

3 Material und Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Bakterienstämme

Für die Präparation und Klonierung von rekombinanten Plasmiden wurde der Bakterienstamm XL1-Blue ($F'::Tn10$ proA⁺B⁺ lacI^q Δ (lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96(Nal^r) thi hsdR17(r_K⁻m_K⁺) supE44 relA1 lac) verwendet. Bakterien des Stamms RZ1032 (dut^{ts} ung tet^r) wurden zur Isolierung einzelsträngiger Uracil-haltiger DNA kultiviert (Hagemeier, 1996).

3.1.2 Phagen

Der Helferphage R408 (Russel *et al.*, 1986; Vieira und Messing, 1987) wurde zur Infektion von RZ1032-Bakterien verwendet, um für Mutagenese-Reaktionen einzelsträngige Uracil-haltige DNA zu präparieren.

3.1.3 Herstellung elektrokompetenter Bakterien und Elektroporation

Elektrokompetente *E. coli* wurden entsprechend der Methode von Hanahan *et al.*, 1991 hergestellt. Folgende Veränderungen gegenüber dem Originalprotokoll ergaben sich bei der Durchführung: als Medium wurde SOB ohne Mg²⁺ verwendet, die Waschschrte erfolgten mit 10% Glycerin und die OD₆₀₀ der Bakterienkultur betrug zum Zeitpunkt der Ernte 0,6-075 Absorptionseinheiten. Elektrokompetente *E. coli* wurden bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

Zur Transformation durch Elektroporation wurde ein Aliquot der kompetenten *E. coli* auf Eis aufgetaut. 50 µl der Baktriensuspension wurden mit 1 µl der DNA-Lösung (bzw. Ligations- oder Mutageneseansatz) sowie 20 µl H₂O_{bidest} in einer eiskalten Elektroporationsküvette (Peqlab, Erlangen) vermischt. Der Ansatz wurde in einem Elektroporator (BioRad) bei 2,5 kV, 25 µF, 200 Ω elektroporiert, in 600 µl LB-Medium aufgenommen und 45 Min. bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (5.000 rpm, 2 Min.) sedimentiert und auf einer LB-Platte mit Ampicillin (100 µg/ml) ausgestrichen. Nach Übernacht-Inkubation bei 37°C

hatten die Kolonien sichtbare Größe erreicht und konnten weiter verwendet werden (Mutagenese, DNA-Preps im Mini- oder Maxi-Maßstab).

3.2 Kultur eukaryontischer Zellen

HeLa-Zellen (humane, epitheliale Zervixkarzinom-Zellen) wurden, wenn nicht anders vermerkt, bei 37°C, 5% CO₂ in einem feuchtigkeitsgesättigten Inkubator kultiviert. Als Zellkulturmedium diente DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), das mit Glutamax, 10% fötalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin supplementiert wurde. Die Translation von mRNAs mit IREs in der 5'UTR wurde spezifisch durch die Zugabe der Eisenquelle Häm-Arginat (Leiras, Turku, Finnland) 20 h nach Waschen der Transfektion aktiviert oder durch Zugabe des Eisenchelators Deferoxaminmesilat (Novartis Pharma) 6 h nach Waschen der Transfektion inaktiviert.

3.3 Transfektion eukaryontischer Zellen

3.3.1 BBS/Kalziumphosphat Methode

Alle Transfektionen von HeLa-Zellen – außer der Experimente mit den Histon *H1F3*/β-Globin Hybridkonstrukten – wurden mit der BBS/Kalziumphosphat Methode durchgeführt.

Zur Transfektion wurden 7×10^5 HeLa-Zellen am Vortag in einer 10 cm Zellkulturschale ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Zellkulturmedium 2-4 Stunden vor der geplanten Transfektion gewechselt. Für hocheffiziente Transfektionen wurden zwischen 30 und 50 µg Plasmid-DNA eingesetzt, das Verhältnis zwischen dem untersuchten Konstrukt und der Kontrolle für variable Transfektionseffizienzen wurde den jeweiligen Expressionsstärken angepaßt (eine Aufstellung der eingesetzten Mengen findet sich im nächsten Absatz). Die verschiedenen Plasmide wurden sorgfältig gemischt und mit H₂O_{bidest} auf 450 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Dann wurden 50 µl einer 2,5 M CaCl₂-Lösung zugefügt und erneut gemischt. Zum Schluß erfolgte die Zugabe von 500 µl einer 2×BBS Stammlösung. Der Transfektionsansatz wurde abschließend noch einmal kräftig gemischt. Dieses Gemisch wurde etwa 20-25 Min. bei Raumtemperatur

inkubiert und anschließend auf die Zellkulturschalen pipettiert. Die Transfektion erfolgte für 20 h in einem Inkubator mit 3% CO₂. Danach wurden die Zellen zweimal mit TBS gewaschen und mit frischem Zellkulturmedium für weitere 24 h in einem Inkubator mit 5% CO₂ weiterkultiviert, um die Expression der transfizierten Plasmid-DNA zu ermöglichen. Zum Ernten wurden die transfizierten Zellen mit PBS gewaschen, mit einem sterilen Zellschaber (Greiner) von der Oberfläche der Zellkulturschale geschabt und in Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Die weitere Aufarbeitung der Zellen zur RNA- oder Proteinisolation ist in eigenen Abschnitten detailliert beschrieben.

Folgende Mengen von Plasmiden wurden für die verschiedenen Experimente eingesetzt:

- Analyse der *F2/HBB* Hybridkonstrukte: 40 µg *F2/HBB* Konstrukt + 10 µg WT300 Kontrolle.
- Konstrukte mit zwei 3'End-Prozessierungssignalen: 40 µg der Konstrukte ohne Kontrolle (da intern kontrolliert).
- Analyse der Poly(A)-Schwanzlängen mit LM-PAT: 25 µg *F2/HBB* Konstrukt + 25 µg Globin/CAT Konstrukt (Danckwardt *et al.*, 2002).
- Untersuchungen mit dem λN/boxB System: 25 µg des λN-Fusionskonstruktes (bzw. nur λN-Peptid als Negativkontrolle) + 10 µg des 5boxB Konstruktes + 5 µg der WT300eIII Kontrolle.
- Immunpräzipitationen: 15 µg von FLAG-hUpf3b (WT bzw. Mutanten) und 15 µg λN-Y14 bzw. λN-RNPS1 oder nur 30 µg FLAG-hUpf3b oder λN-Y14 für die Kontrollen.

Allen Transfektionsansätzen wurden etwa 2,5-3,5 µg eines GFP-Expressionsvektors zugefügt, um die Effizienz der Transfektion unter einem Fluoreszenzmikroskop qualitativ abschätzen zu können.

3.3.2 HBS/Kalziumphosphat Methode

Die Transfektionen für die *HIF3/β*-Globin Experimente wurden mit der HBS/Kalziumphosphat Methode durchgeführt, da hierdurch ein besseres

Verhältnis zwischen spezifischen Banden und Hintergrundbanden in der Ribonuklease-Protektions-Analyse erreicht wurde.

Zur Transfektion wurden am Vortag etwa $8-9 \times 10^5$ HeLa-Zellen in einer 10 cm Zellkulturschale ausgesät. 2-4 h vor der geplanten Transfektion wurde das Zellkulturmedium gewechselt. Für diese Experimente wurden 35 μg des Hybridkonstruktes und 0,75 μg eines β -Globin Expressionsvektors gemischt und mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf 450 μl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Plasmide wurden mit 50 μl 2,5 M CaCl_2 versetzt und gut gemischt. 500 μl einer 2 \times HBS wurden in 15 ml Röhrchen vorgelegt und das DNA/ CaCl_2 -Gemisch unter ständigem Vortexen tropfenweise hinzupipettiert. Der fertige Transfektionsansatz wurde 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und dann zu den Zellen gegeben. Die Transfektion erfolgte für 18 h in einem Inkubator mit den üblichen 5% CO_2 (im Gegensatz zur BBS-Methode). Danach wurden die Zellen zweimal mit TBS gewaschen und mit frischem Zellkulturmedium für weitere 22 h weiterkultiviert, um die Expression der transfizierten Plasmide zu ermöglichen. Für die Ernte wurden die transfizierten Zellen mit PBS gewaschen, mit einem sterilen Zellschaber (Greiner) von der Oberfläche der Zellkulturschalen geschabt und in Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Die weiteren Aufarbeitungsschritte (RNA- oder Protein-Isolation) sind in weiteren Abschnitten beschreiben (s.u.).

