

Einfluss der tRNA Modifikation i<sup>6</sup>A<sub>37</sub> auf  
die Translation in Säugern und deren  
Mitochondrien

DISSERTATION

ZUR  
ERLANGUNG DES DOKTORGRADES (DR. RER. NAT.)  
DER  
MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT  
DER  
RHEINISCHEN FRIEDRICH-WILHELMS-UNIVERSITÄT BONN

VORGELEGT VON  
**SIMON BOHLEBER**

AUS  
KEHL

BONN IM JUNI 2019

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Schweizer  
2. Gutachter: Prof. Dr. Volker Knoop

Tag der Promotion: 20.09.2019  
Erscheinungsjahr: 2019

# Einfluss der tRNA Modifikation $i^6A_{37}$ auf die Translation in Säugern und deren Mitochondrien

## ZUSAMMENFASSUNG

Modifizierte Basen in tRNA-Anticodonschleifen üben einen direkten Einfluss auf die Translationsmaschinerie aus.  $N^6$ -Isopentenyladenosin ( $i^6A$ ) ist die älteste bekannte tRNA-Modifikation. Jedoch war ihre Signifikanz in Säugetieren bisher unbekannt. In dieser Arbeit wurden die Effekte fehlender Isopentenylierung an Base 37 von tRNAs in Säugetieren und deren Mitochondrien untersucht. Die im Cytoplasma lokalisierten  $tRNA^{Ser}(UCN)$  und  $tRNA^{[Ser]Sec}$ , sowie die mitochondriale  $tRNA^{Cys}$ , sind mit  $i^6A$  modifiziert. Die mitochondrialen tRNAs  $tRNA^{Tyr}$ ,  $tRNA^{Trp}$ ,  $tRNA^{Phe}$  und  $tRNA^{Ser}(UCN)$  werden zu  $ms^2i^6A$  (2-Methylthio- $N^6$ -Isopentenyladenosin) weiter thiomethyliert.

Trit1 (tRNA:Isopentenyltransferase 1), die einzige Isopentenyltransferase in Säugetieren, wurde konditional in Maushepatozyten und -neuronen inaktiviert. Ribosomales Profiling nukleärer Transkripte in Lebergewebe offenbarte eine erhöhte Rate an Leserahmenverschiebungen. Eine verstärkte Stopcodon Suppression konnte durch erhöhte Mengen von *in-frame* Ribosomen im 3'-UTR Bereich nachgewiesen werden. Akkumulation von *out-of-frame* Ribosomen auf Stopcodons innerhalb codierender Sequenzen begründen die Aktivierung des *non-sense mediated decay*. Die Recodierung des UGA/Sec Codons scheint nicht signifikant gestört zu sein. Die Besetzzeiten von Codons, welche Wobble-Basenpaarungen benötigen, unterscheiden sich signifikant in den Mitochondrien. Durch gestörte Expression der Untereinheiten der mitochondrialen Elektronen-Transportkette ist die Enzymaktivität verringert. Der Stressmechanismus *mitochondrial integrated stress response* wird ausgelöst, was die Phosphorylierung des eukaryotischen Initiationsfaktors eIF2 $\alpha$  zur Folge hat. Neuron-spezifische *Trit1*-defiziente Mäuse zeigen Mikrozephalie und epileptische Anfälle. Ebenso werden Schlüsseltranskripte der *unfolded protein response* induziert.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit erstmalig codonspezifische Effekte fehlender tRNA  $N^6$ -Isopentenylierung an Adenosin 37 in der cytoplasmatischen und der mitochondrialen Translation von Säugetieren beschrieben. Es wurde gezeigt, dass gestörte mitochondriale Aktivität einen negativen Einfluss auf die Translation im Cytoplasma ausübt. Schließlich konnte die fundamentale Rolle von  $i^6A$  in der Biologie von Säugetieren demonstriert werden.



# Inhaltsverzeichnis

o	EINLEITUNG	I
o.1	Das zentrale Dogma der Molekularbiologie . . . . .	2
o.2	Transkription . . . . .	2
o.3	Translation . . . . .	5
o.3.1	Initiation . . . . .	6
o.3.2	Elongation . . . . .	7
o.3.3	Termination . . . . .	9
o.3.4	Bildungsrate von Proteinen . . . . .	10
o.4	Qualitätskontrolle der Translation . . . . .	11
o.4.1	<i>Non-stop mediated decay</i> . . . . .	11
o.4.2	<i>No-go decay</i> . . . . .	12
o.4.3	<i>Non-sense mediated decay</i> . . . . .	13
o.5	Bildung der Proteinstruktur . . . . .	14
o.6	Selenoproteine . . . . .	15
o.7	Regulatorische Einflüsse auf die Genexpression . . . . .	16
o.8	tRNA-Struktur . . . . .	19
o.9	tRNA-Aminoacylierung . . . . .	21
o.10	Mitochondriale Translation . . . . .	22
o.11	Die tRNA:Dimethylallyl-Isopentenyltransferasen . . . . .	24
o.12	tRNA-Modifikationen in der Anticodon-Schleife . . . . .	28
I	ZIELSETZUNG	31
2	MATERIAL UND METHODEN	33
2.1	Materialien . . . . .	34
2.1.1	Reagenzien . . . . .	34
2.1.2	Kommerzielle Reagenziensysteme . . . . .	35
2.1.3	Rekombinante DNA und Bakterien . . . . .	35
2.1.4	Geräte . . . . .	36
2.1.5	Utensilien . . . . .	37
2.1.6	Software und Datenbanken . . . . .	38
2.2	Transgene Mäuse . . . . .	39
2.2.1	Erzeugung transgener Mäuse . . . . .	39
2.2.2	Genotypisierungen . . . . .	41
2.2.3	Probenentnahme . . . . .	46

2.3	<i>in vitro</i> Methoden . . . . .	46
2.3.1	Quantitative RT-PCR . . . . .	46
2.3.2	Aktivitätsmessung von Transaminasen . . . . .	49
2.3.3	Proteinaufreinigung . . . . .	50
2.3.4	Enzymkinetik von TRIT1 . . . . .	52
2.3.5	Isolation der Mitochondrien und Messung der Komplexaktivität . . . . .	54
2.3.6	3'-Sequenzierung . . . . .	55
2.3.7	RNA-Sequenzierung . . . . .	55
2.3.8	Ribosomales Profiling . . . . .	56
2.4	<i>in silico</i> Methoden . . . . .	62
2.4.1	Erhalt und Präprozessierung von Referenzsequenzen . . . . .	62
2.4.2	Indexierung von Referenzdaten . . . . .	66
2.4.3	Qualitätskontrolle von Sequenzierungsdaten . . . . .	68
2.4.4	Präprozessierung von Sequenzierungsdaten . . . . .	69
2.4.5	Kartierung von Sequenzierungsdaten gegen Referenzsequenzen . . . . .	70
2.4.6	Postprozessierung kartierter Sequenzen . . . . .	76
2.4.7	Differentielle Analyse von Sequenzierungsdaten mit Hilfe von R . . . . .	79
2.4.8	Programmstruktur zur Analyse von Ribo-Seq Daten in R . . . . .	84
2.4.9	Identifizierung translatierender RPFs . . . . .	87
2.4.10	Erstellung von Ribosomenprofilen . . . . .	92
2.4.11	Berechnung von ribosomalen Codonbesetzzeiten . . . . .	94
2.4.12	Globale Leserahmenanalyse translatierender Ribosomen . . . . .	96
2.4.13	Berechnung der Stopcodon Suppression . . . . .	98
2.4.14	Effizienz der Recodierung von UGA/Sec Codons . . . . .	99
2.4.15	Bestimmung der Dichte von RPFs an ausgewählten Codons . . . . .	99
3	ERGEBNISSE . . . . .	101
3.1	<i>in vitro</i> Bestimmung der Kinetik von rekombinantem TRIT1 . . . . .	101
3.1.1	Proteinherstellung und -aufreinigung . . . . .	102
3.1.2	Mutiertes Trit1 besitzt eine geringere spezifische Aktivität . . . . .	103
3.2	Trit1 Mausmodelle . . . . .	108
3.2.1	In der Keimbahn inaktiviertes <i>Trit1</i> ist embryonal letal . . . . .	108
3.2.2	Der Phänotyp ist organspezifisch unterschiedlich stark ausgeprägt. . . . .	109
3.3	Ribosomales Profiling . . . . .	112
3.3.1	Die optimale Verdauzeit für Lebergewebe beträgt 60 Minuten . . . . .	112
3.3.2	Die Größenverteilung von RPFs ist heterogen . . . . .	115
3.3.3	Der Abstand zur P-Stelle in cytoplasmatischen RPFs ist abhängig von der RPF Länge . . . . .	117
3.3.4	RPFs mit einer Länge von 31 Basen bestehen aus zwei Spezies . . . . .	119
3.4	Fehlende Isopentenylierung führt zu veränderter Expression im Cytoplasma und den Mitochondrien: ISR und UPR sind aktiviert. . . . .	122

3.4.1	Enzyme des Folat-Zyklus sind verstärkt exprimiert . . . . .	122
3.4.2	Differentielle Expression <i>Trit1</i> -defizienter Leberproben . . . . .	122
3.4.3	Differentielle Expression <i>Trit1</i> -defizienter Cortexprouben . . . . .	128
3.5	Fehlende Isopentenylierung beeinflusst die globale Translation . . . . .	131
3.5.1	Globaler Anstieg von Leserahmenverschiebungen . . . . .	131
3.5.2	<i>i</i> <sup>6</sup> A-abhängige Codons sind nicht direkt verantwortlich für Leserahmenverschiebungen . . . . .	134
3.5.3	Die Besetzzeit von UCN und AAR Codons ist beeinflusst . . . . .	135
3.5.4	PTCs sind vermehrt vorhanden . . . . .	137
3.5.5	Ribosomale Rettungsfaktoren und Terminationsfaktoren sind induziert . . . . .	138
3.5.6	Anzahl der Ribosomen im 3'-UTR Bereich ist erhöhet . . . . .	139
3.6	Selenoproteine sind nicht systemisch betroffen . . . . .	140
3.6.1	Die Recodierung des UGA/Sec Codons ist unterschiedlich stark moduliert . . . . .	142
3.6.2	Die Recodierung des UGA/Sec Codons beeinflusst nicht den Leserahmen . . . . .	143
3.7	Die mitochondriale Translation ist gestört. . . . .	144
3.7.1	Ribosomendichte nimmt auf mitochondrialen Transkripten Richtung 5'-Ende ab . . . . .	144
3.7.2	Ribosomen pausieren auf <i>i</i> <sup>6</sup> A- und <i>t</i> <sup>6</sup> A-abhängigen Codons in Mitochondrien . . . . .	144
3.7.3	Fehlgefaltete Proteine im Mitochondrium führen zur Induktion der UPR . . . . .	146
3.8	Die mitochondriale Homöostase ist gestört . . . . .	149
3.8.1	Die OXPHOS-Komplexaktivität ist reduziert . . . . .	149
3.9	Das ( <i>m</i> <sup>2</sup> ) <i>t</i> <sup>6</sup> A Level ist global vermindert . . . . .	151
4	DISKUSSION . . . . .	153
	ANHANG A . . . . .	167
A.1	Schmelzkurven der für die RT-PCR verwendeten Primer . . . . .	167
A.2	RPF Größenverteilung auf ISR Transkripten . . . . .	169
A.3	Selenoproteine Proteinexpression . . . . .	170
A.4	Codonbesetzzeiten mitochondrialer Codons . . . . .	171
	LITERATURVERZEICHNIS . . . . .	220





# Abbildungsverzeichnis

1	Schema des Spleißens . . . . .	4
2	Schema eines Ribosoms . . . . .	6
3	Ribosomale Translokation . . . . .	8
4	Signalkaskade der integrierten Stressantwort . . . . .	18
5	tRNA Struktur . . . . .	20
6	Die tRNA:Dimethylallyl-Isopentenyltransferasen katalysierte Reaktion . . . . .	25
7	Konservierte Regionen der Trit1 Sequenz und Homologen . . . . .	27
2.1	Trit1 Vektor zur Erzeugung transgener Mäuse . . . . .	40
2.2	Überprüfung der Rekombination von Trit1 . . . . .	41
2.3	Massenspektrometrie von $(ms^2)i^6A$ . . . . .	42
2.4	Schema des rekombinanten Trit1 . . . . .	52
2.5	Anzahl veröffentlichter Publikationen zu Ribosomalem Profiling . . . . .	57
2.6	Schema zur Analyse von Sequenzierungsdaten . . . . .	63
2.7	Berechnung der FDR . . . . .	82
2.8	Verteilung der p-Werte vor und nach Korrektur des Modells der Null Hypothese . . . . .	84
2.9	Schema Ribo-Seq Analyse . . . . .	86
2.10	Bestimmung des Abstands zur P-Seite . . . . .	90
2.11	Profil von Selenoprotein F . . . . .	94
2.12	Darstellung zum Leserahmen . . . . .	97
3.1	hTRIT1 WT Commassie Färbung . . . . .	102
3.2	hTRIT1 RQ Commassie Färbung . . . . .	103
3.3	Kinetik cytoplasmatischer ASL . . . . .	104
3.4	Kinetik mitochondrialer ASL . . . . .	105
3.5	Kinetik der mitochondrialen tRNA <sup>Cys</sup> -ASL . . . . .	106
3.6	Spezifische Aktivitäten von der TRIT1 WT und R323Q Proteine . . . . .	107
3.7	Aufnahmen von Embryonen mit <i>Trit1</i> -Deletion in der Keimbahn . . . . .	109
3.8	Körpergewicht und Hirngewicht von <i>Trit1</i> -deletierten Mäusen . . . . .	110
3.9	Aktivität von ALAT im Blutplasma . . . . .	111
3.10	Test der RNase I Verdauzeit um RPFs zu generieren . . . . .	113
3.11	Verdau der Proben für Ribo-Seq . . . . .	114
3.12	Größenverteilung cytoplasmatischer RPFs . . . . .	115
3.13	Größenverteilung mitochondrialer RPFs . . . . .	117

3.14	Berechnung des Abstands zur P-Stelle cytoplasmatischer RPFs . . . . .	118
3.15	Einfluss der RPF Länge auf den Abstand zur P-Stelle . . . . .	120
3.16	RT-PCR von Mitgliedern des Folatzyklus in der Leber . . . . .	123
3.17	RT-PCR von Mitgliedern des Folatzyklus im Cortex . . . . .	123
3.18	Differentielle Analyse der Expression von RNA-Seq Daten hepatozytenspezifischer <i>Trit1</i> -defizienter Mäuse . . . . .	125
3.19	Ribosomenprofil von <i>Atf4</i> . . . . .	126
3.20	Ribosomenprofile von Mitgliedern der ISR . . . . .	127
3.21	Differentielle Analyse der RPFs . . . . .	128
3.22	Expression von Neurofilamenten cortexspezifischer <i>Trit1</i> -defizienter Mäuse . . . . .	129
3.23	Transkriptlevel ISR- und UPR-abhängiger Transkripte in Cortexproben . . . . .	130
3.24	Globale Leserahmenverteilung translatierender Ribosomen . . . . .	131
3.25	Positionsspezifische Leserahmenverteilung der Ribosomen . . . . .	133
3.26	Leserahmenverteilung der Ribosomen bei Transkripten ohne UCN Codons . . . . .	134
3.27	Besetzzeiten von UCN und AAR Codons durch A-Stellen von <i>in-frame</i> Ribosomen im Cytoplasma . . . . .	135
3.28	Besetzzeiten von Stopcodons im Cytoplasma . . . . .	137
3.29	RT-PCR Analyse von Terminationspezies . . . . .	138
3.30	Analyse von Ribosomen im 3'-UTR Bereich im Cytoplasma . . . . .	139
3.31	Ribosomenprofile von Selenoproteinen . . . . .	141
3.32	Effizienz der UGA/Sec Recodierung . . . . .	142
3.33	Einfluss des UGA/Sec Codons auf den Leserahmen von RPFs . . . . .	143
3.34	Ribosomenprofil mitochondrialer Transkripte . . . . .	145
3.35	Ribosomendichte auf i <sup>6</sup> A- und t <sup>6</sup> A-abhängigen mitochondrialen Codons . . . . .	147
3.36	Expression mitochondrienspezifischer Proteine zur Stabilisierung der Proteinomöostase im Mitochondrium . . . . .	148
3.37	Ribosomenprofil von <i>Nupr1</i> und <i>Fgf21</i> . . . . .	149
3.38	OXPHOS Komplexaktivität . . . . .	150
3.39	Massenspektrometrische Bestimmung des (ms <sup>2</sup> )t <sup>6</sup> A-Levels von tRNAs . . . . .	151
A.1	Schmelzkurvenanalyse der verwendeten RT-PCR Primer . . . . .	168
A.2	Mittlere RPF Größe auf ISR Transkripten im Vergleich zur globalen mittleren Größe . . . . .	169
A.3	Western Blots verschiedener Selenoproteine . . . . .	170
A.4	Besetzzeit von UUR, GAR und CAR Codons durch A-Stellen mitochondrialer Ribosomen . . . . .	171

# Tabellenverzeichnis

2.1	Reagenzien . . . . .	34
2.2	Kommerzielle Reagenziensysteme . . . . .	35
2.3	Plasmide . . . . .	35
2.4	Geräte . . . . .	36
2.5	Utensilien . . . . .	37
2.6	Software und Datenbanken . . . . .	38
2.7	Trit1 PCR Programm . . . . .	43
2.8	Alb-Cre PCR Programm . . . . .	44
2.9	Camk-Cre PCR Programm . . . . .	45
2.10	Genotypisierung Primer . . . . .	45
2.11	RT-PCR Programm . . . . .	47
2.12	RT-PCR Primer . . . . .	48
2.13	Zur Aktivitätsmessung von TRIT1 verwendete Anticodonschleifen . . . . .	53
2.14	5 x Polysomenpuffer zum Ribosomalen Profiling . . . . .	58
2.15	Lysepuffer zum Ribosomalen Profiling . . . . .	59
2.16	Sucrosepuffer zum Ribosomalen Profiling . . . . .	59
2.17	15 % Polyacrylamid TBE-Urea Gel . . . . .	60
2.18	Ladungspuffer für RNA Oligonukleotide . . . . .	61
2.19	Tablebrowser Einstellungen zum Erhalt eines Maustranskriptoms . . . . .	64
3.1	Konzentration und Qualität der RPFs . . . . .	114
3.2	Zur Analyse verwendete Größen cytoplasmatischer RPFs . . . . .	116
3.3	Zur Analyse verwendete Größen mitochondrialer RPFs . . . . .	116
3.4	Größenspezifischer Abstand zur P-Stelle cytoplasmatischer RPFs . . . . .	119
A.1	Antikörper für Western-Blots . . . . .	170



# Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
aaRS	Aminoacyl-tRNA-Synthetasen
Abb.	Abbildung
Ala	Alanin
AS	Aminosäure
AS-AMP	Amino-Adenylat
ASL	Anticodon-Schleife
A-Stelle	Aminoacyl-Stelle
ATP	Adenosintriphosphat
C	Cytosin
CDS	codierende Sequenz
CHX	Cycloheximid
Cys	Cystein
cy-tRNA	cytosolische tRNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EJC	Exon-Junction-Komplex
ER	Endoplasmatisches Retikulum
E-Stelle	<i>Exit</i> -Stelle
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
f-Met	Formyl-Methionin
fw.	<i>forward</i>
G	Guanin
i <sup>6</sup> A	N <sup>6</sup> -Isopentenyladenosin
ISR	Integrierte Stressantwort

Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
Met	Methionin
mRNA	<i>messenger</i> RNA
ms <sup>2</sup> i <sup>6</sup> A	<i>N</i> <sup>6</sup> -Methylthio-Isopentenyladenosin
ms <sup>2</sup> t <sup>6</sup> A	<i>N</i> <sup>6</sup> -Methylthio-Threonylcarbamoyladenosin
mt-mRNA	mitochondriale mRNA
mt-rRNA	mitochondriale rRNA
mt-tRNA	mitochondriale tRNA
NGD	<i>no-go decay</i>
NMD	<i>non-sense mediated decay</i>
NSD	<i>non-stop mediated decay</i>
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Phe	Phenylalanin
P-Stelle	Peptidyltransferase-Stelle
PTC	<i>premature termination codon</i>
Ribo-Seq	Ribosomales Profiling
RNA	Ribonukleinsäure
RNA-Seq	RNA Sequenzierung
RPF(s)	<i>Ribosome Protected Fragment(s)</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	Quantitative Echtzeit-PCR
rv.	<i>reverse</i>
Sec	Selenocystein
Ser	Serin
t <sup>6</sup> A	<i>N</i> <sup>6</sup> -Threonylcarbamoyladenosin
T	Thymin

Tab.	Tabelle
tRNA <sup>Met<sub>i</sub></sup>	Initiator-tRNA Methionin
tRNA	transfer RNA
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
U	Uracil
UE	Untereinheit
uORF	untranslatierter offener Leserahmen
URE	<i>UGA Recoding Efficiency</i>
UTR	untranslatierte Region

In der vorliegenden Arbeit wird nachfolgende Nomenklatur von Genen und Proteinen verwendet: Kursiv geschriebene Gensymbole bezeichnen die Gene, während nicht kursiv geschriebene Gensymbole für Proteine verwendet werden. Des Weiteren werden menschliche Gene/Proteine groß (*TRIT1*/TRIT1) und Gene/Proteine anderer Spezies klein (*Trit1*/Trit1) geschrieben.





# Danksagung

AN ERSTER STELLE möchte ich meinen Dank an meinen Betreuer und Mentor Prof. Dr. Ulrich Schweizer aussprechen, der sich, viel mehr als ich vor Beginn erhofft hatte, mit mir und meinem Projekt beschäftigt hat. Er bot mir nicht nur eine Stelle mit einem sehr interessanten Projekt, sondern auch eine Betreuung, die weit über das erwartbare hinaus ging. Vielen Dank für die vielen Stunden (Wochen, Monate, Jahre) mit Diskussionen, Denkanstößen, Problemlösungen, des Austauschs, der Motivation und vor allem der Möglichkeiten zur Weiterentwicklung. So war es ihm immer wichtig, dass ich, neben der fachlichen Weiterbildung, auch über den Tellerrand schaue und an Aufgaben wachsen konnte, an denen ich (hoffentlich!) auch menschlich gewachsen bin. Vielen Dank für die durchgehend überragende Unterstützung.

Weiterhin möchte ich mich natürlich auch bei meinem Zweitbetreuer Prof. Dr. Volker Knoop bedanken. Nicht nur dafür, dass er mir eine Promotion an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät ermöglicht hat, sondern vor allem auch für sein fachliches Engagement, welches das geforderte weit übertraf.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Walter Witke und Prof. Dr. Pavel Kroupa für die Begleitung als Dritt- und Viertgutachter und vor allem für die schnellen und unkomplizierten Zusagen.

Bei Dr. Noelia Fradejas Villar kann ich mich gar nicht ausschweifend genug bedanken. Ohne ihre Unterstützung gäbe es diese Arbeit nicht in dieser Form. Sie hat mich von Anfang an bei diesem Projekt begleitet und stand mir immer und zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite - auch wenn keine Zeit vorhanden war. Sie hat während unserer Zusammenarbeit schon so viele Kohlen aus dem Feuer geholt, dass es sehr schwer wird, sich im gleichen Maße revanchieren zu können. Ich hoffe, dass ich ihr ihre Geduld und ihren Einsatz bei weiteren Projekten auch nur annähernd zurück geben kann.

Eine weitere große Stütze war Dr. Doreen Braun, die mir vor allem im Bereich der Lehre und über die akademischen Welt sehr viel beigebracht hat. Es war immer eine Freude von ihr zu lernen und sich auf ihre Erfahrung und ihr Feedback verlassen zu können.

Uschi Reuter müsste eigentlich schon viel früher genannt werden. In einer funktionierenden Arbeitsgruppe müssen viele kleine Zahnräder permanent gepflegt, geölt und angetrieben werden, damit diese richtig ineinander greifen können. Viel zu selten gibt es dafür ein Dan-

keschön, weil es Normalität wird, wenn es dauerhaft gut läuft. Deshalb: vielen Dank Uschi! Nicht nur für deine riesige Unterstützung bei den Versuchen und allem anderen, sondern auch dafür, dass du das Labor täglich am Laufen hältst.

Ohne „Leidensgenossen“ wäre die Zeit als Doktorand wahrscheinlich um einiges schwieriger. Man kann sich umso glücklicher schätzen, wenn man Mitstreiter wie Dorothea Bayer-Kusch, Alfonso Ruben Rodriguez Ruiz, Wenchao Zhao, Angelika Krupa, Henrik Schmidt, Hannah Marko, Tobias Lindenberg und Simone Arndt hat. Im Besonderen möchte ich Alfonso und Zhao für unsere gemeinsame Zeit und die unzähligen spannenden und lustigen Diskussionen in der Mensa danken. Zhao war darüber hinaus eine große Entlastung und Hilfe für mich, wofür ich mich nicht genug bedanken kann. Doro gebührt ebenfalls ein großer Dank dafür, dass sie mich am Anfang und am Ende an die Hand genommen hat und trotz häufiger Nachfrage nie die Geduld verloren hat. In Tobi habe ich direkt bei meiner Ankunft einen neuen Freund gefunden.

Ich möchte mich noch bei unseren Kollaborationspartnern bedanken. Im speziellen bei Dr. Michael T. Howard in Salt Lake City, der mir die Methode des Ribosomalen Profiling beigebracht hat und bei der Interpretation und Analyse der Daten nie um einen Vorschlag verlegen war.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Freunden, meiner Familie und meiner Freundin Isabell bedanken, ohne deren Unterstützung ich niemals bis hierhin gekommen wäre.

*The scientist is not a person who gives the right answers,*

*he's one who asks the right questions.*

Claude Lévi-Strauss

# 0

## Einleitung

TRANSFER RIBONUKLEINSÄUREN (tRNA) sind zentrale Komponenten der Proteinbiosynthese, die Aminosäuren (AS) zu den Ribosomen transportieren. Durch Basenpaarung zwischen einem Codon auf der *messenger* RNA (mRNA) und dem Anticodon der korrespondierenden tRNA ermöglichen diese Moleküle den spezifischen Einbau von AS in Peptidketten während der Translation. Zum Start der Translation bindet die Initiator-tRNA in die

Peptidyl-tRNA-Stelle (P-Stelle) des Ribosoms, während tRNAs zur Elongation mit dem Ribosom über die Aminoacyl-tRNA-Stelle (A-Stelle) interagieren (Ramakrishnan, 2002).

#### 0.1 DAS ZENTRALE DOGMA DER MOLEKULARBIOLOGIE

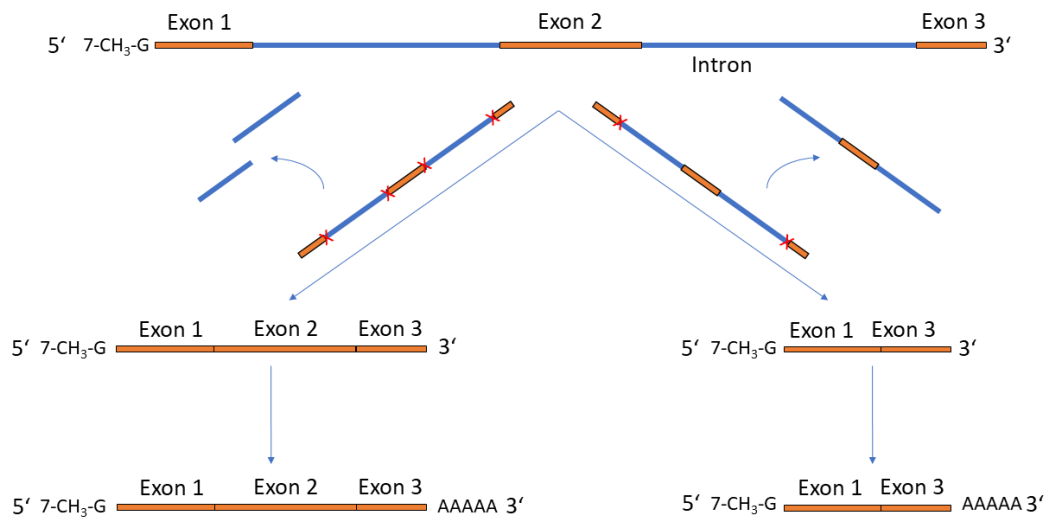
Das seit fast 50 Jahren postulierte zentrale Dogma der Molekularbiologie ist noch immer nicht in allen Details aufgeklärt (Crick, 1970). Aus Desoxyribonukleinsäure (DNA) wird im Zellkern mRNA transkribiert. Diese wird in das Cytoplasma transportiert, um in Proteine translatiert zu werden. Ziel ist es, durch ein stetiges Gleichgewicht zwischen Bildung und Degradierung die benötigte Menge jedes Proteins bereitzustellen, um die optimale Funktion in der Zelle zu gewährleisten (Dekel and Alon, 2005; Scott et al., 2010; Li et al., 2014). Das zentrale Dogma wurde über die Jahre aufgeweicht und gilt heute nicht mehr in dieser unidirektionalen Urform (Koonin, 2012). Mitte der 1980er Jahre wurde z.B. durch die Entdeckung der reversen Transkription in eukaryotischen Zellen die Richtung der Informationsweitergabe von RNA zu DNA gezeigt (Temin, 1985). Moderne Methoden erlaubten die Identifizierung von weiteren, kleinen Molekülen, welche maßgeblich an der Steuerung der Genexpression beteiligt sind (Schneider-Poetsch and Yoshida, 2018).

#### 0.2 TRANSKRIPTION

Das Ziel der Transkription ist es, die in der DNA gespeicherte Information in RNA zu übersetzen. Transkriptionsfaktoren üben hierbei kontrollierenden Einfluss auf die Transkription aus. Es wird zwischen zwei Gruppen von RNAs unterschieden. Codierende mRNA enthält

die Information zur Bildung von Proteinen und wird aus dem Zellkern portiert, um später in ein Protein translatiert zu werden (Neric and Percipalle, 2018). Nicht-codierende RNAs, wie z.B. tRNA oder ribosomale RNA (rRNA), sind eine große und heterogene Gruppe von RNA-Molekülen mit unterschiedlichen Aufgaben in der Zelle. Unter anderem wird die Regulation von Transkription und Translation beeinflusst (Cech and Steitz, 2014).

