

**Kontrolle physiologischer mRNAs
durch einen Ddx5/p68-vermittelten
„Nonsense–mediated mRNA Decay“
(NMD) - Prozess**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
der Doktorin der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultäten III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes

von
Verena Geißler

Homburg/Saar
2013

Tag des Kolloquiums:	13. Dezember 2013
Dekan:	Prof. Dr. Volkhard Helms
Berichterstatter:	Prof. Dr. Hans Stahl Prof. Dr. Friedrich Grässer
Vorsitz:	Prof. Dr. Uli Müller
Akad. Mitarbeiter:	Jun.-Prof. Dr. Dr. Karen Rother

Veröffentlichungen und Poster:

Verena Geißler, Simone Altmeyer, Benjamin Stein, Heike Uhlmann-Schiffler und Hans Stahl

“The RNA helicase Ddx5/p68 binds to hUpf3 and enhances NMD of Ddx17/p72 and Smg5 mRNA.“

Nucleic Acids Res. 2013 Sep 1;41(16):7875-88. doi: 10.1093/nar/gkt538. Epub 2013 Jun 20.

Verena Geißler, Simone Altmeyer und Hans Stahl

“mRNA decay mediated by the DEAD-box RNA helicase Ddx5“

62. Mosbacher Kolloquium, “Mechanisms of RNA-mediated regulation“, Mosbach/Baden, Deutschland, 07. - 09. April 2011 (Poster)

Verena Geißler, Simone Kiermayer und Hans Stahl

“mRNA decay mediated by the DEAD-box RNA helicase Ddx5“

EMBO Konferenz, “The Complex Life of mRNA: from Synthesis to Decay“, Heidelberg, Deutschland, 18. - 20. März 2010 (Poster)

Zusammenfassung

Der „*Nonsense-mediated mRNA Decay*“ (NMD) ist ein Mechanismus zur translationsabhängigen mRNA-Überwachung in Eukaryonten: er degradiert mRNAs mit vorzeitigen Terminationskodons (*premature termination codon*; PTC) sowie eine Reihe normaler, physiologisch-wichtiger mRNAs. In Säugern wird der Abbau PTC-haltiger mRNAs durch den Exon-Junction-Komplex (EJC) ausgelöst, indem dessen Komponente *Up-frameshift 3* (Upf3) eine Upf2-vermittelte Bindung mit dem Ribosomen-gebundenen Upf1, einem Schlüsselprotein des NMD, eingeht. Die Formierung dieses Komplexes induziert eine Translationsrepression und die Rekrutierung von RNA-abbauenden Enzymen. Wie normale mRNAs, bei denen alle EJCs in der ersten Translationsrunde entfernt werden, als Substrate der NMD-Maschinerie erkannt werden, ist unklar. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das DEAD-box-Protein Ddx5/p68, wie auch dessen Paralog Ddx17/p72, über eine physikalische Interaktion mit Upf3 mit dem Upf-Komplex wechselwirken. Hierdurch wird der NMD-Prozess aktiviert, wenn die 3'UTR der zu regulierenden mRNA gleichzeitig von Ddx5 erkannt wird. Dies konnte für die *Ddx5*- sowie die *Ddx17*- und *Smg5*-mRNA nachgewiesen werden. Zum Auslösen des NMD ist die ATP-Binde- aber nicht die RNA-Helikaseaktivität von Ddx5 erforderlich. Aufgrund der Ergebnisse wird ein Modell für den Abbau physiologischer mRNAs durch die NMD-Maschinerie vorgeschlagen, bei dem anstelle des EJC andere RNA-bindende Proteine wie Ddx5 die Substraterkennung erlauben.

Summary

Nonsense-mediated mRNA Decay (NMD) is a mechanism of translation-dependent mRNA surveillance in eukaryotes: it degrades mRNAs with premature termination codons (PTCs) as well as a number of normal, physiological important mRNAs. In mammals, the degradation of PTC-containing mRNAs is triggered by the exon-junction-complex (EJC) through binding of its constituent *Up-frameshift 3* (Upf3), mediated by Upf2, to the ribosome-bound Upf1, a key protein in NMD. The complex formed eventually induces translational repression and recruitment of RNA decay enzymes. Mechanisms by which physiological mRNAs are targeted by the NMD machinery in the absence of an EJC have been described but still are discussed controversially. This work shows that the DEAD box protein Ddx5/p68 and its paralog Ddx17/p72 also bind the Upf complex by physical interaction with Upf3. By activating the NMD machinery, Ddx5 is shown to regulate the expression of its own, *Ddx17*- and *Smg5*-mRNAs. For NMD triggering, the ATP binding activity of Ddx5 and the 3'untranslated region of substrate mRNAs are essential. The expression control results from the preferred binding of Ddx5 to the 3'UTR of certain mRNAs. These results propose a model for the control of physiological mRNAs by the NMD machinery in which Ddx5 or other RNA binding proteins take over the role of the EJC for mRNA substrate recognition.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Abkürzungsverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	XI
Tabellenverzeichnis	XIII
1 Einleitung	1
1.1 DEAD-box-RNA-Helikasen	1
1.1.1 Die DEAD-box-Helikasen Ddx5 und Ddx17	4
1.2 Nonsense-mediated mRNA Decay (NMD)	8
1.2.1 NMD-Faktoren	9
1.2.1.1 Upf1, Upf2 und Upf3	11
1.2.1.2 EJC	13
1.2.2 NMD-Mechanismen	13
1.3 Zielsetzung der Arbeit	17
2 Material und Methoden	18
2.1 Material	18
2.1.1 Geräte	18
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	19
2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Enzyme, Marker und Medien der Zellkultur	20
2.1.4 Kommerzielle Kits und Transfektionsreagenzien	21
2.1.5 Antikörper	22
2.1.6 Primer	23

2.1.7	siRNAs	24
2.1.8	Plasmide	25
2.1.9	Bakterien	27
2.1.10	Zelllinien	27
2.2	Methoden	28
2.2.1	Methoden der Zellkultur	28
2.2.1.1	Kultivieren und Passagieren von Zelllinien	28
2.2.1.2	Einfrieren und Auftauen eukaryontischer Zellen	28
2.2.1.3	Transfektion eukaryontischer Zellen	29
2.2.1.4	Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Agenzien	31
2.2.1.5	Indirekte Immunfluoreszenz (IF)	31
2.2.2	Molekularbiologische und genetische Methoden	32
2.2.2.1	Herstellung von kompetenten E.coli DH5 α	32
2.2.2.2	Transformation von kompetenten E.coli DH5 α	33
2.2.2.3	Bestimmung der Bakterienkonzentration	33
2.2.2.4	Bestimmung der Plasmid-DNA-Konzentration im Photo- meter	33
2.2.2.5	Agarose-Gelelektrophorese	34
2.2.2.6	Gelextraktion von DNA-Fragmenten	34
2.2.2.7	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	35
2.2.2.8	Restriktion mit Endonukleasen	35
2.2.2.9	Polymarase-Kettenreaktion (PCR) zur Vermehrung von DNA-Fragmenten	35
2.2.2.10	Natrium-Acetat-Ethanol-Fällung von DNA-Fragmenten	37
2.2.2.11	Dephosphorylierung von linearisierter Plasmid-DNA	38
2.2.2.12	Ligation von DNA-Fragmenten	38
2.2.2.13	Sequenzierung	38
2.2.3	Methoden zur RNA-Untersuchung	39
2.2.3.1	RNA-Isolation	39
2.2.3.2	Reverse Transkription (RT)	39
2.2.3.3	Quantitative Real-Time RT-PCR	40
2.2.4	Methoden zur Protein-Untersuchung	43
2.2.4.1	Herstellung von Zellextrakten	43

2.2.4.2	SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE) . . .	45
2.2.4.3	Western Blot und Proteinnachweis mittels Chemilumineszenz	46
2.2.5	Ko-Immunpräzipitation (Ko-IP)	47
2.2.6	RNA-Immunpräzipitation (RIP)	49
2.2.7	NMD-Assay	51
2.2.8	EBV-abgeleitetes induzierbares Knock-in-System	53
2.2.9	3'UTR-Reporter-Assay	54
2.2.10	Statistische Auswertung	55
3	Ergebnisse	56
3.1	Komplexbildung von Ddx5 mit den Schlüsselproteinen des NMD	56
3.1.1	Untersuchungen zur Komplexbildung von Ddx5 mit den Upf-Proteinen in HeLa-Zellen	56
3.1.2	Untersuchungen zur Assoziation von Ddx5 mit mRNPs	58
3.1.3	Untersuchungen zur Ko-Lokalisation von Ddx5 und Upf1	60
3.1.4	Untersuchungen zur Interaktion von Ddx5 und Upf3B	62
3.2	Ddx5 und die NMD-Proteine Upf1, Upf2 und Upf3 regulieren die Expression von Ddx17	68
3.2.1	Untersuchungen zu einer möglichen Funktion von Ddx5 im PTC-vermittelten NMD	68
3.2.2	Untersuchungen zur Expressionsregulation von Ddx17 durch Ddx5 .	71
3.2.3	Untersuchungen zur Expressionsregulation von Ddx17 durch die NMD-Proteine Upf1, Upf2 und Upf3	74
3.2.4	Untersuchungen zum Einfluss von Ddx5, Upf1 und Upf3 sowie der Translation auf die mRNA-Stabilität von Ddx17	76
3.3	Untersuchungen zur Expressionsregulation von Smg5 durch Ddx5 und die Schlüsselproteine des NMD	78
3.4	Ddx5 reguliert sich selbst, Ddx17 und Smg5 über Bindung an die jeweilige 3'UTR	81
3.4.1	Untersuchungen zum Einfluss der 3'UTR von Ddx17 bzw. von Smg5 auf ihre Expressionsregulation	81

3.4.2	Untersuchungen zum Einfluss der 3'UTR auf die eigene Expressionsregulation von Ddx5	84
3.5	Untersuchungen zur Interaktion vom großen T-Antigen von <i>Simian Virus 40</i> mit Upf3	85
4	Diskussion	88
5	Literaturverzeichnis	96
	Danksagung	XIV

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
Ago	Argonaute
AKAP95	A-Kinase anchoring protein 95
Ala	Alanin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpolysulfat
AR	Androgenrezeptor
AS	Aminosäuren
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
BTZ	Barentz
C-terminal	carboxy-terminal
CBC	cap-binding-complex
CBP	CREB-binding Protein
CBP20	cap-binding-protein 20
CBP80	cap-binding-protein 80
cDNA	copyDNA
CH-Domäne	Cystein- und Histidin-reiche Domäne
CO ₂	Kohlendioxid
D. melanogaster	Drosophila melanogaster
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
Ddx17	DEAD-box Polypeptid 17
Ddx5	DEAD-box Polypeptid 5
DEAD	Einbuchstabencode der Aminosäuren für Asparaginsäure - Glutaminsäure - Alanin - Asparaginsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphate
DSE	downstream sequence element
dsRNA	Doppelstrang-RNA
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
eIF3	eukaryotic initiation factor 3
eIF4E	eukaryotic translation initiation factor 4E
eIF4G	eukaryotic translation initiation factor 4G
EJC	exon-junction-complex
eRF	eukaryotic release factor
ER α	Estrogenrezeptor α
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FAM	Carboxyfluorescein
FC	Fold Change
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Firefly-Luziferase
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Glu	Glutaminsäure
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
H. sapiens	Homo sapiens
HA	Hämagglutinin
HCV	Hepatitis C Virus
HDAC1	Histondeacetylierungskomplex
HIV-1	Humanes Immundefizienz-Virus 1
HSP70	Hitzeschockprotein 70
IF	Immunfluoreszenz
IP	Immunpräzipitation
kb	Kilobasenpaare
kDA	Kilodalton
l	Liter
λ N-Protein	λ -Antiterminator Protein

LB	Luria Bertani
m	milli = 10^{-3}
M	molar
m ⁷ G-Kappe	7-Methylguanosin-Kappe
MC4R	Melanocortin-4-Rezeptor
MCS	multiple cloning site
MIF4G	middle portion of eIF4G
miRNA	microRNA
mRNA	messengerRNA
mRNPs	Messenger-Ribonukleoprotein-Komplexe
n	nano = 10^{-9}
N-terminal	amino-terminal
NaCl	Natriumchlorid
NLS	nuclear localisation signal
NMD	Nonsense-vermittelter mRNA Abbau
nt	Nukleotid
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame
P-bodies	processing bodies
PABP	Poly(A)-binding-protein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PI3KK	Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K)-verwandte Kinase
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
POX	Peroxidase
PP2A	Protein-Phosphatase 2A
PTC	premature termination codon
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RBD	ribonucleoprotein-type RNA-binding domain
Rent1	regulator of nonsense transcript 1
RIP	RNA-Immunpräzipitation
RL	Renilla-Luziferase
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
Rnase	Ribonuklease
RNP	RNA-Protein-Komplexe
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA

RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase - PCR
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SBS	STAU1-Bindestellen
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SF	Superfamilie
siRNA	small interfering RNA
SMD	Staufen1-vermittelter mRNA Abbau
Smg	Suppressor with morphological effect on genitalia
snRNP	small nuclear Ribonucleoprotein Particle
ssRNA	Einzelstrang-RNA
STAU1	Staufen1
SURF	Smg1-Upf1-eRF1-eRF3
SV40	Simian Virus 40
T-Ag	großes T-Antigen von SV40
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAMRA	Tetramethylrhodamine
taq	<i>thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-bufferd saline
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tram1	translocating chain-associated membrane protein 1
TRIS	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	Units, relative Enzymeinheiten
Upf	up-frameshift
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
mikro	mikro = 10 ⁻⁶

Abbildungsverzeichnis

1	Übersicht über die DEAD-box-Protein-Struktur.	2
2	Schematische Darstellung zellulärer Prozesse mit Beteiligung von DEAD-box-RNA-Helikasen.	4
3	Schematische Darstellung der <i>Ddx17</i> -mRNA.	5
4	Modelle des NMD im Vergleich zur normalen Translationstermination. . . .	16
5	Ko-Immünpräzipitation von Upf1, Upf2 und Upf3 mit Ddx5 aus HeLa-Extrakten.	57
6	Ko-Immünpräzipitation von mRNP-Komponenten mit Ddx5 aus HeLa-Zell-extrakten.	60
7	Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von überexprimiertem Ddx5 und Upf1.	62
8	Physikalische Interaktion von Ddx5 mit Upf3B.	63
9	Ddx5 interagiert mit dem C-Terminus von Upf3B.	65
10	Ddx5 interagiert mit Upf3 in Abwesenheit von Upf1.	66
11	Upf3B interagiert mit dem N-Terminus von Ddx5.	67
12	Ddx17 bindet an Upf3B.	68
13	Ddx5 und Ddx17 haben keinen Einfluss auf die PTC-vermittelte NMD-Kontrolle.	70
14	Autoregulation und wechselseitige Expressionskontrolle von Ddx5 und Ddx17.	73
15	Ddx5 wie auch die Mutanten Ddx5 _{DQAD} und Ddx5 _{GNT} liegen im Komplex mit Upf1, Upf2 und Upf3 vor.	74
16	Regulation der Expression von Ddx17 durch die NMD-Proteine Upf1, Upf2 und Upf3.	75
17	Einfluss von Ddx5, Upf1 und Upf3 sowie der Translation auf die <i>Ddx17</i> -mRNA-Halbwertszeit.	77

18	Ddx5 reguliert die Expression von Smg5.	79
19	Einfluss von Upf3B auf die Expression von Smg5.	80
20	Die 3'UTR der <i>Ddx17</i> - und <i>Smg5</i> -mRNA ist essentiell für die Expressions- kontrolle durch Ddx5 und Upf1.	82
21	Präferentielle Bindung von Ddx5 an die 3'UTR von Smg5.	84
22	Autoregulation von Ddx5 über die eigene 3'UTR.	85
23	Das große T-Antigen von <i>SV40</i> interagiert mit Upf3B.	86
24	Modell des Ddx5-vermittelten NMD physiologischer mRNAs.	94

Tabellenverzeichnis

1	Übersicht über die wichtigsten NMD-Faktoren	10
2	Übersicht über die verwendeten Geräte	18
3	Übersicht über die Verbrauchsmaterialien	19
4	Übersicht über die Chemikalien, Reagenzien, Enzyme, Marker und Medien der Zellkultur	20
5	Kommerzielle Kits und Transfektionsreagenzien	21
6	Übersicht über die verwendeten Primärantikörper	22
7	Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper	23
8	Übersicht über die verwendeten Primer	23
9	Übersicht über die verwendeten Klonierungsprimer	24
10	Übersicht über die verwendeten siRNAs	25
11	Übersicht über die verwendeten Plasmide	25
12	Verwendete DNA- und jetPEI TM -Mengen entsprechend der verwendeten Zellkulturschale.	29
13	Zusammensetzung der verwendeten Trenngele (für 2 Gele)	46

1 Einleitung

In nahezu allen Bereichen des RNA-Stoffwechsels, von der Transkription, dem RNA-Prozessing und der Translation bis hin zum mRNA-Abbau sind RNA-Helikasen involviert. RNA-Helikasen sind Enzyme, die Energie aus der Hydrolyse von Nukleotriphosphaten (NTPs; meist ATP) nutzen, um doppelsträngige RNA und RNA-Protein-Komplexe aufzulösen (Rogers *et al.*, 1999; Jankowsky *et al.*, 2000). Entsprechende Gene lassen sich sowohl in Bakterien als auch in Archaeen und Eukaryonten und einigen Viren finden (Gorbalenya und Koonin, 1993; Fairman-Williams *et al.*, 2010). RNA-Helikasen können basierend auf sequenzspezifische und strukturelle Eigenschaften zusammen mit den strukturell verwandten DNA-Helikasen in 6 Superfamilien eingeteilt werden (Gorbalenya und Koonin, 1993; Singleton *et al.*, 2007). Diese Arbeit beschäftigt sich mit den zur Superfamilie II gehörenden DEAD-box-RNA-Helikasen Ddx5 und Ddx17.

1.1 DEAD-box-RNA-Helikasen

Die DEAD-box-Proteine bilden innerhalb der Superfamilie II (SFII) mit 38 Mitgliedern im Menschen (Abdelhaleem *et al.*, 2003; Jahnknecht, 2010) und 27 in *Saccharomyces cerevisiae* (de la Cruz *et al.*, 1999) die größte Familie (Linder *et al.*, 1989; Gorbalenya und Koonin, 1993; Singleton *et al.*, 2007; Fairman-Williams *et al.*, 2010). Namensgebend ist die hochkonservierte Aminosäuresequenz DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp). Die RNA-Helikasen der ebenfalls zur SFII gehörenden DEAH- und DExH-Familie weisen innerhalb dieses Motives entsprechende Variationen auf (Gorbalenya und Koonin, 1993). Abgesehen von der DEAD-box weisen die entsprechenden Proteine weitere 10 konservierte Motive auf, die sich über circa 400 Aminosäuren erstrecken und die von sehr variablen amino- (N-) und carboxy- (C-) terminalen Sequenzen flankiert werden. Die 11 konservierten Motive

bilden die Helikase-Region, die sich in die RecA-ähnlichen Domänen 1 und 2 teilen lässt. Die Aufgaben der einzelnen Motive bezüglich ATP-Bindung, ATP-Hydrolyse (ATPase), RNA-Bindung und -Entwindung wurden durch Struktur-, Gen- und biochemische Analysen aufgeklärt (Pause und Sonenberg, 1992; Rocak und Linder, 2004; Cordin *et al.*, 2006; Linder, 2006; Abbildung 1).

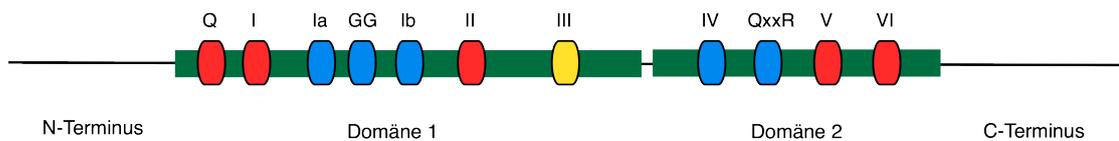


Abbildung 1: Übersicht über die DEAD-box-Protein-Struktur.

Schematische Darstellung der Primärstruktur der DEAD-box-RNA-Helikasen. Domäne 1 und Domäne 2 stellen die zwei RecA-ähnlichen Domänen dar. Die konservierten Motive sind entsprechend ihrer Lage und ihrer biochemischen Funktion dargestellt (rot: ATP-Bindung und -Hydrolyse; blau: RNA-Bindung; gelb: Koordination zwischen RNA- und ATP-Bindung). N- bzw. C-Terminus steht für die bei den einzelnen Proteinen individuellen amino- und carboxyterminalen Bereiche (modifiziert nach Putnam und Jankowsky, 2013).

Motiv I, Motiv II und das Q-Motiv von Domäne 1 und Motiv V und VI von Domäne 2 werden für die ATP-Bindung und -Hydrolyse benötigt, während Motiv 1a, GG und 1b von Domäne 1 und IV, QxxR und V von Domäne 2 in intramolekulare Umlagerungsprozesse und in die RNA-Bindung involviert zu sein scheinen (Walker *et al.*, 1982; Caruthers und McKay, 2002; Cordin *et al.*, 2006; Rocak und Linder, 2004; Tanner *et al.*, 2003; Pause und Sonenberg, 1992; Schwer und Meszaros, 2000; Kim *et al.*, 1998; Cordin *et al.*, 2004; Pause *et al.*, 1993; Jarmoskaite und Russell, 2011). Motiv I und Motiv II (DEAD-Motiv) werden auch Walker A- und Walker B-Motive genannt (Walker *et al.*, 1982). Zur Ausbildung der ATP-Bindungstasche, eine Voraussetzung für die ATP-Hydrolyse, scheint eine Interaktion von Motiv II mit den Motiven I, III und VI nötig zu sein (Cordin *et al.*, 2004). Motiv III verbindet die ATPase- und RNA-Helikase-Aktivität (Pause und Sonenberg, 1992). Durch Bindung von ATP und des RNA-Substrates kommt es zu mehreren Konformationsänderungen innerhalb eines DEAD-box-Proteins, die dazu führen, dass die beiden Domänen ATP und RNA fest gebunden halten und Basenpaarungen aufgetrennt werden (Banroques *et al.*, 2010; Hilbert *et al.*, 2009). Nachdem ATP zu ADP und anorganischem Phosphat

hydrolysiert und das anorganische Phosphat freigesetzt wurde, führen erneute Konformationsänderungen dazu, dass die Bindung von ADP und entwundener RNA letztendlich so schwach ist, dass es zu deren Freisetzung kommt (Lorsch und Herschlag, 1998; Henn *et al.*, 2010).

Seit Entdeckung der DEAD-box-Proteine vor mehr als 20 Jahren (Lindner *et al.*, 1989) wurde die Fähigkeit, stimuliert durch die Bindung an einzel- oder doppelsträngige RNA (ssRNA oder dsRNA), zyklisch ATP zu binden und zu hydrolysieren als deren wichtigste biochemische Aktivität definiert (Linder, 2006). Diese regulierte Bindung kann nicht nur dazu genutzt werden, die Stränge von kurzen doppelsträngigen RNAs zu trennen (Hirling *et al.*, 1989; Rogers *et al.*, 1999), sondern auch die Umlagerung von komplexen RNA-Strukturen zu katalysieren (Rössler *et al.*, 2001; Chamot *et al.*, 2005) oder RNA-Protein-Komplexe (RNP) aufzulösen (Jankowsky *et al.*, 2001). Einige DEAD-box-Proteine interagieren dabei mit spezifischen RNAs (Kossen *et al.*, 2002) während andere sequenzunspezifisch auf eine Vielzahl von RNA-Substraten wirken (Silverman *et al.*, 2003; Grohman *et al.*, 2007; Mohr *et al.*, 2008).

DEAD-box-Helikasen haben zentrale Funktionen im RNA-Stoffwechsel (Cordin *et al.*, 2006; Abbildung 2). So sind sie zum Beispiel an der Ribosomenbiogenese (de la Cruz *et al.*, 1999; Jalal *et al.*, 2007;), der Transkription (Endoh *et al.*, 1999; Watanabe *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2003; Gillian und Svaren, 2004; Wilson *et al.*, 2004), dem prä-mRNA-Spleißen (Liu, 2002; Chan *et al.*, 2004), dem mRNA-Transport ins Zytoplasma (Weirich *et al.*, 2004), der Translation (Linder, 2003; Berthelot *et al.*, 2004), dem microRNA (miRNA)-Processing (Fukuda *et al.*, 2007) und dem Nonsense-vermittelten mRNA Abbau (NMD; Chan *et al.*, 2004, Ferraiuolo *et al.*, 2004; Shibuya *et al.*, 2004) beteiligt. Selbst im RNA-Stoffwechsel von Mitochondrien wurde die Beteiligung von DEAD-box-Proteinen nachgewiesen (Huang *et al.*, 2005). Ihre Funktion üben sie meist als Teil größerer Multiproteinkomplexe aus, wie zum Beispiel des Spleißosoms oder der eukaryontischen Translationsinitiationsmaschinerie (Jarmoskaite und Russell, 2011). Mutationen und Dysregulationen von einigen DEAD-box-Proteinen stehen mit bestimmten Krankheiten wie zum Beispiel Herz- und Krebserkrankungen in Zusammenhang (Abdelhaleem, 2004; Akao, 2009; Chao *et al.*, 2006; Godbout *et al.*, 2007; Sahni *et al.*, 2010; Wortham *et al.*, 2009).

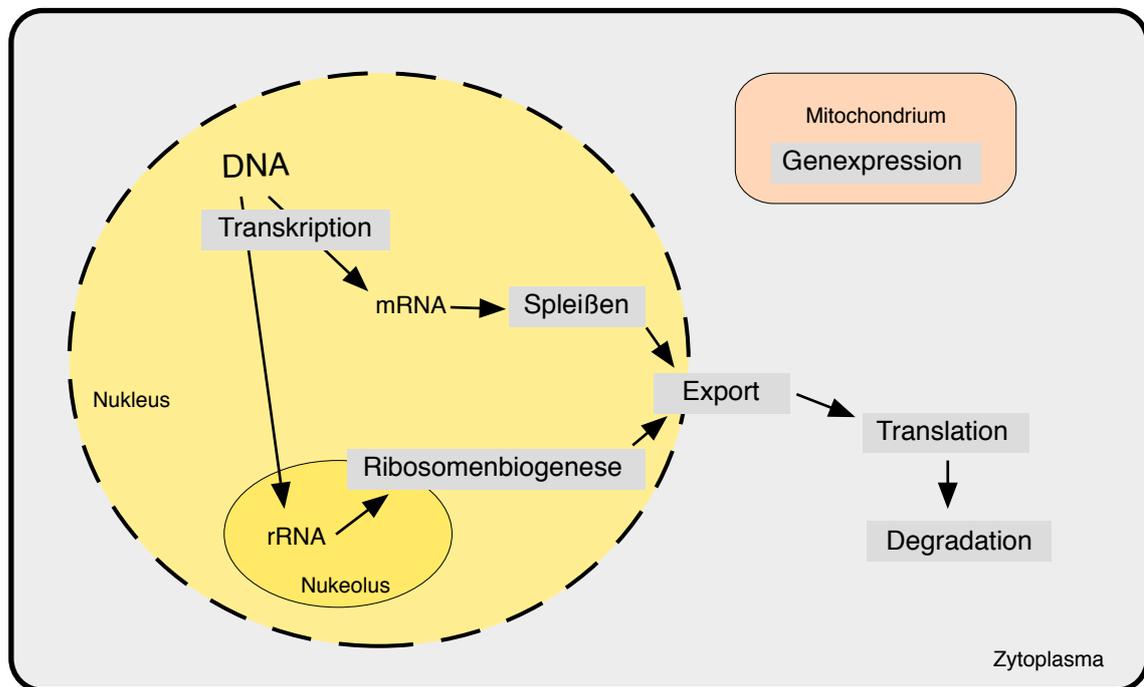


Abbildung 2: Schematische Darstellung zellulärer Prozesse mit Beteiligung von DEAD-box-RNA-Helikasen.

DEAD-box-Helikasen sind unter anderem im Nukleus bei der Transkription von mRNA und rRNA, beim mRNA-Spleißen, bei der Ribosomenbiogenese und beim mRNA-Export ins Zytoplasma beteiligt. Im Zytoplasma sind sie in die Translation und in die Degradation von mRNA involviert. In Mitochondrien spielen sie eine Rolle bei der Genexpression (modifiziert nach Linder, 2006).

1.1.1 Die DEAD-box-Helikasen Ddx5 und Ddx17

Das in dieser Arbeit untersuchte humane Protein *DEAD-box Polypeptid 5* (Ddx5, wegen seines Molekulargewichtes auch p68 genannt) wurde vor mehr als 30 Jahren (1980) durch einen kreuzreaktiven Antikörper (PAb204), der gegen das große T-Antigen von *Simian Virus 40* (SV40) gerichtet ist, entdeckt (Lane und Hoeffler 1980; Crawford *et al.*, 1982). Neben Ddx5 existiert bei Säugern noch das paraloge DEAD-box-Protein Ddx17 (Lamm *et al.*, 1996). Ddx17 liegt in zwei Isoformen vor, die nach ihrem molekularen Gewicht (in kDa) auch p72 (bzw. Ddx17₇₂) und p82 (bzw. Ddx17₈₂) genannt werden. Ddx17₇₂ und Ddx17₈₂ entstehen durch die Verwendung zweier alternativer Translations-Startkodons

im selben Leseraster, so dass sich die längere Isoform Ddx17₈₂ (GUG-Startkodon; Habilitationsschrift Heike Uhlmann-Schiffler, 2009) nur durch einen verlängerten N-terminalen Bereich von 56 Aminosäuren von der kürzeren Isoform Ddx17₇₂ (AUG-Startkodon) unterscheidet (Rössler *et al.*, 2001; Uhlmann-Schiffler *et al.*, 2002, Abbildung 3). Dbp2 ist das Hefehomolog von Ddx5 und Ddx17.

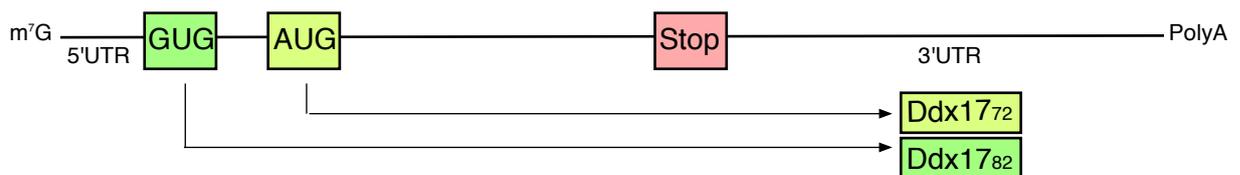


Abbildung 3: Schematische Darstellung der *Ddx17*-mRNA.

Dargestellt sind die alternativen Startkodons, die für die Translation von Ddx17₇₂ (p72) bzw. Ddx17₈₂ (p82) genutzt werden, und das Stoppkodon.

Die Ddx17-Isoformen liegen in allen bisher untersuchten Zellen in ähnlicher Konzentration vor, wobei sich auch die biochemischen Aktivitäten offensichtlich nicht unterscheiden (Uhlmann-Schiffler *et al.*, 2002). Ddx17 und auch Ddx5 können sowohl als Homodimer als auch als Heterodimere vorliegen (Ogilvie *et al.*, 2003). Ein Abgleich der Ddx5- und Ddx17-Aminosäuresequenz ergab eine Homologie innerhalb der konservierten Helikaseregion von annähernd 90%, aber größere Unterschiede in den N- und C-terminalen Regionen (Homologie von circa 30% bzw. 60%), was auf teilweise unterschiedliche Funktionen hindeutet (Lamm *et al.*, 1996; Ogilvie *et al.*, 2003). Beim Mensch liegt das Gen von Ddx5 auf Chromosom 17 in der Region 17q23-q25 (Iggo und Lane 1989). Es ist 6,7 kb (Kilobasenpaare) lang und besteht aus 13 Exons und 12 Introns und hat eine 175 Nukleotid (nt) lange 5'-untranslatierte Region (UTR), sowie eine 301 nt lange 3'UTR (Hloch *et al.*, 1990; Rössler *et al.*, 2000). Das Ddx17-Gen liegt auf Chromosom 22 (22q13.1) und weist mit 2455 nt eine überdurchschnittlich lange 3'UTR auf (Uhlmann-Schiffler *et al.*, 2002). Ddx5 und Ddx17 werden in allen Säugerzellen exprimiert, wobei es allerdings signifikante Expressionsunterschiede zwischen den verschiedenen Organen gibt. Die Expressionsrate scheint ferner abhängig vom Wachstum bzw. vom Entwicklungs- und Differenzierungsstadium einer Zelle zu sein (Hloch 1995; Lamm *et al.*, 1996; Stevenson *et al.*, 1998; Rössler

et al., 2000; Ip *et al.*, 2000; Seufert *et al.*, 2000; Kitamura *et al.*, 2001; Kahlina *et al.*, 2004). Für Ddx5 sind zwei unterschiedlich große mRNAs nachweisbar: eine vollständig gespleißte (2.4 kb), die translatiert wird und eine längere, unvollständig gespleißte (4.2 kb), für die ein entsprechendes Translationsprodukt bisher nicht nachgewiesen werden konnte (Rössler *et al.*, 2000). Die unvollständig gespleißte mRNA-Form enthält ein bis hin zur Hefe konserviertes Intron (Intron 11 beim Menschen; Rössler *et al.*, 2000), dass in *S. cerevisiae* an der autoregulatorischen posttranskriptionellen Expressionskontrolle von Dbp2 beteiligt ist. Bei dieser Autoregulation scheint Dbp2 selbst das Herausspleißen dieses Introns aus der prä-mRNA zu verhindern (Barta und Iggo 1995). In Säugerzellen scheint diese Selbstregulation ebenfalls zu existieren, da bei einer Überexpression von Ddx5 der Anteil der alternativ gespleißten mRNA ansteigt (Rössler *et al.*, 2000, Jalal *et al.*, 2007). Für Ddx17 sind ebenfalls partiell gespleißte mRNA-Formen nachweisbar (5,3 und 9,3 kb; Lamm *et al.*, 1996; Jalal *et al.*, 2007).

Biochemisch sind Ddx5 und Ddx17 gut charakterisiert. Sie können sowohl doppelsträngige als auch einzelsträngige RNAs binden und kurze dsRNA-Bereiche (bis zu 30 nt) mit einem 3'-überstehenden Ende unter ATP-Verbrauch entwinden (Rössler *et al.*, 2001; Jahnknecht, 2010). Die Entwindung der RNA erfolgt in 3'-5'- (Rössler *et al.*, 2001) möglicherweise aber auch in 5'-3'-Richtung (Huang und Liu, 2002; Lee, 2002). Zusätzlich besitzen Ddx5 und Ddx17 eine RNA-Annealing-Aktivität, die in Kooperation mit der Helikase-Aktivität die Umlagerung von RNA-Sekundärstrukturen katalysiert (Rössler *et al.*, 2001).

Ddx5 und Ddx17 sind an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt, wie zum Beispiel dem prä-mRNA-Spleißen (Lui, 2002; Lee, 2002; Lin *et al.*, 2005; Hönig *et al.*, 2002; Guil *et al.*, 2003; Germann *et al.*, 2012; Dardenne *et al.*, 2012) und der rRNA- (Jalal *et al.*, 2007; Fukuda *et al.*, 2007) und miRNA-Prozessierung (Fukuda *et al.*, 2007; Salzman *et al.*, 2007). Dazu wurden Ddx5 und Ddx17 als transkriptionelle Regulatoren, sowohl als Ko-Aktivatoren als auch als Ko-Repressoren, beschrieben. Diese Rolle in der Transkription ist offenbar unabhängig von der RNA-Helikase-Aktivität. Ddx5 und Ddx17 wurden zum Beispiel als wichtige Ko-Aktivatoren von Estrogenrezeptor α (ER α ; Endoh *et al.*, 1999; Watanabe *et al.*, 2001), von p53 (Bates *et al.*, 2005) und von Myo-D (Carreti *et al.*, 2006) beschrieben. Ddx5 und Ddx17 interagieren auch mit den Ko-Aktivatoren p300/CBP und

der RNA-Polymerase II (Fujita *et al.*, 2003; Rossow und Janknecht, 2003). Durch eine Interaktion mit dem Histondeacetylierungs-Komplex (HDAC1) wirken Ddx5 und Ddx17 als Ko-Repressoren (Wilson *et al.*, 2004).

Obwohl für einige Funktionen, wie z.B. bei der Ribosomen-Biogenese eine Redundanz zwischen Ddx5 und Ddx17 beschrieben wurde (Jalal *et al.*, 2007; Dardenne *et al.*, 2012), scheint dennoch sicher, dass sie sich nicht in allen Funktionen gleich sind. Beim alternativen Spleißen unterscheiden sich Ddx5 und Ddx17 z.B. klar in ihren Zielgenen (Hönig *et al.*, 2002; Guil *et al.*, 2003). Unterschiede wurden auch nach Knockout-Experimenten in Mäusen deutlich. Ddx5-Knockout-Mäuse sind embryonal lethal am Tag 11.5, während Ddx17-Knockout-Mäuse erst am zweiten Tag nach der Geburt sterben. Dass die Doppel-(Ddx5/Ddx17)-Knockout-Maus eine noch frühere embryonale Letalität zeigt, deutet andererseits wieder auf eine gewisse funktionelle Redundanz hin (Fukuda *et al.*, 2007).

Ursprünglich wurden sowohl Ddx5 als auch Ddx17 als Zellkern-Proteine beschrieben (Lane und Hoeffler 1980; Crawford *et al.*, 1982; Hirling *et al.*, 1989; Iggo und Lane, 1989; Lamm *et al.*, 1996; Stevenson *et al.*, 1998; Erukashvily *et al.*, 2005), wo sie durch eine Interaktion mit AKAP95 (*A-Kinase anchoring protein 95*) größtenteils Kernmatrix gebunden vorliegen (Akileswaran *et al.*, 2001). Sie sind aber auch in geringen Mengen (circa 1%) im Zytoplasma nachweisbar (Rossow und Janknecht, 2003; Shin *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2006; Diplomarbeit Kan Xie, 2007; Wang *et al.*, 2009). Tatsächlich ermöglichen zwei Kernexport- und zwei Kernlokalisationssignale ein RanGTP-abhängiges Shuttle von Ddx5 zwischen Zellkern und Zytoplasma (Wang *et al.*, 2009). Die Lokalisation innerhalb des Zellkerns ist vom Zellzyklus abhängig: die Nukleoli sind während der Interphase frei von Ddx5, entstehende Nukleoli während der Telophase enthalten dagegen Ddx5 (Iggo *et al.*, 1991; Nicol *et al.*, 2000). Die Isoformen von Ddx17 unterscheiden sich bei Überexpression in ihrer zellulären Lokalisation. Ddx17₇₂ befindet sich in granulären zytoplasmatischen Strukturen und Ddx17₈₂, wie Ddx5, im Zellkern (Jalal *et al.*, 2007; Diplomarbeit Christina Servas, 2008). Über eine zelluläre Funktion von Ddx5 im Zytoplasma ist bislang wenig bekannt. Man weiß allerdings, dass Ddx5 im Zytoplasma mit dem Hepatitis C Virus Protein HCV-NS5B (Goh *et al.*, 2004) und mit der 3'UTR des Hepatitis C Virus Genoms (Harris *et al.*, 2006) interagiert, was für die virale Replikation essentiell ist. Ddx5 scheint auch einen Einfluss auf die Replikation von HIV-1 (Huma-

nes Immundefizienz-Virus) zu haben, wo es den Rev/RRE-vermittelten Kernexport von HIV-1 Transkripten unterstützt (Zhou *et al.*, 2013).

Medizinische Bedeutung erhalten Ddx5 und Ddx17 durch ihre Rolle als potentielle Proto-Onkoproteine bzw. Tumorpromotoren (Janknecht, 2010). So wurde ihnen eine Rolle bei der Entstehung von Darm-, Brust- und Prostatakrebs zugeschrieben (Causevic *et al.*, 2001; Shin *et al.*, 2007; Mooney *et al.*, 2010; Wortham *et al.*, 2009). Häufig wurde dabei eine gesteigerte Expression von Ddx5 und/oder Ddx17 in den entarteten Zellen gefunden. Bei kolorektalen Tumoren scheint die Bindung von Ddx5 und Ddx17 an β -Catenin ursächlich zu sein für eine β -Catenin-abhängige Transkription von bestimmten Proliferation-fördernden Zielgenen wie c-Myc, Cyclin D1 oder c-jun (Segditsas und Tomlinson, 2006, de Lau *et al.*, 2007). In Brusttumoren scheint die Überexpression von Ddx5 und Ddx17 eine Aktivierung von ER α zu bewirken (Normanno *et al.*, 2005; Yager und Davidson, 2006). In Prostata Tumoren führt die gesteigerte Expression der paralogen Proteine zu einer Ko-Aktivierung vom Androgenrezeptor (AR; Clark *et al.*, 2008; Attard *et al.*, 2009). Andere Publikationen beschreiben eine erhöhte Menge an *Ddx5*-mRNA in ovarialen Tumoren und multiplen Myelomen (Stone *et al.*, 2003; Felix *et al.*, 2009). Ddx5 und Ddx17 scheinen auch bei anderen Krankheitsbildern wie z.B. Adipositas (Oishi *et al.*, 2000; Kitamura *et al.*, 2001; Bolduc *et al.*, 2004), Hirnschäden beim Down Syndrom (Kircher *et al.*, 2002) oder der hepatischen Fibrose (Huang *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2010) involviert zu sein.

