

***In-Vitro*-Rekonstitution  
der Deadenylierung und Translationsrepression  
der *nanos*-mRNA aus *D. melanogaster***

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der  
Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften  
**Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

von  
Herrn **Filip Pekovic**  
geboren am 03. Dezember 1992 in Hannover

Gutachter:

Prof. Dr. Elmar Wahle

Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier

Prof. Dr. Utz Fischer

Eingereicht am:

08. Dezember 2021

Verteidigt am:

25. Februar 2022

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>6</b>
1.1 Die ersten Entwicklungsstadien von <i>D. melanogaster</i> .....	6
1.1.1 Oogenese und frühe Embryogenese .....	6
1.1.2 Der Wechsel vom maternalen zum zygotischen Genom .....	8
1.1.3 Ausbildung der Körperachsen durch Morphogene.....	9
1.2 Die Regulation der <i>nanos</i> -mRNA in der frühen Embryogenese.....	11
1.2.1 Die Smaug-abhängige Regulation der <i>nanos</i> -mRNA .....	12
1.2.1.1 Smaug führt zur Deadenylierung der <i>nanos</i> -mRNA .....	12
1.2.1.2 Inhibierung der Translationsinitiation durch Smaug.....	14
1.2.1.3 Die Translation der <i>nanos</i> -mRNA wird auch Cap-unabhängig reprimiert.....	15
1.2.1.4 Die Aufhebung der Smaug-abhängigen Translationsrepression .....	17
1.2.2 Die Zusammensetzung des Repressorkomplexes der <i>nanos</i> -mRNA.....	17
1.2.2.1 Smaug .....	18
1.2.2.2 Cup .....	19
1.2.2.3 Me31B und Tral .....	20
1.2.2.4 Belle.....	21
1.2.2.5 CCR4-NOT .....	21
1.2.3 Zielstellung.....	24
<b>2. ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b> .....	<b>25</b>
2.1 Aufreinigung der <i>nanos</i> -Repressorproteine .....	25
2.2 Rekonstitution der Deadenylierung .....	27
2.2.1 Initiale Experimente mit dem humanen CCR4-NOT-Komplex.....	27
2.2.1.1 Smaug erhöht die Deadenylierungsaktivität von humanem CCR4-NOT .....	27
2.2.1.2 Smaug führt zu einer SRE-spezifischen Deadenylierung.....	29
2.2.2 Rekonstitution des CCR4-NOT-Komplexes von <i>D. melanogaster</i> .....	31
2.2.2.1 Aufreinigung unterschiedlicher <sup>Dm</sup> CCR4-NOT-Subkomplexe .....	31
2.2.2.2 Rekonstitution der basalen Deadenylierung durch <sup>Dm</sup> CCR4-NOT .....	35
2.2.2.3 <sup>Dm</sup> CCR4-NOT zeigt distributives Verhalten.....	40
2.2.2.4 Vergleich der Deadenylierungsaktivität der <sup>Dm</sup> CCR4-NOT-Subkomplexe .....	41
2.2.2.5 <sup>Dm</sup> CCR4-NOT ist die einzig aktive Ribonuklease.....	43
2.2.3 Die Smaug-abhängige Deadenylierung mit <sup>Dm</sup> CCR4-NOT .....	46
2.2.3.1 <sup>Dm</sup> CCR4-NOT <sub>MINI</sub> in der SRE-spezifischen Deadenylierung .....	46
2.2.3.2 <sup>Dm</sup> CCR4-NOT-Subkomplexe in der Smaug-abhängigen Deadenylierung .....	48
2.2.3.3 Stimulierung der Smaug-abhängigen Deadenylierung durch PEG .....	49
2.2.3.4 CCR4 und Caf1 sind nötig für die Smaug-abhängige Deadenylierung .....	52
2.2.3.5 Die Smaug-abhängigen Deadenylierung zeigt Prozessivität.....	53
2.2.3.6 Physische Interaktion zwischen Smaug und <sup>Dm</sup> CCR4-NOT <sub>MINI</sub> .....	60
2.2.3.7 Aufhebung der Smaug-abhängigen Deadenylierung durch Oskar .....	61
2.2.4 Die Funktion weiterer Repressorproteine in der Deadenylierung der <i>nanos</i> -mRNA..	65

2.2.4.1	Cup in der Deadenylierung .....	65
2.2.4.2	Die durch Cup stimulierte Deadenylierung ist ebenfalls PEG-abhängig .....	67
2.2.4.3	CCR4-NOT-Subkomplexe in der durch Cup stimulierten Deadenylierung .....	68
2.2.4.4	Welche Bereiche von Cup sind in die Deadenylierung involviert? .....	69
2.2.4.5	Kooperativität zwischen Cup und Smaug .....	73
2.2.4.6	PABPC in der Deadenylierung .....	75
2.2.4.7	Prozessivität in der durch PABPC stimulierten Deadenylierung .....	78
2.2.4.8	CCR4 und Caf1 sind aktiv in der durch PABPC stimulierten Deadenylierung .....	80
2.2.4.9	PABPC im Abbau von längeren Poly(A)-Schwänzen .....	81
2.2.4.10	Der Einfluss von PABPC auf die Smaug-abhängige Deadenylierung .....	84
2.2.4.11	Me31B und Tral in der Deadenylierung .....	85
2.2.4.12	RBPs führen vermutlich <i>in vivo</i> zu variierenden Deadenylierungsraten .....	88
2.3	Rekonstitution der <i>nanos</i> -Translationsrepression .....	89
2.3.1	<i>Etablierung eines Testsystems für die Translationsrepression</i> .....	89
2.3.1.1	Einsatz von SRE-unspezifischen Translationsextrakten .....	91
2.3.2	<i>Rekonstitution der SRE-spezifischen Translationsrepression</i> .....	93
2.3.2.1	Smaug und Cup sind nötig für die SRE-spezifische Translationsrepression .....	93
2.3.2.2	Die Translationsrepression ist abhängig von makromolekularen <i>Crowdern</i> .....	96
2.3.2.3	Die rekombinanten Komplexe zeigen andere Eigenschaften als der DEE .....	97
2.3.2.4	Der Repressorkomplex wird im <i>E. coli</i> -Translationssystem umgangen .....	102
2.3.2.5	Die Umhüllung der <i>nos</i> -mRNA durch Me31B und Tral .....	104
<b>3.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>105</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>107</b>
4.1	Chemikalien .....	107
4.2	Geräte und Software .....	110
4.3	DNA-Konstrukte .....	111
4.3.1	<i>DNA-Plasmide</i> .....	111
4.4	Proteine .....	115
4.4.1	<i>Antikörper</i> .....	115
4.4.2	<i>Rekombinante Proteine</i> .....	116
4.5	Zellstämme und Zellkultur .....	117
4.5.1	<i>Bakterienstämme</i> .....	117
4.5.2	<i>Insektenzelllinien</i> .....	118
4.5.3	<i>Spezielle Nährmedien</i> .....	118
4.6	Methoden .....	119
4.6.1	<i>Mikrobiologische Methoden</i> .....	119
4.6.1.1	Autoinduktion in <i>E. coli</i> zur Proteinexpression .....	119
4.6.2	<i>Molekularbiologische Methoden</i> .....	120
4.6.2.1	Klonierung der <sup>Dm</sup> CCR4-NOT-Komplexe .....	120
4.6.2.2	Klonierung der Repressorproteine .....	121
4.6.2.3	Klonierung der Transkriptionstemplates .....	122
4.6.2.4	Präparation von RNAs durch <i>In-vitro</i> -Transkription .....	123
4.6.3	<i>Das MultiBac-System</i> .....	124

4.6.3.1	Isolation der Bacmid-DNA .....	124
4.6.3.2	Transfektion von Sf21-Zellen mit Bacmid-DNA .....	124
4.6.4	<i>Proteinbiochemie</i> .....	125
4.6.4.1	Expression und Aufreinigung der <sup>Dm</sup> CCR4-NOT-Komplexe .....	125
4.6.4.2	Expression und Aufreinigung der <i>nanos</i> -Repressorproteine .....	127
4.6.4.3	Quantifizierung von aufgereinigten rekombinanten Proteinen .....	128
4.6.4.4	Western-Blot-Analyse .....	128
4.6.4.5	Präparation zellfreier Translationsextrakte .....	128
4.6.5	<i>Funktionale Assays</i> .....	130
4.6.5.1	Deadenylierungsassays .....	130
4.6.5.2	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i> (EMSA) .....	131
4.6.5.3	<i>In-vitro</i> -Translationsassays .....	131
<b>5.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>133</b>
<b>6.</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>149</b>
<b>7.</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>151</b>
<b>8.</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>152</b>
<b>9.</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>156</b>
9.1	Zusätzliche Abbildungen und Tabellen .....	156
9.2	Lebenslauf .....	165
9.3	Publikationsliste .....	166
9.4	Eidesstaatliche Erklärung .....	167
9.5	Danksagung .....	168





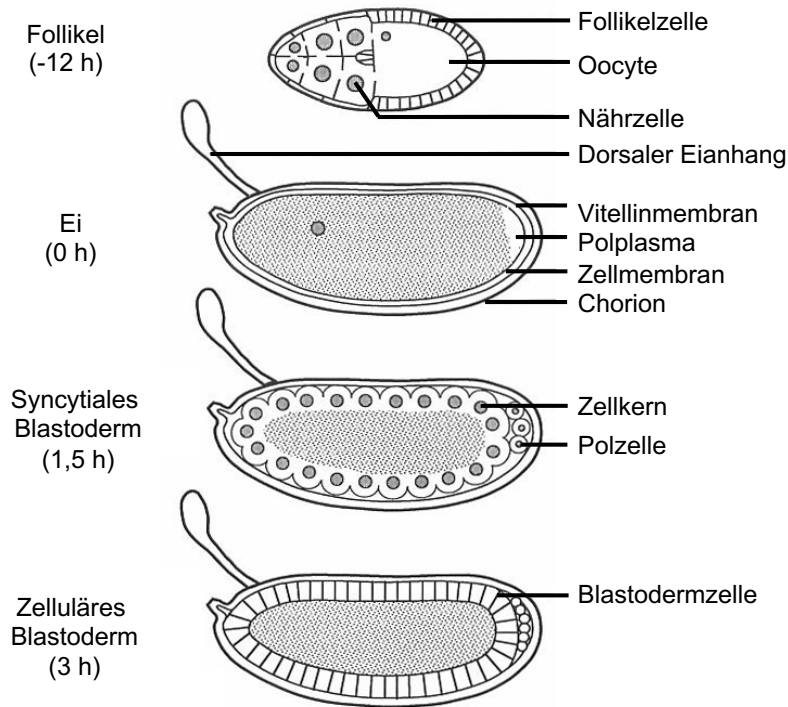
# 1. Einleitung

Für sämtliche Organismen ist eine spezifische Genexpression von entscheidender Bedeutung. Jede Zelle enthält nämlich bereits die vollständige genetische Information, sodass von dieser Vielzahl an Genen nur bestimmte aktiviert und andere wiederum inaktiviert werden müssen. Dabei unterliegt die Expression dieser Gene u.a. einer räumlichen und zeitlichen Kontrolle. Die Regulation der Genexpression kann auf verschiedensten Ebenen erfolgen: z.B. der Synthese und Prozessierung von mRNA, der Lokalisierung der mRNA, der Translation der mRNA und auch durch den Abbau der mRNA. Das Zusammenspiel der verschiedenen Regulationsmechanismen ist meist komplex. Eine Vereinfachung kann durch die Betrachtung der Prozesse in der frühen embryonalen Entwicklung erreicht werden, da hier das Genom transkriptionell still ist und somit jegliche Regulation post-transkriptionell abläuft (Pritchard & Schubiger, 1996). In dieser frühen Phase bestehen bis zu drei Viertel des für Proteine kodierenden Transkriptoms aus sogenannten maternalen mRNAs, welche bereits in der Oogenese in die sich bildende Oocyte eingelagert werden (Vastenhouw et al., 2019). Eine Vielzahl dieser maternalen mRNAs und die mit ihnen assoziierten Proteine wurden eingehend im Modellorganismus *Drosophila melanogaster* untersucht, dessen frühe Entwicklung im folgenden Abschnitt näher dargestellt werden soll.

## 1.1 Die ersten Entwicklungsstadien von *D. melanogaster*

### 1.1.1 Oogenese und frühe Embryogenese

Die Oogenese findet in den zwei Ovarien mit jeweils 16 bis 20 Ovariolen statt. Die Ovariolen weisen mehrere Eikammern, sogenannte Follikel, auf, welche je eine Oocyte beinhalten (Abbildung 1.1). Diese Oocyte ist durch Ringkanäle mit Nährzellen verbunden, welche polyploid sind und eine hohe Transkriptionsaktivität aufweisen, wohingegen der Nucleus der Oocyte überwiegen transkriptions-inaktiv ist (Navarro-Costa et al., 2016). Durch die Ringkanäle werden maternale mRNAs und Proteine in die sich entwickelnde Oocyte geleitet, welche wichtig für deren Reifung sind. Am Ende der Oogenese wird sämtlicher Inhalt der Nährzellen in die Oocyte gepumpt und die Nährzellen verkümmern. Das reife Ei wird daraufhin durch den Samen des Männchens fertilisiert und vom Weibchen abgelegt.



**Abbildung 1.1 Oogenese und frühe Embryogenese in *D. melanogaster*.**

Darstellung von vier verschiedenen Entwicklungsstadien von *D. melanogaster*: Beginnend mit der reifenden Oocyte (12 Stunden vor Fertilisation) und bis zum zellulären Blastoderm (3 Stunden nach Fertilisation). Abbildung modifiziert aus St Johnston & Nüsslein-Volhard (1992).

Die Fertilisierung initiiert 13 rapide und synchrone Kernteilungen, welche keine Zellteilung zur Folge haben, sodass die frühe Embryogenese syncytial ist. Nach der neunten Kernteilung ist bereits ein Großteil der Zellkerne in der Peripherie lokalisiert und drei bis vier Kerne befinden sich im posterioren Polplasma, welche sich hier zu Polzellen entwickeln, die die Vorläufer der Keimbahn sind. Während der 14. Kernteilung, nach etwa 3 Stunden, kommt es dann zur Zellularisierung, indem eine Zellmembran die einzelnen Zellkerne umhüllt, sodass ca. 6000 Zellen im zellulären Blastoderm vorliegen. Dieser Prozess ist auch der erste vollständig vom zygotischen Genom abhängige (Bashirullah et al., 1998) und stellt bereits den Übergang vom maternalen zum zygotischen Genom dar. (Die Oogenese und Embryogenese sind den folgenden Übersichtsartikeln entnommen: (Bashirullah et al., 1998; Bastock & St Johnston, 2008; Harrison & Eisen, 2015; Johnston & Nüsslein-Volhard, 1992)).

### 1.1.2 Der Wechsel vom maternalen zum zygotischen Genom

Sämtliche tierischen und humanen Embryonen vollziehen zu Beginn ihrer Entwicklung einen graduellen Wechsel vom maternalen zum zygotischen Genom. Dabei wird dieser Wechsel von Wellen des Abbaus maternaler Genprodukte und der Transkription von zygotischen Genen durchzogen (Cao et al., 2020; Vastenhouw et al., 2019). So findet in den ersten acht Zyklen der Kernteilung (bis ca. 1 Stunden nach Fertilisation) im *Drosophila*-Embryo nahezu keine Transkription statt, da diese Teilungen mit 8-10 Minuten sehr rapide sind und dadurch die Transkription großer Gene limitiert ist (Edgar & Schubiger, 1986). Die frühe Phase der Entwicklung ist also abhängig von einer präzisen Regulation der maternalen mRNAs. Diese Regulation wird bereits zum Teil in der Oocyte festgelegt und im Embryo fortgesetzt und besteht meist aus einem Zusammenspiel mehrerer Mechanismen. Am wichtigsten sind hier die Mechanismen der Translationsregulation und RNA-Lokalisierung. So wird die Translation einer Vielzahl maternaler mRNAs bereits in der Oocyte reprimiert, und diese reprimierte mRNA muss meist erst zu einer bestimmten Position transportiert werden, an der die Translation aktiviert wird. Die Repression wird im Wesentlichen durch *trans*-agierende Faktoren bestimmt, die häufig in der 3'-UTR binden. Für die Translationsrepression sind die folgenden drei Mechanismen anzunehmen (Johnstone & Lasko, 2001):

1. Die Variation der Länge der Poly(A)-Schwänze ist häufig mit einer Regulation der Translation verbunden. Dabei zeigen mRNAs mit längeren Poly(A)-Schwänze meist eine hohe Translationseffizienz, wohingegen kürzere Schwänze mit einer schwachen Translationseffizienz verbunden sind (Passmore & Collier, 2021; Richter, 1999). Die Entfernung des Poly(A)-Schwanzes wird als Deadenylierung bezeichnet und wird hauptsächlich von den zwei Deadenyasekomplexen CCR4-NOT und PAN2-PAN3 bewerkstelligt, wohingegen die Polyadenylierung durch Poly(A)-Polymerasen stattfindet. Dies führt vor allem gegen Ende der Oogenese in *Drosophila* zu einer Aktivierung der Translation (Lim et al., 2016).

2. Die Translation wird über die Assoziation mehrerer Translationsinitiationsfaktoren am 5'-Cap der mRNA initiiert. Dementsprechend ist die Blockierung dieser Assoziation ein häufiger Ansatzpunkt in der Translationsrepression durch Faktoren die in der 3' UTR binden. Weiterhin können auch Prozesse nach der Translationsinitiation reprimiert werden, wie z.B. die Bindung der ribosomalen 60S Untereinheit (Ostareck et al., 2001).

3. Es wird angenommen, dass die mRNA in ihrer gesamten Länge von einer Proteinhülle maskiert werden kann, sodass die Assoziation mit Ribosomen blockiert wird (Spirin, 1994).

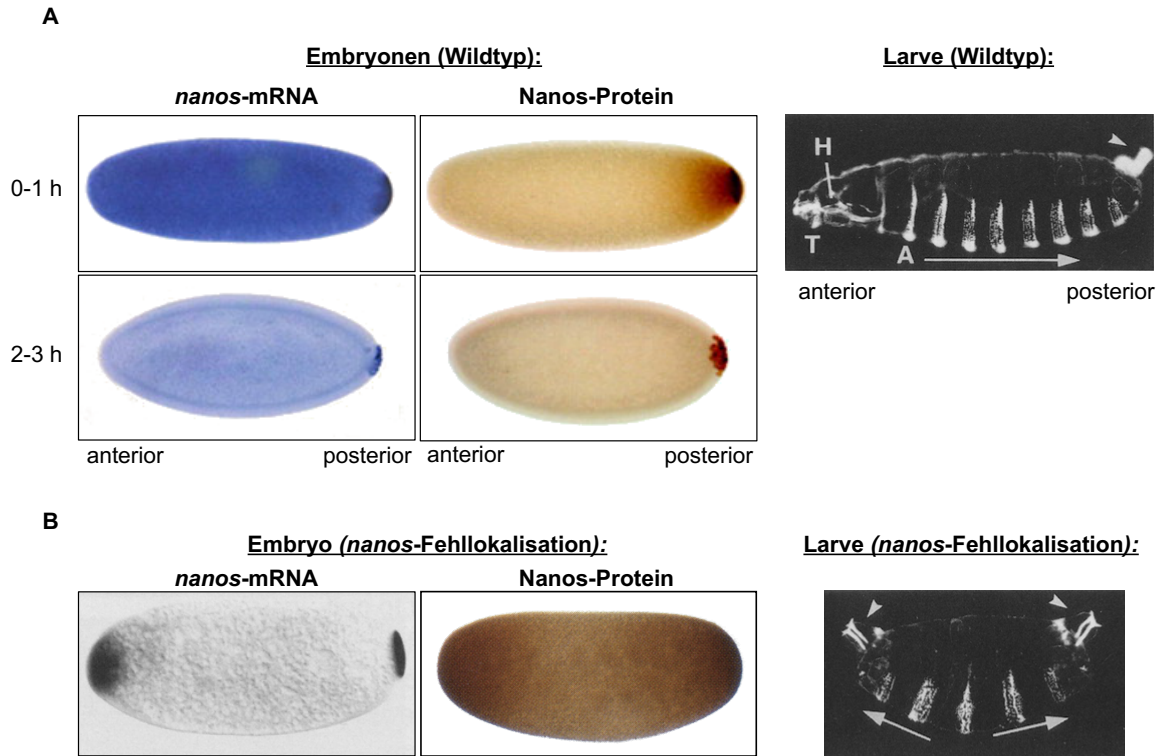
Diese vermutlich maskierten mRNPs enthalten u.a. Y-Box-Proteine (Sommerville & Lado-mery, 1996; Tafuri & Wolfes, 1993) oder die DEAD-Box-RNA-Helikase Me31B (*D. melanogaster*) bzw. DDX6 (Mensch) bzw. Dhh1 (*S. cerevisiae*) (Colegrove-Otero et al., 2005; Nakamura et al., 2001; Weston & Sommerville, 2006).

Im Rahmen der Transition vom maternalen zum zygotischen Genom spielt der erstgenannte Mechanismus eine entscheidende Rolle, da die Deadenylierung neben der Translationsrepression auch meist den Abbau von maternalen mRNAs einleitet (Passmore & Collier, 2021). Dabei wird der CCR4-NOT-Deadenylasekomplex durch verschiedene RBPs an die entsprechenden mRNAs rekrutiert. Neben dem maternal gesteuerten mRNA-Abbau wird in der Folge der Aktivierung des zygotischen Genoms auch ein zygotischer Abbauprozess durch miRNAs eingeleitet, der auf der Expression des *miR-309*-Klusters basiert (Bushati et al., 2008; Huntzinger & Izaurralde, 2011).

Das Zusammenspiel all dieser Prozesse in der frühen Phase der Entwicklung bestimmt u.a. die erfolgreiche Ausbildung der Körperachsen und ist somit meist entscheidend für das Überleben des Organismus.

### **1.1.3 Ausbildung der Körperachsen durch Morphogene**

Die zukünftigen Körperachsen werden bereits während der Oogenese festgelegt (Riechmann & Ephrussi, 2001). Dafür werden die *bicoid*-mRNA zum anterioren Pol und die *nanos*- und *oskar*-mRNA zum posterioren Pol der Oocyte lokalisiert. Dadurch wird die Anterior-Posterior-Körperachse vordefiniert (Ephrussi et al., 1991; Nüsslein-Volhard et al., 1987; C. Wang et al., 1994). Hierbei werden allerdings nur geringe Mengen der *nanos*-mRNA (ca. 4 %) am posterioren Pol lokalisiert (Abbildung 1.2.A), und der überwiegende Teil ist später uniform im Embryo verteilt sowie translationell reprimiert (Bergsten & Gavis, 1999; Smibert et al., 1996). Im Embryo wird das Nanos-Protein nur am posterioren Pol synthetisiert, da dort die Translationsrepression durch Oskar aufgehoben wird (Gavis & Lehmann, 1994; Jeske et al., 2011; Zaessinger et al., 2006). Dadurch entsteht ein Konzentrationsgradient des Nanos-Proteins vom posterioren zum anterioren Pol, der maßgeblich zur Ausbildung der posterioren Körperstrukturen beiträgt. Ein Embryo mit einem zum anterioren Pol fehllokalisierten Nanos-Protein (Abbildung 1.2.B) entwickelt sich zu einer Larve mit fehlender Kopfstruktur und zweiseitig vorliegendem Abdomen (Gavis & Lehmann, 1992), welches lethal ist.



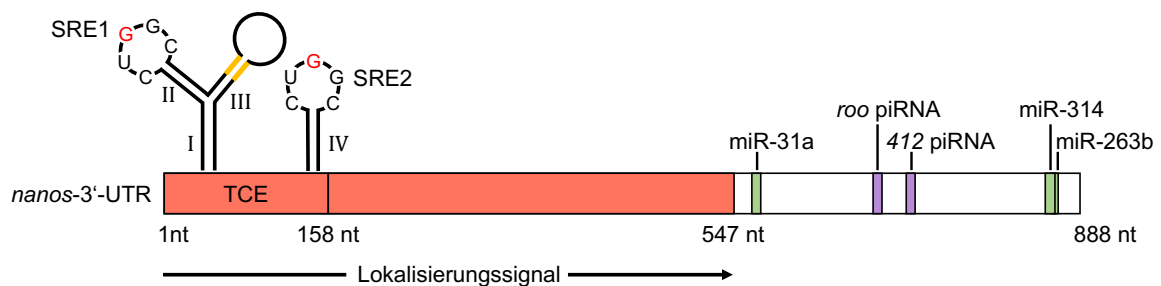
**Abbildung 1.2: *nanos* ist essenziell für die Ausbildung der Anterior-Posterior-Körperachse.**

**A:** Ein kleiner Teil der *nanos*-mRNA lokalisiert zum posterioren Pol des Embryos (*In-situ*-Hybridisierung der mRNA), wohingegen ein Großteil uniform verteilt vorliegt. Nur die posterior lokalisierte *nanos*-mRNA wird translatiert, wodurch sich ein Konzentrationsgradient des Nanos-Proteins vom posterioren zum anterioren Pol bildet (Antikörperfärbung). Dies ist für eine korrekte Entwicklung des Körpers notwendig (siehe Larve). **B:** Die Fehllokalisierung von *nanos* wurde durch einen Austausch der 3'-UTR in einem zusätzlichen *nanos*-Transgen mit der *bicoid*-3'-UTR erreicht, welche Lokalisierungselemente zum anterioren Pol enthält. Dadurch wird auch die Translation von *nanos* am anterioren Pol ermöglicht, sodass an beiden Polen Nanos synthetisiert wird. Dies führt zu einer Ausbildung von abdominalen Segmenten in der gesamten Larve, wodurch diese keine Kopfstruktur oder einen Thorax aufweist. H – Kopf; T – Thorax; A (mit Pfeil) – Abdominale Segmente. Abbildung modifiziert aus Gavis & Lehmann (1992) und Zaessinger et al. (2006).

Die Abwesenheit von anterioren Strukturen mit dem fehlexprimierten *nanos* liegt in der Funktion des Nanos-Proteins als Translationsrepressor von anterioren Morphogenen begründet (Wharton & Struhl, 1991). Im Wildtyp lokalisieren am anterioren Pol die *bicoid*-mRNA und das Bicoid-Protein, welches der Transkriptionsaktivator des zygotischen *hunchback*-Gens ist (Struhl et al., 1989). Die *hunchback*-mRNA ist überwiegend uniform verteilt, und die Translation wird ebenso wie die der *bicoid*-mRNA durch Nanos reprimiert. Dadurch ergibt sich für Bicoid und Hunchback ein Konzentrationsgradient vom anterioren zum posterioren Pol. Dies ist wichtig, da Hunchback ein Transkriptionsinhibitor mehrerer zygotischer Segmentierungsgene ist, welche durch die Abwesenheit von Hunchback im posterioren Bereich exprimiert werden können (Struhl et al., 1992). Dadurch wird die weitere Ausbildung des Abdomens ermöglicht. Somit ist eine präzise Regulation der *nanos*-mRNA unerlässlich für die Entwicklung des Embryos.

## 1.2 Die Regulation der *nanos*-mRNA in der frühen Embryogenese

Für die Regulation der Translation und Stabilität der *nanos*-mRNA sind Elemente in deren 3'-UTR verantwortlich (Abbildung 1.3), wie bei einer Vielzahl von mRNAs. Die 3'-UTR beinhaltet ein Translationskontrollelement (TCE), ein Lokalisierungssignal und Bindestellen für miRNAs sowie piRNAs (Dahanukar & Wharton, 1996; Gavis & Lehmann, 1994; Rouget et al., 2010; Smibert et al., 1996).



**Abbildung 1.3: Schema der *nanos*-3'-UTR.**

Die *nanos*-3'-UTR besteht u.a. aus einem Translationskontrollelement (TCE; Nucleotide 1 – 158), welches zwei SRE-haltige *stem-loops* und eine Bindestelle für Glorund (gelbe Balken) enthält. In den SREs wurde das für die Smaug-Bindung kritische Nucleotid markiert (rot). Weiterhin sind die ersten 547 Nucleotide für die Lokalisierung der mRNA notwendig. Außerdem sind im distalen Part der 3'-UTR zwei Bindestellen für piRNAs und drei potenzielle Bindestellen für miRNAs beschrieben (Rouget et al. 2010). Abbildung modifiziert aus Johnstone & Lasko (2001) und Cruce et al. (2000).

Die Lokalisierung der mRNA wird unabhängig von der Translationsregulation durchgeführt. Im TCE befinden sich eine Sekundärstruktur aus drei *stem-loops* (I-III) und darauffolgend ein weiterer *stem-loop* (IV). Die *stem-loops* II und IV enthalten in ihrem *loop*-Bereich die Bindestelle für das Protein Smaug, sodass diese als „*Smaug recognition elements*“ (SREs) bezeichnet werden (Cruce et al., 2000; Smibert et al., 1996). Weiterhin liegt ein AU-reicher Bereich in *stem-loop* III vor, welcher während der Oogenese vom Protein Glorund gebunden wird. Dadurch wird die Translation der unlokalisierten *nanos*-mRNA während der Oogenese reprimiert (Kalifa et al., 2006). Nachfolgend wird in der Embryogenese die Translationsrepression und der Abbau der nicht lokalisierten *nanos*-mRNA durch Smaug eingeleitet (Abbildung 1.2.A; vgl. 0-1 und 2-3 Stunden). Smaug wird homogen im gesamten Embryo nur in den ersten 3 bis 4 Stunden nach Fertilisation exprimiert (Cao et al., 2020; Smibert et al., 1999). Smaug ist das Kernstück des reprimierten *nanos*-mRNP, da es sämtliche weiteren Repressorproteine direkt oder indirekt zur mRNA rekrutiert (Götze et al., 2017). Neben der *nanos*-mRNA werden noch hunderte weitere mRNAs in der frühen Embryogenese durch Smaug gebunden und reguliert (L. Chen et al., 2014; Eichhorn et al., 2016; Tadros et al.,

2007), sodass das Protein eine zentrale Rolle in der Entwicklung einnimmt. Parallel zur Smaug-abhängigen Regulation wird die *nanos*-mRNA auch durch das Protein Aubergine im Zusammenspiel mit spezifischen piRNAs reprimiert, indem diese zur Deadenylierung der mRNA beitragen (Rouget et al., 2010). Eine Funktion für die potenziellen miRNAs (vgl. Abbildung 1.3) wurde noch nicht beschrieben, jedoch konnte bereits für andere mRNAs eine miRNA-vermittelte Rekrutierung des Deadenylasekomplexes CCR4-NOT sowie Translationsrepression gezeigt werden (Djuranovic et al., 2012; Kuzuoğlu-Öztürk et al., 2016).

### 1.2.1 Die Smaug-abhängige Regulation der *nanos*-mRNA

Die Assoziation der *nanos*-mRNA mit Smaug eröffnet verschiedene Wege der post-transkriptionalen Regulation, die im Wesentlichen den in Abschnitt 1.1.2 aufgeführten drei Mechanismen entspricht. Auf die Regulation der *nanos*-mRNA soll im Folgenden näher eingegangen werden.

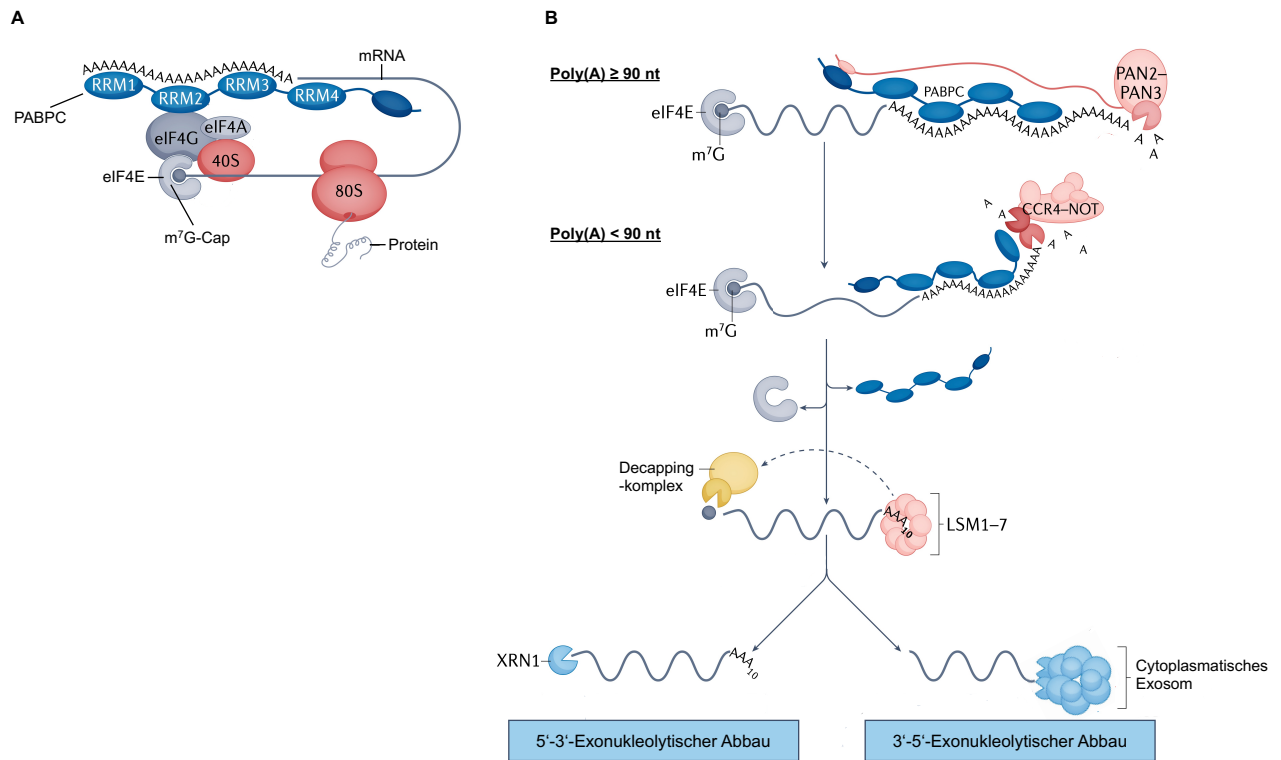
#### 1.2.1.1 Smaug führt zur Deadenylierung der *nanos*-mRNA

Im Verlauf der frühen Embryogenese wird ein Großteil der nicht lokalisierten *nanos*-mRNA deadenyliert und abgebaut (vgl. Abbildung 1.2.A). Die Deadenylierung wird durch die Smaug-abhängige Rekrutierung des CCR4-NOT-Komplexes eingeleitet (Jeske et al., 2006; Semotok et al., 2005; Zaessinger et al., 2006). Generell vermittelt der Poly(A)-Schwanz eine erhöhte Translationseffizienz, welches durch die Bildung einer sogenannten „*closed-loop*“-Struktur zwischen dem 5'- und 3'-Ende der mRNA erreicht wird (Abbildung 1.4.A). Dabei bindet der Translationsinitiationsfaktor eIF4E die 5'-Cap-Struktur, PABPC den 3'-Poly(A)-Schwanz und die beiden Enden werden durch die Assoziation von eIF4G mit eIF4E sowie PABPC verbunden. Durch PABPC wird die Affinität von eIF4E für das Cap erhöht, die Bindung zu eIF4G stabilisiert und es wird eine Funktion für PABPC in der Rekrutierung der 60S-Untereinheit angenommen (Duncan et al., 2009; Kahvejian et al., 2005). Außerdem wird durch die räumliche Nähe der Enden ein schnelles Recycling von Ribosomen nach erfolgter Translation vermutet (Passmore & Coller, 2021).

Ein PABPC-Molekül besetzt einen 30 Nukleotide langen Abschnitt des Poly(A)-Schwanzes (Webster et al., 2018), welches auch eine der kürzesten Längen für eine noch effizient translatierte mRNA ist (Lima et al., 2017; Nudel et al., 1976). Eine weitere Verkürzung des Poly(A)-Schwanzes führt zu einer Dissoziation des PABPC, wodurch die „*closed-loop*“-Struktur aufgebrochen wird und eIF4G nicht mehr stabil assoziiert (Duncan et al., 2009).



Die Verkürzung wird durch die Deadenylasekomplexe CCR4-NOT und PAN2-PAN3 verursacht (Abbildung 1.4.B).



**Abbildung 1.4: Schema der Deadenylierung und des Abbaus von mRNAs.**

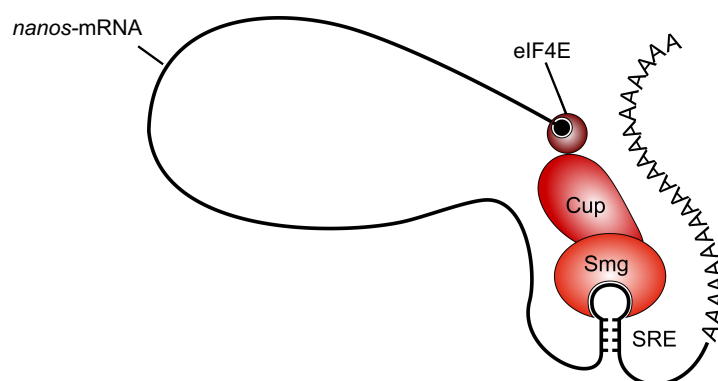
**A:** „closed-loop“-Modell der Translation. Der Poly(A)-Schwanz wird durch die RRM-Domänen von PABPC gebunden, welche auch für die Interaktion mit dem Initiationsfaktor eIF4G notwendig sind. Das 5'-Cap wird durch den Initiationsfaktor eIF4E gebunden, welcher ebenfalls mit eIF4G interagiert. Dementsprechend dient eIF4G als Brücke zwischen dem 5'- und 3'-Ende der mRNA. Weiterhin wird eIF4A durch eIF4G rekrutiert, welche zusammen mit eIF4E den eIF4F-Komplex bilden. **B:** Deadenylierung und nachfolgender Abbau von mRNA. Lange Poly(A)-Schwänze ( $\geq 90$  Nukleotide) werden hauptsächlich von PAN2-PAN3 deadenyliert, wohingegen kurze Schwänze ( $< 90$  Nukleotide) durch den CCR4-NOT-Komplex deadenyliert werden. Die Deadenylierung hat die Dissoziation von PABPC und eIF4E zur Folge, sodass das 5'-Cap frei zugänglich für den Decappingkomplex ist. Dieser wird auch über den LSM1-7-Komplex rekrutiert, welcher u.a. indirekt über den CCR4-NOT-Komplex mit der mRNA assoziiert (Nishimura et al., 2015; Ozgur et al., 2015). Nachfolgend wird die mRNA exonukleolytisch entweder in 5'-3'-Richtung über die Exonuklease XRN1 abgebaut, oder über das cytoplasmatische Exosom in 3'-5'-Richtung. Abbildung modifiziert aus Passmore & Collier (2021).

Dabei verkürzt PAN2-PAN3 hauptsächlich mRNAs mit längeren Poly(A)-Schwänzen ( $\geq 90$  Nukleotide), da für die Assoziation und Deadenylierungsaktivität die Oligomerisierung von PABPC entlang des Poly(A)-Schwanzes notwendig ist (Schäfer et al., 2019). Eine Rekrutierung von PAN2-PAN3 zu spezifischen mRNAs wurde bislang nur über das GW182-Protein im miRNA-abhängigen mRNA-Abbau beobachtet (Braun et al., 2011a). Vermutlich wird PAN2-PAN3 einen Großteil der längeren poly(A)-Schwänze deadenylieren, was auch im Einklang mit der mittleren Poly(A)-Länge von unter 90 Nukleotiden in verschiedensten eukaryotischen Zellen ist (Lima et al., 2017). Die kürzeren Poly(A)-Schwänze mit weniger

PABPC-Molekülen werden hauptsächlich durch CCR4-NOT deadenyliert, welches häufig über spezifische RBPs zu den jeweiligen mRNAs rekrutiert wird. Nachdem das letzte PABPC in Folge der Deadenylierung entfernt wurde, wird auch der 5'-Initiationskomplex destabilisiert und eIF4E dissoziiert vom 5'-Cap (Passmore & Collier, 2021). Daraufhin wird das 5'-Cap durch den Decappingkomplex entfernt und der nachfolgende exonukleolytische mRNA-Abbau läuft entweder in 5'-3'- oder 3'-5'-Richtung ab (Abbildung 1.4.B).

### 1.2.1.2 Inhibierung der Translationsinitiation durch Smaug

Neben der Assoziation mit dem CCR4-NOT-Komplex wird auch eine Bindung von Smaug an Cup angenommen, welches ein eIF4E-bindendes Protein ist (Nakamura et al., 2004; Nelson et al., 2004). Cup ist ein Paralog von 4E-T und enthält ein konserviertes eIF4E-Bindemotiv, das dieselbe Interaktionsfläche in eIF4E wie eIF4G nutzt (Wilhelm & Smibert, 2005). Dadurch wirkt Cup kompetitiv zu eIF4G in der eIF4E-Bindung (Abbildung 1.5; vgl. Abbildung 1.4.A). eIF4G ist für die Bindung weiterer Initiationsfaktoren wie eIF4A und eIF3 notwendig, die wiederum die ribosomale 40S-Untereinheit rekrutieren, sodass ein Ausschluss von eIF4G durch Cup zu einer Blockierung der Translationsinitiation führen sollte. Das Fehlen von 48S-Preinitiationskomplexen konnte auch für eine Reporter-RNA mit der *nanos*-3'-UTR nach Inkubation in *Drosophila*-Embryoextrakten (DEE) beobachtet werden (Jeske et al., 2011).



**Abbildung 1.5: Die Cup-abhängige Repression der Translationsinitiation.**

Durch Smaug wird SRE-spezifisch Cup zur *nanos*-mRNA rekrutiert. Cup bindet an eIF4E, wodurch die Assoziation zu eIF4G unterbunden wird und damit die Translationsinitiation nicht fortschreiten kann. Durch den Komplex werden wie beim „closed-loop“-Modell beide mRNA-Enden zueinander geführt. Abbildung modifiziert aus Götze et al. (2017) und Wilhelm & Smibert (2004).

Ein ähnliches Modell der Translationsrepression wurde z.B. für die *oskar*-mRNA vorgeschlagen, bei der Cup durch Bruno zur mRNA rekrutiert wird (Nakamura et al., 2004). Somit kann Cup auch durch andere RBPs zu bestimmten mRNAs rekrutiert werden, um diese zu reprimieren.

### 1.2.1.3 Die Translation der *nanos*-mRNA wird auch Cap-unabhängig reprimiert

Neben der Cap-abhängigen Repression konnte auch eine gleichermaßen effiziente Translationsrepression für eine Reporter-RNA (mit *nanos*-3'-UTR) ohne Cap-Struktur beobachtet werden. Außerdem waren bei dieser mRNA 40 zufällige Nukleotide *downstream* zum Poly(A)-Schwanz, sodass dieser vor der Deadenylierung geschützt war (Jeske et al., 2011). Dementsprechend wird die Translationsrepression auch unabhängig von der Deadenylierung erreicht. Weiterhin wurde in Jeske et al. (2011) auch eine Reporter-RNA mit einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES) des *Cricket paralysis virus* (CrPV) verwendet, bei der die direkte Assoziation mit der 40S-Untereinheit oder dem 80S-Ribosom ohne vorherige Ausbildung des eIF4F-Initiationskomplexes ablaufen kann (Pestova et al., 2004). Diese Reporter-RNA zeigte unter vergleichbaren Reaktionsbedingungen eine ähnliche Translationsrepression wie die Cap-enthaltende Reporter-RNA. Daher wird der Effekt vermutlich auf Ebene der Assoziation des 80S-Ribosoms stattfinden. Ein Einfluss auf die Translationselongation bzw. die Translation des vollständigen Reporter-ORFs konnte nicht beobachtet werden (Jeske et al., 2011).

Ein Mechanismus, der möglicherweise die Assoziation von Ribosomen beeinträchtigen könnte, ist die Umhüllung der mRNA durch Proteine (vgl. Abschnitt 1.1.2). So konnte für eine Reporter-RNA (mit *nanos*-3'-UTR) gezeigt werden, dass diese nach Inkubation im DEE in einer Saccharose-Gradientenzentrifugation weiter sedimentiert als eine RNA mit Punktmutationen in den SREs, die die Bindung zu Smaug aufheben (Götze et al., 2017). Die Wildtyp-RNA sedimentiert in der Nähe des 80S-Ribosoms, der gebildete Komplex ist also relativ groß. In *pulldown*-Studien aus DEE konnte eine Assoziation einer Reporter-RNA (plus *nanos*-3'-UTR) mit Me31B und seinem Interaktionspartner Trailer hitch (Tral) beobachtet werden (Götze et al., 2017; Jeske et al., 2011). Diese Proteine und ihre Orthologe spielen eine Rolle in der Translationsrepression (Y. Chen et al., 2014; Hubstenberger et al., 2013; Mathys et al., 2014; Nakamura et al., 2001; Tanaka et al., 2006; Tritschler et al., 2009; Weston & Sommerville, 2006; Wilhelm et al., 2005). Außerdem konnte in Götze et al. (2017) gezeigt werden, dass die Anzahl der an die mRNA gebundenen Me31B-Tral-

Heterodimere mit der Länge der mRNA steigt und dieses Verhalten eine mehr oder weniger stark ausgeprägte SRE-Spezifität zeigt. Somit scheinen sowohl Me31B als auch Tral möglicherweise eine Rolle in der Umhüllung der mRNA zu spielen.

Wie genau Me31B und Tral zur mRNA rekrutiert werden ist noch nicht vollständig geklärt. Für beide Proteine ist eine Interaktion mit Cup beschrieben (Nakamura et al., 2004; Tritschler et al., 2008), welche in den Studien allerdings auch durch indirekte Assoziation bedingt sein könnte. Für die humanen Orthologe DDX6 (Me31B) und LSM14A (Tral) konnte eine direkte Interaktion mit dem humanen 4E-T beobachtet werden (Nishimura et al., 2015; Ozgur et al., 2015), die teilweise in konservierten Bereichen, welche auch in Cup vorkommen, stattfand. Somit wird die Interaktion mit Cup wahrscheinlich über dieselben Bereiche ablaufen, was allerdings noch zu zeigen bleibt.

Die Rolle von Cup in der Rekrutierung von Me31B und Tral zur *nanos*-mRNA ist beim Vergleich verschiedener Studien etwas widersprüchlich. So konnte in Jeske et al. (2011) in *pulldown*-Studien aus DEE keine bis nur eine geringfügige Assoziation von Cup mit einer SRE-haltigen Reporter-RNA ohne Cap-Struktur beobachtet werden, wohingegen in Götze et al. (2017) mit denselben RNA-Konstrukten Cup deutlich angereichert werden konnte. Dies könnte durch eine schwächere Assoziation von Cup in Folge der fehlenden Cap-eIF4E-Interaktion begründet sein, sodass Cup je nach experimentellen Bedingungen stärker oder schwächer angereichert ist. Weiterhin wurden für die *oskar*-mRNA nach Gradientenzentrifugation zwei Repressorkomplexe mit unterschiedlichem Vorkommen an Cup beobachtet (Chekulaeva et al., 2006). Der schwerere Komplex enthielt Bruno, Cup und Me31B, wohingegen der leichtere Komplex nur Bruno und Me31B enthielt. Somit könnte es sein, dass Cup nicht zwingend notwendig für eine Rekrutierung bzw. stabile Assoziation von Me31B und Tral ist.

Neben Cup bzw. 4E-T ist auch für den CCR4-NOT-Komplex eine direkte Interaktion mit DDX6 beschrieben (Y. Chen et al., 2014; Ozgur et al., 2015). Somit könnte dies ebenfalls eine Möglichkeit sein, Me31B und Tral SRE-spezifisch zu rekrutieren. Allerdings wurde der CCR4-NOT-Komplex in *pulldown*-Studien aus DEE in keinem stöchiometrischen Verhältnis angereichert (Götze et al., 2017). Jedoch schließt dies nicht aus, dass eine transiente Interaktion zu einer Rekrutierung von Me31B und Tral führen könnte.

Für Smaug wurde neben der Interaktion mit Cup auch eine mit AGO1 beobachtet, welches unabhängig von miRNAs eine wichtige Rolle in der Translationsrepression der *nanos*-mRNA spielt (Pinder & Smibert, 2013). So zeigten u.a. *Drosophila*-Embryonen mit stark

reduzierten AGO1-Proteinmengen eine deutliche Translation der nicht-lokalisierten *nanos*-mRNA, welche vergleichbar mit der Translation in Embryonen mit einer Smaug-RNA-Bindemutante ist. Dabei war die Stabilität der mRNA im Vergleich zum Wildtyp nicht beeinflusst, sodass der Effekt nicht auf einer erhöhten mRNA-Stabilität beruht.

Weiterhin konnte in einer anderen Studie gezeigt werden, dass AGO1 die Translation einer Reporter-RNA, die eine IRES enthält, reprimieren kann. Die Repression wurde hier auch für eine RNA ohne Poly(A)-Schwanz gesehen, sodass die Cap-unabhängige Repression auch vom Poly(A)-Schwanz unabhängig ist und wahrscheinlich einen Schritt nach der Bildung des Translationsinitiationskomplexes beeinflusst (Iwasaki et al., 2009).

Neben der Cap-unabhängigen Translationsrepression konnten auch weitere Eigenschaften des Repressorkomplexes beobachtet werden, die vermutlich über das einfache Smaug-Cup-eIF4E-Modell hinausgehen. So ist die Bildung des Repressorkomplexes abhängig von ATP und mit ca. 20 - 40 Minuten relativ langsam. Für beides könnte die Aktivität der ATP-abhängigen DEAD-Box-Helikase Me31B verantwortlich sein, welche die mRNA vermutlich erst umhüllen muss, um die vollständige Repression zu erzielen.

#### 1.2.1.4 Die Aufhebung der Smaug-abhängigen Translationsrepression

Nur für die im posterioren Polplasma lokalisierte *nanos*-mRNA wird die Smaug-abhängige Translationsrepression und Deadenylierung durch das Protein Oskar aufgehoben (Jeske et al., 2011; Zaessinger et al., 2006). So konnte in Hefe-Zwei-Hybrid-Experimenten und *pull-down*-Studien eine Interaktion zwischen der RNA-bindenden Domäne von Smaug und Oskar beobachtet werden, was vermutlich die Assoziation von Smaug mit den SREs inhibiert (Dahanukar et al., 1999). Der genaue Mechanismus ist allerdings noch unklar.

### 1.2.2 Die Zusammensetzung des Repressorkomplexes der *nanos*-mRNA

Im vorherigen Abschnitt 1.2.1 wurden bereits einige Proteine genannt, die potenziell wichtig für die Bildung des Repressorkomplexes sind. In einer *pull-down*-Studie aus DEE mit quantitativer MS-Analyse wurden weitere Proteine identifiziert, die SRE-spezifisch assoziieren (Götze et al., 2017). Es wurde ein Cluster aus sieben Proteinen mit der höchsten Abundanz

identifiziert, zu dem wie erwartet Smaug, Cup, eIF4E, Me31B und Tral gehören. Hinzu kommen PABPC und Belle, eine weitere ATP-abhängige DEAD-Box-Helikase.

Für PABPC wurden bereits Assoziationen mit anderen Repressorkomplexen beobachtet. So zeigt *Drosophila*-PABPC eine Funktion in der Inhibierung der Rekrutierung von Ribosomen für die *msl-2*-mRNA (Duncan et al., 2009). Weiterhin kann es in der miRNA-vermittelten Repression zur Rekrutierung des miRISC-Komplexes beitragen (Moretti et al., 2012). Außerdem konnte für Orthologe von *Drosophila*-PABPC eine direkte Interaktion mit dem CCR4-NOT-Komplex und eine Stimulierung der Deadenylierung beobachtet werden (Webster et al., 2018; Yi et al., 2018). Für die *nanos*-mRNA wurde auch ein von der Deadenylierung unabhängiger, deutlicher Einfluss des Poly(A)-Schwanzes auf das Ausmaß der Translationsrepression beobachtet (Jeske et al., 2011).

Für *Drosophila*-Embryonen, die eine Kombination eines Nullallel mit einem hypomorphen Allel für Belle beinhalten, konnte eine Aufhebung der Translationsrepression und Deadenylierung beobachtet werden, sodass Belle zumindest *in vivo* eine Funktion in der Translationsregulation der *nanos*-mRNA ausübt (Götze et al., 2017).

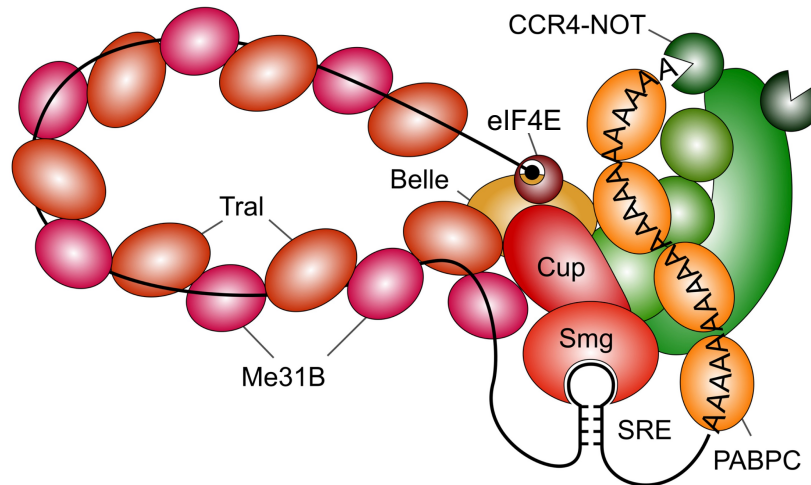
Weiterhin konnte ein Protein-Cluster mit etwas geringerer Abundanz detektiert werden, welches dem CCR4-NOT-Komplex entspricht. Die geringere Abundanz konnte auch mit quantitativem *Western-Blotting* bestätigt werden. Der Komplex ist also kein stöchiometrischer Bestandteil des stabilen Repressorkomplexes.

Ein Modell für die Zusammensetzung des Repressorkomplexes der *nanos*-mRNA ist in der Abbildung 1.6 zu sehen. Nachfolgend wird der Aufbau (siehe Anhang Abbildung 9.1) und die Funktion einzelner Repressorproteine sowie vom CCR4-NOT kurz beschrieben.

### 1.2.2.1 Smaug

Die Namen für Smaug und das in der Oocyte wirkende Glorund stammen aus J.R.R. Tolkiens literarischem Werk, in dem der Drache Smaug den Schatz der Zwerge (*nanos*) bewacht und Glorund der erste Drache ist, somit also der Vorgänger von Smaug.

Smaug ist ein überwiegend unstrukturiertes Protein und weist in seiner Mitte eine SAM-Domäne (**S**terile **a**lpha **m**otif) auf, welche die SREs bindet (Aviv et al., 2003; Green et al., 2003). Über diese Domäne wird vermutlich auch die Interaktion mit Oskar vermittelt (Dahanukar et al., 1999). Direkt neben der SAM-Domäne fügt sich die PHAT-Domäne (**P**seudo-**H**EAT repeat **a**nalogous **t**opology) ein, welche wahrscheinlich für die Assoziation mit Cup notwendig ist (Green et al., 2003; Nelson et al., 2004).



**Abbildung 1.6: Modell des *nanos*-Repressorkomplexes.**

Die *nanos*-mRNA enthält in ihrer 3'-UTR SREs, die von Smaug gebunden werden. Dieses rekrutiert wahrscheinlich Cup zur mRNA. Über die Assoziation von Cup mit dem Cap-gebundenen eIF4E wird eine „closed-loop“-Struktur gebildet. Über Cup werden vermutlich Me31B und Tral rekrutiert, welche als Heterodimer entlang der mRNA polymerisieren. Weiterhin wird der CCR4-NOT-Komplex zur mRNA rekrutiert und deadenyliert diese. Die Funktionen von PABPC und Belle im Repressorkomplex sind noch nicht geklärt. Abbildung aus Götze et al. (2017) entnommen.

### 1.2.2.2 Cup

Cup ist das *Drosophila*-spezifische Paralog zu 4E-T. Beide sind eIF4E-Bindeproteine und reprimieren die Translation (Nakamura et al., 2004; Nelson et al., 2004). Insgesamt beinhaltet Cup im N-terminalen Bereich zwei eIF4E-Bindestellen mit der Konsensussequenz YxxxxLΦ (x ist eine beliebige Aminosäure und Φ eine hydrophobe), die auch in eIF4G für die eIF4E-Bindung verwendet wird (Marcotrigiano et al., 1999; Nakamura et al., 2004). Dadurch wird eIF4G von der eIF4E-Bindung verdrängt und der Initiationskomplex kann nicht mehr gebildet werden. Für Embryonen mit einer N-terminalen Deletion der eIF4E-Bindestellen von Cup ( $\Delta$ aa1-212) konnte im Fall der *oskar*-mRNA trotzdem eine Translationsrepression beobachtet werden, welche allerdings um 50 % niedriger im Vergleich zum Wildtyp war (Chekulaeva et al., 2006). Somit scheint auch hier ein zweiter, Cap-unabhängiger Mechanismus zu wirken. Für Cup und 4E-T konnte neben der Translationsrepression auf Ebene der Initiation auch die Stimulierung der Deadenylierung in *tethering*-Experimenten beobachtet werden (Igreja & Izaurralde, 2011). Hier ist allerdings nicht klar, ob dies ein direkter oder indirekter Effekt war, da diese Experimente in *Drosophila*-S2-Zellen durchgeführt wurden. Neben der Bindung an eIF4E und der vermutlichen Assoziation mit dem CCR4-NOT-Komplex konnte zumindest für humanes 4E-T auch eine direkte Interaktion mit DDX6 über die Cup-Homologiedomäne (CHD) beobachtet werden (Ozgur et al., 2015). Die

CHD ist ein konservierter Bereich in der Mitte von Cup, welcher auch in 4E-T vorkommt, und zumindest in *tethering*-Experimenten hat sie zu einer Translationsrepression und Deadenylierung der Substrat-RNA geführt (Igreja & Izaurralde, 2011).

### 1.2.2.3 Me31B und Tral

Me31B (*Maternally expressed at 31B*) gehört zur Klasse der ATP-abhängigen DEAD-Box-RNA-Helikasen (Nakamura et al., 2001). Die DEAD-Box-RNA-Helikasen weisen keine RNA-Sequenzspezifität auf. Die Auftrennung eines kurzen RNA-Doppelstrangs benötigt die Bindung von ATP, welches wiederum für die Dissoziation der Helikase hydrolysiert werden muss (Linder & Jankowsky, 2011; Liu et al., 2008). Für die Orthologe von Me31B ist eine Funktion in der Translationsrepression und im *decapping* von mRNAs beschrieben (Coller & Parker, 2005; Kamenska et al., 2016; Mathys et al., 2014; Radhakrishnan et al., 2016). So interagiert Me31B über seine C-terminale RecA2-ähnliche-Domäne mit dem *decapping*-Aktivator Edc3 (Tritschler et al., 2008). Für das humane Ortholog DDX6 konnte eine direkte Interaktion mit der MIF4G-Domäne von NOT1 gezeigt werden, welches wichtig für die miRNA-abhängige Translationsrepression ist (Y. Chen et al., 2014; Mathys et al., 2014). Weiterhin wird über die C-terminale Domäne von Me31B auch Trailer hitch (Tral) gebunden. Dies schließt die Bindung an Edc3 aus, sodass Me31B in zwei distinkten Komplexen vorliegt (Tritschler et al., 2008).

Tral und seine Orthologen sind ebenfalls in der Translationsrepression und im *decapping* involviert (Rajyaguru et al., 2012; Tritschler et al., 2008). Das Protein besteht aus einer N-terminalen LSm14-Domäne, die für das humane Ortholog die Interaktion mit 4E-T vermittelt (Brandmann et al., 2018). Nachfolgend enthält das Protein mehrere RGG-Motive, die im *S. cerevisiae*-Ortholog für die Translationsrepression notwendig sind (Rajyaguru et al., 2012) und vermutlich eine Funktion in der RNA-Bindung ausüben. In der Mitte des Proteins befindet sich das FDF-Motiv, das für die Interaktion mit Me31B notwendig ist (Tritschler et al., 2008, 2009). Sowohl Me31B als auch Tral lokalisieren in *P-bodies*. Dabei handelt es sich um zelluläre Partikel, die reich an *decapping*-Faktoren, Deadenylasen und translationell reprimierten mRNAs sind (Ayache et al., 2015; Parker & Sheth, 2007; Tritschler et al., 2009). Wie genau Me31B und Tral die *nanos*-mRNA regulieren, ist nicht bekannt.

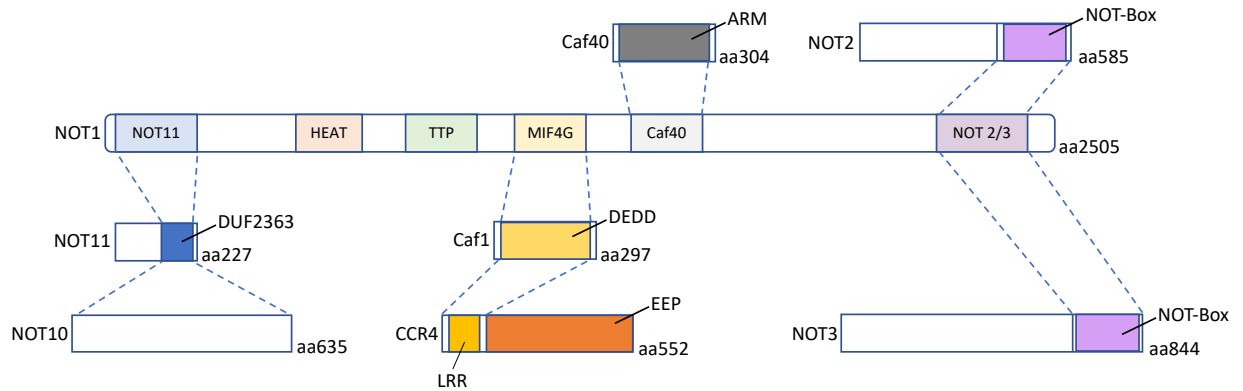


#### 1.2.2.4 Belle

Belle ist wie Me31B eine ATP-abhängige DEAD-Box-RNA-Helikase. Neben der typischen Domänenstruktur einer DEAD-Box-RNA-Helikase hat Belle einen verlängerten N-Terminus, der ein eIF4E-Bindemotiv enthält (Shih et al., 2007; Yarunin et al., 2011). Für Belle und seine Orthologe (DDX3 im Menschen; Ded1p in *S. cerevisiae*) konnte eine Funktion sowohl in der Translationsinitiation als auch in der -repression beobachtet werden (Kotov et al., 2020; M. C. Lai et al., 2016; Liao et al., 2019; Shih et al., 2007). So führte eine Deletion von *ded1* in *S. cerevisiae* zu einer deutlichen Verringerung der globalen Translation (Chuang et al., 1997; de La Cruz et al., 1997). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Orthologen von Belle auch mit Initiationsfaktoren der Translation wie z.B. eIF4G interagieren (Hilliker et al., 2011; Soto-Rifo et al., 2012). Die Translationsrepression ist dabei von der eIF4E-Bindung und dem C-Terminus der Helikase abhängig, wohingegen die Translationsstimulierung die Helikaseaktivität benötigt (Hilliker et al., 2011). Außerdem konnte eine RNA-unabhängige Assoziation zwischen Ded1p und Dhh1 (Me31B-Ortholog aus *S. cerevisiae*) in *pulldown*-Studien beobachtet werden (Drummond et al., 2011), sodass Belle möglicherweise über Me31B oder eIF4E zur *nanos*-mRNA rekrutiert wird. Für *belle*-Mutanten wurde ein negativer Effekt auf die Translationsrepression der *nanos*-mRNA beobachtet, der nicht auf einer veränderten mRNA-Stabilität beruht (Götze et al., 2017). Somit könnte es hier auch auf Ebene der Cap-abhängigen Translationsrepression wie Cup und 4E-T wirken.

#### 1.2.2.5 CCR4-NOT

Der CCR4-NOT-Komplex besteht in *Drosophila* aus acht konservierten Untereinheiten (Abbildung 1.7). Davon ist NOT1 mit 280 kDa das größte Protein und bildet das Zentrum des Komplexes über das sämtliche andere Untereinheiten rekrutiert werden. NOT1 wurde ursprünglich als negativer Regulator der Transkription von Promotoren ohne TATA-Box (*Negative on TATA*) beschrieben (Collart & Struhl, 1994). Der N-terminale Bereich von NOT1 bindet direkt an NOT11, welches wiederum NOT10 bindet (Bawankar et al., 2013). Über die Funktion von NOT10/11 ist wenig bekannt, jedoch konnte für die humanen Orthologe RNA-Bindung beobachtet werden (Raisch et al., 2019). Die Autoren zeigten, dass die beiden Proteine als Bestandteile des CCR4-NOT-Komplexes die Blockierung anderer RNA-binder Regionen des Komplexes umgehen, wodurch die Deadenylierung weiterhin durchgeführt werden konnte.



**Abbildung 1.7: Zusammensetzung des *Drosophila*-CCR4-NOT-Komplexes.**

Der *Drosophila*-CCR4-NOT-Komplex besteht aus acht konservierten Untereinheiten. NOT1 ist die größte Untereinheit und bildet die Interaktionsoberfläche für die Rekrutierung der anderen Untereinheit. Dargestellt sind die folgenden Domänen und Interaktionsbereiche in NOT1: HEAT – bestehend aus  $\alpha$ -helicalen HEAT-Tandemwiederholungen; MIF4G – ähnelt der Struktur des mittleren Bereichs von eIF4G; TTP – Interaktionsbereich zum Tristetraprolin-Protein; NOT11, Caf40, NOT 2/3 zeigen die jeweiligen Interaktionsbereiche an. Die Interaktion mit den jeweiligen Untereinheiten und den entsprechenden Domänen wird durch unterbrochene Linien angezeigt. NOT11: DUF2363 – Domäne unbekannter Funktion; Caf1: Nukleasedomäne mit DEDD-Motiv; CCR4: LRR – Leucin-reiche Region, EEP – Nukleasedomäne; Caf40: ARM – *Armadillo-repeat*-Domäne bestehend aus Wiederholungen von zwei  $\alpha$ -Helices, die eine Haarnadelstruktur bilden; NOT2/NOT3: NOT-Box – bestehend aus drei  $\alpha$ -Helices und einem  $\beta$ -Faltblatt. Neben den Proteinen ist ihre Größe in Aminosäuren (aa) angegeben. Abbildung modifiziert aus Bawankar et al. (2013).

In der Mitte von NOT1 befindet sich die MIF4G-Domäne, die von der katalytischen Untereinheit Caf1 (*CCR4-associated factor 1*) gebunden wird (Bawankar et al., 2013). Caf1 bindet wiederum in der Leucin-reichen Region im N-Terminus von CCR4 (*Carbon catabolite repressor protein 4 homolog*), der zweiten katalytischen Untereinheit. CCR4 gehört zur heterogenen Exonuklease-Endonuklease-Phosphatase-Familie (EEP), welche allesamt Phosphoesterasen sind (Y. Chen et al., 2021). Caf1 ist Teil der DEDDh-Familie, zu der auch die Poly(A)-Ribonukleasen PAN2 und PARN gehören (Zuo & Deutscher, 2001). Charakteristisch für die DEDDh-Familie ist die Verteilung von vier sauren und anderen konservierten Aminosäuren in drei separaten Sequenzmotiven.

In unmittelbarer Nähe zur MIF4G-Domäne von NOT1 befindet sich ein Bereich, der für die Interaktion mit Caf40 wichtig ist (Bawankar et al., 2013). Für Caf40 konnte eine direkte RNA-Bindung sowie eine Assoziation mit RBPs beobachtet werden (Raisch et al., 2019; Sgromo et al., 2017). Das Heterodimer NOT2-NOT3 interagiert über die C-terminalen Bereiche in den jeweiligen Proteinen mit dem C-Terminus von NOT1 (Bawankar et al., 2013). NOT2 und NOT3 bilden dabei eine weitere Interaktionsoberfläche zu RBPs, um den CCR4-NOT-Komplex zu bestimmten mRNAs zu rekrutieren (W. S. Lai et al., 2019; Raisch et al., 2016).

Insgesamt wird die Nukleaseaktivität des CCR4-Caf1-Heterodimers durch die weiteren Untereinheiten gesteigert und eine spezifische Deadenylierung bestimmter mRNAs ermöglicht (Raisch et al., 2019; Stowell et al., 2016). Neben der Rekrutierung durch RBPs wie z.B. TTP kann der CCR4-NOT-Komplex auch über miRNAs im Zusammenspiel mit dem GW182-Protein zu bestimmten mRNAs rekrutiert werden (Braun et al., 2011b; W. S. Lai et al., 2019).