Die Bildung der mRNA erfolgt mit Hilfe der RNA-Polymerase, die doppelsträngige DNA als Matrize zur Synthese einzelsträngiger prä-mRNA nutzt. Anders als in DNA findet man in RNA die Base Uracil (U) anstelle von Thymin (T). U ist energetisch gesehen weniger kostspielig als T. U kann jedoch durch Desaminierung von Cytosin (C) entstehen. In der langlebigen DNA würde dies zu einer erhöhten Mutationsrate führen. Deshalb wird T verwendet, das durch die zusätzliche Methylgruppe Mutationen detektierbar macht und somit Reparaturen erlaubt. Adenin (A), Guanin (G) und C bleiben bestehen. Die prä-mRNA wird cotranskriptionell modifiziert. Am 5'-Ende wird sie mit einem modifizierten Guanin über eine 5'-5'-Phosphodiesterbindung verbunden (m<sup>7</sup>G-Cap) (Abb. 1). Am 3'-Ende katalysiert das Enzym Poly(A)-Polymerase das Anheften eines Poly(A)-Schwanzes. Beide Strukturen sind wichtig für die Stabilität der mRNA, da sie einen Abbau durch Exonukleasen verhindern. Die Länge des Poly(A)-Schwanzes bestimmt dabei über die Halbwertszeit der mRNA. Die m<sup>7</sup>G-Cap wird zum Transport aus dem Zellkern benötigt und vermeidet ein 5'-Triphosphat wie in prokaryotischen mRNAs, welches vom angeborenen Immunsystem erkannt wird. Weitergehend finden beide Strukturen Verwendung bei der Initiation der Trans-



**Abbildung 1: Schema des Spleißens.** Die am 5'-Ende mit einer  $m^7G$  Cap modifizierten und am 3'-Ende polyadenylierten prä-mRNA wird durch das Spleißosom prozessiert (rote Kreuze). Durch alternatives Spleißen besteht die Möglichkeit der Produktion verschiedener Isoformen durch Entfernung unterschiedlicher Introns (orange). Übrig gebliebene Exons (blau) beinhalten die Information über die Aminosäureabfolge des späteren Proteins.

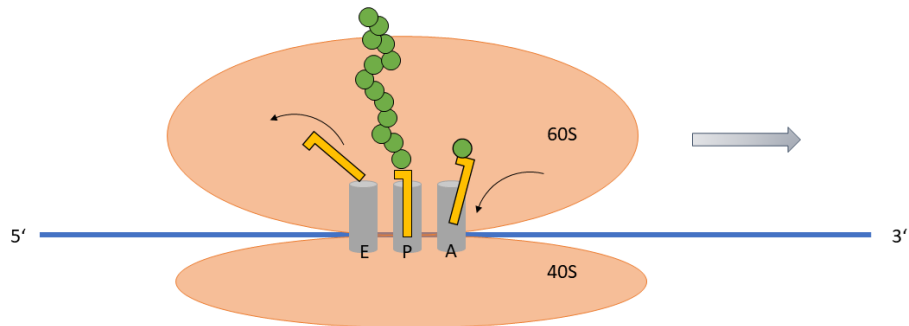
lation. Die prä-mRNA zeichnet sich in der Regel durch nicht codierende Bereiche (Introns) innerhalb der codierenden Bereiche (Exons) aus. Intronbereiche werden auf der DNA z.B. zur Regulation der Transkription benötigt.

Die prozessierte mRNA wird in Eukaryoten anschließend aus dem Zellkern ins Cytoplasma transportiert, um translatiert zu werden. Eine mRNA enthält eine codierende Sequenz (CDS), sowie Bereiche 5' und 3' der CDS, welche regulatorische Funktionen ausüben und nicht translatiert werden (*untranslated regions*, UTR). Die codierende Sequenz zeichnet sich dadurch aus, dass sie mit dem Startcodon AUG startet und durch eines der drei Stopcodons UGA, UAA oder UAG terminiert wird. Vom Startcodon beginnend bilden jeweils drei Basen ein Codon. Das Ribosom bewegt sich während der Translation in dieser Triplet Periodizität

bis zum Stopcodon über die mRNA. Neben der codierenden Sequenz können auch noch weitere Bereiche auf einer mRNA vorhanden sein, die der Definition einer codierenden Sequenz entsprechen, jedoch kein Protein codieren (*untranslated open reading frame*, uORF). Die uORFs können regulatorische Funktionen während der Translation übernehmen.

### 0.3 TRANSLATION

Ribosomen bestehen aus zwei Untereinheiten (UE), der großen 60S UE in Eukaryoten (50S in Prokaryoten) und der kleinen 40S UE (30S in Prokaryoten), welche unterschiedliche Funktionen ausüben (Abb. 2). Die Benennung der UE erfolgt historisch bedingt über die Sedi-mentationskoeffizienten in der Ultrazentrifuge, welche von der Masse der UE abhängen. Das aktive Zentrum der Peptidyltransferase befindet sich in der großen UE, während die kleine UE die Codon:Anticodon Interaktion vermittelt und an die mRNA bindet (Green and Noller, 1997). Die Codon:Anticodon Interaktion ist essentiell für eine korrekte Translation. Das Zusammenspiel verschiedener Bindungsenergien ermöglicht Einfluss auf die Elongationsgeschwindigkeit zu nehmen (Grosjean and Westhof, 2016; Zhao et al., 2017). Interessanterweise üben Teile der rRNA die katalytische Funktion des Peptidyltransfers aus (Moore and Steitz, 2011). Die Struktur der rRNA legt nahe, dass diese universell konserviert ist (Ben-Shem et al., 2010, 2011; Klinge et al., 2011). Beide UE haben drei Positionen, welche Bindungsstellen für tRNAs bieten: die A-Stelle (Aminoacyl-Stelle), die P-Stelle (Peptidyltransferase-Stelle) und die E-Stelle (*Exit*-Stelle), aus welcher deacetylierte tRNAs aus dem Ribosom entfernt werden (Abb. 2). Die Translation wird in drei Schritte eingeteilt: Initiation, Elon-



**Abbildung 2: Schema eines Ribosoms.** Das Ribosom besteht aus einer großen und kleinen Untereinheit (60S bzw. 40S in Eukaryoten) und liest die mRNA (blau) von 5' nach 3'. Aminosäuren (grün) werden von tRNAs (gelb) zur A-Stelle gebracht. Nach erfolgtem Peptidyltransfer von der P- zur A-Stelle verlässt die tRNA das Ribosom über die E-Stelle.

gation und Termination, wobei jeder Schritt selbst aus komplexen Unterprozessen besteht (Ramakrishnan, 2002).

### 0.3.1 INITIATION

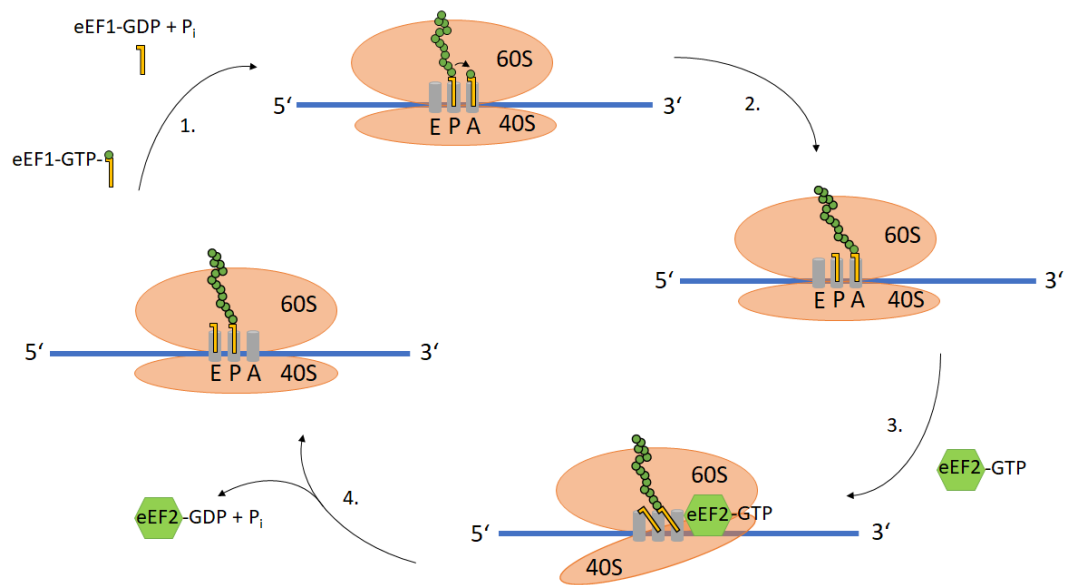
Die Initiation besteht aus acht verschiedenen Phasen und benötigt bei Eukaryoten mindestens neun verschiedene eukaryotische Initiationsfaktoren (eIF1-5 mit Untereinheiten) (Jackson et al., 2010). Als Initiation wird der Vorgang der Basenpaarung der Initiator-tRNA Methionin ( $\text{Met-tRNA}^{\text{Met}_i}$ ) mit dem Startcodon in der 80S P-Stelle des Ribosoms bezeichnet. In der A-Stelle des Ribosoms wird durch weitere Initiationsfaktoren besetzt. Die Initiation wird durch die Bildung des 43S-Präinitiationskomplexes eingeleitet. Der 43S-Präinitiations-



komplex besteht u.a. aus der kleinen 40S-UE und einem Dreifachkomplex aus eIF2, an eIF2 gebundenem GTP sowie der Met-tRNA<sup>Met</sup><sub>i</sub>. Der 43S-Präinitiationskomplex bindet in einem ersten Schritt an die m<sup>7</sup>G-Cap Struktur der mRNA, welche durch weitere Faktoren entspannt wird. Das ermöglicht dem 43S-Präinitiationskomplex die mRNA in Richtung Startcodon entlang zu gleiten (Pestova et al., 2001). Sobald das Startcodon erkannt wird, wird das an eIF2 gebundene Guanosintriphosphat (GTP) hydrolysiert. In Prokaryoten dient dieser Erkennung die Shine-Dalgarno Sequenz auf der mRNA, die komplementär zur 16S rRNA ist und sich in der Nähe des Startcodons befindet (Shine and Dalgarno, 1974). Die Konsensussequenz in Eukaryoten wird Kozak-Sequenz genannt, die Einfluss auf die Initiations-effizienz nimmt (Kozak, 1984, 1987). Die GTP-Hydrolyse führt zur Ablösung aller weiteren Initiationsfaktoren des 43S-Präinitiationskomplexes und der mRNA, was das Signal der Anlagerung der großen 60S UE gibt. Mit der Anlagerung der großen 60S UE entsteht das translationsbereite Ribosom. In diesem Ribosom ist die P-Stelle mit der tRNA<sup>Met</sup><sub>i</sub> besetzt. Das zweite Codon der codierenden Sequenz befindet sich in der leeren A-Stelle, wo auf die Bindung der passenden Aminoacyl-tRNA gewartet wird.

### 0.3.2 ELONGATION

Im ersten Schritt der Elongation bindet der Elongationsfaktor eEF1A GTP-abhängig an eine mit einer AS beladene tRNA (aminoacylierte tRNA), um diese zur A-Seite des Ribosoms zu leiten (Dever and Green, 2012). Die Aminoacylierung von tRNAs wird in Kapitel 0.9 detailliert erklärt. Ist das Anticodon der tRNA passend zum Codon in der A-Stelle, wird GTP



**Abbildung 3: Elongationszyklus.** Eine aminoacylierte tRNA lagert sich in der freien A-Stelle an, während die leere tRNA in der E-Stelle das Ribosom mit Hilfe von eEF1-GTP verlässt (1.). Der Peptidyltransfer findet statt, indem die AS-Kette der P-Stelle auf die AS in der A-Stelle übertragen wird (2.). Spontane Translokation in 60S UE mit A/P und P/E Hybridzuständen wird durch Bindung von eEF2-GTP stabilisiert (3.). Die komplette Translokation erfolgt durch Hydrolyse von eEF2-GTP und der einhergehenden Konformationsänderung (4.). Der gesamte Ribosomkomplex ist nun ein Codon weiter gewandert, wobei sich die leere A-Stelle nun auf dem folgenden Codon befindet. Adaptiert von Frank et al. (2007).

durch eEF1A hydrolysiert, was zur Entfernung des Faktors führt und der tRNA erlaubt sich der A-Stelle anzupassen und zu binden (Abb. 3). Die Übertragung der AS auf die wachsende Peptidkette wird durch das Peptidyltransferasezentrum der großen UE katalysiert, wobei die Peptidbindung schnell und ohne Energieeinsatz entsteht und das Peptid von der P- auf die A-Stelle übertragen wird (Pape et al., 1998; Schmeing et al., 2002).

Die anschließende Translokation des Ribosoms wird in Prä- und Posttranslokation eingeteilt (Moazed and Noller, 1989). An erster Stelle steht die spontane Bildung von A/P und P/E Hybridzuständen, bei denen die Anticodonschleifen in der A- bzw. P-Stelle der kleinen UE verbleiben, während die Akzeptorarme in die P- bzw. E-Stelle der großen UE wandern

(Wasserman et al., 2016). Anschließend bindet die GTPase eEF2 im Komplex mit GTP an das im Hybridzustand befindliche Ribosom (Dorner et al., 2006). Einerseits führt dies zu einer Stabilisierung des Hybridzustands, andererseits wird GTP schnell hydrolysiert und  $P_i$  sowie eEF2 entfernt. Dies führt zu einer Änderung der Konformation des Ribosoms und ermöglicht der mRNA sowie den Anticodonschleifen in die P- bzw. E-Stelle der kleinen UE zu wandern (Joseph, 2003). eEF2 verhindert während des geöffneten Zustands des Ribosoms ein Zurückschnellen der tRNAs in den Ausgangszustand (Gao et al., 2009).

Das Ribosom geht nun in die Phase der Posttranslokation über. Hier liegt die deacetylierte tRNA in der E-Stelle und die Peptidyl-tRNA in der P-Stelle beider ribosomalen UE vor. Die A-Stelle beinhaltet das noch unbesetzte folgende Codon. Die Freisetzung der tRNA in der E-Stelle scheint von zuvor durchgeführten Menge an Translokationen des Ribosoms abzuhängen. Je häufiger elongiert wurde, desto spontaner und unabhängiger wird die tRNA aus der E-Stelle freigesetzt (Chen et al., 2011). Die Schritte der Elongation werden wiederholt durchgeführt bis das Ribosom eines der drei Stopcodons UGA, UAA oder UAG erreicht, die Translation terminiert und das Protein freisetzt (Dever and Green, 2012).

### 0.3.3 TERMINATION

Bei der Termination in Eukaryoten sind die zwei Faktoren eRF1 und eRF3 (*eukaryotic releasing factor 1* (ETF1) und 3) beteiligt, welche das Ribosom trennen und das Protein aus dem Ribosomenkomplex lösen (Frolova et al., 1996; Kisselev et al., 2003; Dever and Green, 2012). Die Termination läuft gekoppelt mit dem Recycling der Ribosomen ab (Shoemaker

and Green, 2011). Der Faktor eRF1 besitzt die Form einer tRNA und decodiert alle drei Stop-codons. Die Bindung von eRF1 in der A-Stelle induziert die Hydrolyse der Esterbindung der Peptidyl-tRNA im Peptidyl-Transferasezentrum der P-Stelle (Song et al., 2000). Die Hydrolyse geschieht in Zusammenarbeit mit der GTPase eRF3, die nach der Reaktion dissoziiert. (Zhouravleva et al., 1995; Alkalaeva et al., 2006). Im Postterminationskomplex befindet sich die deacylierte tRNA in der P-Stelle, während eRF1 in der A-Stelle verbleibt. Das Recycling des Postterminationskomplexes ist in Prokaryoten detaillierter aufgelöst als in Eukaryoten (Graf et al., 2018). Die ATPase ABCE1 (*ATP-binding cassette sub-family E member 1*) katalysiert die Dissoziation der 60S und der 40S ribosomalen UE, sowie von eRF1 im Postterminationskomplex. Die 40S UE ist weiterhin an tRNA und mRNA gebunden (Pisarev et al., 2007). Der eukaryotische Initiationsfaktor eIF3 fördert die Dissoziation. Durch eIF1 wird die deacylierte tRNA aus der P-Stelle gelöst. Die eIF3 Untereinheit eIF3j löst anschließend die mRNA von der 40S ribosomalen UE, womit die beiden ribosomalen UE wieder für die erneute Initiation bereit stehen (Pisarev et al., 2007).

#### 0.3.4 BILDUNGSRATE VON PROTEINEN

Die Menge eines Proteins hängt von verschiedenen Faktoren ab und kann über unterschiedliche Mechanismen kontrolliert werden. So kann die Proteinmenge auf transkriptioneller Ebene über die Menge an mRNA Molekülen reguliert werden. Auf translationaler Ebene ist die Regulation über die Menge an Ribosomen pro mRNA Molekül, sowie über die Menge an bereitgestellter tRNA möglich. Verdünnung und Abbau der RNA und der Proteine führt

zu einem komplexen und hochdynamischen Netzwerk aus verschiedenen Bildungs- und Abbauraten, welche sich am Ende auf die Proteinmenge auswirken (Hausser et al., 2019).

#### 0.4 QUALITÄTSKONTROLLE DER TRANSLATION

Während der Translation besteht eine Fehleranfälligkeit, welche kontrolliert werden muss (Atkinson et al., 2008; Shoemaker and Green, 2012; Graille and Séraphin, 2012; Hershey et al., 2012). Auf mRNA Ebene wurden mehrere Kontrollmechanismen beschrieben. Unter anderem *no-go decay* (NGD), *non-sense mediated decay* (NMD) und *non-stop mediated decay* (NSD) (Doma and Parker, 2006; Hug et al., 2016; van Hoof et al., 2002). Eine zentrale Rolle spielt hierbei ein Komplex aus PELO (*Pelota mRNA surveillance and ribosome rescue factor*), HBS1L (*HBS1 like translational GTPase*) und ABCE1, welcher zur Dissoziation der ribosomalen UE führt (Pisareva et al., 2011). In Eukaryoten wurde eine weitere GTPase namens GTPBP2 (GTP Bindungsprotein 2) identifiziert, die mit PELO Co-immunopräzipitiert (Ishimura et al., 2014).

##### 0.4.1 NON-STOP MEDIATED DECAY

NSD degradiert mRNAs ohne Stopcodons und erkennt diese über die während der Translation des Poly(A)-Schwanzes in diesem Bereich stehen gebliebenen Ribosomen (Frischmeyer et al., 2002; Ito-Harashima et al., 2007). Die Degradation der mRNA erfolgt über einen Exosomenkomplex (Anderson and Parker, 1998; Mitchell et al., 1997; Chlebowski et al., 2013). Der Exosomenkomplex wird durch den sogenannten SKI-Komplex zur mRNA geführt, um

diese von 3' nach 5' zu verdauen. Beide Komplexe sind in Hefen durch das Protein Ski7 (*Superkiller Protein 7*) verbunden. In Menschen wurde kürzlich eine kleinere Isoform von HBS1L entdeckt, die diese Funktion übernimmt (Kalisiak et al., 2017). Die E3 Ubiquitin-Ligase Listerin als Teil eines ribosomalen Qualitätskontrollen-Komplexes ubiquitinyliert dabei die Peptidyl-tRNA in der 60S ribosomalen UE (Bengtson and Joazeiro, 2010). Die AAA-ATPase CDCS48 extrahiert anschließend die ubiquitinylierte Peptidyl-tRNA aus der 60S UE und führt diese zum Proteasom, wo das Peptid degradiert wird (Brandman et al., 2012; Defenouillère et al., 2013). Dies führt neben reduzierten mRNA Leveln auch zu einer reduzierten Proteinmenge (Wilson et al., 2007).

#### 0.4.2 *NO-GO DECAY*

NGD zielt auf die mRNAs ab, auf welchen Ribosomen z.B. durch stabile Schleifen, *in-frame* Poly(A)-Bereiche (mind. 18) oder beschädigten Basen in der A-Stelle aufgehalten werden und nicht wie vorgesehen translatieren können (Doma and Parker, 2006). Anders als beim NSD bindet ein Komplex, bestehend aus PELO (ein Ortholog von Dom34 in Hefe) und HBS1L, in die unbesetzte A-Stelle des Ribosoms (Becker et al., 2011). PELO imitiert hierbei eRF1 und HBS1L dementsprechend eRF3 (Inagaki et al., 2003; Alkalaeva et al., 2006). Der Verdau der freigesetzten mRNA findet anschließend durch eine Endonuklease statt (Lebreton et al., 2008; Doma and Parker, 2006). Interessanterweise wurde eine Beteiligung dieses Komplexes auch bei Ribosomen des NSD gefunden, welche am 3' Ende der mRNA aufgelaufen sind (Tsuboi et al., 2012).

#### 0.4.3 *NON-SENSE MEDIATED DECAY*

NMD ist ein vielschichtiger Prozess, der einerseits der Eliminierung von mRNAs mit vorzeitigen Stopcodons (PTC, *premature termination codons*) und andererseits der Regulation von zellulären RNAs dient (Baker and Parker, 2004; Kervestin and Jacobson, 2012; He and Jacobson, 2015; Hug et al., 2016; Kurosaki et al., 2019). Eine negative Rückkopplung übt hierbei einen Einfluss auf den NMD aus (Huang et al., 2011). Weitergehend wird eine Autoregulation des NMD angenommen, da die meisten Transkripte, die am NMD beteiligt sind, selbst auch NMD-sensitiv sind. Die NMD Sensitivität korreliert mit der Länge der 3'UTR und dem Vorhandensein von uORF (Yepiskoposyan et al., 2011). Bei der Eliminierung von mRNA mit PTC in Säugetieren ist der NMD Mechanismus eng mit dem Spleißen von prä-mRNAs verbunden. Hierbei werden mRNAs mit PTC abgebaut, welche 50 - 55 Nukleotide entfernt vom 5'-Ende des finalen Exon-Junction-Komplexes (EJC) liegen (Zhang et al., 1998; Thermann et al., 1998). EJC werden zur Bildung von mRNA aus prä-mRNA benötigt und bleiben nach dem Spleißen auf der mRNA sitzen, bis ein Ribosom die Komplexe mit Hilfe von PYM1 (*PYM homolog 1, Exon Junction Complex associated factor*) entfernt (Le Hir et al., 2001; Le Hir and Séraphin, 2008; Gehring et al., 2009).

Pausiert das translatierende Ribosom auf einem PTC, da aufgrund der Umgebung nicht effektiv terminiert werden kann, lagert sich UPF1 (*UPF1 RNA helicase and ATPase*) mit der assoziierten Kinase SMG1 (*SMG1 nonsense mediated mRNA decay associated PI3K related kinase*) an die schon an das Ribosom gebundenen Terminationsfaktoren an und bil-

det den SURF Komplex (*surveillance complex*). UPF2 (*UPF2 regulator of nonsense mediated mRNA decay*) und UPF3b (*UPF3A regulator of nonsense mediated mRNA decay*) lagern sich an den auf das PTC folgende EJC an. Die Bindung mit dem SURF Komplex führt dann zu einer Phosphorylierung von UPF1, was die Dissoziation der Terminationsfaktoren eERF1 und eERF3 zur Folge hat (Kashima et al., 2006). Die damit folgende Konformationsänderung führt zur Aktivierung der Helicaseaktivität von UPF1, die Sekundärstrukturen und auf der mRNA sitzende Proteine in Richtung des EJC entfernt. Der Verdau der mRNA wird somit ermöglicht (Chakrabarti et al., 2011; Schoenberg and Maquat, 2012).

#### 0.5 BILDUNG DER PROTEINSTRUKTUR

Da Proteine eine komplexe Sekundär- und Tertiärstruktur besitzen, welche essentiell für die korrekte Funktion ist, muss schon während der Translation sichergestellt werden, dass sich das Protein fehlerfrei faltet (Dobson, 2003; Zhang and Ignatova, 2011). Hierfür wird ein komplexes Netzwerk aus Chaperonen bereitgestellt, welche cotranslational an die wachsende Polypeptidkette binden (*de-novo* Faltung) und dabei helfen, die dreidimensionale Struktur auszubilden (Hartl, 1996; Hartl et al., 2011; Kim et al., 2013). Die Translationsgeschwindigkeit übt einen großen Einfluss auf die Ausbildung der Strukturen aus (Zhang et al., 2009; Siller et al., 2010; Cabrita et al., 2010; Nedialkova and Leidel, 2015). Fehlgefaltete Proteine aggregieren innerhalb des Cytoplasmas aufgrund hydrophober Kräfte (Eichner et al., 2011). Die *de-novo* Faltung ist ein Adenosintriphosphat (ATP) abhängiger Mechanismus, bei dem sich die Chaperone der 70 Kilodalton (kDa) HSP70 (*Heat shock protein 70*) Familie (z.B.



HSPA8) an hydrophobe Regionen der wachsenden Polypeptidkette anlagern. Ebenfalls werden Mitglieder dieser Familie bei Stress induziert, um toxische Proteinaggregation zu verhindern (Auluck et al., 2002; Hartl et al., 2011).

## 0.6 SELENOPROTEINE

Selenoproteine sind eine kleine Gruppe von Proteinen (in der Maus 24, im Menschen 25), die meist einmalig die 21. proteinogene Aminosäure Selenocystein (Sec) tragen (Labunskyy et al., 2014). Der Sec Einbau erfolgt über einen speziellen Mechanismus an internen UGA Codons. Sec wird von der tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> transportiert, welche ein zum UGA passendes Anticodon besitzt (Lee et al., 1989). Im 3'-UTR Bereich von Selenoprotein mRNAs in Eukaryoten findet sich bei allen Selenoproteinen eine regulatorische Struktur, das SECIS-Element (*selenocysteine insertion sequence*) (Low and Berry, 1996). Mit Hilfe dieser *cis*-wirkenden Struktur und den *trans*-wirkenden Faktoren SECISBP2 (*Secis binding protein 2*) und eEFSec (*eukaryotic elongation factor, selenocysteine-tRNA specific*), können UGA Codons von Stopcodons zu Sec Codons recodiert werden (Copeland et al., 2000; Tujebajeva et al., 2000). Es wurde gezeigt, dass Änderungen dieser speziellen Translationsmaschinerie zu Reduktion der Recodierung von UGA Codons führt, mit einer einhergehenden Reduktion des mRNA- und Protein-Spiegels (Fradejas et al., 2013; Fradejas-Villar et al., 2017).

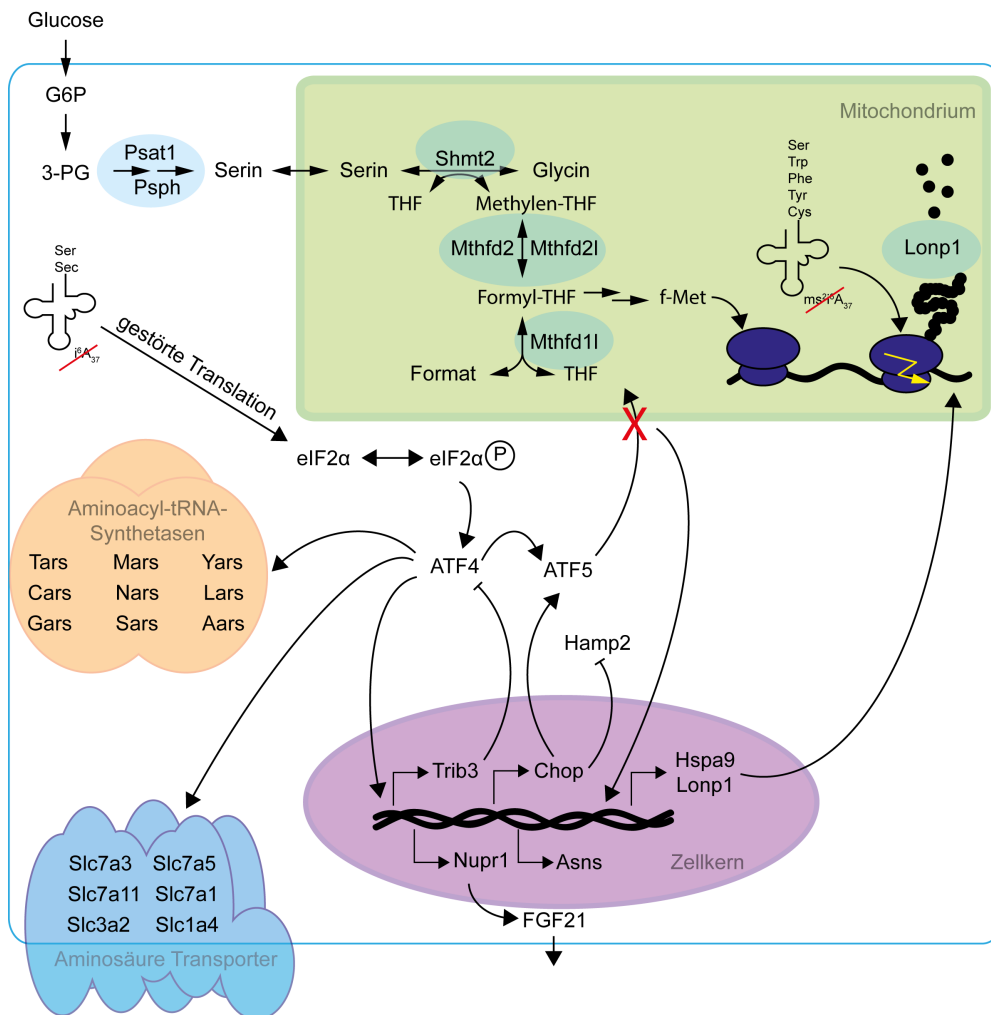
## 0.7 REGULATORISCHE EINFLÜSSE AUF DIE GENEXPRESSION

Die Qualität reifer Proteine untersteht ebenfalls einer Kontrolle (Creppe et al., 2015). Fehlfaltete Proteine führen zu Stresssignalen am endoplasmatischen Retikulum (ER), die eine Kaskade verschiedener Mechanismen auslösen (u.a. Autophagie), um die normale Zellfunktion wieder herzustellen. Dieses ER-Stresssignal kann über verschiedene integrale ER Proteine ausgelöst werden. Diese sind unter anderem Atf6 (*activating transcription factor 6*), Ire1 $\alpha$  (*Inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$* ) und Perk (*double-stranded RNA-dependent protein kinase-like ER kinase*) (Wang and Kaufman, 2014). So führt z.B. die Perk-induzierte Kaskade zu einer Phosphorylierung des Initiationsfaktors eIF2 $\alpha$ , welches wiederum zu einer Aktivierung von Atf4 führt (Kouroku et al., 2007). Diese Aktivierung steht unter der Kontrolle der Translation durch eIF2 $\alpha$  und dem Vorkommen von uORF in Atf4 (Andreev et al., 2015). Atf4 besitzt zwei uORFs, die vor der eigentlichen codierenden Sequenz liegen. Das erste uORF dient als positiver Regulator, der dazu führt, dass durchlaufende Ribosomen bei der nächsten codierenden Sequenz, dem zweiten uORF, reinitiiieren und elongieren. Das zweite uORF überlappt hierbei in einem anderen Leserahmen mit dem Startcodon, was zum Überlesen des Startcodons der CDS führt. Bei geringerem eIF2-GTP Level findet die Reinitiation nicht schnell genug statt, weshalb die Ribosomen dann vermehrt am Startcodon der CDS die Translation initiieren (Vattem and Wek, 2004). Weitere, durch uORF regulierte Transkripte wie Ddit3 (Chop, *DNA damage inducible transcript 3*) werden ebenfalls verstärkt exprimiert (Palam et al., 2011; Harding et al., 2000).