1.2 Nonsense-mediated mRNA Decay (NMD)

Der Nonsense-vermittelte mRNA Abbau (engl. *nonsense-mediated mRNA Decay*; NMD) ist ein evolutionär konservierter zellulärer Prozess, dessen Funktion nach ersten Erkenntnissen im Abbau von mRNAs mit einem vorzeitigen Stoppkodon (engl. *premature termination codon*; PTC) liegt. Er verhindert damit, dass verkürzte und dadurch möglicherweise funktionslose und/oder toxische Proteine in der Zelle synthetisiert und angehäuft werden (Maquat, 2004; Behm-Ansmant und Izaurralde, 2006; Chang *et al.*, 2007; Isken und Maquat, 2008; Brogna und Wen, 2009; Huang und Wilkinson, 2012; Kervestin und Jacobson, 2012). PTCs können direkt durch einen Einzelbasenaustausch in der genomischen

DNA oder indirekt durch eine Verschiebung im Leseraster durch zum Beispiel genomische Insertionen oder Deletionen entstehen oder auch durch regulierte oder aberrierende, alternative Spleißvorgänge (Cuccurese *et al.*, 2005; Isken und Maquat, 2008; Lareau *et al.*, 2004; Lewis *et al.*, 2003; Mitrovich und Anderson, 2000). Neben dieser Qualitäts-überwachenden Rolle des NMD, wird zunehmend seine Bedeutung auch für die Expressionskontrolle von Genen bis hin zur Regulation von Entwicklungsvorgängen (Hwang und Maquat, 2011) erkannt, wobei er sich auch noch selbst reguliert (Huang und Wilkinson, 2012). Tatsächlich ändert sich die zelluläre Konzentration von circa 10% der physiologischen (normalen) mRNAs, wenn der NMD gehemmt ist (He *et al.*, 2003; Mendell *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2011).

Der kritische Schritt im PTC-vermittelten NMD ist die Erkennung des “frühzeitigen“ Stoppkodons und damit die Kennzeichnung einer defekten mRNA. Obwohl die Kernkomponenten des NMD über die Artengrenzen hinaus konserviert sind, scheint der genaue Mechanismus zur Identifikation von PTCs zwischen den Arten zu variieren (Chang *et al.*, 2007; Huang und Wilkinson, 2012; Schweingruber *et al.*, 2013).

1.2.1 NMD-Faktoren

Der NMD wurde 1979 erstmals in *Saccharomyces cerevisiae* beobachtet (Losson und Lacroute, 1979; Culbertson *et al.*, 1980) und 1991 wurde mit *Up-frameshift 1* (Upf1; Leeds *et al.*, 1991) das erste für den NMD essentielle Genprodukt beschrieben, danach folgten Upf2 (Cui *et al.*, 1995) und Upf3 (Leeds *et al.*, 1992). Neben den Upf-Proteinen spielen die Smg-Proteine (*Suppressor with morphological effect on genitalia*; Smg1, Smg5, Smg6, Smg7, Smg8, Smg9) und die Proteine des Exon-Junction-Komplexes (engl. *exon-junction-complex*; EJC) mit den Proteinen MAGOH, BTZ (Barentz), Y14 und eIF4AIII eine wichtige Rolle im NMD-Prozess (Übersicht in Mühlemann *et al.*, 2008; Bhuvanagiri *et al.*, 2010; Nicholson *et al.*, 2010 und EJC: Le Hir *et al.*, 2000; Le Hir *et al.*, 2001; Gehring *et al.*, 2003; Gehring *et al.*, 2005). Eine Übersicht über die biochemischen Eigenschaften und Funktionen der einzelnen Proteine ist in Tabelle 1 gezeigt (nach Isken und Maquat, 2008; Nicholson *et al.*, 2010).

Tabelle 1: Übersicht über die wichtigsten NMD-Faktoren mit ihren biochemischen Charakteristika und NMD-Funktionen

NMD-Faktor	Charakteristika	Funktionen im NMD
Upf1	ATPase; 5'-3'-Helikase	Komponente des SURF-Komplexes, vermittelt die Erkennung von PTCs, mRNA- Degradation
Upf2	Phosphoprotein	EJC Adapterprotein, Interaktion mit Upf1 und Upf3, fördert Phosphorylierung von Upf1
Upf3A + B	RNA-Bindeproteine	EJC-Proteine, Interaktion mit Upf2, fördern Phosphorylierung von Upf1, Upf3B effektiver im NMD als Upf3A
Smg1	Ser-/Thr-Kinase der PI3KK-Familie, ATPase, Phosphoprotein	phosphoryliert Upf1
Smg5	PIN-Domäne	interagiert mit PP2A, fördert Dephosphorylierung von Upf1
Smg6	PIN-Domäne, Endonuklease	Endonukleaseaktivität, fördert Dephosphorylierung von Upf1
Smg7	TPR Repeats	fördert Dephosphorylierung von Upf1
Smg8	Phosphoprotein	inhibiert Kinase-Aktivität von Smg1
Smg9	Phosphoprotein	Komplex mit Smg1
Y14-MAGOH Heterodimer	RNA-Bindeproteine	EJC-Proteine, fördern Translation, rekrutieren Upf3
eIF4AIII	RNA-Bindeprotein, RNA-Helikase	EJC-Protein, bindet direkt an den Exon-Exon-Übergang, dient als Anker für MAGOH und BTZ
BTZ	RNA-Bindeprotein, Phosphoprotein	EJC-Protein, interagiert mit eIF4AIII und Y14-MAGOH
CBP80	RNA-Bindeprotein	bildet mit CBP20 den CBC, fördert NMD

1.2.1.1 Upf1, Upf2 und Upf3

Upf1 ist ein evolutionär konserviertes und universell exprimiertes Phosphoprotein mit einer RNA/DNA-abhängigen ATPase und RNA-Helikase Aktivität (Applequist *et al.*, 1997). Es ist auch bekannt unter den Namen Rent1 (*regulator of nonsense transcript 1*; in der Maus; Perlick *et al.*, 1996) oder Smg2 (*suppressor with morphogenetic defects in genitalia 2*; *Caenorhabditis elegans*; Page *et al.*, 1999). Das humane Gen ist auf Chromosom 19 lokalisiert und wird in allen Geweben als zytoplasmatisches 130 kDa-Protein exprimiert (Applequist *et al.*, 1997; Page *et al.*, 1999). Upf1 ist ein Schlüsselprotein des NMD, das mit weiteren NMD-Faktoren, wie Upf2, Smg1, Smg5-Smg7, Smg6, CBP80 (*cap-binding-protein 80*) und eRF1-eRF3 (*eukaryotic release factor 1 und 3*) interagiert (Kadlec *et al.*, 2006; Chamieh *et al.*, 2008; Czaplinski *et al.*, 1998; Ivanov *et al.*, 2008; Denning *et al.*, 2001; Yamashita *et al.*, 2001; Ohnishi *et al.*, 2003; Anders *et al.*, 2003; Chiu *et al.*, 2003; Hosoda *et al.*, 2005; Hwang *et al.*, 2010). Upf1 ist an mehreren Schritten des NMD beteiligt, von der Erkennung über die Markierung bis hin zum Abbau eines entsprechenden Transkriptes. Zusätzlich zu seiner Rolle im NMD hat Upf1 auch Funktionen bei zwei anderen mRNA-Abbauwegen: im Staufen1 (STAU1)-vermittelten Abbau (SMD) bestimmter physiologischer mRNAs und im replikationsabhängigen Histon-mRNA Abbau. Beim SMD enthalten die entsprechenden mRNAs als Erkennungssignale doppelsträngige RNA-Regionen in ihrer 3'UTR, die als STAU1-Bindestellen (SBS) fungieren (Kim *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007; Gong *et al.*, 2009). Bei der replikationsabhängigen Histon-Synthese müssen am Ende einer S-Phase Histon-mRNAs abgebaut werden. Upf1 interagiert dazu mit dem Haarnadel/SLPB Komplex in der 3'UTR der Histon-mRNAs (Kaygun und Marzluff, 2005). Interessanterweise spielt Upf1 abseits dieser RNA-Degradationsprozesse auch eine Rolle bei der DNA-Replikation, der DNA-Reparatur, sowie im Telomerstoffwechsel und bei der Stabilisierung der genomischen RNA von HIV-1 (Azzalin und Lingner, 2006; Dahlseid *et al.*, 2003; Lew *et al.*, 1998; Ajamian *et al.*, 2008; Chawla *et al.*, 2011). Außerdem wurde Upf1 funktionell mit der microRNA (miRNA)-vermittelten Genregulation in Verbindung gebracht (Jin *et al.*, 2009). Upf1 besteht aus zwei konservierten funktionellen Regionen, die über eine Verknüpfungssequenz miteinander verbunden sind: einer N-terminalen Cystein- und Histidin-reichen Domäne (CH-Domäne), die für die Bindung zu Upf2 erforderlich ist, und einer C-terminalen Helikase-Domäne (Applequist *et al.*, 1997; Culbertson und Leeds, 2003). Upf1 gehört zur Superfamilie I der DNA/RNA-Helikasen

(Fairman-Williams *et al.*, 2010; Jankowsky *et al.*, 2011; Jankowsky, 2011; Jankowsky und Putnam, 2010) und enthält alle sieben für diese Familie typischen Motive (Applequist *et al.*, 1997). Die ATPase Aktivität umfasst zwei der sieben konservierten Motive im mittleren Bereich des Proteins und ist mit der 5'-3'-Helikase-Aktivität verknüpft (Bhattacharya *et al.*, 2000; Czaplinski *et al.*, 1995; Kashima *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2007; Chamieh *et al.*, 2008). Beide Aktivitäten sind essentiell für den NMD-Ablauf, zum einen für die Deassemblierung der mRNPs und zum anderen für das Recycling der NMD-Faktoren (Czaplinski *et al.*, 1995; Weng *et al.*, 1996; Bhattacharya *et al.*, 2000; Franks *et al.*, 2010). Essentiell für den NMD und zwar für den Umbau der mRNPs ist auch die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Upf1 (Durand *et al.*, 2007).

Upf2 ist, wie Upf1, ein großes Phosphoprotein (148 kDa) und trotz einiger Kernlokalisationssignale (engl. *nuclear localisation signals*; NLS) ebenfalls überwiegend im Zytoplasma lokalisiert (Lykke-Andersen *et al.*, 2000; Mendell *et al.*, 2000; Serin *et al.*, 2001). Upf2 bindet über separate Bindungsstellen an Upf1 und Upf3 und fungiert so als Bindeglied für diese Proteine (He *et al.*, 1997; Lykke-Andersen *et al.*, 2000; Serin *et al.*, 2001). Upf2 interagiert über N- und C-terminale Bereiche mit Upf1, wobei der C-terminale wichtiger zu sein scheint (Clerici *et al.*, 2009). Die Interaktion mit einem hauptsächlich positiv geladenen Bereich der RNA-Bindedomäne (*ribonucleoprotein-type RNA-binding domain*; RBD) von Upf3 erfolgt über hochkonservierte, überwiegend negativ geladene Aminosäuren der letzten von drei Upf2-MIF4G- (*middle portion of eIF4G*) Domänen (Kadlec *et al.*, 2004).

Upf3 ist ein kleineres (circa 57 kDa), nukleäres Protein (Lykke-Andersen *et al.*, 2000), das als eine Komponente des EJC mit Hilfe der C-terminalen Region mit mehreren anderen EJC-Faktoren interagiert (Le Hir *et al.*, 2001; Bono *et al.*, 2006; Chamieh *et al.*, 2008). Im menschlichen Genom existieren 2 Gene für Upf3. Das Gen für Upf3A ist auf Chromosom 13 lokalisiert, das für Upf3B auf dem X-Chromosom, weshalb letzteres auch Upf3X genannt wird. Beide Gene kodieren für zwei alternativ gespleißte mRNAs, woraus letztendlich 4 Upf3-Isoformen resultieren. Wird beim Spleißen von Upf3B Exon 8 übersprungen, entsteht ein Protein ohne die Aminosäuren 270-282, bei Upf3A führt ein Überspringen von Exon 4 zu einem Protein ohne die Aminosäuren 117-149 (Serin *et al.*, 2001). Trotz einer hohen Sequenzähnlichkeit von circa 60% zeigt Upf3B eine deutlich höhere Aktivität im NMD

als Upf3A. Grund ist vermutlich ein kurzes C-terminales Sequenzmotiv von Upf3B, das im Gegensatz zu diesem Bereich im Upf3A-Protein, in vielen Arten hochkonserviert ist (Kunz *et al.*, 2006). Upf3A und Upf3B scheinen um die Bindung an Upf2 zu konkurrieren. Im Falle eines geringen zellulären Upf3B-Levels kann mehr Upf3A an Upf2 binden, was wiederum zu einer Stabilisierung von Upf3A führt. Bei einem höheren zellulären Upf3B-Level ist weniger Upf3A an Upf2 gebunden und damit instabil. Hierdurch kann ein Ausfall von Upf3B zumindest zum Teil durch Upf3A kompensiert werden (Chan *et al.*, 2009).

1.2.1.2 EJC

In Säugerzellen benötigt der PTC-vermittelte NMD ein vorzeitiges Stoppkodon, das 50-55 Nukleotide stromaufwärts eines Exon-Exon-Überganges lokalisiert ist (Isken und Maquat, 2007). Während des Spleißens formiert sich auf der mRNA an jedem Exon-Exon-Übergang mit einem Abstand von 20–24 Nukleotiden in 5'-Richtung eine Gruppe von Proteinen zum sogenannten Exon-Junction-Komplex (EJC; Le Hir *et al.*, 2000; Sun und Maquat, 2000). Die Zusammensetzung des EJC ist dynamisch, besteht aber mindestens aus den Kernproteinen Y14, MAGOH, Barentsz (BTZ; auch bekannt als CASC3 und MLN51) und eIF4AIII, sowie aus dem NMD-Faktor Upf3 (Bono *et al.*, 2006; Le Hir *et al.*, 2001; Le Hir *et al.*, 2000). An die mRNA gebunden, wandert der EJC mit ins Zytoplasma, wo er weitere mRNA-Stoffwechselprozesse, wie zum Beispiel Translationsaktivierung, Lokalisation der mRNA oder eben auch den NMD, beeinflusst (Lykke-Andersen *et al.*, 2001; Le Hir *et al.*, 2001; Lejeune *et al.*, 2002). Die Wichtigkeit des EJC für den NMD wird dadurch deutlich, dass PTC-haltige mRNAs von natürlicherweise Intron-losen Säugergenen wie die *Melanocortin-4-Rezeptor-* (MC4R), *Hitzeschockprotein 70-* (HSP70) oder *Histon H4-* mRNA, gegenüber dem NMD resistent sind (Brocke *et al.*, 2002; Maquat und Li, 2001).

1.2.2 NMD-Mechanismen

In der ersten Runde der Translation werden normalerweise durch das translatierende Ribosom alle EJCs von der mRNA verdrängt. Bei Vorliegen eines PTC wird das Ribosom

vorzeitig angehalten und ein EJC, das sich stromabwärts davon befindet, verbleibt auf der mRNA. Aufgrund dieses EJC wird jetzt das Stoppkodon als vorzeitig erkannt und dient als Signal zur NMD-Aktivierung (Nagy und Maquat, 1998; Thermann *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998; Kataoka *et al.*, 2000; Brocke *et al.*, 2002; Le Hir *et al.*, 2001; Kashima *et al.*, 2006; Gehring *et al.*, 2009). Upf3 als Teil des EJC bindet hierzu an Upf2, das wiederum mit Upf1 interagiert, was zur Rekrutierung und Aktivierung weiterer NMD-Faktoren und letztendlich zum Abbau der mRNA führt (Culbertson und Neeno-Eckwall, 2005; Ishigaki *et al.*, 2001; Maquat, 2004). Der EJC dient nur als Plattform für die Komplexbildung der Upfs (Kim *et al.*, 2001; Le Hir *et al.*, 2001), wenn ein PTC mindestens 50-55 nt stromaufwärts liegt (Nagy und Maquat, 1998; Thermann *et al.*, 1998; Carter *et al.*, 1995; Daar und Maquat, 1988; Zhang *et al.*, 1998a; Zhang *et al.*, 1998b). Andernfalls kommt die Interaktion mit Upf1 als Teil des SURF-Komplex (weiter bestehend aus Smg1 und den Terminationsfaktoren eRF1 und eRF3), der sich am terminierenden Ribosom bildet (Kashima *et al.*, 2006) nicht zu Stande. Zur Aktivierung von Upf1 ist die Phosphorylierung durch die *Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K)-verwandte Kinase* (PI3KK) Smg1 erforderlich (Grimson *et al.*, 2004; Page *et al.*, 1999; Pal *et al.*, 2001; Yamashita *et al.*, 2001). Phosphoryliertes Upf1 assoziiert dann transient mit ribosom-gebundenem eIF3 (eukaryotischer Initiationsfaktor 3). Diese Interaktion führt dann zu einer Translationsrepression durch die Inhibierung der eIF3-abhängigen Überführung des 40S-Met-tRNA^{iMet}-mRNA Komplexes zum translationsfähigen 80S-Met-tRNA^{iMet}-mRNA Initiationskomplexes (Isken und Maquat, 2008). Durch diese Translationsrepression werden Abbauenzyme rekrutiert, die den Abbau der mRNA ermöglichen. Dieser Abbau kann auf zwei verschiedenen Arten geschehen, entweder durch Deadenylierung bzw. Decapping oder durch endonukleotische Schnitte in der Nähe des PTC gefolgt jeweils von exonukleotischen Verdau (Nicholson *et al.*, 2010). Phosphoryliertes Upf1 kann danach durch Interaktion mit Smg5, Smg6 und Smg7 durch die Protein-Phosphatase 2A (PP2A) wieder dephosphoryliert und damit für einen weiteren NMD-Prozess recycelt werden (Ohnishi *et al.*, 2003; Anders *et al.*, 2003; Chiu *et al.*, 2003; Conti und Izaurralde, 2005; Lejeune und Maquat, 2005; Singh *et al.*, 2008).

Der Mechanismus der Erkennung von NMD-sensitiven, physiologischen mRNAs ist bis heute unklar. Bestimmte Merkmale, wie zum Beispiel offene Leserahmen im 5'UTR-Bereich der mRNA (engl. *upstream open reading frame*; uORF) oder lange 3'UTRs schei-

nen den Abbau dieser mRNAs zu begünstigen (Mendell *et al.*, 2004; He *et al.*, 2003; Rehwinkel *et al.*, 2005; Wittmann *et al.*, 2006; Rodriguez-Gabriel *et al.*, 2006). Das Vorliegen einer langen 3'UTR bedingt einen relativ großen räumlichen Abstand zwischen dem natürlichen Stoppkodon und dem Poly(A)-Ende mit dem daran gebundenen Poly(A)-Bindeprotein (PABPC1; Hoshino *et al.*, 1999). Im Normalfall erkennt eRF1 während der Termination der Translation das Stoppkodon und bindet zusammen mit eRF3 in die A-Bindestelle des Ribosoms. Der C-Terminus von PABPC1 kann dann mit dem N-Terminus von eRF3 interagieren, was die Termination fördert. Im Falle einer langen 3'UTR scheint die Interaktion mit PABPC1 gestört zu sein (Ivanov *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2008), was wiederum die Rekrutierung von Upf1 durch Interaktion mit eRF3 und damit die Ausbildung des SURF-Komplexes begünstigen könnte (Amrani *et al.*, 2004; Ivanov *et al.*, 2008; Kashima *et al.*, 2006). Allerdings aktiviert nicht jede lange 3'UTR den NMD-Prozess (Singh *et al.*, 2008) und andere Arbeiten berichten von einer verstärkten Bindung von Upf1 an lange 3'UTRs, was den NMD aktivieren könnte (Hogg und Goff, 2010). Ob diese Bindung allerdings direkt oder indirekt (z.B. durch andere Faktoren vermittelt) ist und ob hierzu die NMD-Faktoren Upf2 und Upf3 benötigt werden, ist nicht bekannt. In Abbildung 4 sind die Modelle des NMD der normalen Translationstermination gegenübergestellt.

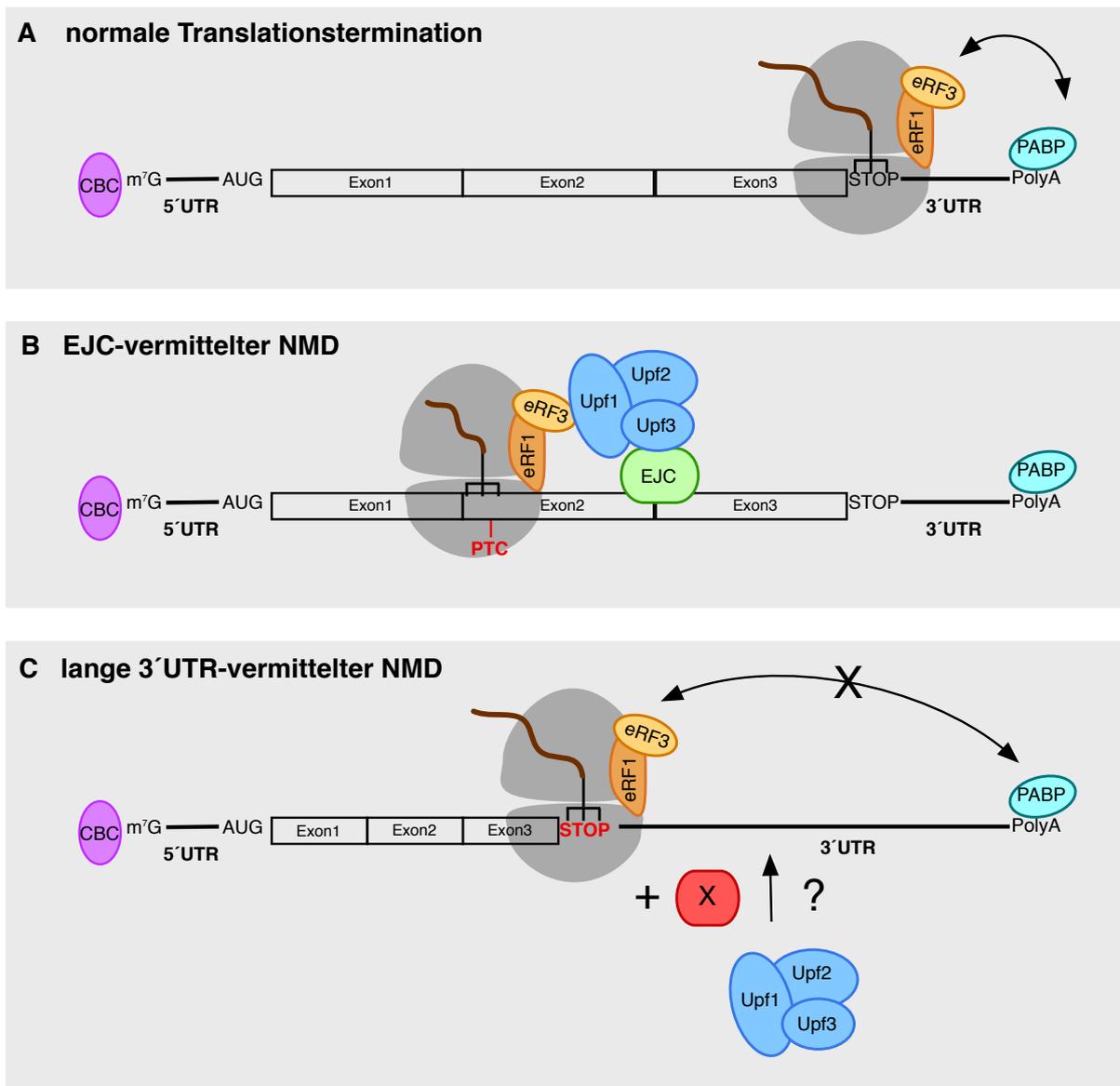


Abbildung 4: Modelle des NMD im Vergleich zur normalen Translationstermination (modifiziert nach Shoemaker und Green, 2012).

A: Bei der normalen Translationstermination scannt das translatierende Ribosom die neu synthetisierte mRNA, die an ihrer 5'-Kappe den sogenannten „cap-binding-complex“ (CBC) gebunden hat, und verdrängt alle gebundenen Exon-Junction-Komplexe (EJC) bis das normale Terminationskodon (STOP) erreicht ist. Es kann die charakteristische, terminationsfördernde Interaktion zwischen den Terminationsfaktoren eRF1 und eRF3 und dem Poly(A)-bindenden Protein (PABP) ausgebildet werden. **B:** Im EJC-vermittelten NMD wird das Ribosom an einem vorzeitigen Stoppkodon (PTC) angehalten und es bleiben EJCs stromabwärts des PTC gebunden, was zur Bildung eines funktionellen NMD-Komplexes aus Upf1, Upf2 und Upf3 und zum Abbau der PTC-haltigen mRNA führt. **C:** Im 3'UTR-Modell scheint die lange 3'UTR bestimmter mRNAs die Distanz zwischen eRF1/eRF3 und PABP zu erhöhen und so die Ausbildung der Interaktion zu verhindern. Wie es zur Ausbildung des NMD-Komplexes kommt ist unverstanden.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Neuere Arbeiten haben gezeigt, dass das DEAD-box-Protein Ddx5 nicht nur im Zellkern sondern auch im Zytoplasma vorkommt, ohne dass ihm hier eine eindeutige Funktion zugeordnet werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher überprüft werden, ob Ddx5 als RNA-Bindeprotein im Zytoplasma in den mRNA-Metabolismus involviert ist. Da in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* das Dbp2-Homlog an der Qualitätskontrolle von mRNAs durch die NMD-Maschinerie beteiligt ist, wurde als Ausgangspunkt dieser Arbeit auch für Ddx5 eine mögliche NMD-Funktion in Betracht gezogen und es sollte nach potentiellen Interaktionen mit NMD-Faktoren gesucht werden. Da in Säugerzellen sowohl PTC-haltige als auch physiologische mRNAs über die NMD-Maschinerie kontrolliert werden, sollte auf eine mögliche Ddx5-Funktion in beiden Fällen getestet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Im Folgenden sind die während der Dissertation verwendeten Geräte (Tabelle 2), Verbrauchsmaterialien (Tabelle 3), Chemikalien (Tabelle 4), Kits und Transfektionsreagenzien (Tabelle 5), Antikörper (Tabelle 6 und 7), Primer (Tabelle 8 und 9), siRNAs (Tabelle 10), Plasmide (Tabelle 11), Bakterien (2.1.9) und die verwendeten Zelllinien (2.1.10) aufgelistet.

2.1.1 Geräte

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Geräte

Gerätetyp	Gerätebezeichnung (Hersteller)
Autoklav	Varioklav Dampfsterilisator (H+P Labortechnik GmbH, Oberschleissheim)
Brutschränke	Hera cell 150, Function Line (Heraeus, Hanau)
Dest.-Wasser-Anlage	Milli-Q (Millipore, Schwalbach Ts.)
Eismaschine	(Ziegra, Isenhagen)
Elektrophorese-Kammern	(Hofer, San Francisco)
Fast Real Time PCR System	7500 Fast system (Applied Biosystems, Darmstadt)
Fluoreszenzmikroskop	Eclipse TE-2000U (Nikon, Düsseldorf)
Geldokumentationssystem	ChemiDoc TM XRS (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
Kühlzentrifuge	Centrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburg)
Luminometer	(Berthold Detection Systems GmbH, Pforzheim)
Magnetrührer	MR3001 (Heidolph, Schwabach)

Mikroskop	DMIL (Leica, Wetzlar)
Mikrowelle	5067 (TEC, Wiesbaden)
PCR-Geräte, Thermocycler	96 Universal Gradient peqstar (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
pH-Meter	Toledo MP220 pH Meter (Mettler, Giessen)
Photometer	Biophotometer (Eppendorf, Hamburg)
Rotoren	SW55TI (Beckman, München)
Schüttler	Duomax 2030; Unimax 1010 (Heidolph, Schwabach)
Spannungsgeräte	PS600 (Desaga, Wiesloch)
Sterilbank	Lamin Air HB2448 (Heraeus, Hanau)
Stickstofftank	Chronos Biosafe (Messer Griesheim)
Tischzentrifugen	(Roth, Karlsruhe; Sarstedt, Nürnbergrecht)
Transfer-Apparatur	TE Series, Transpher electrophoresis unit (Hoefer, San Francisco)
Trockenschrank	(Heraeus, Hanau)
Ultraschallgerät	Branson Sonifier Cell Disruptor B15 (G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd)
Vortex	Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, New York)
Waagen	AM100, PM600, PM3000 (Mettler, Giessen)
Wasserbäder	GFL (Burgwedel und Köttermann, Uetze/Hänigsen)
Zentrifugen	Model J2-21 Centrifuge (Beckman, München) Centrifuge 5417C (Eppendorf, Hamburg)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Übersicht über die Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
Gilson-Pipetten	Abimed, Langenfeld
Glasplatten für Elektrophorese	Amersham, Freiburg
Einmalspritzen, Skalpelle	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
PCR-Reaktionsgefäße (0,2ml und 0,5ml), DNA LoBind Tube 0,5 ml; Reaktionsgefäße (1,5ml und 2,0ml), Küvetten UVette 220 – 1600nm	Eppendorf, Hamburg
Glasgefäße, sterile Zellschaber	Fisher Scientific, Schwerte
PVDF Western Blotting Membrane	Roche Diagnostics, Mannheim

Deckgläser, Drigalskispatel, Handschuhe, Objektträger, Pasteurpipetten, Plastikflaschen, sterile Spitzenfilter	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen, Plastikröhrchen (15ml und 50ml), Zellkulturschalen	Sarstedt, Nürnberg
Whatman 3MM-Papier (Gel-Blotting Papier)	Schleicher & Schuell, Dassel
MicroAmp Optical Adhesive Film Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
PCR 96-Well TW-MT-Platten, farblos	Biozym Scientific, Hess. Oldendorf

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien, Enzyme, Marker und Medien der Zellkultur

Tabelle 4: Übersicht über die Chemikalien, Reagenzien, Enzyme, Marker und Medien der Zellkultur

Bezeichnung	Firma
HyperLadder I, HyperPAGE	Bioline GmbH, Luckenwalde
Doxycyclin	Clontech, Saint-Germain-en-Laye
Mounting Medium	Dianova, Hamburg
ATP, dNTP Mix, Prestained Protein Molecular Weight Marker, Restriktionsenzyme, Shrimp Alkaline Phosphatase, Taq-Polymerase, T4-DNA-Ligase, 10x T4-DNA-Ligasepuffer, Dnase I	Fermentas, St.Leon-Rot
Protein-A-Sepharose CL-4B, ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Gibco® Opti-MEM® I “Reduced Serum Medium without serum”, DMEM High Glucose, EDTA, Fetal Bovine Serum, dNTP-Mix, Trypsin-EDTA, Protein G-Sepharose 4 Fast Flow	Invitrogen, Karlsruhe
RNase A	Novagen, EMD Chemicals, USA
DMEM high Glucose, FCS, 10x Trypsin-EDTA	PAA Laboratories GmbH, Coelbe
Lumi-Light Western Blotting Substrate, Complete Protease Inhibitor EDTA-frei, Ampicillin, Kanamycin	Roche Diagnostics, Mannheim
Agar-Agar, Agarose NEEO Ultra-Qualität, Rotiphorese Gel 30, TEMED	Roth, Karlsruhe

DAPI, NP40 (Igepal), Triton X-100, Tween-20, Xylencyanol, Natriumvanadate, Puromycin Dihydrochlorid, Hygromycin B	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PfuUltra High Fidelity-Polymerase	Stratagene, La Jolla
Magermilchpulver	Sucofin, Zeven
Taqman® Fast Advanced Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
AllStars Neg. Control siRNA	Qiagen, Hilden

Weitere nicht näher beschriebene Standardchemikalien stammen aus dem Zentralen Chemikalienlager der Universität des Saarlandes.

2.1.4 Kommerzielle Kits und Transfektionsreagenzien

Tabelle 5: Kommerzielle Kits und Transfektionsreagenzien

Name	Verwendung	Firma
High Pure PCR Product Purification Kit	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	Roche, Mannheim
Transcriptor High Fidelity cDNA-Synthesis Kit	cDNA-Synthese	Roche, Mannheim
KAPA2G™ Robust	PCR	PEQLAB, Erlangen
Kappa HiFi PCR Kit	PCR	PEQLAB, Erlangen
Jetstar 2.0 Plasmid Purification	Plasmid-Präparation (MIDI)	Genomed, Löhne
Invisorb Spin Plasmid Mini Two	Plasmid-Präparation (MINI)	Invitex, Berlin
Rneasy Mini Kit	RNA-Extraktion	Qiagen, Hilden
jetPEI™	Plasmid-Transfektion	PEQLAB, Erlangen
nanojuice	Plasmid-Transfektion	Merck, Darmstadt
X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent	Plasmid-Transfektion	Roche, Mannheim
Interferin	siRNA-Transfektion	PEQLAB, Erlangen

2.1.5 Antikörper

Folgende Antikörper wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet, um Proteine im Western Blot (WB) oder in der indirekten Immunfluoreszenz (IF) nachzuweisen bzw. zur Ko-Immunpräzipitation (IP) von Proteinen und wurden, wenn nicht anders vermerkt, aus Hybridoma-Zellen gewonnen (Med. Biochemie, Homburg).

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper

Name	Beschreibung	Herkunft
α -CBP80	Maus, monoklonal; Epitop AS 21-320	sc-271304, Santa Cruz
α -Ddx5 (C10)	Maus, monoklonal; Epitop Ddx5, AS 605-614	Rössler <i>et al.</i> , 2000
α -Ddx17 (CAK)	Kaninchen, polyklonal; Epitop Ddx17 AS 437-650	Uhlmann-Schiffler <i>et al.</i> , 2002
α -EGFP	Maus, monoklonal; Epitop GFP/EGFP	MAB3580, Upfstate, Millipore
α -eIF4E	Ziege, polyklonal; Epitop eIF4E, C-terminal	sc-6968, Santa Cruz
α -eIF4G	Ziege, polyklonal; Epitop eIF4G, N-terminal	sc-9601, Santa Cruz
α -eRF3	Kaninchen, polyklonal; Epitop AS 190-204	ab49878, abcam
α -FLAG	Maus, monoklonal; Epitop FLAG Clone M2	F3165; Sigma
α -HA	Maus, monoklonal; Epitop HA-Tag	clone 12CA5, Roche
α -HA	Ratte, monoklonal, Epitop HA	clone 3F10, Roche
α -KT3	Maus, monoklonal; Epitop T-Antigen, KT3-Fusionsproteine	MacArthur und Walter, 1984
α -MAGOH	Maus, monoklonal; Epitop Volllängenprotein	sc-56724, Santa Cruz
α -Maus IgG	Kaninchen, polyklonal; Epitop Maus IgG	#06-371, Millipore
α -PABPC1	Maus, monoklonal; Epitop AS 1-300, Deletion 82-129	sc-166027, Santa Cruz
α -PABPN1	Ziege, polyklonal; Epitop PABPN1, N-terminal	sc-33007, Santa Cruz
α -Smg5	Ziege, polyklonal; Epitop Smg5, N-terminal	sc-50980, Santa Cruz
α -T-Ag (PAb101)	Maus, monoklonal; Epitop T-Antigen, C-terminal	Deppert <i>et al.</i> , 1981
α -Tubulin	Maus, monoklonal; Epitop alpha-Tubulin AS 426-450	#05-829, Millipore
α -Upf1	Kaninchen, polyklonal; Epitop AS 71-370	sc-48802, Santa Cruz
α -Upf2	Ziege, polyklonal; Epitop Upf2, C-terminal	sc-20227, Santa Cruz
α -Upf3	Kaninchen, polyklonal; Epitop AS 51-240	sc-48800, Santa Cruz

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper

Name	Beschreibung	Herkunft
α -Kaninchen-Pox	Ziege	A0545, Sigma
α -Kaninchen-Pox	Ziege	12-348, Millipore
α -Maus-Pox	Ziege	A4416, Sigma
α -Ziege-Pox	Affe	sc-2020, Santa Cruz
α -Maus-Alexa-Fluor®568 (rot)	Ziege	Invitrogen

2.1.6 Primer

Verwendete Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim) hergestellt.

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Primer

Primer	Forward Primer 5'-3'	Reverse Primer 5'-3'
qDdx5	CAAACATGGAAAAGCTCC TATT	CTCTGTCTTCGACCAACT GA
qDdx17	TCAAGTTTGTGATCAACT ATG	ACTACCACTTGAGTGGTT TCA
qSmg5	GATATCAGAATGAATTAG CTGGCG	CTCACACTTCTTCAGTTG GTGGTAC
qTram1	AGGAACAGAAAATGGTGT GAATGG	AACAGGAAAATCTCTAAT GCTGAAAG
qGAPDH	TGAAGGTCGGAGTCAACG GATTTGGT	GCAGAGATGATGACCCTT TTGGCTC
qEGFP Firefly	CACCTACGGCAAGCTGA CACTTACGCTGAGTACTT CG	CATGTGATCGCGCTTCT GCAACCCCTTTTTGGAAA CG
Renilla	TTCGTGGAAACCATGTTG CC	TGGAAAAGAATCCTGGGT CC

Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten Klonierungsprimer

Konstrukt	Forward Primer 5'-3'	Reverse Primer 5'-3'
pCIneo-FLAG- Upf3B-1-270	CGCGCTCGAGATGAAGGA AGAGAAGGA	CGCGGTCGACTCACAGCT TAATCTT
pCIneo-FLAG- Upf3B-270-470	CGCGCTCGAGAAGAAGCA AGAAAAAGGA	CGCGGTCGACTCTAGATC ACTCCTCT
pCIneo-FLAG- Upf3B-1-420	CGCGCTCGAGATGAAGGA AGAGAAGGA	CGCGGTCGACTCAGTTTC TTATTCGA
pCIneo-FLAG- Upf3B-145-470	CGCGCTCGAGAGAGATAC CAAAGTCGGGA	CGCGGTCGACTCTAGATC ACTCCTCT
pCIneo-EGFP- 3'UTR-Ddx17	CGCGTCCGGATAAAACCA CTCAAGTGGTAGTGACTC CAGCACGCGTCCGGATAA AACCACTCAAGTGGTAGT GACTCCAGCA	CGCGGCGGCCCGCCAAGAT GATGGTATC
pCIneo-EGFP- 3'UTR-Smg5	GAACTCCGGATGATACTG ACCCCAGGCCCTG	ACCTGCGGCCGCGGTTTA TTAAGTGATGCTTTAGTC TCAG
pCIneo-EGFP- 3'UTR-Tram1	CAACTCCGGATAATGAAT TATAAACTAATTGATTAA TGTCCCC	ACCTGCGGCCGCGATTGA TTTCTCAATGTATAGTTC AGTATA
pCIneo-EGFP- 3'UTR-Ddx5	CAACTCCGGATAAGACTT TAGAAGTATATGTAAATG TCTG	ACCTGCGGCCGCTCACCT GTATCAATTCATTCTGACTC

2.1.7 siRNAs

Die in dieser Arbeit benutzten siRNAs (20nmol, HPP-grade) stammen von der Firma Qiagen, Hilden.

Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten siRNAs

siRNA	Zielsequenz 5'-3'	Referenz
Ddx5si A	AACCGCAACCATTGACGCCAT	Jalal <i>et al.</i> , 2007
Ddx5si B	GAGATTACACCTCACGCTG	Jalal <i>et al.</i> , 2007
Ddx5+17si	AAGGCTAGATGTGGAAGATGT	Jalal <i>et al.</i> , 2007
Upf1si	AAGATGCAGTTCCGCTCCATT	Mendell <i>et al.</i> , 2002
Upf2si	AAGGCTTTTGTCCCAGCCATC	Mendell <i>et al.</i> , 2002
Upf3si	AAGGAGAAGCGAGTAACCCTG	Kim <i>et al.</i> , 2005

2.1.8 Plasmide

Tabelle 11: Übersicht über die verwendeten Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
pEGFP-Upf1	Expressionsplasmid für Upf1, GFP-Fusionsprotein, RNAi resistente Form (Mendell <i>et al.</i> , 2002)	Prof. H. Dietz (Johns Hopkins University, Baltimore)
pCIneo-FLAG-Upf2	Expressionsplasmid für Upf2, FLAG-Fusionsprotein (Kunz <i>et al.</i> , 2006)	Dr. G. Neu-Yilik (Universität Heidelberg)
pCIneo-FLAG-Upf3A	Expressionsplasmid für Upf3A, FLAG-Fusionsprotein (Kunz <i>et al.</i> , 2006)	Dr. G. Neu-Yilik (Universität Heidelberg)
pCIneo-FLAG-Upf3B	Expressionsplasmid für Upf3B, FLAG-Fusionsprotein (Gehring <i>et al.</i> , 2003)	Dr. G. Neu-Yilik (Universität Heidelberg)
pCIneo-FLAG-Upf3B-1-270	Expressionsplasmid für Upf3B-1-270, FLAG-Fusionsprotein	diese Arbeit
pCIneo-FLAG-Upf3B-270-470	Expressionsplasmid für Upf3B-270-470, FLAG-Fusionsprotein	diese Arbeit
pCIneo-FLAG-Upf3B-145-470	Expressionsplasmid für Upf3B-145-470; FLAG-Fusionsprotein	diese Arbeit
pCIneo-FLAG-Upf3B-1-420	Expressionsplasmid für Upf3B-1-420; FLAG-Fusionsprotein	diese Arbeit

pCMV-p68WT	Expressionsplasmid für wt-p68 mit pCIneo-Insert mit KT3-Epitop	Doktorarbeit Carolin Jalal, 2005
pCMV-Ddx5-1-189-KT3	Expressionsplasmid für Ddx5-1-189, KT3-Fusionsprotein	Doktorarbeit Carolin Jalal, 2005
pCMV-Ddx5-190-614-KT3	Expressionsplasmid für Ddx5-190-614, KT3-Fusionsprotein	Doktorarbeit Carolin Jalal, 2005
pRTS-hygro	EBV-Episom zur Herstellung von induzierbaren, Protein exprimierenden Zelllinien	Professor D. Eick (Ludwig-Maximilians-Universität, München)
pRTS-pur	EBV-Episom zur Herstellung von induzierbaren miRNA transkribierenden Zelllinien	Professor D. Eick (Ludwig-Maximilians-Universität, München)
pRTS-hygro-Ddx5-WT-HA	EBV-Episom zur induzierbaren Transkription von Ddx5-WT, HA-Fusionsprotein	Diplomarbeit Thomas Tretter, 2008
pRTS-hygro-Ddx5-DQAD-HA	EBV-Episom zur induzierbaren Transkription von Ddx5-DQAD, HA-Fusionsprotein	Diplomarbeit Thomas Tretter, 2008
pRTS-hygro-Ddx5-GNT-HA	EBV-Episom zur induzierbaren Transkription von Ddx5-GNT, HA-Fusionsprotein	Diplomarbeit Thomas Tretter, 2008
pRTS-hygro-Ddx17₇₂-HA	EBV-Episom zur induzierbaren Transkription von Ddx17 ₇₂ , HA-Fusionsprotein	Diplomarbeit Camilla Broja, 2008
pRTS-hygro-Ddx17₈₂-HA	EBV-Episom zur induzierbaren Transkription von Ddx17 ₈₂ , HA-Fusionsprotein	Diplomarbeit Camilla Broja, 2008
pRTS-hygro-Ddx17-HA	EBV-Episom zur induzierbaren Transkription von Ddx17 (Ddx17 ₇₂ +Ddx17 ₈₂), HA-Fusionsprotein	Diplomarbeit Thomas Tretter, 2008
pCIneo-Renilla-Luziferase-β-globin-WT	Expressionsplasmid für Renilla-Luziferase- β -globin-WT; NMD-Assay (Boelz <i>et al.</i> , 2006)	Prof. A.E. Kulozik (Universität Heidelberg)
pCIneo-Renilla-Luziferase-β-globin-PTC	Expressionsplasmid für Renilla-Luziferase- β -globin-PTC; NMD-Assay (Boelz <i>et al.</i> , 2006)	Prof. A.E. Kulozik (Universität Heidelberg)
pCIneo-Firefly-Luziferase	Expressionsplasmid für Firefly-Luziferase; NMD-Assay (Boelz <i>et al.</i> , 2006)	Prof. A.E. Kulozik (Universität Heidelberg)

pCIneo-EGFP-3'UTR-Ddx17	Expressionsplasmid zur Transkription einer EGFP-3'UTR-Ddx17-mRNA	diese Arbeit
pCIneo-EGFP-3'UTR-Smg5	Expressionsplasmid zur Transkription einer EGFP-3'UTR-Smg5-mRNA	diese Arbeit
pCIneo-EGFP-3'UTR-Tram1	Expressionsplasmid zur Transkription einer EGFP-3'UTR-Tram1-mRNA	diese Arbeit
pCIneo-EGFP-3'UTR-Ddx5	Expressionsplasmid zur Transkription einer EGFP-3'UTR-Ddx5-mRNA	diese Arbeit

2.1.9 Bakterien

Der *E. coli*-Stamm DH5 α (Genotyp: supE44 Δ lacU169 (Φ 80 lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 end A1 gyrA96 thi-1 relA1; Hanahan 1983) wurde zur Vervielfältigung von Plasmiden verwendet.