### 1.2.3 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war es, die Komponenten des *nanos*-mRNA-Repressorkomplexes zu bestimmen, die für eine effiziente Deadenylierung und Translationsrepression notwendig sind. Eine präzise und stabile Regulation der *nanos*-mRNA sowie vieler weiterer maternalen mRNAs ist von entscheidender Bedeutung für das korrekte Voranschreiten der frühen Entwicklung. Weiterhin ist die hier untersuchte Smaug-abhängige Deadenylierung vermutlich ein weitreichender Prozess, da die Stabilität von über hundert maternalen mRNAs durch Smaug beeinflusst wird (Tadros et al., 2007). Neben Smaug ist auch für Cup und das humane sowie *S. cerevisiae*-Ortholog von PABPC eine Stimulierung der Deadenylierung beobachtet worden (Igreja & Izaurralde, 2011; Jeske et al., 2006; Semotok et al., 2005; Webster et al., 2018; Yi et al., 2018). Für Cup wurde dies allerdings nur in *tethering*-Assays beobachtet, sodass eine direkte Assoziation mit dem CCR4-NOT zu prüfen bleibt. Weiterhin konnte für das humane Me31B-Ortholog DDX6 eine direkte Interaktion mit NOT1 beobachtet werden (Y. Chen et al., 2014), jedoch wurde bis jetzt keine Stimulierung der Deadenylierung durch Me31B oder seiner Orthologe beschreiben. Ebenso wurde für Belle, eIF4E und Tral keine Funktion in der Deadenylierung beobachtet. Nichtsdestotrotz stellt sich die Frage, ob Smaug allein für eine Rekrutierung des CCR4-NOT-Komplexes ausreicht oder die anderen Repressorproteine ebenfalls eine Funktion ausüben. Dazu sollten sämtliche potenziellen Repressorproteine der *nanos*-mRNA rekombinant exprimiert und einzeln aufgereinigt werden, um ihre individuelle Funktion in der Translationsrepression und Deadenylierung zu untersuchen.

Weiterhin sollte der vollständige *Drosophila*-CCR4-NOT-Komplex rekonstituiert und seine basale Aktivität charakterisiert werden, um den direkten Einfluss der Repressorproteine auf die Deadenylierungsaktivität testen zu können.

Die ursprünglichen Translationsexperimente zur Repression der *nanos*-mRNA wurden in DEE als Translationsextrakt durchgeführt, welcher bereits sämtliche Repressorproteine enthält (Jeske et al., 2011). Dementsprechend sollte ein Translationssystem entwickelt werden, welches keine Hintergrundaktivität durch Repressorproteine im Translationsextrakt aufweist. Damit sollte dann bestimmt werden, welche der Repressorproteine für die langsame Bildung des kinetisch stabilen Repressorkomplexes notwendig sind.

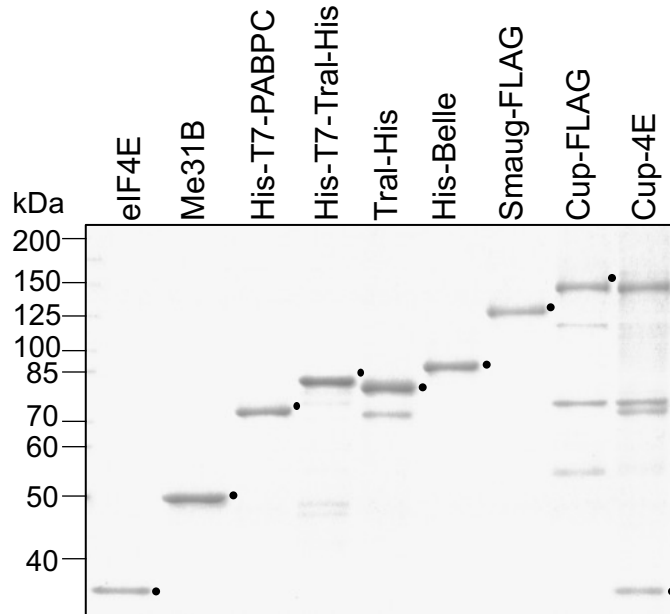
## 2. Ergebnisse und Diskussion

Zunächst wird auf die Fragestellung eingegangen, welche der Repressorproteine für die SRE-abhängige Rekrutierung des CCR4-NOT-Komplexes und die damit einhergehende Deadenylierung der *nanos*-mRNA verantwortlich sind. Abschließend wird diskutiert, welche Repressorproteine für die *In-Vitro*-Rekonstitution einer effizienten Translationsrepression der *nanos*-mRNA notwendig sind. Die in dieser Arbeit hergestellten und eingesetzten Reporter-RNAs sind schematisch im Anhang (Abbildung 9.2) dargestellt.

### 2.1 Aufreinigung der *nanos*-Repressorproteine

Zur Analyse der essenziellen Proteine für die Translationsrepression und Deadenylierung mussten diese zuerst exprimiert und aufgereinigt werden. Um ihre individuelle Rolle in diesen Prozessen zu untersuchen, wurden diese Proteine nach Möglichkeit einzeln entweder in *E. coli* oder baculoviral in Sf21-Insektenzellen überexprimiert (Bieniossek et al., 2012; Fitzgerald et al., 2006). Durch Expression in Insektenzellen sollten vor allem post-translationale Modifikationen integriert und die Löslichkeit der Proteine verbessert werden, da mit prokaryotischen Expressionssysteme wie *E. coli* häufig Probleme bei der löslichen und stabilen Überexpression von größeren Proteinen (>70 kDa) auftreten.

Nach einer Affinitätschromatographie (vgl. Abschnitt 4.6.4.2) wurden zunächst weitere Reinigungsschritte durchgeführt, z.B. verschiedenste Ionenaustauschchromatographien oder Größenausschlusschromatographie, welche allerdings für nahezu jedes Protein zu einem sehr hohen Verlust in der Ausbeute führten. Ein Großteil dieser Proteine blieb an dem Säulenmaterial haften und es konnte keine scharfe Auflösung erzielt werden. Eine Verbesserung durch verschiedenste Pufferzusätze (z.B. Detergenzien) oder unterschiedliche Temperaturen konnte nicht erreicht werden. Dementsprechend wurden sämtliche Repressorproteine direkt nach der ersten Affinitätschromatographie für die folgenden Experimente verwendet. Ein überwiegender Teil dieser Proteine zeigte auf einem Coomassie-gefärbten SDS-Gel (Abbildung 2.1) kaum bis keine Proteinkontaminationen, und nur für Cup und Cup-4E wurden wiederholt dieselben Kontaminationen mitgereinigt.



**Abbildung 2.1: Ergebnis der Reinigung der Repressorproteine.**

Coomassie-gefärbtes 10 % SDS-PA-Gel zur Analyse der Reinheit der Repressorproteine. Links sind die Markerbanden mit den entsprechenden Molekulargewichten gekennzeichnet und oberhalb der jeweiligen Spur ist das entsprechende Repressorprotein benannt. Dazugehörige N- oder C-terminale Protein-Tags sind ebenfalls aufgeführt. Im Gel ist die Bande mit dem erwarteten Molekulargewicht des Repressorproteins durch einen Punkt gekennzeichnet. Cup-4E steht hier für die Koreinigung von Cup und eIF4E. Tral-His wurde aus Insektenzellen und His-T7-Tral-His aus *E. coli* aufgereinigt.

Diese stellten sich nach massenspektrometrischer Analyse als das Hitzeschockprotein Hsp70 und Cytoskelettprotein  $\beta$ -Tubulin aus *S. frugiperda* (Sf21) heraus. Für Cup ist zumindest in Co-IP-Studien eine Interaktion mit Hsp90 beschrieben und eine genetische Interaktion mit Hsp83 angedeutet (Pisa et al., 2009). Eine Auflösung der Bindung zum Hsp70 durch Waschschritte mit Magnesium-ATP oder zwitterionischen Detergenzien (Rial & Ceccarelli, 2002) war erfolglos.

Weiterhin konnte eine ca. äquimolare Assoziation zwischen Cup und eIF4E beobachtet werden, da in der Affinitätschromatographie Cup durch seinen Affinitätstag an der Säule immobilisiert wurde und das koexprimierte eIF4E durch Interaktion mit Cup mitgereinigt wurde. Eine stabile Interaktion zwischen eIF4E und Cup wurde bereits mit einem aufgereinigten N-terminalen Fragment von Cup beobachtet und durch *pull-down*-Studien mit *in vitro* translatierten Proteinen (Kinkelin et al., 2012; Nelson et al., 2004).

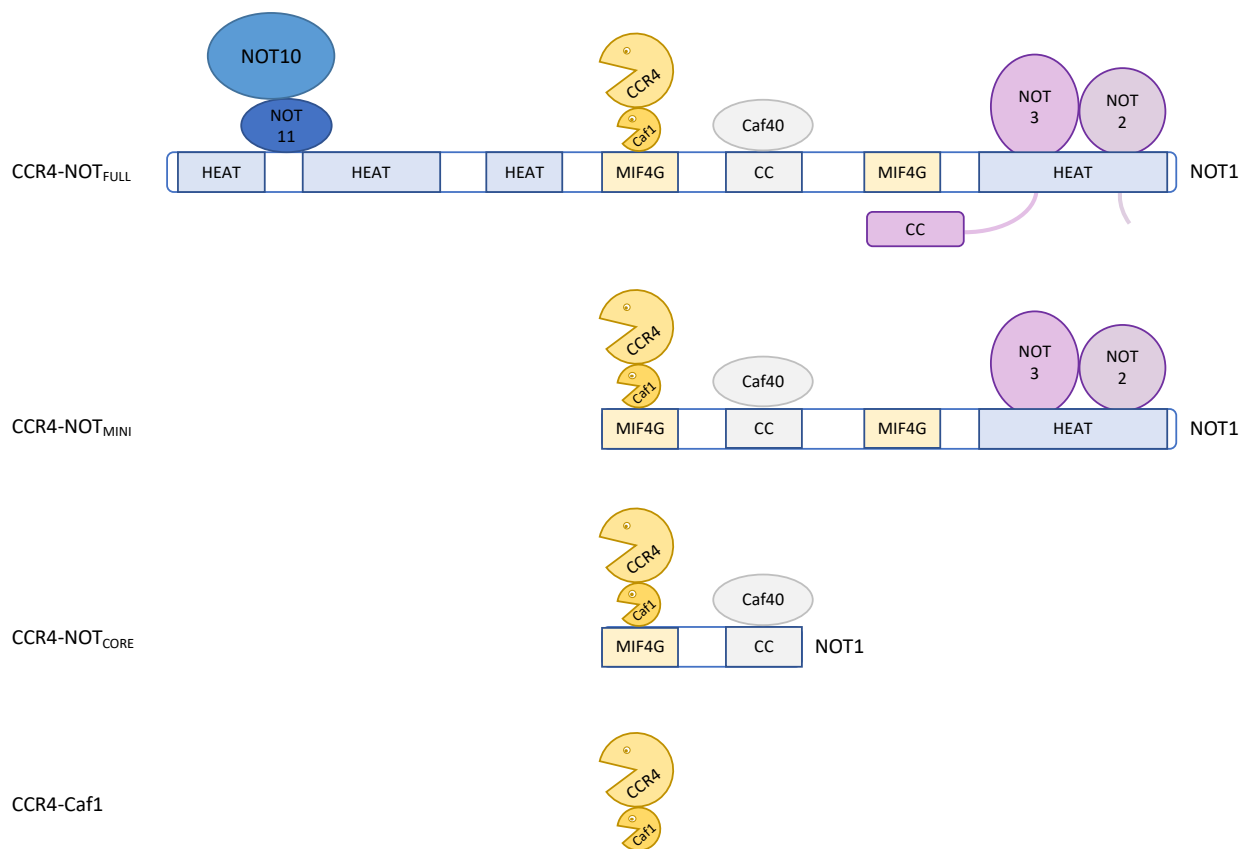
Insgesamt konnte für die *Drosophila*-Proteine Smaug, Cup, Cup-4E, Belle und PABPC die erste beschriebene, erfolgreiche Reinigung durchgeführt werden.

## 2.2 Rekonstitution der Deadenylierung

### 2.2.1 Initiale Experimente mit dem humanen CCR4-NOT-Komplex

#### 2.2.1.1 Smaug erhöht die Deadenylierungsaktivität von humanem CCR4-NOT

Zu Beginn der Deadenylierungsexperimente wurden die von der Arbeitsgruppe um Dr. Eugene Valkov aufgereinigten humanen CCR4-NOT-Subkomplexe (Raisch et al., 2019) bereitgestellt (Abbildung 2.2), um Vorversuche durchzuführen.

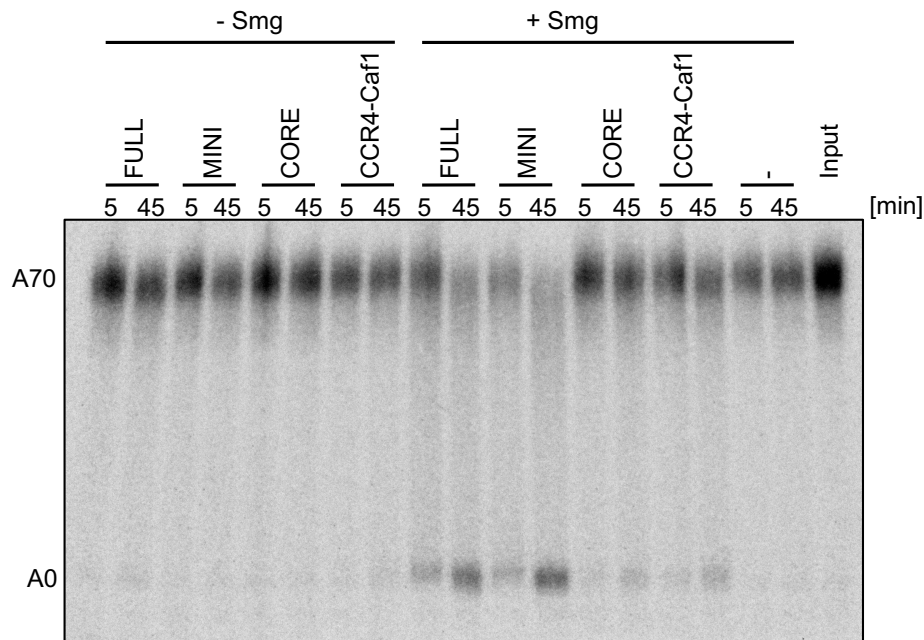


**Abbildung 2.2: Schema der Zusammensetzung der humanen CCR4-NOT-Subkomplexe.**

Gezeigt sind die verschiedenen Varianten des CCR4-NOT-Komplexes mit den folgenden Domänen in NOT1: HEAT – Domäne bestehend aus alpha-helicalen HEAT-Tandemwiederholungen; MIF4G – ähnelt mit seiner an  $\alpha$ -Helices reichen Struktur der des mittleren Bereichs von eIF4G; CC – lineare Coiled-Coil-Domäne.

Der „FULL“-Komplex entspricht dem natürlich vorkommenden CCR4-NOT-Komplex, wohingegen die verkürzten Varianten „MINI“ und „CORE“ artifiziiell sind. Bei „MINI“ fehlten die N-terminalen Bereiche von NOT1, NOT2 und NOT3, die Proteine NOT10 und NOT11 fehlen vollständig. Für die noch kürzere Variante „CORE“ wurde der C-terminus deletiert, wodurch NOT2/NOT3 fehlen. CCR4-Caf1 stellt hier nur das Nukleasemodul dar. Die Abbildung wurde modifiziert aus Raisch et al. (2019).

Da Smaug der essenzielle Faktor in der SRE-Spezifität und der Rekrutierung der anderen Repressorproteine ist, wurde dieses zunächst in seiner Aktivität in der Deadenylierung untersucht. Dazu wurde Smaug mit einer SRE-haltigen RNA mit einem 70 Adenylate langen Poly(A)-Schwanz (SRE<sup>WT</sup>-RNA) vorinkubiert, und nach dieser Vorinkubation wurden die unterschiedlich zusammengesetzten humanen CCR4-NOT-Komplexe (vgl. Abbildung 2.2) zugegeben, um die Deadenylierung zu initiieren (Abbildung 2.3).



**Abbildung 2.3: Der „MINI“-Subkomplex ist ausreichend für die Smaug-abhängige Deadenylierung.**

Autoradiogramm eines denaturierenden Harnstoff-PA-Gels mit den Produkten der Deadenylierungsreaktionen. Es wurden 5 nM radioaktiv markierte SRE<sup>WT</sup>-A70-RNA mit 30 nM Smaug oder Reaktionspuffer vorinkubiert und die Deadenylierung durch Zugabe der entsprechenden Subkomplexe (10 nM für „FULL“, „MINI“ und „CORE“; 50 nM für CCR4-Caf1) gestartet. Mit A70 ist die nicht umgesetzte Substrat-RNA mit intaktem Poly(A)-Schwanz markiert, wohingegen A0 das vollständig deadenylierte Produkt kennzeichnet. Die Reaktionen ohne Smaug (-Smg) befinden sich auf der linken Seite und diejenigen mit Smaug (+Smg) auf der rechten Seite. Die entsprechenden Reaktionszeitpunkte und Subkomplexe sind über den jeweiligen Spuren markiert, wobei (-) hier für die Reaktion nur mit Smaug und ohne CCR4-NOT steht. Der Input beinhaltet die jeweils aufgetragene Menge an Substrat-RNA im Deadenylierungspuffer.

Ohne Smaug war kaum bis keine Deadenylierungsaktivität zu sehen, wohingegen nach Vorinkubation mit Smaug eine deutlich erhöhte Aktivität für die „FULL“ und „MINI“ Komplexe und nur eine leicht gesteigerte Aktivität für die „CORE“ und CCR4-Caf1 Komplexe zu beobachten war. Dabei trat für die durch Smaug stimulierten Reaktionen eine vollständige Deadenylierung des Substrats für beide Zeitpunkte auf. Die Reaktion mit Smaug und ohne Deadenylasekomplex zeigte keine Deadenylierung, sodass Smaug keine Kontamination durch eine potenziell mitgereinigte Nuklease aufwies.



Dieses Experiment zeigt, dass Smaug tatsächlich die Deadenylierung einer SRE-haltigen RNA in einem *in vitro* rekonstituierten Deadenylierungssystem stimuliert. Weiterhin lässt sich vermuten, dass Smaug hauptsächlich mit NOT2, NOT3 und/oder dem C-terminalen Bereich von NOT1 interagiert, da diese in den weniger aktiven „CORE“-Komplex und CCR4-Caf1-Heterodimer fehlen. So konnten für NOT1, NOT2 und NOT3, neben Caf40, häufig Interaktionen zu anderen RBPs beobachtet werden (Hanet et al., 2019; Ozgur et al., 2015; Sgromo et al., 2017). Aus diesem Experiment lässt sich allerdings keine Aussage über die RNA-Spezifität treffen, denn die erhöhte Aktivität kann auch bloß auf einer RNA-unabhängigen allosterischen Aktivierung des Deadenylasekomplexes beruhen.

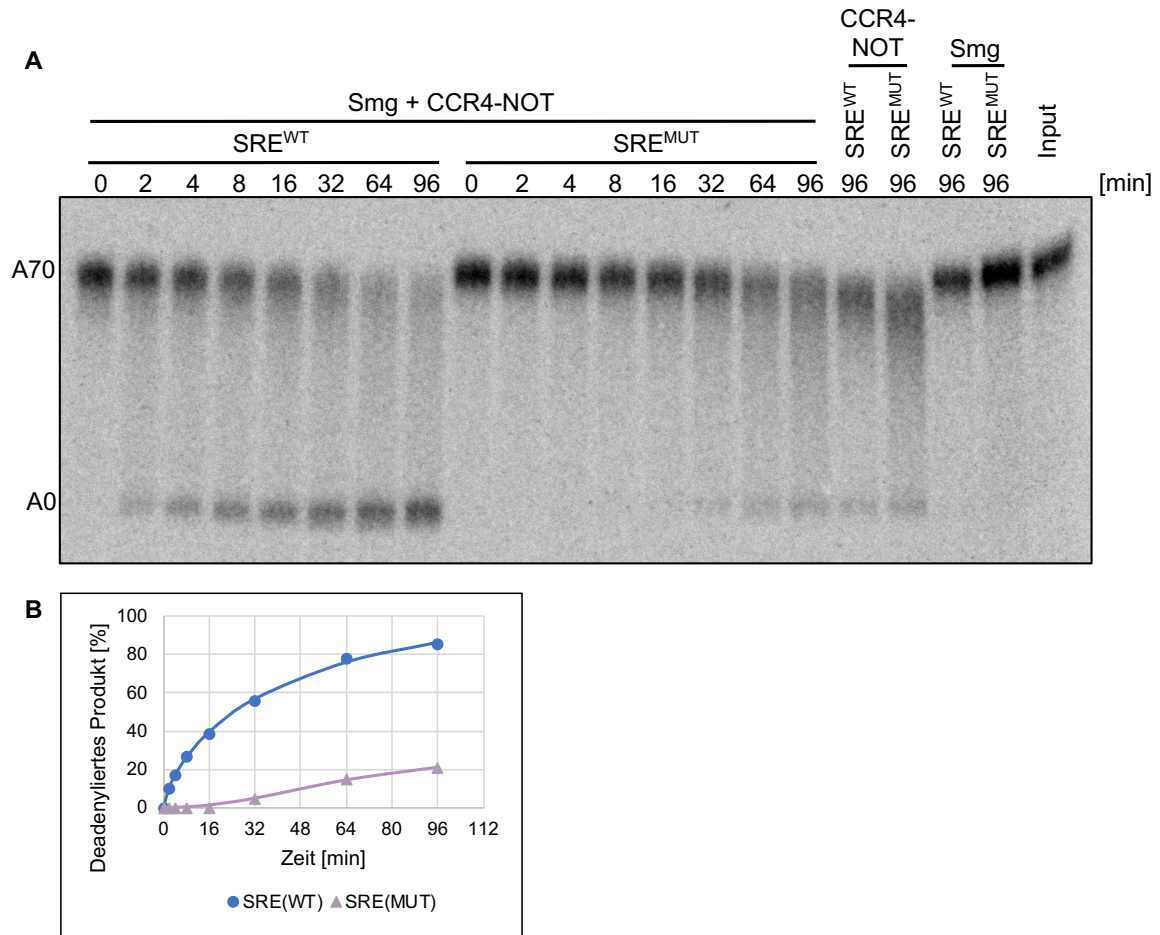
### 2.2.1.2 Smaug führt zu einer SRE-spezifischen Deadenylierung

Um Rückschlüsse über die SRE-Spezifität der Smaug-abhängigen Deadenylierung zu ziehen, wurde im nachfolgenden Experiment zusätzlich zur SRE-haltigen RNA eine Substrat-RNA mit je einer Punktmutation des kritischen Nukleotids im SRE eingesetzt (SRE<sup>MUT</sup>-RNA; vgl. Abbildung 1.3). Für diese Mutation wurde eine Blockierung der Assoziation der *nanos*-mRNA mit Smaug beobachtet (Aviv et al., 2003; Jeske et al., 2011). Beide RNAs wurden wie zuvor mit Smaug vorinkubiert und die Deadenylierung wurde durch Zugabe vom humanen CCR4-NOT<sub>FULL</sub> gestartet und eine Kinetik aufgenommen (Abbildung 2.4).

Für die mit Smaug vorinkubierte SRE<sup>WT</sup>-RNA lag bereits zum ersten Zeitpunkt (2 min) vollständig deadenyliertes Produkt vor, wohingegen dieses bei der entsprechenden Reaktion mit der SRE<sup>MUT</sup>-RNA erst nach 32 Minuten auftrat. Zum Endzeitpunkt lag ein Verhältnis von 86 % vollständig deadenylierter SRE<sup>WT</sup>-RNA zu 21 % SRE<sup>MUT</sup>-RNA vor. Der CCR4-NOT-Komplex allein zeigte eine stärkere Deadenylierung der SRE<sup>MUT</sup>-RNA im Vergleich zur SRE<sup>WT</sup>-RNA. Die Deadenylierungsaktivität des CCR4-NOT-Komplexes für die SRE<sup>MUT</sup>-RNA unterschied sich kaum für die Reaktionen mit und ohne Smaug. Für die Reaktionen ohne CCR4-NOT war wie zuvor keine Deadenylierungsaktivität zu beobachten.

Dieses Experiment bestätigte die Annahme, dass der Stimulierung durch Smaug auch eine SRE-Spezifität zu Grunde liegt (Dahanukar et al., 1999; Jeske et al., 2006). Weiterhin war den Reaktionen nur mit CCR4-NOT<sub>FULL</sub> zu entnehmen, dass der humane Komplex eine etwas stärkere Aktivität mit der mutierten RNA zeigte; diese entsprach ungefähr dem Endzeitpunkt der Reaktion mit Smaug und der SRE<sup>MUT</sup>-RNA. Dementsprechend wird hier die tatsächliche SRE-Spezifität der Smaug-abhängigen Reaktion unterschätzt. Die hohe Affinität von Smaug für SRE-haltige RNAs konnte bereits in einer Studie mit der RNA-bindenden SAM-Domäne von Smaug gezeigt werden (Aviv et al., 2003). Hier lag die Affinität bei

einem  $K_D$  von 12 nM für die SRE-haltige RNA und mit der hier benutzten Punktmutation konnte keine RNA-Bindung detektiert werden. Dementsprechend ist auch für das Deadenylierungsexperiment eine ähnliche SRE-Spezifität zu erwarten.



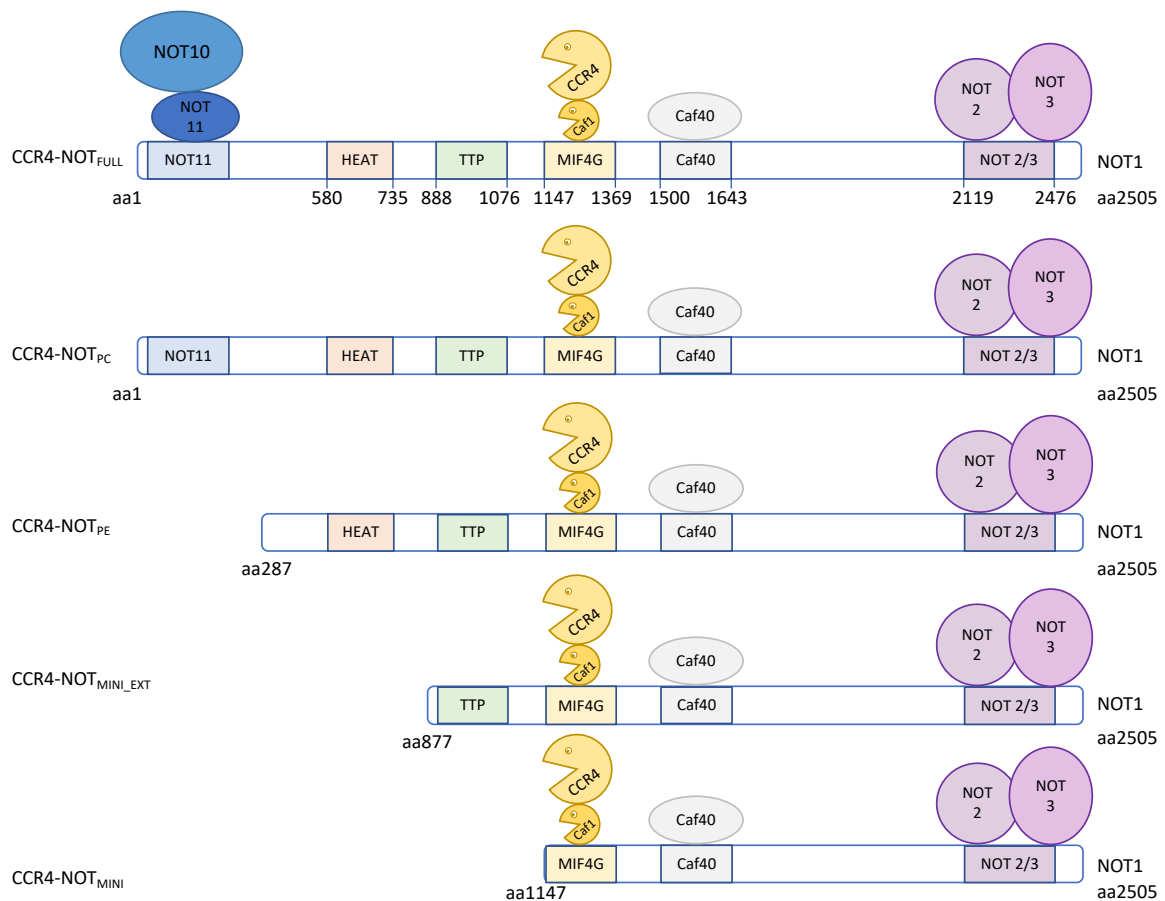
**Abbildung 2.4: Die Smaug-abhängige Deadenylierung ist auch SRE-spezifisch.**

**A:** Autoradiogramm eines denaturierenden Harnstoff-PA-Gels mit den Produkten der Deadenylierungsreaktionen. Es wurden je 5 nM der radioaktiv markierten SRE<sup>WT</sup>- oder SRE<sup>MUT</sup>-A70-RNA mit 30 nM Smaug vorinkubiert, und die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 nM humanem „FULL“-Komplex gestartet (die beiden Kinetiken links auf dem Gel). Die jeweiligen Reaktionen wurden für 2 bis 96 Minuten inkubiert und der Zeitpunkt 0 Minuten entspricht der direkten Probenentnahme vor Zugabe des CCR4-NOT-Komplexes. Die Laufhöhe von Substrat (A70) und Produkt (A0) sind links angegeben, und rechts wurden die Kontrollreaktionen nur mit CCR4-NOT oder nur mit Smaug aufgetragen. Über den jeweiligen Spuren sind die entsprechenden Reaktionszeitpunkte und RNA-Protein-Kombinationen aufgeführt. Der Input beinhaltet die jeweils aufgetragene Menge an Substrat-RNA im Deadenylierungspuffer. **B:** Quantifizierung des vollständig deadenylierten Produkts in den Smaug und CCR4-NOT enthaltenden Reaktionen mit SRE<sup>WT</sup>-RNA und SRE<sup>MUT</sup>-RNA. Das Autoradiogramm wurde densitometrisch mit dem Programm FiJi quantifiziert (Schindelin et al., 2012).

## 2.2.2 Rekonstitution des CCR4-NOT-Komplexes von *D. melanogaster*

### 2.2.2.1 Aufreinigung unterschiedlicher <sup>Dm</sup>CCR4-NOT-Subkomplexe

Die erfolgreichen initialen Experimente mit dem humanen CCR4-NOT-Komplex bildeten die Basis, eine Aufreinigung des *D. melanogaster*-Komplexes (<sup>Dm</sup>CCR4-NOT) und eine Rekonstitution der Deadenylierung anzustreben. Dazu wurden, ausgehend vom <sup>Dm</sup>CCR4-NOT<sub>MINI</sub>, unterschiedlich große Subkomplexe generiert (Abbildung 2.5), bei denen hauptsächlich die Länge von NOT1 variiert wurde. <sup>Dm</sup>CCR4-NOT<sub>MINI</sub> entspricht im Wesentlichen dem humanen „MINI“, außer dass vollständiges NOT2 und NOT3 eingesetzt wurden.



**Abbildung 2.5: Schema der Zusammensetzung der *Drosophila*-CCR4-NOT-Subkomplexe.**

Gezeigt sind die verschiedenen Varianten des CCR4-NOT-Komplexes mit entsprechenden Domänen und Interaktionsbereichen von NOT1: HEAT – bestehend aus  $\alpha$ -helicalen HEAT-Tandemwiederholungen; MIF4G – ähnelt der Struktur des mittleren Bereichs von eIF4G; TTP – Interaktionsbereich zu Tristetraprolin; NOT11, Caf40, NOT 2/3 zeigen die jeweiligen Interaktionsbereiche an. „PC“ und „PE“ entsprechen natürlich vorkommenden Isoformen von NOT1, wohingegen die N-terminal verkürzten NOT1-Varianten „MINI\_EXT“ und „MINI“ artifizuell sind. Mit Ausnahme vom „FULL“-Komplex, fehlen allen Subkomplexen NOT10/11. Weiterhin liegt hier im Vergleich zu den humanen CCR4-NOT-Varianten keine Verkürzung für NOT2/3 bei den Subkomplexen vor.

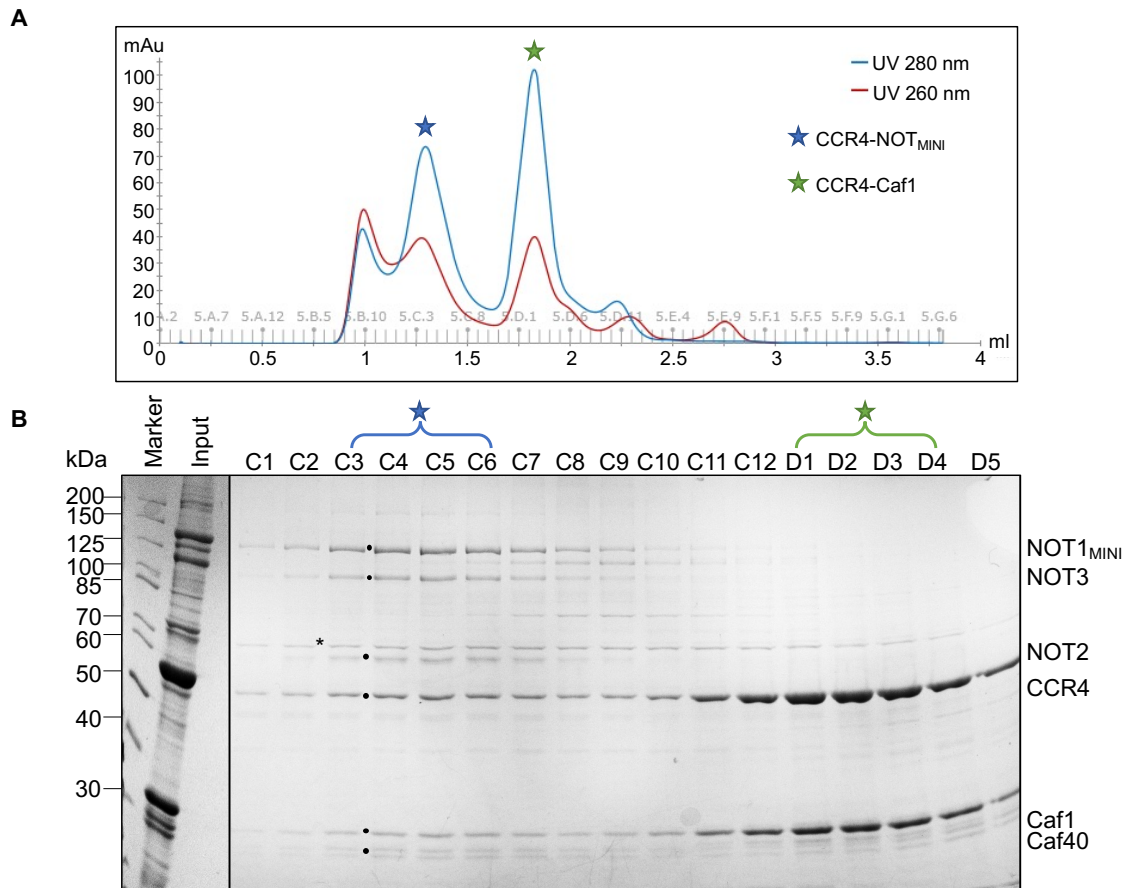
$DmCCR4-NOT_{MINI\_EXT}$  ist ähnlich zum  $DmCCR4-NOT_{MINI}$ , enthält aber eine N-terminale Verlängerung von NOT1, welches hier bei Aminosäure 877 beginnt. Weiterhin wurde der voraussichtliche TTP-Interaktionsbereich eingefügt (Fabian et al., 2013). Der N-Terminus von NOT1 wurde in  $DmCCR4-NOT_{PE}$  weiter verlängert, welches eine natürliche Spleißvariante von NOT1 ist (Hoskins et al., 2015).  $DmCCR4-NOT_{PC}$  enthält das vollständige NOT1, welches auch in  $DmCCR4-NOT_{FULL}$  vorkommt. Zusätzlich beinhaltet  $DmCCR4-NOT_{FULL}$  als einziger Komplex auch NOT10 und NOT11.

Zuerst wurde eine bakterielle Expression und Aufreinigung des  $DmCCR4-NOT_{MINI}$  analog zum humanen Komplex durchgeführt (Raisch et al., 2019), welche allerdings an der Unlöslichkeit von CCR4-Caf1 und NOT1 scheiterte. Daraufhin wurden NOT1 mit NOT2, NOT3 mit Caf40-FLAG, und FLAG-CCR4 mit Caf1 in drei MultiBac-Vektoren kloniert, um Baculoviren zu generieren (Bieniossek et al., 2012; Fitzgerald et al., 2006). Die CCR4-NOT-Subkomplexe wurden über eine baculovirale Koinfektion von Sf21-Insektenzellen mit allen drei Baculoviren überexprimiert (vgl. Abschnitt 4.6.4.1), mittels FLAG-markiertem CCR4 und Caf40 affinitätsgereinigt und die hexameren bzw. oktameren Subkomplexe wurden abschließend durch eine Größenausschlusschromatographie isoliert (Abbildung 2.6). Dabei wurde der Größenausschlussäule der Cellulose-Filter entfernt, da an diesem sonst der CCR4-NOT-Komplex haften blieb.

In den Fraktionen C1-C6 der Größenausschlusschromatographie wurde hauptsächlich der hexamere  $DmCCR4-NOT_{MINI}$  isoliert, mit einer ca. äquimolaren Proteinkontamination bei 70 kDa (Abbildung 2.6.B). Die Fraktionen C7-C11 enthielten neben den Proteinen des CCR4-NOT-Komplexes auch noch mehrere Proteinkontaminationen zwischen 70 und 150 kDa, sodass diese Fraktionen verworfen wurden. Die Fraktionen C12-D5 zeigten die erfolgreiche Abtrennung des überschüssigen Caf40 und CCR4-Caf1-Heterodimer, welches auch gleichzeitig zur Aufreinigung des CCR4-Caf1-Heterodimers diente. Außerdem war die Absorption bei 280 nm für den CCR4-NOT-Komplex (blauer Stern) um ca. 2-fach höher als bei 260 nm und für das CCR4-Caf1-Heterodimer (grüner Stern) um ca. 2,6-fach höher, was vermuten lässt, dass die Fraktionen überwiegend frei von RNA waren (Abbildung 2.6.A).

Somit konnte eine erfolgreiche Reinigungsstrategie für den hexameren  $DmCCR4-NOT_{MINI}$ -Komplex etabliert werden. Bezüglich der unbekanntenen Proteinkontamination bei 70 kDa (Abbildung 2.6.B) konnte, nach Auftragung des  $DmCCR4-NOT_{MINI}$ -Komplexes neben Cup auf einem SDS-PA-Gel, gezeigt werden, dass die unbekanntene Proteinkontamination

dasselbe Molekulargewicht und Laufverhalten wie die Hsp70-Kontamination in Cup aufweist. Dies lässt vermuten, dass es sich hier auch um Hsp70 handelt (Daten nicht gezeigt). Detergenzien halfen auch hier nicht in der weiteren Aufreinigung. Demnach wurden die Fraktionen C1-C6 vereint und aufkonzentriert, da dies die saubersten Fraktionen waren.

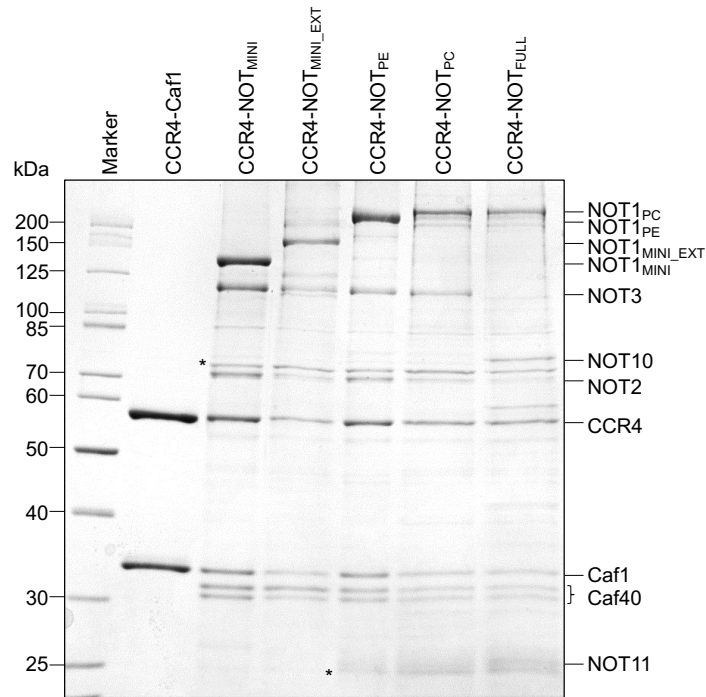


**Abbildung 2.6: Aufreinigung des  $DmCCR4-NOT_{MINI}$  mittels Größenausschlusschromatographie.**

Die Elution aus einer initialen Aufreinigung des  $DmCCR4-NOT_{MINI}$ -Komplexes mittels FLAG-Affinitätschromatographie wurde weiter über eine Größenausschlusschromatographie (Superose 6) aufgereinigt.

**A:** UV-Spektrum der Größenausschlusschromatographie. Zu sehen ist die Absorption (in mAu) für 260 nm und 280 nm über den Verlauf der Auftrennung. Mit einem blauen Stern ist der Absorptionspeak für CCR4-NOT<sub>MINI</sub> gekennzeichnet, und der grüne Stern markiert den Absorptionspeak für überschüssiges CCR4-Caf1 und Caf40. **B:** Coomassie-gefärbtes 12 % SDS-PA-Gel der Proteinfractionen nach Größenausschlusschromatographie. Links sind die entsprechenden Markerbanden mit Molekulargewichten aufgeführt, daneben ist die Elution der initialen FLAG-Aufreinigung aufgetragen (Input) und über den jeweiligen Spuren sind die Fraktionen der Chromatographie gekennzeichnet, mit einem blauen Stern für den hexameren  $DmCCR4-NOT_{MINI}$  und einem grünen Stern für das überschüssige CCR4-Caf1 und Caf40. Schwarze Punkte kennzeichnen die erwarteten Molekulargewichte, und der schwarze Stern zeigt eine Proteinkontamination an.

Da diese Reinigungsstrategie für den  $DmCCR4-NOT_{MINI}$ -Komplex erfolgreich war, wurde sie auch für die anderen  $DmCCR4-NOT$ -Subkomplexe angewandt. Nachfolgend ist die Reinheit sämtlicher  $DmCCR4-NOT$ -Subkomplexe in einem Coomassie-gefärbtem SDS-PA-Gel zu sehen (Abbildung 2.7).



**Abbildung 2.7: Präparationen der *Drosophila*-CCR4-NOT-Komplexe.**

Coomassie-gefärbtes 10 % SDS-PA-Gel zur Analyse der Reinheit der <sup>Dm</sup>CCR4-NOT-Komplexe. Links sind die Markerbanden mit den entsprechenden Molekulargewichten gekennzeichnet, und oberhalb der jeweiligen Spur sind die entsprechenden CCR4-NOT-Komplexe benannt. Rechts sind die erwarteten Laufhöhen der einzelnen Proteine gekennzeichnet, und mit Sternen wurden zwei prominente Kontaminationen gekennzeichnet.

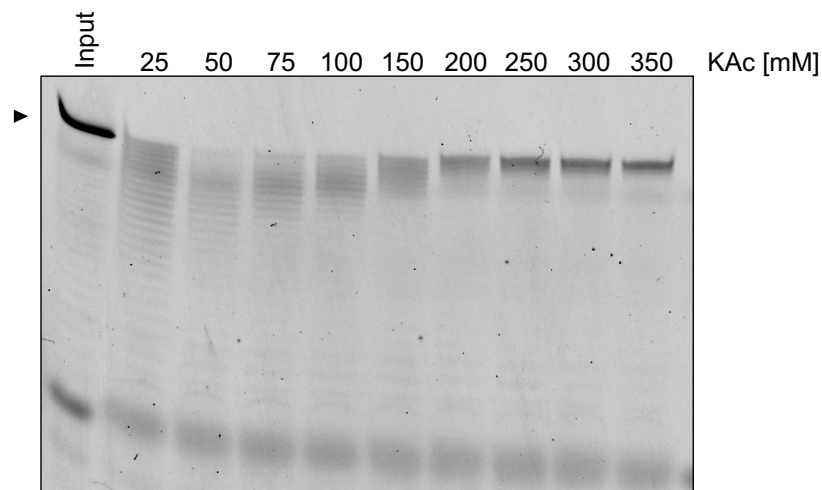
Die Analyse mittels Coomassie-gefärbtem SDS-Gel ergab, dass alle <sup>Dm</sup>CCR4-NOT-Komplexe mit der oben aufgeführten Reinigungsstrategie aufgereinigt werden konnte und überwiegend frei von Proteinkontaminationen sowie in ca. äquimolaren Verhältnissen vorliegen (Abbildung 2.7). Sämtliche Komplexe enthielten Caf40 als Doppelbande, welches auch mittels Western-Blot als rekombinantes Caf40 identifiziert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Außerdem wurde reproduzierbar ein Verlust an NOT2/NOT3 bei Zugabe von NOT10 und NOT11 zur Rekonstitution des <sup>Dm</sup>CCR4-NOT<sub>FULL</sub>-Komplexes beobachtet.

Die Isoformen NOT1-RE (<sup>Dm</sup>CCR4-NOT<sub>PE</sub>), welchem die NOT10/NOT11-Interaktionsregion fehlt, und NOT1-RG (<sup>Dm</sup>CCR4-NOT<sub>FULL</sub>) sind die über die verschiedenen Entwicklungsstadien am häufigsten und mitunter stärksten exprimierten Isoformen (vgl. Anhang: Abbildung 9.3). Es könnte dementsprechend anzunehmen sein, dass *in vivo* für bestimmte Prozesse jeweils ein NOT2/3 oder NOT10/11 beinhaltender Komplex benötigt wird. Generell ist die Funktion von NOT10/11 weder in *D. melanogaster* noch für andere Orthologe eindeutig geklärt. So konnte für den humanen Komplex gezeigt werden, dass NOT10/11 in der RNA-Bindung involviert sind (Raisch et al., 2019). Dies wurde hier nicht weiter untersucht.

### 2.2.2.2 Rekonstitution der basalen Deadenylierung durch $D^m$ CCR4-NOT

Mit den aufgereinigten  $D^m$ CCR4-NOT-Komplexen wurden zuerst Experimente durchgeführt, um die optimalen Reaktionsbedingungen mit der höchsten Deadenylierungsaktivität zu bestimmen. Generell dienen zu Beginn der Untersuchungen die Reaktionsbedingungen für den humanen und Hefe-Komplex und die anfänglichen Deadenylierungsexperimente mit zellfreien *Drosophila*-Embryoextrakten als Orientierung (Jeske et al., 2014; Raisch et al., 2019; Webster et al., 2017).

So ist aus Versuchen mit dem *S. pombe*-CCR4-NOT-Komplex bekannt, dass zu hohe Salzkonzentrationen eine Hemmung der Deadenylierungsaktivität bewirken (Webster et al., 2017). Dementsprechend wurde in einem ersten Deadenylierungsexperiment die Salzkonzentration variiert, und Aktivität des  $D^m$ CCR4-NOT<sub>MINI</sub>-Komplexes mit der kurzen synthetischen FAM-7mer-A20-RNA untersucht (Abbildung 2.8).

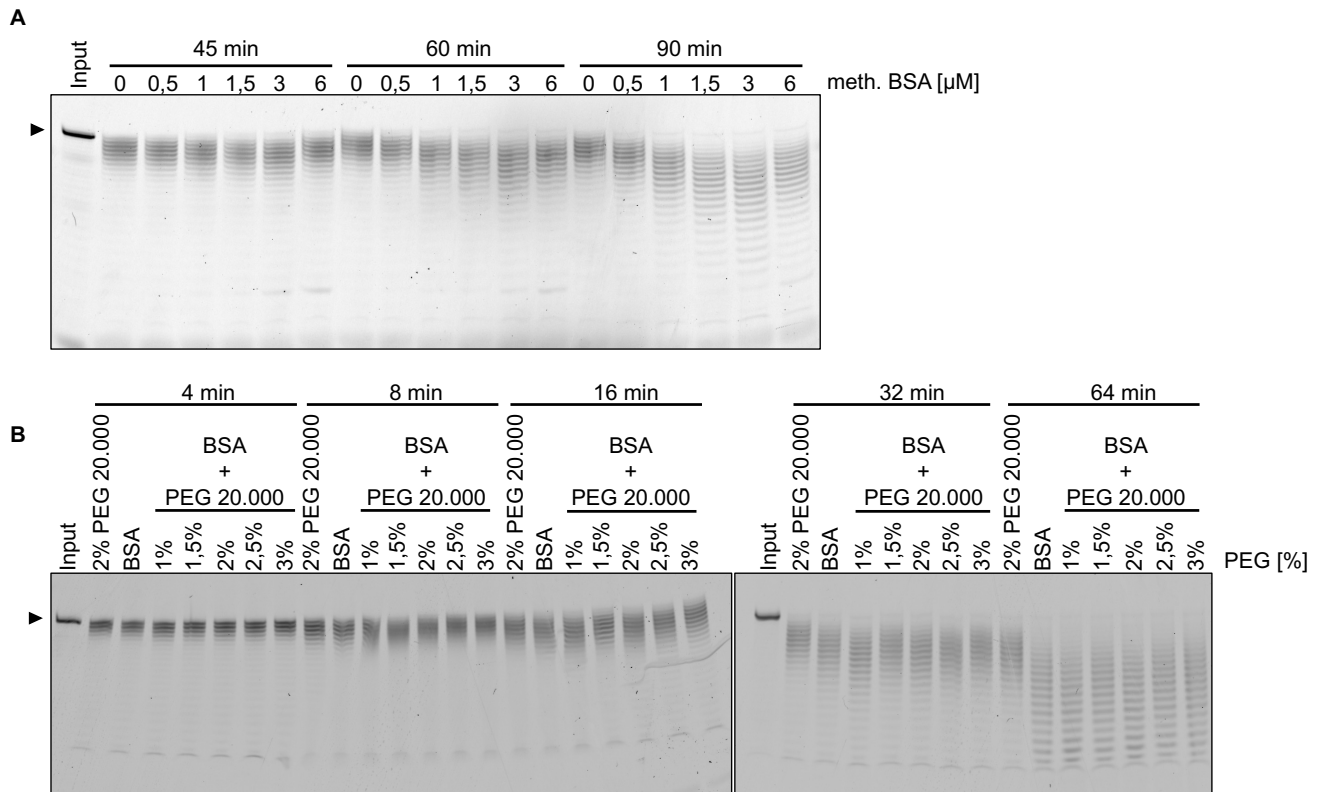


**Abbildung 2.8: Die Deadenylierungsaktivität des  $D^m$ CCR4-NOT<sub>MINI</sub> ist salzempfindlich.**

Fluoreszenzscan eines denaturierenden Harnstoff-PA-Gels mit den Produkten der Deadenylierungsreaktionen. Die FAM-7mer-A20-RNA (10 nM) wurde bei unterschiedlichen Kaliumacetat-Konzentrationen mit dem  $D^m$ CCR4-NOT<sub>MINI</sub> (5 nM) für 60 Minuten inkubiert. Links ist mit einem Pfeilkopf die Substrat-RNA markiert und über den Spuren sind die jeweiligen Salzkonzentrationen angegeben. Der Input beinhaltet die jeweils aufgetragene Menge an Substrat-RNA im Deadenylierungspuffer.

Für die kurze synthetische FAM-7mer-A20-RNA wurde eine Abnahme der Deadenylierungsaktivität mit steigender Salzkonzentration beobachtet, was mit dem Ergebnis aus *S. pombe* übereinstimmt. Auch dort konnte eine optimale Aktivität um 25 mM Salz beobachtet werden. Ob das Salz einen direkten Einfluss auf die Deadenylierungsaktivität oder die RNA-Bindung hat, wurde für den *Drosophila*-Komplex nicht weiterverfolgt. Außerdem kann hier von einer 3'-Exonukleaseaktivität ausgegangen werden, da eine 5'-fluoreszenzmarkierte RNA verwendet wurde.

Generell war die Aktivität der ersten CCR4-NOT-Präparationen eher schwach und nicht langlebig; sie kam bereits nach 20 Minuten zum Erliegen. Um die Aktivität bzw. Stabilität zu steigern, wurden verschiedene Additive getestet (Abbildung 2.9), wie z.B. die makromolekularen „Crowder“ BSA oder PEG 20.000 (Berg et al., 1999; Y. Wang et al., 2012).



**Abbildung 2.9: Stimulierung der Langlebigkeit des  $D^m$ CCR4-NOT<sub>MINI</sub> durch methyliertes BSA.**

Fluoreszenzscans von denaturierenden Harnstoff-PA-Gelen mit den entsprechenden Produkten der Deadenylierungsreaktionen. Generell wurde bei **A** und **B** links mit einem Pfeilkopf die Substrat-RNA markiert und der Input entspricht der jeweils aufgetragenen Menge an Substrat-RNA im Deadenylierungspuffer. **A:** Die FAM-7mer-A20-RNA (10 nM) wurde bei unterschiedlichen Konzentrationen an methyliertem BSA mit dem  $D^m$ CCR4-NOT<sub>MINI</sub> (5 nM) für 45 bis 90 Minuten inkubiert. Über den Spuren sind die jeweiligen BSA-Konzentrationen und Reaktionszeitpunkte angegeben. **B:** Hier wurde der Reaktion aus FAM-7mer-A20-RNA (10 nM) und  $D^m$ CCR4-NOT<sub>MINI</sub> (5 nM) entweder nur PEG 20.000 (2 %), nur methyliertes BSA (ca. 2,3  $\mu$ M) oder eine Kombination aus methyliertem BSA (2,3  $\mu$ M) und unterschiedlichen Konzentration PEG 20.000 (1 bis 3 %) zugegeben und für 4 bis 64 Minuten inkubiert. Über den jeweiligen Spuren sind die entsprechenden Additive und Reaktionszeitpunkte gekennzeichnet.

Dazu wurde eine Titration von methyliertem BSA (RNase-frei) in der Reaktion mit der FAM-7mer-RNA und dem  $D^m$ CCR4-NOT<sub>MINI</sub>-Komplex durchgeführt (Abbildung 2.9.A). Außerdem wurde eine kurze Kinetik der Deadenylierung mit späten Zeitpunkten erstellt, bei denen in vorherigen Experimenten bereits keine weitere Deadenylierungsaktivität mehr vorlag.

Das Experiment zeigte, dass in der Reaktion ohne BSA die Deadenylierung von 45 min bis 90 min nicht mehr fortschritt. Nach Zugabe von BSA war eine konzentrationsabhängige



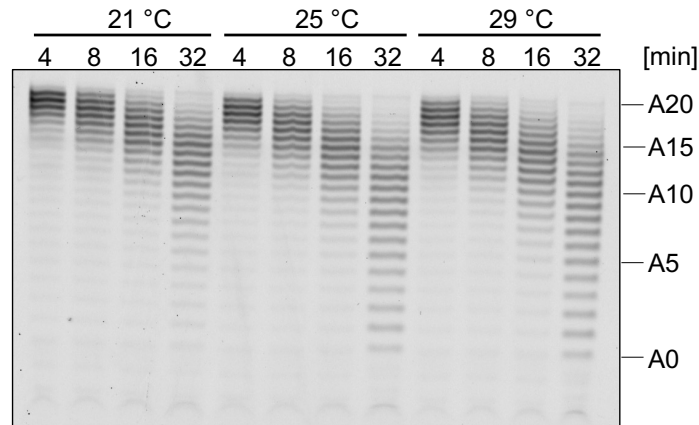
Stimulierung der Langlebigkeit der Reaktion zu sehen, welche selbst nach 90 Minuten noch nicht beendet war. Hier lag ein Maximum der Stimulierung zwischen 1,5 und 3  $\mu\text{M}$  BSA vor. Weiterhin war zu beobachten, dass die Deadenylierungsaktivität bei 45 Minuten annähernd gleich war.

Für die Titration von PEG 20.000 wurde die Reaktion erneut mit der FAM-7mer-RNA und dem  $\text{DmCCR4-NOT}_{\text{MINI}}$ -Komplex durchgeführt, jedoch wurde hier standardmäßig für die PEG-Titration auch BSA hinzugefügt, da es bereits einen positiven Effekt zeigte (Abbildung 2.9.B). Hier wurde außerdem eine umfassendere Kinetik aufgenommen, die zwischen 4 und 16 Minuten keinen Unterschied im Deadenylierungsfortschritt zwischen den Reaktionen nur mit PEG, nur mit BSA oder einer Kombination aus beiden zeigte. Erst nach 32 Minuten war zu erkennen, dass die nur BSA-haltige Reaktion weiter fortgeschritten war als die nur PEG-haltige. Die Zugabe von steigenden Mengen PEG zur BSA-haltigen Reaktion bewirkte keinen Unterschied. Nach 64 Minuten ergab sich ein ähnliches Ergebnis, wie nach 32 Minuten nur mit weiter fortgeschrittener Deadenylierung.

Aus diesen zwei Experimenten lässt sich schlussfolgern, dass methyliertes BSA hauptsächlich die Langlebigkeit und nicht die Geschwindigkeit des  $\text{DmCCR4-NOT}_{\text{MINI}}$ -Komplexes beeinflusst, da der Fortschritt der Deadenylierung für den ersten Zeitpunkt in der BSA-Titration (Abbildung 2.9.A) bzw. für die ersten drei Zeitpunkte in der PEG-Titration (Abbildung 2.9.B) nahezu identisch ist. Eine Titration von PEG 20.000 in An- oder Abwesenheit von BSA ergab auch keine Stimulierung der Reaktion (Abbildung 2.9.B und Daten nicht gezeigt), sodass nur das methylierte BSA in den Standardreaktionspuffer übernommen wurde.

Neben der Zugabe von Additiven wurden auch drei verschiedene für *D. melanogaster* typische Umgebungstemperaturen gewählt, um die optimale Reaktionstemperatur zu ermitteln (Abbildung 2.10). Dazu wurde die FAM-7mer-RNA mit dem  $\text{DmCCR4-NOT}_{\text{MINI}}$ -Komplex zwischen 21 und 29 °C inkubiert.

Bei sämtlichen Temperaturen war für jeden Zeitpunkt eine graduelle Deadenylierung zu sehen. Der Substrat-RNA wurden nach 32 Minuten bei 21 °C überwiegend ca. 4-10 Adenylate entfernt, wohingegen es bei 25 °C und 29 °C größtenteils ca. 6-15 Adenylate waren. Somit konnte nur bei der niedrigsten Temperatur eine Abnahme der Deadenylierungsaktivität beobachtet werden, wohingegen die Reaktionen bei 25 °C und 29 °C ähnlich verliefen. Hieraus ergab sich eine Reaktionstemperatur von 25 °C für die nachfolgenden Experimente.



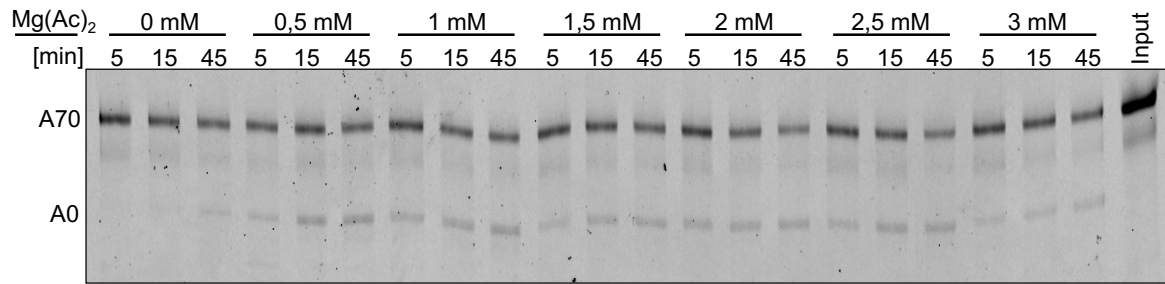
**Abbildung 2.10: Temperaturabhängigkeit des  $DmCCR4-NOT_{MINI}$ -Komplexes.**

Fluoreszenzscan eines denaturierenden Harnstoff-PA-Gels mit den Reaktionsprodukten der Deadenylierungsreaktionen. Die FAM-7mer-A20-RNA (25 nM) wurde mit dem  $DmCCR4-NOT_{MINI}$ -Komplex (25 nM) bei drei unterschiedlichen Temperaturen (21 bis 29 °C) inkubiert. Rechts ist die Länge des poly(A)-Schwanzes der Substrat-RNA angegeben, und über den jeweiligen Spuren sind die entsprechenden Reaktionszeitpunkte und Inkubationstemperaturen angegeben.

Mit den ersten Präparationen des  $DmCCR4-NOT_{MINI}$ -Komplexes konnte außerdem eine starke Abnahme der Aktivität durch Einfrieren und Auftauen des Komplexes beobachtet werden, was nicht beim humanen Komplex auftrat. Der Proteinreinigungspuffer hatte ursprünglich für beide Komplexe eine identische Zusammensetzung, sodass die Anfälligkeit für das Einfrieren wahrscheinlich dem *Drosophila*-Komplex intrinsisch ist. Um die Stabilität zu erhöhen, wurde dem Reinigungspuffer 10 % Saccharose hinzugefügt, welche auch in dem Reinigungspuffer der anderen Repressorproteine enthalten war. Durch Zugabe dieses Additivs wird u.a. die Bildung von störenden Eiskristallen beim Einfrieren und Auftauen des Proteins reduziert (Hauptmann et al., 2018), was hier zu einer deutlichen Steigerung der Stabilität führte (Daten nicht gezeigt).

Abschließend wurde mit dem optimierten  $DmCCR4-NOT_{MINI}$ -Komplex noch eine Titration der Magnesium-Ionen-Konzentration durchgeführt (Abbildung 2.11), da divalente Kationen für die Aktivität der Ribonukleasen CCR4 und Caf1 sowie anderer Deadenylasen (PARN, Pan2-Pan3) unerlässlich sind (Bianchin et al., 2005; Henriksson et al., 2010; H. Wang et al., 2010; Webster et al., 2017; Xu et al., 2014).

Für die Magnesium-Titration wurde die TCE<sup>MUT</sup>-A70-RNA eingesetzt (Jeske et al., 2006), welche einen Teil des Translationskontrollelements der *nanos* 3'-UTR mit Punktmutationen in den SREs enthält. Damit sollte auch gleichzeitig die Aktivität mit einer längeren strukturierten RNA und einem längeren Poly(A)-Schwanz getestet werden.



**Abbildung 2.11: Magnesiumabhängigkeit des  $D^m$ CCR4-NOT<sub>MINI</sub>-Komplexes.**

Fluoreszenzscan eines denaturierenden Harnstoff-PA-Gels mit den Produkten der Deadenylierungsreaktionen. Die FAM-TCE<sup>MUT</sup>-A70-RNA (25 nM) wurde mit dem  $D^m$ CCR4-NOT<sub>MINI</sub>-Komplex (25 nM) mit variierenden Mg(Ac)<sub>2</sub>-Konzentrationen (von 0 bis 3 mM) für 5 bis 45 Minuten inkubiert. Links ist die Laufhöhe von Substrat (A70) sowie Produkt (A0) angegeben, und über den jeweiligen Spuren sind die entsprechenden Reaktionszeitpunkte und Mg(Ac)<sub>2</sub>-Konzentrationen angegeben. Der Input beinhaltet die jeweils aufgetragene Menge an Substrat-RNA im Deadenylierungspuffer.

Das Experiment zeigte insgesamt keine graduelle Deadenylierung des Substrats wie bei der kurzen FAM-7mer-RNA, sondern eine Koexistenz von nicht umgesetztem Substrat und vollständig deadenyliertem Produkt. Weiterhin trat in der Reaktion ohne Magnesium-Ionen die geringste Deadenylierungsaktivität auf. Durch Zugabe von bereits 0,5 mM Mg(Ac)<sub>2</sub> konnte die höchste Aktivität erzielt werden, die zwischen 0,5 mM und 2,5 mM annähernd gleich blieb. Dahingegen war bei 3 mM eine leichte Reduktion zu sehen.

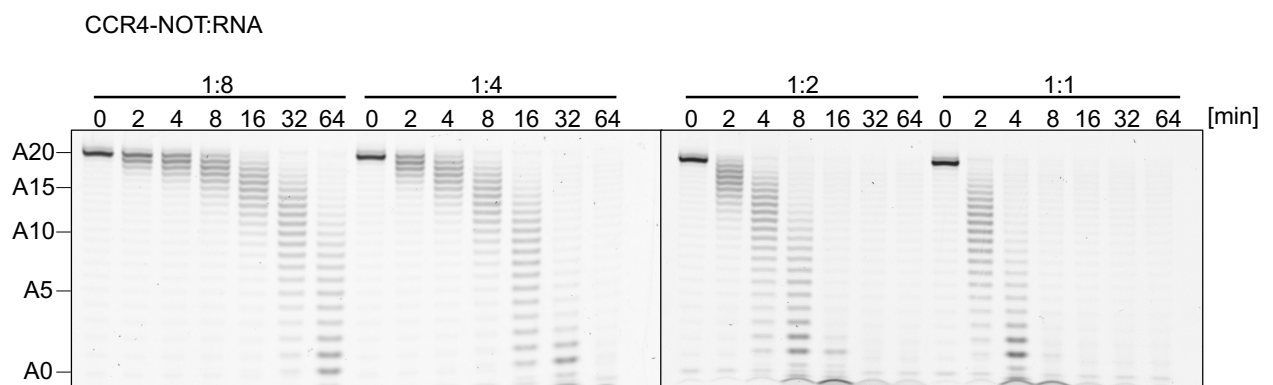
Hiermit konnte also gezeigt werden, dass ohne Magnesium-Ionen im Reaktionspuffer die Deadenylierungsaktivität auch für den *Drosophila*-Komplex deutlich gesenkt wurde. Die verbliebene Restaktivität wird vermutlich durch Spuren von Magnesium-Ionen in der Proteinpräparation oder im Reaktionspuffer verursacht. Für das humane CCR4 wurde ebenfalls ein Optimum bei 0,5 mM beobachtet (H. Wang et al., 2010), und generell wurden für die Deadenylierungsexperimente mit den Orthologen des CCR4-NOT-Komplexes Konzentrationen im Bereich zwischen 1-2 mM verwendet, was in etwa den physiologischen Bedingungen entspricht (Jeske et al., 2014; Raisch et al., 2019; Webster et al., 2017). Die Abhängigkeit von divalenten Kationen ist vor allem in den aktiven Zentren von CCR4 (ein Magnesium-Ion) und Caf1 (zwei Magnesium-Ionen) lokalisiert. Die Magnesium-Ionen spielen dabei u.a. eine wichtige Rolle in der Stabilisierung des Enzym-RNA-Übergangszustandes und der Bindung von Poly(A)-Schwänzen (Y. Chen et al., 2021; W. Yang, 2011). So führten in *S. pombe* Zink-Ionen zu einer geringeren Präferenz für Adenylate (Andersen et al., 2009).

Abseits der Magnesiumabhängigkeit ist hier auch zu beobachten, dass zu sämtlichen Zeitpunkten hauptsächlich vollständig deadenyliertes Produkt neben nicht umgesetztem Substrat vorliegt. Der  $D^m$ CCR4-NOT<sub>MINI</sub>-Komplex scheint hier stabil mit der Substrat-RNA zu

assoziiieren, bis diese vollständig deadenyliert wurde, was einer prozessiven Reaktion gleicht. Jedoch waren in diesem Experiment die Konzentrationen an Substrat-RNA und  $DmCCR4-NOT_{MINI}$  identisch, sodass bei vollständiger RNA-Bindung die gesamte RNA-Population komplett deadenyliert sein sollte. Dementsprechend weist ein Teil der RNA vermutlich eine Faltung auf, die stabil durch den CCR4-NOT-Komplex gebunden wird und möglicherweise deren Deadenylierungsrate erhöht. Ähnliches konnte auch für den humanen CCR4-NOT-Komplex mit der SRE-RNA beobachtet werden (vgl. Abbildung 2.4). Generell wurden für den humanen Komplex unterschiedliche Deadenylierungsaktivitäten mit variierender Länge und Struktur des nicht-Poly(A)-Teils der mRNA beobachtet (Raisch et al., 2019). Mit den  $DmCCR4-NOT$ -Komplexen und der kurzen FAM-7mer-A20-RNA wurde z.B. immer nur eine graduelle Deadenylierung beobachtet (vgl. Abbildung 2.12 und 2.13).

