an eine QIAquick Gel Extraction Säule gebunden. Nach zweimaligem Waschen mit PE-Puffer und Abzentrifugieren für 1 min bei 5000 rpm, wurde die Säule für 1 min bei 14000 rpm getrocknet und der Primer in 50 µl H₂O eluiert.

3.15.3 Sequenzierreaktionen

Um den Primer an die DNA zu binden, wurden je 30 µg des jeweiligen Plasmids (mit der β -Globin cDNA) zusammen mit 7 µg Primer -durch Zugabe von 0,1 Volumen 2 M Natriumhydroxidösung mit 2 mM EDTA- für 10 min bei Raumtemperatur denaturiert und dann mit 1 µl Glykogen, 0,1 Volumen 1 M Natriumazetat pH 5,5 und 2,5 Volumen Ethanol gefällt, in 42 µl H₂O resuspendiert und in 7 µl Aliquots bei -20 °C gelagert. Zur Herstellung der Sequenzierleiter wurde ein Aliquot aufgetaut und die Kettenabbruchreaktion nach Herstellerangaben durchgeführt (Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit, USB). Die Sequenase ist eine modifizierte T7 DNA-Polymerase, die auch ddNTPs als Substrat erkennt. Den ddNTPs fehlt eine 3'OH-Gruppe, die Elongationsreaktion bricht daher ab. Durch Zugabe von $\alpha\text{-}^{35}\text{S}$ -dATP und limitierender Menge an Nukleotiden entstehen im Kettenabbruchverfahren, in 4 Ansätzen mit je einem ddNTP, radioaktiv markierte DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe, die im Toeprinting als Längenstandard eingesetzt werden können.

3.15.4 Toeprinting mit Zellextrakt

2-5 µl Zellextrakt (3.15.1) wurden für 4 min auf 50 °C erhitzt und dann sofort auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 2 µl radioaktivem Primer wurde dieser für 2 min bei 50 °C und direkt im Anschluß für 2 min bei 40 °C an die β -Globin-mRNA im Extrakt gebunden. Dann wurden je 200 µl auf 40 °C vorgewärmter Toeprinting-Reverse Transkriptase-Mix zugegeben und alles für weitere 40 min zur cDNA-Synthese inkubiert. Durch Phenol / Chloroform-Extraktion und

Ethanol-Präzipitation wurden die cDNA-Fragmente aufgereinigt und durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (3.6.1.2) aufgetrennt, wobei auch eine Sequenzierreaktion (3.15.3) geladen wurde, um anhand der Länge der cDNA-Fragmente die Position der Ribosomen auf der mRNA bestimmen zu können. Die Gele wurden anschließend getrocknet und das radioaktive Signal quantifiziert.

3.16 Proteinexpressionsmethoden

Tabelle 20 listet die rekombinant exprimierten Proteine, Vektoren und deren spezifische Expressionsbedingungen (Vektor, Organismus, Temperatur, Induktion, Antibiotika) auf. Transiente Transfektionen humaner Zellen sind in Abschnitt (3.5.3) beschrieben.

Tabelle 20 Proteinexpression und Aufreinigung

Protein und Vektor	Beschreibung	Organismus	Induktion	Antibiotika	Aufreinigung	Erhalten von / Referenz
pET28 (eIF1A)	His-Tag, Expression von eIF1A	BL21 STAR	DE3 37 °C bis OD = 0,5, 1 mM IPTG 3 h 37 °C	Kan	NiNTA, MonoQ (100-500 mM KCl), nicht dialysieren	Tatyana Pestova ((Pisarev et al., 2007b), und Referenzen)
pET28 (deIF5B)	His-Tag, Expression von trunkiertem eIF5B	BL21 STAR	DE3 37 °C bis OD = 0,4, 1 mM IPTG 2 h 30 °C	Kan	2 mM Pefabloc vor Sonikation, NiNTA, MonoQ (30-500 mM KCl), nicht dialysieren	Tatyana Pestova ((Pisarev et al., 2007b) und Referenzen)
pET15 (eIF4B)	His-Tag, Expression von eIF4B	BL21 STAR	DE3 37 °C bis OD = 0,5, 1 mM IPTG 3 h 37 °C	Amp	2 mM Pefabloc vor Sonikation, NiNTA, MonoQ (100-500 mM KCl), nicht dialysieren	Tatyana Pestova ((Pisarev et al., 2007b), und Referenzen)
pET15b (eRF3a)	His-Tag, Expression von eRF3a	BL21 Codon PLUS	DE 37 °C bis OD = 0,5, 1 mM IPTG 2 h 30 °C	Amp	2 mM Pefabloc vor Sonikation, NiNTA, MonoQ (100-500 mM KCl), dann MonoS, nicht dialysieren	Pavel Ivanov (Ivanov et al., 2008)
pET21 (ΔeRF3)	His-Tag, Expression von N-Terminal trunkiertem eRF3a	BL21 Codon PLUS	DE 37 °C bis OD = 0,5, 1 mM IPTG 2 h 30 °C	Amp	2 mM Pefabloc vor Sonikation, NiNTA, MonoQ (100-500 mM KCl), nicht dialysieren	Tatyana Pestova ((Alkalaeva et al., 2006), und Referenzen)

pET19b (eIF5)	His-Tag, Expression von eIF5	BL21 DE3		37 °C bis OD = 0,5, 1 mM IPTG 3 h 37 °C	Amp	NiNTA, MonoQ (100-500 mM KCl)	Tatyana Pestova ((Pisarev et al., 2007b), und Referenzen)
pQE (eIF1)	His-Tag, Expression von eIF1A	BL21 STAR	DE3	37 °C bis OD = 0,5, 1 mM IPTG 3 h 37 °C	Amp	NiNTA, MonoS (100-500 mM KCl), nicht dialysieren	Tatyana Pestova ((Pisarev et al., 2007b), und Referenzen)
eIF4A	His-Tag, Expression von eIF4A	BL21 STAR	DE3	37 °C bis OD = 0,5, 1 mM IPTG 3 h 37 °C	Amp	NiNTA, MonoQ (100-500 mM KCl)	Tatyana Pestova ((Pisarev et al., 2007b), und Referenzen)
eIF4G (M63)	His-Tag, Expression von eIF4G	BL21 STAR	DE3	37 °C bis OD = 0,5, 1 mM IPTG 3 h 37 °C	Kan	NiNTA, MonoS (100-500 mM KCl)	Tatyana Pestova ((Pisarev et al., 2007b), und Referenzen)
eRF1 (G183A)	His-Tag, Expression von katalytisch inaktiver eRF1 Mutante (GGQ zu (G183A) mutiert)	M15		37 °C bis OD = 0,5, 4 mM IPTG 16 h 16 °C	Kan, Amp	NiNTA, MonoQ (100-500 mM KCl), MonoS (100-500 mM KCl)	Tatyana Pestova ((Alkalaeva et al., 2006), und Referenzen)
eRF1	His-Tag, Expression von eRF1	BL21 STAR	DE3	37 °C bis OD = 0,5, 4 mM IPTG 16 h 16 °C	Amp	NiNTA, MonoQ (100-500 mM KCl)	Tatyana Pestova ((Alkalaeva et al., 2006), und Referenzen)
eRF1NM	His-Tag, Expression von C-terminal trunktierter eRF1 Mutante	DH5			Amp	NiNTA, MonoQ (30-500 mM KCl), nicht dialysieren.	Tatyana Pestova ((Alkalaeva et al., 2006), und Referenzen)
pcDNA5 FRT (UPF1-WT, -SA, -SE, -ΔCHR)	N-terminales FLAG-Tag, Expression von UPF1 Wildtyp und Mutanten	Hek 293-FlpIn (stabile Transfektion)		kontinuierlich exprimiert	Hygromycin	M2 Agarose, MonoQ (100-500 mM KCl)	

3.16.1 Proteinexpression in *E. coli*

Zur Expression von humanen rekombinanten Proteinen in *E. coli* wurde der Stamm BL21 DE3, BL21 DE Codon plus (für eRF3a), M15 (für eRF1 (G183A)) oder BI21 DE3 –STAR verwendet (Tabelle 20). 100 µl Zellen wurden mit 1 µg Vektor-DNA (2.8) transformiert, um am nächsten Tag konfluente Platten zu erhalten. Je 2 dieser Platten wurden dann zum Animpfen für 1 Liter 2 x LB Medium benutzt. Beim Erreichen der angegebenen OD₆₀₀ wurde die Proteinexpression mit IPTG induziert. Die Zellen wurden nach einem bestimmten Zeitraum durch Zentrifugation geerntet und zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Zusammenfassend wurden eIF1, 1A, 4A, 4B, 5, 5B, eRF1, eRF1 (G183A), eRF1NM, eRF3a und ΔeRF3 in *E. coli* exprimiert.

3.16.2 Stabile Expression von UPF1 in Hek 293- Zellen (Flip-In System)

N-terminal flag-getaggtetes UPF1 und die UPF1 Mutanten UPF1-SA, -SE und -dCH wurden stabil in Hek 293 Flip-In-Zellen (Invitrogen) exprimiert.

3.16.2.1 Klonierung in pcDNA5FRT

FLAG-UPF1 (Wildtyp oder Mutanten) wurden über die NheI / NotI Schnittstellen aus pCIneo in pcDNA5-FRT (Invitrogen) umklontiert.

3.16.2.2 Transfektion und Selektion stabil transfizierter Zellen

Das FLAG-UPF1-pcDNA5-FRT-Konstrukt wurde dann nach Herstellerangaben -zusammen mit dem pOG44 Vektor, der für die Integrase kodiert- im Verhältnis 1:10 mittels transienter DNA-Transfektion (3.5.3.1) in Hek 293-Flip-In-Zellen (Invitrogen) eingebracht. Nach 3 Tagen wurde mit der Hygromycin-Selektion (200 µg / µl) begonnen. Nach weiteren zwei Tagen wurde das Medium nochmals gewechselt, um nicht-transfizierte, abgestorbene Zellen zu entfernen. Danach wurde das Medium nicht mehr ausgetauscht. Nach zwei bis drei Wochen konnten Hygromycin-resistente Zellklone gepickt und vereinzelt werden. Die Zellklone wurden dann expandiert und durch Immunoblot (3.11) auf Expression des Zielproteins getestet.

3.16.2.3 Gewinnung von phosphoryliertem und nicht phosphoryliertem UPF1

Es wurden pro Konstrukt oder Behandlung mindestens sechzig 15 cm-Schalen (80 % Konfluenz) für die weitere Aufreinigung benötigt. Die Zellen wurden hierfür am Vortag entsprechend ausgesät. Um die Phosphorylierung von UPF1 zu induzieren bzw. die Dephosphorylierung von UPF1 zu inhibieren, wurden die Zellen gegebenenfalls für 4 h mit 50 nM Okadeinsäure oder 1 μ M Wortmannin (Calbiochem) behandelt. Okadeinsäure inhibiert Proteinphosphatase 2A, welche UPF1 dephosphoryliert; Wortmannin ist ein Inhibitor der Proteinkinase SMG1, die zur Phosphorylierung von UPF1 beiträgt. Zellernte und Proteinaufreinigung sind unter (3.17.1.2) beschrieben.

3.17 Proteinaufreinigungsmethoden

Ribosomale 40S- und 60S-Untereinheiten, Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (Stanley, 1974), eIFs 2, 4F, 5B, 6, eEFs 1H, 2 und ABCE1 wurden aus Kaninchenretikulozytenlysate (Green Hectares) gewonnen (siehe auch (Si et al., 1997; Pestova & Hellen, 2003; Pisarev et al., 2007a; Pisarev et al., 2007b; Pisarev et al., 2010) und Referenzen). eIF3 wurde aus Kaninchenretikulozytenlysate (Green Hectares) oder HeLa-Zellen gewonnen (Pisarev et al., 2007b).

His₆-getaggte eIFs 1, 4A, 4B, 5, eRF 1, Δ eRF 3 wurden in *E. coli* BL21 (DE3) rekombinant exprimiert und aufgereinigt wie beschrieben ((Alkalaeva et al., 2006; Pisarev et al., 2007b) und Referenzen). Volle Länge eRF3a in pET15b-eRF3a ((Jakobsen et al., 2001), erhalten von L. Y. Frolova) wurde in *E. coli* exprimiert.

3.17.1 Aufreinigung getaggtter rekombinanter Proteine

3.17.1.1 His-Tag: EIF 1, 1A, 4A, 4B, 4G, 5, 5B, eRF1, eRF1(G183A), eRF1NM, eRF3a, Δ eRF3a

Die Gewinnung von eIFs 1, 1A, 4A, 4G, 5, 5B, eRF1, eRF1 (G183A), eRF1NM und Δ eRF3a wurde wie beschrieben durchgeführt ((Alkalaeva et al., 2006) und Referenzen). Die Aufreinigung von eIF3j erfolgte aus *E. coli* und wurde von A. Pisarev durchgeführt (Pisarev et al., 2007a). Volle Länge eRF3a in pET15b-eRF3a ((Jakobsen et al., 2001), erhalten von L. Y. Frolova) wurde in *E. coli* exprimiert und durch NiNTA-Affinitätschromatographie, MonoS und MonoQ Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, Amersham Pharmacia) aufgereinigt. Die Proteine wurden zunächst über NiNTA-Affinitätschromatographie gereinigt: Der Zellpellet (aus 1-4 l Bakterienkultur, je nach Expression des rekombinanten Zielproteins) wurde in 50 ml NiNTA-

Lysepuffer (2.3) resuspendiert, die Zellen wurden durch Ultraschall aufgebrochen und die Zellbruchstücke wurden bei 10000 rpm für 20 min abzentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand für 2 h an die NiNTA-Agarosebeads gebunden. Die Beads wurden nacheinander mit je 50 ml NiNTA-Waschpuffer 1-4 gewaschen und das Protein in 10 ml NiNTA-Elutionspuffer eluiert. Nach zweifacher Verdünnung oder alternativ nach Dialyse über Nacht in HPLC-Puffer A100, wurden Verunreinigungen durch Ionenaustausch-HPLC entfernt. Die Proteine wurden in HPLC-Puffer A50 oder A100 an MonoQ HR 5 / 5 oder MonoS HR 5 / 5 Ionenaustauschsäulen gebunden und über einen Gradienten mit Puffer B eluiert (Tabelle 20). Die Proteine wurden aliquotiert und in Elutionspuffer bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

rekombinante Faktoren:



Abbildung 7 Aufreinigung rekombinanter, His-getaggtter Translationsfaktoren.

3.17.1.2 FLAG-Tag: Aufreinigung von FLAG-UPF1

UPF1 wurde, wie unter (3.16.2) beschrieben, stabil in Hek 293-Zellen exprimiert. Die Zellen (pro Konstrukt mindestens sechzig 15 cm Zellkulturschalen) wurden durch Abschaben in 1 ml UPF1-Lysepuffer (2.3) pro Kulturschale auf Eis geerntet. Für die Ernte des phospho-UPF1 wurden zusätzlich Phosphataseinhibitoren (2.3) zugegeben. Nach 20-minütiger Inkubation mit $10\text{ }\mu\text{g} / \mu\text{l}$ RNase A bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden Zellbruchstücke durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand für 2 h an M2-FLAG-Agarose-Beads (2.2) gebunden. Dann wurde dreimal mit UPF1-Waschpuffer (2.3) gewaschen, und mit FLAG-Peptid (2.2) in UPF1-Elutionspuffer (2.3) eluiert. Zur Aufreinigung von phosphoryliertem UPF1 wurden alle Puffer mit Phosphataseinhibitor ('PhosSTOP'; Roche Diagnostics oder 2.3) supplementiert.

Zur darauffolgenden HPLC-Aufreinigung wurden die Proteine zweifach in HPLC Puffer A100 verdünnt (2.3) und auf eine Hitrap Mono Q-Säule (Amersham Pharmacia) geladen. Die Elution erfolgte durch einen 100-500 mM KCl-Gradienten bei 260 mM KCl. Das Protein wurde dann konzentriert und ein Pufferaustausch gegen HPLC Puffer A100 (2.3) durchgeführt (Amicon Ultra-30K 0,5 ml Centrifugal Filters, Microcon). Dadurch befanden sich alle Proteine im identischen Puffer, die Proteinkonzentration wurde auf ca. $0.2\text{ }\mu\text{g} / \mu\text{l}$ eingestellt.

3.17.2 Aufreinigung von Translationsfaktoren und Aminoacyl-tRNA-Synthetase aus Kaninchenretikulozytenlysat

Eine genaue Beschreibung der Aufreinigung von Translationsfaktoren aus Retikulozytenlysat ist den Schriften von Si, Pestova und Pisarev et al. zu entnehmen (Si et al., 1997; Pestova & Hellen, 2003; Pisarev et al., 2007a; Pisarev et al., 2007b; Pisarev et al., 2010). Eine Übersicht über die verschiedenen Aufreinigungsschritte findet sich in Abbildung 8.

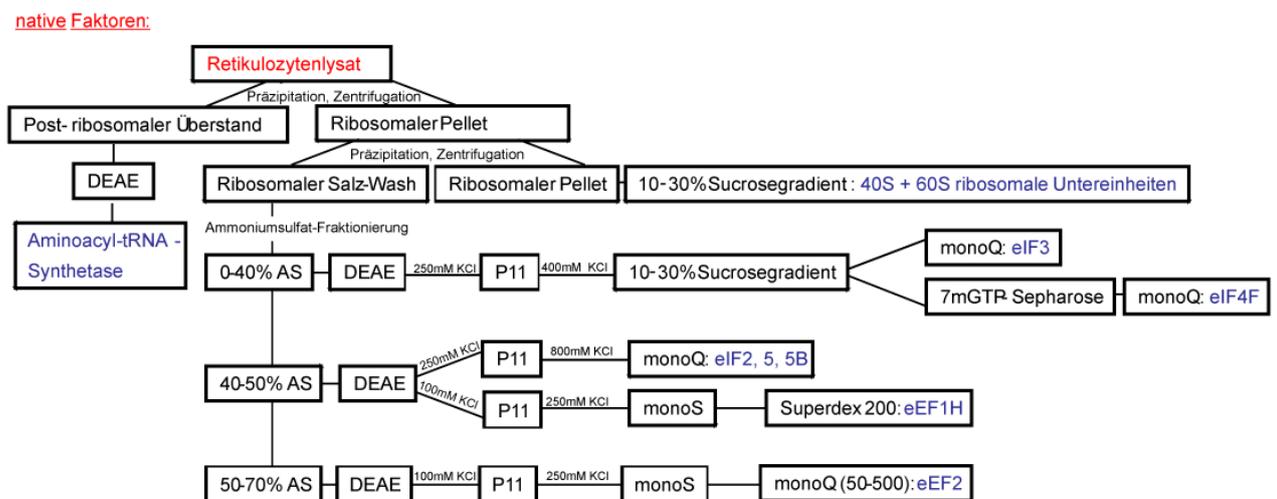


Abbildung 8 Aufreinigung nativer Translationsfaktoren, Aminoacyl-tRNA-Synthetasen und ribosomaler Untereinheiten aus Kaninchenretikulozytenlysat.

3.17.3 Aufreinigung von Prä-Terminationskomplexen (Pre-TCs)

3.17.3.1 Aufreinigung von Prä-Terminationskomplexen aus dem rekonstituierten System

Pre-TCs wurden wie beschrieben (Alkalaeva et al., 2006) durch Sucrosegradientenzentrifugation (3.20.2.1) aufgereinigt. Dazu wurden je 10 Elongationsreaktionen (3.20.1.4) gepoolt. Diese Pre-TCs (mit dem vorletzten Kodon des ORFs in der P-Site der großen ribosomalen Untereinheit) wurden sodann bei 4 °C für 75 min bei 53k rpm in einem 10-30 % (w / v) Sucrosegradienten von freier mRNA und Proteinen getrennt. Nach der Fraktionierung des Gradienten wurden die mit [³⁵S]-Cystein markierten Pre-TCs aliquotiert und bei -80 °C zur weiteren Verwendung gelagert.

3.17.3.2 Aufreinigung von Prä-Terminationskomplexen (Pre-TCs) aus Retikulozytenlysat

Alternativ wurden die Terminationskomplexe mithilfe einer eRF1 Mutante arretiert und so direkt aus Kaninchenretikulozytenlysat gewonnen. Diese Mutation (G183A) im Peptidyltransferasezentrum von eRF1 blockiert Peptide Release und damit die Termination. Dazu wurden MVHC-STOP oder MVHC-STOP-P(A) mRNA in Retikulozytenlysat -wie unter (3.20.3) beschrieben- translatiert, das Reaktionsvolumen betrug 50 μ l je Reaktion und es wurden je 10 Reaktionen pro Sucrosegradient (3.20.2.1) gepoolt. Zuerst wurden je 52 pmol eRF1G183A, 52 pmol eRF3, 2 mM GTP bei 37 °C für 10 min inkubiert. Die so vorgeformten eRF1G183A / eRF3 / GTP-Komplexe wurden dann für weitere 5 min mit der restlichen Reaktion bei 30 °C vorinkubiert. Nach RNA-Zugabe wurde für weitere 20 min bei 30 °C inkubiert, die arretierten Terminationsintermediate wurden dann über Sucrosegradientenzentrifugation getrennt. Während der Zentrifugation dissoziieren die eRFs wieder vom Ribosom (Alkalaeva et al., 2006). Durch Silberfärbung (3.7.2) und Immunoblot (3.11) wurden die Pre-TCs auf Kontamination mit anderen Faktoren aus RRL, insbesondere UPF1, UPF2, UPF3b, CBP80 getestet.

3.18 Aktivitätsassays zur funktionellen Charakterisierung von UPF1

3.18.1 ATPase-Aktivitätsassay

100nM UPF1 wurden in ATPase-Puffer (2.3), mit oder ohne 1-100 μ M RNA-Duplex (3.18.2) in 20 μ l Reaktionsvolumen vorinkubiert. Durch Zugabe von 10 μ Ci [γ -³²P]-ATP und 10 μ M ATP sowie Inkubation bei 37 °C, wurde die enzymatische Reaktion gestartet. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Reaktion auf Eis gestoppt und 1 μ l jeder Probe auf eine PEI-Zellulose-F Dünnschichtchromatographieplatte (Merck) gegeben. Durch Dünnschichtchromatographie (Laufpuffer s. 2.3) wurde das Substrat [γ -³²P]-ATP von den Hydrolyseprodukten [γ -³²P] und ADP getrennt. [γ -³²P]-ATP und [γ -³²P] wurden durch Phosphorimaging visualisiert und wie folgt quantifiziert: % hydrolysiertes ATP = [γ -³²P] / ([γ -³²P]-ATP + [γ -³²P])x100.

3.18.2 Helikase-Aktivitätsassay

Herstellung des RNA-Duplex: Zur radioaktiven Markierung des 5'-Endes wurden 50 pmol RNA-oligo 13-down mit 10 Einheiten T4-Polynukleotid-Kinase und 5 μ l [γ -³²P]-ATP (3,000 Ci / mmol; Amersham) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Dann wurden 60 pmol RNA-oligo 38-up zugegeben und in Duplex Annealing-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM KAc, 2 mM

MgCl₂) durch 1-minütiges Erhitzen auf 95 °C und langsames Abkühlen im Heizblock von 72 °C auf 37 °C gebunden. Der RNA-Duplex wurde durch Phenol- / Chloroform-Extraktion gereinigt und über eine G-25 Sepharose-Säule von freien Nukleotiden getrennt.

Helikase-Experiment: 200nM UPF1 wurden in 10 µl Reaktionsvolumen für 40 min mit 0.25 Einheiten RNAsin, 1 mM ATP, 5nM RNA-Duplex (Oligos 38-up und [γ -³²P]-13-down) und 100nM nicht gelabeltes 13-down als Kompetitor in Translationspuffer (2.3) inkubiert. Die Reaktion wurde dann auf Eis, durch Zugabe von 2,5 µl native STOP Probenlaufpuffer, gestoppt (2.3). Die RNA-Duplexe wurden in einem nativen 12 % (v / w) TBE-Gel bei 4 °C für 2 Stunden bei 15 mA von den einzelsträngigen Reaktionsprodukten getrennt, 10 Minuten fixiert und getrocknet. Durch Phosphorimaging wurde die Radioaktivität quantifiziert. Die Aufspaltung der Duplexe wurde mit der Formel wiedergegeben: % gespalteter Duplex = Intensität abgespaltener Strang / (Intensität Duplex + Intensität abgespaltener Strang) x 100.

3.19 *In vitro* Transkription

3.19.1 Transkriptionsvektoren

Transkriptionsvektoren für MVHL-STOP, MVHC-STOP mRNA und Met-Initiator-tRNAi wurden beschrieben (Alkalaeva et al., 2006; Pisarev et al., 2007a; Pisarev et al., 2007b; Fan-Minogue et al., 2008). Ein Vektor zur Transkription der MVHC-STOP-P(A) mRNA wurde durch Insertion eines Teils einer β -Globin DNA, die von einem T7-Promoter und einem 70 nt Poly-(A) Schwanz flankiert war, zwischen die PSTI / EcoRI Schnittstellen von pUC57 gewonnen (CelTek Genes). Die Transkriptionsvektoren wurden mit geeigneten Restriktionsenzymen einige Nukleotide unterhalb des endogenen Stopkodons der β -Globin mRNA linearisiert (Tabelle 21). MVHC-STOP-P(A) wurde mit EcoRI unterhalb des 70 nt Poly-(A)-Schwanzes geschnitten. Die RNA-Transkription wurde dann mit T7 RNA-Polymerase in Gegenwart von ARCA oder m⁷GpppG „Cap“-Analoge durchgeführt (siehe unten). Zur Erhaltung von radioaktiv markierter MVHC-STOP mRNA wurde die Transkription in Gegenwart von [α -³²P]-ATP durchgeführt.

Tabelle 21 *In vitro* Transkription: Restriktionsenzyme, Polymerasen

mRNA Transkript	Restriktionsenzym	Promoter/ Polymerase	Bezug	Anwendung	Temperatur
MVHL-STOP	MscI	T7	Roche	<i>in vitro</i> Translation	37 °C
MVHC-STOP	MscI	T7	Roche	<i>in vitro</i> Translation	37 °C
MVHC-Poly-(A)	EcoRI	T7	Roche	<i>in vitro</i> Translation	37 °C
β -Globin Sonde	BamH1	SP6	Roche	Northern Sonde	40 °C

3.19.2 Linearisierung der DNA

mRNAs für die *in vitro* Translationsexperimente und Sonden für Northern Blots wurden durch *in vitro* Transkription linearisierter Plasmid-DNA hergestellt. Zuerst wurden 10 µg Plasmid-DNA mit einem entsprechenden Restriktionsenzym am 3`-Ende der kodierten mRNA geschnitten (Tabelle 21). Die linearisierte DNA wurde mit dem Marchery & Nagel PCR Purification Kit aufgereinigt und in 50 µl eluiert. Es folgte die *in vitro* Transkription.

3.19.3 Standard- *in vitro* Transkriptionsprotokoll

In einer 20 µl Transkriptionsreaktion in 1 x Transkriptionspuffer wurden 30 Einheiten RNAsin, 1 mM DTT, 600 µM rNTPs (Roche Diagnostics), 0,5-1 µg linearisierte DNA, 1 µl SP6, T3 oder T7 RNA-Polymerase für 2 h bei 37 °C oder 40 °C inkubiert. Zum „Capping“ wurde 1 mM m⁷G-„Cap“-Analog (Roche Diagnostics) oder zur Steigerung der Translationseffizienz anti-reverse „Cap“-Analog (Promega, Ambion) zugegeben. Das DNA-Template wurde durch 15 min Verdau mit 1 Einheit DNase I (Roche Diagnostics) entfernt, die mRNA dann über Trizol- / Chloroform-Extraktion gereinigt und mit Isopropanol präzipitiert.

3.19.4 Transkription mittels Kit

Zur Herstellung großer Mengen „gecappter“ mRNA wurde der mMMESSAGE mMACHINE Kit von Ambion (Abschnitt 2.7), wie im Protokoll beschrieben, angewendet. Die Aufreinigung erfolgte wie unter Punkt 3.19.3 beschrieben.

3.19.5 Transkription der Methionin-Initiator-tRNA_i^{Met}

Methionin-tRNA_i^{Met} wurde von einem mit BamHI verdauten Vektor mit T7 RNA-Polymerase transkribiert. Hierfür wurden 20 µg Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 100 µl 2 h bei 37 °C transkribiert. Desweiteren enthielt der Reaktionsansatz 10 U / µl T7 RNA-Polymerase, T7 Polymerase-Puffer, 4 mM NTPs, 80 mg / ml PEG8000, 1 U / µl RNAsin, 20 mM MgCl₂ und 10 mM DTT. Die Aufreinigung erfolgte durch Phenol / Chloroform Extraktion und G-50 Sepharosesäulen, um Proteine und uninkorporierte Nukleotide zu entfernen. Durch RNA-Gelelektrophorese (3.6.1.1) wurde die Qualität der RNA überprüft.