2.1.10 Zelllinien

Für die vorliegende Dissertation wurden verschiedene etablierte Zelllinien verwendet.

HeLa-Zellen sind humane Epithelzellen eines Cervix-Karzinoms, die mit dem humanen Papillomvirus 18 transformiert wurden (Scherer *et al.*, 1953).

Die Zelllinie **H1299** stammt von menschlichen Lungen-Karzinomzellen und ist p53-defizient (Giaccone *et al.*, 1992). Sie wurde freundlicherweise von Professor D. Eick (Ludwig-Maximilians-Universität, München) zur Verfügung gestellt.

Die Zelllinie **COS1** stammt aus der Niere der grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) und geht aus der Zelllinie TC7 hervor. Sie wurde mit einer origin-defekten SV40-Mutante transformiert und produziert deshalb das große T-Antigen (Gluzman, 1981).

2.2 Methoden

Soweit nicht anders angegeben, entsprechen die in der Arbeit angewendeten molekularbiologischen Methoden den Standardverfahren nach Sambrook *et al.* (1989).

2.2.1 Methoden der Zellkultur

2.2.1.1 Kultivieren und Passagieren von Zelllinien

Zur Kultivierung der in 2.1.10 beschriebenen Zelllinien wurde DMEM mit 10% inaktiviertem FCS (60°C, 30 min) verwendet. Die adhärenenten Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ (COS1 und HeLa) bzw. 8% CO₂ (H1299) in Zellkulturflaschen kultiviert. Antibiotika wurden lediglich zur Selektion und zur Induktion der episomalen Expression (2.2.8) verwendet. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage nach Erreichen von circa 90% Konfluenz nach Waschen mit PBS pH 7,4 (16 g NaCl, 0,4 g KCl, 2,88 g Na₂HPO₄, 0,48 g KH₂PO₄, ad. 2 l H₂O bidest.) trypsinisiert (konz. oder 1:10 verdünnt) und in entsprechenden Verdünnungen (1:3 bis 1:10) neu ausgesät. Nach circa 20-30 Passagen wurden neue Zellen aufgetaut.

2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen eukaryontischer Zellen

Zum Einfrieren wurde das Medium aus der Kulturflasche entnommen und der Zellrasen mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Trypsinieren abgelöst und in 2 ml Medium ohne FCS + 30% DMSO resuspendiert. Je 1 ml wurde in beschriftete Einfrierkryoröhrchen gegeben und diese in eine Isopropanol gefüllte Einfrierbox für 24 h bei -80°C langsam runtergekühlt, bevor sie zur langfristigen Lagerung in Flüssigstickstofftanks überführt wurden. Zum Auftauen wurden die Zellen dem Tank mit flüssigem Stickstoff entnommen und in 1 ml Medium resuspendiert und nach zweimaligem Waschen mit Medium in 10 ml Medium aufgenommen und in Zellkulturschalen ausplattiert.

2.2.1.3 Transfektion eukaryontischer Zellen

Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen in der für den jeweiligen Versuch optimalen Zellzahl in 6-Well-Platten ($1,5 \cdot 10^5 - 4,5 \cdot 10^5$ Zellen) oder in 10 cm-Zellkulturschalen ($1 \cdot 10^6$) in Medium ausgesät. Zur Einbringung von Fremd-DNA in die Zelllinien wurde als Transfektionsreagenz jetPEITM (PEQLAB), X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent (Roche) oder Nanojuice® (Merck) eingesetzt. Zur Transfektion der Zellen mit siRNA wurde das Transfektionsreagenz INTERFERinTM (PEQLAB) verwendet.

a) Transfektion mit jetPEITM

Pro Transfektionsansatz wurden jeweils DNA und jetPEITM-Reagenz in eine 150 mM Natriumchlorid-Lösung gegeben und nach 10 sec vortexen mit der Tischzentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurde die jetPEITM-Lösung in den DNA-Ansatz gegeben und nach Vortexen und Abzentrifugieren, der Ansatz zur Komplexbildung 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsansatz tropfenweise in frisches Medium auf die zu transfizierenden Zellen gegeben.

Tabelle 12: Verwendete DNA- und jetPEITM-Mengen entsprechend der verwendeten Zellkulturschale.

Zellkultur- schale	X µl NaCl (150 mM)	X µg DNA	X µl jetPEI TM	Gesamt- reaktionsansatz
6er-Well	100	3	6	200
10 cm Schale	250	10	20	500

Zur Transfektion von H1299-Zellen mit dem episomalen, EBV-abgeleiteten Expressionssystem (2.2.8) wurden je 2 µl des Plasmids pRTS-pur und 2 µl des entsprechenden pRTS-hygro-Plasmids (pRTS-hygro-Ddx5_{WT-HA}, pRTS-hygro-Ddx5_{DQAD-HA} bzw. pRTS-hygro-Ddx5_{GNT-HA} bzw. pRTS-hygro-Ddx17_{HA}, pRTS-hygro-Ddx17_{72-HA} oder pRTS-hygro-Ddx17_{82-HA}) und 6 µl jetPEITM in insgesamt 200 µl 150 mM NaCl gemischt. Nach 16-18 Stunden wurde das Medium durch antibiotikahaltiges Selektionsmedium ersetzt.

b) Transfektion mit X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent

Zur Transfektion der EGFP-3'URT-Plasmide (2.2.9) wurden je 3 μl X-tremeGENE 9 und 1 μg Plasmid-DNA in 100 μl OptiMEM gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Dieser Ansatz wurde dann tropfenweise in 2 ml frisches Medium auf die Zellen gegeben. Die Zellernte erfolgte 72 h nach Transfektion. Zur RNA-Immunpräzipitation (RIP) der EGFP-3'UTR-Reporter-mRNAs wurden HeLa-Zellen in 10 cm-Schalen mit 15 μl X-tremeGENE 9 und 5 μg Plasmid-DNA in 500 μl OptiMEM transfiziert.

c) Transfektion mit Nanojuice®

Zur Transfektion eines 6er-Wells mit Nanojuice® wurden 0,5 μl Nanojuice Reagent und 0,5 μl Nanojuice Booster in 20 μl serumfreien Medium gemischt und mit 0,25 μg DNA vermischt (bei Transfektion mit 2 Plasmiden je 0,125 μg). Nach einer 15-minütigen Inkubation bei RT wurde der Transfektionsansatz tropfenweise zu den zu transfizierenden Zellen (in frischem Medium) gegeben und die Zellen nach 48 h ohne erneuten Medienwechsel für die indirekte Immunfluoreszenz (2.2.1.5) fixiert.

d) Transfektion mit INTERFERin™

Für einen siRNA-vermittelten Protein-Knockdown wurden je nach Experiment verschiedene Transfektionsansätze verwendet. Zur Transfektion eines 6er-Wells zum Knockdown von Ddx5, Ddx17, Upf1, Upf2, Upf3 oder Smg5 zur Analyse der Zellextrakte im Western Blot (2.2.4.3) oder zur Halbwertszeitbestimmung der *Ddx17*-mRNA (2.2.3.3) wurden 1 μl 2 μM siRNA und 4 μl INTERFERin™ in 200 μl OptiMEM gemischt und nach 15 minütiger Inkubation tropfenweise in 2 ml frisches Medium auf die Zellen gegeben. Diese Transfektion wurde nach 4 Stunden wiederholt. Die Zellernte erfolgt nach 48 h. Zur Transfektion eines 6er-Wells für den NMD-Assay (2.2.7) oder dem 3'UTR-Reporter-Assay (2.2.9) wurden 10 μl 20 μM siRNA und 15 μl INTERFERin™ in 800 μl OptiMEM gemischt, für 10 min bei RT inkubiert und danach direkt (ohne Medium) tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach 4 h wurde der Transfektionsansatz durch frisches Medium ersetzt.

2.2.1.4 Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Agenzien

a) Wortmannin-Behandlung von HeLa-Zellen

Zur Inhibition der Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K)-verwandten Kinase Smg1 wurden HeLa-Zellen mit Wortmannin (Walter *et al.*, 2000) behandelt. Wortmannin ist ein Stoffwechselprodukt aus dem Pilz *Penicillium fumiculosum*. HeLa-Zellen wurden mit 10 μM (in 0,5% DMSO) Wortmannin inkubiert. Die Zellen wurden 48 h nach Behandlung geerntet. Zur Kontrolle wurden mit 0,5% DMSO behandelte Zellen mitgeführt.

b) Actinomycin D Behandlung von HeLa-Zellen

Zur Analyse der mRNA-Halbwertszeit von Ddx17 wurden mit siRNA (Kontroll-, Ddx5-, Upf1- oder Upf3-siRNA) vorbehandelte HeLa-Zellen mit Actinomycin D (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), ein Hemmstoff der RNA-Transkription, inkubiert. Mittels quantitativer Real-Time RT-PCR (2.2.3.3) konnten die *Ddx17*-mRNA-Level zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 h, 3 h und 6 h) nach Actinomycin D Behandlung gemessen und verglichen werden.

c) Cycloheximide Behandlung von HeLa-Zellen

Zur Analyse der mRNA-Halbwertszeit von Ddx17 nach Inhibition der Translation wurden HeLa-Zellen gleichzeitig mit dem Translationsblocker Cycloheximide (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und Actinomycin D (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) behandelt und mit Hilfe der quantitativen Real-Time RT-PCR (2.2.3.3) die *Ddx17*-mRNA-Level zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt. Der Abbau der *Ddx17*-mRNA wurde im Vergleich zu nur mit Actinomycin D behandelten Zellen betrachtet.

2.2.1.5 Indirekte Immunfluoreszenz (IF)

Die indirekte Immunfluoreszenz wurde in dieser Arbeit zur subzellulären Lokalisierung bzw. zur Ko-Lokalisierung von Proteinen verwendet. Dazu wurden Zellen auf Deckgläschen in 6er-Wells herangezogen und transfiziert (2.2.1.3). 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit 3,7% Formaldehyd (v/v) in PBS fixiert (RT, 10 min) und zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 0,2% Triton X-100 (v/v) und 1% BSA (w/v) in PBS für

6 min zur Permeabilisierung der zellulären Membranen inkubiert und einmal mit PBS gewaschen. Mögliche unspezifische Bindungen wurden mit Blocking Puffer (2% BSA (w/v), 5% Glycerol (v/v), 0,2% Tween (v/v), 0,05% Natriumazid (w/v) in PBS) minimiert (RT, 20 min). Der primäre Antikörper, in Blocking Puffer verdünnt, wurde für eine Stunde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur auf den permeabilisierten Zellen inkubiert. Es folgten drei Waschschrte mit PBS, woraufhin der entsprechende Sekundäantikörper auf die fixierten Zellen gegeben wurde. Der sekundäre, Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Antikörper wurde ebenfalls bei Raumtemperatur für eine Stunde in der feuchten, dunklen Kammer inkubiert. Zum Anfärben der Kerne wurden die Zellen mit DAPI (0,5 mg/ml DAPI-Lösung in PBS (w/v)) inkubiert. Abschließend wurde das Deckgläschen zweimal mit PBS und zweimal mit H₂O bidest. gewaschen und in 10 µl Eindeckmedium der Firma Dianova (Hamburg) auf einem Objektträger eingedeckelt. Die Untersuchung der Präparate erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop und wurde elektronisch dokumentiert.

2.2.2 Molekularbiologische und genetische Methoden

2.2.2.1 Herstellung von kompetenten E.coli DH5α

Zur Herstellung von kompetenten E.coli DH5α wurden 20 ml Luria Bertani (LB)-Medium (10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, ad. 1 l H₂O bidest.) mit einer Kolonie DH5α von einer Stammplatte angeimpft und bei 37 °C über Nacht geschüttelt. Von dieser Übernachtskultur wurde 1 ml in 25 ml LB-Medium überführt und bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von 0,5-0,7 bei einer Wellenlänge von 600 nm inkubiert (2.2.2.3). Nach einer Zentrifugation (4 °C, 6 min, 6000 rpm) wurde das Pellet mit 8,5 ml TFP1-Lösung pH 5,8 (3 ml 1 M Kaliumacetat, 10 ml 1 M KCl, 1 ml 1 M CaCl₂, 12 ml Glycerol, 5 ml 10 M MnCl₂, ad. 100 ml H₂O bidest.) vorsichtig resuspendiert. Nach einer zehnminütigen Inkubationszeit auf Eis wurde erneut abzentrifugiert (4 °C, 6 min, 6000 rpm), der Überstand verworfen und die Zellen in 1 ml TFP2-Lösung pH 6,5 (1 ml 0,2 M MOPS, 10 ml 1 M KCl, 1,5 ml 1 M CaCl₂, 2,4 ml Glycerol, ad. 30 ml H₂O bidest.) gelöst. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen in Aliquots zu je 100 µl mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.2.2 Transformation von kompetenten E.coli DH5 α

Ein Aliquot kompetenter E.coli DH5 α (2.2.2.1) wurde langsam auf Eis aufgetaut und 100 ng Plasmid-DNA oder 10 μ l Ligationsansatz (2.2.2.12) zugegeben. Nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis erfolgte ein zweiminütiger Hitzeschock bei 42 °C. Danach wurden die Zellen sofort für mindestens eine Minute auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 500 μ l LB-Medium wurden die Bakterien bei 37 °C für eine Stunde geschüttelt, damit sich die Plasmid-vermittelte Antibiotikaresistenz ausbilden konnte. 100 μ l der Bakterien und das Restvolumen wurden auf je eine LB-Agarplatte (10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 16 g Agar-Agar, ad. 1 l H₂O bidest.) mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die gewachsenen Kolonien konnten dann für die Beimpfung von LB-Flüssigkulturen verwendet werden, um Plasmidpräparationen (2.2.2.7) durchzuführen.

2.2.2.3 Bestimmung der Bakterienkonzentration

Die optische Dichte (OD) von Bakteriensuspensionen wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm im linearen Bereich von OD_{600nm}=0,2-0,8 im Photometer gemessen. Als Referenzwert (Leerwert) diente das reine LB-Medium.

2.2.2.4 Bestimmung der Plasmid-DNA-Konzentration im Photometer

Um die Plasmid-DNA-Konzentration zu bestimmen, wurde die Plasmid-DNA in einer 1:50 Verdünnung mit TE-Puffer (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8,0) in UV-Küvetten im Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm vermessen. Der Nullabgleich erfolgte mit TE-Puffer. Aus der gemessenen Extinktion (μ g/ml) und dem Verdünnungsfaktor (1:50) konnte dann die Plasmid-DNA Konzentration (μ g/ μ l) berechnet werden ((Extinktion x 50)/1000).

2.2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA nach ihrer Größe wurden 1%-ige Agarose-Gele (0,8 g DNA-Agar, 80 ml H₂O bidest., 1,6 ml 50x TAE-Puffer) verwendet. Der aufgekochten Lösung wurden 6 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben und nach Abkühlen auf circa 70 °C in die abgedichtete Gelkammer mit Probenkamm gegossen. In die Probenfächer des mit 1x TAE-Puffer (aus 50x TAE pH 8,0: 242 g Tris-HCl, 18,6 g EDTA, 57,1 ml Essigsäure, ad. 1 l H₂O bidest.) überschichteten Gels wurde die Plasmid-DNA bzw. die Amplikons geladen und die DNA-Fragmente bei 8-10 V/cm aufgetrennt. Die DNA-Proben wurden hierzu 1:6 mit DNA-Ladepuffer (3,5 ml Glycerin, 0,5 ml EDTA pH 8,0, 0,05% Bromphenolblau (w/v), 0,05% Xylencyanol (w/v)) versetzt. Die Detektion der DNA-Banden erfolgt unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 302 nm. Als DNA-Standard wurde der *Hyper Ladder I* der Firma Bioline (Luckenwalde) verwendet.

2.2.2.6 Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Für die Isolation von DNA-Fragmenten nach Auftrennung in der Agarose-Gelelektrophorese (2.2.2.5) wurde das „QIAquick Gel Extraction Kit Pro“ (Tabelle 5) nach Angaben des Herstellers verwendet. Nach Ausschneiden der DNA-Bande aus dem Agarosegel unter UV-Licht mit einem Skalpell, wurde das Gelstück in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und pro 100 mg Gel 100 µl Puffer QG zugegeben. Durch Inkubation bei 50 °C im Heizblock wurde das Gelstück gelöst. Die erhaltene Lösung wurde danach auf die Säule („QIAquick column“) gegeben. Durch Zentrifugation (RT, 1 min, 10000 rpm) wurde die DNA an die Anionenaustauschermatrix gebunden. Der durchgeflossene Überstand wurde verworfen und die restliche Agarose durch Zugabe von 500 µl Puffer QG gewaschen (RT, 1 min, 10000 rpm). Zum Entfernen restlicher Salze wurden 750 µl Puffer PE auf die Säule gegeben und nach einer fünfminütigen Inkubation abzentrifugiert (RT, 1 min, 10000 rpm) und der Durchfluss ebenfalls verworfen. Durch eine erneute Zentrifugation (RT, 1 min, 10000 rpm) wurden letzte Reste des PE-Puffers entfernt. Abschließend wurde die DNA mit 30-50 µl sterilem H₂O bidest. eluiert.

2.2.2.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

2 ml LB-Medium (Minipräp) wurden mit einzelnen Bakterienkolonien von LB-Agarplatten mit Hilfe eines Zahnstochers oder eine Impföse angeimpft bzw. wurden 50 ml LB-Medium (Midipräp) mit dem entsprechenden Antibiotikum mit 500 µl Transformationsansatz (2.2.2.2) beimpft und über Nacht kultiviert. Zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus Übernachtskulturen wurden entsprechende Mini- oder Midipräparation Kits entsprechenden den Herstellerangaben verwendet. (Miniprep: „Invisorb Spin Plasmid Mini Two-Kits“, Invitex; Midiprep: Jetstar 2.0 Plasmid Purification Midi Kit, Genomed; Tabelle 5).

2.2.2.8 Restriktion mit Endonukleasen

Die Restriktion von DNA erfolgte mit 10 U Restriktionsenzym in einem Volumen von 10 bis 20 µl und dauerte in Abhängigkeit von der Restriktionseffizienz des Enzyms 60 min bis 16 Stunden (Puffersystem und Restriktionstemperatur nach Angaben des Herstellers).

2.2.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Vermehrung von DNA-Fragmenten

a) FLAG-Upf3B-Deletionsmutanten

Um bestimmte Sequenzbereiche der cDNA von Upf3B in den Vektor pCIneo-FLAG zu klonieren, wurde die cDNA von dem Ausgangsplasmid pCIneo-FLAG-Upf3B mit entsprechenden Primern amplifiziert und anschließend mit XhoI und SalI verdaut. Die XhoI- und SalI-Restriktionsschnittstellen wurden mit den verwendeten Primern angefügt. Die Durchführung der Amplifikation erfolgte mit dem „KAPA2G Robust PCR Kit“ nach Angaben des Herstellers Peylab Biotechnologie (Erlangen).

Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes mit einem Gesamtvolumen von 25 μl und die Reaktionsbedingungen sind im Folgenden zusammengestellt:

Reaktionsansatz:

100 ng	Vektor-DNA
2 μl	forward Primer (10mM)
2 μl	reverse Primer (10mM)
0,5 μl	dNTPs (10mM)
5 μl	Puffer B
0,2 μl	Kappa Robust Polymerase
ad. 25 μl	H ₂ O bidest.
<hr/>	
25 μl	Gesamtvolumen

PCR-Programm:

95 °C 1 min	
95 °C 30 s	} 35 Zyklen
58 °C 1,5 min	
72 °C 1 min	
72 °C 10 min	
22 °C ÜN	

b) pCIneo-EGFP-3'UTR-Konstrukte

Um die spezifischen 3'UTRs von Ddx17, Ddx5, Smg5 oder Tram1 in einen pCIneo-EGFP-Vektor zu klonieren, wurde die cDNA einer Total-RNA-Präparation (2.2.3.1 und 2.2.3.2) in der PCR als Ausgangstemplate verwendet. Mit entsprechenden Primern wurden die spezifischen 3'UTRs amplifiziert und anschließend mit BspEI und NotI verdaut. Die Durchführung der Amplifikation erfolgte mit dem „Kappa HiFi PCR Kit“ nach Angaben des Herstellers Peylab Biotechnologie (Erlangen).

Die Zusammensetzung des Restriktionsansatzes und die Reaktionsbedingungen sind im Folgenden zusammengestellt:

Reaktionsansatz:

2 μ l	cDNA
0,75 μ l	forward Primer (10mM)
0,75 μ l	reverse Primer (10mM)
0,75 μ l	dNTPs (10mM)
5 μ l	Puffer HiFi Kappa
0,5 μ l	HiFi Kappa Polymerase
ad. 25 μ l	H ₂ O bidest.
<hr/>	
25 μ l	Gesamtvolumen

PCR-Programm:

95 °C 5 min	
98 °C 20 s	} 35 Zyklen
52 °C 15 s +0,1 °C/Zyklus	
72 °C 1 min 20 s	
72 °C 3 min	
22 °C ÜN	

Die notwendigen forward und reverse-Primer können Tabelle 9 entnommen werden.

2.2.2.10 Natrium-Acetat-Ethanol-Fällung von DNA-Fragmenten

In einem ersten Schritt wurden ein Volumen H₂O bidest., ein Zehntel Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 2,5 Volumen 100%-igem Ethanol zum Ansatz gegeben und gemischt. Die Proben wurden für 1 h bei -20 °C inkubiert und anschließend die DNA pelletiert (4 °C, 30 min, 10000 rpm). Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 400 μ l 70%-igem Ethanol gewaschen (RT, 5 min, 10000 rpm). Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet getrocknet und in 50 μ l H₂O bidest. gelöst.

2.2.2.11 Dephosphorylierung von linearisierter Plasmid-DNA

Die 5'-Phosphatgruppen von linearisierter (2.2.2.8) Plasmid-DNA wurden durch Inkubation mit der alkalischen Phosphatase aus Shrimps (SAP) für 2 h bei 37°C abgespalten, um eine Religation des Vektors zu verhindern und so die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Ligation (2.2.2.12) des gewünschten DNA-Fragments in den Vektor zu erhöhen. Das Enzym SAP wurde anschließend durch eine 15-minütige Inkubation bei 65°C deaktiviert.

2.2.2.12 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei einem Ligationsansatz von 20 µl wurden Vektor und DNA-Insert im Verhältnis 1:3-1:6 sowie 2 µl T4-DNA-Ligase (5U/µl) und 2 µl 10x T4-DNA-Ligasepuffer eingesetzt. Der komplette Ansatz wurde über Nacht im klimatisierten Raum bei ca. 19°C inkubiert und davon 10 µl für eine Transformation (2.2.2.2) eingesetzt.

2.2.2.13 Sequenzierung

Die in dieser Arbeit hergestellten DNA-Plasmide wurden durch Dr. Klein (Institut für Immunologie und Genetik, 67613 Kaiserslautern, Postfach 2565) sequenziert und anschließend mit Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) auf Sequenzrichtigkeit unter Zuhilfenahme von Vergleichssequenzdaten überprüft.

2.2.3 Methoden zur RNA-Untersuchung

2.2.3.1 RNA-Isolation

Zur RNA-Isolation wurde das „RNeasy Mini Kit“ von QIAGEN verwendet. Die Zellen wurden zuerst lysiert und homogenisiert, die RNA anschließend an eine Silikamembran gebunden und gewaschen und letztendlich mit einem Elutionspuffer von der Membran eluiert. Die Isolierung von Total-RNA wurde dabei gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurden die mit 1x PBS gewaschenen Zellen eines 6er-Wells in 1x PBS aufgenommen, zentrifugiert (4 °C, 5 min, 2000 rpm) und das Zellpellet ($<5 \times 10^6$ Zellen) in 350 μ l RLT-Puffer resuspendiert und mit Hilfe einer Hohnadel (Durchmesser 0,9 mm) sorgfältig homogenisiert. Nach Zugabe von 350 μ l 70% Ethanol (v/v in DEPC) wurde die RNeasy Säule beladen und bei 10 000 rpm für 15 s zentrifugiert. Es folgten mehrere Waschschrirte (2x 500 μ l RPE, 10 000 rpm, 1x 15 s und 1x 2 min). Um die Säule vollständig zu trocknen wurde nochmals bei 14 000 rpm für 2 min zentrifugiert. Die Elution der RNA erfolgte dann mit 30 μ l RNase-freiem Wasser (10 000 rpm, 1 min). Die isolierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.3.2 Reverse Transkription (RT)

Die isolierte Total-RNA (2.2.3.1) wurde mit Hilfe des „Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit“ in cDNA umgeschrieben. Zuvor wurde die isolierte RNA mit DNase I (Fermentas) verdaut, um Verunreinigungen mit DNA zu eliminieren. Zu 1 μ g Total-RNA wurden 1 μ l DNase I und 1 μ l 10x DNase I-Puffer mit $MgCl_2$ gegeben (ad. x μ l RNase-freies H_2O , Gesamtvolumen 8,4 μ l) und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Der DNase I-Verdau wurde durch Zugabe von 1 μ l EDTA (25 mM) und einer 15-minütigen Inkubation bei 65 °C abgestoppt. Zur Amplifikation wurden Random Hexamer Primer, eine Mischung aus einzelsträngigen Hexanukleotiden zufälliger Sequenz mit 3'-Hydroxyenden, die an die mRNAs binden, eingesetzt. Der Mix aus RNA und Random Hexamer Primern wurde 10 min bei 65 °C denaturiert, für 5 min auf Eis abgekühlt.

Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes mit einem Gesamtvolumen von 20 μl und die Reaktionsbedingungen sind im Folgenden zusammengestellt:

RT-Reaktionsansatz:

11,4 μl	DNase I verdaute RNA + Random Hexamer Primer Mix
4 μl	5x RT-Reaktionspuffer
0,5 μl	RNase Inhibitor (40U/ μl)
2 μl	dNTP Mix (10mM)
1 μl	DTT (0,1M)
1,1 μl	Reverse Transkriptase (20U/ μl)
<hr/>	
20 μl	Gesamtvolumen

Reaktionsbedingungen:

10 min 29 °C

60 min 48 °C

5 min 85 °C

Eis

Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.3.3 Quantitative Real-Time RT-PCR

Um Rückschlüsse auf die zelluläre Menge einer bestimmten mRNA ziehen zu können, wurde mit der cDNA (2.2.3.2) der zu untersuchenden Probe eine quantitative Real-Time RT-PCR durchgeführt. Die verwendete Real-Time TaqManTM PCR-Technologie basiert auf dem Prinzip einer Standard-PCR, ist aber kombiniert mit der Aussendung von fluoreszierenden Lichtsignalen, wobei die Menge der Lichtsignale mit der Menge der amplifizierten DNA korreliert. Hierbei werden spezifische Primer sowie eine spezifische Sonde (TaqMan-Sonde), die am 5'-Ende einen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (hier FAM) und am 3'-Ende einen Quencher (hier TAMRA) besitzt, verwendet. Bei Anregung der intakten Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge von 488 nm wird die Fluo-

reszenz des Reporter-Floureszenzfarbstoffs aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher durch das Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers (FRET; Förster 1948) unterdrückt. Lagern sich aber sowohl die Primer wie auch die Sonde während der PCR an die cDNA an und kommt es zur Elongation der DNA, trifft die Taq-Polymerase, die zusätzlich zur Polymeraseaktivität eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität besitzt, auf die angelagerte Sonde und beginnt sie zu verdrängen. Durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase wird die Sonde während der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende abgebaut und die räumliche Nähe - und somit auch der FRET - zwischen Reporter und Quencher aufgehoben. Die Fluoreszenz des Reporters steigt dadurch während der exponentiellen Phase der PCR direkt proportional zur Menge des entstehenden PCR-Produktes mit jedem PCR-Zyklus an. Die Menge des Amplifikats ist wiederum proportional zur Menge des eingesetzten Templates (Huggett *et al.*, 2005; Nolan *et al.*, 2006). Da nur 100%-ig gebundene Sonden verdrängt und durch die Taq-Polymerase hydrolysiert werden, ist das gemessene Signal sequenzspezifisch. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgt mit Hilfe des 7500 Fast Real-Time PCR Systems von Applied Biosystems; eine gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate ist nicht mehr erforderlich. Die eingesetzten, spezifischen Primer und Sonden wurden als TaqMan Genexpressions-Assays von der Firma Applied Biosystems bezogen (Ddx17: HS 00978019_m1, 18S rRNA: HS99999901_s1, Smg5: HS 00383399_m1, GAPDH: HS02758991_g1). Die Sequenzen für die EGFP-spezifischen TaqMan Sonde und die Primer wurden der Publikation Parsley *et al.* (2002) entnommen (Sonde: 5'-FAM-AAAGACCCCAACGAGAAGCGCGA-TAMRA-3', im Assay 100 nM; forward Primer: 5'-CTGCTGCCCCGACAACCA-3'; reverse Primer: 5'-GAACTCCAGCAGGACCATGTG-3', im Assay 200 nM).

Zur Durchführung der Real-time RT-PCR wurde der cDNA-Ansatz jeder Probe (mit einem Volumen von 20 µl) mit 20 µl PCR-H₂O verdünnt und davon je 1 µl als Template eingesetzt. Jede Probe wurde dreifach bestimmt.

Die detaillierte Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist nachfolgend aufgeführt:

Reaktionsansatz:

1 μ l cDNA

10 μ l TaqMan Fast Advanced Master Mix

1 μ l TaqMan-Gene Expression Assay bzw. EGFP-Primer-Sonden-Mix

8 μ l PCR-H₂O

20 μ l Gesamtvolumen

Die Auswertung der Real-time RT-PCR erfolgte mit der vergleichenden $\Delta\Delta$ CT-Methode (Livak und Schmittgen, 2001). Hierbei wird von jeder Probe der sogenannte CT-Wert (Threshold Cycle = Schwellenwert-Zyklus) verwendet. Dieser Wert beschreibt denjenigen PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Je niedriger der CT-Wert, desto mehr Kopien der Zielsequenz lagen in der entsprechenden Probe vor. Aus den CT-Werten einer cDNA-Sequenz in verschiedenen Proben kann die relative Expression der entsprechenden mRNA-Sequenz berechnet werden. In der vorliegenden Arbeit wird bei den verwendeten Proben zwischen Testproben (experimentell beeinflusste Probe, bei der die Abweichung der Expressionsrate des Zielgens gemessen werden soll) und Kontrollproben (experimentell unbeeinflusste Probe, die als Bezug für die Testprobe dient) unterschieden. Die untersuchten Gene werden als Zielgene (hier *Ddx17*, *Smg5* oder EGFP-3'UTR-Reportergen) bezeichnet und die Gene, mit deren Hilfe die Expressionsrate des Zielgens normalisiert wird als Referenzmolekül. Es wurden Referenzmoleküle verwendet, deren Expression nur wenig von äußeren Bedingungen abhängt (Radonic *et al.*, 2004; Weisser *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005). Als nicht regulierte endogene Referenz-mRNA wurde in den Genexpressionsversuchen das „Haushaltsgen“ GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) verwendet. Zur Bestimmung der Halbwertszeit der *Ddx17*-mRNA wurde als Referenzmolekül die 18S rRNA gewählt. Man benötigt ein Referenzmolekül, um Ungenauigkeiten bei der Ausgangsmenge der eingesetzten DNA auszugleichen, was als ‚Normalisierung‘ bezeichnet wird. Zur Normalisierung des Zielgens wurden zunächst die gemittelten (aus einer Dreifachbestimmung) CT-Werte des Zielgens gegen die gemittelten CT-Werte eines Referenzmoleküls in der jeweils gleichen Probe unter Verwendung nachfolgender Formel verrechnet:

$$\Delta CT = CT \text{ Zielgen} - CT \text{ Referenzmolekül}$$

Danach erfolgte die Berechnung der Expressionsrate des Zielgens in der Testprobe im Vergleich zur Expressionsrate des gleichen Zielgens in der entsprechenden Kontrollprobe mit Hilfe folgender Formel:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ Testprobe} - \Delta CT \text{ Kontrollprobe}$$

Die Unterschiede in der Genexpression in der Testprobe im Vergleich zur Expression in den Kontrollproben wurden mit folgender Formel berechnet:

$$FC = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Das Ergebnis wird als sogenannter „Fold Change“ (FC) dargestellt. Darunter versteht man die normalisierte Expressionsrate des Zielgens in der Testprobe (nach z.B. Transfektion mit spezifischen siRNAs) als Vielfaches der normalisierten Expressionsrate des Zielgens in der Kontrollprobe (Kontroll-siRNA). Ein FC von 2 bedeutet, dass in der Testprobe doppelt so viele Kopien der mRNA des Zielgens vorliegen wie in der Kontrollprobe. Ein FC von 0,5 drückt dagegen aus, dass in der Testprobe nur halb so viele Kopien an mRNA des Zielgens vorhanden sind wie in der korrespondierenden Kontrollprobe.

2.2.4 Methoden zur Protein-Untersuchung

2.2.4.1 Herstellung von Zellextrakten

a) für die Ko-Immunpräzipitation mit endogenen Proteinen (2.2.5)

Zur Herstellung der Zellextrakte für die Ko-Immunpräzipitation (Ko-IP) mit endogenen Proteinen wurden subkonfluente Zellen aus 4 Zellkulturschalen vereinigt. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit Hilfe eines sterilen Zellkulturschabers in 1 ml PBS abgelöst und pelletiert (4 °C, 5 min, 2000 rpm). Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in 1 ml Niedrig-Salz-Puffer

(LSB) pH 8,6 (20 mM HEPES-NaOH pH 7,5, 10 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, ad. 100 ml H₂O bidest.) resuspendiert und eine Minute auf Eis inkubiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (4 °C, 3 min, 3000 rpm) und dem Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in Lysepuffer (1125 µl LSB pH 8,6; 50 µl Complete Protease Inhibitor EDTA-frei, 100 µl 5% NP40 (v/v), 50 µl 5% Na-Desoxycholat (v/v), 13,25 µl PMSF (100 mM Stammlösung), 30 µl Natriumvanadate (100 mM Stammlösung)) aufgenommen und 30 sec durch starkes Vortexen gemischt. Danach wurden die unlöslichen Kernbestandteile abzentrifugiert (4 °C, 10 min, 14000 rpm) und der Überstand nach einem Präclearing für die Ko-IP verwendet. Für das Präclearing wurde Protein-A-Sepharose (PAS) (50% Bettvolumen) dreimal mit LSB gewaschen und danach der Zellextrakt mit 30 µl PAS inkubiert, um unspezifische Proteinbindungen zu eliminieren. Nach einer Inkubation für 10 min auf Eis wurde die PAS durch Zentrifugation abgetrennt und 15 µl zytosolischer Extrakt vom Überstand abgenommen und mit 15 µl 2 x SDS-Probenpuffer mit 200 mM DTT versetzt und 5 min bei 95 °C aufgeköcht, um als Vor-IP-Kontrolle (Input) zu dienen. Der restliche Zellextrakt wurde für die Ko-IP eingesetzt.

b) für die Ko-Immunpräzipitation mit exogenen Proteinen (2.2.5)

Zur Herstellung der Zellextrakte für die Ko-IP mit exogenen Proteinen wurden subkonfluente, transfizierte Zellen (2.2.1.3) aus drei 6er-Wells vereinigt. Die Aufarbeitung der Zellen erfolgte nach dem in a) beschriebenen Protokoll für endogene Proteine.

c) für die RNA-Immunpräzipitation (RIP) exogener mRNA (2.2.6)

Zur Herstellung der Zellextrakte für die RIP mit exogener mRNA wurden je Konstrukt 2 Schalen subkonfluente, transfizierte Zellen (pCIneo-EGFP-3'UTR-Smg5 oder -Tram1; 2.2.1.3) in 650 µl Lysepuffer (Ansatz für 2 Konstrukte: 1125 µl LSB pH 8,6; 50 µl Complete Protease Inhibitor EDTA-frei, 100 µl 5% NP40 (v/v), 50 µl 5% Na-Desoxycholat (v/v), 13,25 µl PMSF (100 mM Stammlösung), 30 µl Natriumvanadate (100 mM Stammlösung), 6 µl RiboLock RNase Inhibitor) resuspendiert, 30 s gevortext, 5 min auf Eis inkubiert, abzentrifugiert (4 °C, 10 min, 14000 rpm) und 300 µl des Überstandes nach einem Präclearing für die RIP verwendet. Aus 30 µl des Überstandes wurden zur Analyse der zellulären Gesamtmenge der Reporter-mRNAs die RNA isoliert (2.2.3.1).

d) zur Protein-Analyse im Western Blot (2.2.4.3)

Das Medium wurde abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines sterilen Zellschabers in 1 ml PBS abgelöst und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und sofort auf Eis gestellt. Die abzentrifugierten Zellen (4 °C, 5 min, 2000 rpm) wurden danach entsprechend der Pelletgröße in 100-250 µl 2x SDS-Probenpuffer (8 ml 250 mM TrisCl pH 6,8, 8 ml 10% SDS, 4 ml Glycerol und 0,05% (w/v) Bromphenolblau) mit 200 mM DTT lysiert. Die Zellextrakte wurden dann bei ständiger Kühlung im Eisbad für 15 sec kontinuierlich beschallt und die Proteine sofort bei 95 °C für 5 min im Heizblock denaturiert. Die Zellextrakte wurden dann bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.4.2 SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE)

Mit der SDS-Polyacrylamid Gel Elektrophorese werden Proteine nach ihrer molekularen Masse aufgetrennt. Die Proteinproben wurden dazu vorher bei 95 °C in 2x SDS-Probenpuffer mit 200 mM DTT bei 95 °C für 5 min im Heizblock denaturiert und bei ständiger Kühlung im Eisbad für 15 sec kontinuierlich beschallt und so die Sekundär- und Tertiärstrukturen aufgelöst. Die Disulfidbrücken werden durch Dithiothreitol (DTT) reduziert. Das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) verstärkt die negative Eigenladung der Proteine. Die denaturierten Proben wurden auf ein Polyacrylamidgel geladen. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung im 1x SDS-Laufpuffer (4x SDS-Laufpuffer pH 8,3: 24,2 g Tris-HCl, 115,3 g Glycin, 4 g SDS, ad. 1 l H₂O bidest.) wurden die Proteinproben zuerst bei 20 mA im 5% Sammelgel (für 2 Gele: 2,5 ml 250 mM TrisCl pH 6,8, 250 µl 2% SDS (w/v), 830 µl 30% Acrylamid/Bisacrylamid, 50 µl 10% APS (w/v), 1,365 ml H₂O bidest., 5 µl TEMED) und danach bei 30 mA im Trenngel aufgetrennt. Die Prozentigkeit des Trenngel (Tabelle 13) richtete sich nach der molekularen Masse der zu untersuchenden Proteine.

Als Größenmarker wurden der *prestained protein molecular weight marker* von der Firma Fermentas (St.Leon-Rot) oder der *HyperPAGE prestained protein marker* der Firma Bioline (Luckenwalde) verwendet.