3.4 Plasmid-Konstrukte

Für die *F2/HBB* Hybridkonstrukte wurden eine *Xho*I-Restriktionsschnittstelle direkt vor dem Terminationskodon und eine *Hind*III-Schnittstelle 192 nt stromab des Terminationskodons in einen β -Globin Expressionsvektor (Thermann *et al.*, 1998) eingefügt. Die *F2* 3'UTR in einer Länge von 237 nt inklusive des Terminationskodons und 3'flankierender Sequenzen wurde mittels PCR aus humaner genomischer DNA mit einem geeigneten Primer-Paar (5'-TTT TCT CGA GTA GGG GGC CAC TCA TAT TCT GGG C-3'; 5'-TTT TAA GCT TCC CAC CTC AGC CTC CCG AGT G-3') amplifiziert und in den modifizierten β -Globin Expressionsvektor eingefügt. Das *F2*G*-Konstrukt wurde mit genomischer DNA eines gesunden Probanden erstellt, das *F2*A*-Konstrukt mit der DNA eines homozygoten Trägers der *F2* 20210 G \rightarrow A Mutation (zur

Verfügung gestellt von B. Vetter). Die Konstrukte mit zwei 3'End-Prozessierungsstellen wurden durch Insertion von PCR-amplifizierten Fragmenten der *F2*G*, *F2*A* oder *HBB* 3'UTRs in die *HindIII*-Schnittstelle entweder des modifizierten β -Globin Expressionsvektors (*HBB/HBB*-Konstrukt) oder der *F2*G*- bzw. *F2*A*-Hybridkonstrukte (alle anderen Konstrukte mit zwei 3'End-Prozessierungssignalen) konstruiert.

Für die Erstellung der *HIF3/HBB* Hybridkonstrukte wurde wie bei den *F2/HBB*-Konstrukten eine *XhoI*-Restriktionsschnittstelle direkt vor dem Terminationskodon in einen β -Globin-Expressionsvektor (mit oder ohne ein PTC an Position 39 des ORF) inseriert, nicht jedoch eine *HindIII* Schnittstelle in einer 3'gelegenen Position, die nicht benötigt wurde. Der verwendete Expressionsvektor enthielt ein funktionelles IRE in der 5'UTR, um spezifisch die Translation der mRNA regulieren zu können (Thermann *et al.*, 1998). Anschließend wurde die vollständige β -Globin 3'UTR mit dem Poly(A)-Signal AATAAA und einem kryptischen Poly(A)-Signal ATTAAA sowie 1,8 kb 3'flankierender Sequenzen (inklusive U-reichen Sequenzen für die Polyadenylierung) durch ein Fragment des humanen *HIF3* Gens ersetzt, das aus dem Terminationskodon, der 3'UTR sowie 918 nt stromab gelegener Sequenzen inklusive dem Histon-spezifischen Purinreichen „Spacer“-Element für die Histon 3'End-Prozessierung (Muller und Schumperli, 1997) bestand. Dieses Fragment wurde zwischen der *XhoI* Schnittstelle und der *XbaI* Schnittstelle (in der 3'flankierenden Region des β -Globin Gens, ca. 1,7 kb stromab des Poly(A)-Signals) des Vektors eingefügt. Die verwendete Histon 3'UTR enthält keine offensichtliche Sequenz, die als Poly(A)-Signal benutzt werden könnte. Das *HIF3*-Fragment wurde aus humaner genomischer DNA amplifiziert (Primer-Paar : 5'-TTT TCT CGA GTG AAA CTG GCG GGA CGT TCC CCT TTG-3'; 5'-TTT TTC TAG AGA GCC CCT GGG AAA ATA AGT CC-3'). Die Konstrukte WT Δ C/H1 und NS 39 Δ C/H1 unterschieden sich von den IRE-Konstrukten durch die Deletion eines Cytosin-Nukleotids in der IRE-Sequenz, wodurch das IRE funktionell inaktiviert wird (Hentze *et al.*, 1987a; Hentze *et al.*, 1987b). In den Konstrukten cWT IRE/H1 und

cNS 39 IRE/H1 wurde das intronhaltige genomische β -Globin Gen durch einen intronlosen β -Globin ORF ersetzt (Neu-Yilik *et al.*, 2001).

Der Vektor pCI-neo λ N zur Expression von N-terminal λ N-fusionierten Proteinen wurde durch Insertion der λ N-Sequenz (mit einem ATG in einem guten Kontext für die Translationsinitiation) zwischen der *NheI* und der *XhoI*-Schnittstelle des Vektors pCI-neo (Promega) erstellt. Die λ N-Sequenz wurde mit PCR aus dem Vektor λ N-4G (zur Verfügung gestellt durch E. Gregorio) amplifiziert (Primer-Paar: 5'-TTT TTT GCT AGC CAC CAT GGA CGC ACA AAC ACG ACG-3'; 5'-TTT TCT CGA GCG GTG GGT TTG CAG CTT TCC ATT GAG CTT G-3').

Der Vektor zur Expression einer β -Globin mRNA mit 5boxB Bindungsstellen in der 3'UTR wurde durch Insertion der boxB-Sequenz in die *XhoI* und die *ApaI*-Schnittstelle des Konstruktes WT-spf (Thermann *et al.*, 1998) erstellt. Die *ApaI*-Schnittstelle wurde anschließend durch *in vitro* Mutagenese entfernt (Oligo: 5'-CCT TCT TCA GG GCC CAG GAA TCC CCA GTT TAG TAG TTG G-3') und eine weitere boxB Sequenz durch PCR (Primer: 5'-CCC ACA GCT CCT GGG CAA CGT GC-3'; 5'-CCA TAT AGG GCC CTT CTT CAG GGC CCT ATA TGG GCC CTT CTT CAG GGC CCA GTT TAG TAG TTG GAC-3') und anschließende Klonierung in die *XhoI* Schnittstelle eingefügt (Globin-2boxB). Die doppelte boxB-Sequenz wurde mit einer weiteren PCR amplifiziert (Primer: 5'-TCC TTT GTC GAC TAA GTC CAA CTA CTA AAC TGG G-3'; 5'-AAG GCT CGA GAT AAT ATC CTC GAT AGG GCC-3') und in das Konstrukt mit einer boxB-Sequenz in die *XhoI*-Restriktionsschnittstelle eingefügt (Globin-3boxB). Durch das Einfügen einer weiteren doppelten boxB-Sequenz in die *XhoI* Schnittstelle des 3boxB Plasmids wurde das Plasmid β -Globin 5boxB erhalten. Die Konstrukte IRE-5boxB und IRE Δ C-5boxB wurden durch Umklonieren eines *EcoRI/XbaI* Fragmentes aus dem 5boxB Konstrukt in einen β -Globin Expressionsvektor mit IRE bzw. Δ C-IRE in der 5'UTR erhalten. Ein 5boxB Konstrukt mit einem nach 3'verschobenen Terminationskodon wurde durch Deletion des physiologischen Terminationskodons und eines Terminationskodons in der 3'UTR (Oligos: 5'-GCA AGA AAG CGA GCT TGG TGA TAC TTG TGG G-3'; 5'-GGA ATC CCC AGT TTG GTA GTT GGA CTT AGG-3')

erstellt. Ein weiteres Terminationskodon innerhalb der 5boxB-Bindungsstellen wurde mit einer weiteren *in vitro* Mutagenese aus dem Leserahmen geschoben (5'-CAG GGC CCA GTT TGT AGT TGG ACT TAG-3').