Eine weitere Kontrolle der Funktionalität von Proteinen ist die integrierte Stressantwort (ISR, *integrated stress response*), welche ebenfalls zu einer Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  führt (Abb. 4). Die Folge ist eine globale Hemmung der Translation, was unter anderem vor oxidativem Stress schützt (Harding et al., 2003; Pakos-Zebrucka et al., 2016). Verschiedene Stresssignale (Mangel an Aminosäuren, Virusinfektionen, Hämverlust und ER Stress) führen hierbei zur Aktivierung der ISR Regulatoren. Die verminderte Translation erlaubt der Zelle fehlgefaltete Proteine abzubauen und so die Zellintegrität wieder herzustellen.

Die Regulation des ISR erfolgt über genspezifische Reinitiation der Ribosomen an codierenden Sequenzen regulatorischer Transkripte. Hierbei regulieren vor allem PPP1R15A (*Protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A*, auch als GADD34 bekannt) und PPP1R15B (*Protein phosphatase 1 regulatory subunit 15B*, auch als CReP bekannt) die Dephosphorylierung von eIF2 $\alpha$  und die damit einhergehende Wiederherstellung der Translation (Lee et al., 2009; Young et al., 2015).

Eine Antwort auf den Mangel einer AS in Prokaryoten ist z.B. die Attenuation, die die Expression von des an der Biosynthese der AS beteiligten Operons reguliert. In *E. coli* wurde dieser Mechanismus für das Tryptophan-Operon erstmalig beschrieben (Yanofsky, 1981). Hier führt Tryptophan-Defizienz zu einer längeren Aufenthaltszeit von Ribosomen im Attenuatorbereich des Tryptophan-Operons, da dort verstärkt Tryptophan-Codons lokalisiert sind. Aufgrund der Ribosomen kann keine mRNA-Haarnadelstruktur mehr ausgebildet werden, was die weitere Transkription des Operons ermöglicht. Die Ausbildung der Haar-



**Abbildung 4: Auswirkungen von phosphoryliertem eIF2 $\alpha$  durch gestörte Translation in der eukaryotischen Zelle.**

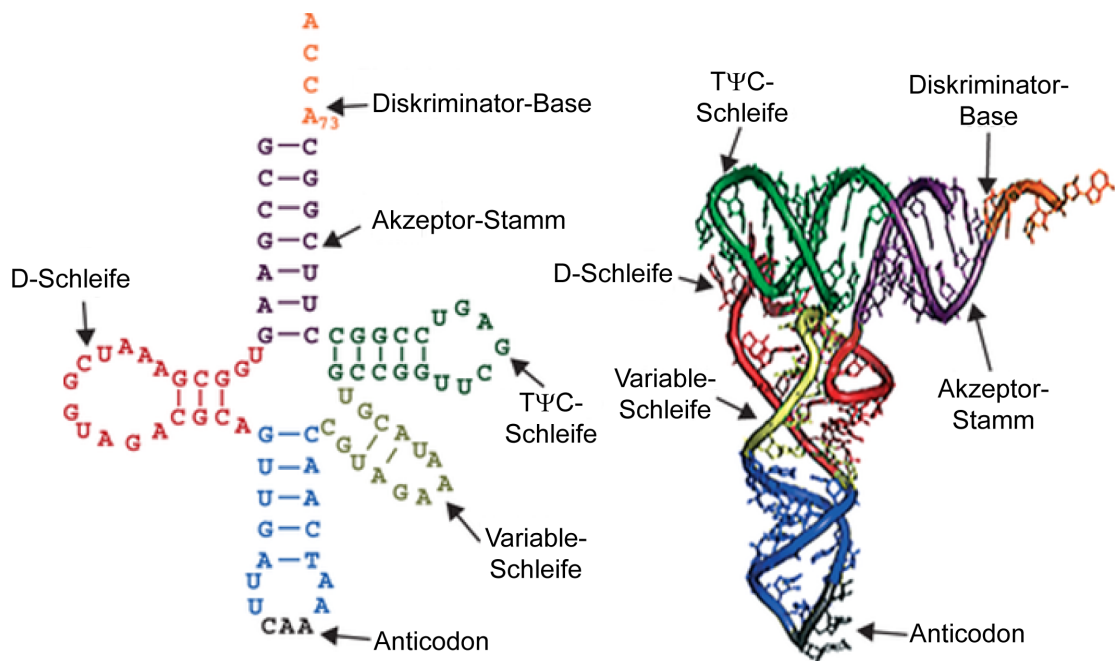
Durch gestörte Translation wird eIF2 $\alpha$  phosphoryliert. Dies führt zu Aktivierung von Atf4, welches wiederum weitere Ziele hat. Aminoacyl-tRNA Synthetasen und Aminosäuretransporter werden aktiviert. Ebenso wird die Expression weiterer zentraler Gene des ISR aktiviert. Bei Proteinaggregation im Mitochondrium wird Atf5 nicht mehr aufgenommen, weshalb dieses im Zellkern die Genexpression der Protease Lonp1 und des Chaperons Hspa9 verstärkt, welche ins Mitochondrium transportiert werden. Unabhängig vom ISR wird verstärkt Formyl-Methionin (f-Met) im Mitochondrium gebildet, um die Initiation der mitochondrialen Translation zu erhöhen. Hierbei spielen die Enzyme Psat1 (Phosphoserin-Aminotransferase), Psph (Phosphoserin-Phosphatase), Shmt2 (Serin-Hydroxymethyltransferase 2), Mthfd2 (Methylen-tetrahydrofolat-Dehydrogenase (NADP<sup>+</sup> abhängig) 2, Methenyl-tetrahydrofolat-Cyclohydrolase), Mthfd2l (Methylen-tetrahydrofolat-Dehydrogenase (NADP<sup>+</sup> abhängig) 2 Like) und Mthfd1 (Methylen-tetrahydrofolat-Dehydrogenase, Cyclohydrolase und Formyl-tetrahydrofolat-Synthetase 1) eine entscheidende Rolle in der Bildung von f-Met.

nadelstruktur führt ansonsten zur Termination der Transkription.

## 0.8 tRNA-STRUKTUR

tRNAs besitzen eine Nukleotidlänge von 72 - 95 Nukleotiden und eine große Sequenzvariabilität. Trotz dieser Variabilität besitzen alle tRNAs eine konservierte Kleeblatt-artige Sekundärstruktur, welche aus fünf verschiedenen Regionen besteht: Anticodon-Schleife (ASL), Akzeptorstamm am 5' und 3' Ende der tRNA, D-Arm, TΨC-Schleife und variabler Schleife (Abb. 5) (Giegé et al., 2012). Erstmals wurde die Struktur der tRNA 1965 anhand der Alanin tRNA<sup>Ala</sup> aus Hefe gezeigt (HOLLEY et al., 1965). Intramolekulare Wechselwirkungen der Basen führen zu der Ausbildung einer tertiären dreidimensionalen L-förmigen Struktur der tRNA, was anhand der Phenylalanin tRNA<sup>Phe</sup> in Hefe beschrieben wurde (Kim et al., 1974).

Nach der Modifizierung verschiedener Basen (siehe Kap. 0.12) wird eine CCA-Sequenz an die Diskriminatorbase am 3'-Ende angefügt, die in der Regel keine Basenpaarung eingeht. Die CCA-Sequenz dient einerseits als Markierung zur Aminoacylierung und andererseits übt sie Einfluss auf die Termination der Translation und der Positionierung im Ribosom aus (Sprinzl and Cramer, 1979; Simonović and Steitz, 2008; Betat et al., 2010). Die L-Form führt zu einer maximalen Entfernung von CCA-Ende und ASL, was die optimale Erkennung der tRNA durch verschiedene Enzyme erlaubt. Die tRNA-Modifikationen beeinflussen einerseits das Decodierungspotential während der Translation und andererseits die Struktur und Thermostabilität (Lorenz et al., 2017).



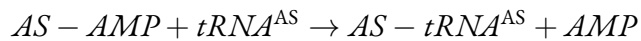
**Abbildung 5: Sekundär- und Tertiärstruktur von tRNA.** tRNAs besitzen eine konservierte Sekundär- (links) und Tertiärstruktur (rechts) mit verschiedenen Bereichen. In der Tertiärstruktur wird gezeigt, wie die D-Schleife (Dihydrouridin Schleife) und die TΨC-Schleife zur Ausbildung der Struktur interagieren. Die Anticodon-Schleife ist in blau dargestellt. Adaptiert von Pang et al. (2014).

## 0.9 tRNA-AMINOACYLIERUNG

Bevor eine tRNA überhaupt zur Translation beitragen kann, muss sie mit der ihrem Anticodon entsprechenden AS beladen werden. Bis hierhin wurde das Zusammenspiel der tRNA, mRNA und rRNA mechanistisch beschrieben. Jedoch sollte bei der Betrachtung der verschiedenen Prozesse, welche im Ganzen die Translation beschreiben, die Aminoacylierung der tRNAs, also der erste Schritt der Proteinbiosynthese, nicht außer Acht gelassen werden.

Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (aaRS) sind eine Familie essentieller Enzyme, welche, neben der kovalenten Bindung einer AS zu entsprechenden tRNA Isoakzeptoren, auch weitere metabolische Prozesse beeinflussen (Guo et al., 2010; Pang et al., 2014). Ihre fundamentale Rolle ist aber die Etablierung des genetischen Codes. Die aaRS teilen sich in zwei Gruppen auf, welche unter anderem durch konservierte Sequenzmotive und der Bindungsstelle der AS mit der Ribose unterschieden werden (Eriani et al., 1990; Burbaum and Schimmel, 1991). Klasse I aaRS sind meist monomerisch, während Klasse II aaRS meist dimerisch vorkommen. Es findet sich sowohl ein eigener Satz an aaRS im Cytosol und den Mitochondrien als auch in den Plastiden der Pflanzen. In der Regel ist eine aaRS pro AS-Spezies vorhanden (und nicht pro tRNA). Meist erfolgt die Erkennung von tRNAs durch aaRS über die ASL und den AS-Akzeptorarm, sowie durch die Diskriminatorbase (Abb. 5). Eine Ausnahme bilden Leucyl-aaRS, Seryl-aaRS und Alanyl-aaRS, die über andere Bereiche identifiziert werden (Hou and Schimmel, 1988; Giegé et al., 1998). Eine konservierte zweistufige Reaktion aktiviert die Aminosäure durch Reaktion mit ATP unter Bildung eines Amino-Adenylats

(AS-AMP). In einem zweiten Schritt wird die aktivierte AS auf das 3'-CCA Ende der tRNA übertragen (Schimmel, 1987).



Die aaRS besitzen einen Korrekturlesemechanismus, welcher gewährleistet, dass tRNAs, die mit falschen AS beladen werden, wieder hydrolysiert werden. Falsch beladene tRNAs werden durch eine Editierungsstelle erkannt und die AS durch Hydrolyse entfernt. Die aktiven Zentren für die Synthese und die Editierung sind räumlich voneinander getrennt. Hierbei kann ein falsch beladenes aminoacyliertes CCA-Ende aus der Aminoacylierungsstelle heraus schwingen und dadurch in die Editierungsstelle gelangen. Einen ähnlichen Mechanismus findet man auch bei der DNA-Polymerase. Die tRNA bleibt bei der Editierung an die aaRS gebunden, weshalb dieser Mechanismus schnell und energiesparend ist. Dies führt zu einer Fehlerrate von nur  $1:10^4$  -  $1:10^5$ . Das CCA-Ende ist nicht essentiell für die Aminoacylierung, spielt aber eine wichtige Rolle bei der tRNA Qualitätskontrolle (Wellner et al., 2018).

## 0.10 MITOCHONDRIALE TRANSLATION

Mitochondrien sind die Kraftwerke der eukaryotischen Zelle. Diese Organellen bestehen aus einer Doppelmembran und produzieren das energiereiche ATP durch die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS), deren Bestandteile an der inneren Membran lokalisiert sind. Die OXPHOS besteht aus fünf verschiedenen Komplexen, welche jeweils aus mehreren Enzymen zusammen gesetzt sind. Das 16.5 Kilobasen (kb) umfassende mitochondriale Genom codiert



neun monocistronische und zwei bicistronische mitochondriale mRNAs (mt-mRNA), welche 13 Proteine codieren, zwei mitochondriale rRNAs (mt-rRNA) und 22 mitochondriale tRNAs (mt-tRNA) (Anderson et al., 1981). Alle 13 mitochondrial codierten Proteine sind Bestandteile der OXPHOS-Komplexe.

Das Mitochondrium hat eine eigene Translationsmaschinerie mit eigenen Ribosomen (Mitoribosom), die bei 55S sedimentieren (im Gegensatz zu 80S in Eukaryoten und 70S in Prokaryoten). Das Mitoribosom unterscheidet sich dementsprechend vor allem durch einen höheren Proteinanteil von eukaryotischen und prokaryotischen Ribosomen (O'Brien, 1971; Greber and Ban, 2016). Die Entwicklung des höheren Proteinanteils wird mit dem Schutz vor erhöhtem oxidativen Stress durch reaktive Sauerstoffspezies innerhalb der Mitochondrien erklärt (Lightowers et al., 2014). Das Mitoribosom besteht aus der kleinen 28S UE und der großen 39S UE (Amunts et al., 2015). Die Unterschiede der Mitoribosomen zu cytosolischen Ribosomen und die Verkleinerung des mitochondrialen Genoms könnte ein Grund für veränderte mt-tRNAs sein (Mai et al., 2017).

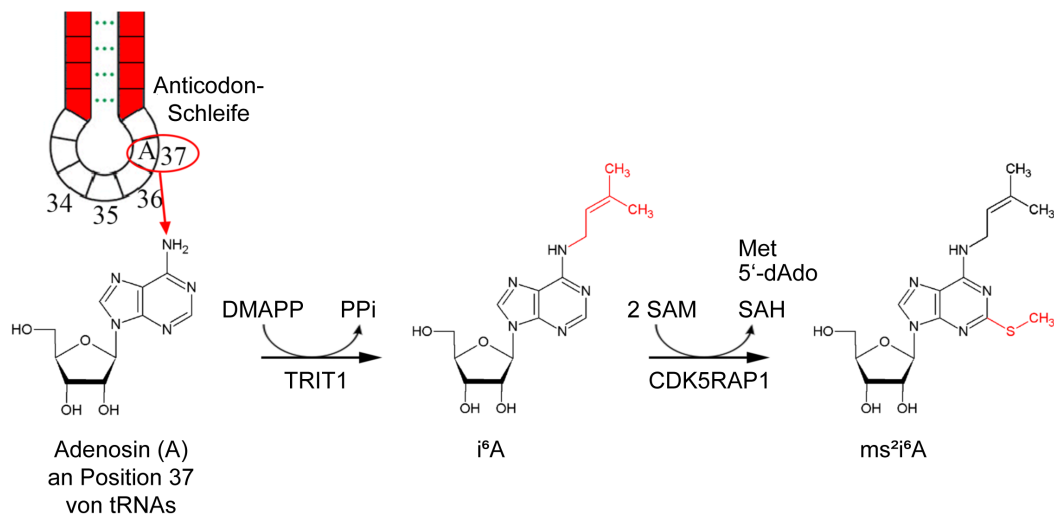
Mitochondriale tRNAs sind im Vergleich zu cytosolischen tRNAs (cy-tRNAs) kürzer und nicht alle mt-tRNAs bilden eine D-Schleife aus (Suzuki et al., 2011). Die mt-tRNAs besitzen, wie die cy-tRNAs, ebenfalls modifizierte Nukleotide (Suzuki and Suzuki, 2014; Salinas-Giegé et al., 2015). Nach erfolgter Basenmodifikation wird das CCA-Ende 3' angefügt (Nagaike et al., 2001). Anschließend werden die mt-tRNAs mit den entsprechenden AS beladen (Diodato et al., 2014). Die 22 mt-tRNAs können alle Codons decodieren. Tat-

sächlich decodiert eine mt-tRNA jeweils die ganze Codonbox bzw. Halbbox (Suzuki and Suzuki, 2014). Ein weiterer Unterschied zu cy-tRNAs ist, dass Formylmethionin-tRNA<sup>Met</sup> (f-Met-tRNA<sup>Met</sup>) zur Initiation benötigt wird, wobei die Bindung an Initiations- und Elongationsfaktoren lediglich durch die Formylierung der Aminosäure vermittelt wird (Tucker et al., 2011). Die meisten mitochondrialen Proteine werden im Kerngenom codiert und in Mitochondrien importiert (Neupert, 2015).

Störungen in der mitochondrialen Translation mit folgender mitochondrialer Dysfunktion haben eine zur ISR ähnliche Stressantwort zur Folge (mitochondriale ISR, ISRmt). Die mitochondriale Stressantwort wird über den mTOR (*mechanistic Target of Rapamycin*) Komplex 1 (mTORC1) reguliert und resultiert ebenfalls in der Phosphorylierung von cytosolischem eIF2 $\alpha$  (Khan et al., 2017). Darüber hinaus wird bei mitochondrialer Dysfunktion das Cytokin FGF21 (*Fibroblast growth factor 21*) ausgeschüttet (Restelli et al., 2018).

#### 0.11 DIE tRNA:DIMETHYLALLYL-ISOPENTENYLTRANSFERASEN

Trit1 (tRNA:Dimethylallyl-Isopentenyltransferase 1) ist ein tRNA-modifizierendes Enzym in Wirbeltieren (Abb. 6). Isopentenylierung wird spezifisch durch tRNA:Dimethylallyl-Isopentenyltransferasen vermittelt und existiert in allen drei Formen des Lebens (Abb. 7). Homologe von Trit1/TRIT1 sind in Bakterien (MiaA), Hefe (Mod5 und Tit1 in *S. cerevisiae* und *S. pombe*), *C. elegans* (gro-1) und *A. thaliana* (Atp2) identifiziert. In vielen tRNAs, deren Codons mit U starten, ist Adenosin 37 mit N<sup>6</sup>-Isopentenyladenosin (i<sup>6</sup>A) modifiziert (Schweizer et al., 2017). Ein in tRNAs zur Isopentenylierung benötigtes Motif ist die Ba-



**Abbildung 6: Reaktion der Isopentenylierung und Methylthiolierung durch TRIT1 und CDK5RAP1.** Ein Isopentenylrest wird durch das Enzym TRIT1 von Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) auf Adenine an Position 37 in tRNAs übertragen. Dieses isopentenylierte Adenin kann dann durch das Enzym CDK5RAP1 zu ms<sup>2</sup>i<sup>6</sup>A weiter modifiziert werden.

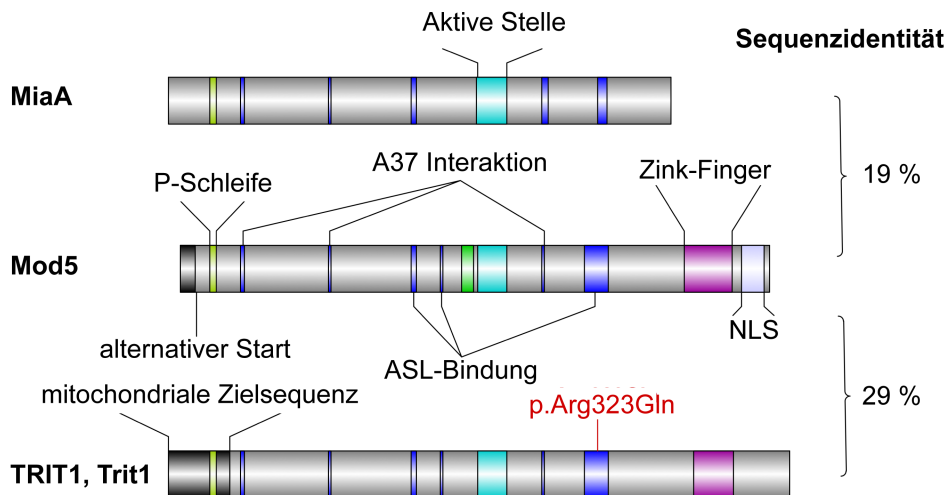
senabfolge A36-A37-A38, welches jedoch auch nicht zwingend zur Isopentenylierung führt (Lamichhane et al., 2013). Isopentenylierte Adenosine werden durch das Enzym CDK5RAP1 (*CDK5 regulatory subunit-associated protein 1*), einem Homolog des bakteriellen MiaB, zu 2-Methylthio-i<sup>6</sup>A (ms<sup>2</sup>i<sup>6</sup>A) in Säugetieren und Bakterien weiter modifiziert (Reiter et al., 2012; Wei et al., 2015).

1972 wurde das Enzym MiaA in *E. coli* isoliert und beschrieben (Rosenbaum and Gefter, 1972). Eine zur Isopentenylyltransferase ähnliche Aktivität wurde in verschiedenen Pflanzengewebe auch schon Mitte bis Ende der 1970er Jahre nachgewiesen (Horgan, 1975; Taya et al., 1978; Chen and Melitz, 1979). In *A. thaliana* wurden neun verschiedene Isopentenylyltransferase-codierende Gene identifiziert, wobei nur Atipt2 und Atipt9 als tRNA Isopentenylyltransferasen fungieren (Kakimoto, 2001; Miyawaki et al., 2004). Die durch Atipt2 katalysierte

tRNA-Isopentenylierung wurde 2002 durch Komplementierung von *Mod5*-defizienten *S. cerevisiae* mit *Atipt2* beschrieben (Golovko et al., 2002). Im Gegensatz zu Hefen und Säugtieren wurden in *A. thaliana* jedoch bisher keine tRNAs mit alleiniger i<sup>6</sup>A-Modifikation, aber mit der weiter hydroxylierten und thiomethylierten Form N<sup>6</sup>-(cis-hydroxyisopentenyl)-Adenosin (ms<sup>2</sup>io<sup>6</sup>A), identifiziert (Chen et al., 2010). Interessanterweise liegt i<sup>6</sup>A nicht nur in tRNAs eingebaut vor, sondern wird durch die sieben anderen Isopentenyltransferasen *Atipt1* und *Atipt3-8* durch die Isopentenylierung von ATP und ADP erzeugt (Miyawaki et al., 2006). Die Isopentenyltransferasen in *A. thaliana* sind in allen Geweben exprimiert (Miyawaki et al., 2004). In der freien Form wirkt i<sup>6</sup>A als Cytokinin (Phytohormon) in Pflanzen (Jameson and Song, 2016). Cytokinine üben unter anderem einen Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung von Pflanzenzellen aus (Mok and Mok, 2001). Ebenfalls ist i<sup>6</sup>A in Pflanzen an der Signaltransduktion zwischen den verschiedenen Organen über membrangebundene Histidinkinase beteiligt (Aoyama and Oka, 2003).

Die eukaryotischen Gene codieren sowohl cytoplasmatische als auch mitochondriale Isoformen (Dihanich et al., 1987). Eine mitochondriale Importsequenz erlaubt den Transport von Trit1 in das Mitochondrium, um dort tRNAs zu isopentenylieren (Abb. 7). Trotz relativ geringer Sequenzidentität der Homologe sind die funktionellen Strukturen konserviert (Schweizer et al., 2017).

Es wurde ein Patient mit einer homozygoten *p.Arg323Gln*-Mutation in *TRIT1* identifiziert, welche sich in einem Bereich des Gens befindet, der an der Bindung mit der ASL



**Abbildung 7: Sequenz von Trit1/TRIT1 Homologen.** Dargestellt sind die Proteinsequenzen mit den funktionellen Regionen von MiaA (*E. coli*), Mod5 (*S. cerevisiae*) und Trit1/TRIT1 (Säugetiere). Die Sequenzidentität zwischen den Homologen ist relativ gering. Die funktionellen Regionen sind jedoch konserviert. Die aktive Stelle (hellblau), sowie die Bereiche, die mit der Base A37 interagieren (dunkelblau), sind in allen Homologen konserviert. Mod5 und Trit1 besitzen noch einen zusätzlichen Bindung mit der Anticodon-Schleife (dunkelblau). Ebenfalls besitzen beide Homologe eine mitochondriale Zielsequenz (dunkelgrau), die bei Mod5 nicht vollständig ausgeprägt ist. Die P-Schleife (gelb) ist in allen drei dargestellten Homologen vorhanden und dient der Bindung von DMAPP. In Mod5 ist zusätzlich eine nukleäre Lokalisationssequenz (weiß) vorhanden. Adaptiert von (Schweizer et al., 2017).

beteiligt ist (Abb. 7) (Yarham et al., 2014). Dies führt zu mangelhafter Isopentenylierung cytosolischer und mitochondrialer tRNAs im Patienten, welche mit einem Defekt der mitochondrialen Atmungskette einhergeht.

## 0.12 tRNA-MODIFIKATIONEN IN DER ANTICODON-SCHLEIFE

Die  $i^6A$ -Modifikation wurde im Jahr 1966 identifiziert und ist somit so lange bekannt wie der genetische Code selbst (Hall et al., 1966; Zachau et al., 1966). Bis heute sind mehr als 100 modifizierte Nukleotide in tRNAs über alle Bereiche des Lebens beschrieben (Björk et al., 1987; El Yacoubi et al., 2012). Viele dieser Modifikationen sind für die Aufrechterhaltung der Genauigkeit und Effizienz der ribosomalen Dekodierung verantwortlich, und somit essentiell für die Proteomintegrität (Nedialkova and Leidel, 2015). Im Besonderen sollen Modifikationen an Base 34 (erste Base des Anticodons) und an Base 37, die sich direkt neben dem Anticodon befindet, das Dekodierungspotential von tRNAs beeinflussen. Dies gilt speziell für tRNAs, die mehr als ein Codon dekodieren (eine Codonbox), so wie es z.B. in Mitochondrien üblich ist (Grosjean and Westhof, 2016). Aus diesem Grund führen Mutationen in Genen, die tRNA modifizierende Enzyme kodieren, häufig zu mitochondrialen Funktionsstörungen (Torres et al., 2014).

Jüngst wurde gezeigt, dass tRNA-Modifikationen nicht so statisch vorliegen wie bisher geglaubt, sondern die metabolische Aktivität der Zelle dynamisch reflektieren können. Die metabolische Aktivität der Zelle kann unter anderem durch Stressantwort oder Ernährungsumstellung verändert werden (Tuorto et al., 2018). Es wurde ebenfalls gezeigt, dass beeinträchtigte mitochondriale Respiration zu einer Verminderung von  $N^6$ -Threonylcarbamoyl-adenosin ( $t^6A$ ) an Basenposition 37 mitochondrialer tRNAs führt. Während der Respiration wird  $HCO_3^-/CO_2$  produziert, das zur Bildung von  $t^6A$  benötigt wird (Lin et al., 2018).

Codons mit weniger energiereichen Codon:Anticodon-Bindungen sind besonders abhängig von Modifikationen in der Anticodonschleife (Grosjean and Westhof, 2016). So ist die Dekodierung von Lysin AAA Codons mit einer tRNA, welche ein UUU Anticodon besitzt, durch die relativ schwache Codon:Anticodon-Bindungsenergie besonders fehleranfällig. Eine Verschiebung des Leserahmens kann so verhältnismäßig einfach eintreten, wenn ein Codon mit einem A an erster Position direkt auf das Lysincodon folgt. Der Einfluss von Modifikationen in der Anticodonschleife bakterieller tRNA<sup>Lys</sup> wurde im strukturellen Detail studiert (Murphy et al., 2004). Genetische Defekte im Stoffwechselweg der t<sup>6</sup>A Bildung führen zu einer beeinträchtigten Translation mit Leserahmenverschiebung in *S. cerevisiae* (Glavic et al., 2015).

In Wirbeltieren wird cy-tRNA<sup>Lys</sup>(UUU) durch das Enzym CDKAL1 (*CDK5 Regulatory Subunit Associated Protein 1 Like 1*) zu 2-Methylthio-t<sup>6</sup>A (ms<sup>2</sup>t<sup>6</sup>A) weiter modifiziert. Mutationen in CDKAL1 sind mit der Entwicklung einer Insulinresistenz im Menschen assoziiert (van Vliet-Ostapchouk et al., 2007). Weiterführend wurde die Wichtigkeit der vollen Modifikation von tRNA<sup>Lys</sup> durch abweichende Proinsulinsynthese und Sekretion, einhergehend mit Glukoseintoleranz in *Cdkal1*-defizienten Mäusen, beschrieben (Wei et al., 2011).

Während viele tRNAs, die Codons mit A an Position 34 dekodieren, mit t<sup>6</sup>A oder dessen Derivaten an Base 37 modifiziert sind, tragen tRNAs, die Codons mit U an Position 36 dekodieren, andere Modifikationen an Base 37. So ist z.B. die cy-tRNA<sup>Phe</sup>(UUY) einmalig mit Wybutosin (yW) an Position 36 modifiziert. Der Einbau dieses modifizierten Nukleosids be-

nötigt einen, aus vier Genen bestehenden, komplexen Stoffwechselweg (Perche-Letuvée et al., 2014).

In Säugetieren tragen die cy-tRNAs Serin (cy-tRNA<sup>Ser</sup>(UCN)) und Selenocystein (cy-tRNA<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup>(UGA)) i<sup>6</sup>A, wobei Letztere exklusiv zur Translation von einem Satz von 24 Selenoproteingen verwendet wird (Fradejas et al., 2013; Warner et al., 2002, 2000; Jühling et al., 2009; Lamichhane et al., 2013). Die in Mitochondrien i<sup>6</sup>A modifizierten mt-tRNAs sind Serin (Ser) (UCN), Tryptophan (Trp), Phenylalanin (Phe), Tyrosin (Tyr) und Cystein (Cys). Ser, Trp, Phe und Tyr werden zu ms<sup>2</sup>i<sup>6</sup>A weiter modifiziert (Suzuki and Suzuki, 2014).

*Cdk5rap1*-defiziente Mäuse zeigen eine mitochondriale Dysfunktion und eine Induktion der Marker für oxidativen Stress (Wei et al., 2015). Ausschaltung von MiaA in *E. coli*, Tit1 in *S. pombe*, Mod5 in *S. cerevisiae* und Gro-1 in *C. elegans* führt allgemein zu einem langsam wachsenden Phänotypen, was im Falle der Rundwürmer durch mitochondriumspezifische Komplementierung vollständig gerettet werden kann (Schweizer et al., 2017; Lamichhane et al., 2013; Lemieux et al., 2001). Kürzlich wurden *MiaA*- und *MiaB*-defiziente *S. albicans* mit einem Wachstumsdefekt beschrieben, welcher bei *MiaA*-Defizienz stärker als bei *MiaB*-Defizienz ausgeprägt ist (Koshla et al., 2019). Es wurden fünf Patienten mit bi-allelischer Mutation in *TRIT1* (Genbank Eintrag NM\_017646.4) berichtet, welche durch myoklonische Epilepsie charakterisierte klinische Merkmale mitochondrialer Krankheiten zeigten (Yarham et al., 2014; Kernohan et al., 2017). Dies deutet darauf hin, dass Wirbeltiere empfänglicher für beeinträchtigte tRNA Isopentenylierung sind als Mikroben.