### 2.2.2.3 $DmCCR4-NOT$ zeigt distributives Verhalten

Unter den optimierten Bedingungen wurde im Folgenden der  $DmCCR4-NOT_{MINI}$ -Komplex bei konstanter Substrat-RNA-Konzentration titriert und eine Kinetik der Deadenylierung durchgeführt, um das in den vorherigen Experimenten angedeutete distributive Verhalten für die kurze FAM-7mer-RNA eindeutiger zu charakterisieren (Abbildung 2.12).



**Abbildung 2.12: Distributivität der Deadenylierung durch  $DmCCR4-NOT_{MINI}$ .**

Fluoreszenzscans von denaturierenden Harnstoff-PA-Gelen mit den Produkten der Deadenylierungsreaktionen. Die FAM-7mer-A20-RNA (50 nM) wurde mit 6,25; 12,5; 25 oder 50 nM  $DmCCR4-NOT_{MINI}$  für 2 bis 64 Minuten inkubiert. Der Zeitpunkt 0 Minuten entspricht der direkten Probenentnahme vor Zugabe des CCR4-NOT-Komplexes. Links ist die Poly(A)-Länge angegeben, und über den Spuren sind die jeweiligen Reaktionszeitpunkte und Verhältnisse von CCR4-NOT zur Substrat-RNA angegeben.

Bei einem ca. 8-fachen Substratüberschuss war eine graduelle Deadenylierung des Substrates über die Zeit zu sehen. Das vollständig deadenylierte Produkt trat hier nach 64 Minuten

auf. Zu keinem Zeitpunkt lagen verschiedene Populationen an deadenyliertem Produkt und gleichzeitig nicht umgesetztem Substrat vor (vgl. Abbildung 2.11). Bei Erhöhung der CCR4-NOT-Konzentration war eine Verschiebung des Fortschritts der Deadenylierung zu früheren Zeitpunkten zu beobachten.

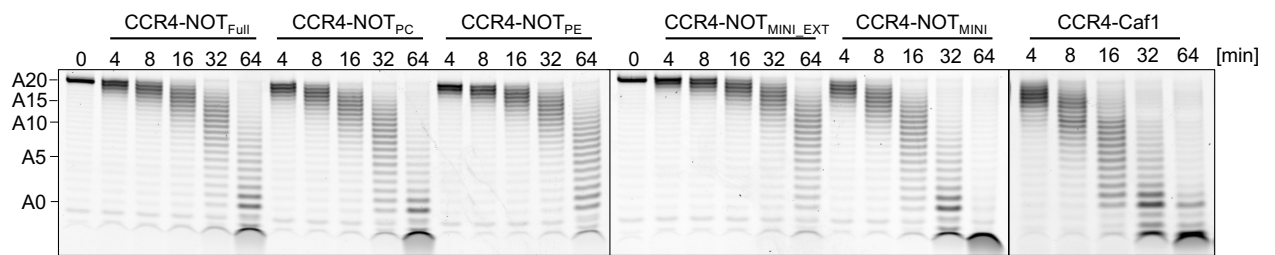
Dieses Muster von Reaktionsprodukt und -intermediaten lässt auf einen distributiven Reaktionsmechanismus schließen. Dies bedeutet, dass der Enzymkomplex mit einer Substrat-RNA assoziiert und dabei jeweils einzelne Adenylate freisetzt bevor der Komplex mit dem nächsten Substrat assoziiert. Dadurch tritt eine gleichmäßige Deadenylierung der Gesamtpopulation der mRNA auf. Weiterhin wird hier wahrscheinlich eine geringe Stabilität des Enzym-RNA-Komplexes vorliegen, da die Reaktion vermutlich durch schnelle Assoziations-/Dissoziationsereignisse getrieben ist.

Diese graduelle Deadenylierung wurde u.a. auch für dieselbe kurze Substrat-RNA mit den Orthologen des CCR4-NOT-Komplexes und auch dem CCR4-Caf1-Heterodimer beobachtet, wobei in diesen Experimenten meist nahezu äquimolare Mengen an Enzym zu Substrat eingesetzt wurden, was die Aussagekraft über die Distributivität der Reaktion einschränkt (Y. Chen et al., 2021; Raisch et al., 2019; Webster et al., 2018). Es bleibt noch zu untersuchen mit welchem Anteil der distributive Reaktionsmechanismus *in vivo* tatsächlich eintritt, da zahlreiche Interaktionspartner zum CCR4-NOT beschrieben sind, die ihn u.a. zu einer spezifischen RNA rekrutieren und die Deadenylierungsrate beschleunigen (Arvola et al., 2020; Stowell et al., 2016).

#### 2.2.2.4 Vergleich der Deadenylierungsaktivität der <sup>Dm</sup>CCR4-NOT-Subkomplexe

Die bisherigen Experimente wurden überwiegend mit dem hexameren <sup>Dm</sup>CCR4-NOT<sub>MINI</sub>-Komplex durchgeführt, welcher eine artifizielle Verkürzung von NOT1 und damit auch vom <sup>Dm</sup>CCR4-NOT-Komplex darstellt. Außerdem beinhaltet der <sup>Dm</sup>CCR4-NOT<sub>FULL</sub>-Komplex zwei weitere Proteine (NOT10 und NOT11), welche potenziell eine Rolle in der basalen Aktivität ausüben. Deshalb wurden die verschiedenen Subkomplexe (vgl. Abbildung 2.7) auf ihre Deadenylierungsaktivität mit der FAM-7mer-RNA untersucht. Die meisten CCR4-NOT-Subkomplexe wurden in denselben Konzentrationen eingesetzt, und bei diesen Reaktionen lag die FAM-7mer-RNA in einem 10-fachen Überschuss vor. Dahingegen wurde das CCR4-Caf1-Heterodimer in einem 5-fachen Überschuss zur Substrat-RNA eingesetzt (Abbildung 2.13).

Für alle Subkomplexe konnte eine ähnliche graduelle Deadenylierungsaktivität beobachtet werden, welche dem vorherigen Ergebnis zum  $DmCCR4-NOT_{MINI}$  entsprach (vgl. Abbildung 2.12). Für die Komplexe  $DmCCR4-NOT_{FULL}$ ,  $DmCCR4-NOT_{PC}$  und  $DmCCR4-NOT_{MINI}$  sowie das CCR4-Caf1-Heterodimer konnte überwiegend vollständig deadenyliertes Produkt nach 32 oder 64 Minuten beobachtet werden. Dahingegen zeigte der Komplex  $DmCCR4-NOT_{PE}$  leicht geringere Deadenylierungsaktivität und der  $DmCCR4-NOT_{MINI\_EXT}$  eine deutlich reduzierte, mit ca. 5-10 entfernten Adenylaten zum Endzeitpunkt.



**Abbildung 2.13: Die  $DmCCR4-NOT$ -Subkomplexe zeigen vergleichbare Deadenylierung.**

Fluoreszenzscans von denaturierenden Harnstoff-PA-Gelen mit den Produkten der Deadenylierungsreaktionen. Es wurden je 5 nM der entsprechenden  $DmCCR4-NOT$ -Subkomplexe oder 250 nM des CCR4-Caf1-Heterodimers mit 50 nM FAM-7mer-A20-RNA für 4 bis 64 Minuten inkubiert. Der Zeitpunkt 0 Minuten entspricht der direkten Probenentnahme vor Zugabe des entsprechenden Deadenylasekomplexes. Links ist die Länge des Poly(A)-Schwanzes markiert, und über den Spuren sind die Reaktionszeit und der entsprechende Proteinkomplex angegeben.

Dementsprechend scheint weder die N-terminale Hälfte von NOT1 noch das Vorhandensein von NOT10/11 eine essenzielle Rolle in der basalen Deadenylierung zu spielen. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen zur Deadenylierungsaktivität der humanen CCR4-NOT-Subkomplexe (Raisch et al., 2019). Außerdem konnte für den humanen Komplex gezeigt werden, dass eine C-terminale Verkürzung von NOT1, mit einem Verlust von NOT2 und NOT3 einhergehend, zu einer leichten Reduzierung der Deadenylierungsrate führt (Raisch et al., 2019).

Ausschlaggebend scheint dementsprechend der mittlere Part von NOT1 mit den Interaktionsbereichen zu Caf1/CCR4 und Caf40 zu sein, da dieser sowohl beim humanen als auch dem hier getesteten *Drosophila*-Komplex im Vergleich zum CCR4-Caf1-Heterodimer zu einer gesteigerten Deadenylierung führt (Pavanello et al., 2018; Raisch et al., 2019). So muss man beim humanen Komplex die 5-fache und beim rekonstituierten *Drosophila*-Komplex die 25-fache Konzentration an CCR4-Caf1-Heterodimer einsetzen, um eine vergleichbare Aktivität zu den hexameren bzw. oktameren CCR4-NOT-Komplexen zu erreichen (vgl. Abbildung 2.13).

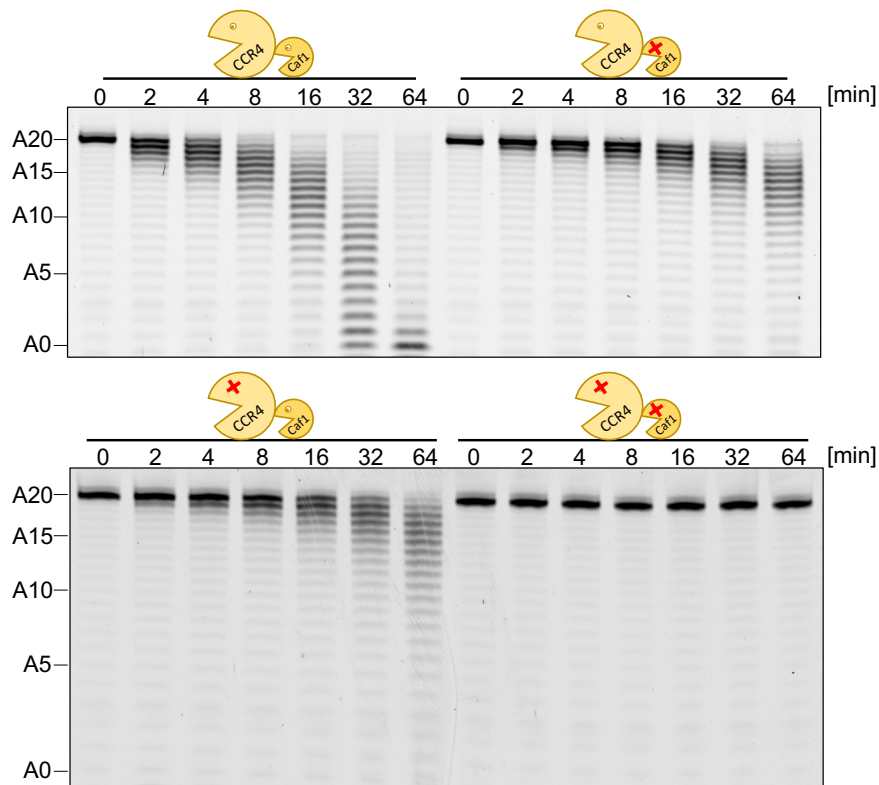
Für den humanen Komplex ist bekannt, dass Caf40 u.a. in der RNA-Bindung involviert ist (Raisch et al., 2019) und demnach wahrscheinlich zu einer stabileren Assoziation mit der Substrat-RNA beiträgt. In Raisch et al. (2019) konnte auch für NOT10/11 eine schwache RNA-Interaktion beobachtet werden, welche allerdings weder im humanen noch im *Drosophila*-Komplex zu einer gesteigerten Deadenylierung für verschiedenste Substrat-RNAs geführt hat. Für den humanen Komplex konnte allerdings gezeigt werden, dass bei Blockierung von Caf40, z.B. durch einen Proteininteraktionspartner, das NOT10/11-Heterodimer den Aktivitätsverlust kompensieren kann (Raisch et al., 2019).

Generell treten NOT10/11 erst in höheren Organismen auf und beide sind nicht in Hefe (*S. pombe* und *S. cerevisiae*) konserviert, welche allerdings zwei Spezies-spezifische Untereinheiten (*S. pombe*: Mmi1 bzw. *S. cerevisiae*: Caf130) aufweisen, die auch eine Rolle in der RNA-Bindung spielen (Stowell et al., 2016). Somit ist für den *Drosophila*-Komplex ein ähnlicher Sachverhalt zu erwarten, der noch zu testen bleibt.

#### 2.2.2.5 <sup>Dm</sup>CCR4-NOT ist die einzig aktive Ribonuklease

Um auszuschließen, dass die Deadenylierungsaktivität der <sup>Dm</sup>CCR4-NOT-Komplexe von einer kontaminierenden Nuklease herrührt, wurden beschriebene Punktmutationen in die aktiven Zentren der beiden Ribonukleasen CCR4 und Caf1 eingefügt und diese in Form des <sup>Dm</sup>CCR4-NOT<sub>MINI</sub>-Komplexes aufgereinigt (Temme et al., 2010; Tucker et al., 2002). Dann wurde eine Kinetik der Deadenylierung mit der FAM-7mer-RNA und den beiden Einzelmutanten und der Doppelmutante in <sup>Dm</sup>CCR4-NOT<sub>MINI</sub> durchgeführt (Abbildung 2.14).

Der Wildtyp-Komplex zeigte dieselbe graduelle Deadenylierungsaktivität wie bereits in vorherigen Experimenten, mit vollständig deadenyliertem Produkt zum Endzeitpunkt. Dagegen wies die Aktivität der jeweiligen Einzelmutanten eine deutliche Reduktion auf, welche jeweils größer als 50 % im Vergleich zum Wildtyp war. Insgesamt war die Aktivität beider Einzelmutanten nahezu identisch. Die Doppelmutante zeigte keinerlei Deadenylierungsaktivität. Der Wildtyp-<sup>Dm</sup>CCR4-NOT-Komplex war also sehr wahrscheinlich die einzig agierende Ribonuklease in der Proteinpräparation. Sämtliche hier eingesetzten Wildtyp- oder Mutanten-Komplexe wurden parallel auf selbe Art und Weise exprimiert und gereinigt, sodass die Deadenylierungsaktivitäten vergleichbar sein sollten.



**Abbildung 2.14: Die Deadenylierung ist gleichermaßen von CCR4 und Caf1 abhängig.**

Fluoreszenzscan von denaturierenden Harnstoff-PA-Gelen mit den Reaktionsprodukten der Deadenylierungsreaktionen. Es wurden je 5 nM der entsprechenden  $D^m$ CCR4-NOT<sub>MINI</sub>-Komplexe mit 50 nM FAM-7mer-A20-RNA für 2 bis 64 Minuten inkubiert. Der Zeitpunkt 0 Minuten entspricht der direkten Probenentnahme vor Zugabe des entsprechenden Deadenylasekomplexes. Links ist die Länge des Poly(A)-Schwanzes markiert, und über den Spuren sind die Reaktionszeit und der entsprechende Proteinkomplex angegeben. Die Cartoons stellen hier die zwei Ribonukleasen CCR4 und Caf1 dar, deren Mutation durch ein rotes Kreuz angezeigt wird.

Weiterhin zeigten die beiden Einzelmutanten keinen additiven Effekt, sondern einen dominant negativen Effekt auf die Aktivität der jeweils anderen Ribonuklease, da die Deadenylierungsaktivität um über 50 % in den Einzelmutanten gesenkt war. Dementsprechend scheint die Deadenylierungsaktivität beider Ribonukleasen voneinander abzuhängen. So blockiert möglicherweise eine der mutierten Ribonukleasen das 3'-Ende vorübergehend. Zudem könnte der Wildtyp-Komplex im Vergleich zu den Einzelmutanten die Substrat-RNA effizienter binden.

Für den rekonstituierten *S. pombe*-CCR4-NOT-Komplex konnte ebenfalls gezeigt werden, dass beide Ribonukleasen eine gleichwertige Rolle ausüben, wohingegen beim rekonstituierten humanen Komplex CCR4 die höhere Aktivität aufweist (Raisch et al., 2019; Stowell et al., 2016). Diese zwei orthologen Komplexe zeigen, im Gegensatz zum rekonstituierten *Drosophila*-Komplex, für die beiden Ribonukleasen einen nahezu additiven Effekt bezüglich der Deadenylierungsaktivität. Allerdings konnte auch für Einzelmutanten im humanen CCR4-Caf1-Heterodimer ein noch stärkerer dominant negativer Effekt auf die Deadenylierungsaktivität der jeweils anderen Ribonuklease beobachtet werden als mit dem hier



untersuchten *Drosophila*-Komplex (Maryati et al., 2015). Generell treten beim Vergleich der publizierten Deadenylierungsexperimente auch innerhalb derselben Spezies häufig Unterschiede in der Aktivität der Ribonukleasen auf (Y. Chen et al., 2021; Pavanello et al., 2018; Raisch et al., 2019; Stowell et al., 2016; Webster et al., 2018).

Wie bereits zuvor dargestellt, ist die Deadenylierung sehr sensitiv gegenüber höheren Salzkonzentrationen (vgl. Abschnitt 2.2.2.2). Außerdem konnte für das humane CCR4-Caf1 gezeigt werden, dass die Aktivität der einzelnen Nukleasen (auch im Heterodimer) sehr stark mit dem pH-Wert und der Konzentration an divalenten Kationen variiert (Y. Chen et al., 2021). Der pH-Wert ist wichtig, weil in den aktiven Zentren beider Ribonukleasen Histidine vorhanden sind, die voraussichtlich als Nukleophile in der Deadenylierung agieren und auch eine Rolle in der Substratbindung spielen (Y. Chen et al., 2021). So wurde von Y. Chen et al. (2021) für schwach saure pH-Werte auch eine kooperative Abhängigkeit der beiden humanen Ribonukleasen beobachtet. Dementsprechend ist ein direkter Aktivitätsvergleich nur unter dem Vorbehalt, dass ähnliche Reaktionsbedingungen (Salz, Konzentration von divalenten Kationen und pH-Wert) vorlagen, durchzuführen. Da bereits kleine Änderungen der Reaktionsbedingungen starke Unterschiede in der Deadenylierungsaktivität hervorrufen, sollten z.B. die unterschiedlichen Orthologe am besten in ein und demselben Experiment verglichen werden, um tatsächliche Spezies-spezifische Unterschiede festzustellen. So ist ein Vergleich der hier erhaltenen Ergebnisse mit denen der rekonstituierten CCR4-NOT-Orthologe schwierig, da ein Großteil der Reaktionspuffer sich unterschieden.

## 2.2.3 Die Smaug-abhängige Deadenylierung des <sup>Dm</sup>CCR4-NOT-Komplexes

### 2.2.3.1 <sup>Dm</sup>CCR4-NOT<sub>MINI</sub> in der SRE-spezifischen Deadenylierung

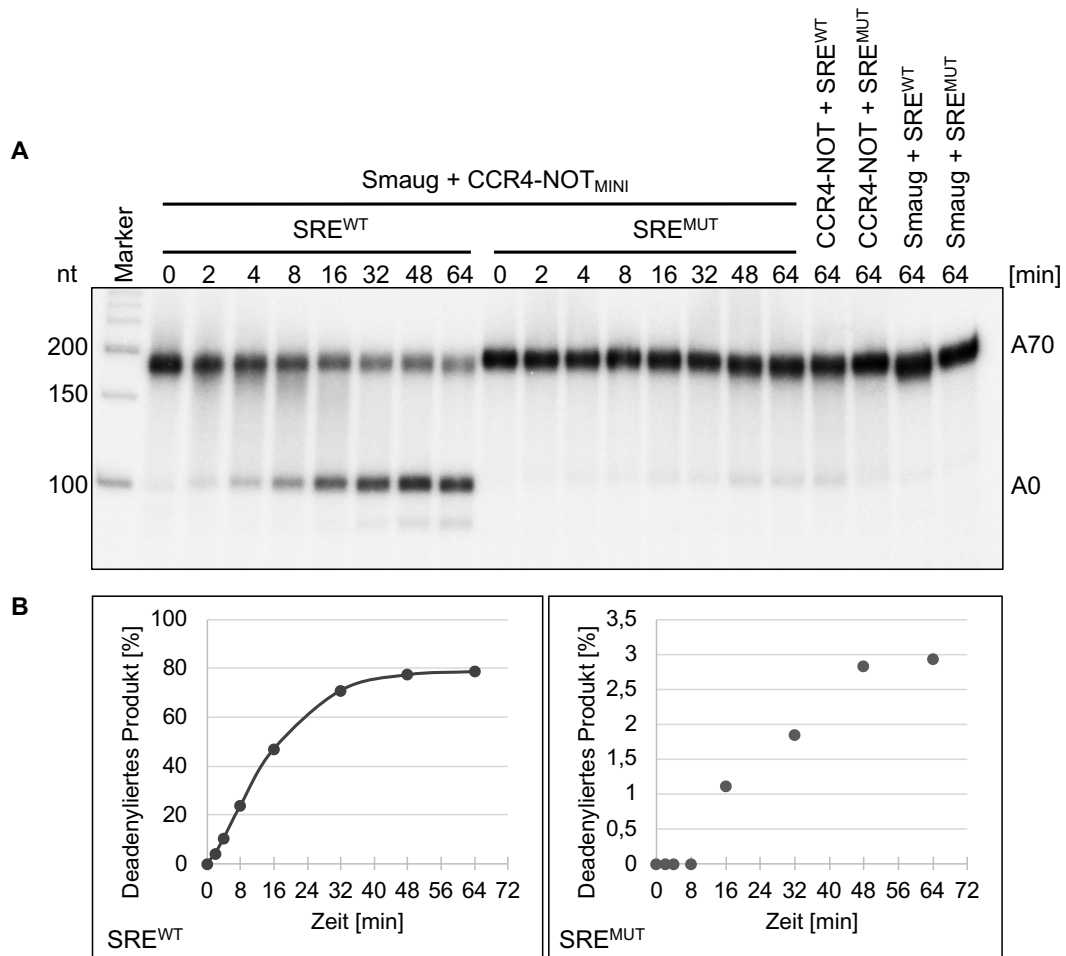
In den initialen Experimenten mit dem humanen CCR4-NOT-Komplex wurde bereits gezeigt, dass der „MINI“-Subkomplex ausreicht, um eine Smaug-abhängige und SRE-spezifische Deadenylierung zu ermöglichen (vgl. Abbildung 2.3 und Abbildung 2.4). Demzufolge wurde der <sup>Dm</sup>CCR4-NOT<sub>MINI</sub>-Subkomplex verwendet, um dieses Ergebnis mit dem *Drosophila*-eigenen Deadenylasekomplex zu überprüfen (Abbildung 2.15).

Dazu wurde wieder die SRE<sup>WT</sup>- oder SRE<sup>MUT</sup>-RNA mit Smaug vorinkubiert und eine Kinetik der Deadenylierung nach Zugabe von <sup>Dm</sup>CCR4-NOT<sub>MINI</sub> aufgenommen. Für die mit Smaug vorinkubierte SRE<sup>WT</sup>-RNA stieg der Anteil deadenylierten Produkts in den ersten 16 Minuten nahezu linear an und nahm danach langsamer zu (Abbildung 2.15.B). Dagegen zeigte die SRE<sup>MUT</sup>-RNA in den ersten 8 Minuten eine „lag-Phase“, und danach nur einen sehr schwachen Anstieg. Insgesamt war eine hohe Deadenylierungsaktivität für die mit Smaug vorinkubierte SRE<sup>WT</sup>-RNA zu sehen (80 % vollständig deadenyliertes Produkt zum Endzeitpunkt), wohingegen für die mutierte RNA eine deutlich niedrigere Aktivität vorlag (ca. 3 % vollständig deadenyliertes Produkt zum Endzeitpunkt). Die basale CCR4-NOT-Aktivität konnte hier nur in Form von vollständig deadenyliertem Produkt entnommen werden (ca. 3 % für SRE<sup>WT</sup>; < 1 % für SRE<sup>MUT</sup>), da eine Verschiebung der Gesamtpopulation der RNA durch eine mögliche distributive Deadenylierung auch nur wegen eines verzerrten Gellaufverhaltens bedingt sein könnte. Ohne CCR4-NOT ist, wie zuvor, keine Deadenylierung zu sehen.

Das Ergebnis dieses Experiments entspricht in wesentlichen Zügen dem der initialen humanen Experimente, da auch hier eine hohe Deadenylierungsaktivität für die mit Smaug inkubierte SRE<sup>WT</sup>-RNA im Gegensatz zu einer niedrigeren Aktivität für die mutierte RNA auftrat. Der Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante fällt für den *Drosophila*-Komplex noch prägnanter aus, da dieser, anders als der humane Komplex, eine sehr niedrige basale Deadenylierungsaktivität zeigt. Beim *Drosophila*-Komplex liegt eine leichte Präferenz für die SRE<sup>WT</sup>-RNA vor, was möglicherweise auch durch eine mitgereinigte SRE-spezifische Proteinkontamination verursacht worden ist. Weiterhin wurde für den *Drosophila*-Komplex ein 10-facher Überschuss an Substrat-RNA verwendet, für den humanen Komplex dagegen ein äquimolares Verhältnis (vgl. Abbildung 2.4). Vergleichbare niedrigere Konzentrationen des humanen Komplexes zeigten unter sämtlichen Reaktionsbedingungen (Temperatur bei

37 °C oder Zusatz von BSA) keinerlei Deadenylierungsaktivität (Daten nicht gezeigt). Dadurch war ein direkter Aktivitätsvergleich schwierig.

Generell zeigte die rekonstituierte Reaktion eine ähnlich rapide Deadenylierung wie vergleichbare Experimente mit *Drosophila*-Embryoextrakt, in denen die gleiche Substrat-RNA verwendet wurde (Jeske et al., 2006). Im Embryoextrakt konnte mit mRNA-*pulldowns* gezeigt werden, dass deutlich substöchiometrische Verhältnisse von gebundenem CCR4-NOT zur SRE<sup>WT</sup>-RNA vorliegen, wohingegen Smaug ca. äquimolar im Verhältnis zu den SREs gebunden hat. Dies wurde hier in der Wahl der Konzentrationen berücksichtigt.

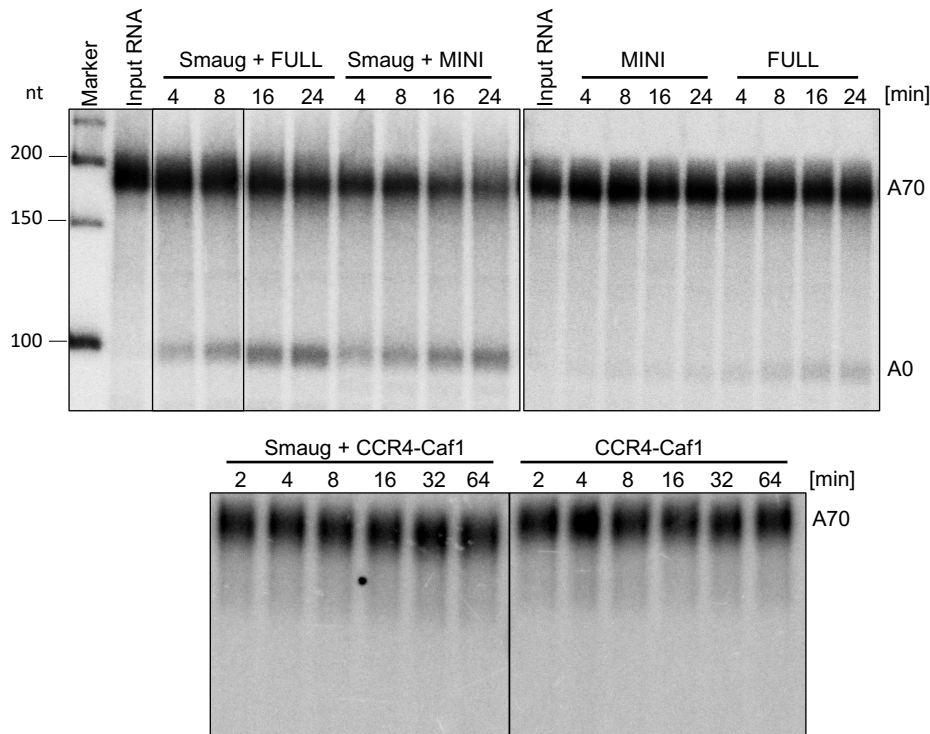


**Abbildung 2.15: Der <sup>Dm</sup>CCR4-NOT<sub>MINI</sub> ist aktiv in der Smaug-abhängigen Deadenylierung.**

**A:** Autoradiogramm eines denaturierenden Harnstoff-PA-Gels mit den Produkten der Deadenylierungsreaktionen. Es wurden je 20 nM der radioaktiv markierten SRE<sup>WT</sup>- oder SRE<sup>MUT</sup>-A70-RNA mit 80 nM Smaug vorinkubiert, und die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 nM <sup>Dm</sup>CCR4-NOT<sub>MINI</sub> gestartet (die beiden Kinetiken links auf dem Gel). Die jeweiligen Reaktionen wurden für 2 bis 64 Minuten inkubiert, und der Zeitpunkt 0 Minuten entspricht der direkten Probenentnahme vor Zugabe des CCR4-NOT-Komplexes. Links sind die Laufhöhen eines Größenstandards in Nukleotiden angegeben, und rechts ist die Laufhöhe von Substrat (A70) und Produkt (A0) markiert. Weiterhin wurden auf der rechten Hälfte die Kontrollreaktionen nur mit CCR4-NOT oder nur mit Smaug aufgetragen. Über den jeweiligen Spuren sind die entsprechenden Reaktionszeitpunkte und RNA-Protein-Kombinationen aufgeführt. **B:** Quantifizierung des vollständig deadenylierten Produkts in den Smaug- und CCR4-NOT-enthaltenden Reaktionen mit SRE<sup>WT</sup>- und SRE<sup>MUT</sup>-RNA. Das Autoradiogramm wurde densitometrisch mit dem Programm FiJi quantifiziert (Schindelin et al., 2012).

### 2.2.3.2 <sup>Dm</sup>CCR4-NOT-Subkomplexe in der Smaug-abhängigen Deadenylierung

Für die humanen Subkomplexe konnte gezeigt werden, dass in der Smaug-abhängigen Deadenylierung kein Unterschied in der Aktivität zwischen dem „FULL“- und dem „MINI“-Subkomplex vorliegt (vgl. Abbildung 2.3). Mit den entsprechenden *Drosophila*-Komplexen wurde ein analoges Experiment, mit einer leicht erweiterten Kinetik, durchgeführt (Abbildung 2.16).



**Abbildung 2.16: <sup>Dm</sup>CCR4-NOT<sub>MINI</sub> ist ausreichend für die Smaug-abhängige Deadenylierung.**

Autoradiogramme von denaturierenden Harnstoff-PA-Gelen mit den Produkten der Deadenylierungsreaktionen. Für die Reaktionen mit <sup>Dm</sup>CCR4-NOT<sub>FULL</sub> (FULL) und <sup>Dm</sup>CCR4-NOT<sub>MINI</sub> (MINI) wurden 20 nM radioaktiv markierte SRE<sup>WT</sup>-A70-RNA entweder mit 80 nM Smaug oder Reaktionspuffer vorinkubiert, die Deadenylierung durch Zugabe der entsprechenden Komplexe (1 nM) gestartet und für 4 bis 24 Minuten durchgeführt. Für die Reaktionen mit dem CCR4-Caf1-Heterodimer wurden 5 nM SRE<sup>WT</sup>-A70-RNA mit 20 nM Smaug vorinkubiert, durch Zugabe von 25 nM CCR4-Caf1 die Reaktion gestartet und für 2 bis 64 Minuten inkubiert. Links sind die Laufhöhen eines Größenstandards in Nucleotiden angegeben, und rechts die vom Substrat (A70) und Produkt (A0). Die entsprechenden Reaktionszeitpunkte und Protein-Subkomplex-Kombinationen sind über den jeweiligen Spuren markiert. Der Input beinhaltet die jeweils aufgetragene Menge an Substrat-RNA im Deadenylierungspuffer.

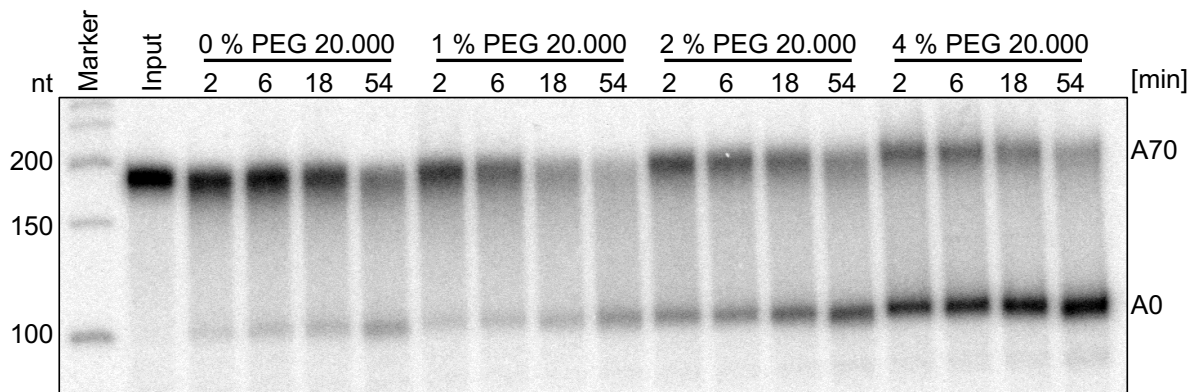
Sowohl für den <sup>Dm</sup>CCR4-NOT<sub>FULL</sub> als auch <sup>Dm</sup>CCR4-NOT<sub>MINI</sub> ergaben sich bei Zugabe von Smaug ähnliche Deadenylierungsaktivitäten. Bei den Reaktionen ohne Smaug zeigte sich etwas mehr akkumuliertes Produkt für den <sup>Dm</sup>CCR4-NOT<sub>FULL</sub>. Die Reaktionen mit dem CCR4-Caf1-Heterodimer zeigten mit und ohne Smaug keine Aktivität. Demnach ergab sich ein ähnliches Bild für die Smaug-abhängige Deadenylierung wie mit dem humanen

Komplex (vgl. Abbildung 2.3), da auch hier der N-terminale Part von NOT1, mit NOT10/11, zu keiner Steigerung der Aktivität führte und das Nuklease-Heterodimer keine Aktivität ausübte. Hieraus folgt, dass auch für den *Drosophila* Komplex der zentrale Part von NOT1 mit seinen Interaktionspartnern für die Smaug-abhängige Deadenylierung essenziell ist. Die Interaktion zwischen Smaug und dem CCR4-NOT-Komplex ist also wahrscheinlich konserviert.

Außerdem zeigte der <sup>Dm</sup>CCR4-NOT<sub>FULL</sub> ohne Smaug eine geringfügig erhöhte Aktivität im Vergleich zum <sup>Dm</sup>CCR4-NOT<sub>MINI</sub>, welches möglicherweise durch eine Kontamination mit einem SRE-spezifischen Protein verursacht wurde.

### 2.2.3.3 Stimulierung der Smaug-abhängigen Deadenylierung durch PEG

Aus vorher durchgeführten Experimenten zur Rekonstitution der Translationsrepression der *nanos*-mRNA (vgl. Abschnitt 2.3.2.2) war bekannt, dass die Zugabe von PEG 20.000 die Smaug-abhängige Repression deutlich steigert. Demzufolge wurde für die Smaug-abhängige Deadenylierung ebenfalls eine PEG-Titration durchgeführt, um den Einfluss von molekularem „Crowding“ zu untersuchen (Abbildung 2.17).



**Abbildung 2.17: Die Smaug-abhängige Deadenylierung wird durch PEG stimuliert.**

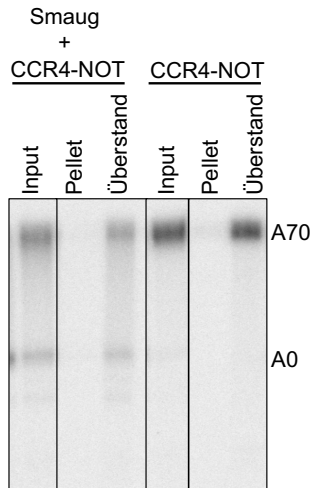
Autoradiogramm eines denaturierenden Harnstoff-PA-Gels mit den Produkten der Deadenylierungsreaktionen. Es wurden 10 nM radioaktiv markierte SRE<sup>WT</sup>-A70-RNA mit 80 nM Smaug bei einer PEG 20.000-Konzentration von 0 bis 4 % vorinkubiert und die Deadenylierung durch Zugabe von 2 nM <sup>Dm</sup>CCR4-NOT<sub>MINI</sub> gestartet. Die Deadenylierung wurde hier für 2 bis 54 Minuten durchgeführt. Links ist ein Größenstandard in Nukleotiden angegeben, und rechts die Laufhöhe des Substrats (A70) und des Produkts (A0). Über den Spuren sind die Reaktionszeit und die entsprechende PEG 20.000-Konzentration angegeben. Der Input enthält die jeweils aufgetragene Menge an Substrat-RNA im Deadenylierungspuffer.

Bei sämtlichen Deadenylierungsreaktionen war zu jedem Zeitpunkt das Auftreten von vollständig deadenyliertem Produkt zu beobachten. Mit Zugabe von PEG war eine deutliche Steigerung der Deadenylierungsaktivität zu beobachten.

Bei der höchsten PEG-Konzentration war außerdem für die gewählten Zeitpunkte kaum mehr ein Fortschreiten der Reaktion zu sehen, da bereits nach 2 Minuten nahezu das Maximum an vollständig deadenyliertem Produkt in dieser Reaktion vorlag.

In anderen Experimenten konnte gezeigt werden, dass PEG die basale Aktivität des <sup>Dm</sup>CCR4-NOT nicht erhöht, weder für die kurze FAM-7mer-RNA (vgl. Abbildung 2.9) noch für die lange SRE-haltige RNA. Die erhöhte Deadenylierungsaktivität beruht also nicht auf einer erhöhten basalen Aktivität des CCR4-NOT-Komplexes. Sie beruht auch nicht auf einer schnelleren Smaug-RNA-Bindung, da vor Zugabe des CCR4-NOT-Komplexes eine Vorinkubation der RNA mit Smaug durchgeführt wurde, welche mittels EMSA als ausreichend validiert wurde (vgl. Anhang: Abbildung 9.4). Demnach könnte die erhöhte Aktivität in einer schnelleren Assoziation des CCR4-NOT-Komplexes mit einem noch nicht umgesetzten Smaug-RNA-Komplex begründet liegen.

Weiterhin wurde vielfach beschrieben, dass „Crowder“ wie PEG die Flüssig-Flüssig-Phasentrennung sowie Aggregation von überwiegend intrinsisch ungeordneten Proteinen begünstigen (Ambadipudi et al., 2017; Lin et al., 2019; Munishkina et al., 2004; Park et al., 2020). So entsteht während der Flüssig-Flüssig-Phasentrennung eine von der Umgebungsflüssigkeit abgesonderte dichtere Phase, welche eine hohe Konzentration an Makromolekülen enthält. Diese dichtere Phase kann z.B. durch Zentrifugation von der leichteren Phase getrennt werden (Taratuta et al., 1990). Dabei kann sich ein Pellet bilden, welches die Makromoleküle der dichteren Phase enthält. Hierbei kann allerdings nicht direkt zwischen Präzipitation durch Aggregatbildung oder tatsächlicher Flüssig-Flüssig-Phasentrennung unterschieden werden. Da Smaug auch ein überwiegend intrinsisch ungeordnetes Protein ist, liegt es nahe, dass die Zugabe von PEG zu einer Phasentrennung oder Aggregation von Smaug führt. Daher wurde die Smaug-abhängige Deadenylierung auch bezüglich einer Phasentrennung oder Aggregation untersucht, indem die Reaktion nach erfolgter Deadenylierung 10 Minuten bei 20.000 g zentrifugiert wurde und der Überstand sowie ein potenzielles Pellet analysiert wurden (Abbildung 2.18).



**Abbildung 2.18: PEG induziert keine Phasentrennung oder Aggregation.**

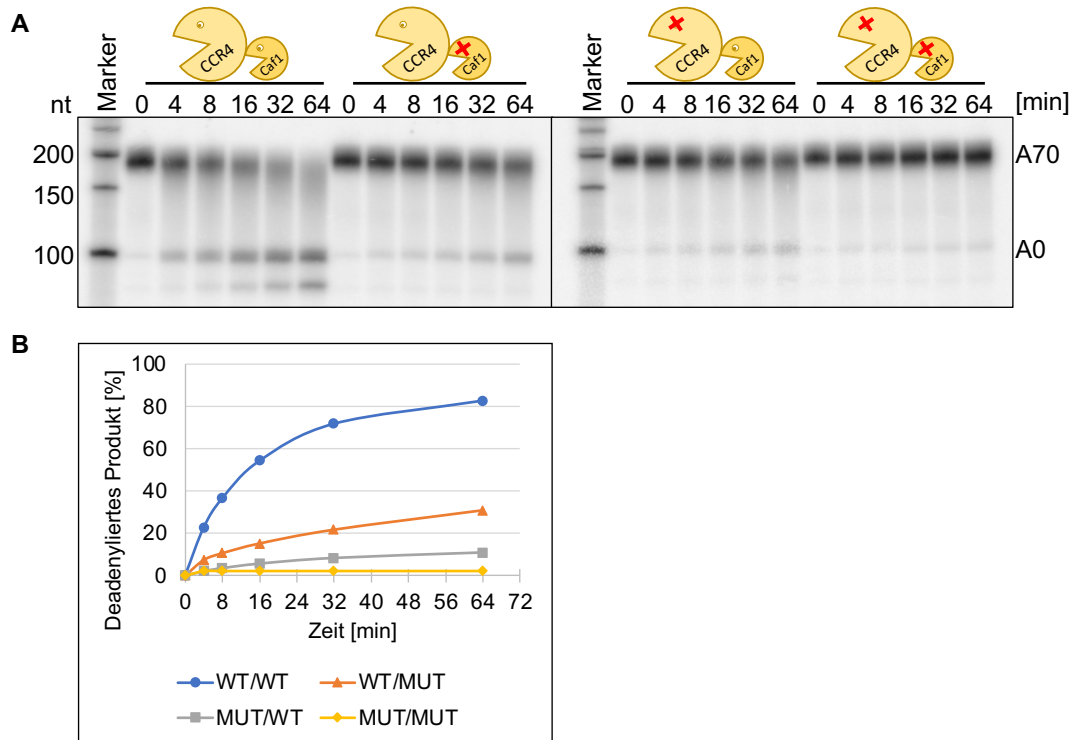
Autoradiogramm eines denaturierenden Harnstoff-PA-Gels mit den Produkten der Deadenylierungsreaktionen. Es wurden 10 nM radioaktiv markierte SRE<sup>WT</sup>-A70-RNA mit 80 nM Smaug bei einer PEG 20.000-Konzentration von 3 % vorinkubiert und die Reaktionen nach Zugabe von D<sup>m</sup>CCR4-NOT<sub>MINI</sub> für 45 Minuten inkubiert. Die Deadenylierungsprodukte wurden durch Zentrifugation in eine potenziell unlösliche (Pellet) und lösliche Phase (Überstand) getrennt. Der Input stellt die Reaktion vor Zentrifugation dar. Rechts ist die Laufhöhe des Substrats (A70) und des Produkts (A0) angegeben, und über den Spuren sind die jeweilige Proteinkombination sowie die Phase gekennzeichnet.

Sämtliches Substrat als auch Produkt waren nach Zentrifugation im löslichen Überstand. Demnach lag keine Phasentrennung vor, und die Zugabe von PEG schien zu keiner Aggregation zu führen. Einen Hinweis, wie PEG bzw. makromolekulares „Crowding“ die Smaug-abhängige Reaktion beeinflusst, könnte die ebenfalls PEG-abhängige rekonstituierte Translationsrepression geben (vgl. Abbildung 2.47). In dieser assoziiert Smaug nach RNA-Bindung mit anderen Repressorproteinen und rekrutiert diese dadurch zur *nanos*-mRNA, sodass PEG hier möglicherweise eine Funktion in der Protein-Protein-Interaktion hat.

Demnach ist sowohl bei der Deadenylierung als auch bei der Translationsrepression das überwiegend intrinsisch unstrukturierte Smaug involviert. Die Zugabe eines makromolekularen „Crowders“ führt möglicherweise zu einer Stabilisierung bestimmter Proteinkonformationen oder zur Bildung neuer Sekundärstrukturen, was z.B. auch für das intrinsisch unstrukturierte Histonprotein 1 (H1) beobachtet werden konnte (André & Spruijt, 2020; Roque et al., 2007). Generell erscheint die Zugabe eines „makromolekularen Crowders“ als sehr schlüssig, da in der Zelle Makromoleküle in Form von Nukleinsäuren, Proteinen und Polysacchariden bis zu 30 % des Volumens einnehmen und mit bis zu 400 mg/mL in sehr hohen Konzentrationen vorliegen (André & Spruijt, 2020; McGuffee & Elcock, 2010; Zimmerman & Trach, 1991). Besonders das frühe Stadium des Embryos, in dem Smaug hauptsächlich vorkommt, hat insgesamt sehr hohe Proteinkonzentration (Cao et al., 2020; Casas-Vila et al., 2017). Dementsprechend wurden mittlere Mengen an PEG 20.000 (ca. 3 %) für die meisten folgenden und auch vorherigen Experimenten eingesetzt.

### 2.2.3.4 CCR4 und Caf1 sind nötig für die Smaug-abhängige Deadenylierung

Nachfolgend soll die aktive Ribonuklease des  $Dm$ CCR4-NOT-Komplexes in der Smaug-abhängigen Deadenylierung bestimmt werden (Abbildung 2.19).



**Abbildung 2.19: Sowohl CCR4 als auch Caf1 sind essenziell für die Smaug-abhängige Deadenylierung.**

**A:** Autoradiogramme von denaturierenden Harnstoff-PA-Gelen mit den Produkten der Deadenylierungsreaktionen. Es wurden je 10 nM der radioaktiv markierten  $SRE^{WT}$ -A70-RNA mit 40 nM Smaug vorinkubiert, und die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 nM der unterschiedlichen  $Dm$ CCR4-NOT<sub>MINI</sub>-Varianten gestartet. Die jeweiligen Reaktionen wurden für 4 bis 64 Minuten inkubiert, und der Zeitpunkt 0 Minuten entspricht der direkten Probenentnahme vor Zugabe des CCR4-NOT-Komplexes. Rechts wurde ein Größenstandard in Nukleotiden aufgetragen, und die Laufhöhe von Substrat (A70) und Produkt (A0) sind links angegeben. Über den jeweiligen Spuren sind die entsprechenden Reaktionszeitpunkte und die Wildtyp/Mutanten-Kombinationen als Cartoon aufgeführt. Das rote Kreuz zeigt hier die mutierte Ribonuklease in  $Dm$ CCR4-NOT<sub>MINI</sub> an. **B:** Quantifizierung des vollständig deadenylierten Produkts aus der Smaug-abhängigen Deadenylierung mit den verschiedenen Varianten von  $Dm$ CCR4-NOT<sub>MINI</sub>. Das Autoradiogramm wurde densitometrisch mit dem Programm FiJi quantifiziert (Schindelin et al., 2012).

Dazu wurde die  $SRE^{WT}$ -RNA mit Smaug vorinkubiert, und dieselben Präparationen der Wildtyp/Mutanten-Kombinationen in  $Dm$ CCR4-NOT<sub>MINI</sub> wie in Abschnitt 2.2.2.5 wurden eingesetzt. Aus dem Experiment war zu entnehmen, dass Smaug die höchste Aktivität mit dem Doppelwildtyp zeigte (ca. 80 % vollständig deadenyliertes Produkt zum Endzeitpunkt), wohingegen beide Einzelmutanten jeweils eine über 50 % reduzierte Aktivität aufwiesen: für die Caf1-Mutante ca. 31 % zum Endzeitpunkt und für die CCR4-Mutante ca. 11 %. Die Doppelmutante zeigte kaum Aktivität (2 % zum Endzeitpunkt).

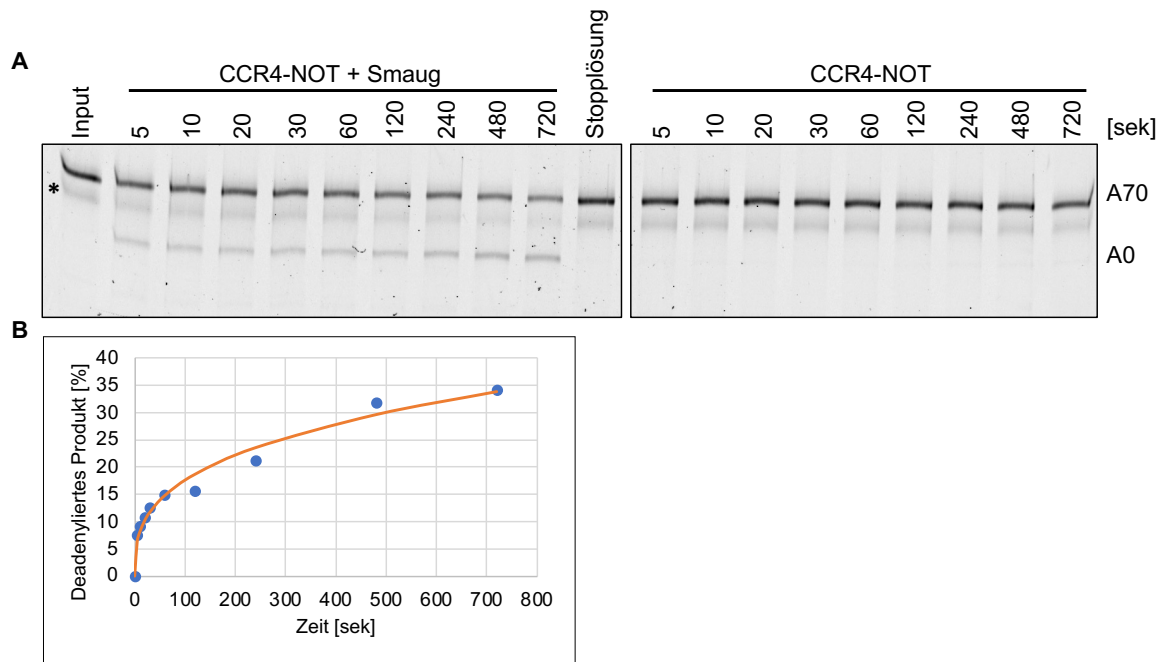


Die Ergebnisse hier weisen Parallelen zu dem analogen Experiment mit  $D^m$ CCR4-NOT<sub>MINI</sub> in Abwesenheit von Smaug (vgl. 2.2.2.5) auf. Bei beiden zeigte der Doppelwildtyp deutlich die höchste Aktivität, und die beiden Ribonukleasen CCR4 und Caf1 sind von der Aktivität der jeweils anderen abhängig, wobei in der Smaug-abhängigen Reaktion eine leichte höhere Aktivität mit dem CCR4-Wildtyp erreicht wurde. Außerdem kann hiermit auch bewiesen werden, dass Smaug den  $D^m$ CCR4-NOT-Komplex rekrutiert und nicht eine andere Nuklease, da mit der Doppelmutante keine Nukleaseaktivität auftritt.

### 2.2.3.5 Die Smaug-abhängigen Deadenylierung zeigt Prozessivität

In den vorherigen Experimenten zur Smaug-abhängigen Deadenylierung war bereits bei den frühesten Zeitpunkten das gleichzeitige Vorhandensein von nicht umgesetzter Substrat-RNA und vollständig deadenyliertem Produkt zu sehen, bei einem ca. 10-fachen Überschuss von Substrat zu CCR4-NOT (vgl. Abbildung 2.15). Weiterhin existierte nicht umgesetztes Substrat auch noch zu späteren Zeitpunkten, im Gegensatz zu dem, was man bei einer distributiven Reaktion erwarten würde. Dementsprechend liegt hier eindeutig kein distributiver Reaktionsmechanismus, sondern ein prozessiver vor. Dies bedeutet, dass der CCR4-NOT-Komplex spezifisch von Smaug zur SRE-haltigen RNA rekrutiert wird, dort verbleibt bis sämtliche Adenylate entfernt wurden, um erst dann vom nächsten Smaug-RNA-Komplex rekrutiert zu werden. Je nach Experiment spiegelt der Anteil vollständig deadenylierten Produkts in den ersten Zeitpunkten ungefähr das Verhältnis von CCR4-NOT zum Smaug-gebundenen RNA-Substrat wider, nämlich 10 %. Dies würde also einem prozessiven Deadenylierungsereignis entsprechen.

Da in sämtlichen vorherigen Smaug-abhängigen Experimenten zu jedem Zeitpunkt bereits vollständig deadenyliertes Produkt auftrat und dadurch nicht genau das initiale Deadenylierungsereignis mit den ersten entfernten Adenylaten bestimmt werden konnte, wurde im nachfolgenden eine Kinetik mit noch früheren Zeitpunkten durchgeführt (Abbildung 2.20). Dazu wurde außerdem eine RNA, die einem größeren Teil des natürlichen Translationskontrollelements (TCE) entspricht, verwendet, da die bisherige SRE<sup>WT</sup>-RNA nur aus den zwei essenziellen Smaug-bindenden *stem-loop* Strukturen und einer kurzen Linkerregion besteht (Jeske et al., 2006). Die SREs sind im TCE weiter voneinander und vom Poly(A)-Schwanz entfernt, sodass dies möglicherweise einen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Reaktion hat. Die TCE<sup>WT</sup>-RNA wurde mit Smaug vorinkubiert und danach die Reaktion mit  $D^m$ CCR4-NOT<sub>MINI</sub> gestartet bzw. es wurde parallel eine Reaktion ohne Smaug durchgeführt.



**Abbildung 2.20: Die Smaug-abhängige Deadenylierung zeigt Prozessivität.**

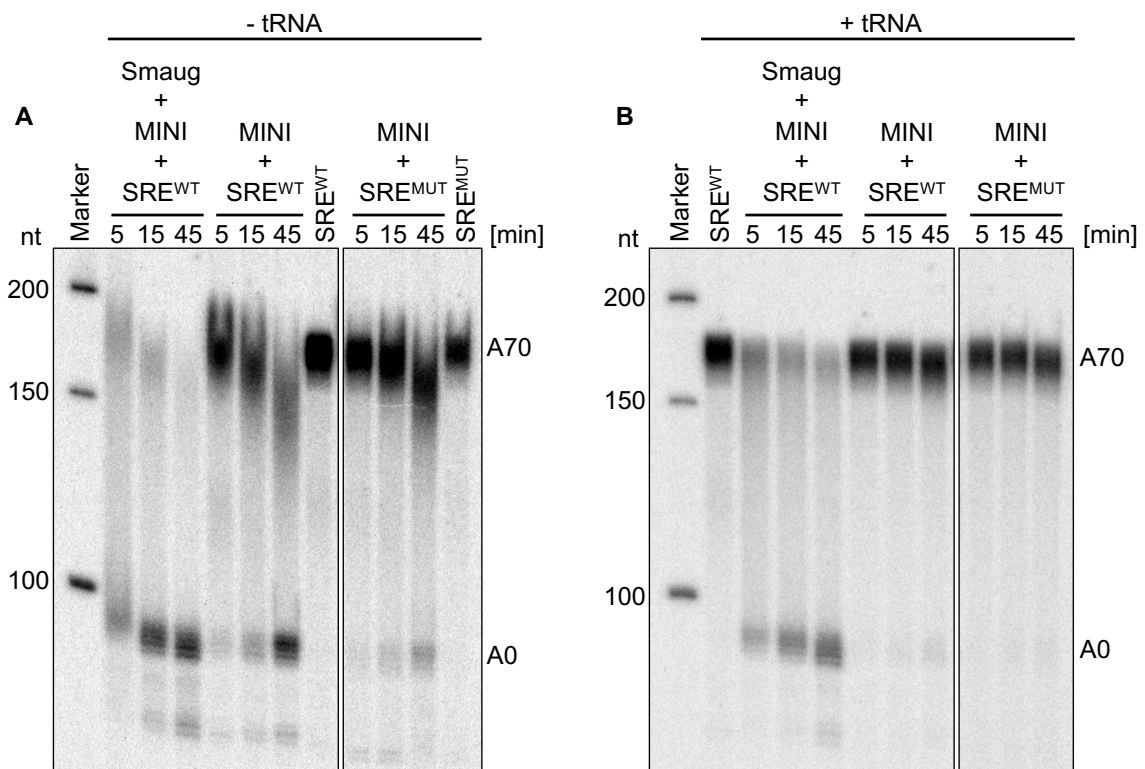
**A:** Fluoreszenzscan eines denaturierenden Harnstoff-PA-Gels mit den Produkten der Deadenylierungsreaktionen. Es wurden je 50 nM der FAM-TCE<sup>WT</sup>-A70-RNA mit 300 nM Smaug oder Deadenylierungspuffer vorinkubiert und die Deadenylierung wurde durch Zugabe von 5 nM <sup>Dm</sup>CCR4-NOT<sub>MINI</sub> gestartet. Die jeweiligen Reaktionen wurden für 5 bis 720 Sekunden inkubiert. Der Input enthält die jeweils aufgetragene Menge an Substrat-RNA im Deadenylierungspuffer, und bei der Probe „Stopplösung“ wurde der Smaug-RNA-Komplex direkt mit CCR4-NOT in die Stopplösung gegeben. Rechts wurde die Laufhöhe von Substrat (A70) und Produkt (A0) angegeben, und der Stern gibt ein Nebenprodukt der Transkriptionsreaktion an, welches nicht beseitigt werden konnte. Über den jeweiligen Spuren sind die entsprechenden Reaktionszeitpunkte und die Proteinkombinationen aufgeführt. **B:** Quantifizierung des vollständig deadenylierten Produkts aus der Smaug-abhängigen Deadenylierung. Der Fluoreszenzscan wurde densitometrisch mit dem Programm FiJi quantifiziert (Schindelin et al., 2012).

Für die Smaug-abhängige Reaktion konnte bereits zum ersten Zeitpunkt, nach fünf Sekunden, vollständig deadenyliertes Produkt beobachtet werden (ca. 6 %) und keine Intermediate. Die nur CCR4-NOT beinhaltende Reaktion zeigte keinerlei Aktivität, wie bereits zuvor für die längeren RNA-Konstrukte beobachtet. Zusätzlich wurde die Smaug-beinhaltende Reaktion direkt nach der Vorinkubation in die Stopplösung gegeben und nachfolgend CCR4-NOT hinzugegeben, um das vollständige Abstoppen der Reaktion durch die Stopplösung zu validieren. Für diese Reaktion war keine Produktbildung zu sehen, sodass die Stopplösung wirksam war und die Produktbildung in den frühen Zeitpunkten nicht durch eine Weiterreaktion in der Stopplösung zu erklären war.

Auch aus diesem Versuch konnte kein Rückschluss über den ersten Zeitpunkt der Smaug-abhängigen Deadenylierung getroffen werden. Daraufhin wurde versucht mittels Quenched-Flow-Methode eine Kinetik im Millisekunden-Bereich durchzuführen. Dabei kam es aber

zu einem wiederholten Abbau und Verlust der Substrat-RNA. Zudem mussten hohe Proteinmengen eingesetzt werden, was mehrere Versuche aus praktikablen Gründen nicht zuließ.

Da der <sup>Dm</sup>CCR4-NOT-Komplex mit der längeren SRE-haltigen RNA kaum Deadenylierungsaktivität gezeigt hat, kann hier kein sicherer Rückschluss über seinen Reaktionsmechanismus im Hinblick auf Distributivität oder Prozessivität im Vergleich zur Smaug-abhängigen Reaktion getroffen werden. Dementsprechend wurden die Reaktionsbedingungen variiert, um die Aktivität des CCR4-NOT-Komplexes zu erhöhen, und die Reaktionsprodukte wurden durch Gele mit höherer Auflösung getrennt, sodass auch kleinere Unterschiede sichtbar wurden. So wurde das Verhältnis von CCR4-NOT-Komplexes zu Substrat-RNA auf 1:4 erhöht (vorher 1:10), und die Hefe-tRNA wurde aus der Mischung entfernt, da sie neben der Substrat-RNA die einzige andere RNA in der Reaktion ist (Abbildung 2.21).



**Abbildung 2.21: Die basale Aktivität des <sup>Dm</sup>CCR4-NOT<sub>MINI</sub>-Komplexes wird durch tRNA inhibiert.**

**A und B:** Autoradiogramme von denaturierenden Harnstoff-PA-Gele mit den Produkten der Deadenylierungsreaktionen. Es wurden 20 nM der radioaktiv markierten SRE<sup>WT</sup>-A70-RNA mit 80 nM Smaug oder die SRE<sup>WT</sup>- und SRE<sup>MUT</sup>-A70-RNA mit Deadenylierungspuffer vorinkubiert, und die Deadenylierungsreaktionen wurden durch Zugabe von 5 nM <sup>Dm</sup>CCR4-NOT<sub>MINI</sub> initiiert. Bei **A** enthielten die Reaktionen keine Hefe-tRNA und bei **B** war diese enthalten (ca. 250 ng/μL). Die jeweiligen Reaktionen wurden für 5 bis 45 Minuten inkubiert. SRE<sup>WT</sup> bzw. SRE<sup>MUT</sup> entspricht hier der eingesetzten Menge an Substrat-RNA im Deadenylierungspuffer. Links wurde ein Größenstandard in Nukleotiden aufgetragen, und die Laufhöhe von Substrat (A70) und Produkt (A0) sind rechts aufgeführt. Über den jeweiligen Spuren sind die entsprechenden Reaktionszeitpunkte und Protein-RNA-Kombinationen aufgeführt.

Hier zeigte die Smaug-enthaltende Reaktion ohne tRNA (Abbildung 2.21.A) ein hohes Aufkommen von Intermediaten zwischen der nicht umgesetzten Substrat-RNA und dem vollständig deadenylierten Produkt. Weiterhin lag die Substrat-RNA nicht als eine definierte Bande vor, sondern verlief in einem diffusen Bereich, sodass auch hier Deadenylierungsaktivität auftrat. Für die frühen Zeitpunkte war auch vollständig deadenyliertes Produkt zu sehen. Im Gegensatz dazu zeigte die Reaktion mit tRNA (Abbildung 2.21.B), wie gewohnt, für alle Zeitpunkte nicht umgesetzte Substrat-RNA und gleichzeitig auftretendes vollständig deadenyliertes Produkt. Wird nun die nur  $DmCCR4-NOT_{MINI}$  enthaltende Reaktion ohne tRNA betrachtet, so war für die  $SRE^{WT}$ -RNA zum einen die recht starke graduelle Deadenylierung der RNA über die Zeit zu sehen, mit ca. 20-30 entfernten Adenylaten nach 45 Minuten, zum anderen das Auftreten von vollständig deadenyliertem Produkt bereits nach fünf Minuten. Ein ähnliches, wenn auch schwächer ausgeprägtes, Muster der Deadenylierung war für die  $SRE^{MUT}$ -RNA zu sehen. Hingegen zeigte die Reaktion mit tRNA eine deutliche Reduktion der Deadenylierungsaktivität für beide Substrat-RNAs. Hier war nur nach 45 Minuten eine schwache graduelle und vollständige Deadenylierung zu sehen.

Diesem Experiment ist zu entnehmen, dass die basale Deadenylierungsaktivität des  $DmCCR4-NOT$ -Komplexes in der Tat durch die Hefe-tRNA beeinträchtigt wird. Die Reaktionen ohne tRNA zeigen distributives Verhalten, mit einer ähnlichen Deadenylierungsaktivität zur kurzen FAM-7mer-RNA (vgl. 2.2.2.3). Auch hier wurden im Mittel 20 Adenylate nach 45 Minuten entfernt. In den Reaktionen mit der FAM-7mer-RNA wurde ebenfalls keine tRNA zugegeben, da nur die basale Aktivität der Deadenylase ohne potenziell kompetierende RNA-Moleküle untersucht werden sollte. Für die Reaktionen mit RBPs wie Smaug wurde initial tRNA zugegeben, um die Spezifität der Rekrutierung des CCR4-NOT-Komplexes hervorzuheben. Außerdem wurde in den ursprünglichen Experimenten mit DEE auch Hefe-tRNA eingesetzt (Jeske et al., 2006).

Neben dem distributiven Verhalten trat in den Reaktionen ohne tRNA scheinbar auch prozessives Verhalten auf, da bereits zum ersten Zeitpunkt vollständig deadenyliertes Produkt neben nicht umgesetztem Substrat vorlag (Abbildung 2.21). Die Prozessivität ist ausgeprägter für die  $SRE^{WT}$ -RNA, sodass möglicherweise aus den Sf21-Insektenzellen ein SRE-spezifisches Protein mitgereinigt wurde. Diese scheinbare Prozessivität kann möglicherweise auch durch eine bevorzugte Bindung einer bestimmten RNA-Faltung bedingt sein. Außerdem kann die Akkumulation von vollständig deadenyliertem Produkt zu späteren Zeitpunkten auch durch die distributive Deadenylierung erklärt sein, da für einen kleinen Teil des Substrats theoretisch auch schnellere Assoziations-/Dissoziationsereignisse mit dem

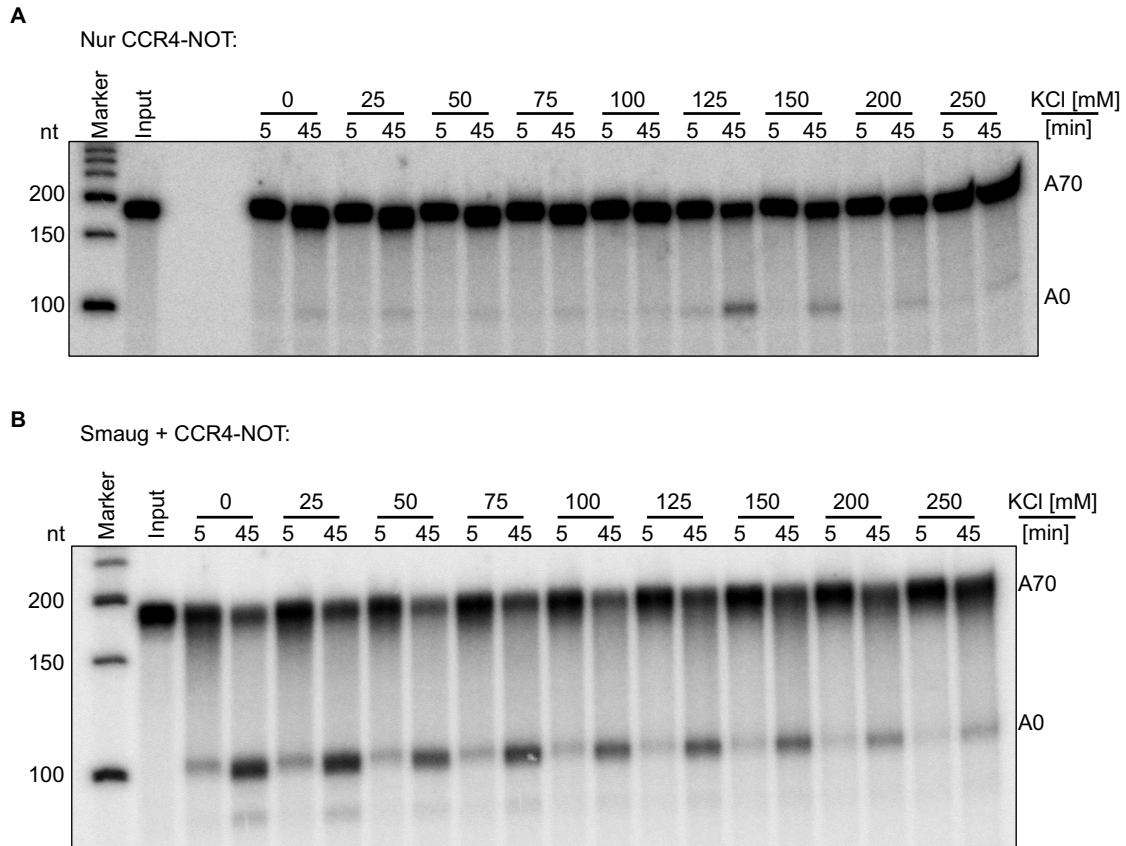
CCR4-NOT-Komplex auftreten können. Da das daraus resultierende vollständig deadenylierte Produkt nicht weiter im Gel migrieren kann, erscheint das akkumulierte Signal für fortgeschrittenere Reaktionszeitpunkte stärker im Vergleich zum „Schmier“ auf Höhe des Substrats.