3.19.6 Herstellung von RNA-Sonden für Northern Blots

Zur Herstellung von radioaktiver RNA für Northern-Sonden (Tabelle 21), wurden anstelle von rGTP, 50 μCi radioaktives [$\alpha^{32}\text{-P}$]-GTP (800 mCi / mmol; PE) verwendet. Außerdem wurde die Sonden-RNA nach DNaseI-Verdau über Quick Spin Säulen (Roche Molecular Biochemicals) gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt.

3.20 Translationsexperimente

3.20.1 Translation im rekonstituierten Translationssystem

3.20.1.1 Aminoacylierung von tRNAs

Native tRNA aus Kalbsleber (Novagen) wurde durch HPLC-Gelfiltration mit Superdex G-75 aufgereinigt. Die Aminoacylierung von nativer (400 μg) oder transkribierter (20 μg) tRNA wurde in 200 μl Reaktionsvolumen mit 20 μl eukaryontischer Aminoacyl-tRNA-Synthetase (aus RRL, (Stanley, 1974)) durchgeführt. Zusätzlich enthielt die Reaktion 40 mM TrisHCl, pH 7,5, 15 mM MgCl_2 , 10 mM ATP, 1 Einheit / μl RNasin und 0,1 mM Methionin oder, bei Elongator-tRNA, 0,1 mM Methionin, Valin, Histidin, 0,01 mM Cystein und 400 μCi [^{35}S]-Cystein (37 TBq / mmol) (Pestova & Hellen, 2001). Nach 30 min Inkubation bei 37 °C, wurden die tRNAs Phenol-extrahiert (pH 4,7), durch eine G-50 Sepharose Säule gefiltert, mit Ethanol präzipitiert, in 45 μl Wasser resuspendiert und bei -80 °C gelagert.

3.20.1.2 Initiation

Um 48S-Komplexe zu bilden, wurden eIFs (15-25 pmol eIF1, 1A, 4A; 6,4 pmol eIF4B; 2,5 pmol eIF4F; 5 pmol eIF2, 3), 5 pmol Met-tRNA und 3.5 pmol ribosomale 40S-Untereinheiten in 50 μl Reaktionsvolumen in Translationspuffer mit 0,2 mM ATP und 0,2 mM GTP inkubiert (mit 10 pmol UPF1 oder BSA). Da in Retikulozytenlysat die eIF3a-Untereinheit trunkiert ist, wurde für die Initiations- und Elongationsversuche volle Länge eIF3 aus HeLa- Zellen verwendet (erhalten von A. Pisarev). Nach 10 min bei 37 °C, wurden 1.5 pmol MVHC-STOP oder MVHC-STOP P(A) mRNA zugegeben und für weitere 10 min inkubiert. Die gebildeten 48S-Initiationskomplexe wurden durch Sucrosegradientenzentrifugation (3.20.2.1) oder Primerextensionsinhibition (3.20.2.2) analysiert.

3.20.1.3 Bindung der 60S-Untereinheit

Die Bildung von 48S-Initiationskomplexen ist unter (3.20.1.2) beschrieben. Zur Bindung der ribosomalen 60S-Untereinheit wurden in einem weiteren Inkubationsschritt 2 pmol 60S-Untereinheiten, 10 pmol eIF5, 3 pmol eIF5B zugefügt und 10 min bei 37 °C inkubiert. Hierbei entstehen 80S-Initiationskomplexe, die durch Sucrosegradientenzentrifugation (3.20.2.1) oder Primer-extensionsinhibition (3.20.2.2) analysiert wurden.

3.20.1.4 Elongation

Die Bildung von 80S-Initiationskomplexen ist unter (3.20.1.3) beschrieben. Zur Elongation wurden die geformten 80S-Initiationskomplexe für 10 min mit 4 pmol aminoacylierter Elongator-tRNA, 2 pmol eEF1H und 2.5 pmol eEF2 inkubiert. Durch Toeprinting (3.20.2.2) wurden diese sogenannten Prä-Terminationskomplexe („Pre-Termination Complexes“, Pre-TCs) analysiert. Durch Sucrosegradientenzentrifugation wurden die Pre-TCs aufgereinigt (3.17.3.1).

3.20.1.5 Termination

Pre-TCs (3.20.1.4 und 3.17.3) wurden zusammen mit 5 pmol UPF1 oder BSA, 3 pmol eRF1 und 5 pmol eRF3a (oder entsprechenden Verdünnungen), Kombinationen von 2-4 mM GTP / GMPPNP / ATP / AMPPNP für 10 min bei 37 °C in 40 µl Translationspuffer (2.3) mit 1 µl RNasin inkubiert. Für die Experimente, in denen eRFs limitierend waren, wurden 0,3 pmol eRF1 und 0,5 pmol eRF3a eingesetzt. Die Analyse der Produkte erfolgte durch Toeprinting (3.20.2.2) oder Präzipitation (Peptide Release Assay, 3.20.2.3).

3.20.1.6 Recycling

Pre-TCs (3.20.1.4 und 3.17.3.1) wurden in Translationspuffer (2.3) für 10 min bei 37 °C mit 4 mM ATP, 2 mM GTP, 3 pmol eRF1 und 5 pmol eRF3a inkubiert. Die Konzentration von freiem Magnesium betrug 1,5 mM und 2,5 mM. Um Ribosomen nach der Termination komplett zu dissoziieren, wurden zusätzlich 25 pmol eIF1, 25 pmol eIF1A, 5 pmol eIF3 und 5 pmol eIF3j zugegeben. Durch Toeprinting (3.20.2.2) wurde die Assoziation der Ribosomen mit der MVHC-STOP-P(A) mRNA nachverfolgt.

3.20.2 Analyse der Translationsprodukte

3.20.2.1 Sucrosegradientenzentrifugation

Die Sucrosegradienten (10-30 % w / v, in Translationspuffer 2.3) wurden mit einem Hoefler SG15 Gradientenmacher in Beckman 13x51mm Polypropylenröhrchen gegossen. Präparative Sucrosegradienten wurden zur Aufreinigung von Pre-TCs verwendet (3.17.3). Pro Sucrosegradient wurden maximal 500 µl Probe geladen und bei 4 °C für 75 min bei 53000 rpm in einem SW55 Rotor ultrazentrifugiert. Die Polypropylenröhrchen wurden mit einer G 21 1 / 2-Nadel angestochen, pro Fraktion wurden 3 Tropfen gesammelt. Ein 5 µl Aliquot jeder Fraktion wurde nach Zugabe von 1 ml Rotiscint im Szintillationszähler gemessen, die Pre-TCs befanden sich üblicherweise in den unteren zwei bis vier Fraktionen.

Außerdem wurden 48S- und 80S-Initiationskomplexe (3.20.1.2 und 3.20.1.3) im Sucrosegradient aufgetrennt und analysiert. Hierzu wurden die Initiationskomplexe auf einer radioaktiv, mit [γ - 32 P] markierten mRNA assembliert. Nach der Zentrifugation konnten die Fraktionen dann mittels Cherenkov Counting gemessen und die Assoziation der mRNA mit 48S- oder 80S-Komplexen quantifiziert werden.

3.20.2.2 Primerextensionsinhibierung ("Toeprinting")

Toeprinting wurde wie beschrieben durchgeführt (Pestova et al., 1996). Dazu wurden radioaktiv mit [γ - 32 P] markierte Primer eingesetzt (3.15.2), die 70-100 Nukleotide unterhalb des Terminationskodons an die 3'-UTR der β -Globin Reporter mRNAs binden (Tabelle 18, Tabelle 12; MVHC-STOP: 5'-GCAATGAAAATAAATTTCC-3' und MVHC-STOP-P(A): 5'-GCATTTGCAGAGG-ACAGG-3'). Es wurde eine Translationsreaktion in 40 µl durchgeführt. Dann wurden zur cDNA-Synthese 7,5 µl Toeprinting-Mix zugefügt (2.3) und eine Reverse Transkription für 30 min bei 37 °C durchgeführt. Durch Zugabe von 0,5 % SDS, 25 mM EDTA wurde die Reaktion abgestoppt.

Die Reverse Transkriptase läuft in 3'-5'-Richtung entlang der mRNA und kopiert dabei die RNA-Sequenz in eine „copy“-DNA-Sequenz (cDNA). Die Länge der cDNA entspricht dem Abstand zwischen dem (als Startpunkt der reversen Transkription benötigten) Primer und dem 5'-Ende der mRNA (= cDNA voller Länge). Die Reverse Transkriptase kann hierbei manche RNA-Proteinkomplexe (wie z. B. ribosomale Komplexe auf einer mRNA) oder RNA-Strukturelemente nicht überwinden, dadurch entstehen kürzere cDNA-Fragmente, die dann

Phenol-Chloroform gereinigt, EtOH präzipitiert und mittels Polyacrylamidgelelektrophorese auf einem 6 % Sequenziergel (3.6.1.2) aufgetrennt werden. Durch Vergleich mit einer parallel laufenden Sequenzierreaktion (3.15.3) können die entstandenen cDNA-Produkte bestimmten Positionen des Ribosoms auf der mRNA zugeordnet werden.

So können Initiations- Elongations- und Terminationskomplexe identifiziert und durch Phosphorimaging (3.7.4) quantifiziert werden. Die Position des Toeprints wird dabei relativ zur Position des Ribosoms auf der mRNA angegeben. Die Toeprints von 48S- und 80S-Initiationskomplexen befinden sich + 16 nt vom AUG-Start-Kodon in der ribosomalen P-Bindestelle. Die Toeprints von Pre-TCs befinden sich + 16 nt vom UGC-Kodon in der P-Bindestelle des Ribosoms und die Toeprints von mit eRF1 assoziierten Pre- und Post-TCs befinden sich + 15 nt vom UAA Stopkodon in der A-Bindestelle des Ribosoms.

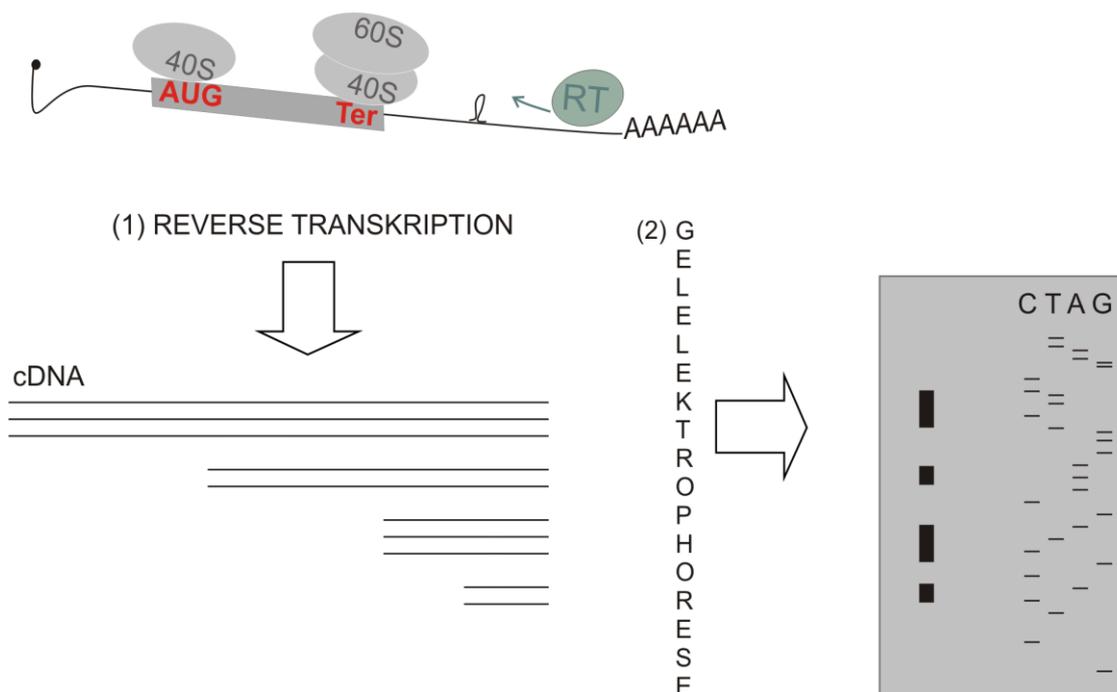


Abbildung 9 Schematische Darstellung von Toeprinting.

Das Enzym Reverse Transkriptase (RT) kann eine mRNA in cDNA kopieren. Je nach Länge der mRNA entstehen dabei unterschiedlich lange cDNAs. Wenn die Reverse Transkriptase durch Hindernisse auf der mRNA (z.B. Ribosomen oder mRNA-Sekundärstruktur) in ihrer Prozessivität behindert ist, bricht sie ab und es entstehen cDNA-Fragmente von charakteristischer Länge, die einen Rückschluss auf die Position der ribosomalen Komplexe auf der mRNA erlauben. Weitere Erläuterungen im Text. AUG = Startkodon, Ter = Terminationskodon, RT = Reverse Transkriptase, cDNA = „copy“-DNA, CTAG = Sequenzierreaktion.

3.20.2.3 Peptide Release Assay

Pre-TCs wurden in Gegenwart von [³⁵S]-Cystein tRNA assembliert (3.17.3). Die so markierten Komplexe wurden zuerst bei 37 °C mit 5 pmol UPF1 für 10 Minuten vorinkubiert. Dann wurden Nukleotide, 2 pmol eRF1 und 3 pmol eRF3a zugegeben. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 50 µl Proben entnommen und in TCA Mix (2.3) abgestoppt. Die Freisetzung des durch Translation entstandenen MVHC-Tetrapeptids, wurde dann durch TCA-Präzipitation wie beschrieben gemessen (Zavialov et al., 2001): Durch 15 min Inkubation bei 4 °C und anschließende Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min, werden Ribosomen und an diese noch gebundene Peptide präzipitiert, die während der Termination durch Hydrolyse der Peptidbindung freigesetzten Peptide befinden sich im Überstand. Durch Messung der Radioaktivität im Überstand kann die Menge der freigesetzten (mit [³⁵S]-Cystein markierten) Tetrapeptide ermittelt und somit das Fortschreiten der Termination verfolgt werden.

3.20.3 Translation in RRL

Die Translation der Glühwürmchen-Luziferase mRNA in Nuklease-behandeltem Retikulozytenlysat (Promega) erfolgte wie vom Hersteller beschrieben. In vitro transkribierte (3.19), m7GpppG-„gecappte“, polyadenylierte Luziferase Reporter mRNA wurde, in einem Reaktionsvolumen von 5 µl, mit 0,1 µl Aminosäuren-Mix ohne Methionin, 0,2 µl [³⁵S]-Methionin, 1 µl RNAsin translatiert. Nach Zugabe von 100ng P-UPF1, uP-UPF1 oder BSA wurde das Lysat 20 min bei 37 °C vorinkubiert. Dann wurden 0,02 pmol mRNA zugegeben und die Inkubation bei 30 °C fortgesetzt, durch Zugabe von 2 x Lämmli-puffer (2.3) wurde die Reaktion nach der angegebenen Zeit gestoppt. Die Proteine wurden mittels SDS-Gelelektrophorese (3.6.1.3) getrennt und das Gel anschließend in 10 % Essigsäure fixiert und getrocknet. Das [³⁵S]-Methionin wird bei der Translation in neu synthetisierte Luziferase-Proteine eingebaut, dadurch kann man die Translationseffizienz mit und ohne UPF1 vergleichen. Die Radioaktivität der Luziferase-Bande wurde durch Phosphorimaging (3.7.4) quantifiziert, die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten anschließend statistisch ausgewertet.

3.21 Komplementierung des rekonstituierten Systems mit translationskompetentem, zytoplasmatischem HeLa-Zellextrakt

Die Herstellung von translationskompetentem HeLa-Zellextrakt erfolgte wie unter Pisarev et al. (Pisarev et al., 2010) beschrieben. Zur Komplementierung wurden 2 µl Extrakt (oder 1 / 5,

1 / 10, 1 / 40 Verdünnungen) mit 5 pmol UPF1, 1 pmol eRF1 und 2 pmol eRF3 in 40 µl Translationspuffer mit 1 mM ATP und 0,5 mM GTP vorinkubiert, dann wurden ca. 0,1-0,05 pmol Pre-TCs zugegeben und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden durch Toeprinting analysiert (3.20.2.2).

4 Ergebnisse

4.1 Expression und HPLC-Aufreinigung von FLAG-UPF1 (angereichert für die phosphorylierte oder unphosphorylierte Isoform)

Um den Effekt von UPF1 auf die Translation in einem aus aufgereinigten Komponenten rekonstituierten *in vitro* System zu untersuchen, wurde zuerst FLAG-getaggtetes UPF1 in Hek293-FlpIn-Zellen stabil exprimiert (3.16.2) und aufgereinigt (3.17.1.2). Für NMD spielt die Phosphorylierung von UPF1 eine wichtige Rolle (1.5.2.2, Abbildung 4). Daher schien es angebracht, sowohl phosphoryliertes, als auch nicht phosphoryliertes UPF1 zu gewinnen. Okadaensäure (OA) inhibiert die für die Dephosphorylierung von UPF1 maßgebliche Proteinphosphatase 2A (PP2A). Wortmannin (W) inhibiert die PI3-Kinase-ähnliche Kinase (PI3KK) SMG1, die für die Phosphorylierung von UPF1 notwendig ist. Die Zellen, die UPF1 stabil exprimierten, wurden daher mit diesen Inhibitoren behandelt (3.16.2.3), um die phosphorylierte (P-UPF1) oder nicht phosphorylierte („unphosphorylated“ UPF1, uP-UPF1) Isoform von UPF1 anzureichern. Über Affinitätschromatographie und HPLC wurden die Proteine aus dem Zelllysat aufgereinigt (Abbildung 10 A und B).

Der Phosphorylierungsgrad dieser Präparationen wurde in einem Immunoblot untersucht (Abbildung 10 C, oben). Mit einem anti-UPF1 Antikörper wurde die Gesamtmenge an FLAG-UPF1 ermittelt. Zur Detektion des phosphospezifischen Signals wurde ein Antikörper verwendet (Abbildung 10C, unten), der von PI3-ähnlichen Kinasen (PI3K) an S / T-Q-Phosphorylierungsstellen phosphorylierte Proteine erkennt. Die Stärke des Signals vor und nach Behandlung mit aktiver oder hitzeinaktivierter alkaliner Phosphatase (AP) (3.12) erlaubte mir Rückschlüsse auf den Phosphorylierungsgrad von UPF1. Die Behandlung des aus mit OA behandelten Zellen gewonnenen UPF1 mit aktiver AP führte, im Vergleich zur Behandlung mit Hitze-inaktivierter AP, zu einer Abnahme des phosphospezifischen Signals (Abbildung 10 C, vgl. Spuren 4-6 mit Spuren 7-9). Das phosphospezifische Signal des aus mit Wortmannin behandelten Zellen aufgereinigten UPF1 war allgemein schwächer und veränderte sich durch die Behandlung mit AP nicht (Abbildung 10C, vgl. Spuren 4-6 mit 10-12). Das schwache phosphospezifische Signal, das auch noch nach Behandlung mit aktiver AP detektiert wurde (Spuren 1-6 und 10-12), könnte entweder durch unspezifische Färbung, durch unvollständige Dephosphorylierung mittels AP oder durch unvollständige Inhibierung der

Phosphorylierung mittels Wortmannin verursacht worden sein. Durch semi-quantitative Schätzung ermittelte ich eine ca. 3-fache Anreicherung des phosphospezifischen Signals in der P-UPF1 Präparation gegenüber der uP-UPF1 Präparation, was auf eine differentielle Phosphorylierung der beiden Präparationen hindeutet.

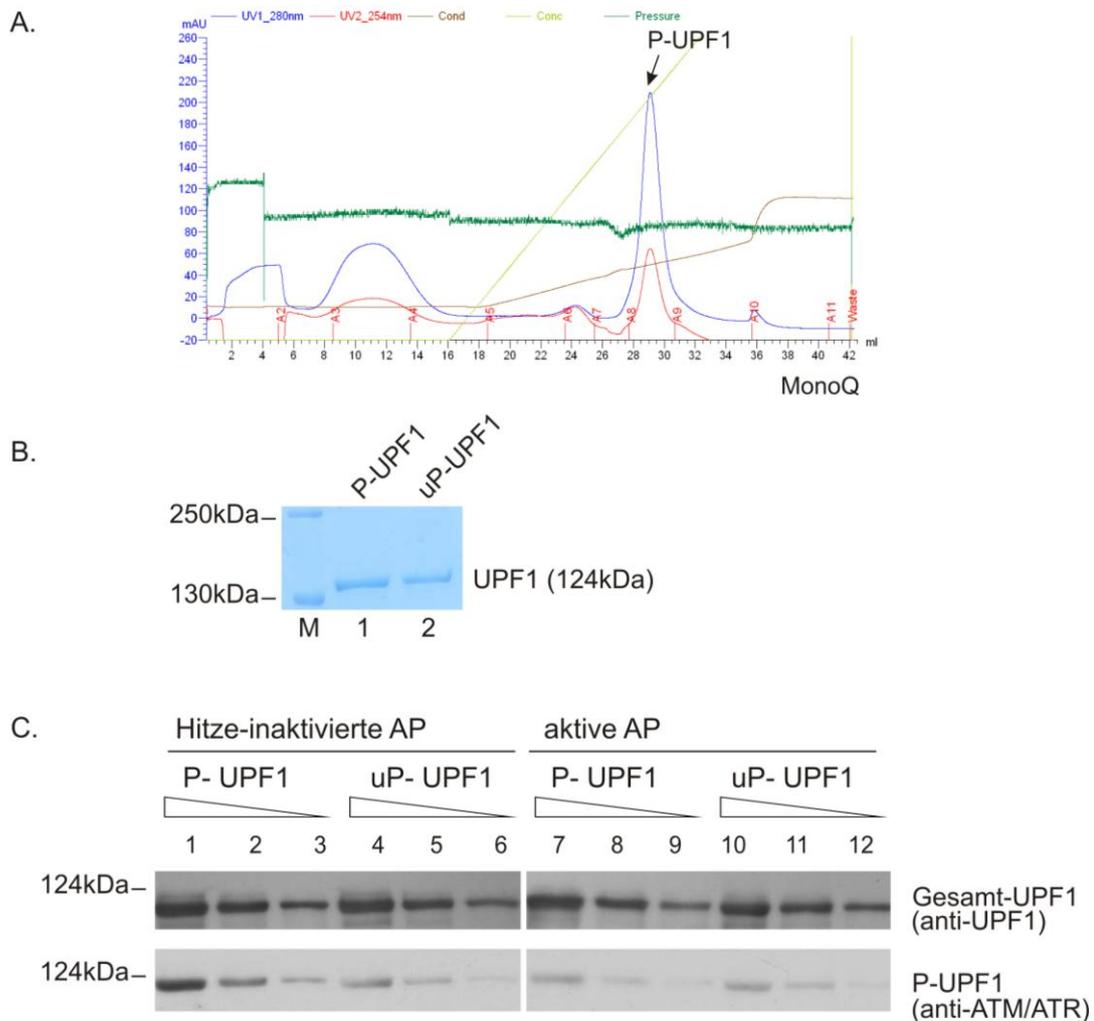


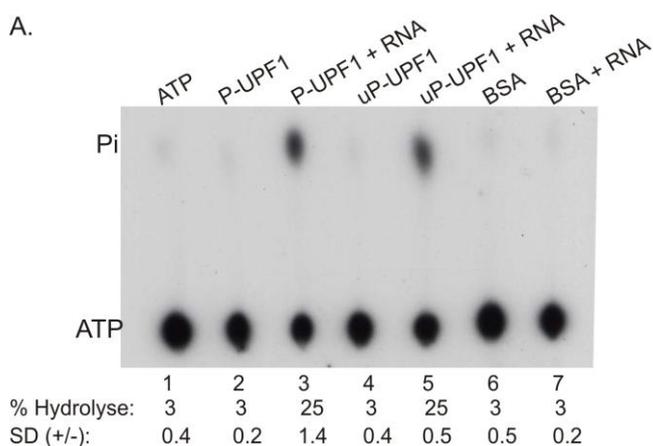
Abbildung 10 Anreicherung und Aufreinigung von phosphoryliertem P-UPF1 und nicht phosphoryliertem uP-UPF1.

(A) Elutionsprofil von UPF1. UPF1 eluiert bei 250 mM KCl (100-500 mM KCl Gradient, MonoQ, Amersham Pharmacia). (B) Coomassie-Färbung von FLAG- immunopräzipitiertem und HPLC-gereinigtem UPF1 nach Anreicherung der phosphorylierten (P-UPF1, Spur 1) oder unphosphorylierten (uP-UPF1, Spur 2) Isoform (M = Größenmarker) mittels Wortmannin oder Okadeinsäure. (C) Determination des Phosphorylierungsstatus der UPF1-Präparationen im Immunoblot. Die Proben wurden zuerst mit Hitze-inaktiverter (Spuren 1-6) oder aktiver (Spuren 7-12) alkaliner Phosphatase (AP) behandelt und dann geblottet. Obere Reihe: Ein anti-UPF1 Antikörper wurde als Ladekontrolle verwendet. Untere Reihe: Der Phosphorylierungsgrad von unverdünntem, 1 / 2 oder 1 / 4 verdünntem phosphoryliertem (P-) und unphosphoryliertem (uP-) UPF1 nach der HPLC-Aufreinigung wurde mit einem anti-ATM / ATR-Antikörper untersucht, der S / T-Q-Phosphorylierungsstellen erkennt.

4.2 Gereinigtes FLAG-UPF1 ist biochemisch aktiv

Um die Intaktheit der Faltung des rekombinanten Proteins zu überprüfen, untersuchte ich als Nächstes die biochemische Aktivität des gereinigten UPF1 als ATPase und DNA- / RNA-Helikase (Bhattacharya et al., 2000; Kashima et al., 2006; Cheng et al., 2007; Chamieh et al., 2008). Frühere Experimente anderer Autoren zur Aktivität von UPF1 (Bhattacharya et al., 2000; Kashima et al., 2006; Cheng et al., 2007; Chamieh et al., 2008) wurden unter Pufferbedingungen oder an Substraten durchgeführt, die inkompatibel mit dem rekonstituierten Translationsystem sind. Die Helikase- und ATPase-Experimente wurden daher bei einem physiologischem pH von 7,5 unter denselben Pufferbedingungen ausgeführt, die ich später auch für die Translationsexperimente im rekonstituierten System verwendete. Die gewonnenen Daten (4.2.1 und 4.2.2) zeigen, dass UPF1 unter den gegebenen experimentellen Bedingungen seine bekannten biochemischen Funktionen erfüllt.

A.



B.

RNA Duplex:
 5'-(CAAAA)₅CUGAGGACUUACG-3'
 3'-GACUCCUGAAUGC-5'
 $\Delta G = 21 \text{ kcal/mol}$

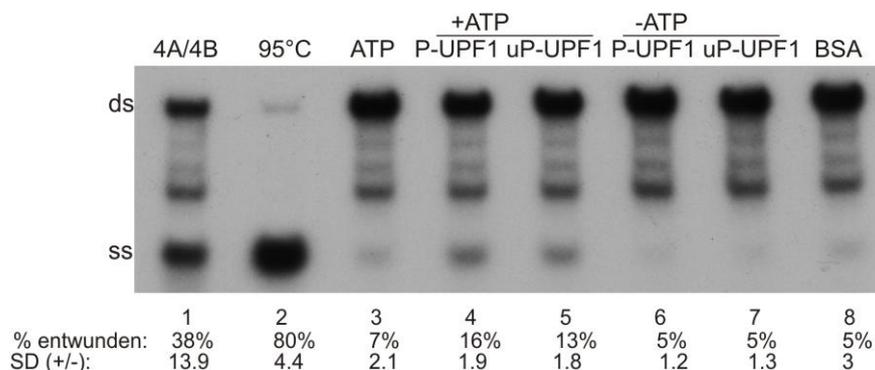


Abbildung 11 P-UPF1 und uP-UPF1 sind unter den Bedingungen des rekonstituierten Translationsystems biochemisch aktiv.