*A fact acquires its true and full value only through the  
idea which is developed from it.*

Justus von Liebig

# 1

## Zielsetzung

IN DIESER ARBEIT soll der Einfluss fehlender  $N^6$ -Isopentenylierung an Base  $A_{37}$  in tRNAs auf die Translation im Cytoplasma und den Mitochondrien von Mäusen untersucht werden. Hierfür sollen Algorithmen zur Analyse und Interpretation von Sequenzierungsdaten entwickelt werden. Ebenfalls werden biochemische und molekularbiologische Methoden angewandt, um *in vitro* kinetische Untersuchungen der Isopentenyltransferasereaktion durch-

zuföhren.

Zur organspezifischen Untersuchung der Effekte auf Zellen und Mitochondrien werden hepatozyten- und neuronspezifische *Trit1*-defiziente Mäuse verwendet. Diese Mäuse besitzen keine i<sup>6</sup>A Modifikation in cy-tRNA<sup>Ser</sup>(UCN), cy-tRNA<sup>Ser[Sec]</sup> und mt-tRNA<sup>Cys</sup>, sowie keine ms<sup>2</sup>i<sup>6</sup>A Modifikation in mt-tRNA<sup>Ser</sup>(UCN), mt-tRNA<sup>Trp</sup>, mt-tRNA<sup>Phe</sup> und mt-tRNA<sup>Tyr</sup>.

Mit Hilfe von Ribosomalem Profiling soll der Zustand und die Position von Ribosomen in Subcodon-Auflösung untersucht werden. Die Kartierung mitochondrialer Ribosomen soll Einblicke über Veränderungen in der mitochondrialen Translationsmaschinerie geben. Weiterführend sollen biochemische Analysen durchgeführt werden, um den Expressionszustand einzelner Transkripte zu validieren. Messungen der mitochondrialen Komplexaktivitäten sollen Auskunft über die Funktion der Mitochondrien geben.

*If your experiment needs statistics, you ought to have done  
a better experiment.*

Ernest Rutherford

# 2

## Material und Methoden

DIE VERWENDETEN METHODEN und Materialien sind in diesem Kapitel aufgeführt. Die Analyse von Sequenzierungsdaten wird im Detail erläutert. Ebenso wird näher auf die Entwicklung und Verwendung der Algorithmen eingegangen.

## 2.1 MATERIALIEN

### 2.1.1 REAGENZIEN

Reagenz	Händler	Artikelnummer
Pyridoxal-5-Phosphat Hydrat (PLP)	Sigma	P3657
NADH	Sigma	N8129
L-Alanin	Applichem	A3690,0050
L-Lactose-Dehydrogenase Typ II	Sigma	L2500
$\alpha$ -Ketoglutarat	Sigma	75890
Cycloheximid	VWR	97064-722
Chloramphenicol	Sigma	C0378
DNAse	ThermoFisher	AM2222
RNAse I	ThermoFisher	AM2294
Superase In	ThermoFisher	AM2696
Riboblock RNAse Inhibitor	ThermoFisher	EO0382
T4 Polynukleotid-Kinase	NEB	M0201L
Pyrophosphatase	Genecraft	GC-006-0100
Ethidiumbromid Lösung	Sigma	46067-50ML-F
$^{14}$ C-DMAPP	Hartmann Analytic	ARC0797
TEMED	Applichem	A1148,0100
Acrylamid (40 %) 29:1 Mix	Applichem	A0385,1000
HDGreen Plus DNA Stain	Intas	
Ni-NTA Agarose	Qiagen	30210
LB-Brühe, Miller	Sigma	L3152-1KG
Ampicillin Na-Salz	Applichem	A0839,0025
Taq Polymerase BioTherm	Genecraft	GC-002-5000
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	ThermoFisher	R0392
Bromphenolblau	Sigma	B0126

Tabelle 2.1: Verwendete Reagenzien.

### 2.1.2 KOMMERZIELLE REAGENZIENSYSTEME

Reagenziensystem	Händler	Artikelnummer
Ribo-Zero Gold rRNA Removal Kit	Illumina	MRZG12324
NEBNext Small RNA Library Prep Set for Illumina	NEB	E7330L
QuantSeq 3' mRNASeq Library Prep Kit FWD	Lexogen	015.96
iScript cDNA Synthesis	Bio-Rad	1708891
Absolute qPCR SYBR Green Fluorescein Mix	ThermoFisher	AB-1219/B
TRIzol	ThermoFisher	15596026
Pierce BCA Protein	ThermoFisher	23225
Albumin Standard	ThermoFisher	23209
miRNEasy Mini Kit	Qiagen	217004
RNeasy Mini Kit	Qiagen	74104

Tabelle 2.2: Verwendete kommerziellen Reagenziensysteme.

### 2.1.3 REKOMBINANTE DNA UND BAKTERIEN

	Quelle	Artikelnummer
pET52(+)	Novagen	71554-3
pET52(+) <sub>TRIT<sub>I</sub></sub> WT	Labor	
pET52(+) <sub>TRIT<sub>I</sub></sub> R323Q	Labor	
BL2 <sub>r</sub> Star E.coli	ThermoFisher	C601003

Tabelle 2.3: Verwendete Bakterien und Plasmide.

#### 2.1.4 GERÄTE

Produkt	Hersteller
Pipette Eppendorf research (0.1 - 2.5 $\mu$ l, 0.5 - 10 $\mu$ l, 10 - 100 $\mu$ l, 20 - 200 $\mu$ l, 100 - 1000 $\mu$ l)	Eppendorf
Nanodrop 2000	Thermo Fisher Scientific
pH-Elektrode SenTix 41	Xylem Analytics
pH-Meter 761 Calimatic	Knick
Ultraschallgerät Branson Sonifier 250	Emerson Germany Office
Magnetrührer IKA RCT classic	IKA Werke
Plate Reader Infinite 200 PRO	Tecan
Mastercycler ep realpex2	Eppendorf
Zentrifuge Optima TLX-120K	Beckman Coulter
Pippin Prep	Sage Science
LS 6500 Szintillationszähler	Beckman Coulter
Elektrophorese System Mini PROTEAN 3	BioRad
Classic Gel Dokumentation	Intas
Plattformschüttler IKA Rocker 3D digital	Janke & Kunkel
Vortex IKA VF2	Janke & Kunkel
Thermomixer comfort	Eppendorf
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf
Rotor FA-45-24-11	Eppendorf
Waage BP 2100 S	Sartorius
Spektrometer Genesys 10 UV	ThermoFisher
Netzteil PHERO-stab. 500	Biotec-Fischer
Agarose Gelelektrophoresesystem Owl	ThermoFisher
Schüttelinkubator New Brunswick Innova 40	Eppendorf
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf
Schwingrotor A-4-62	Eppendorf
Rotor TLA-110	Beckman Coulter

Tabelle 2.4: Verwendete Geräte.

### 2.1.5 UTENSILIEN

<b>Produkt</b>	<b>Händler</b>	<b>Artikelnummer</b>
Mikrotestplatte 96 Well	Sarstedt	82.1581
Dickwandige Polycarbonat Röhrchen	Beckman Coulter	362305
Amicon Ultra-4 Zentrifugen-Filtereinheiten	Merck	C7719
Filterspitzen Biosphere 100	Sarstedt	70.760.212
Filterspitzen Biosphere 1000	Sarstedt	70.762.211
Filterspitzen Biosphere 10	Sarstedt	70.1130.210
Reaktionsgefäße Biopur sterile 1.5 ml	Eppendorf	0030121589
Econo-Pac Chromatographie Säule, 10 ml	BioRad	732-1010
PCR Reagenziengefäße	Biozym Scientific	710988

Tabelle 2.5: Verwendete Utensilien.

## 2.1.6 SOFTWARE UND DATENBANKEN

Software	Quelle
RWTH Aachen Compute Cluster	<a href="https://doc.itc.rwth-aachen.de/display/CC/Home">https://doc.itc.rwth-aachen.de/display/CC/Home</a>
RStudio 1.2.1335	<a href="https://www.rstudio.com/">https://www.rstudio.com/</a>
R 3.6.0	<a href="http://cran.cnr.berkeley.edu/">http://cran.cnr.berkeley.edu/</a>
GraphPad Prism 7	<a href="https://www.graphpad.com/">https://www.graphpad.com/</a>
Office 2016 16.16.9	
Texmaker 5.0.2	<a href="http://www.xmlmath.net/texmaker/">http://www.xmlmath.net/texmaker/</a>
MiKTeX 2.9.7050	<a href="http://https://miktex.org/">http://https://miktex.org/</a>
Adobe Illustrator CS7	
IBS	<a href="http://ibs.biocuckoo.org/">http://ibs.biocuckoo.org/</a> (Liu et al., 2015)
STAR Aligner 2.7	<a href="https://github.com/alexdobin/STAR">https://github.com/alexdobin/STAR</a>
FastQC 0.11.8	<a href="https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/">https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/</a>
TrimGalore 0.6.1	<a href="https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/">https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/</a>
Cutadapt 2.3	<a href="https://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/installation.html">https://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/installation.html</a>
Samtools 1.9	<a href="http://www.htslib.org/">http://www.htslib.org/</a>
HTSeq 0.11.1	<a href="https://htseq.readthedocs.io/en/release_0.11.1/">https://htseq.readthedocs.io/en/release_0.11.1/</a>
Pubmed	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/</a>
UCSC Tablebrowser	<a href="https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTables">https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTables</a>
Ensembl Biomart	<a href="https://www.ensembl.org/index.html">https://www.ensembl.org/index.html</a>
Ensembl FTP-Server	<a href="https://www.ensembl.org/info/data/ftp/index.html">https://www.ensembl.org/info/data/ftp/index.html</a>
DAVID 6.8	<a href="https://david.ncifcrf.gov/home.jsp">https://david.ncifcrf.gov/home.jsp</a>

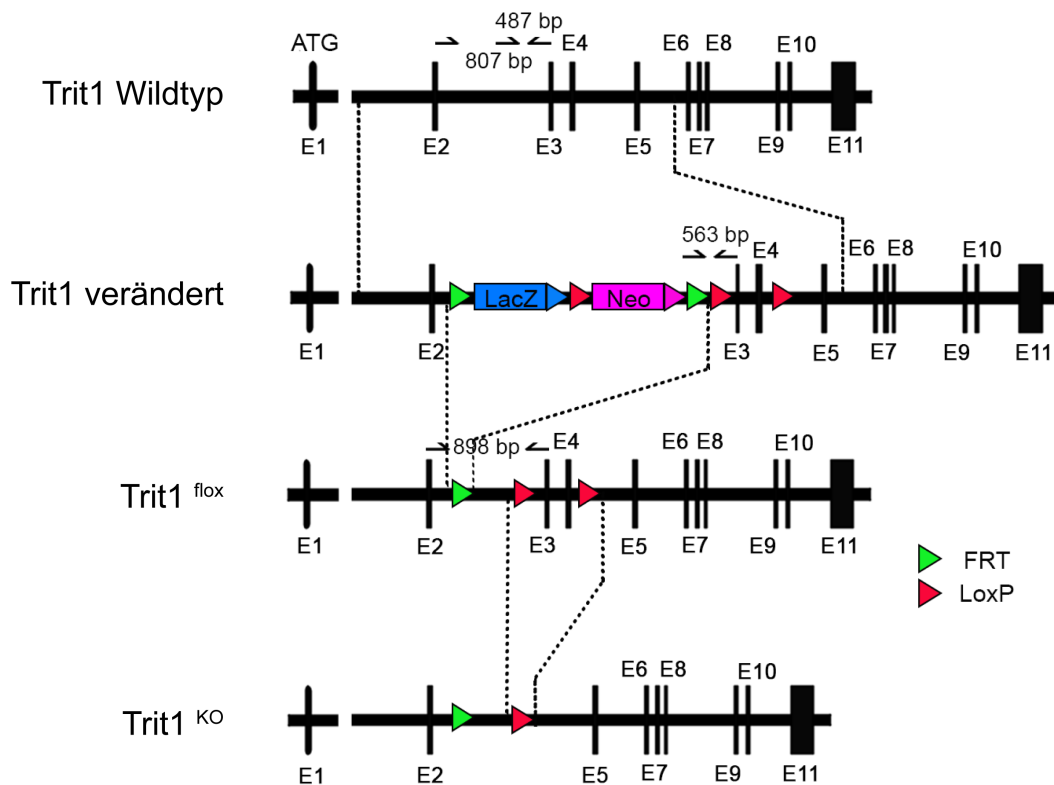
Tabelle 2.6: Verwendete Software und Datenbanken.



## 2.2 TRANSGENE MÄUSE

### 2.2.1 ERZEUGUNG TRANSGENER MÄUSE

Die in dieser Arbeit verwendeten Mäuse, sowie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) Bedingungen und Primer zur Genotypisierung, wurden von Frau Dr. Noelia Fradejas Villar erzeugt und durften, mit freundlicher Genehmigung, für die vorliegende Studie verwendet werden. Ein kurzer Überblick über die für die Erzeugung erforderlichen Schritte und den verwendeten Vektor soll hier, zum besseren Verständnis, gegeben werden. Der verwendete Vektor von EUCOMM trägt ein bakterielles *LacZ*- und ein Neomycinresistenzgen, flankiert von zwei *FRT*-Stellen. Exons 3 und 4 wurden von *loxP*-Stellen flankiert (Abb. 2.4). Der linearisierte Vektor wurde in HM1-Stammzellen zur homologen Rekombination verwendet. Nach Elektroporation wurden die neomycinresistenten ES-Klone per Southern-Blot überprüft. Resistente Klone wurden karyotypisiert und ein korrekter Klon in eine Blastozyste mikroinjiziert. Mehrere Chimären wurden mit C57BL6/6J Weibchen zur Keimbahnübertragung zurück gekreuzt, was mittels PCR überprüft wurde. Die Neomycinkassette wurde entfernt, indem die erzeugten *Trit1*-Mäuse mit *FLPe*-positiven Mäusen verpaart wurden. Die *FLPe*-Rekombinase katalysiert die Rekombination zwischen zwei *FRT*-Stellen, was zur endgültigen Produktion eines *Trit1* Allels führt, bei dem Exon 3 und Exon 4 innerhalb zweier *loxP*-Stellen flankiert vorliegen. Da die *loxP*-Stellen in Intronbereichen liegen, wirken sich diese nicht auf die Expression des *Trit1*-Gens aus. Durch Verpaarung mit Cre-Rekombinase exprimierenden Mäusen wird der Bereich zwischen den *loxP*-Stellen rekombiniert, was zu



**Abbildung 2.1: Verwendeter Vektor zur Erzeugung von transgenen Trit1 Mäusen.** Verschiedene Primer zur Analyse der Rekombination sind mit Hilfe von Halbpfeilen eingezeichnet. Das LacZ- und das Neomycinresistenz-Gen ist in blau bzw. pink dargestellt. Durch Rekombination mit FLPe- bzw. Cre-Rekombinase entfernte Bereiche sind durch gestrichelte Linien eingezeichnet. Die FRT- und loxP-Stellen sind mit grünen bzw. roten Dreiecken aufgetragen. Mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. Noelia Fradejas Villar.

einer Entfernung von Exon 3 und Exon 4 - und somit zur Ausschaltung der Funktion - führt (Sternberg and Hamilton, 1981).

Mittels quantitativer Echtzeit-PCR (RT-PCR) wurde die Abwesenheit von Exon 3 in der *Trit1*-mRNA nachgewiesen. Eine genaue Beschreibung der Methode ist in Kapitel 2.3.1 zu finden. Hierbei wurden die Primer so erstellt, dass der fw. (*forward*) Primer in Exon 2 und der rv. (*reverse*) Primer in Exon 3 lokalisiert ist. Bei erfolgreicher Rekombination kann

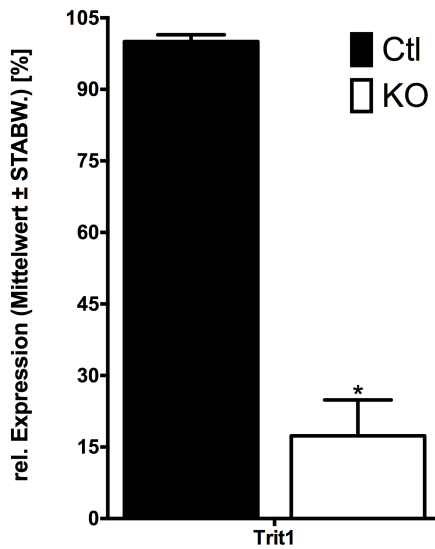


Abbildung 2.2: Überprüfung der Rekombination von *Trit1* durch RT-PCR. Dargestellt sind die RT-PCR Ergebnisse von Lebergewebe hepatozytenspezifischer *Trit1*-defizienter Mäuse mit den zugehörigen Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichung. Ctl = Kontrolle, KO = *Trit1* knock-out. Signifikante Unterschiede (t-Test,  $p < 0.05$ ) sind mit einem Stern gekennzeichnet (n = 3).

der rv. Primer in Exon 3 nicht mehr binden, was zu einem Verlust des Signals führt (Abb. 2.2). Eine Western-Blot Analyse zur Überprüfung des Proteingehalts war aus Ermangelung eines geeigneten murinen *Trit1*-Antikörpers nicht möglich. Die gestörte Funktion von *Trit1* wurde jedoch, in Kollaboration mit der Gruppe von Prof. Mark Helm in Mainz, mit Hilfe von Massenspektrometrie nachgewiesen. Hierbei wurde tRNA mittels Gelelektrophorese von größeren RNA Spezies getrennt, um anschließend die Menge an isopentenylierten Adenosinen zu bestimmen (Abb. 2.3).

#### 2.2.2 GENOTYPISIERUNGEN

Zur Genotypisierung wurde die DNA der transgenen Mäuse durch alkalische Lyse aus den Gewebestücken von Ohr- und Schwanzbiopsien extrahiert. Hierfür wurden die Gewebestücke für 60 Minuten bei 95 °C in 100  $\mu$ l NaOH-Puffer (25 mM NaOH, 0.2 mM EDTA) inkubiert. Anschließend wurde mit 100  $\mu$ l HCl-Puffer (0.04 mM Tris-HCl, 22 mM HCl)

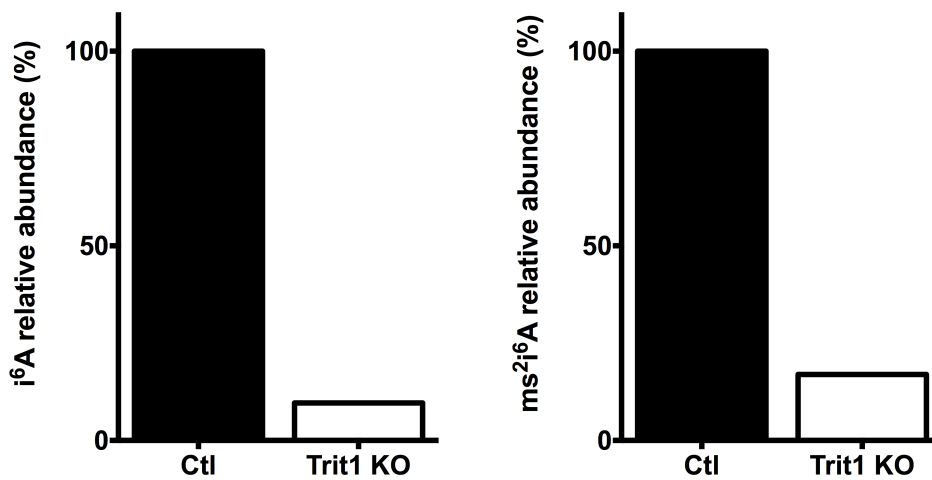


Abbildung 2.3: Massenspektrometrische Bestimmung der (ms<sup>2</sup>)i<sup>6</sup>A Menge in tRNAs. Mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. Noelia Fradejas Villar.

neutralisiert. Jeweils 1  $\mu$ l der DNA-Lösung wurden mittels PCR nach den Protokollen in Tabellen 2.7, 2.8 und 2.9 analysiert. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2.10 aufgelistet. Die PCR für *Trit1* wird verwendet, um das Vorhandensein der ersten *loxP*-Stelle zu überprüfen, welches auf beiden Allelen bei der Kontrolle und den jeweiligen deletierten Mäusen vorhanden sein muss. Das entsprechende Fragment besitzt 898 Basenpaare. Bei einem Wildtyp Allel fehlt diese Sequenz, was zu einem kleineren Fragment mit 807 Basenpaaren führt (Abb. 2.4). Die Fragmente wurden durch 2 % Agarosegele (2 g Agarose in 100 mL 1 x TBE-Puffer (0.1 M Tris, 0.1 M Borsäure, 2 mM EDTA Na-Salz), 3  $\mu$ l HDGreen Plus DNA Stain) aufgetrennt. Hierfür wurden die PCR-Produkte mit entsprechender Menge 6x Ladungspuffer (3 ml Glycerol (30 %), 25 mg Bromphenolblau, H<sub>2</sub>O auf 10 ml) versetzt und 20  $\mu$ l der Proben aufgetragen. Die Gele wurden für 45 Minuten bei 110 Volt aufgetrennt. Die Banden wurden in einer Intas Geldokumentation mittels UV-Strahlung detektiert.

<b>Zeit</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Wiederholung</b>	
3 min	95 °C		
30 s	95 °C	35x	
30 s	60 °C		
60 s	72 °C		
5 min	72 °C		

<b>Lösung</b>	<b>Ausgangskonzentration</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>Volumen</b>
H <sub>2</sub> O			18.250 µl
Puffer	10x	1x	2.500 µl
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2 mM	1.000 µl
dNTPs	5 mM	0.2 mM	1.000 µl
Primer fwd	10 µM	0.2 µM	0.500 µl
Primer rv	10 µM	0.2 µM	0.500 µl
Taq Polymerase	5 U/µl	0.05 U/µl	0.250 µl
DNA			1.000 µl
			25 µl

Tabelle 2.7: PCR Programm für *Trit1*.

<b>Zeit</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Wiederholung</b>	
3 min	94 °C		
30 s	94 °C		
30 s	64 °C	35x	
45 s	72 °C		
3 min	72 °C		

<b>Lösung</b>	<b>Ausgangskonzentration</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>Volumen</b>
H <sub>2</sub> O			17.380 µl
Puffer	10 x	1 x	3.000 µl
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2 mM	1.000 µl
dNTPs	5 mM	0.2 mM	1.500 µl
Primer fwd	1 10 µM	0.2 µM	1.000 µl
Primer rv	1 10 µM	0.2 µM	1.000 µl
Primer fwd	2 10 µM	0.2 µM	2.000 µl
Primer rv	2 10 µM	0.2 µM	2.000 µl
Taq Polymerase	5 U/µl	0.01 U/µl	0.125 µl
DNA			1.000 µl
			30 µl

Tabelle 2.8: PCR Programm für Alb-Cre.

Zeit	Temperatur	Wiederholung
5 min	95 °C	
30 s	95 °C	
45 s	63 °C	35x
60 s	72 °C	
3 min	72 °C	

Lösung	Ausgangskonzentration	Endkonzentration	Volumen
H <sub>2</sub> O			22.380 µl
Puffer	10 x	1 x	3.000 µl
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2 mM	1.000 µl
dNTPs	5 mM	0.2 mM	1.000 µl
Primer fwd 1	10 µM	0.2 µM	0.500 µl
Primer rv 1	10 µM	0.2 µM	0.500 µl
Primer rv 2	10 µM	0.2 µM	0.500 µl
Taq Polymerase	5 U/µl	0.01 U/µl	0.125 µl
DNA			1.000 µl
			30 µl

Tabelle 2.9: PCR Programm für Camk-Cre.

Gen	Sequenz	Strang
Trit1	TCT-CGA-GTG-GCT-GAA-CTG-AG	fw
	GGT-AGT-AAT-AAG-AAC-TTT-CCA-GAG-CAG	rv
Alb-Cre	GCG-GTC-TGG-CAG-TAA-AAA-CTA-TC	fw1
	GTG-AAA-CAG-CAT-TGC-TGT-CAC-TT	rv1
	CTA-GGC-CAC-AGA-ATT-GAA-AGA-TCT	fw2
	GTA-GGT-GGA-AAT-TCT-AGC-ATC-ATC-C	rv2
Camk-Cre	GGT-TCT-CCG-TTT-GCA-CTC-AGG-A	fw
	CCT-GTT-GTT-CAG-CTT-GCA-CCA-G	rv1
	CTG-CAT-GCA-CGG-GAC-AGC-TCT	rv2

Tabelle 2.10: Verwendete Primer zur Genotypisierung.

### 2.2.3 PROBENENTNAHME

Die Mäuse wurden morgens zur gleichen Zeit in einem Alter von 6-12 Wochen durch zervikale Dislokation getötet. Der Tod wurde durch fehlende Schmerz- und Druckreflexe geprüft. Die Proben wurden, wenn nicht anders angegeben, nach Entnahme bei -80 °C gelagert und zuvor in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Zur Leberentnahme wurde zuerst das Abdomen geöffnet. Die Leber wurde im ganzen heraus genommen und direkt in 4 °C kaltem 1 x PBS-Puffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) gewaschen. Die Leber wurde danach mit Zellulosepapier getrocknet. Anschließend wurde sie mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten und in einem 2 ml Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Die Gehirnentnahme erfolgte durch Öffnung der Schädeldecke. Hierzu wurde der Kopf abgetrennt und die Haut entfernt. Die Schädeldecke wurde vom Hinterkopf her vorsichtig geöffnet und entfernt. Anschließend wurden die Riechkolben durchgeschnitten und das Gehirn heraus genommen. Der Cortex wurde danach vom Hirn getrennt und in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff gefroren.

## 2.3 *IN VITRO* METHODEN

### 2.3.1 QUANTITATIVE RT-PCR

Zur quantitativen Messung von RNA wurde diese mit TRIzol Reagenz, nach Herstellerprotokoll, aus dem Gewebe extrahiert. Anschließend wurde die RNA-Konzentration mittels



Nanodrop bestimmt und 1  $\mu\text{g}$  RNA mit dem iScript cDNA Synthese Reagenzsystem, nach Herstellerprotokoll, zu cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde, nach erfolgter Reaktion, 1:10 mit  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt. Zur quantitativen RT-PCR Analyse wurden Triplikate vermessen. Da die Wahl der *Housekeeping*-Gene einen starken Einfluss auf die Ergebnisse nehmen kann, wurden 18s rRNA sowie Gapdh (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) verwendet und verglichen (Gong et al., 2016). Jeweils 5  $\mu\text{l}$  cDNA (ca. 500 ng cDNA) wurden in RT-PCR-Platten vorgelegt und anschließend 20  $\mu\text{l}$  Reaktionsmix, bestehend aus 7  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ , je 0.25  $\mu\text{l}$  fw. und rv. Primer (10  $\mu\text{M}$ ) sowie 12.5  $\mu\text{l}$  2x Syber Green, zugegeben. Es wurde 3x mit der Pipette in jeder Probenkammer auf und abgezogen um zu mischen. Anschließend wurde die Platte mit einer Folie versiegelt und für 30 Sekunden bei 1000 x g zentrifugiert, um entstandene Luftblasen zu entfernen. Die Primer wurden dahingehend erstellt, dass sie eine ähnliche Schmelztemperatur besitzen und somit mit dem gleichen Programm vermessen werden können (Tab. 2.11, Tab. 2.12). Die Spezifität der Primer wurde mittels anschließender Schmelzkurvenanalyse überprüft (Abb. A.1). Die Produkte wurden durch Gelelektrophorese auf einem 2 % Agarosegel aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid markiert, um eventuell vorhandene Nebenprodukte zu erkennen, was nicht der Fall war.

Tabelle 2.11: RT-PCR Programm.

Zeit	Temperatur	Wiederholung
15 min	95 °C	
30 s	95 °C	
45 s	60 °C	40x
30 s	72 °C	
3 min	72 °C	

Gen	Sequenz	Strang
18s rRNA	TTG-ACG-GAA-GGG-CAC-CAC-CAG	fw
	GCA-CCA-CCA-CCC-ACG-GAA-TCG	rv
Gapdh	TGC-ACC-ACC-AAC-TGC-TTA-G	fw
	GGA-TGC-AGG-GAT-GAT-GTT-C	rv
Trit1	ATA-ATT-GGT-TVV-TCC-CAC-CA	fw
	CCG-TGG-TGG-ACT-TTA-GGA-AC	rv
Asns	CGC-TTT-GAG-AAT-GTC-AAT-GGA-T	fw
	AAC-AGA-GCC-ACA-AAT-AAG-GGT-A	rv
Fgf21	CTG-GGG-GTC-TAC-CAA-GCA-TA	fw
	CAC-CCA-GGA-TTT-GAA-TGA-CC	rv
Nupr1	ACC-AAG-AGA-GAA-GCT-GCT-GC	fw
	CTC-CCT-CTC-CAG-AAC-CTC-ACT	rv
Hspa8	CTA-CCC-AGA-GGA-AGT-GTC-C	fw
	TTG-GTA-ACG-GTC-TTT-CCG-A	rv
Hspa9	AGC-AAC-AGA-TTG-TAA-TCC-AGT-C	fw
	CTC-AGC-GTA-CTT-CTC-TGC-A	rv
Lonp1	TCT-GAG-TTC-AAT-GTC-ACT-CG	fw
	GTC-CAA-GTT-CTC-ATC-ACT-CTG	rv
Mthfd11	CGA-ACG-ACC-GAT-TTC-TGA-G	fw
	AAT-GTC-AAA-CTG-TGC-CTG-C	rv
Mthfd2	CTT-GGA-CCA-GTA-CTC-TAT-GC	fw
	CCT-AAG-GTT-GGA-ATG-CCT-G	rv
Mthfd2l	GGC-GGG-AAG-ATC-CAA-GAA-CG	fw
	CGC-TAT-CGT-CAC-CGT-TGC-AT	rv
Etf1	GCT-ACA-CTA-GAA-ATT-GTC-ACA-G	fw
	GCA-AGA-TAC-CTC-CAA-TTC-CA	rv
Gtpbp2	GTT-GGC-GGC-TCT-GTG-TGT-TA	fw
	CAC-TGC-CCT-GAA-CCG-TCT-TC	rv
Pelota	CAT-CGA-ACT-GGA-GCC-CAA-CC	fw
	CAT-GAC-CAC-AGC-TGC-CAC-AT	rv
Psat1	TTG-TGA-GGG-AAT-TGC-TAG-CT	fw
	CGT-AGT-CAG-CAC-TCC-TTC-C	rv
Psph	CCG-TCA-TCA-GAG-AAG-AAG-GA	fw
	CTC-TCC-GTG-TCA-TTT-CAG-AC	rv
Shmt2	GGC-AAG-AGA-TAC-TAC-GGA-GG	fw
	ATC-CAG-GTC-AAA-GGC-TTC-C	rv

Tabelle 2.12: Verwendete RT-PCR Primer.