Die Expressionsvektoren λ N-hUpf3b, λ N-Y14, λ N-Magoh, λ N-RNPS1, λ N-HnRNP D, λ N-HnRNP K, λ N-SRp20, λ N-U5 116kD, λ N-9G8, λ N-HRH1, λ N-Hrp1 und λ N-HnRNP A1 wurden durch Insertion der jeweiligen cDNAs im korrekten Leserahmen mit dem λ N-Peptid konstruiert. Die cDNAs wurden entweder mittels RT-PCR aus HeLa cytoplasmatischer Gesamt-RNA (λ N-hUpf3b, λ N-Y14, λ N-Magoh, λ N-RNPS1, λ N-HnRNP D, λ N-HnRNP K, λ N-SRp20, λ N-U5 116, λ N-9G8, λ N-HRH1) oder mittels PCR aus *S. cerevisiae* genomischer DNA (λ N-Hrp1) oder mittels PCR aus einem Plasmid für HnRNPA1 (zur Verfügung gestellt von D. Ostareck, EMBL, Heidelberg) amplifiziert. Die dafür verwendeten Oligonukleotide sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Name	Oligonukleotide
hUpf3b	5'-TTTTCTCGAGATGAAGGAAGAGAAGGAGCACAG-3' 5'-TTTTCTAGATCACTCCTCTCCTCCTTCTTTCTATGGC-3'
Y14	5'-TTTTCTCGAGATGGCGGACGTGCTAGATC-3' 5'-TTTTTTTTGCGGCCGCTCAGCGACGTCTCCGGTCTGG-3'
Magoh	5'-TTTTCTCGAGATGGAGAGTGACTTTTATCTGGA-3' 5'-CCATGTCCACACCAATATTTTCAG-3'
RNPS1	5'-TTTTGAATTCGGATTTATCAGGAGTGAAAAAGAAGAGC-3' 5'-TTTTCTAGATTATCGGGAGGAGTTGGAGCTGG-3'
HnRNP D	5'-TTTTGAATTCCTCGGAGGAGCAGTTCGGCGGGGACG-3' 5'-TTTTGTTCGACTTAGTATGGTTTGTAGCTATTTTGATGACCACCTC-3'
HnRNP K	5'-TTTTGAATTCGAAACTGAACAGCCAGAAGAAACCTTCC-3' 5'-TTTTGTTCGACTTAGAAAAACTTTCCAGAATACTGCTTCACACTG-3'
SRp20	5'-TTTTGAATTCATCGTGATTCCTGTCCATTGGACTGTAAGG-3' 5'-TTTTGTTCGACCTATTTCTTTTCATTTGACCTAGATCGACTACGAG-3'
U5-116kD	5'-TTTTCTCGAGATGGATACCGACTTATATGATGAGTTTGG-3' 5'-TTTTTCTGAGTCACATGGGGTAATTGAGCACAACATCC-3'
9G8	5'-TTTTGTTCGACCTCGCGTTACGGGCGGTACGGAGG-3' 5'-TTTTGTTCGACTCAGTCCATTCTTTCAGGACTTGCACCTTCTG-3'

HRH1	5'-TTTTGAATTCCATGGCTGTGGCTGTAGCC-3'
	5'-TTTTTTTTGCGGCCGCTCACTGTCTGCCTCCGCATCAGG-3'
Hrp1	5'-TTTTGAATTCCAGCTCTGACGAAGAAGATTTCAACGAC-3'
	5'-TTTTGTGCGACTTACCTATTATATGGATGGTAGCCATTATTACGTC-3'
HnRNP A1	5'-TTTTGAATTCCTCTAAGTCAGAGTCTCCTAAAGAGCC-3'
	5'-TTTTGTGCGACTTAAAATCTTCTGCCACTGCCATAGCTAC-3'

Die meisten Deletions- und alle Punktmutanten von hUpf3b sind durch *in vitro* Mutagenese hergestellt worden (Beschreibung der Durchführung und der verwendeten Oligonukleotide im Abschnitt über Mutagenese). Die Deletionsmutanten Δ 1-48, Δ 451-470 und Δ 371-470 wurden durch PCR mit Oligonukleotiden mit den gewünschten Deletionen (Δ 1-48: 5'-TTT TCT CGA GGC GCT GAG CAA GGT GG-3'; Δ 451-470: 5'-TTT TGT CGA CTC ATT CTG CTG CTG AAT CTC C-3'; Δ 371-470 5'-GGG TCG ACT CTA GAT CAC TCT TTC TCA TAG C-3') sowie den passenden Gegen-Primern amplifiziert und in den Vektor pCI-neo λ N insertiert. Die kurzen C-terminalen Fragmente von hUpf3b mit λ N-Peptid wurden durch PCR mit Oligos an den gewünschten Positionen innerhalb des hUpf3b ORF (200AA: 5'-TTT TCT CGA GCT CAA GAA GCC AGA AAA AGG-3'; 150AA: 5'-TTT TCT CGA GCC AAA GAG ACC TGA AG-3'; 100AA: 5'-TTT TCT CGA GAA GAC TTT TAA GAG AAA AG-3'; 70AA: TTT TCT CGA GGG CAG CTC AGA AAA AAC TG-3') und einem Gegen-Primer (5'-TTT TGT CGA CTC ACT CCT CTC CTC C-3') amplifiziert und in das pCI-neo λ N-Plasmid zwischen der *XhoI* und der *SalI* Schnittstelle eingefügt.

Der Vektor pCI-neo FLAG wurde erstellt durch Einfügen der Sequenz für das FLAG-Epitop im Kontext einer guten Translationsinitiationssequenz zwischen den Restriktionsschnittstellen *NheI* und *XhoI*. Dazu wurde ein Oligo mit der FLAG-Sequenz (5'-TTT TTT GCT AGC CAC CAT GGA CTA CAA GGA CGA CGA TGA CAA GCC ACC GCT CGA GAT GGC G-3') und ein geeignetes Gegen-Oligo (5'-TTT TGA ATT CTC GAG TCA GCG ACG TCT CCG GTC-3') weiter stromab verwendet mit denen ein etwas größeres Fragment amplifiziert wurde. Die unerwünschten Sequenzen wurden anschließend durch einen *XhoI*-

Verdau und Religation aus dem Expressionsvektor entfernt. Die Plasmide FLAG-hUpf3bWT bzw. FLAG-hUpf3b Δ 421-434 wurden durch Einfügen der *XhoI/NotI* Fragmente aus den korrespondierenden λ N-hUpf3b Vektoren erstellt.

Die Kotransfektionskontrolle WT300+eIII für die λ N/boxB-Versuche wurde durch Modifikation des Vektors WT+300 (Neu-Yilik *et al.*, 2001) erstellt. Hierzu wurden Sequenzen aus β -Globin Exon 3 in die 3'UTR des WT+300 Konstruktes (Schnittstellen *SalI* und *NotI*) eingefügt. Alle übrigen verwendeten Konstrukte sind bereits früher beschrieben worden (Brocke *et al.*, 2002; Danckwardt *et al.*, 2002; Neu-Yilik *et al.*, 2001; Thermann *et al.*, 1998).