(A) ATPase-Aktivität von P-UPF1 und uP-UPF1. Die für P-UPF1 oder uP-UPF1 angereicherten und Proteinpräparationen wurden für 20 min in Translationspuffer mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ inkubiert. Nach der dünn-schichtchromatographischen Auftrennung der Reaktionsprodukte wurden $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ und das Hydrolyseprodukt $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-Pi}$ durch Autoradiographie nachgewiesen. Gezeigt sind der prozentuale Anteil von hydrolysiertem ATP und die Standardabweichung (SD) von drei unabhängigen Experimenten. (B) Helikase-Aktivität von UPF1 mit einem RNA-Duplex (oben) als Substrat. Die Proteine wurden mit dem RNA-Duplex, dessen kurzer Strang mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ gelabelt war, für 40 min in Translationspuffer inkubiert. Nach der nativen Gelelektrophorese wurden der RNA-Duplex (Double Strand, ds) und das einzelsträngige $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-gelabelte}$ Reaktionsprodukt (Single Strand, ss) durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Als Maß für die Helikase-Aktivität wurde der Prozentsatz von entwundenem RNA-Duplex (ss) im Verhältnis zum Gesamtsignal (ss + ds) in drei unabhängigen Experimenten ermittelt und daraus eine Standardabweichung (SD) berechnet. Inkubation mit der RNA-Helikase eIF4A mit dem Kofaktor eIF4B (4A / 4B) und Erhitzen des RNA-Duplex auf 95 °C dienten als Positivkontrollen, Rinderserumalbumin (BSA) wurde als Negativkontrolle verwendet. P-UPF1 = mit phosphoryliertem UPF1 angereicherte Proteinpräparation; uP-UPF1 = mit nicht phosphoryliertem UPF1 angereicherte Proteinpräparation.

4.2.1 ATPase-Aktivität von UPF1

Wie bereits bekannt (Weng et al., 1998; Bhattacharya et al., 2000; Kashima et al., 2006), ist die ATPase-Aktivität von UPF1 RNA-abhängig (Abbildung 11A, vgl. Spur 2 mit 3 und Spur 4 mit 5). Im ATPase-Assay (3.18.1) war die Effizienz der ATP-Hydrolyse von P-UPF1 ähnlich der Hydrolyseaktivität von uP-UPF1 (Abbildung 11A, Spuren 3 und 5). Nach einem Zeitraum von 20 min lag der Anteil von hydrolysiertem ATP bei ~25 %. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Kashima et al. (Kashima et al., 2006) überein, die keinen Unterschied in der ATPase-Aktivität von P-UPF1 und uP-UPF1 feststellen konnten. Reaktionen ohne RNA oder mit Rinderserumalbumin (BSA) anstelle von UPF1 (Abbildung 11A, Spuren 6 und 7) zeigten nur eine geringe Hintergrundaktivität im Rahmen von spontaner ATP-Hydrolyse (Abbildung 11 A, Spur 1).

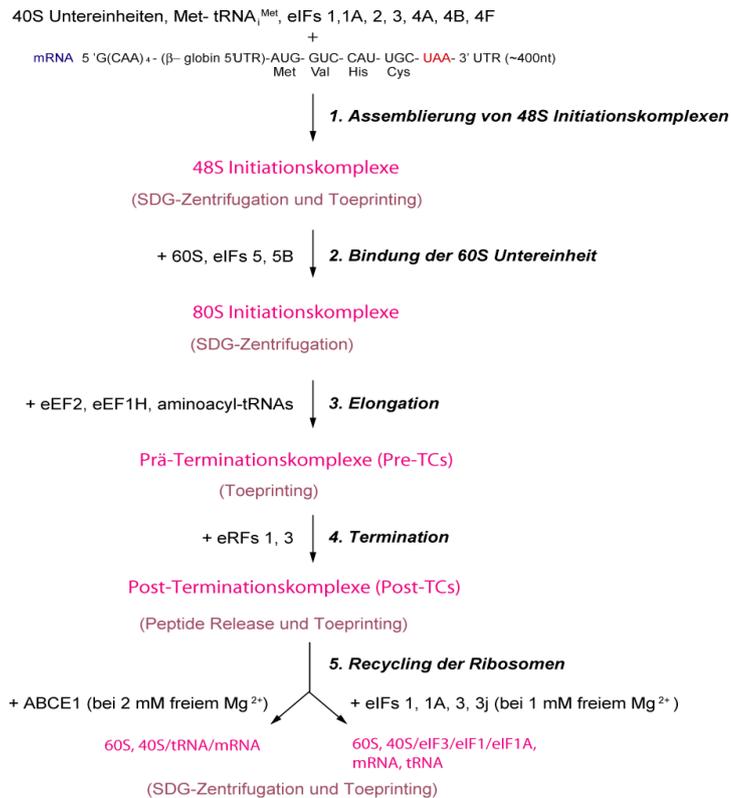
4.2.2 Helikase-Aktivität von UPF1

Die Aktivität von UPF1 als Helikase wurde an einem radioaktiv markierten RNA-Duplex als Substrat ermittelt (3.18.2) (Abbildung 11B). Erhitzen auf 95 °C oder der Initiationsfaktor eIF4A mit dem Kofaktor eIF4B dienten als Positivkontrollen (Abbildung 11B, Spuren 1 und 2). Die Helikase-Aktivitäten von P-UPF1 (16 %) und uP-UPF1 (13 %) waren ähnlich (Abbildung 11B, Spuren 4 und 5) und deutlich schwächer als die Aktivität von eIF4A/ B (38 %), lagen jedoch über den Negativkontrollen BSA (5 %) und ATP (7 %) (Spuren 3 und 8), sowie den Reaktionen ohne ATP (Spuren 6 und 7).

4.3 Aufbau des rekonstituierten *in vitro* Translationsystems

Um den Einfluss von gereinigtem (4.1), biologisch aktiven (4.2) UPF1 auf die Translation zu ermitteln, musste ich zuerst alle für das *in vitro* Translationsystem benötigten Bestandteile gewinnen. Ribosomale Untereinheiten und Translationsfaktoren wurden aus Kaninchenretikulozytenlysat (RRL) aufgereinigt oder rekombinant exprimiert (4.3.1), mRNAs *in vitro* transkribiert (3.19) und gereinigte tRNAs aminoacyliert (3.20.1.1). In Translations-experimenten (3.20 und Abbildung 12) ermittelte ich dann den Effekt von UPF1 auf die Initiation, Elongation, Termination und das Recycling (4.4). Dazu wurden über mehrere Inkubationsschritte, bei denen schrittweise Translationsfaktoren, Ribosomen, und Aminoacyl-tRNAs zugegeben wurden (Abbildung 12A), nacheinander 48S- und 80S-Komplexe auf einer der Reporter-mRNAs (Abbildung 12B) assembliert und elongiert, und anschließend Prä-Terminationskomplexe (Pre-TCs) für Terminations- oder Recyclingexperimente über Sucroседichtegradientenzentrifugation aufgereinigt. Mit geeigneten biochemischen Methoden (Abbildung 12A), wie SDG-Zentrifugation, Primerextensionsinhibierung und TCA-Präzipitation, untersuchte ich dabei den möglichen Einfluss von UPF1 auf jeden einzelnen Schritt der *in vitro* rekonstituierten Translation.

A. Das rekonstituierte *in vitro* Translationsystem



B. Die Reporter-mRNAs

MVHL-STOP mRNA (nicht gecappt und nicht adenyliert):

5' G (CAA)_n- (β- globin 5' UTR)- AUG- GUG- CAC- CUU- UAA- 3' UTR (~400nt)
Met Val His Leu

MVHC-STOP mRNA (nicht gecappt und nicht adenyliert):

5' G (CAA)_n- (β- globin 5' UTR)- AUG- GUG- CAC- UGC- UAA- 3' UTR (~400nt)
Met Val His Cys

MVHC-STOP-P(A) mRNA (gecappt und polyadenyliert):

5' m⁷G (CAA)_n- (β- globin 5' UTR)- AUG- GUG- CAC- UGC- UAA- 3' UTR (~90nt)- P(A)₇₀
Met Val His Cys

Abbildung 12 Schematische Darstellung des rekonstituierten Translationsystems.

(A) Das rekonstituierte Translationsystem erlaubt die schrittweise Untersuchung des potenziellen Effekts von UPF1 auf die Translation. Über mehrere Inkubationsschritte können die Initiation (1. und 2.), Elongation (3.) und Termination (4.) der Translation sowie das Recycling der Ribosomen (5.) *in vitro* nachvollzogen werden. Jeder Schritt kann durch geeignete biochemische Methoden (Primerextensionsinhibition („Toeprinting“), SDG-Zentrifugation oder Peptide Release, in lila dargestellt) analysiert werden. SDG = Sucroседичтеградіент. (B) Die MVHL-STOP, MVHC-STOP- (nicht „gecappt“ und nicht adenyliert) und MVHC-STOP-P(A)- („gecappt“ und polyadenyliert) Reporter-mRNAs wurden in den Translationsexperimenten als Substrate eingesetzt. Die obere mRNA kodiert für das kurze Tetrapeptid MVHL (Met = Methionin, Val = Valin, His = Histidin, Lys = Lysin), die unteren beiden mRNAs kodieren für das Tetrapeptid MVHC (Met = Methionin, Val = Valin, His = Histidin, Cys = Cystein), gefolgt von einem STOP-Kodon (UAA). Die Abbildung zeigt die Kodons des ORF und deren Aminosäuresequenz. M⁷G = „Cap“-Struktur, P(A) = Poly-A-Schwanz.

4.3.1 Aufreinigung von Translationsfaktoren, Aminoacyl-tRNA-Synthetasen und Ribosomen

Die Expression und Aufreinigung der Translationsfaktoren (siehe Coomassie-Färbung, Abbildung 13) erfolgte nach Protokollen von Tatyana Pestova (3.17 und 3.16). Die Aktivität der gereinigten Faktoren in der Translation wurde dann in Translationsexperimenten, die jeweils in Gegenwart oder Abwesenheit von UPF1 stattfanden, validiert (4.4).

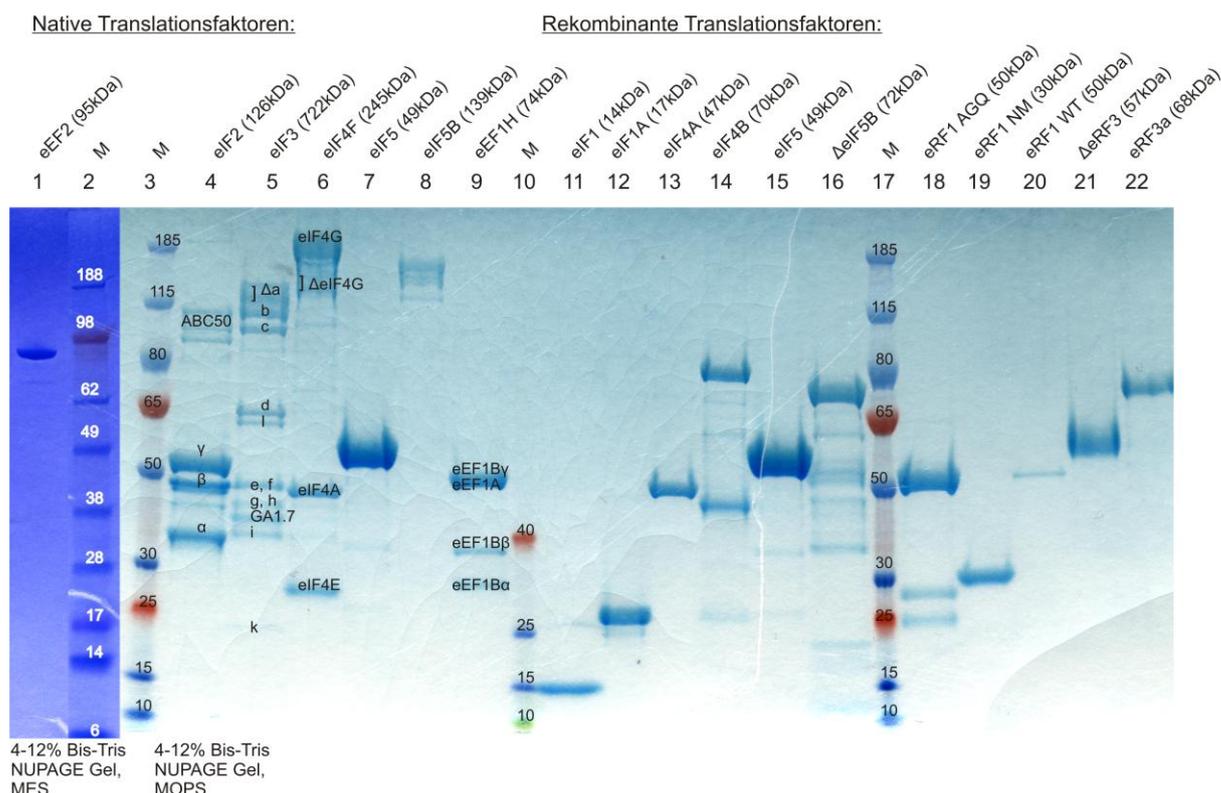


Abbildung 13 Coomassie-Färbung der gereinigten Translationsfaktoren.

eIF = eukaryontischer Initiationsfaktor, eEF = eukaryontischer Elongationsfaktor, eRF = eukaryontischer Terminationsfaktor. Das Molekulargewicht der Größenstandards ist in kDa angegeben. Die Translationsfaktoren wurden entweder direkt aus RRL aufgereinigt (Spuren 1-9), oder in *E. coli* rekombinant exprimiert und aufgereinigt (Spuren 11-22). In der Abbildung sind die Untereinheiten von eIF2, eIF3, eIF4F und eEF1H beschriftet. ABC50 (Spur 4) und GA1.7 (Spur 5) sind Proteine, die mit eIF2 bzw. eIF3 assoziiert sind, jedoch keinen offensichtlichen Einfluss auf die Translation haben (Pisarev et al., 2007b). Rekombinant exprimierter eIF4B (Spur 14) ist für gewöhnlich teilweise degradiert.

4.3.2 Aufreinigung und Funktionalitätstest von eRF3a voller Länge

Gewöhnlich wurde im Labor von Tatyana Pestova für die Translationsexperimente eine N-terminal verkürzte Version von eRF3a (Δ eRF3, Δ aa 1-138) eingesetzt. UPF1 interagiert in Immunopräzipitationsexperimenten sowohl mit dem C- als auch mit dem N-Terminus von eRF3a (Ivanov et al., 2008; Singh et al., 2008). Daher schien es geboten, in den Translations-

experimenten mit UPF1 nur eRF3a voller Länge („full length eRF3a“, fleRF3a) zu verwenden. Ich modifizierte das Expressionsprotokoll für Δ eRF3 (3.17.1.1), um den Ertrag und die Stabilität von eRF3a zu erhöhen. In den Terminationsexperimenten (Abbildung 14) verhielt sich gereinigter eRF3a (siehe Coomassiefärbung, Abbildung 13, Spur 22) wie der kürzere Δ eRF3 (siehe Coomassiefärbung, Abbildung 13, Spur 21 und Toeprint, Abbildung 15A) und wurde daher in allen Experimenten mit UPF1 eingesetzt. Das Prinzip der Primerextensionsinhibition („Toeprinting“) ist in Abschnitt 3.20.2.2 erläutert.

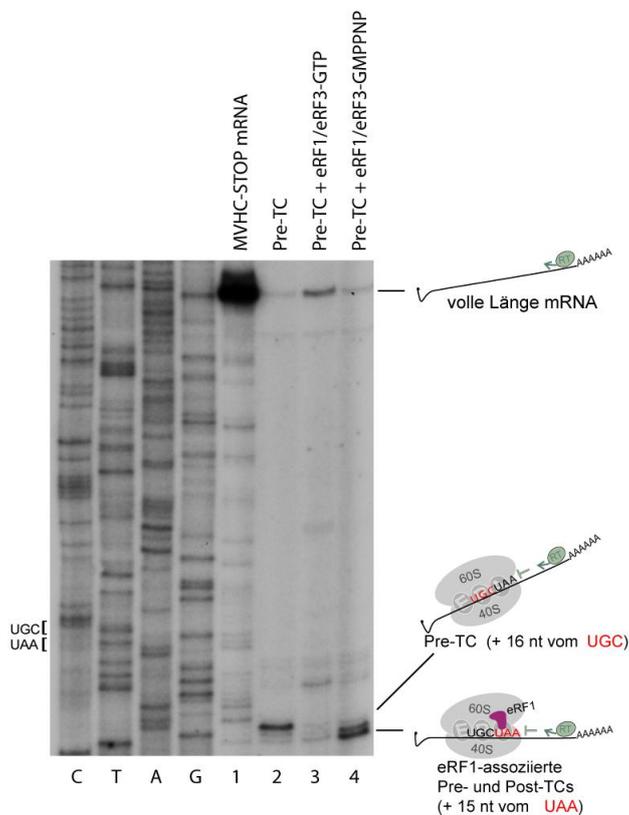


Abbildung 14 **Aufreinigung von funktionellem eRF3a voller Länge (fleRF3a).**

(A) Terminationsexperiment mit fleRF3a. Pre-TCs wurden auf der MVHC-STOP mRNA (Spur 1) assembliert. Toeprints von Sucrosegradienten-aufgereinigten Prä-Terminationskomplexen (Pre-TCs) befinden sich + 16 nt stromabwärts des UGC-Kodons in der ribosomalen P-Bindestelle (Spur 2). Durch Zugabe von eRF1 / eRF3-GTP werden die Ribosomen nach vollendeter Termination destabilisiert und dissoziieren teilweise (Spur 3), der Toeprint fehlt deshalb. Durch Zugabe des nicht-hydrolysierten Nucleotidanalogs GMPPNP konnten im Toeprint + 15 nt 3' des Terminationskodons (UAA) Terminationsintermediate sichtbar gemacht werden, bei denen die Konformationsänderung der Ribosomen schon erfolgt ist (Spur 4). Die Toeprints dieser mit eRF1 assoziierten Pre- und Post-TCs befinden sich + 15 nt vom UAA Stopkodon. PTC = Prä-Terminationskomplex, CTAG = Sequenzierreaktionen, UGC = Cystein-Kodon, UAA = Terminationskodon.

4.3.3 Aufreinigung und Charakterisierung von Terminationsintermediaten aus RRL

Prä-Terminationskomplexe (Pre-TCs) können durch Translation im rekonstituierten System mit anschließender Sucrosedichtegradienten- (SDG-) Zentrifugation gewonnen werden (schematisch dargestellt in Abbildung 12). Diese Vorgehensweise hat den Vorteil, dass alle Komponenten klar definiert sind. Es gibt jedoch auch mehrere Nachteile: Im rekonstituierten Translationssystem würden große Mengen von Aminoacyl-tRNAs, wie sie zur Translation längerer ORFs benötigt würden, die Translation inhibieren. Deshalb ist die mögliche Länge des ORF sehr limitiert. Außerdem werden manche mRNAs, wie die hier verwendete MVHC-STOP-P(A) mRNA, schlecht translatiert, was zu einer sehr dürftigen Ausbeute an Pre-TCs führt, sodass auch aus wirtschaftlichen Erwägungen eine Alternative sinnvoll erschien, nämlich die Gewinnung von Terminationsintermediaten aus Translationsreaktionen in RRL. Darüber hinaus können diese Komplexe noch Ribosomen- oder mRNA-assoziierte Faktoren enthalten, die im rekonstituierten System aus aufgereinigten Faktoren fehlen, jedoch vielleicht für den Einfluss von UPF1 auf die Translation benötigt werden.

Um Terminationsintermediate direkt aus RRL zu gewinnen, verwendete ich eine Mutante von eRF1 (eRF1G183A), die während der Termination (schematisch dargestellt in Abbildung 3C) zwar noch an die Pre-TCs bindet und eine Konformationsänderung des Ribosoms herbeiführt, jedoch die Hydrolyse der Peptidbindung nicht katalysieren kann, sodass die Ribosomen nicht vollständig terminieren (Frolova et al., 1999; Alkalaeva et al., 2006). Durch Zugabe eines Komplexes aus dieser eRF1-Mutante, Δ eRF3 und GTP zu Translationsreaktionen in RRL, konnten nach SDG-Zentrifugation Terminationsintermediate auf der MVHC-STOP mRNA isoliert und durch Primerextensionsinhibierung („Toeprinting“) nachgewiesen werden (Abbildung 15A, Spur 2). Durch die SDG-Zentrifugation dissoziierte der Großteil der Terminationsfaktoren. Dadurch „shifteten“ die Komplexe zurück in die für Pre-TCs typische Position auf der mRNA und im Toeprint erschien eine spezifische Bande + 16 Nukleotide 3' des vorletzten Kodons (UGC) (Abbildung 15A, Spur 2, wie beschrieben in (Alkalaeva et al., 2006)). Durch Zugabe von eRF1 / eRF3-GTP zu diesen Intermediaten werden die Ribosomen nach vollendeter Termination destabilisiert und dissoziieren (Abbildung 15A, Spur 3), der Toeprint fehlt deshalb. Durch Zugabe des nicht-hydrolysierbaren Nukleotidanalogs GMPPNP, konnten im Toeprint + 15 nt 3' des Terminationskodons (UAA) Terminationsintermediate sichtbar gemacht werden, bei denen die Konformationsänderung der Ribosomen schon erfolgt ist (Abbildung 15A, Spur 4). Die Terminationsintermediate aus RRL verhielten sich in diesem

Versuch also ähnlich der Pre-TCs aus dem rekonstituierten System (vgl. Abbildung 15 und Abbildung 20), und werden daher im Folgenden auch als Pre-TCs („RRL-Pre-TCs“) bezeichnet. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit der MVHC-STOP-P(A) mRNA erzielt (7.1.1, Abbildung 29). Die Silberfärbung (Abbildung 15B) zeigte, dass die Terminationsintermediate aus RRL (Spur 7) -im Vergleich zu einer Verdünnungsreihe von aus RRL aufgereinigten ribosomalen Untereinheiten (Spuren 1-6)- im Bereich zwischen 50 und 250 kDa mit einigen nicht-ribosomalen Proteinen (oder RNAs) assoziiert waren. Diese Komplexe wurden in den in Abschnitt 4.4.4 und 7.1.1 beschriebenen Experimenten eingesetzt.

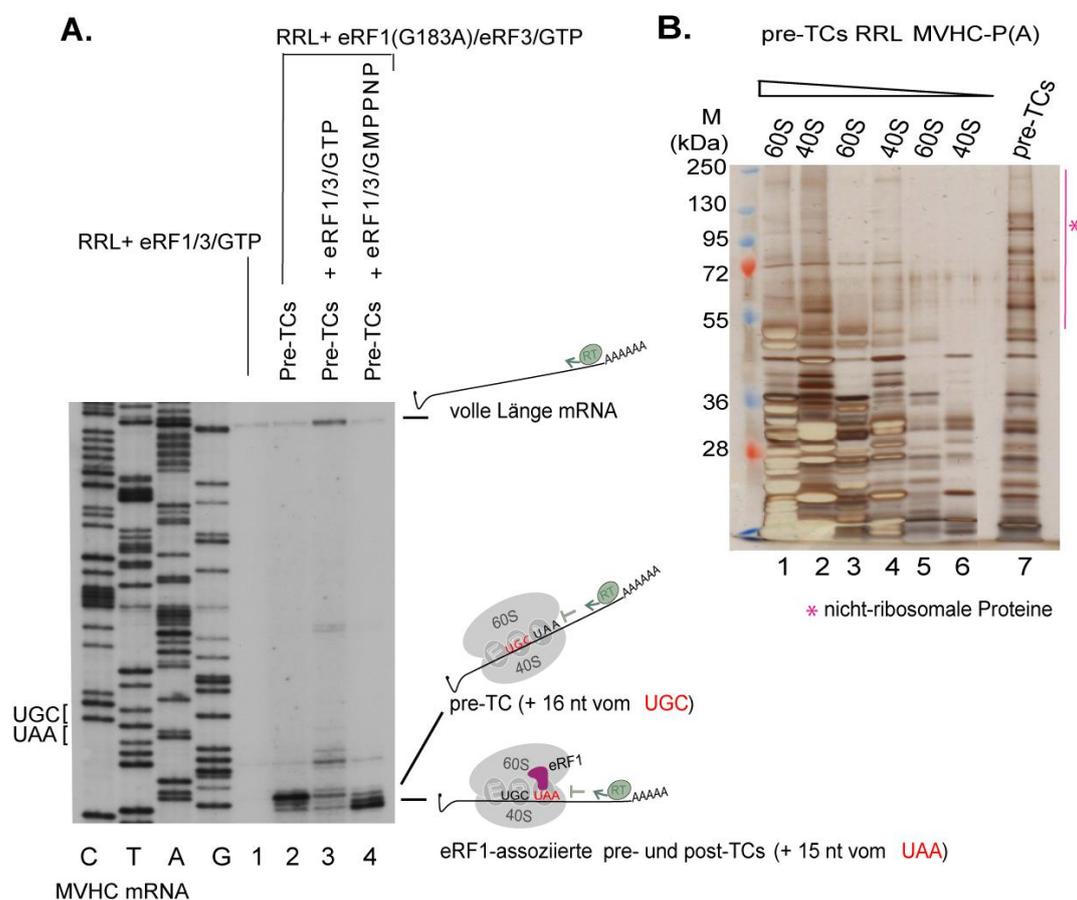


Abbildung 15 Aufreinigung von Terminationskomplexen direkt aus Kaninchenretikulozytenlysat.

(A) Toeprint. Terminationsintermediate („RRL-Pre-TCs“) auf der MVHC-STOP mRNA können durch Zugabe von einem Komplex aus eRF1(G183A) / Δ eRF3-GTP zu Translationsreaktionen in RRL und durch anschließende SDG-Zentrifugation aufgereinigt werden (Spur 2). Sie terminieren wie Pre-TCs aus dem rekonstituierten System (Spur 3) und können durch GMPPNP arretiert werden (Spur 4). Die Toeprints von Pre-TCs befinden sich + 16 nt vom UGC-Kodon und die Toeprints von mit eRF1 assoziierten Pre- und Post-TCs befinden sich + 15 nt vom UAA Stopkodon. Pre-TC = Prä-Terminationskomplex, CTAG = Sequenzierreaktionen, UGC = Cystein-Kodon, UAA = Terminationskodon. (B) Silberfärbung der Terminationsintermediate (Spur 7) aus RRL und Verdünnungsreihe von ribosomalen 60S- und 40S-Untereinheiten (Spuren 1-6).

4.4 Der Einfluss von gereinigtem FLAG-UPF1 auf die *in vitro* Translation

4.4.1 Initiation und Elongation im rekonstituierten Translationssystem sind unabhängig von UPF1

Phosphoryliertes UPF1 interagiert in Zellkulturexperimenten anderer Autoren mit Initiationsfaktor 3 (eIF3) und inhibiert in Kaninchenretikulozytenlysat die Bindung der 60S-Untereinheit während der Initiation (Isken et al., 2008). Da es sich hier um einen indirekten Effekt handeln könnte, untersuchte ich im rekonstituierten System (4.3) mittels Sucroседich-
togradienten (SDG)-Zentrifugation (3.20.2.1) und Primerextensionsinhibition („Toeprinting“, 3.20.2.2), ob UPF1 einen direkten Einfluss auf die Bildung von 48S-Initiationskomplexen, auf die Bindung der 60S-Untereinheit oder die Elongation ausübt.

Im ersten Experiment (Abbildung 16B) wurden 48S- und elongationskompetente 80S-Initiationskomplexe auf der nicht „gecappten“ und nicht polyadenylierten, radioaktiv markierten MVHC-STOP Reporter-mRNA (Abbildung 16A) aus gereinigten ribosomalen 40S- und 60S-Untereinheiten sowie den Initiationsfaktoren eIF2, 3, 1, 1A, 4A, 4B, 4F, 5 und 5B in Gegenwart oder Abwesenheit von UPF1 assembliert. Diese mit der mRNA assoziierten Komplexe wurden dann durch SDG-Zentrifugation nach ihrem Sedimentationsverhalten aufgetrennt. Ribosomen-assoziierte mRNAs migrieren schneller und befinden sich daher weiter unten im Gradienten als freie mRNAs. 48S- oder 80S-Initiationskomplexe, die in Gegenwart von P-UPF1 oder uP-UPF1 assembliert worden waren, zeigten ein ähnliches Migrationsprofil wie die Komplexe ohne UPF1, was darauf hindeutet, dass die Bildung von 48S-Komplexen und Bindung der 60S-Untereinheit im rekonstituierten *in vitro* System nicht durch UPF1 beeinflusst wird.