Tabelle 13: Zusammensetzung der verwendeten Trenngele (für 2 Gele)

Substanz	7,50%	10%	12,50%	15%
750 mM Tris-Cl pH8,8	5 ml	5 ml	5 ml	4,75 ml
10% SDS (w/v)	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
30% Acrylamid/Bisacrylamid	2,5 ml	3,33 ml	4,16 ml	5 ml
10% APS (w/v)	140 µl	140 µl	140 µl	140 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
H ₂ O bidest	2,25 ml	1,33 ml	0,59 ml	-

2.2.4.3 Western Blot und Proteinnachweis mittels Chemilumineszenz

Mit Hilfe eines Western Blots lassen sich immobilisierte Proteine immunologisch nachweisen. Dazu wurden in der SDS-PAGE (2.2.4.2) aufgetrennte Proteine auf eine Trägermembran (PVDF-Membran) übertragen. Die PVDF-Membran wurde zuvor mit Methanol aktiviert und in Transferpuffer (2,9 g Glycin, 5,8 g Tris-HCl, 0,37 g SDS, 200 ml Methanol, ad. 1 l H₂O bidest.) rehydriert. Die Übertragung erfolgte durch ein senkrecht angelegtes, elektrisches Feld im Tankblotverfahren bei einer Stromstärke von 400 mA für etwa ein bis zwei Stunden in Western Blot Transferpuffer. Danach wurden die unspezifischen, proteinfreien Bindestellen mit 10% Milchpulver in TBS-T (100 ml 10x TBS pH 7,5, 1 ml Tween® 20, ad. 1 l bidest. H₂O; 10x TBS pH 7,5: 24,2 g Tris-HCl, 87,66 g NaCl, ad. 1 l H₂O bidest.) für 30 min abgesättigt. Die nachfolgende Inkubation mit einem Primärantikörper (Tabelle 6) variierte zwischen einer Stunde bei Raumtemperatur bis zu 16 h bei 4 °C. Ungebundene Antikörper wurden mit TBS-T 5x 5 min schüttelnd bei RT gewaschen. Der Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper (Tabelle 7) wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die ungebundenen Sekundärantikörper wurden ebenfalls mit TBS-T entfernt (5x 3 min, RT). Der spezifische Proteinnachweis erfolgte mittels Chemolumineszenz mit dem *Lumi-Light Western Blotting Substrate* der Firma Roche (Mannheim) oder mit dem *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* von GE Healthcare (Uppsala, Schweden). Das Substrat Luminol oxidiert dabei die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase, so dass die Detektion durch das „*ChemiDoc*

XRS“ Dokumentationssystem von Bio-Rad Laboratories GmbH (München) ermöglicht wurde. Nach Aufnahme der Proteinbanden mit dem „*ChemiDoc XRS*“-System war eine quantitative Auswertung mit der Software „*Quantity One 4.6.7*“ von Bio-Rad Laboratories GmbH (München) möglich. Sollten mehrere Proteine auf einer Membran nachgewiesen werden, wurde die Peroxidase des Sekundärantikörpers durch eine 15-minütige Inkubation in einer 0,02%-igen Natriumazid-Lösung (w/v) in H₂O bei Raumtemperatur zerstört. Nach Entfernen des Natriumazids durch einen Waschschrift (5 min mit TBS-T bei RT) konnte die Membran mit einem weiteren primären Antikörper inkubiert werden.

2.2.5 Ko-Immunitpräzipitation (Ko-IP)

Die Ko-Immunitpräzipitation ist eine Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen. Sie basiert auf der Eigenschaft des Protein A aus *Staphylococcus aureus* mit hoher Affinität die konstante Region (Fc-Region) von Immunitglobulinen zu binden. Durch die Kopplung von Protein A an Sepharose-Beads und anschließende Bindung von Immunitglobulinen an Protein A erhält man Protein-A-Sepharose-Antikörper-Komplexe, die in der Lage sind aus einem Zellproteingemisch ein bestimmtes Protein zu präzipitieren. Liegt dieses präzipitierte Protein in Interaktion mit anderen Proteinen vor, sollten diese Interaktionspartner ebenfalls mit gebunden werden. Die gebundenen Proteine werden nach mehreren Waschschriften durch Denaturierung von den Beads gelöst, in der SDS-PAGE (2.2.4.2) nach ihrer molekularen Masse aufgetrennt und im Western Blot (2.2.4.3) nachgewiesen.

a) Ko-Immunitpräzipitation von endogenen Proteinen

Zur Herstellung der Protein-A-Sepharose-Antikörper-Komplexe (PAS-AK) wurden 30 µl gequollene PAS mit 300 µl NET-Puffer 300 (6,1 g TrisCl pH 7,5 (50 mM), 17,52 g NaCl (300 mM), 1,86 g EDTA (5 mM), 500 µl Igepal (0,05%), ad. 1 l H₂O bidest.) gewaschen (RT, 1 min, 5000 rpm). Das Pellet wurde dann in 250 µl NET-Puffer 300 resuspendiert und der entsprechende Antikörper für 3 h bei 4 °C rollend daran gebunden. Von den Antikörpern C10 und PAb101 wurden jeweils 10 µg an PAS gekoppelt. Anschließend wurden die Immunitkomplexe jeweils für 5 min bei Raumtemperatur gewaschen: zweimal mit 300 µl NET-Puffer 300, einmal mit 300 µl NET-Puffer 500 (6,1 g TrisCl pH 7,5 (50 mM),

29,25 g NaCl (500 mM), 1,86 g EDTA (5 mM), 500 μ l Igepal (0,05%), ad. 1 l H₂O bidest.) und zweimal mit 300 μ l LSB, jeweils für 5 min bei RT gefolgt von einer Zentrifugation (4 °C, 1 min, 8000 rpm). Im nächsten Schritt wurden 300 μ l Zellextraktlösung (2.2.4.1) nach Präclearing mit den PAS-AK-Komplexen über Nacht bei 4 °C rollend inkubiert. Mit je 300 μ l Waschpuffer (LSB mit 5% NP40 (v/v)) wurden unspezifisch gebundene Proteine gewaschen (5x 5 min, 4 °C, rollend). Das Pellet aus PAS-AK und präzipitierten Proteinen wurde in 24 μ l 2x SDS-Probenpuffer mit 6 μ l 1 M DTT aufgenommen und für 5 min bei 95 °C und 1200 rpm im Heizblock inkubiert. Der gewonnene Überstand (RT, 1 min, 8000 rpm) wurde auf ein SDS-Gel (2.2.4.2) aufgetragen und die Proteine nach ihrer molekularen Masse aufgetrennt und im Western Blot mit spezifischen Antikörpern detektiert (2.2.4.3). Um die Salzstabilität der Proteininteraktionen zu untersuchen, wurden in einigen Experimenten zusätzlich 250 mM NaCl zu den Zellextrakten und in den Waschpuffer gegeben. Um auszuschließen, dass die gefundene Interaktion unspezifisch über RNA vermittelt wird, wurde bei den meisten Versuchen 20 μ g Ribonuklease A (RNase A) zu den Zellextrakten gegeben.

b) Ko-Immunpräzipitation mit exogenen Proteinen

Für die Ko-Immunpräzipitation mit exogenen Proteinen (EGFP-, FLAG- bzw. HA-Fusionsproteine) wurde zu den hergestellten Zellextraktüberständen (2.2.4.1) 5 μ g des entsprechenden Tag-spezifischen Antikörpers (EGFP-, FLAG- oder HA-Antikörper) gegeben. Zur besseren Kopplung dieser Maus-AK an die PAS wurde in diesen Experimenten ein Kaninchen- α -Maus-IgG-AK verwendet. Er bindet stärker an die PAS als die verwendeten Tag-spezifischen AK. Die Tag-spezifischen Antikörper wurden also über den Kaninchen- α -Maus-IgG-AK an die PAS gebunden. Dazu wurden 5 μ g Kaninchen- α -Maus-AK an 30 μ l PAS (50% Bettvolumen) gebunden (3-4 h, 4 °C). Nach dieser Kopplung wurde der PAS-Kaninchen- α -Maus-IgG-AK-Komplex mit 500 μ l LSB gewaschen und anschließend mit dem, mit dem Tag-spezifischen Antikörper, versetzten Zellextraktüberstand über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die nachfolgenden Schritte entsprachen dem in a) beschriebenen Protokoll für endogene Proteine.

c) Pulldown-Assay

FLAG-getaggtetes Upf3B wurde in HeLa-Zellen überexprimiert und dann über Nacht bei 4 °C mit PAS-Kaninchen- α -Maus-IgG-FLAG-Komplexen inkubiert, um als Fängerprote-

in im Pull-down-Assay zudienen. KT3-getaggte Ddx5-Deletionmutanten (KT3-Ddx5-₁₋₁₈₉ oder KT3-Ddx5-₁₉₀₋₆₁₄) wurden nach Überexpression als Beuteprotein für 4 h mit dem an FLAG-Antikörpern gebundenen FLAG-Upf3B inkubiert. Die nachfolgenden Schritte entsprachen dem in a) beschriebenen Protokoll.

2.2.6 RNA-Immunpräzipitation (RIP)

Mit der Methode der RNA-Immunpräzipitation (RIP), die eine Immunpräzipitation mit einer RNA-Extraktion kombiniert, können mRNAs und Proteinen in mRNP-Komplexen nachgewiesen werden. Zur Präzipitation von Ddx5 und an Ddx5 spezifisch gebundene mRNAs wurde eine Ko-IP entsprechend dem in Absatz 2.2.5 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Zum Schutz der RNA wurde die RIP in Anwesenheit des RiboLock RNase Inhibitors durchgeführt.

Nach Inkubation der mit EGFP-spezifischen Antikörper gekoppelten PAS mit den entsprechenden Zellextrakten und 3 µl RiboLock RNase Inhibitor über Nacht bei 4 °C wurden die Protein-PAS-Komplexe zum Entfernen unspezifisch gebundener Proteine sechsmal für 5min rollend bei 4 °C mit 500 µl NT2-Puffer (50 mM Tris pH 7,4, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ und 0,05% NP-40) gewaschen. Nach dem Waschen der Immunpellets wurden die präzipitierten mRNP- Komplexe vom Antikörper eluiert. Zur Elution wurde ein antigens Peptid (Peptid 945; KAAPMIGYPMPTGYSQ) verwendet, das theoretisch nur an Immunglobuline gekoppelte Ddx5-RNA-Komplexe kompetitiv löst; unspezifisch gebundene Komponenten sollten an der PAS gebunden bleiben. Hierzu wurden 200 µl einer Peptidlösung (2 mg Peptid in 200 µl NT2-Puffer + 3 µl RiboLock RNase Inhibitor) zu den gewaschenen Immunpellets gegeben und 1 h rollend bei 4 °C inkubiert, zentrifugiert (3 min, 4 °C, 7000 rpm) und der Überstand abgenommen. Die 200 µl Eluat und die 30 µl Input-Zellextrakt (aufgenommen in 170 µl NT2-Puffer und am Vortag bei -80 °C eingefroren) wurden anschließend mit je 60 µg Proteinase K und 0,2% SDS für 30 min bei 55 °C verdaut. Danach wurde die RNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert. Dazu wurden sowohl die 200 µl Eluat als auch die 200 µl Input-Probe mit 500 µl kaltem Phenol und 100 µl Chlorofom versetzt, 30 s stark gevortext und 10 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation (10 min, 4 °C, 14000 rpm) kam es zur Phasentrennung.

Die wässrige, RNA-haltige obere Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die wässrige Lösung wurde mit 1/10 Vol 3 M Natriumacetat (pH 5,2), 2,5 Vol Ethanol (100%) und mit 0,5 µl Glykogen (20 mg/ml in DEPC behandeltem Wasser) versetzt und zur Fällung über Nacht bei -20°C inkubiert. Die RNA wurde pelletiert (10 min, 4°C, 14000 rpm) und dreimal mit 400 µl eiskaltem 70%-igen Ethanol (v/v in DEPC-H₂O) gewaschen (10 min, 4°C, 14000 rpm). Das erhaltene RNA-Pellet wurde getrocknet und in 50 µl DEPC-H₂O gelöst. Nach Umschreiben der RNA in cDNA mit Hilfe Reverser Transkriptase (2.2.3.2) ließen sich die zu untersuchenden EGFP-Reporter-mRNAs mittels halbquantitativer RT-PCR mit EGFP-spezifischen Primern (Tabelle 8) amplifizieren und mittels Agarosegelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung (2.2.2.5) nachweisen. Um die Menge an ko-präzipitierter mRNA im Bezug zu zellulär vorhandenen mRNA betrachten zu können, wurden von der isolierten Gesamt-RNA Aliquots in die PCR-Reaktionen eingesetzt, die einen bestimmten prozentualen Anteil (5%, 2,5% und 1%) von, in den Immunfällungen eingesetzten RNA-Mengen, entsprachen.

Die detaillierte Zusammensetzung des Reaktionsansatzes sowie die Reaktionsbedingungen der PCR zum spezifischen Nachweis von in cDNA umgeschriebener EGFP-3'UTR-mRNA (Smg5 oder Tram1) sind nachfolgend aufgeführt:

Reaktionsansatz:

4 µl	cDNA (RIP C10 oder PAb101)
	oder
1 µl	Input-Verdünnung (5%, 2,5% und 1% cDNA Total-RNA)
2 µl	forward Primer (10 mM)
2 µl	reverse Primer (10 mM)
0,5 µl	dNTPs (10 mM)
1,5 µl	MgCl ₂ (25 mM)
2,5 µl	10x Taq-Polymerase Puffer
0,25 µl	Taq Polymerase (5U/µl)
ad. 25 µl	H ₂ O bidest.
<hr/>	
25 µl	Gesamtvolumen

PCR-Programm:

94 °C 4 min	} 30 Zyklen
94 °C 45 s	
54 °C 45 s	
72 °C 45 s	
72 °C 10 min	
20 °C ÜN	

Die notwendigen forward und reverse-Primer können Tabelle 8 entnommen werden.

2.2.7 NMD-Assay

Um eine funktionelle Rolle von Proteinen im PTC-vermittelten NMD zu untersuchen, wurde ein auf Chemilumineszenz basierendes NMD-Reportersystem verwendet (zur Verfügung gestellt von Prof. A. E. Kulozik, Uni. Heidelberg; Boelz *et al.*, 2006). Bei diesem Assay werden HeLa-Zellen mit Vektoren transfiziert, in denen entweder stromaufwärts eines Renilla-Luziferase-Reportergens das wildtypische Gen für β -Globin kloniert ist bzw. der β -Globin-Abschnitt ein vorzeitiges Stoppcodon (engl. *premature termination condon* (PTC)) besitzt. Zusätzlich werden diese Zellen mit einem weiteren Vektor, der das Gen für die Firefly-Luziferase enthält, ko-transfiziert. Dieser Kontrollreporter (Firefly) dient als interner Standard, um eventuelle unterschiedliche Transfektionseffizienzen, Pipettierolumina und Zellyseeffizienzen auszugleichen. Im Normalfall (Kontroll-siRNA) wird die PTC-haltige Reporter-mRNA vom NMD erkannt und abgebaut, während das wildtypische Transkript stabil ist.

Zunächst wurden $1,5 \times 10^5$ HeLa-Zellen/Well in 6-er Wellplatten ausgesät und für 24 h kultiviert. Danach wurden die Zellen mit entsprechenden siRNAs transfiziert (800 μ l OptiMEM + 15 μ l Interferin + 10 μ l 20 μ M siRNA; 2.2.1.3). 24 h nach siRNA-Transfektion wurden die Zellen mit Hilfe des Transfektionsreagenz jetPEITM mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert (2 μ g pCIneo-Renilla-Luziferase- β -globin-WT oder pCIneo-Renilla-Luziferase- β -globin-PTC + 0,7 μ g pCIneo-Firefly-Luziferase; 2.2.1.3) und nach 4 h das Medium gewechselt. 72 h nach siRNA-Transfektion wurden die Zellen geern-

tet. Zur Messung der Luziferase-Aktivitäten im Luminometer wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen, in 1 ml 1x PBS aufgenommen, zentrifugiert (4°C, 5 min, 2000 rpm) und das Zellpellet in 70 µl Zellysepuffer (nach Promega: 25 mM Trisphosphat, pH 7,8, 2 mM DTT, 2 mM DCTA, 10% Glycerol, 1% Triton) resuspendiert und für 1 h bei -20°C eingefroren. Die lysierten Zellen wurden bei RT aufgetaut und dreimal jeweils 10 µl einer Probe (Dreifachbestimmung) in eine weiße 96 Wellplatte (Greiner) pipettiert. Nach Zugabe von je 75 µl Dual-Glo-Luciferase-Reagent konnte nach 10-minütiger Inkubationszeit die, durch die Aktivität der Firefly-Luziferase erzeugte Lumineszenz gemessen werden. Die Lumineszenz wurde anschließend durch die Zugabe von 75 µl Dual Glo-Stop & Glo-Reagent gestoppt und die Lumineszenz der Renilla-Luziferase angeregt, die nach 10-minütiger Inkubation gemessen werden konnte. Mit Hilfe des Dual-GloTM Luciferase Assay Systems lassen sich die Aktivitäten von Renilla- und Firefly-Luziferase aufgrund ihrer unterschiedlichen Enzymstrukturen und Substratanforderungen nacheinander in einer Probe messen. Durch Bildung des Quotienten aus beiden Messungen (Renilla/Firefly) ergab sich die relative Luziferase-Aktivität. Im Assay entspricht die Renilla-Luziferase-Aktivität des wildtypischen Reporterkonstrukt 100%, die Renilla-Luziferase-Aktivität des PTC-haltigen Reporters wird in Beziehung dazu gesetzt. Fehlt ein essentieller Faktor des NMD durch zum Beispiel Knockdown mittels siRNA, kommt es im Vergleich zu Kontroll-siRNA transfizierten Zellen zu einer Anreicherung des PTC-haltigen Reportertranskriptes, da der NMD-induzierte Abbau blockiert ist. Im Normalfall wird die PTC-haltige Reporter-mRNA vom NMD erkannt und abgebaut. Zur Analyse der Reporter-mRNAs wurde die RNA mittel Hilfe des RNeasy Mini Kits von QIAGEN isoliert (2.2.3.1) und mit Hilfe des Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kits in cDNA umgeschrieben (2.2.3.2). Der Nachweis der Reporter-mRNAs erfolgt mittels halbquantitativer PCR mit spezifischen Primern für Renilla und Firefly (Tabelle 8), die dann mittels Agarosegelelektrophorese (2.2.2.5) nachgewiesen wurden. Zur Kontrolle der Effizienz der siRNA-Behandlung wurden die entsprechenden Proteine in einer Western Blot Analyse (2.2.4.3) immunologisch nachgewiesen.

Die detaillierte Zusammensetzung des Reaktionsansatzes sowie die Reaktionsbedingungen der RT-PCR zum spezifischen Nachweis von in cDNA umgeschriebener *Renilla-Luziferase-β-Globin-WT*- oder *Renilla-Luziferase-β-Globin-PTC*-mRNA oder *Firefly-Luziferase*-mRNA sind nachfolgend aufgeführt:

Reaktionsansatz:

1 μ l bzw. 5 μ l	cDNA (Renilla bzw. Firefly)
2 μ l	forward Primer (10mM)
2 μ l	reverse Primer (10mM)
0,5 μ l	dNTPs (10mM)
1,5 μ l	MgCl ₂ (25 mM)
2,5 μ l	10x Taq-Polymerase Puffer
0,25 μ l	Taq Polymerase
ad. 25 μ l	H ₂ O bidest.
<hr/>	
25 μ l	Gesamtvolumen

PCR-Programm:

95 °C 1 min	} 32 Zyklen
95 °C 15 s	
56 °C 15 s	
72 °C 20 s	
72 °C 1 min	
22 °C ÜN	

Die notwendigen forward und reverse-Primer können Tabelle 8 entnommen werden.

2.2.8 EBV-abgeleitetes induzierbares Knock-in-System

Um in Eukaryonten eine stabile, induzierbare Expression von Proteinen zu ermöglichen, wurde in dieser Arbeit, ein in der Arbeitsgruppe etabliertes EBV-abgeleitetes Knock-in-System verwendet (zur Verfügung gestellt von Prof. D. Eick, GSF München; Diplomarbeit Thomas Tretter, 2008). Durch die stabil replizierenden Episome pRTS-hygro und pRTS-pur (Bornkamm *et al.*, 2005) erhalten die eukaryontischen Zellen eine doppelte Antibiotikaresistenz (Hygromycin und Puromycin), die eine effiziente Selektion der transfizierten Zellen ermöglicht. Das Plasmid pRTS-hygro enthält hierbei die Sequenz für das Protein, dessen Überexpression gewünscht ist. Zur Detektion der exogenen Proteine wurde C-terminal eine Tag-Sequenz (Hämagglutinin-Tag; HA-Tag) angefügt. Die Proteinexpres-

sion erfolgt gezielt durch einen induzierbaren, bidirektionalen Promotor (Baron *et al.*, 1995) und ist mit der Expression von EGFP (engl. *Enhanced Green Fluorescent Protein*) gekoppelt, dessen Fluoreszenz zur Überwachung der Transfektions- und Selektionseffizienz genutzt werden kann. Die Induktion des Promotors kann durch Tetracyclin und seine Derivate, wie zum Beispiel Doxycyclin erfolgen.

H1299-Lungenkarzinomzellen wurden jeweils mit dem pRTS-pur-Plasmid und einem pRTS-hygro-HA-Fusionsprotein-Plasmide transfiziert (2.2.1.3). Als Kontrolle diente ein Ansatz mit pRTS-pur und pRTS-hygro, jeweils als Leervektor. Zur Selektion der transfizierten H1299-Zellen wurden die Zellen 5 Tage lang durch Zugabe von Selektionsmedium mit 1 µg/ml Puromycin und 200 µg/ml Hygromycin behandelt. Zur Kontrolle wurde das Absterben von untransfizierten Zellen abgewartet. Die Zellen, die die Selektion überlebten, enthielten beide Episome stabil. Die Selektion erfolgte ungefähr 16-18 h nach Transfektion. Um die Expression der HA-Fusionsproteine zu induzieren, wurde dem Selektionsmedium 1 µg/ml Doxycyclin zugefügt. Die Zellernte erfolgte 48 h nach Induktion. Nach dem Ernten der Zellen (2.2.4.1) wurden die Proteine mit einer SDS-PAGE aufgetrennt (2.2.4.2) und im Western Blot (2.2.4.3) nachgewiesen.

2.2.9 3'UTR-Reporter-Assay

Für den 3'UTR-Reporter Assay wurde an das 3'-Ende einer EGFP-cDNA-Sequenz die 3'-UTR-Sequenz von Ddx17, Smg5, Tram1 oder Ddx5 kloniert. Zur Durchführung des Assays wurden 350 000 HeLa-Zellen pro 6er-Well ausgesät und 24 h später je 3 Wells mit einem der Reporterkonstrukte transfiziert (2.2.1.3). Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsinisiert und in 2 ml Medium/Well vereinigt, resuspendiert und auf drei neue Wells ausgesät. Nach Absetzen der Zellen nach circa 4-5 h wurden die Zellen mit der jeweiligen siRNA transfiziert (2.2.1.3) und 4 h später das Transfektionsmedium durch frisches Medium mit 10% FCS ersetzt. Nach 72 h wurden die Zellen geerntet und die Extrakte für eine Western Blot Analyse (2.2.4.3) bzw. zur Analyse der Genexpression mittels Real-Time RT-PCR (2.2.3.3) weiter behandelt.

2.2.10 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse sämtlicher Experimente sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SEM) dargestellt. Die Signifikanzberechnung erfolgte mit Hilfe des zweiseitigen *Student's t*-Tests. Entsprechend gängigen Kriterien gilt ein Unterschied als signifikant, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $< 5\%$ ($p < 0,05$) ist.

3 Ergebnisse

3.1 Komplexbildung von Ddx5 mit den Schlüsselproteinen des NMD

3.1.1 Untersuchungen zur Komplexbildung von Ddx5 mit den Upf-Proteinen in HeLa-Zellen

Das DEAD-box-Protein Ddx5, das ursprünglich als Kernprotein beschrieben wurde, kann zwischen dem Kern und dem Zytoplasma pendeln, wobei ihm hier bisher keine eindeutige Funktion zugeordnet werden konnte. Vor dem Hintergrund, dass in *Saccharomyces cerevisiae* eine Interaktion zwischen Dpb2, dem Hefehomolog von Ddx5 und Ddx17, und dem NMD-Protein Upf1 beschrieben wurde und eine Funktion von Dpb2 im Hefe-NMD postuliert wurde (Bond *et al.*, 2001), sollte in der vorliegenden Arbeit zunächst eine mögliche Rolle von Ddx5 im NMD von Säugerzellen untersucht werden. Zur Klärung dieser Frage wurden zunächst Ddx5-Ko-Immunpräzipitationsexperimente (IP) mit HeLa-Zellextrakten durchgeführt. Zur Immunfällung von Ddx5 wurde der monoklonale Maus-Antikörper C10 (der gegen den C-Terminus (Aminosäuren AS 605-614) von Ddx5 gerichtet ist) benutzt. Zur Kontrolle wurde ein für das große T-Antigen von SV40 spezifischer Antikörper (PAb101) verwendet.

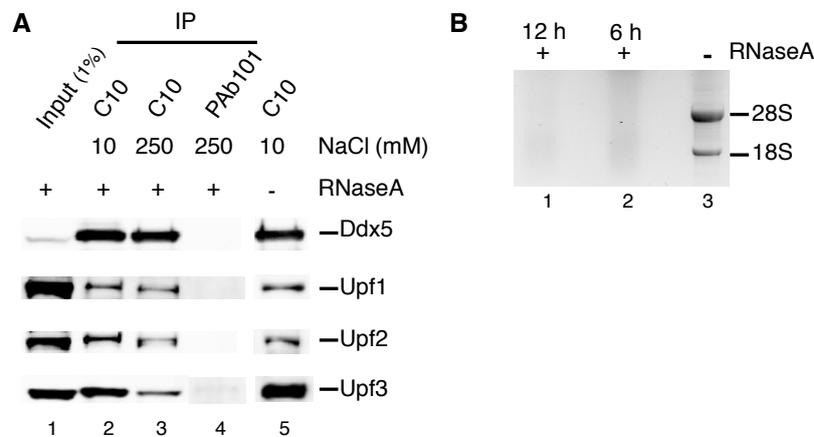


Abbildung 5: Ko-Immünpräzipitation von Upf1, Upf2 und Upf3 mit Ddx5 aus HeLa-Extrakten.

A: Ddx5 wurde aus HeLa-Zellextrakten mit (+) und ohne (-) RNase A-Behandlung mit dem Antikörper C10 (Spuren 2, 3 und 5) oder mit dem Kontroll-Antikörper PAb101 (Spur 4) bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen (mM) immunpräzipitiert. Ko-immunpräzipitierte Upf-Proteine wurden im Western Blot mit entsprechenden Antikörpern detektiert. Ein Prozent der zur Immunpräzipitation eingesetzten Extrakte wurde hier und in den nachfolgenden Experimenten als Kontrolle direkt analysiert (Input (1%)). **B:** RNA-Analyse der Zellextrakte nach verschiedenen Zeitpunkten des RNase A-Verdau durch Agarosegelelektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung. Die Position von 28S und 18S rRNA ist angezeigt.

Wie erwartet und in Abbildung 5 gezeigt, präzipitierte der Antikörper C10 sehr effizient und spezifisch im Extrakt vorhandenes Ddx5, das vom Antikörper PAb101 nicht erkannt wurde. In den Ddx5-spezifischen Immunkomplexen konnten auch Upf1, Upf2 und Upf3 nachgewiesen werden. Interessanterweise war der Anteil an ko-präzipitiertem Upf3 höher als der von Upf1 und Upf2 (Abbildung 5A, Spur 5). Es ist anzumerken, dass der verwendete Upf3-spezifische Antikörper nicht zwischen den paralogen Proteinen Upf3A und Upf3B differenziert und beide detektiert, wobei Upf3A und Upf3B in der Gelelektrophorese aufgrund nahezu identischer Größe (Upf3A, 476 AS; Upf3B, 470 AS; Serin *et al.*, 2001) auch nicht aufgetrennt werden können. Um zu überprüfen, ob die Ko-Immünpräzipitationen von Ddx5 und Upf1, Upf2 und Upf3 indirekt aufgrund einer Bindung der Proteine an gleiche RNA-Moleküle zustande kommt, wurde die RNA im Extrakt durch Behandlung mit der Endoribonuklease RNase A entfernt. Die Ko-Präzipitation der Upf-Proteine mit Ddx5 war jedoch auch in Abwesenheit von RNA (der RNA-Abbau wurde

im Agarosegel kontrolliert; Abbildung 5B) zu beobachten, und scheint daher auf direkter Protein-Protein-Interaktion zu beruhen (Abbildung 5A, Spur 2). Es ist aber nicht auszuschließen, dass für die initiale Bildung der Proteinkomplexe RNA erforderlich ist; einmal zustande gekommen scheint der Komplex dann allerdings auch in Abwesenheit der RNA stabil. Eine Erhöhung der Salzkonzentration (250 mM NaCl) in den Extrakten führte zu einer teilweisen Dissoziation der Upf-Proteine (Abbildung 5A, Spur 3), wobei der Anteil an ko-präzipitiertem Upf3 stärker abnahm als der von Upf1 und Upf2, so dass sich die drei Upf-Proteine in annähernd gleichen Mengen zeigten. Dieses Ergebnis könnte darauf hinweisen, dass eine stabilere Interaktion der Upf-Proteine mit Ddx5 besteht, wenn sie im Dreierkomplex, in dem Upf2 die Interaktion von Upf1 und Upf3 vermittelt, gebunden sind.

3.1.2 Untersuchungen zur Assoziation von Ddx5 mit mRNPs

mRNAs liegen in einer Zelle in Form von sogenannten Messenger-Ribonukleoprotein-Komplexen (mRNPs) vor (Ishigaki *et al.*, 2001; Maquat, 2004). Die Proteinzusammensetzung von mRNPs ist abhängig von der Lokalisation (z.B. Nukleus oder Zytoplasma) der mRNA und ändert sich auch mit deren Funktion, wobei die gebundenen Proteine u.a. den Translationsablauf und die Stabilität (Lebensdauer) einer mRNA beeinflussen (Daneholt, 2001; Dreyfuss *et al.*, 2002; Hieronymus und Silver, 2004; Svitkin *et al.*, 2009; Beilharz *et al.*, 2010). So ist beispielsweise das „*cap-binding*“ Protein CBP80 in der Regel nur in der ersten Runde der Translation an eine mRNA gebunden und wird danach durch das zytoplasmatische Protein eIF4E (engl. *eukaryotic translation initiation factor 4E*) ersetzt (Isken und Maquat, 2008; Gehring *et al.*, 2009; Sato und Maquat, 2009). Weitere mRNP Komponenten sind zum Beispiel das Poly(A)-bindende Protein C1 (PABPC1), das das nukleäre PABPN1 im Zytoplasma ersetzt (Sato und Maquat, 2009), und dann entweder an den „*eukaryotic initiation factor 4G*“ (eIF4G) bindet um die Translation zu verstärken (Wells *et al.*, 1998; Kahvejian *et al.*, 2005) oder an den „*eukaryotic release factor 3*“ (eRF3) um die Translation zu beenden (Hoshino *et al.*, 1998; Cosson *et al.*, 2002a, 2002b). Auch die oben beschriebenen Upf-Proteine und die EJC-Proteine (u.a. MAGOH, Y14 und eIF4AIII) können als mRNP-Faktoren betrachtet werden. Die EJC-Proteine markieren die Exon-Exon-Übergänge auf (noch nicht translatierter) mRNA und signa-

lisieren so vorausgegangene Spleißvorgänge. Sie werden in der ersten Translationsrunde durch das passierende Ribosom entfernt (Gehring *et al.*, 2009).

Wie in Abbildung 6A gezeigt, lassen sich einige mRNP-typische Proteine, wie CBP80, eIF4E, eIF4G, PABPC1, PABPN1 und MAGOH in Ddx5-spezifischen Immunkomplexen nachweisen. Die Interaktionen zeigten sich allerdings RNase A sensitiv, ein Zeichen für eine indirekte, RNA-vermittelte Interaktion dieser Proteine mit Ddx5. Vergleicht man die ko-präzipitierten Mengen der kompetierenden Proteine CBP80 und eIF4E bzw. PABPN1 und PABPC1 miteinander, so zeigt sich eine deutlich stärkere Präsenz von CBP80 und PABPN1 mit Ddx5. Ddx5 scheint also hauptsächlich mit mRNPs assoziiert zu sein, die die ersten Runde der Translation noch nicht durchlaufen haben (Maquat *et al.*, 2010). Für eine präferenzielle Bindung des Ddx5-Upf-Komplexes an mRNPs, die sich vor der ersten Runde der Translation befinden, spricht auch die (RNase A-sensitive) Präsenz von MAGOH, ein Hauptprotein der EJC, die ebenfalls in der ersten Runde der Translation durch das translatierende Ribosomen verdrängt werden (Gehring *et al.*, 2009).

Die einzige nicht-RNA vermittelte Interaktion mit Ddx5-Immunkomplexen ließ sich für eRF3 beobachten, was aufgrund der beschriebenen Interaktion zwischen eRF3 und Upf1 erklärt werden könnte. eRF3 bindet in Folge der Erkennung eines Stoppkodons an das angehaltene Ribosom und bildet mit Upf1 den sogenannten SURF-Komplex (Czaplinski *et al.*, 1998; Kashima *et al.*, 2006; Ivanov *et al.*, 2008). Da Upf1 wiederum wie in Abschnitt 3.1.1 gezeigt im Komplex mit Upf2 und Upf3 mit Ddx5 interagiert vorliegt, scheint sich also zu mindestens ein Teil der mit Ddx5 assoziierten mRNAs im Zustand der Translations-termination zu befinden. Um die Anwesenheit von Ddx5 in der ersten Translationsrunde bzw. an CBP80-gebundenen mRNAs zu untermauern, wurden Ko-Präzipitationsexperimente mit einem gegen CBP80 gerichteten Antikörper durchgeführt. Wie in Abbildung 6B gezeigt, lässt sich Ddx5 in RNase-sensitiver Weise mit CBP80 ko-präzipitieren.

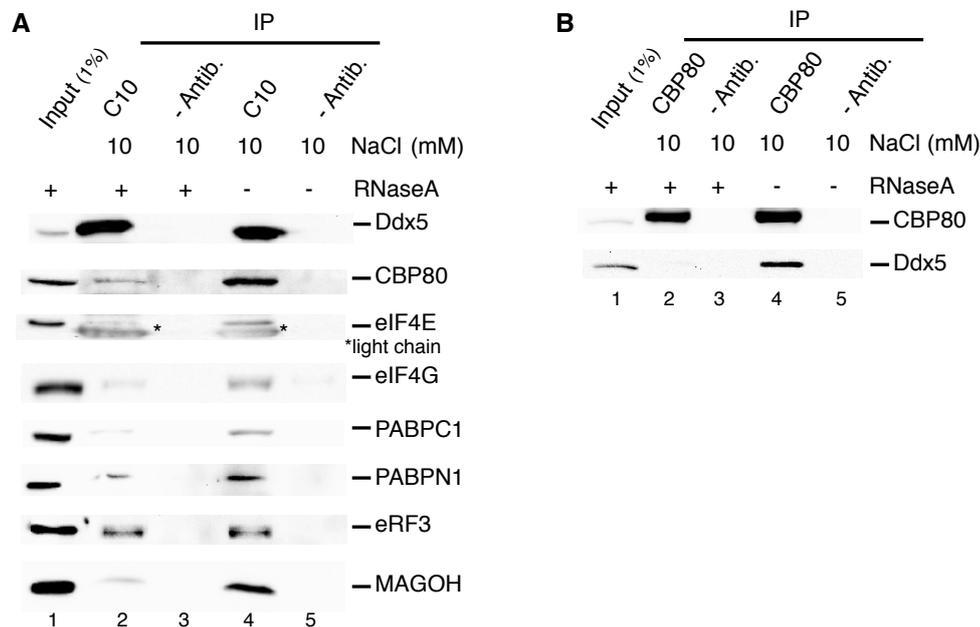


Abbildung 6: Ko-Immünpräzipitation von mRNP-Komponenten mit Ddx5 aus HeLa-Zellextrakten.

A: Ddx5 wurde aus RNase A-behandelten (+) oder -unbehandelten (-) HeLa-Zellextrakten mit dem Antikörper C10 (Spuren 2 und 4) immunpräzipitiert. Ko-immunpräzipitierte Proteine wurden im Western Blot mit entsprechenden Antikörpern detektiert. Kreuzreaktionen zwischen den Immunglobulinketten sind angezeigt (*). **B:** CBP80 wurde aus RNase A-behandelten (+) oder -unbehandelten (-) HeLa-Zellextrakten immunpräzipitiert und auf ko-immunpräzipitiertes Ddx5 im Western Blot analysiert. Zur Kontrolle wurde in A und B eine Mock-Präzipitation ohne Antikörper durchgeführt (- Antib.; jeweils Spuren 3 und 5).

3.1.3 Untersuchungen zur Ko-Lokalisation von Ddx5 und Upf1

Die Interaktion von Proteinen in einer Zelle kann durch den Nachweis ihrer Ko-Lokalisation in fixierten Zellen untermauert werden. Um dies für Ddx5 und die NMD-Proteine in der Zelle zu untersuchen, wurden KT3-getaggtetes (ein Epitop des SV40 T-Antigen; die letzten sechs Aminosäuren) Ddx5 und EGFP-getaggtetes (engl. *enhanced green fluorescent protein*) Upf1 mit Hilfe der Plasmide pCMV-p68wt bzw. pEGFP-Upf1 für 48 h in HeLa-Zellen überexprimiert. Die Lokalisation des exogenen Ddx5 wurde durch die Verwendung des monoklonalen KT3-Antikörpers und einem Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpers

(Maus-Alexa®Fluor568; rot) sichtbar gemacht, beim EGFP-Upf1-Fusionsprotein wurde dessen Eigenfluoreszenz (grün) zur Detektion genutzt. Eine mögliche Ko-Lokalisation der untersuchten Proteine im Rahmen des Auflösungsvermögens des Mikroskops sollte durch Farbüberlagerung in der indirekten Immunfluoreszenzanalyse erkennbar sein.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt (siehe auch Diplomarbeit Verena Geißler, 2008). Die Zellkerne sind mittels DAPI-Färbung sichtbar gemacht. Die Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen, wie in der Literatur beschrieben (Lane und Hoeffler, 1980; Crawford *et al.*, 1982; Stevenson *et al.*, 1998; Erukashvily *et al.*, 2005; Iggo und Lane, 1989; Rössler *et al.*, 2000; Uhlmann-Schiffler *et al.*, 2002; Jalal *et al.*, 2007), eine deutliche Dominanz von überexprimiertem Ddx5 im Zellkern. Das überexprimierte Ddx5 konnte allerdings auch im Zytoplasma in granulären Körperchen detektiert werden. EGFP-Upf1 war dagegen wie beschrieben (Perlick *et al.*, 1996; Applequist *et al.*, 1997) exklusiv im Zytoplasma lokalisiert und hier, ähnlich wie Ddx5, in zytoplasmatischen Körperchen angereichert. Die Überlagerung der Fluoreszenzbilder (merge) ergab deutliche gelbe Fluoreszenzsignale für diese zytoplasmatischen Strukturen, was auf eine Ko-Lokalisation der beiden Proteine in diesem Bereich hindeutet. Viele Proteine, die in den mRNA-Abbau involviert sind, lassen sich in zytoplasmatischen Strukturen, *processing bodies* (P-bodies) genannt, lokalisieren. P-bodies scheinen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des mRNA-Metabolismus zu erfüllen. In ihnen werden mRNAs zwischengelagert, um sie dem Translationsprozess zu entziehen und eventuell abzubauen. Es handelt sich dabei um eine Ansammlung von mRNPs und Enzymen, wie z.B. Deadenylasen, Decapping-Enzyme und auch Exonukleasen, wie z.B. Xrn1 (Coller und Parker, 2004; Eulalio *et al.*, 2007; Franks und Lykke-Andersen, 2008; Simon *et al.*, 2006). Des Weiteren sind in P-bodies all jene Faktoren zu finden, die für die Kennzeichnung der abzubauenden mRNAs verantwortlich sind, dazu zählen unter anderem siRNAs, miRNAs (Jakymiw *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005; Pauley *et al.*, 2006), aber auch die Proteine des NMD (Durand *et al.*, 2007; Sheth und Parker, 2006; Erickson und Lykke-Andersen, 2011; Unterholzner und Izaurralde, 2004; Fukuhara *et al.*, 2005), insbesondere Upf1. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass es sich bei den zytoplasmatischen Strukturen, in denen Ddx5 und Upf1 zusammen nachgewiesen wurden, um P-bodies handelt. Es ist des Weiteren anzumerken, dass auch für Ago, das Schlüsselprotein der RNA-Interferenz, und Ddx5 eine Ko-Lokalisation in solchen zytoplasmatischen Strukturen beobachtet wurde (siehe Diplomarbeit Verena Geißler, 2008)

und Ago in der Literatur als P-body-Marker-Protein beschrieben ist (Sen und Blau, 2005; Lui *et al.*, 2005; Leung *et al.*, 2006).

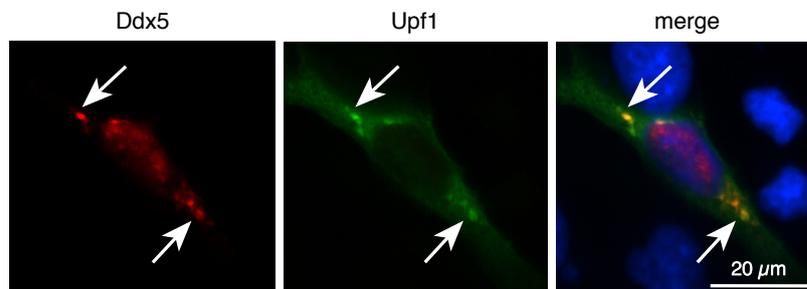


Abbildung 7: Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von überexprimiertem Ddx5 und Upf1.

HeLa-Zellen wurden zur Expression von KT3-getaggttem Ddx5 und EGFP-getaggttem Upf1 mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert und nach 48 h für eine indirekte Immunfluoreszenzanalyse fixiert und permeabilisiert. Zur Detektion von KT3-Ddx5 wurde ein KT3-spezifischer Antikörper und ein Alexa®Fluor568 gekoppelter α -Maus-Antikörper (rote Färbung) verwendet. Die Eigenfluoreszenz von EGFP (grüne Färbung) wurde für die Lokalisation von EGFP-Upf1 genutzt. Die intakten Zellkerne wurden zur Kontrolle mit DAPI gefärbt (blaue Färbung). Die Ko-Lokalisation von KT3-Ddx5 und EGFP-Upf1 ergibt in der Überlagerung (merge) ein gelbes Fluoreszenzsignal, das mit Pfeilen gekennzeichnet ist.