### 2.3.2 AKTIVITÄTSMESSUNG VON TRANSAMINASEN

Die Transaminaseaktivität wurde im Blutserum bestimmt. Hierfür wurde während der Organentnahme frisches Vollblut von Mäusen in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß gesammelt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 15 Minuten bei 2000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das gelb-orangene Serum wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Zur Aktivitätsmessung wurde ein gekoppelter enzymatischer Test verwendet. Pyruvat, das Produkt der Alanin-Aminotransferase (ALT, GPT) aus L-Alanin und  $\alpha$ -Ketoglutarat, wird mit Hilfe des Cofaktors NADH durch LDH (Laktat-Dehydrogenase) reduziert. Die Aktivität kann anhand des verbrauchten NADH (Nicotinamidadenindinukleotid) gemessen werden. Die NADH Menge wird durch Messung der Absorption bei 340 nm bestimmt.

Es wurden 8 ml Reaktionspuffer (100 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.1 mM Pyridoxal-5-Phosphat, 0.105 mM NADH, 1.2 U/mL LDH) auf Eis hergestellt. Die Proben wurden in Triplikaten in einer 96-Well Mikrotiterplatte vermessen, wobei 10  $\mu$ l Probe pro Probekammer vorgelegt wurde. Es wurde außerdem von jeder Probe zusätzlich 10  $\mu$ l in eine weitere Probekammer zur Bestimmung des Leerwertes gegeben. In jede Probekammer wurden 144  $\mu$ l Reaktionspuffer pipettiert. Anschließend wurde 36  $\mu$ l Wasser zu den Leerwerten und 36  $\mu$ l 1 M L-Alanin Lösung zu den Proben gegeben und für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Zum Start der Reaktion wurde 20  $\mu$ l  $\alpha$ -Ketoglutarat als Starter hinzugegeben und direkt die Absorption über 5 Minuten alle 30 Sekunden bei 340 nm in einem Infinite 200

PRO Plattenlesegerät von Tecan gemessen.

Die Absorption sollte idealerweise im Bereich von 0.5 bis 0.9 liegen. Zur Auswertung werden die Absorptionswerte gegen die Zeit in Minuten aufgetragen. Mit Hilfe einer Trendlinie und der Geradengleichung  $y = m * x + c$  kann die Differenz der Absorption  $\Delta A_{340}$  zwischen Minute 2 und Minute 3 berechnet werden, indem diese Werte für  $x$  eingesetzt werden. Der erhaltene  $\Delta A_{340}$ -Wert wird mit folgender Formel zur Berechnung der Aktivität verwendet:

$$ALT(U/ml) = \frac{\Delta A_{340} \text{min}^{-1} * 0.21 \text{ml}}{3.5 \text{mM}^{-1} * 0.01 \text{ml}}$$

Der Extinktionskoeffizient von NADH beträgt  $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  und muss an die Höhe der Flüssigkeit im Well angepasst werden. In den in dieser Arbeit verwendeten Platten ist die Höhe der Flüssigkeit  $0.562 \text{ cm}$ , was einem Extinktionskoeffizienten von  $3.50 \text{ mM}^{-1}$  entspricht.

### 2.3.3 PROTEINAUFREINIGUNG

Zur Überexpression des jeweiligen Proteins wurden BL21Star *E. coli* Stämme mit den entsprechenden Vektoren transformiert (Tab. 2.3, Abb. 2.4). Anschließend wurden die Bakterien auf ampicillinhaltigen LB-Agar Platten ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) ausplattiert und über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Kolonie gestochen und in  $10 \text{ ml}$  ampicillinhaltiges LB-Medium ( $100 \mu\text{g/ml}$  Ampicillin) gegeben. Diese Vorkultur wurde über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  und  $120 \text{ rpm}$  inkubiert. Tags darauf wurde  $1 \text{ l}$  ampicillinhaltiges LB-Medium ( $100 \mu\text{g/ml}$

Ampicillin) mit der Vorkultur versetzt und die Translation des TRIT1 Proteins bei OD600 = 0.6 mit IPTG (1 mM) gestartet. Nach 12 h Inkubation bei 37 °C und 120 rpm wurden die Bakterien bei 6000 x g und 4 °C für 15 Minuten pelletiert und in Waschpuffer I (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol und 10 % Glycerol) resuspendiert. Nach Ultraschallbehandlung (auf Eis, 5 x 10 Sekunden Stöße, 30 Sekunden Pause zwischen den Stößen zur Abkühlung) wurde die Suspension bei 4 °C und 12000 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Zwischenzeitlich wurden 2 ml Ni-NTA Lösung in eine Säule gegeben, das Ethanol entfernt, und die Säule zweimal mit Waschpuffer I gewaschen. Der Überstand der Suspension wurde anschließend auf die gewaschene Ni-NTA Säule geladen und über Nacht bei 4 °C bei langsamer Rotation inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit 30 ml Waschpuffer I und anschließend mit 10 ml Waschpuffer II (wie Waschpuffer I mit 60 mM Imidazol) gewaschen. Nachfolgend wurde mit 10 ml Elutionspuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 250 mM Imidazol und 10 % Glycerol) in verschiedenen Fraktionen eluiert. Ein 12 % Polyacrylamidgel wurde mit 20 µl der Proben beladen und eine Stunde bei 200 aufgetrennt. Anschließend wurde das Polyacrylamidgel mit Commassie-Brillant-Blau angefärbt (Abb. 3.1 und Abb. 3.2). Die reinsten Elutionsfraktionen wurden vereint und mit Hilfe von Amicon Ultra Säulen in 1 x PBS gepuffert und auf ein Gesamtvolumen von 400 µl aufkonzentriert (jeweils 5 Minuten bei 7500 x g und 4 °C, mehrmals wiederholt). Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem Pierce-BCA Reagenzsystem wurde das Protein in je 10 µl pro Reaktionsgefäß aliquotiert und nach Schockfrostung in flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert.



Abbildung 2.4: Schema des rekombinanten Trit1. Mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. Noelia Fradejas Villar.

#### 2.3.4 ENZYMKINETIK VON TRIT1

Bei der Isopentenylreaktion wird eine Isopentenylgruppe von Dimethylallylpyrophosphat durch TRIT1 auf Adenosin an Position 6 der Base übertragen (Abb. 6). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein in unserem Labor bereits bestehende Methode dahingehend erweitert, dass die Enzymkinetik gemessen werden kann. Die Messung der Menge isopentenylierter Adenosine wird durch radioaktiv  $^{14}\text{C}$  markiertes DMAPP ermöglicht. Als Substrate dienen einerseits  $^{14}\text{C}$  DMAPP und andererseits verschiedene RNA-Oligonukleotide, welche identisch mit den Anticodonschleifen verschiedener tRNAs sind (Tab. 2.13). Als Negativkontrolle wurde ein tRNA<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup>(UCA)-ASL mit einem Basentausch von A zu G an Position 37 verwendet.

Zur Messung der Kinetik wurden die Bedingungen so gewählt, dass die ASL als limitierender Faktor vorliegen. DMAPP und TRIT1 sind im Überschuss vorhanden. Die ASL wurden in neun verschiedenen Konzentrationen im Bereich von 100 pM bis 10  $\mu\text{M}$  in Triplicaten vermessen. Zuerst wurde der Reaktionspuffer, bestehend aus 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT, 2.5 U/ml Pyrophosphatase (zur Verhinderung einer möglichen Rückreaktion) und 20 U/ml Riboblock RNase Inhibitor hergestellt. Anschließend wurden

ASL	Sequenz	Zellkpartment
Ser (UGA)	GA-UGG-ACU- <b>UGA</b> -AAU-CCA-UU	Cytoplasma
Ser (AGA)	GA-UGG-ACU- <b>AGA</b> -AAU-CCA-UU	
Ser (CGA)	GU-UGG-ACU- <b>CGA</b> -AAU-CCA-AU	
Sec (UCA)	UG-CAG-GCU- <b>UCA</b> -AAC-CUG-UA	
Sec (UCA A37G)	UG-CAG-GCU- <b>UCA</b> -GAC-CUG-UA	
Cys (CGA)	AU-UGA-AUU- <b>GCA</b> -AAU-UCG-AA	Mitochondrium
Ser (UGA)	GG-UUG-GCU- <b>UGA</b> -AAC-CAG-CU	
Trp (UCA)	AA-GAG-CCU- <b>UCA</b> -AAG-CCC-UC	
Phe (GAA)	AA-UAC-ACU- <b>GAA</b> -AAU-GUU-UA	
Tyr (GUA)	AU-UGG-ACU- <b>GUA</b> -AAU-CUA-AA	

Tabelle 2.13: Zur Aktivitätsmessung von TRIT1 verwendete Anticodonschleifen.

die verschiedenen Konzentrationen ASL in jeweils 5  $\mu\text{l}$  Reaktionspuffer in 1.5 ml Reaktionsgefäße vorgelegt, mit 0.6 nmol (12  $\mu\text{M}$ ) TRIT1 Enzym versetzt sowie mit Reaktionspuffer auf 50  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. In einem 2 ml Reaktionsgefäß wurden 49.5  $\mu\text{l}$  Reaktionspuffer pro Probe vorgelegt, und mit 0.5  $\mu\text{l}$   $\text{C}^{14}$ -DMAPP (9.1  $\mu\text{M}$ ) pro Probe versetzt.

Die Proben wurden im Thermoblock für 5 min auf 37 °C vorgewärmt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  DMAPP-Lösung und 30 Sekunden schütteln bei 700 rpm gestartet und bei 37 °C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde 100  $\mu\text{l}$  eiskalte 10 % wässrige TCA-Lösung zugegeben und der gesamte Inhalt jedes Reaktionsgefäßes auf ein 3 cm x 3 cm großes Stück 0.83 mm Whatman-Filterpapier gegeben und 10 Minuten an der Luft getrocknet. Anschließend wurden die Filterpapiere jeweils zweimal für 10 Minuten in 10 % TCA-Lösung, zweimal für 10 Minuten in 95 % Ethanol und einmal für 10 Minuten in Diethylether gewaschen. Zwischen den einzelnen Waschsritten wurde 10 Minuten an der Luft getrocknet. Nach dem letzten Waschsritt wurden die Proben nach 30-minütiger

Lufttrocknung mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit in einem Counterröhrchen versetzt und die Radioaktivität mit einem Beckmann LS 6500 Szintillationszähler gemessen. Das verwendete Programm misst die Radioaktivität jeweils 10 Minuten pro Röhrchen.

### 2.3.5 ISOLATION DER MITOCHONDRIEN UND MESSUNG DER KOMPLEXAKTIVITÄT

Die Präparation und Analyse der Mitochondrien wurde in Kollaboration mit Arbeitsgruppe von Prof. Wolfram Kunz von Dr. Alexei Kudin in Bonn durchgeführt. Mitochondrien aus der Leber wurden, mit kleinen Abweichungen, nach dem Protokoll von Steinbrecht und Kunz präpariert (Steinbrecht and Kunz, 1970). Hierbei wurden die Mäuse mit Chloroform anästhesiert und durch Enthauptung getötet. Die Leber wurde direkt in eiskalte Lösung A (0.3 M Sucrose, 3 mM EGTA pH 7.4) gegeben und das Blut durch leichtes schütteln entfernt. Anschließend wurde die Leber in 30 ml Lösung A gegeben und bei 600 U/s mit einem Potter Homogenisator homogenisiert. Das Homogenat wurde danach für 5 Minuten mit 900 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde durch ein Seihtuch gepresst und für 10 Minuten bei 12000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml eiskalter Lösung B (0.3 M Sucrose pH 7.4, eingestellt mit kleiner Menge Tris-Base) gelöst und in einen kleinen Glashomogenisator überführt und 10-12 x manuell zu einer homogenen Suspension homogenisiert. Zum Schluss wurde die Suspension 10 Minuten bei 12000 x g zentrifugiert und das Pellet in Lösung B gelöst, wobei 160  $\mu$ l Lösung pro 1 Gramm Pellet verwendet wurde.

Enzymaktivitäten der Enzyme der Atmungskette (rotenonsensitive NADH-CoQ1 Oxidoreduktase (Komplex I), Cytochrom-c-Oxidase (COX, Komplex IV) und Citrat-Synthase



wurden spektrophotometrisch im Homogenat nach Standardmethoden gemessen (Wiedemann et al., 2000). Um mögliche Effekte durch mitochondriale Proliferation zu negieren, wurden die Daten gegen den mitochondrialen Marker Citrat-Synthase normalisiert.

#### 2.3.6 3'-SEQUENZIERUNG

Die RNA wurde mit Hilfe von TRIzol Reagenz, nach Herstellerprotokoll, aus dem Gewebe extrahiert. Die weitere Bearbeitung, wie die Erstellung der Bibliothek und die anschließende Sequenzierung, wurde durch die zentrale Einrichtung *Next Generation Sequencing* der medizinischen Fakultät der Universität Bonn, mit freundlicher Hilfe von Dr. André Heimbach, durchgeführt. Die Bibliothek wurde mit dem *QuantSeq 3' mRNAseq Library Prep Kit FWD* von Lexogen erstellt und mit einer Illumina HiSeq 2500 Sequenziermaschine für 50 Zyklen im Einzelende-Modus sequenziert.

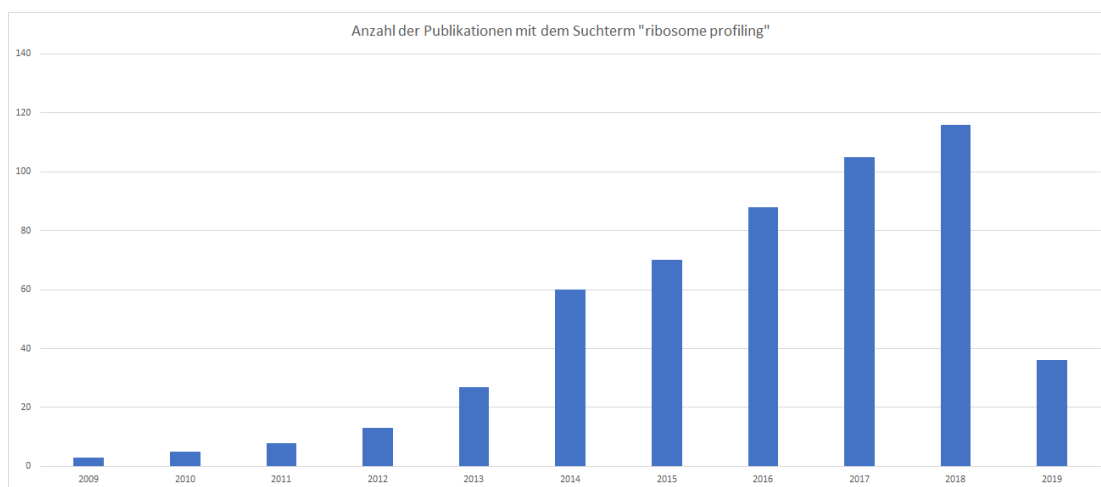
#### 2.3.7 RNA-SEQUENZIERUNG

Es wurden 30 mg Gewebe in 1.5 ml Qiazol Reagenz homogenisiert und die RNA mit dem *RNeasy Mini Kit* nach Herstellerprotokoll extrahiert. Die anschließende Bearbeitung der Proben wurde von Dr. Brian Dalley, Mitarbeiter der Sequenzierereinrichtung der Universität von Utah (USA), durchgeführt. Die rRNA wurde mit dem *Ribo-Zero Gold rRNA Removal Kit* von Illumina aus den Proben entfernt. Die Proben wurden anschließend durch Zugabe von 30 mM MgCl<sub>2</sub> und 8 Minuten bei 94 °C fragmentiert. Anschließend wurden die fragmentierten RNA-Oligonukleotide mit T4 Polynukleotid-Kinase und ATP behandelt, um

die Enden für die Ligationsreaktion vorzubereiten. Die Bibliothek wurde mit dem *NEBNext Small RNA Library Prep Set* für Illumina Sequenziermaschinen erstellt. Nach der Erstellung der Bibliothek wurde ein Pippin Prep zur Größenselektion der Fragmente verwendet, wobei Fragmente zwischen 20 und 40 Nukleotide extrahiert wurden. Die selektierten Fragmente wurden anschließend 50 Zyklen auf einer Illumina HiSeq 2000 Sequenziermaschine im Einzelende-Modus sequenziert.

#### 2.3.8 RIBOSOMALES PROFILING

Ribosomales Profiling erlaubt eine genomweite, nukleotidgenaue Aufnahme der Position aller mRNA-besetzenden Ribosomen (Ingolia et al., 2009). Es ist dabei unerheblich ob diese Ribosomen translatierend sind oder sich in den UTR Bereichen aufhalten. Mitochondriale Ribosomen können ebenfalls erfasst werden (Rooijers et al., 2013). Aufgrund des detaillierten und umfassenden Einblickes und sinkender Kosten für Sequenzierungen wird diese Methode immer populärer (Abb. 2.5). Durch den Einsatz von RNAsen werden alle freien RNA Bereiche, welche nicht von Ribosomen geschützt werden, verdaut. Die geschützten mRNA-Oligonukleotide (RPFs, *Ribosome Protected Fragments*) werden anschließend aufgereinigt, extrahiert und sequenziert. Je nach verwendeter RNase werden, durch unterschiedlich effektiven Verdau in verschiedenen Organismen und Geweben, verschiedene Längenverteilungen beobachtet (Gerashchenko and Gladyshev, 2017). Ebenso unterscheiden sich die RNAsen bei den bevorzugten Schnittstellen (DelCardayré and Raines, 1995). RNase I schneidet jedes Nukleotid gleichmäßig, während z.B. Nuklease T1 nur nach Guaninen schneiden kann (Ge-



**Abbildung 2.5: Anzahl der Veröffentlichungen über Ribosomales Profiling seit Erstpublikation der Methode.**

rashchenko and Gladyshev, 2017). RNase I wird als Standard RNase bei Lebergewebe von Mäusen verwendet. Die Längen cytoplasmatischer RPFs liegen normalverteilt vor und besitzen ein Maximum bei 28 Nukleotiden (Gerashchenko and Gladyshev, 2017). Mitochondriale RPFs hingegen zeigen eine bimodale Verteilung mit Maxima bei 27 und 33 Nukleotiden (Rooijers et al., 2013).

Die Ribosomen können, je nach Fragestellung, mit verschiedenen Translationsinhibitoren arretiert werden. So führt die Inhibierung der Translation mit Cycloheximid (CHX) zu einem Arretieren translatierender Ribosomen durch das Blockieren der Translokation nach erfolgtem Peptidyltransfer. Cycloheximid bindet dabei an die E-Stelle der 60s ribosomalen Untereinheit und interagiert mit der deacetylierten tRNA in der E-Stelle, was in einem Verdrehen der tRNA resultiert (Ju et al., 2010). Dies führt dazu, dass die A-Stelle von einer neuen tRNA besetzt werden kann, welche jedoch nicht mehr von der A-Stelle in die P-Stelle trans-

lokiert, da die tRNA in der E-Stelle den Komplex nicht mehr verlassen kann. Eine Auswirkung auf die Transkription konnte nur bei sehr hohen Dosen CHX gezeigt werden (Ju et al., 2010). Der Einsatz von Harringtonin erlaubt die Arretierung der Ribosomen direkt bei der Initiierung. Durch das Zusammenspiel beider Inhibitoren kann so z.B. die Geschwindigkeit der Translation bestimmt werden, die in Mauszellen ungefähr sechs Nukleotide pro Sekunde beträgt (Ingolia et al., 2011). In Hefe wurde gezeigt, dass sich der Einsatz von Translationsinhibitoren auf die Verteilung und den Zustand der Ribosomen auswirkt (Lareau et al., 2014; Hussmann et al., 2015; Gerashchenko and Gladyshev, 2014). So wurde in Hefe eine neue, kleinere Konformation von Ribosomen mit Längen um 20 Nukleotide gezeigt, welche ohne CHX Behandlung auftreten (Lareau et al., 2014). Dies wurde darauf zurück geführt, dass die inhibierte Translokation bei CHX Behandlung das Ribosom im großen Zustand „einfriert“. Chloramphenicol kann zur Inhibierung mitochondrialer Ribosomen verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit wurden dem Lysepuffer CHX und Chloramphenicol zugesetzt.

#### PROTOKOLL ZUR GEWINNUNG VON RPFs

Lösung	Konzentration
Tris-HCl pH 7.5	50 mM
KCl	1500 mM
MgCl <sub>2</sub>	50 mM

Tabelle 2.14: 5 x Polysomenpuffer zum Ribosomalen Profiling.

Die folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Es wurden 40 mg Gewebe in 1.5 ml Reaktionsgefäße abgewogen und mit 1 ml Lysepuffer versetzt (Tab. 2.15). Anschließend wurden die Proben 2 x 1 Minute mit einem Handhomogenisator homogenisiert. Mit einer 1000

<b>Lösung</b>	<b>Konzentration</b>
5x Polysompuffer	1x
10 % TX-100	1 %
DTT	1 mM
DNase	10 U/ml
Cycloheximid	200 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
Chloramphenicol	100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Tabelle 2.15: Lysepuffer zum Ribosomalen Profiling.

$\mu\text{l}$  Pipette wurde zum Schluss eine Minute durch auf- und abziehen weiter homogenisiert.

Der Verdau wurde durch Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  RNase I gestartet und 60 Minuten bei Raumtemperatur und leichtem schütteln inkubiert. Anschließend wurde der Verdau durch Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  SUPERase In gestoppt und für 10 Minuten bei 4 °C und 15000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und direkt wieder auf Eis gestellt.

<b>Lösung</b>	<b>Konzentration</b>
5x Polysompuffer	1x
77 % Sucrose	50 %
MgCl <sub>2</sub>	3.3 $\mu\text{M}$ %
SUPERase In	20 U/ml
DTT	0.5 mM
Cycloheximid	200 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
Chloramphenicol	100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

Tabelle 2.16: 50 % Sucrosepuffer zum Ribosomalen Profiling.

Während des Verdaus wurde der Sucrosepuffer für die Ultrazentrifugation vorbereitet (Tab. 2.16). Es wurden 220  $\mu\text{l}$  verdautes Lysat in dickwandige Polycarbonatröhrchen zur Ultrazentrifugation vorgelegt. Anschließend wurde das Lysat mit 660  $\mu\text{l}$  des Sucrosepuffers vorsichtig und langsam unterlegt. Jede Probe wurde in zwei Röhrchen präpariert. Die Röhrchen wurden mit einem TLA-110 Rotor in einer Beckman-Coulter Tischzentrifuge bei 100000

rpm und 4 °C für 1 Stunde zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurde die Flüssigkeit mit einer 1000  $\mu$ l Pipette aus den Röhren entfernt, bevor diese aus dem Rotor genommen wurden. Die Ribosomenfraktion ist durch ein weißlich, durchsichtiges Pellet an der Innenwand des Röhrchens zu erkennen. Zur Extraktion der RNA wurden die Pellets in 700  $\mu$ l Quiazol resuspendiert. Die kleinen RNA Fragmente wurden mit dem *miRNeasy Mini Kit* von Qiagen extrahiert. Es wurde in 30  $\mu$ l RNase freiem Wasser eluiert. Anschließend wurde die RNA Menge und Reinheit mittels Nanodrop bestimmt (Tab. 3.1). Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### QUALITÄTSKONTROLLE DES VERDAUS

Die Verdauqualität wurde anhand der Auftrennung der verschieden großen RNA Fragmenten auf einem 15 % Polyacrylamid TBE-Urea Gel bestimmt (Tab. 2.17).

Reagenz	Konzentration
Urea	7.2 g
10 x TBE	1 x
40 % Acrylamid (29:1)	15 %
10 % APS	1 %
TEMED	1 %

Tabelle 2.17: 15 % Polyacrylamid TBE-Urea Gel.

Das Gel wurde gegossen und nach Aushärtung (mind. 30 Minuten) in 1 x TBE Puffer eine Stunde bei 200 V ohne Proben laufen gelassen. Das überschüssige Urea in den Kammern wurde anschließend mit einer 200  $\mu$ l Pipette und 1 x TBE Puffer entfernt. Es wurden insgesamt 900 ng RNA pro Probe mit 2 x Ladungspuffer versetzt und mit H<sub>2</sub>O ein Gesamt-

volumen von 20 ml hergestellt (Tab. 2.18). Nach zweiminütigem Erhitzen bei 95 °C wurden die Proben direkt auf Eis gestellt. Das gesamte Volumen wurde geladen und 1.5 Stunden bei 200 V aufgetrennt. Das Gel wurde für 5 Minuten in 50 ml 1 x TBE Puffer, versetzt mit 5 µl Ethidiumbromid, eingelegt um die Banden mit Hilfe von UV-Strahlung zu visualisieren.

Lösung	Konzentration
Formamid	98 % V/V
EDTA	10 mM
Bromphenolblau	300 µg/ml

Tabelle 2.18: 2x Ladungspuffer für RNA-Gele.

## SEQUENZIERUNG VON RPFs

Die anschließende Bearbeitung der Proben wurde von Dr. Brian Dalley, Mitarbeiter der Sequenzierereinrichtung der Universität von Utah (USA), durchgeführt. Die rRNA wurde mit dem *Ribo-Zero Gold rRNA Removal Kit* von Illumina aus den Proben entfernt. Die fragmentierten RNA-Oligonukleotide wurden mit T4 Polynukleotid-Kinase und ATP behandelt, um die Enden für die Ligationsreaktion vorzubereiten. Die Bibliothek wurde mit dem *NEBNext Small RNA Library Prep Set* für Illumina Sequenziermaschinen erstellt. Nach der Erstellung der Bibliothek wurde ein Pippin Prep zur Größenselektion der Fragmente verwendet, wobei Fragmente mit einer Länge zwischen 20 und 40 Nukleotiden extrahiert wurden. Die selektierten Fragmente wurden anschließend 50 Zyklen auf einer Illumina HiSeq 2000 Sequenziermaschine im Einzelende-Modus sequenziert.

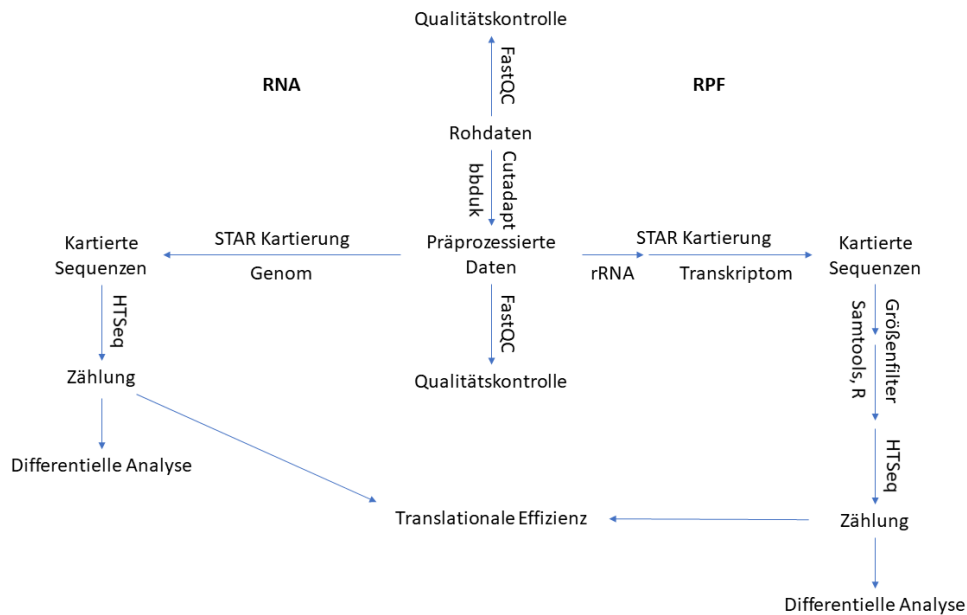
## 2.4 *IN SILICO* METHODEN

In diesem Absatz werden die verwendeten computergestützten Methoden und das generelle Vorgehen einer Sequenzierungsanalyse behandelt (Conesa et al., 2016). Es wird die verwendete Software, sowie die Programmiersprachen mit den verwendeten Paketen aufgelistet. Ein Fokus liegt auf der Beschreibung der Prozessierung von Sequenzierungsdaten und einer detaillierten Erklärung der dafür selbst geschriebenen Programme. Die Unterschiede in der Prozessierung der Daten von Ribo-seq (Ribosomales Profiling), RNA-Seq (RNA-Sequenzierung) und 3'-Sequenzierung (Poly(A) 3'-RNA-Sequenzierung) ist in Abbildung 2.6 dargestellt. Für die Sequenzierungen werden verschiedene Programme zur Kartierung verwendet. Alle Sequenzierungsdaten wurden in der vorliegenden Arbeit mit dem Programm *STAR* kartiert (Dobin et al., 2013).

### 2.4.1 ERHALT UND PRÄPROZESSIERUNG VON REFERENZSEQUENZEN

Die Qualität der prozessierten Daten steigt mit der Qualität des verwendeten Genoms gegen welches die Daten kartiert werden. Zur Analyse der Daten von RNA-Seq und der 3'-Sequenzierung wurde das *Ensemble* Mausgenom *GRCm38* verwendet, um eine möglichst breite Abdeckung des gesamten Genoms zu erhalten (Zerbino et al., 2018). Dieses wird über die *BioMart*-Plattform, oder direkt über den FTP-Server bereitgestellt. Die Qualität des Genoms hängt direkt von der ebenso bereit gestellten Qualität der GTF-Datei ab, in welcher die Informationen zu den einzelnen Genannotationen zu finden sind. Für RNA-Seq genügt





**Abbildung 2.6: Schema zur Analyse von Sequenzierungsdaten.** Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Schritte ist in Kapitel 2.4.1 zu finden.

dies schon zur Analyse.

Ribo-Seq Daten hingegen sollten nicht gegen das gesamte Genom kartiert werden, da die kleinen Oligonukleotidstücke an multiplen Stellen übereinstimmen - auch in Intron Bereichen. Deshalb wurde hierfür ein selbst erstelltes *UCSC GRCm38/mm10 RefSeq*-Transkriptom verwendet, welches über den *NCBI Tablebrowser* erstellt und herunter geladen wurde (Kent et al., 2002; Karolchik et al., 2004). Die Besonderheit des erstellten Transkriptoms besteht darin, dass neben den codierenden Sequenzen ebenfalls die annotierten 3'- und 5'-UTR Bereiche ausgegeben werden. Für jedes Transkript wurden alle bekannten Isoformen extrahiert. Zum Erhalt der Daten müssen die Einstellungen aus Tabelle 2.19 im *NCBI Tablebrowser* verwendet werden.