Um zu untersuchen, ob UPF1 die Elongation beeinflussen kann, wurden im zweiten Experiment 48S-Initiationskomplexe auf der „gecappten“ und polyadenylierten MVHC-STOP-P(A) mRNA (Abbildung 16A) in Gegenwart oder Abwesenheit von UPF1 assembliert (Abbildung 16 C, Spuren 1-3). Die Zugabe von eIF5, eIF5B und 60S-Untereinheiten führte zur Bildung von elongationskompetenten 80S-Initiationskomplexen, die durch Zugabe der Elongationsfaktoren eEF2, eEF1H und aminoacylierten tRNAs elongiert wurden (Spuren 4-6) (Alkalaeva et al., 2006). Die gebildeten Komplexe wurden durch Primerextensionsinhibition („Toeprinting“) analysiert. Durch Toeprinting ist es möglich, die Position, Bindungsstärke und Menge von

ribosomalen Komplexen auf der mRNA zu ermitteln (das Prinzip des Experiments ist unter 3.20.2.2 erklärt). Wie beschrieben (Alkalaeva et al., 2006; Pisarev et al., 2007a, b), befanden sich Toeprints von 48S-Initiationskomplexen relativ zum A des AUG Kodons in der P-Bindestelle des Ribosoms + 16 nt stromabwärts (Abbildung 16 C, Spur 1). Toeprints von Prä-Terminationskomplexen (Pre-TCs) -d. h. elongierten 80S-Komplexen mit dem Stopkodon in der A-Bindestelle (siehe auch 1.3.3)- befanden sich relativ zum U des vorletzten Kodons (UGC, Cystein) in der P-Bindestelle des Ribosoms + 16 nt stromabwärts (Abbildung 16 C, Spur 4). Die Position und Intensität der 48S- und Pre-TC Toeprints wurde durch Zugabe von P-UPF1 (Spuren 2 und 5) und uP-UPF1 (Spuren 3 und 6) nicht beeinflusst. Zusammenfassend können die Initiation und Elongation im rekonstituierten Translationssystem also unabhängig von UPF1 effizient ablaufen.

Die Menge an Radioaktivität in jeder Fraktion wurde gemessen (Fraktion #1 = unterste Fraktion). (C) Toeprinting der in Gegenwart oder Abwesenheit von uP-UPF1 oder P-UPF1 auf der „gecappten“ und polyadenylierten MVHC-STOP-P(A) mRNA assemblierten 48S-Initiationskomplexe (Spuren 1-3) und 80S-Prä-Terminationskomplexe (Pre-TCs, Spuren 4-6). UPF1 wurde in (A) und (B) in 2 x molarem Überschuß zu eIF2 und eIF3 eingesetzt. 48S = 48S-Initiationskomplex, 80S = 80S-Initiationskomplex, Pre-TC = elongierter 80S-Initiationskomplex = Prä-Terminationskomplex, AUG = Startkodon, UGC = Cystein-Kodon, RT = Reverse Transkriptase.

4.4.2 Die Translation einer Luziferase-mRNA in RRL ist unabhängig von UPF1

Die unter Abschnitt 4.4.1 beschriebenen Experimente zeigen, dass die Initiation und Elongation der Translation im rekonstituierten Translationssystem nicht durch UPF1 beeinflusst werden. Möglicherweise könnte unter den Bedingungen des rekonstituierten Systems ein positiver oder negativer Effekt von UPF1 jedoch untergehen, da z.B. Inhibitoren oder Aktivatoren der Translation fehlen (vgl. Abschnitt 4.4.4) oder bereits die maximale Effizienz erreicht ist. Auch könnten weitere Kofaktoren für den in RRL beobachteten Einfluss von phosphoryliertem UPF1 auf die Initiation (Isken et al., 2008) benötigt werden. Dieser Möglichkeit wurde in einem Zeitexperiment in RRL Rechnung getragen (Abbildung 17). Eine „gecappte“ und polyadenylierte Glühwürmchen-Luziferase mRNA wurde dazu in Gegenwart von [S^{35}]-Methionin, P-UPF1, uP-UPF1 oder einer entsprechenden Menge von BSA *in vitro* in RRL (Promega) translatiert. Aliquots wurden entnommen und durch SDS-PAGE analysiert (Abbildung 17, oben). Die Quantifizierung des inkorporierten [S^{35}]-Methionin (Abbildung 17, unten) mittels Phosphoimaging, ließ keinen Unterschied zwischen Reaktionen mit UPF1 oder BSA erkennen. Daraus lässt sich schließen, dass weder uP-UPF1 noch P-UPF1 einen Einfluss auf die Translation in diesem System haben. Ein möglicher Grund für die Diskrepanz zu den Ergebnissen der oben erwähnten anderen Studie könnten Unterschiede in den post-translationalen Modifikationen der hier und bei Isken et al. (Isken et al., 2008) eingesetzten Proteinpräparationen sein.

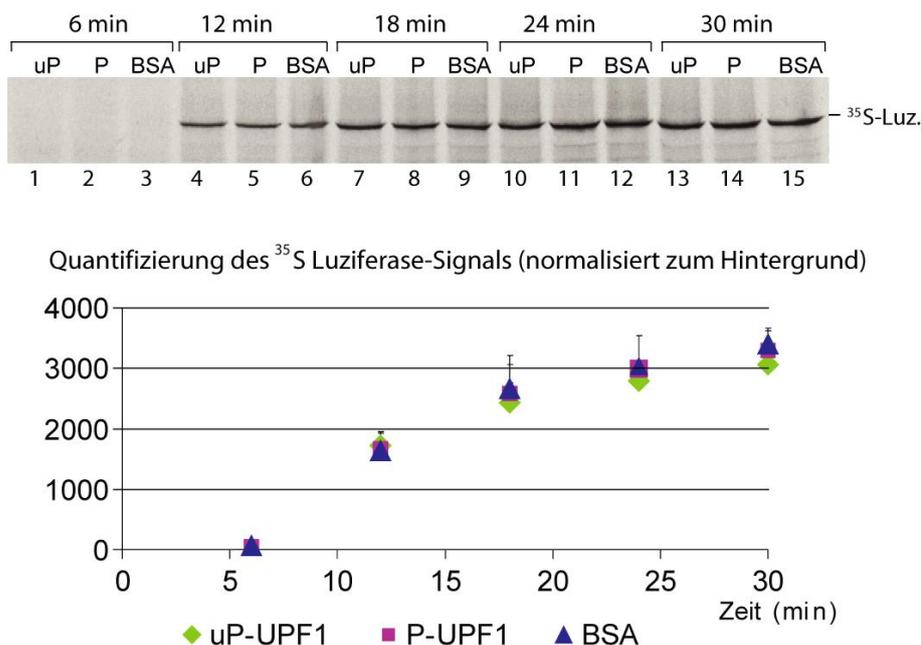


Abbildung 17 Die Translation einer Luziferase-mRNA in RRL wird durch UPF1 nicht beeinflusst.

Zeitversuch der Translation von „gecappter“ und polyadenylierter Glühwürmchen-Luziferase mRNA in 5 µl nukleasiertem und mit [³⁵S]-Methionin versetztem RRL. 100 ng BSA, P-UPF1 (P) oder uP-UPF1 (uP) wurden erst für 10 min bei 37 °C in RRL vorinkubiert, dann wurden 0,016 pmol mRNA zugegeben und für 6 bis 30 min bei 30 °C translatiert. Oben: Repräsentatives SDS-Gel, das die Akkumulation der Luziferase zeigt. Unten: Die Quantifizierung des radioaktiven Signals erfolgte mit FLA-3000 Phosphorimager. Der Graph zeigt die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten, Balken repräsentieren die Standardabweichung.

4.4.3 Der Einfluss von UPF1 auf die Termination im rekonstituierten Translationsystem

Während der Termination (Abschnitt 1.3.3 und Abbildung 18) bilden eRF1 und eRF3 mit GTP einen ternären Komplex (eRF1 / eRF3-GTP), der an die A-Bindestelle des Ribosoms bindet und eine Konformationsänderung des Ribosoms bewirkt. Nach der GTP-Hydrolyse durch eRF3 kommt es zur Freisetzung des noch mit der Peptidyl-tRNA assoziierten Peptids. UPF1 interagiert mit eRF1 und eRF3 (Czaplinski et al., 1998; Bhattacharya et al., 2000; Kashima et al., 2006; Ivanov et al., 2008) und scheint translationalen „Readthrough“ (anstatt zu terminieren, baut das Ribosom eine Aminosäure ein) zu modulieren (1.7 und (Weng et al., 1996b; Ivanov et al., 2008)). In der Hefe wurde durch Toeprinting gezeigt, dass die Termination an Nonsense-Kodons aberrant ist (Amrani et al., 2004): Die Terminationskomplexe auf dem NMD-Substrat waren wesentlich stabiler als die Terminationskomplexe auf der normalen mRNA. Im Vergleich zur normalen Termination scheint die Termination und / oder die Dissoziation der Ribosomen von „vorzeitigen“ Terminationskodons langsam und ineffizient zu sein (Amrani et

al., 2004; Ghosh et al., 2010). Diese Ergebnisse wurden in der Literatur so interpretiert, dass im Falle einer aberranten (d. h. NMD auslösenden) 3'-UTR die Termination verlangsamt ist. Es wurde postuliert, dass UPF1 die Termination anhält und von SMG1 phosphoryliert wird, wenn die terminationsfördernde Interaktion zwischen eRF3 und PABPC1 ausbleibt (Ivanov et al., 2008). Dieses Modell impliziert, dass UPF1 sowohl die normale als auch die „vorzeitige“ Termination aktiv kontrolliert. Alternativ könnte die (evtl. durch das Fehlen von PABPC1 oder anderen terminationsfördernden Elementen in der 3'-UTR) verlangsamte Termination erst die Interaktion von UPF1 und SMG1 mit den eRFs ermöglichen, ohne dass UPF1 selbst die Termination beeinflusst. Der beim Erkennen des Terminationskodons gebildete makromolekulare Komplex aus UPF1-assoziierten Faktoren könnte überdies die Dissoziation des Ribosoms verhindern, ohne dass dies etwas mit einem primären Einfluss von UPF1 auf die Translation *per se* zu tun hätte, schließlich bewirkt UPF1 auch die De-Assemblierung von Degradations-intermediaten des NMD (Franks et al., 2010).

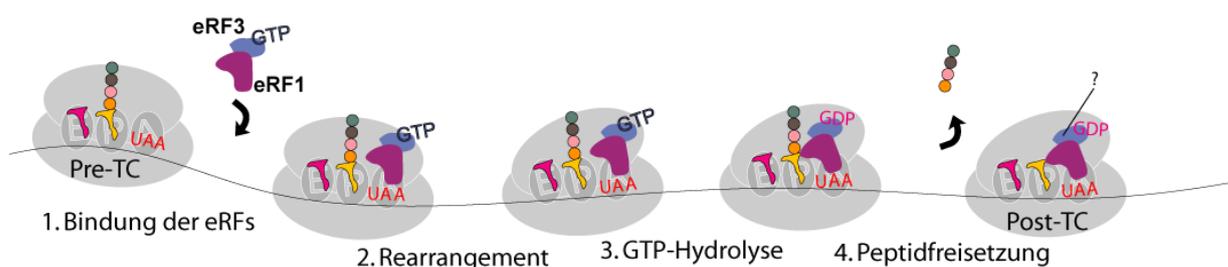


Abbildung 18 Schematische Darstellung der Termination.

Während der Termination erkennt eRF1 das Stopkodon und bindet in einem ternären Komplex mit eRF3 und GTP (eRF1 / eRF3-GTP) an die A-Bindestelle der Prä-Terminationskomplexe („Pre-TCs“) und bewirkt dort eine Konformationsänderung des Ribosoms. Nach der GTP-Hydrolyse durch eRF3 induziert eRF1 die Freisetzung des Peptids. Nach der Termination sind die jetzt als Post-Terminationskomplexe („Post-TCs“) bezeichneten 80S-Komplexe noch mit eRF1 (und evtl. mit eRF3) assoziiert. Die Post-TCs werden durch die Freisetzung des Peptids destabilisiert und dissoziieren teilweise von der mRNA.

4.4.3.1 Die Kinetik der Freisetzung des Peptids während der Termination wird durch UPF1 nicht beeinflusst

Es wurde vermutet, dass UPF1 die Kinetik der Termination verändert (Weng et al., 1996b; Czaplinski et al., 1998; Hilleren & Parker, 1999; Wang et al., 2001). Um die möglicherweise transienten Effekte von UPF1 auf die Termination zu untersuchen, verfolgte ich in einer Zeit-

reihe die Kinetik der Freisetzung des Peptids während der Termination (schematische Darstellung s. Abbildung 18).

Auf der MVHC-STOP-P(A) mRNA (Abbildung 12B) in Gegenwart von radioaktiver [³⁵S]-Cystein-tRNA^{Cys} assemblierte Pre-TCs wurden nach ihrer Aufreinigung durch SDG-Zentrifugation mit einem Überschuss von Nukleotiden, eRF1 und eRF3 inkubiert, die vorher mit oder ohne UPF1 vorinkubiert worden waren. Die zeitabhängige Freisetzung des radioaktiv markierten Tetrapeptids Met-Val-His-[³⁵S]-Cys während der Termination wurde nach Präzipitation der Ribosomen durch Trichloressigsäure im Überstand gemessen (Abbildung 19). Weder P-UPF1 (rechte Spalte) noch uP-UPF1 (linke Spalte) beeinflusste die Freisetzung des Tetrapeptids, unabhängig von der Abwesenheit (obere Reihe) oder Gegenwart von ATP (mittlere Reihe) oder AMPPNP (untere Reihe). Wenn eRFs im Überschuss über Pre-TCs sind, hat UPF1 also auch vor Erreichen des thermodynamischen Gleichgewichts keinen direkten Einfluss auf die Termination.

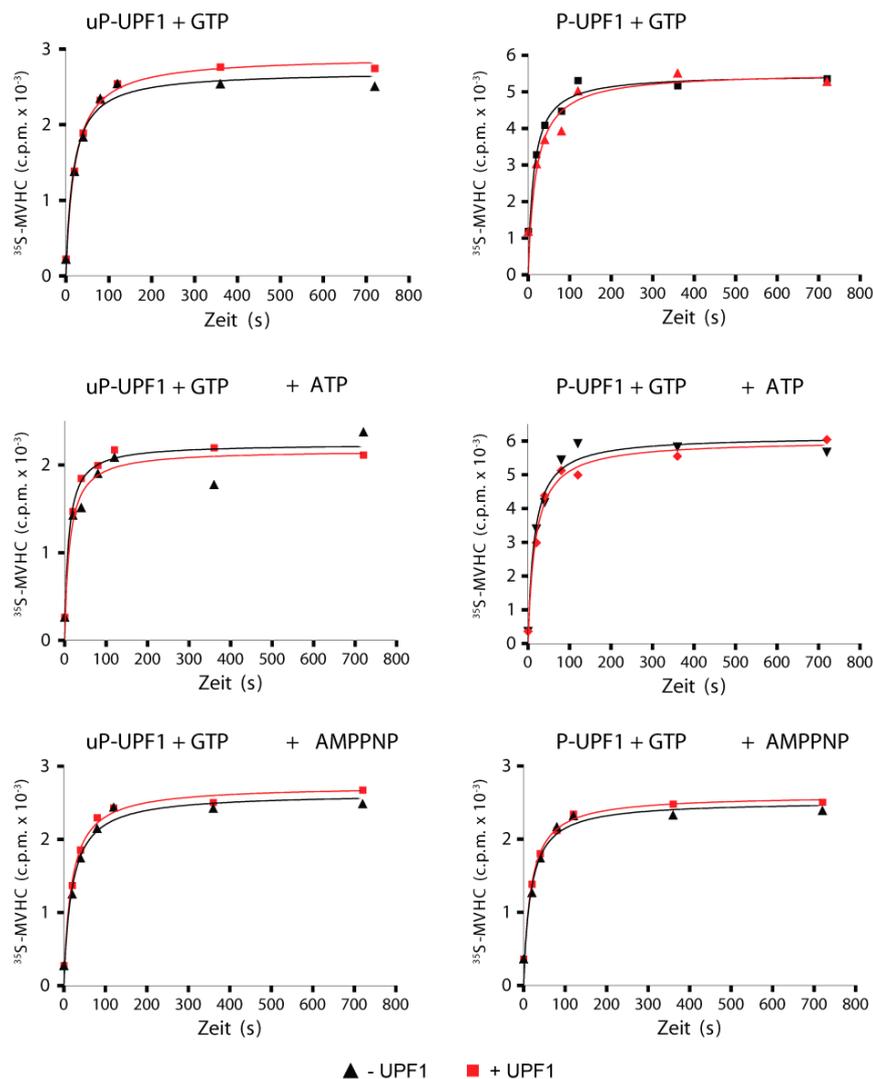


Abbildung 19 UPF1 hat keinen Einfluss auf die Kinetik der Termination, wenn eRFs im Überschuss über Pre-TCs vorliegen.

Kinetik der Freisetzung des Tetrapeptids MVHC- ^{35}S in Gegenwart (+) oder Abwesenheit (-) von P-UPF1 oder uP-UPF1. 5 pmol P-UPF1 oder uP-UPF1, 2 pmol eRF1 und 3 pmol eRF3 wurden mit den angegebenen Nukleotiden (ATP = Adenosin-Triphosphat; GTP = Guanosin-Triphosphat) und nicht hydrolysierbaren Nukleotidanaloga (AMPPNP = Adenylyl-Imidodiphosphat; GMPPNP = Guanylyl-Imidodiphosphat) zur Komplexbildung vorinkubiert. Nach Zugabe von mit ^{35}S -Cystein gelabelten Pre-TCs, wurden Aliquots entnommen und die Menge des freigesetzten Peptids gemessen.

4.4.3.2 Die Termination in Gegenwart von UPF1 ist effizient: „Endpoint“-Experiment

Die Freisetzung des Peptids während der Termination (Abbildung 18) destabilisiert die ribosomalen Komplexe und führt teilweise zur Dissoziation der mRNA und der nun deacylierten tRNA (Pisarev et al., 2007a). Um den möglichen Einfluss von UPF1 auf die Stabilität der Terminationskomplexe zu untersuchen, führte ich ein Primerextensionsinhibitions- („Toeprin-

ting“-) Experiment (das Prinzip des Experiments ist in Abschnitt 3.20.2.2 erklärt) durch (Abbildung 20). Pre-TCs wurden auf der MVHC-STOP mRNA (schematische Darstellung s. Abbildung 12B) assembliert und durch SDG-Zentrifugation gereinigt. Um die Interaktion von UPF1 mit den Pre-TCs zu ermöglichen, wurden diese für 10 min mit UPF1 oder BSA vorinkubiert und daraufhin mit einem Überschuss von Nukleotiden, eRF1 und eRF3 für 10 min inkubiert. Die entstandenen ribosomalen Komplexe wurden durch Toeprinting analysiert. Nach dem derzeitigen Terminationsmodell (Abbildung 18, nach (Alkalaeva et al., 2006; Pisarev et al., 2007a; Pisarev et al., 2010)) induziert die Bindung von eRF1 / eRF3-GTP eine Konformationsänderung der Pre-TCs, die sich im Toeprint als eine Verschiebung um 2 Nukleotide (im Folgenden als + 2 nt „Shift“ bezeichnet) manifestiert. Nach der GTP-Hydrolyse durch eRF3, veranlasst eRF1 die Peptid-Hydrolyse und bleibt mit den ribosomalen Komplexen (die jetzt als Post-Terminationskomplexe, „Post-TCs“ bezeichnet werden) weiterhin assoziiert, sodass der + 2 nt „Shift“ erhalten bleibt. Durch die Peptid-Hydrolyse werden die ribosomalen Komplexe destabilisiert und dissoziieren teilweise von der mRNA. Dadurch wird die Intensität ihres Toeprints reduziert und die Intensität des Signals der cDNA voller Länge nimmt zu.

Übereinstimmend mit diesem Modell „shifteten“ Pre-TCs, die mit eRFs und dem nicht-hydrolysierbaren GTP-Analog GMPPNP inkubiert worden waren, um zwei Nukleotide (Abbildung 20A, vgl. Spur 13 (Pre-TCs) mit Spuren 4,10; Abbildung 20B, vgl. Spur 7 (Pre-TCs) mit Spur 4), wohingegen die Inkubation mit GTP zu einer starken Abnahme der (Post-TC-) Toeprints, mit gleichzeitiger Zunahme der Menge an cDNA voller Länge, führte (Abbildung 20A, Spuren 1, 7; Abbildung 20 B, Spur 1). Dies deutet auf die Destabilisierung dieser Komplexe nach der Termination hin. Weder P-UPF1 noch uP-UPF1 hatten unter diesen Bedingungen einen Einfluss auf die Position oder Stärke der Toeprints (Abbildung 20A, Spuren 8, 9; 11, 12; 14, 15). Da UPF1 eine enzymatische ATPase-Aktivität besitzt, wurden diese Versuche auch in Gegenwart von ATP oder dem nicht-hydrolysierbaren ATP-Analog AMPPNP durchgeführt (Abbildung 20A, Spuren 1-6; Abbildung 20B). Da UPF1 *in vivo* mit den eRFs interagiert (Kashima et al., 2006; Ivanov et al., 2008), wurde ein ähnliches Experiment durchgeführt, bei dem UPF1 zusammen mit den eRFs und verschiedenen Nukleotidanaloga vorinkubiert wurde (Abschnitt 7.1, Abbildung 21). Jedoch war auch unter diesen Bedingungen kein Einfluss von UPF1 auf die Termination nachweisbar.

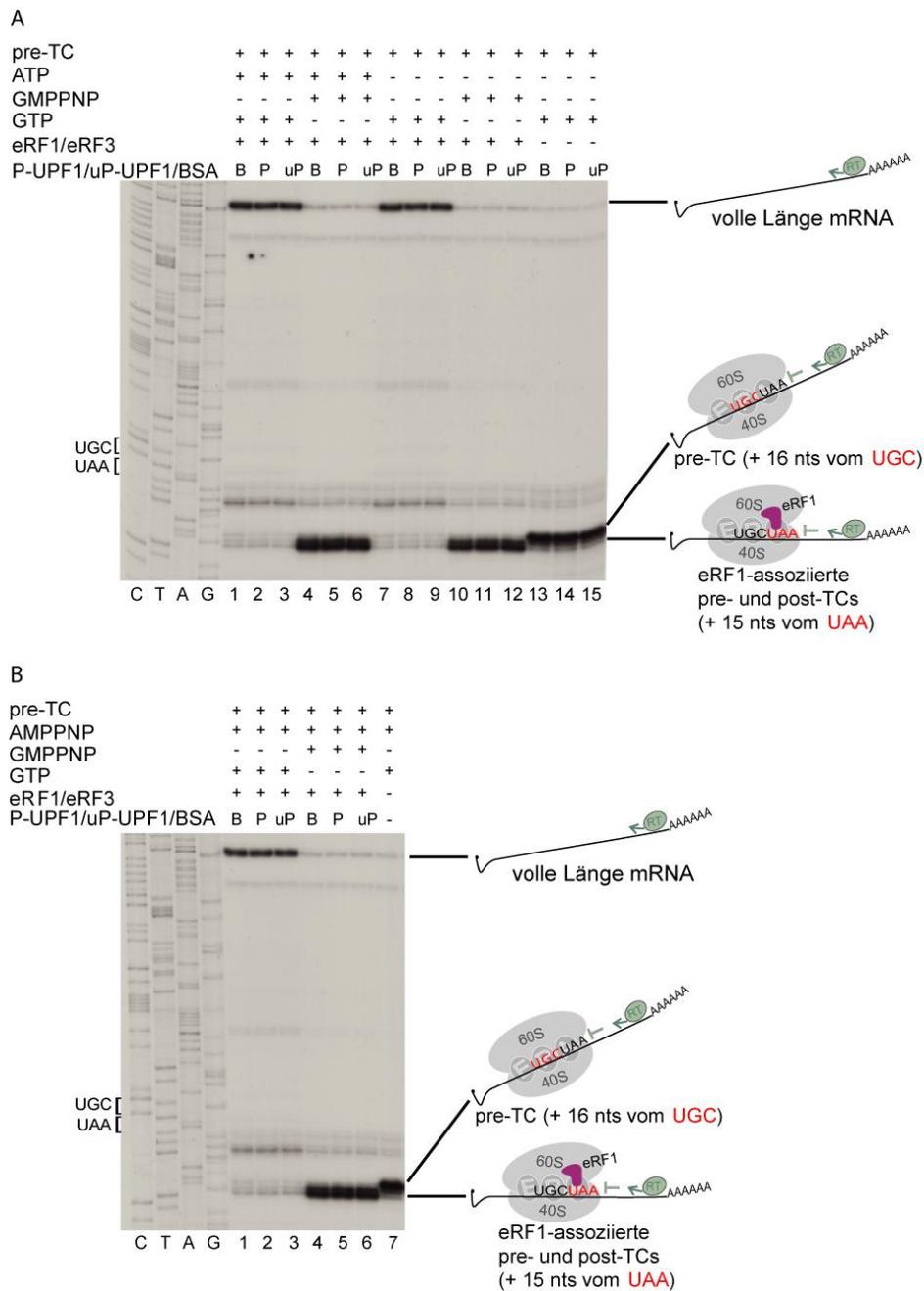


Abbildung 20 Die Termination und die Stabilität von Post-TCs wird durch UPF1 nicht beeinflusst.

(A, B) Analyse von ribosomalen Komplexen, nach 10 min Inkubation mit eRFs, durch Toeprinting. Auf der MVHC-STOP mRNA assemblierte Pre-TCs (0,05 - 0,1 pmol) wurden mit 5 pmol uP- oder P-UPF1 und den angegebenen Nukleotiden in Translationspuffer bei einer Konzentration von 1 mM freiem (nicht an Nukleotide gebundenem) Magnesium vorinkubiert, dann wurden 2 pmol eRF1 und 3 pmol eRF3 zugegeben. Die Position der Toeprints von Pre-TCs (+ 16 nt 3' des U des UGC (Cystein) Kodons in der ribosomalen P-Bindestelle) und von mit eRF1 assoziierten Pre- und Post-TCs (+ 15 nt 3' des U des UAA (Terminations-) Kodons in der ribosomalen A-Bindestelle) sind jeweils auf der rechten Seite der Graphik angegeben, zusammen mit einer schematischen Darstellung dieser Komplexe. (A) Toeprinting-Experiment in Gegenwart oder Abwesenheit von ATP. (B) Toeprinting-Experiment in Gegenwart von AMPPNP.

vorinkubiert, dann wurden auf der MVHC-STOP-P(A) mRNA assemblierte Pre-TCs (0,05-0,1 pmol) zugegeben. Die Position der Toeprints von Pre-TCs (+ 16 nt 3' des U des UGC (Cystein) Kodons in der ribosomalen P-Bindestelle) und von mit eRF1 assoziierten Pre- und Post-TCs (+ 15 nt 3' des U des UAA- (Terminations-) Kodons in der ribosomalen A-Bindestelle) sind jeweils auf der rechten Seite der Graphik angegeben, zusammen mit einer schematischen Darstellung dieser Komplexe. (A) Toeprinting-Experiment in Gegenwart oder Abwesenheit von uP-UPF1. (B) Toeprinting-Experiment in Gegenwart oder Abwesenheit von P-UPF1. (C) Toeprinting-Experiment in Gegenwart von AMPPNP.

4.4.3.3 Komplementierung des rekonstituierten Systems mit translationskompetentem, zytoplasmatischem HeLa-Zellextrakt

Für seinen Einfluss auf die Translation könnte UPF1 weitere Faktoren benötigen, die im rekonstituierten Translationssystem aus gereinigten Faktoren fehlen, wie z. B. SMG1, UPF2 oder UPF3b. Hefestämme mit Deletionen in den Genen für Upf1, Upf2 oder Upf3 zeigen nicht nur eine Stabilisierung von Nonsens-mRNAs, sondern gleichzeitig erhöhte Readthrough-Aktivität von vorzeitigen Stopkodons (Weng et al., 1996b; Wang et al., 2001; Keeling et al., 2004). Dies wurde als ein Hinweis auf eine Funktion der UPF-Proteine in der Termination gedeutet, möglicherweise vermittelt durch die Interaktion dieser Proteine mit den Terminationsfaktoren eRF1 und eRF3 (Czaplinski et al., 1998). Da alle drei NMD-Faktoren in dem beschriebenen Effekt auf die Translation eine Funktion zu haben scheinen, könnte man (wenn man von einer direkten Funktion ausgeht) daraus auch schließen, dass die Zugabe eines einzelnen Faktors zum rekonstituierten Translationssystem wahrscheinlich nicht ausreicht.