3.1.4 Untersuchungen zur Interaktion von Ddx5 und Upf3B

Als nächstes sollte untersucht werden, ob einer der drei ko-präzipitieren Upf-Faktoren in der Lage ist physikalisch mit Ddx5 zu interagieren. Hierzu wurden die Upf-Proteine mit Hilfe entsprechender Plasmide jeweils für 48 h in HeLa-Zellen überexprimiert und die aus diesen Zellen gewonnenen Extrakte in Ko-Immunpräzipitationsexperimenten eingesetzt. Zur Präzipitation von EGFP-Upf1 (Plasmid pEGFP-Upf1) wurde ein EGFP-spezifischer Antikörper verwendet, zur Präzipitation von FLAG-Upf2 (pCIneo-FLAG-Upf2), FLAG-Upf3A (pCIneo-FLAG-Upf3A) und FLAG-Upf3B (pCIneo-FLAG-Upf3B) wurde ein FLAG-spezifischer Antikörper eingesetzt. Die Proben wurden anschließend im Western Blot auf ko-präzipitiertes Ddx5 analysiert. Zur Kontrolle wurden HeLa-Zellen mit den entsprechenden Leervektoren transfiziert und die erhaltenen Zellextrakte ebenfalls zur

Ko-Immünpräzipitation mit den entsprechenden Antikörpern verwendet.

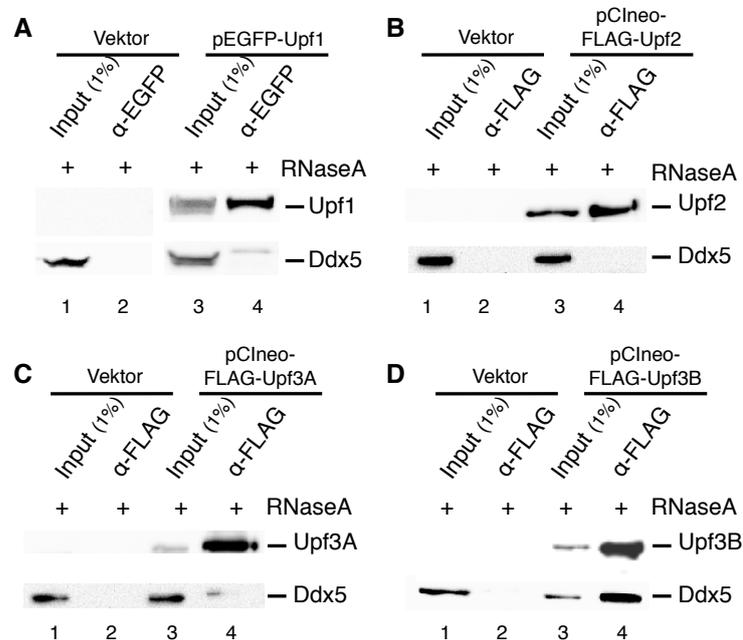


Abbildung 8: Physikalische Interaktion von Ddx5 mit Upf3B.

HeLa-Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, die entweder für EGFP-getaggttes Upf1 (**A**), FLAG-getaggttes Upf2 (**B**), FLAG-getaggttes Upf3A (**C**) oder FLAG-getaggttes Upf3B (**D**) kodieren oder mit den entsprechenden Leervektoren (Vektor). Nach 48 h wurden Zellextrakte hergestellt und in Anwesenheit von RNase A Immunpräzipitationen mit EGFP- bzw. FLAG-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Immun- und ko-immunpräzipitierte Proteine wurden im Western Blot mit entsprechenden Antikörpern detektiert.

Die Ergebnisse zeigen (Abbildung 8), dass Upf3B bevorzugt an Ddx5 bindet, während dies für Upf1, Upf2 und Upf3A nicht zu beobachten war. Die zur Markierung der exogen exprimierten Proteine benutzten Tags scheinen nicht die Komplexierung der Upf-Proteine untereinander zu stören (Mendell *et al.*, 2002; Gehring *et al.*, 2003, Kunz *et al.*, 2006 und nicht gezeigte Ergebnisse), was eine schwache indirekte Ko-Immünpräzipitation mit den anderen Upf-Proteinen erklärt (siehe Spur 4 in Abbildung 8A und C). Es sei darauf hingewiesen, dass die Fraktion von Ddx5 die im Komplex mit den endogenen Upfs vorliegt nicht durch die EGFP- und FLAG-spezifischen Antikörper präzipitierbar wurde. Das Genom von *H. sapiens* kodiert für zwei Upf3 Proteine, die Paraloge Upf3A (Chromosom 13) und Upf3B (X-Chromosom, daher auch UPF3X genannt). Für den NMD-Prozess scheint

Upf3B der wichtigere Faktor zu sein, der aber bei einem Ausfall durch Upf3A zumindest teilweise ersetzt werden kann (Kim *et al.*, 2001; Serin *et al.*, 2001; Kunz *et al.*, 2006; Chan *et al.*, 2009). Da Ddx5 mit Upf3A nicht direkt zu interagieren scheint, wurden weitere Experimente auf Upf3B beschränkt.

Im Folgenden wurden Experimente durchgeführt um die Bindungsdomäne von Ddx5 auf der Upf3B-Polypeptidkette einzugrenzen. Bei der Konstruktion hierzu benutzter Upf3B-Teilproteine wurden die Interaktionsdomänen, mit denen die drei Upf-Proteine in Kontakt zueinander treten, berücksichtigt. Wie in Abbildung 9A dargestellt, bindet Upf1 über die N-terminale CH-Domäne an den C-Terminus von Upf2 (Clerici *et al.*, 2009). Upf2 interagiert mit der letzten seiner drei MIF4G-Domänen mit der RNA-Bindedomäne von Upf3B (Kadlec *et al.*, 2004). Upf3B wiederum bindet mit dem C-Terminus an MAGOH-Y14 und an die RecA2 Domäne von eIF4AIII des EJC (Gehring *et al.*, 2003; Buchwald *et al.*, 2010; Melero *et al.*, 2012).

Es wurden FLAG-getaggte Upf3B-Deletionsmutanten kloniert, die entweder nicht in der Lage waren mit Upf2 zu interagieren (FLAG-Upf3B₋₁₄₅₋₄₇₀ bzw. FLAG-Upf3B₋₂₇₀₋₄₇₀; Chamiéh *et al.*, 2008; Kadlec *et al.*, 2004) oder denen die EJC-Bindestelle fehlte (FLAG-Upf3B₋₁₋₄₂₀ bzw. FLAG-Upf3B₋₁₋₂₇₀; Gehring *et al.*, 2003). Mit Hilfe dieser Mutanten sollte auch geklärt werden, ob die Bindung von Ddx5 an Upf3B unabhängig ist von dessen Interaktion mit Upf2 oder dem EJC, bzw. ob die Ddx5-Upf3B-Wechselwirkung mit der Bindung dieser Faktoren kollidiert. Die verwendeten Upf3B-Deletionsmutanten sind in Abbildung 9B dargestellt. Sie wurden einzeln in HeLa-Zellen überexprimiert und mit FLAG-spezifischen Antikörpern gefällt. In einer ersten Analyse wurden die Upf3B-Deletionsmutanten FLAG-Upf3B₋₁₄₅₋₄₇₀ und FLAG-Upf3B₋₁₋₄₂₀ verwendet. In den Ko-Immunpräzipitationskomplexen dieser Deletionsmutanten ist in beiden Fällen Ddx5 nachweisbar (Abbildung 9C). Ddx5 scheint also unabhängig von Upf2 oder dem EJC an Upf3 binden zu können. Durch Ko-IP-Experimente mit den Deletionsmutanten FLAG-Upf3B₋₁₋₂₇₀ bzw. FLAG-Upf3B₋₂₇₀₋₄₇₀ konnte die Upf3B-Bindungsstelle für Ddx5 weiter eingeschränkt werden. Während die Deletionsmutante FLAG-Upf3B₋₁₋₂₇₀ keine Interaktion mit Ddx5 aufweist, trifft dies für die Deletionsmutante FLAG-Upf3B₋₂₇₀₋₄₇₀ (Abbildung 9D) sehr wohl zu. Ddx5 bindet also an den C-terminalen Teil von Upf3B im Bereich der Aminosäuren 270-420.

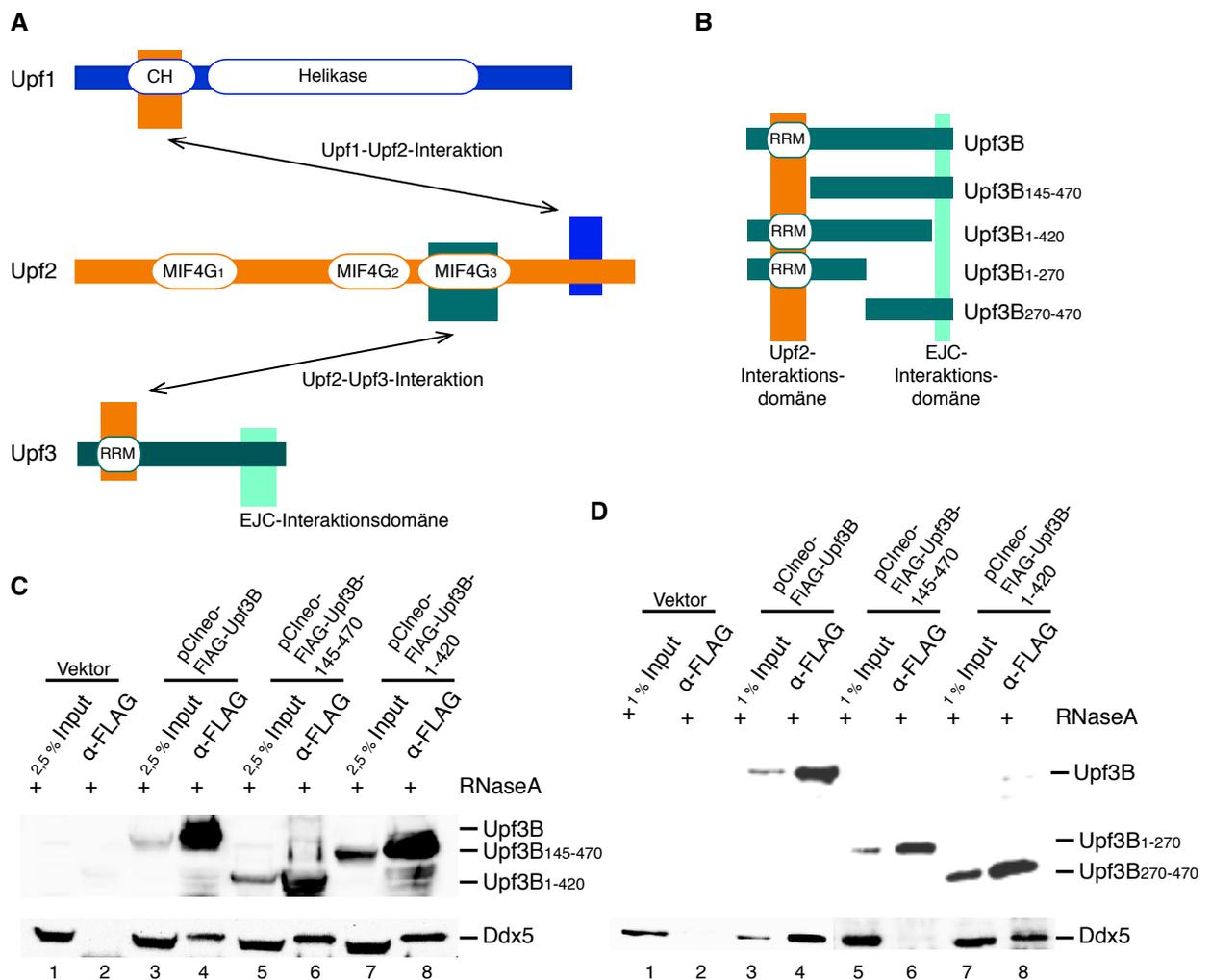


Abbildung 9: Ddx5 interagiert mit dem C-Terminus von Upf3B.

A: Schematische Darstellung der NMD-Proteine Upf1, Upf2 und Upf3 mit den wichtigsten Motiven. Die interagierenden Domänen sind farblich hervorgehoben und durch Pfeile angezeigt. **B:** Schematische Darstellung von Upf3B und den verwendeten Upf3B-Deletionsmutanten. **C und D:** HeLa-Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, die für jeweils eine der Upf3B-Deletionsmutanten (Spuren 3-8) kodieren, oder den entsprechenden Leervektoren (Vektor; Spuren 1 und 2). Nach 48 h wurden Zellextrakte hergestellt und in Anwesenheit von RNase A Immunpräzipitationen mit einem FLAG-spezifischen Antikörper durchgeführt. Immun- und ko-immunpräzipitierte Proteine wurden im Western Blot mit entsprechenden Antikörpern detektiert.

Obwohl Upf1 nicht direkt an Upf3 sondern mit Hilfe von Upf2 als Bindeglied an Upf3 bindet, besteht die Möglichkeit, dass es über eine Konformationsbeeinflussung Einfluss

auf die Ddx5-Upf3B Komplexbildung ausübt. Um dies zu überprüfen, wurden Ddx5-Ko-IP-Experimente mit HeLa-Zellen durchgeführt, in denen durch RNA-Interferenz (RNAi) ein Knockdown von Upf1 erzeugt wurde. Diese Experimente zeigen keinen Einfluss von Upf1 auf die Ddx5-Upf3B-Interaktion (Abbildung 10).

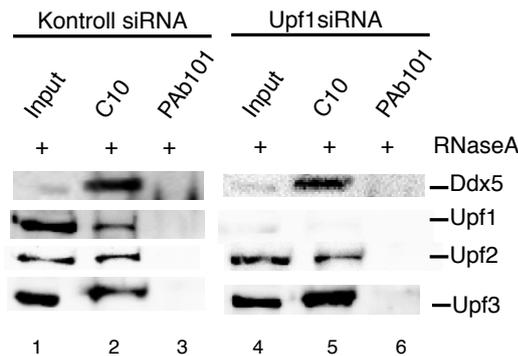


Abbildung 10: Ddx5 interagiert mit Upf3 in Abwesenheit von Upf1.

HeLa-Zellen wurden mit Kontroll- bzw. Upf1-siRNA transfiziert. Nach 48 h wurden Zellextrakte hergestellt und in Anwesenheit von RNase A Immunpräzipitationen mit dem Ddx5-spezifischen Antikörper C10 (Spuren 2 und 5) oder dem Kontroll-Antikörper PAb101 (Spuren 3 und 6) durchgeführt. Ko-präzipitierte Upf-Proteine wurden im Western Blot mit entsprechenden Antikörpern nachgewiesen.

Um die Bindungsregion mit der Ddx5 an Upf3B bindet zu bestimmen, wurden Pull-down-Assays mit Ddx5-Deletionsmutanten, die in Abbildung 11A schematisch dargestellt sind, durchgeführt. Wie zu sehen, wurde Ddx5 hierzu als N- und C-terminale Mutante exprimiert. Die N-terminale Mutante enthält neben dem Q-Motiv und Motiv Ia, vor allem das Motiv I, auch Walker A Motiv genannt, das für die ATP-Bindung wichtig ist. Die C-terminale Mutante enthält neben Motiv Ib, III, IV und V, das Motiv II (Walker B/DEAD-Motiv), das für die ATP-Hydrolyse benötigt wird (Walker *et al.*, 1982; Linder *et al.*, 1989). Zuerst wurde FLAG-getaggtetes Upf3B in HeLa-Zellen überexprimiert und dann als Fänger im Pull-down-Assay eingesetzt. KT3-getaggte Ddx5-Deletionmutanten (KT3-Ddx5₋₁₋₁₈₉ bzw. KT3-Ddx5₋₁₉₀₋₆₁₄) wurden nach Überexpression als Beuteprotein mit dem an FLAG-Antikörpern gebundenen FLAG-Upf3B inkubiert. Die Analyse im Western Blot ergab eine Bindung von Ddx5₋₁₋₁₈₉ an Upf3B während die Deletionsmutante Ddx5₋₁₉₀₋₆₁₄ nicht in der Lage war mit Upf3B zu interagieren (Abbildung 11B). Ddx5 bindet also mit

den N-terminalen Aminosäuren 1-189, die das ATP-bindende Motiv (Walker A Motiv) enthalten, an Upf3B.

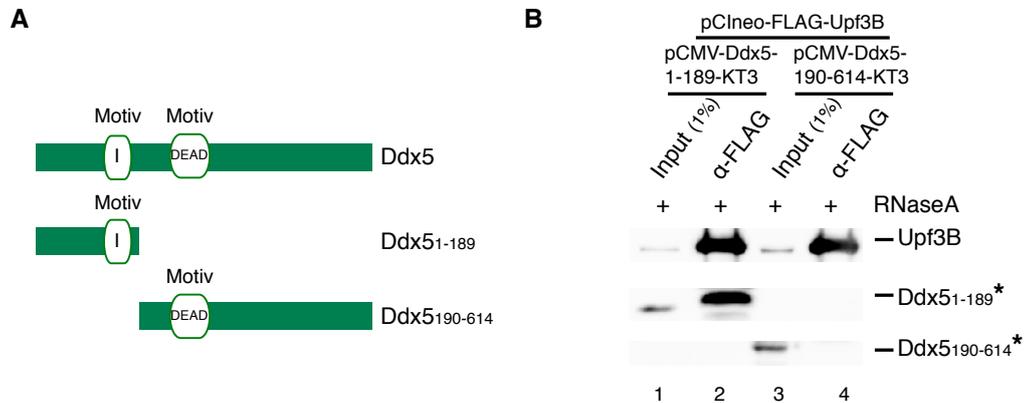


Abbildung 11: Upf3B interagiert mit dem N-Terminus von Ddx5.

A: Schematische Darstellung der verwendeten Ddx5-Deletionsmutanten mit den Motiven I und DEAD. **B:** Pull-down-Assays mit Zellextrakten von HeLa-Zellen, die mit pCIneo-FLAG-Upf3B und pCMV-Ddx5-KT3-1-189 (Spuren 1 und 2) oder pCIneo-FLAG-Upf3B und pCMV-Ddx5-KT3-190-614 (Spuren 3 und 4) transfiziert waren. FLAG-Upf3B wurde als Fängerprotein für die Ddx5-Deletionsmutanten (Beuteproteine; *) benutzt. Die immunpräzipitierten Proteine wurden im Western Blot mit einem FLAG- bzw. KT3-spezifischen Antikörpern detektiert.

Wie in Abbildung 12 zu sehen, konnte Ddx17 ebenfalls in den FLAG-Upf3B-Ko-IP-Komplexen nachgewiesen werden. Da Ddx5 und Ddx17 nicht nur eine hohe Homologie (Lamm *et al.*, 1996; Ogilvie *et al.*, 2003) aufweisen und in ihren biochemischen Aktivitäten sehr ähnlich sind (Jahnknecht, 2010; Rössler *et al.*, 2001), sondern auch miteinander Komplexe bilden (Ogilvie *et al.*, 2003), war dieser Befund nicht verwunderlich. Eine funktionelle Redundanz der Proteine wurde bereits, wie in der Einleitung beschrieben, bei der Ribosomenbiogenese und Transkriptionsregulation beschrieben (Jalal *et al.*, 2007; Fuller-Pace *et al.*, 2013).

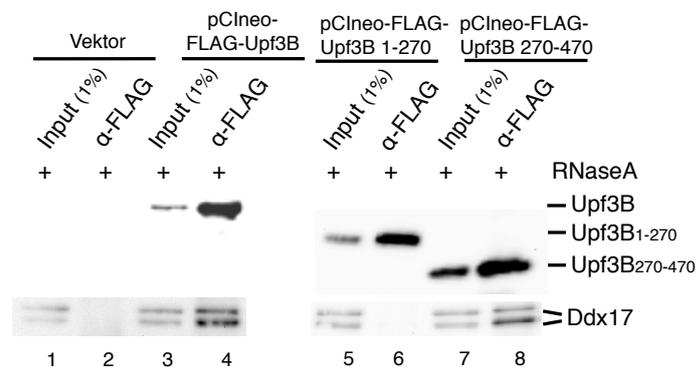


Abbildung 12: Ddx17 bindet an Upf3B.

HeLa-Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, die nur für den FLAG-Tag (Vektor; Spuren 1 und 2) oder für FLAG-getaggtetes Upf3B (pCIneo-FLAG-Upf3B; Spuren 3 und 4) oder für die angezeigten FLAG-getaggteten Upf3B-Deletionsmutanten (pCIneo-FLAG-Upf3B₁₋₂₇₀; Spuren 5 und 6 oder pCIneo-FLAG-Upf3B₂₇₀₋₄₇₀; Spuren 7 und 8) kodieren. Nach 48 h wurden in Anwesenheit von RNase A Immunpräzipitationen mit einem FLAG-spezifischen Antikörper durchgeführt und die Präzipitate im Western Blot auf die entsprechenden Proteine hin analysiert.

Zusammenfassend kann geschlossen werden, dass der N-terminale Teil von Ddx5 an den C-terminalen Bereich von Upf3B bindet, ohne dass andere NMD-Schlüsselproteine wie Upf1 und Upf2 für diese Komplexbildung erforderlich sind.

3.2 Ddx5 und die NMD-Proteine Upf1, Upf2 und Upf3 regulieren die Expression von Ddx17

3.2.1 Untersuchungen zu einer möglichen Funktion von Ddx5 im PTC-vermittelten NMD

Die nachgewiesene Interaktion von Ddx5 und Upf3B legt die Möglichkeit nahe, dass Ddx5 eine Rolle im NMD-Prozess spielt. Um auf eine mögliche Funktion im PTC-vermittelten mRNA-Abbau zu testen, wurde ein auf Chemilumineszenz basierendes NMD-Reportersystem in HeLa-Zellen verwendet (Boelz *et al.*, 2006), das die Expression zweier Luziferase-

Genkonstrukte mit und ohne vorzeitigem Stoppkodon (PTC) vergleicht. Die NMD-Reporter-mRNA wird hierbei von einem Renilla-Luziferase- β -Globin-Fusionsgen kodiert, das innerhalb des β -Globin-Abschnitts das vorzeitige Stoppkodon trägt. Im Gegensatz zur Vergleichs-mRNA, die keine Mutation enthält (Wildtyp; WT), wird sie vom NMD-Apparat erkannt und abgebaut. Zur Normalisierung wird die Aktivität einer ko-exprimierten Firefly-Luziferase verwendet. Das Fehlen einer essentiellen Komponente des NMD hat allgemein einen negativen Einfluss auf den NMD-Prozess (Ferraiuolo *et al.*, 2004; Mendell *et al.*, 2004; Rehwinkel *et al.*, 2005). Wird die Expression von Proteinen des NMD mittels RNAi unterdrückt, wird der NMD-Prozess inhibiert und bei Verwendung des oben beschriebenen NMD-Reporter-Assays kommt es zu einer Anreicherung des PTC-haltigen Reportertranskripts. Dies wurde im Folgenden für Ddx5 getestet und da Ddx17, wie in Abbildung 12 gezeigt, ebenfalls mit Upf3B interagiert (und daher in den NMD-Prozess involviert sein könnte), wurde zusätzlich eine siRNA verwendet, die aufgrund der Homologie beider Gene sowohl die Expression von Ddx5 als auch die von Ddx17 unterdrückt. Der Proteinknockdown in den einzelnen Ansätzen wurde im Western Blot überprüft (Abbildung 13C). Wie die Ergebnisse in Abbildung 13A zeigen, kam es nach Knockdown von Ddx5 und/oder Ddx17 zu keinem Anstieg der Renilla-Luziferase-Aktivität des PTC-haltigen Reporters und somit also zu keiner Beeinträchtigung der NMD-Aktivität in HeLa-Zellen. Als Positivkontrolle diente der Knockdown von Upf1, was zu einer deutlichen Inhibierung der NMD-Aktivität in HeLa-Zellen führte und somit zu einem Anstieg der Renilla-Luziferase-Aktivität des PTC-haltigen Transkripts von circa 10% (in Kontroll-siRNA transfizierten Zellen) auf etwa 40%. Die Menge an wildtypischer zu PTC-haltiger β -Globin-Renilla-Luziferase-mRNA wurde zusätzlich mittels RT-PCR und Agaorsegelelektrophorese nach Normalisierung gegen die Firefly-Luziferase-mRNA dargestellt. Die RT-PCR-Analyse untermauert das durch die Renilla-Luziferase-Aktivitätsmessung erhaltene Ergebnis (Abbildung 13B). Beide Ergebnisse schließen eine generelle Beteiligung von Ddx5 und/oder Ddx17 am PTC-vermittelten NMD aus.

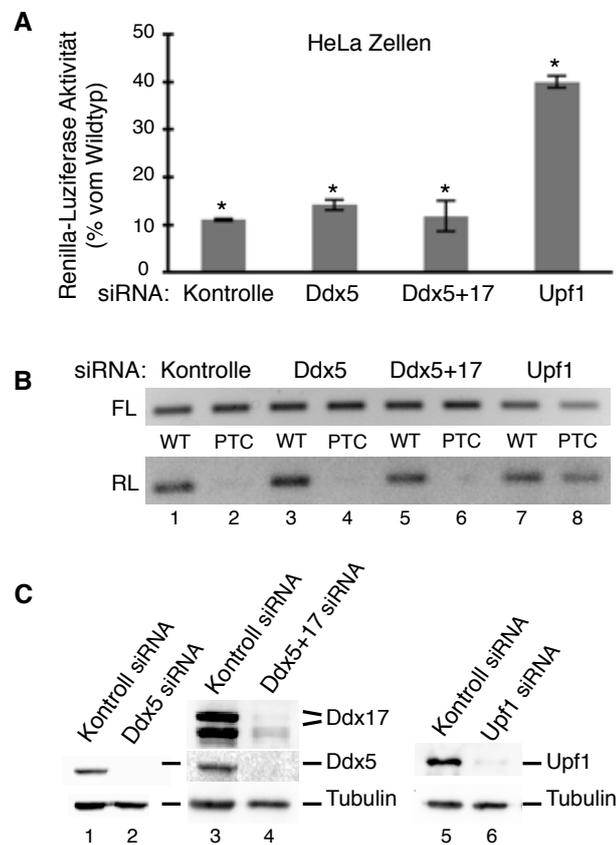


Abbildung 13: Ddx5 und Ddx17 haben keinen Einfluss auf die PTC-vermittelte NMD-Kontrolle.

A: HeLa-Zellen wurden, wie bei Boelz *et al.*, 2006 beschrieben, mit den angegebenen siRNAs sowie 24 h später mit den NMD-Reporter-Konstrukten transfiziert. Die Proteinexpressionslevel der Renilla-Luziferase/ β -Globin-Fusionsproteine mit und ohne vorzeitigem Stoppkodon wurden durch Messung der Luziferase-Aktivität am Luminometer bestimmt ($n=3$; $*p<0,0005$), wobei zur Normalisierung die Aktivität einer ko-exprimierten Firefly-Luziferase verwendet wurde. In der Abbildung ist die Renilla-Luziferase-Aktivität des PTC-haltigen Reporters im Verhältnis zur Renilla-Luziferase-Aktivität des wildtypischen Reporters dargestellt. **B:** Halbquantitative Analyse der wildtypischen (WT) bzw. PTC-haltigen (PTC) Renilla-Luziferase mRNA (RL) im Verhältnis zur mRNA der Firefly-Luziferase (FL) mittels RT-PCR und Agarosegelelektrophorese **C:** Der siRNA-vermittelte Knockdown von Ddx5, Ddx5 und Ddx17 und Upf1 wurde im Western Blot mit Tubulin als Ladekontrolle kontrolliert.

3.2.2 Untersuchungen zur Expressionsregulation von Ddx17 durch Ddx5

Es wurde beschrieben, dass Ddx5 einen negativen Einfluss sowohl auf die eigene Expression als auch auf die Expression von Ddx17 hat (Jalal *et al.*, 2007). Diese Effekte können nur zum Teil auf Ddx5-gesteuerte Variationen in der Spleißeffektivität zurückgeführt werden (siehe Einleitung) und es erscheint möglich, dass NMD-Faktoren hier eine Rolle spielen. Der NMD verhindert nämlich nicht nur die Anhäufung verkürzter Proteine durch die Erkennung und den gezielten Abbau von mRNAs mit vorzeitigem Stoppkodon, sondern reguliert auch die Expression vieler physiologischer Transkripte. Die genauen Vorgänge bei diesem Kontrollprozess sind jedoch noch weitestgehend unverstanden (Maquat, 2004; Neu-Yilik und Kulozik, 2008; Rebbapragada und Lykke-Andersen, 2009; Nicholson *et al.*, 2010).

In einem ersten Schritt wurde die Regulation der Ddx17-Expression durch Ddx5 auf Proteinebene überprüft. HeLa-Zellen wurden 48 h nach Transfektion mit einer Ddx5-spezifischen siRNA auf die beiden Ddx17-Isoformen, Ddx17₈₂ und Ddx17₇₂, hin im Western Blot analysiert (Abbildung 14A; Jalal *et al.*, 2007). Nach Knockdown von Ddx5 zeigte sich eine im Vergleich zur Kontrolle auf circa 400% gesteigerte Expression beider Ddx17-Isoformen. Um unspezifische (off-target) Effekte auszuschließen, wurde der Versuch mit einer anderen Ddx5-spezifischen siRNA wiederholt, wobei sich wiederum eine deutliche Steigerung der Ddx17-Expression beobachten ließ (Abbildung 14A, siRNA B). Da der Effekt mit der anfänglichen siRNA (siRNA A) aber größer war, wurde in zukünftigen Experimenten ausschließlich diese siRNA verwendet.

Zur weiteren Untersuchung der Expressionskontrolle von Ddx5 und Ddx17 wurde ein Knock-in-System auf der Basis eines episomalen, EBV-abgeleiteten Expressionssystems angewandt, das zuvor im Rahmen zweier Diplomarbeiten für die Expression von Ddx5 und Ddx17 in unserem Labor etabliert wurde (siehe Thomas Tretter, 2008 und Camilla Broja, 2008). Das System ermöglicht eine durch Doxycyclin induzierbare effiziente Proteinexpression in humanen Lungenkarzinomzellen (H1299) aufgrund einer Selektion der transfizierten Zellen mit Hilfe einer, durch die Plasmide (pRTS-hygro und pRTS-pur; Bornkamm *et al.*, 2005) kodierten doppelten Antibiotikaresistenz (Hygromycin und Puromycin). Es wurden Konstrukte sowohl für die Expression von wildtypi-

schem Ddx5 (pRTS-hygro-Ddx5_{WT-HA}), also auch für die Expression von mutiertem Ddx5 (pRTS-hygro-Ddx5_{DQAD-HA} bzw. pRTS-hygro-Ddx5_{GNT-HA}) und Ddx17 bzw. der einzelnen Ddx17-Isoformen (pRTS-hygro-Ddx17_{HA}, pRTS-hygro-Ddx17_{72-HA} oder pRTS-hygro-Ddx17_{82-HA}) benutzt. Es sei darauf hingewiesen, dass die exprimierten Proteine C-terminal eine Tag-Sequenz (Hämagglutinin-Tag; HA-Tag) tragen, wodurch sie sich nachweisen und auch von den endogenen Proteinen unterscheiden lassen.

Durch die Überexpression von Ddx5 kam es zu einer Abnahme des endogenen Ddx17- (betroffen waren beide Isoformen) und Ddx5-Levels (Abbildung 14B, Spur 2), wobei letzteres auf eine autoregulatorische Aktivität von Ddx5 hindeutet. Ddx5 reguliert daher sowohl die eigene Expression als auch die der Produkte seines paralogen Gens *ddx17*.

Die starke Expression von Ddx5-Mutanten mit Hilfe des EBV-abgeleiteten Expressionssystems ließ hoffen, dass endogenes Ddx5 von seinen Targets verdrängt wird, was Hinweise auf mögliche für die Expressionsregulation erforderlichen biochemischen Aktivitäten geben könnte. Untersucht wurde eine DQAD-Mutante von Ddx5 (mutiert im DEAD-box Motiv /Walker B Motiv) die nicht mehr im Stande ist ATP zu hydrolysieren, aber im Gegensatz zur ebenfalls verwendeten GNT-Mutante (mutiert im ATP-Bindemotiv/Walker A Motiv) noch ATP binden kann. Beiden Mutanten fehlt die ATPase und RNA-Helikase Aktivität (Jalal *et al.*, 2007). Die Überexpression der Ddx5-DQAD-Mutante hat einen, dem Wildtyp vergleichbaren, repressiven Einfluss auf die Expression von endogenem Ddx5/Ddx17 (Abbildung 14B, Spur 3), während die Ddx5-GNT-Mutante keinen solchen Effekt zeigt (Abbildung 14B, Spur 4). Die ATP-Bindung, nicht aber die ATP-Hydrolyse scheinen daher essentiell für die von Ddx5 ausgeübte Expressionskontrolle.

Eine Überexpression von exogenem Ddx17₇₂ und/oder Ddx17₈₂ mit Hilfe des oben beschriebenen EBV-abgeleiteten Expressionssystems führt zu einer deutlichen Abnahme des zellulären Ddx5-Gehalts (Abbildung 14C). Eine gesteigerte Expression von Ddx5 nach Ddx17-Knockdown konnte allerdings nicht beobachtet werden (nicht gezeigte Ergebnisse, siehe auch Jalal *et al.*, 2007), was fraglich erscheinen lässt, ob Ddx17 *in vivo* einen negativen Einfluss auf die Ddx5-Expression ausübt. Weitere Untersuchungen beschränken sich daher auf den Einfluss von Ddx5 auf die eigene und die Expression von Ddx17.

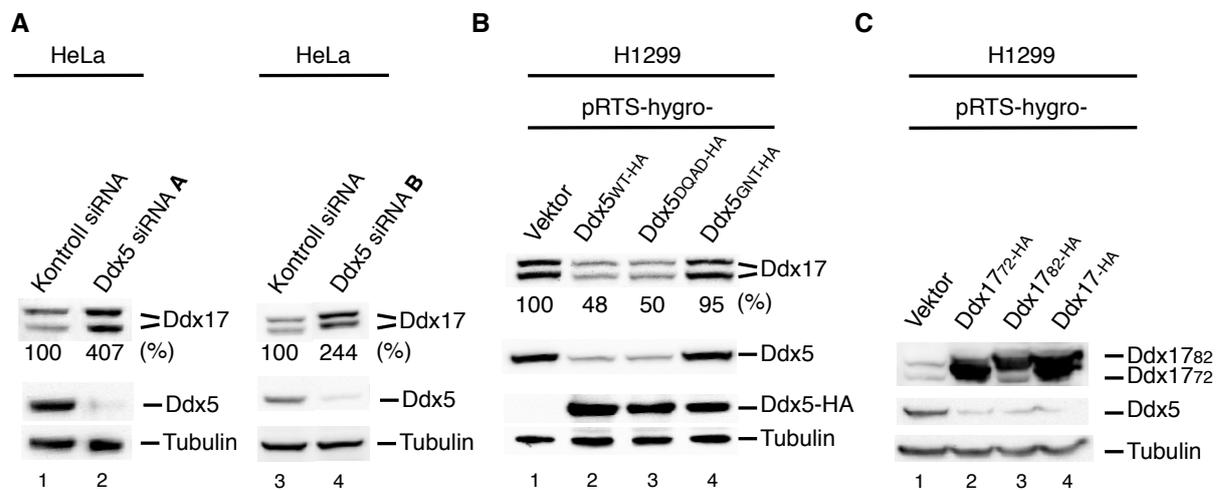


Abbildung 14: Autoregulation und wechselseitige Expressionskontrolle von Ddx5 und Ddx17.

A: Verstärkte Expression von Ddx17 nach Knockdown von Ddx5. Gezeigt ist eine Western Blot Analyse von HeLa-Zellen 48 h nach Transfektion mit zwei verschiedenen Ddx5-siRNAs (Ddx5-siRNA A: Spur 2; Ddx5-siRNA B: Spur 4) sowie einer Kontroll-siRNA (Kontroll-siRNA: Spuren 1 und 3). **B:** Regulation der endogenen Ddx5- und Ddx17-Expression durch exogen-exprimiertes Ddx5. H1299-Zellen wurden für eine konditionale Expression (siehe Methoden) von Ddx5 (Ddx5^{WT}-HA), der ATPase-defekten Mutante Ddx5^{DQAD}-HA und der ATP-bindungsdefekten Mutante Ddx5^{GNT}-HA mit den angezeigten pRTS-hygro-Plasmiden (pRTS-hygro-Vektor, Spur 1; pRTS-hygro-Ddx5^{WT}-HA, Spur 2; pRTS-hygro-Ddx5^{DQAD}-HA, Spur 3; pRTS-hygro-Ddx5^{GNT}-HA, Spur 4) transfiziert und mit Puromycin (1 µg/ml) und Hygromycin (200 µg/ml) für 5 Tage selektiert, bevor die Proteinexpression mit Doxycyclin (0,5 µg/ml) für 48 h induziert wurde. Die Proteine der Gesamtzellextrakte wurden im Western Blot mit entsprechenden Antikörpern detektiert. Der Ddx17-Proteingehalt (in A und B) ist im Verhältnis zur Kontrolle (%) angegeben. **C:** Regulation des endogenen Ddx5 durch exogen-exprimiertes Ddx17. H1299-Zellen wurden für eine konditionale Expression von Ddx17 (Ddx17^{HA}) und dessen einzelnen Isoformen (Ddx17⁷²-HA und Ddx17⁸²-HA) mit den angezeigten pRTS-hygro-Plasmiden (pRTS-hygro-Vektor, Spur 1; pRTS-hygro-Ddx17⁷²-HA, Spur 2; pRTS-hygro-Ddx17⁸²-HA, Spur 3; pRTS-hygro-Ddx17^{HA}, Spur 4) transfiziert und wie in (B) nachgewiesen. Tubulin diente in (A), (B) und (C) als Ladungskontrolle.

Die Unfähigkeit der Ddx5-GNT-Mutante, die Ddx5- und Ddx17-Expression zu beeinflussen, könnte auf einer im Verhältnis zum Wildtyp geänderten Bindungsaffinität zu Upf3 beruhen, und es stellt sich die Frage, ob die ATP-Bindung von Ddx5 für die Komplexbildung mit Upf3B nötig ist. Um dies zu untersuchen, wurden Immunpräzipitationen mit HA-getagtem Ddx5-WT als auch mit den Ddx5-Mutanten (DQAD und GNT) durchgeführt und die Immunpräzipitate anschließend auf gebundene Upf-Proteine hin analysiert. Es

konnte in allen Ko-IP-Experimenten Upf1, Upf2 und Upf3 nachgewiesen werden. Die einzelnen Mutationen scheinen daher keinen Einfluss auf die Ddx5-Upf3B-Komplexbildung zu haben.

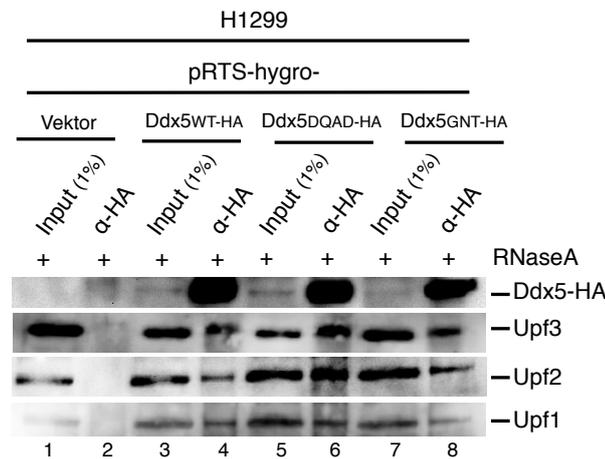


Abbildung 15: Ddx5 wie auch die Mutanten Ddx5DQAD und Ddx5GNT liegen im Komplex mit Upf1, Upf2 und Upf3 vor.

H1299-Zellen wurden nach konditionaler Expression von Ddx5 und den entsprechenden Mutanten (siehe Abbildung 14B) für eine HA-spezifische Immunpräzipitation verwendet und ko-immunpräzipitierte Upf-Proteine im Western Blot mit entsprechenden Antikörpern analysiert.

3.2.3 Untersuchungen zur Expressionsregulation von Ddx17 durch die NMD-Proteine Upf1, Upf2 und Upf3

Um zu untersuchen, ob NMD-Faktoren bei der von Ddx5 ausgeübten Kontrolle der Ddx17-Expression eine Rolle spielen, sollten die Hauptproteine des NMD einzeln in Knockdown-Experimenten auf einen entsprechenden Einfluss hin untersucht werden. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl ein Knockdown von Upf1 als auch von Upf2 oder Upf3 eine gesteigerte Expression von Ddx17 zur Folge hat (Abbildung 16). Vor allem die Abwesenheit von Upf3 bewirkt in etwa eine Verdopplung des zellulären Ddx17-Levels (Abbildung 16C, Spuren 1 und 2), der umgekehrt bei Überexpression von Upf3B um etwa die Hälfte abnimmt (FLAG-Upf3B, Abbildung 16C, Spuren 3 und 4). Dies belegt, dass sowohl Upf1 als auch Upf2 und Upf3 in die Ddx5-abhängige Kontrolle der Ddx17-Expression involviert sind.