3.5 *In vitro* Mutagenese

In vitro Mutagenesen wurden nach zwei verschiedenen Methoden durchgeführt, wobei für die Wahl der verwendeten Methode die jeweiligen Vor- und Nachteile abgewogen wurden. Bei der PCR-Methode ist die Effizienz jedes Schritts der Mutagenese direkt nachvollziehbar, so daß man eine nicht zufriedenstellende PCR sofort noch einmal durchführen kann, ohne zuerst Klone auf die Mutation untersuchen zu müssen. Hinzu kommt, daß die Mutagenese-Effizienz beinahe 100% beträgt. Der Nachteil dieser Methode besteht in möglichen unerwünschte Punktmutationen, die durch die Fehlerrate der PCR-Reaktion entstehen. Daher muß man die Mutanten stets über die gesamte Länge des amplifizierten Fragmentes sequenzieren. Ein Vorteil der anderen Methode mit einzelsträngiger, uracilhaltiger DNA liegt darin, daß ausschließlich die gewünschten Mutationen eingeführt werden (die Fehlerrate ist vernachlässigbar gering), zudem ist sie weniger arbeitsaufwendig als die PCR-Methode. Nachteilig ist dabei jedoch, daß die einzelnen Schritte nicht überprüfbar sind und die Mutageneseeffizienz bei nur etwa 50% liegt.

In dieser Arbeit wurden die Mutagenesen für die *F2/HBB* Hybridkonstrukte und die *H1F3/HBB* Konstrukte sowie einige der Deletionen in hUpf3b unter Verwendung einzelsträngiger DNA durchgeführt. Die übrigen Deletionen und alle Punktmutationen in hUpf3b wurden mit der PCR-Methode eingeführt.

3.5.1 PCR *in vitro* Mutagenese

Durch *in vitro* Mutagenese mittels PCR wurden die Deletionen Δ 117-279 und Δ 49-143 sowie die Punktmutationen K421A, R423A, P424A, Y429F und R434A in den λ N-hUpf3b Expressionsvektor eingeführt. Die verwendeten Oligonukleotide waren: Δ 117-279: 5'-CTC TTT TGT CCA ATT CTT TAC CAT CAA AGC GAT CCC-3'; Δ 49-143: 5'-GGT ATC TCT TTT CTT AGT TTC TTT CTT CTC CTT-3'; K421A: 5'-CGC TGG ACG ATC CGC GTT TCT TAT TCG-3'; R423A: 5'-CTG CAT CGC TGG AGC ATC CTT GTT TC-3'; P424A: 5'-GCT GCA TCG CTG CAC GAT CCT TGT TTC-3'; Y429F: 5'-GCT CCT GGT TGG AAA AGC TGC ATC GC-3'; R434A: 5'-CGA TTT CGG CTT GCA GCT CCT GGT TG-3'. Diese Oligos wurden als Antisense-Primer für die erste PCR-Reaktion verwendet, als Sense-Primer diente hUpf3b-Xho1-sense (5'-TTT TCT CGA GAT GAA GGA AGA GAA GGA GCA CAG-3'). Die Bedingungen der PCR wurden den jeweiligen Annealing-Temperaturen der Primer angepaßt. Als Polymerase für die PCR-Reaktionen wurde Vent®-Polymerase (New England Biolabs) eingesetzt, die eine höhere Genauigkeit als Taq-Polymerase aufweist. Es wurden 30 PCR-Zyklen durchgeführt, das entstandene Produkt wurde anschließend über ein Agarosegel aufgereinigt. Das Produkt diente bei der zweiten PCR als Sense-Primer, Antisense-Primer war T3-antisense (5'-GCA TTA ACC CTC ACT AAA GGG-3'). Mit einem wiederum angepaßten PCR-Programm wurde das gewünschte Stück der hUpf3b cDNA amplifiziert (ebenfalls 30 Zyklen) und über ein Agarosegel aufgereinigt. Die Fragmente wurden über Nacht mit *Xho1* und *Not1* verdaut, aufgereinigt und in den Vektor pCI-neo λ N ligiert. Die erhaltenen Klone wurden zuerst mittels eines vorläufigen Restriktionsverdaus (*Xho1* und *Not1*) analysiert und abschließend vollständig sequenziert.

3.5.2 *In vitro* Mutagenese mit Uracil-haltiger einzelsträngiger DNA

Diese Methode der *in vitro* Mutagenese wurde wie beschrieben durchgeführt (Hagemeier, 1996). Für die Insertion der *Xho1* Schnittstelle in β -Globin (*F2/HBB* und *H1F3/HBB*) wurde das Oligo 5'-CAG CAA GAA AGC GAG CTT ACT

CGA GGT GAT ACT TGT GGG CCA G-3' verwendet. Für das Konstrukt *F2/HBB* wurde zusätzlich noch eine *HindIII* Schnittstelle mit dem Oligo 5'-CTT CAT TTC TTT ATG TTT TAA AGC TTG CAC TGA CCT CCC ACA TTC-3' eingefügt. Die Deletionsmutanten $\Delta 154-232$, $\Delta 268-279$ und $\Delta 421-434$ von hUpf3b wurden mit den Oligos $\Delta 154-232$: 5'-CCA TTT CCT CCT AGT CCC GAC TTT GG-3'; $\Delta 268-279$: 5'-CTT TTG TCC AAT TCT TTC TTT GGT TCA TCC-3' und $\Delta 421-434$: 5'-GAG TCG ATT TCG GCT GTT TCT TAT TCG ATC-3' erstellt.

3.6 Sequenzierung von DNA

DNA-Sequenzierungen wurden auf dem automatischen Sequenzierer LiCOR 2000 (MWG-Biotech) durchgeführt. Die Analyse der Rohdaten erfolgte mit der Sequence Analysis Software (Base ImagIR, Version 2.0) des Herstellers. Die Sequenzreaktionen wurden mit dem Sequenzierkit „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“ (Amersham Pharmacia Biotech) gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Die verwendeten IRD-800 markierten Oligonukleotide waren:

Bezeichnung	Sequenz	Bemerkung
F90	5'-TATGCTTACCAAGCTGTGATTCCA-3'	β -Globin Promotor-Region
F115	5'-CCCCTTCCTATGACATGAACTTAA-3'	β -Globin, 2. Intron, antisense Orientierung
116	5'-CCAAGCTAGGCCCTTTTGCTAATC-3'	β -Globin, 3. Intron, sense Orientierung
F119	5'-TCCCAAGGTTTGAAGTAGCTCTTC-3'	β -Globin, 3'UTR, antisense Orientierung
T3	5'-ATTAACCCTCACTAAAG-3'	T3 Promotor
T7	5'-AATACGCACTATAG-3'	T7 Promotor
SP6	5'-ATTTAGGTGACACTATAGAATAC-3'	SP6 Promotor
hUpf3b sense 473	5'-CGGGACTATCGATGATGATCC-3'	hUpf3b, ORF Position 473
hUpf3b asense 983	5'-CTCCCTATAGTCTCTGCCGC-3'	hUpf3b, ORF Position 983, antisense Orientierung

3.7 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die DNA-Aufreinigung über Agarosegele erfolgte für nachfolgende Klonierungen oder für die spätere Verwendung bei der *in vitro* Transkription. Die Aufreinigung erfolgte mit Qiaquick Säulen (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers. Die gereinigte DNA wurde bei -20°C bis zur endgültigen Verwendung gelagert.

3.8 Plasmid-Präparation im Mini-Maßstab

Präparationen von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab wurden mittels alkalischer Lyse durchgeführt. Dazu wurden die Bakterien einer 1,5 ml Übernachtskultur abzentrifugiert (5.000 rpm, 2 Min.), der Überstand abgenommen und das Pellet in 100 μl Puffer 1 (50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-Cl, pH 8.0) resuspendiert. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 200 μl Puffer 2 (200 mM NaOH, 1% SDS). Nach 5 Min. bei Raumtemperatur wurde der Ansatz durch 200 μl Puffer 3 (3M KOAc, 5 M Acetat, pH 5.2) neutralisiert und die präzipitierten Proteine sedimentiert (13.000 rpm, 4°C , 10 Min.). Der Überstand wurde mit 800 μl 2-Propanol versetzt und die DNA gefällt (13.000 rpm, 4°C , 20 Min.). Das Pellet wurde mit 70% EtOH gewaschen, getrocknet und in etwa 40 μl H_2O bidest resuspendiert. Diese DNA wurde für Restriktionsverdaus, Sequenzierungen und weitere Klonierungsschritte benutzt.