Daher führte ich ein Komplementierungsexperiment mit translationskompetentem HeLa-Zellextrakt durch. Dafür wurden eRFs, UPF1 oder BSA mit einer Verdünnungsreihe von Zellextrakt vorinkubiert, dann für 10 min mit auf der MVHC-STOP mRNA (Abbildung 12B) assemblierten Pre-TCs inkubiert und die resultierenden Komplexe durch Toeprinting analysiert. Leider war die Komplementierung des rekonstituierten Systems mit Zellextrakt aufgrund von hoher RNase-Aktivität im Extrakt nur eingeschränkt möglich (Abbildung 22). Die Stabilität der Terminationskomplexe in Gegenwart von UPF1 oder BSA war jedoch bei Verdünnungen, die noch einen Toeprint erlaubten, identisch (vgl. Spur 1 mit Spur 2 und Spur 3 mit Spur 4).

A

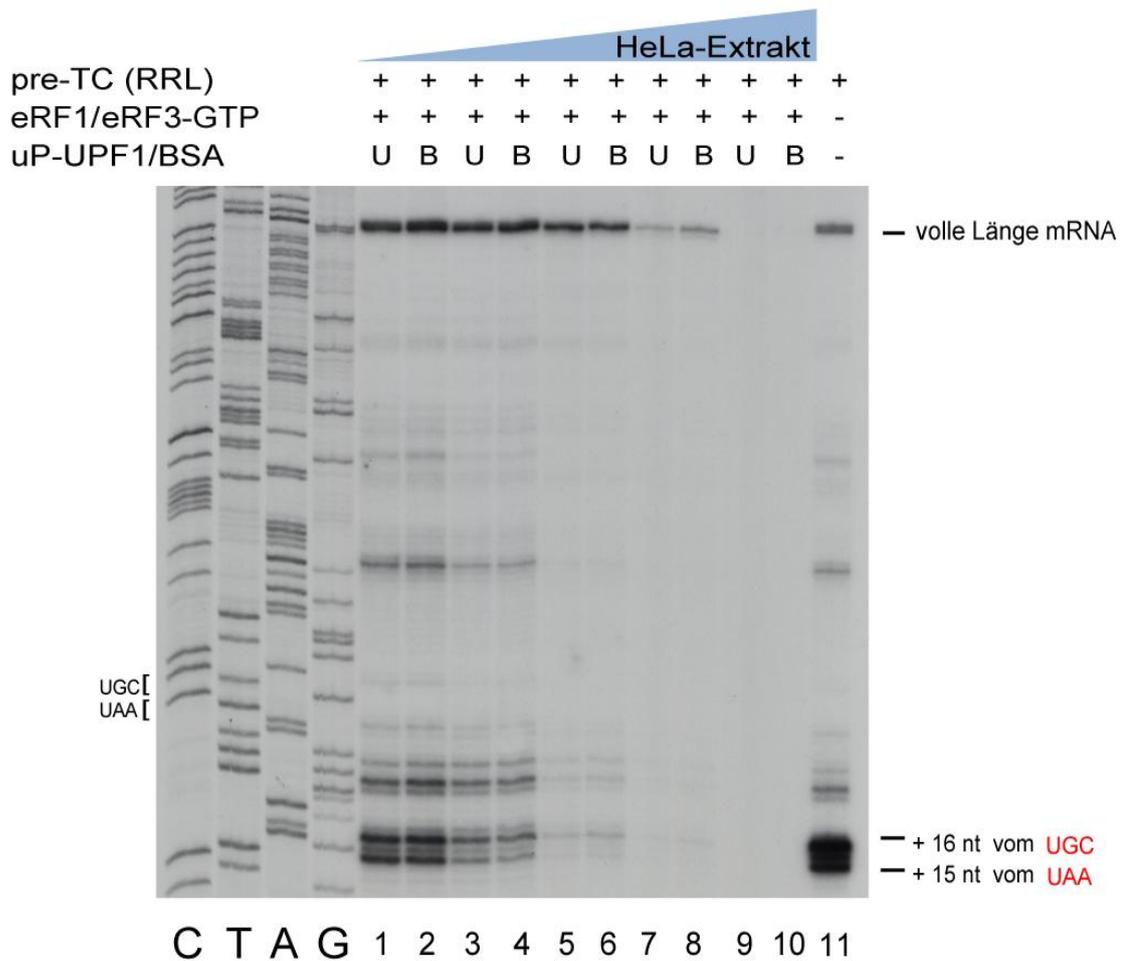


Abbildung 22 Die Stabilität von Post-TCs wird in Gegenwart von HeLa-Extrakt durch UPF1 nicht beeinflusst.

Terminationsfaktoren, UPF1 (U) oder BSA (B) wurden mit einer Verdünnungsreihe von translationskompetentem HeLa-Zellextrakt (2 μ l, 1 / 5, 1 / 10, 1 / 40) für 5 min zur Komplexbildung vorinkubiert und dann für 10 min mit Pre-TCs auf der MVHC-STOP mRNA inkubiert. Die resultierenden Komplexe wurden durch Toeprinting analysiert. Die Position der Toeprints von Pre-TCs oder 40S- / mRNA- / tRNA-Komplexen nach der Dissoziation von Post-TCs durch ABCE1 (+ 16 nt 3' des U des UGC (Cystein) Kodons) und von mit eRF1 assoziierten Pre- und Post-TCs (+ 15 nt 3' des U des UAA (Terminations-) Kodons in der ribosomalen A-Bindestelle) sind jeweils auf der rechten Seite der Graphik angegeben.

4.4.4 UPF1 fördert die Dissoziation von Terminationskomplexen

4.4.4.1 UPF1 beeinflusst die Stabilität von Terminationskomplexen bei reduzierter Menge an Terminationsfaktoren

mRNAs sind im Zytoplasma in Form von mRNPs mit vielen weiteren Faktoren assoziiert, wie z. B. mit miRNAs und zahlreichen Proteinen, einschließlich PABPC1, YB1 oder dem EJC, die die Translation positiv oder negativ beeinflussen können ((Hieronymus & Silver, 2004; Svitkin et al., 2009; Beilharz et al., 2010), siehe auch Abschnitt 1.2) und die gegebenenfalls im Wechselspiel mit UPF1 stehen könnten.

Die Komplementierung des rekonstituierten Systems mit Zellextrakt war aufgrund hoher RNase-Aktivität nur eingeschränkt möglich (4.4.3.3). Um der oben beschriebenen Hypothese des Bedarfs weiterer Faktoren Rechnung zu tragen, reinigte ich daher (anstelle der Assemblierung von Pre-TCs durch *in vitro* Translation im rekonstituierten System) -mithilfe einer Mutante von eRF1- Terminationsintermediate aus Translationsreaktionen in RRL auf, die noch mit einigen nicht-ribosomalen Proteinen assoziiert waren (4.3.2, Abbildung 15B).

Wie die Pre-TCs aus dem rekonstituierten Translationssystem, befanden sich die Toeprints dieser Terminationsintermediate auf der nicht polyadenylierten MVHC-STOP mRNA + 16 Nukleotide stromabwärts des UGC (Cystein)-Kodons (Abbildung 23A, Spur 1). Durch Zugabe von eRFs und GTP wurden die Ribosomen nach vollendeter Termination destabilisiert, sodass der Toeprint deutlich schwächer wurde (Spur 2). Durch Zugabe des nicht-hydrolysierbaren Nukleotidanalogs GMPPNP konnten im Toeprint + 15 nt 3' des Terminationskodons (UAA) Terminationsintermediate sichtbar gemacht werden, bei denen die Konformationsänderung der Ribosomen schon erfolgt war, jedoch die Peptidabspaltung nicht stattfinden konnte. Diese Komplexe sind noch stabil mit der mRNA assoziiert (Alkalaeva et al., 2006), was zu einem quantitativen „Shift“ führte (Spur 3). Die Terminationsintermediate aus RRL verhielten sich in diesem und in einem vergleichbaren Experiment (Abschnitt 4.3.2, Abbildung 15A) also ähnlich wie die Pre-TCs aus dem rekonstituierten Translationssystem.

Diese Terminationsintermediate aus RRL („RRL-Pre-TCs“) auf der MVHC-STOP mRNA wurden vor Zugabe von verschiedenen Mengen von eRFs mit UPF1 oder BSA vorinkubiert. Die resultierenden ribosomalen Komplexe wurden durch Toeprinting analysiert. Bei niedriger Konzentration der Terminationsfaktoren führte die Vorinkubation mit P-UPF1 oder uP-UPF1 zu

einer Abnahme der Pre-TC Toeprints, bei gleichzeitiger Zunahme der vollen Länge cDNA-Bande (Abbildung 23A, vgl. Spuren 7 und 8 mit Spur 6). Zwei mögliche Erklärungsansätze sind theoretisch denkbar: UPF1 könnte entweder die Termination oder aber die post-terminale Dissoziation von Terminationskomplexen (= das Recycling der Ribosomen) fördern.

Auch die Toeprints von RRL-Pre-TCs auf der „gecappten“ und polyadenylierten MVHC-STOP-P(A) mRNA wurden durch UPF1 in Gegenwart von eRFs moduliert (Abbildung 29, Abschnitt 7.1). Der Einfluss von UPF1 auf die Stabilität der ribosomalen Komplexe war also unabhängig von der eingesetzten mRNA sowie unabhängig vom „Cap“ oder Poly-(A)-Schwanz.

Die Toeprints von Komplexen aus dem rekonstituierten Translationssystem wurden von UPF1 schwächer beeinflusst (Abbildung 23B, vgl. Spuren 3 und 4, sowie Spuren 5 und 6). Dies könnte entweder auf die Assoziation der RRL-Pre-TCs mit weiteren Proteinen (4.3.2, Abbildung 15) oder auf leicht unterschiedliche Konzentrationen der RRL-Pre-TCs und der Pre-TCs zurückzuführen sein. Dieses Experiment deutet auf eine Poly-(A)-Schwanz-unabhängige Stimulation der Termination oder der Dissoziation von Post-Terminationskomplexen durch UPF1 hin.

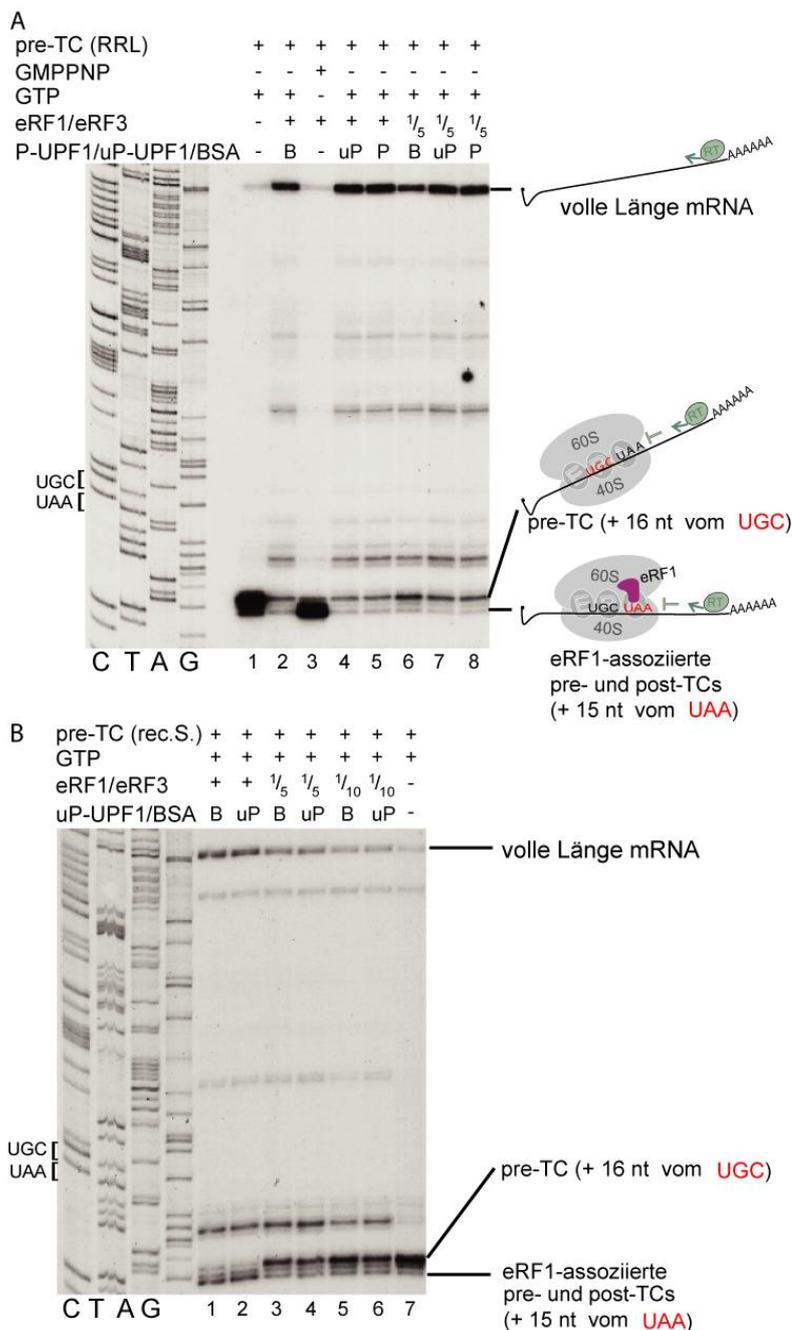


Abbildung 23 Die Gegenwart von UPF1 stimuliert die Termination oder die Dissoziation von Terminationskomplexen bei reduzierter Menge an eRFs.

Terminationsintermediate aus RRL (A), sowie Pre-TCs aus dem rekonstituierten Translationssystem (B) auf der MVHC-STOP-mRNA wurden 10 min mit den angegebenen UPF1-Isoformen (uP = uP-UPF1, P = P-UPF1) oder BSA (B) bei 1 mM ATP, 0,5 mM GTP und 1,5 mM freiem Magnesium in Translationspuffer vorinkubiert. Dann wurden die Translationsterminationsfaktoren (1 pmol eRF1, 2 pmol eRF3, oder die angegebenen Verdünnungen) zugegeben und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die resultierenden Komplexe wurden durch Toeprinting analysiert. Die Position der ribosomalen Toeprints (relativ zum UGC- oder UAA-Kodon) ist angegeben. Pre-TC = Prä-Terminationskomplex, Post-TC = Post-Terminationskomplex, UGC = Cystein-Kodon, UAA = Terminationskodon.

4.4.4.2 Der Einfluss auf die Stabilität von Terminationskomplexen ist reproduzierbar und spezifisch für UPF1

Da die Überexpression einer Kinase-inaktiven SMG1-Mutante zu verstärkter Immunopräzipitation von UPF1 mit eRF3 führt, schlagen Kashima et al. (Kashima et al., 2006) vor, dass die durch SMG1 vermittelte Phosphorylierung von UPF1 während des NMD dessen Dissoziation von eRF3 induziert. Daher untersuchte ich, ob die Phosphorylierung von UPF1 auch eine Rolle bei dessen Funktion in der Termination spielt: Weitere Toeprinting-Experimente mit den RRL-Pre-TCs zeigten, dass uP-UPF1 und P-UPF1 im Vergleich zu BSA die Dissoziation der Terminationskomplexe gleichermaßen förderten (Abbildung 24A, vgl. Spur 1 mit Spuren 2 und 3). Dabei war P-UPF1 im Trend etwas effektiver, jedoch war der Unterschied zu uP-UPF1 statistisch nicht signifikant (Abbildung 24B, vgl. Säule 1 mit Säulen 2 und 3). Diese moderate Stimulation von 20-30 % (im Vergleich zu den Kontrollreaktionen mit BSA) war daher unabhängig vom Phosphorylierungsgrad von UPF1, jedoch hoch reproduzierbar und statistisch signifikant.

Um auszuschließen, dass es sich bei dem Effekt von UPF1 auf die Termination um eine Verunreinigung der UPF1-Präparationen durch dessen Interaktionspartner eRF3 handelt, führte ich ein Kontrollexperiment mit eRF1, jedoch ohne eRF3 durch. Unter diesen Bedingungen war die Termination -den Ergebnissen anderer Autoren entsprechend (Alkalaeva et al., 2006; Pisarev et al., 2007a)- wesentlich weniger effizient als in Gegenwart von eRF1 und eRF3 (Abbildung 24A und B, vgl. Spuren / Säulen 4 bis 6 mit Spuren / Säulen 1 bis 3) und wurde auch nicht durch UPF1 beeinflusst (Abbildung 24A und B, vgl. Spur / Säule 4 mit Spuren / Säulen 5 und 6). Dies lässt einen unspezifischen Effekt durch eine präparative Verunreinigung von UPF1 durch eRF3 wenig wahrscheinlich erscheinen.

Als Kontrolle für einen unspezifischen Einfluss von UPF1 durch seine RNA-Binde- oder RNA-Helikase-Aktivität wurde die RNA-Helikase eIF4A mit dem Kofaktor eIF4B herangezogen, die sich im Gegensatz zu UPF1 wie BSA verhielt (Abbildung 24C und D, vgl. Spur / Säule 2 mit Spuren / Säulen 1 und 3). Die Stimulation der Dissoziation von Terminationskomplexen war also keine generelle Eigenschaft von RNA-Bindeproteinen oder Helikasen, sondern scheint spezifisch für UPF1 zu sein.

Als weitere Spezifitätskontrollen konnten FLAG-getaggte Mutanten von UPF1 herangezogen werden, die in Kontrollelexperimenten inaktiv in der Termination waren. Daraus kann man schließen, dass es sich nicht um einen Effekt durch das FLAG-Tag handelt (die UPF1-Mutanten werden im nächsten Abschnitt näher erläutert). Zusammenfassend scheint der Einfluss von UPF1 auf die Stabilität der Terminationskomplexe spezifisch für UPF1 zu sein.

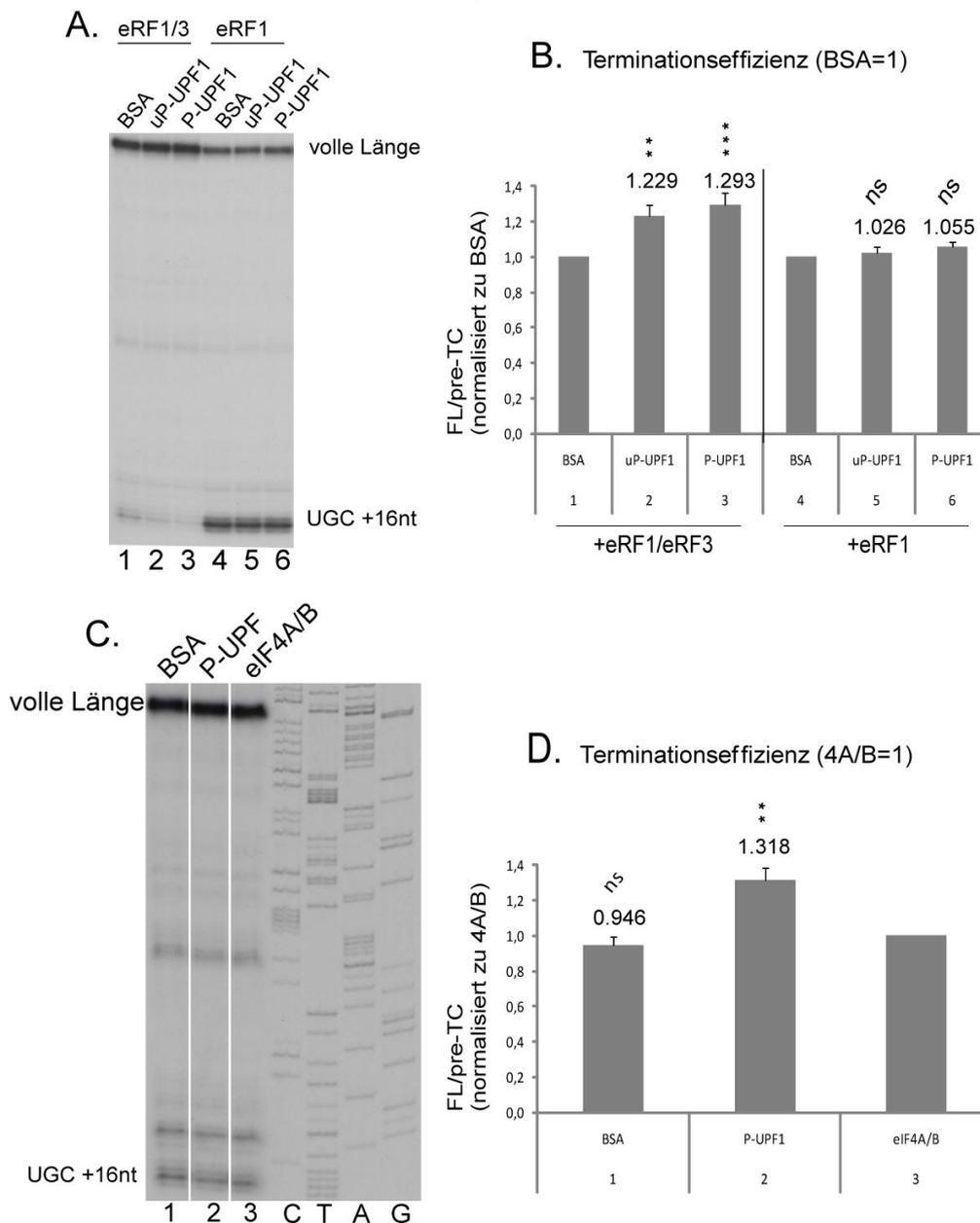


Abbildung 24 Die Stimulation der Termination oder der Dissoziation von Terminationskomplexen ist UPF1-spezifisch und eRF3-abhängig.

(A) Toeprinting von mit P-UPF1, uP-UPF1 oder BSA vorinkubierten Terminationsintermediaten aus RRL auf der MVHC-STOP-P(A) mRNA nach 5 min Inkubation mit 0,3 pmol eRF1 (Spuren 4-6) oder 0,3 pmol eRF1 und 1 pmol

eRF3 (Spuren 1-3). Die Kontrollreaktionen ohne eRF3 zeigen, dass die UPF1 Präparationen frei von dessen Interaktionspartner eRF3 sind. **(B)** Quantifizierung der Ergebnisse aus (A) mit dem Phosphorimager FLA3000 und statistische Analyse der Ergebnisse. Das Verhältnis der vollen Länge cDNA Bande zur Pre-TC Bande (FL / Pre-TC) wurde zu der Negativkontrolle BSA normalisiert. Ein einseitiger t-Test wurde mit $n = 19$ (P-UPF1) und $n = 16$ (uP-UPF1) unabhängigen Experimenten durchgeführt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an (SEM), die Sterne repräsentieren die Signifikanzstufen (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$, ns = nicht signifikant). **(C)** Toeprinting von mit P-UPF1, eIF4A / B oder BSA vorinkubierten Terminationsintermediaten aus RRL auf der MVHC-STOP-P(A) mRNA nach 5 min Inkubation mit eRFs. **(D)** Quantifizierung der Ergebnisse aus (C) wie unter (B) beschrieben, von $n = 10$ unabhängigen Experimenten. Die Reaktionen wurden hier zur Negativkontrolle eIF4A/B normalisiert.

4.4.4.3 Der Einfluß von UPF1-Mutanten auf die Termination

Die CH-reiche Region von UPF1 vermittelt dessen Interaktion mit eRF3 (Kashima et al., 2006; Ivanov et al., 2008) und mit UPF2 (Kadlec et al., 2006; Clerici et al., 2009) (erläutert in 1.5.2.3). Außerdem wird translationaler Readthrough durch Mutationen in dieser Region moduliert (Weng et al., 1996b) und NMD inhibiert (Kashima et al., 2006; Ivanov et al., 2008). Da der Einfluß von UPF1 auf die Termination nach meinen Ergebnissen eRF3-abhängig war (4.4.4.2), untersuchte ich daher den Einfluss einer entsprechenden Mutante von UPF1 (UPF1- Δ CHR, Δ aa 130-250 (Ivanov et al., 2008)) auf die Termination. Jedoch war der Einfluss dieser Mutante auf die Termination fast genauso stark wie der Einfluss von Wildtyp-UPF1 (Abbildung 25E). Die Interaktion von UPF1 mit eRF3 war also entweder nicht relevant für die Aktivität von UPF1 in der Termination, oder die Interaktion dieser Mutante mit eRF3 ((Ivanov et al., 2008) und Abbildung 25D) war noch ausreichend.

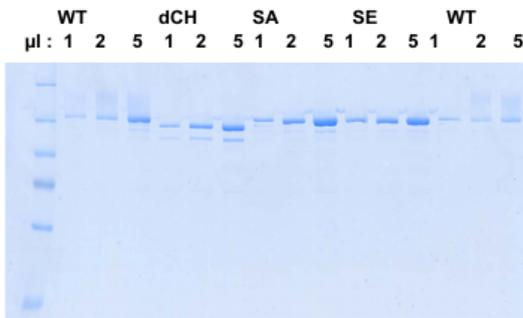
Die Phosphorylierung von UPF1 durch SMG1 ist für dessen NMD-Funktion essenziell. 4 Serin-Aminosäuren am C-Terminus, die durch SMG1 phosphoryliert werden, sind NMD-relevant (Kashima et al., 2006). Um meine Ergebnisse, dass uP-UPF1 und P-UPF1 gleichermaßen die Termination beeinflussen zu überprüfen, mutierte ich daher diese 4 Serine entweder zu phosphomimetischem Glutamat (UPF1-4SE) oder (wie Kashima et al., 2006) zu Alanin (UPF1-4SA). Zuerst untersuchte ich den Effekt dieser Mutanten auf NMD. Dafür wurden HeLa-Zellen mit siRNAs gegen UPF1 oder -als Negativkontrolle- mit siRNAs gegen Luziferase behandelt. Dadurch war die Menge an funktionellem UPF1 depletiert (nicht gezeigt) und der NMD-vermittelte Abbau eines β -Globin Reporters mit einer Nonsense-Mutation (NS39) teilweise inhibiert (Abbildung 25C). In Zellen, in denen das endogene UPF1 depletiert war, wurden

dann durch Transfektion von siRNA-resistenten Plasmiden WT-UPF1, UPF1- Δ CHR, UPF1-4SA und UPF1-4SE exprimiert. Während die Transfektion mit WT-UPF1 die NMD-Effizienz wiederherstellte, war die UPF1- Δ CHR-Mutante -mit den Ergebnissen anderer Autoren übereinstimmend (Kashima et al., 2006; Ivanov et al., 2008)- inaktiv in NMD. Die UPF1-4SA und UPF1-4SE-Mutanten waren noch partiell aktiv in NMD, eventuell ist der für NMD notwendige Phosphorylierungszyklus von UPF1 nicht auf diese 4 Stellen beschränkt.

Interessanterweise kann die Δ CHR-Mutante, die noch aktiv in der Termination ist, keinen NMD auslösen, umgekehrt können die 4SA- / 4SE-Mutanten, die inaktiv in der Termination sind, noch teilweise NMD auslösen. Die Aktivität von UPF1 in der Termination scheint nach meinen Daten daher teilweise unabhängig von der Aktivität von UPF1 im NMD zu sein. In der Hefe wurde gezeigt, dass durch bestimmte Mutationen diese beiden Funktionen von Upf1 getrennt werden können (Weng et al., 1996a, b): Mutationen in der Helikase-Region von Upf1 inhibierten NMD, ohne die Fidelität der Translation zu beeinflussen. Dahingegen hatten Mutationen in der CH-reichen Region normale NMD-Aktivität, aber förderten translationalen Readthrough.

Die Interaktion der UPF1-4SA und UPF1-4SE-Mutanten mit UPF2, UPF3b und eRF3 war durch die Mutation nicht beeinträchtigt (Abbildung 25D). Auch im ATPase-Assay mit HPLC-gereinigtem UPF1 verhielten sich die Mutanten wie der Wildtyp (Abbildung 25B). Der N-terminale (mit eRF3 und UPF2 interagierende) und mittlere (ATP hydrolysierende) Teil des Proteins schien also normal gefaltet zu sein, dennoch waren die beiden Mutanten inaktiv in der Termination. Dies könnte man so interpretieren, dass der C-Terminus, der die mutierten Phosphorylierungsstellen enthält, für die Aktivität von UPF1 in der Termination wichtig ist. Das unterschiedliche Verhalten der verschiedenen UPF1-Mutanten in den Terminationsexperimenten könnte als ein weiteres Indiz dafür gewertet werden, dass der beobachtete Effekt spezifisch für UPF1 ist und z. B. nicht auf einer Kontamination der UPF1-Präparation, oder auf einem durch das FLAG-Tag vermittelten Effekt beruht.