Für die Reaktion mit Smaug und ohne tRNA zeigte sich ein ähnliches Muster der Deadenylierung wie bei den nur CCR4-NOT beinhaltenden Reaktion, jedoch mit einer stärker ausgeprägten Prozessivität. Die Smaug-abhängigen Reaktionen unter Zugabe von tRNA zeigten wie bisher eine deutliche Prozessivität, da zu sämtlichen Zeitpunkten noch unangetastetes Substrat neben vollständig deadenyliertem Produkt vorlag (Abbildung 2.21.B). Außerdem konnte hier mit der erhöhten CCR4-NOT-Konzentration auch eine schwache graduelle Deadenylierung beobachtet werden (vgl. 5 und 45 Minuten). Dementsprechend wurde die Zugabe von tRNA für die Gewährleistung der Smaug-abhängigen SRE-Spezifität beibehalten, da auch im *in vivo* System zahlreiche andere kompetierende RNA-Moleküle enthalten sind.

Neben der Zugabe von Hefe-tRNA wurde auch die Salzkonzentration variiert, da diese einen starken Einfluss auf die Deadenylierungsaktivität des <sup>Dm</sup>CCR4-NOT-Komplexes hat (vgl. Abschnitt 2.2.2.2). Hierfür wurde KCl als Salz verwendet, da dieses stärker dissoziiert vorliegt als KAc. Die Menge an Salz wurde für die Reaktion mit und ohne Smaug titriert, unter Zugabe von Hefe-tRNA, und die Deadenylierung wurde nach einem frühen (5 min) und späten (45 min) Zeitpunkt betrachtet (Abbildung 2.22). Durch die Zugabe von Smaug wurden ca. 25 mM NaCl und durch CCR4-NOT ca. 10 mM KAc der Reaktion zugeführt.

Für die Reaktion ohne zusätzliches Salz und nur mit CCR4-NOT war nach 45 Minuten eine hauptsächlich graduelle Deadenylierung (ca. 10-15 entfernte Adenylate) auf der Höhe der Substrat-Bande und wenig vollständig deadenyliertes Produkt zu sehen. Die graduelle Deadenylierungsaktivität nahm mit steigender Salzkonzentration ab und war mit ca. 125 mM KCl vollständig inhibiert, vergleichbar mit der kurzen FAM-7mer-RNA (vgl. Abbildung 2.8). Dahingegen war die vollständige Deadenylierung nicht negativ beeinflusst durch die hier eingesetzten Salzkonzentrationen, sondern zeigte ein Maximum bei 125 mM KCl. Daneben wies die Reaktion mit Smaug bei sämtlichen Salzkonzentrationen einen „Schmier“ vom nicht umgesetzten Substrat zum vollständig deadenylierten Produkt auf, welches zu beiden Zeitpunkten deutlich angereichert vorlag. Das Maximum an Deadenylierung trat hier bei keinerlei zusätzlichem Salz auf. Außerdem nahm die vollständige Deadenylierung mit steigender Salzkonzentration ab. Die Salztitration wurde für die Smaug-abhängige Reaktion mit KAc wiederholt, da dieses hauptsächlich in den vorherigen

Experimenten und auch zuvor mit dem *Drosophila*-Embryoextrakt verwendet wurde. Hier ergab sich kein Unterschied zur Titration mit KCl (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 2.22: Distributivität und Prozessivität bei verschiedenen Salzkonzentrationen.**

**A und B:** Autoradiogramme von denaturierenden Harnstoff-PA-Gelen mit den Reaktionsprodukten der Deadenylierungsreaktionen. Es wurden 20 nM der radioaktiv markierten SRE<sup>WT</sup>-A70-RNA mit Deadenylierungspuffer (**A**) oder 80 nM Smaug (**B**) vorinkubiert und die Deadenylierung wurde durch Zugabe von 5 nM D<sup>m</sup>CCR4-NOT<sub>MINI</sub> initiiert. Sowohl bei **A** als auch **B** wurde die Konzentration an KCl im Reaktionspuffer von 0 bis 250 mM titriert. Die jeweiligen Reaktionen wurden für 5 bis 45 Minuten inkubiert und der Input entspricht hier der eingesetzten Menge an Substrat-RNA im Deadenylierungspuffer. Links wurde ein Größenstandard in Nukleotiden aufgetragen und die Laufhöhe von Substrat (A70) und Produkt (A0) sind rechts aufgeführt. Über den jeweiligen Spuren sind die entsprechenden Reaktionszeitpunkte und Salzkonzentration aufgeführt.

So konnte auch hier unter Anwesenheit von Hefe-tRNA gezeigt werden, dass unter Bedingungen bei denen der D<sup>m</sup>CCR4-NOT hauptsächlich distributiv agiert (kein zusätzliches Salz), er durch Zugabe von Smaug einen Wechsel zu einem prozessiven Reaktionsmechanismus vollführt, unter dem Vorbehalt, dass der früheste Reaktionszeitpunkt bei 5 Minuten lag und nur ein 4-facher Überschuss von Substrat zu Enzym eingesetzt wurde.

Die Steigerung der vollständigen Deadenylierung für die Reaktion ohne Smaug durch KCl-Konzentration über 125 mM war überraschend, da mit der kurzen FAM-7mer-RNA zumindest eine deutliche Reduktion der graduellen Deadenylierung beobachtet wurde (vgl. Abbildung 2.8).

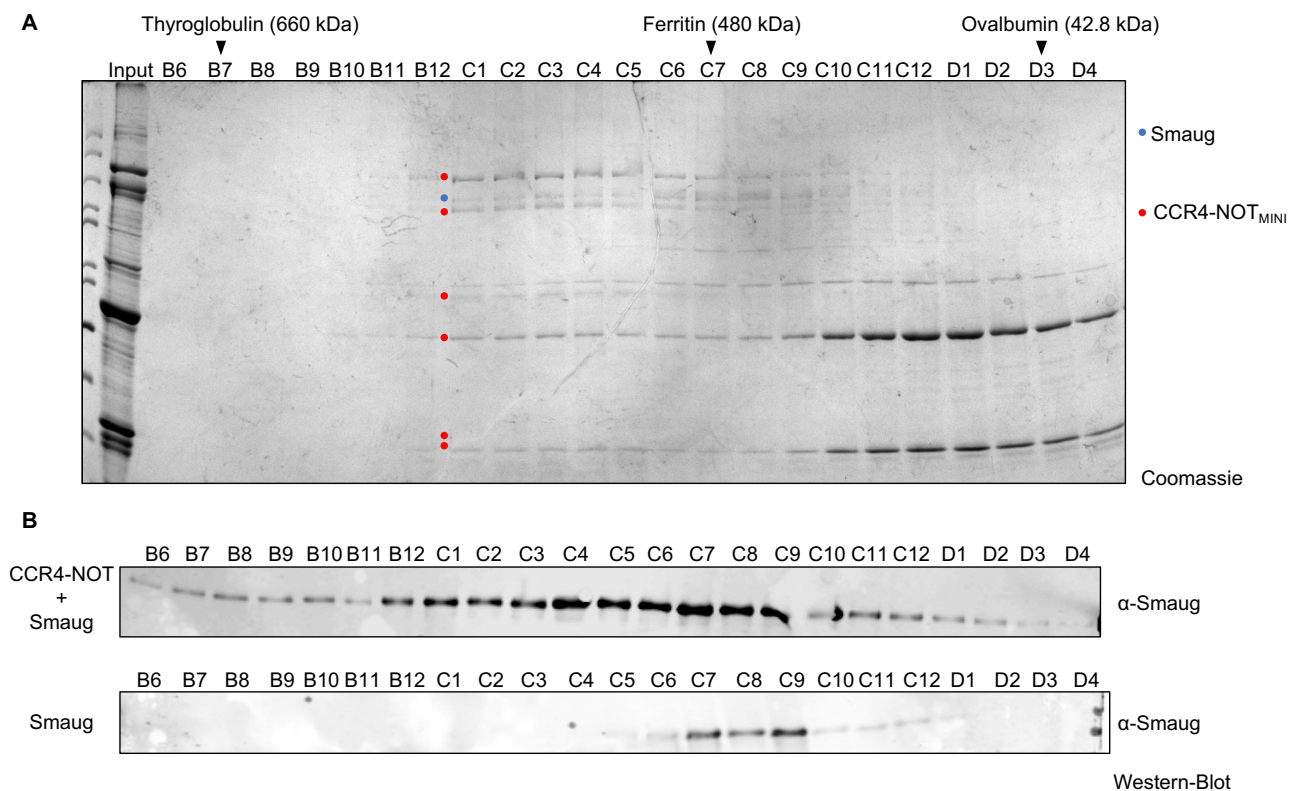
Möglicherweise wird durch das Salz die Affinität zur RNA erhöht oder ein kontaminierendes SRE-spezifisches Protein wird stabilisiert und rekrutiert den CCR4-NOT-Komplex zur mRNA.

Generell wurden bislang wenige Studien zur Distributivität und Prozessivität durchgeführt, da die rekonstituierten CCR4-NOT-Komplexe noch relativ neu sind und die Experimente fast immer unter nahezu äquimolaren Enzym-Substrat-Konzentrationen durchgeführt wurden (Raisch et al., 2019; Stowell et al., 2016). In Studien zu gezielter Deadenylierung durch RBPs konnte bislang nur für die *S. pombe*-Orthologe von Pumilio (Puf3) und TTP (Zfs1) das gleichzeitige Auftreten von nicht umgesetztter Substrat-RNA und vollständig deadenyliertem Produkt für die ersten Sekunden der Deadenylierung gezeigt werden, jedoch war hier nur ein 2-facher Überschuss von Substrat zu Enzym eingesetzt worden (Webster et al., 2019). Für beide Proteine ist unter diesen Bedingungen eine sehr schnelle vollständige Deadenylierung einer A30-enhaltenden RNA (nach ca. 2 bis 4 Minuten) zu beobachten, was sehr wahrscheinlich auch für die Smaug-abhängige Deadenylierung unter ähnlichen Bedingungen gelten würde.

Inwiefern diese rekonstituierten Deadenylierungsreaktionen die physiologischen Bedingungen *in vivo* widerspiegeln, ist noch zu untersuchen. Für *Drosophila*-Embryonen liegen hier keine physiologischen Daten zum Vergleich vor. Lediglich die initialen Experimente mit *Drosophila* Embryoextrakten, welcher noch am ehesten dem *in vivo* System nahekommt, enthielten um die 50 mM KAc und zeigten auch das gleichzeitige Auftreten von vollständig deadenyliertem Produkt und nicht umgesetzttem Substrat zu frühen Zeitpunkten in der SRE-spezifischen Reaktion, wohingegen die Deadenylierung der SRE<sup>MUT</sup>-RNA vergleichbar mit der rekonstituierten Reaktion sehr schwach war (Jeske et al., 2006).

### 2.2.3.6 Physische Interaktion zwischen Smaug und $DmCCR4-NOT_{MINI}$

Alle bisherigen Experimente in der Smaug-abhängigen Deadenylierung legen eine physische Interaktion zwischen Smaug und  $DmCCR4-NOT$  nahe. Um dies zu testen, wurde Smaug mit dem  $DmCCR4-NOT_{MINI}$ -Komplex inkubiert, und nachfolgend wurden die gebildeten Proteinkomplexe mittels Größenausschlusschromatographie aufgetrennt (Abbildung 2.23). Als Kontrolle diente eine Reaktion, bei der Smaug allein unter denselben Bedingungen inkubiert wurde. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels Coomassie-gefärbtem SDS-Gel (Abbildung 2.23.A) und Fluoreszenz-Western-Blot (Abbildung 2.23.B) analysiert.



**Abbildung 2.23: Smaug interagiert mit dem  $DmCCR4-NOT_{MINI}$ -Komplex.**

Smaug (15  $\mu$ g in 50  $\mu$ L) wurde entweder mit  $DmCCR4-NOT_{MINI}$  (15  $\mu$ g in 20  $\mu$ L) oder Proteinpuffer (20  $\mu$ L) für eine Stunde bei 8 °C inkubiert, und 50  $\mu$ L der Proteinmischungen wurden über eine Größenausschlusschromatographie (Superose 6 3.2; 2,4 mL Säulenvolumen) aufgetrennt. **A:** Coomassie-gefärbtes 12 % SDS-PAGE-Gel der Proteinfractionen der Mischung aus Smaug und  $DmCCR4-NOT_{MINI}$  nach Größenausschlusschromatographie. Der Input entspricht hier 10 % der auf die Chromatographiesäule gegebenen Mischung aus Smaug und  $DmCCR4-NOT_{MINI}$ . Über den Spuren sind die jeweiligen Fraktionen der Chromatographie angegeben und die Hauptpeaks eines Säulenlaufs mit Größenstandards (Thyroglobulin, Ferritin, Ovalbumin). Die Position von Smaug wurde durch einen blauen Punkt kenntlich gemacht und die Position der CCR4-NOT-Komponenten mit einem roten Punkt. **B:** Fluoreszenz-Western-Blot mit den Fraktionen der Chromatographie für die Mischung oder nur Smaug. Bei beiden Western-Blots wurde ein Antikörper gegen Smaug eingesetzt und detektiert.



Für die Probe nur mit Smaug war ein schwaches Signal in den Fraktionen C5-D1 im Western-Blot zu sehen, mit dem stärksten Signal bei C7-C9. Dahingegen zeigte die Reaktion mit Smaug und  $DmCCR4-NOT_{MINI}$  eine Verschiebung von Smaug zu früheren Fraktionen sowohl im Western-Blot als auch im Coomassie-gefärbten Gel. Hier war bereits in Fraktion B6 mittels Western-Blot Smaug zu detektieren, welches bis Fraktion D4 enthalten war und ein Maximum von C4-C10 aufweist. Insgesamt war hier die Signalintensität für Smaug deutlich höher als in der nur Smaug enthaltenden Reaktion, da Smaug am Säulenmaterial haften blieb. Im Coomassie-gefärbten Gel war auch zu sehen, dass Smaug ab Fraktion C1 mit den CCR4-NOT enthaltenden Fraktionen komigriert.

Hiermit konnte gezeigt werden, dass durch die Inkubation von Smaug mit  $DmCCR4-NOT_{MINI}$  ein Proteinkomplex gebildet wird, der im Vergleich zum einzelnen Smaug ein anderes Laufverhalten in der Größenaufschlusschromatographie zeigte. Weiterhin wurde hier auch eine leichte Verschiebung der  $DmCCR4-NOT_{MINI}$  enthaltenden Fraktionen zu früheren Fraktionen beobachtet (vgl. Abbildung 2.6), was durch eine Bindung von Smaug (mit 110 kDa) zu erklären wäre. Zudem wurde die Wiedergewinnung von Smaug von der hier verwendeten Säule deutlich erhöht, sodass Smaug in diesem Proteinkomplex anscheinend das Reinigungsverhalten vom  $DmCCR4-NOT_{MINI}$  annimmt.

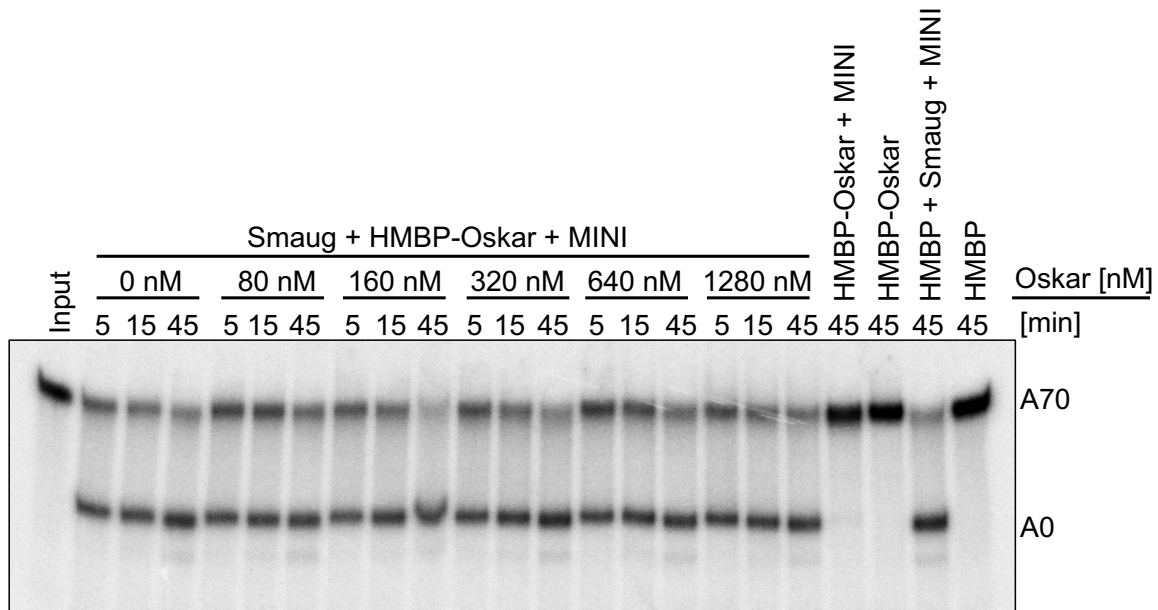
Eine tiefere Untersuchung, welche Bereiche von Smaug für die physische Bindung des  $DmCCR4-NOT$ -Komplexes notwendig sind, wurde zu diesem Zeitpunkt unterbrochen, da dies von der Arbeitsgruppe um Dr. Mandy Jeske (Uni Heidelberg) übernommen wurde. Hier kann lediglich vermutet werden, dass die intrinsisch ungeordneten Bereiche eine wichtige Rolle in der Interaktion einnehmen, da dies bereits für die *Drosophila*-Proteine Nanos und Roquin sowie die *S. pombe*-Proteine Puf3 und Zfs1 in der CCR4-NOT-Interaktion gezeigt werden konnte (Raisch et al., 2016; Sgromo et al., 2017; Webster et al., 2019).

### 2.2.3.7 Aufhebung der Smaug-abhängigen Deadenylierung durch Oskar

Aus Studien zur Translationsrepression der *nanos*-mRNA in *Drosophila*-Embryoextrakten ist bekannt, dass das Protein Oskar die Repression am posterioren Pol des Embryos aufhebt und damit zur Ausbildung des Nanos-Proteingradienten beiträgt (Jeske et al., 2011). Der genaue Mechanismus dieser Aufhebung ist nicht bekannt. Da Smaug sowohl für die Translationsrepression als auch Deadenylierung ein essenzieller Faktor ist, sollte dies ein entscheidender Ansatzpunkt für die Aktivität von Oskar sein. Deshalb wurde im nachfolgenden der Einfluss von Oskar auf die rekonstituierte Smaug-abhängige Deadenylierung untersucht.

Dazu wurden His<sub>8</sub>-MBP-Oskar (HMBP-Oskar) und, als negative Kontrolle, His<sub>8</sub>-MBP (HMBP) von der Arbeitsgruppe um Dr. Mandy Jeske (Jana Kubikova) bereitgestellt.

Zuerst wurde untersucht, ob die Zugabe von Oskar zu einem Smaug-SRE<sup>WT</sup>-RNA-Komplex die Interaktion mit D<sup>m</sup>CCR4-NOT<sub>MINI</sub> unterbindet oder den Smaug-RNA-Komplex destabilisiert (Abbildung 2.24). Dazu wurde der vorgebildete Smaug-RNA-Komplex vor Zugabe des CCR4-NOT-Komplexes noch mit Oskar inkubiert.



**Abbildung 2.24: Oskar inhibiert nicht die Interaktion von CCR4-NOT mit dem Smaug-RNA-Komplex.** Autoradiogramm eines denaturierenden Harnstoff-PA-Gels mit den Produkten der Deadenylierungsreaktionen. Es wurden 20 nM radioaktiv markierte SRE<sup>WT</sup>-A70-RNA mit 80 nM Smaug oder Deadenylierungspuffer für 30 Minuten vorinkubiert und nachfolgend unterschiedliche Konzentrationen an HMBP-Oskar (0 bis 1280 nM) oder HMBP (1280 nM) zu den entsprechenden Reaktionen für weitere 30 Minuten gegeben. Die Deadenylierung wurde durch Zugabe von 2 nM D<sup>m</sup>CCR4-NOT<sub>MINI</sub> gestartet und für 5 bis 45 Minuten ausgeführt. Rechts sind die Laufhöhen des Substrats (A70) und des Produkts (A0) angegeben. Über den Spuren sind die Reaktionszeit, die Konzentration an Oskar und die entsprechende Proteinkombinationen aufgeführt. Der Input enthält die jeweils aufgetragene Menge an Substrat-RNA im Deadenylierungspuffer.

In dem Experiment war zu sehen, dass sämtliche Reaktionen mit Smaug und D<sup>m</sup>CCR4-NOT<sub>MINI</sub> bereits nach 5 Minuten vollständig deadenyliertes Produkt zeigten. Die Zugabe von Oskar oder MBP führte hier zu keiner Veränderung. Ebenfalls war in der Kombination von Oskar mit dem CCR4-NOT-Komplex eine leichte Deadenylierungsaktivität zu sehen, die ohne CCR4-NOT komplett verschwand.

Demnach konnte hier gezeigt werden, dass Oskar die Interaktion vom Smaug-RNA-Komplex mit dem CCR4-NOT-Komplex nicht inhibiert und ebenfalls die Stabilität des Smaug-SRE<sup>WT</sup>-RNA-Komplexes nicht beeinflusst.



Die Kontrollreaktion mit Oskar und CCR4-NOT zeigte erneut eine schwache Deadenylierungsaktivität und die Zugabe von MBP zu Smaug führte zu keiner Inhibition.

Dieses Experiment und das vorherige (vgl. Abbildung 2.24) zeigen, dass Oskar die Smaug-abhängige Deadenylierung inhibieren kann, indem es wahrscheinlich die Bindung der SRE<sup>WT</sup>-RNA durch Smaug blockiert. Dementsprechend ist anzunehmen, dass Oskar mit der SAM-Domäne von Smaug, welche für die SRE-spezifische RNA-Bindung notwendig ist, interagiert und dadurch die Smaug-RNA-Assoziation blockiert. Diese spezifische Interaktion mit der SAM-Domäne konnte tatsächlich bereits im Hefe-Zwei-Hybrid-System und in *pulldown*-Experimenten mit *In-Vitro*-translatierten Smaug-Fragmenten und Oskar bestätigt werden (Dahanukar et al., 1999). Die Funktion Oskars in der Blockierung des ersten Schritts der Bildung des *nanos*-Repressorkomplexes erscheint sinnvoll, da der einmal geformte Repressorkomplex sehr stabil ist (Götze et al., 2017; Jeske et al., 2011), was vermutlich schon durch die Bindung von Smaug an die SRE-haltige RNA erreicht wird (vgl. Abbildung 2.24). Aus entwicklungsbiologischer Sicht scheint dies auch schlüssig, denn Oskar wird während der Oogenese spezifisch am posterioren Pol der Oocyte translatiert und verankert (Vanzo & Ephrussi, 2002), wohingegen Smaug erst in der darauffolgenden frühen Phase der Embryogenese translatiert wird (Cao et al., 2020; Dahanukar et al., 1999). Dementsprechend befindet sich Oskar bereits am posterioren Pol, bevor Smaug überhaupt translatiert wurde und kann somit dort dessen Assoziation mit der *nanos*-mRNA unterbinden. Zur weiteren Bestätigung dieser Annahme sollten z.B. RNA-Bindungsstudien von Smaug mit kompetierenden Mengen Oskar durchgeführt werden.

## 2.2.4 Die Funktion weiterer Repressorproteine in der Deadenylierung der *nanos*-mRNA

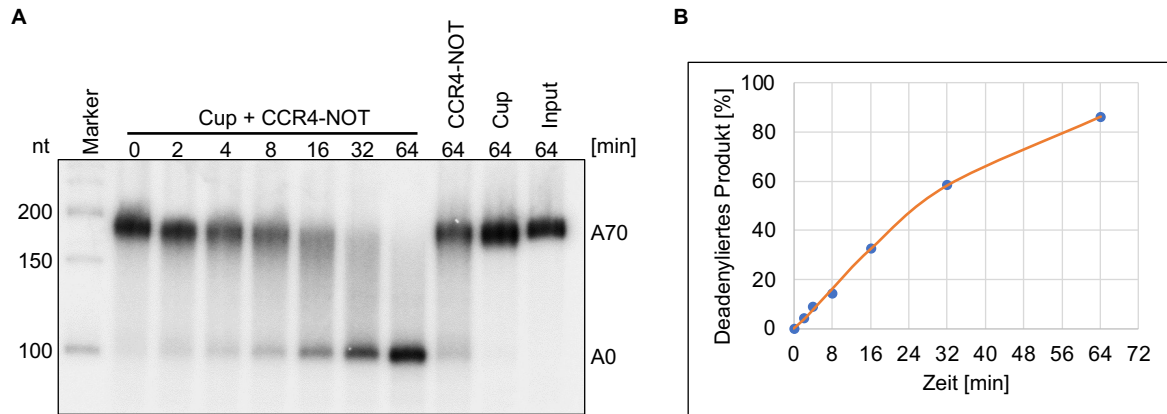
Durch Smaug werden auch weitere Repressorproteine zur *nanos*-mRNA rekrutiert, für die unter anderem eine Interaktion mit dem CCR4-NOT-Komplex impliziert ist. So wurde für Cup gezeigt, dass in *tethering*-Experimenten in S2-Insektenzellen die RNA durch gebundenes Cup deadenyliert wird (Igreja & Izaurralde, 2011). Für rekombinantes humanes PABPC wurde ebenfalls eine Stimulierung der Deadenylierung beobachtet (Yi et al., 2018), und für das humane Me31B-Ortholog DDX6 wurde eine Interaktion mit NOT1 gezeigt, welche in der miRNA-induzierten Translationsrepression von Bedeutung ist (Mathys et al., 2014; Ozgur et al., 2015).

Dementsprechend stellt sich hier die Frage, ob diese Repressorproteine neben Smaug ebenfalls eine Funktion in der Deadenylierung einnehmen und falls ja, inwiefern dies die Smaug-abhängige Deadenylierung beeinflusst.

### 2.2.4.1 Cup in der Deadenylierung

Wie bereits erwähnt, konnte durch *tethering*-Experimente in S2-Zellen gezeigt werden, dass Cup die Deadenylierung stimuliert (Igreja & Izaurralde, 2011). Ob dies ein primärer Effekt ist oder doch nur ein sekundärer z.B. durch die Interaktion mit anderen Partnern des CCR4-NOT-Komplexes, konnte durch dieses Experiment nicht beantwortet werden. Daher wurde das aufgereinigte Cup in dem rekonstituierten Deadenylierungssystem mit dem <sup>Dm</sup>CCR4-NOT-Komplex getestet. Dazu wurde Cup mit der SRE<sup>MUT</sup>-RNA vorinkubiert, um einen SRE-spezifischen Effekt durch eine mitgereinigte Proteinkontamination auszuschließen (Abbildung 2.26). Die Deadenylierung wurde durch Zugabe von <sup>Dm</sup>CCR4-NOT<sub>MINI</sub> gestartet, und es wurde eine Kinetik aufgenommen.

Für die Reaktion mit Cup und <sup>Dm</sup>CCR4-NOT<sub>MINI</sub> trat bereits nach 2 Minuten vollständig deadenyliertes Produkt auf, und zum Endzeitpunkt (64 Minuten) ist die Substrat-RNA nahezu vollständig deadenyliert. Dahingegen wies die Reaktion nur mit CCR4-NOT nach 64 Minuten eine deutlich weniger fortgeschrittene Deadenylierung auf. Weiterhin zeigte die Reaktion mit Cup und CCR4-NOT nach 4 Minuten auch vermehrt eine graduelle Deadenylierung. Die Reaktion nur mit Cup zeigte keine Aktivität, sodass hier keine kontaminierende Nuklease vorlag.



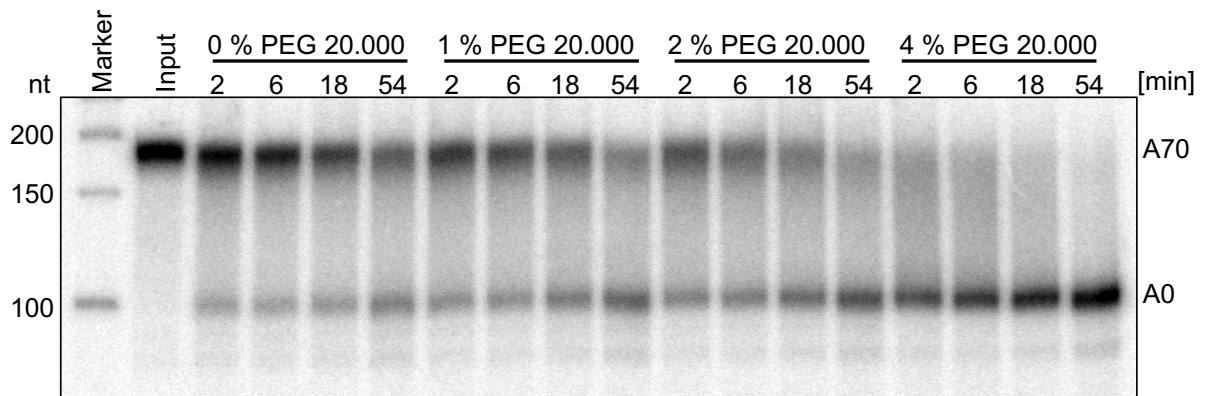
**Abbildung 2.26: Cup stimuliert die Deadenylierungseffizienz des  $D^m$ CCR4-NOT<sub>MINI</sub>-Komplexes.**

**A:** Autoradiogramm eines denaturierenden Harnstoff-PA-Gels mit den Produkten der Deadenylierungsreaktionen. Es wurden 20 nM radioaktiv markierte SRE<sup>MUT</sup>-A70-RNA mit 80 nM Cup oder Deadenylierungspuffer vorinkubiert, und die Deadenylierung wurde durch Zugabe von 2 nM  $D^m$ CCR4-NOT<sub>MINI</sub> gestartet. Die Deadenylierung wurde hier für 2 bis 64 Minuten durchgeführt. Links ist ein Größenstandard in Nukleotiden angegeben und rechts die Laufhöhe des Substrats (A70) und des Produkts (A0). Über den Spuren sind die Reaktionszeit und die entsprechende Proteinkombination aufgeführt. Der Input enthält die jeweils aufgetragene Menge an Substrat-RNA im Deadenylierungspuffer. **B:** Quantifizierung des vollständig deadenylierten Produkts aus der Kinetik mit Cup und CCR4-NOT. Das Autoradiogramm wurde densitometrisch mit dem Programm FiJi quantifiziert (Schindelin et al., 2012).

Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass das aufgereinigte Cup die Deadenylierungsaktivität des  $D^m$ CCR4-NOT<sub>MINI</sub>-Komplexes stimuliert. Weiterhin scheint unter diesen Bedingungen eine partielle Distributivität neben der Prozessivität der Reaktion vorzuliegen, da nach vier Minuten auch eine langsamere graduelle Deadenylierung des Substrats neben der rapiden vollständigen Deadenylierung zu beobachten war. Möglicherweise liegt hier für einen Teil der Cup-RNA-Komplexe eine stabilere Interaktion mit dem CCR4-NOT-Komplex vor, sodass diese Substrate schneller vollständig deadenyliert werden. Die Cup-RNA-Komplexe, zu denen eine weniger stabile Interaktion mit CCR4-NOT besteht, werden distributiv deadenyliert. Generell wurde in den folgenden Experimenten meist das gleichzeitige Auftreten von nicht umgesetztem Substrat zu vollständig deadenyliertem Produkt für jegliche Reaktionszeitpunkte beobachtet. Daher könnte das hier beobachtete Reaktionsmuster möglicherweise durch ein fehlgefaltetes Cup begründet werden. Weiterhin legt dieses Experiment den Schluss nahe, dass Cup direkt an die Substrat-RNA bindet und dadurch den CCR4-NOT rekrutiert. Durch UV-Crosslinking und mittels EMSA (vgl. Anhang: Abbildung 9.4 und Abbildung 9.5) konnte die RNA-Bindung durch Cup belegt werden. Dies stimmt auch mit den Studien zum RNA-gebundenen Proteom in *D. melanogaster*, in denen Cup als RNA-Interaktionspartner identifiziert wurde, überein (Sysoev et al., 2016; Wessels et al., 2016).

#### 2.2.4.2 Die durch Cup stimulierte Deadenylierung ist ebenfalls PEG-abhängig

Da die Smaug-abhängige Deadenylierung PEG-abhängig ist, wurde auch für Cup der Einfluss von PEG getestet (Abbildung 2.27). Dazu wurde analog zu dem Experiment mit Smaug (vgl. Abschnitt 2.2.3.3) eine Titration von PEG 20.000 durchgeführt.



**Abbildung 2.27: Die Cup-abhängige Deadenylierung zeigt ebenfalls eine Stimulierung durch PEG.**

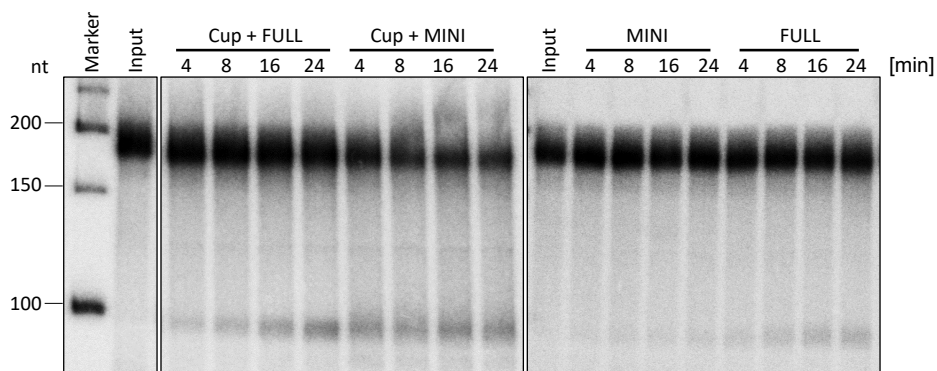
Autoradiogramm eines denaturierenden Harnstoff-PA-Gels mit den Produkten der Deadenylierungsreaktionen. Es wurden 10 nM radioaktiv markierte SRE<sup>WT</sup>-A70-RNA mit 80 nM Cup bei einer PEG 20.000-Konzentration von 0 bis 4 % vorinkubiert und die Deadenylierung durch Zugabe von 1 nM <sup>Dm</sup>CCR4-NOT<sub>MINI</sub> gestartet. Die Deadenylierung wurde hier für 2 bis 54 Minuten durchgeführt. Links ist ein Größenstandard in Nukleotiden angegeben und rechts die Laufhöhe des Substrats (A70) und des Produkts (A0). Über den Spuren sind die Reaktionszeit und die entsprechende PEG 20.000-Konzentration angegeben. Der Input enthält die jeweils aufgetragene Menge an Substrat-RNA im Deadenylierungspuffer.

Generell trat hier unter sämtlichen Reaktionsbedingungen bereits zum ersten Reaktionszeitpunkt vollständig deadenyliertes Produkt auf. Mit steigendem Gehalt an PEG 20.000 wurde die Deadenylierung beschleunigt. Bei 4 % PEG 20.000 war ein Großteil des Substrats bereits zum ersten Zeitpunkt (2 Minuten) nahezu vollständig deadenyliert. Insgesamt schritt die Deadenylierung in den ersten drei Zeitpunkten nur geringfügig voran.

Demnach konnte hier gezeigt werden, dass auch die Cup-abhängige Deadenylierung durch PEG 20.000 stimuliert wurde, in einem nahezu identischen Ausmaß wie die Smaug-abhängige Reaktion. Daraufhin wurde auch hier nach einer Phasentrennung oder Aggregation geschaut, welche jedoch auch hier nicht beobachtet werden konnten (vgl. Abschnitt 2.2.3.3; Daten nicht gezeigt). Die Stimulierung der Reaktion durch „Crowder“ beruht vermutlich auch auf einer Begünstigung der Assoziation mit dem CCR4-NOT-Komplex oder einer Erhöhung der Proteininstabilität bzw. Proteinfaltung von Cup (André & Spruijt, 2020; Roque et al., 2007).

### 2.2.4.3 CCR4-NOT-Subkomplexe in der durch Cup stimulierten Deadenylierung

In Experimenten mit den humanen CCR4-NOT-Subkomplexen wurde, wie für Smaug, auch für Cup eine maximale Aktivität mit den Komplexen „MINI“ und „FULL“ erreicht (Daten nicht gezeigt). Dementsprechend wurde zur weiteren Überprüfung, dass auch für *Drosophila* der N-terminale Part von NOT1 mit NOT10/11 keine Funktion in der Cup-abhängigen Deadenylierung ausübt, Cup mit  $D^m\text{CCR4-NOT}_{\text{FULL}}$  parallel zu  $D^m\text{CCR4-NOT}_{\text{MINI}}$  in Ihrer Deadenylierungsaktivität getestet (Abbildung 2.28). Das Experiment wurde parallel zu dem mit Smaug durchgeführt, sodass hier dieselben Kontrollen mit  $D^m\text{CCR4-NOT}_{\text{FULL}}$  und  $D^m\text{CCR4-NOT}_{\text{MINI}}$  gezeigt werden (vgl. Abbildung 2.16).



**Abbildung 2.28:**  $D^m\text{CCR4-NOT}_{\text{MINI}}$  ist ausreichend für die Cup-abhängige Deadenylierung.

Autoradiogramm eines denaturierenden Harnstoff-PA-Gels mit den Produkten der Deadenylierungsreaktionen. Es wurden für die Reaktionen mit  $D^m\text{CCR4-NOT}_{\text{FULL}}$  (FULL) und  $D^m\text{CCR4-NOT}_{\text{MINI}}$  (MINI) 20 nM radioaktiv markierte  $\text{SRE}^{\text{WT}}\text{-A70-RNA}$  mit 80 nM Cup oder Reaktionspuffer vorinkubiert, die Deadenylierung durch Zugabe der entsprechenden Subkomplexe (1 nM) gestartet und für 4 bis 24 Minuten inkubiert. Links sind die Laufhöhen eines Größenstandards in Nucleotiden angegeben und rechts die vom Substrat (A70) und Produkt (A0). Die entsprechenden Reaktionszeitpunkte und Protein-CCR4-NOT-Kombinationen sind über den jeweiligen Spuren markiert. Der Input beinhaltet die jeweils aufgetragene Menge an Substrat-RNA im Deadenylierungspuffer.

In den Cup-enthaltenden Reaktionen war sowohl für den  $D^m\text{CCR4-NOT}_{\text{FULL}}$  als auch  $D^m\text{CCR4-NOT}_{\text{MINI}}$  vollständig deadenyliertes Produkt in den ersten Zeitpunkten zu sehen. Die Menge an vollständig deadenyliertem Produkt war zum Endzeitpunkt für beide Reaktionen ähnlich, jedoch zeigte die Reaktion mit  $D^m\text{CCR4-NOT}_{\text{FULL}}$  etwas langsamere Deadenylierung. Im Vergleich dazu trat in den Reaktionen ohne Cup deutlich weniger Produktbildung auf, jedoch auch vollständig deadenyliertes Produkt bei gleichzeitigem Auftreten von nicht umgesetztem Substrat.

Insgesamt war hier in den Cup-enthaltenden Reaktionen eine ähnliche Aktivität mit beiden Subkomplexen zu sehen. Die basale Aktivität des  $D^m\text{CCR4-NOT}_{\text{FULL}}$ -Komplexes war deutlich höher als vom  $D^m\text{CCR4-NOT}_{\text{MINI}}$ -Komplex, sodass im Vergleich die Stimulierung



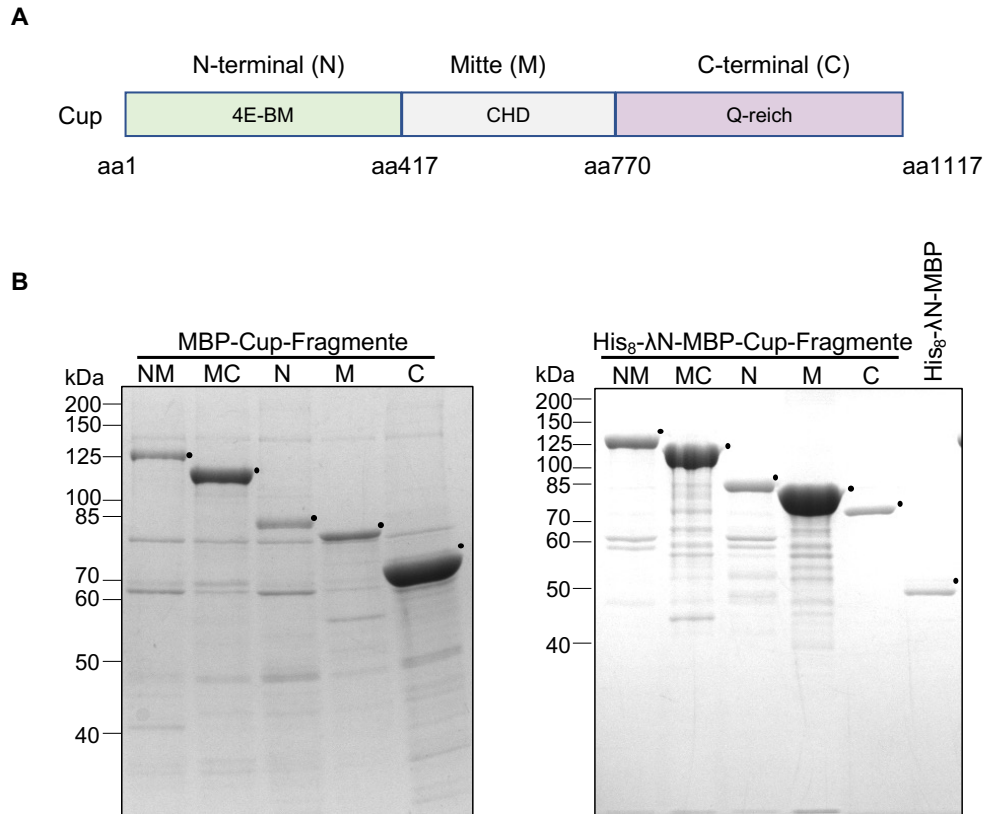
der Deadenylierungsaktivität des <sup>Dm</sup>CCR4-NOT<sub>MINI</sub>-Komplexes durch Cup etwas höher ausfiel. Da <sup>Dm</sup>CCR4-NOT<sub>FULL</sub> eine vollständige Deadenylierung eines geringen Anteils der RNA zeigte, lag möglicherweise eine SRE-spezifische Proteinkontamination vor.

Nichtsdestotrotz konnte hier gezeigt werden, dass für die Cup-abhängige Reaktion auch der <sup>Dm</sup>CCR4-NOT<sub>MINI</sub> bereits ausreicht und dementsprechend der N-terminale Part von NOT1, mit NOT10/11, keine Stimulierung oder Inhibierung der Reaktion mit Cup bewirkt. Weitere *Drosophila*-Komplexe wurden hier nicht getestet.

#### 2.2.4.4 Welche Bereiche von Cup sind in die Deadenylierung involviert?

In den bereits erwähnten *tethering*-Experimenten zu Cup wurden auch Fragmente von Cup im Hinblick auf ihre Aktivität in der Deadenylierung getestet (Igreja & Izaurralde, 2011). Cup wurde hier in drei Bereiche aufgeteilt: einen N-terminalen, mit den eIF4E-Bindemotiven, einen mittleren Bereich mit der vermutlich für die Interaktion zu Me31B notwendigen „Cup-Homologiedomäne“ (Ozgun et al., 2015) und einen C-terminalen Bereich, welcher reich an Glutamin ist und überwiegend, wie der Rest des Proteins, ungeordnet ist. (Abbildung 2.29.A). In *Drosophila* enthalten RNA-bindende Proteine viele repetitive, intrinsisch ungeordnete Bereiche mit einem hohen Anteil an Glutamin, Glycin und Asparagin (Sysoev et al., 2016), welches die Annahme einer direkten Assoziation von Cup mit der RNA bekräftigt (vgl. Abschnitt 2.2.4.1). Mit diesen Fragmenten ergab sich in der Studie von Igreja & Izaurralde, dass der mittlere und C-terminale Bereich von Cup eine Deadenylierung der an sie gebundenen RNA verursachten und nur der N-terminale Bereich keine Deadenylierung zeigte. Zusätzlich übte der N-terminale Bereich einen negativen Effekt auf die Deadenylierungsaktivität der beiden anderen Bereiche aus, wenn er mit ihnen verknüpft wurde. Für dieses Experiment gelten dieselben Vorbehalte wie für die Ergebnisse aus dem *tethering*-Experiment mit dem vollständigen Cup, sodass auch in den nachfolgenden Experimenten mit aufgereinigten Proteinen gearbeitet wurde (Abbildung 2.29.B).

Dazu wurden dieselben Fragmente verwendet, wie in dem vorher beschriebenen *tethering*-Experiment definiert (Igreja & Izaurralde, 2011). Weiterhin wurden die Cup-Fragmente mit einem N-terminalen MBP-Tag oder His<sub>6</sub>-λN-MBP-Tag versehen und in Sf21-Insektenzellen exprimiert. Die Expression und Aufreinigung war für sämtliche Cup-Fragmente erfolgreich (Abbildung 2.29), zeigte jedoch mit beiden Protein-Tags einige Proteinkontaminationen und Abbaubanden, welche auch für das vollständige Cup auftraten (vgl. Abbildung 2.1).

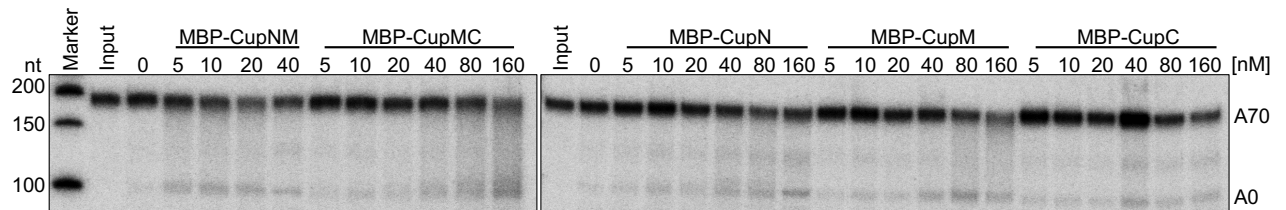


**Abbildung 2.29: Darstellung der in der Deadenylierung zu testenden Cup-Fragmente.**

**A:** Schema der Bereiche des Cup-Proteins (mod. aus Igreja & Izaurralde (2011)). Der N-terminale Bereich (N) enthält die eIF4E-Bindemotive (4E-BM); die Mitte (M) beinhaltet die „Cup-Homologie-Domäne“ (CHD), welche für die Interaktion mit Me31B wichtig ist; der C-terminale Bereich (C) ist reich an Glutaminen (Q). **B:** Coomassie-gefärbte 10 % SDS-PA-Gele mit den aufgereinigten Cup-Fragmenten. Links sind die Markerbanden mit den entsprechenden Molekulargewichten gekennzeichnet, und oberhalb der jeweiligen Spur ist das entsprechende Cup-Fragment mit dem jeweiligen Protein-Tag benannt. His<sub>8</sub>-λN-MBP entspricht hier dem Protein-Tag ohne Cup. In den Gelen ist die Bande mit dem erwarteten Molekulargewicht des Cup-Fragments durch einen Punkt gekennzeichnet. Für die MBP-Fragmente wurden 5 % der Elution geladen und für die His<sub>8</sub>-λN-MBP-Fragmente waren es 0,5 %.

Generell erwiesen sich diese Proteine als sehr instabil und nur die Fusion mit einem MBP-Tag sowie die Expression in Insektenzellen hatte die Aufreinigung von allen Fragmenten ermöglicht. Besonders der N-terminale Bereich hatte sich als sehr schwer zu reinigen erwiesen und konnte nur mit der Kombination aus His<sub>6</sub>-λN-MBP-Tag in größeren Mengen isoliert werden. So war es auch für das vollständige Cup weder nativ noch denaturierend möglich dieses über einen Protein-Tag am N-Terminus zu immobilisieren. Hier konnte nur durch Zugabe von eIF4E, welches im N-terminalen Bereich bindet, eine Reinigung über einen N-terminalen Protein-Tag erfolgen. Die Bindung zu eIF4E ist vermutlich notwendig, um eine Veränderung in der Proteinstruktur zu bewirken (Kinkelin et al., 2012). Dies lässt vermuten, dass auch bei den oben beschriebenen *tethering*-Experimenten Probleme mit dem N-terminalen Bereich aufgetreten sein könnten und daraus der dominant negative Effekt resultierte.

Nachfolgend wurden die aufgereinigten MBP-Cup-Fragmente in ihrer Deadenylierungsaktivität mit dem  $DmCCR4-NOT_{MINI}$ -Komplex getestet (Abbildung 2.30).



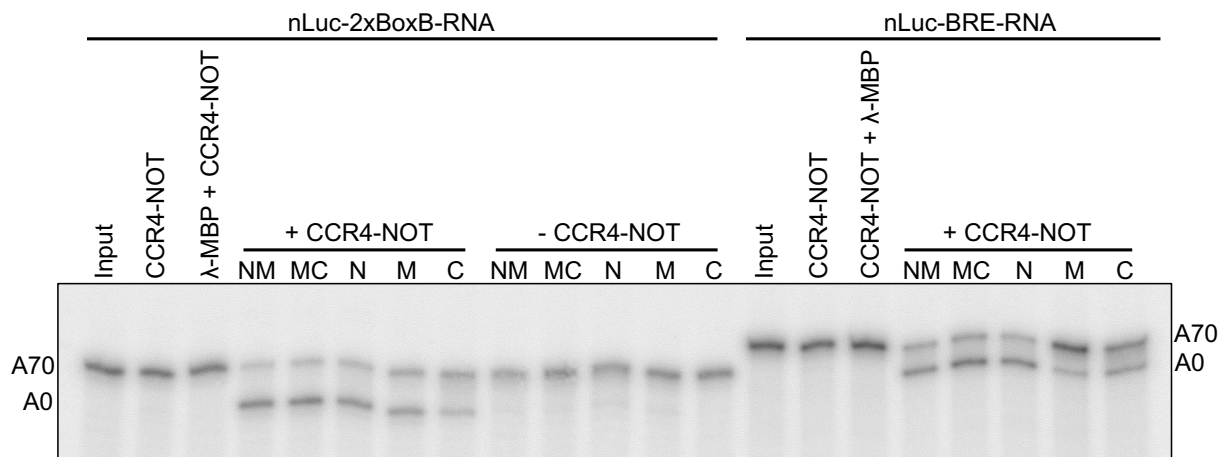
**Abbildung 2.30: Sämtliche Cup-Fragmente stimulieren die Deadenylierung.**

Autoradiogramme von denaturierenden Harnstoff-PA-Gelen mit den Produkten der Deadenylierungsreaktionen. Es wurden 5 nM radioaktiv markierte  $SRE^{MUT}$ -A70-RNA mit unterschiedlichen Konzentrationen der MBP-Cup-Fragmente oder Reaktionspuffer vorinkubiert und die Deadenylierung durch Zugabe von 1 nM  $DmCCR4-NOT_{MINI}$  initiiert. Die Deadenylierung wurde für 30 Minuten durchgeführt. Links sind die Laufhöhen eines Größenstandards in Nukleotiden angegeben und rechts die vom Substrat (A70) und Produkt (A0). Die entsprechenden Cup-Fragmente und deren Konzentrationen sind über den jeweiligen Spuren markiert. Der Input beinhaltet die jeweils aufgetragene Menge an Substrat-RNA im Deadenylierungspuffer.

Dazu wurden unterschiedliche Konzentrationen der MBP-Cup-Fragmente mit der  $SRE^{MUT}$ -RNA vorinkubiert und danach die Deadenylierung durch Zugabe von  $DmCCR4-NOT_{MINI}$  gestartet. Für sämtliche Fragmente konnte mit jeglicher Konzentration das Auftreten von vollständig deadenyliertem Produkt beobachtet werden. Die Stimulierung der Deadenylierung war dabei für alle Fragmente überwiegend ähnlich. Lediglich MBP-CupMC zeigte wiederholt eine leicht höhere Stimulierung.

Somit sind sämtliche MBP-Cup-Fragmente aktiv in der Stimulierung der Deadenylierung. Noch höhere Konzentrationen oder andere Protein-Präparationen führten zu ähnlicher Stimulierung. Bei zu hohen Konzentrationen wurde die Deadenylierung inhibiert, vermutlich durch nicht an die Substrat-RNA gebundenes Cup oder der Poly(A)-Schwanz der Substrat-RNA wurde blockiert (Daten nicht gezeigt). Weiterhin konnte in diesem Experiment kein Bereich von Cup eingegrenzt werden, der zum einen für die Deadenylierung und zum anderen für die Assoziation mit der Substrat-RNA essenziell ist. Außerdem ist die Aktivität der einzelnen Fragmente deutlich niedriger als die des vollständigen Cups (vgl. Abbildung 2.26), sodass wahrscheinlich sämtliche Bereiche von Cup eine Rolle in der Deadenylierung spielen. Zudem konnte in UV-Cross-Linking-Experimenten (durchgeführt von Dr. Christiane Rammelt) gezeigt werden, dass sämtliche Cup-Fragmente RNA binden (Anhang Abbildung 9.5). Dieses Experiment gibt jedoch keine Aussage über die tatsächliche Stabilität und Affinität der Protein-RNA-Wechselwirkung.

In dieser Arbeit wurde die RNA-Bindung von Cup nicht weiter charakterisiert. Stattdessen wurde für das nachfolgende Experiment ein N-terminaler His<sub>6</sub>-λN-MBP-Tag in die Cup-Fragmente eingefügt (Abbildung 2.29.B), sodass diese eine BoxB-haltige Substrat-RNA mit vergleichbarer Affinität binden. Dadurch sollte bewerkstelligt werden, dass nur die tatsächliche Deadenylierungsaktivität der Cup-Fragmente verglichen wird, ohne den Hintergrund der RNA-Bindung miteinbeziehen zu müssen. Für das Experiment wurden die His<sub>6</sub>-λN-MBP-Cup-Fragmente oder His<sub>6</sub>-λN-MBP mit der BoxB-haltigen RNA oder einer Kontroll-RNA ohne BoxB (nLuc-BRE-RNA) vorinkubiert und die Deadenylierung durch Zugabe von D<sup>m</sup>CCR4-NOT<sub>MINI</sub> gestartet (Abbildung 2.31).



**Abbildung 2.31: Die stimulierende Interaktion mit CCR4-NOT ist über das gesamte Cup verteilt.**

Autoradiogramm eines denaturierenden Harnstoff-PA-Gels mit den Produkten der Deadenylierungsreaktionen. Es wurden 2 nM radioaktiv markierte nLuc-2xBoxB-A70- oder nLuc-BRE-A70-RNA mit den unterschiedlichen His<sub>8</sub>-λN-MBP-Cup-Fragmenten (80 nM für CupM, 40 nM für die anderen), His<sub>8</sub>-λN-MBP (80 nM) oder Reaktionspuffer vorinkubiert und bei den entsprechenden Reaktionen die Deadenylierung durch Zugabe von 1 nM D<sup>m</sup>CCR4-NOT<sub>MINI</sub> initiiert. Die Deadenylierung wurde für 30 Minuten durchgeführt. Links und rechts sind die Laufhöhen des Substrats (A70) und Produkts (A0) für die jeweilige RNA angegeben. Die entsprechenden Proteinmischungen und Substrat-RNAs sind über den jeweiligen Spuren markiert. Der Input beinhaltet die jeweils aufgetragene Menge an Substrat-RNA im Deadenylierungspuffer.

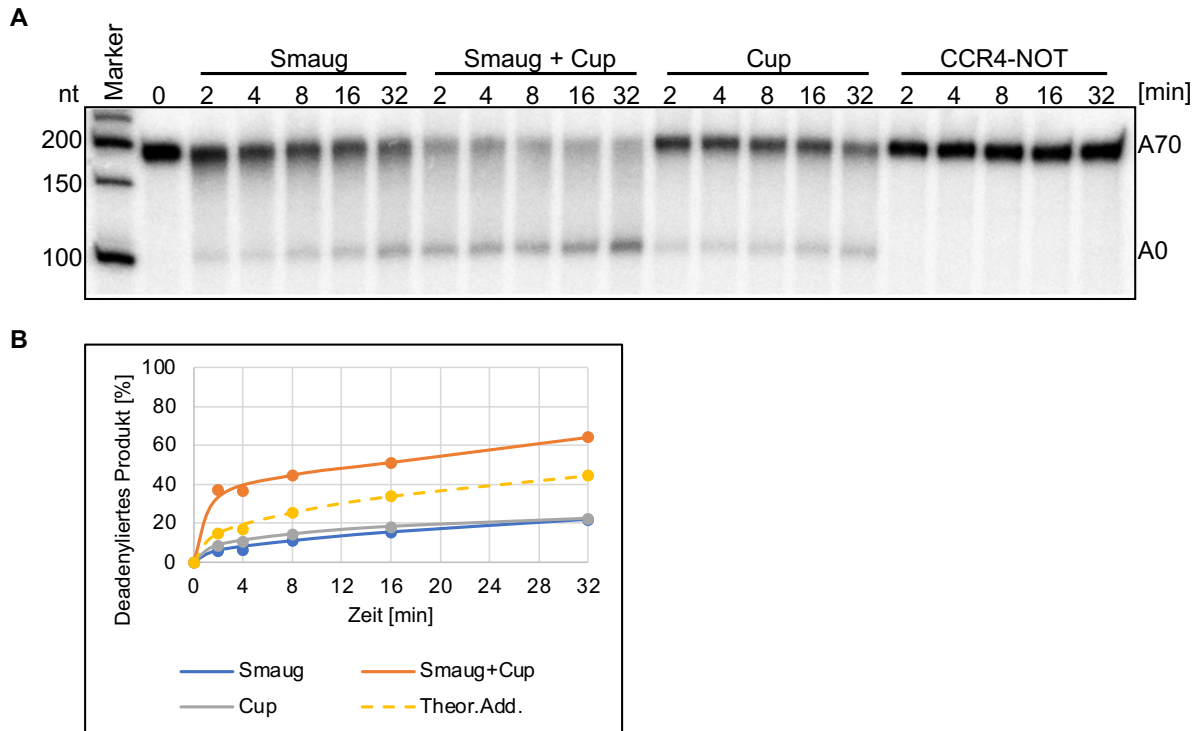
Für die Reaktionen nur mit CCR4-NOT oder in Kombination mit His<sub>6</sub>-λN-MBP trat für beide Substrat-RNAs keine Deadenylierung auf. Die Reaktionen mit den Cup-Fragmenten und CCR4-NOT zeigte für die BoxB-haltige RNA eine moderate bis starke Deadenylierungsaktivität (ca. 50-70 % vollständig deadenyliertes Produkt). Ohne Zugabe von CCR4-NOT waren für einige dieser Reaktionen sehr geringe Mengen an vollständig deadenyliertem Produkt zu sehen, sodass wahrscheinlich eine geringe Kontamination einer mitgereinigten Nuklease vorlag. Die analogen Reaktionen mit der Kontroll-RNA zeigten ebenfalls vergleichbare Deadenylierungsaktivitäten (ca. 50-60 % vollständig deadenyliertes Produkt), mit Ausnahme von CupM (ca. 20 %). Dies wurde erwartet, da die Fragmente RNA auch ohne λN-Tag banden (vgl. Abbildung 2.30 und Anhang Abbildung 9.5).

Wie bereits in dem vorherigen Experiment mit den MBP-Cup-Fragmenten, konnte auch hier kein großer Unterschied in der Deadenylierungsaktivität zwischen den Fragmenten gezeigt werden. Die Aktivitäten sind hier generell etwas höher, was vermutlich durch den  $\lambda$ N-Tag begründet werden kann. Ein Vergleich der Gesamtaktivität ist allerdings durch die unterschiedlichen Substrat-RNAs nicht aussagekräftig. Der Unterschied zwischen BoxB-RNA und Kontroll-RNA ist verschwindend gering und nur für das CupM-Fragment ist ein größerer Unterschied zu sehen. Durch Fusion mit dem  $\lambda$ N-Tag könnte die Proteinkonformation der jeweiligen Cup-Fragmente beeinflusst worden sein, was möglicherweise zu einer erhöhten RNA-Bindung führte. Ansonsten könnte auch das  $\lambda$ N-Peptid beide mRNAs mit ähnlicher Affinität binden. Zur Klärung dieser Fragen sollten Protein-RNA-Bindungsstudien durchgeführt werden.

Nichtsdestotrotz ändert dies nichts an der Aussage, dass sämtliche Cup-Fragmente gleichermaßen die Deadenylierung stimulieren können und dies überwiegend mit den *tethering*-Experimenten in S2-Insektenzellen übereinstimmt (Igreja & Izaurralde, 2011). In dieser Arbeit konnte auch eine Stimulierung der Deadenylierung durch die den N-terminalen Bereich enthaltenden Cup-Fragmente erreicht werden, welches vermutlich durch eine Stabilisierung des Proteins durch den MBP-Tag und His<sub>6</sub>- $\lambda$ N-MBP-Tag erklärt werden kann.

#### 2.2.4.5 Kooperativität zwischen Cup und Smaug

Bereits zuvor konnte in *pulldown*-Experimenten aus *Drosophila*-Embryoextrakten mit Smaug oder mit SRE-haltiger RNA eine Anreicherung von Cup bestimmt werden, welche durch die SAM-PHAT-Domäne von Smaug bewerkstelligt wird (Götze et al., 2017; Nelson et al., 2004). Dies legt den Schluss nahe, dass Smaug und Cup wahrscheinlich interagieren. Da in Deadenylierungsassays sowohl Cup als auch Smaug aktiv waren, sollte in dem folgenden Experiment der Effekt einer gemeinsamen Zugabe zur Deadenylierungsreaktion beobachtet werden. Hierfür wurde die SRE<sup>WT</sup>-RNA entweder nur mit Smaug, nur mit Cup oder einer Kombination von beiden vorinkubiert und die Deadenylierung mit dem D<sup>m</sup>CCR4-NOT<sub>MINI</sub> initiiert (Abbildung 2.32). Weiterhin wurde diesem Experiment kein PEG 20.000 hinzugefügt, da dieses die Reaktion zu stark beschleunigte und damit den Unterschied in der Deadenylierungsaktivität zwischen den einzelnen Proteinen und der Kombination beider zu sehr reduzierte.



**Abbildung 2.32: Smaug und Cup zeigen Kooperativität in der Deadenylierung.**

**A:** Autoradiogramm eines denaturierenden Harnstoff-PA-Gels mit den Produkten der Deadenylierungsreaktionen. Es wurden 10 nM radioaktiv markierte SRE<sup>WT</sup>-RNA mit Smaug (80 nM) oder Reaktionspuffer für 20 Minuten vorinkubiert und nachfolgend wurden Cup (80 nM) oder Reaktionspuffer für weitere 20 Minuten zugegeben. Die Deadenylierung wurde durch Zugabe von 1 nM <sup>Dm</sup>CCR4-NOT<sub>MINI</sub> initiiert und für 2 bis 32 Minuten durchgeführt. Der Zeitpunkt 0 Minuten entspricht der Probenentnahme vor Zugabe des CCR4-NOT-Komplexes zur Smaug+Cup-Reaktion. Links ist ein Größenstandard in Nukleotiden aufgetragen, und rechts sind die Laufhöhen des Substrats (A70) und Produkts (A0) angegeben. Die entsprechenden Reaktionszeitpunkte und Proteinkombinationen sind über den jeweiligen Spuren markiert. **B:** Quantifizierung des vollständig deadenylierten Produkts aus der Smaug- und Cup-abhängigen Deadenylierung. Das Autoradiogramm wurde densitometrisch mit dem Programm FiJi quantifiziert (Schindelin et al., 2012).

Für die beiden einzelnen Proteine Smaug und Cup war eine nahezu identische Stimulierung der Deadenylierung zu sehen (vgl. Abbildung 2.32.B; blaue und graue Kurve), wohingegen die Reaktion nur mit dem CCR4-NOT-Komplex keine detektierbare Aktivität zeigte. Die unterbrochene gelbe Kurve zeigte die theoretische Addition beider Deadenylierungsaktivitäten der einzelnen Proteinreaktionen. Dies würde dem Fall entsprechen, dass beide Proteine unabhängig voneinander ihre Aktivität ausüben. Nun ergab die tatsächliche Kombination aus Smaug und Cup in den ersten beiden Zeitpunkten ein mehr als doppelt so hohes Ausmaß der vollständigen Deadenylierung. Zu späteren Zeitpunkten glichen sich die Aktivitäten an, jedoch zeigte die tatsächliche Kombination aus beiden Proteinen zum Endzeitpunkt der Kinetik immer noch eine um ca. 1,5-fach höhere Deadenylierungsaktivität.

Durch einen EMSA mit den hier eingesetzten Proteinen und der Substrat-RNA konnte verifiziert werden, dass die eingesetzten Proteinkonzentrationen hinsichtlich der RNA-Bindung sättigend waren und der stimulierende Effekt auf die Deadenylierungsaktivität nicht allein auf eine erhöhte RNA-Bindung zurückzuführen war (vgl. Anhang: Abbildung 9.4).

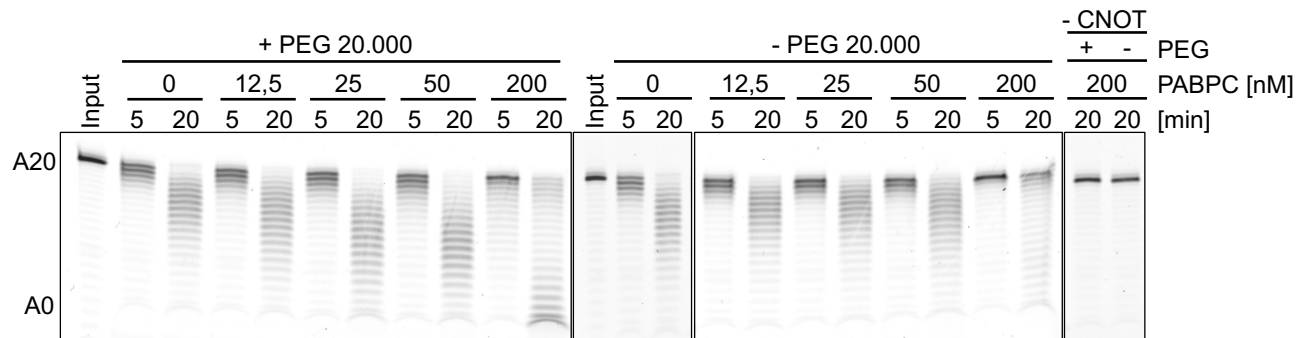
Somit scheinen Smaug und Cup die Reaktion mit dem CCR4-NOT-Komplex parallel stimulieren zu können und es liegt eine schwach Kooperativität vor. Im biologischen Sinne könnte dies als zusätzliche Absicherung dienen, um eine möglichst schnelle und stabile Rekrutierung des CCR4-NOT-Komplexes zu bewerkstelligen, da vor allem in den ersten Minuten der Aktivitätsunterschied der Smaug-Cup-Kombination zu den einzelnen Proteinen besonders prägnant ist. So ist auch in *Drosophila*-Embryoextrakten in den ersten zwei Minuten vollständig deadenyliertes Produkt zu detektieren (Jeske et al., 2006), trotz zahlreicher anderer kompetierender RNA-Protein-Komplexe.

#### 2.2.4.6 PABPC in der Deadenylierung

Wie bereits erwähnt, zeigt sowohl humanes als auch *S. pombe*-PABPC eine Stimulierung der Deadenylierung (Webster et al., 2018; Yi et al., 2018). Demnach ist auch für das *Drosophila*-Ortholog eine ähnliche Funktion zu erwarten. Ein PABPC-Molekül bindet bzw. bedeckt einen Poly(A)-Abschnitt von ca. 27 bis 30 Nukleotiden (Passmore & Collier, 2021). Für das PABPC aus *S. pombe* und *X. laevis* wurde eine minimale Poly(A)-Länge von 8 bis 12 Nukleotiden bestimmt, die noch mit hoher Affinität gebunden wird (Kühn & Pieler, 1996; Webster et al., 2018). Dementsprechend wurde hier für initiale Deadenylierungsexperimente die kurze FAM-7mer-RNA mit einem 20 nt langen poly(A)-Schwanz verwendet. Dazu wurden unterschiedliche Konzentrationen von PABPC mit der FAM-7mer-RNA vorinkubiert und die Deadenylierung durch Zugabe von <sup>Dm</sup>CCR4-NOT<sub>MINI</sub> initiiert (Abbildung 2.33). Außerdem wurde die Abhängigkeit der Reaktion von PEG 20.000 untersucht, da dieses sowohl für die Smaug- als auch Cup-abhängige Deadenylierungsaktivität stimulierend wirkte (vgl. Abschnitte 2.2.3.3 und 2.2.4.2).