3.9 Plasmid-Präparation im Midi-, Maxi- und Mega-Maßstab

Die Präparation von größeren Mengen Plasmid DNA erfolgte aus 20 ml (Midi), 100 ml (Maxi) oder 500 ml (Mega) Übernachtskulturen. Die Isolation erfolgte mit Anionenaustauschersäulen (Qiagen) gemäß Herstellerangaben. Die isolierten Mengen an DNA lagen bei etwa 100 μg (Midi), 600 μg (Maxi) oder 2,5 mg (Mega) hochreiner Plasmid-DNA. Diese DNAs wurden für die Transfektion von HeLa-Zellen verwendet.

3.10 RNA-Präparation aus eukaryontischen Zellen

3.10.1 Präparation von zytoplasmatischer Gesamt-RNA

Die Zellen wurden, wie im Abschnitt Transfektion eukaryontischer Zellen beschrieben, geerntet und in 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Die

Zellen wurden vorsichtig abzentrifugiert (1.200 rpm, RT, 2 Min.) und der Überstand entfernt. Anschließend wurden die Zellen auf Eis in 250 µl eiskaltem Lysepuffer (10 mM Tris-Cl, 8 mM MgCl₂, 10 mM NaCl, 1 mM DTT, 5 mM Vanadyl-Ribosyl-Complex, 0,5 % NP-40, pH 7.5) resuspendiert und durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Spritze (Kanüle G23) lysiert. Nach 5 Min. Inkubation auf Eis wurden die unlöslichen Zellbestandteile (Membranen, Zellkerne, etc.) abzentrifugiert (10.000 rpm, 4°C, 10 Min.). Der Überstand wurde in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt und mit 750 µl TRIzol LS-Reagenz (Gibco-BRL) gemischt. Die weitere Aufarbeitung der RNA erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Am Schluß wurde die RNA in etwa 20 µl H₂O_{bidest} resuspendiert und bei -80°C für die nachfolgenden Analysen gelagert.

3.10.2 Präparation nukleärer Gesamt-RNA

Die Präparation von nukleärer Gesamt-RNA erfolgte exakt wie bereits beschrieben (Kugler *et al.*, 1995). Die Untersuchung der nukleären RNA erfolgte mit der Primer-Extension-Analyse.

3.10.3 Fraktionierung von zytoplasmatischer Gesamt-RNA in poly(A)-angereicherte und poly(A)-abgereicherte RNA

Zytoplasmatische Gesamt-RNA wurde mit dem „Poly(A) Spin Column Kit“ (New England Biolabs) in eine poly(A)-angereicherte und eine poly(A)-abgereicherte Fraktion aufgetrennt. Als Ausgangsmaterial dienten 50 µg der Gesamt-RNA, die mit Oligo-dT-Zellulose inkubiert wurden. Die poly(A)-abgereicherte Fraktion bestand aus der RNA, die bei diesem ersten Bindungsschritt nicht gebunden wurde. Nach mehreren Waschschritten (nach Herstellerangaben) wurde die gebundene poly(A)-angereicherte RNA von der Oligo-dT-Zellulose eluiert. Die beiden Fraktionen wurden für weitere Analysen bei -80°C gelagert.

3.11 Ribonuklease-Protektions-Analyse

Die 3'-Sonde für die *H1F3/HBB* Hybrid mRNAs wurde durch *in vitro* Transkription eines Plasmids hergestellt, das Exon 3 des Konstruktes WT IRE/H1 bis zur Histon 3'-Prozessierungsstelle mit 120 nt stromauf (Intron 2) und 113 nt

stromab gelegenen Sequenzen enthielt. Diese Konstruktion der Sonde gewährleistet, daß sowohl korrekte Histon 3'End-Prozessierung, als auch korrektes Spleißen des 2. Introns mit nur einer Sonde überprüft werden können. Die erwarteten Fragmente haben für korrekt gespleißte und prozessierte Hybrid-mRNAs eine Länge von 184 nt und für das kotransfizierte WT β -Globin eine Länge von 125 nt. Die cDNA Sonden für die Analyse des kompletten ORF wurde durch *in vitro* Transkription der Plasmide pGEM5-cDNA WT/H1 bzw. pGEM5-cDNA NS 39/H1 hergestellt. Sie enthalten die cDNA der Hybrid-mRNAs mit oder ohne die NS 39 Mutation vom ATG-Initiationskodon bis zur Histon 3'Prozessierungsstelle sowie 113 nt der stromab gelegenen Histonsequenzen. Mit diesen Sonden kann die Histon 3'End-Prozessierung und zusätzlich das Spleißen beider Introns analysiert werden. Die erwarteten Fragmente haben für vollständig gespleißte und richtig prozessierte Hybrid-mRNAs eine Länge von 497 nt und für die Transfektionskontrolle β -Globin eine Länge von 438 nt. Abnormales Spleißen des 1. oder 2. Introns würde zu protektierten Fragmenten von 403 oder 313 nt führen. Die cDNA NS 39 Sonde weist eine Fehlpaarung an der NS 39-Position mit der β -Globin Kontrolle auf, daher kann ein partieller Verdau der Kontroll-RNA nicht ausgeschlossen werden.

Die Sonden für die Analysen der *F2/HBB* mRNAs wurden durch Transkription eines Plasmids hergestellt, in dem das *XhoI/HindIII* Fragment der 3'UTR von *F2/HBB* inkloniert wurde. Die Sonde protektiert Fragmente von 105 nt für korrekt prozessierte Hybrid-mRNAs und 251 nt für 3'verlängerte Hybrid-mRNAs. Für die Assays mit zwei 3'End-Prozessierungssignalen in einem Konstrukt (*in vivo* Kompetitionsassay) wurden die *XhoI/HindIII* Fragmente der 3'UTRs aller Kompetitionskonstrukte subkloniert und für die Sondentranskription verwendet.

Die Durchführung der Ribonuklease-Protektionsanalyse erfolgte nach üblichen Protokollen und wird daher nur in aller Kürze dargestellt. Zwischen 1-5 μ g zytoplasmatischer Gesamt-RNA wurden für die Analysen mit 300.000-1.000.000 cpm der radioaktiv markierten spezifischen Sonden über Nacht in Hybridisierungspuffer (40 mM Pipes, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 80%