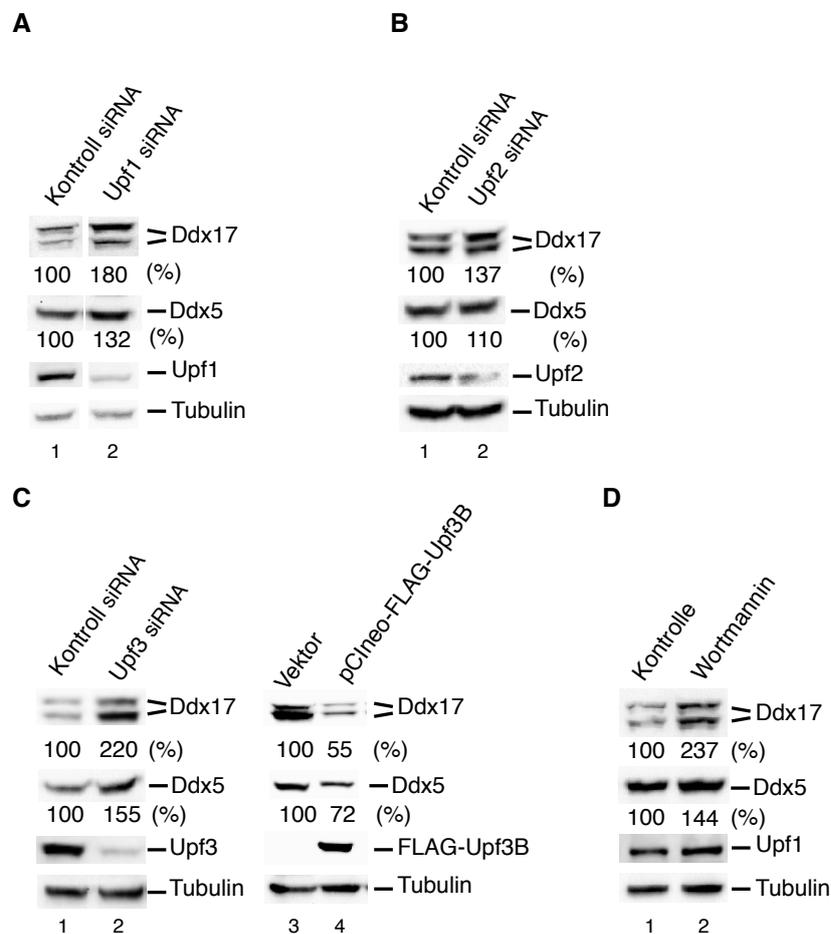


Abbildung 16: Regulation der Expression von Ddx17 durch die NMD-Proteine Upf1, Upf2 und Upf3.

A-C: Einfluss der einzelnen Upf-Faktoren. HeLa-Zellen wurden jeweils mit Kontroll-, Upf1-, Upf2- oder Upf3-siRNA bzw. mit dem Plasmid pCIneo-FLAG-Upf3B-Konstrukt transfiziert und nach 48 h auf die angezeigten Proteine hin im Western Blot mit spezifischen Antikörpern analysiert. **D:** Einfluss von Wortmannin. HeLa-Zellen wurden nach Behandlung mit Wortmannin (10 μ M in 0,5% DMSO; Spur 2) bzw. nach Behandlung mit DMSO (0,5%; Kontrolle, Spur 1) für 48 h im Western Blot auf die angezeigten Proteine hin analysiert. Der Proteingehalt von Ddx5 und von Ddx17 im Verhältnis zur Kontrolle (%) ist angegeben. Tubulin diente als Ladungskontrolle.

Wortmannin inhibiert den NMD-Prozess durch Inhibition der *Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K)-verwandte Kinase* Smg1. Hierdurch wird die Phosphorylierung von Upf1 verhindert und der NMD-Prozess blockiert (Pal *et al.*, 2001; Yamashita *et al.*, 2001; Ohnishi *et al.*, 2003; Boelz *et al.*, 2006). Wie in Abbildung 16D gezeigt, lässt sich auch die

Expression von Ddx17 in HeLa-Zellen durch Wortmannin-Behandlung um circa 100% steigern, was unterstreicht, dass die NMD-Maschinerie wie im PTC-induzierten Abbau von mRNAs auch die Ddx5-gesteuerte Kontrolle der Ddx17-Expression bewerkstelligt. Wie in Absatz 3.2.2 und in Abbildung 14B gezeigt, übt Ddx5 auch eine autoregulatorische Expressionskontrolle aus. Um zu überprüfen, ob hier ebenfalls die NMD-Maschinerie beteiligt ist, wurde auch die Ddx5-Expression nach Knockdown der einzelnen NMD-Schlüsselproteine und Überexpression von Upf3B untersucht. Die Ergebnisse zeigen einen klaren Einfluss der Upf-Proteine auf die Ddx5-Expression, die auch durch Behandlung mit Wortmannin gesteigert werden konnte, wobei die beobachteten Effekte insgesamt schwächer waren als bei Ddx17 beobachtet.

3.2.4 Untersuchungen zum Einfluss von Ddx5, Upf1 und Upf3 sowie der Translation auf die mRNA-Stabilität von Ddx17

Eine Analyse der mRNA-Halbwertszeit von Ddx17 sollte zeigen, ob die Expressionskontrolle von Ddx17 durch Ddx5 auf eine posttranskriptionelle Regulation zurückzuführen ist oder auf eine veränderte mRNA-Syntheserate beruht. Hierzu wurde nach Knockdown von Ddx5 oder Upf1 oder Upf3 in HeLa-Zellen die RNA-Transkription mit Actinomycin D blockiert, um die Halbwertszeit der *Ddx17*-mRNA mittels quantitativer Real-Time RT-PCR zu bestimmen. Zur Quantifizierung wurde die $\Delta\Delta$ -CT-Methode verwendet, wobei sich die Expression des Zielgens (hier Ddx17) auf ein nicht reguliertes endogenes Referenzmolekül (hier 18S rRNA) bezieht. Durch diese Normalisierung wird ein Vergleich der Ddx17-Expression in verschiedenen Proben möglich. Die mRNA-Halbwertszeiten wurden anhand der sich ergebenden Bestgeraden berechnet. Es zeigte sich ein circa zweifacher Anstieg in der mRNA-Halbwertszeit nach Knockdown von Ddx5, Upf3 oder Upf1, was zeigte, dass die Expression des *ddx17*-Gens posttranskriptionell durch Regulation der mRNA-Halbwertszeit und nicht durch eine gesteigerte mRNA-Synthese reguliert wird (Abbildung 17A).

Inhibiert man die Translation einer mRNA, verhindert man auch deren Abbau durch den NMD, da ein vorzeitiges Stoppkodon erst durch das Zusammenspiel der NMD-Proteine mit der Translationsmaschinerie identifiziert werden kann (Belgrader *et al.*, 1993; Car-

ter *et al.*, 1995; Thermann *et al.*, 1998). Deshalb wurde im Weiteren bestimmt, ob die Regulation der *Ddx17*-mRNA ebenfalls von der Translation abhängt. Durch Behandlung von HeLa-Zellen mit dem Translationsblocker Cycloheximide konnte die Halbwertszeit der *Ddx17*-mRNA tatsächlich etwa verdoppelt werden und entsprach somit der, bei einem Knockdown von Ddx5, Upf1 bzw. von Upf3, beobachteten Halbwertszeit (Abbildung 17B).

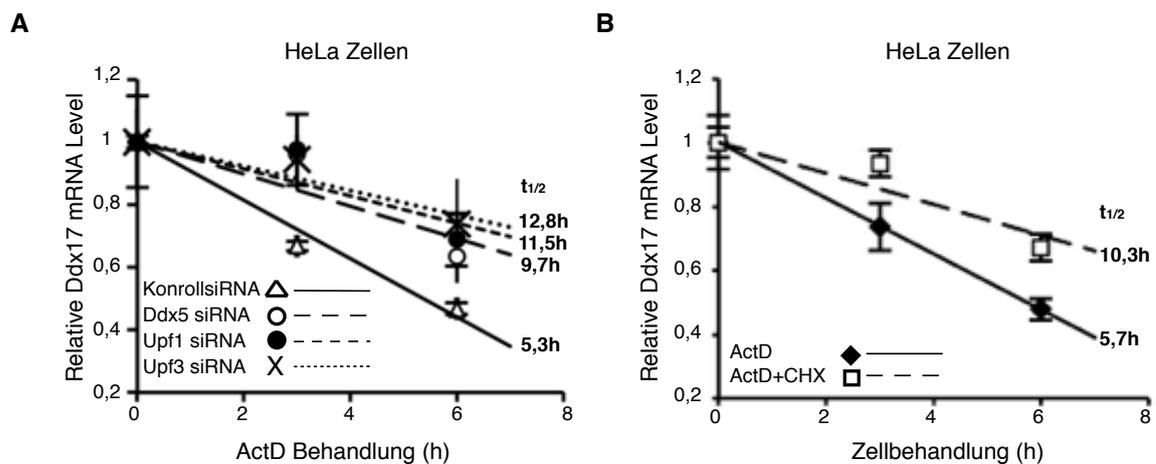


Abbildung 17: Einfluss von Ddx5, Upf1 und Upf3 sowie der Translation auf die *Ddx17*-mRNA-Halbwertszeit.

A: Einfluss von Ddx5, Upf1 und Upf3. HeLa-Zellen wurden mit Kontroll-, Ddx5- Upf1- oder Upf3-siRNA transfiziert und 48 h später für die angegebenen Zeiten mit Actinomycin D (ActD; 5 µg/ml) inkubiert. Nach Isolation der Gesamt-Zell-RNA wurde für jeden Zeitpunkt der zelluläre *Ddx17*-mRNA-Level bezogen auf 18S rRNA mittels Real-time RT-PCR ermittelt (n=2-3; $t_{1/2}$ = berechnete Halbwertszeit) Die mRNA-Halbwertszeiten wurden anhand der Bestgeraden berechnet. **B:** Einfluss der Translation. HeLa-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit Actinomycin D bzw. mit Actinomycin D und Cycloheximid (CHX; 100 µg/ml) inkubiert und der *Ddx17*-mRNA-Gehalt wie in (A) analysiert.

3.3 Untersuchungen zur Expressionsregulation von Smg5 durch Ddx5 und die Schlüsselproteine des NMD

Die bisherigen Ergebnisse müssen dahingehend gedeutet werden, dass Ddx5 durch Aktivierung der NMD-Maschinerie die Expression von Ddx17 kontrolliert. Dies legt die Vermutung nahe, dass auch noch andere normale mRNAs durch den Ddx5-gesteuerten Mechanismus reguliert werden. Andere Untersuchungen haben gezeigt, dass physiologische mRNAs mit einer langen 3'untranslatierten Region (3'UTR) bevorzugt Substrate für den NMD sind, wobei genauere NMD-auslösende Merkmale oder Faktoren bisher nicht definiert werden konnten (Mendell *et al.*, 2004; He *et al.*, 2003; Rehwinkel *et al.*, 2005; Wittmann *et al.*, 2006; Rodriguez-Gabriel *et al.*, 2006). Als eine Möglichkeit wird diskutiert, dass aufgrund der Länge der 3'UTR das normale Stoppkodon vom Translationsapparat als vorzeitig interpretiert wird (Muhrad und Parker, 1999; Kebaara und Atkin, 2009). 3'UTRs haben einen wesentlichen Einfluss auf die Expression eukaryontischer Gene, sie können regulierend auf die Translation, die Stabilität und auch die subzelluläre Lokalisation ihrer mRNAs wirken (Kuersten und Goodwin, 2003). mRNAs von *S. cerevisiae* und *D. melanogaster* besitzen eher kurze 3'UTRs mit einer durchschnittlichen Länge von 100 bis 330 Nukleotiden (Graber *et al.*, 2002; Hoskins *et al.*, 2002). Die 3'UTRs humaner mRNAs sind mit mehr als 500 Nukleotiden im Durchschnitt länger als die von *S. cerevisiae* und *D. melanogaster*. Überdurchschnittlich lange 3'UTRs können einige tausend Nukleotide lang sein (Mazumder *et al.*, 2003), was auch auf Ddx17 zutrifft, für dessen 3'UTR eine Länge von 2455 Nukleotiden (nt) gefunden wurde. Interessant für die weiteren Untersuchungen war die Tatsache, dass für Smg5 (*suppressor with morphogenetic effect on genitalia 5*), einem essentiellen NMD-Faktor, ein 3'UTR-abhängiger Abbau der mRNA durch die NMD-Maschinerie in einer Feed-back regulatorischen Weise beschrieben wurde (Mendell *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2011; Yepiskoposyan *et al.*, 2011). Da das *Smg5*-Transkript ebenfalls eine relativ lange 3'UTR (1342 nt) aufweist, sollte überprüft werden, ob eventuell auch Ddx5 in die Kontrolle dieser mRNA involviert ist. Smg5 bindet im Komplex mit Smg6 und Smg7 an phosphoryliertem Upf1, was wiederum die Dephosphorylierung von Upf1 durch die Protein-Phosphatase 2A (PP2A) (Ohnishi *et al.*, 2003) sowie die Deadenylierung und den exonukleolitischen Abbau der mRNA herbeiführt (Unterholzner und Izaurralde, 2004; Mühlemann *et al.*, 2008).

Durch Knockdown von Ddx5 oder Ddx5 und Ddx17 (Ddx5+17) sowie von Upf1 oder Upf3 sollte diese Möglichkeit überprüft werden. Wie in Abbildung 18 gezeigt, kam es nach Runterregulation der einzelnen Proteine in HeLa-Zellen sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene zu einer erhöhten Smg5-Genexpression. Vor allem beim gleichzeitigen Knockdown von Ddx5 und Ddx17 war die Expression von Smg5 deutlich erhöht, möglicherweise ein Hinweis auf eine redundante Funktion von Ddx5 und Ddx17 bei diesem Prozess. Der Anstieg der *Smg5*-mRNA wurde mittels Real-time RT-PCR nachgewiesen. Das Ergebnis ist als sogenannter „*Fold Change*“ dargestellt, worunter man das Verhältnis der normalisierten Expressionsrate des Gens in der Testprobe, hier Smg5, zu der normalisierten Expressionsrate des Gens in der Kontrollprobe versteht. Als nicht regulierte endogene Referenz-mRNA wurde in diesen Versuchen das „Haushaltsgen“ GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) verwendet.

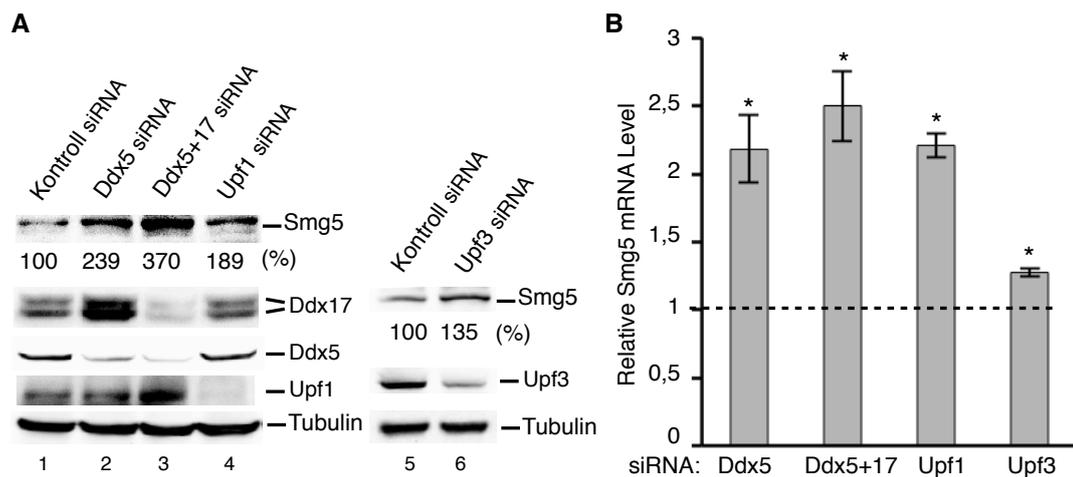


Abbildung 18: Ddx5 reguliert die Expression von Smg5.

A: Analyse auf Proteinebene. Western Blot Analyse von Kontroll- (Spuren 1 und 5) oder Ddx5- (Spur 2) oder Ddx5+Ddx17- (Spur 3) oder Upf1- (Spur 4) oder Upf3-siRNA (Spur 6) behandelten HeLa-Zellen 48 h nach Transfektion. Tubulin diente als Ladungskontrolle. Der Smg5-Proteingehalt ist im Verhältnis zur Kontrolle (%) angegeben. **B:** Analyse auf mRNA-Ebene. In parallel zu (A) durchgeführten Experimenten wurde Gesamt-Zell-RNA isoliert und der jeweilige zelluläre Smg5-mRNA-Level bezogen auf GAPDH mittels Real-time RT-PCR ermittelt (n=3; *p<0,05) Die relative Veränderung der Genexpression nach Knockdown der einzelnen Proteine bezieht sich auf Kontroll-siRNA behandelte Zellen (gestrichelte Linie).

Smg5 gehört zu einer Gruppe von Transkripten, die laut einer früheren Arbeit, durch einen alternativen, Upf3-unabhängigen Zweig des NMD reguliert werden (Chan *et al.*, 2007). Da die bisherigen Ergebnisse aber auf eine essentielle Funktion von Upf3B bei der Ddx5-abhängigen Regulation hindeuten, sollte dessen Rolle bei der Kontrolle der *Smg5*-mRNA näher untersucht werden. Wie in den Abbildungen 18 und 19 zu sehen, konnte durch Knockdown von Upf3 nur eine schwache Steigerung (Abbildung 18, Spur 6), bei Überexpression allerdings eine deutliche Inhibierung der Smg5-Expression beobachtet werden (Abbildung 19, Spur 2). Mehr noch, die Überexpression der Upf3B-Deletionsmutanten Upf3B₋₁₋₂₇₀ (bindet nicht an Ddx5) und/oder Upf3B₋₂₇₀₋₄₇₀ (bindet kein Upf2) führte zu einer, um das zwei- bis dreifach gesteigerten Smg5-Expression (Abbildung 19, Spuren 3-6). Damit konnte die Abhängigkeit der Smg5-Regulation von Upf3 und Ddx5/Ddx17 gezeigt werden.

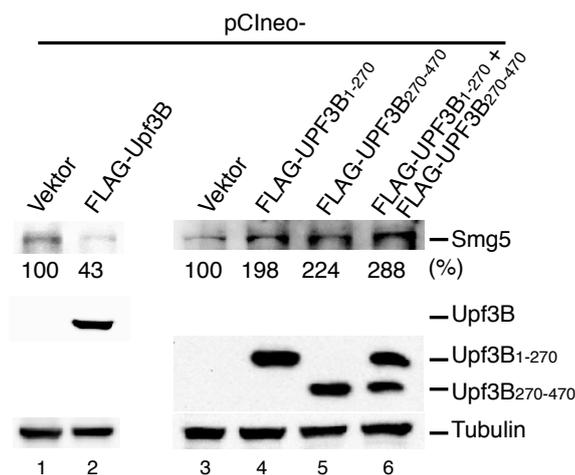


Abbildung 19: Einfluss von Upf3B auf die Expression von Smg5.

HeLa-Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, die entweder für FLAG-getaggttes Upf3B (pCIneo-FLAG-Upf3B; Spur 2), für die Upf3B-Deletionsmutanten (pCIneo-FLAG-Upf3B₋₁₋₂₇₀ und/oder pCIneo-FLAG-Upf3B₋₂₇₀₋₄₇₀; Spuren 4-6) oder nur für den FLAG-Tag (Vektor; Spuren 1 und 3) kodieren. Nach 48 h wurden die Gesamtzellextrakte im Western Blot auf die angezeigten Proteine hin analysiert. Der Smg5-Proteingehalt ist im Verhältnis zur Kontrolle (%) angegeben. Tubulin diente als Ladungskontrolle.

3.4 Ddx5 reguliert sich selbst, Ddx17 und Smg5 über Bindung an die jeweilige 3'UTR

3.4.1 Untersuchungen zum Einfluss der 3'UTR von Ddx17 bzw. von Smg5 auf ihre Expressionsregulation

Wie schon erwähnt besitzen die *Ddx17*- und die *Smg5*-mRNA eine lange 3'UTR, die als Signal für den Ddx5-gesteuerten Abbau fungieren könnte. Um dies zu untersuchen, wurde ein entsprechender Reporter-Assay etabliert. Hierzu wurde an das 3'Ende der EGFP-cDNA-Sequenz jeweils die in cDNA umgeschriebene 3'UTR-Sequenz von Ddx17, Smg5 und Tram1 (*translocating chain-associated membrane protein 1*, ein Glykoprotein, dass mit seinen Transmembrandomänen das endoplasmatische Retikulum durchspannt; Görlich *et al.*, 1992) kloniert (Abbildung 20A). Die 3'UTR von Tram1 diene als Negativkontrolle, da Tram1, wie von Singh *et al.* (2008) gezeigt, trotz einer langen (1494 nt) 3'UTR nicht unter NMD-Kontrolle steht. Es wurde der Einfluss von Ddx5/Ddx17 bzw. von Upf1 auf die Expression der entsprechenden Reporterkonstrukte in HeLa-Zellen untersucht. Ähnlich wie bei der *Ddx17*- und *Smg5*-mRNA (Abbildungen 14, 16 und 18) führte ein Knockdown von Ddx5/Ddx17 oder Upf1 zu einer Steigerung des EGFP-Levels um den Faktor zwei bis drei, wenn die *EGFP*-mRNA mit der 3'UTR von Ddx17 oder Smg5 verknüpft war. Auch die zellulären Level der entsprechenden *EGFP*-mRNAs stiegen deutlich an, höchstwahrscheinlich weil durch die niedrigen zellulären Ddx5/Ddx17- bzw. Upf1-Konzentrationen der durch die 3'UTR induzierte Abbau reduziert war. Das EGFP-3'UTR-Tram1-Konstrukt zeigte dagegen keinen Effekt, d.h. sowohl nach Knockdown von Ddx5/Ddx17 noch von Upf1 ließ sich eine gesteigerte Genexpression nachweisen. Diese Ergebnisse belegen somit, dass die 3'UTR von Ddx17 und Smg5 an der Aktivierung des NMD durch Ddx5 beteiligt ist.

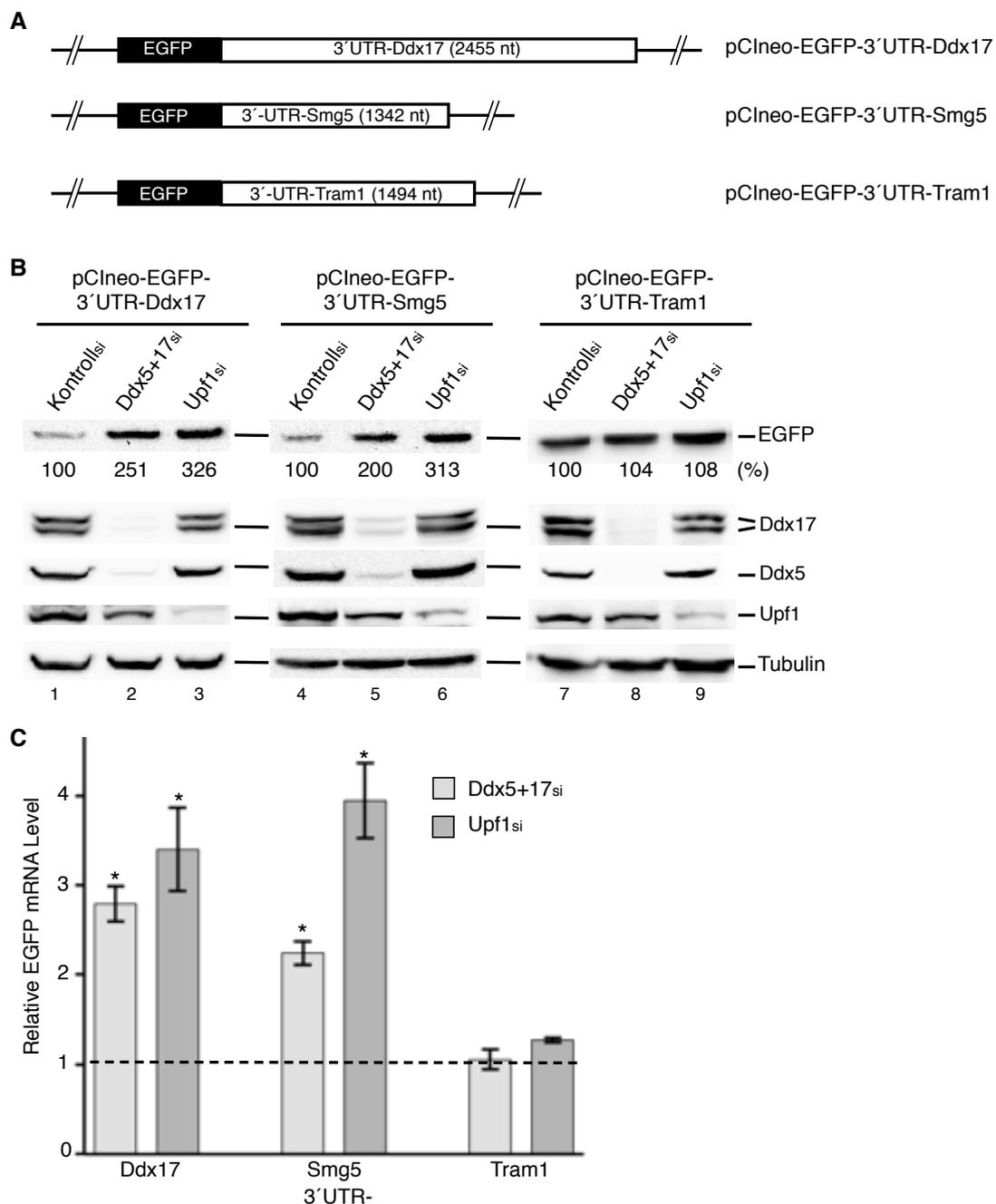


Abbildung 20: Die 3'UTR der Ddx17- und Smg5-mRNA ist essentiell für die Expressionskontrolle durch Ddx5 und Upf1.

A: Schematische Darstellung der relevanten Bereiche der verwendeten EGFP-Reporterkonstrukte mit Angabe von Herkunft und Größe (in Nukleotiden; nt) der fusionierten 3'UTRs. **B:** Analyse auf Proteinebene. Western Blot Analyse von HeLa-Zellen, die mit den in (A) dargestellten Reporter-Konstrukten und in der Folge mit der jeweiligen siRNA transfiziert wurden, auf die angezeigten Proteine hin. Tubulin diente als Ladungskontrolle. Die EGFP-Proteingehalt ist im Verhältnis zur Kontrolle (%) angegeben. **C:** Analyse auf mRNA-Ebene. In parallel zu (B) durchgeführten Experimenten wurde Gesamt-Zell-RNA isoliert und der mRNA-Level des jeweiligen EGFP-Reporters bezogen auf GAPDH mittels Real-time RT-PCR ermittelt ($n=2-3$; $*p<0,005$). Die relative Veränderung der Genexpression nach Knockdown von Ddx5+17 bzw. Upf1 bezieht sich auf Kontroll-siRNA behandelte Zellen (gestrichelte Linie).

Hieraus ergibt sich die Frage, ob Ddx5 direkt mit der 3'UTR dieser Transkripte wechselwirkt. Parallel zu dieser Doktorarbeit wurde daher in einer von mir mitbetreuten Diplomarbeit mittels RNA-Immunpräzipitation (RIP) untersucht, ob es *in vivo* eine präferentielle Bindung von Ddx5 an bestimmte mRNAs gibt (Diplomarbeit Benjamin Stein, 2011). Tatsächlich zeigte sich, dass Ddx5 mit einer 80- bis 200-fach höheren Affinität an *Ddx17*-, *Ddx5*- und *Smg5*-mRNA bindet, als zum Beispiel an *GAPDH*- aber auch *Tram1*-mRNA. Weitere Experimente sollten daher klären, ob diese Wechselwirkung tatsächlich mit der 3'UTR dieser mRNAs stattfindet. Hierzu wurden HeLa-Zellen mit den EGFP-3'UTR-Konstrukten (pCIneo-EGFP-3'UTR-Smg5 oder pCIneo-EGFP-3'UTR-Tram1) transfiziert und einer Ddx5-spezifischen RIP unterworfen. Aus den Immunpräzipitaten wurde die RNA extrahiert und nach Umschreibung in cDNA folgte eine halbquantitative RT-PCR der untersuchten EGFP-Reporter-mRNAs. Die Menge der ko-präzipitierten mRNAs wurde dann in Bezug gesetzt zu der in der Zelle vorhandenen Gesamtmenge.

Wie in Abbildung 21 gezeigt, ergab sich für die 3'UTR-Reporter-mRNA von Smg5, dass 1,86% dieser mRNA in der Zelle an Ddx5 gebunden vorlagen, während es von der *EGFP-3'UTR-Tram1*-mRNA nur 0,03% waren. Diese circa 60-fach höhere Affinität belegt eine präferentielle Bindung von Ddx5 an die *Smg5*-3'UTR. Interessant ist in diesem Zusammenhang das RIP-Experimente mit den Renilla-Luziferase/ β -Globin-Konstrukten (siehe Absatz 3.2.1) keine erhöhte Affinität von Ddx5 zu der PTC-haltigen mRNA ergeben haben (nicht gezeigte Ergebnisse) entsprechend dem Befund, dass Ddx5 den Abbau dieser mRNA mit einem vorzeitigen Stoppkodon nicht induziert (siehe Abbildung 13).

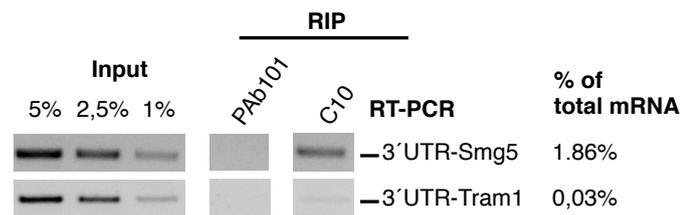


Abbildung 21: Präferentielle Bindung von Ddx5 an die 3'UTR von Smg5.

Nach Transfektion von HeLa-Zellen mit den Reporterkonstrukten pCIneo-EGFP-3'UTR-Smg5 oder pCIneo-EGFP-3'UTR-Tram1 wurden Ddx5-spezifische RIP-Experimente durchgeführt, wobei PAb101-Antikörper als Kontrolle dienten. Aus den Immunpräzipitaten wurde mittels C10-spezifischer Peptidelution Ddx5-gebundene RNA gewonnen und die EGFP-spezifischen mRNAs mittels halbquantitativer RT-PCR bestimmt. Gezeigt ist die Agarose-gelelektrophoretische Analyse der RT-PCR-Produkte der RIP und von drei Aliquots der Gesamt-RNA (Input). Die mRNA-Menge in den Immunpräzipitaten ist als Prozent (%) der zellulären Gesamt-Menge angegeben.

3.4.2 Untersuchungen zum Einfluss der 3'UTR auf die eigene Expressionsregulation von Ddx5

Wie in Abbildung 14B zu sehen, kommt es in H1299-Zellen bei exogener Überexpression von Ddx5 zu einer deutlichen Abnahme des endogenen Proteins. Um zu untersuchen, ob bei dieser Autoregulation die 3'UTR ebenfalls beteiligt ist, wurde in Analogie zu obigen Experimenten, die EGFP-cDNA mit der 3'UTR-Sequenz von Ddx5 verknüpft. Diese 3'UTR-Sequenz wurde von Rössler *et al.*, 2000 beschrieben und ist (nur) 301 nt lang. Durch Knockdown von Ddx5/Ddx17 bzw. von Upf1 wurde deren Einfluss auf die Expression dieses Reporterkonstrukts untersucht.

In Abbildung 22 ist zu sehen, dass sowohl Ddx5/Ddx17 als auch Upf1 die Expression dieses Konstruktes über die 3'UTR beeinflussen. Ddx5 scheint sich also selbst mit Hilfe der NMD-Maschinerie über die eigene 3'UTR zu regulieren.

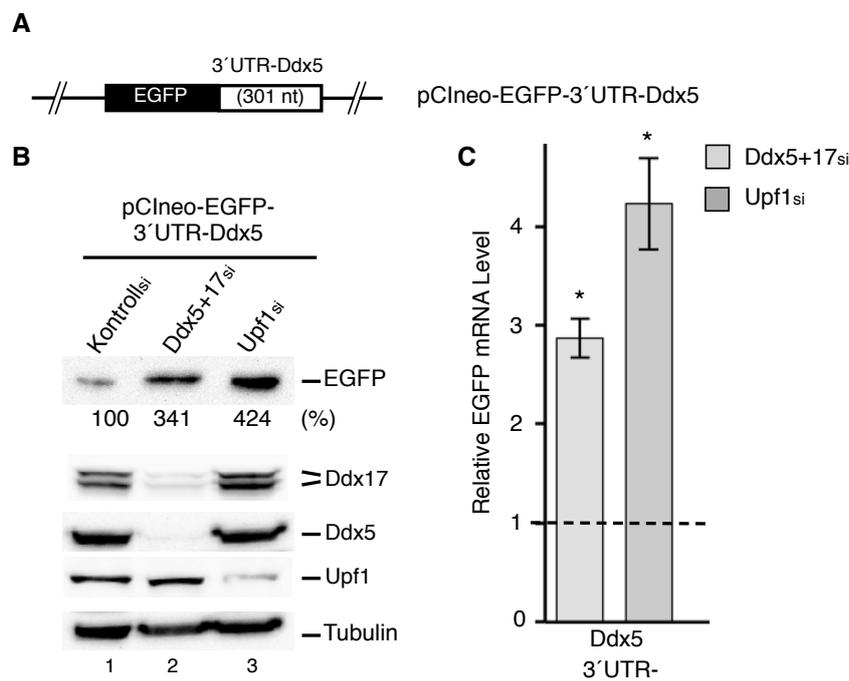


Abbildung 22: Autoregulation von Ddx5 über die eigene 3'UTR.

A: Schematische Darstellung des verwendeten pCIneo-EGFP-3'UTR-Ddx5 Reporterkonstrukts mit Angabe der Größe der 3'UTR in Nucleotiden (nt). **B:** Analyse auf Proteinebene. Western Blot Analyse von HeLa-Zellen, die mit dem pCIneo-EGFP-3'UTR-Ddx5 Reporter-Konstrukt und in der Folge mit der jeweiligen siRNA transfiziert wurden. Tubulin diente als Ladungskontrolle. Die EGFP-Proteingehalt ist im Verhältnis zur Kontrolle (%) angegeben. **C:** Analyse auf mRNA-Ebene. In parallel zu (B) durchgeführten Experimenten wurde Gesamt-Zell-RNA isoliert und der mRNA-Level des EGFP-Reporters bezogen auf GAPDH mittels Real-time RT-PCR ermittelt (n=3; *p<0,005). Die relative Veränderung der Genexpression nach Knockdown von Ddx5+17 bzw. Upf1 bezieht sich auf Kontroll-siRNA behandelte Zellen (gestrichelte Linie).

3.5 Untersuchungen zur Interaktion vom großen T-Antigen von *Simian Virus 40* mit Upf3

Ein weiterer interessanter Aspekt bei der gefundenen Komplexbildung zwischen Ddx5 und den Proteinen des NMD ergibt sich aus der immunologischen Verwandtschaft zwischen dem großen Tumorantigen (T-Ag) des *Simian Virus 40* (SV40) und Ddx5. Obwohl beide

Proteine RNA-Helikaseaktivität besitzen (Hirling *et al.*, 1989; Scheffner *et al.*, 1989), zeigen sie neben der gemeinsamen Antikörperbindungsstelle für den monoklonalen Antikörper PAb204 (Hirling *et al.*, 1989) keine weitere Aminosäuresequenz-Homologie, was auf eine zufällige immunologische Kreuzreaktion hindeuten könnte. Andererseits ist es aber auch denkbar, dass beide Proteine eine gleiche oder ähnliche Funktion in der Zelle haben, in die die Antikörperbindungsstelle involviert ist. Hierzu passt, dass eine Bindung von T-Ag an Polysomen berichtet wurde (Michel und Schwyzer, 1982).

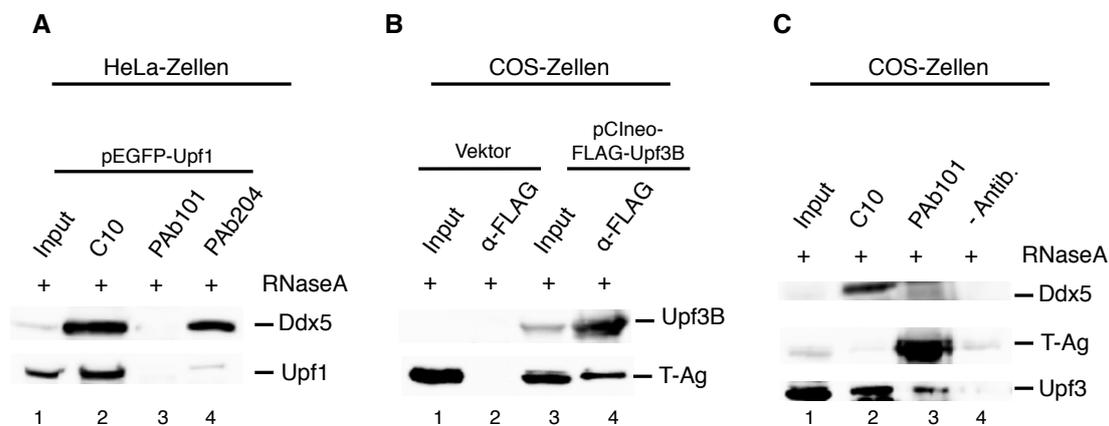


Abbildung 23: Das große T-Antigen von *SV40* interagiert mit Upf3B.

A: Der Ddx5-spezifische monoklonale Antikörper PAb204 erkennt keine Ddx5-Upf-Komplexe. HeLa-Zellen wurden mit dem EGFP-Upf1 exprimierenden Plasmid (pEGFP-Upf1) transfiziert und nach 48 h mit dem Antikörper C10 (Spur 2) oder dem Kontroll-Antikörper PAb101 (Spur 3) oder dem Antikörper PAb204 (Spur 4) in Anwesenheit von RNase A immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden im Western Blot auf die angezeigten Proteine hin analysiert. **B:** *SV40* T-Antigen ko-immunpräzipitiert mit Upf3B. COS1-Zellen wurden mit dem Plasmid pCIneo-FLAG-Upf3B (Spuren 3 und 4) oder mit einem entsprechenden Leervektor (Vektor; Spuren 1 und 2) transfiziert. Nach 48 h wurden in Anwesenheit von RNase A Immunpräzipitationsexperimente mit einem FLAG-spezifischen Antikörper durchgeführt und die Immunpräzipitate im Western Blot mit entsprechenden Antikörpern analysiert. **C:** Upf3 ko-immunpräzipitiert mit *SV40* T-Antigen. Ddx5 bzw. T-Ag wurde aus COS1-Zellextrakten mit dem Antikörper C10 (Spur 2) oder PAb101 (Spur 3) unter RNase A-Behandlung immunpräzipitiert und assoziierte Upf3-Proteine im Western Blot detektiert. Ein ohne Antikörper durchgeführtes Experiment diente als Kontrolle (-Antib., Spur 4).

Erste Ergebnisse haben gezeigt, dass der kreuzreagierende Antikörper PAb204 den Ddx5-Upf-Komplex nicht erkennt oder zu verhindern scheint (Abbildung 23A). Exemplarisch wurde hier eine Ko-IP mit überexprimiertem EGFP-Upf1 gezeigt, da ähnliche Experimente mit Upf3 an technischen Schwierigkeiten scheiterten. Es sollte daher in Ko-Immünpräzi-

itationsexperimenten getestet werden, ob auch T-Ag im Komplex mit Upf3 vorliegt. Hierzu wurden COS1-Zellen, die aus Nierengewebe von Grünen Meerkatzen (*Cercopithecus aethiops*) gewonnen wurden und intaktes T-Ag exprimieren (Gluzman, 1981), benutzt. Interessanterweise konnte tatsächlich eine Komplexbildung zwischen T-Ag und Upf3 beobachtet werden. Welche Rolle dieser Komplex in der Zelle spielt, bleibt abzuwarten (Abbildung 23B und C).

4 Diskussion

In eukaryontischen Zellen wird die Genexpression nicht nur auf der Ebene der Transkription geregelt, sondern auch posttranskriptionell, z.B. durch die Kontrolle der mRNA-Halbwertszeit oder der Translation. Ein geregelter Abbau von defekten und normalen mRNAs kann durch die NMD-Maschinerie erfolgen, von der man jedoch zunächst angenommen hatte, dass sie nur für die Entfernung von aberranten mRNAs mit verfrühten Stoppkodons zuständig ist (was ihr auch den Namen gegeben hat). Während der eigentliche Abbaumechanismus für defekte und normale mRNAs im Prinzip gleich ist, unterscheiden sich beide Prozesse in der Art der Substraterkennung. Beim Abbau von PTC-haltigen mRNAs ist der EJC der entscheidende Faktor, der über die Untereinheit Upf3 (unter Mit Hilfe von Upf2) das Signal zur mRNA-Degradation an die NMD-Maschinerie weiterleitet. Für normale mRNAs ist dieser initiale Schritt noch weitgehend unverstanden. Bis heute wurde kein zum EJC-analoger Faktor beschrieben, der an die mRNA gebunden mit Upf3 interagiert und so den Abbau von normalen mRNAs in Gang setzen könnte. In dieser Arbeit konnte Ddx5 als ein solcher EJC-analoger Faktor beschrieben werden, der mit den drei Hauptkomponenten des NMD, Upf1, Upf2 und Upf3 einem stabilen Komplex bildet (Abbildung 5). Es konnte gezeigt werden, dass über diese Interaktion bestimmte Substrat-mRNAs mit Hilfe der NMD-Maschinerie abgebaut werden, nämlich die *Ddx5*-mRNA selbst sowie die *Ddx17*- und die *Smg5*-mRNA.

Eine genauere Analyse der Komplexbildung zwischen Ddx5 und den Upf-Proteinen ergab, dass wie beim EJC, der Kontakt durch Upf3 vermittelt wird (Abbildung 8). Dass Ddx5 mit Upf3 physikalisch wechselwirkt, war zunächst überraschend, da in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* Dbp2, das Hefehomolog des humanen Ddx5, mit Upf1 interagiert (Bond *et al.*, 2001). Tatsächlich unterliegen auch in *S. cerevisiae* bestimmte mRNAs einem beschleunigten Abbau, wozu ebenfalls Upf1, Upf2 und Upf3 und zusätzlich definierte Sequenzelemente, sogenannte „downstream sequence elements“ (DSE; 3' von einem PTC

gelegen) erforderlich sind (Czaplinski *et al.*, 1999; Gonzalez *et al.*, 2001; Ruiz-Echevarria *et al.*, 1998). Es gibt allerdings auch Hinweise, dass der Abstand zwischen Poly(A)-Schwanz und Stoppkodon entscheidend für die Erkennung von NMD-Substraten ist (Muhlrads und Parker 1999).