In der Reaktion ohne PABPC war eine graduelle Deadenylierung der Substrat-RNA zu beobachten, die mit und ohne PEG ähnlich verlief. Dahingegen war für die PEG-enthaltende Reaktion ab einer äquimolaren Zugabe von PABPC zur Substrat-RNA (25 nM) eine leichte Stimulierung der Deadenylierung zu beobachten, die mit einem 8-fachen Überschuss von PABPC zur Substrat-RNA deutlich stieg. Bei letzterem war allerdings auch das gleichzeitige

Auftreten von weiter fortgeschrittener Deadenylierung und langsamerer Deadenylierung im Vergleich zu den niedrigeren Konzentrationen an PABPC zu sehen (Vergleich bei 20 Minuten). Im Gegensatz dazu zeigten die Reaktionen ohne PEG keine Stimulierung durch Zugabe von PABPC, sondern bei einem 8-fachen Überschuss von PABPC eine Inhibierung der Reaktion. Ohne CCR4-NOT war für PABPC keine Nukleaseaktivität zu detektieren.

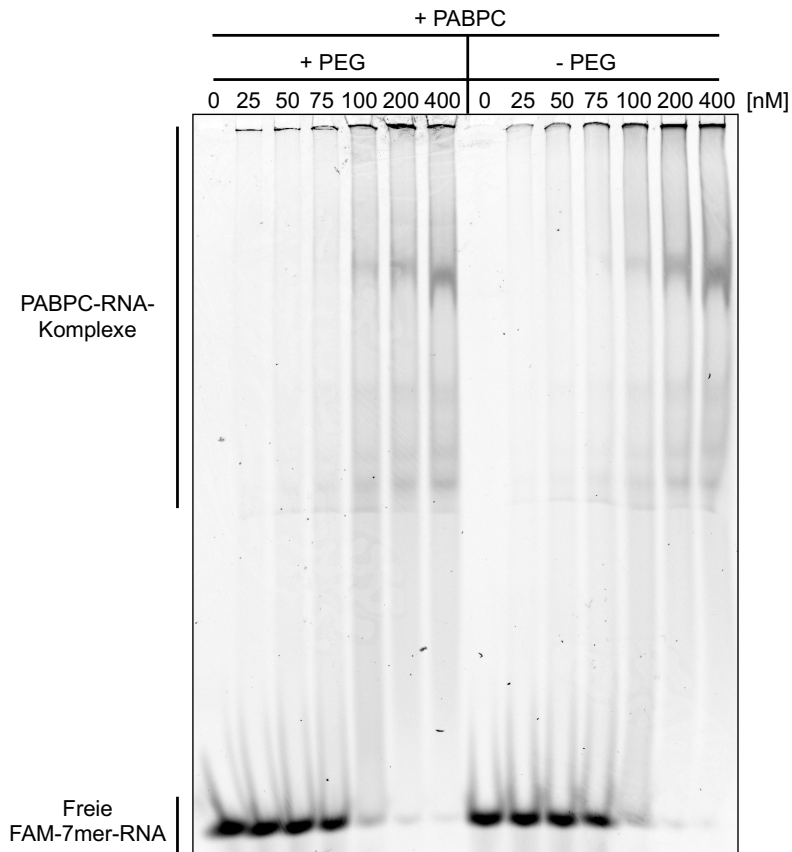


**Abbildung 2.33: PABPC stimuliert die Deadenylierung der FAM-7mer-RNA durch  $D^m$ CCR4-NOT<sub>MINI</sub>.** Fluoreszenzscans von denaturierenden Harnstoff-PA-Gelen mit den Produkten der Deadenylierungsreaktionen. 25 nM FAM-7mer-A20-RNA wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen PABPC (12,5 bis 200 nM) oder Reaktionspuffer vorinkubiert, und nachfolgend wurde die Deadenylierung durch Zugabe von 1 nM  $D^m$ CCR4-NOT<sub>MINI</sub> initiiert und für 5 bis 20 Minuten ausgeführt. Dabei wurde einem Teil der Reaktionen PEG 20.000 zugegeben und dem anderen nicht. Ganz rechts sind die Reaktionen nur mit PABPC und ohne CCR4-NOT aufgetragen. Links sind die Laufhöhen des Substrats (A20) und Produkts (A0) angegeben. Die entsprechenden Reaktionszeitpunkte, PABPC-Konzentrationen und Zugabe von PEG sind über den jeweiligen Spuren markiert. Der Input beinhaltet die jeweils aufgetragene Menge an Substrat-RNA im Deadenylierungspuffer.

Dementsprechend zeigte das *Drosophila*-PABPC wie seine Orthologe eine Stimulierung der Deadenylierung, die hier allerdings etwas schwächer ausfiel. Die Konzentration an PABPC, die für eine hohe Stimulierung notwendig war, überstieg deutlich die theoretische Einschätzung, dass äquimolare Mengen an PABPC und FAM-7mer-A20 ausreichen würden. Ein ähnliches Ergebnis konnte auch mit dem humanen PABPC und CCR4-NOT-Komplex beobachtet werden, bei dem sogar ein 133-facher Überschuss an PABPC zur Substrat-RNA eingesetzt wurde (Yi et al., 2018). Außerdem liegt wie auch für Smaug und Cup eine PEG-Abhängigkeit vor, die vermutlich auf einem vergleichbaren Mechanismus basiert.

Um zu verifizieren, dass die eingesetzte Menge an PABPC ausreichend für eine Sättigung der Substrat-RNA war, wurde ein EMSA durchgeführt (Abbildung 2.34). Hierbei wurde auch die PEG-Abhängigkeit der RNA-Bindung untersucht.





**Abbildung 2.34: Die PABPC-RNA-Assoziation wird nicht durch PEG beeinflusst.**

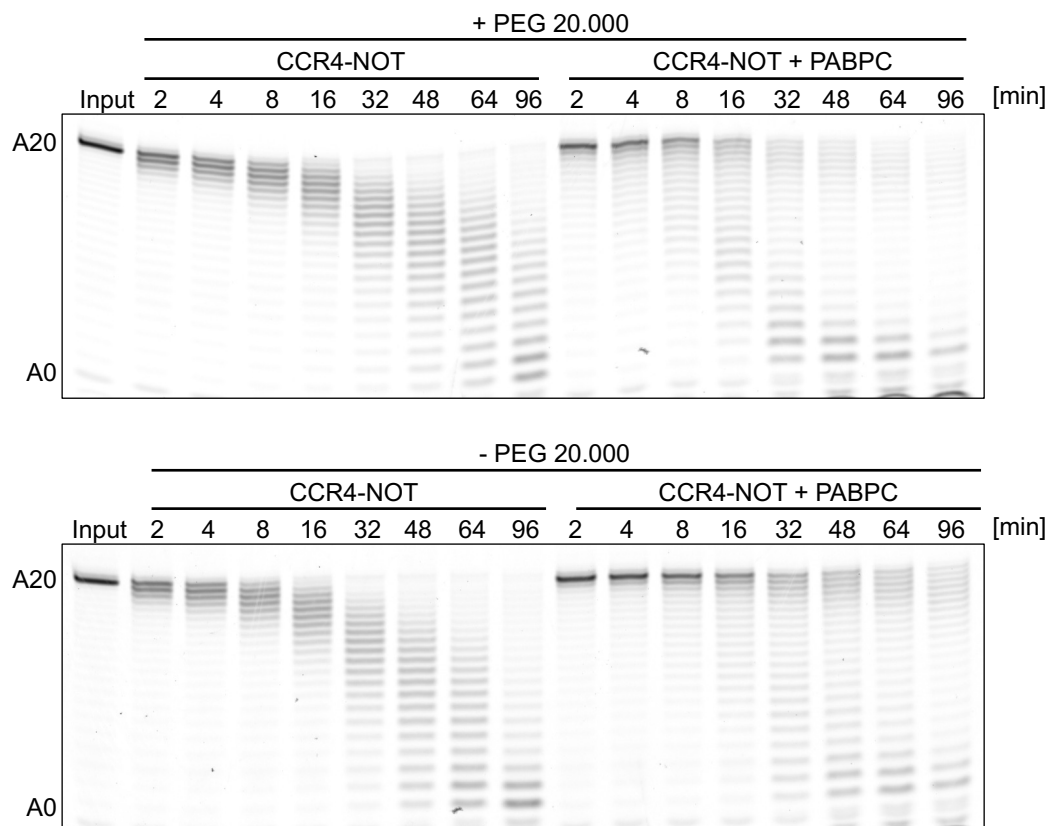
Fluoreszenzscan eines nichtdenaturierenden PA-Gels zur Auftrennung der Protein-RNA-Komplexe nach erfolgter Bindungsreaktion. Die FAM-7mer-A20-RNA (25 nM) wurde mit den angegebenen Konzentrationen an PABPC (von 0 bis 400 nM) und mit oder ohne PEG 20.000 für 20 Minuten bei 25 °C inkubiert. Daraufhin wurden die RNA-Protein-Komplexe durch eine nichtdenaturierende Gelelektrophorese bei 200 V und Raumtemperatur aufgetrennt. Über den Spuren sind die jeweiligen PABPC-Konzentrationen und die Zugabe von PEG angegeben. Links wurden die Positionen der freien Substrat-RNA und der PABPC-gebundenen RNA kenntlich gemacht.

Für beide Reaktionsbedingungen war sehr wenig Bindung der FAM-7mer-RNA bei äquimolaren Konzentrationen (25 nM) zu sehen, und erst bei einem 8-fachen Überschuss an PABPC (200 nM) war eine nahezu vollständige Bindung zu beobachten. Diese wurde auch nicht durch einen 16-fach Überschuss (400 nM) gesteigert, sodass der 8-fache Überschuss an PABPC bereits ausreichend war. Insgesamt war kaum ein Unterschied zwischen mit und ohne PEG auszumachen.

Dementsprechend ist das Ergebnis des Deadenylierungsexperiments (vgl. Abbildung 2.33) durch eine nicht ausreichende Sättigung der Substrat-RNA mit PABPC zu erklären, welches vermutlich durch hohe tRNA-Konzentration bedingt ist. Die Zugabe von PEG zeigte keinen Effekt auf die RNA-Bindung, welches die Annahme stärkt, dass es sich um eine ähnliche Stimulierung wie bei Smaug und Cup handeln könnte. Das PEG wird vermutlich auch hier die Assoziation zwischen PABPC und CCR4-NOT beschleunigen.

### 2.2.4.7 Prozessivität in der durch PABPC stimulierten Deadenylierung

Bei der Titration von PABPC im Deadenylierungsexperiment (vgl. Abbildung 2.33) traten bei der höchsten Proteinkonzentration (mit PEG) zwei Spezies von Produkten auf, die sich im Fortschritt ihrer Deadenylierung unterschieden. Außerdem war hier ohne PEG sogar eine Inhibition der Deadenylierung zu sehen. Um das Reaktionsverhalten zu erklären, wurde daraufhin eine umfangreichere Kinetik der Deadenylierung mit und ohne PABPC sowie mit und ohne PEG durchgeführt (Abbildung 2.35). Außerdem wurde ein zehnfacher Überschuss der Substrat-RNA zum CCR4-NOT-Komplex eingesetzt.



**Abbildung 2.35: Zweistufiger Mechanismus der PABPC-stimulierten Deadenylierung.**

Fluoreszenzscans von denaturierenden Harnstoff-PA-Gelen mit den Produkten der Deadenylierungsreaktionen. 25 nM FAM-7mer-A20-RNA wurden mit 200 nM PABPC oder Reaktionspuffer vorinkubiert, und nachfolgend wurde die Deadenylierung durch Zugabe von 2.5 nM  $^{Dm}$ CCR4-NOT<sub>MINI</sub> initiiert. Die Deadenylierung wurde für 2 bis 96 Minuten ausgeführt. Dabei wurde einem Teil der Reaktionen PEG 20.000 zugegeben und dem anderen nicht. Links sind die Laufhöhen des Substrats (A20) und Produkts (A0) angegeben. Die entsprechenden Reaktionszeitpunkte, Proteinkombinationen und Zugabe von PEG sind über den jeweiligen Spuren markiert. Der Input beinhaltet die jeweils aufgetragene Menge an Substrat-RNA im Deadenylierungspuffer.

Die Reaktion nur mit  $^{Dm}$ CCR4-NOT<sub>MINI</sub> zeigte wie bisher sowohl mit als auch ohne PEG eine graduelle Deadenylierung der Substrat-RNA und nach ca. 96 Minuten überwiegend vollständig deadenyliertes Produkt. Für die Reaktion mit PABPC und PEG traten zwei

Reaktionsverläufe auf. Zum einen gab es schneller deadenylierte Substrate, die bereits nach zwei Minuten eine fortgeschrittenere Deadenylierung zeigten und nach 32 bis 48 Minuten überwiegend vollständig deadenyliert vorlagen. Zum anderen gab es Substrate, die auch nach 16 Minuten noch nicht umgesetzt waren und erst danach langsam deadenyliert wurden. Dieser Reaktionsverlauf trat auch in langsamerer Form für die Reaktion ohne PEG auf.

Der Reaktionsmechanismus ähnelt auf den ersten Blick dem einer langsamen prozessiven Reaktion, da in den ersten Zeitpunkten (2 bis 16 Minuten) sowohl nicht umgesetztes Substrat als auch weiter fortgeschrittene Deadenylierung im Vergleich zur Reaktion ohne PABPC auftrat. Dagegen spricht allerdings, dass das vollständig deadenylierte Produkt nach 32 bzw. 48 Minuten deutlich über dem Verhältnis von CCR4-NOT (2.5 nM) und Substrat-RNA (25 nM) lag, welches einer ersten prozessiven Deadenylierung entsprechen würde. Hier wären 10 % vollständig deadenyliertes Produkt zu erwarten und nicht um die 30 %.

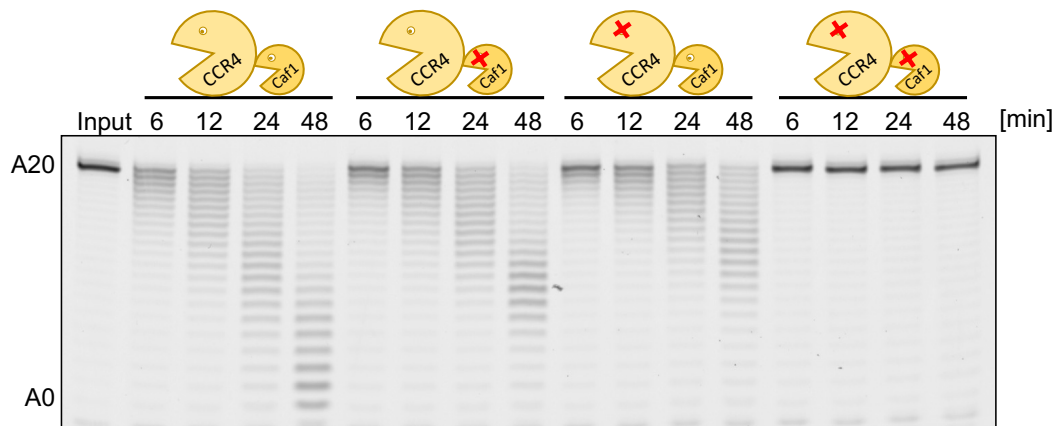
Insgesamt erweckt der Reaktionsverlauf den Anschein, als würde der CCR4-NOT-Komplex den PABPC-RNA-Komplex zu Beginn der Reaktion bevorzugt binden und mehrere Adenylate entfernen, bis vermutlich zu viele Adenylate entfernt wurden, um eine stabile PABPC-RNA-Bindung zu gewährleisten. Hiernach wird der nächste noch nicht umgesetzte PABPC-RNA-Komplex von CCR4-NOT gebunden bis sämtliche PABPC-RNA-Komplexe umgesetzt wurden. So wäre auch die nahezu gleichbleibende Anzahl entfernter Adenylate (ca. 1-13) zwischen 2 und 8 Minuten in der PEG-haltigen Reaktion zu erklären, da hier hauptsächlich nur die Menge dieser Reaktionsintermediate steigt. Nachdem alle PABPC-RNA-Komplexe aufgelöst wurden, setzt wahrscheinlich wieder die distributive Basisaktivität des CCR4-NOT-Komplexes ein (ab ca. 16 Minuten), sodass hier auch vollständig deadenyliertes Produkt vorliegt. Die schnelle Dissoziation von PABPC von RNAs mit weniger als zehn Adenylaten konnte auch für das *S. pombe* Ortholog beobachtet werden, welches für Substrat-RNAs mit fünf Adenylaten eine um ca. 50-fach höhere Dissoziationsgeschwindigkeit im Vergleich zu einer RNA mit fünfzehn Adenylaten hat (Webster et al., 2018).

Außerdem wurde durch Zugabe von PABPC auch noch nach 8 Minuten eine Inhibierung der Deadenylierung der bis dahin nicht umgesetzten Substrat-RNA beobachtet. Möglicherweise blockiert PABPC zu Beginn das 3'-Ende der RNA von der Aktivität des CCR4-NOT-Komplexes, welcher erst den Kontakt zur RNA herstellen muss. Dies könnte vermutlich durch den recht kurzen Poly(A)-Schwanz (20 Adenylate) bedingt sein, welcher knapp unter der durch ein PABPC-Molekül bedeckten Länge von 27 bis 30 Adenylaten lag. Daher könnte PABPC hier ungewöhnliche Bindungen mit der RNA eingehen.

Für nachfolgende Experimente wäre es sinnvoll die kurze FAM-7mer-RNA mit einem längeren poly(A)-Schwanz zu versehen (30 oder 50 Adenylate), da damit analog zu den Experimenten mit dem *S. pombe* CCR4-NOT-Komplex ein genauer *footprint* von PABPC auf dem poly(A) bestimmt werden könnte (Webster et al., 2018). Generell konnte hier für die kurze Substrat-RNA im Gegensatz zum humanen und *S. pombe*-Komplex kein eindeutiges *footprinting* beobachtet werden (Webster et al., 2018; Yi et al., 2018). Hier ist nur zwischen 2 und 16 Minuten ein überwiegender Stopp der Deadenylierung nach ca. 13 entfernten Adenylaten zu sehen (in der PEG-haltigen Reaktion), was einem 7 nt großen *footprint* entsprechen würde. Dies würde zumindest grob mit dem für *S. pombe* bestimmten *footprint* von 8 nt übereinstimmen (Webster et al., 2018).

#### 2.2.4.8 CCR4 und Caf1 sind aktiv in der durch PABPC stimulierten Deadenylierung

Für das humane und *S. pombe*-Ortholog konnte gezeigt werden, dass nur CCR4 aktiv in der PABPC-abhängigen Deadenylierung ist, und die Caf1-abhängige Deadenylierung durch PABPC blockiert wird (Webster et al., 2018; Yi et al., 2018). Somit ergibt sich die Frage, ob dies für den *Drosophila*-Komplex ebenfalls zutrifft. Um dies zu beantworten, wurde die FAM-7mer-RNA mit PABPC vorinkubiert, und dieselben Präparationen der Wildtyp/Mutanten-Kombinationen in  $^{Dm}CCR4-NOT_{MINI}$  wie in Abschnitt 2.2.2.5 wurden eingesetzt (Abbildung 2.36).



**Abbildung 2.36: CCR4 und Caf1 sind beide aktiv in der durch PABPC stimulierten Deadenylierung.**

Fluoreszenzscan eines denaturierenden Harnstoff-PA-Gels mit den Produkten der Deadenylierungsreaktionen. Es wurden je 25 nM FAM-7mer-A20-RNA mit 200 nM PABPC vorinkubiert und die Reaktion wurde durch Zugabe von 2,5 nM der unterschiedlichen Wildtyp/Mutanten-Kombinationen von  $^{Dm}CCR4-NOT_{MINI}$  gestartet. Die Deadenylierung wurde für 6 bis 48 Minuten ausgeführt. Rechts wurde die Laufhöhe von Substrat (A20) und Produkt (A0) angegeben, und über den jeweiligen Spuren sind die entsprechenden Reaktionszeitpunkte und die Wildtyp/Mutanten-Kombinationen als Cartoon aufgeführt. Das rote Kreuz zeigt hier die mutierte Ribonuklease in  $^{Dm}CCR4-NOT_{MINI}$  an. Der Input beinhaltet die jeweils aufgetragene Menge an Substrat-RNA im Deadenylierungspuffer.

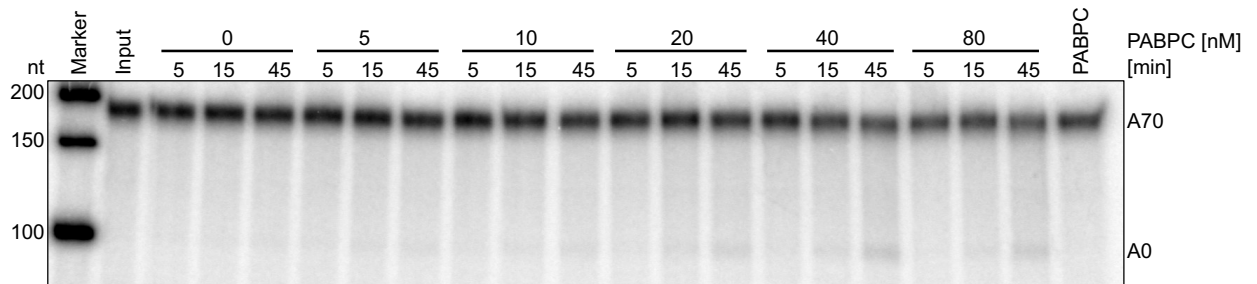
Hier war zu sehen, dass beim Wildtyp, wie zuvor, nach 48 Minuten ein Großteil der Substrat-RNA nahezu vollständig deadenyliert vorlag, wohingegen die beiden Einzelmutanten eine um ca. 50 % reduzierte Deadenylierungsaktivität zeigten. Die Einzelmutante mit dem Wildtyp-CCR4 zeigte hier etwas fortgeschrittenere Deadenylierung als mit dem Wildtyp-Caf1. Die Doppelmutante übte wie erwartet keine Aktivität aus.

Damit kann gezeigt werden, dass im rekonstituierten *Drosophila*-System beide Ribonukleasen eine recht ähnliche Aktivität in der durch PABPC stimulierten Deadenylierung aufweisen, wohingegen eine CCR4-Mutante in den beiden oben aufgeführten Orthologen einen dominant negativen Effekt ausübt (Webster et al., 2018; Yi et al., 2018). Für *Drosophila* kann hier nur eine leichte Präferenz für die CCR4-abhängige Deadenylierung beobachtet werden. Die deutlich unterschiedlichen Aktivitäten von CCR4 und Caf1 in der PABPC stimulierten Deadenylierung im rekonstituierten *S. pombe*-System dienten als Grundlage, um in *S. cerevisiae* nach einer biologischen Funktion zu suchen (Webster et al., 2018). Dafür wurde die Deadenylierung von Codon-optimierten-mRNAs (CO-mRNA) mit nicht Codon-optimierten-mRNAs (NCO-mRNA) in *S. cerevisiae*-Zellen verglichen (Webster et al., 2018), da für CO-mRNAs eine Anreicherung von PABPC beobachtet werden konnte (Costello et al., 2015; Webster et al., 2018). So konnte gezeigt werden, dass die CO-mRNA langsamer deadenyliert wird als die NCO-mRNA. Bei der NCO-mRNA sind vermutlich sowohl Caf1 als auch CCR4 aktiv, wohingegen bei der CO-mRNA die Aktivität von Caf1 durch PABPC blockiert wird. Während in einer CCR4-Deletionsmutante eine langsamere Deadenylierung der CO-mRNA zu beobachten war, trat in einer Caf1-Deletionsmutante keine Veränderung auf. Da CO-mRNAs meist stärker translatiert werden als NCO-mRNAs (Costello et al., 2015; Hanson & Collier, 2018), liegt auch gleichzeitig eine Kopplung von Translation und Deadenylierung vor. Somit wäre es von Interesse in zukünftigen Experimenten zu sehen, ob auch für den <sup>Dm</sup>CCR4-NOT-Komplex eine Beeinflussung der Deadenylierung durch die Codonverwendung auftritt, da zumindest für die rekonstituierte PABPC-abhängige Deadenylierung kaum ein Unterschied zwischen CCR4 und Caf1 vorliegt.

#### 2.2.4.9 PABPC im Abbau von längeren Poly(A)-Schwänzen

Da die Stimulierung der Deadenylierung durch PABPC in *S. pombe* mit der Länge des Poly(A)-Schwanzes leicht variiert (Webster et al., 2018) und die hier eingesetzte kurze FAM-7mer-A20 wahrscheinlich nicht den Kontakt zu sämtlichen RRM-Domänen von PABPC ermöglicht, wurden die nachfolgenden Experimente mit den längeren SRE-haltigen

RNAs (mit 70 Adenylaten) durchgeführt. Dafür wurde zuerst eine Titration von PABPC mit der SRE<sup>WT</sup>-RNA durchgeführt und <sup>Dm</sup>CCR4-NOT<sub>MINI</sub> zum Start der Deadenylierung eingesetzt (Abbildung 2.37).



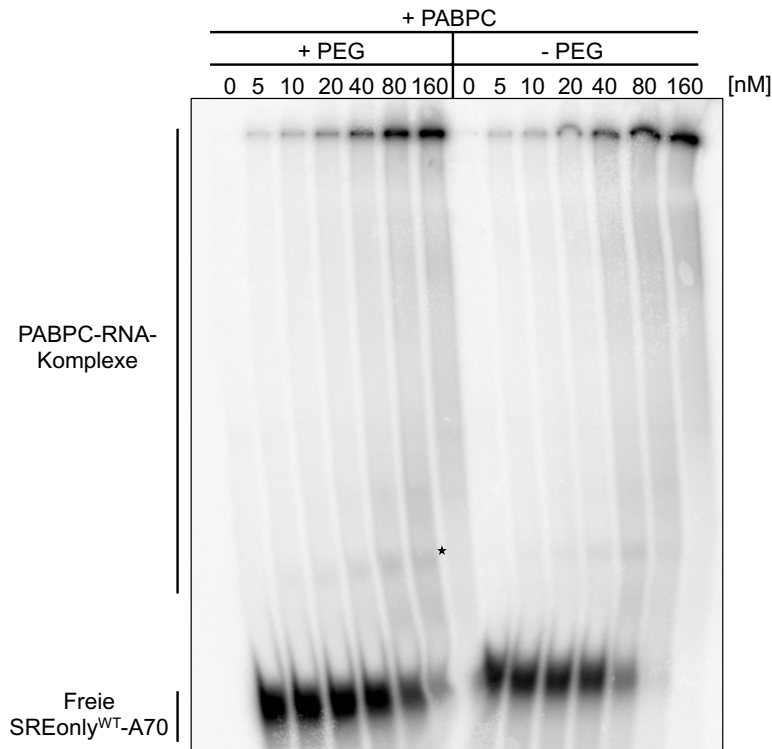
**Abbildung 2.37: Schwächere Stimulierung der Deadenylierung für die A70-RNA durch PABPC.**

Autoradiogramm eines denaturierenden Harnstoff-PA-Gels mit den Produkten der Deadenylierungsreaktionen. 5 nM radioaktiv markierte SRE<sup>WT</sup>-A70-RNA wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an PABPC (0 bis 80 nM) oder Reaktionspuffer vorinkubiert und die Deadenylierung durch Zugabe von 0,5 nM <sup>Dm</sup>CCR4-NOT<sub>MINI</sub> initiiert. Die Deadenylierung wurde für 5 bis 45 Minuten ausgeführt. Links sind die Laufhöhen eines Größenstandards in Nukleotiden angegeben und rechts die vom Substrat (A70) und Produkt (A0). Die entsprechenden Reaktionszeitpunkte und PABPC-Konzentrationen sind über den jeweiligen Spuren markiert. „PABPC“ ist hier die Reaktion mit 80 nM PABPC und ohne CCR4-NOT. Der Input beinhaltet die jeweils aufgetragene Menge an Substrat-RNA im Deadenylierungspuffer.

Für die Reaktion nur mit CCR4-NOT war kaum Deadenylierung zu detektieren, wohingegen mit steigenden PABPC-Konzentrationen eine Erhöhung der Deadenylierungsaktivität zu beobachten war. Das Maximum wurde, wie für die kurze RNA, mit einem 8-fachen Überschuss erreicht (bei 40 nM) und zeigte hier nach 15 Minuten bereits vollständig deadenyliertes Produkt. Insgesamt war auch eine kontinuierliche Deadenylierung vom Substrat zum vollständig deadenylierten Produkt (vor allem nach 45 Minuten), mit gleichzeitig nicht umgesetztem Substrat, zu beobachten. Die Reaktion ohne CCR4-NOT zeigte keine Deadenylierung, so dass PABPC keine Nukleasekontamination aufwies.

Somit konnte gezeigt werden, dass *Drosophila*-PABPC auch die Deadenylierung von Substrat-RNA mit längerem Poly(A)-Schwanz stimuliert, welcher hier eine vergleichbare Länge zu den *in vivo* vorliegenden Poly(A)-Schwänzen (ca. 73 nt mittlere poly(A)-Länge in *Drosophila*-Embryonen) aufweist, die allerdings einem *steady-state* Zustand entsprechen (Eisen et al., 2020; Lim et al., 2016). Die Deadenylierungsaktivität ist im Vergleich zur FAM-7mer-A20-RNA (vgl. Abbildung 2.35) für keine der eingesetzten PABPC-Konzentrationen deutlich erhöht und ist verglichen mit der Smaug- und Cup-abhängigen Deadenylierung (Abbildung 2.15 und Abbildung 2.26) deutlich schwächer. Möglicherweise wird hier ein PABPC-RNA-Komplex, wie bei der FAM-7mer-RNA, sehr langsam nahezu vollständig deadenyliert, bis die Substrat-RNA zu wenige Adenylate für eine Bindung zu PABPC hat.

Da hier die eingesetzte Menge an PABPC auch nicht in dem erwarteten Verhältnis von 2:1 zur Substrat-RNA stand, wurde wie auch für die kurze FAM-7mer-RNA ein EMSA mit der SRE<sup>WT</sup>-RNA durchgeführt, um die Anzahl der PABPC-Moleküle pro RNA-Molekül zu bestimmen (Abbildung 2.38).

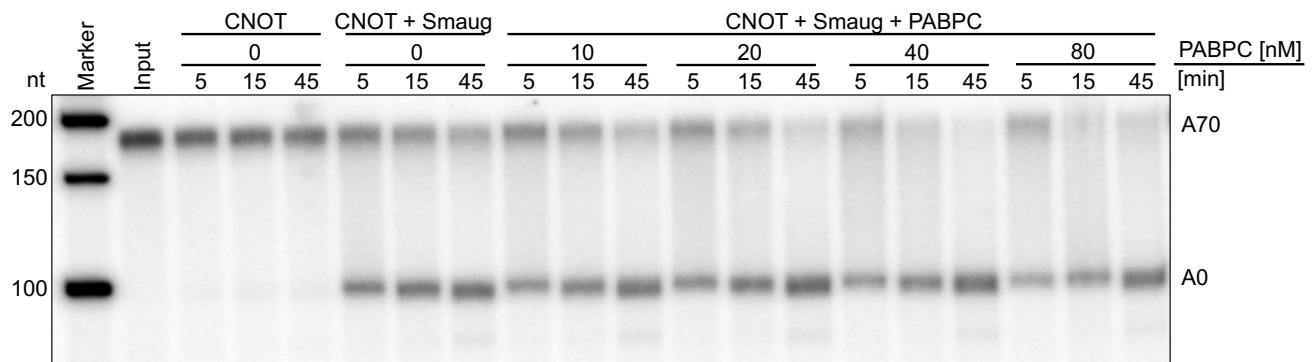


**Abbildung 2.38: Höhere Konzentrationen an PABPC werden zur Bindung der SRE-A70-RNA benötigt.** Autoradiogramm eines nichtdenaturierenden PA-Gels zur Auftrennung der Protein-RNA-Komplexe nach erfolgter Bindungsreaktion. Die SRE-A70-RNA (5 nM) wurde mit den angegebenen Konzentrationen an PABPC (von 0 bis 160 nM) und mit oder ohne PEG 20.000 für 20 Minuten bei 25 °C inkubiert. Daraufhin wurden die RNA-Protein-Komplexe durch eine nichtdenaturierende Gelelektrophorese bei 200 V und Raumtemperatur aufgetrennt. Über den Spuren sind die jeweiligen PABPC-Konzentrationen und die Zugabe von PEG angegeben. Links wurden die Positionen der freien Substrat-RNA und der PABPC-gebundenen RNA kenntlich gemacht. Die mit dem Stern gekennzeichnete Bande stellt wahrscheinlich ein gebundenes PABPC pro RNA-Molekül dar.

Hier konnte mit einem äquimolaren Verhältnis aus PABPC (5 nM) und SRE<sup>WT</sup>-RNA keine vollständige Bindung der RNA erreicht werden, wie bereits für die FAM-7mer-RNA beobachtet. Erst ab 160 nM (einem 32-fachen Überschuss zur Substrat-RNA) lag eine vollständige Bindung vor. Da ein Großteil der gebundenen RNA in den Geltaschen verblieb, ist eine Einschätzung der Anzahl an PABPC-Molekülen schwierig. Vermutlich stellt die mit dem Stern gekennzeichnete Bande ein PABPC pro RNA-Molekül dar, da diese bereits bei den niedrigsten PABPC-Konzentrationen auftrat. Sie zeigte ab 40 nM die maximale Intensität, welches auch der höchsten Aktivität im Deadenylierungsassay (vgl. Abbildung 2.37) entsprach. Höhere Konzentrationen an PABPC, bei denen mehr RNA-Bindung vorlag, zeigten keine gesteigerte Deadenylierungsaktivität (Daten nicht gezeigt).

#### 2.2.4.10 Der Einfluss von PABPC auf die Smaug-abhängige Deadenylierung

Da *in vivo* ein Großteil der Poly(A)-Schwänze mit PABPC bedeckt sind und dieses Protein auch in einem SRE-abhängigen *pulldown* aus *Drosophila*-Embryoextrakten angereichert werden konnte (Götze et al., 2017), wird im nachfolgenden der Einfluss von PABPC auf die Smaug-abhängige, SRE-spezifische Deadenylierung untersucht. Dazu wurde die SRE<sup>WT</sup>-RNA entweder nur mit Smaug oder noch zusätzlich mit PABPC vorinkubiert, beginnend mit einem 2-fachen Überschuss zur Substrat-RNA, und die Deadenylierung wurde durch Zugabe von D<sup>m</sup>CCR4-NOT<sub>MINI</sub> gestartet (Abbildung 2.39).



**Abbildung 2.39: Die Smaug-abhängige Deadenylierung wird durch PABPC geringfügig stimuliert.**

Autoradiogramm eines denaturierenden Harnstoff-PA-Gels mit den Produkten der Deadenylierungsreaktionen. 5 nM radioaktiv markierte SRE<sup>WT</sup>-A70-RNA wurden zuerst mit 30 nM Smaug oder Reaktionspuffer für 20 Minuten vorinkubiert und danach unterschiedliche Konzentrationen an PABPC (0 bis 80 nM) für weitere 20 Minuten zugegeben. Die Deadenylierung wurde durch Zugabe von 0,5 nM D<sup>m</sup>CCR4-NOT<sub>MINI</sub> initiiert und für 5 bis 45 Minuten ausgeführt. Links sind die Laufhöhen eines Größenstandards in Nucleotiden angegeben und rechts die vom Substrat (A70) und Produkt (A0). Die entsprechenden Reaktionszeitpunkte, PABPC-Konzentrationen und Proteinmischungen sind über den jeweiligen Spuren markiert. Der Input beinhaltet die jeweils aufgetragene Menge an Substrat-RNA im Deadenylierungspuffer.

Für die Reaktion nur mit Smaug und CCR4-NOT war wie bisher eine rapide Deadenylierung zu beobachten. Die Reaktion mit 40 nM PABPC, die Konzentration, bei der im vorherigen Deadenylierungsexperiment die höchste Aktivität erzielt wurde (vgl. Abbildung 2.37), zeigte auch hier die stärkste Stimulierung beim Vergleich der Deadenylierung zum Endzeitpunkt (45 Minuten). Jedoch trat hier zu Beginn eine leicht reduzierte vollständige Deadenylierung im Vergleich zur nur Smaug enthaltenden Reaktion auf, mit etwas mehr Intermediaten. Demnach scheint die Smaug-abhängige Deadenylierung durch PABPC überwiegend nicht gestört zu werden. So konnte auch für andere RBPs wie z.B. das humane, *S. pombe*- und *Drosophila*-Pumilio gezeigt werden, dass es den CCR4-NOT-Komplex zu bestimmten mRNAs rekrutiert und die Deadenylierung trotz Anwesenheit von PABPC stattfinden kann (Arvola et al., 2020; Webster et al., 2019; Weidmann et al., 2014).



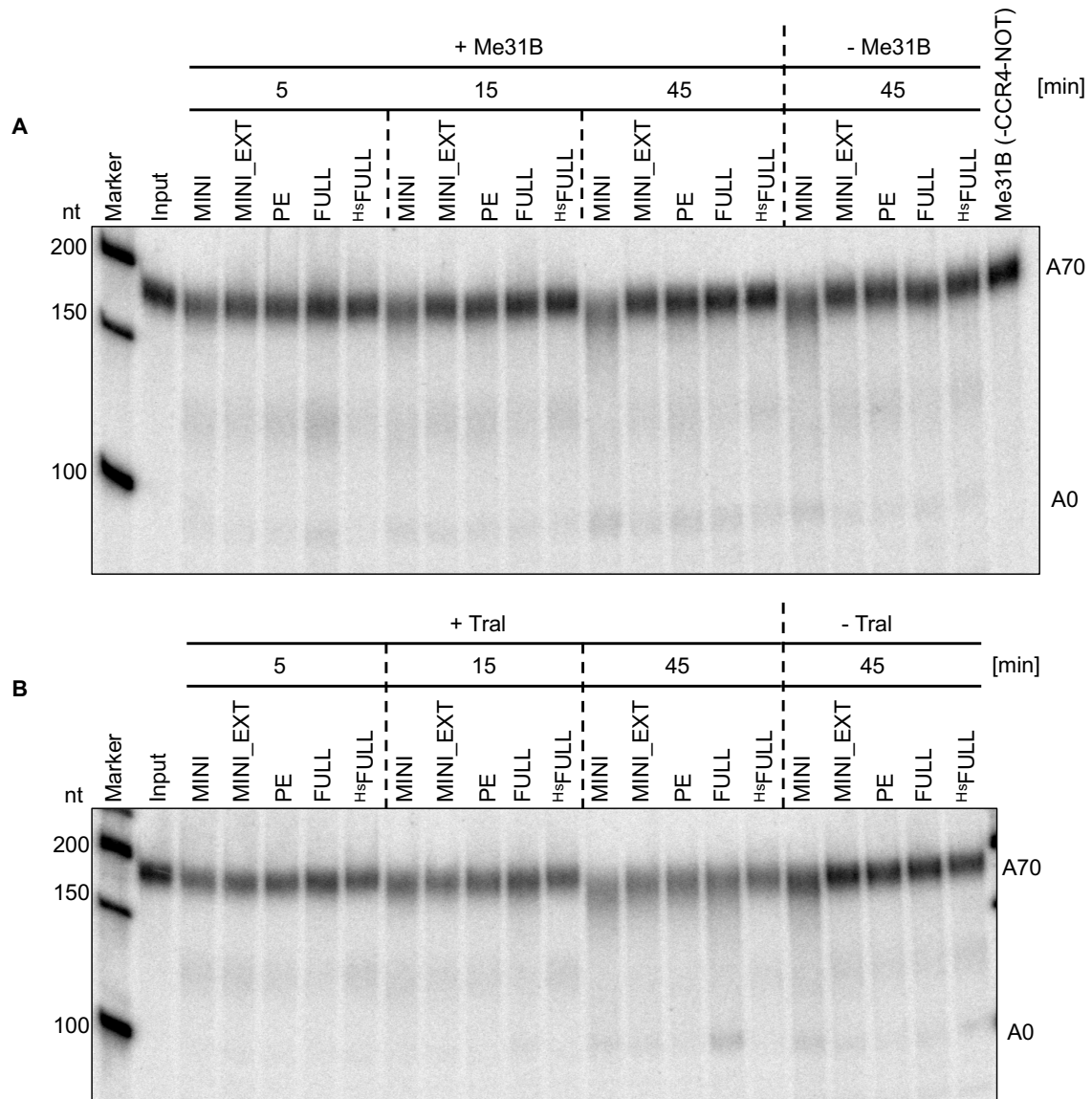
#### 2.2.4.11 Me31B und Tral in der Deadenylierung

Für Me31B und seine Orthologe konnte in verschiedenster Weise gezeigt werden, dass sie vor allem in der Translationsrepression (Coller & Parker, 2005; Hanet et al., 2019; Nakamura et al., 2004; M. Wang et al., 2017) und im mRNA-Abbau, speziell dem Decapping (Jonas & Izaurralde, 2013; Radhakrishnan et al., 2016; Radhakrishnan & Green, 2016), eine entscheidende Funktion ausüben. Wie bereits in Abschnitt 2.2.4 beschrieben, konnte für das humane ME31B-Ortholog DDX6 eine direkte Interaktion mit der MIF4G-Domäne von NOT1 detektiert werden. Dies lässt eine Rolle in der Deadenylierung vermuten (Mathys et al., 2014; Ozgur et al., 2015). Studien mit Dhh1p, dem Ortholog aus Hefe, zeigten einen beschleunigten Abbau von nicht Codon-optimierten mRNAs durch Dhh1p, welches allerdings dem Decapping zugeschrieben wird, da Deletionsstämme von Dhh1p keine Verschlechterung in der Deadenylierung zeigten (Radhakrishnan et al., 2016; Webster et al., 2018). Dementsprechend bleibt ein direkter Einfluss von Me31B und seinen Orthologen auf die Deadenylierung zu testen.

Weiterhin liegt im *nanos*-Repressorkomplex neben Me31B auch sein Interaktionspartner Tral vor (Götze et al., 2017; Tritschler et al., 2008, 2009), welches wie seine Orthologen auch eine Rolle in der Translationsrepression (Brandmann et al., 2018; Hara et al., 2018; Nakamura et al., 2004) und dem Decapping (Jonas & Izaurralde, 2013; Tritschler et al., 2008) hat. Hier konnte bis jetzt keinerlei direkte Assoziation mit dem CCR4-NOT-Komplex beobachtet werden.

Für ein erstes Experiment wurden dementsprechend sämtliche Varianten des <sup>Dm</sup>CCR4-NOT-Komplexes auf eine Stimulierung durch Me31B oder Tral getestet. Dazu wurde die SRE<sup>MUT</sup>-RNA entweder mit Me31B oder Tral vorinkubiert und die Deadenylierung durch Zugabe der unterschiedlichen <sup>Dm</sup>CCR4-NOT-Subkomplexe und des humanen „Full“ CCR4-NOT-Komplexes gestartet (Abbildung 2.40).

Weder für Me31B noch für Tral ließ sich hier eine Stimulierung oder Inhibierung der Deadenylierung ausmachen. Die leichte Stimulierung durch Tral mit dem <sup>Dm</sup>CCR4-NOT-FULL (Abbildung 2.40.B) konnte nicht reproduziert werden. Auch eine Kombination aus Me31B und Tral führte zu keiner Veränderung der Reaktion (Daten nicht gezeigt).

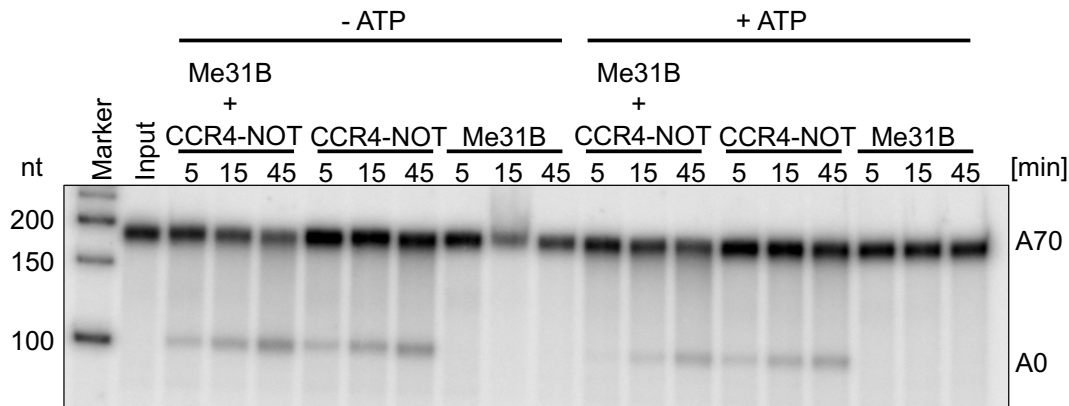


**Abbildung 2.40: Me31B und Tral zeigen keine Stimulierung der Deadenylierung.**

**A und B:** Autoradiogramme von denaturierenden Harnstoff-PA-Gelen mit den Produkten der Deadenylierungsreaktionen. Es wurden 5 nM radioaktiv markierte SRE<sup>WT</sup>-A70-RNA mit 40 nM Me31B (**A**), 40 nM Tral (**B**) oder Reaktionspuffer vorinkubiert und die Deadenylierung durch Zugabe der entsprechenden Subkomplexe (1 nM für „FULL“, „PE“, „MINI\_EXT“ und „MINI“; 5 nM für humanen „FULL“ (H<sup>s</sup>FULL)) gestartet. Links sind die Laufhöhen eines Größenstandards in Nukleotiden angegeben und rechts die Laufhöhe vom Substrat (A70) und Produkt (A0). Die entsprechenden Proteinmischungen und Reaktionszeitpunkte sind über den jeweiligen Spuren markiert. Der Input beinhaltet die jeweils aufgetragene Menge an Substrat-RNA im Deadenylierungspuffer

Nachfolgend wurde mit Me31B noch ein Experiment mit und ohne ATP (sowie ohne tRNA) durchgeführt, da zumindest für das humane Ortholog DDX6 eine Aktivierung der ATPase-Aktivität nach Assoziation mit der MIF4G-Domäne von NOT1 zu sehen ist (Mathys et al., 2014). Dazu wurde Me31B entweder mit oder ohne ATP mit der SRE<sup>WT</sup>-RNA vorinkubiert und die Deadenylierung durch Zugabe des humanen „Full“-Komplexes gestartet, in einer Konzentration, die eine detektierbare basale Deadenylierungsaktivität erlaubt (Abbildung

2.41). Der humane Komplex wurde gewählt, da dieser zumindest mit DDX6 eine Interaktion zeigte (Mathys et al., 2014; Ozgur et al., 2015). Die SRE<sup>WT</sup>-RNA wurde hier eingesetzt, da die SRE<sup>MUT</sup>-RNA mit dem humanen Komplex eine hohe Hintergrundaktivität zeigte (vgl. Abbildung 2.4).



**Abbildung 2.41: Me31B zeigt eine Inhibierung der Deadenylierung unter Zugabe von ATP.**

Autoradiogramm eines denaturierenden Harnstoff-PA-Gels mit den Produkten der Deadenylierungsreaktionen. 20 nM radioaktiv markierte SRE<sup>WT</sup>-A70-RNA wurden mit 160 nM Me31B oder Reaktionspuffer vorinkubiert und die Deadenylierung der entsprechenden Reaktionen durch Zugabe von 10 nM humanem CCR4-NOT<sub>FULL</sub> gestartet. Die Deadenylierung wurde für 5 bis 45 Minuten ausgeführt. Links sind die Laufhöhen eines Größenstandards in Nukleotiden angegeben und rechts die Laufhöhe vom Substrat (A70) und Produkt (A0). Die Reaktionszeitpunkte, entsprechenden Proteinmischungen und die Zugabe von ATP (0,8 mM) sind über den jeweiligen Spuren markiert. Der Input beinhaltet die jeweils aufgetragene Menge an Substrat-RNA im Deadenylierungspuffer

Es war für sämtliche Reaktionen mit humanem CCR4-NOT zu allen Zeitpunkten eine vollständige Deadenylierung der Substrat-RNA zu sehen. In der Reaktion ohne ATP war kein Unterschied in der Deadenylierungsaktivität mit und ohne Me31B zu beobachten, wohingegen bei der Reaktion mit ATP, Me31B und CCR4-NOT eine zu Beginn etwas langsamere Deadenylierung auftrat. Die Reaktion nur mit CCR4-NOT zeigte keinen Unterschied mit und ohne ATP.

Demnach scheint die Zugabe von ATP zumindest in der basalen Deadenylierung keine wichtige Rolle zu spielen, was auch in einer anderen Studie für den *Drosophila*-Komplex in Embryoextrakten beobachtet werden konnte (Niinuma & Tomari, 2017). Die Zugabe von ATP scheint mittels Me31B zu einer marginalen Inhibierung der Deadenylierung zu führen. Für das *S. cerevisiae*-Ortholog Dhh1 konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von ATP und RNA zur Bildung von *liquid droplets* aus Dhh1-RNA-Komplexen und einer Phasentrennung führt (Mugler et al., 2016). Diese *liquid droplets* konnten nach Zugabe von Not1 wieder aufgelöst werden, indem durch die Bindung zu NOT1 die ATPase-Aktivität von Dhh1 aktiviert wird (Mathys et al., 2014; Mugler et al., 2016). Demnach könnte der ATP-ME31B-RNA-Komplex möglicherweise in *liquid droplets* vorliegen, die vermutlich ein ungünstiges

Milieu für die Deadenylierungsaktivität des CCR4-NOT darstellen und aufgelöst werden müssen. Die hier eingesetzte Me31B-Konzentration lag allerdings zehnfach unter der niedrigsten Dhh1-Konzentration, für die *liquid droplets* beobachtet wurden. Daher gilt es diese Vermutung, z.B. durch mikroskopische Aufnahmen der Komplexe, zu beweisen.

#### 2.2.4.12 RBPs führen vermutlich *in vivo* zu variierenden Deadenylierungsraten

In Fibroblasten aus Mäusen konnte beobachtet werden, dass die Rate der Deadenylierung sich für verschiedene mRNAs bis zu 1000-fach unterscheidet (Eisen et al., 2020). So wurde auch in dieser Arbeit beim Vergleich der Smaug- oder PABPC-stimulierten Deadenylierungsaktivität für die gleiche Substrat-RNA ein sehr großer Unterschied beobachtet (Abbildung 2.39). Auch für andere RBPs, wie z.B. *S. pombe*-Puf3 und -Zfs, trat eine im Vergleich zu PABPC deutlich stärkere Stimulierung der Deadenylierungsaktivität auf (Webster et al., 2019). Inwiefern sich aus diesen RBP-CCR4-NOT-Interaktionen unterschiedliche Deadenylierungsraten ergeben, bleibt noch mechanistisch zu klären. Generell enthalten die RBPs, die eine starke Stimulierung der Deadenylierung zeigen, intrinsisch ungeordnete Bereiche, welche für die Interaktion mit dem CCR4-NOT-Komplex wichtig sind (Jonas & Izaurralde, 2013; Raisch et al., 2016; Webster et al., 2019). Vermutlich wird über diese Bereiche die Assoziation und Dissoziation des Komplexes reguliert, sodass dies direkt einen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Deadenylierung hat.

Weiterhin konnte in derselben Studie mit den Fibroblasten aus Mäusen gezeigt werden, dass sich die Rate des mRNA-Abbaus für gleichweit deadenylierte mRNAs bis zu 1000-fach unterscheidet, je nachdem ob sie rapide oder langsam deadenyliert wurden (Eisen et al., 2020). Die rapide deadenylierten mRNAs zeigten dabei eine kurze Halbwertszeit. Vermutlich wird ein Großteil dieser schnell abgebauten mRNAs in mRNPs enthalten sein, wie die *nanos*-mRNA, wo weitere Proteine die mRNA-Abbaumaschinerie rekrutieren, z.B. Me31B und Tral den Decapping-Komplex (Ozgur et al., 2015; Tritschler et al., 2008).

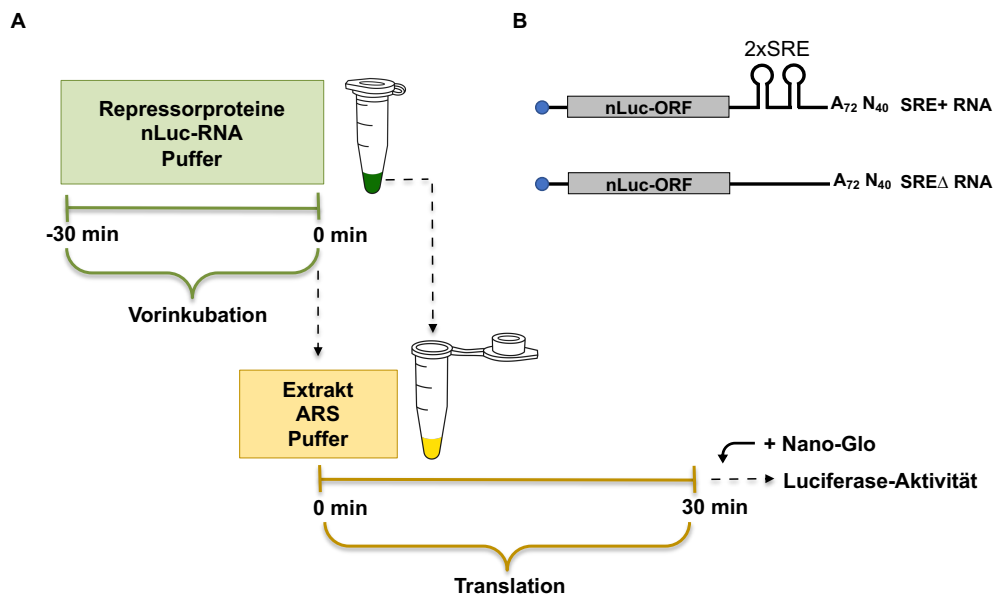
Insgesamt wird Smaug durch die Rekrutierung des CCR4-NOT-Komplexes sehr wahrscheinlich auch *in vivo* die relativ schnelle vollständige Deadenylierung und den damit einhergehenden Abbau der *nanos*-mRNA bewirken (Jeske et al., 2006; Zaessinger et al., 2006). Diese Interaktion scheint auch im humanen CCR4-NOT-Komplex konserviert zu sein, sodass vermutlich die humanen Smaug-Orthologe SAMD4A und SAMD4B eine ähnliche Funktion ausüben.

## 2.3 Rekonstitution der *nanos*-Translationsrepression

Alle in Abschnitt 1.2.2 und Abbildung 1.6 beschriebenen Repressorkandidaten wurden *in vitro* auf ihre Rolle in der Translationsrepression der *nanos*-mRNA getestet. Die hier verwendeten Proteinpräparationen entsprachen denen aus Abschnitt 2.1.

### 2.3.1 Etablierung eines Testsystems für die Translationsrepression

Aus den anfänglichen Experimenten mit dem *Drosophila*-Embryoextrakt (DEE) ist bekannt, dass die Bildung des Repressorkomplexes zeitabhängig und der Komplex kinetisch stabil ist (Jeske et al., 2011). Demnach konnte ein zweistufiger Assay etabliert werden, bei dem zuerst die Bildung des Repressorkomplexes auf einer Reporter-RNA in einer Vorinkubation rekonstituiert wurde. Nachfolgend wurde ein Teil dieser Reaktion in einen separaten Translationsmix verdünnt, in dem die Translationsreaktion in einem zellfreien Translationsextrakt gestartet wurde (Abbildung 2.42).

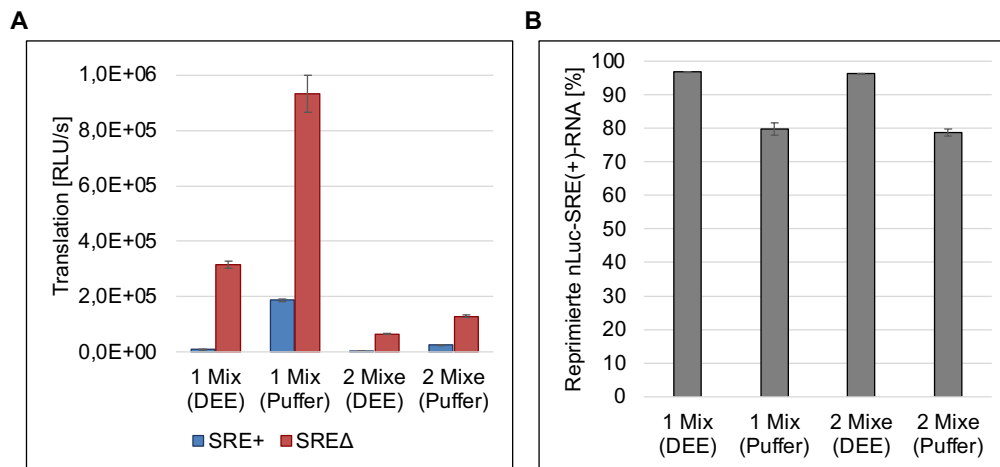


**Abbildung 2.42:** Schema des zweistufigen Translationsassays.

**A:** Die Repressorproteine wurden mit der Reporter-RNA (nLuc-RNA) im Translationspuffer für ca. 30 Minuten vorinkubiert. Danach wurde ein Teil dieser Reaktion in ein separates Reaktionsgefäß mit dem Translationsmix, bestehend aus zellfreiem Translationsextrakt und ATP-regenerierendem System (ARS), in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt. Die Translation wurde hier, falls nicht anders angegeben, für 30 Minuten durchgeführt. Die Aktivität der translatierten Nanoluciferase wurde durch Zugabe von Nano-Glo<sup>®</sup> unter Emission von Photonen detektiert. **B:** Die überwiegend verwendeten Reporter-RNAs zur Untersuchung der *nanos*-Translationsrepression. Am 5'-Ende befindet sich die Cap-Struktur (blauer Punkt), gefolgt von dem Nanoluciferase-ORF und dem SRE-enthaltenden Teil der *nanos*-3'-UTR (SRE+) oder einer zufälligen Abfolge von Nukleotiden (SREΔ). Am 3'-Ende befindet sich ein 72 Adenylate langer interner Poly(A)-Schwanz, welchem nachfolgend noch 40 zufällige Nukleotide angehängt wurden.

Dieser Reaktionsablauf war nötig, da durch die zu testenden Repressorproteine hohe Konzentrationen an Salz eingeführt wurden, welche bei direkter Zugabe zum zellfreien Translationsextrakt die Translationseffizienz deutlich reduziert hätten. Durch die Überführung einer kleinen Menge des vorgebildeten Repressorkomplexes in die Translationsreaktion konnte die Salzkonzentration beträchtlich gesenkt werden.

Der Einfluss dieses Reaktionsablaufs auf die Repressionseffizienz wurde zunächst mit DEE untersucht, indem dieser entweder nach dem ursprünglichen Protokoll (Jeske et al., 2011) in nur einer Reaktionsmischung oder nach dem zweistufigen Protokoll inkubiert wurde (Abbildung 2.43). Der DEE diente hier auch als Translationsextrakt.



**Abbildung 2.43: Das zweistufige Translationssystem zeigt identische Repressionseffizienz.**

Die Repressionseffizienz des DEEs wurde entweder in einer Reaktionsmischung (1 Mix) oder dem zweistufigen Assay (2 Mixe) untersucht. Dazu wurden die nLuc-SRE(+)- oder nLuc-SRE(Δ)-RNA (je 1 nM) mit DEE (40 % [v/v]) oder Translationspuffer vorinkubiert und nachfolgend wurde für die 1 Mix-Reaktion die Translation durch Zugabe von ARS gestartet, wohingegen beim zweistufigen Assay die Translation durch Zugabe der vorinkubierten Reporter-RNA (2 μl) zum Translationsmix (18 μl) initiiert wurde. Nach 30 Minuten wurde die Luciferase-Aktivität durch Zugabe von Nano-Glo® bestimmt. Unter den entsprechenden Balken ist angegeben, womit die Reporter-RNA vorinkubiert wurde und welches Assayschema verwendet wurde. **A:** Die direkten Translationswerte in RLU/s. **B:** Verhältnis der Luciferase-Aktivität als Prozent Repression für die SRE(+)-RNA zur SRE(Δ)-RNA in den jeweiligen Proben. n = 3.

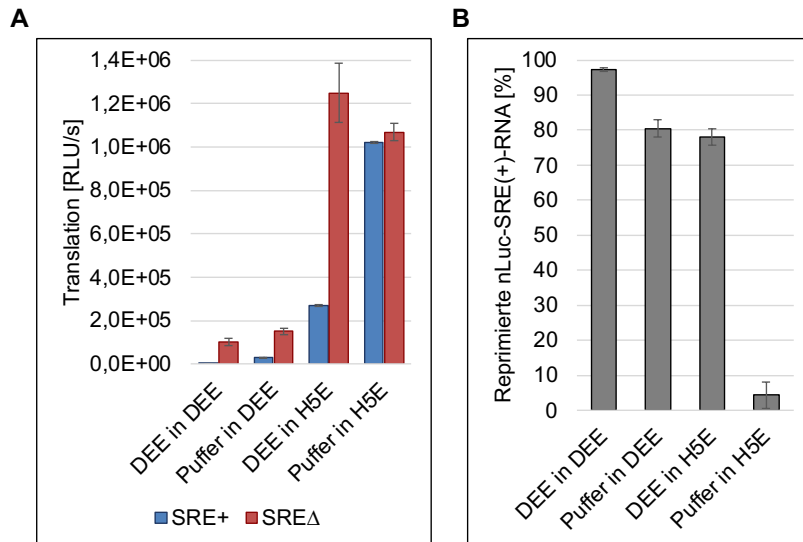
Hier war für beide Reaktionen nach Vorinkubation mit DEE eine deutlich niedrigere Translation von SRE(+)- als auch SREΔ-RNA im Vergleich zur Vorinkubation mit Translationspuffer zu beobachten. Weiterhin trat in sämtlichen Reaktionen eine deutlich geringere Translation der SRE(+)-RNA auf (Abbildung 2.43.A). Diese war in beiden Protokollen nach Vorinkubation mit DEE um ca. 95 % niedriger als die der SREΔ-RNA und auch die Vorinkubation mit Puffer zeigte für beide Reaktionsabläufe eine um 80 % geringere Translation (Abbildung 2.43.B). Daher wurde auch in den Reaktionen ohne Vorinkubation eine recht effiziente Repressorkomplexbildung bewerkstelligt. Dies war zu erwarten, da der DEE als Translationsextrakt verwendet wurde, in welchem sämtliche Repressorproteine enthalten waren.

Mit diesem Experiment konnte also gezeigt werden, dass die Repressionseffizienz für die SRE-haltige RNA für beide Protokolle identisch ist. Demnach hat die Verdünnung keinen negativen Einfluss auf den vorgebildeten Repressorkomplex und der zweistufige Assay wurde für die nachfolgenden Experimente beibehalten. Die niedrigere Translation für beide RNAs nach Inkubation mit DEE konnte auch in früheren Experimenten beobachtet werden und ist durch unspezifischen Abbau der RNA bedingt (Jeske et al., 2011). Dieser Abbau variierte mit den DEE-Chargen. Weiterhin ist in diesem Experiment ein maßgebliches Problem für die Rekonstitution der SRE-abhängigen Translationsrepression zu erkennen. Auch für die nur mit Puffer vorinkubierte SRE-haltige RNA bildet sich nach Zugabe des Translationsextraktes (DEE) eine recht stark ausgeprägte Repression aus, die bei ca. 80 % liegt und damit nur geringfügig unter der mit DEE vorinkubierten RNA (ca. 95 %) ist. Dementsprechend existiert hier nur ein enger Bereich, um eine weitere Stimulierung der Translationsrepression durch die zu testenden Repressorproteine zu beobachten. Außerdem scheiterten die Rekonstitutionsexperimente, in denen DEE als Translationsextrakt in dem zweistufigen Assay benutzt wurde, weil das mit den Repressorproteinen eingeführte Salz die basale Repressionsaktivität des DEE steigerte (vgl. Anhang Abbildung 9.6). Demnach musste nach einem System gesucht werden, welches in Abwesenheit zugesetzter Repressorproteine keine basale SRE-spezifische Repression zeigt.

### 2.3.1.1 Einsatz von SRE-unspezifischen Translationsextrakten

Da Smaug hauptsächlich erst in den frühen Stadien der Embryonalentwicklung translatiert und nach der Embryogenese abgebaut wird (Cao et al., 2020; Dahanukar et al., 1999), sollten zellfreie Translationsextrakte aus früheren oder späteren Entwicklungsstadien (z.B. S2-Zellen) keine SRE-Spezifität zeigen. Außerdem wurden Zelllinien anderer Organismen, wie z.B. ovariale Zelllinien von *Trichoplusa ni* (High-Five-Zellen) und *Spodoptera frugiperda* (Sf21-Zellen), benutzt, um die Möglichkeit einer basalen SRE-spezifischen Reduktion noch weiter zu reduzieren. Die Zellextrakte wurden auf ihre Translationsaktivität und das Fehlen einer SRE-abhängigen Aktivität untersucht. Dazu wurde im Vergleich zum DEE exemplarisch der High-Five-Extrakt (H5E) als Translationssystem verwendet (Abbildung 2.44).

Dem Experiment ist zu entnehmen, dass für die mit Translationspuffer vorinkubierten und in DEE translatierten Reporter-RNAs die SRE-haltige RNA wie zuvor um 80 % reprimiert wurde. Dagegen trat bei Translation im H5E mit ca. 4 % keine signifikante SRE-spezifische Repression auf (Abbildung 2.44.B).



**Abbildung 2.44: H5E zeigt keine SRE-Spezifität und inhibiert nicht die *nanos*-Translationsrepression.** Die nLuc-SRE(+)- oder nLuc-SRE( $\Delta$ )-RNA (je 1 nM) wurden entweder mit DEE (40 % [v/v]) oder Translationspuffer vorinkubiert. Nachfolgend wurde die vorinkubierte Reporter-RNA (2  $\mu$ l) zum entsprechenden Translationsmix mit DEE oder H5E zugegeben. Nach 30 Minuten Translation wurde die Luciferase-Aktivität durch Zugabe von Nano-Glo<sup>®</sup> bestimmt. Unter den entsprechenden Balken ist angegeben, womit die Reporter-RNA vorinkubiert wurde und in welchem Translationsextrakt die Translation stattfand. **A:** Die direkten Translationswerte in RLU/s. **B:** Verhältnis der Luciferase-Aktivität als Prozent-Repression für die SRE(+)-RNA zur SRE( $\Delta$ )-RNA in den jeweiligen Proben. n = 3.

Wenn jedoch die RNA mit DEE vorinkubiert wurde, zeigte sich in beiden Translationsextrakten eine SRE-spezifische Repression, für die Translation mit DEE bei ca. 97 % und für H5E bei ca. 78 %. Die Gesamttranslation der mit DEE vorinkubierten Reporter-RNA war im H5E deutlich höher als im DEE.

Hiermit wurde die Annahme bestätigt, dass der aus einer ovariellen Zelllinie stammende H5E keine SRE-spezifische Aktivität zeigen sollte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der durch Vorinkubation mit DEE auf der SRE-haltigen RNA gebildete Repressorkomplex auch in H5E reprimierend wirkt und die basale Translation im H5E durch Zugabe vom DEE nicht gesenkt wurde (vgl. Abbildung 2.44.A). Insgesamt fällt die SRE-spezifische Translationsrepression im H5E im Vergleich zum DEE etwas geringer aus. Die Repression bei Vorinkubation mit DEE und Translation in H5E entspricht nahezu der für die Vorinkubation mit Puffer und Translation in DEE. Dies lässt vermuten, dass die Bildung des Repressorkomplexes in der Vorinkubation möglicherweise noch nicht abgeschlossen ist und im Translationsextrakt weiter abläuft. Eine weitere Möglichkeit wäre eine Aufhebung der Repression durch den H5E, welches im Folgenden durch eine ausgedehnte Translationskinetik untersucht wurde (vgl. Abschnitt 2.3.2.1).



Außerdem könnten *Drosophila*-spezifische Interaktionen zu bestimmten Proteinen oder anderen Biomolekülen für eine nahezu vollständige Repression notwendig sein.