deionisiertes Formamid, pH 6.4) hybridisiert (Hybridisierungstemperaturen: 57°C für die *HIF3/HBB* mRNAs, 55°C für die *F2/HBB* mRNAs und die Konstrukte mit doppelten 3'Prozessierungssignalen; die geeigneten Hybridisierungstemperaturen wurden in Vorexperimenten ermittelt und stellen einen Kompromiß zwischen Sensitivität und Hintergrundhybridisierung dar). Die Menge an eingesetzter RNA und Sonde wurde je nach Experiment variiert, damit die Sonde stets im Überschuß vorhanden war. Bei den *HIF3/HBB* mRNAs wurden etwa 4-5 µg RNA mit 300.000-500.000 cpm Sonde hybridisiert, bei den *F2/HBB* mRNAs üblicherweise 2-3 µg RNA mit 500.000-1.000.000 cpm Sonde. Am nächsten Tag wurden die Ansätze auf Raumtemperatur abgekühlt und mit Ribonuklease T1 (2,5 U) und Ribonuklease A (3,5 µg) in RNase-Verdaupuffer (10 mM Tris-Cl, 5 mM EDTA, 300 mM NaOAc, pH 7.5) vermischt. Der Verdau erfolgte für 30 Min. bei Raumtemperatur oder 30°C, je nach gewünschter Stringenz. Anschließend wurden die RNasen durch Zugabe von Proteinase K (50 µg – 15 Min. bei 37°C) und SDS abgebaut und die Ansätze mit Phenol-Chloroform extrahiert. Der Überstand der Extraktion wurde mit Glykogen (40 µg) versetzt und die RNAs mit absolutem Ethanol für 15 Min. bei -20°C gefällt und anschließend abzentrifugiert (13.000 rpm, 15 Min., 4°C). Die Überstände wurden vollständig entfernt und die Pellets in 7 µl RNA-Probenpuffer (80% Formamid, 0,1% Bromphenolblau, 0,1% Xylencyanol, 2 mM EDTA) resuspendiert. Die Proben wurden für 3 Min. bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und auf 4-6%igen denaturierenden Polyacrylamid-Harnstoffgelen aufgetrennt. Nach Beendigung des Laufs wurden die Gele auf Whatman 3MM Papier (Whatman-Biometra) übertragen und auf einem Vakuum-Geltrockner für 1 h getrocknet. Die radioaktiven Banden wurden entweder durch Röntgenfilm-Autradiographie visualisiert oder mittels eines Phosphoimagers (Bio-Rad, Molecular Imager Modell GS-250 oder Raytest-Fuji, BAS 3000) quantifiziert.

3.12 RNA-Analyse mittels Northern-Blot

Die Sonden für die Northern-Blot-Analysen wurden hergestellt durch *in vitro* Transkription eines Plasmides, das 48 nt der β -Globin 3'UTR, 128 nt des kodierenden Teils des β -Globin Exons 3 und 19 nt von β -Globin Exon 2 enthielt.

Die Wahl dieser Sonde gestattet es, sowohl die *F2/HBB* mRNAs als auch die 5boxB mRNAs zu detektieren, da in beiden Fällen die zu Exon 2 und 3 komplementären Regionen sehr effizient hybridisieren können.

Das verwendete Northern-Blot-Protokoll wird hier nur kurz zusammengefaßt dargestellt. 3-6 µg zytoplasmatischer Gesamt-RNA wurde auf einem 1,4%igen Formaldehyd-Agarosegel über Nacht (~16-18 h, 75 V) aufgetrennt. Nachdem die 28S und 18S ribosomalen RNAs ausreichend getrennt waren, wurde das Gel abgebaut und die RNA über Nacht durch Kapillartransfer auf eine neutrale Nylonmembran (Nytran N45, Schleicher & Schüll) transferiert. Dann wurde die RNA mit UV-Licht (120 mJ/cm²) kovalent mit der Membran verbunden. Die Hybridisierung mit der Sonde erfolgte bei 65°C über Nacht in Church-Gilbert Puffer (0,5 M Na₂HPO₄, 1 mM EDTA, 7% SDS, pH7.2) nach einem Prähybridisierungsschritt (2 h, 65°C), der ebenfalls in Church-Gilbert Puffer durchgeführt wurde. Die unspezifisch gebundene Sonde wurde am nächsten Tag durch mehrere Waschschrte (2×15 Min. Waschpuffer 1 [2×SSC, 0,1% SDS], 65°C und 2×15 Min. Waschpuffer 2 [0,2×SSC, 0,1% SDS] bei 65°C) entfernt. Die Membran wurde anschließend kurz getrocknet und entweder mit Hilfe eines Phosphoimagers (siehe Ribonuklease-Protektionsanalyse) quantifiziert oder durch Röntgenfilm-Autoradiographie visualisiert.

3.13 *In vitro* Transkription

Radioaktiv markierte RNA-Sonden für Northern-Blots und Ribonuklease-Protektions-Analysen wurden durch *in vitro* Transkription von (durch Restriktionsverdau) linearisierten Plasmiden hergestellt. Hierzu wurden 0,5-1 µg der DNA mit der geeigneten Polymerase (SP6, T3, T7) in Transkriptionspuffer (Roche Molecular Biochemicals) in Anwesenheit von Nukleotiden (600 µM ATP, CTP, UTP; Roche Molecular Biochemicals) und dem RNasen-Inhibitor RNasin (30 U; Promega) mit 50 µCi [α -³²P]GTP (800 mCi/mmol; NEN) für 30-60 Min. inkubiert (SP6-Polymerase: 40°C; T3- und T7-Polymerase: 37°C). Danach wurde die Plasmid-DNA verdaut (DNase I, 15 U, 20 Min., 37°C; Roche Molecular Biochemicals). Für den Einsatz in Northern-Blots wurde die markierte Sonden-RNA über Sephadex G-25 Säulen (Roche Molecular Biochemicals) gemäß den

Herstellerangaben aufgereinigt. Das Verhältnis von markierter RNA (Durchfluß) und nicht inkorporierten Nukleotiden (Säulenmatrix) wurde mit einem Geiger-Müller-Zähler qualitativ bestimmt und diente als Anhaltspunkt für die Effizienz der *in vitro* Transkriptionsreaktion. Für Ribonuklease-Protektions-Analysen wurde die Sonde mit 20 µg *E. coli* tRNA (Fluka) versetzt, mit Phenol/Chloroform extrahiert und abschließend mit 2-Propanol gefällt. Das RNA-Pellet wurde mit eiskaltem 70%igen Ethanol gewaschen und in Hybridisierungspuffer (30-50 µl, siehe Ribonuklease-Protektions-Analyse) aufgenommen. 10 µl einer 1:100 Verdünnung der Sonde wurden in einem Szintillationszähler (Wallac) vermessen und geeignete Mengen der Sonde (300.000-1.000.000 cpm) für die Hybridisierung verwendet. Die Qualität der Sonde wurde durch Auftragen von 2.000-10.000 cpm der unverdauten Sonde auf das Polyacrylamidgel der Protektionsanalyse überprüft.

3.14 Primer-Extension-Analyse

Die Primer-Extension-Analyse von zytoplasmatischer und nukleärer Gesamt-RNA wurde mit den Oligonukleotiden 5'-AGA ACC TCT GGG TCC AAG GG-3' (Exon-spezifisch) und 5'-TGG TCT CCT TAA ACC TGT CT-3' (Intron-spezifisch) durchgeführt. Die Oligonukleotide wurden zuerst radioaktiv markiert (siehe Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden), dann mit 20 µg der RNA-Präparationen gemischt (Intron-spezifischer Primer mit nukleärer RNA, Exon-spezifischer Primer mit zytoplasmatischer RNA) und gemeinsam mit 1/10 Volumen 3 M NaOAc und 2,5 Volumen eiskaltem Ethanol präzipitiert (13.000 rpm, 4°C, 15 Min.). Das RNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und der Überstand vollständig entfernt. Das Pellet wurde dann in 20 µl Annealing-Puffer (5×Konzentration: 1,25M KCl, 10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH, 7.9) resuspendiert. Der Ansatz wurde für 1½ h bei 50°C inkubiert, dann wurden 46 µl PE-Puffer (10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 100 µg/ml Actinomycin D, 0,33 mM dNTP's, 20 mM Tris-Cl, pH 8.7) und 20 U Superskript II Reverse Transkriptase (Invitrogen) hinzugefügt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde schließlich mit Ethanol (2,5 Volumen, eiskalt) gefällt (13.000 rpm, 4°C, 15 Min.), gewaschen und in Formamid-Probenpuffer (80%

Formamid, 0,1% Bromphenolblau, 0,1% Xylencyanol, 2 mM EDTA) aufgenommen. Die Proben wurden für 3 Min. bei 95°C denaturiert, rasch auf Eis abgekühlt und auf einem 6%igen denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde auf einem Vakuum-Geltrockner für eine Stunde getrocknet, die Banden wurden entweder mit einem Phosphoimager (siehe Ribonuklease-Protektions-Analyse) quantifiziert oder durch Autoradiographie auf Röntgenfilmen dargestellt.