Die näheren Untersuchungen der physikalischen Wechselwirkung zwischen Ddx5 und Upf3 zeigen, dass sie durch die zusätzliche Anwesenheit von Upf1 und Upf2 stabilisiert wird und auf den N- und C-terminalen Teil von Ddx5 beziehungsweise von Upf3 limitiert ist (Abbildung 9 bis 11). Sie interferiert auch nicht mit der Bindung von Upf3 an Upf2, wie auch für die Upf3-EJC-Interaktion berichtet. Der C-Terminus von Upf3 interagiert zwar auch mit dem EJC, eine Eingrenzung des für Ddx5 zuständigen Bindungsbereich ergab aber, dass er nicht mit dem für den EJC beschriebenen übereinstimmt. Nichtsdestotrotz scheinen Ddx5 und der EJC um die Bindung an Upf3 zu konkurrieren, da EJC-Proteine, vertreten z.B. durch MAGOH, in Abwesenheit von RNA nicht mit Ddx5 ko-immunpräzipitieren (Abbildung 6). Außerdem wurde in dieser Arbeit auch gezeigt, dass Ddx5 keinen Einfluss auf die Stabilität von PTC-haltigen mRNAs ausübt (Abbildung 13), was ebenfalls impliziert dass sich eine gleichzeitige Bindung von Upf3 an Ddx5 und an den EJC ausschließt und es sich hier um einen alternativen Weg des NMD handelt.

Folgerichtig wurde danach die Fähigkeit von Ddx5 analysiert die NMD-Maschinerie auf physiologische Transkripte zu lenken und deren Abbau zu beschleunigen, vorausgesetzt Ddx5 interagiert mit solchen mRNAs in geeigneter Art und Weise. In der Tat konnten drei Substrat-mRNAs, die durch Ddx5 in Kooperation mit den NMD-Faktoren Upf1, Upf2 und Upf3 reguliert werden, identifiziert werden: *Ddx5*, *Ddx17* und *Smg5*. Frühere Ergebnisse hatten bereits gezeigt, dass Ddx5 einen negativen Einfluss sowohl auf die eigene Expression als auch auf die Expression von *Ddx17* hat (Abbildung 14). Allerdings wurden diese Beobachtungen dahingehend interpretiert, dass diese Ddx5-vermittelte negative Expressionskontrolle zu mindestens zum Teil auf Ebene des Spleißens erfolgt. So nimmt der Anteil an unvollständig gespleißten prä-mRNAs ab, wenn der Level an endogenem Ddx5 in der Zelle z.B. durch Knockdown gesenkt wird (Jalal *et al.*, 2007). Allerdings konnte nicht gezeigt werden, dass in Abwesenheit von Ddx5 die Effizienz des Spleißens selbst erhöht ist. Hier konnte ein eindeutiger Anstieg (zweifach) der *Ddx17*-mRNA-Halbwertszeit nach Ddx5-Knockdown nachgewiesen werden (Abbildung 17). Das und die Abhängigkeit der

Halbwertszeit von Upf1, Upf2, Upf3 und Wortmannin belegen (Abbildung 16), dass die Degradation der *Ddx5*- und *Ddx17*-mRNA durch die Ddx5-aktivierte NMD-Maschinerie erfolgt.

Der NMD in Säugern findet größtenteils während der ersten Runde der Translation statt, und in Übereinstimmung mit dieser Tatsache, konnte gezeigt werden, dass Ddx5 bevorzugt mit mRNPs interagiert, an die CBP80 gebundenen ist (Abbildung 6). CBP80 bildet zusammen mit CBP20 den „*cap-binding-complex*“ (CBC) an der m⁷G-mRNA-Kappe, der sich bereits im Zellkern assembliert. Er veranlasst hier die Rekrutierung der U1 snRNPs an die prä-mRNA und in seiner Abwesenheit kann der Prozess des Spleißens und auch der Export der prozessierten RNA ins Zytoplasma nicht stattfinden (Topisirovic *et al.*, 2011). Neuere Ergebnisse zeigen, dass CBP80 den NMD verstärkt, in dem es die Kommunikation zwischen dem terminierenden Ribosom am PTC und dem EJC erleichtert (Hwang *et al.*, 2010). Nach der ersten Runde der Translation wird der CBC größtenteils durch einen zytoplasmatischen „*cap-binding-complex*“, auch als eukaryotischer Initiationsfaktor eIF4 (bestehend aus eIF4A, eIF4B, eIF4E und eIF4G; Gingras *et al.*, 1999) bezeichnet, ausgetauscht. Dass Ddx5-gebundene mRNAs erst seit kurzer Zeit im Zytoplasma vorliegen, wird deutlich durch die Tatsache, dass der Anteil an ko-präzipitiertem PABPN1 den von PABPC1 in den mit Ddx5 ko-präzipitierten mRNPs deutlich überwiegt. So findet man PABPN1, ein hoch affines und spezifisches RNA-Bindeprotein, vorwiegend im Zellkern, von wo aus es an den Poly(A)-Schwanz einer mRNA gebunden ins Zytoplasma wechseln kann (Krause *et al.*, 1994; Schul *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1999; Calado *et al.*, 2000). Hier wird es wahrscheinlich aufgrund von Konzentrationsunterschieden von PABPC1 verdrängt (Nietfeld *et al.*, 1990). Der geringere Anteil der über Ddx5 immunpräzipitierten mRNPs, der eIF4E und auch eIF4G (anstelle von CTIF; Kim *et al.*, 2009) enthält, scheint dem Abbau in der ersten Runde entgangen zu sein, könnte aber dennoch in späteren Translationsrunden von der NMD-Maschinerie abgebaut werden. Eine Aktivierung des NMD auch in späteren Translationsrunden wurde zunächst nur für die Bäckerhefe (Gao *et al.*, 2005) angenommen. In humanen Zellen wurden eIF4E-gebundene mRNAs dagegen bislang als NMD-immun betrachtet (Ishigaki *et al.*, 2001). Allerdings zeigen neueste Untersuchungen, dass dies nicht der Fall ist. Vielmehr kann danach CBP80 schon vor der ersten Runde durch eIF4E ersetzt und eine eIF4E-gebundene mRNA sogar noch in späteren Translationsrunden durch den NMD abgebaut werden (Rufener und Mühlemann, 2013; Durand

und Lykke-Andersen, 2013).

Die Ddx5-vermittelte Expressionskontrolle von Smg5 (Abbildung 18) ist von besonderem Interesse, da Smg5 als essentieller NMD-Faktor durch eben diesen Prozess über einen Feedback Mechanismus reguliert wird (Anders *et al.*, 2003; Chiu *et al.*, 2003; Yepiskoposyan *et al.*, 2011). Wie für andere NMD-sensitive Transkripte wurde die lange 3'UTR der *Smg5*-mRNA als NMD-induzierendes Merkmal identifiziert. Da aber andere mRNAs mit ähnlich langer 3'UTR NMD-resistent sind, war das eigentliche Erkennungsmerkmal für solche NMD-Substrate bisher unklar (Mendell *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2011; Yepiskoposyan *et al.*, 2011). Für Smg5, wie für einige andere wildtypische Gene, wurde berichtet, dass sie unempfindlich gegen über dem Knockdown von Upf3 sind, was zu der Vorstellung führte, dass in einem alternativen Zweig des NMD auch andere Faktoren als der klassische EJC (und folglich ohne Upf3) als Signal dienen könnten (Chan *et al.*, 2007). In der Tat, gemäß den hier erhaltenen Ergebnissen, scheint Ddx5 die Rolle des EJC in der NMD-Aktivierung zu übernehmen. Es konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von Ddx5 mit der 3'UTR der *Smg5*-mRNA das initiale Signal zu sein scheint, zu dessen Weiterleitung aber Upf3 ebenfalls erforderlich ist.

Es wurde bereits gezeigt, dass die Expression von Upf3B im Menschen reguliert wird (Zetoune *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2009), weshalb auch der Ddx5-vermittelte NMD in HeLa-Zellen limitiert sein dürfte. Dies wird durch die hier gemachte Beobachtung unterstützt, dass es bei Überexpression von Upf3B zu einer Runterregulation von Smg5 (wie auch von Ddx17) kommt (Abbildung 19). Noch komplexer dürfte diese Situation durch die Tatsache werden, dass das Paralog Upf3A, wie in der Einleitung beschrieben, einen Verlust von Upf3B kompensiert (Chan *et al.*, 2009). Darüber hinaus kann angenommen werden, dass der Ddx5-Upf3-Komplex unterschiedliche Affinitäten zu einzelnen mRNAs zeigt, was erklären würde, warum der Ddx5-vermittelte NMD von Smg5, im Vergleich zu Ddx17, unempfindlicher gegenüber einem Knockdown von Upf3B zu sein scheint. Auch die Experimente mit überexprimierten, nicht-funktionellen Upf3B-Deletionsmutanten (Upf3B₋₁₋₂₇₀, bindet nicht an Ddx5 und Upf3B₋₂₇₀₋₄₇₀, bindet kein Upf2), die wahrscheinlich endogenes Upf3B aus seinen funktionellen Komplexen verdrängen, bestärken die bislang in Frage gestellte Rolle von Upf3B in der Smg5-Regulation (Abbildung 19). Wie gezeigt sind die 3'UTRs der *Smg5*-, *Ddx5*- und *Ddx17*-mRNAs das Signal für die Ddx5-abhängige Degrada-

dation (Abbildungen 20 und 22). Interessanterweise, lässt die *Ddx5*-mRNA aber bislang implizierte NMD-induzierende Elemente für physiologische mRNAs, wie eine lange 3'UTR oder ORFs vermissen (He *et al.*, 2003; Mendell *et al.*, 2004; Rehwinkel *et al.*, 2005; Guan *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2005; Wittmann *et al.*, 2006). Auch das Reporterkonstrukt mit der 3'UTR von *Tram1* (trotz einer Länge von 1494 nt) ist insensitiv gegenüber dem *Ddx5*-induzierten NMD. Die hier erzielten Ergebnisse weisen daher auf definierte Bindungsstellen in der 3'UTR von mRNAs als NMD-Erkennungsmerkmale für Initiatorproteine wie *Ddx5* hin. Diese Sicht wird auch von dem Ergebnis der *Ddx5*-spezifischen RIP mit dem Reporterkonstrukt, das die *Smg5*-3'UTR enthält, unterstützt, die zeigt, dass die Interaktion auf den Bereich der 3'UTR eingegrenzt werden kann (Abbildung 21). Ein „Thethering Experiment“ von *Ddx5*, also das Binden von *Ddx5* an eine künstliche Bindungsstelle in der 3'UTR eines Reporters zur Aktivierung des NMD war leider nicht möglich, da die Fusion der RNA-bindenden Domäne des Bakteriophagen λ -Antiterminator Proteins (λ N- Peptid) an den N- oder C-Terminus von *Ddx5* zu einem extrem niedrigen Expressionslevel des Fusionsproteins bzw. zu einem Fusionsprotein ohne Upf3-Bindungsaktivität führte (Verena Geißler, nicht veröffentlichte Ergebnisse). Mit Hilfe eines solchen Assays ließe sich die NMD-induzierende Aktivierung von *Ddx5* direkt nachweisen, wie bereits zuvor auch z.B. für die NMD-Faktoren Upf1, Upf2, Upf3 und *Smg5* durch die Bindung an eine mRNA downstream von einem normalen Terminationscodon demonstriert wurde (Lykke-Andersen *et al.*, 2000; Gehring *et al.*, 2003; Kunz *et al.*, 2006; Gehring *et al.*, 2008).

Hier durchgeführte Experimente (Abbildung 12) zeigen, dass auch *Ddx17* an Upf3 bindet, was Ähnlichkeit zur teilweise redundanten Funktion der Upf3 Paraloge Upf3A und Upf3B im PTC-vermittelten NMD aufweist (Chan *et al.*, 2007). Es bedarf allerdings noch der Klärung, ob *Ddx17* allein zu dieser Interaktion in der Lage ist oder ob dies über eine Komplexbildung mit *Ddx5* zustande kommt (Ogilvie *et al.*, 2003). Wenn diese Interaktion sich dann auch noch als funktionell erweisen sollte, könnte so die Regulation entsprechender NMD-Transkripte bei einem Ausfall von *Ddx5* aufrecht erhalten werden. Möglich ist aber auch, dass *Ddx17* in einer solchen Funktion eine andere mRNA-Spezifität aufweist.

Da *Ddx5* ein nukleär-zytoplasmatisches Shuttelprotein ist, das an transkriptionellen und posttranskriptionellen Prozessen im Kern beteiligt ist (Zonta *et al.*, 2013), ist es vorstell-

bar, dass es im Komplex mit Upf3, bereits im Kern an die 3'UTR bestimmter mRNAs bindet und so als Teil der entsprechenden mRNPs diese ins Zytosol begleitet. Es ist beschrieben, dass DEAD-Box-Proteine als Kristallisationsplattform von größeren Proteinkomplexen auf der RNA dienen, und Ddx5 scheint hier ähnlich zu fungieren (Ballut *et al.*, 2005; Putnam und Jankowsky, 2013). Diese Vorstellung wird bestätigt durch die hier beschriebene spezifische Bindung von Ddx5 an die *Ddx5*-, *Ddx17*- und *Smg5*-mRNA (Diplomarbeit Benjamin Stein, 2011), die auf die 3'UTR eingegrenzt werden konnte. Man kann daher postulieren, dass es innerhalb der 3'UTR bestimmter mRNAs Sequenzen bzw. RNA-Strukturen gibt, die von Ddx5 spezifisch erkannt werden. Eine solche spezifische RNA-Bindung ist beispielsweise für das Protein Stauf1 bekannt, das ebenfalls die NMD-Maschinerie auf bestimmte mRNAs lenken kann. Hierbei dient Stauf1 nach Bindung an bestimmte mRNAs allerdings nicht wie Ddx5 (und der EJC) als Plattform für die Upf-Proteine, sondern interagiert direkt mit Upf1, um den mRNA-Abbau auszulösen (Kervestin und Jacobson, 2012; Park und Maquat, 2013).

Die Bindung an die 3'UTR scheint auch deshalb entscheidend für die Einleitung des NMD durch Ddx5 zu sein, da für diesen Schritt die Bindung von ATP an Ddx5 erforderlich ist (Abbildung 14), was wie schon vorher gezeigt, die RNA-Bindungsaktivität erhöht (Banroques *et al.*, 2010; Hilbert *et al.*, 2009). Ohne Bindung an ATP ist Ddx5 auch nicht mehr in der Lage, die Sekundärstruktur einer RNA zu verändern (Jalal *et al.*, 2007) und es ist möglich, dass eine solche Aktivität für eine effiziente Ddx5-RNA-Interaktion erforderlich ist. Die Bindung von ATP scheint für die Komplexbildung von Ddx5 mit Upf3B allerdings nicht nötig zu sein (Abbildung 15). Dennoch könnte in Abwesenheit von ATP Ddx5 in dem Ddx5-Upf3-Komplex eine Konformation einnehmen, die zur einer Aktivierung des NMD nicht in der Lage ist (Tanner *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2004; Andreou und Klostermeier, 2012).

Entsprechend den hier vorgestellten Ergebnissen ist es vorstellbar, dass nach Anlagerung von Upf2 an den Ddx5-Upf3-Komplex im Zytoplasma, die Interaktion des eRF1-eRF3-Terminationskomplexes mit PABP, die als essentiell für eine effiziente Termination der Translation angesehen wird, gestört ist. Als Konsequenz und in Analogie zum EJC-Model (siehe Einleitung) werden die NMD-Faktoren Upf1 und Smg1 durch eRF3 zur Bildung des SURF-Komplexes (Smg1-Upf1-eRF1-eRF3) rekrutiert. Letztendlich ent-

steht ein funktioneller NMD-Komplex, der sich durch den Kontakt von Upf1 mit dem Upf2-Upf3B-Ddx5-Komplex ausbildet. Tatsächlich konnte hier eRF3, das bevorzugt an durch Stoppkodons angehaltenen Ribosomen gefunden wird, als weitere Komponente des Ddx5-Upf-Proteinkomplexes nachgewiesen werden (Abbildung 6). In dem so entstandenen NMD-Komplex kann darauf hin die Phosphorylierung von Upf1 durch Smg1 ausgelöst werden, was die Translation hemmt und zum Abbau der mRNA führt (Le Hir *et al.*, 2000; Kervestin und Jacobson, 2012).

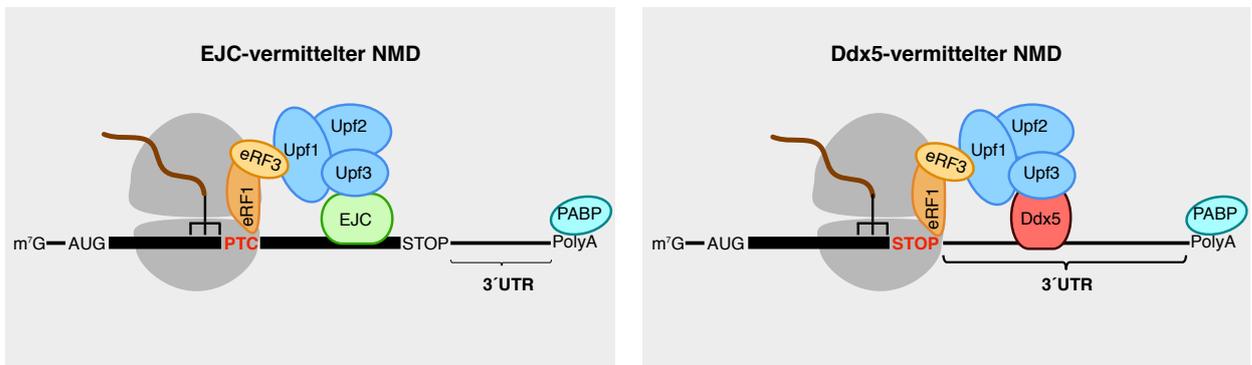


Abbildung 24: Modell des Ddx5-vermittelten NMD physiologischer mRNAs.

Die Rekrutierung des funktionellen NMD-Komplexes (Upf1, Upf2 und Upf3) erfolgt in PTC-haltigen mRNAs durch eine Markierung der mRNA durch den EJC (links, modifiziert nach nach Shoemaker und Green, 2012). In Analogie hierzu erfolgt die Rekrutierung der NMD-Proteine für bestimmte physiologische mRNAs durch die Bindung von Ddx5 an die 3'UTR der abzubauenen mRNA (rechts). Ddx5 dient damit zur Markierung der mRNA und als Plattform für Bildung des Upf3-Upf2-Upf1-Komplexes. (AUG, Startkodon; schwarzer Balken, ORF; schwarze Linie, 3'UTR; grau, terminierendes Ribosom; PTC, vorzeitiges Stoppkodon; STOP, normales Terminationskodon)

Dieser hier vorgeschlagene Mechanismus zur Aktivierung des NMD hinsichtlich physiologischer mRNAs ist neu. Es wurde bisher noch kein Fall beschrieben in dem die NMD-Funktion des EJC durch ein anderes Protein ersetzt wird. Die Tatsache, dass sich Ddx5 selbst mit Hilfe der NMD-Maschinerie reguliert und zusätzlich noch die Expression von Ddx17 und Smg5 beeinflusst, fügt sich in das von anderen Arbeitsgruppen beschriebene Modell der Autoregulation des NMD (Singh *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2011; Yepiskopyan *et al.*, 2011). Um den Level der physiologischen NMD-Targets konstant zu halten, scheint sich der NMD durch eine Feed-back Regulation der beteiligten Proteine selbst zu kontrollieren. So konnte die mRNA mehrerer NMD-Faktoren als NMD-Substrate identifi-

ziert werden. Interessanterweise und in Übereinstimmung mit dieser Arbeit sind für diese Feed-back Regulation die 3'UTRs der untersuchten mRNAs (Upf1, Smg5 und Smg7) erforderlich und ausreichend (Yepiskoposyan *et al.*, 2011).

Die hier analysierten mRNAs sind wahrscheinlich nicht die einzigen, die mit Hilfe von Ddx5 reguliert werden und ihre Identifizierung bleibt abzuwarten. Es ist auch vorstellbar, dass noch weitere Proteine existieren, die analog zu Ddx5, den NMD für bestimmte mRNAs aktivieren können. Die Suche nach RNA-Bindemotiven für Ddx5 innerhalb der hier untersuchten 3'UTRs wäre ebenfalls ein interessantes Thema für zukünftige Arbeiten. Des Weiteren ist es interessant zu analysieren, ob (und wie) diese neue Funktion von Ddx5 mit dessen Zellwachstumsregulation zusammenhängt, die wie bereits beschrieben ATP-Bindeaktivität benötigt (Jalal *et al.*, 2007) und ob es einen Zusammenhang zur kanzerogen Aktivität (Mooney *et al.*, 2010; Shin *et al.*, 2007) dieses multifunktionellen Proteins gibt.

Ein weiterer Anknüpfungspunkt für zukünftige Experimente ergibt sich aus der beobachteten Komplexbildung zwischen T-Ag und Upf3 (Abbildung 23). Interessant hierbei ist, dass der mit Ddx5 kreuzreagierende Antikörper PAb204 die Komplexbildung von Upf3 mit Ddx5 zu verhindern scheint. Falls dieser Befund durch weitere Experimenten bestätigt werden könnte, wäre dies ein erster Hinweis darauf, dass Viren den NMD-Prozess in Säugerzellen zu ihren Gunsten beeinflussen.

5 Literaturverzeichnis

Abdelhaleem, M., 2004. Do human RNA helicases have a role in cancer? *Biochim. Biophys. Acta* 1704, 37–46.

Abdelhaleem, M., Maltais, L., Wain, H., 2003. The human DDX and DHX gene families of putative RNA helicases. *Genomics* 81, 618–622.

Ajamian, L., Abrahamyan, L., Milev, M., Ivanov, P.V., Kulozik, A.E., Gehring, N.H., Mouland, A.J., 2008. Unexpected roles for UPF1 in HIV-1 RNA metabolism and translation. *RNA* 14, 914–927.

Akao, Y., 2009. A Role of DEAD-Box RNA Helicase rck/p54 in Cancer Cells. *Current Drug Therapy* 4.

Akileswaran, L., Taraska, J.W., Sayer, J.A., Gettemy, J.M., Coghlan, V.M., 2001. A-kinase-anchoring protein AKAP95 is targeted to the nuclear matrix and associates with p68 RNA helicase. *J. Biol. Chem.* 276, 17448–17454.

Amrani, N., Ganesan, R., Kervestin, S., Mangus, D.A., Ghosh, S., Jacobson, A., 2004. A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* 432, 112–118.

Anders, K.R., Grimson, A., Anderson, P., 2003. SMG-5, required for *C.elegans* nonsense-mediated mRNA decay, associates with SMG-2 and protein phosphatase 2A. *EMBO J.* 22, 641–650.

Andreou, A.Z., Klostermeier, D., 2012. Conformational changes of DEAD-box helicases monitored by single molecule fluorescence resonance energy transfer. *Meth. Enzymol.* 511, 75–109.

Appelquist, S.E., Selg, M., Raman, C., Jäck, H.M., 1997. Cloning and characterization of HUPF1, a human homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* nonsense mRNA-reducing UPF1 protein. *Nucleic Acids Res.* 25, 814–821.

Attard, G., Cooper, C.S., de Bono, J.S., 2009. Steroid hormone receptors in prostate cancer: a hard habit to break? *Cancer Cell* 16, 458–462.

Azzalin, C.M., Lingner, J., 2006. The double life of UPF1 in RNA and DNA stability pathways. *Cell Cycle* 5, 1496–1498.

Ballut, L., Marchadier, B., Baguet, A., Tomasetto, C., Séraphin, B., Le Hir, H., 2005. The exon junction core complex is locked onto RNA by inhibition of eIF4AIII ATPase activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 861–869.

Banroques, J., Doère, M., Dreyfus, M., Linder, P., Tanner, N.K., 2010. Motif III in superfamily 2 “helicases” helps convert the binding energy of ATP into a high-affinity RNA binding site in the yeast DEAD-box protein Ded1. *J. Mol. Biol.* 396, 949–966.

Baron, U., Freundlieb, S., Gossen, M., Bujard, H., 1995. Co-regulation of two gene activities by tetracycline via a bidirectional promoter. *Nucleic Acids Res.* 23, 3605–3606.

Barta, I., Iggo, R., 1995. Autoregulation of expression of the yeast Dbp2p “DEAD-box” protein is mediated by sequences in the conserved DBP2 intron. *EMBO J.* 14, 3800–3808.

Bates, G.J., Nicol, S.M., Wilson, B.J., Jacobs, A.-M.F., Bourdon, J.-C., Wardrop, J., Gregory, D.J., Lane, D.P., Perkins, N.D., Fuller-Pace, F.V., 2005. The DEAD box protein p68: a novel transcriptional coactivator of the p53 tumour suppressor. *EMBO J.* 24, 543–553.

Behm-Ansmant, I., Izaurralde, E., 2006. Quality control of gene expression: a stepwise assembly pathway for the surveillance complex that triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev.* 20, 391–398.
Beilharz, T.H., Humphreys, D.T., 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, L.E., 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.

Berthelot, K., Muldoon, M., Rajkowitsch, L., Hughes, J., McCarthy, J.E.G., 2004. Dynamics and processivity of 40S ribosome scanning on mRNA in yeast. *Mol. Microbiol.* 51, 987–1001.
Bhattacharya, A., Czaplinski, K., Trifillis, P., He, F., Jacobson, A., Peltz, S.W., 2000. Characterization of the biochemical properties of the human Upf1 gene product that is involved in nonsense-mediated mRNA decay. *RNA* 6, 1226–1235.

- Bhuvanagiri, M., Schlitter, A.M., Hentze, M.W., Kulozik, A.E., 2010. NMD: RNA biology meets human genetic medicine. *Biochem. J.* 430, 365–377.
- Boelz, S., Neu-Yilik, G., Gehring, N.H., Hentze, M.W., Kulozik, A.E., 2006. A chemiluminescence-based reporter system to monitor nonsense-mediated mRNA decay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349, 186–191.
- Bolduc, C., Larose, M., Yoshioka, M., Ye, P., Belleau, P., Labrie, C., Morissette, J., Raymond, V., Labrie, F., St-Amand, J., 2004. Effects of dihydrotestosterone on adipose tissue measured by serial analysis of gene expression. *J. Mol. Endocrinol.* 33, 429–444.
- Bond, A.T., Mangus, D.A., He, F., Jacobson, A., 2001. Absence of Dbp2p alters both nonsense-mediated mRNA decay and rRNA processing. *Mol. Cell. Biol.* 21, 7366–7379.
- Bono, F., Ebert, J., Lorentzen, E., Conti, E., 2006. The crystal structure of the exon junction complex reveals how it maintains a stable grip on mRNA. *Cell* 126, 713–725.
- Bornkamm, G.W., Berens, C., Kuklik-Roos, C., Bechet, J.-M., Laux, G., Bachl, J., Korndoerfer, M., Schlee, M., Hölzel, M., Malamoussi, A., Chapman, R.D., Nimmerjahn, F., Mautner, J., Hillen, W., Bujard, H., Feuillard, J., 2005. Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system. *Nucleic Acids Res.* 33, e137.
- Brocke, K.S., Neu-Yilik, G., Gehring, N.H., Hentze, M.W., Kulozik, A.E., 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.
- Broja, C., 2008. Weiterführende Untersuchungen zur Funktion der p68-Subfamilienproteine. Diplomarbeit, Universität des Saarlandes.
- 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.
- Calado, A., Carmo-Fonseca, M., 2000. Localization of poly(A)-binding protein 2 (PABP2) in nuclear speckles is independent of import into the nucleus and requires binding to poly(A) RNA. *J. Cell. Sci.* 113 (Pt 12), 2309–2318.

- Caretti, G., Schiltz, R.L., Dilworth, F.J., Di Padova, M., Zhao, P., Ogryzko, V., Fuller-Pace, F.V., Hoffman, E.P., Tapscott, S.J., Sartorelli, V., 2006. The RNA helicases p68/p72 and the noncoding RNA SRA are coregulators of MyoD and skeletal muscle differentiation. *Dev. Cell* 11, 547–560.
- Carter, M.S., Doskow, J., Morris, P., Li, S., Nhim, R.P., Sandstedt, S., Wilkinson, M.F., 1995. A regulatory mechanism that detects premature nonsense codons in T-cell receptor transcripts in vivo is reversed by protein synthesis inhibitors in vitro. *J. Biol. Chem.* 270, 28995–29003.
- Caruthers, J.M., McKay, D.B., 2002. Helicase structure and mechanism. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12, 123–133.
- Causevic, M., Hislop, R.G., Kernohan, N.M., Carey, F.A., Kay, R.A., Steele, R.J., Fuller-Pace, F.V., 2001. Overexpression and poly-ubiquitylation of the DEAD-box RNA helicase p68 in colorectal tumours. *Oncogene* 20, 7734–7743.
- 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.
- Chamot, D., Colvin, K.R., Kujat-Choy, S.L., Owttrim, G.W., 2005. RNA structural rearrangement via unwinding and annealing by the cyanobacterial RNA helicase, CrhR. *J. Biol. Chem.* 280, 2036–2044.
- Chan, C.C., Dostie, J., Diem, M.D., Feng, W., Mann, M., Rappsilber, J., Dreyfuss, G., 2004. eIF4A3 is a novel component of the exon junction complex. *RNA* 10, 200–209.
- Chan, W.-K., Bhalla, A.D., Le Hir, H., Nguyen, L.S., Huang, L., Géczy, J., Wilkinson, M.F., 2009. A UPF3-mediated regulatory switch that maintains RNA surveillance. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 747–753.
- Chan, W.-K., Huang, L., Gudikote, J.P., Chang, Y.-F., Imam, J.S., MacLean, J.A., 2nd, Wilkinson, M.F., 2007. An alternative branch of the nonsense-mediated decay pathway. *EMBO J.* 26, 1820–1830.
- Chang, Y.-F., Chan, W.-K., Imam, J.S., Wilkinson, M.F., 2007. Alternatively spliced T-cell receptor transcripts are up-regulated in response to disruption of either splicing elements or reading frame. *J. Biol. Chem.* 282, 29738–29747.
- Chao, C.-H., Chen, C.-M., Cheng, P.-L., Shih, J.-W., Tsou, A.-P., Lee, Y.-H.W., 2006. DDX3, a DEAD box RNA helicase with tumor growth-suppressive property and transcriptional regulation activity of the p21waf1/cip1 promoter, is a candidate tumor suppressor. *Cancer Res.* 66, 6579–6588.

- Chawla, R., Redon, S., Raftopoulou, C., Wischniewski, H., Gagos, S., Azzalin, C.M., 2011. Human UPF1 interacts with TPP1 and telomerase and sustains telomere leading-strand replication. *EMBO J.* 30, 4047–4058.
- Chen, Z., Li, Y., Krug, R.M., 1999. Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *EMBO J* 18, 2273–2283.
- Cheng, Z., Muhrad, D., Lim, M.K., Parker, R., Song, H., 2007. Structural and functional insights into the human Upf1 helicase core. *EMBO J.* 26, 253–264.
- Chiu, S.-Y., Serin, G., Ohara, O., Maquat, L.E., 2003. Characterization of human Smg5/7a: a protein with similarities to *Caenorhabditis elegans* SMG5 and SMG7 that functions in the dephosphorylation of Upf1. *RNA* 9, 77–87.
- Clark, E.L., Coulson, A., Dalglish, C., Rajan, P., Nicol, S.M., Fleming, S., Heer, R., Gaughan, L., Leung, H.Y., Elliott, D.J., Fuller-Pace, F.V., Robson, C.N., 2008. The RNA helicase p68 is a novel androgen receptor coactivator involved in splicing and is overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res.* 68, 7938–7946.
- Clerici, M., Mourão, A., Gutsche, I., Gehring, N.H., Hentze, M.W., 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.
- Coller, J., Parker, R., 2004. Eukaryotic mRNA decapping. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 861–890. Conti, E., Izaurralde, E., 2005. Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 316–325.
- Cordin, O., Banroques, J., Tanner, N.K., Linder, P., 2006. The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene* 367, 17–37.
- Cordin, O., Tanner, N.K., Doère, M., Linder, P., Banroques, J., 2004. The newly discovered Q motif of DEAD-box RNA helicases regulates RNA-binding and helicase activity. *EMBO J.* 23, 2478–2487.
- Cosson, B., Berkova, N., Couturier, A., Chabelskaya, S., Philippe, M., Zhouravleva, G., 2002a. Poly(A)-binding protein and eRF3 are associated in vivo in human and *Xenopus* cells. *Biol. Cell* 94, 205–216.

- Cosson, B., Couturier, A., Chabelskaya, S., Kiktev, D., Inge-Vechtomov, S., Philippe, M., Zhouravleva, G., 2002b. Poly(A)-binding protein acts in translation termination via eukaryotic release factor 3 interaction and does not influence [PSI(+)] propagation. *Mol. Cell. Biol.* 22, 3301–3315.
- Crawford, L., Leppard, K., Lane, D., Harlow, E., 1982. Cellular proteins reactive with monoclonal antibodies directed against simian virus 40 T-antigen. *J. Virol.* 42, 612–620.
- 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.
- Cui, Y., Hagan, K.W., Zhang, S., Peltz, S.W., 1995. Identification and characterization of genes that are required for the accelerated degradation of mRNAs containing a premature translational termination codon. *Genes Dev.* 9, 423–436.
- Culbertson, M.R., Leeds, P.F., 2003. Looking at mRNA decay pathways through the window of molecular evolution. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 207–214.
- Culbertson, M.R., Neeno-Eckwall, E., 2005. Transcript selection and the recruitment of mRNA decay factors for NMD in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 11, 1333–1339.
- Culbertson, M.R., Underbrink, K.M., Fink, G.R., 1980. Frameshift suppression *Saccharomyces cerevisiae*. II. Genetic properties of group II suppressors. *Genetics* 95, 833–853.
- Czaplinski, K., Ruiz-Echevarria, M.J., González, C.I., Peltz, S.W., 1999. Should we kill the messenger? The role of the surveillance complex in translation termination and mRNA turnover. *Bioessays* 21, 685–696.
- Czaplinski, K., Ruiz-Echevarria, M.J., Paushkin, S.V., Han, X., Weng, Y., Perlick, H.A., Dietz, H.C., Ter-Avanesyan, M.D., Peltz, S.W., 1998. The surveillance complex interacts with the translation release factors to enhance termination and degrade aberrant mRNAs. *Genes Dev.* 12, 1665–1677.
- Czaplinski, K., Weng, Y., Hagan, K.W., Peltz, S.W., 1995. Purification and characterization of the Upf1 protein: a factor involved in translation and mRNA degradation. *RNA* 1, 610–623.
- Daar, I.O., Maquat, L.E., 1988. Premature translation termination mediates triosephosphate isomerase mRNA degradation. *Mol. Cell. Biol.* 8, 802–813.

- Dahlseid, J.N., Lew-Smith, J., Lelivelt, M.J., Enomoto, S., Ford, A., Desruisseaux, M., McClellan, M., Lue, N., Culbertson, M.R., Berman, J., 2003. mRNAs encoding telomerase components and regulators are controlled by UPF genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* 2, 134–142.
- Daneholt, B., 2001. Assembly and transport of a premessenger RNP particle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 7012–7017.
- Dardenne, E., Pierredon, S., Driouch, K., Gratadou, L., Lacroix-Triki, M., Espinoza, M.P., Zonta, E., Germann, S., Mortada, H., Villemin, J.-P., Dutertre, M., Lidereau, R., Vagner, S., Auboeuf, D., 2012. Splicing switch of an epigenetic regulator by RNA helicases promotes tumor-cell invasiveness. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 1139–1146.
- De la Cruz, J., Kressler, D., Linder, P., 1999. Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends Biochem. Sci.* 24, 192–198.
- De Lau, W., Barker, N., Clevers, H., 2007. WNT signaling in the normal intestine and colorectal cancer. *Front. Biosci.* 12, 471–491.
- Denning, G., Jamieson, L., Maquat, L.E., Thompson, E.A., Fields, A.P., 2001. Cloning of a novel phosphatidylinositol kinase-related kinase: characterization of the human SMG-1 RNA surveillance protein. *J. Biol. Chem.* 276, 22709–22714.
- Deppert, W., Gurney, E.G., Harrison, R.O., 1981. Monoclonal antibodies against simian virus 40 tumor antigens: analysis of antigenic binding sites, using adenovirus type 2-simian virus 40 hybrid viruses. *J. Virol.* 37, 478–482.
- Dreyfuss, G., Kim, V.N., Kataoka, N., 2002. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 195–205.
- Durand, S., Cougot, N., Mahuteau-Betzer, F., Nguyen, C.-H., Grierson, D.S., Bertrand, E., Tazi, J., Lejeune, F., 2007. Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay (NMD) by a new chemical molecule reveals the dynamic of NMD factors in P-bodies. *J. Cell Biol.* 178, 1145–1160.
- Durand, S., Lykke-Andersen, J., 2013. Nonsense-mediated mRNA decay occurs during eIF4F-dependent translation in human cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 702–709.

Endoh, H., Maruyama, K., Masuhiro, Y., Kobayashi, Y., Goto, M., Tai, H., Yanagisawa, J., Metzger, D., Hashimoto, S., Kato, S., 1999. Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor alpha. *Mol. Cell. Biol.* 19, 5363–5372.

Enukashvily, N., Donev, R., Sheer, D., Podgornaya, O., 2005. Satellite DNA binding and cellular localisation of RNA helicase P68. *J. Cell. Sci.* 118, 611–622.

Erickson, S.L., Lykke-Andersen, J., 2011. Cytoplasmic mRNP granules at a glance. *J. Cell. Sci.* 124, 293–297.

Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., Izaurralde, E., 2007. P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 9–22.

Fairman-Williams, M.E., Guenther, U.-P., Jankowsky, E., 2010. SF1 and SF2 helicases: family matters. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 20, 313–324.

Felix, R.S., Colleoni, G.W.B., Caballero, O.L., Yamamoto, M., Almeida, M.S.S., Andrade, V.C.C., Chauffaille, M. de L.L.F., Silva, W.A. da, Jr, Begnami, M.D., Soares, F.A., Simpson, A.J., Zago, M.A., Vettore, A.L., 2009. SAGE analysis highlights the importance of p53csv, ddx5, mapkapk2 and ranbp2 to multiple myeloma tumorigenesis. *Cancer Lett.* 278, 41–48.

Ferraiuolo, M.A., Lee, C.-S., Ler, L.W., Hsu, J.L., Costa-Mattioli, M., Luo, M.-J., Reed, R., Sonenberg, N., 2004. A nuclear translation-like factor eIF4AIII is recruited to the mRNA during splicing and functions in nonsense-mediated decay. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 4118–4123.

Förster, T., 1948. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* 437, 55–75.

Franks, T.M., Lykke-Andersen, J., 2008. The control of mRNA decapping and P-body formation. *Mol. Cell* 32, 605–615.

Franks, T.M., Singh, G., Lykke-Andersen, J., 2010. Upf1 ATPase-dependent mRNP disassembly is required for completion of nonsense-mediated mRNA decay. *Cell* 143, 938–950.

Fujita, T., Kobayashi, Y., Wada, O., Tateishi, Y., Kitada, L., Yamamoto, Y., Takashima, H., Murayama, A., Yano, T., Baba, T., Kato, S., Kawabe, Y.-I., Yanagisawa, J., 2003. Full activation of estrogen receptor alpha activation function-1 induces proliferation of breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 278, 26704–26714.

Fukuda, T., Yamagata, K., Fujiyama, S., Matsumoto, T., Koshida, I., Yoshimura, K., Mihara, M., Naitou, M., Endoh, H., Nakamura, T., Akimoto, C., Yamamoto, Y., Katagiri, T., Foulds, C., Takezawa, S., Kitagawa, H., Takeyama, K., O'Malley, B.W., Kato, S., 2007. DEAD-box RNA helicase subunits of the Droscha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs. *Nat. Cell Biol.* 9, 604–611.

Fukuhara, N., Ebert, J., Unterholzner, L., Lindner, D., Izaurralde, E., Conti, E., 2005. SMG7 is a 14-3-3-like adaptor in the nonsense-mediated mRNA decay pathway. *Mol. Cell* 17, 537–547.

Fuller-Pace, F.V., 2013. The DEAD box proteins DDX5 (p68) and DDX17 (p72): multi-tasking transcriptional regulators. *Biochim. Biophys. Acta* 1829, 756–763.

Gao, Q., Das, B., Sherman, F., Maquat, L.E., 2005. Cap-binding protein 1-mediated and eukaryotic translation initiation factor 4E-mediated pioneer rounds of translation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 4258–4263.

Gehring, N.H., Hentze, M.W., Kulozik, A.E., 2008. Tethering assays to investigate nonsense-mediated mRNA decay activating proteins. *Meth. Enzymol.* 448, 467–482.

Gehring, N.H., Kunz, J.B., Neu-Yilik, G., Breit, S., Viegas, M.H., Hentze, M.W., Kulozik, A.E., 2005. Exon-junction complex components specify distinct routes of nonsense-mediated mRNA decay with differential cofactor requirements. *Mol. Cell* 20, 65–75.

Gehring, N.H., Lamprinaki, S., Hentze, M.W., Kulozik, A.E., 2009. The hierarchy of exon-junction complex assembly by the spliceosome explains key features of mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *PLoS Biol.* 7, e1000120. Gehring, N.H., Neu-Yilik, G., Schell, T., Hentze, M.W., Kulozik, A.E., 2003. Y14 and hUpf3b form an NMD-activating complex. *Mol. Cell* 11, 939–949.

Geißler, V., 2008. Weiterführende Untersuchung zur Komplexbildung von humanem p68 mit Proteinen der Translationskontrolle. Diplomarbeit, Universität des Saarlandes.

Germann, S., Gratadou, L., Zonta, E., Dardenne, E., Gaudineau, B., Fougère, M., Samaan, S., Dutertre, M., Jauliac, S., Auboeuf, D., 2012. Dual role of the ddx5/ddx17 RNA helicases in the control of the pro-migratory NFAT5 transcription factor. *Oncogene* 31, 4536–4549.

Giaccone, G., Battey, J., Gazdar, A.F., Oie, H., Draoui, M., Moody, T.W., 1992. Neuromedin B is present in lung cancer cell lines. *Cancer Res.* 52, 2732s–2736s.