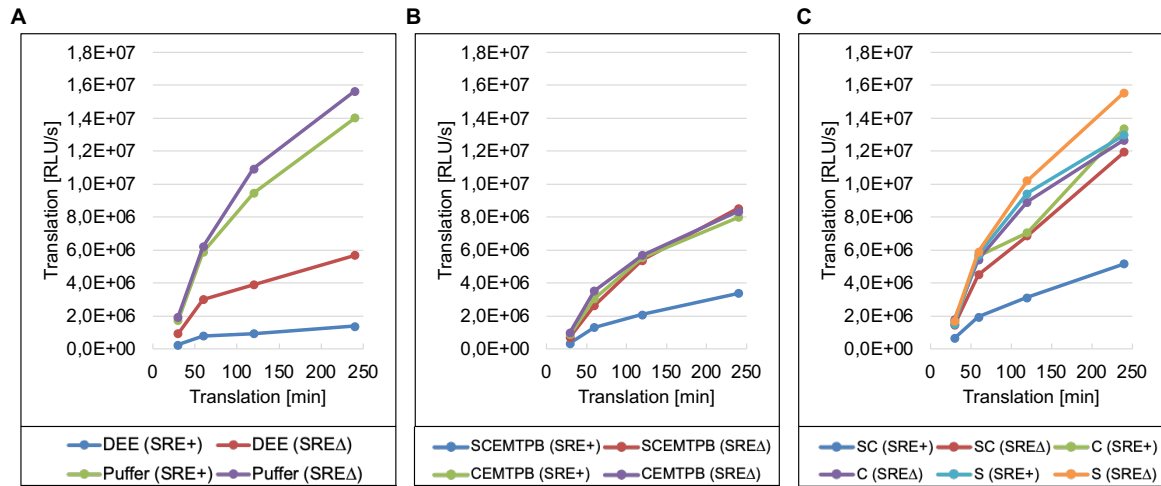
Trotz der etwas geringeren Repression eignet sich der H5E auf Grund seiner fehlenden SRE-Spezifität für die Rekonstitution der SRE-abhängigen Translationsrepression mit den rekombinanten Repressorproteinen. Für die anderen getesteten Translationsextrakte ergaben sich ähnliche Ergebnisse, jedoch mit noch niedrigerer SRE-spezifischer Repression nach Vorinkubation mit DEE. Insgesamt zeigte der H5E die höchsten Translationsausbeuten und mit bis zu 4 Stunden die längste Translationsaktivität (Daten nicht gezeigt), sodass dieser überwiegend für die nachfolgenden Experimente verwendet wurde.

## **2.3.2 Rekonstitution der SRE-spezifischen Translationsrepression**

### **2.3.2.1 Smaug und Cup sind nötig für die SRE-spezifische Translationsrepression**

Mit dem etabliertem H5E, welcher keine basale SRE-spezifische Aktivität zeigte, konnten nun die Repressorproteine auf ihre Funktion in der *nanos*-Translationsrepression untersucht werden. Dazu wurden die Reporter-RNAs mit unterschiedlichen Kombinationen der Repressorproteine und entweder mit oder ohne Smaug vorinkubiert (Abbildung 2.45). Als positive und negative Kontrollen dienten die Inkubationen mit DEE oder Puffer. Weiterhin wurde eine Translationskinetik von 30 bis 240 Minuten durchgeführt, um die Stabilität des gebildeten Repressorkomplexes zu beurteilen.

Wie zuvor wurde für die nur mit Puffer vorinkubierte RNA keine SRE-spezifische Repression beobachtet, wohingegen die mit DEE vorinkubierte SRE-haltige RNA zu 70 bis 80 % über vier Stunden reprimiert blieb (Abbildung 2.45.A). Aus der Rekonstitution der Translationsrepression war zu entnehmen, dass mit sämtlichen sieben Repressorproteinen eine ähnliche Translationsrepression der SRE-haltigen RNA (ca. 60 bis 70 %) zu der mit dem DEE erreicht wurde (blaue Kurve; Abbildung 2.45.B). Diese war Smaug-abhängig und blieb über 4 Stunden stabil. Die Kombination aus Smaug und Cup in der Vorinkubationsreaktion war ausreichend, um eine ähnlich hohe Repression (ca. 60 bis 70 %) zu erzielen (Abbildung 2.45.C). Dies wurde nicht durch Smaug oder Cup allein erreicht. Für die Reaktionen mit DEE und allen sechs bzw. sieben Repressorproteinen war außerdem eine unspezifische Translationsrepression zu beobachten.



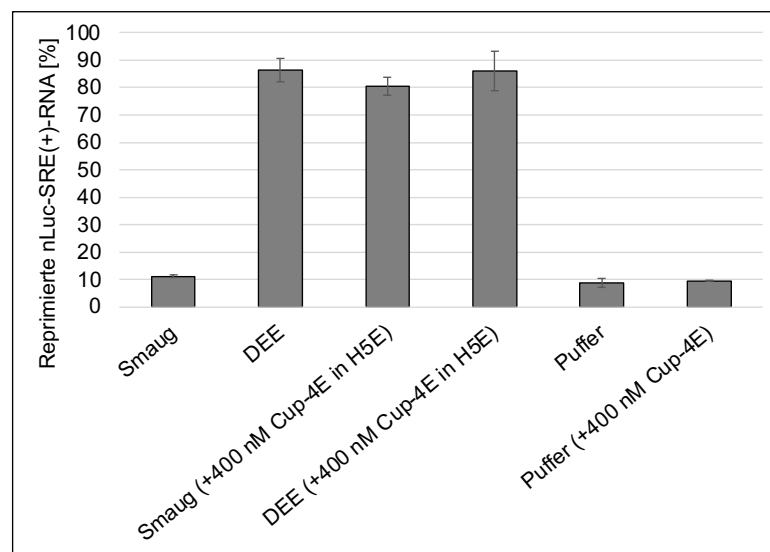
**Abbildung 2.45: Smaug und Cup sind essenziell für die SRE-spezifische Translationsrepression.**

Die nLuc-SRE(+)- oder nLuc-SRE( $\Delta$ )-RNA (je 1 nM) wurden mit **A**: DEE (40 % [v/v]) oder Translationspuffer, **B**: den 7 Repressorproteinen mit und ohne Smaug (als Einbuchstabencode) oder **C**: nur Smaug, Cup oder mit Smaug und Cup vorinkubiert. Unter den entsprechenden Diagrammen ist angegeben womit die Reporter-RNA vorinkubiert wurde und die verwendeten Repressorproteine sind mit dem entsprechenden Anfangsbuchstaben gekennzeichnet. Es wurden je Repressorprotein ca. 20 nM eingesetzt. Nachfolgend wurde die vorinkubierte Reporter-RNA (2  $\mu$ l) zum Translationsmix mit H5E (18  $\mu$ l) zugegeben. Nach 30 bis 240 Minuten Translation wurde die Luciferase-Aktivität durch Zugabe von Nano-Glo<sup>®</sup> in RLU/s bestimmt. Ein repräsentatives Experiment von zweien. Smaug – S; Cup – C; eIF4E – E; Me31B – M; Tral – T; PABPC – P; Belle – B.

Somit konnte gezeigt werden, dass überraschenderweise von sämtlichen potenziellen Repressorproteinen nur Smaug und Cup in der Vorinkubationsreaktion notwendig waren, um einen stabilen Repressorkomplex zu bilden. Die Titration der anderen Repressorproteine ergab keinerlei Stimulierung der Translationsrepression (Daten nicht gezeigt), sodass diese entweder nicht notwendig oder nicht am langsamen Schritt der Komplexformierung beteiligt sind und möglicherweise aus dem jeweiligen Translationsextrakt rekrutiert werden. Sämtliche Repressorproteine, außer Smaug und Cup, sind ubiquitär, konserviert und in vergleichsweise hohen Konzentrationen vorhanden (Götze et al., 2017), sodass Orthologe vermutlich mit dem vorgebildeten Smaug-Cup-RNA-Komplex interagieren können. Außerdem war die niedrigere Repression im H5E im Vergleich zum DEE-Translationssystem wahrscheinlich nicht durch eine Auflösung des Repressorkomplexes im H5E bedingt, da der gebildete Repressorkomplex über 4 Stunden stabil blieb. Dies bekräftigt die Vermutung, dass im DEE auch während der Translation noch weiterer Repressorkomplex assembliert wird. Weiterhin wurde für die Reaktionen mit allen sieben Proteinen und DEE auch eine unspezifische Repression der SRE $\Delta$ -RNA beobachtet, welche möglicherweise durch RNA-Abbau zu erklären ist. Allerdings waren für die Reaktionen nur mit Smaug und Cup die Translationsaktivitäten im Vergleich zur Pufferkontrolle kaum reduziert, sodass die SRE-abhängige Repression vermutlich nicht durch RNA-Abbau zu erklären ist. In nachfolgenden Experimenten konnte

gezeigt werden, dass die Stabilität der RNA nach einer Inkubation mit Smaug und Cup unverändert blieb (Daten nicht gezeigt). Für die Reaktionen mit allen sieben Repressorproteinen wird die starke unspezifische Repression vermutlich durch Cup-4E verursacht, welches wahrscheinlich die Cap-Struktur blockiert (vgl. Abbildung 2.48). Außerdem wurde für Me31B und Tral bereits Translationsrepression beobachtet (Hara et al., 2018; M. Wang et al., 2017).

Nachfolgend wurde untersucht, ob eine Vorinkubation der Reporter-RNA nur mit Smaug für eine effiziente Repression ausreicht, wenn der Translationsextrakt (H5E) mit Cup gesättigt wurde (Abbildung 2.46). Dafür wurde eine ähnliche Konzentration an Cup (400 nM) wie im DEE (800 nM Cup im Reaktionsmix; Götze et al., (2017)) eingesetzt. Es musste das Cup-4E-Heterodimer zugegeben werden, da dieses deutlich höher konzentriert werden konnte als Cup allein. Die Mengen des zugeführten Proteinreinigungspuffers wurden hier, wie auch sonst, angeglichen, um einen Salzeffekt auszuschließen.



**Abbildung 2.46: Smaug ist in der Vorinkubation ausreichend für eine hohe SRE-spezifische Repression.** Die nLuc-SRE(+)- oder nLuc-SRE( $\Delta$ )-RNA (je 1 nM) wurden mit Smaug (20 nM), DEE (40 % [v/v]) oder Translationspuffer vorinkubiert. Nachfolgend wurde die vorinkubierte Reporter-RNA (2  $\mu$ l) zum Translationsmix mit H5E (18  $\mu$ L) zugegeben. Ein Teil der Translationsreaktionen enthielt 400 nM Cup-4E. Nach 30 Minuten Translation wurde die Luciferase-Aktivität durch Zugabe von Nano-Glo<sup>®</sup> bestimmt. Das Verhältnis der Luciferase-Aktivität wurde als Prozent-Repression für die SRE(+)-RNA zur SRE( $\Delta$ )-RNA in den jeweiligen Proben dargestellt. Unter den entsprechenden Balken ist angegeben, womit die Reporter-RNA vorinkubiert wurde, und in welche Translationsmischung die Vorinkubation gegeben wurde. n = 3.

In den Reaktionen ohne zugegebenes Cup-4E wurde wie bisher keine SRE-spezifische Repression mit der nur Smaug-enthaltenden Reaktion beobachtet, wohingegen mit dem DEE eine hohe Repression (ca. 85 %) auftrat. Durch Zugabe von Cup-4E in die Translationsreaktion wurde auch für die mit Smaug vorinkubierte RNA eine ähnliche SRE-spezifische

Repression (ca. 80 %) wie mit dem DEE erreicht. Die Zugabe von Cup-4E führte zu keiner Steigerung der Repression für die mit DEE vorinkubierte RNA.

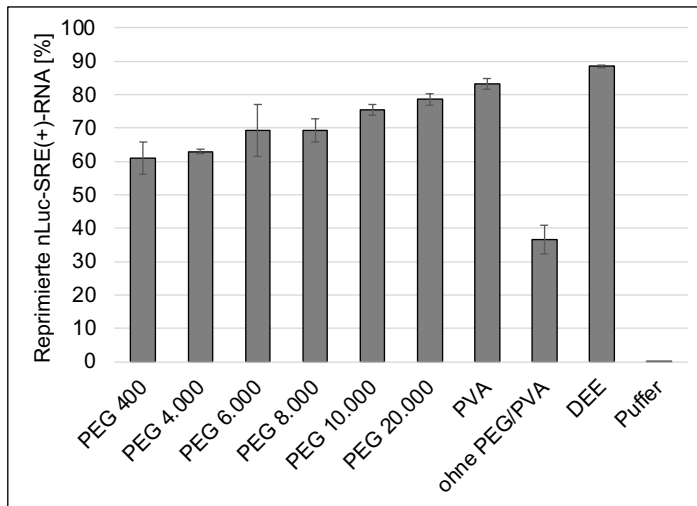
Hiermit konnte gezeigt werden, dass die Smaug-RNA-Assoziation vermutlich der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion ist. Die direkte Zugabe ohne Vorinkubation von Smaug und Reporter-RNA zum Translationsextrakt (mit Cup-4E) führte zu keiner SRE-spezifischen Repression (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurde die langsame Smaug-RNA-Assoziation in RNA-Bindungsexperimenten von Dr. Christiane Rammelt beobachtet. Somit scheint die langsame Bildung des Repressorkomplexes nicht zwingend durch ein Umhüllen der mRNA mit Me31B und Tral bedingt zu sein (Götze et al., 2017; Kluge et al., 2020), da eine Vorinkubation mit Smaug bereits ausreicht, um eine ähnliche Repression wie mit DEE zu erreichen.

### 2.3.2.2 Die Translationsrepression ist abhängig von makromolekularen *Crowdern*

Da für einen Teil der Repressorproteine eine deutliche Stimulierung ihrer Aktivität in der Deadenylierung durch Zugabe von makromolekularen *Crowdern* beobachtet werden konnte (vgl. Abschnitt 2.2.3.3 und 2.2.4.2), wurden nachfolgend auch unterschiedliche *Crowder* in der Rekonstitution der Translationsrepression eingesetzt (Abbildung 2.47). Dazu wurden die Reporter-RNAs mit Smaug und Cup entweder mit oder ohne *Crowder* unterschiedlichen Molekulargewichts vorinkubiert.

Für die rekonstituierte Reaktion mit Smaug und Cup ohne Zusatz von *Crowdern* (ohne PEG/PVA) war nur eine geringe Repression der SRE-haltigen RNA zu beobachten (ca. 35 %), wohingegen sich diese selbst beim Einsatz des *Crowders* mit dem geringsten Molekulargewicht (PEG 400) nahezu verdoppelte (ca. 60 %). Mit PVA und PEG 20.000 wurde die stärkste Stimulierung erreicht, mit einer Repression von ca. 80 %, welche nahezu der des DEEs (ca. 89 %) entsprach.

Damit konnte auch hier beobachtet werden, dass die Zugabe von makromolekularen *Crowdern* zu einer Stimulierung der Smaug- und Cup-abhängigen Reaktion führte. Da sowohl für die Translationsrepression als auch für die Deadenylierung (vgl. Abbildung 2.17 und Abbildung 2.27) ein positiver Effekt durch Zugabe von PEG zu beobachten ist, wird dieses sehr wahrscheinlich direkt auf Smaug und Cup wirken, im speziellen auf die Struktur (Roque et al., 2007).



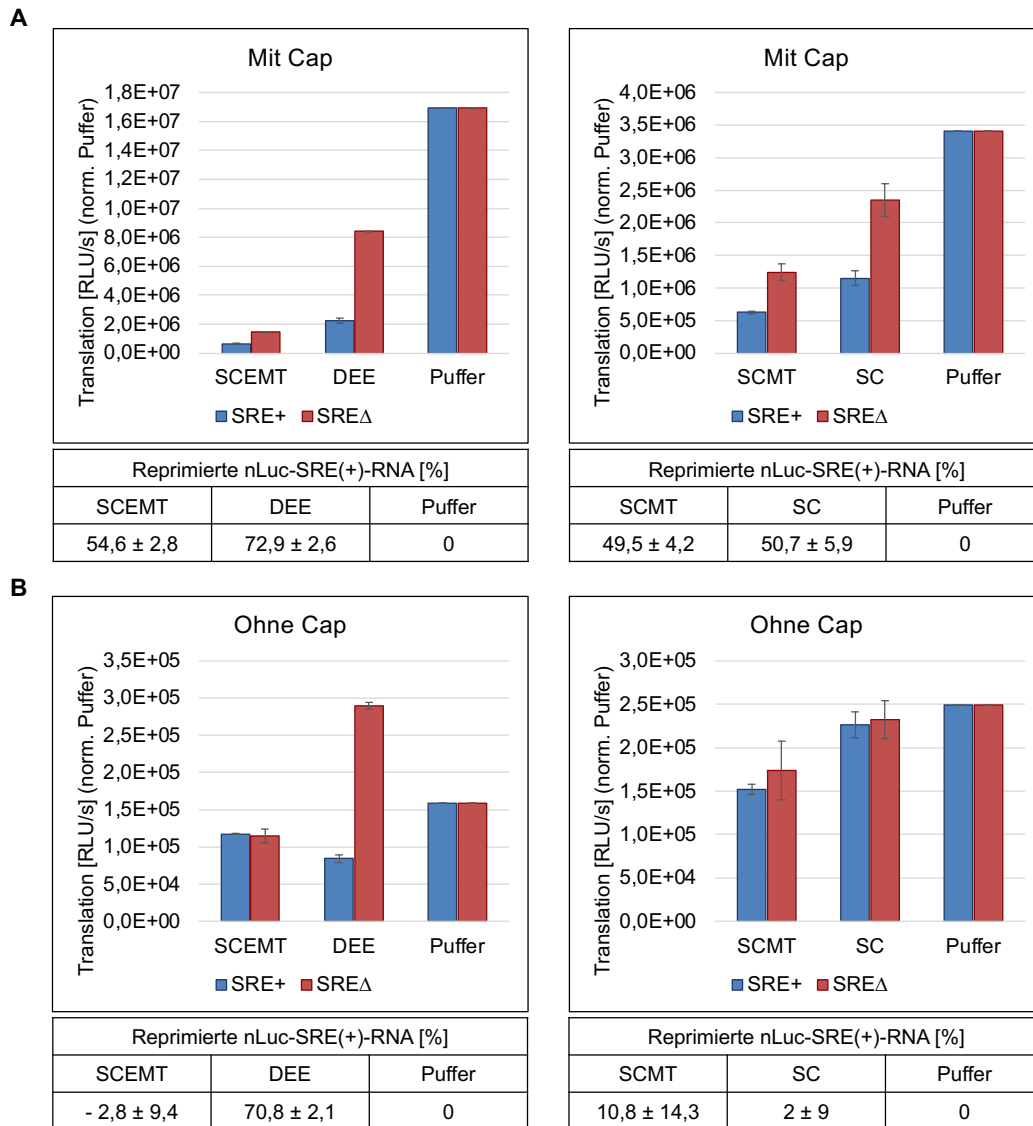
**Abbildung 2.47:** „Makromolekulare Crowder“ stimulieren die rekonstituierte Translationsrepression.

Die nLuc-SRE(+)- oder nLuc-SRE( $\Delta$ )-RNA (je 1 nM) wurden mit Smaug und Cup (je 20 nM), DEE (40 % [v/v]) oder Translationspuffer vorinkubiert. Zum Reaktionsmix mit Smaug und Cup wurden je 3 % (v/v %) Crowder gegeben, welche sich in ihrem Molekulargewicht unterschieden. Die Reaktionen mit DEE oder Puffer enthielten keinen zugegebenen Crowder, ebenso wie eine Kontrollreaktion mit Smaug und Cup (ohne PEG/PVA). Nachfolgend wurde die vorinkubierte Reporter-RNA (2  $\mu$ l) zum Translationsmix mit H5E (18  $\mu$ L) zugegeben. Nach 30 Minuten Translation wurde die Luciferase-Aktivität durch Zugabe von Nano-Glo<sup>®</sup> bestimmt. Unter den entsprechenden Balken ist angegeben womit die Reporter-RNA vorinkubiert wurde. n = 3.

Mit dem DEE wurde kein Effekt bei unterschiedlichen Konzentrationen an PEG 20.000 beobachtet (Daten nicht gezeigt), weil hier vermutlich bereits ausreichend hohe Konzentrationen an natürlichen Makromolekülen vorliegen, sodass dieses Reaktionsmilieu mit großer Wahrscheinlichkeit von entscheidender Bedeutung für die Funktionalität von Smaug und Cup ist.

### 2.3.2.3 Die rekombinanten Komplexe zeigen andere Eigenschaften als der DEE

In den initialen Experimenten mit dem DEE in der *nanos*-Translationsrepression konnten neben der langsamen Repressorkomplexbildung auch die Unabhängigkeit von einer Cap-Struktur beobachtet werden (Jeske et al., 2011). Da Cup ein beschriebener Interaktionspartner von eIF4E ist (Nakamura et al., 2004), wurde die Funktionalität von Cup in der Bildung eines Repressorkomplexes auf einer Reporter-RNA ohne Cap-Struktur untersucht (Abbildung 2.48). Dazu wurde entweder eine Reaktion mit dem aufgereinigten Cup-eIF4E-Heterodimer oder nur Cup durchgeführt, unter Zugabe von Smaug, Me31B und Tral. Dabei enthielt die Reporter-RNA entweder eine Cap-Struktur oder keine.



**Abbildung 2.48: Die rekonstituierte Translationsrepression ist Cap-abhängig.**

Die nLuc-SRE(+)- oder nLuc-SRE( $\Delta$ )-RNA (je 1 nM) enthielten entweder eine Cap-Struktur (**A**) oder keine (**B**) und wurden mit unterschiedlichen Kombinationen der Repressorproteine, DEE (40 % [v/v]) oder Translationspuffer vorinkubiert. Nachfolgend wurde die vorinkubierte Reporter-RNA (2  $\mu$ l) zum Translationsmix mit H5E (18  $\mu$ L) zugegeben. Nach 30 Minuten Translation wurde die Luciferase-Aktivität durch Zugabe von Nano-Glo<sup>®</sup> bestimmt. Unter den entsprechenden Balken ist angegeben womit die Reporter-RNA vorinkubiert wurde und wie hoch die SRE-spezifische Repression war. Die eingesetzten Repressorproteine sind durch ihren entsprechenden Anfangsbuchstaben gekennzeichnet. Smaug – S; Cup – C; eIF4E – E; Me31B – M; Tral – T. n = 3.

Für alle Smaug- oder DEE-enthaltenden Reaktionen mit der Cap-Struktur in der Reporter-RNA war eine SRE-spezifische Translationsrepression zu beobachten (Abbildung 2.48.A). Dahingegen zeigte der Einsatz von Reporter-RNAs ohne Cap eine Aufhebung der SRE-spezifischen Repression für die rekonstituierten Reaktionen, jedoch keine Änderung für die SRE-spezifische Repression des DEEs (Abbildung 2.48.B). Weiterhin war die Translationsaktivität der nLuc-SRE( $\Delta$ )-RNA ohne Cap nach Vorinkubation mit DEE deutlich höher als

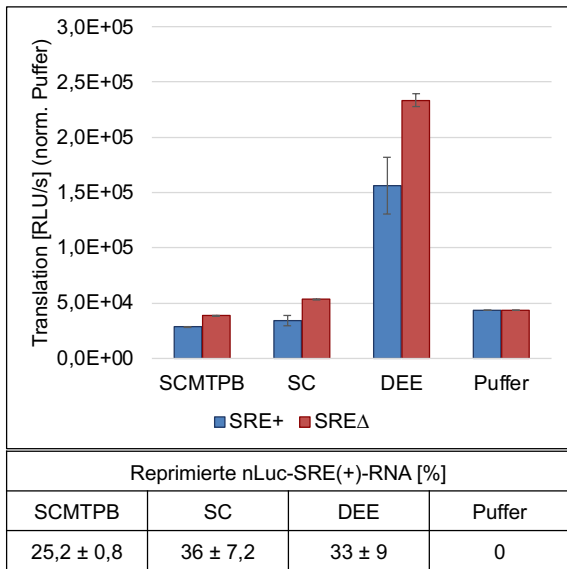
in der Pufferkontrolle (ca. 2-fach) im Gegensatz zur Reporter-RNA mit Cap. Außerdem trat in den Reaktionen mit DEE oder den rekombinanten Proteinen eine mehr oder weniger starke unspezifische Repression für die Reporter-RNA mit Cap auf. Dagegen lag für die Reporter-RNA ohne Cap nahezu keine unspezifische Repression vor.

Somit konnte auch in diesem Experiment gezeigt werden, dass die SRE-spezifische Repression im DEE unabhängig von der Cap-Struktur verläuft. Dagegen zeigt das rekonstituierte System in allen Proteinkombinationen eine nahezu vollständige Cap-Abhängigkeit, welche dem ursprünglichen Modell des *nanos*-Repressorkomplexes aus Smaug-Cup-eIF4E entspricht (Wilhelm & Smibert, 2005). Außerdem konnte in diesem Experiment beobachtet werden, dass die unspezifische Translationsrepression der Repressorproteine mit der Cap-enthaltenden Reporter-RNA nicht für eine RNA ohne Cap auftrat. Daher wird vermutlich die Blockierung der Cap-Struktur durch z.B. Cup-4E für die hohe unspezifische Repression verantwortlich sein und nicht ein möglicher RNA-Abbau durch kontaminierende Nukleasen.

In dem nachfolgenden Experiment wurde das vollständige Cup durch ein mittleres Cup-Fragment (Abbildung 2.29) ersetzt, welches die Interaktionsregion zu Me31B aufweist, aber nicht mehr die zu eIF4E (Abbildung 2.49). Damit sollte die Funktionalität von Cup losgelöst von eIF4E in der Cap-unabhängigen Repression untersucht werden. Dazu wurden die Reporter-RNAs (ohne Cap) entweder mit Smaug und dem mittleren Cup-Fragment oder einer Kombination aus den beiden Proteinen plus Me31B, Tral, PABPC und Belle vorinkubiert.

Für alle Reaktionen außer der Pufferreaktion wurde eine schwache SRE-spezifische Repression (um ca. 30 %) mit der RNA ohne Cap beobachtet. Die Zugabe von Me31B, Tral, Belle und PABPC bewirkte keinen Unterschied im Ausmaß der Repression.

Das vollständige Cup scheint demnach unter den hier getesteten Bedingungen (vgl. Abbildung 2.48) bevorzugt im Cap-abhängigen Repressionsmechanismus aktiv zu sein, wohingegen das um die eIF4E-Interaktionsregion verkürzte Cup-Fragment auch geringfügig Cap-unabhängige Repression zeigte. Die Aktivität des DEE war nur in diesem Experiment (Abbildung 2.49) deutlich geringer als zuvor beobachtet, wohingegen mit dem mittleren Cup-Fragment wiederholt nur eine geringfügige Repression auftrat. Die ursprüngliche These, wie die Cap-Unabhängigkeit bewerkstelligt wird, basiert auf einer Polymerisierung des Me31B-Tral-Heterodimers entlang der mRNA und einer damit einhergehenden Blockierung der Assoziation bzw. des Voranschreitens von Ribosomen (Götze et al., 2017). Dies konnte mit den hier durchgeführten Experimenten nicht beobachtet werden, da die Reaktionen unabhängig vom zugeführten Me31B und Tral war.



**Abbildung 2.49: Das mittlere Cup-Fragment führt zu einer Cap-unabhängigen Translationsrepression.**

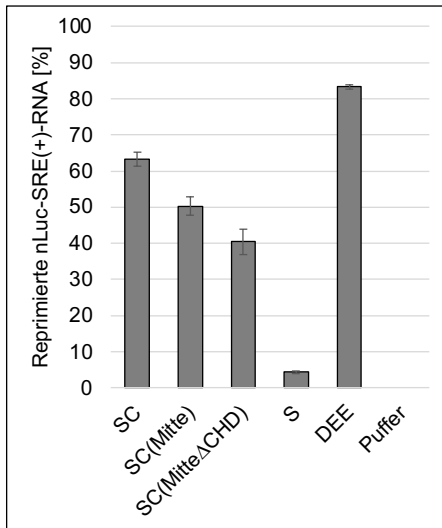
Die nLuc-SRE(+)- oder nLuc-SRE( $\Delta$ )-RNA (je 1 nM) enthielten keine Cap-Struktur und wurden mit unterschiedlichen Kombinationen der Repressorproteine, DEE (40 % [v/v]) oder Translationspuffer vorinkubiert. Dabei wurde hier das mittlere Cup-Fragment (Aminosäuren 417-770) eingesetzt und die Proteinkonzentrationen lagen bei ca. 20 nM. Nachfolgend wurde die vorinkubierte Reporter-RNA (2  $\mu$ l) zum Translationsmix mit H5E (18  $\mu$ L) zugegeben. Nach 30 Minuten Translation wurde die Luciferase-Aktivität durch Zugabe von Nano-Glo<sup>®</sup> in RLU/s bestimmt. Unter den entsprechenden Balken ist angegeben, womit die Reporter-RNA vorinkubiert wurde und wie hoch die SRE-spezifische Repression war. Die eingesetzten Repressorproteine sind durch ihren entsprechenden Anfangsbuchstaben gekennzeichnet. Smaug – S; Cup (Mittleres Fragment) – C; eIF4E – E; Me31B – M; Tral – T. n = 3.

Wahrscheinlich werden Orthologe beider Proteine aus dem zellfreien Translationssystem rekrutiert, wie bereits weiter oben diskutiert. Eine Rolle von anderen Repressionsmechanismen oder anderen unbekanntem Repressorproteinen ist auch nicht abzuweisen, allerdings enthält die hier verwendete mRNA keine bekannten Bindestellen für piRNA oder miRNA (Rouget et al., 2010), sodass zumindest die dazugehörigen Repressionsmechanismen wahrscheinlich keine Rolle spielen.

Um die Rolle von einem möglichen Me31B-Ortholog aus dem H5E auf die Translationsrepression zu untersuchen, wurde die beschriebene Interaktionsdomäne (CHD – Cup-Homologiedomäne) im mittleren Cup-Fragment (Kamenska et al., 2014, 2016) deletiert (Abbildung 2.50). Dazu wurde die Cap-enthaltende Reporter-RNA mit Smaug und entweder mit vollständigem Cup oder dem mittleren Cup-Fragment oder der  $\Delta$ CHD-Mutante inkubiert.

Dem Experiment ist zu entnehmen, dass für sämtliche Kombinationen aus Smaug und Cup eine SRE-spezifische Repression zu beobachten war und die Deletion der CHD nur zu einer geringfügig niedrigeren Repression führte.





**Abbildung 2.50: Das mittlere Cup-Fragment übt auch mit deletierter CHD Translationsrepression aus.**

Die Cap-enhaltende nLuc-SRE(+)- oder nLuc-SRE( $\Delta$ )-RNA (je 1 nM) wurden mit Smaug (20 nM), Smaug und Cup bzw. Cup-Fragment (je 20 nM), DEE (40 % [v/v]) oder Translationspuffer vorinkubiert. Nachfolgend wurde die vorinkubierte Reporter-RNA (2  $\mu$ l) zum Translationsmix mit H5E (18  $\mu$ l) zugegeben. Nach 30 Minuten Translation wurde die Luciferase-Aktivität durch Zugabe von Nano-Glo<sup>®</sup> bestimmt. Unter den entsprechenden Balken ist angegeben womit die Reporter-RNA vorinkubiert wurde. Smaug – S; Cup – C; Cup(Aminosäuren 417-770) – Cup(Mitte). n = 3.

Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen für das humane Cup-Homolog 4E-T überein, bei dem die Deletion der CHD ebenfalls zu einer kaum niedrigeren Repression führt (Kamenska et al., 2016). Hier konnte nur durch Deletion eines hochkonservierten Aminosäuremotivs (Motiv I) vor der CHD in Kombination mit der CHD-Deletion eine deutliche Reduktion der Repression beobachtet werden. Dabei spielt das Motiv I keine Rolle in der Bindung vom Me31B-Ortholog DDX6, allerdings wird hier das Protein UNR gebunden, welches eine wichtige Rolle in der Translationsrepression der *D. melanogaster msl-2*-mRNA in Kombination mit dem Protein SXL (Sex-lethal) ausübt (Abaza et al., 2006; Duncan et al., 2009). UNR wird über SXL rekrutiert und bindet gleichzeitig auch an PABPC, wodurch es vermutlich die PABPC-Aktivität so verändert, dass eine Rekrutierung des ribosomalen 43S-Präinitiationskomplexes inhibiert wird, selbst wenn die *closed-loop*-Struktur mit eIF4G und eIF4E noch vorliegt (Duncan et al., 2009). Außerdem konnte für die *msl-2*-mRNA eine Assoziation mit dem Hrp48-Protein beobachtet werden, welches direkt an eine Untereinheit des Initiationsfaktors eIF3 bindet und damit in einem der Cap-Bindung nachfolgenden Schritt die Translationsrepression reguliert (Szostak et al., 2018). Für den *nanos*-Repressorkomplex wurde ebenfalls eine Blockierung der 43S-Assoziation beobachtet. Neben der Blockierung der „*closed-loop*“-Struktur durch Cup-4E könnte die Blockierung möglicherweise über einen ähnlichen Mechanismus wie bei der *msl-2*-Repression ablaufen. Allerdings konnte bei Verwendung einer Reporter-RNA mit interner ribosomaler Eintrittsstelle (IRES) aus dem *Cricket-Paralysis-Virus* (CrPV) gezeigt werden, dass die eingefügte *nanos*-3'-UTR auch zu einer Translationsrepression (ca. 50 – 67 %) führt (Jeske et al., 2011). Die dort verwendete CrPV-IRES ist vom Typ I, sodass eine direkte Bindung der ribosomalen

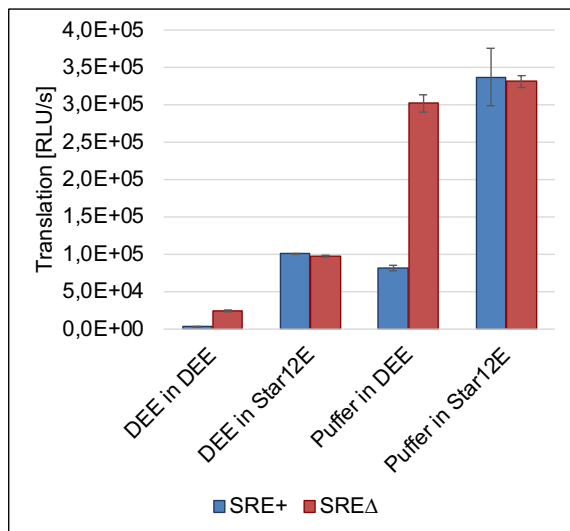
40S-Untereinheit oder des 80S-Ribosoms stattfinden kann (Y. Yang & Wang, 2019). Dementsprechend wird hier vermutlich ein Schritt nach der 40S- oder 80S-Assoziation inhibiert.

Weiterhin konnte für die Translationsrepression der *D. melanogaster oskar*-mRNA, welche ebenfalls die Assoziation mit Cup und Me31B beinhaltet, das Auftreten von zwei Repressorkomplexen beobachtet werden, welche in einem Saccharosegradienten unterschiedlich sedimentieren (Chekulaeva et al., 2006). Beide Komplexen zeigen dieselben Mengen an Bruno und Me31B, jedoch ist Cup nahezu nur in dem schwereren Komplex enthalten. Somit scheint hier Me31B wahrscheinlich unabhängig von Cup zu der RNA rekrutiert zu werden. Eine Untersuchung der physischen Interaktion zwischen Cup und Me31B gelang mit den rekombinanten Proteinen bisher nicht, da diese unspezifisch an das entsprechende Affinitätschromatographiematerial banden. So konnte in der Hinsicht auch keine Aussage über die Wirksamkeit der CHD-Deletion getroffen werden. Dementsprechend sollte in zukünftigen Experimenten die direkte Assoziation von Me31B mit Cup mit weiteren Proteintags unter verschiedenen Bedingungen getestet werden. Falls möglich, sollten Fliegenstämme mit den entsprechenden Deletionen bzw. Mutationen in Cup im Hinblick auf die Translationsrepression und die assoziierten Repressorproteine getestet werden. Nicht auszuschließen ist auch eine Wechselwirkung mit dem CCR4-NOT-Komplex, für den in dieser Arbeit eine Interaktion mit Smaug, Cup und PABPC gezeigt werden konnte und für dessen humanes Ortholog eine Interaktion mit DDX6 beschrieben ist, welche die ATPase-Aktivität von DDX6 stimuliert (Mathys et al., 2014). Weiterhin konnten Mathys et al. (2014) für das humane DDX6 eine Stimulierung der Translationsrepression durch Bindung von NOT1 beobachten, welche unabhängig von der Deadenylierungsaktivität ist. Damit könnte eventuell auch die ATP-Abhängigkeit der Translationsrepression erklärt werden (Jeske et al., 2011), welche in den hier vorgestellten Experimenten nicht beobachtet werden konnte. Somit sollte zukünftig der rekonstituierte <sup>Dm</sup>CCR4-NOT auf eine Funktion in der Translationsrepression untersucht werden.

#### 2.3.2.4 Der Repressorkomplex wird im *E. coli*-Translationssystem umgangen

Keiner der hier getesteten eukaryotischen Translationsextrakte (H5E, SfE, S2E) ermöglichte eine Untersuchung der Abhängigkeit von Me31B und Tral, weil vermutlich bereits sättigende Konzentrationen an Orthologen von Me31B und Tral vorhanden waren. Demnach wurde ein prokaryotisches Translationssystem aus *E. coli* etabliert, welches keine entsprechenden Orthologe enthält und die Translation von exogen zugeführter mRNA ermöglicht.

Dazu wurden Translationsextrakte aus RNaseE-defizienten *E. coli*-Zellen hergestellt, da die herkömmlichen Zellstämme zur Proteinexpression (BL21(DE3), Rosetta™) zu hohe Mengen an RNasen aufweisen und dadurch sämtliche zugesetzte mRNA in kürzester Zeit verdauen (Daten nicht gezeigt). Als Reporter-RNA wurde die nLuc-SRE(+) oder nLuc-SRE( $\Delta$ )-RNA um eine Ribosomenbindestelle *upstream* zum nLuc-ORF ergänzt. Weiterhin enthielten die RNAs eine Cap-Struktur und einen internen poly(A)-Schwanz. Obwohl diese Strukturen für eine prokaryotische Translation nicht notwendig sind und im Falle des Poly(A)-Schwanzes sogar negativ sein können (Hajnsdorf & Kaberdin, 2018), wurden sie dennoch eingefügt, um denselben vorgeformten Repressorkomplex sowohl in der Translationsreaktion mit DEE als auch mit *E. coli*-Extrakt (Star12E) zu untersuchen (Abbildung 2.51).



**Abbildung 2.51: Keine Repression im *E.coli*-Extrakt.**

Die RBS-nLuc-SRE(+)- oder RBS-nLuc-SRE( $\Delta$ )-RNA (je 1 nM) wurden mit DEE (40 % [v/v]) oder Translationspuffer vorinkubiert. Nachfolgend wurde die vorinkubierte Reporter-RNA (2  $\mu$ l) zum Translationsmix mit DEE oder Star12E (je 18  $\mu$ l) zugegeben. Nach 30 Minuten Translation bei 27 °C wurde die Luciferase-Aktivität durch Zugabe von Nano-Glo® bestimmt. Unter den entsprechenden Balken ist angegeben womit die Reporter-RNA vorinkubiert wurde und in welchem Extrakt sie translatiert wurde. n = 3.

Reprimierte nLuc-SRE(+)-RNA [%]			
DEE (DEE)	DEE (Star12E)	Puffer (DEE)	Puffer (Star12E)
88,2 $\pm$ 1,0	-4,2 $\pm$ 1,4	73,1 $\pm$ 2,0	-1,8 $\pm$ 13,7

Hier ist zu sehen, dass die mit DEE vorinkubierte SRE-haltige Reporter-RNA im DEE als Translationssystem nahezu vollständig reprimiert vorlag (88,2 %), wohingegen dieselbe vorinkubierte RNA im Star12E keinerlei SRE-spezifische Repression aufwies. Die beiden Pufferkontrollen mit der SRE( $\Delta$ )-RNA zeigten nahezu identische Translationsaktivitäten und der Star12E zeigte keine basale SRE-spezifische Aktivität.

Hiermit konnte gezeigt werden, dass in einem *E. coli*-Translationssystem, welches unabhängig von der Cap- und Poly(A)-Struktur ist, keinerlei SRE-spezifische Repression geschieht. In den von Götze et al. (2017) und Jeske et al. (2011) publizierten Experimenten ist ein äußerst stabiler Repressorkomplex beschrieben, welcher in einer mutmaßlichen Umhüllung der mRNA mit Me31B und Tral sowie einer daraus einhergehenden Blockierung der Assoziation mit Ribosomen begründet liegt. Von diesem Standpunkt aus wäre zu erwarten,

dass dieser umhüllte Komplex auch in *E. coli* weiterhin die Ribosomenassoziation verhindern sollte. Die Umgehung des Repressorkomplexes lässt vermuten, dass entweder keine stabile Umhüllung der mRNA vorliegt oder die Umhüllung durch die Translationsmaschinerie in *E. coli* aufgelöst wird. Möglicherweise wird die Cap-unabhängige Repression im DEE auch von einem zusätzlichen unbekanntem Mechanismus gesteuert. Die Translationsbedingungen sind, mit Ausnahme der erhöhten Konzentration an Magnesium (16,5 mM) und der Zugabe von GTP, nahezu identisch zur Translation im DEE, sodass diese vermutlich nicht für die Aufhebung der Repression verantwortlich sind. Magnesium-Ionen hatten in einer Titration bis 8 mM keinen negativen oder positiven Einfluss auf die Repression mit rekombinanten Proteinen (Daten nicht gezeigt). Eine andere Erklärung für die Aufhebung der Repression könnte möglicherweise in der leicht erhöhten Stabilität gegenüber Abbau durch RNasen für die SRE(+)-RNA vorliegen (Götze et al., 2017). Um die Stabilität zu beurteilen, könnte die Reporter-RNA nach der Translation im Star12E extrahiert werden und direkt in einem nachfolgenden Translationsassay, z.B. in H5E, eingesetzt werden.

#### 2.3.2.5 Die Umhüllung der *nos*-mRNA durch Me31B und Tral.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit die These einer Umhüllung der mRNA durch Me31B und Tral nicht vollständig belegt oder widerlegt werden. Ein zukünftiger Ansatzpunkt könnte z.B. die Betrachtung des Repressorkomplexes in der Kryoelektronenmikroskopie (Kryo-EM) sein. Hier wurden für den auf der nLuc-SRE(+)-RNA rekonstituierten Komplex, mit allen sieben rekombinanten Repressorproteinen, bisher keine verwertbaren Partikel beobachtet (Daten nicht gezeigt). Auch die Auftrennung der nativen Repressorkomplexe im DEE über eine Größenausschlusschromatographie und nachfolgende Betrachtung mittels Kryo-EM zeigte z.B. keine zirkulären Partikel, die dem „*closed-loop*“-Modell aus Smaug-Cup-4E entsprechen, oder umhüllte Partikel (Me31B-Tral). Jedoch waren die jeweiligen Repressorproteine einer MS-Analyse zufolge die abundantesten Proteine in den untersuchten Fraktionen. Dementsprechend wird zurzeit versucht die nativen Komplexe aus DEE in ausreichenden Mengen zu isolieren. Dazu wird zum einen direkt Smaug immobilisiert, indem DEE aus einem Fliegenstamm, der FLAG-Smaug exprimiert, eingesetzt wird. Zum anderen wird eine biotinylierte SRE-haltige RNA mit DEE inkubiert, um den darauf gebildeten Repressorkomplex durch einem nachfolgenden Streptavidin-Pulldown zu isolieren.

### 3. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Deadenylierung von SRE-haltigen RNAs durch den *Drosophila*-CCR4-NOT-Komplex *in vitro* rekonstituiert. Dafür wurden der vollständige, aus acht Untereinheiten bestehende CCR4-NOT-Komplex sowie kleinere Varianten des Komplexes aufgereinigt. Die eingesetzten SREs sind *stem-loops*, die durch das Protein Smaug gebunden werden, welches wiederum andere Repressorproteine zur mRNA rekrutiert. Dementsprechend wurden neben Smaug auch die anderen sechs potenziellen Repressorproteine (vgl. Abbildung 1.6 und Götze et al., (2017)) der SRE-haltigen *nanos*-mRNA rekombinant hergestellt und isoliert: Cup, Me31B, Trailer hitch, Belle, eIF4E und PABPC. Eine Kombination aus Smaug und dem hexameren <sup>Dm</sup>CCR4-NOT<sub>MINI</sub>, welchem der N-terminale Bereich von NOT1 sowie NOT10/11 fehlten, reichte aus, um eine prozessive SRE-spezifische Deadenylierung zu bewirken. Im Gegensatz dazu zeigten die <sup>Dm</sup>CCR4-NOT-Komplexe in Abwesenheit von Smaug nur eine überwiegend distributive basale, also SRE-unabhängige Deadenylierungsaktivität. Die basale Aktivität war nur für das CCR4-Caf1-Heterodimer ca. um den Faktor fünf kleiner, als mit den größeren Komplexen beobachtet. Dies wurde auch für die humanen und Hefe-Komplexe berichtet (Raisch et al., 2019; Stowell et al., 2016).

Neben Smaug führte von den sieben Repressorproteinen nur Cup zu einer ähnlichen Stimulierung der Deadenylierung, die auch parallel zu der Smaug-abhängigen Deadenylierung stattfinden konnte. Für Cup scheint die Bindung von RNA und die Interaktion mit dem CCR4-NOT-Komplex über das gesamte Protein verteilt zu sein, was überwiegend mit den *tethering*-Experimenten in S2-Zellen übereinstimmt (Igreja & Izaurralde, 2011). Von den verbleibenden fünf Repressorproteinen zeigte nur PABPC eine nach Literaturberichten zu erwartende Stimulierung der Deadenylierung, welche allerdings deutlich schwächer war, als die für Smaug und Cup beobachtete. PABPC beeinträchtigte die Smaug- und SRE-abhängige Deadenylierung nicht. Sowohl für die basale als auch die durch Smaug stimulierte Deadenylierung konnte gezeigt werden, dass die beiden Ribonukleasen, CCR4 und Caf1, zur Reaktion beitrugen und in ihrer Aktivität partiell voneinander abhängig waren.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit also gezeigt werden, dass der *Drosophila*-CCR4-NOT-Komplex durch Smaug und Cup zu mRNAs rekrutiert werden kann und dort prozessiv agiert. Weiterhin konnte die Smaug-abhängige Deadenylierung auf Ebene der Smaug-RNA-

Bindung durch hohe Konzentrationen von Oskar blockiert werden. Dies wird vermutlich über die Interaktion zwischen der RNA-Bindedomäne von Smaug mit Oskar erreicht (Dahanukar et al., 1999). So könnte die Translation der *nanos*-mRNA am posterioren Pol aktiv bleiben.

Außerdem wurden in dieser Arbeit Translationssysteme etabliert, welche die Untersuchung einer SRE-spezifischen Translationsrepression ermöglichten. Dafür wurden zellfreie Translationsextrakte aus Insektenzellen hergestellt, welche keine SRE-spezifische Repression aufwiesen. Mit Hilfe dieser Extrakte konnte gezeigt werden, dass für eine stabile SRE-spezifische Repression mindestens Smaug und Cup benötigt werden. Dabei bestimmt die Bindung von Smaug an die SRE-RNA wahrscheinlich die Geschwindigkeit der Bildung des Repressorkomplexes (Jeske et al., 2011). Ein Zusatz der weiteren fünf Repressorproteine führte nicht zu einer Steigerung der Translationsrepression. Vermutlich können diese konservierten und ubiquitär vorkommenden Proteine aus dem Insektenzellextrakt rekrutiert werden. Daher konnte in dieser Arbeit die Frage, auf welchem Mechanismus die Cap-unabhängige Translationsrepression beruht, nicht beantwortet werden.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Chemikalien

Generell wurden die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien von der Firma Merck bezogen. Ausnahmen sind in der folgenden Tabelle 4.1 gelistet.

Tabelle 4.1: Liste eingesetzter Chemikalien.

Grund- und Feinchemikalien	
<u>Chemikalie:</u>	<u>Hersteller:</u>
4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid (AEBSF)	AppliChem
2-Propanol (Isopropanol), $\geq 99,8$ %, p.a.	Roth
$\alpha$ -Lactose Monohydrat	Roth
Acrylamid-Lösung 30 % (Rotiphorese <sup>®</sup> A)	Roth
Acrylamid:Bisacrylamid-Lösung 30 % (37,5:1)	Serva
Acrylamid:Bisacrylamid-Lösung 40 % (19:1)	Serva
Agar-Agar, Kobe 1, für die Mikrobiologie	Roth
Agarose, UltraPure	Invitrogen
Ampicillin, Natriumsalz, 99 %	Roth
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Bovines Serumalbumin (BSA), Fraktion V, methyliert	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau Natriumsalz	Roth
Coomassie <sup>®</sup> Brilliant Blue G 250	Serva
D(+)-Glucose	Roth
Diethylpyrocarbonat (DEPC), 97 %	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Gerbu
Essigsäure, 100 %, p.a.	Roth
Ethanol, $\geq 99,8$ %	Diagonal
FLAG-Peptid, Lyophilisat	Sigma-Aldrich
Formamid, deionisiert	Roth
FuGENE <sup>®</sup> HD Transfektionsreagenz	Promega

Fortsetzung auf folgender Seite

**Fortsetzung von Tabelle 2.1**

---

<u>Chemikalie:</u>	<u>Hersteller:</u>
Gelatine, aus der Haut von Kaltwasserfischen	Sigma-Aldrich
Gentamycinsulfat, für die Biochemie	Roth
Glycerin, $\geq 99,5$ %, p.a.	Roth
Harnstoff (UREA), $\geq 99,5$ %, p.a.	Roth
Hefe-tRNA	Roche
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Peglab
Kanamycinsulfat	Roth
Kreatinphosphat, Dinatriumsalz	Sigma-Aldrich
Leupeptin	Roche
Methanol, $\geq 99\%$	Roth
Nano-Glo <sup>®</sup> (Furimazin)	Promega
Natriumchlorid	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natriumhypochlorit (12 %-Lsg.)	Roth
Nonidet <sup>™</sup> P-40 (NP-40)	Sigma-Aldrich
PageRuler <sup>™</sup> <i>prestained protein ladder</i>	Thermo Scientific
PageRuler <sup>™</sup> <i>unstained protein ladder</i>	Thermo Scientific
Pepstatin	Roche
Phenol, Roti <sup>®</sup> -Phenol (TE-gesättigt)	Roth
Phenol, Roti <sup>®</sup> -Aqua-Phenol (Wasser-gesättigt)	Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), $\geq 99$ %	Sigma-Aldrich
Roti <sup>®</sup> -Quant Bradford-Reagenz	Roth
Spectinomycin-dihydrochlorid-pentahydrat	Sigma-Aldrich
T4-DNA-Ligase Reaktionspuffer (10x)	NEB
Tetracyclin-hydrochlorid, 96 %	Calbiochem
Transkriptionspuffer (10 x)	NEB
Trypanblau-Lsg., 0,4 % in PBS	BioRad
Xylencyanol	Roth
X-Gal	Peqlab

Fortsetzung auf folgender Seite



**Fortsetzung von Tabelle 2.1**

<b>Nukleotide und Nukleinsäuren</b>	
<u>Chemikalie:</u>	<u>Ursprung:</u>
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-UTP	Perkin Elmer
3'-O-Methyl-m7G(5')ppp(5')G Anti-Revers-Cap-Analogon	Jena Bioscience
6-FAM-7mer-A20	Raisch et al., (2019)
6-FAM-ApG Cap-Analogon (Produktion eingestellt)	Iba Lifescience
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	NEB
Ribonukleosidtriphosphate (NTPs)	NEB
<b>Enzyme</b>	
<u>Chemikalie:</u>	<u>Hersteller/Herkunft:</u>
<i>Calf intestinal phosphatase (CIP)</i>	Roche
DNase I (RNase-frei; 1 U/ $\mu$ L)	Roche
Kreatinkinase (10 g/l)	Sigma-Aldrich
GST-PreScission <sup>TM</sup> -Protease	Dr. Claudia Temme
Restriktionsendonukleasen und Reaktionspuffer	NEB
RNase-Inhibitor (40 U/ $\mu$ l), Murin	NEB
SUMO-Protease (Ulp1)	Dr. Bodo Moritz
T3-RNA-Polymerase (50 U/ $\mu$ l)	NEB
T4-DNA-Ligase (400 U/ $\mu$ l)	NEB
T7-RNA-Polymerase (50 U/ $\mu$ l)	NEB
<b>Chromatographiematerial und Säulen</b>	
<u>Material:</u>	<u>Hersteller:</u>
Amylose-Matrix	NEB
Anti-FLAG M2 Affinitätsgel (anti-FLAG-Agarose)	Sigma-Aldrich
Glutathion(GSH)-Sepharose <sup>TM</sup> 4B	Cytiva
Hydroxylapatit-Chromatographiesäule	BioRad
Mono Q <sup>®</sup> 5/50 Anionenaustauschsäule, 1 ml	Cytiva
Mono S <sup>®</sup> 5/50 Kationenaustauschsäule, 1 ml	Cytiva
Ni-NTA-Agarose	Qiagen

Fortsetzung auf folgender Seite

**Fortsetzung von Tabelle 2.1**

<u>Material:</u>	<u>Hersteller:</u>
Superose® 6 10/300, Größenausschlusschromat., 24 ml	Cytiva
Superose® 6 3.2/300, Größenausschlusschromat., 2,4 ml	Cytiva
<b>Molekularbiologische Kits</b>	
<u>Kit:</u>	<u>Hersteller:</u>
Monarch® DNA-Geextraktions-Kit	NEB
Nano-Glo® Luciferase-Assay-System	Promega
Zymoclean Gel-DNA <i>recovery kit</i>	Zymoclean

## 4.2 Geräte und Software

**Tabelle 4.2: Lister der speziellen Geräte und Software.**

<b>Geräte</b>	
<u>Gerät:</u>	<u>Hersteller:</u>
ÄKTA <i>pure</i> , FPLC-System	Cytiva
ÄKTA <i>purifier</i> , FPLC-System	Cytiva
Automatischer Zellzähler TC20	BioRad
Tank-Blotter für Western-Blots	OWL
Brutschränke	Heraeus Instrument
Durchlichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss
Elektroporationsgerät zur Transformation Eporator	Eppendorf
Fluoreszenz- und Autoradiographie-Imager Typhoon 9200	Cytiva
Kühlzentrifuge Avanti JXN-30	Beckmann
Odyssey DLx	LI-COR
Schüttelinkubatoren für die Zellkultur	Infor
Sonifikator, Branson Sonifier 250	Branson
Spektrophotometer U-3000	Hitachi
Szintillationszähler Tri-Carb 2100TR	Packard
TriStar <sup>2</sup> Multiplatten-Reader	Berthold

Fortsetzung auf folgender Seite

Fortsetzung von Tabelle 2.2

Software	
<u>Software:</u>	<u>Entwickler:</u>
Excel	Microsoft
FiJi bzw. ImageJ	Schindelin et al., 2012
GIMP	The GIMP Team
ICE Research	Berthold
Image Studio™	LI-COR
PowerPoint	Microsoft
SnapGene	GSL Biotech
Unicorn (ÄKTA)	Cytiva

## 4.3 DNA-Konstrukte

### 4.3.1 DNA-Plasmide

Alle nachfolgenden Expressionsplasmide enthalten kodierende Sequenzen für Proteine aus *D. melanogaster*. Die Expressionplasmide mit dem pFastBac1-, pFBDM- oder pFL-Vektorgrundgerüst wurden für die Generierung von Bacmiden und Baculoviren verwendet, wohingegen alle anderen direkt für die Expression in *E. coli* eingesetzt wurden.

Tabelle 4.3: Expressions- und Transkriptionsplasmide.

Expressionsplasmide		
<u>Plasmid:</u>	<u>Kodierte ORFs:</u>	<u>Ursprung:</u>
pET28a-His <sub>8</sub> -MBP-CCR4	His <sub>8</sub> -MBP-CCR4	diese Arbeit
pET28a-His <sub>6</sub> -PABPC	His <sub>6</sub> -T7-PABPC	diese Arbeit
pET28a-His <sub>6</sub> -Tral-His <sub>8</sub>	His <sub>6</sub> -T7-Tral-His <sub>8</sub>	diese Arbeit
pET28a-MBP-His <sub>8</sub> -NOT1 <sub>MINI</sub>	MBP-His <sub>8</sub> -NOT1 <sub>MINI</sub>	diese Arbeit
pETDuet-1-Caf40-FLAG	Caf40-FLAG	diese Arbeit
pETDuet-1-His <sub>8</sub> -MBP-NOT10	His <sub>8</sub> -MBP-NOT10	diese Arbeit

Fortsetzung auf folgender Seite

**Fortsetzung von Tabelle 2.3**

<u>Plasmid:</u>	<u>Kodierte ORFs:</u>	<u>Ursprung:</u>
pETDuet-1-His <sub>6</sub> -NOT11_His <sub>8</sub> -MBP- NOT10	His <sub>6</sub> -NOT11_His <sub>8</sub> -MBP- NOT10	diese Arbeit
pETDuet-1-MBP-His <sub>8</sub> -NOT1_Caf40- FLAG	MBP-His <sub>8</sub> -NOT1_Caf40- FLAG	diese Arbeit
pETSUMOadapt-eIF4E-1	His <sub>6</sub> -SUMO-eIF4E	(Pekovic, 2016)
pFastBac1-His <sub>8</sub> -Belle	His <sub>8</sub> -Belle	Dr. Christiane Rammelt
pFastBac1-GST-Me31B	GST-Me31B	Dr. Christiane Rammelt
pFastBac1-Tral-His <sub>8</sub>	Tral-His <sub>8</sub>	Dr. Christiane Rammelt
pFastBac-Dual-CCR4 <sup>WT</sup> -FLAG_His <sub>8</sub> - Caf1 <sup>WT</sup>	CCR4 <sup>WT</sup> -FLAG_His <sub>8</sub> - Caf1 <sup>WT</sup>	Dr. Christiane Rammelt
pFBDM-Caf40-FLAG	Caf40-FLAG	diese Arbeit
pFBDM-Caf40	Caf40	diese Arbeit
pFBDM-CCR4 <sup>WT</sup> -FLAG	CCR4-FLAG	diese Arbeit
pFBDM-CCR4 <sup>MUT</sup> -FLAG	CCR4 <sup>MUT</sup> -FLAG	diese Arbeit
pFBDM-CCR4 <sup>WT</sup> -FLAG_His <sub>8</sub> - Caf1 <sup>MUT</sup>	CCR4 <sup>WT</sup> -FLAG_His <sub>8</sub> - Caf1 <sup>MUT</sup>	diese Arbeit
pFBDM- <sup>Dm</sup> CCR4 <sup>MUT</sup> -FLAG_His <sub>8</sub> - Caf1 <sup>WT</sup>	CCR4 <sup>MUT</sup> -FLAG_His <sub>8</sub> - Caf1 <sup>WT</sup>	diese Arbeit
pFBDM-CCR4 <sup>MUT</sup> -FLAG_His <sub>8</sub> - Caf1 <sup>MUT</sup>	CCR4 <sup>MUT</sup> -FLAG_His <sub>8</sub> - Caf1 <sup>MUT</sup>	diese Arbeit
pFBDM-Cup-FLAG	Cup-FLAG	diese Arbeit
pFBDM-His <sub>8</sub> -λN-MBP-CupNM	His <sub>8</sub> -λN-MBP-CupNM	diese Arbeit
pFBDM-His <sub>8</sub> -λN-MBP-CupMC	His <sub>8</sub> -λN-MBP-CupMC	diese Arbeit
pFBDM-His <sub>8</sub> -λN-MBP-CupN	His <sub>8</sub> -λN-MBP-CupN	diese Arbeit
pFBDM-His <sub>8</sub> -λN-MBP-CupM	His <sub>8</sub> -λN-MBP-CupM	diese Arbeit

Fortsetzung auf folgender Seite

**Fortsetzung von Tabelle 2.3**

<u>Plasmid:</u>	<u>Kodierte ORFs:</u>	<u>Ursprung:</u>
pFBDM-His <sub>8</sub> -λN-MBP-CupC	His <sub>8</sub> -λN-MBP-CupC	diese Arbeit
pFBDM-His <sub>8</sub> -MBP-Cup	His <sub>8</sub> -MBP-Cup	diese Arbeit
pFBDM-His <sub>8</sub> -NOT2	His <sub>8</sub> -NOT2	diese Arbeit
pFBDM-His <sub>8</sub> -NOT2_His <sub>8</sub> -NOT1 <sub>MINI</sub>	His <sub>8</sub> -NOT2_His <sub>8</sub> - NOT1 <sub>MINI</sub>	diese Arbeit
pFBDM-His <sub>8</sub> -NOT2_MBP-His <sub>8</sub> - NOT1 <sub>MINI</sub>	His <sub>8</sub> -NOT2_MBP-His <sub>8</sub> - NOT1 <sub>MINI</sub>	diese Arbeit
pFBDM-His <sub>8</sub> -NOT2_NOT1 <sub>MINI_EXT</sub>	His <sub>8</sub> -NOT2_NOT1 <sub>MINI_EXT</sub>	diese Arbeit
pFBDM-His <sub>8</sub> -NOT2_NOT1 <sub>PE</sub>	His <sub>8</sub> -NOT2_NOT1 <sub>PE</sub>	diese Arbeit
pFBDM-His <sub>8</sub> -NOT2_NOT1 <sub>PC</sub>	His <sub>8</sub> -NOT2_NOT1 <sub>PC</sub>	diese Arbeit
pFBDM-His <sub>8</sub> -NOT3_Caf40-FLAG	His <sub>8</sub> -NOT3_Caf40-FLAG	diese Arbeit
pFBDM-MBP-CupNM	MBP-CupNM	diese Arbeit
pFBDM-MBP-CupMC	MBP-CupMC	diese Arbeit
pFBDM-MBP-CupN	MBP-CupN	diese Arbeit
pFBDM-MBP-CupM	MBP-CupM	diese Arbeit
pFBDM-MBP-CupC	MBP-CupC	diese Arbeit
pFBDM-Smaug-FLAG	Smaug-FLAG	diese Arbeit
pFL-His <sub>8</sub> -Cup_eIF4E-1	His <sub>8</sub> -Cup_eIF4E	Dr. Fulvia Bono
pGex6p1-PABPC	GST-PABPC	diese Arbeit
pnEA-NOT11	NOT11	Bawankar et al., (2013)
pnEK-His <sub>8</sub> -Cup	His <sub>8</sub> -Cup	Dr. Fulvia Bono
pnEK-His <sub>8</sub> -CupM	His <sub>8</sub> -CupM	diese Arbeit
pnEK-His <sub>8</sub> -CupM(ΔCHD)	His <sub>8</sub> -CupM(ΔCHD)	diese Arbeit
pnEK-His <sub>8</sub> -MBP-NOT10	His <sub>8</sub> -MBP-NOT10	diese Arbeit

Fortsetzung auf folgender Seite

**Fortsetzung von Tabelle 2.3**

<u>Plasmid:</u>	<u>Kodierte ORFs:</u>	<u>Ursprung:</u>
pnYC-MBP	MBP	Dr. Eugene Valkov
pnYC-MBP-NOT10	MBP-NOT10	Bawankar et al., (2013)
pRSFDuet-1-FLAG-NOT2 <sub>MINI</sub> _His8-NOT3 <sub>MINI</sub>	FLAG-NOT2 <sub>MINI</sub> _His8-NOT3 <sub>MINI</sub>	diese Arbeit
pRSF-His6-CCR4_Caf1-FLAG	His6-CCR4_Caf1-FLAG	diese Arbeit
<b>Transkriptionsplasmide</b>		
<u>Plasmid:</u>	<u>Kodierte ORFs:</u>	<u>Ursprung:</u>
pBSK-nLuc-BRE <sup>WT</sup>	nLuc-BRE <sup>WT</sup> -RNA	diese Arbeit
pBSK-nLuc-BRE <sup>MUT</sup>	nLuc-BRE <sup>MUT</sup> -RNA	diese Arbeit
pBSK-nLuc-2xBoxB	nLuc-2xBoxB-A70-RNA	diese Arbeit
pBSK-nLuc-SRE <sup>WT</sup>	nLuc-SRE <sup>WT</sup> -RNA bzw. nLuc-SRE(+)-RNA	Kluge et al., (2020)
pBSK-nLuc-SRE <sup>Δ</sup>	nLuc-SRE <sup>Δ</sup> -RNA	Dr. Christiane Rammelt
pBSK-SREonly <sup>WT</sup>	SRE <sup>WT</sup> -A70-RNA	Jeske et al., (2006)
pBSK-SREonly <sup>MUT</sup>	SRE <sup>MUT</sup> -A70-RNA	Jeske et al., (2006)
pBSK-TCE <sup>WT</sup>	TCE <sup>WT</sup> -A70-RNA	Jeske et al., (2006)
pBSK-TCE <sup>MUT</sup>	TCE <sup>MUT</sup> -A70-RNA	Jeske et al., (2006)
pET28a-nLuc-SRE <sup>WT</sup>	RBS-nLuc-SRE <sup>WT</sup> -RNA	diese Arbeit
pET28a-nLuc-SRE <sup>MUT</sup>	RBS-nLuc-SRE <sup>MUT</sup> -RNA	diese Arbeit

## 4.4 Proteine

### 4.4.1 Antikörper

Für Western-Blot-Analysen wurden die primären Antikörper in TBST-Puffer mit 1,5 % Gelatine verdünnt. Die Detektion erfolgte mittels fluoreszenzmarkierter sekundärer Antikörper, welche in TBST-Puffer verdünnt wurden. Die entsprechenden Antikörper und ihre Verdünnungen sind in Tabelle 4.4 angegeben.

**Tabelle 4.4: Primäre und sekundäre Antikörper.**

<b>Antikörper</b>		
<i>Primärer Antikörper:</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Ursprung:</i>
$\alpha$ -Belle, Kaninchen	1:1000	Götze et al., (2017)
$\alpha$ -Caf1, Kaninchen	1:1000	Temme et al., (2004)
$\alpha$ -CCR4, Kaninchen	1:1000	Temme et al., (2004)
$\alpha$ -Cup, Kaninchen	1:5000	diese Arbeit
$\alpha$ -eIF4E-1, Ratte	1:500	diese Arbeit
$\alpha$ -Me31B, Kaninchen	1:1000	Götze et al., (2017)
$\alpha$ -NOT1 (EG314), Kaninchen	1:1000	Temme et al., (2010)
$\alpha$ -NOT2, Kaninchen	1:1000	Temme et al., (2004)
$\alpha$ -NOT3, Kaninchen	1:1000	Jeske et al., (2006)
$\alpha$ -PABPC, Kaninchen	1:5000	Dr. Matthias Hentze
$\alpha$ -Smaug, Kaninchen	1:500	Dr. Bodo Moritz
$\alpha$ -Tral, Ratte	1:1000	Götze et al., (2017)
<i>Sekundärer Antikörper:</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Ursprung</i>
$\alpha$ -Kaninchen, IRDye 800CW (Esel)	1:15.000	LI-COR
$\alpha$ -Maus, IRDye 800CW (Ziege)	1:15.000	LI-COR
$\alpha$ -Ratte, IRDye 800CW (Ziege)	1:15.000	LI-COR

#### 4.4.2 Rekombinante Proteine

Tabelle 4.5: Eingesetzte Proteinpräparationen.