3.14.1 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

5 pmol des gewünschten Oligonukleotids wurden mit 10 U T4 Polynukleotid-Kinase (Life Technologies/Invitrogen) in Anwesenheit von 50 µCi [γ -³²P]-ATP (3000 mCi/mmol; NEN) bei 37°C für 45 Min. markiert. Zum Abstoppen wurde die Reaktion für 15 Min. auf 65°C erhitzt. Anschließend wurden die uninkorporierten Nukleotide durch fraktionierende Aufreinigung über eine NICK-Säule (Amersham-Pharmacia) gemäß Herstellerangaben entfernt. Das markierte Oligonukleotid konnte nun für die Primer Extension-Analyse eingesetzt werden.

3.15 LM-PAT-Assay

Die Analyse der Poly(A)-Schwanzlängen mit LM-PAT erfolgte im wesentlichen wie beschrieben (Salles *et al.*, 1999) und wird daher nur kurz zusammengefaßt. Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Oligonukleotide (50 ng; Life Technologies) wurden mit 1 µg einer Präparationen von zytoplasmatischer Gesamt-RNA inkubiert (42°C, 30 Min.), ein spezifisches Anker-Oligo (5'-GCG AGC TCC GCG GCC GCG(T)_{12-3'}) wurde im 5-fachen Überschuß hinzugegeben (18°C, 2 h) und alle Oligos mit T4-DNA Ligase (Roche Molecular Biochemicals) ligiert. Anschließend wurde eine Reverse Transkription mit 1 µl Superscript II (Invitrogen) durchgeführt. 10% dieser Erststrangsynthese wurden in einer PCR mit dem Anker-Oligo und einem *HBB*-spezifischen Oligo (5'-TGT GCT GGC CCA TCA CT-3') in Gegenwart von 10 µCi [α -³²P]ATP (800 mCi/mmol; NEN) eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden auf einem denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgel (6 % ig) aufgetrennt.

3.16 RT-PCR

Zur Klonierung von Faktoren (Komponenten des EJC oder andere Proteine des mRNA Metabolismus) wurden Reverse Transkriptionen von zellulärer RNA mit anschließenden Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) durchgeführt. Die Erststrangsynthese erfolgte mit Superscript II Reverser Transkriptase (Life Technologies) oder Expand Reverser Transkriptase (Roche Molecular Biochemicals) mit Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primern (Life Technologies). Für die PCR-Reaktionen wurden Gen-spezifische Oligos eingesetzt. Als Polymerasen kamen Vent®-Polymerase (New England Biolabs), Expand High Fidelity-Mix oder Expand Long Template-Mix (beide Roche Molecular Biochemicals) zum Einsatz. Es wurde eine möglichst geringe Zahl von PCR-Zyklen (etwa 30-35) durchgeführt, um das Auftreten unerwünschter Mutationen zu verhindern. Die amplifizierten Fragmente wurden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt, verdaut und in einen geeigneten Vektor einligiert. Alle auf diese Weise erstellten Expressionsvektoren wurden in voller Länge sequenziert.

3.17 Proteinextraktion

Die Proteinextrakte für Immunblot-Analysen wurden gemeinsam mit RNA-Präparationen aus den gleichen Transfektionsansätzen gewonnen. Dazu wurden die Zellen wie beschrieben geerntet und auf Eis lysiert (siehe Abschnitt: Präparation von zytoplasmatischer Gesamt-RNA). Der Lysepuffer für die Proteinextraktion enthielt zusätzlich den Proteaseninhibitor PMSF (1,5 mM). Die unlöslichen Zellbestandteile wurden abzentrifugiert, 40 µl des Überstandes wurden für Protein-Analysen abgenommen und der Rest (~220 µl) für die RNA-Isolation eingesetzt.

Für Immunpräzipitationen wurden die Zellen mit einem isotonischen Lysepuffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl, 1% Triton X-100, pH 7.5; 1 Tablette „complete“ Proteaseninhibitor [Roche Molecular Biochemicals] pro 10 ml, 1,5 mM PMSF) lysiert, mehrmals durch eine G-23 Kanüle gezogen und 5 Min. auf Eis inkubiert. Die nicht solubilisierten Zellfraktionen wurden abzentrifugiert (10.000 rpm, 4°C, 10 Min.) und der Überstand in neue Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Für RNase-Verdaus der Extrakte wurden diese mit RNase A (3,5 µg/ml) für 10 Min.

bei 30°C inkubiert. Die Extrakte wurden anschließend durch Zentrifugation (13.000 rpm, 4°C, 10 Min.) geklärt. Nun konnten die Proteinlysate für die Immunpräzipitationen eingesetzt werden.

Die Proteinlysate wurden bis zur endgültigen Verwendung bei –80°C gelagert.

3.17.1 Proteinbestimmung

Die Messung der Proteinkonzentration in zytoplasmatischen Extrakten erfolgte mit dem „Protein-Assay“ (Bio-Rad) bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem Spektrophotometer (Beckmann). Die Konzentrationen wurden unter Verwendung einer BSA-Eichreihe errechnet.

3.18 Immunpräzipitation

250 µl Proteinextrakt wurden für die Immunpräzipitation mit 10 µl anti-FLAG-M2 Agarose Affinity Gel (Sigma) versetzt und über Nacht bei 4°C unter ständigem Rotieren inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Affinitätsgel abzentrifugiert (10.000 rpm, 4 °C, 10 Sekunden), der Überstand entfernt und das Gelpellet in 750 µl IP-Waschpuffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl, 0,1 % Triton X-100, pH 7.5) resuspendiert. Dann wurde das Affinitätsgel wiederum abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschschrift wurde noch dreimal wiederholt und der Überstand der letzten Zentrifugation sehr sorgfältig (möglichst vollständig) entfernt. Die präzipitierten Proteine wurden mit 50 µl Elutionspuffer (0,1 M Glycin, pH 3,0) bei Raumtemperatur eluiert, das Affinitätsgel pelletiert und der Überstand für Immunblot-Analysen eingesetzt.

3.19 Protein-Analyse mittels Immunblot

Die Proteinextrakte oder die Eluate der Immunpräzipitationen wurden auf geeigneten SDS-Polyacrylamidgelen (8-14%ig) elektrophoretisch aufgetrennt. Es wurden etwa 20-30 µg der Proteinextrakte bzw. die Hälfte der Immunpräzipitationen eingesetzt. Vor der Elektrophorese wurden die Proteinextrakte mit 2× oder 6× SDS-Probenpuffer vermischt und 4 Min. bei 95°C denaturiert. Nach dem Gellauf wurden die Proteine durch ein Semi-Dry Blotverfahren (mit zwei Anoden- und einem Kathoden-Puffer) auf eine PVDF-

Membran (Roche Molecular Biochemicals) übertragen. Unspezifische Bindung des 1. Antikörpers an die PVDF-Membran wurde durch Inkubation in Block-Puffer (5% Milch in TBS-T [TBS+0,1% Tween 20] für anti- β -Globin Antikörper; 10% Milch in TBS-T für anti-hUpf3b und anti-hUpf2 Antikörper; 10% FCS in TBS-T für anti- λ N-Antikörper) für eine Stunde bei Raumtemperatur (hUpf3b und hUpf2 über Nacht bei 4°C) minimiert. Der spezifische Antikörper wurde in Block-Puffer zur Membran gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert (hUpf3b und hUpf2 1½ h bei Raumtemperatur). Anschließend wurde die Membran mit TBS-T mehrmals gewaschen und mit dem sekundären Antikörper (Ziege anti-Kaninchen HRP-Konjugat) in TBS-T für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde erneut mit einem Überschuß an TBS-T gewaschen. Die Detektion erfolgte mit dem ECL^{Plus} Chemilumineszenzreagenz (Amersham-Pharmacia) und die Signale wurden auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht. Die Quantifizierung des Immunblots der Proteinmengen von *F2*G* und *F2*A* erfolgte mit einem Chemi-Dok3-System (Bio-Rad).