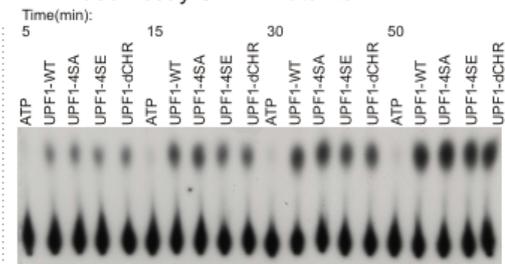
A. Aufreinigung der UPF1-Mutanten



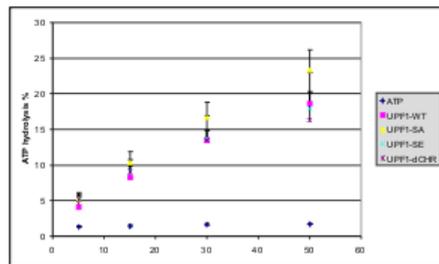
C. NMD-Aktivität der UPF1-Mutanten

siRNA:	UPF1:	NS39 level (% of WT)
siLuc	F- Tag	7%
siUPF1	F- Tag	39%
siUPF1	F- UPF1WT	7%
siUPF1	F- UPF1SA	20%
siUPF1	F- UPF1SE	15%
siUPF1	F- UPF1dCH	41%
untreated	F- Tag	11%

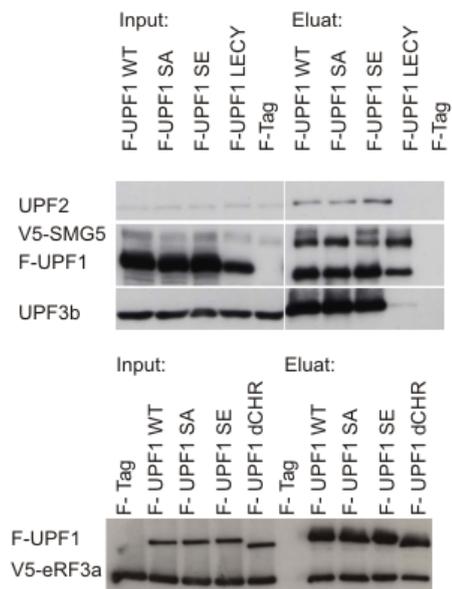
B. ATPase Assay UPF1-Mutanten



RNA Duplex: 1µM



D. Interaktionen im Pulldown



E. Terminationseffizienz der UPF1-Mutanten

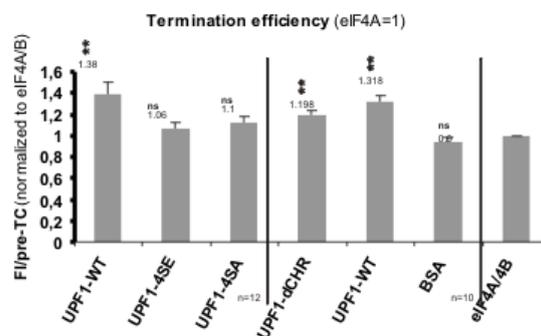


Abbildung 25 Effekt der UPF1 Mutanten auf die Termination.

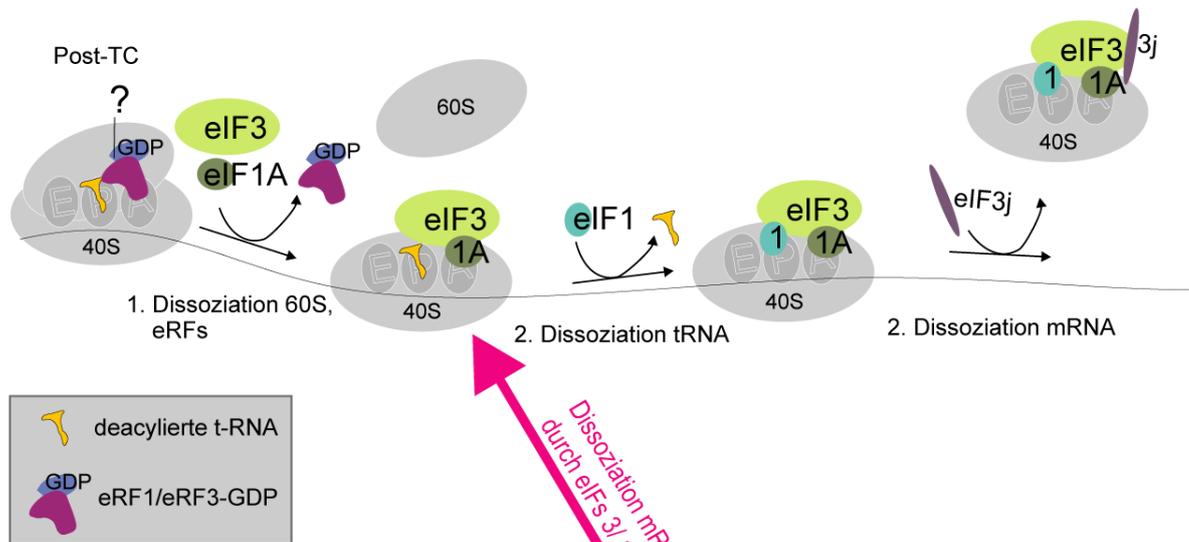
Aufreinigung, Aktivitätsassays, Interaktion der UPF1-Mutanten mit weiteren NMD-Faktoren und eRF3 und ihr Einfluss auf die Translation im rekonstituierten Translationssystem. (A) Coomassie-Färbung der aus Hek-Zellen gereinigten UPF1-Mutanten. (B) Die ATPase-Aktivität der gereinigten Mutanten unterscheidet sich nicht vom

Wildtyp. Die Standardabweichung bezieht sich auf vier unabhängige Experimente. (C) NMD Rescue-Experiment. UPF1-4SA und -4SE Mutanten können NMD in UPF1-depletierten Zellen teilweise wiederherstellen, UPF1-dCHR ist komplett inaktiv. (D) Pulldown von endogenem UPF2 und UPF3b durch FLAG-UPF1 Wildtyp oder Mutanten. Die UPF1-4SA und 4SE (phosphomimetischen) Mutanten interagieren so stark wie der Wildtyp mit UPF2, UPF3b und eRF3. UPF1-LECY diente als Negativkontrolle und interagierte wie erwartet nicht mit UPF2 / 3b. UPF1-ΔCHR, UPF1-4SA und -4SE interagierten ähnlich stark wie der Wildtyp mit eRF3a. (E) Die Terminationseffizienz der Mutanten wurde durch Toeprinting analysiert und quantifiziert wie unter Abbildung 24 beschrieben. Als Negativkontrollen dienten BSA und die RNA-Helikase eIF4A mit dem Kofaktor eIF4B. eIF4A / B wurde als Kontrolle für die Möglichkeit verwendet, dass UPF1 durch seine RNA-Binde- oder Helikase-Aktivität die Termination unspezifisch beeinflussen könnte, indem es z.B. Konformationsänderungen der RNA induziert. Alle Werte wurden zu eIF4A / B normalisiert. Säulen 1-3 und 4-6 gehören zu verschiedenen Experimenten, die n = 12 und n = 10 mal durchgeführt wurden. Die Terminationseffizienz mit eIF4A / B unterschied sich nicht signifikant von der Effizienz von BSA (Säulen 6 und 7), was darauf hindeutet dass die Stimulation der Termination ein UPF1-spezifischer Effekt ist (Säule 5). UPF1dCHR stimulierte die Termination ebenso effizient wie Wildtyp UPF1, UPF1-4SA und 4SE hatten keinen Effekt auf die Termination (Säulen 2 und 3). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an (SEM), die Sterne repräsentieren die Signifikanzstufen (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

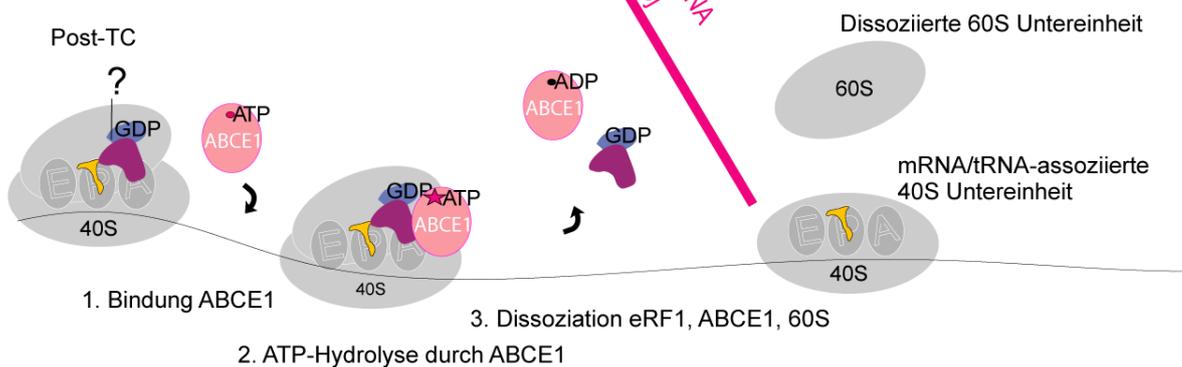
4.4.5 Das Recycling der Ribosomen wird im rekonstituierten Translationssystem von UPF1 nicht beeinflusst

Das Recycling von Post-TCs wird durch die NTPase ABCE1 und die eIFs I, 1A, und eIF3 mit seiner schwach gebundenen 3j-Untereinheit vermittelt (näher erläutert in Abschnitt 1.3.4). Alternativ zu einer Rolle von UPF1 bei der Initiation könnten die Daten, dass hyperphosphoryliertes UPF1 mit eIF3 interagiert und die Bindung der 60S-Untereinheit inhibiert (Isken et al., 2008) auf eine Funktion von UPF1 beim Recycling der Ribosomen hindeuten. Das „ATP-Binding-Cassette Protein“ ABCE1 vermittelt die Dissoziation von Post-Terminationskomplexen (Post-TCs) bei hoher Magnesium-Konzentration (Pisarev et al., 2010). Bei niedriger Magnesiumkonzentration kann diese auch ohne ABCE1 durch die Initiationsfaktoren (eIFs) 1, 1A, 3 und 3j erfolgen (Pisarev et al., 2007a). Zwei Möglichkeiten für eine Rolle von UPF1 beim Recycling sind vorstellbar: UPF1 könnte die Dissoziation von Post-TCs fördern. Dadurch wäre die 3'-nichttranslatierte Region der mRNA frei von Ribosomen und eventuell besser für Degradationsenzyme zugänglich (Brojna & Wen, 2009). Alternativ könnte es die Dissoziation von Post-TCs inhibieren und dadurch die über eRF3 vermittelte Assoziation mit Degradationsfaktoren beeinflussen.

A. Recycling durch Initiationsfaktoren



B. Recycling durch ABCE1

**Abbildung 26 Recycling-Modell.**

Beim Recycling von Post-TCs werden die ribosomalen Untereinheiten, tRNAs und die mRNA voneinander getrennt, um für die nächste Translationsrunde zur Verfügung zu stehen. Die Abspaltung der 60S-Untereinheit erfolgt über die eIFs 3 und 1A oder durch ABCE1. Daraufhin vermitteln die Initiationsfaktoren eIF1, 1A, 3, 3j die Dissoziation der deacylierten tRNA und der mRNA. Abkürzungen: tRNA = Transfer-RNA, 1 = eIF1, 1A = eIF1A, 2 = eIF2, 3 = eIF3, 4B = eIF4B, 5 = eIF5, 5B = eIF5B, ABCE1 = „ATP-Binding Cassette, Sub-Family E Member 1“.

4.4.5.1 Die Dissoziation von Post-TCs durch Translationsinitiationsfaktoren ist in Gegenwart von UPF1 effizient

Während das Recycling eukaryontischer Post-TCs generell durch die NTPase ABCE1 vermittelt wird, kann es bei niedriger Magnesiumkonzentration (ca. 1 mM freies Magnesium) auch durch die Initiationsfaktoren eIF1 / 1A / 3 / 3j erfolgen (1.3.4). Zuerst analysierte ich den Einfluss von UPF1 auf das Recycling durch Initiationsfaktoren in einem Toeprinting-Experiment. Dazu wurden Post-TCs, die man durch Inkubation von eRF1 / eRF3-GTP mit Pre-TCs erhält, in

Gegenwart oder Abwesenheit von UPF1 mit den eIFs 1 / 1A / 3 / 3j inkubiert. Wie erwartet reduzierte die Inkubation von Pre-TCs (Abbildung 27, Spur 1) mit eRF1 / eRF3-GTP die Intensität der Toeprints der ribosomalen Komplexe (Spur 2), bei gleichzeitiger Zunahme der vollen Länge cDNA-Bande. Dies deutet auf deren Destabilisierung nach der Termination hin. Dagegen induzierte die Bindung von eRF1 / eRF3-GMPPNP an die Pre-TCs eine Konformationsänderung des Ribosoms, die in diesem Experiment als quantitative Verschiebung des Toeprints um + 1 nt zu erkennen ist (Spur 3) (die Größe der Verschiebung, des sog. „Shifts“, kann in Abhängigkeit von der Reporter-mRNA 1 bis 2 nt betragen).

Durch Zugabe der Initiationsfaktoren bei 1 mM Mg^{2+} wurde der Toeprint der Post-TCs weiter reduziert (vgl. Spur 2 mit Spur 4), was auf deren vollständige Dissoziation hindeutet. Die Dissoziation der Post-TCs durch die eIFs war unabhängig von P- oder uP-UPF1, sowohl in Gegenwart von ATP (Vgl. Spur 4 mit Spuren 5 und 6) als auch dem nicht-hydrolysierbaren ATP-Analog AMPPNP (Spuren 10-11). Bei 2 mM Mg^{2+} können die Initiationsfaktoren Post-TCs nicht dissoziieren („recyclen“) (Pisarev et al., 2010). Daher konnten die Initiationsfaktoren den Post-TC Toeprint bei erhöhter Mg^{2+} Konzentration nicht reduzieren (Spalte 7). Dieses Bild veränderte sich auch durch Zugabe von P-UPF1 oder uP-UPF1 nicht, unabhängig ob ATP oder AMPPNP als Kofaktor zugegeben wurden (Spuren 8-9, 12-13). UPF1 hatte also keinen Einfluss auf das Recycling durch eIFs.

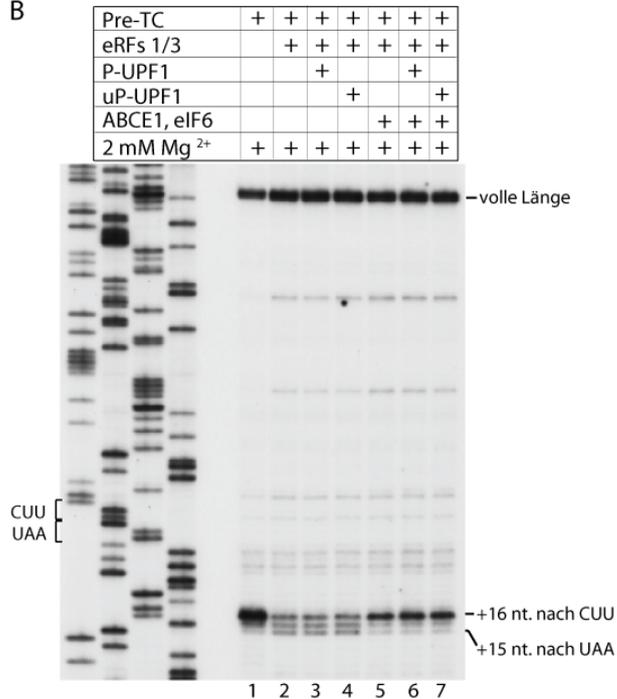
4.4.5.2 Durch ABCE1 vermitteltes Recycling wird von UPF1 nicht beeinflusst

Die ATPase ABCE1 dissoziiert Post-TCs in separate 60S-Untereinheiten sowie tRNA- / mRNA-gebundene 40S-Untereinheiten und eIF6 verhindert die Reassoziierung der dissoziierten ribosomalen Untereinheiten (1.3.4). Um den Einfluss von UPF1 auf Recycling durch ABCE1 bei erhöhter Mg^{2+} -Konzentration zu ermitteln, wurden Pre-TCs auf der MVHL-mRNA (Abbildung 28A) assembliert und in Gegenwart oder Abwesenheit von UPF1 mit Kombinationen von eRF1, eRF3, ABCE1 und eIF6 inkubiert. Die ribosomalen Komplexe wurden durch Toeprinting (Abbildung 28B) oder SDG-Zentrifugation (Abbildung 28 C) analysiert. Der Toeprint von Pre-TCs (Abbildung 28B, Spur 1) befand sich + 16 nt 3' vom CUU- (Leucin-) Kodon. Wie beschrieben (Pisarev et al., 2010), kam es in Gegenwart der eRFs zur Termination (Spuren 2-4), und der daraus resultierende + 2 nt „Shift“ des Toeprints (+ 15 nt vom UAA Stopkodon) wurde durch Zugabe von ABCE1 und eIF6 wieder rückgängig gemacht (vgl. Spuren 2 und 5). Der Toeprint befand sich nun wieder + 16 nt nach dem CUU-Kodon. Dies deutete auf die Aufspaltung der Post-TCs in freie 60S-Untereinheiten sowie noch mit der deacylierten Leucin-tRNA und der mRNA assoziierte 40S-Untereinheiten hin. Zugabe von P-UPF1 oder uP-UPF1 (Spuren 6 und 7) hatte keinen Einfluss auf diesen Rück-„Shift“. Entsprechend wurde auch in dem in Abbildung 28C dargestellten SDG-Zentrifugationsexperiment mit radioaktiv markierten 60S-Untereinheiten, die Dissoziation der Post-TCs durch UPF1 nicht beeinflusst (vgl. Abbildung 28C, schwarze und weiße Kreise). UPF1 hatte daher keinen Einfluss auf die Dissoziation von Post-TCs durch ABCE1.

A "MVHL-STOP" mRNA:

5'-G(CAA)₄- (β-globin 5'-UTR)- AUG - GUG - CAC - CUU - UAA -3'-UTR(~400nt)
 Met Val His Leu

B



C

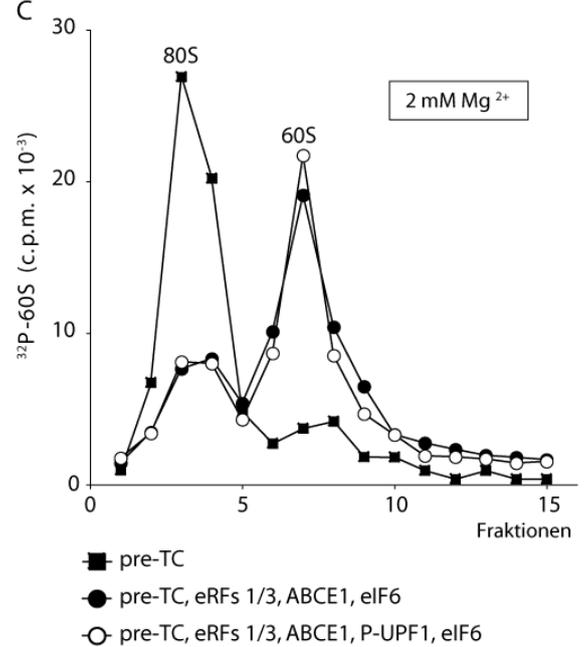


Abbildung 28 Durch ABCE1 vermitteltes Recycling wird durch UPF1 nicht beeinflusst.

(Dieses Experiment wurde von T. Pestova durchgeführt) (A) Toeprinting von Terminationskomplexen (TCs). Pre-TCs (Spur 1) wurden auf der MVHL-STOP-P(A) mRNA assembliert und nach SDG-Zentrifugation für das Recycling-Experiment verwendet. Pre-TCs wurden bei 2 mM MgCl₂ in Gegenwart von GTP mit (+) oder ohne (-) die angegebenen UPF1 Isoformen (P = P-UPF1, uP = uP-UPF1), Translationsterminationsfaktoren (eRFs) und Recyclingfaktoren (ABCE1 und eIF6) inkubiert. Die Position der Pre-TC-(relativ zum CUU Kodon) und Post-TC-(relativ zum UAA Kodon) Toeprints ist angegeben. Pre-TC = Prä-Terminationskomplex, CUU = Leucin-Kodon, UAA = Terminationskodon. (B) Analyse der ABCE1-vermittelten Dissoziation von 80S-Ribosomen in 60S- und 40S- durch Sucrosegradientenzentrifugation. Pre-TCs wurden wie in (A) beschrieben assembliert, jedoch mit radioaktiv markierten 60S-Untereinheiten.

5 Diskussion

Zusätzlich zur Funktion der UPF-Proteine im NMD-Signalweg (Abschnitt 1.5.1), deuten Studien in der Hefe und in menschlichen Zellen auf eine Funktion von UPF1 (und evtl. auch anderen UPF-Faktoren) in der Termination und (Re-) Initiation der Translation hin ((Wang et al., 2001; Amrani et al., 2004; Keeling et al., 2004; Fleischer et al., 2006; Isken et al., 2008; Ivanov et al., 2008; Ghosh et al., 2010), Abschnitt 1.7).

Einige NMD-Faktoren und insbesondere UPF1 haben NMD-unabhängige Funktionen (siehe Abschnitt 1.5.1, Tabelle 1 und Abschnitt 1.5.2). Die potenzielle Verflechtung dieser Signalwege macht die Interpretation von *in vivo*-Experimenten schwierig (dargestellt in Abschnitt 1.7). Licht in die potenzielle(n) Funktion(en) von UPF1 während der Translation zu bringen, ist zum Verständnis des Mechanismus von NMD von Bedeutung, da NMD bekanntlich kotranslational stattfindet.

In dieser Studie wurde daher systematisch der mögliche Einfluss von UPF1 auf jeden einzelnen Schritt der Translation in einem *in vitro* aus gereinigten Komponenten rekonstituierten, eukaryontischen Translationssystem biochemisch analysiert (Alkalaeva et al., 2006; Pestova et al., 2005; Pisarev et al., 2007a,b; Pisarev et al., 2010). In diesem rekonstituierten System konnte kein direkter Einfluss von UPF1 auf die Initiation oder die Elongation der Translation festgestellt werden. Jedoch lieferte das rekonstituierte Translationssystem Hinweise darauf, dass UPF1 einen subtilen positiven Einfluss auf die Termination hat. In einem modifizierten Ansatz mit aus der Translation in Retikulozytenlysat stammenden Terminationsintermediaten („RRL-Pre-TCs“) konnte ein quantitativ moderater, jedoch hoch reproduzierbarer und statistisch signifikanter Einfluss von UPF1 auf die Dissoziation von Terminationskomplexen, in Gegenwart von geringen Mengen an Terminationsfaktoren nachgewiesen werden.

5.1 UPF1 beeinflusst die Dissoziation von Terminationskomplexen

Die hier vorgestellte Arbeit zeigt, dass UPF1 die Stabilität von aus RRL aufgereinigten Terminationsintermediaten („RRL-Pre-TCs“) in Gegenwart von eRF1 und eRF3 im Vergleich zur Kontrolle um das etwa 1,3-fache reduziert (4.4.4.2). Da die genaue Komposition dieser Komplexe bisher nicht bekannt ist, könnte es sich dabei um einen Einfluss von UPF1 auf Ereignisse während oder aber auch nach der Termination handeln.

Bisher gibt es kein rekonstituiertes *in vitro* NMD-System. Der von mir beobachtete Einfluss von UPF1 auf die Stabilität der Terminationskomplexe war *in vitro* nicht auf NMD-Substrate beschränkt. Zusammen mit der vorangegangenen Arbeit unserer Arbeitsgruppe (Ivanov et al., 2008), die zeigte, dass die Depletion von UPF1 in HeLa-Zellen translationalen „Readthrough“ einer normalen mRNA (d.h. eines Nicht-NMD-Substrats) beeinflusst, deutet dieses Ergebnis auf eine breitere Rolle von UPF1 bei der Regulation der Translation bei *H. sapiens*. Die Datenbank PaxDB (www.pax-db.org) schätzt die Häufigkeit von Proteinen semi-quantitativ anhand von Massenspektrometrie-Daten (Shotgun Proteomics). Nach PaxDB liegen UPF1 (39.08 ppm), eRF1 (39.02 ppm) und eRF3a (GSPT1, 34.08 ppm) in menschlichen Zellen ungefähr in gleicher Konzentration vor, wohingegen UPF2 (3.45 ppm) und UPF3b (4.50 ppm) deutlich weniger abundant sind. Die hohe Abundanz von UPF1 und die stöchiometrische Relation zu den Terminationsfaktoren legt die Möglichkeit nahe, dass dieser Faktor im Gegensatz zu UPF2 und UPF3b auch bei der Translation von normalen mRNAs eine Funktion haben könnte.

Die Toeprints der aus RRL aufgereinigten Terminationsintermediate, in Gegenwart von eRF1 und eRF3, waren durch Vorinkubation mit UPF1 reduziert. Die Toeprints von Pre-TCs aus dem rekonstituierten System waren -unter den identischen experimentellen Bedingungen- von UPF1 jedoch nicht so stark beeinflusst (4.4.4.1). Vermutlich tragen daher ein oder mehrere weitere Faktoren zu dem stärkeren UPF1-vermittelten Effekt bei, der mit den RRL-Pre-TCs beobachtet wurde.

Der Einfluss von UPF1 auf die Stabilität der Terminationskomplexe war Poly-(A)-Schwanz-unabhängig (7.1.1). Daher ist das Poly-(A)-Bindeprotein PABPC1, das nach gängigen NMD-Modellen (Amrani et al., 2004; Singh et al., 2008, Ivanov et al., 2008; siehe Abschnitt 1.6.1) mit UPF1 um die Interaktion mit den eRFs kompetiert um normale und vorzeitige (d.h. NMD auslösende) Terminationsereignisse zu unterscheiden, wahrscheinlich nicht der Faktor, durch den der Effekt von UPF1 vermittelt wird.

mRNAs sind im Zytoplasma mit vielen weiteren Faktoren assoziiert, wie z. B. mit miRNAs, PABPC1, YB1 oder dem EJC, die die Translation positiv oder negativ beeinflussen können ((Hieronymus & Silver, 2004; Svitkin et al., 2009; Beilharz et al., 2010), siehe Abschnitt 1.2). Durch Analyse der Komposition der Terminationsintermediate aus RRL werden vermutlich Anhaltspunkte für entsprechende Kandidaten gefunden werden können, die gegebenenfalls

im Wechselspiel mit UPF1 stehen könnten und deren Wirkung auf das rekonstituierte Translationssystem dann auch getestet werden kann.

Die Steigerung der Dissoziation von Terminationskomplexen in Gegenwart von UPF1 war in meinen Versuchen mit 20-30 % moderat. Quantitativ kleine Veränderungen der Genexpression können jedoch unter Umständen zu physiologisch sehr signifikanten Konsequenzen führen. Ein Beispiel hierfür sind miRNAs. miRNAs beeinflussen die Proteinproduktion der von ihnen gebundenen, endogenen mRNAs im Durchschnitt nur moderat (Guo et al., 2010; Hendrickson et al., 2009; Selbach et al., 2008), trotzdem sind miRNAs bei der Regulation vieler biologischer Prozesse beteiligt (zusammengefasst in (Bushati und Cohen, 2007)). Subtile Änderungen in der miRNA-Genregulation (ca. + / - 30 %), wie sie durch Veränderungen einzelner Nukleotide („Single Nucleotide Polymorphisms“, SNPs) entstehen, welche die miRNA-mRNA-Interaktion beeinflussen, können für Brustkrebs prädisponieren (Nicoloso et al., 2010). Auch das Beispiel der durch eine „Gain of Function“-Punktmutation (20210 CG → CA) gesteigerten 3`-Endprozessierung der Prothrombin-Prä-mRNA (Gehring et al., 2001; Danckwardt et al., 2004) verdeutlicht die pathologische und physiologische Relevanz, die quantitativ moderate Änderungen einzelner Prozesse der Genexpression haben können. Die Protease Thrombin (Gerinnungsfaktor II, F2) ist unter anderem ein wichtiger Bestandteil der Blutgerinnungskaskade. Etwa 1-2 % der kaukasischen Bevölkerung tragen die (20210 CG → CA)-Mutation im Prothrombin-Gen (Poort et al., 1996). Die in der 3`-UTR gelegene Mutation führt zu einer gesteigerten Polyadenylierung der F2-mRNA (Gehring et al., 2001) und geht mit einem auf das 2-4-Fache erhöhten Risiko der Bildung von Blutgerinnseln einher (Poort et al., 1996). Die Prothrombinkonzentration im Blutplasma der Betroffenen beträgt dabei nur das 1,25- bis 1,3-Fache der normalen Konzentration. Diese kleine Änderung reicht jedoch schon aus, um das empfindliche Gleichgewicht der pro- und antikoagulativen Aktivitäten während der Blutgerinnung zu stören und dadurch das Thromboserisiko signifikant zu erhöhen.