Anschließend erhält man ein Transkriptom im Fasta-Format, welches neben den codie-

Feld	Eingabe
clade:	Mammal
genome:	Mouse
assembly:	GRCm38/mm10
group:	Genes and Gene Predictions
track:	NCBI RefSeq
table:	UCSC RefSeq (ref-Gene)
clade:	Mammal
region:	genome
output format:	sequence
output file:	transcriptome.fasta
anklicken	get output
auswählen	genomic
auswählen	CDS in upper case, UTR in lower case
abwählen	introns
anlicken	get sequence

**Tabelle 2.19:** Einstellungen des *UCSC Tablebrowser* um die Sequenzen eines Maustranskripts inklusive UTR Bereiche zu erhalten.

renden Sequenzen (Großbuchstaben) ebenfalls die UTR Bereiche (Kleinbuchstaben) enthält. Fasta-Dateien sind so aufgebaut, dass jede Zeile, die mit „>“ beginnt, Informationen (üblicherweise Bezeichner und genomische Koordinaten) über die nachfolgende Sequenz in den nächsten Zeilen enthält. Dies ermöglicht eine große Menge Informationen platzsparend zu erhalten. In der Natur des Transkripts liegt selbstverständlich, dass verschiedene Isoformen eines Transkripts vorkommen können. Um multiple Treffer für ein RPF zu vermeiden, wird das Transkriptom dahingehend verändert, dass nur Isoformen mit der längsten codierenden Sequenz eines Transkripts verwendet werden. Ebenso werden die *NCBI*-Zugangsnummern durch die entsprechenden Gensymbole ersetzt. Hierfür wurden, aufgrund der großen Menge an Informationen, im Rahmen dieser Arbeit ein Skript zur Automati-

sierung geschrieben. Intern wird das Programmpaket *biomaRt* verwendet, um den *NCBI*-Zugangsnummern die richtigen Gensymbole zuzuordnen. Das Skript kann über die Konsole in UNIX-Systemen gestartet werden.

---

```
RScript --vanilla change_transcriptome.R input.fasta output.fasta
```

---

Da in dem so erhaltenen Transkriptom keine Information über die mitochondrial codierten Transkripte vorhanden ist, wurden diese händisch in eine eigene Datei eingefügt. Hierfür wurde über *NCBI* das mitochondriale Genom als Fasta-Datei herunter geladen. Anschließend wurden die codierenden Sequenzen der 13 mitochondrial codierten Proteine in eine Textdatei übertragen und als Fasta-Datei gespeichert. Bei mt-ND1-4, mt-Co3, mt-Atp6 und mt-Cytb mussten, um das Stopcodon zu vervollständigen, ein oder zwei zusätzliche “A“ angefügt werden, was im Mitochondrium durch Polyadenylierung bewerkstelligt wird und deshalb nicht in den Daten zu sehen ist (Temperley et al., 2010).

Durch die Methodik des Ribosomalen Profiling werden nicht nur RPFs sequenziert, sondern auch Verunreinigungen durch hauptsächlich ribosomale RNA, aber auch weiteren kleineren RNA Spezies wie tRNA, miRNA und snoRNA. Zwar wird die rRNA vor der Sequenzierung während der Präparation entfernt, was jedoch nicht vollständig gelingt. Je nach Spezies können zwischen 30 % bis 70 % der sequenzierten Oligonukleotide rRNA sein (McGlincy and Ingolia, 2017). Deshalb ist es außerordentlich wichtig die Daten vor der eigentlichen Transkriptomkartierung zuerst von rRNA und anderen, kleinen RNA Spezies bioinformatisch zu reinigen. Hierfür wurde die *RNACentral*-Datenbank verwendet, welche vom Euro-

päischen Bioinformatischen Institut (EMBL-EBI) entwickelt wurde und koordiniert wird. Die Datenbank enthält Informationen über nicht codierende RNA Spezies. Sequenzen von rRNA, tRNA, snoRNA, miRNA und snRNA wurden im Fasta-Format herunter geladen. Um dies zu bewerkstelligen wurde folgender Befehl in der Suchleiste verwendet:

---

```
RNA AND TAXONOMY:"10090" AND (rna_type:"tRNA" OR rna_type:"rRNA" OR  
rna_type:"snoRNA" OR rna_type:"miRNA")
```

---

Durch die Verbindung der einzelnen Suchbegriffe durch logische Operatoren werden nur Sequenzen angezeigt, welche RNA Spezies sind und in der Maus vorkommen und entweder tRNA, rRNA, snoRNA oder miRNA zugeordnet sind. Insgesamt werden mit dieser Konfiguration 8633 Sequenzen im Fasta-Format bereitgestellt.

#### 2.4.2 INDEXIERUNG VON REFERENZDATEN

Um eine schnelle und effiziente Kartierung zu gewährleisten, müssen die Fasta-Dateien einmalig mit den entsprechenden Kartierungsprogrammen indexiert werden.

##### *STAR* Indexierung der Transkriptomdateien

---

```
STAR --runThreadN 8 --runMode genomeGenerate --genomeDir path/to/output  
--genomeFastaFiles path/to/transcriptome.fasta
```

```
STAR --runThreadN 8 --runMode genomeGenerate --genomeDir path/to/output  
--genomeFastaFiles path/to/ncRNAs.fasta
```

```
STAR --runThreadN 8 --runMode genomeGenerate --genomeDir path/to/output  
--genomeFastaFiles path/to/chrM.fasta --genomeSAindexNbases 5
```

---

### *STAR* Indexierung des Genoms

---

```
STAR --runThreadN 64 --runMode genomeGenerate --genomeDir path/to/genome  
--genomeFastaFiles path/to/genome/genome.fa --sjdbGTFfile path/to/gtf/genome.gtf  
--sjdbOverhang 49
```

---

Je nach Stärke des verwendeten Rechners kann die Option *runThreadN* angepasst werden. Die Zahl gibt die Anzahl zu verwendeter Kerne an und wird durch den Rechner limitiert. Da *STAR* bei Verwendung des Genoms auch Exon-Exon Junctions erkennen kann, muss die Option *sjdbOverhang* an die entsprechende Nukleotidlänge, welche bei der Sequenzierung verwendet wurde, angepasst werden (Nukleotidlänge -1). Sollten andere Daten mit anderer Nukleotidlänge analysiert werden, muss das verwendete Genom nochmals mit dem geänderten Wert indexiert werden, da sonst Einbußen der Kartierungsqualität zu erwarten sind.

Durch die, im Vergleich zum Transkriptom, immens größere Informationsdichte des Genomes ist es empfehlenswert, die Indexierung und Kartierung mit *STAR* auf einem geeigneten Server zu berechnen. Es werden, je nach Größe des Genoms, bis zu 100 GB Arbeitsspeicher verwendet. Die Berechnungen wurden deshalb auf dem *RWTH Compute Cluster* in Aachen durchgeführt. Aufgrund der geringeren Größe des Transkriptoms und der damit einhergehenden Verringerung der benötigten Rechenleistung kann ein handelsüblicher Desktop PC mit mindestens 16 GB Arbeitsspeicher verwendet werden. Im Rahmen dieser Arbeit

wurde die Berechnungen und nachfolgende Analysen auf einem Mac Mini (Late 2014) mit 16 GB Arbeitsspeicher durchgeführt.

### 2.4.3 QUALITÄTSKONTROLLE VON SEQUENZIERUNGSDATEN

Nach der Sequenzierung wird zuerst die Qualität der Rohdaten überprüft. Zur Qualitätskontrolle wurde das Programm *FastQC* verwendet (Andrews, 2010).

---

```
fastqc input.fq.gz -o /fastqc
```

---

Dieses Programm untersucht die Qualität der Rohdaten nach verschiedenen Aspekten, um anschließend eine Übersichtdatei zu erstellen. Hierbei werden unter anderem die Größenverteilung der Reads, der GC-Gehalt, die Qualität der einzelnen Basen sowie der Anteil von Adaptersequenzen dargestellt. Ebenso können die Ergebnisse Hinweise auf Probleme bei der Präparation der Sequenzbibliothek geben, wie etwa einen erhöhten Wert an duplizierten Sequenzen, was auf zu geringe Probenmenge und zu oft wiederholte PCR-Amplifikation hindeutet. Dies erlaubt eine erste Abschätzung der Qualität der Sequenzierung. Hierbei gilt zu beachten, dass Ribo-Seq Daten eine scheinbar schlechtere Qualität im Vergleich zu RNA-Seq Daten besitzen. So kann z.B. der GC-Gehalt vom Optimum abweichen, was aber nicht unbedingt eine schlechte Qualität der Daten zu bedeuten hat. Die Anzahl duplizierter Sequenzen ist ebenfalls erhöht, was an der geringeren Länge der Sequenzen liegt.

#### 2.4.4 PRÄPROZESSIERUNG VON SEQUENZIERUNGSDATEN

Bevor die Rohdaten kartiert werden können, müssen diese von Adaptoren, überstehenden Basen und Verunreinigungen befreit werden. Ebenso werden Sequenzen entfernt, die sich unterhalb eines bestimmten Qualitätslimits befinden. Die Rohdaten werden i.d.R. im Fastq-Format gespeichert. In diesem Format ist die Sequenzierungsqualität für jede einzelne Base dargestellt. Diese Qualitätsinformation wird in einen sogenannten *Phred-Score* umgerechnet, der sich in einer Skala zwischen 0 und 100 bewegt. Ein *Phred-Score* von 10 bedeutet, dass die Base mit einer Wahrscheinlichkeit von 90 % richtig sequenziert wurde. Standardmäßig werden Reads mit einem Phred-Score kleiner 20 (99 % Chance) entfernt.

Anschließend werden die Daten nach Adaptersequenzen untersucht, welche ebenfalls entfernt werden. Zuletzt werden nur Reads behalten, welche eine Mindestgröße besitzen. Bei Ribo-Seq Daten wurde die Mindestgröße auf 17 Nukleotide, bei RNA-Seq Daten auf 20 Nukleotide festgelegt. Zur Präprozessierung wurden, je nach verwendeter Sequenzierungsmethode, verschiedene Anwendungen genutzt. 3'-Sequenzierungsdaten wurden mit dem Programm *bbduk* anhand der Vorgabe des QuantSeq Reagenzsystem Herstellers Lexogen präprozessiert (Bushnell, 2014). Für RNA-Seq und Ribo-Seq Daten wurde hingegen *TrimGalore* mit *Cutadapt* verwendet (Martin, 2014). Dieses Programm bietet die Möglichkeit, verschiedene Adapter automatisch zu erkennen und zu entfernen. *Cutadapt* bietet des Weiteren die Möglichkeit einer Multiprozessorunterstützung. Ebenso werden weitere Optionen geboten. *stringency* gibt an, wie viele Basen mit der Adaptersequenz übereinstimmen müssen, bis die-

se Teilequenz als Adapter erkannt und somit entfernt wird. Nach Beendigung des Prozesses wird eine Statistik mit Anzahl der entfernten Basen und Adapter ausgegeben. Übrig bleibt dann die Sequenz von 5' bis zur letzten Base 3' vor der identifizierten Adaptersequenz. Es werden nicht nur Adapter geschnitten, sondern auch Basen mit erhöhter Wahrscheinlichkeit eines Sequenzierfehlers entfernt. Die Programme erlauben die Bearbeitung von komprimierten Fastq-Dateien, was an der Dateiondung *.fq.gz* zu erkennen ist. Dies vermindert den benötigten Speicherplatz immens.

### 3'-Sequenzierung

---

```
sh bbduk.sh in=input.fq.gz out=output.fq.gz int=f ref=polyA.fa.gz,truseq_rna.fa.gz k=13 ktrim=r  
useshortkmers=t mink=5 qtrim=r trimq=20 minlength=20 -Xmx20g
```

---

### RNA-Seq

---

```
trim_galore input.fq.gz --output_dir --length 20 --stringency 5 --quality 20 --cores 4
```

---

### Ribo-Seq

---

```
trim_galore input.fq.gz --output_dir --length 17 --stringency 5 --quality 20 --cores 4
```

---

## 2.4.5 KARTIERUNG VON SEQUENZIERUNGSDATEN GEGEN REFERENZSEQUENZEN

Die präprozessierten Daten wurden anschließend zur Kartierung gegen die Referenzdateien verwendet. Wie bereits erwähnt wurde, ist es essentiell wichtig Ribo-Seq Daten vor der eigentlichen Kartierung von vorhandener, nicht-codierender RNA zu reinigen. Hierbei wer-



den alle Sequenzen, welche mindestens einmal gegen eine Sequenz der nicht kodierenden RNA Spezies kartieren, herausgefiltert. Die übrig gebliebenen Sequenzen sind dementsprechend anderen Ursprungs und wurden zur weiteren Bearbeitung gespeichert. In einem zweiten Schritt wurden diese echten RPFs gegen das Referenztranskriptom kartiert. *STAR* hat eine große Auswahl an Optionen, die eine Feinabstimmung der Kartierung ermöglichen. Die Schnelligkeit von *STAR* beruht auf dem zugrunde liegenden Algorithmus, der sogenannten *multiseed*-Heuristik. Hier werden alle Sequenzen in kleinere Sequenzen geteilt und diese gegen die Referenzsequenzen kartiert. Je kleiner hierbei die Sequenz ist, desto schneller kann die Kartierung erfolgen. Hierbei kommt es selbstverständlich zu einer Abwägung zwischen Geschwindigkeit und Genauigkeit, auf welche über verschiedene Parameter eingegriffen werden kann. Wie bereits erwähnt, spielt die Länge der Untersequenz eine tragende Rolle, ebenso wie die Anzahl an Nichtübereinstimmungen einzelner Basen.

Eine weitere wichtige Option ist die Auswahl des Kartierungsalgorithmus. *STAR* erlaubt die Auswahl zwischen lokaler und Ende-zu-Ende Kartierung. Der Unterschied besteht darin, dass bei einer lokalen Kartierung die Basen an den 5'- und 3'-Enden nicht unbedingt perfekt kartiert werden müssen um den höchsten Kartierungswert zu erhalten. Im Gegensatz dazu ist *STAR* bei der Ende-zu-Ende Kartierung gezwungen, immer die gesamte Sequenz von der ersten bis zur letzten Base zur Berechnung des Kartierungswertes zu verwenden. Die Nutzung der lokalen Kartierung negiert ein wenig Ungenauigkeiten bei der Adapterentfernung und Sequenzierung. Für RNA Sequenzierungen kann, aufgrund der Länge der Sequenzen, der

Kartierungsalgorithmus weniger stringent eingestellt werden als bei den RPFs, wo es überaus wichtig ist den nukleotidgenauen Ursprung zu ermitteln.

## Ribo-Seq

---

### ### KARTIERUNG GEGEN KLEINE RNA SPEZIES

```
STAR --runThreadN 4 --genomeLoad LoadAndKeep --genomeDir path/to/ncRNA/index
--readFilesIn input_unmapped.fq.gz --readFilesCommand zcat
--outFilterMismatchNoverLmax 0.05 --outFilterScoreMinOverLread 0
--outFilterMatchNminOverLread 0 --alignIntronMax 1 --scoreGap 1000000
--alignEndsType EndToEnd --seedSearchStartLmax 15 --outFileNamePrefix
outfile_ncRNA --outSAMtype BAM Unsorted --outReadsUnmapped Fastx
```

### ### KOMPRESSION DER UNKARTIERTEN SEQUENZEN VON .fq ZU .fq.gz

```
pigz -p 8 input_unmapped.fq --fast
```

### ### QUALITÄTSKONTROLLE

```
fastqc input_unmapped.fq.gz -o /fastqc
```

### ### KARTIERUNG GEGEN TRANSCRIPTOM

```
STAR --runThreadN 4 --genomeLoad LoadAndKeep --genomeDir path/to/transcriptome/index
--readFilesIn input_unmapped.fq.gz --readFilesCommand zcat
--outFilterMismatchNoverLmax 0.05 --outFilterScoreMinOverLread 0
--outFilterMatchNminOverLread 0 --alignIntronMax 1 --scoreGap 1000000
--alignEndsType EndToEnd --seedSearchStartLmax 15 --outFileNamePrefix outfile_CDS
--outSAMtype BAM Unsorted
```

---

Um mehrere Proben schnell nacheinander kartieren zu können bietet *STAR* die Option *genomeLoad*, welche es erlaubt das Genom im Zwischenspeicher zu behalten. Mit *read-*

*FilesCommand zcat* teilt man dem Programm mit, dass komprimierte Dateien zur Bearbeitung verwendet werden. Die eigentlichen Kartierungseinstellungen finden sich in den sieben Optionen *outFilterMismatchNoverLmax 0.5*, *outFilterScoreMinOverLread 0*, *outFilterMatchNminOverLread 0*, *alignIntronMax 1*, *scoreGap 1000000*, *alignEndsType EndToEnd* und *seedSearchStartLmax 15*.

Die Anzahl an erlaubten Nichtübereinstimmungen wird hier flexibel in Abhängigkeit der entsprechenden Sequenzlänge festgelegt. Der Wert bei *outFilterMismatchNoverLmax* gibt das höchste erlaubte Verhältnis von Nichtübereinstimmungen zur Gesamtzahl der Nukleotide der kartierten Sequenz an. So ist ab einer Länge von 20 Nukleotiden eine Nichtübereinstimmungen erlaubt. Mit *outFilterScoreMinOverLread* und *outFilterMatchNminOverLread* können Qualitätsfilter der Kartierung angelegt werden, welche ebenfalls in Abhängigkeit der Sequenzlänge stehen. Bei 0 werden alle Sequenzen mit den zugehörigen Qualitätswerten ausgegeben. Diese können auch noch nachträglich entfernt werden.

*alignIntronMax 1* führt zur Nichtbeachtung von Kartierungen, die sich über ein Intron spannen. Im Falle der RPFs wird gegen ein Transkriptom kartiert, welches keine Introns enthält, weshalb diese Option in diesem Fall nicht zwingend notwendig ist. Bei Kartierungen gegen das Genom sollte dieser Option jedoch Beachtung geschenkt werden, weshalb sie hier auch genannt wird.

Bei der Berechnung des Qualitätswerts gibt es verschiedene Faktoren, die sich negativ auswirken. Einerseits Nichtübereinstimmungen, welche wie oben gezeigt definiert wurden. Ein

weiterer Faktor ist die Anzahl an erstellten Lücken, um eine bestmögliche Kartierung mit möglichst vielen Übereinstimmung zu erhalten. Je nach Anwendung, wie z.B. bei der Suche nach SNPs, macht es Sinn, Lücken zu erlauben. Durch die benötigte nukleotidgenaue Auflösung wurde bei der Kartierung von RPFs auf die Möglichkeit von Lücken verzichtet. Deshalb wurde die Strafe zum Eröffnen einer Lücke mit *scoreGap* 1000000 extrem hoch gesetzt um diese zu verhindern.

Eine ebenfalls sehr konservative Herangehensweise wurde bei der Option des Kartierungsalgorithmus gewählt. *STAR* erlaubt die Auswahl zwischen verschiedenen Modi. So kann bestimmt werden, dass Sequenzen immer vom ersten Nukleotid bis zum letzten Nukleotid beachtet werden müssen. Diese Methode wurde hier auch mit der Option *alignEndsType EndToEnd* gewählt. Es besteht aber auch die Möglichkeit diesen Zwang zu lockern um so z.B. die 5'- und 3'-Enden nicht beachten zu müssen, welche häufiger von Sequenzierungsfehlern betroffen sind.

Die letzte Einstellung, *seedSearchStartLmax* 15, wirkt sich auf die Genauigkeit des Kartierungsalgorithmus aus, indem die Sequenzen zur Kartierung in gleich große Stücke geteilt werden. Je größer die zu kartierenden Sequenzen sind, desto größer kann dieser Wert gewählt werden.

## RNA-Seq

---

```
STAR --genomeLoad LoadAndKeep --genomeDir /path/to/StarIndex --readFilesIn
input_trimmed.fq.gz --outFileNamePrefix alignment.bam --runThreadN 64 --outSAMtype
BAM Unsorted --readFilesCommand zcat
```

---

Die Kartierung von RNA-Seq Daten kann mit den Standardeinstellungen von *STAR* durchgeführt werden. Da gegen das ganze Genom kartiert wird und *STAR* auch über Introns hinweg kartieren kann, können Informationen über z.B. Spleißvarianten ebenfalls erhalten werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Daten zur einfachen Expressionsanalyse verwendet.

### 3'-Sequenzierung

---

```
STAR --genomeLoad LoadAndKeep --genomeDir /path/to/StarIndex --runThreadN 64
--readFilesIn input_trimmed.fq.gz --outFilterType BySJout --outFilterMultimapNmax 20
--alignSJoverhangMin 8 --alignSJDBoverhangMin 1 --outFilterMismatchNmax 999
--outFilterMismatchNoverLmax 0.1 --alignIntronMin 20 --alignIntronMax 1000000
--outSAMattributes NH HI NM MD --outSAMtype BAM Unsorted --outFileNamePrefix
alignment.bam --readFilesCommand zcat
```

---

Durch die unterschiedliche Präparation der Bibliothek vor der Sequenzierung muss für die Kartierung der 3'-Sequenzierungsdaten von den Standardeinstellungen abgewichen werden. Da aufgrund der Sequenzierungsmethode keine Exon-Junctions zu erwarten sind, werden alle Sequenzen mit *outFilterType BySJout* herausgefiltert, die solche Eigenschaften zeigen.

*outFilterMultimapNmax 20* stellt den Filter für multiple Kartierungen einer Sequenz dar. Wenn eine Sequenz mehr als 20 verschiedene Kartierungen im Genom besitzt, wird diese nicht ausgegeben.

Auch hier werden mit *outFilterMismatchNoverLmax 0.1* Nichtübereinstimmungen von Nukleotiden als variabler Filter in Abhängigkeit der Sequenzlänge verwendet.

Introns werden mit *alignIntronMin* 20 (minimale Nukleotidlänge die ein Intron haben muss, um als Intron und nicht als Deletion definiert zu werden) und *alignIntronMax* 1000000 (maximale Länge eines Introns) definiert.

#### 2.4.6 POSTPROZESSIERUNG KARTIERTER SEQUENZEN

Die ausgegeben Kartierungsdaten werden von *STAR* im BAM-Format gespeichert, welches von dem Programm *samtools* gelesen werden kann (Li et al., 2009). In diesem Format werden alle Informationen jeder kartierten Sequenz zeilenweise dargestellt. Informationen sind unter anderem das entsprechende Gen, die Position der Kartierung im Genom oder Transkriptom, die Sequenz und die Qualität der Kartierung. *Samtools* erlaubt verschiedene Bearbeitungen an den Kartierungsdaten durchzuführen, wie z.B. filtern und sortieren. Ebenfalls kann die Qualität der Kartierung jeder einzelnen Sequenz (*MapQ*-Werte) ausgelesen werden. Diese *MapQ*-Werte setzen sich aus verschiedenen Qualitätsmarkern zusammen: u.a. aus den *Phred-Scores* jeder einzelnen Base der Kartierung, der Anzahl an Lücken zum Erreichen des besten Wertes, der Anzahl an Nichtübereinstimmungen und der Anzahl der verschiedenen Kartierungsmöglichkeiten einer einzelnen Sequenz in den Referenzsequenzen. Je öfter eine Sequenz gleichzeitig an mehrere Sequenzen in der Referenz kartiert, desto schlechter wird dieser Wert. Vor der eigentlichen Filterung wurden die Daten mit *samtools* sortiert.

---

```
samtools sort -o output_sorted.bam input.bam
```

---

Kartierungen von RNA-Seq und 3'-Sequenzierungsdaten können anschließend direkt

mit dem Programm *HTSeq* gezählt werden, um eine anschließende differentielle Analyse durchzuführen (Anders et al., 2015). Hierbei erkennt das Programm, ob kartierte Elemente eindeutig einem Gen zugeordnet werden können.

---

```
htseq-count -a 10 --nonunique none -f bam input_sorted.bam /path/to/genome.gtf > counts.txt
```

---

*HTSeq* bietet durch verschiedene Optionen die Möglichkeit, auf die Zählung Einfluss zu nehmen. Wichtig ist hierbei, wie *HTSeq* Sequenzen mit multiplen Kartierungen behandelt. Mit der Standardoption *nonunique none* werden nur Sequenzen mit eindeutiger Kartierung zu einer Referenzsequenz gezählt. Kartierungen zu multiplen Referenzen oder Kartierungen, welche sich über zwei Referenzsequenzen ausbreiten, werden nicht berücksichtigt. Ebenso werden alle Sequenzen mit einem *MapQ-Score* kleiner 10 nicht berücksichtigt. Die Expressionsstärke des entsprechenden Gens wird mit der Anzahl der kartierten Elemente gleichgesetzt. Das Programm liefert am Ende jedes Durchlaufs eine statistische Übersicht der Zuordnung aller Kartierungen, sowie die Anzahl aller Sequenzen, die eindeutig einem Gen zugeordnet werden konnten. Diese Zählung wurde später für die differentielle Analyse von RNA-Seq und 3'-Sequenzierung verwendet.

Ribo-Seq Daten müssen vor der Zählung weiter bearbeitet werden, da nur die Größen verwendet werden sollen, welche eindeutig als Ribosomen identifiziert wurden (siehe Kap. 2.4.9). Durch sogenannte *FLAG-Stats* beinhaltet jede Sequenz in der Kartierungsdatei die Information, ob diese nur an eine Stelle oder an mehrere Stellen im Genom kartiert wurde. Falls eine multiple Kartierung besteht, wird die Kartierung mit der höchsten Kartierungs-

qualität (und somit der höchsten Wahrscheinlichkeit) als primäre Kartierung, die anderen als sekundäre Kartierungen bezeichnet. *Samtools* bietet die Option *-F*, mit welcher alle Sequenzen extrahiert werden, die dem entsprechenden *FLAG-Stat* zugeordnet sind. Wichtige *FLAG-Stats* sind u.a. 4 (alle Sequenzen mit einer eindeutigen Kartierung) und 256 (primäre Transkripte). Die Werte können durch Addition kombiniert werden um alle Sequenzen zu extrahieren, welche entweder primär oder eindeutig sind. Unkartierte Reads und sekundäre Kartierungen wurden so aussortiert.

---

```
samtools view input_sorted.bam -q 10 -F 260 | awk '{print $3 "\t" $4 "\t" $10}' > output_cut.sam
```

---

Es wurden alle kartierten Sequenzen mit einer Kartierungsqualität kleiner 10 heraus gefiltert (*-q 10*). Bei einem Wert von 255 werden nur eindeutige Kartierungen extrahiert. Bei 3 oder größer ist eine Sequenz, welche an maximal zwei Stellen kartiert werden konnte, mit einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 50 % an einer Stelle kartiert.

Da Ribo-Seq Daten direkt gegen mRNA Sequenzen kartiert wurden und weiter detailliert analysiert werden sollten, wurden, aus Speicherplatzgründen, die wichtigsten Information aus den Ergebnisdateien der Kartierungen mit Hilfe einfacher Konsolenbefehle heraus extrahiert. Die sortierte BAM-Datei wurde in einem ersten Schritt nach den oben beschriebenen Parametern gefiltert. Anschließend wurden die Informationen Gencode (Spalte 3), Position der 5'-Base auf der entsprechenden Sequenz (Spalte 4) und die Sequenz des RPF (Spalte 10) in einer neuen Datei gespeichert, welche als Ausgangsdatei für weitergehende Analysen verwendet wurde.



Alle folgenden Analysen wurden in R durchgeführt. R ist eine objektorientierte höhere Programmiersprache, welche eine schnelle und elegante Bearbeitung von strukturierten Daten erlaubt. Durch eine sehr große aktive Gemeinschaft werden viele verschiedene Programmpakete zu verschiedenen Problemlösungen angeboten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die verschiedenen Fragestellungen durch selbst geschriebene Funktionen analysiert. Selbstverständlich wurden auch Funktionen verschiedener veröffentlichter Pakete verwendet, welche bei Nutzung hervorgehoben werden.

#### 2.4.7 DIFFERENTIELLE ANALYSE VON SEQUENZIERUNGSDATEN MIT HILFE VON R

Zur differentiellen Analyse, also des statistischen Vergleichs der Menge kartierter Sequenzen pro Gen zwischen zwei Gruppen, wurde das Paket *DESeq2* in R verwendet (Love et al., 2014). Dieses Paket bietet verschiedene statistische Modelle zur Berechnung der Signifikanz an. Ebenso wird eine Normalisierung der Daten durchgeführt, was u.a. aufgrund unterschiedlicher Sequenzierungstiefen nötig ist. *DESeq2* verwendet hier eine erweiterte negative binomiale Verteilung (Pascal-Verteilung, Poisson-Gamma-Verteilung) als Modell (Anders and Huber, 2010). Die Angleichung der Daten an das Modell erfolgt über die drei Parameter Sequenzierungstiefe, Expressionsstärke und Glättung der Abhängigkeit der Varianzen an die erwarteten Mittelwerte. Aus diesem Grund ist es wichtig, dass einfach gezählte Werte - wie *HTSeq* diese ausgibt - als Eingabedaten für die Analyse verwendet werden, um eine doppelte Normalisierung zu vermeiden, was zu falschen Ergebnissen führen kann. Dies sei an dieser Stelle erwähnt, da es neben *STAR* und *HTSeq* weitere Programme gibt, welche zur Kartierung und

Zählung verwendet werden können. Manche dieser Programme bieten auch schon normalisierte Ausgaben der Zählung an, welche dann nicht noch einmal mit *DESeq2* normalisiert werden sollten.

#### Erstellung des zentralen Objekts von *DESeq2*

---

```
countFiles.path = "path/to/count/files/"

sampleTable = data.frame(sampleName = metadata$libraryName,
                          fileName = metadata$countFile,
                          condition = metadata$condition,
                          sampleNO = metadata$sampleNO
                          )

DESeq2Table = DESeqDataSetFromHTSeqCount(sampleTable = sampleTable,
                                          directory = countFiles.path,
                                          design = ~ condition)
```

---

Um eine differentielle Analyse durchführen zu können, benötigt *DESeq2* Informationen über die Ausgabedateien von *HTSeq* in einem Tabellenformat. Diese Annotation wird von *DESeq2* verwendet, um die Daten einzulesen und in dem Objekt *DESeq2Table* zu speichern.

Die Spaltenbezeichner sind:

1. Name der Probe
2. Name der Datei mit den Zählungen
3. Gruppenzugehörigkeit

#### 4. Nummer der Probe innerhalb der Gruppe

Wie bereits erwähnt, werden in einem ersten Schritt die Proben an das negative binomiale Verteilungsmodell angeglichen. Zuerst werden Größenfaktoren der Sequenziertiefe berechnet, welche auch in dem Objekt *DESeq2 Table* gespeichert werden. Anschließend wird eine Abschätzung der Streuung der Werte jedes einzelnen Gens berechnet um einen Streuungsparameter zu erhalten, welcher für spätere Test verwendet wird.