3.20 Puffer und Lösungen

2-Propanol

Ammoniumacetat/PEG zur Mutagenese	3,5 M NH ₄ OAc pH 7.5, 20% (w/v) PEG ₈₀₀₀
Annealing Puffer (10×) zur Mutagenese	0,5 M NaCl, 100 mM Tris pH 8.0, 100 mM MgCl ₂ , 50 mM DTT
Anoden Puffer I, f. Western Blot	30 mM Tris-Base, 20 % Methanol
Anoden Puffer II, f. Western Blot	300 mM Tris-Base, 20 % Methanol
BBS (2×)	50 mM BES (N,N-bis(hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonat), 1.5 mM Na ₂ HPO ₄ , 280 mM NaCl, pH 6.96, sterilfiltriert, bei -80°C gelagert
CaCl ₂ zur Transfektion	2,5 M in H ₂ O _{bidest.} sterilfiltriert, bei – 20°C gelagert

Church-Gilbert Puffer, Northern	0,5 M Na ₂ HPO ₄ , 1 mM EDTA, 7% SDS, pH 7,2
Deferoxaminmesilat (DFO)	100 mM in H ₂ O _{bidest}
Desoxynukleotid (dNTP)-Mix	2,5 mM je dATP, dCTP, dGTP, dTTP in H ₂ O _{bidest}
DNA-Probenpuffer	30% Glycerin, 1mM EDTA, 0,25% Bromphenolblau
Ethanol, 70%	
Ethanol, absolut	
HBS (2×)	50 mM HEPES, 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ , 280 mM NaCl, 10 mM KCl, 12 mM glucose, pH 6,96, sterilfiltriert, bei – 80°C gelagert
Hybridisierungspuffer, RPA	40 mM Pipes, 400 mM NaCl, 1 mM, EDTA, 80% Formamid (deionisiert), pH 6,4, sterilfiltriert, bei –20°C gelagert
IP-Elutionspuffer	0,1 M Glycin, pH 3,0
IP-Waschpuffer	150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl, 0,1% Triton X-100, pH 7,5
Kathodenpuffer, f. Western Blot	25 mM Tris-Base, 40mM 6- Aminohexansäure, 20 % Methanol
Laemmli Laufpuffer	25 mM Tris-Base, 1,4% Glycin (w/v), 0.1 % SDS
Lösung I (Plasmidisol. aus <i>E. coli</i>)	50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-Cl pH 8.0, steril filtriert
Lösung II (Plasmidisol. aus <i>E. coli</i>)	200 mM NaOH, 1% SDS
Lösung III (Plasmidisol. aus <i>E. coli</i>)	3 M/ 5 M KOAc
Lysepuffer (isotonisch)	150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl, 1% Triton X-100, pH 7,5, 1 Tablette complete

Lysepuffer für HeLa-Zellen	10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM NaCl, 8 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 1.5 mM PMSF, 0,5% NP-40
MOPS-Puffer pH 7.0 (10×)	0,2 M MOPS, 80 mM NaOAc, 10 mM EDTA, pH 7.0, lichtgeschützt gelagert
PBS (10×)	85 mM Na ₂ HPO ₄ - 15 mM K ₂ HPO ₄ pH 7.4, 1.37 M NaCl, 30 mM KCl, autoklaviert
PE-Annealingpuffer (5×)	1,25 M KCl, 10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH, 7,9
PE-Puffer	10 mM MgCl ₂ , 5 mM DTT, 100 µg/ml Actinomycin D, 0,33 mM dNTP's, 20 mM Tris-Cl, pH 8,7
RNA Ladepuffer, RPA	80% Formamid (deionisiert), 0,1% Xylencyanol, 0,1% Bromphenolblau, 2 mM EDTA
RNA-Probenpuffer	50% Glycerin, 1mM EDTA, 0.25% Bromphenolblau
RNase-Verdaupuffer, RPA	10 mM Tris-Cl, 5 mM EDTA, 300 mM NaOAc, pH 7,5, autoklaviert
SDS	10% in H ₂ O _{bidest}
SDS-Probenpuffer (2×)	0,125 M Tris-Cl, 20% Glycerin, 4% (w/v) SDS, 2% β-Mercaptoethanol, 0,25% Bromphenolblau
SDS-Probenpuffer (6×)	0,35 M Tris-Cl, 36% Glycerin, 10% (w/v) SDS, 9,3% (w/v) DTT, 0,5% Bromphenolblau
SSC (20×)	3 M NaCl, 0.3 M Trinatriumzitat, pH 7.0
TBE	0.9 M Tris pH 8.3, 0.9 M Borsäure, 10 mM EDTA pH 8.0

TBS (10×)	1.5 M NaCl, 100 mM Tris-Cl pH 7.5, autoklaviert
TBS-T	100 mM Tris-Cl pH 7.5, 0.9% NaCl, 0.5% Tween
TE pH 8.0	10 mM Tris-Cl pH 8.0, 1 mM EDTA
Waschpuffer 1, Northern	2× SSC, 0,1% SDS
Waschpuffer 2, Northern	0,2× SSC, 0,1% SDS

3.21 Medien für Bakterienkultur

Luria-Bertani Medium (LB):

10 g Bacto Trypton (Difco)

5 g Yeast Extract (Difco)

10 g NaCl

gelöst in 950 ml H₂O_{bidest}, autoklaviert

2 x YT Medium:

16 g Bacto Trypton (Difco)

10 g Yeast Extract (Difco)

5 g NaCl

gelöst in 950 ml H₂O_{bidest}, autoklaviert

SOB Medium (-Mg²⁺):

20 g Bacto Trypton (Difco)

5 g Yeast Extract (Difco)

0,58 g NaCl (10mM)

0,19 g KCl (2,5 mM)

auf 1000 ml aufgefüllt mit H₂O_{bidest}, autoklaviert

LB-Agarplatten:

1,5% (w/w) Bacto Agar in LB Medium suspendiert, autoklaviert, auf 50°C abgekühlt und nach Zugabe von Antibiotika in Petrischalen erstarren lassen; bei 4°C gelagert.

3.22 Reagenzien und Materialien**3.22.1 Chemikalien**

Acrylamid/Bisacrylamid	Roth
Agarose	Biozym
Ampicillin	Grünenthal
β-Mercaptoethanol	Roth
Bacto-Agar	Difco
Bacto Yeast Extract	Difco
Bacto-Tryptone	Difco
Bromphenolblau	Fluka
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma
DMEM	Gibco BRL
Ethidiumbromid	Roth
<i>E. coli</i> tRNA	Fluka
EDTA	Roth
FCS	Biochrom
MOPS (3-(N-Morpholino)-Propansulfonat)	Roth
Penicillin-Streptomycin Lösung	Biochrom
PMSF (Phenylmethylsulfonyl-Fluorid)	Sigma
Tris-Base	Merck
Triton X100	Sigma

Weitere Standardchemikalien wurden von den Firmen Roth, Merck und Sigma bezogen.

3.22.2 Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Bezug
Anti β -Globin	1:2000	Eurogentec
Anti λ N Peptid	1:2000	Ennio De Gregorio, EMBL, Heidelberg
Anti hUpf2	1:2000	J. Lykke-Andersen, Yale University, New Haven, USA
Anti hUpf3b	1:5000	J. Lykke-Andersen
Anti Kaninchen IgG, HRP-gekoppelt	1:5000	Dianova

3.22.3 Laborkunststoffwaren

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

3.22.4 Enzyme

Enzyme wurden von den Firmen Roche Molecular Biochemicals, Amersham-Pharmacia Life Sciences, New England Biolabs, Promega und Invitrogen/Life Technologies bezogen.