Überdies kann die 3`-Endprozessierung der F2-mRNA auch bei der normalen Bevölkerung sehr genau durch sog. „Upstream Sequence Element“-bindende Proteine (USE-BPs) positiv und negativ reguliert und somit an die Umweltbedingungen angepasst werden (Danckwardt et al., 2011). Auch NMD ist ein regulierter und mit verschiedenen Signalnetzen verschalteter

Prozess, und die NMD-Effizienz ist entsprechend modulierbar, z. B. durch zellulären Stress wie Hypoxie oder Nährstoffmangel (zusammengefasst in Gardner et al., 2010).

Der in dieser Arbeit beobachtete moderate Einfluß von UPF1 auf die Stabilität der Terminationkomplexe deutet darauf hin, dass UPF1 eine modulatorische Funktion hat: Meine Daten sind gut mit einem NMD-Modell vereinbar, in dem ein modulatorischer Einfluß von UPF1 auf die Termination die Integration von positiven und negativen NMD-Signalen -womöglich über mehrere Terminationsrunden (Hogg & Goff, 2010)- vermittelt (1.8). Auch besteht die Möglichkeit, dass während ihrer Aufreinigung durch SDG-Zentrifugation ein Teil der schwächer assoziierten Faktoren von den Terminationsintermediaten dissoziierte und sich durch die Modifizierung des Aufreinigungsprotokolls ein stärkerer Effekt erzielen ließe.

5.2 Potenzielle Mechanismen für die gesteigerte Termination oder Dissoziation von Terminationkomplexen durch UPF1

Während des NMD erlaubt UPF1 die Integration von positiven und negativen NMD-Signalen ((Czaplinski et al., 1998; Brogna & Wen, 2009; Rebbapragada & Lykke-Andersen, 2009; Nicholson et al., 2010), 1.6.1). Es wäre daher nicht weiter verwunderlich, wenn UPF1 eher einen modulierenden als drastischen Effekt hat. Eine Reihe von Mechanismen der Einflussnahme von UPF1 auf die Termination oder das Recycling wären theoretisch möglich und bedürfen der weiteren Untersuchung: (1) UPF1 könnte die Assoziation der eRFs mit Pre-Terminationkomplexen und damit die Termination fördern. (2) UPF1 könnte durch seine Interaktion mit eRF3 (Kashima et al., 2006; Ivanov et al., 2008) die Terminationseffizienz steigern, indem es eine für die GTP-Hydrolyse günstige Konformation von eRF3 stabilisiert. (3) UPF1 könnte, bei limitierender Menge an Terminationsfaktoren, das Recycling von eRF3 oder dessen Dissoziation fördern. (4) UPF1 könnte die Post-TCs destabilisieren, indem es z. B. die Dissoziation von eRF3 oder eRF1 fördert. (5) Es ist nicht vollständig auszuschließen, dass UPF1 als direkter Interaktionspartner von eRF3 die Terminationsfaktoren bei niedrigen Konzentrationen stabilisiert und dadurch ihre Aktivität beeinflusst. Gegen diese Erklärung sprechen aber die UPF1-Mutanten, die in der Terminationsexperimenten inaktiv waren, deren Interaktion mit eRF3 jedoch nicht gestört war (4.4.4.3). Für eine fördernde Rolle von UPF1 beim Recycling der Ribosomen sprechen auch Daten von *S. cerevisiae* (Gosh et al., 2010), die beschreiben, dass UPF1 an NMD-Substraten für die Dissoziation von Post-Terminationkomplexen benötigt wird (näher erläutert in Abschnitt 5.4).

5.3 Mögliche physiologische Bedeutung der gesteigerten Dissoziation von Terminationskomplexen durch UPF1

Es ist denkbar, dass UPF1 zwar generell mit dem Translationsapparat assoziiert ist (Kashima et al., 2006; Isken et al., 2008; Singh et al., 2008; Ghosh et al., 2010), aber an NMD-Substraten erst durch die Interaktion mit weiteren NMD-Faktoren aktiviert wird. UPF1 könnte jedoch auch bei der normalen Translation eine aktive Rolle spielen: Durch die gesteigerte Dissoziation von Terminationskomplexen könnte UPF1 normale mRNAs vor der Degradation durch eRF3-assoziierte Degradationsfaktoren schützen (Hosoda et al., 2003; Kobayashi et al., 2004). In Experimenten mit Hefeextrakt war die Termination oder das Recycling bei NMD-Substraten weniger effektiv ((Amrani et al., 2004), näher erläutert in Abschnitt 4.4.3), was die eRF3-vermittelte Degradation wahrscheinlicher machen könnte. Andererseits könnte UPF1 die Degradation von NMD-Substraten auch fördern, weil durch gesteigerte Dissoziation von Post-TCs die 3' nichttranslatierte Region der mRNA frei von Ribosomen und eventuell besser für Degradationsenzyme zugänglich wäre (Brojna & Wen, 2009). Diese Möglichkeiten bedürfen der weiteren Untersuchung, und es wird interessant sein zu sehen, wie sich die Aktivitäten weiterer NMD-Faktoren oder PABPC1 auf die hier verwendeten Translationssysteme auswirken.

5.4 UPF1 hat im rekonstituierten System keinen direkten Einfluss auf die Initiation oder Elongation der Translation

Phosphoryliertes UPF1 interagiert in Zellkulturexperimenten anderer Autoren mit Initiationsfaktor 3 (eIF3) und inhibiert in Kaninchenretikulozytenlysat („Rabbit Reticulocyte Lysate“, RRL) die Bindung der 60S-Untereinheit während der Initiation (Isken et al., 2008). In den hier vorgestellten Experimenten hatte UPF1 keinen direkten Einfluss auf die Initiation oder Elongation der *in vitro* rekonstituierten Translation (4.4.1). Dies könnte verschiedene Gründe haben:

Zum Ersten könnte es sich bei dem beschriebenen Effekt von UPF1 auf die Initiation, auch um einen Recycling-Defekt handeln (Maderazo et al., 2000; Isken & Maquat, 2008). Manche Mutationen der Terminationsfaktoren und des Recyclingfaktors ABCE1 führen zu veränderten Polysomen-Profilen, die solchen von Initiationsdefekten sehr ähnlich sind (Smirnov et al., 1976; Zhao et al., 2004; Andersen & Leever, 2007). Dies ist möglicherweise darin begründet,

dass Defekte in der Termination sich auch auf die Initiation auswirken können. Der „Closed-Loop“-Mechanismus der Translation (Uchida et al., 2002), durch den die Initiation stimuliert wird, indem die 40S-Untereinheiten von terminierenden Ribosomen vorzugsweise auf derselben mRNA reinitiiieren, könnte durch Defekte beim Recycling behindert werden (aus Pisarev et al., 2010).

Zum Zweiten könnte die Sensitivität des rekonstituierten Systems für modulatorische Aktivitäten limitiert sein. Durch das fehlende Zusammenspiel von Translationsinhibitoren und -stimulatoren bedingt, die in zellulären oder Zellextrakt-basierten Systemen Einfluss auf die Translation nehmen, ist die Effizienz der Translation womöglich sehr hoch (Svitkin et al., 2009). Dadurch könnte ein positiver Einfluss von UPF1 untergehen. Die Stimulation der Bildung von 48S-Initiationskomplexen durch PABPC1 war in diesem System nur 1,6-fach (Svitkin et al., 2009), wohingegen sie in Krebs-2 Zellextrakten wesentlich höher liegt (Kahvejian et al., 2005). Die Autoren (Svitkin et al., 2009) postulieren, dass PABPC1 in der Zellextrakt-basierten Translation dem inhibitorischen Effekt des RNA-Bindeproteins YB1 (p50) auf die Aktivität des Initiationsfaktors eIF4F entgegenwirkt, und konnten zeigen, dass die Zugabe von YB1 die Translation in RRL PABPC1-abhängig macht. Die Terminationsreaktionen mit gereinigten Pre-TCs sind sehr effizient, und in der Abwesenheit von Kompetitoren könnte ein Plateau erreicht sein, das keine weitere Effizienzsteigerung mehr zulässt. Wie mit UPF1, war auch mit PABPC1 im rekonstituierten System kein Einfluss auf die Termination nachweisbar (T. Pestova, persönliche Kommunikation), obwohl auch PABPC1 mit eRF3 interagiert (Kononenko et al., 2010) und die Termination *in vivo* stimuliert (Ivanov et al., 2008). Analog hierzu wäre es denkbar, dass ein Einfluss von UPF1 auf die Translation im rekonstituierten System wegen dessen hoher Effizienz nicht nachweisbar war.

Zum Dritten könnte der Einfluss von UPF1 auf die Translation von NMD-Substraten beschränkt sein und / oder durch zusätzliche Faktoren vermittelt werden, die im rekonstituierten Translationssystem fehlen. UPF1 bindet in *C. elegans* zwar auch an mRNAs, die keine NMD-Substrate sind, ist aber mit NMD-Substraten verstärkt assoziiert (Johns et al., 2007; Hogg & Goff, 2010). Die bei Isken et al. (Isken et al., 2008) beschriebene Inhibition der Bindung der 60S-Untereinheit durch UPF1 während der Translationsinitiation in Retikulozytenlysat beschränkte sich auf die phosphorylierte UPF1-Isoform (s. Abschnitt 1.7). Sie könnte daher zu einem späteren Zeitpunkt im NMD stattfinden, nachdem das vorzeitige

Terminationskodon erkannt und UPF1 durch SMG1 phosphoryliert wurde. Die Inhibition der Initiation könnte daher auf ein komplexes, zeitlich und / oder räumlich reguliertes Zusammenspiel von Protein-Interaktionen (z. B. mit weiteren NMD-Faktoren) und post-translationalen Modifikationen zurückzuführen sein, das *in vitro* nicht reproduzierbar war. Der NMD-Faktor UPF2 interagiert über die zweite MIF4GH-Domäne mit den Initiations- und Recyclingfaktoren Sui1 / eIF1 sowie eIF4A1 und wurde darüber mit der Translationsinitiation und dem Recycling in Verbindung gebracht ((Mendell et al., 2000), näher erläutert in Abschnitt 1.5.3). UPF2 könnte in einem Zellextrakt-basierten System möglicherweise den von Isken et al. (Isken et al., 2008) beobachteten Einfluss von phosphoryliertem UPF1 auf die Initiation vermitteln.

In der gegenwärtigen Literatur ergibt sich bezüglich der Rolle von UPF1 in verschiedenen Stadien der Translation insgesamt jedoch ein widersprüchliches Bild: In Hefe konnte gezeigt werden, dass UPF1 mit Polyribosomen assoziiert ist (Atkin et al., 1995; Atkin et al., 1997) und NMD-vermitteltes „Decapping“ an Polyribosomen, also an translational aktiven mRNAs stattfindet (Hu et al., 2010). Die Initiation oder Elongation schien daher bei NMD-Substraten nicht beeinträchtigt zu sein. Die hier *in vitro* rekonstituierte Initiation und Elongation der Translation war, übereinstimmend mit diesen Daten aus *S. cerevisiae*, von UPF1 nicht beeinträchtigt.

In der hier vorgelegten Arbeit konnte UPF1 die Proteinproduktion einer Luziferase-mRNA in Retikulozytenlysat nicht beeinflussen. Damit stimmt überein, dass die Translation einer CAN1- / LUC-Reporter-mRNA in Nuklease-behandeltem Hefeextrakt von Wildtyp- oder *upf1Δ*-Stämmen weitgehend unverändert war (Ghosh et al., 2010 und Fig. 7A). Dagegen war die Translation derselben CAN1- / LUC-Reporter-mRNA in Hefeextrakten, die mit einer NMD-Reporter-mRNA vorinkubiert worden waren, weniger effizient als bei Vorinkubation mit einer Wildtyp-mRNA. Ergo beeinflusst die Art der vorherigen Terminations- oder allgemeiner formuliert: Translationsereignisse die Translationseffizienz. Die Autoren interpretieren diese Beobachtung anhand weiterer Experimente und der Daten von (Isken et al., 2008) dahingehend, dass UPF1 an NMD-Substraten für die Dissoziation von Post-TCs benötigt wird, und in mit NMD-Reportern vorinkubierten *upf1Δ*-Extrakten dadurch weniger funktionelle Ribosomen für die (Re-) Initiation auf der CAN1- / LUC-Reporter-mRNA zur Verfügung stehen. Auch mit nicht Nuklease-behandeltem Extrakt aus *upf2Δ*- und *upf3Δ*-Stämmen war die Translation weniger effizient als mit Wildtyp-Extrakten (Ghosh et al., 2010). Daraus ließe sich schließen,

dass alle drei NMD-Faktoren (und potenziell noch weitere zelluläre Komponenten) eine Funktion bei dem beschriebenen Effekt auf das Recycling der Ribosomen haben und daher die Zugabe eines einzelnen Faktors zum rekonstituierten Translationssystem eventuell nicht ausreicht. Dies wäre eine mögliche Erklärung, warum ich im rekonstituierten Translationssystem keinen Einfluss von UPF1 auf das Recycling der Ribosomen, weder durch Translationsinitiationsfaktoren noch durch ABCE1, feststellen konnte (4.4.5).

5.5 Ausblick

Das Ergebnis dieser Untersuchung, dass UPF1 die Stabilität der aus RRL gereinigten Terminationsintermediate in Gegenwart von Terminationsfaktoren moduliert (4.4.4), wirft weitere Fragen auf: Welcher Faktor (oder welche Faktoren) vermitteln diesen Effekt? Der Vergleich der *in vitro* assemblierten Pre-TCs mit den Terminationsintermediaten aus RRL, z. B. durch Massenspektrometrie, könnte darüber erste Hinweise liefern.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, in einem im Vergleich zur Komplexität von Zellen oder Zellextrakten sehr vereinfachten System, dass die Translation *in vitro* durch den NMD-Faktor UPF1 beeinflusst werden kann. Um die Signifikanz dieses Ergebnisses für den *in vivo* Mechanismus der Translation oder NMD festzustellen, sind weitere Untersuchungen in komplementären Systemen, wie Zellextrakten oder Zellen, notwendig.

Bis vor kurzem ging man davon aus, dass NMD in höheren Eukaryonten spleiß- und translationsabhängig ist, wodurch die Etablierung eines zellfreien *in vitro* NMD-Systems, in dem durch geeignete Manipulationen der Mechanismus von NMD genau aufgeschlüsselt werden könnte, sehr anspruchsvoll schien. Durch die Entdeckung, dass manche mRNAs mit langer 3'-UTR spleiß-unabhängig durch NMD abgebaut werden können (Buhler et al., 2006; Eberle et al., 2008), und durch die Entwicklung von NMD-Reportern, mit denen NMD-Proteine artifiziell über das λ N / BoxB- oder MS2-Tethering-System rekrutiert werden können (Lykke-Andersen et al., 2000; Gehring et al., 2003), ist die Etablierung eines solchen Systems näher gerückt. Zellfreie Hefesysteme unterstützen keinen NMD, jedoch konnte man hier durch Depletion und Repletion einzelner NMD-Faktoren deren Einfluss auf die Translation näher untersuchen (Amrani et al., 2004; Ghosh et al., 2010). UPF1 scheint in diesem System Post-Terminations-Ereignisse zu beeinflussen (Ghosh et al., 2010). Ein ähnliches System wäre auch

für *H. sapiens* zu etablieren, um den Einfluss von UPF1 auf die Stabilität der Terminationskomplexe zu validieren.

Anhand der Anzahl der an NMD beteiligten Proteine und Proteinkomplexe (PABPC1, SMG1, SMG8, SMG9, SURF, EJC, DECID etc.) ist eine schrittweise Untersuchung dieser Vorgänge, beginnend mit der Erkennung eines vorzeitigen Terminationskodons im Laufe der Translation, die einleuchtendste Vorgehensweise. Die hier gezeigten Untersuchungen zum Einfluss des zentralen NMD-Faktors UPF1 auf die Translation sind ein erster Schritt. Die Vorteile dieses Systems liegen in der vergleichsweise geringen Komplexität des Systems sowie der guten Handhabung und Reproduzierbarkeit.

Als nächsten Schritt könnte man sich vorstellen, den Einfluss des SURF-Komplexes aus den Terminationsfaktoren, UPF1 und SMG1 auf die Termination näher zu untersuchen. Eine dominant negative Mutante von SMG1 mit beeinträchtigter Kinaseaktivität interagiert stärker als der Wildtyp mit den Terminationsfaktoren und der nicht-phosphorylierten Isoform von UPF1 (Kashima et al., 2006). Es wäre interessant zu sehen, wie sich die Komplementierung des rekonstituierten Translationssystems mit dieser Mutante oder dem Wildtyp auf die Translation auswirkt.

Zur Einbindung der hier vorgestellten Daten in den Mechanismus und die physiologische Rolle von NMD, könnten die oben erwähnten zellfreien *in vitro* Systeme einen Ausgangspunkt für die gezielte *in vitro* Untersuchung einzelner, komplexerer NMD-Aspekte liefern, wie die Erkennung von vorzeitigen Stopkodons während der Translation, um den jeweiligen Schritt anschließend aus gereinigten Proteinen rekonstituieren zu können.

Das mechanistische Verständnis der Erkennung von vorzeitigen Terminationskodons ist umso wichtiger, da die meisten Therapieansätze zur Behandlung von mit NMD assoziierten Krankheiten auf diesen Schritt ausgerichtet sind (zusammengefasst in Holbrook et al., 2004; Neuyilik & Kulozik, 2008; Bhuvanagiri et al., 2010).

6 Literaturverzeichnis

- Alkalaeva EZ, Pisarev AV, Frolova LY, Kisselev LL, Pestova TV. 2006. In vitro reconstitution of eukaryotic translation reveals cooperativity between release factors eRF1 and eRF3. *Cell* 125:1125-1136.
- Amrani N, Ganesan R, Kervestin S, Mangus DA, Ghosh S, Jacobson A. 2004. A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* 432:112-118.
- Andersen DS, Leever SJ. 2007. The essential Drosophila ATP-binding cassette domain protein, pixie, binds the 40 S ribosome in an ATP-dependent manner and is required for translation initiation. *J Biol Chem* 282:14752-14760.
- Applequist SE, Selg M, Raman C, Jack HM. 1997. Cloning and characterization of HUPF1, a human homolog of the Saccharomyces cerevisiae nonsense mRNA-reducing UPF1 protein. *Nucleic Acids Res* 25:814-821.
- Atkin AL, Altamura N, Leeds P, Culbertson MR. 1995. The majority of yeast UPF1 co-localizes with polyribosomes in the cytoplasm. *Mol Biol Cell* 6:611-625.
- Atkin AL, Schenkman LR, Eastham M, Dahlseid JN, Lelivelt MJ, Culbertson MR. 1997. Relationship between yeast polyribosomes and Upf proteins required for nonsense mRNA decay. *J Biol Chem* 272:22163-22172.
- Azzalin CM, Lingner J. 2006a. The double life of UPF1 in RNA and DNA stability pathways. *Cell Cycle* 5:1496-1498.
- Azzalin CM, Lingner J. 2006b. The human RNA surveillance factor UPF1 is required for S phase progression and genome stability. *Curr Biol* 16:433-439.
- Azzalin CM, Reichenbach P, Khoriauli L, Giulotto E, Lingner J. 2007. Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science* 318:798-801.
- Beelman CA, Parker R. 1995. Degradation of mRNA in eukaryotes. *Cell* 81:179-183.
- Beilharz TH, Humphreys DT, Preiss T. 2010. miRNA Effects on mRNA closed-loop formation during translation initiation. *Prog Mol Subcell Biol* 50:99-112.
- Belgrader P, Cheng J, Maquat LE. 1993. Evidence to implicate translation by ribosomes in the mechanism by which nonsense codons reduce the nuclear level of human triosephosphate isomerase mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:482-486.
- Ben-Shem A, Jenner L, Yusupova G, Yusupov M. 2010. Crystal structure of the eukaryotic ribosome. *Science* 330:1203-1209.
- Besse F, Ephrussi A. 2008. Translational control of localized mRNAs: restricting protein synthesis in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:971-980.
- Bhattacharya A, Czaplinski K, Trifillis P, He F, Jacobson A, Peltz SW. 2000. Characterization of the biochemical properties of the human Upf1 gene product that is involved in nonsense-mediated mRNA decay. *RNA* 6:1226-1235.
- Bushati N, Cohen SM. 2007. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23:175-205.
- Bhuvanagiri M, Schlitter AM, Hentze MW, Kulozik AE. 2010. NMD: RNA biology meets human genetic medicine. *Biochem J* 430:365-377.
- Bidou L, Stahl G, Hatin I, Namy O, Rousset JP, Farabaugh PJ. 2000. Nonsense-mediated decay mutants do not affect programmed -1 frameshifting. *RNA* 6:952-961.

- Brocke KS, Neu-Yilik G, Gehring NH, Hentze MW, Kulozik AE. 2002. The human intronless melanocortin 4-receptor gene is NMD insensitive. *Hum Mol Genet* 11:331-335.
- Brogna S, Wen J. 2009. Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms. *Nat Struct Mol Biol* 16:107-113.
- Brueckner F, Armache KJ, Cheung A, Damsma GE, Kettenberger H, Lehmann E, Sydow J, Cramer P. 2009. Structure-function studies of the RNA polymerase II elongation complex. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 65:112-120.
- Buchwald G, Ebert J, Basquin C, Sauliere J, Jayachandran U, Bono F, Le Hir H, Conti E. 2010. Insights into the recruitment of the NMD machinery from the crystal structure of a core EJC-UPF3b complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:10050-10055.
- Buhler M, Steiner S, Mohn F, Paillusson A, Muhlemann O. 2006. EJC-independent degradation of nonsense immunoglobulin-mu mRNA depends on 3' UTR length. *Nat Struct Mol Biol* 13:462-464.
- Carter MS, Li S, Wilkinson MF. 1996. A splicing-dependent regulatory mechanism that detects translation signals. *EMBO J* 15:5965-5975.
- Chamieh H, Ballut L, Bonneau F, Le Hir H. 2008. NMD factors UPF2 and UPF3 bridge UPF1 to the exon junction complex and stimulate its RNA helicase activity. *Nat Struct Mol Biol* 15:85-93.
- Cheng Z, Muhlrud D, Lim MK, Parker R, Song H. 2007. Structural and functional insights into the human Upf1 helicase core. *EMBO J* 26:253-264.
- Chernoff YO, Vincent A, Liebman SW. 1994. Mutations in eukaryotic 18S ribosomal RNA affect translational fidelity and resistance to aminoglycoside antibiotics. *EMBO J* 13:906-913.
- Cheung YN, Maag D, Mitchell SF, Fekete CA, Algire MA, Takacs JE, Shirokikh N, Pestova T, Lorsch JR, Hinnebusch AG. 2007. Dissociation of eIF1 from the 40S ribosomal subunit is a key step in start codon selection in vivo. *Genes Dev* 21:1217-1230.
- Clerici M, Mourao A, Gutsche I, Gehring NH, Hentze MW, Kulozik A, Kadlec J, Sattler M, Cusack S. 2009. Unusual bipartite mode of interaction between the nonsense-mediated decay factors, UPF1 and UPF2. *EMBO J* 28:2293-2306.
- Conti E, Izaurralde E. 2001. Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age. *Curr Opin Cell Biol* 13:310-319.
- Cuccurese M, Russo G, Russo A, Pietropaolo C. 2005. Alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay regulate mammalian ribosomal gene expression. *Nucleic Acids Res* 33:5965-5977.
- Culbertson MR, Underbrink KM, Fink GR. 1980. Frameshift suppression *Saccharomyces cerevisiae*. II. Genetic properties of group II suppressors. *Genetics* 95:833-853.
- Czaplinski K, Ruiz-Echevarria MJ, Paushkin SV, Han X, Weng Y, Perlick HA, Dietz HC, Ter-Avanesyan MD, Peltz SW. 1998. The surveillance complex interacts with the translation release factors to enhance termination and degrade aberrant mRNAs. *Genes Dev* 12:1665-1677.
- Danckwardt S, Gantzert AS, Macher-Goepfing S, Probst HC, Gentzel M, Wilm M, Grone HJ, Schirmacher P, Hentze MW, Kulozik AE. 2011. p38 MAPK controls prothrombin expression by regulated RNA 3' end processing. *Mol Cell* 41:298-310.
- Danckwardt S, Gehring NH, Neu-Yilik G, Hundsdoerfer P, Pforsich M, Frede U, Hentze MW, Kulozik AE. 2004. The prothrombin 3' end formation signal reveals a unique architecture that is sensitive to thrombophilic gain-of-function mutations. *Blood* 104:428-435.

- Doma MK, Parker R. 2006. Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature* 440:561-564.
- Eberle AB, Stalder L, Mathys H, Orozco RZ, Muhlemann O. 2008. Posttranscriptional gene regulation by spatial rearrangement of the 3' untranslated region. *PLoS Biol* 6:e92.
- Fairman-Williams ME, Guenther UP, Jankowsky E. 2010. SF1 and SF2 helicases: family matters. *Curr Opin Struct Biol* 20:313-324.
- Fan-Minogue H, Du M, Pisarev AV, Kallmeyer AK, Salas-Marco J, Keeling KM, Thompson SR, Pestova TV, Bedwell DM. 2008. Distinct eRF3 requirements suggest alternate eRF1 conformations mediate peptide release during eukaryotic translation termination. *Mol Cell* 30:599-609.
- Fasken MB, Corbett AH. 2005. Process or perish: quality control in mRNA biogenesis. *Nat Struct Mol Biol* 12:482-488.
- Fleischer TC, Weaver CM, McAfee KJ, Jennings JL, Link AJ. 2006. Systematic identification and functional screens of uncharacterized proteins associated with eukaryotic ribosomal complexes. *Genes Dev* 20:1294-1307.
- Franks TM, Singh G, Lykke-Andersen J. 2010. Upf1 ATPase-dependent mRNP disassembly is required for completion of nonsense-mediated mRNA decay. *Cell* 143:938-950.
- Frolova LY, Tsivkovskii RY, Sivolobova GF, Oparina NY, Serpinsky OI, Blinov VM, Tatkov SI, Kisselev LL. 1999. Mutations in the highly conserved GGQ motif of class 1 polypeptide release factors abolish ability of human eRF1 to trigger peptidyl-tRNA hydrolysis. *RNA* 5:1014-1020.
- Gardner LB. 2010. Nonsense-mediated RNA decay regulation by cellular stress: implications for tumorigenesis. *Mol Cancer Res* 8:295-308.
- Garneau NL, Wilusz J, Wilusz CJ. 2007. The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:113-126.
- Gebauer F, Hentze MW. 2004. Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:827-835.
- Gehring NH, Frede U, Neu-Yilik G, Hundsdoerfer P, Vetter B, Hentze MW, Kulozik AE. 2001. Increased efficiency of mRNA 3' end formation: a new genetic mechanism contributing to hereditary thrombophilia. *Nat Genet* 28:389-392.
- Gehring NH, Kunz JB, Neu-Yilik G, Breit S, Viegas MH, Hentze MW, Kulozik AE. 2005. Exon-junction complex components specify distinct routes of nonsense-mediated mRNA decay with differential cofactor requirements. *Mol Cell* 20:65-75.
- Gehring NH, Lamprinaki S, Hentze MW, Kulozik AE. 2009a. The hierarchy of exon-junction complex assembly by the spliceosome explains key features of mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *PLoS Biol* 7:e1000120.
- Gehring NH, Lamprinaki S, Kulozik AE, Hentze MW. 2009b. Disassembly of exon junction complexes by PYM. *Cell* 137:536-548.
- Gehring NH, Neu-Yilik G, Schell T, Hentze MW, Kulozik AE. 2003. Y14 and hUpf3b form an NMD-activating complex. *Mol Cell* 11:939-949.
- Ghosh S, Ganesan R, Amrani N, Jacobson A. 2010. Translational competence of ribosomes released from a premature termination codon is modulated by NMD factors. *RNA* 16:1832-1847.
- Gong C, Kim YK, Woeller CF, Tang Y, Maquat LE. 2009. SMD and NMD are competitive pathways that contribute to myogenesis: effects on PAX3 and myogenin mRNAs. *Genes Dev* 23:54-66.

- Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. 2010. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466:835-840.
- Harger JW, Dinman JD. 2004. Evidence against a direct role for the Upf proteins in frameshifting or nonsense codon readthrough. *RNA* 10:1721-1729.
- Hendrickson DG, Hogan DJ, McCullough HL, Myers JW, Herschlag D, Ferrell JE, Brown PO. 2009. Concordant regulation of translation and mRNA abundance for hundreds of targets of a human microRNA. *PLoS Biol* 7:e1000238.
- Hieronymus H, Silver PA. 2004. A systems view of mRNP biology. *Genes Dev* 18:2845-2860.
- Hilleren P, Parker R. 1999. mRNA surveillance in eukaryotes: kinetic proofreading of proper translation termination as assessed by mRNP domain organization? *RNA* 5:711-719.
- Hogg JR, Goff SP. 2010. Upf1 senses 3'UTR length to potentiate mRNA decay. *Cell* 143:379-389.
- Holbrook JA, Neu-Yilik G, Hentze MW, Kulozik AE. 2004. Nonsense-mediated decay approaches the clinic. *Nat Genet* 36:801-808.
- Hosoda N, Kobayashi T, Uchida N, Funakoshi Y, Kikuchi Y, Hoshino S, Katada T. 2003. Translation termination factor eRF3 mediates mRNA decay through the regulation of deadenylation. *J Biol Chem* 278:38287-38291.
- Hu W, Petzold C, Collier J, Baker KE. 2010. Nonsense-mediated mRNA decapping occurs on polyribosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Struct Mol Biol* 17:244-247.
- Hwang J, Sato H, Tang Y, Matsuda D, Maquat LE. 2010. UPF1 association with the cap-binding protein, CBP80, promotes nonsense-mediated mRNA decay at two distinct steps. *Mol Cell* 39:396-409.
- Inaoka T, Kasai K, Ochi K. 2001. Construction of an in vivo nonsense readthrough assay system and functional analysis of ribosomal proteins S12, S4, and S5 in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 183:4958-4963.
- Isken O, Kim YK, Hosoda N, Mayeur GL, Hershey JW, Maquat LE. 2008. Upf1 phosphorylation triggers translational repression during nonsense-mediated mRNA decay. *Cell* 133:314-327.
- Isken O, Maquat LE. 2007. Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes Dev* 21:1833-1856.
- Isken O, Maquat LE. 2008. The multiple lives of NMD factors: balancing roles in gene and genome regulation. *Nat Rev Genet* 9:699-712.
- Ivanov PV, Gehring NH, Kunz JB, Hentze MW, Kulozik AE. 2008. Interactions between UPF1, eRFs, PABP and the exon junction complex suggest an integrated model for mammalian NMD pathways. *EMBO J* 27:736-747.
- Jackson RJ. 2005. Alternative mechanisms of initiating translation of mammalian mRNAs. *Biochem Soc Trans* 33:1231-1241.
- Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV. 2010. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:113-127.
- Jakobsen CG, Seggaard TM, Jean-Jean O, Frolova L, Justesen J. 2001. [Identification of a novel termination release factor eRF3b expressing the eRF3 activity in vitro and in vivo]. *Molekuliarnaia biologiya* 35:672-681.
- Jankowsky A, Guenther UP, Jankowsky E. 2010. The RNA helicase database. *Nucleic Acids Res* 39:D338-341.

- Jankowsky E. 2010. RNA helicases at work: binding and rearranging. *Trends Biochem Sci* 36:19-29.
- Jankowsky E, Putnam A. 2010. Duplex unwinding with DEAD-box proteins. *Methods Mol Biol* 587:245-264.
- Jin H, Suh MR, Han J, Yeom KH, Lee Y, Heo I, Ha M, Hyun S, Kim VN. 2009. Human UPF1 participates in small RNA-induced mRNA downregulation. *Mol Cell Biol* 29:5789-5799.
- Johansson MJ, Jacobson A. 2010. Nonsense-mediated mRNA decay maintains translational fidelity by limiting magnesium uptake. *Genes Dev* 24:1491-1495.
- Johns L, Grimson A, Kuchma SL, Newman CL, Anderson P. 2007. *Caenorhabditis elegans* SMG-2 selectively marks mRNAs containing premature translation termination codons. *Mol Cell Biol* 27:5630-5638.
- Kadlec J, Guilligay D, Ravelli RB, Cusack S. 2006. Crystal structure of the UPF2-interacting domain of nonsense-mediated mRNA decay factor UPF1. *RNA* 12:1817-1824.
- Kadlec J, Izaurralde E, Cusack S. 2004. The structural basis for the interaction between nonsense-mediated mRNA decay factors UPF2 and UPF3. *Nat Struct Mol Biol* 11:330-337.
- Kahvejian A, Svitkin YV, Sukarieh R, M'Boutchou MN, Sonenberg N. 2005. Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes Dev* 19:104-113.
- Kashima I, Yamashita A, Izumi N, Kataoka N, Morishita R, Hoshino S, Ohno M, Dreyfuss G, Ohno S. 2006. Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev* 20:355-367.
- Kataoka N, Yong J, Kim VN, Velazquez F, Perkinson RA, Wang F, Dreyfuss G. 2000. Pre-mRNA splicing imprints mRNA in the nucleus with a novel RNA-binding protein that persists in the cytoplasm. *Mol Cell* 6:673-682.
- Kaygun H, Marzluff WF. 2005. Regulated degradation of replication-dependent histone mRNAs requires both ATR and Upf1. *Nat Struct Mol Biol* 12:794-800.
- Keeling KM, Lanier J, Du M, Salas-Marco J, Gao L, Kaenjak-Angeletti A, Bedwell DM. 2004. Leaky termination at premature stop codons antagonizes nonsense-mediated mRNA decay in *S. cerevisiae*. *RNA* 10:691-703.
- Kim YK, Furic L, Desgroseillers L, Maquat LE. 2005. Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell* 120:195-208.
- Kim YK, Furic L, Parisien M, Major F, DesGroseillers L, Maquat LE. 2007. Staufen1 regulates diverse classes of mammalian transcripts. *EMBO J* 26:2670-2681.
- Kobayashi T, Funakoshi Y, Hoshino S, Katada T. 2004. The GTP-binding release factor eRF3 as a key mediator coupling translation termination to mRNA decay. *J Biol Chem* 279:45693-45700.
- Kohler A, Hurt E. 2007. Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:761-773.
- Kong J, Liebhaber SA. 2007. A cell type-restricted mRNA surveillance pathway triggered by ribosome extension into the 3' untranslated region. *Nat Struct Mol Biol* 14:670-676.
- Kononenko AV, Mitkevich VA, Atkinson GC, Tenson T, Dubovaya VI, Frolova LY, Makarov AA, Haurlyiuk V. 2010. GTP-dependent structural rearrangement of the eRF1:eRF3 complex and eRF3 sequence motifs essential for PABP binding. *Nucleic Acids Res* 38:548-558.
- Kunz JB, Neu-Yilik G, Hentze MW, Kulozik AE, Gehring NH. 2006. Functions of hUpf3a and hUpf3b in nonsense-mediated mRNA decay and translation. *RNA* 12:1015-1022.

- Le Hir H, Gatfield D, Izaurralde E, Moore MJ. 2001. The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO J* 20:4987-4997.
- Le Hir H, Izaurralde E, Maquat LE, Moore MJ. 2000a. The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *EMBO J* 19:6860-6869.
- Le Hir H, Moore MJ, Maquat LE. 2000b. Pre-mRNA splicing alters mRNP composition: evidence for stable association of proteins at exon-exon junctions. *Genes Dev* 14:1098-1108.
- Le Hir H, Nott A, Moore MJ. 2003. How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. *Trends Biochem Sci* 28:215-220.
- Le Texier V, Riethoven JJ, Kumanduri V, Gopalakrishnan C, Lopez F, Gautheret D, Thanaraj TA. 2006. AltTrans: transcript pattern variants annotated for both alternative splicing and alternative polyadenylation. *BMC Bioinformatics* 7:169.
- Lelivelt MJ, Culbertson MR. 1999. Yeast Upf proteins required for RNA surveillance affect global expression of the yeast transcriptome. *Mol Cell Biol* 19:6710-6719.
- Lewis BP, Green RE, Brenner SE. 2003. Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:189-192.
- Luco RF, Allo M, Schor IE, Kornblihtt AR, Misteli T. 2011. Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing. *Cell* 144:16-26.
- Lykke-Andersen J, Shu MD, Steitz JA. 2000. Human Upf proteins target an mRNA for nonsense-mediated decay when bound downstream of a termination codon. *Cell* 103:1121-1131.
- Maderazo AB, He F, Mangus DA, Jacobson A. 2000. Upf1p control of nonsense mRNA translation is regulated by Nmd2p and Upf3p. *Mol Cell Biol* 20:4591-4603.
- Maniatis T, Reed R. 2002. An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* 416:499-506.
- Maquat LE. 2004. Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:89-99.
- Maquat LE, Tarn WY, Isken O. 2010. The pioneer round of translation: features and functions. *Cell* 142:368-374.
- Mendell JT, Medghalchi SM, Lake RG, Noensie EN, Dietz HC. 2000. Novel Upf2p orthologues suggest a functional link between translation initiation and nonsense surveillance complexes. *Mol Cell Biol* 20:8944-8957.
- Mendell JT, Sharifi NA, Meyers JL, Martinez-Murillo F, Dietz HC. 2004. Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutates genomic noise. *Nat Genet* 36:1073-1078.
- Mitrovich QM, Anderson P. 2000. Unproductively spliced ribosomal protein mRNAs are natural targets of mRNA surveillance in *C. elegans*. *Genes Dev* 14:2173-2184.
- Mitrovich QM, Anderson P. 2005. mRNA surveillance of expressed pseudogenes in *C. elegans*. *Curr Biol* 15:963-967.
- Moore MJ, Proudfoot NJ. 2009. Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell* 136:688-700.
- Morris C, Wittmann J, Jack HM, Jalinot P. 2007. Human INT6/eIF3e is required for nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO reports* 8:596-602.

- Muhlemann O. 2008. Recognition of nonsense mRNA: towards a unified model. *Biochem Soc Trans* 36:497-501.
- Muhlemann O, Eberle AB, Stalder L, Zamudio Orozco R. 2008. Recognition and elimination of nonsense mRNA. *Biochim Biophys Acta* 1779:538-549.
- Nagy E, Maquat LE. 1998. A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem Sci* 23:198-199.
- Neu-Yilik G, Kulozik AE. 2008. NMD: multitasking between mRNA surveillance and modulation of gene expression. *Adv Genet* 62:185-243.
- Nicholson P, Yepiskoposyan H, Metze S, Zamudio Orozco R, Kleinschmidt N, Muhlemann O. 2010. Nonsense-mediated mRNA decay in human cells: mechanistic insights, functions beyond quality control and the double-life of NMD factors. *Cell Mol Life Sci* 67:677-700.
- Ohnishi T, Yamashita A, Kashima I, Schell T, Anders KR, Grimson A, Hachiya T, Hentze MW, Anderson P, Ohno S. 2003. Phosphorylation of hUPF1 induces formation of mRNA surveillance complexes containing hSMG-5 and hSMG-7. *Mol Cell* 12:1187-1200.
- Pal M, Ishigaki Y, Nagy E, Maquat LE. 2001. Evidence that phosphorylation of human Upf1 protein varies with intracellular location and is mediated by a wortmannin-sensitive and rapamycin-sensitive PI 3-kinase-related kinase signaling pathway. *RNA* 7:5-15.
- Peltz SW, Hammell AB, Cui Y, Yasenchak J, Puljanowski L, Dinman JD. 1999. Ribosomal protein L3 mutants alter translational fidelity and promote rapid loss of the yeast killer virus. *Mol Cell Biol* 19:384-391.
- Pestova TV, Hellen CU. 2001. Preparation and activity of synthetic unmodified mammalian tRNAⁱ(Met) in initiation of translation in vitro. *RNA* 7:1496-1505.
- Pestova TV, Hellen CU. 2003. Translation elongation after assembly of ribosomes on the Cricket paralysis virus internal ribosomal entry site without initiation factors or initiator tRNA. *Genes Dev* 17:181-186.
- Pestova TV, Hellen CU. 2005. Reconstitution of eukaryotic translation elongation in vitro following initiation by internal ribosomal entry. *Methods* 36:261-269.
- Pestova TV, Hellen CU, Shatsky IN. 1996. Canonical eukaryotic initiation factors determine initiation of translation by internal ribosomal entry. *Mol Cell Biol* 16:6859-6869.
- Pisarev AV, Hellen CU, Pestova TV. 2007a. Recycling of eukaryotic posttermination ribosomal complexes. *Cell* 131:286-299.
- Pisarev AV, Skabkin MA, Pisareva VP, Skabkina OV, Rakotondrafara AM, Hentze MW, Hellen CU, Pestova TV. 2010. The role of ABCE1 in eukaryotic posttermination ribosomal recycling. *Mol Cell* 37:196-210.
- Pisarev AV, Unbehauen A, Hellen CU, Pestova TV. 2007b. Assembly and analysis of eukaryotic translation initiation complexes. *Methods Enzymol* 430:147-177.
- Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. 1996. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 88:3698-3703.
- Proudfoot NJ, Furger A, Dye MJ. 2002. Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* 108:501-512.
- Rebbapragada I, Lykke-Andersen J. 2009. Execution of nonsense-mediated mRNA decay: what defines a substrate? *Curr Opin Cell Biol* 21:394-402.

- Rehwinkel J, Letunic I, Raes J, Bork P, Izaurralde E. 2005. Nonsense-mediated mRNA decay factors act in concert to regulate common mRNA targets. *RNA* 11:1530-1544.
- Rehwinkel J, Raes J, Izaurralde E. 2006. Nonsense-mediated mRNA decay: Target genes and functional diversification of effectors. *Trends Biochem Sci* 31:639-646.
- Reznik B, Lykke-Andersen J. 2010. Regulated and quality-control mRNA turnover pathways in eukaryotes. *Biochem Soc Trans* 38:1506-1510.
- Rodnina MV, Wintermeyer W. 2009. Recent mechanistic insights into eukaryotic ribosomes. *Curr Opin Cell Biol* 21:435-443.
- Selbach M, Schwanhaussner B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. 2008. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 455:58-63.
- Shatkin AJ, Manley JL. 2000. The ends of the affair: capping and polyadenylation. *Nat Struct Biol* 7:838-842.
- Sheikh MS, Fernandez-Salas E, Yu M, Hussain A, Dinman JD, Peltz SW, Huang Y, Fornace AJ, Jr. 1999. Cloning and characterization of a human genotoxic and endoplasmic reticulum stress-inducible cDNA that encodes translation initiation factor 1(eIF1(A121/SUI1)). *J Biol Chem* 274:16487-16493.
- Shoemaker CJ, Eyler DE, Green R. 2010. Dom34:Hbs1 promotes subunit dissociation and peptidyl-tRNA drop-off to initiate no-go decay. *Science* 330:369-372.
- Si K, Chaudhuri J, Chevesich J, Maitra U. 1997. Molecular cloning and functional expression of a human cDNA encoding translation initiation factor 6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14285-14290.
- Singh G, Rebbapragada I, Lykke-Andersen J. 2008. A competition between stimulators and antagonists of Upf complex recruitment governs human nonsense-mediated mRNA decay. *PLoS Biol* 6:e111.
- Smirnov VN, Surguchov AP, Fominykh ES, Lizlova LV, Saprygina TV, Inge-Vechtomov SG. 1976. Recessive nonsense-suppression in yeast: further characterization of a defect in translation. *FEBS Lett* 66:12-15.
- Smith CW, Patton JG, Nadal-Ginard B. 1989. Alternative splicing in the control of gene expression. *Annu Rev Genet* 23:527-577.
- Sonenberg N, Hinnebusch AG. 2009. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136:731-745.
- Stamm S, Riethoven JJ, Le Texier V, Gopalakrishnan C, Kumanduri V, Tang Y, Barbosa-Morais NL, Thanaraj TA. 2006. ASD: a bioinformatics resource on alternative splicing. *Nucleic Acids Res* 34:D46-55.
- Stanley WM, Jr. 1974. Specific aminoacylation of the methionine-specific tRNA's of eukaryotes. *Methods Enzymol* 29:530-547.
- Steitz TA. 2008. A structural understanding of the dynamic ribosome machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:242-253.
- Sureau A, Gattoni R, Dooghe Y, Stevenin J, Soret J. 2001. SC35 autoregulates its expression by promoting splicing events that destabilize its mRNAs. *EMBO J* 20:1785-1796.
- Svitkin YV, Evdokimova VM, Brasey A, Pestova TV, Fantus D, Yanagiya A, Imataka H, Skabkin MA, Ovchinnikov LP, Merrick WC, Sonenberg N. 2009. General RNA-binding proteins have a function in poly(A)-binding protein-dependent translation. *EMBO J* 28:58-68.
- Thermann R, Neu-Yilik G, Deters A, Frede U, Wehr K, Hagemeyer C, Hentze MW, Kulozik AE. 1998. Binary specification of nonsense codons by splicing and cytoplasmic translation. *EMBO J* 17:3484-3494.

- Uchida N, Hoshino S, Imataka H, Sonenberg N, Katada T. 2002. A novel role of the mammalian GSPT/eRF3 associating with poly(A)-binding protein in Cap/Poly(A)-dependent translation. *J Biol Chem* 277:50286-50292.
- Velichutina IV, Dresios J, Hong JY, Li C, Mankin A, Synetos D, Liebman SW. 2000. Mutations in helix 27 of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* 18S rRNA affect the function of the decoding center of the ribosome. *RNA* 6:1174-1184.
- Velichutina IV, Hong JY, Mesecar AD, Chernoff YO, Liebman SW. 2001. Genetic interaction between yeast *Saccharomyces cerevisiae* release factors and the decoding region of 18 S rRNA. *J Mol Biol* 305:715-727.
- Viegas MH, Gehring NH, Breit S, Hentze MW, Kulozik AE. 2007. The abundance of RNPS1, a protein component of the exon junction complex, can determine the variability in efficiency of the Nonsense Mediated Decay pathway. *Nucleic Acids Res* 35:4542-4551.
- Wang W, Cajigas IJ, Peltz SW, Wilkinson MF, Gonzalez CI. 2006. Role for Upf2p phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae* nonsense-mediated mRNA decay. *Mol Cell Biol* 26:3390-3400.
- Wang W, Czaplinski K, Rao Y, Peltz SW. 2001. The role of Upf proteins in modulating the translation read-through of nonsense-containing transcripts. *EMBO J* 20:880-890.
- Weng Y, Czaplinski K, Peltz SW. 1996a. Genetic and biochemical characterization of mutations in the ATPase and helicase regions of the Upf1 protein. *Mol Cell Biol* 16:5477-5490.
- Weng Y, Czaplinski K, Peltz SW. 1996b. Identification and characterization of mutations in the UPF1 gene that affect nonsense suppression and the formation of the Upf protein complex but not mRNA turnover. *Mol Cell Biol* 16:5491-5506.
- Weng Y, Czaplinski K, Peltz SW. 1998. ATP is a cofactor of the Upf1 protein that modulates its translation termination and RNA binding activities. *RNA* 4:205-214.
- Yamashita A, Ohnishi T, Kashima I, Taya Y, Ohno S. 2001. Human SMG-1, a novel phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase, associates with components of the mRNA surveillance complex and is involved in the regulation of nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev* 15:2215-2228.
- Zavialov AV, Buckingham RH, Ehrenberg M. 2001. A posttermination ribosomal complex is the guanine nucleotide exchange factor for peptide release factor RF3. *Cell* 107:115-124.
- Zhang J, Sun X, Qian Y, LaDuca JP, Maquat LE. 1998. At least one intron is required for the nonsense-mediated decay of triosephosphate isomerase mRNA: a possible link between nuclear splicing and cytoplasmic translation. *Mol Cell Biol* 18:5272-5283.
- Zhao Z, Fang LL, Johnsen R, Baillie DL. 2004. ATP-binding cassette protein E is involved in gene transcription and translation in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun* 323:104-111.

7 Anhang

7.1 Weitere Experimente

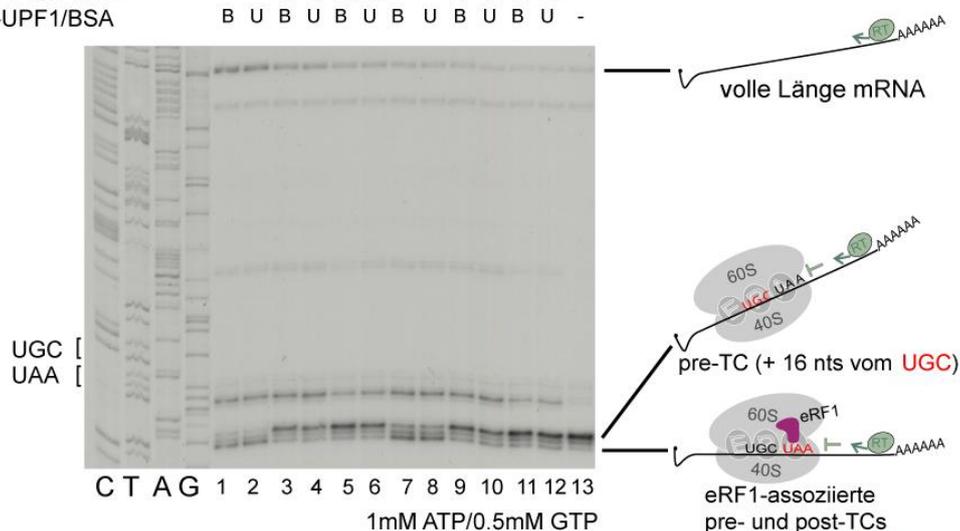
7.1.1 Die Gegenwart von UPF1 moduliert die Stabilität von Terminationskomplexen aus RRL unabhängig vom Poly-(A)-Schwanz

(Siehe Abschnitt 4.4.4)

A.

pre-TCs aus rec. Syst.:

pre-TC (MVHC)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
mM freies Mg ²⁺	1	1	1	1	1	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
eRF1-eRF3/GTP	+	+	1/5	1/5	1/10	1/10	+	+	1/5	1/5	1/10	1/10	-	-
uP-UPF1/BSA	B	U	B	U	B	U	B	U	B	U	B	U	B	U



B.

pre-TC aus RRL:

pre-TC (MVHC-P(A))	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
mM freies Mg ²⁺	2.5	1	1	1	1	1	1	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
eRF1-eRF3/GTP	-	+	+	1/5	1/5	1/10	1/10	+	+	1/5	1/5	1/10	1/10	-
uP-UPF1/BSA	-	B	U	B	U	B	U	B	U	B	U	B	U	B

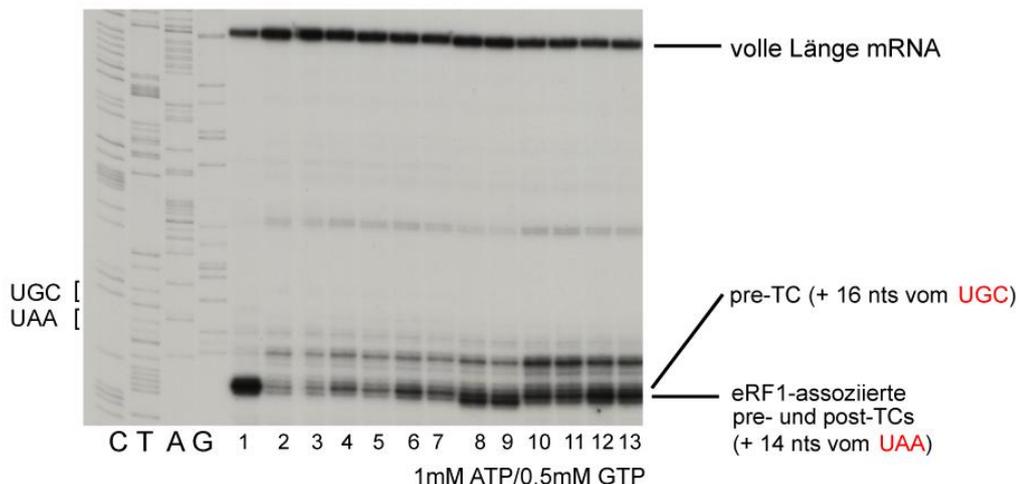


Abbildung 29 Die Gegenwart von UPF1 moduliert die Stabilität von Terminationskomplexen aus RRL unabhängig vom Poly-(A)-Schwanz.

(A, B) Toeprint von durch Translation der MVHC-STOP-P(A) (A) oder MVHC-STOP (B) mRNA in RRL gewonnenen Terminationskomplexen. „RRL-Pre-TCs“ wurden nach 10 min Vorinkubation mit UPF1 oder BSA für 5 min mit den angegebenen Verdünnungen von eRFs bei 1 mM ATP, 0,5 mM GTP und 1 mM oder 2,5 mM freiem Magnesium inkubiert und die resultierenden Komplexe wurden durch Toeprinting analysiert.

7.2 Publikationen und Poster

Die hier vorgestellte Arbeit soll in Teilen bei der Zeitschrift „RNA“ eingereicht werden (Kerschgens et al., 2011. RNA, Manuskript in Vorbereitung).

Teile dieser Arbeit wurden von mir bei den folgenden wissenschaftlichen Konferenzen vorgestellt:

EMBO Konferenz, “The Complex Life of mRNA: from Synthesis to Decay”, EMBL, Heidelberg, Deutschland, 18. - 20. März 2010, Posterpräsentation.

15th Annual Meeting of the RNA Society 2010, Washington University, Seattle, USA, 22. - 26. Juni 2010, Posterpräsentation.

7.3 Erklärung

Erklärungen gemäß § 8 (3) b) und c) der Promotionsordnung:

- a) ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.
- b) ich erkläre hiermit, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Heidelberg, den 27.05.2011



Kathrin Kerschgens

7.4 Danksagung

Für die Vergabe dieses interessanten Promotionsthemas, und die Möglichkeit diese Arbeit in der Molecular Medicine Partnership Unit (MMPU) durchführen zu können, sowie die wissenschaftliche Betreuung, ihr wertvolles Feedback, die Hilfe bei der Erstellung eines Manuskripts für die Veröffentlichung dieser Daten und das Lesen der Dissertation möchte ich mich vor allem bei Prof. Dr. Dr. A. E. Kulozik und bei Herrn Prof. Dr. M. W. Hentze bedanken.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Walter Nickel danke ich für seine Bereitschaft mich als Erstkorrektor zu betreuen sowie für sein Interesse am Fortgang meiner Promotion und seine wertvollen Anregungen und Ideen. Großen Dank auch an Hans-Michael Müller für seine Hilfe mit dem Bakulovirus-Proteinexpressionssystem.

Besonderer Dank gebührt meiner Betreuerin Dr. Gaby Neu-Yilik, für ihre hilfreichen Ratschläge und Anregungen zu diesem Projekt, das Lesen der Dissertation und ihr wertvolles Feedback.

This work is based on a eukaryotic *in vitro* translation system reconstituted from purified components that has been developed by Tatyana Pestova (assistant professor, PhD, DSc), who offered me the opportunity to come to her lab, and her colleagues. I would like to express my deep gratitude to Tanya, Chris and the members of their laboratory Andrei, Ira, Sylvain, Vera and Ying-Pu, for sharing their knowledge of the reconstituted translation system, especially by training me how to purify translation factors and how to reconstitute translation *in vitro*, and for the heartily welcome in New York. Moreover, I want to thank Tanya for valuable discussions, her interest and commitment to the project and for her constant support with ideas and motivation. Additionally, I would like to thank her for her help with the writing of the paper and for performing the experiments shown in Fig. 28.

Desweiteren möchte ich mich bei den Mitgliedern von Andreas, Matthias und Martinas Arbeitsgruppen für die Unterstützung jeglicher Art und die angenehme Laboratmosphäre bedanken. Herzlichen Dank an Anne, Aurelie, Beate, Jan, Jana, Kent, Klodiana, Mandy, Nicole, Niels, Pasha, Sandro, Sven und Rolf für diverse Plasmide, Zelllinien, technische Unterstützung, die vielen sehr hilfreichen Ratschläge und Ideen sowie für Kaffee und Schokolade; Irene and Tuija for a good time during my stay in New York.