#### Normalisierung und Berechnung der Statistik mit *DESeq2*

---

```
# NORMALISIERUNG
DESeq2 Table = estimateSizeFactors(DESeq2 Table)
DESeq2 Table = estimateDispersions(DESeq2 Table)
# STATISTISCHE ANALYSE
DESeq2 Table = nbinomWaldTest(DESeq2 Table)
DESeq2 Res = results(DESeq2 Table, pAdjustMethod = "BH")
```

---

Nach Normalisierung der Daten wird die statistische Analyse durchgeführt. Hierzu verwendet *DESeq2* einen Wald-Test. Durch die große Anzahl an Beobachtungen wird von einer Normalverteilung der Zahlen ausgegangen. Ein wichtiges Augenmerk sollte hierbei auf das multiple Testproblem gelegt werden. Viele Vergleiche führen zu einer  $\alpha$ -Fehler Kumulierung, was dazu führt, dass p-Werte nur noch eine geringe Aussagekraft über die Signifikanz besitzen. Einfacher ausgedrückt: bei 100 Vergleichen und einem  $\alpha$  von 0.05 für jeden Vergleich besteht die Wahrscheinlichkeit, dass fünf Vergleiche falsch positiv sind. Bei 10000 Vergleichen liegt die Rate an falsch positiven Vergleichen somit schon bei 500. Da Analysen von

p-Werte	0,51	0,93	0,04	0,002	0,30
geordnete p-Werte	0,002	0,04	0,30	0,51	0,93
Rang	1	2	3	4	5
FDR	0,01	0,10	0,50	0,64	0,93

**Abbildung 2.7: Berechnung der FDR nach Benjamini und Hochberg.** In einem ersten Schritt werden die ermittelten p-Werte der Größe nach von klein nach groß geordnet. Anschließend wird jedem p-Wert anhand dieser Ordnung ein Rang zugewiesen. Der größte p-Wert bleibt bestehen. Alle weiteren Werte werden durch die Formel  $FDR = \text{p-Wert} * \left( \frac{\text{Anzahl aller p-Werte}}{\text{Rang des p-Wertes}} \right)$  angepasst.

Genexpressionen, je nach Größe des Genoms und der Anzahl der Gruppen, fünfstellige Vergleiche durchführen, entsteht einer großen Anzahl falsch positiver Ergebnisse. Aus diesem Grund gibt es verschiedene Verfahren zur Korrektur der  $\alpha$ -Fehler Kumulierung, wie etwa die Bonferroni-Korrektur oder auch die hier verwendete FDR (*False Discovery Rate*) nach Benjamini und Hochberg (Benjamini and Hochberg, 1995).

Hierbei werden alle p-Werte mathematisch so angepasst, dass falsch positive Werte heraus gefiltert werden. Zuerst werden die p-Werte der Größe nach von klein nach groß geordnet (Abb. 2.7). Anschließend wird jeder p-Wert einem Rang zugeordnet. Aus dem größten p-Wert wird der größte angepasste p-Wert. Die Berechnung aller anderen angepassten p-Werte wird durch die Formel  $FDR = \text{p-Wert} * \left( \frac{\text{Anzahl aller p-Werte}}{\text{Rang des p-Wertes}} \right)$  berechnet.

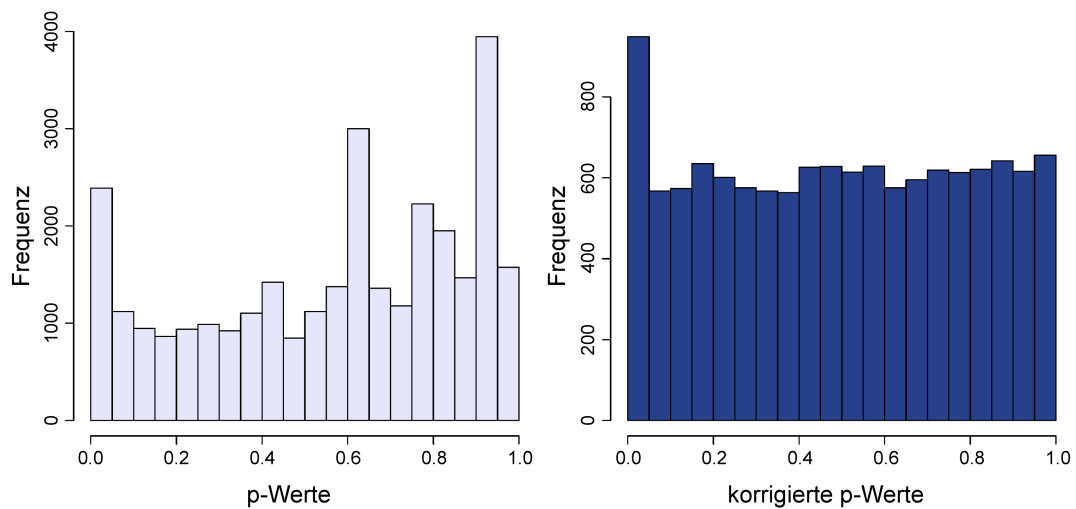
## Korrektur der Nullhypothese und Extraktion signifikanter Ergebnisse mit *DESeq2*

---

```
# KORREKTUR DES MODELS DER NULL HYPOTHESE
FDR.DESeq2Res = fdrtool(DESeq2Res$stat, statistic= "normal", plot = F)
FDR.DESeq2Res$param[1, "sd"]
DESeq2Res[, "padj"] = p.adjust(FDR.DESeq2Res$pval, method = "BH")
# EXTRAKTION DER SIGNIFIKANTEN GENE
sigGenes = rownames(subset(DESeq2Res, padj < 0.05))
sigTable = DESeq2Res[rownames(DESeq2Res) %in% sigGenes,]
# SPEICHERUNG DER TABELLE
write.table(x = sigTable, file = "sigtable.csv", col.names = NA, sep = "\t")
```

---

Zur Überprüfung der Anwendung des richtigen Modells der Nullhypothese sind die Verteilung der p-Werte in Form eines Histogramms dargestellt (Abb. 2.8). Da die zugrunde liegenden statistischen Modelle auf einer Normalverteilung der Daten beruhen, muss die Anzahl der p-Werte bei einem Vergleich zweier identischer Gruppen in jedem Rang in etwa gleich sein. Das bedeutet, dass bei 50000 vergleichen und 10 Rängen in etwa 500 p-Werte in jeden Rang fallen sollten. Bei Expressionsanalysen unterschiedlicher Gruppen wird eine spezifische Antwort auf einen Reiz erwartet, sei es z.B. das Fehlen eines Gens oder die Behandlung mit einem neuen Medikament. Die Mehrzahl der Gene sollte nicht verändert vorliegen, weshalb sich die p-Werte, wie bereits oben erwähnt, verteilen. Tatsächlich veränderte Gene jedoch werden mit sehr kleinen p-Werten erwartet. Der kleinste Rang im Histogramm muss also stärker repräsentiert sein als die anderen Ränge, während diese in etwa gleich stark ver-



**Abbildung 2.8: Verteilung der p-Werte vor und nach Korrektur des Modells der Null Hypothese** Die Verteilung der p-Werte ist für alle p-Wert Ränge im Bereich zwischen 0 und 1 als Histogramm vor (links) und nach (rechts) der Korrektur der Null Hypothese dargestellt.

treten sind. Eine Korrektur der p-Werte anhand des neuen Null-Hypothesen Modells kann nachträglich mit dem Paket *fdrtool* vorgenommen werden (Strimmer, 2008). Die Berechnung wird anhand der *z-Werte* (Anzahl der Standardabweichungen, die ein Wert von seinem Mittelwert entfernt ist) durchgeführt. Anschließend werden die p-Werte wieder mit der FDR korrigiert, die Gene mit signifikanten Unterschieden extrahiert und in Tabellenform abgespeichert.

#### 2.4.8 PROGRAMMSTRUKTUR ZUR ANALYSE VON RIBO-SEQ DATEN IN R

Zur Analyse der Ribo-Seq Daten in R wurden die kartierten Daten verwendet, welche einen MapQ-Wert  $> 10$  haben und einmalig kartieren oder die primäre Kartierung bei multipler Kartierung sind (siehe Kap. 2.4.6). Diese Daten wurden in R eingelesen und in dem zen-

tralen Objekt *IRiboCounts* gespeichert, welches für alle weiteren Analysen verwendet wurde (Abb. 2.9). Zuvor wurde eine Metadatei erstellt, welche im Tabellenformat die Informationen Probennummer, Gruppe und Dateinamen enthält. Die zusätzlichen Pakete *data.table* und *stringr* werden zum Bearbeiten und Einlesen benötigt.

### Erstellung des Zentralen Objekts zur Bearbeitung von Ribo-Seq Daten in R

---

```
library(data.table)

library(stringr)

ribofiles.path = "/path/to/ribo-seq/files/"

files = list.files(ribofiles.path, pattern = "*_s-cut.sam")

sampleNO = str_sub(files, 1, -11)

condition = c(rep("KO",2), rep("WT",2))

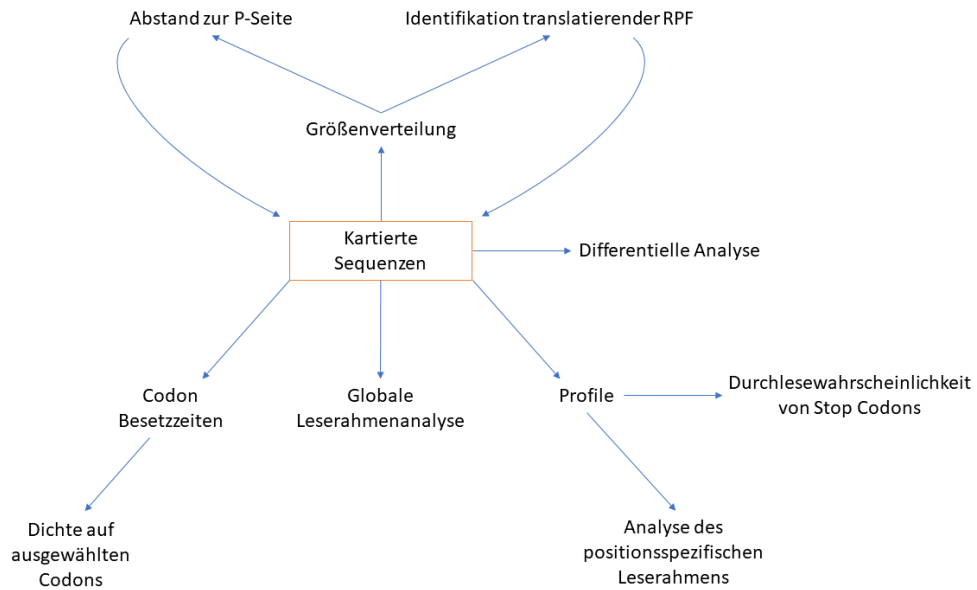
metadata = data.frame(sampleNO = sampleNO,
                      condition = condition,
                      files = files)

IRiboCounts = list()

for(i in 1:length(files)){
  IRiboCounts[[as.character(sampleNO[i])] = fread(pasteo(ribofiles.path, files[i]), sep = "\t")
}
```

---

Für verschiedene Analysen werden auch Informationen aus der Transkriptomdatei, welche zur Kartierung verwendet wurde, benötigt. Diese Datei wurde mit der Funktion *buildTranscriptomeAnnotation()* eingelesen und durch die jeweiligen Start und Stop Positionen der Gene erweitert. Innerhalb der Funktion wird das Paket *microseq* verwendet, welches für



**Abbildung 2.9:** Schema zur Analyse von Ribo-Seq Daten in R. Das zentrale Objekt beinhaltet die Informationen (Transkript, Position und Sequenz) der kartierten Sequenzen (orange). Ausgehend von diesem Objekt können die weiteren Analysen durchgeführt werden.

das Einlesen und Speichern von FASTA-Dateien dient. Hierbei wird die Datei in ein tabelleartiges Objekt gespeichert, bei welchem in der ersten Spalte die Genbezeichner (*transcriptome\$header*) und in der zweiten Spalte die Sequenzen (*transcriptome\$Sequences*) zu finden sind. Dieses Objekt kann durch weitere Spalten erweitert werden. Da die CDS in Großbuchstaben und die UTR in Kleinbuchstaben codiert sind, wurden die Start und Stop Positionen für jedes Gen durch die Suche nach dem ersten und letzten Großbuchstaben bestimmt und angefügt (*transcriptome\$Start* bzw. *transcriptome\$Stop*).

---

```

buildTranscriptomeAnnotation = function(transcriptomeFile = NULL)
{
  require(microseq)
  transcriptome = microseq::readFasta(transcriptomeFile)

```



```

transcriptome$Symbol = transcriptome$Header
transcriptome$Start = as.numeric(sapply(transcriptome$Sequence, function(x) grep("[A-Z]",
  unlist(strsplit(x, ""))[1])))
transcriptome$Stop = as.numeric(sapply(transcriptome$Sequence, function(x) tail(grep("[A-Z]",
  unlist(strsplit(x, ""))), n=1)))
return(transcriptome)
}

```

---

#### 2.4.9 IDENTIFIZIERUNG TRANSLATIERENDER RPFs

Im Gegensatz zu RNA-Seq Fragmenten haben RPFs eine relativ fixe Größe, welche zwischen 26 und 34 Basen liegt (Ingolia et al., 2009). Diese Größen können, wie zuvor schon erwähnt, durch verschiedene äußere Einflüsse und Spezieszugehörigkeit unterschiedlich sein (siehe Kap. 2.3.8). Ebenso zeigen die mitochondrialen RPFs eine breitere Verteilung sowie eine größere mittlere Größe (Pearce et al., 2017). Um translatierende RPFs zu identifizieren wurden nur Größen verwendet, welche sich innerhalb der Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Größenverteilung befinden. Anschließend wurden alle RPFs dieser Größen, welche sich im Startbereich eines Transkripts befinden, zur Berechnung der Abstände vom 5'-Ende zur ersten Base der P-Stelle verwendet. Translatierende Ribosomen besitzen eine erhöhte Dichte auf dem Startcodon, da die Initiation der Translation mehr Zeit in Anspruch nimmt als die Elongation. Als drittes Merkmal zeigen translatierende Ribosomen eine Codon Triplet-Periodizität, was zu einer erhöhten RPF-Dichte im Abstand von jeweils drei Nukleotiden

führt.

#### Berechnung der Größenverteilung von RPFs

---

```
sizes = getSizeDistribution(alignment = IRiboCounts,  
                           readlength = c(20,40),  
                           mitochondria = c(TRUE, FALSE))
```

---

Zur Berechnung der Größenverteilung wurde die Funktion *getSizeDistribution* geschrieben. Diese Funktion berechnet die Größenverteilung aller Sequenzen und erstellt ein Histogramm für jede Probe. Ebenso werden die Mittelwerte der Verteilung  $\pm$  Standardabweichungen berechnet und als Vorschlag der zu verwendenden Größen angegeben. Die finale Bestimmung translatisierender Ribosomen findet durch die Berechnung der Abstände zur P-Stelle und der Triplet-Periodizität der verschiedenen Längen durch die Funktion *getOffsets* statt.

#### Berechnung der Abstände zur P-Stelle

---

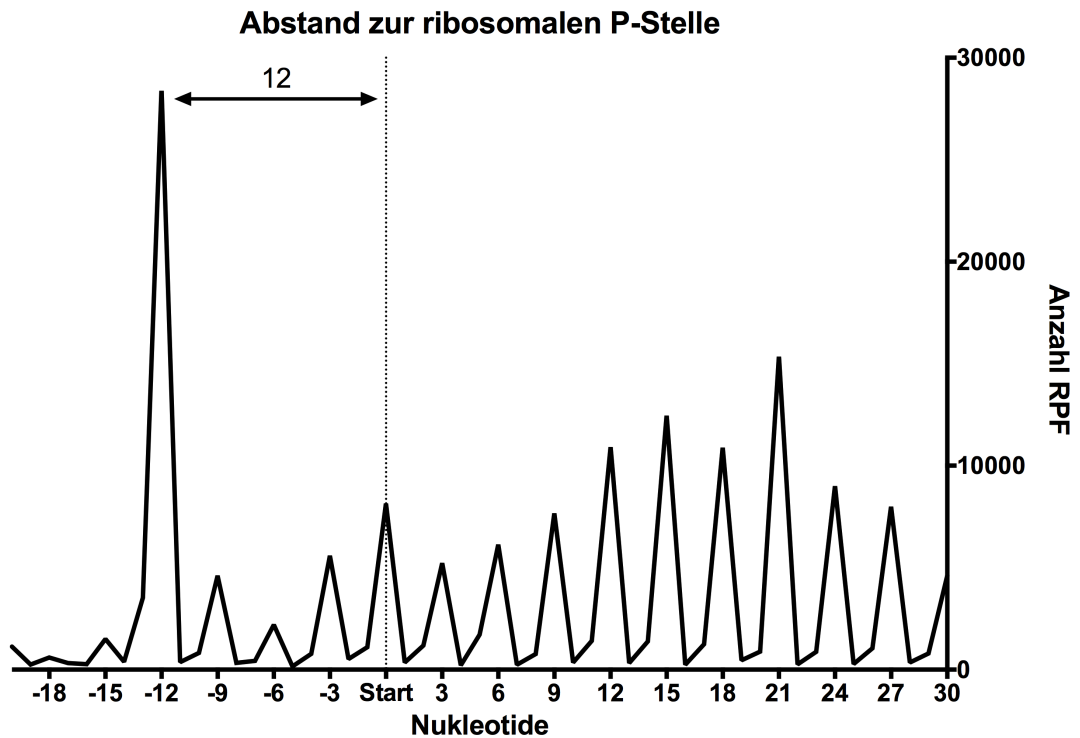
```
offsets = getOffsets(alignment = IRiboCounts,  
                    transcriptome = transcriptome,  
                    window = c(-20,60),  
                    readlength = sizes,  
                    mitochondria = c(TRUE, FALSE))
```

---

Diese Funktion gibt die Anzahl der Nukleotide vom 5'-Ende eines RPF zur ersten Base der P-Stelle wieder. Jede RPF Größe wird hierbei separat berechnet. Die Option *window*

erlaubt ein Fenster zu definieren, in welchem die Periodizität begutachtet werden soll. Als Standard wurde ein Fenster von 20 Nukleotiden 5' des Startcodons bis 60 Nukleotiden 3' des Startcodons festgelegt. Zur Berechnung werden in einem ersten Schritt die Startpositionen von allen RPFs transkriptspezifisch subtrahiert. Dies führt dazu, dass das Startcodon für alle Transkripte an der Position 0 zu finden ist. Somit können die Informationen von allen Transkripten in einem zweiten Schritt zusammen gefasst werden. Anschließend wird für jede Position innerhalb des Fensters die Anzahl an RPFs, welche an dieser Position kartiert wurden, bestimmt. Die größte Anzahl an RPFs vor dem Startcodon wird als die Fraktion betrachtet, welche sich gerade bei der Initiation und somit mit der P-Stelle auf dem Startcodon befindet. In einem zweiten Schritt wird die Menge an Ribosomen pro Position und Größe für jede Probe in einer Tabelle gespeichert. Mit Hilfe eines Programms zur Tabellenkalkulation wurde die Anzahl RPFs gegen die Positionen aufgetragen. Das typische Muster für translatierende Ribosomen wurde hierbei für jede verwendete RPF Größe separat untersucht (Abb. 2.10). Durch die Periodizität wird diese Fraktion als translatierende Ribosomen definiert.

Mitochondriale Ribosomen unterscheiden sich nicht nur in der Größenverteilung von cytoplasmatischen Ribosomen, sondern auch in der Bestimmung des Abstands zur P-Stelle. Da keine 5'-UTR Regionen bei den mitochondrialen Transkripten vorkommen, ist es nicht möglich den Abstand zur P-Stelle nach der oben genannten Methode zu berechnen. Die unterschiedliche Natur der RPFs führt auch dazu, dass die genaue Position der P-Stelle nicht absolut korrekt anhand cytoplasmatischer RPFs bestimmt werden kann. Verschiedene Grup-



**Abbildung 2.10:** Bestimmung des Abstands vom 5'-Ende eines RPF zur P-Stelle. Die Anzahl an RPFs sind positionsspezifisch im Initiationsbereich aufgetragen. Das höchste Maximum vor dem Startcodon gibt den Abstand vom 5'-Ende eines RPF zum ersten Nucleotid der P-Stelle wieder.

pen beschäftigen sich mit der Lösung dieses Problems (wie z.B. die Bestimmung der P-Stelle vom 3'-Ende von RPFs in Bakterien) und schlagen bisher einen Abstand von 17 Nucleotiden vom 5'-Ende aller mitochondrialen RPFs der Größe von 31-35 Nucleotiden zur A-Stelle vor (Pearce et al., 2017; Mohammad et al., 2019). Der Abstand von 17 Nucleotiden wurde für alle in dieser Arbeit verwendeten Größen mitochondrialer RPFs als Abstand zur A-Stelle definiert.

Die RPFs der Größen, die als translatierende Ribosomen definiert wurden, wurden für die differentielle Analyse verwendet. Hierzu wurden alle RPFs entfernt, welche nicht einer der definierten Größe angehören. Die zu verwendenden Daten wurden in Tabellenform ab-

gespeichert. Hierbei ist darauf zu achten, dass das Trennzeichen ein Leerzeichen ist und dass in jeder Probe die gleichen Transkripte in der gleichen Reihenfolge vorkommen. Transkripte, welche in einer Probe nicht existieren, werden mit einem Wert von 0 hinzugefügt. Die differentielle Analyse wurde anschließend, wie in Kapitel 2.4.7 bereits erklärt, durchgeführt.

### Extraktion translatierender RPFs zur differentiellen Analyse

---

```
# ENTFERNUNG VON RPF
lAlignment = sapply(names(lRiboCounts), function(x) lRiboCounts[[x]][nchar(lRiboCounts[[x]]$V3)
  %in% sizes[[x]],, simplify = FALSE)

# BESTIMMUNG DER ANZAHL AN RPF PRO TRANSKRIPT
lAlignment = sapply(lAlignment, function(x) table(x$V1))

# EXTRAKTION ALLER VERWENDETER GENBEZEICHNER
vTranscripts = transcriptome$Header

# HINZUFÜGEN FEHLENDER TRANSKRIPTE MIT DEM WERT 0
lAlignment = lapply(lAlignment, function(x) {
  missingGenes = vTranscripts[which(vTranscripts %in% names(x) == FALSE)]
  missingGenes = rep(0, length(missingGenes))
  names(missingGenes) = vTranscripts[which(vTranscripts %in% names(x) == FALSE)]
  x = append(x, missingGenes)
  x = x[order(names(x))]
})

# SPEICHERN DER TABELLEN
lapply(names(lAlignment), function(x) {
  write.table(lAlignment[[x]], file = paste0(x, "_clean-RPF_counts.csv"), sep = " ")
}))
```

---

#### 2.4.10 ERSTELLUNG VON RIBOSOMENPROFILEN

Eine weitere, namensgebende Betrachtung von Ribo-Seq Daten ist, neben der differentiellen Analyse, die Verteilung der RPFs über die Transkripte. Diese Profile bieten verschiedene Möglichkeiten zur Interpretation von Ribo-Seq Daten. Wenn etwa eine bestimmte tRNA in einem untersuchten Modell deletiert wird, ist eine Veränderung der Profile an der Stelle der korrespondierenden Codons erwartbar (Fradejas-Villar et al., 2017). Die Profile liefern auch weitergehende Informationen, u.a. über die Dynamik der Translation und den Einfluss des Codon Kontext, sowie das Aufkommen von neuen Translationsstartpunkten in den untranslatierten Bereichen (Brar, 2016).

---

```
lTranscriptOccupancy = getTranscriptOccupancy(alignment = IRiboCounts,  
                                               metadata = metadata,  
                                               transcriptome = transcriptome,  
                                               offsets = offsets,  
                                               cores = 4,  
                                               transcripts = NULL,  
                                               RPM = c(TRUE, FALSE))
```

---

Die Funktion *getTranscriptOccupancy* bildet für jedes Transkript einen Vektor mit der Gesamtzahl der Basen des Transkripts als Länge. Für jede Position wird die Anzahl aller RPFs bestimmt, welche mit dem ersten Nukleotid der A-Stelle (welche mit Hilfe des Objekts *offsets*

für jedes RPF bestimmt wird) auf dieser Position liegen. Anschließend werden diese Werte gegen die Sequenziertiefe normalisiert, um die verschiedenen Proben miteinander vergleichen zu können. Es werden dabei RPM (reads per million mapped reads) gebildet, indem die Anzahl RPFs pro Position mit der Gesamtzahl kartierter Sequenzen dividiert und mit 1000000 multipliziert wird. Mit Hilfe des Pakets *doParallel* wurden die Berechnungen dieser Funktion parallelisiert. Dies führt, insbesondere bei großen Datenmengen, zu einer signifikanten schnelleren Berechnungszeit. Durch die Option *cores* kann die Anzahl zu verwendender Kerne zur Berechnung angegeben werden. Jeder Kern berechnet hierbei eine Probe, weshalb keine schnellere Berechnungszeit zu erwarten ist, wenn mehr Kerne als Proben angegeben werden. Die Option *transcripts* erlaubt, die Berechnung auf die angegebenen Transkripte zu beschränken, welche mit den Gensymbolen wie folgt angegeben werden: *c*(„*Alb*“, „*Trit1*“, „*Asns*“, *usw.*). *NULL* bedeutet hier, alle Transkripte zu berechnen.

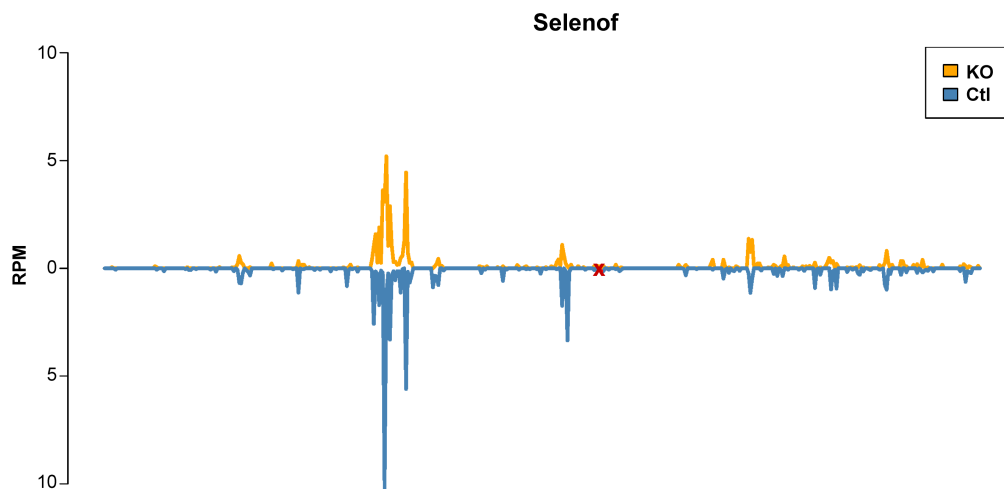
Das Objekt *lTranscriptOccupancy* kann nun für die Darstellung von Profilen verwendet werden. Hierzu wurde die Funktion *plotTranscriptOccupancy()* geschrieben.

---

```
plotTranscriptOccupancy(transcriptOccupancys = lTranscriptOccupancy,  
                        transcriptome = transcriptome,  
                        CDS = c(TRUE, FALSE),  
                        selenoproteins = c(TRUE, FALSE))
```

---

Die Funktion erlaubt durch die Option *CDS* die Auswahl, das ganze Transkript (*FALSE*) oder nur die codierende Sequenz (*TRUE*) darzustellen. Ebenso kann ausgewählt werden,



**Abbildung 2.11: Profil von Selenoprotein F.** Dargestellt sind die Ribosomenprofile der codierenden Sequenz von Selenof *Trit1*-defizienter Proben (orange) und deren Kontrollen (blau). Die Position des UGA/Sec Codons ist durch ein rotes Kreuz markiert. Aufgetragen sind die Mittelwerte der normalisierten RPFs (RPM) von jeweils zwei Replikaten pro Gruppe.

ob das UGA/Sec Codon in Selenoproteinen markiert werden soll (*selenoproteins*), wenn das Profil von Selenoproteinen erstellt wird (Abb. 2.11).

#### 2.4.11 BERECHNUNG VON RIBOSOMALEN CODONBESETZZEITEN

Ribo-Seq ermöglicht eine codongenaue Betrachtung aller Ribosomen. Dies erlaubt, Aussagen über die Menge an Ribosomen auf spezifischen Codons treffen zu können und somit deren Translationsverhalten festzustellen. So ist z.B. bekannt, dass fehlende tRNA-Modifikationen Codonbesetzzeiten entsprechender Codons verändern können. Zur Untersuchung der Codonbesetzzeiten wurde die Funktion *getCodonOccupancy* geschrieben.

---

```
codonOccupancyMatrix = getOccupancyMatrix(alignment = IRiboCounts,
                                           metadata = metadata,
```



```
transcriptome = transcriptome,  
offsets = offsets,  
cores = 4,  
RPM = c(TRUE, FALSE),  
correctFrame = c(TRUE, FALSE),  
mitos = c(TRUE, FALSE))
```

---

Die Funktion wurde, wie in Kapitel 2.4.10 erläutert, mit dem Paket *doParallel* parallelisiert. Die Option *RPM* bestimmt, ob RPM berechnet werden sollen oder die nicht normalisierte Anzahl gefundener RPFs ausgegeben wird. Die Funktion erlaubt die Korrektur des Leserahmens aller RPFs, die sich nicht im Leserahmen 0 befinden. Diese Option (*correctFrame*) sollte jedoch mit Vorsicht genossen und nur unter speziellen Fragestellungen verwendet werden, da ein reeller Unterschied zwischen zwei Gruppen negiert werden kann.

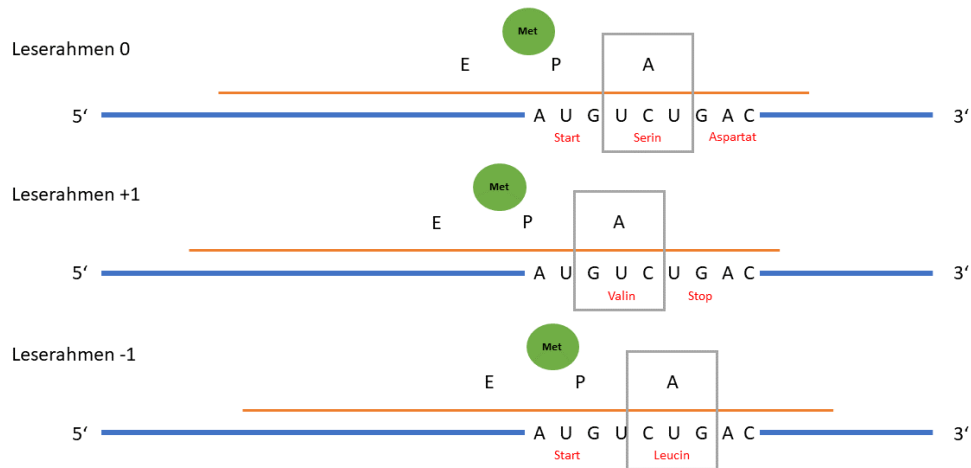
Der Parameter *mitos* gibt an, ob die Codonbesetzzeiten von mitochondrialen RPFs analysiert werden sollen. Hierbei wird der Algorithmus, aufgrund der in Kapitel 2.4.9 erwähnten ungenauen Bestimmung der P-Stelle von mitochondrialen Ribosomen, modifiziert. Hierbei wird nicht die exakte Position der gewünschten Seite bestimmt, sondern eine Wahrscheinlichkeit des Aufenthalts der mitochondrialen RPFs ermittelt. Es wird in einem ersten Schritt der Leserahmen betrachtet, in welchem sich das untersuchte RPF befindet. Höchste Wahrscheinlichkeit sollte immer der Leserahmen 0 haben, da nur in diesem die richtigen Codons codiert sind. Befindet sich das RPF im Leserahmen 0, wird eine Wahrscheinlichkeit von 2:3 angenommen, dass dies der korrekte Aufenthaltsort ist. Entsprechend liegt die Wahrschein-

lichkeit für eine +1 Verschiebung und eine -1 Verschiebung bei jeweils 1:6. Sollte das RPF in einem +1 oder -1 Leserahmen gefunden werden, so wird die Richtigkeit mit einer Wahrscheinlichkeit von 2:3 angenommen. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich dieses RPF eigentlich im Leserahmen 0 befindet, wird dabei mit 1:3 festgelegt. Diese Berechnungen führen zu einer Fokussierung auf Codons im korrekten Leserahmen 0, wobei die biologische Variabilität durch Verschiebungen des Leserahmens nicht negiert wird.