- Gillian, A.L., Svaren, J., 2004. The Ddx20/DP103 dead box protein represses transcriptional activation by Egr2/Krox-20. *J. Biol. Chem.* 279, 9056–9063.
- Gingras, A.C., Raught, B., Sonenberg, N., 1999. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 913–963.
- Gluzman, Y., 1981. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23, 175–182.
- Godbout, R., Li, L., Liu, R.-Z., Roy, K., 2007. Role of DEAD box 1 in retinoblastoma and neuroblastoma. *Future Oncol* 3, 575–587.
- Goh, P.-Y., Tan, Y.-J., Lim, S.P., Tan, Y.H., Lim, S.G., Fuller-Pace, F., Hong, W., 2004. Cellular RNA helicase p68 relocalization and interaction with the hepatitis C virus (HCV) NS5B protein and the potential role of p68 in HCV RNA replication. *J. Virol.* 78, 5288–5298.
- Gong, C., Kim, Y.K., Woeller, C.F., Tang, Y., Maquat, L.E., 2009. SMD and NMD are competitive pathways that contribute to myogenesis: effects on PAX3 and myogenin mRNAs. *Genes Dev.* 23, 54–66.
- González, C.I., Bhattacharya, A., Wang, W., Peltz, S.W., 2001. Nonsense-mediated mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 274, 15–25.
- Gorbalenya A.E., and Koonin E.V., 1993. Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 419–429.
- Görlich, D., Hartmann, E., Prehn, S., Rapoport, T.A., 1992. A protein of the endoplasmic reticulum involved early in polypeptide translocation. *Nature* 357, 47–52.
- Graber, J.H., McAllister, G.D., Smith, T.F., 2002. Probabilistic prediction of *Saccharomyces cerevisiae* mRNA 3'-processing sites. *Nucleic Acids Res.* 30, 1851–1858.
- Grimson, A., O'Connor, S., Newman, C.L., Anderson, P., 2004. SMG-1 is a phosphatidylinositol kinase-related protein kinase required for nonsense-mediated mRNA Decay in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Cell. Biol.* 24, 7483–7490.

- Grohman, J.K., Del Campo, M., Bhaskaran, H., Tijerina, P., Lambowitz, A.M., Russell, R., 2007. Probing the mechanisms of DEAD-box proteins as general RNA chaperones: the C-terminal domain of CYT-19 mediates general recognition of RNA. *Biochemistry* 46, 3013–3022.
- Guan, Q., Zheng, W., Tang, S., Liu, X., Zinkel, R.A., Tsui, K.-W., Yandell, B.S., Culbertson, M.R., 2006. Impact of nonsense-mediated mRNA decay on the global expression profile of budding yeast. *PLoS Genet.* 2, e203.
- Guil, S., Gattoni, R., Carrascal, M., Abián, J., Stévenin, J., Bach-Elias, M., 2003. Roles of hnRNP A1, SR proteins, and p68 helicase in c-H-ras alternative splicing regulation. *Mol. Cell. Biol.* 23, 2927–2941.
- Guo, J., Hong, F., Loke, J., Yea, S., Lim, C.L., Lee, U., Mann, D.A., Walsh, M.J., Sninsky, J.J., Friedman, S.L., 2010. A DDX5 S480A polymorphism is associated with increased transcription of fibrogenic genes in hepatic stellate cells. *J. Biol. Chem.* 285, 5428–5437.
- Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557–580.
- Harris, D., Zhang, Z., Chaubey, B., Pandey, V.N., 2006. Identification of cellular factors associated with the 3′-nontranslated region of the hepatitis C virus genome. *Mol. Cell Proteomics* 5, 1006–1018.
- He, F., Brown, A.H., Jacobson, A., 1997. Upf1p, Nmd2p, and Upf3p are interacting components of the yeast nonsense-mediated mRNA decay pathway. *Mol. Cell. Biol.* 17, 1580–1594.
- He, F., Li, X., Spatrick, P., Casillo, R., Dong, S., Jacobson, A., 2003. Genome-wide analysis of mRNAs regulated by the nonsense-mediated and 5′ to 3′ mRNA decay pathways in yeast. *Mol. Cell* 12, 1439–1452.
- Henn, A., Cao, W., Licciardello, N., Heitkamp, S.E., Hackney, D.D., De La Cruz, E.M., 2010. Pathway of ATP utilization and duplex rRNA unwinding by the DEAD-box helicase, DbpA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 4046–4050.
- Hieronimus, H., Silver, P.A., 2004. A systems view of mRNP biology. *Genes Dev.* 18, 2845–2860.
- Hilbert, M., Karow, A.R., Klostermeier, D., 2009. The mechanism of ATP-dependent RNA unwinding by DEAD box proteins. *Biol. Chem.* 390, 1237–1250.
- Hirling, H., Scheffner, M., Restle, T., Stahl, H., 1989. RNA helicase activity associated with the human p68 protein. *Nature* 339, 562–564.

- Hloch, P., Schiedner, G., Stahl, H., 1990. Complete cDNA sequence of the human p68 protein. *Nucleic Acids Res.* 18, 3045.
- Hloch, P., 1995. Die Genstruktur des menschlichen DEAD-Box-Proteins p68 und Untersuchungen zu seiner Expression sowie zur Charakterisierung der RNA-Bindeaktivität des Tumorsuppressor-Proteins p53. Doktorarbeit, Universität Konstanz.
- Hogg, J.R., Goff, S.P., 2010. Upf1 senses 3'UTR length to potentiate mRNA decay. *Cell* 143, 379–389.
- Hönig, A., Auboeuf, D., Parker, M.M., O'Malley, B.W., Berget, S.M., 2002. Regulation of alternative splicing by the ATP-dependent DEAD-box RNA helicase p72. *Mol. Cell. Biol.* 22, 5698–5707.
- Hoshino, S., Imai, M., Kobayashi, T., Uchida, N., Katada, T., 1999. The eukaryotic polypeptide chain releasing factor (eRF3/GSPT) carrying the translation termination signal to the 3'-Poly(A) tail of mRNA. Direct association of erf3/GSPT with polyadenylate-binding protein. *J. Biol. Chem.* 274, 16677–16680.
- Hoshino, S., Imai, M., Mizutani, M., Kikuchi, Y., Hanaoka, F., Ui, M., Katada, T., 1998. Molecular cloning of a novel member of the eukaryotic polypeptide chain-releasing factors (eRF). Its identification as eRF3 interacting with eRF1. *J. Biol. Chem.* 273, 22254–22259.
- Hoskins, R.A., Smith, C.D., Carlson, J.W., Carvalho, A.B., Halpern, A., Kaminker, J.S., Kennedy, C., Mungall, C.J., Sullivan, B.A., Sutton, G.G., Yasuhara, J.C., Wakimoto, B.T., Myers, E.W., Celniker, S.E., Rubin, G.M., Karpen, G.H., 2002. Heterochromatic sequences in a *Drosophila* whole-genome shotgun assembly. *Genome Biol.* 3, RESEARCH0085.
- Hosoda, N., Kim, Y.K., Lejeune, F., Maquat, L.E., 2005. CBP80 promotes interaction of Upf1 with Upf2 during nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 893–901.
- Huang, H., Shiffman, M.L., Cheung, R.C., Layden, T.J., Friedman, S., Abar, O.T., Yee, L., Chokkalingam, A.P., Schrodi, S.J., Chan, J., Catanese, J.J., Leong, D.U., Ross, D., Hu, X., Monto, A., McAllister, L.B., Broder, S., White, T., Sninsky, J.J., Wright, T.L., 2006. Identification of two gene variants associated with risk of advanced fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 130, 1679–1687.
- Huang, H.-R., Rowe, C.E., Mohr, S., Jiang, Y., Lambowitz, A.M., Perlman, P.S., 2005. The splicing of yeast mitochondrial group I and group II introns requires a DEAD-box protein with RNA chaperone function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 163–168.

- Huang, L., Lou, C.-H., Chan, W., Shum, E.Y., Shao, A., Stone, E., Karam, R., Song, H.-W., Wilkinson, M.F., 2011. RNA homeostasis governed by cell type-specific and branched feedback loops acting on NMD. *Mol. Cell* 43, 950–961.
- Huang, L., Wilkinson, M.F., 2012. Regulation of nonsense-mediated mRNA decay. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 3, 807–828.
- Huang, Y., Liu, Z.-R., 2002. The ATPase, RNA unwinding, and RNA binding activities of recombinant p68 RNA helicase. *J. Biol. Chem.* 277, 12810–12815.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., Zumla, A., 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* 6, 279–284.
- Hwang, J., Maquat, L.E., 2011. Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) in animal embryogenesis: to die or not to die, that is the question. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21, 422–430.
- Hwang, J., Sato, H., Tang, Y., Matsuda, D., Maquat, L.E., 2010. UPF1 association with the cap-binding protein, CBP80, promotes nonsense-mediated mRNA decay at two distinct steps. *Mol. Cell* 39, 396–409.
- Iggo, R.D., Jamieson, D.J., MacNeill, S.A., Southgate, J., McPheat, J., Lane, D.P., 1991. p68 RNA helicase: identification of a nucleolar form and cloning of related genes containing a conserved intron in yeasts. *Mol. Cell. Biol.* 11, 1326–1333.
- Iggo, R.D., Lane, D.P., 1989. Nuclear protein p68 is an RNA-dependent ATPase. *EMBO J.* 8, 1827–1831.
- Ip, F.C., Chung, S.S., Fu, W.Y., Ip, N.Y., 2000. Developmental and tissue-specific expression of DEAD box protein p72. *Neuroreport* 11, 457–462.
- Ishigaki, Y., Li, X., Serin, G., Maquat, L.E., 2001. Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. *Cell* 106, 607–617.
- Isken, O., Maquat, L.E., 2007. Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes Dev.* 21, 1833–1856.
- Isken, O., Maquat, L.E., 2008. The multiple lives of NMD factors: balancing roles in gene and genome regulation. *Nat. Rev. Genet.* 9, 699–712.

- Ivanov, P.V., Gehring, N.H., Kunz, J.B., Hentze, M.W., Kulozik, A.E., 2008. Interactions between UPF1, eRFs, PABP and the exon junction complex suggest an integrated model for mammalian NMD pathways. *EMBO J.* 27, 736–747.
- Jakymiw, A., Lian, S., Eystathioy, T., Li, S., Satoh, M., Hamel, J.C., Fritzler, M.J., Chan, E.K.L., 2005. Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. *Nat. Cell Biol.* 7, 1267–1274.
- Jalal, C., Uhlmann-Schiffler, H., Stahl, H., 2007. Redundant role of DEAD box proteins p68 (Ddx5) and p72/p82 (Ddx17) in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Nucleic Acids Res.* 35, 3590–3601.
- Jalal, C., 2005. Funktion der menschlichen p68-Subfamilie der DEAD-Box-Proteine bei der Ribosomen-Biogenese. Dissertation, Universität des Saarlandes.
- Janknecht, R., 2010. Multi-talented DEAD-box proteins and potential tumor promoters: p68 RNA helicase (DDX5) and its paralog, p72 RNA helicase (DDX17). *Am J Transl Res* 2, 223–234.
- Jankowsky, A., Guenther, U.-P., Jankowsky, E., 2011. The RNA helicase database. *Nucleic Acids Res.* 39, D338–341.
- Jankowsky, E., 2011. RNA helicases at work: binding and rearranging. *Trends Biochem. Sci.* 36, 19–29.
- Jankowsky, E., Gross, C.H., Shuman, S., Pyle, A.M., 2000. The DExH protein NPH-II is a processive and directional motor for unwinding RNA. *Nature* 403, 447–451.
- Jankowsky, E., Gross, C.H., Shuman, S., Pyle, A.M., 2001. Active disruption of an RNA-protein interaction by a DExH/D RNA helicase. *Science* 291, 121–125.
- Jankowsky, E., Putnam, A., 2010. Duplex unwinding with DEAD-box proteins. *Methods Mol. Biol.* 587, 245–264.
- Jarmoskaite, I., Russell, R., 2011. DEAD-box proteins as RNA helicases and chaperones. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2, 135–152.
- Jin, H., Suh, M.R., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, Y., Heo, I., Ha, M., Hyun, S., Kim, V.N., 2009. Human UPF1 participates in small RNA-induced mRNA downregulation. *Mol. Cell. Biol.* 29, 5789–5799.

- Kadlec, J., Guilligay, D., Ravelli, R.B., 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.
- Kahlina, K., Goren, I., Pfeilschifter, J., Frank, S., 2004. p68 DEAD box RNA helicase expression in keratinocytes. Regulation, nucleolar localization, and functional connection to proliferation and vascular endothelial growth factor gene expression. *J. Biol. Chem.* 279, 44872–44882.
- Kahvejian, A., Svitkin, Y.V., Sukarieh, R., M'Boutchou, M.-N., 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, V.N., Velazquez, F., Perkinson, R.A., 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, W.F., 2005. Regulated degradation of replication-dependent histone mRNAs requires both ATR and Upf1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 794–800.
- Kebaara, B.W., Atkin, A.L., 2009. Long 3'-UTRs target wild-type mRNAs for nonsense-mediated mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 37, 2771–2778.
- Kervestin, S., Jacobson, A., 2012. NMD: a multifaceted response to premature translational termination. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 700–712.
- Kim, J.L., Morgenstern, K.A., Griffith, J.P., Dwyer, M.D., Thomson, J.A., Murcko, M.A., Lin, C., Caron, P.R., 1998. Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding. *Structure* 6, 89–100.
- Kim, K.M., Cho, H., Choi, K., Kim, J., Kim, B.-W., Ko, Y.-G., Jang, S.K., Kim, Y.K., 2009. A new MIF4G domain-containing protein, CTIF, directs nuclear cap-binding protein CBP80/20-dependent translation. *Genes Dev.* 23, 2033–2045.

- Kim, V.N., Kataoka, N., Dreyfuss, G., 2001. Role of the nonsense-mediated decay factor hUpf3 in the splicing-dependent exon-exon junction complex. *Science* 293, 1832–1836.
- Kim, Y.K., Furic, L., Desgroseillers, L., Maquat, L.E., 2005. Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell* 120, 195–208.
- Kim, Y.K., Furic, L., Parisien, M., Major, F., DesGroseillers, L., Maquat, L.E., 2007. Staufen1 regulates diverse classes of mammalian transcripts. *EMBO J.* 26, 2670–2681.
- Kircher, S.G., Kim, S.H., Fountoulakis, M., Lubec, G., 2002. Reduced levels of DEAD-box proteins DBP-*RB* and *p72* in fetal Down syndrome brains. *Neurochem. Res.* 27, 1141–1146.
- Kitamura, A., Nishizuka, M., Tominaga, K., Tsuchiya, T., Nishihara, T., Imagawa, M., 2001. Expression of *p68* RNA helicase is closely related to the early stage of adipocyte differentiation of mouse 3T3-L1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287, 435–439.
- Kossen, K., Karginov, F.V., Uhlenbeck, O.C., 2002. The carboxy-terminal domain of the DExDH protein YxiN is sufficient to confer specificity for 23S rRNA. *J. Mol. Biol.* 324, 625–636.
- Krause, S., Fakan, S., Weis, K., Wahle, E., 1994. Immunodetection of poly(A) binding protein II in the cell nucleus. *Exp. Cell Res.* 214, 75–82.
- Kuersten, S., Goodwin, E.B., 2003. The power of the 3' UTR: translational control and development. *Nat. Rev. Genet.* 4, 626–637.
- Kunz, J.B., Neu-Yilik, G., Hentze, M.W., Kulozik, A.E., Gehring, N.H., 2006. Functions of hUpf3a and hUpf3b in nonsense-mediated mRNA decay and translation. *RNA* 12, 1015–1022.
- Lamm, G.M., Nicol, S.M., Fuller-Pace, F.V., Lamond, A.I., 1996. *p72*: a human nuclear DEAD box protein highly related to *p68*. *Nucleic Acids Res.* 24, 3739–3747.
- Lane, D.P., Hoeffler, W.K., 1980. SV40 large T shares an antigenic determinant with a cellular protein of molecular weight 68,000. *Nature* 288, 167–170.
- Lareau, L.F., Green, R.E., Bhatnagar, R.S., Brenner, S.E., 2004. The evolving roles of alternative splicing. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14, 273–282.

- Le Hir, H., Gatfield, D., Izaurralde, E., Moore, M.J., 2001. The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO J.* 20, 4987–4997.
- Le Hir, H., Izaurralde, E., Maquat, L.E., Moore, M.J., 2000. The spliceosome deposits multiple proteins 20–24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *EMBO J.* 19, 6860–6869.
- Lee, C.-G., 2002. RH70, a bidirectional RNA helicase, co-purifies with U1snRNP. *J. Biol. Chem.* 277, 39679–39683.
- Leeds, P., Peltz, S.W., Jacobson, A., Culbertson, M.R., 1991. The product of the yeast UPF1 gene is required for rapid turnover of mRNAs containing a premature translational termination codon. *Genes Dev.* 5, 2303–2314.
- Leeds, P., Wood, J.M., Lee, B.S., Culbertson, M.R., 1992. Gene products that promote mRNA turnover in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 12, 2165–2177.
- Lejeune, F., Ishigaki, Y., Li, X., Maquat, L.E., 2002. The exon junction complex is detected on CBP80-bound but not eIF4E-bound mRNA in mammalian cells: dynamics of mRNP remodeling. *EMBO J.* 21, 3536–3545. Lejeune, F., Maquat, L.E., 2005. Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 309–315.
- Leung, A.K.L., Calabrese, J.M., Sharp, P.A., 2006. Quantitative analysis of Argonaute protein reveals microRNA-dependent localization to stress granules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 18125–18130.
- Lew, J.E., Enomoto, S., Berman, J., 1998. Telomere length regulation and telomeric chromatin require the nonsense-mediated mRNA decay pathway. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6121–6130.
- Lewis, B.P., Green, R.E., Brenner, S.E., 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.
- Lin, C., Yang, L., Yang, J.J., Huang, Y., Liu, Z.-R., 2005. ATPase/helicase activities of p68 RNA helicase are required for pre-mRNA splicing but not for assembly of the spliceosome. *Mol. Cell. Biol.* 25, 7484–7493.
- Linder, P., 2003. Yeast RNA helicases of the DEAD-box family involved in translation initiation. *Biol. Cell* 95, 157–167.

- Linder, P., 2006. Dead-box proteins: a family affair—active and passive players in RNP-remodeling. *Nucleic Acids Res.* 34, 4168–4180.
- Linder, P., Lasko, P.F., Ashburner, M., Leroy, P., Nielsen, P.J., Nishi, K., Schnier, J., Slonimski, P.P., 1989. Birth of the D-E-A-D box. *Nature* 337, 121–122.
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M.A., Hannon, G.J., Parker, R., 2005. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat. Cell Biol.* 7, 719–723.
- Liu, Z.-R., 2002. p68 RNA helicase is an essential human splicing factor that acts at the U1 snRNA-5' splice site duplex. *Mol. Cell. Biol.* 22, 5443–5450.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–408.
- Lorsch, J.R., Herschlag, D., 1998. The DEAD box protein eIF4A. 2. A cycle of nucleotide and RNA-dependent conformational changes. *Biochemistry* 37, 2194–2206.
- Losson, R., Lacroute, F., 1979. Interference of nonsense mutations with eukaryotic messenger RNA stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 5134–5137.
- Lykke-Andersen, J., Shu, M.D., Steitz, J.A., 2000. Human Upf proteins target an mRNA for nonsense-mediated decay when bound downstream of a termination codon. *Cell* 103, 1121–1131.
- Lykke-Andersen, J., Shu, M.D., Steitz, J.A., 2001. Communication of the position of exon-exon junctions to the mRNA surveillance machinery by the protein RNPS1. *Science* 293, 1836–1839.
- MacArthur, H., Walter, G., 1984. Monoclonal antibodies specific for the carboxy terminus of simian virus 40 large T antigen. *J. Virol.* 52, 483–491.
- Maquat, L.E., 2004. Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 89–99.
- Maquat, L.E., Li, X., 2001. Mammalian heat shock p70 and histone H4 transcripts, which derive from naturally intronless genes, are immune to nonsense-mediated decay. *RNA* 7, 445–456.

- Maquat, L.E., Tarn, W.-Y., Isken, O., 2010. The pioneer round of translation: features and functions. *Cell* 142, 368–374.
- Mazumder, B., Seshadri, V., Fox, P.L., 2003. Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. *Trends Biochem. Sci.* 28, 91–98.
- Melero, R., Buchwald, G., Castaño, R., Raabe, M., Gil, D., Lázaro, M., Urlaub, H., Conti, E., Llorca, O., 2012. The cryo-EM structure of the UPF-EJC complex shows UPF1 poised toward the RNA 3' end. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 498–505, S1–2.
- Mendell, J.T., ap Rhys, C.M.J., Dietz, H.C., 2002. Separable roles for *rent1/hUpf1* in altered splicing and decay of nonsense transcripts. *Science* 298, 419–422.
- Mendell, J.T., Medghalchi, S.M., Lake, R.G., Noensie, E.N., Dietz, H.C., 2000. Novel *Upf2p* orthologues suggest a functional link between translation initiation and nonsense surveillance complexes. *Mol. Cell. Biol.* 20, 8944–8957.
- Mendell, J.T., Sharifi, N.A., Meyers, J.L., Martinez-Murillo, F., Dietz, H.C., 2004. Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutes genomic noise. *Nat. Genet.* 36, 1073–1078.
- Michel, M.R., Schwyzer, M., 1982. Messenger ribonucleoproteins of cells infected by simian virus 40 contain large T-antigen. *Eur. J. Biochem.* 129, 25–32.
- Mitrovich, Q.M., Anderson, P., 2000. Unproductively spliced ribosomal protein mRNAs are natural targets of mRNA surveillance in *C. elegans*. *Genes Dev.* 14, 2173–2184.
- Mohr, G., Del Campo, M., Mohr, S., Yang, Q., Jia, H., Jankowsky, E., Lambowitz, A.M., 2008. Function of the C-terminal domain of the DEAD-box protein *Mss116p* analyzed in vivo and in vitro. *J. Mol. Biol.* 375, 1344–1364.
- Mooney, S.M., Grande, J.P., Salisbury, J.L., Janknecht, R., 2010. Sumoylation of p68 and p72 RNA helicases affects protein stability and transactivation potential. *Biochemistry* 49, 1–10.
- Mühlemann, O., Eberle, A.B., Stalder, L., Zamudio Orozco, R., 2008. Recognition and elimination of nonsense mRNA. *Biochim. Biophys. Acta* 1779, 538–549.

- Muhlrad, D., Parker, R., 1999. Aberrant mRNAs with extended 3' UTRs are substrates for rapid degradation by mRNA surveillance. *RNA* 5, 1299–1307.
- Nagy, E., Maquat, L.E., 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, A.E., 2008. NMD: multitasking between mRNA surveillance and modulation of gene expression. *Adv. Genet.* 62, 185–243.
- Nicholson, P., Yepiskoposyan, H., Metzke, S., Zamudio Orozco, R., Kleinschmidt, N., Mühlemann, 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.
- Nicol, S.M., Causevic, M., Prescott, A.R., Fuller-Pace, F.V., 2000. The nuclear DEAD box RNA helicase p68 interacts with the nucleolar protein fibrillarin and colocalizes specifically in nascent nucleoli during telophase. *Exp. Cell Res.* 257, 272–280.
- Nietfeld, W., Mentzel, H., Pieler, T., 1990. The *Xenopus laevis* poly(A) binding protein is composed of multiple functionally independent RNA binding domains. *EMBO J.* 9, 3699–3705.
- Nolan, T., Hands, R.E., Bustin, S.A., 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat. Protocols* 1, 1559–1582.
- Normanno, N., Di Maio, M., De Maio, E., De Luca, A., de Matteis, A., Giordano, A., Perrone, F., NCI-Naple Breast Cancer Group, 2005. Mechanisms of endocrine resistance and novel therapeutic strategies in breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 12, 721–747.
- Ogilvie, V.C., Wilson, B.J., Nicol, S.M., Morrice, N.A., Saunders, L.R., Barber, G.N., Fuller-Pace, F.V., 2003. The highly related DEAD box RNA helicases p68 and p72 exist as heterodimers in cells. *Nucleic Acids Res.* 31, 1470–1480.
- Ohnishi, T., Yamashita, A., Kashima, I., Schell, T., Anders, K.R., Grimson, A., Hachiya, T., Hentze, M.W., 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.
- Oishi, M., Taniguchi, Y., Nishimura, K., Yamada, T., Sasaki, Y., 2000. Characterisation of gene expression in bovine adipose tissue before and after fattening. *Anim. Genet.* 31, 166–170.

- Page, M.F., Carr, B., Anders, K.R., Grimson, A., Anderson, P., 1999. SMG-2 is a phosphorylated protein required for mRNA surveillance in *Caenorhabditis elegans* and related to Upf1p of yeast. *Mol. Cell. Biol.* 19, 5943–5951.
- Pal, M., Ishigaki, Y., Nagy, E., Maquat, L.E., 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.
- Park, E., Maquat, L.E., 2013. Staufen-mediated mRNA decay. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 4, 423–435.
- Parsley, T.B., Chen, B., Geletka, L.M., Nuss, D.L., 2002. Differential modulation of cellular signaling pathways by mild and severe hypovirus strains. *Eukaryotic Cell* 1, 401–413.
- Pauley, K.M., Eystathioy, T., Jakymiw, A., Hamel, J.C., Fritzler, M.J., Chan, E.K.L., 2006. Formation of GW bodies is a consequence of microRNA genesis. *EMBO Rep.* 7, 904–910.
- Pause, A., Méthot, N., Sonenberg, N., 1993. The HRIGRXXR region of the DEAD box RNA helicase eukaryotic translation initiation factor 4A is required for RNA binding and ATP hydrolysis. *Mol. Cell. Biol.* 13, 6789–6798.
- Pause, A., Sonenberg, N., 1992. Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: the mammalian translation initiation factor eIF-4A. *EMBO J.* 11, 2643–2654.
- Perlick, H.A., Medghalchi, S.M., Spencer, F.A., Kendzior, R.J., Jr, Dietz, H.C., 1996. Mammalian orthologues of a yeast regulator of nonsense transcript stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 10928–10932.
- Putnam, A.A., Jankowsky, E., 2013. DEAD-box helicases as integrators of RNA, nucleotide and protein binding. *Biochim. Biophys. Acta* 1829, 884–893.
- Radonić, A., Thulke, S., Bae, H.-G., Müller, M.A., Siegert, W., Nitsche, A., 2005. Reference gene selection for quantitative real-time PCR analysis in virus infected cells: SARS corona virus, Yellow fever virus, Human Herpesvirus-6, Camelpox virus and Cytomegalovirus infections. *Viol. J.* 2, 7.
- 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.
- Rocak, S., Linder, P., 2004. DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 232–241.
- Rodríguez-Gabriel, M.A., Watt, S., Bähler, J., Russell, P., 2006. Upf1, an RNA helicase required for nonsense-mediated mRNA decay, modulates the transcriptional response to oxidative stress in fission yeast. *Mol. Cell. Biol.* 26, 6347–6356.
- Rogers, G.W., Jr, Lima, W.F., Merrick, W.C., 2001. Further characterization of the helicase activity of eIF4A. Substrate specificity. *J. Biol. Chem.* 276, 12598–12608.
- Rogers, G.W., Jr, Richter, N.J., Merrick, W.C., 1999. Biochemical and kinetic characterization of the RNA helicase activity of eukaryotic initiation factor 4A. *J. Biol. Chem.* 274, 12236–12244.
- Rössler, O.G., Hloch, P., Schütz, N., Weitzenegger, T., Stahl, H., 2000. Structure and expression of the human p68 RNA helicase gene. *Nucleic Acids Res.* 28, 932–939.
- Rössler, O.G., Straka, A., Stahl, H., 2001. Rearrangement of structured RNA via branch migration structures catalysed by the highly related DEAD-box proteins p68 and p72. *Nucleic Acids Res.* 29, 2088–2096.
- Rosow, K.L., Janknecht, R., 2003. Synergism between p68 RNA helicase and the transcriptional coactivators CBP and p300. *Oncogene* 22, 151–156.
- Rufener, S.C., Mühlemann, O., 2013. eIF4E-bound mRNPs are substrates for nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 710–717.
- Ruiz-Echevarría, M.J., González, C.I., Peltz, S.W., 1998. Identifying the right stop: determining how the surveillance complex recognizes and degrades an aberrant mRNA. *EMBO J.* 17, 575–589.
- Sahni, A., Wang, N., Alexis, J.D., 2010. UAP56 is an important regulator of protein synthesis and growth in cardiomyocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393, 106–110.

- Salzman, D.W., Shubert-Coleman, J., Furneaux, H., 2007. P68 RNA helicase unwinds the human let-7 microRNA precursor duplex and is required for let-7-directed silencing of gene expression. *J. Biol. Chem.* 282, 32773–32779.
- Sambrook, J., Fritsch E., Maniatis T., 1989. *Molecular cloning - a laboratory manual.*, Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sato, H., Maquat, L.E., 2009. Remodeling of the pioneer translation initiation complex involves translation and the karyopherin importin beta. *Genes Dev.* 23, 2537–2550.
- Scheffner, M., Knippers, R., Stahl, H., 1989. RNA unwinding activity of SV40 large T antigen. *Cell* 57, 955–963.
- Scherer, W.F., Syverton, J.T., Gey, G.O., 1953. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J. Exp. Med.* 97, 695–710.
- Schul, W., van Driel, R., de Jong, L., 1998. A subset of poly(A) polymerase is concentrated at sites of RNA synthesis and is associated with domains enriched in splicing factors and poly(A) RNA. *Exp. Cell Res.* 238, 1–12.
- Schweingruber, C., Rufener, S.C., Zünd, D., Yamashita, A., Mühlemann, O., 2013. Nonsense-mediated mRNA decay - mechanisms of substrate mRNA recognition and degradation in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1829, 612–623.
- Schwer, B., Meszaros, T., 2000. RNA helicase dynamics in pre-mRNA splicing. *EMBO J.* 19, 6582–6591.
- Segditsas, S., Tomlinson, I., 2006. Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene* 25, 7531–7537.
- Sen, G.L., Blau, H.M., 2005. Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat. Cell Biol.* 7, 633–636.
- Serin, G., Gersappe, A., Black, J.D., Aronoff, R., Maquat, L.E., 2001. Identification and characterization of human orthologues to *Saccharomyces cerevisiae* Upf2 protein and Upf3 protein (*Caenorhabditis elegans* SMG-4). *Mol. Cell. Biol.* 21, 209–223.
- Servas, C., 2008. Untersuchungen zur spezifischen Funktion der Ddx17-Isoformen p72 und p82 in humanen Zellen. Diplomarbeit, Universität des Saarlandes.

- Seufert, D.W., Kos, R., Erickson, C.A., Swalla, B.J., 2000. p68, a DEAD-box RNA helicase, is expressed in chordate embryo neural and mesodermal tissues. *J. Exp. Zool.* 288, 193–204.
- Sheth, U., Parker, R., 2006. Targeting of aberrant mRNAs to cytoplasmic processing bodies. *Cell* 125, 1095–1109.
- Shi, H., Cordin, O., Minder, C.M., Linder, P., Xu, R.-M., 2004. Crystal structure of the human ATP-dependent splicing and export factor UAP56. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 17628–17633.
- Shibuya, T., Tange, T.Ø., Sonenberg, N., Moore, M.J., 2004. eIF4AIII binds spliced mRNA in the exon junction complex and is essential for nonsense-mediated decay. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 346–351.
- Shin, S., Rossow, K.L., Grande, J.P., Janknecht, R., 2007. Involvement of RNA helicases p68 and p72 in colon cancer. *Cancer Res.* 67, 7572–7578.
- Silverman, E., Edwalds-Gilbert, G., Lin, R.-J., 2003. DExD/H-box proteins and their partners: helping RNA helicases unwind. *Gene* 312, 1–16.
- Simon, E., Camier, S., Séraphin, B., 2006. New insights into the control of mRNA decapping. *Trends Biochem. Sci.* 31, 241–243.
- 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.
- Singleton, M.R., Dillingham, M.S., Wigley, D.B., 2007. Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 23–50.
- Stein, B., 2011. Untersuchungen zur spezifischen Bindung des DEAD-box Proteins p68 an mRNA in humanen Zellen. Diplomarbeit, Universität des Saarlandes.
- Stevenson, R.J., Hamilton, S.J., MacCallum, D.E., Hall, P.A., Fuller-Pace, F.V., 1998. Expression of the “dead box” RNA helicase p68 is developmentally and growth regulated and correlates with organ differentiation/maturation in the fetus. *J. Pathol.* 184, 351–359.
- Stone, B., Schummer, M., Paley, P.J., Thompson, L., Stewart, J., Ford, M., Crawford, M., Urban, N., O'Briant, K., Nelson, B.H., 2003. Serologic analysis of ovarian tumor antigens reveals a bias toward antigens encoded on 17q. *Int. J. Cancer* 104, 73–84.

Sun, X., Maquat, L.E., 2000. mRNA surveillance in mammalian cells: the relationship between introns and translation termination. *RNA* 6, 1–8.

Svitkin, Y.V., Evdokimova, V.M., Brasey, A., Pestova, T.V., Fantus, D., Yanagiya, A., Imataka, H., Skabkin, M.A., Ovchinnikov, L.P., Merrick, W.C., Sonenberg, N., 2009. General RNA-binding proteins have a function in poly(A)-binding protein-dependent translation. *EMBO J.* 28, 58–68.

Tanner, N.K., Cordin, O., Banroques, J., Doère, M., Linder, P., 2003. The Q motif: a newly identified motif in DEAD box helicases may regulate ATP binding and hydrolysis. *Mol. Cell* 11, 127–138.

Taylor, R., Kebaara, B.W., Nazarens, T., Jones, A., Yamanaka, R., Uhrenholdt, R., Wendler, J.P., Atkin, A.L., 2005. Gene set coregulated by the *Saccharomyces cerevisiae* nonsense-mediated mRNA decay pathway. *Eukaryotic Cell* 4, 2066–2077.

Thermann, R., Neu-Yilik, G., Deters, A., Frede, U., Wehr, K., Hagemeyer, C., Hentze, M.W., Kulozik, A.E., 1998. Binary specification of nonsense codons by splicing and cytoplasmic translation. *EMBO J.* 17, 3484–3494.

Topisirovic, I., Svitkin, Y.V., Sonenberg, N., Shatkin, A.J., 2011. Cap and cap-binding proteins in the control of gene expression. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2, 277–298.

Tretter, T., 2008. Etablierung eines EBV-abgeleiteten induzierbaren Knock-down-Knock-in Systems für die Proteine der p68-DEAD-Box-Subfamilie. Diplomarbeit, Universität des Saarlandes.

Uhlmann-Schiffler, H., Rössler, O.G., Stahl, H., 2002. The mRNA of DEAD box protein p72 is alternatively translated into an 82-kDa RNA helicase. *J. Biol. Chem.* 277, 1066–1075.

Uhlmann-Schiffler, H., 2009. Proteine und Metalle- eine Verbindung fürs Leben. Habilitationsschrift, Universität des Saarlandes.

Unterholzner, L., Izaurralde, E., 2004. SMG7 acts as a molecular link between mRNA surveillance and mRNA decay. *Mol. Cell* 16, 587–596.

Walker, E.H., Pacold, M.E., Perisic, O., Stephens, L., Hawkins, P.T., Wymann, M.P., Williams, R.L., 2000. Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Mol. Cell* 6, 909–919.

- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., Gay, N.J., 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1, 945–951.
- Wang, D., Zavadil, J., Martin, L., Parisi, F., Friedman, E., Levy, D., Harding, H., Ron, D., Gardner, L.B., 2011. Inhibition of nonsense-mediated RNA decay by the tumor microenvironment promotes tumorigenesis. *Mol. Cell. Biol.* 31, 3670–3680.
- Wang, H., Gao, X., Huang, Y., Yang, J., Liu, Z.-R., 2009. P68 RNA helicase is a nucleocytoplasmic shuttling protein. *Cell Res.* 19, 1388–1400.
- Watanabe, M., Yanagisawa, J., Kitagawa, H., Takeyama, K., Ogawa, S., Arao, Y., Suzawa, M., Kobayashi, Y., Yano, T., Yoshikawa, H., Masuhiro, Y., Kato, S., 2001. A subfamily of RNA-binding DEAD-box proteins acts as an estrogen receptor alpha coactivator through the N-terminal activation domain (AF-1) with an RNA coactivator, SRA. *EMBO J.* 20, 1341–1352.
- Weirich, C.S., Erzberger, J.P., Berger, J.M., Weis, K., 2004. The N-terminal domain of Nup159 forms a beta-propeller that functions in mRNA export by tethering the helicase Dbp5 to the nuclear pore. *Mol. Cell* 16, 749–760.
- Weisser, M., Haferlach, T., Schoch, C., Hiddemann, W., Schnittger, S., 2004. The use of housekeeping genes for real-time PCR-based quantification of fusion gene transcripts in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 18, 1551–1553.
- Wells, S.E., Hillner, P.E., Vale, R.D., Sachs, A.B., 1998. Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol. Cell* 2, 135–140.
- Weng, Y., Czaplinski, K., Peltz, S.W., 1996. 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.
- Wilson, B.J., Bates, G.J., Nicol, S.M., Gregory, D.J., Perkins, N.D., Fuller-Pace, F.V., 2004. The p68 and p72 DEAD box RNA helicases interact with HDAC1 and repress transcription in a promoter-specific manner. *BMC Mol. Biol.* 5, 11.
- Wittmann, J., Hol, E.M., Jäck, H.-M., 2006. hUPF2 silencing identifies physiologic substrates of mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *Mol. Cell. Biol.* 26, 1272–1287.

- Wortham, N.C., Ahamed, E., Nicol, S.M., Thomas, R.S., Periyasamy, M., Jiang, J., Ochocka, A.M., Shousha, S., Huson, L., Bray, S.E., Coombes, R.C., Ali, S., Fuller-Pace, F.V., 2009. The DEAD-box protein p72 regulates ERalpha-/oestrogen-dependent transcription and cell growth, and is associated with improved survival in ERalpha-positive breast cancer. *Oncogene* 28, 4053–4064.
- Xie, K., 2007. Untersuchungen möglicher Interaktionen des DEAD-box-Proteins p68 mit Mitgliedern der Argonaute-Proteinfamilie. Diplomarbeit, Universität des Saarlandes.
- Yager, J.D., Davidson, N.E., 2006. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 354, 270–282.
- 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.
- Yan, X., Mouillet, J.-F., Ou, Q., Sadovsky, Y., 2003. A novel domain within the DEAD-box protein DP103 is essential for transcriptional repression and helicase activity. *Mol. Cell. Biol.* 23, 414–423.
- Yang, L., Lin, C., Liu, Z.-R., 2006. P68 RNA helicase mediates PDGF-induced epithelial mesenchymal transition by displacing Axin from beta-catenin. *Cell* 127, 139–155.
- Yepiskoposyan, H., Aeschmann, F., Nilsson, D., Okoniewski, M., Mühlemann, O., 2011. Autoregulation of the nonsense-mediated mRNA decay pathway in human cells. *RNA* 17, 2108–2118.
- Zetoune, A.B., Fontanière, S., Magnin, D., Anczuków, O., Buisson, M., Zhang, C.X., Mazoyer, S., 2008. Comparison of nonsense-mediated mRNA decay efficiency in various murine tissues. *BMC Genet.* 9, 83.
- Zhang, J., Sun, X., Qian, Y., LaDuca, J.P., Maquat, L.E., 1998a. 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.
- Zhang, J., Sun, X., Qian, Y., Maquat, L.E., 1998b. Intron function in the nonsense-mediated decay of beta-globin mRNA: indications that pre-mRNA splicing in the nucleus can influence mRNA translation in the cytoplasm. *RNA* 4, 801–815.
- Zhang, X., Ding, L., Sandford, A.J., 2005. Selection of reference genes for gene expression studies in human neutrophils by real-time PCR. *BMC Molecular Biology* 6, 4.

Zhou, X., Luo, J., Mills, L., Wu, S., Pan, T., Geng, G., Zhang, J., Luo, H., Liu, C., Zhang, H., 2013. DDX5 facilitates HIV-1 replication as a cellular co-factor of Rev. PLoS ONE 8, e65040.

Zonta, E., Bittencourt, D., Samaan, S., Germann, S., Dutertre, M., Auboeuf, D., 2013. The RNA helicase DDX5/p68 is a key factor promoting c-fos expression at different levels from transcription to mRNA export. Nucleic Acids Res. 41, 554–564.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Als Erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Hans Stahl für die Ermöglichung dieser Dissertation und für seine freundliche Unterstützung bedanken. Er hat diese Arbeit mit seinen Ideen, seiner Geduld und Erfahrung und vielen fruchtbaren Diskussionen immer wieder vorangetrieben.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Friedrich Grässer bedanken.

Herrn Prof. Dr. Dietz (Johns Hopkins Universität, Baltimore) danke ich für die Bereitstellung des pEGFP-Upfl-Plasmids, Herrn Prof. Dr. A.E. Kulozik (Universitätsklinikum Heidelberg) danke ich für die Gabe der pRTS-pur- and pRTS-hygro-Plasmide und ein herzlicher Dank gilt auch Frau Dr. G. Neu-Yilik (Universitätsklinikum Heidelberg) für die Zurverfügungstellung der NMD-Reporter- und pCIneo-FLAG-Upf2-, pCIneo-FLAG-Upf3A- und pCIneo-FLAG-Upf3B-Plasmide.

Ein besonderer Dank geht auch an Dr. Simone Altmeyer die durch ihr stetiges Interesse, ihre Erfahrung und unzählige praktische Tipps diese Arbeit mit geprägt hat.

Danken möchte ich auch den „Mitgliedern der DEAD-box Crew“ Anna-Maria Bohrer, Heike Haas, Hala Ismael, Sybille Jungbluth, Katja Noll und Dr. Heike Uhlmann-Schiffler für die angenehme Arbeitsatmosphäre und praktische Unterstützung.

Bei meinen Eltern und meiner Schwester möchte ich mich für die vielseitige Unterstützung und den familiären Rückhalt bedanken.

Simon Zapp danke ich für seine liebevolle Unterstützung, für sein Verständnis für meine zeitintensive Arbeit, aber vor allem dafür, dass er immer für mich da ist.