Proteinpräparationen		
<u>Protein:</u>	<u>Expression:</u>	<u>Ursprung:</u>
Bruno (- His <sub>8</sub> -MBP)	<i>E. coli</i> BL21-Star <sup>TM</sup>	diese Arbeit
D <sup>m</sup> CCR4-Caf1	Sf21	diese Arbeit
D <sup>m</sup> CCR4-NOT <sub>FULL</sub>	Sf21	diese Arbeit
D <sup>m</sup> CCR4-NOT <sub>MINI</sub>	Sf21	diese Arbeit
D <sup>m</sup> CCR4-NOT <sub>MINI_EXT</sub>	Sf21	diese Arbeit
D <sup>m</sup> CCR4-NOT <sub>PE</sub>	Sf21	diese Arbeit
D <sup>m</sup> CCR4-NOT <sub>PC</sub>	Sf21	diese Arbeit
H <sup>s</sup> CCR4-Caf1	Sf21	Raisch et al., (2019)
H <sup>s</sup> CCR4-NOT <sub>CORE</sub>	Sf21	Raisch et al., (2019)
H <sup>s</sup> CCR4-NOT <sub>FULL</sub>	Sf21	Raisch et al., (2019)
H <sup>s</sup> CCR4-NOT <sub>MINI</sub>	Sf21	Raisch et al., (2019)
Cup-FLAG	Sf21	diese Arbeit
eIF4E (- SUMO-Tag)	<i>E. coli</i> Rosetta <sup>TM</sup> (DE3)	(Pekovic, 2016)
His <sub>8</sub> -Belle	Sf21	diese Arbeit
His <sub>8</sub> -Cup + eIF4E	Sf21	diese Arbeit
His <sub>8</sub> -CupM	<i>E. coli</i> BL21(DE3)-Star <sup>TM</sup>	diese Arbeit
His <sub>8</sub> -CupM( $\Delta$ CHD)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)-Star <sup>TM</sup>	diese Arbeit
His <sub>8</sub> - $\lambda$ N-MBP-CupNM	Sf21	diese Arbeit
His <sub>8</sub> - $\lambda$ N-MBP-CupMC	Sf21	diese Arbeit
His <sub>8</sub> - $\lambda$ N-MBP-CupN	Sf21	diese Arbeit
His <sub>8</sub> - $\lambda$ N-MBP-CupM	Sf21	diese Arbeit
His <sub>8</sub> - $\lambda$ N-MBP-CupC	Sf21	diese Arbeit
His <sub>6</sub> -T7-PABPC	<i>E. coli</i> BL21(DE3)-Star <sup>TM</sup>	diese Arbeit
His <sub>6</sub> -T7-Tral-His <sub>8</sub>	<i>E. coli</i> BL21(DE3)-Star <sup>TM</sup>	diese Arbeit
MBP-CupNM	Sf21	diese Arbeit
MBP-CupMC	Sf21	diese Arbeit

Fortsetzung auf folgender Seite



**Fortsetzung von Tabelle 2.5**

<u>Protein:</u>	<u>Expression:</u>	<u>Ursprung:</u>
MBP-CupN	Sf21	diese Arbeit
MBP-CupM	Sf21	diese Arbeit
MBP-CupC	Sf21	diese Arbeit
Me31B (- GST-Tag)	Sf21	diese Arbeit
Tral-His <sub>8</sub>	Sf21	diese Arbeit
Smaug-FLAG	Sf21	diese Arbeit

## 4.5 Zellstämme und Zellkultur

### 4.5.1 Bakterienstämme

<b>BL21(DE3)-Star<sup>TM</sup></b>	T7-Promotor-basierter Expressionsstamm. Erhöhung der mRNA-Stabilität durch Mutation im Gen RNaseE ( <i>rne131</i> ). Genotyp: <i>E. coli</i> , F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hsdS<sub>B</sub></i> , ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup></i> , <i>m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , <i>rne131</i> , (DE3)
<b>DH10B</b>	Stamm zur Amplifikation von Plasmiden. Genotyp: <i>E. coli</i> , F <sup>-</sup> , <i>mcrA</i> , $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ), $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta$ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , $\lambda$ - <i>rpsL</i> , (Str <sup>R</sup> ), <i>nupG</i>
<b>DH10MultiBac</b>	Stamm enthält das MultiBac-Bacmid, in welches die Transfervektoren (pFBDM etc.) integriert werden (Bieniossek et al., 2012). Genotyp: <i>E. coli</i> , F <sup>-</sup> , <i>mcrA</i> , $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ), $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta$ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , $\lambda$ - <i>rpsL</i> , (Str <sup>R</sup> ), <i>nupG</i> , pMON14272, pMON7124
<b>Rosetta<sup>TM</sup>(DE3)</b>	T7-Promotor-basierter Expressionsstamm mit seltenen Kodons. Genotyp: <i>E. coli</i> , F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hsdS<sub>B</sub></i> , ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup></i> <i>m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , (DE3), pRARE, (Cam <sup>R</sup> )

#### 4.5.2 Insektenzelllinien

<b>High-Five</b>	Offiziell: BTI-TN-5B1-4. Zelllinie aus den Ovarien von <i>Trichoplusia ni</i> zur Expression von rekombinanten Proteinen (Wickham et al., 1992).
<b>Schneider 2 (S2)</b>	Zelllinie eines späten Stadiums (20 – 24 h) von <i>D. melanogaster</i> Embryonen (Schneider, 1972).
<b>Sf21</b>	Offiziell: IPLB-Sf21-AE. Zelllinie aus den Ovarien von <i>Spo-doptera frugiperda</i> zur Amplifikation von Baculoviren und Expression von rekombinanten Proteinen (Vaughn et al., 1977).

#### 4.5.3 Spezielle Nährmedien

<b>5052xAutoinduktion</b>	LB-Medium mit Zugabe von: $\alpha$ -Lactose (0,2 %), Glucose (0,05 %), Glycerin (0,5 %), $MgSO_4$ (2 mM) (Studier, 2005)
<b>ExCell 420 SFM</b>	Medium zur Kultivierung von Sf21- und High-Five-Zellen. Serumfrei, mit L-Glutamin, Hersteller: Sigma-Aldrich.
<b>Schneider's <i>Drosophila</i> Medium</b>	Medium zur Kultivierung von S2-Zellen. Mit L-Glutamin und Natriumhydrogencarbonat. Hersteller: Thermo Fisher.

## 4.6 Methoden

Biochemische und molekularbiologische Standardmethoden wurden nach (Sambrook & Russell, 2001) durchgeführt. Spezielle Methoden dieser Arbeit werden im nachfolgenden aufgeführt.

### 4.6.1 Mikrobiologische Methoden

#### 4.6.1.1 Autoinduktion in *E. coli* zur Proteinexpression

Für die Überexpression von rekombinanten Proteinen in *E. coli* wurden Stämme mit dem Lambda DE3-Prophagen verwendet, welcher das Gen für die T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle des lacUV5-Promotor enthält. Da die Expression des Zielproteins unter der Kontrolle des T7-Promoters und lac-Operons steht, kann hiermit durch Zugabe von IPTG oder  $\alpha$ -Lactose die Expression reguliert werden. Für Proteine, die zur Aggregation neigen, wurde die Expression durch Zugabe von  $\alpha$ -Lactose in Form eines Autoinduktionsmediums initiiert (Studier, 2005). Das Autoinduktionsmedium enthält neben der  $\alpha$ -Lactose auch Glucose, welche das lac-Operon inhibiert und bevorzugt metabolisiert wird. Dadurch wird zu Beginn der Zugabe des Autoinduktionsmediums hauptsächlich die Glucose aufgebraucht und erst mit sinkenden Glucose-Konzentrationen wird allmählich die  $\alpha$ -Lactose metabolisiert. Dies gewährleistet eine langsame kontinuierliche Induktion im Vergleich zu der rapiden sehr starken Induktion mit IPTG. Hiermit soll vor allem die korrekte Faltung der Proteine in *E. coli* begünstigt werden. Außerdem wirkt die rapide Proteinexpression durch IPTG inhibitorisch auf das Zellwachstum, sodass mit der Autoinduktion höhere Zelldichten und damit auch Zellmassen erreicht werden.

## 4.6.2 Molekularbiologische Methoden

Die DNA-Sequenzen der in dieser Arbeit erzeugten Plasmide wurden mittels Sanger-Sequenzierung (durchgeführt von Eurofins Genomics) überprüft.

### 4.6.2.1 Klonierung der <sup>Dm</sup>CCR4-NOT-Komplexe

Zur Klonierung der verschiedenen <sup>Dm</sup>CCR4-NOT-Subkomplexe wurden sämtliche ORFs mit Ausnahme von NOT10 und NOT11 aus *D. melanogaster* cDNA isoliert. Den einzelnen Proteinen der Komplexe wurde mittels PCR ein Protein-Tag angefügt: für NOT1<sub>MINI</sub> (Aminosäuren 1147 – 2505), NOT2, NOT3 und Caf1 ein N-terminaler His<sub>8</sub>-Tag und für CCR4 sowie Caf40 ein C-terminaler FLAG-tag. His<sub>8</sub>-NOT2 wurde in den pFBDM-Vektor zwischen die *NheI*- und *KpnI*-Schnittstellen eingefügt, woraufhin His<sub>8</sub>-NOT1<sub>MINI</sub> in das resultierende pFBDM-His<sub>8</sub>-NOT2-Plasmid zwischen die *HindIII*- und *XbaI*-Schnittstellen eingefügt wurde.

Dieses pFBDM-His<sub>8</sub>-NOT2\_His<sub>8</sub>-NOT1<sub>MINI</sub>-Plasmid war die Grundlage für die Herstellung der längeren Varianten von NOT1, welche allerdings keinen N-terminalen His<sub>8</sub>-Tag mehr aufweisen. Dazu wurden zwischen die *XbaI*- und *AgeI*-Schnittstellen in dem NOT1<sub>MINI</sub>-Plasmid die folgenden längeren Varianten von NOT1 eingefügt bis das vollständige NOT1 erreicht wurde: *AvrII*\_NOT1<sub>MINI</sub>\_EXT\_*AgeI* (Aminosäuren 878-1570); *XbaI*\_NOT1<sub>PE</sub>\_A*geI* (Aminosäuren 288-1570); *XbaI*\_NOT1<sub>PC</sub>\_A*geI* (Aminosäuren 1-1570).

Weiterhin wurde Caf40-FLAG zwischen die *EcoRI*- und *XbaI*-Schnittstellen des pFBDM-Vektors eingefügt. His<sub>8</sub>-NOT3 wurde in das pFBDM-Caf40-FLAG-Plasmid zwischen die Schnittstellen von *SmaI* und *KpnI* integriert, was zum pFBDM-Caf40-FLAG\_His<sub>8</sub>-NOT3-Plasmid führte.

Das Modul aus beiden Ribonukleasen wurde in ein Plasmid gebracht. Dazu wurde CCR4-FLAG zwischen die *XhoI*- und *KpnI*-Schnittstellen vom pFastBac-Dual-Vektor ligiert und His<sub>8</sub>-Caf1 zwischen die *BamHI*- und *XbaI*-Schnittstellen des resultierenden pFastBac-Dual-CCR4-FLAG-Plasmids eingefügt, woraus das pFastBac-Dual-CCR4-FLAG\_His<sub>8</sub>-Caf1-Plasmid entstand. Für die Generierung der Ribonuklease-Mutanten wurden mittels *overlap-extension*-PCR Punktmutationen in CCR4 (412D/414N zu Alanin) und Caf1 (53D/55E zu Alanin) eingefügt (Temme et al., 2010). Zur Assemblierung der Wildtyp/Mutanten-Kombinationen wurde entweder CCR4<sup>WT</sup>-FLAG oder CCR4<sup>MUT</sup>-FLAG zwischen die *BamHI*- und *XbaI*-Schnittstelle vom pFBDM-Vektor ligiert. Nachfolgend wurde entweder His<sub>8</sub>-Caf1<sup>WT</sup>

oder His<sub>8</sub>-Caf1<sup>MUT</sup> in die entsprechenden Plasmide pFBDM-CCR4<sup>WT</sup>-FLAG oder pFBDM-CCR4<sup>MUT</sup>-FLAG zwischen die *BamHI*- und *XbaI*-Schnittstellen integriert.

NOT10 wurde aus dem pnYC-MBP-NOT10 mit *KpnI* und *NheI* geschnitten und zwischen die Schnittstellen von *KpnI* und *AvrII* im pnEK-His<sub>8</sub>-MBP-Cup-Plamid (vgl. Abschnitt 4.6.2.2) eingefügt, wobei Cup durch NOT10 ausgetauscht wurde. Dadurch wurde ein N-terminaler His<sub>8</sub>-MBP-Tag mit nachfolgender PreScission-Spaltstelle an NOT10 angefügt. Das pnEK-His<sub>8</sub>-MBP-NOT10-Plasmid wurde mit *BglIII* und *XbaI* geschnitten und das Restriktionsfragment zwischen die *BglIII*- und *AvrII*-Schnittstellen vom pETDuet-1-Vektor, hinter den zweiten T7-Promotor, kloniert. Das resultierende pETDuet-1-His<sub>8</sub>-MBP-NOT10-Plasmid wurde hinter dem ersten T7-Promotor mit *Sall* und *BglIII* geschnitten, um ein *XhoI*\_NOT11\_*BamHI*-Restriktionsfragment, aus dem pnEA-NOT10-Plasmid, zwischen diese Schnittstellen zu integrieren, sodass auch gleichzeitig ein N-terminaler His<sub>6</sub>-Tag an NOT11 fusioniert wurde. Hieraus ergab sich das pETDuet-1-His<sub>6</sub>-NOT11\_His<sub>8</sub>-MBP-NOT10-Plasmid.

#### 4.6.2.2 Klonierung der Repressorproteine

Sämtliche ORFs der Repressorproteine wurden aus *D. melanogaster* cDNA amplifiziert, mit Ausnahme von Cup, welches von Dr. Fulvia Bono bereitgestellt wurde (als pnEK-His<sub>8</sub>-Cup- und pFL-His<sub>8</sub>-Cup\_eIF4E-Plasmid). Weiterhin wurde mittels PCR ein C-terminaler FLAG-Tag an Smaug und Cup fusioniert. Nachfolgend wurde Smaug-FLAG zwischen die *NheI*- und *NotI*-Schnittstellen und Cup-FLAG zwischen die *SmaI*- und *XhoI*-Schnittstellen des pFBDM-Vektors eingefügt.

Für die Generierung der MBP-Cup-Fragmente wurde zuerst MBP aus dem pnYC-MBP-Plasmid mit *SpeI* und *XhoI* geschnitten und zwischen die entsprechenden Schnittstellen in pnEK-His<sub>8</sub>-Cup eingefügt. Dem resultierenden pnEK-MBP-Cup-Plasmid wurde mittels PCR ein N-terminaler His<sub>8</sub>-Tag hinzugefügt und nachfolgend wurden in dieses Plasmid die verschiedenen Cup-Fragmente eingefügt. Dazu wurden die Fragmente über eine PCR mit pFBDM-Cup-FLAG amplifiziert und zwischen die *XhoI*- und *AvrII*-Schnittstellen des pnEK-His<sub>8</sub>-MBP-Cup-Plasmids integriert. Die MBP-Cup-Fragmente wurden aus diesem pnEK-His<sub>8</sub>-MBP-Vektorhintergrund mittels *NcoI* und *AvrII* geschnitten und zwischen die *NcoI*- und *NheI*-Schnittstellen vom pFBDM-Vektor ligiert. Ein N-terminaler His<sub>8</sub>-λN-Tag wurde den pFBDM-MBP-Cup-Fragmente über die *NcoI*- und *SmaI*-Schnittstellen hinzugefügt, was in pFBDM-His<sub>8</sub>-λN-MBP-Cup-Fragment-Plasmiden resultierte.

Das CupM-Fragment wurde wie oben beschrieben aus pFBDM-Cup-FLAG amplifiziert und zwischen die *XhoI*- und *AvrII*-Schnittstellen des pEK-His<sub>8</sub>-Cup-Plasmids eingefügt. Dem resultierenden pEK-His<sub>8</sub>-CupM-Plasmid wurde der Bereich mit der CHD (aa566 bis 589) mittels *overlap-extension-PCR* deletiert.

Das pET28a-His<sub>6</sub>-Tral-His<sub>8</sub>-Plasmid wurde generiert, indem ein Tral-His<sub>8</sub>-Restriktionsfragment aus dem pFBDM-Tral-His<sub>8</sub>-Plasmid mit *HindIII* und *Eco53kI* geschnitten wurde und zwischen die entsprechenden Schnittstellen im pET28a-Vektor eingefügt wurde.

Weiterhin wurde in einem mit *BamHI* und *XhoI* geschnittenen pET28a-Vektor zwischen diese Restriktionsschnittstellen PABPC kloniert, woraus das pET28a-His<sub>6</sub>-PABPC-Plasmid resultierte.

Die Plasmide, welche die ORFs von Me31B und Belle enthalten, wurden von Dr. Christiane Rammelt bereitgestellt.

#### 4.6.2.3 Klonierung der Transkriptionstemplates

Die SREonly-RNA, TCE-RNA und nLuc-SRE-RNA sowie die entsprechenden Mutanten (SRE<sup>MUT</sup>) wurden bereits beschrieben (Jeske et al., 2006; Kluge et al., 2020). Sämtliche Transkriptionsvektoren beinhalten *downstream* zum 3'-UTR-Element einen poly(A)-Schwanz aus 70 Adenylaten.

Für die Herstellung des *tethering*-Konstrukts pBSK-nLuc-2xBoxB wurden zuerst vier synthetische Restriktionsfragmente mit insgesamt zwei BoxB-*stem-loops* (Baron-Benhaim et al., 2004) assembliert. Die assemblierten Fragmente enthielten DNA-Überhänge am 5'- und 3'-Ende, die einem Verdau mit *BglIII* und *XbaI* entsprachen, um sie zwischen die *BglIII*- und *XbaI*-Schnittstellen vom pBSK-nLuc-SRE<sup>WT</sup>-Plasmid zu integrieren.

Für die Klonierung des pBSK-nLuc-BRE<sup>WT</sup>-Plasmids wurde das AB-Element der *oskar* 3'UTR (Kim-Ha et al., 1995), welches von Bruno gebunden wird, mittels PCR amplifiziert und zwischen die *BglIII*- und *XbaI*-Schnittstellen des pBSK-nLuc-SRE<sup>WT</sup>-Plasmids integriert. Dabei wurde auch gleichzeitig am 5'-Ende des AB-Elements eine *EcoRI*-Schnittstelle und am 3'-Ende eine *BamHI*-Schnittstelle hinzugefügt. Diese beiden Schnittstellen wurden genutzt, um das mehrfach mutierte AB-Element (Kim-Ha et al., 1995) zu generieren, indem vier synthetische Restriktionsfragmente assembliert wurden und zwischen diese beiden Schnittstellen eingefügt wurden. Hieraus ergab sich das pBSK-nLuc-BRE<sup>MUT</sup>-Plasmid.

Weiterhin wurde ein Restriktionsfragment, bestehend aus dem nLuc-ORF mit den *downstream* SREs (Wildtyp und Mutante) sowie einem poly(A)-Schwanz (A70), mittels

*SacI* und *XhoI* aus den pBSK-nLuc-SRE-Plasmiden geschnitten und in den pET28a-Vektor zwischen die entsprechenden Schnittstellen ligiert. Dadurch lag *upstream* zum ORF eine Ribosomenbindestelle aus dem Gen10 vom Bakteriophagen T7 vor (Olins & Rangwala, 1989). Dies ermöglichte die nachfolgende Translation der Transkripte in *E. coli*.

#### 4.6.2.4 Präparation von RNAs durch *In-vitro*-Transkription

Zur Generierung von RNAs wurde diese ausgehend von linearisierten Plasmiden in einer *Run-off*-Transkription mittels T3- oder T7-RNA-Polymerase synthetisiert.

Dazu wurde zuerst für die unmarkierte oder radioaktiv markierte RNA eine Transkription mit dem Anti-Revers-Cap-Analogon (7 mM) in der Abwesenheit von GTP gestartet. Nach 5 Minuten wurde der Reaktion 1 mM GTP versetzt und für weitere 2 Stunden inkubiert. Für die radioaktiv markierte RNA befindet sich von Anfang an auch [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-UTP in der Reaktion. Sämtliche radioaktiv markierte RNA wurde nach erfolgter Gelelektrophorese aus dem Gel gereinigt. Die unmarkierte RNA wurde mit DNase I (1 U) für 30 Minuten inkubiert, nachfolgend wurde die RNA mittels Phenol extrahiert und über eine Ethanol-fällung präzipitiert.

Im Gegensatz dazu wurde für die fluoreszenzmarkierte RNA die Transkription mit dem 6-Carboxyfluorescein-(6-FAM)-markierten ApG-Cap-Analogon (1 mM) in Abwesenheit von GTP gestartet. Hier wurde nach 5 Minuten GTP (0,2 mM) zur Reaktion gegeben und für weitere 20 Minuten inkubiert, bevor die GTP-Konzentration auf 1 mM erhöht wurde und die Transkription eine weitere Stunde ablief. Danach wurde die fluoreszenzmarkierte RNA auf dieselbe Art wie die unmarkierte RNA aufgereinigt.

**Tabelle 4.6: Zusammensetzung der Transkriptionsreaktion.**

<u>Transkriptionsreaktion:</u>	<u>NTP-Mix</u>
1x Transkriptionspuffer	1 mM ATP
1x NTP-Mix	1 mM CTP
7 mM oder 1 mM Cap-Analogon	1 mM GTP
1 mM DTT	1 mM UTP   0,2 mM für radioaktiv markiert
0,8 U/ $\mu$ L RNase-Inhibitor	
1 $\mu$ g DNA-Template	
$\pm$ 40 $\mu$ Ci [ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-UTP	
125 U T3- oder T7-RNA-Polymerase	

### 4.6.3 Das MultiBac-System

Die Generierung und Selektion der Bacmid-DNA mit integrierten Zielprotein-ORFs sowie die Propagation der entsprechenden Baculoviren ist dem „Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System“-Handbuch von Invitrogen bzw. Thermo Fisher zu entnehmen (Thermo Fisher, 2015). Lediglich die Isolation der Bacmid-DNA und die Transfektion der Insektzellen unterschieden sich hier vom angegebenen Handbuch, sodass diese im nachfolgenden erklärt werden.

#### 4.6.3.1 Isolation der Bacmid-DNA

Die Bacmid-DNA wurde aus 6 mL transformierten DH10MultiBac, nach erfolgter Antibiotika- und Blau-Weiß-Selektion, isoliert. Dazu wurden die Zellen zuerst für 15 Minuten bei  $3.750 \times g$  (bei RT) sedimentiert, danach das Zellpellet in 250  $\mu\text{L}$  Resuspensionspuffer aufgelöst und durch Zugabe von 250  $\mu\text{L}$  des alkalischen Lysispuffers aufgelassen (vgl. Tabelle 4.7). Abschließend wurde das Lysat durch Zugabe des Neutralisationspuffers neutralisiert. Nach Zugabe der letztgenannten zwei Puffer wurde die Mischung durch sanftes Invertieren des Reaktionsgefäßes gemischt. Hiernach wurden die unlöslichen Zelltrümmer und genomische DNA durch Zentrifugation (20 Minuten bei  $20.000 \times g$  und RT) von der löslichen Bacmid-DNA getrennt. Der Überstand (ca. 650  $\mu\text{L}$ ) wurde daraufhin mit 800  $\mu\text{L}$  eiskaltem Isopropanol gemischt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde die Bacmid-DNA mittels Zentrifugation (15 Minuten bei  $20.000 \times g$  und RT) pelletiert und das Pellet zweimal mit je 500  $\mu\text{L}$  Ethanol (80 % (v/v)) gewaschen. Das Pellet wurde an der Raumluft getrocknet (in der Sterilbank) und in 40  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  (DEPC-behandelt) aufgenommen.

**Tabelle 4.7: Zusammensetzung der Puffer zur Bacmid-Isolation.**

<i>Resuspensionspuffer:</i>	<i>Lysispuffer:</i>	<i>Neutralisationspuffer:</i>
50 mM Tris-HCl, pH 8,0	200 mM Natriumhydroxid	3 M Kaliumacetat, pH 5,5
10 mM EDTA	1 % (w/v) SDS	
100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase A		

#### 4.6.3.2 Transfektion von Sf21-Zellen mit Bacmid-DNA

Aus einer Suspensionskultur mit Sf21-Zellen wurden je  $1,5 \times 10^6$  Zellen in 2 mL Medium (ExCell 420 SFM) in eine Vertiefung einer 6-well-Platte ausgesät und für mind. 30 Minuten bei 27 °C inkubiert, bis die Zellen semi-adhären waren.



Parallel dazu wurden 5  $\mu\text{L}$  der auf Raumtemperatur erwärmten Transfektionslösung (FuGene<sup>®</sup> HD) mit 10  $\mu\text{L}$  Bacmid-DNA-Lösung (ca. 10 bis 20  $\mu\text{g}$ ) und 200  $\mu\text{L}$  ExCell-Medium durch Invertieren gemischt. Die Transfektionsmischung wurde mind. für 15 Minuten bei 27 °C inkubiert. Hiernach wurde die gesamte Transfektionsmischung zu den semi-adhären-ten Sf21-Zellen gegeben und für 3 bis 5 Tage bei 27 °C inkubiert, bis erste Zeichen einer baculoviralen Infektionen auftraten (stark vergrößerte Zellen, geringe Konfluenz, abgelöste Zellen etc.). Der flüssige Überstand stellt hier die erste virale Generation (V0) dar, die meist noch einen niedrigen Virentiter aufweist, sodass diese weiter propagiert wurde.

#### 4.6.4 Proteinbiochemie

##### 4.6.4.1 Expression und Aufreinigung der <sup>Dm</sup>CCR4-NOT-Komplexe

Für die Rekonstitution der hexameren <sup>Dm</sup>CCR4-NOT-Komplexe wurden Sf21-Zellen mit drei Baculoviren infiziert, welche folgende Proteinkombinationen exprimieren: 1. His<sub>8</sub>-NOT3 und Caf40-FLAG; 2. CCR4-FLAG und His<sub>8</sub>-Caf1 und 3. His<sub>8</sub>-NOT2 mit einer der verschiedenen Varianten von NOT1. Die Baculoviren wurden der Reihenfolge entsprechend in einem Verhältnis 2:1:2 eingesetzt. Die infizierten Zellen wurden 72 Stunden nach der Infektion geerntet und in eiskaltem Lysispuffer (Tabelle 4.8) resuspendiert. Die Zellen wurden durch Sonifikation (sechs bis zehn Zyklen, bestehend aus je 10 Sekunden Sonifikation und 45 Sekunden Pause; eisgekühlt) lysiert und danach wurde das Lysat mittels Zentrifugation (20 Minuten bei 20.000  $\times$  g und 6 °C) von Zelltrümmern und unlöslichen Proteinen getrennt. Nachfolgend wurde der Überstand zu einer anti-FLAG M2 Agarosematrix gegeben und für 2 Stunden unter konstanter Rotation bei ca. 8 °C inkubiert. Alle folgenden Reinigungsschritte erfolgten im *Batch*-Format.

**Tabelle 4.8: Zusammensetzung der Proteinreinigungspuffer.**

<u>Lysispuffer (pH 7,6):</u>	<u>Waschpuffer (pH 7,6):</u>	<u>Elutionspuffer (pH 7,6):</u>
500 mM NaCl	500 mM NaCl	500 mM NaCl
50 mM HEPES-NaOH	50 mM HEPES-NaOH	50 mM HEPES-NaOH
10 mM Kaliumphosphat	10 mM Kaliumphosphat	10 mM Kaliumphosphat
10 % Saccharose	10 % Saccharose	10 % Saccharose
1 mM PMSF		±200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FLAG-Peptid
1 $\mu\text{M}$ Pepstatin A		±160 mM Imidazol

Die Matrix wurde nach der Bindungsreaktion viermal mit Waschpuffer gewaschen und die Elution erfolgte durch Zugabe von Waschpuffer mit 200 µg/ml FLAG-Peptid (vgl. Tabelle 4.8). Dazu wurde die Matrix für 30 Minuten mit dem Elutionspuffer inkubiert und danach der Überstand mittels PES-Konzentrators (10 kDa MWCO) aufkonzentriert.

Die Elution aus der FLAG-Affinitätschromatographie wurde nachfolgend durch eine Größenausschlusschromatographie weiter aufgereinigt. Dazu wurde das aufkonzentrierte Eluat auf eine Superose 6 3.2-Größenausschlussäule (Trennbereich von 5 kDa bis 5 MDa) gegeben, die mit dem vorher genutzten Waschpuffer äquilibriert wurde. Die Proteine wurden mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,04 ml/min bzw. 0,017 CV/min über die Säule nach ihrer Größe getrennt. Parallel dazu wurde mit einem UV-Detektor die Absorption bei 280 nm und 260 nm verfolgt. Die Fraktionen wurden über ein Coomassie-gefärbtes SDS-PA-Gel und mittels Western Blot analysiert. Die den hexameren CCR4-NOT-Komplex enthaltenden Fraktionen wurden gesammelt und wie oben aufkonzentriert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Für die Rekonstitution des oktameren  $D^m$ CCR4-NOT<sub>FULL</sub>-Komple wurden His<sub>8</sub>-MBP-NOT10 und His<sub>6</sub>-NOT11 in *E. coli* BL21(DE3)-Star<sup>TM</sup> mittels Autoinduktion überexprimiert. Nach 24 Stunden wurde die Zellen geerntet, in eiskaltem Lysispuffer mit 1 mg/mL Lysozym und 10 mM Imidazol resuspendiert und für 1 Stunde unter konstanter Rotation bei ca. 8 °C inkubiert. Hiernach wurden die Zellen durch Sonifikation, wie oben beschrieben, lysiert und das Lysat durch Zentrifugation (20 Minuten bei 15.000 × g und 6 °C) von Zelltrümmern sowie unlöslichen Proteinen getrennt. Der Überstand wurde zu einer Ni-NTA-Agarosematrix gegeben und für 2 Stunden unter konstanter Rotation bei ca. 8 °C inkubiert. Daraufhin wurde die Matrix viermal mit Waschpuffer plus 20 mM Imidazol gewaschen und die Elution durch Zugabe von Waschpuffer mit 160 mM Imidazol gestartet (vgl. Tabelle 4.8). Nach 30 Minuten wurde die Matrix durch Zentrifugation (3 Minuten bei 500 × g und 6 °C) vom Eluat getrennt. Das Eluat wurde zu einer Amylose-Matrix gegeben und für weitere 2 Stunden bei ca. 8 °C konstant rotierend inkubiert. Die Amylose-Matrix wurde zweimal mit Waschpuffer gewaschen und NOT10 sowie His<sub>6</sub>-NOT11 wurden von der Matrix eluiert, indem diese für 2 Stunden mit einer ca. äquimolaren Menge an GST-PreScission<sup>TM</sup>-Protease inkubiert wurden, wodurch der His<sub>8</sub>-MBP-Tag an NOT10 abgespalten wurde. Das Eluat wurde von der Matrix und dem daran gebundenen His<sub>8</sub>-MBP-Tag durch Zentrifugation (3 Minuten bei 500 × g und 6 °C) getrennt. Nach Aufkonzentrierung des Eluats mittels PES-Konzentrators (10 kDa MWCO), wurde ein zweifacher Überschuss des NOT10-NOT11-

Heterodimers mit dem hexameren  $\text{DmCCR4-NOT}_{\text{PC}}$  für 2 Stunden bei 8 °C inkubiert, um den oktameren  $\text{DmCCR4-NOT}_{\text{FULL}}$  zu rekonstituieren.

Die vorliegenden Proteinkomplexe wurden durch eine Größenausschlusschromatographie (Superose 6 3.2), wie oben beschrieben, aufgetrennt und die den  $\text{DmCCR4-NOT}_{\text{FULL}}$ -Komplex enthaltenden Fraktionen wurden gesammelt und aufkonzentriert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

#### 4.6.4.2 Expression und Aufreinigung der *nanos*-Repressorproteine

Sf21-Zellen wurden mit Baculoviren infiziert, die für die Proteine Smaug-FLAG, Cup-FLAG, Tral-His<sub>8</sub>, GST-Me31B, His<sub>8</sub>-Belle und sämtliche MBP- sowie His<sub>8</sub>-λN-MBP-Cup-Fragmente kodieren. Der Aufschluss der Zellen und die Aufreinigung der Proteine verlief für den entsprechenden Protein-Tag analog zu der FLAG-Affinitätschromatographie für die CCR4-NOT-Komplexe und der Ni-NTA-Affinitätschromatographie von His<sub>8</sub>-MBP-NOT10 plus His<sub>6</sub>-NOT11 (vgl. Abschnitt 4.6.4.1). Lediglich GST-Me31B und die Cup-Fragmente wichen in ihrer Präparation ab. So wurde GST-Me31B für 2 Stunden an einer GSH-Sepharose-Matrix immobilisiert, die Matrix viermal mit Waschpuffer (vgl. Tabelle 4.8) gewaschen und die Elution erfolgte durch Spaltung des GST-Tag von GST-Me31B durch Zugabe von GST-PreScission<sup>TM</sup>-Protease zu der Matrix (vgl. Elution von NOT10 und His<sub>6</sub>-NOT11 in Abschnitt 4.6.4.1). Durch den GST-Tag an der Protease verblieb diese an der Matrix.

Die MBP-Cup-Fragmente wurden von der Amylose-Matrix durch Zugabe von Waschpuffer mit 20 mM Maltose eluiert und die His<sub>8</sub>-λN-MBP-Cup-Fragmente wurden nach der initialen Aufreinigung mittels Ni-NTA-Matrix noch durch eine Amylose-MBP-Affinitätschromatographie weiter aufgereinigt, falls erforderlich. Auch hier wurden die Fragmente mit 20 mM Maltose im Waschpuffer eluiert.

Für die Expression von His<sub>6</sub>-T7-PABPC und His<sub>6</sub>-T7-Tral-His<sub>8</sub> wurden hauptsächlich *E. coli* BL21(DE3)-Star<sup>TM</sup> unter Autoinduktion verwendet, da mit den anderen Expressionsstämmen nach der Proteinreinigung eine Nukleasekontamination vorlag. Der Zellaufschluss und die Ni-NTA-Affinitätschromatographie wurde wie für His<sub>8</sub>-MBP-NOT10 plus His<sub>6</sub>-NOT11 durchgeführt (vgl. Abschnitt 4.6.4.1).

Die Repressorproteine wurden, falls notwendig, über einen Amicon-Ultra-Konzentrator (10 kDa MWCO) aufkonzentriert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Die Identität der Proteine wurde mittels Western-Blot überprüft.

#### 4.6.4.3 Quantifizierung von aufgereinigten rekombinanten Proteinen

Die Konzentration der Proteinpräparationen wurde über eine In-Gel-Quantifizierung mit einem Vergleichsprotein bekannter Konzentration durchgeführt. Dazu wurden die Proteinpräparationen und eine Konzentrationsreihe des Vergleichsproteins (BSA) über eine SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Das Gel wurde gescannt und die Intensität der Färbung der einzelnen Proteinbanden wurde mit dem Programm FiJi quantifiziert (Schindelin et al., 2012). Mit dem Vergleichsprotein wurde eine Eichgerade erstellt, anhand derer die unbekannt Proteinkonzentrationen ermittelt wurden.

#### 4.6.4.4 Western-Blot-Analyse

Die zu analysierenden Proteine wurden zuerst über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Danach wurde das SDS-PA-Gel über Nacht in 192 mM Glycin und 25 mM Tris auf eine Nitrocellulose-Membran bei 27 V und ca. 8 °C in einem Tank-Blotter (*wet blot*) transferiert. Nachfolgend wurde die Membran in TBST mit 1,5 % Gelatine für 1 bis 2 Stunden bei RT inkubiert, um überschüssige Bindestellen zu blockieren. Danach wurden die entsprechenden primären Antikörper (vgl. Tabelle 4.4) in TBST mit 1,5 % Gelatine verdünnt und für mindestens eine Stunde zu der Membran gegeben. Nach der Bindung wurde ungebundener Antikörper durch dreimaliges Waschen mit TBST beseitigt. Hiernach wurde der entsprechende sekundäre Antikörper in TBST verdünnt und für eine Stunde mit der Membran inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde erneut durch dreimaliges Waschen mit TBST entfernt. Die Detektion des fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpers erfolgte mit dem LI-COR Odyssey DLx Fluoreszenzscanner.

#### 4.6.4.5 Präparation zellfreier Translationsextrakte

Die Präparation von *Drosophila*-Embryoextrakt wurde nach Götze et al., 2017 und Jeske et al., 2014 durchgeführt.

Für die Herstellung von zellfreien Translationsextrakten aus High-Five-, Sf21- und S2-Zellen wurde eine Kombination aus den Methoden in (Ezure et al., 2006), welche bereits zellfreie Translationsextrakte aus Sf21- und High-Five-Zellen etabliert hatten, und Jeske et al., 2014 angewandt. Dazu wurden die entsprechenden Insektenzellen bei 200 bis 300 × g für 7 Minuten zentrifugiert und der Überstand komplett verworfen.

Die Zellen wurden in eiskaltem Extraktionspuffer A (vgl. Tabelle 4.9) auf  $1,5 \times 10^8$  Zellen/ml verdünnt (ca. 1:1) und in einen vorgekühlten DOUNCE-Homogenisator überführt. Dort wurden sie mit 30 bis 40 Stößen aufgeschlossen und je 500  $\mu$ L Aliquots vom Lysat wurden bei  $20.000 \times g$  für 30 Minuten zentrifugiert, um die Zelltrümmer abzutrennen. Die flüssige Phase wurde abgenommen und, falls notwendig, nochmal für 5 Minuten bei  $20.000 \times g$  zentrifugiert, um letzte Reste an Zelltrümmern zu beseitigen. Der zellfreie Translationsextrakt wurde in 200  $\mu$ L Aliquots verteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

Die Herstellung von zellfreien Translationsextrakten aus *E. coli* orientierte sich an den beschriebenen Protokollen für gekoppelte Transkriptions-Translations-Systeme (Kigawa et al., 2004; Kim et al., 2006), die allerdings nicht für die Translation von exogen zugeführter mRNA eingesetzt werden konnten, da die RNase-Konzentration zu hoch war. Darum wurden *E. coli* BL21(DE3)-Star<sup>TM</sup> verwendet, welche eine Mutation in der RNaseE aufweisen, sodass mRNAs hier generell stabiler sind.

Zuerst wurden die Zellen bis zu einer Zelldichte ( $\text{OD}_{595\text{ nm}}$ ) von 1 bis 2 hochgezogen. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation für 10 Minuten bei  $5.000 \times g$  und  $6^\circ\text{C}$  geerntet. Das Zellpellet wurde gewogen und das 1,3-fache Volumen an eiskaltem Extraktionspuffer B (vgl. Tabelle 4.9) zugegeben. Nachfolgend wurden die Zellen durch einen vorgekühlten Hochdruck-Homogenisator mit 6.000 Psi in einem Durchgang aufgeschlossen. Das Lysat wurde für 10 Minuten bei  $12.000 \times g$  und  $6^\circ\text{C}$  zentrifugiert, um die Zelltrümmer und unlöslichen Moleküle abzutrennen. Der zellfreie Translationsextrakt wurde in 200  $\mu$ L Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

**Tabelle 4.9: Zusammensetzung der Extraktionspuffer für zellfreie Translationsextrakte.**

<u>Extraktionspuffer A (Insektenzellen):</u>	<u>Extraktionspuffer B (BL21(DE3)-Star<sup>TM</sup>):</u>
100 mM KAc	10 mM Tris pH 8,2
30 mM HEPES-KOH pH 7,4	60 mM KAc
2 mM Mg(Ac) <sub>2</sub>	14 mM Mg(Ac) <sub>2</sub>
5 mM DTT	2 mM DTT
0,5 mM PMSF	0,5 mM PMSF

## 4.6.5 Funktionale Assays

### 4.6.5.1 Deadenylierungsassays

Die zu untersuchende Substrat-RNA wurde entweder direkt im Deadenylierungspuffer (vgl. Tabelle 4.10) unter Zugabe vom jeweiligen CCR4-NOT-Komplex inkubiert oder sie wurde noch mit einem Repressorprotein für 20 bis 30 Minuten vorinkubiert, bevor der CCR4-NOT-Komplex zugegeben wurde.

Die Repressorproteine wurden vor Zugabe zur Reaktion in einem Verdünnungspuffer (200 mM KAc, 50 mM HEPES-KOH pH 7,4) auf die erforderliche Konzentration verdünnt. Die Inkubationen wurden standardmäßig bei 25 °C sowohl für den *Drosophila*- als auch humanen CCR4-NOT-Komplex durchgeführt. Weiterhin enthielten die Reaktion methyliertes BSA, PEG 20.000 und tRNA, falls nicht anders angegeben. Das methylierte BSA erhöhte die Stabilität des <sup>Dm</sup>CCR4-NOT-Komplexes, das PEG 20.000 steigerte die Deadenylierungsaktivität in der Repressorprotein-assoziierten Deadenylierung und die Zugabe von tRNA führte zu einer Erhöhung der SRE-Spezifität der Smaug-abhängigen Deadenylierung. Die Deadenylierungsreaktion wurde mit einem zwei- bis dreifachen Überschuss an eiskaltem Formamid-Ladepuffer abgestoppt.

**Tabelle 4.10: Pufferzusammensetzung in der Deadenylierung.**

<u>Deadenylierungspuffer:</u>	<u>Formamid-Ladepuffer (Stopplösung):</u>
50 mM KAc	95 % Formamid, deionisiert
30 mM HEPES-KOH pH 7,4	17,5 mM EDTA pH 8,0
2 mM Mg(Ac) <sub>2</sub>	0,01 % Bromphenolblau
0,25 mg/ml Hefe-tRNA	0,01 % Xylencyanol
0,15 mg/ml meth. BSA	
2 mM DTT	
0,8 U/μl RNase-Inhibitor	
3 % (v/v) PEG 20.000	

Für die fluoreszenzmarkierte Substrat-RNA wurde das Xylencyanol aus dem Ladepuffer entfernt, da es beim Fluoreszenzscan ebenfalls detektiert wurde und auf ähnlicher Höhe wie die FAM-7mer-A20-RNA lief.

Nachfolgend wurden die abgestoppten Reaktionen für 3 Minuten bei 95 °C erhitzt, auf Eis abgekühlt und durch ein denaturierendes PA-Gel (19:1 Acrylamid-Bisacrylamid-Lsg., 1x TBE und 7 M Urea) die Reaktionsprodukte elektrophoretisch aufgetrennt.

Gele mit fluoreszenzmarkierten Produkten wurden direkt mit dem Typhoon 9200 gescannt, wohingegen Gele mit radioaktiv markierter RNA zuvor mit einem *Storage-Phosphor-Screen* über Nacht bei – 20 °C inkubiert wurden und der *Screen* am folgenden Tag gescannt wurde. Die Bilder wurden densitometrisch mittels FiJi quantifiziert (Schindelin et al., 2012).

#### 4.6.5.2 *Electrophoretic mobility shift assay* (EMSA)

Um die RNA-Bindung der hier aufgereinigten Proteine zu analysieren, wurde ein *electrophoretic mobility shift assay* durchgeführt. Dazu wurden die Proteine mit der jeweiligen Substrat-RNA im Deadenylierungspuffer (vgl. Tabelle 4.10) plus 5 % Glycerin für 20 bis 30 Minuten bei 25 °C inkubiert. Die gebildeten Protein-RNA-Komplexe wurden durch ein nicht-denaturierendes PA-Gel (5 % 60:1 Acrylamid-Bisacrylamid-Lsg., 0,5x TBE) bei 25 °C elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gele mit fluoreszenzmarkierter RNA wurden direkt mit dem Typhoon 9200 gescannt und die Gele mit radioaktiv markierter RNA wurden mittels *Storage-Phosphor-Screen* gescannt (vgl. Abschnitt 4.6.5.1).

#### 4.6.5.3 *In-vitro*-Translationsassays

Die Durchführung der *In-vitro*-Translationsassays wurde modifiziert aus (Götze et al., 2017) entnommen. So wurde für sämtliche Rekonstitutionsexperimente mit aufgereinigten Repressorproteinen ein zweistufiger Translationsassay durchgeführt, um die Menge an durch die Repressorproteine eingeführtem Salz in den zellfreien Translationsextrakten zu reduzieren. Dazu wurden die Bildung des Repressorkomplexes und die dazugehörige Translationsreaktion in zwei verschiedenen Reaktionsgefäßen getrennt. So wurde zuerst in einem Reaktionsgefäß die Nanoluciferase-Reporter-RNA im Translationspuffer (ohne ATP-regenerierendes System (ARS)) entweder mit den rekombinanten Repressorproteinen oder 40 % (v/v) *Drosophila* Embryoextrakt (DEE) gemischt und für 30 Minuten bei 25 °C inkubiert, um die Bildung eines Protein-RNA-Komplexes zu gewährleisten. Nachfolgend wurde ein Teil aus dieser Reaktionsmischung in einem separaten Reaktionsmix aus Translationspuffer, ARS und zellfreien Translationsextrakt im Verhältnis 1:10 verdünnt. In diesem zweiten Reaktionsmix wurde die Translation durch Zugabe von ARS und Translationsextrakt gestartet und für mind. 30 Minuten bei 25 °C durchgeführt.

Danach wurden die Reaktionen auf Eis abgestoppt und für ein Drittel der Translationsreaktion durch Zugabe von Nano-Glo<sup>®</sup> (Furimazin) die Aktivität der translatierten Nanoluciferase bestimmt (England et al., 2016). Dabei setzt die Nanoluciferase das Furimazin unter Einwirkung von molekularem Sauerstoff zu Furimamid und Kohlenstoffdioxid um. Außerdem tritt bei dieser Reaktion Biolumineszenz auf, welche durch den Tristar<sup>2</sup> in Form von *relative light units* (RLU) pro Sekunde detektiert wurde.

In der nachfolgenden Tabelle 4.11 sind die Translationspuffer für die Vorinkubation und die entsprechenden zellfreien Translationssysteme sowie das ARS dargestellt. Nur die *E. coli* Extrakte (Star12E) wurden zwischen 27 und 37 °C inkubiert, im Gegensatz zu den üblichen 25 °C.

**Tabelle 4.11: Zusammensetzung der Translationspuffer und des ARS.**

<u>Translationspuffer (Vorinkubation):</u>	<u>ATP-regenerierendes System (ARS):</u>
50 mM KAc	20 mM Kreatinphosphat
30 mM HEPES-KOH pH 7,4	40 ng/μL Kreatinkinase
1 mM Mg(Ac) <sub>2</sub>	20 μM Aminosäuremix
0,8 mM ATP	
0,25 mg/ml Hefe-tRNA	
2 mM DTT	
0,8 U/μl RNase-Inhibitor	
± 3 % (v/v) PEG 20.000	
<u>Translationspuffer (+ Sf21E; + H5E; + S2E)</u>	<u>Translationspuffer (+ DEE):</u>
wie Vorinkubationspuffer plus:	wie Vorinkubationspuffer plus:
40 % zellfreier Translationsextrakt	40 % zellfreier Translationsextrakt
2 mM Mg(Ac) <sub>2</sub>	1 mM Mg(Ac) <sub>2</sub>
<u>Translationspuffer (+ Star12E):</u>	
30 % zellfreier Translationsextrakt	
50 mM KAc	
16 mM HEPES-KOH pH 7,4	
0,8 mM GTP	
1,2 mM ATP	
16,5 mM Mg(Ac) <sub>2</sub>	
2 mM DTT	
0,8 U/μl RNase-Inhibitor	



## 5. Literaturverzeichnis

- Abaza, I., Coll, O., Patalano, S., & Gebauer, F. (2006).** Drosophila UNR is required for translational repression of male-specific lethal 2 mRNA during regulation of X-chromosome dosage compensation. *Genes & Development*, *20*(3), 380.
- Ambadipudi, S., Biernat, J., Riedel, D., Mandelkow, E., & Zweckstetter, M. (2017).** Liquid–liquid phase separation of the microtubule-binding repeats of the Alzheimer-related protein Tau. *Nature Communications*, *8*(1), 275.
- Andersen, K. R., Jonstrup, A. T., van Bich, L. A. N., & Brodersen, D. E. (2009).** The activity and selectivity of fission yeast Pop2p are affected by a high affinity for Zn<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> in the active site. *RNA*, *15*(5), 850.
- André, A. A. M., & Spruijt, E. (2020).** Liquid–Liquid Phase Separation in Crowded Environments. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(16), 1–20.
- Arvola, R. M., Chang, C.-T., Buytendorp, J. P., Levdansky, Y., Valkov, E., Freddolino, P. L., & Goldstrohm, A. C. (2020).** Unique repression domains of Pumilio utilize deadenylation and decapping factors to accelerate destruction of target mRNAs. *Nucleic Acids Research*, *48*(4), 1843–1871.
- Aviv, T., Lin, Z., Lau, S., Rendl, L. M., Sicheri, F., & Smibert, C. A. (2003).** The RNA-binding SAM domain of Smaug defines a new family of post-transcriptional regulators. *Nature Structural & Molecular Biology* 2003 *10*:8, *10*(8), 614–621.
- Ayache, J., Bénard, M., Ernoult-Lange, M., Minshall, N., Standart, N., Kress, M., & Weil, D. (2015).** P-body assembly requires DDX6 repression complexes rather than decay or Ataxin2/2L complexes. *Molecular Biology of the Cell*, *26*(14), 2579.
- Baron-Benhamou, J., Gehring, N. H., Kulozik, A. E., & Hentze, M. W. (2004).** Using the  $\lambda$ N Peptide to Tether Proteins to RNAs. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *257*, 135–153.
- Bashirullah, A., Cooperstock, R. L., & Lipshitz, H. D. (1998).** RNA localization in development. *Annual Review of Biochemistry*, *67*, 335–394.
- Bastock, R., & St Johnston, D. (2008).** Drosophila oogenesis. *Current Biology*, *18*(23), R1082–R1087.

- Bawankar, P., Loh, B., Wohlbold, L., Schmidt, S., & Izaurralde, E. (2013).** NOT10 and C2orf29/NOT11 form a conserved module of the CCR4-NOT complex that docks onto the NOT1 N-terminal domain. *RNA Biology*, *10*(2), 228.
- Berg, B. van den, Ellis, R. J., & Dobson, C. M. (1999).** Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation. *The EMBO Journal*, *18*(24), 6927.
- Bergsten, S. E., & Gavis, E. R. (1999).** Role for mRNA localization in translational activation but not spatial restriction of nanos RNA. *Development*, *126*(4), 659–669.
- Bianchin, C., Mauxion, F., Sentis, S., Séraphin, B., & Corbo, L. (2005).** Conservation of the deadenylase activity of proteins of the Caf1 family in human. *RNA*, *11*(4), 487–494.
- Bieniossek, C., Imasaki, T., Takagi, Y., & Berger, I. (2012).** MultiBac: expanding the research toolbox for multiprotein complexes. *Trends in Biochemical Sciences*, *37*(2), 49–57.
- Brandmann, T., Fakim, H., Padamsi, Z., Youn, J., Gingras, A., Fabian, M. R., & Jinek, M. (2018).** Molecular architecture of LSM14 interactions involved in the assembly of mRNA silencing complexes. *The EMBO Journal*, *37*(7), e97869.
- Braun, J. E., Huntzinger, E., Fauser, M., & Izaurralde, E. (2011a).** GW182 Proteins Directly Recruit Cytoplasmic Deadenylation Complexes to miRNA Targets. *Molecular Cell*, *44*(1), 120–133.
- Braun, J. E., Huntzinger, E., Fauser, M., & Izaurralde, E. (2011b).** GW182 proteins directly recruit cytoplasmic deadenylation complexes to miRNA targets. *Molecular Cell*, *44*(1), 120–133.
- Bushati, N., Stark, A., Brennecke, J., & Cohen, S. M. (2008).** Temporal Reciprocity of miRNAs and Their Targets during the Maternal-to-Zygotic Transition in *Drosophila*. *Current Biology*, *18*(7), 501–506.
- Cao, W. X., Kabelitz, S., Gupta, M., Yeung, E., Lin, S., Rammelt, C., Ihling, C., Pekovic, F., Low, T. C. H., Siddiqui, N. U., Cheng, M. H. K., Angers, S., Smibert, C. A., Wühr, M., Wahle, E., & Lipshitz, H. D. (2020).** Precise Temporal Regulation of Post-transcriptional Repressors Is Required for an Orderly *Drosophila* Maternal-to-Zygotic Transition. *Cell Reports*, *31*(12), 107783.
- Casas-Vila, N., Bluhm, A., Sayols, S., Dinges, N., Dejung, M., Altenhein, T., Kappei, D., Altenhein, B., Roignant, J.-Y., & Butter, F. (2017).** The developmental proteome of *Drosophila melanogaster*. *Genome Research*, *27*(7), 1273.

- Chekulaeva, M., Hentze, M. W., & Ephrussi, A. (2006).** Bruno Acts as a Dual Repressor of oskar Translation, Promoting mRNA Oligomerization and Formation of Silencing Particles. *Cell*, *124*(3), 521–533.
- Chen, L., Dumelie, J. G., Li, X., Cheng, M. H. K., Yang, Z., Laver, J. D., Siddiqui, N. U., Westwood, J. T., Morris, Q., Lipshitz, H. D., & Smibert, C. A. (2014).** Global regulation of mRNA translation and stability in the early *Drosophila* embryo by the Smaug RNA-binding protein. *Genome Biology*, *15*(1), 1–21.
- Chen, Y., Boland, A., Kuzuoğlu-Öztürk, D., Bawankar, P., Loh, B., Chang, C. te, Weichenrieder, O., & Izaurralde, E. (2014).** A DDX6-CNOT1 complex and W-binding pockets in CNOT9 reveal direct links between miRNA target recognition and silencing. *Molecular Cell*, *54*(5), 737–750.
- Chen, Y., Khazina, E., Izaurralde, E., & Weichenrieder, O. (2021).** Crystal structure and functional properties of the human CCR4-CAF1 deadenylase complex. *Nucleic Acids Research*, *49*(11), 6489–6510.
- Chuang, R. Y., Weaver, P. L., Liu, Z., & Chang, T. H. (1997).** Requirement of the DEAD-Box Protein Ded1p for Messenger RNA Translation. *Science*, *275*(5305), 1468–1471.
- Colegrove-Otero, L. J., Minshall, N., & Standart, N. (2005).** RNA-binding proteins in early development. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *40*(1), 21–73.
- Collart, M. A., & Struhl, K. (1994).** NOT1(CDC39), NOT2(CDC36), NOT3, and NOT4 encode a global-negative regulator of transcription that differentially affects TATA-element utilization. *Genes & Development*, *8*(5), 525–537.
- Coller, J., & Parker, R. (2005).** General Translational Repression by Activators of mRNA Decapping. *Cell*, *122*(6), 875.
- Costello, J., Castelli, L. M., Rowe, W., Kershaw, C. J., Talavera, D., Mohammad-Qureshi, S. S., Sims, P. F. G., Grant, C. M., Pavitt, G. D., Hubbard, S. J., & Ashe, M. P. (2015).** Global mRNA selection mechanisms for translation initiation. *Genome Biology*, *16*(1), 10.
- Cruce, S., Chatterjee, S., & Gavis, E. R. (2000).** Overlapping but Distinct RNA Elements Control Repression and Activation of nanos Translation. *Molecular Cell*, *5*(3), 457–467.
- Dahanukar, A., Walker, J. A., & Wharton, R. P. (1999).** Smaug, a novel RNA-binding protein that operates a translational switch in *Drosophila*. *Molecular Cell*, *4*(2), 209–218.

- Dahanukar, A., & Wharton, R. P. (1996).** The Nanos gradient in *Drosophila* embryos is generated by translational regulation. *Genes & Development*, *10*(20), 2610–2621.
- de La Cruz, J., Iost, I., Kressler, D., & Linder, P. (1997).** The p20 and Ded1 proteins have antagonistic roles in eIF4E-dependent translation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(10), 5201–5206.
- Djuranovic, S., Nahvi, A., & Green, R. (2012).** miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay. *Science*, *336*(6078), 237.
- Drummond, S. P., Hildyard, J., Firczuk, H., Reamtong, O., Li, N., Kannambath, S., Claydon, A. J., Beynon, R. J., Eyers, C. E., & McCarthy, J. E. G. (2011).** Diauxic shift-dependent relocalization of decapping activators Dhh1 and Pat1 to polysomal complexes. *Nucleic Acids Research*, *39*(17), 7764–7774.
- Duncan, K. E., Strein, C., & Hentze, M. W. (2009).** The SXL-UNR Corepressor Complex Uses a PABP-Mediated Mechanism to Inhibit Ribosome Recruitment to *msl-2* mRNA. *Molecular Cell*, *36*(4), 571–582.
- Edgar, B. A., & Schubiger, G. (1986).** Parameters controlling transcriptional activation during early *drosophila* development. *Cell*, *44*(6), 871–877.
- Eichhorn, S. W., Subtelny, A. O., Kronja, I., Kwasnieski, J. C., Orr-Weaver, T. L., & Bartel, D. P. (2016).** mRNA poly(A)-tail changes specified by deadenylation broadly reshape translation in *Drosophila* oocytes and early embryos. *ELife*, *5*, e16955.
- Eisen, T. J., Eichhorn, S. W., Subtelny, A. O., Lin, K. S., McGeary, S. E., Gupta, S., & Bartel, D. P. (2020).** The Dynamics of Cytoplasmic mRNA Metabolism. *Molecular Cell*, *77*(4), 786.
- England, C. G., Ehlerding, E. B., & Cai, W. (2016).** NanoLuc: A Small Luciferase is Brightening up the Field of Bioluminescence. *Bioconjugate Chemistry*, *27*(5), 1175.
- Ephrussi, A., Dickinson, L. K., & Lehmann, R. (1991).** oskar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant nanos. *Cell*, *66*(1), 37–50.
- Ezure, T., Suzuki, T., Higashide, S., Shintani, E., Endo, K., Kobayashi, S., Shikata, M., Ito, M., Tanimizu, K., & Nishimura, O. (2006).** Cell-Free Protein Synthesis System Prepared from Insect Cells by Freeze-Thawing. *Biotechnology Progress*, *22*(6), 1570–1577.
- Fabian, M. R., Frank, F., Rouya, C., Siddiqui, N., Lai, W. S., Karetnikov, A., Blackshear, P. J., Nagar, B., & Sonenberg, N. (2013).** Structural basis for the recruitment

- of the human CCR4–NOT deadenylase complex by Tristetraprolin. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(6), 735.
- Fitzgerald, D. J., Berger, P., Schaffitzel, C., Yamada, K., Richmond, T. J., & Berger, I. (2006).** Protein complex expression by using multigene baculoviral vectors. *Nature Methods* 2006 3:12, 3(12), 1021–1032.
- Gavis, E. R., & Lehmann, R. (1992).** Localization of nanos RNA controls embryonic polarity. *Cell*, 71(2), 301–313.
- Gavis, E. R., & Lehmann, R. (1994).** Translational regulation of nanos by RNA localization. *Nature*, 369(6478), 315–318.
- Götze, M., Dufourt, J., Ihling, C., Rammelt, C., Pierson, S., Sambrani, N., Temme, C., Sinz, A., Simonelig, M., & Wahle, E. (2017).** Translational repression of the Drosophila nanos mRNA involves the RNA helicase Belle and RNA coating by Me31B and Trailer hitch. *RNA*, 23(10), 1552–1568.
- Green, J. B., Gardner, C. D., Wharton, R. P., & Aggarwal, A. K. (2003).** RNA Recognition via the SAM Domain of Smaug. *Molecular Cell*, 11(6), 1537–1548.
- Hajnsdorf, E., & Kaberdin, V. R. (2018).** RNA polyadenylation and its consequences in prokaryotes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 373(1762), 20180166.
- Hanet, A., Räsch, F., Weber, R., Ruscica, V., Fauser, M., Raisch, T., Kuzuoğlu-Öztürk, D., Chang, C.-T., Bhandari, D., Igreja, C., & Wohlbold, L. (2019).** HELZ directly interacts with CCR4–NOT and causes decay of bound mRNAs. *Life Science Alliance*, 2(5), e201900405.
- Hanson, G., & Coller, J. (2018).** Codon optimality, bias and usage in translation and mRNA decay. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 19(1), 20.
- Hara, M., Lourido, S., Petrova, B., Lou, H. J., von Stetina, J. R., Kashevsky, H., Turk, B. E., & Orr-Weaver, T. L. (2018).** Identification of PNG kinase substrates uncovers interactions with the translational repressor TRAL in the oocyte-to-embryo transition. *ELife*, 7, e33150.
- Harrison, M. M., & Eisen, M. B. (2015).** Transcriptional Activation of the Zygotic Genome in Drosophila. *Current Topics in Developmental Biology*, 113, 85–112.
- Hauptmann, A., Podgoršek, K., Kuzman, D., Srčić, S., Hoelzl, G., & Loerting, T. (2018).** Impact of Buffer, Protein Concentration and Sucrose Addition on the Aggregation and Particle Formation during Freezing and Thawing. *Pharmaceutical Research* 2018 35:5, 35(5), 1–16.

- Henriksson, N., Nilsson, P., Wu, M., Song, H., & Virtanen, A. (2010).** Recognition of Adenosine Residues by the Active Site of Poly(A)-specific Ribonuclease. *Journal of Biological Chemistry*, 285(1), 163–170.
- Hilliker, A., Gao, Z., Jankowsky, E., & Parker, R. (2011).** The DEAD-box protein Ded1 modulates translation by the formation and resolution of an eIF4F-mRNA complex. *Molecular Cell*, 43(6), 962.
- Hoskins, R. A., Carlson, J. W., Wan, K. H., Park, S., Mendez, I., Galle, S. E., Booth, B. W., Pfeiffer, B. D., George, R. A., Svirskas, R., Krzywinski, M., Schein, J., Accardo, M. C., Damia, E., Messina, G., Méndez-Lago, M., de Pablos, B., Demakova, O. v., Andreyeva, E. N., ... Celniker, S. E. (2015).** The Release 6 reference sequence of the *Drosophila melanogaster* genome. *Genome Research*, 25(3), 445.
- Hubstenberger, A., Noble, S. L., Cameron, C., & Evans, T. C. (2013).** Translation Repressors, an RNA Helicase, and Developmental Cues Control RNP Phase Transitions during Early Development. *Developmental Cell*, 27(2), 161–173.
- Huntzinger, E., & Izaurralde, E. (2011).** Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews Genetics* 2011 12:2, 12(2), 99–110.
- Igreja, C., & Izaurralde, E. (2011).** CUP promotes deadenylation and inhibits decapping of mRNA targets. *Genes & Development*, 25(18), 1955.
- Iwasaki, S., Kawamata, T., & Tomari, Y. (2009).** *Drosophila* Argonaute1 and Argonaute2 Employ Distinct Mechanisms for Translational Repression. *Molecular Cell*, 34(1), 58–67.
- Jeske, M., Meyer, S., Temme, C., Freudenreich, D., & Wahle, E. (2006).** Rapid ATP-dependent Deadenylation of nanos mRNA in a Cell-free System from *Drosophila* Embryos \*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(35), 25124–25133.
- Jeske, M., Moritz, B., Anders, A., & Wahle, E. (2011).** Smaug assembles an ATP-dependent stable complex repressing nanos mRNA translation at multiple levels. *The EMBO Journal*, 30(1), 90.
- Jeske, M., Temme, C., & Wahle, E. (2014).** Assaying mRNA Deadenylation In Vitro. *Methods in Molecular Biology*, 1125, 297–311.
- Johnston, D. S., & Nüsslein-Volhard, C. (1992).** The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell*, 68(2), 201–219.
- Johnstone, O., & Lasko, P. (2001).** Translational Regulation and RNA Localization in *Drosophila* Oocytes and Embryos. *Annual Review of Genetics*, 35(1), 365–406.

- Jonas, S., & Izaurralde, E. (2013).** The role of disordered protein regions in the assembly of decapping complexes and RNP granules. *Genes & Development*, 27(24), 2628–2641.
- 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 & Development*, 19(1), 104.
- Kalifa, Y., Huang, T., Rosen, L. N., Chatterjee, S., & Gavis, E. R. (2006).** Glorund, a *Drosophila* hnRNP F/H homolog, is an ovarian repressor of nanos translation. *Developmental Cell*, 10(3), 291–301.
- Kamenska, A., Lu, W. T., Kubacka, D., Broomhead, H., Minshall, N., Bushell, M., & Standart, N. (2014).** Human 4E-T represses translation of bound mRNAs and enhances microRNA-mediated silencing. *Nucleic Acids Research*, 42(5), 3298–3313.
- Kamenska, A., Simpson, C., Vindry, C., Broomhead, H., Bénard, M., Ernoult-Lange, M., Lee, B. P., Harries, L. W., Weil, D., & Standart, N. (2016).** The DDX6–4E-T interaction mediates translational repression and P-body assembly. *Nucleic Acids Research*, 44(13), 6318.
- Kigawa, T., Yabuki, T., Matsuda, N., Matsuda, T., Nakajima, R., Tanaka, A., & Yokoyama, S. (2004).** Preparation of *Escherichia coli* cell extract for highly productive cell-free protein expression. *Journal of Structural and Functional Genomics 2004 5:1*, 5(1), 63–68.
- Kim, T. W., Keum, J. W., Oh, I. S., Choi, C. Y., Park, C. G., & Kim, D. M. (2006).** Simple procedures for the construction of a robust and cost-effective cell-free protein synthesis system. *Journal of Biotechnology*, 126(4), 554–561.
- Kim-Ha, J., Kerr, K., & Macdonald, P. M. (1995).** Translational regulation of oskar mRNA by Bruno, an ovarian RNA-binding protein, is essential. *Cell*, 81(3), 403–412.
- Kinkelin, K., Veith, K., Grünwald, M., & Bono, F. (2012).** Crystal structure of a minimal eIF4E–Cap complex reveals a general mechanism of eIF4E regulation in translational repression. *RNA*, 18(9), 1624.
- Kluge, F., Götze, M., & Wahle, E. (2020).** Establishment of 5'–3' interactions in mRNA independent of a continuous ribose-phosphate backbone. *RNA*, 26(5), 613.
- Kotov, A. A., Godneeva, B. K., Olenkina, O. M., Adashev, V. E., Trostnikov, M. v., & Olenina, L. v. (2020).** The *Drosophila* RNA Helicase Belle (DDX3) Non-Autonomously Suppresses Germline Tumorigenesis Via Regulation of a Specific mRNA Set. *Cells*, 9(3), 550.

- Kühn, U., & Pieler, T. (1996).** Xenopus Poly(A) Binding Protein: Functional Domains in RNA Binding and Protein – Protein Interaction. *Journal of Molecular Biology*, 256(1), 20–30.
- Kuzuoğlu-Öztürk, D., Bhandari, D., Huntzinger, E., Fauser, M., Helms, S., & Izaurralde, E. (2016).** miRISC and the CCR4–NOT complex silence mRNA targets independently of 43S ribosomal scanning. *The EMBO Journal*, 35(11), 1186–1203.
- Lai, M. C., Sun, H. S., Wang, S. W., & Tarn, W. Y. (2016).** DDX3 functions in antiviral innate immunity through translational control of PACT. *The Febs Journal*, 283(1), 88.
- Lai, W. S., Stumpo, D. J., Wells, M. L., Gruzdev, A., Hicks, S. N., Nicholson, C. O., Yang, Z., Faccio, R., Webster, M. W., Passmore, L. A., & Blackshear, P. J. (2019).** Importance of the Conserved Carboxyl-Terminal CNOT1 Binding Domain to Tristetraprolin Activity In Vivo. *Molecular and Cellular Biology*, 39(13), e00029-19.
- Leader, D. P., Krause, S. A., Pandit, A., Davies, S. A., & Dow, J. A. T. (2018).** FlyAtlas 2: a new version of the *Drosophila melanogaster* expression atlas with RNA-Seq, miRNA-Seq and sex-specific data. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D809–D815.
- Liao, S. E., Kandasamy, S. K., Zhu, L., & Fukunaga, R. (2019).** DEAD-box RNA helicase Belle posttranscriptionally promotes gene expression in an ATPase activity-dependent manner. *RNA*, 27(5), 825–839.
- Lim, J., Lee, M., Son, A., Chang, H., & Kim, V. N. (2016).** mTAIL-seq reveals dynamic poly(A) tail regulation in oocyte-to-embryo development. *Genes & Development*, 30(14), 1671–1682.
- Lima, S. A., Chipman, L. B., Nicholson, A. L., Chen, Y.-H., Yee, B. A., Yeo, G. W., Coller, J., & Pasquinelli, A. E. (2017).** Short Poly(A) Tails are a Conserved Feature of Highly Expressed Genes. *Nat Struct Mol Biol.*, 20(12), 1057–1063.
- Lin, Y., McCarty, J., Rauch, J. N., Delaney, K. T., Kosik, K. S., Fredrickson, G. H., Shea, J. E., & Han, S. (2019).** Narrow equilibrium window for complex coacervation of tau and RNA under cellular conditions. *ELife*, 8, e42571.
- Linder, P., & Jankowsky, E. (2011).** From unwinding to clamping — the DEAD box RNA helicase family. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2011 12:8, 12(8), 505–516.
- Liu, F., Putnam, A., & Jankowsky, E. (2008).** ATP hydrolysis is required for DEAD-box protein recycling but not for duplex unwinding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(51), 20209.



- Marcotrigiano, J., Gingras, A. C., Sonenberg, N., & Burley, S. K. (1999).** Cap-Dependent Translation Initiation in Eukaryotes Is Regulated by a Molecular Mimic of eIF4G. *Molecular Cell*, 3(6), 707–716.
- Maryati, M., Airhihen, B., & Winkler, G. S. (2015).** The enzyme activities of Caf1 and Ccr4 are both required for deadenylation by the human Ccr4–Not nuclease module. *Biochemical Journal*, 469(Pt 1), 169.
- Mathys, H., Basquin, J., Ozgur, S., Czarnocki-Cieciura, M., Bonneau, F., Aartse, A., Dziembowski, A., Nowotny, M., Conti, E., & Filipowicz, W. (2014).** Structural and Biochemical Insights to the Role of the CCR4-NOT Complex and DDX6 ATPase in MicroRNA Repression. *Molecular Cell*, 54(5), 751–765.
- McGuffee, S. R., & Elcock, A. H. (2010).** Diffusion, Crowding & Protein Stability in a Dynamic Molecular Model of the Bacterial Cytoplasm. *PLOS Computational Biology*, 6(3), e1000694.
- Moretti, F., Kaiser, C., Zdanowicz-Specht, A., & Hentze, M. W. (2012).** PABP and the poly(A) tail augment microRNA repression by facilitated miRISC binding. *Nature Structural & Molecular Biology* 2012 19:6, 19(6), 603–608.
- Mugler, C. F., Hondele, M., Heinrich, S., Sachdev, R., Vallotton, P., Koek, A. Y., Chan, L. Y., & Weis, K. (2016).** ATPase activity of the DEAD-box protein Dhh1 controls processing body formation. *ELife*, 5, e18746.
- Munishkina, L. A., Cooper, E. M., Uversky, V. N., & Fink, A. L. (2004).** The effect of macromolecular crowding on protein aggregation and amyloid fibril formation. *Journal of Molecular Recognition*, 17(5), 456–464.
- Nakamura, A., Amikura, R., Hanyu, K., & Kobayashi, S. (2001).** Me31B silences translation of oocyte-localizing RNAs through the formation of cytoplasmic RNP complex during *Drosophila* oogenesis. *Development*, 128(17), 3233–3242.
- Nakamura, A., Sato, K., & Hanyu-Nakamura, K. (2004).** *Drosophila* Cup Is an eIF4E Binding Protein that Associates with Bruno and Regulates oskar mRNA Translation in Oogenesis. *Developmental Cell*, 6(1), 69–78.
- Navarro-Costa, P., McCarthy, A., Prudêncio, P., Greer, C., Guilgur, L. G., Becker, J. D., Secombe, J., Rangan, P., & Martinho, R. G. (2016).** Early programming of the oocyte epigenome temporally controls late prophase I transcription and chromatin remodelling. *Nature Communications* 2016 7:1, 7(1), 1–15.

- Nelson, M. R., Leidal, A. M., & Smibert, C. A. (2004).** Drosophila Cup is an eIF4E-binding protein that functions in Smaug-mediated translational repression. *The EMBO Journal*, *23*(1), 150–159.
- Niinuma, S., & Tomari, Y. (2017).** ATP is dispensable for both miRNA- and Smaug-mediated deadenylation reactions. *RNA*, *23*(6), 866.
- Nishimura, T., Padamsi, Z., Fakim, H., Milette, S., Dunham, W. H., Gingras, A. C., & Fabian, M. R. (2015).** The eIF4E-Binding Protein 4E-T Is a Component of the mRNA Decay Machinery that Bridges the 5' and 3' Termini of Target mRNAs. *Cell Reports*, *11*(9), 1425–1436.
- Nudel, U., Soreq, H., Littauer, U. Z., Marbaix, G., Huez, G., Leclercq, M., Hubert, E., & Chantrenne, H. (1976).** Globin mRNA Species Containing Poly(A) Segments of Different Lengths. *European Journal of Biochemistry*, *64*(1), 115–121.
- Nüsslein-Volhard, C., Frohnhofer, H. G., & Lehmann, R. (1987).** Determination of Anteroposterior Polarity in Drosophila. *Science*, *238*(4834), 1675–1681.
- Olins, P. O., & Rangwala, S. H. (1989).** A Novel Sequence Element Derived from Bacteriophage T7 mRNA Acts as an Enhancer of Translation of the lacZ Gene in Escherichia coli". *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, *2*(29), 16973–16976.
- Ostareck, D. H., Ostareck-Lederer, A., Shatsky, I. N., & Hentze, M. W. (2001).** Lipoxigenase mRNA Silencing in Erythroid Differentiation: The 3'UTR Regulatory Complex Controls 60S Ribosomal Subunit Joining. *Cell*, *104*(2), 281–290.
- Ozgun, S., Basquin, J., Kamenska, A., Filipowicz, W., Standart, N., & Conti, E. (2015).** Structure of a Human 4E-T/DDX6/CNOT1 Complex Reveals the Different Interplay of DDX6-Binding Proteins with the CCR4-NOT Complex. *Cell Reports*, *13*(4), 703–711.
- Park, S., Barnes, R., Lin, Y., Jeon, B. jin, Najafi, S., Delaney, K. T., Fredrickson, G. H., Shea, J. E., Hwang, D. S., & Han, S. (2020).** Dehydration entropy drives liquid-liquid phase separation by molecular crowding. *Communications Chemistry* *2020 3:1*, *3*(1), 1–12.
- Parker, R., & Sheth, U. (2007).** P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation. *Molecular Cell*, *25*(5), 635–646.
- Passmore, L. A., & Coller, J. (2021).** Roles of mRNA poly(A) tails in regulation of eukaryotic gene expression. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *2021*, 1–14.

- Pavanello, L., Hall, B., Airhihen, B., & Winkler, G. S. (2018).** The central region of CNOT1 and CNOT9 stimulates deadenylation by the Ccr4–Not nuclease module. *Biochemical Journal*, 475(21), 3437–3450.
- Pekovic, F. (2016).** Expression und Aufreinigung des Translationsrepressorkomplex der nanos mRNA aus *Drosophila melanogaster*. *Masterarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Institut Für Biochemie Und Biotechnologie.*
- Pestova, T. v., Lomakin, I. B., & Hellen, C. U. T. (2004).** Position of the CrPV IRES on the 40S subunit and factor dependence of IRES/80S ribosome assembly. *EMBO Reports*, 5(9), 906.
- Pinder, B. D., & Smibert, C. A. (2013).** microRNA-independent recruitment of Argonaute 1 to nanos mRNA through the Smaug RNA-binding protein. *EMBO Reports*, 14(1), 80.
- Pisa, V., Cozzolino, M., Gargiulo, S., Ottone, C., Piccioni, F., Monti, M., Gigliotti, S., Talamo, F., Graziani, F., Pucci, P., & Verrotti, A. C. (2009).** The molecular chaperone Hsp90 is a component of the cap-binding complex and interacts with the translational repressor Cup during *Drosophila* oogenesis. *Gene*, 432(1–2), 67–74.
- Pritchard, D. K., & Schubiger, G. (1996).** Activation of transcription in *Drosophila* embryos is a gradual process mediated by the nucleocytoplasmic ratio. *Genes & Development*, 10(9), 1131–1142.
- Radhakrishnan, A., Chen, Y.-H., Martin, S., Alhusaini, N., Green, R., & Collier, J. (2016).** The DEAD-box protein Dhh1p couples mRNA decay and translation by monitoring codon optimality. *Cell*, 167(1), 122.
- Radhakrishnan, A., & Green, R. (2016).** Connections Underlying Translation and mRNA Stability. *Journal of Molecular Biology*, 428(18), 3558–3564.
- Raisch, T., Bhandari, D., Sabath, K., Helms, S., Valkov, E., Weichenrieder, O., & Izaurralde, E. (2016).** Distinct modes of recruitment of the CCR4–NOT complex by *Drosophila* and vertebrate Nanos. *The EMBO Journal*, 35(9), 974–990.
- Raisch, T., Chang, C.-T., Levdansky, Y., Muthukumar, S., Raunser, S., & Valkov, E. (2019).** Reconstitution of recombinant human CCR4-NOT reveals molecular insights into regulated deadenylation. *Nature Communications 2019 10:1*, 10(1), 1–14.
- Rajyaguru, P., She, M., & Parker, R. (2012).** Scd6 targets eIF4G to repress translation: RGG-motif proteins as a class of eIF4G-binding proteins. *Molecular Cell*, 45(2), 244.
- Rial, D. v., & Ceccarelli, E. A. (2002).** Removal of DnaK contamination during fusion protein purifications. *Protein Expression and Purification*, 25(3), 503–507.

- Richter, J. D. (1999).** Cytoplasmic Polyadenylation in Development and Beyond. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(2), 446.
- Riechmann, V., & Ephrussi, A. (2001).** Axis formation during Drosophila oogenesis. *Current Opinion in Genetics & Development*, 11(4), 374–383.
- Roque, A., Ponte, I., & Suau, P. (2007).** Macromolecular Crowding Induces a Molten Globule State in the C-Terminal Domain of Histone H1. *Biophysical Journal*, 93(6), 2170.
- Rouget, C., Papin, C., Boureux, A., Meunier, A. C., Franco, B., Robine, N., Lai, E. C., Pelisson, A., & Simonelig, M. (2010).** Maternal mRNA deadenylation and decay by the piRNA pathway in the early Drosophila embryo. *Nature* 2010 467:7319, 467(7319), 1128–1132.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001).** *Molecular cloning: a laboratory manual* (3rd ed., Vols. 1–3). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schäfer, I. B., Yamashita, M., Schuller, J. M., Schüssler, S., Reichelt, P., Strauss, M., & Conti, E. (2019).** Molecular Basis for poly(A) RNP Architecture and Recognition by the Pan2-Pan3 Deadenylase. *Cell*, 177(6), 1619-1631.e21.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012).** Fiji - an Open Source platform for biological image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682.
- Schneider, I. (1972).** Cell lines derived from late embryonic stages of Drosophila melanogaster. *Development*, 27(2), 353–365.
- Semotok, J. L., Cooperstock, R. L., Pinder, B. D., Vari, H. K., Lipshitz, H. D., & Smibert, C. A. (2005).** Smaug recruits the CCR4/POP2/NOT deadenylase complex to trigger maternal transcript localization in the early Drosophila embryo. *Current Biology*, 15(4), 284–294.
- Sgromo, A., Raisch, T., Bawankar, P., Bhandari, D., Chen, Y., Kuzuoğlu-Öztürk, D., Weichenrieder, O., & Izaurralde, E. (2017).** A CAF40-binding motif facilitates recruitment of the CCR4-NOT complex to mRNAs targeted by Drosophila Roquin. *Nature Communications* 2017 8:1, 8(1), 1–16.
- Shih, J. W., Tsai, T. Y., Chao, C. H., & Wu Lee, Y. H. (2007).** Candidate tumor suppressor DDX3 RNA helicase specifically represses cap-dependent translation by acting as an eIF4E inhibitory protein. *Oncogene* 2008 27:5, 27(5), 700–714.

- Smibert, C. A., Lie, Y. S., Shillinglaw, W., Henzel, W. J., & Macdonald, P. M. (1999).** Smaug, a novel and conserved protein, contributes to repression of nanos mRNA translation in vitro. *RNA*, 5(12), 1535.
- Smibert, C. A., Wilson, J. E., Kerr, K., & Macdonald, P. M. (1996).** smaug protein represses translation of unlocalized nanos mRNA in the Drosophila embryo. *Genes & Development*, 10(20), 2600–2609.
- Sommerville, J., & Lodomery, M. (1996).** Transcription and masking of mRNA in germ cells: involvement of Y-box proteins. *Chromosoma* 1996 104:7, 104(7), 469–478.
- Soto-Rifo, R., Rubilar, P. S., Limousin, T., de Brejne, S., Décimo, D., & Ohlmann, T. (2012).** DEAD-box protein DDX3 associates with eIF4F to promote translation of selected mRNAs. *The EMBO Journal*, 31(18), 3745.
- Spirin, A. S. (1994).** Storage of messenger RNA in eukaryotes: Envelopment with protein, translational barrier at 5' side, or conformational masking by 3' side? *Molecular Reproduction and Development*, 38(1), 107–117.
- Stowell, J. A. W., Webster, M. W., Kögel, A., Wolf, J., Shelley, K. L., & Passmore, L. A. (2016).** Reconstitution of Targeted Deadenylation by the Ccr4-Not Complex and the YTH Domain Protein Mmi1. *Cell Reports*, 17(8), 1978.
- Struhl, G., Johnston, P., & Lawrence, P. A. (1992).** Control of Drosophila body pattern by the hunchback morphogen gradient. *Cell*, 69(2), 237–249.
- Struhl, G., Struhl, K., & Macdonald, P. M. (1989).** The Gradient Morphogen bicoid Is a Concentration-Dependent Transcriptional Activator. *Cell*, 57, 1259–1273.
- Studier, F. W. (2005).** Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 41(1), 207–234.
- Sysoev, V. O., Fischer, B., Frese, C. K., Gupta, I., Krijgsveld, J., Hentze, M. W., Castello, A., & Ephrussi, A. (2016).** Global changes of the RNA-bound proteome during the maternal-to-zygotic transition in Drosophila. *Nature Communications* 2016 7:1, 7(1), 1–11.
- Szostak, E., García-Beyaert, M., Guitart, T., Graindorge, A., Coll, O., & Gebauer, F. (2018).** Hrp48 and eIF3d contribute to msl-2 mRNA translational repression. *Nucleic Acids Research*, 46(8), 4099.
- Tadros, W., Goldman, A. L., Babak, T., Menzies, F., Vardy, L., Orr-Weaver, T., Hughes, T. R., Westwood, J. T., Smibert, C. A., & Lipshitz, H. D. (2007).** SMAUG Is a Major Regulator of Maternal mRNA Destabilization in Drosophila and Its Translation Is Activated by the PAN GU Kinase. *Developmental Cell*, 12(1), 143–155.

- Tafuri, S. R., & Wolfes, A. P. (1993).** Selective Recruitment of Masked Maternal mRNA from Messenger Ribonucleoprotein Particles Containing FRGYZ (mRNP4)\*. *Journal of Biological Chemistry*, 268(32), 24255–24261.
- Tanaka, K. J., Ogawa, K., Takagi, M., Imamoto, N., Matsumoto, K., & Tsujimoto, M. (2006).** RAP55, a cytoplasmic mRNP component, represses translation in *Xenopus* oocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 281(52), 40096–40106.
- Taratuta, V. G., Holschbach, Andreas., Thurston, G. M., Blankschtein, Daniel., & Benedek, G. B. (1990).** Liquid-liquid phase separation of aqueous lysozyme solutions: effects of pH and salt identity. *The Journal of Physical Chemistry*, 94(5), 2140–2144.
- Temme, C., Zaessinger, S., Meyer, S., Simonelig, M., & Wahle, E. (2004).** A complex containing the CCR4 and CAF1 proteins is involved in mRNA deadenylation in *Drosophila*. *The EMBO Journal*, 23(14), 2862.
- Temme, C., Zhang, L., Kremmer, E., Ihling, C., Chartier, A., Sinz, A., Simonelig, M., & Wahle, E. (2010).** Subunits of the *Drosophila* CCR4-NOT complex and their roles in mRNA deadenylation. *RNA*, 16(7), 1356–1370.
- Tritschler, F., Braun, J. E., Eulalio, A., Truffault, V., Izaurralde, E., & Weichenrieder, O. (2009).** Structural Basis for the Mutually Exclusive Anchoring of P Body Components EDC3 and Tral to the DEAD Box Protein DDX6/Me31B. *Molecular Cell*, 33(5), 661–668.
- Tritschler, F., Eulalio, A., Helms, S., Schmidt, S., Coles, M., Weichenrieder, O., Izaurralde, E., & Truffault, V. (2008).** Similar Modes of Interaction Enable Trailer Hitch and EDC3 To Associate with DCP1 and Me31B in Distinct Protein Complexes. *Molecular and Cellular Biology*, 28(21), 6695.
- Tucker, M., Staples, R. R., Valencia-Sanchez, M. A., Muhlrads, D., & Parker, R. (2002).** Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4p/Pop2p/Notp mRNA deadenylase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 21(6), 1427.
- Vanzo, N. F., & Ephrussi, A. (2002).** Oskar anchoring restricts pole plasm formation to the posterior of the *Drosophila* oocyte. *Development*, 129(15), 3705–3714.
- Vastenhouw, N. L., Cao, W. X., & Lipshitz, H. D. (2019).** The maternal-to-zygotic transition revisited. *Development*, 146(11).
- Vaughn, J. L., Goodwin, R. H., Tompkins, G. J., & McCawley, P. (1977).** The establishment of two cell lines from the insectspodoptera frugiperda (lepidoptera; noctuidae). *In Vitro* 1977 13:4, 13(4), 213–217.

- Wang, C., Dickinson, L. K., & Lehmann, R. (1994).** Genetics of nanos localization in *Drosophila*. *Developmental Dynamics*, 199(2), 103–115.
- Wang, H., Morita, M., Yang, X., Suzuki, T., Yang, W., Wang, J., Ito, K., Wang, Q., Zhao, C., Bartlam, M., Yamamoto, T., & Rao, Z. (2010).** Crystal structure of the human CNOT6L nuclease domain reveals strict poly(A) substrate specificity. *The EMBO Journal*, 29(15), 2566–2576.
- Wang, M., Ly, M., Lugowski, A., Laver, J. D., Lipshitz, H. D., Smibert, C. A., & Rissland, O. S. (2017).** ME31B globally represses maternal mRNAs by two distinct mechanisms during the *Drosophila* maternal-to-zygotic transition. *ELife*, 6, e27891.
- Wang, Y., Sarkar, M., Smith, A. E., Krois, A. S., & Pielak, G. J. (2012).** Macromolecular Crowding and Protein Stability. *Journal of the American Chemical Society*, 134(40), 16614–16618.
- Webster, M. W., Chen, Y.-H., Stowell, J. A. W., Alhusaini, N., Sweet, T., Graveley, B. R., Collier, J., & Passmore, L. A. (2018).** mRNA Deadenylation Is Coupled to Translation Rates by the Differential Activities of Ccr4-Not Nucleases. *Molecular Cell*, 70(6), 1089.
- Webster, M. W., Stowell, J. A., & Passmore, L. A. (2019).** RNA-binding proteins distinguish between similar sequence motifs to promote targeted deadenylation by Ccr4-Not. *ELife*, 8, e40670.
- Webster, M. W., Stowell, J. A. W., Tang, T. T. L., & Passmore, L. A. (2017).** Analysis of mRNA deadenylation by multi-protein complexes. *Methods*, 126, 95–104.
- Weidmann, C. A., Raynard, N. A., Blewett, N. H., Etten, J. van, & Goldstrohm, A. C. (2014).** The RNA binding domain of Pumilio antagonizes poly-adenosine binding protein and accelerates deadenylation. *RNA*, 20(8), 1298–1319.
- Wessels, H.-H., Imami, K., Baltz, A. G., Kolinski, M., Beldovskaya, A., Selbach, M., Small, S., Ohler, U., & Landthaler, M. (2016).** The mRNA-bound proteome of the early fly embryo. *Genome Research*, 26(7), 1000.
- Weston, A., & Sommerville, J. (2006).** Xp54 and related (DDX6-like) RNA helicases: roles in messenger RNP assembly, translation regulation and RNA degradation. *Nucleic Acids Research*, 34(10), 3082.
- Wharton, R. P., & Struhl, G. (1991).** RNA regulatory elements mediate control of *Drosophila* body pattern by the posterior morphogen nanos. *Cell*, 67(5), 955–967.
- Wickham, T. J., Davis, T., Granados, R. R., Shuler, M. L., & Wood, H. A. (1992).** Screening of Insect Cell Lines for the Production of Recombinant Proteins and

- Infectious Virus in the Baculovirus Expression System. *Biotechnology Progress*, 8(5), 391–396.
- Wilhelm, J. E., Buszczak, M., & Sayles, S. (2005).** Efficient Protein Trafficking Requires Trailer Hitch, a Component of a Ribonucleoprotein Complex Localized to the ER in *Drosophila*. *Developmental Cell*, 9(5), 675–685.
- Wilhelm, J. E., & Smibert, C. A. (2005).** Mechanisms of translational regulation in *Drosophila*. *Biology of the Cell*, 97(4), 235–252.
- Xu, K., Bai, Y., Zhang, A., Zhang, Q., & Bartlam, M. G. (2014).** Insights into the structure and architecture of the CCR4–NOT complex. *Frontiers in Genetics*, 0(MAY), 137.
- Yang, W. (2011).** Nucleases: Diversity of Structure, Function and Mechanism. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 44(1), 1.
- Yang, Y., & Wang, Z. (2019).** IRES-mediated cap-independent translation, a path leading to hidden proteome. *Journal of Molecular Cell Biology*, 11(10), 911–919.
- Yarunin, A., Harris, R. E., Ashe, M. P., & Ashe, H. L. (2011).** Patterning of the *Drosophila* oocyte by a sequential translation repression program involving the d4EHP and Belle translational repressors. *RNA Biology*, 8(5), 904–912.
- Yi, H., Park, J., Ha, M., Lim, J., Chang, H., & Kim, V. N. (2018).** PABP Cooperates with the CCR4-NOT Complex to Promote mRNA Deadenylation and Block Precocious Decay. *Molecular Cell*, 70(6), 1081-1088.e5.
- Zaessinger, S., Busseau, I., & Simonelig, M. (2006).** Oskar allows nanos mRNA translation in *Drosophila* embryos by preventing its deadenylation by Smaug/CCR4. *Development*, 133(22), 4573–4583.
- Zimmerman, S. B., & Trach, S. O. (1991).** Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 222(3), 599–620.
- Zuo, Y., & Deutscher, M. P. (2001).** Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. *Nucleic Acids Research*, 29(5), 1017.



## 6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Oogenese und frühe Embryogenese in <i>D. melanogaster</i> .	7
Abbildung 1.2: <i>nanos</i> ist essenziell für die Ausbildung der Anterior-Posterior-Körperachse.	10
Abbildung 1.3: Schema der <i>nanos</i> -3'-UTR.	11
Abbildung 1.4: Schema der Deadenylierung und des Abbaus von mRNAs.	13
Abbildung 1.5: Die Cup-abhängige Repression der Translationsinitiation.	14
Abbildung 1.6: Modell des <i>nanos</i> -Repressor Komplexes.	19
Abbildung 1.7: Zusammensetzung des <i>Drosophila</i> -CCR4-NOT-Komplexes.	22
Abbildung 2.1: Reinigung der Repressorproteine.	26
Abbildung 2.2: Schema der Zusammensetzung der humanen CCR4-NOT-Subkomplexe.	27
Abbildung 2.3: Der „MINI“-Subkomplex ist ausreichend für die Smaug-abhängige Deadenylierung.	28
Abbildung 2.4: Die Smaug-abhängige Deadenylierung ist auch SRE-spezifisch.	30
Abbildung 2.5: Schema der Zusammensetzung der <i>Drosophila</i> -CCR4-NOT-Subkomplexe.	31
Abbildung 2.6: Aufreinigung des <sup>Dm</sup> CCR4-NOT <sub>MINI</sub> mittels Größenausschlusschromatographie.	33
Abbildung 2.7: Präparationen der <i>Drosophila</i> -CCR4-NOT-Komplexe.	34
Abbildung 2.8: Die Deadenylierungsaktivität des <sup>Dm</sup> CCR4-NOT <sub>MINI</sub> ist salzempfindlich.	35
Abbildung 2.9: Stimulierung der Langlebigkeit des <sup>Dm</sup> CCR4-NOT <sub>MINI</sub> durch methyliertes BSA.	36
Abbildung 2.10: Temperaturabhängigkeit des <sup>Dm</sup> CCR4-NOT <sub>MINI</sub> -Komplexes.	38
Abbildung 2.11: Magnesiumabhängigkeit des <sup>Dm</sup> CCR4-NOT <sub>MINI</sub> -Komplexes.	39
Abbildung 2.12: Distributivität der Deadenylierung durch <sup>Dm</sup> CCR4-NOT <sub>MINI</sub> .	40
Abbildung 2.13: Die <sup>Dm</sup> CCR4-NOT-Subkomplexe zeigen vergleichbare Deadenylierung.	42
Abbildung 2.14: Die Deadenylierung ist gleichermaßen von CCR4 und Caf1 abhängig.	44
Abbildung 2.15: Der <sup>Dm</sup> CCR4-NOT <sub>MINI</sub> ist aktiv in der Smaug-abhängigen Deadenylierung.	47
Abbildung 2.16: <sup>Dm</sup> CCR4-NOT <sub>MINI</sub> ist ausreichend für die Smaug-abhängige Deadenylierung.	48
Abbildung 2.17: Die Smaug-abhängige Deadenylierung ist PEG-abhängig.	49
Abbildung 2.18: PEG induziert keine Phasentrennung oder Aggregation.	51
Abbildung 2.19: Sowohl CCR4 als auch Caf1 sind essenziell für die Smaug-abhängige Deadenylierung.	52
Abbildung 2.20: Die Smaug-abhängige Deadenylierung zeigt Prozessivität.	54
Abbildung 2.21: Die basale Aktivität des <sup>Dm</sup> CCR4-NOT <sub>MINI</sub> -Komplexes wird durch tRNA inhibiert.	55
Abbildung 2.22: Distributivität und Prozessivität bei verschiedenen Salzkonzentrationen.	58
Abbildung 2.23: Smaug interagiert mit dem <sup>Dm</sup> CCR4-NOT <sub>MINI</sub> -Komplex.	60
Abbildung 2.24: Oskar inhibiert nicht die Interaktion von CCR4-NOT mit dem Smaug-RNA-Komplex.	62
Abbildung 2.25: Oskar inhibiert die Assoziation von Smaug mit der SRE <sup>WT</sup> -RNA.	63
Abbildung 2.26: Cup stimuliert die Deadenylierungseffizienz des <sup>Dm</sup> CCR4-NOT <sub>MINI</sub> -Komplexes.	66
Abbildung 2.27: Die Cup-abhängige Deadenylierung zeigt ebenfalls eine Stimulierung durch PEG.	67
Abbildung 2.28: <sup>Dm</sup> CCR4-NOT <sub>MINI</sub> ist ausreichend für die Cup-abhängige Deadenylierung.	68

<i>Abbildung 2.29: Darstellung der in der Deadenylierung zu testenden Cup-Fragmente.</i>	70
<i>Abbildung 2.30: Sämtliche Cup-Fragmente stimulieren die Deadenylierung.</i>	71
<i>Abbildung 2.31: Die stimulierende Interaktion mit CCR4-NOT ist über das gesamte Cup verteilt.</i>	72
<i>Abbildung 2.32: Smaug und Cup zeigen Kooperativität in der Deadenylierung.</i>	74
<i>Abbildung 2.33: PABPC stimuliert die Deadenylierung der FAM-7mer-RNA durch <sup>Dm</sup>CCR4-NOT<sub>MINI</sub>.</i>	76
<i>Abbildung 2.34: Die PABPC-RNA-Assoziation wird nicht durch PEG beeinflusst.</i>	77
<i>Abbildung 2.35: Zweistufiger Mechanismus der PABPC-stimulierten Deadenylierung.</i>	78
<i>Abbildung 2.36: CCR4 und Caf1 sind beide aktiv in der durch PABPC stimulierten Deadenylierung.</i>	80
<i>Abbildung 2.37: Schwächere Stimulierung der Deadenylierung für die A70-RNA durch PABPC.</i>	82
<i>Abbildung 2.38: Höhere Konzentrationen an PABPC werden zur Bindung der SRE-A70-RNA benötigt.</i>	83
<i>Abbildung 2.39: Die Smaug-abhängige Deadenylierung wird durch PABPC geringfügig stimuliert.</i>	84
<i>Abbildung 2.40: Me31B und Tral zeigen keine Stimulierung der Deadenylierung.</i>	86
<i>Abbildung 2.41: Me31B zeigt eine Inhibierung der Deadenylierung unter Zugabe von ATP.</i>	87
<i>Abbildung 2.42: Schema des zweistufigen Translationsassays.</i>	89
<i>Abbildung 2.43: Das zweistufige Translationssystem zeigt identische Repressionseffizienz.</i>	90
<i>Abbildung 2.44: H5E zeigt keine SRE-Spezifität und inhibiert nicht die nanos-Translationsrepression.</i>	92
<i>Abbildung 2.45: Smaug und Cup sind essenziell für die SRE-spezifische Translationsrepression.</i>	94
<i>Abbildung 2.46: Smaug ist in der Vorinkubation ausreichend für eine hohe SRE-spezifische Repression.</i>	95
<i>Abbildung 2.47: „Makromolekulare Crowder“ stimulieren die rekonstituierte Translationsrepression.</i>	97
<i>Abbildung 2.48: Die rekonstituierte Translationsrepression ist Cap-abhängig.</i>	98
<i>Abbildung 2.49: Das mittlere Cup-Fragment führt zu einer Cap-unabhängigen Translationsrepression.</i>	100
<i>Abbildung 2.50: Das mittlere Cup-Fragment übt auch mit deletierter CHD Translationsrepression aus.</i>	101
<i>Abbildung 2.51: Keine Repression im E.coli-Extrakt.</i>	103
<i>Abbildung 9.1: Zusammensetzung der potenziellen Repressorproteine der nanos-mRNA</i>	156
<i>Abbildung 9.2: Schema einer Auswahl der hier eingesetzten Reporter-RNAs.</i>	157
<i>Abbildung 9.3: NOT1<sub>RE</sub> und NOT1<sub>RG</sub> sind die am häufigsten exprimierten Isoformen von NOT1.</i>	158
<i>Abbildung 9.4: EMSA für die Assoziation von Smaug und Cup mit der SRE<sup>WT</sup>-RNA.</i>	159
<i>Abbildung 9.5: Sämtliche Bereiche von Cup binden RNA.</i>	159
<i>Abbildung 9.6: Sensibilität des DEE gegenüber Salz.</i>	160

## 7. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 4.1: Liste eingesetzter Chemikalien.</i>	107
<i>Tabelle 4.2: Lister der speziellen Geräte und Software.</i>	110
<i>Tabelle 4.3: Expressions- und Transkriptionsplasmide.</i>	111
<i>Tabelle 4.4: Primäre und sekundäre Antikörper.</i>	115
<i>Tabelle 4.5: Eingesetzte Proteinpräparationen.</i>	116
<i>Tabelle 4.6: Zusammensetzung der Transkriptionsreaktion.</i>	123
<i>Tabelle 4.7: Zusammensetzung der Puffer zur Bacmid-Isolation.</i>	124
<i>Tabelle 4.8: Zusammensetzung der Proteinreinigungspuffer.</i>	125
<i>Tabelle 4.9: Zusammensetzung der Extraktionspuffer für zellfreie Translationsextrakte.</i>	129
<i>Tabelle 4.10: Pufferzusammensetzung in der Deadenylierung.</i>	130
<i>Tabelle 4.11: Zusammensetzung der Translationspuffer und des ARS.</i>	132
<i>Tabelle 8.1: Abkürzungen</i>	152
<i>Tabelle 9.1: Oligonukleotidsequenzen</i>	160

## 8. Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 8.1: Abkürzungen

<u>Abkürzung:</u>	<u>Bedeutung:</u>
(v/v)	Volumen pro Volumen
4E-T	eIF4E-Transporter
aa	Aminosäure
AGO1	Argonaute-1
ARM	<i>Armadillo repeats</i> (Proteindomäne)
ARS	ATP-regenerierendes System
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Adenin und Uracil
Au	Absorptionseinheit
BRE	<i>Bruno recognition element</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
C-Terminus	Carboxy-Terminus (bei Proteinen)
Caf1	<i>CCR4-associated factor 1</i>
CC	Coiled-Coil-Domäne
CCR4	<i>Carbon catabolite repressor protein 4 homolog</i>
CHD	Cup-Homologiedomäne
CO-mRNA	Codon-optimierte-mRNA
CrPV	<i>Cricket paralysis virus</i>
CTP	Cytidintriphosphat
CV	Säulenvolumen
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
Da	Dalton
DDX6	DDX-Helikasen gehören zur DEAD-Box-Familie
DEAD	Aminosäuremotiv (Einbuchstabencode)
Ded1p	<i>Defines essential domain 1 protein</i>
DEDD	Aminosäuremotiv (Einbuchstabencode)
DEE	<i>Drosophila</i> -Embryoextrakt
Dhh1	DExD/H-Box-Helikase 1 (aus <i>S. cerevisiae</i> )
Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease

Fortsetzung auf folgender Seite

**Fortsetzung von Tabelle 8.1**

---

<u>Abkürzung:</u>	<u>Bedeutung:</u>
DTT	Dithiothreitol
DUF	<i>Domain of unknown function</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Edc3	<i>Enhancer of decapping 3</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEP	Exonuklease-Endonuklease-Phosphatase-Familie
eIF	Eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>
FAM	Carboxyfluorescein
FDF	Aminosäuremotiv (Einbuchstabencode)
GTP	Guanosintriphosphat
GW182	Protein mit vielen Glycinen (G) und Tryptophanen (W) im N-Terminus
H5E	High-Five-Translationsextrakt
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
Hsp	Hitzeschockprotein
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle
KAc	Kaliumacetat
Kryo-EM	Kryoelektronenmikroskopie
LRR	Leucin-reiche Region
LSM1-7	Proteinkomplex aus sieben Sm- <i>like</i> Proteinen
LSm14A	Sm- <i>like</i> -14 Homolog A
MBP	Maltose-Bindeprotein
Me31B	<i>Maternally expressed at chromosome 31B</i>
meth.	methyliert
Mg(Ac) <sub>2</sub>	Magnesiumacetat
MIF4G	Middle domain of eukaryotic initiation factor 4G
min	Minute
MINI_EXT	MINI_Extension
miRNA	microRNA
mRNA	<i>messenger</i> -RNA
mRNP	<i>messenger</i> -Ribonukleoprotein-Partikel
MS	Massenspektrometrie
msl-2	<i>male-specific lethal 2</i>

---

Fortsetzung auf folgender Seite

**Fortsetzung von Tabelle 8.1**

---

<u>Abkürzung:</u>	<u>Bedeutung:</u>
MUT	Mutante
MWCO	<i>Molecular weight cut-off</i>
N-Terminus	Amino-Terminus (bei Proteinen)
NCO-mRNA	Nicht Codon-optimierte-mRNA
nLuc	Nanoluciferase
NOT	<i>Negative on TATA</i>
nt	Nukleotide
NTP	Nukleosidtriphosphat
ORF	<i>Open reading frame</i>
PA-Gel	Polyacrylamid-Gel
PABPC	Zytosolisches Poly(A)-Bindepotein
PAN2-PAN3	Poly(A)-Nukleasen 2 und 3
PARN	Poly(A)-spezifische Ribonuklease
PEG	Polyethylenglycol
PES	Polyethersulfon
PHAT	<i>Pseudo-HEAT repeat analogous topology</i> (Protein-Domäne)
piRNA	<i>piwi-interacting-RNA</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVA	Polyvinylalkohol
RBP	RNA-Bindeprotein
RGG	Aminosäuremotiv (Einbuchstabencode)
RLU	<i>Relative Light Units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur (~ 25 °C)
<i>S. frugiperda</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
S2E	S2-Translationsextrakt
SAM	<i>Sterile alpha motif</i> (Protein-Domäne)
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sf21	<i>Spodoptera frugiperda</i> -Zellen
Sf21E	Sf21-Translationsextrakt
SRE	<i>Smaug-recognition-elements</i>
Star12E	Translationsextrakt aus <i>E. coli</i> Star-Zellen
SXL	<i>Sex-lethal</i>
T7-Tag	Peptid der <i>leader</i> -Sequenz aus Gen10 des T7-Bakteriophagen

---

Fortsetzung auf folgender Seite

**Fortsetzung von Tabelle 8.1**

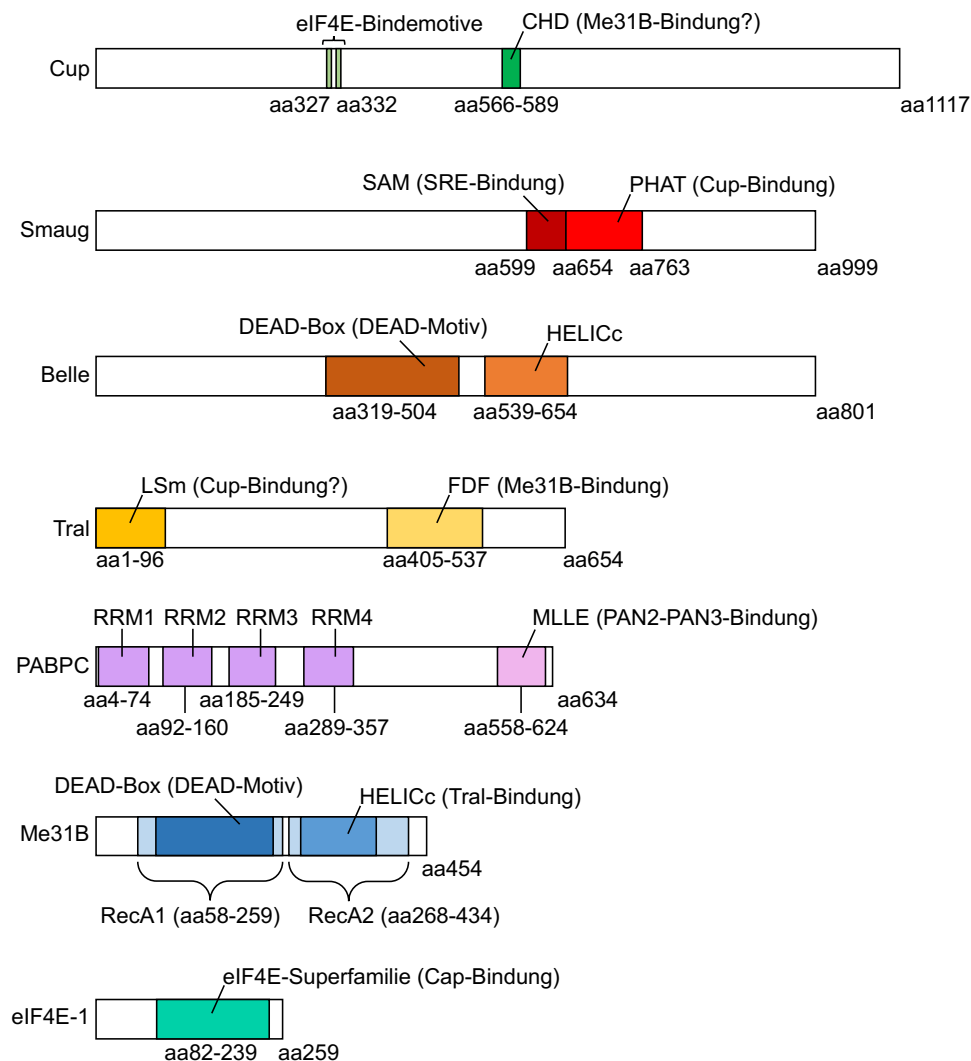
---

<u>Abkürzung:</u>	<u>Bedeutung:</u>
TBST	Tris- <i>buffered saline</i> mit 0,05 % Tween 20
TCE	<i>Translation control element</i>
Tral	Trailer hitch
tRNA	transfer-RNA
TTP	Tristetraprolin (Protein)
UTP	Uridintriphosphat
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>
XRN1	5'-3'-Exoribonuklease 1
λN	λN-Peptid

---

## 9. Anhang

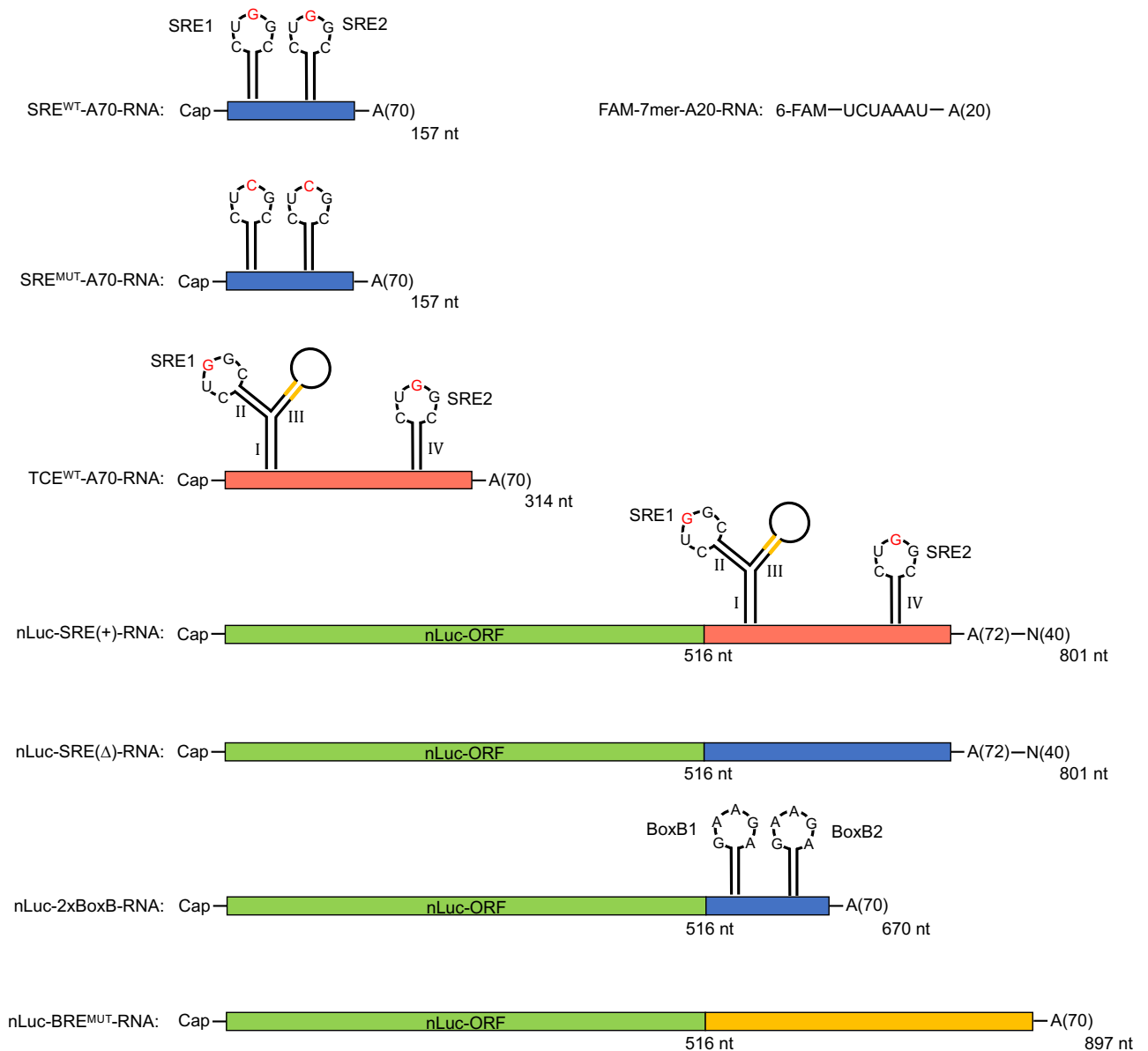
### 9.1 Zusätzliche Abbildungen und Tabellen



**Abbildung 9.1: Zusammensetzung der potenziellen Repressorproteine der *nanos*-mRNA**

Bekannte Domänen und Interaktionsoberflächen der einzelnen Repressorproteine wurden farblich kenntlich gemacht und benannt. Die weißen Bereiche sind überwiegend intrinsisch ungeordnet. Nachfolgend werden die einzelnen Domänen der Repressorproteine erklärt. **Cup**: CHD – Cup-Homologiedomäne; **Smaug**: SAM – *Sterile alpha motif* (RNA-Bindung), PHAT – *Pseudo-HEAT repeat analogous topology* (Cup-Bindung); **Belle**: DEAD-Box – enthält das DEAD-Motiv (RNA-Bindung und ATPase-Aktivität), HELICc – C-terminale Domäne der Helikase-Superfamilie (Helikase-Aktivität); **Tral**: LSm – *Like-Sm*-Domäne (*P-body*-Bildung), FDF – Aminosäuremotiv (Me31B-Bindung); **PABPC**: RRM – RNA recognition motif (RNA-Bindung; Poly(A)-spezifisch), MLLE – *mademoiselle*-Domäne (PAN2-PAN3-Interaktion; Passmore & Collier (2021)); **Me31B**: RecA1/2 – RecA-ähnliche Domänen (ATPase und Helikase-Aktivität); Rest siehe Belle; **eIF4E-1**: eIF4E-Superfamilie – Bereich der konserviert ist und für die Cap-Bindung sowie eIF4G-Interaktion notwendig ist.

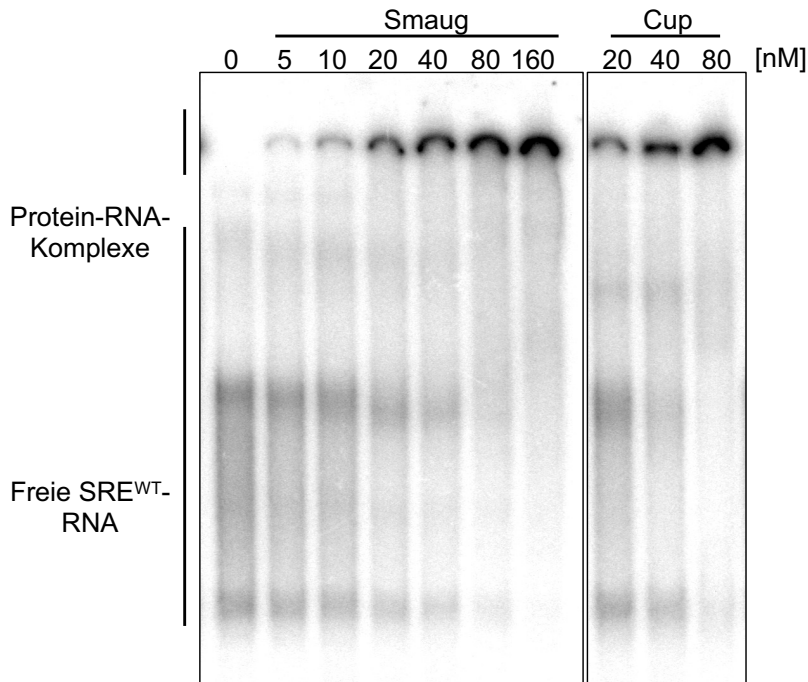




**Abbildung 9.2: Schema einer Auswahl der hier eingesetzten Reporter-RNAs.**

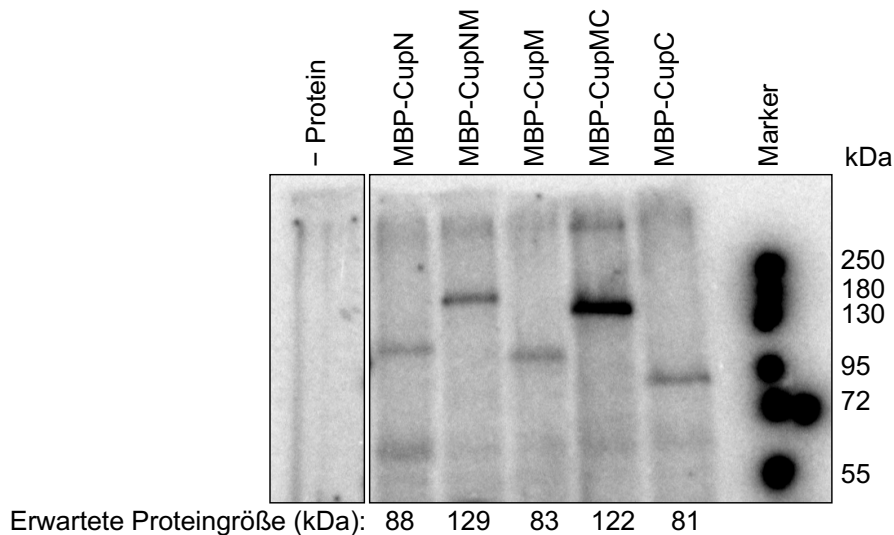
Die blauen Bereiche bestehen überwiegend aus zufälligen Nukleotiden. Die SRE<sup>WT</sup>-A70- und die nLuc-2xBoxB-RNA enthalten in diesem Bereich nur die jeweiligen *stem-loop*-Strukturen (SREs bzw. BoxB), die von Smaug bzw. vom λN-Peptid gebunden werden. Bei den SREs ist das für die Smaug-Bindung kritische Nukleotid rot markiert. In der SRE<sup>MUT</sup>-A70-RNA wurde dieses Nukleotid ausgetauscht. Der rote Bereich in der TCE<sup>WT</sup>-A70-RNA und nLuc-SRE(+)-RNA stellt das TCE der *nanos*-mRNA dar. Dieses enthält vier *stem-loops*, von denen Nr. II und IV durch Smaug gebunden werden (Crucs et al., 2000; Smibert et al., 1996). In *stem-loop* III liegt in Gelb markiert die Bindestelle von Glorund vor (Kalifa et al., 2006). Der grüne Bereich gibt den ORF der Nanoluciferase an. Im gelben Bereich befindet sich das mutierte AB-Element der *oskar*-3'UTR (Kim-Ha et al., 1995). Sämtliche mRNAs enthielten, falls nicht anders angegeben, eine Cap-Struktur und einen 20 bis 72 Nukleotide langen Poly(A)-Schwanz. Für die Translationskonstrukte nLuc-SRE(+) und nLuc-SRE(Δ) folgten auf den Poly(A)-Schwanz 40 zufällige Nukleotide, welche den Poly(A)-Schwanz vor der Deadenylierung schützten.





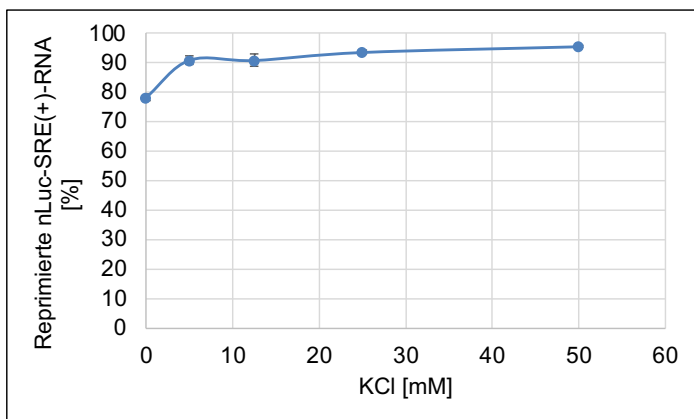
**Abbildung 9.4: EMSA für die Assoziation von Smaug und Cup mit der SRE<sup>WT</sup>-RNA.**

Autoradiogramm eines nichtdenaturierenden PA-Gels zur Auftrennung der Protein-RNA-Komplexe nach erfolgter Bindungsreaktion. Die SRE-A70-RNA (10 nM) wurde mit den angegebenen Konzentrationen an Smaug, Cup oder Reaktionspuffer für 20 Minuten bei 25 °C inkubiert. Daraufhin wurden die RNA-Protein-Komplexe durch eine nichtdenaturierende Gelelektrophorese bei 200 V und Raumtemperatur aufgetrennt. Über den Spuren sind die jeweiligen Proteinkonzentrationen und entsprechenden Proteine angegeben. Links wurden die Positionen der freien Substrat-RNA und der Protein-gebundenen RNA kenntlich gemacht.



**Abbildung 9.5: Sämtliche Bereiche von Cup binden RNA.**

Autoradiogramm eines SDS-PA-Gels mit den aufgetrennten Protein-RNA-Komplexen nach UV-Quervernetzung. Je 0,6 pmol der Proteine wurden mit 0,5 pmol eines RNA-Oligonukleotids in Deadenylierungspuffer für 10 Minuten inkubiert. Danach wurden die Proteine durch UV-Bestrahlung (254 nm, 200 mJ/cm<sup>2</sup>) mit dem RNA-Oligonukleotid quervernetzt. Über den Spuren sind die eingesetzten Proteine angegeben und unter den Spuren die erwarteten Proteingrößen. Rechts sind die Laufhöhen eines Größenstandards in kDa angegeben. Das Experiment wurde von Dr. Christiane Rammelt durchgeführt.



**Abbildung 9.6: Sensibilität des DEE gegenüber Salz.**

Der Einfluss von Salz, welches durch die Repressorproteine eingeführt wurde, auf die Repressionseffizienz des DEEs. Dafür wurde die nLuc-SRE(+)- oder nLuc-SRE( $\Delta$ )-RNA (je 1 nM) mit unterschiedlichen Konzentrationen KCl (0 bis 500 mM) zusätzlich zum Translationspuffer vorinkubiert und nachfolgend wurde die Translation durch Zugabe der vorinkubierten Reporter-RNA (2  $\mu$ l) zum Translationsmix (18  $\mu$ l) mit DEE als Translationsextrakt initiiert. Hier wurde KCl verwendet, da dieses in den anfänglichen Protein-Reinigungspuffern enthalten war. Nach 30 Minuten wurde die Luciferase-Aktivität durch Zugabe von Nano-Glo<sup>®</sup> in RLU/s bestimmt. Dargestellt ist das Verhältnis der Luciferase-Aktivität als Prozent-Repression für die SRE(+)-RNA zur SRE( $\Delta$ )-RNA in den jeweiligen Proben. n = 3.

**Tabelle 9.1: Oligonukleotidsequenzen**

Oligonukleotide		
<i>Oligonukleotid:</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Verwendung</i>
3utr BREmut for1_EcoRI	aattcgcttagttttaattagttttaattgagattggtctctgtctttgtattttaga	BREmut-Klonierung
3utr BREmut for2_BamHI	gtcctagtcattattttagattattttgggttttggtttcttagttagatttaag	BREmut-Klonierung
3utr BREmut rev1_EcoRI	aaaatctaaaataacaaagacagagaacaatctcaattaaaaactaattaaaactaagcg	BREmut-Klonierung
3UTR BREmut rev2_BamHI	gatccttaaatctaactaagaacccaaaacccaaaataatctaaaataatggactaggac	BREmut-Klonierung
3UTR BREwt rev_XbaI_BamHI	gctctagaggatccttaaatctaacatagaac	BREwt-Klonierung
3UTR BREwtfor_BglIII_EcoRI	ggaagatctgaattcgcttagtttaatatg	BREwt-Klonierung

Fortsetzung auf folgender Seite

**Fortsetzung von Tabelle 9.1**

<i>Oligonukleotid:</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Verwendung</i>
BoxB1for_Eco53kI	ctcggggccctgaagaagggcccata- tagggccctgaagaagggcccg	BoxB-Klonierung
BoxB1rev_BamHI	gatccggggccttcttcagggccctatat- gggcccttcttcagggcccgag	BoxB-Klonierung
BoxB2for_BamHI	gatccggggcctgaagaagggcccata- tagggccctgaagaagggccct	BoxB-Klonierung
BoxB2rev_XbaI	ctagagggccttcttcagggccctatat- gggcccttcttcagggcccg	BoxB-Klonierung
Caf40_SmaI_for	tccccgggatgagtctcaaccgagtc	Caf40-Klonierung
Caf40for EcoRI	ggaattcatgagtctcaaccgagtc	Caf40-Klonierung
Caf40revHindIII	ccaagcttacttatcgtcgtcatccttg- taatcggagcccagtggcgacatg	Caf40-Klonierung
Cup Blunt for	atgcaaatggccgaagctgagcaag	Cup-Amplifikation
Cup Blunt rev	ttaatgaaactcatccccgctgttg	Cup-Amplifikation
Cup for AleI	gaacactcctgtgatgatcg	ΔCHD-OE-PCR
Cup forOE-PCR	gtacaggaaccagaacgacgaggagaaaatg	ΔCHD-OE-PCR
Cup revOE-PCR	catttctcctcgtcgttctggttctctgtac	ΔCHD-OE-PCR
Cup_1-417_rev AvrII	cgcttaggttagtactgattaggttc	CupN-Klonierung
Cup_1-417:for XhoI	ccgctcgagatgcaaatgg	CupN-Klonierung
Cup_417-770 rev AvrII	cgcttaggttatcgacgccatttg	CupM-Klonierung
Cup_417-770_for XhoI	ccgctcgaggacgagtccatc	CupM-Klonierung
Cup_770_1118 rev AvrII	ccgcttaggttaatgaaactcatcc	CupC-Klonierung
Cup_770-1118_for XhoI	Ccgctcgagcgaactcactgaac	CupC-Klonierung
Cup_rev_BbvCI	ttgctgaggctgcgtttgc	ΔCHD-OE-PCR
CupFLAG for SmaI	tccccgggctttatcttcagggc	Cup-Klonierung
CupFLAG rev XhoI	ccgctcgagttacttatcgtcgtcatccttgaat- catgaaactcatccccgc	Cup-Klonierung
for GST-PABPC	tggggccctgggatcaatggcttctctatacgtc	PABPC-Klonie- rung

Fortsetzung auf folgender Seite

**Fortsetzung von Tabelle 9.1**

<u>Oligonukleotid:</u>	<u>Sequenz</u>	<u>Verwendung</u>
His8_for_NcoI_Serine addition	catgggcagcagccatcatcaccatcaccatcaccattc	His-Tag
His8_SmaI_for	tccccgggatgcatcatcaccatcaccatcaccat	His-Tag
His8-Cup for XhoI	ccgctcgagatgcatcatcatcatcatcatcac-caccatgcaaatggccgaagctgag	Cup-Klonierung
HislambdaN SmaI for	tccccgggatgggcagcagccatcatc	His-λN-Klonierung
lambdaN_NcoI_rev	catgccatggtgtttgcagctttccatt	His-λN-Klonierung
lambdaN1 for NdeI	tatgatggacgcacaaacacgacgacgt-gagcgtcgc	λN-Klonierung
lambdaN1rev_middle	gctcacgtcgtcgtgtttgtcgtccatca	λN-Klonierung
lambdaN2for_middle	ctagcgtttgcagctttccattgagcttgtttctcagcgcgac	λN-Klonierung
lambdaN2rev_NheI	gctgagaaacaagctcaatg-gaaagctgcaaacg	λN-Klonierung
MBPforXmaIHis8	tccccgggatgcatcatcaccatcaccatcaccataaaatcgaagaaggtaaactgg	MBP-Klonierung
MBPprevXhoI	ccgctcgagcttggtgatacagagtctg	MBP-Klonierung
Not1_Full_revAgeI	tggctaatagcacgcgctatc	NOT1 <sub>PC/PE/MINI_EXT</sub> -Klonierung
Not1_pC_Full_forXbaI	gctctagaatggctagtaacgtag-agagccaactg	NOT1 <sub>PC</sub> -Klonierung
Not1_pE_Full_forXbaI	gctctagaatggctagtgacacatcttg-gattaatc	NOT1 <sub>PE</sub> -Klonierung
Not10forBamHI	cgggatccaatggactcggcggaatcc	NOT10-Klonierung
Not10revSall	acgcgtcgacctaaactcggcgtcccgcc	NOT10-Klonierung
Not11forNdeI	ggaattccatattgattacaaggat-gacgacgataagatgtttctgtccatcgcc	NOT11-Klonierung
Not11revKpnI	gggtaccctacttagctagggagttggac	NOT11-Klonierung
Not1MCrevHindIII	cccaagctttcagttgatggtggtctac	NOT1 <sub>MINI</sub> -Klonierung

Fortsetzung auf folgender Seite

**Fortsetzung von Tabelle 9.1**

<u>Oligonukleotid:</u>	<u>Sequenz</u>	<u>Verwendung</u>
Not1revHpaI	agttaactctagactcacttatcgtcgtcstcctt- gtaatcgttgatggtggctacctc	NOT1 <sub>MINI</sub> -Klonie- rung
Not2forNheI	ctagctagcatgcatcatcaccatcaccatcac- catatggcgaatttaaatttc	NOT2-Klonierung
Not2revKpnI	gggttaccttatacagactgtccattc	NOT2-Klonierung
Not3_Eco53kI_rev	gtgtttcaatgagacgtcg	NOT3-Klonierung
Not3forNcoI	catgccatggatgcatcatcaccatcaccatca- ccataggctgcgacgagaaaattg	NOT3-Klonierung
Not3minrevHindIII	cccaagctttcaattcagctccttgtc	NOT3-Klonierung
Not3revKpnI	gggttacctcaattcagctccttgtc	NOT3-Klonierung
NOTIforEcoRI	ggaattcatggcaactgttg	NOT1 <sub>PC/PE/MINI_EXT</sub> - Klonierung
NotIMC HisforSpeI	ggactagtagcatcatcaccatcaccatcac- catgtgactgtgccaccagag	NOT1 <sub>MINI</sub> -Klonie- rung
NotIMCfor	gtgactgtgccaccagag	NOT1 <sub>MINI</sub> -Amplifi- kation
NotIMCrev	tcagttgatggtggctac	NOT1 <sub>MINI</sub> -Amplifi- kation
NotImid for	tatccgctccattcctcac	NOT1-Klonierung
NotImidfor EcoRI	cggaattcgtgactgtgccaccagag	NOT1 <sub>MINI</sub> -Klonie- rung
Osk_3'UTR_for_BglII	gaagatctgttgggttcttaatacaag	BRE-Amplifikation
pGEX-PABPC forBamHI	cgcgatccatggcttctctatacgtcggtg	PABPC-Klonie- rung
pGEX-PABPC revXhoI	ccgctcgagtagttggcgggctcggtg	PABPC-Klonie- rung
pop2_DTEtoATA_for	cactatgtggccatggccaccgcgttt- ccaggcgtggtag	Caf1-OE-PCR
pop2_DTEtoATA_rev	ctaccacgcctggaacgcggtggccat- ggccacatagtg	Caf1-OE-PCR
pop2_rev_xbaI	gctctagatcatgaagcgtgttcgtc	Caf1-Klonierung

Fortsetzung auf folgender Seite

**Fortsetzung von Tabelle 9.1**

<i>Oligonukleotid:</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Verwendung</i>
pop2forXhoI	ctcgagtcacttatcgtcgtcatccttgtaatct- gaagcgctgttcgtctc	Caf1-Klonierung
twin_DFNtoAFA_for	gctgctgctgtgcggtgccttcgcctcgctac- ccgattcag	CCR4-OE-PCR
twin_DFNtoAFA_rev	ctgaatcgggtagcgaggcgaaggcac- cgcacagcagcagc	CCR4-OE-PCR
twin_for2	cgggatccatgaaaggcaatcattataaaatg	CCR4-OE-PCR
twin_revHindIII	ccaagcttctaccggcgattgatcag	CCR4-Klonierung
twinforBamHI	cgggatccaatgaaaggcaatcattataaaatg	CCR4-Klonierung
twinrevSalI	acgcgtcgacctaccggcgattgatcag	CCR4-Klonierung



## 9.2 Lebenslauf

### Persönliche Angaben:

Vor- und Nachname: Filip Pekovic  
Geschlecht: männlich  
Geburtstag und -ort: 3. Dezember 1992 in Hannover, Deutschland  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: verheiratet

### Bildungsweg:

10/2016 - 09/2021 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Doktorand)**  
**Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**  
Institut für Biochemie und Biotechnologie  
Allgemeine Biochemie  
Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Elmar Wahle

09/2016 **Abschluss M. Sc. in Biochemie**  
**Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**  
Institut für Biochemie und Biotechnologie  
Allgemeine Biochemie (Prof. Dr. Elmar Wahle)  
Thema: „Expression und Aufreinigung des Translationsrepressorkomplexes der *nanos*-mRNA aus *Drosophila melanogaster*“

10/2014 - 09/2016 **Studium Master Biochemie, 120 LP**  
**Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

09/2014 **Abschluss B. Sc. in Biochemie**  
**Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**  
Institut für Biochemie und Biotechnologie  
Allgemeine Biochemie (Prof. Dr. Elmar Wahle)  
Thema: „Der Einfluss von baculoviral exprimiertem Belle auf die Translation der *nanos*-mRNA von *Drosophila melanogaster*“

10/2011 – 09/2014 **Studium Bachelor Biochemie, 180 LP**  
**Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

06/2011 **Abitur**  
**Leibnizschule Hannover (Gymnasium)**

### 9.3 Publikationsliste

#### Veröffentlicht:

**Cao, W. X., Kabelitz, S., Gupta, M., Yeung, E., Lin, S., Rammelt, C., Ihling, C., Pekovic, F., Low, T. C. H., Siddiqui, N. U., Cheng, M. H. K., Angers, S., Smibert, C. A., Wühr, M., Wahle, E., & Lipshitz, H. D. (2020).** Precise Temporal Regulation of Post-transcriptional Repressors Is Required for an Orderly *Drosophila* Maternal-to-Zygotic Transition. *Cell Reports*, 31(12), 107783.

#### Vorträge:

„Reconstitution of Smaug-dependent deadenylation of nanos mRNA by the CCR4-NOT complex“, halbjährliches Meeting des Schwerpunktprogramms SPP1935 (20.-22.09.2021) in Berlin (GER).

„Post-transcriptional regulation of *Drosophila melanogaster nanos* mRNA“, halbjährliches Meeting des Schwerpunktprogramms SPP1935 (25.-27.11.2019) in Würzburg (GER)

„Reconstitution of translational repression of *Drosophila nanos* mRNA“, jährlicher Retreat des Graduiertenkollegs GRK1591 (12.-14.12.2018) in Stangerode (GER)

„Attempts at the *in vitro* reconstitution of the translational repression of nanos mRNA“, jährlicher Retreat des Graduiertenkollegs GRK1591 (06.-08.12.2017) in Stangerode (GER)

## **9.4 Eidesstaatliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich meine Dissertationsschrift selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Sämtliche Textstellen, die wörtlich oder inhaltlich aus der Literatur entnommen wurden, habe ich als solche gekennzeichnet. Die hier vorliegende Arbeit wird erstmals zum Zweck einer Promotion eingereicht. Ich versichere, dass ich keine früheren erfolglosen Promotionsversuche unternommen habe.

Halle (Saale), 07. Dezember 2021

Filip Pekovic

## 9.5 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Elmar Wahle vielmals bedanken. Zum einen für die Möglichkeit der Anfertigung meiner Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe, zum anderen für die jahrelange exzellente Betreuung. Durch Seine Hinweise blieb das Projekt stets auf richtigem Kurs. Außerdem fühlte ich mich in meinen Vorhaben jederzeit durch Ihn unterstützt, und generell war Elmar ein wunderbarer Chef. Danke für alles!

Weiterhin bedanke ich mich recht herzlich bei Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier und Prof. Dr. Utz Fischer für das Lesen dieser Arbeit und die Erstellung der Gutachten.

Ein großer Dank gilt Elmar, Dr. Christiane Rammelt und Ron Uhlig für die zahlreichen Diskussionen und Korrekturvorschläge, die mir bei der Anfertigung meiner Dissertation unheimlich geholfen haben.

Außerdem danke ich Dr. Eugene Valkov und Yevgen Levdansky vielmals für die Bereitstellung von Präparationen des humanen CCR4-NOT-Komplexes und für Ihre Expertise zu Fragen der Deadenylierung. Ebenfalls bedanke ich mich sehr bei Dr. Mandy Jeske und Jana Kubikova für die Bereitstellung des Oskar-Proteins und die regen Diskussionen.

Allen Mitgliedern der AG Wahle, die ich kennen lernen durfte, danke ich im besonderen Maße für Ihre Unterstützung. Sei es für die Einweisung in neue Geräte, das Teilen von Reagenzien oder einfach nur für einen lustigen Plausch in der Pausenzeit. Insbesondere bedanke ich mich bei Sarah Kabelitz und Christiane für die fabelhafte Laboratmosphäre. Bei euch fühlte ich mich immer willkommen und es war eine schöne Zeit, die ich sehr missen werde.

Weiterhin konnte ich durch meine Assoziation mit dem GRK1591 und dem SPP1935 eine Vielzahl exzellenter Vorträge hören. Bei den jährlichen Meetings war es mir möglich meine Ergebnisse einem interessierten Fachpublikum vorzustellen und Feedback zu erhalten. Dafür danke ich allen Teilnehmenden und insbesondere den Organisatoren sehr, da diese stets für ein fantastisches Drumherum gesorgt haben. Außerdem ist an dieser Stelle der DFG zu danken, deren Finanzierung mir die Zeit als Doktorand erst ermöglicht hat.

Zu guter Letzt gilt meiner Familie und meinen Freunden ein riesiger Dank für eure jahrelange Unterstützung. Ihr habt mir stets gut zugeredet und abseits der Arbeit für eine erholsame sowie lustige Zeit gesorgt. Allen voran danke ich hier Ron Uhlig, Barbara von Hippel, Sina Cassau und Leander Ehmke für die schönen Jahre.