#### 2.4.12 GLOBALE LESERAHMENANALYSE TRANSLATIERENDER RIBOSOMEN

Zur Subcodonanalyse des Leserahmens wird das Objekt *lRiboCounts* verwendet. Zuerst werden jene RPFs extrahiert und zur Berechnung verwendet, welche, wie in Kapitel 2.4.9 beschrieben, als translatierende Ribosomen identifiziert wurden. Anschließend werden die Positionen der einzelnen RPFs, mit Hilfe der jeweils gefundenen Abstände, auf die erste Base der A-Stelle adjustiert. Um Einflüsse der Initiation oder Termination zu vermeiden, wurden alle RPFs zur Berechnung verwendet, welche sich im Bereich von fünf Codons nach dem Startcodon bis fünf Codons vor dem Stopcodon befinden. Alle Positionen wurden wie zuvor beschrieben mit der Startposition des zugehörigen Transkripts subtrahiert. Dies ermöglicht alle RPFs, unabhängig der ursprünglichen Position, zur Berechnung zusammenfassen zu können, was eine wesentliche Verkürzung der Rechenzeit mit sich bringt.

Da ein Codon aus drei Basen besteht, gibt es drei mögliche Positionen, auf denen sich das Ribosom befinden kann. Sitzt das Ribosom auf der ersten Base des Codons, befindet es sich im Leserahmen 0. Auf der zweiten Base sitzt das Ribosom dementsprechend im Leserahmen



**Abbildung 2.12: Darstellung der Leserahmen 0, +1 und -1.** Die E-, P- und A-Stellen des RPF (orange) sind bekannt. Bei bekannter Position des Startcodons kann ermittelt werden, ob das RPF im korrekten oder falschen Leserahmen auf der mRNA (blau) translatiert.

+1. Befindet sich das Ribosom auf der dritten Base des vorhergehenden Codons, ist dies der Leserahmen  $-1$  (Abb. 2.12).

Da durch die Normalisierung der Positionen gegen das jeweilige Startcodon die erste Base des Startcodons in jedem Transkript 0 ist, kann dies zu einer einfachen Suche nach dem Leserahmen aller RPFs genutzt werden. Hierfür wird eine Zahlensequenz nach der Formel  $a_n = (3 * n)$  verwendet, wobei der obere Grenzwert dem Wert der größten Position aller RPFs entspricht. Zur Suche nach allen RPFs im Leserahmen 0 wird die Zahlensequenz  $[0, 3, 6, 9, \dots]$  genutzt. Die Anzahl aller RPFs, deren Position einer der Zahlen der Zahlensequenz entspricht, wird ermittelt. Für die Leserahmen  $+1$  und  $-1$  wird entsprechend verfahren, in dem die Formel durch  $(3 * n) + 1$  oder  $(3 * n) - 1$  angepasst wird. Diese Berech-

nung wurde für alle Proben und alle verwendeten RPF Größen separat durchgeführt und in Tabellenform zur weiteren Bearbeitung mittels eines Tabellenkalkulationsprogramms abgespeichert.

Die Berechnung kann nicht nur für die Gesamtanzahl RPFs pro Leserahmen verwendet werden, sondern auch zur Bestimmung der Anzahl an RPFs pro Position innerhalb der Zahlenreihen. Da die Zahlenreihen die Positionen einzelner Nukleotide eines Codons darstellen, können jeweils drei Einzelwerte an der gleichen Stelle der Zahlenreihe zu einem Codon zusammen gefasst werden. Genauer gesagt bedeutet dies für vereinfachte beispielhafte Zahlenreihen der drei Leserahmen ( $-1$ ,  $0$  und  $+1$ ) entsprechend  $[-1, 2]$ ,  $[0, 3]$  und  $[1, 4]$ , womit jeweils die erste und die zweite Position zu einem Codon zusammen gefasst werden können. Das erste Codon entspricht damit den Werten für die Positionen  $[-1, 0, +1]$  und das zweite Codon dementsprechend den Werten für die Positionen  $[2, 3, 4]$ . Dies ermöglicht den Anteil von  $+1$  und  $-1$  Leserahmenverschiebungen für jedes Codon über alle Transkripte normalisiert zu berechnen.

#### 2.4.13 BERECHNUNG DER STOPCODON SUPPRESSION

Um die Suppression von Stopcodons zu untersuchen, wurden alle RPFs im Bereich von 10 Codons vor und nach den Stopcodons aller Transkripte extrahiert. Anschließend wurden die Positionen durch Subtraktion der Position des Stopcodons auf einen Bereich von  $-30$  bis  $30$ , wobei  $0$  die Position des Stopcodons ist, normiert. Die Durchlesewahrscheinlichkeit von Stopcodons wurde definiert als die Anzahl von RPFs  $3'$  dividiert durch die Anzahl RPFs

5' von Stopcodons: *Durchlesewahrscheinlichkeit* =  $\frac{n(3'RPM)}{n(5'RPM)}$ .

Analog zur Leserahmenbestimmung in Kapitel 2.4.12 wurde der Leserahmen aller RPFs in dem oben definierten Bereich bestimmt. Da RPFs, die sich 5' des Stopcodons nicht im korrekten Leserahmen befinden das Stopcodon nicht als solches decodieren, wurde die Berechnung für jeden Leserahmen separat durchgeführt.

#### 2.4.14 EFFIZIENZ DER RECODIERUNG VON UGA/SEC CODONS

Die Berechnung der Effizienz der UGA-Recodierung (URE, *UGA recoding efficiency*) wurde, analog zu Kapitel 2.4.13, für Selenoproteine, welche ein UGA im mittleren Teil der codierenden Sequenz aufweisen, durchgeführt. Verwendete Selenoproteine sind: Dio1, Dio2, Dio3, Gpx1, Gpx2, Gpx3, Gpx4, Msrb1, Selenof, Selenoh, Selenom, Selenon, Selenop, Selenot, Selenow, und Sephs2. Hierbei wurde nicht nur der Bereich von  $\pm 20$  Nukleotide um das UGA Codon gewählt, sondern alle RPFs auf der codierenden Sequenz 5' und 3' des UGA Codons verwendet. Die Berechnung wurde ebenfalls für alle Leserahmen separat durchgeführt, um eventuelle Einflüsse auf den Leserahmen zu negieren.

#### 2.4.15 BESTIMMUNG DER DICHTEN VON RPFs AN AUSGEWÄHLTEN CODONS

Um den direkten Einfluss verschiedener Codons auf fehlende Modifikationen bei tRNAs zu messen, wurde die Funktion *getFirstCodonDensity* geschrieben.

---

```
getFirstCodonDensity(alignment = IRiboCounts,
```

```
metadata = metadata,
```

transcriptome = transcriptome,

window = c(-40,40),

offsets = offsets,

codon = "TGA")

---

Diese Funktion erlaubt die Bestimmung der RPF Dichte im Bereich des ersten Erscheinens des gesuchten Codons in allen Transkripten. Hierbei wird in einem ersten Schritt die Position des Codons für jedes Transkript bestimmt. Anschließend wird in einem Fenster von 80 Basen um das entsprechende Codon die Anzahl aller RPFs positionsspezifisch bestimmt und in Tabellenform, zur weiteren Bearbeitung mit Hilfe eines Programms zur Tabellenkalkulation, gespeichert. Bei Betrachtung von mitochondrialen RPFs wurde hierbei, aufgrund der ungenauen Bestimmung der A-Stelle, die Menge an Ribosomen bestimmt, welche auf dem Codon  $\pm 1$  Nukleotid sitzen.

*Progress is made by trial and failure; the failures are generally a hundred times more numerous than the successes; yet they are usually left unchronicled.*

William Ramsay

# 3

## Ergebnisse

### 3.1 *IN VITRO* BESTIMMUNG DER KINETIK VON REKOMBINANTEM TRIT1

Um den Einfluss der R323Q Mutation auf die Aktivität von humanem TRIT1 zu bestimmen wurde eine *in vitro* Versuchsanordnung etabliert (siehe Kap. 2.3.4). Es fanden ASL von bekannten tRNAs mit  $i^6A_{37}$  Modifikation als Substrate Verwendung. BL21star *E. coli* wurden mit einem pET52b(+) Vektor transformiert und TRIT1 mit einem Poly-Histidin-Ende überexprimiert (siehe Kap. 2.3.3). Das Protein wurde über eine Nickel-NTA Säule aufgerei-

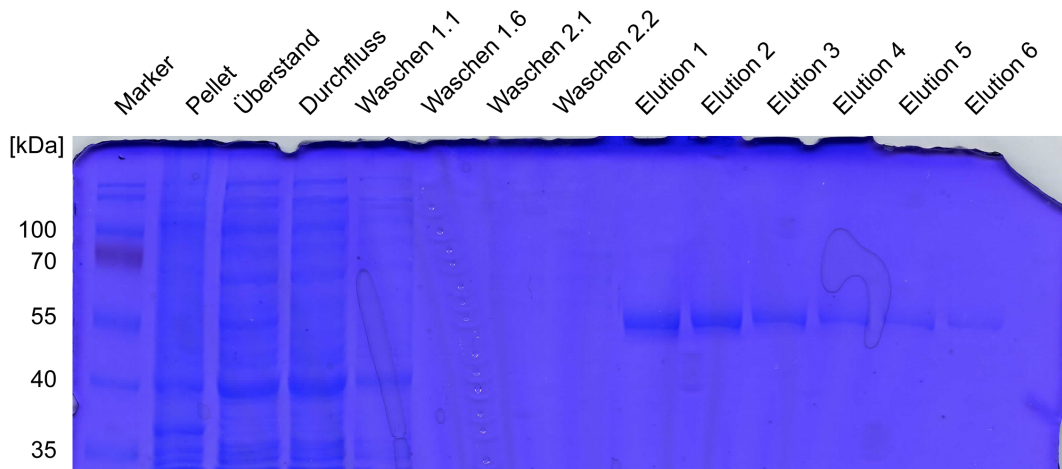


Abbildung 3.1: Commissie Färbung einer SDS-PAGE der Fraktionen der Ni-NTA Aufreinigung des TRIT1 Wildtyp Proteins. TRIT1 hat eine Größe von ungefähr 55 kDa.

nigt und anschließend im *in vitro* Reaktionssystem verwendet, um die spezifische Aktivität mit den verschiedenen ASL Substraten zu bestimmen. Eine Endpunktanalyse erlaubt den Vergleich der Aktivität zwischen Wildtyp TRIT1 und der TRIT1 R323Q Mutanten.

### 3.1.1 PROTEINHERSTELLUNG UND -AUFREINIGUNG

Rekombinantes Trit1 wurde, wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben, exprimiert und aufgereinigt. Unspezifisch gebundene Proteine wurden in Waschsritten mit steigender Imidazolkonzentration entfernt. Elutionsfraktionen 1-6 wurden mit 150 mM Imidazol eluiert. TRIT1 mit Poly-Histidin-Schwanz besitzt eine Größe von ungefähr 55 kDa. Die Elutionsfraktionen 1-3 des Wildtypproteins und die Elutionsfraktionen 2-4 der Mutante wurden jeweils vereint (Abb. 3.1 und Abb. 3.2). Nach der Konzentrationsbestimmung wurden die Proben aliquotiert und nach Schockfrost in flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert.



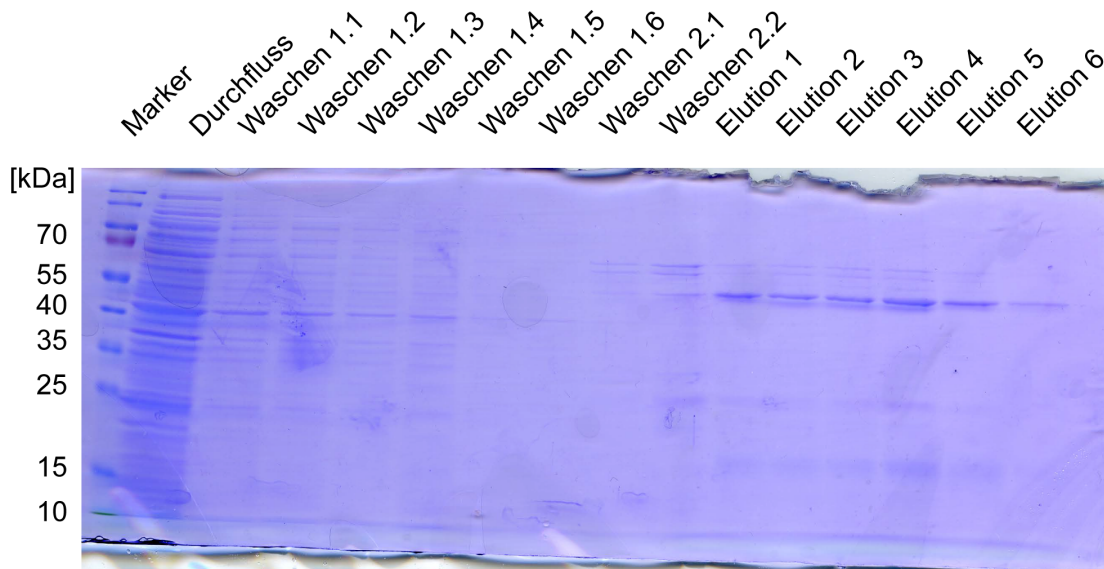


Abbildung 3.2: Commassie Färbung einer SDS-PAGE der Fraktionen der Ni-NTA Aufreinigung des TRIT1 R323Q Proteins. TRIT1 hat eine Größe von ungefähr 55 kDa.

### 3.1.2 MUTIERTES TRIT1 BESITZT EINE GERINGERE SPEZIFISCHE AKTIVITÄT

Für die Bestimmung der spezifischen Aktivitäten wurde ein *in vitro* Reaktionssystem mit  $^{14}\text{C}$  radioaktiv markiertem DMAPP als Isopentenyl-Donor etabliert (siehe Kap. 2.3.4). Hierbei wurde DMAPP im Überschuss verwendet, um dem Protein zu jeder Zeit ausreichend zur Verfügung zu stehen. Die Konzentration der ASL wurde titriert, um die Kinetik zwischen ASL und Protein messen zu können. Zuerst wurden die  $k_M$ -Werte der einzelnen ASL mit dem Wildtyp-Enzym bestimmt.

Unterschiede in der maximalen Geschwindigkeit und den  $k_M$ -Werten der einzelnen ASL cytoplasmatischer tRNAs sind erkennbar (Abb. 3.3).  $V_{\max}$  ist bei  $\text{tRNA}^{\text{Ser}}(\text{UGA})$  am Größten, gefolgt von  $\text{tRNA}^{\text{Ser}}(\text{AGA})$ . Der  $k_M$ -Wert ist bei  $\text{tRNA}^{\text{[Ser]Sec}}$  am Geringsten und bei  $\text{tRNA}^{\text{Ser}}(\text{UGA})$  am Höchsten.

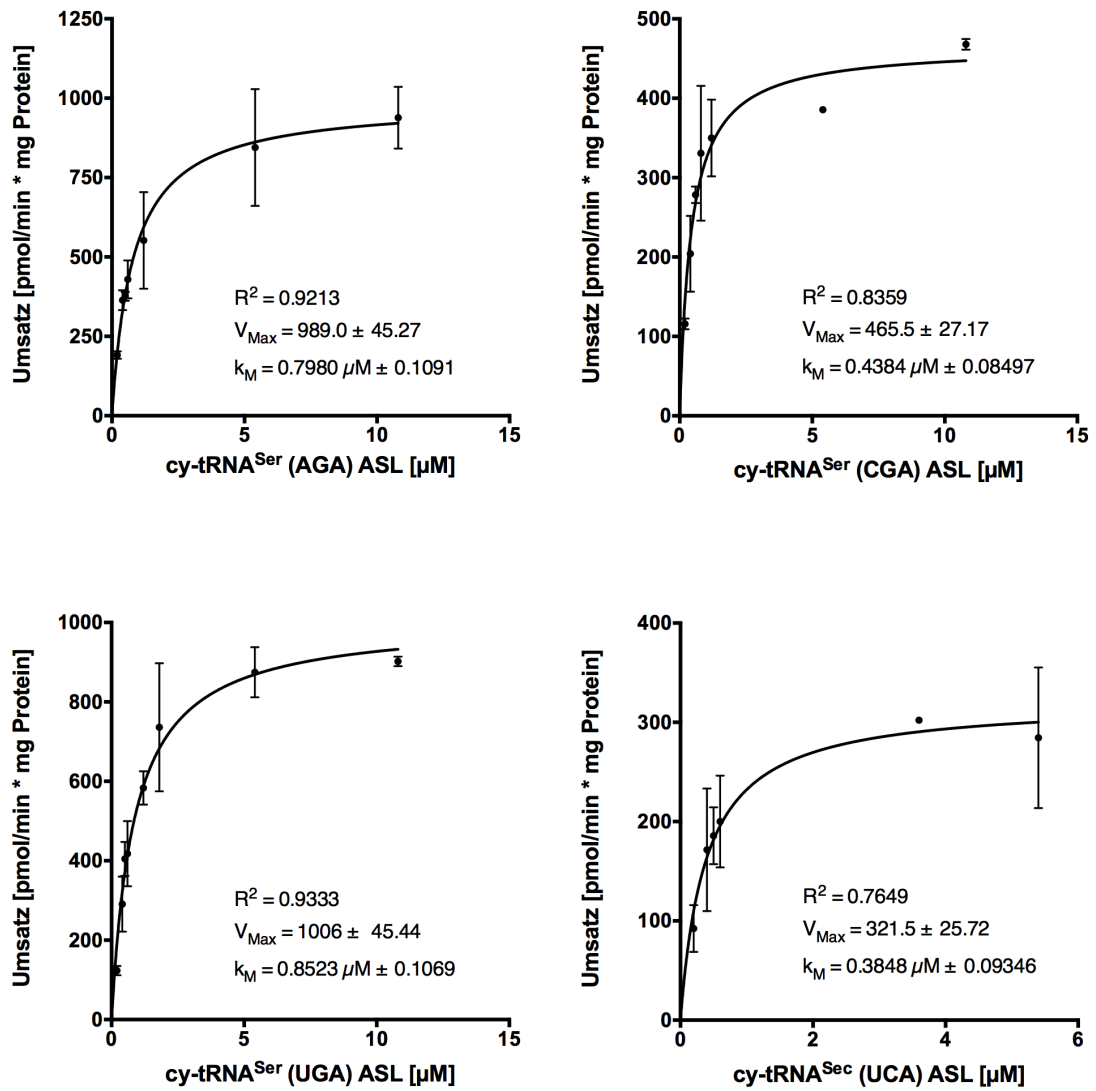


Abbildung 3.3: Kinetik cytoplasmatischer ASL. Die Darstellung zeigt die Menge an umgesetzten Isopentenylresten pro Minute pro mg Protein über verschiedene Konzentrationen der ASL. Der Regressionskoeffizient und die ermittelten kinetischen Werte sind in den Darstellungen zu finden. Die Werte wurden für die cytoplasmatischen ASL der tRNA<sup>[Ser]Sec</sup>, tRNA<sup>Ser</sup> (CGA), tRNA<sup>Ser</sup> (UGA) und tRNA<sup>Ser</sup> (AGA) bestimmt. Es wurden Triplikate vermessen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung.

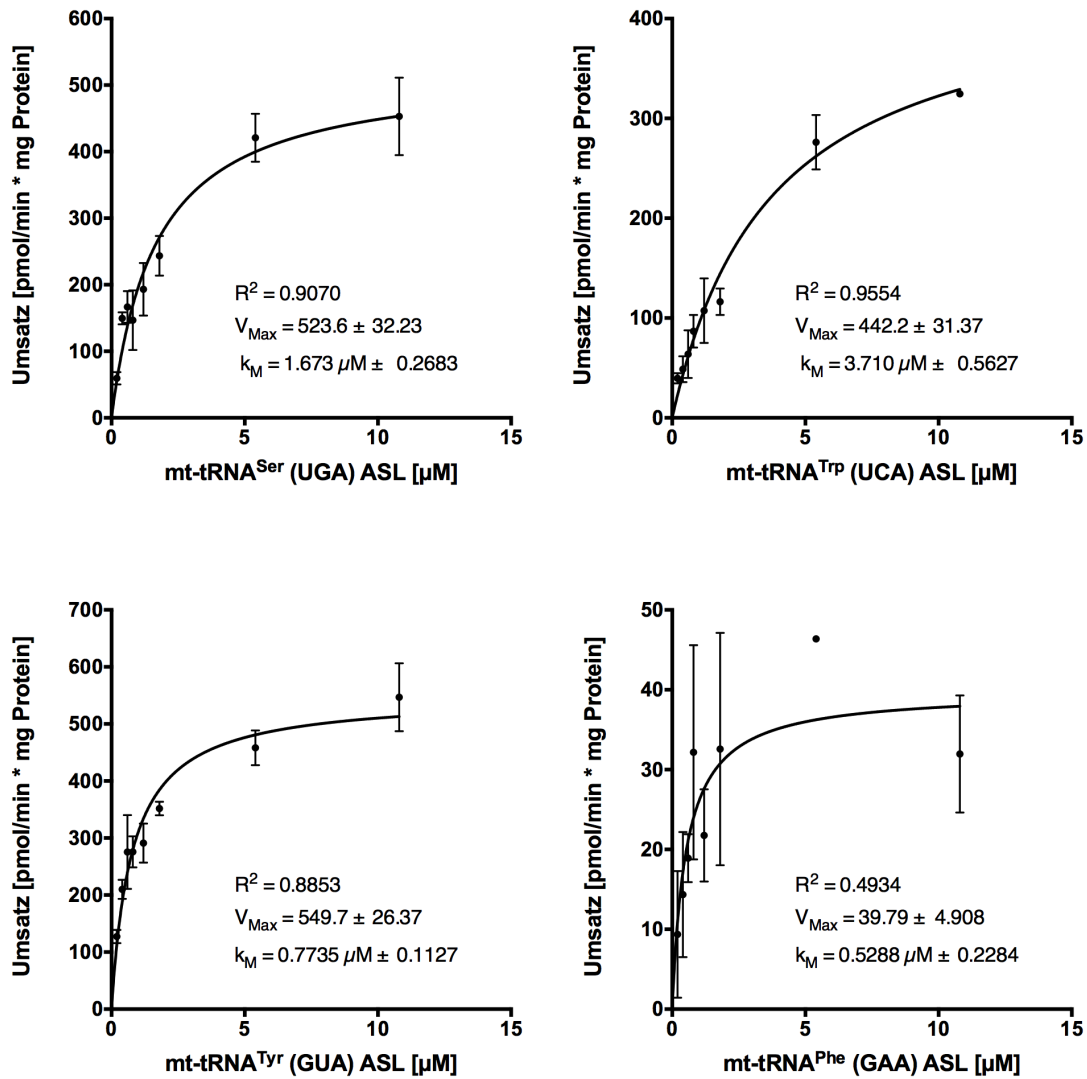
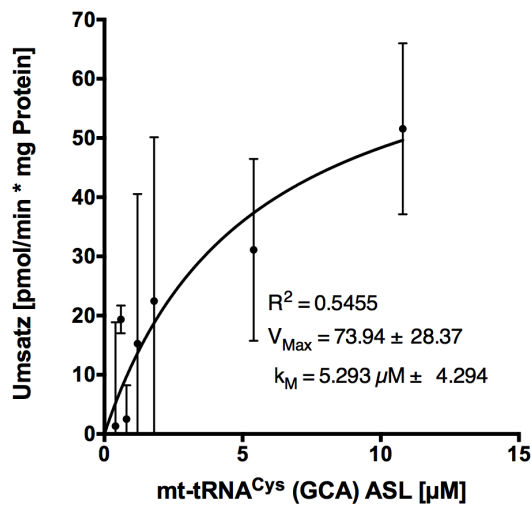


Abbildung 3.4: Kinetik mitochondrialer ASL. Die Darstellung zeigt die Menge an umgesetzten Isopentenylresten pro Minute pro mg Protein über verschiedene Konzentrationen der ASL. Der Regressionskoeffizient und die ermittelten kinetischen Werte sind in den Darstellungen zu finden. Die Werte wurden für die mitochondrialen ASL der tRNA<sup>Ser</sup>(UGA), tRNA<sup>Tyr</sup>(GUA), tRNA<sup>Trp</sup>(UCA) und tRNA<sup>Phe</sup>(GAA) bestimmt. Es wurden Triplikate vermessen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.



**Abbildung 3.5: Kinetik der mt-tRNA<sup>Cys</sup>-ASL.** Die Darstellung zeigt die Menge an umgesetzt Isopentenylresten pro Minute pro mg Protein über verschiedene Konzentrationen der ASL. Der Regressionskoeffizient und die ermittelten kinetischen Werte ist in der Darstellung zu finden. Die Werte wurden für den mitochondrialen ASL der tRNA<sup>Cys</sup>(GCA) bestimmt. Es wurden Triplikate vermessen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

Die ASL von mt-tRNA<sup>Ser</sup>(UGA), mt-tRNA<sup>Trp</sup>(UCA) und mt-tRNA<sup>Tyr</sup>(GUA) besitzen geringere  $V_{\max}$  und höhere  $k_M$ -Werte als cytoplasmatische ASL (Abb. 3.4). Die geringste maximale Geschwindigkeit zeigt mt-tRNA<sup>Phe</sup>(GAA). Für mt-tRNA<sup>Cys</sup>(GCA) wurde, neben des geringeren  $V_{\max}$  Wertes, der höchste  $k_M$ -Wert im Vergleich zu den anderen ASL gefunden (Abb. 3.5).

Zur Messung der spezifischen Aktivität wurde eine Endpunktanalyse durchgeführt. Hierbei wurde die Reaktion für alle ASL sowohl mit dem Wildtyp- als auch dem R323Q-Mutantenprotein durchgeführt. Dies erlaubt die spezifische Aktivität beider Proteine miteinander zu vergleichen (Abb. 3.6). Die R323Q Mutation führt zu einer Erniedrigung der spezifischen Aktivität bei allen ASL. Eine Aktivität konnte *in vitro* jedoch für alle ASL, mit Ausnahme der ASL von cy-tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> und mt-tRNA<sup>Phe</sup>(GAA) gezeigt werden, wobei auch keine Aktivität für mt-tRNA<sup>Phe</sup>(GAA) in der Kontrolle unter den gewählten Bedingungen gemessen werden konnte. Dieses Experiment legt dar, dass die R323Q Mutation *in vitro* zu einer Re-

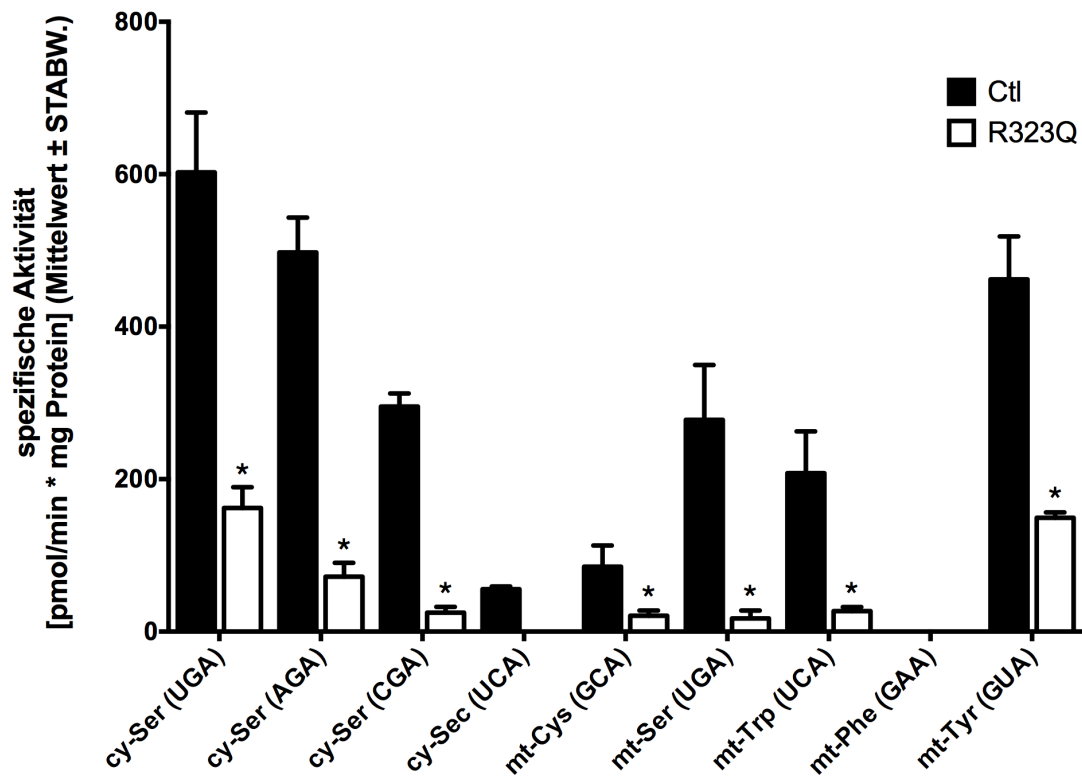


Abbildung 3.6: Spezifische Aktivitäten von TRIT1 WT und RQ. Die Darstellung zeigt die Menge an umgesetzten Isopen-tenylresten pro Minute pro mg Protein. Die Konzentration der eingesetzten ASL betrug jeweils die zuvor ermittelten  $k_M$ -Werte. Die Reaktion wurde nach 5 Minuten gestoppt und die übertragene Radioaktivität gemessen. Für den ASL von mt-tRNA<sup>Phe</sup> konnte nach 5 Minuten kein Signal detektiert werden. Es wurden Triplikate vermessen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Signifikante Unterschiede (t-Test,  $p < 0.05$ ) sind mit einem Stern gekennzeichnet.

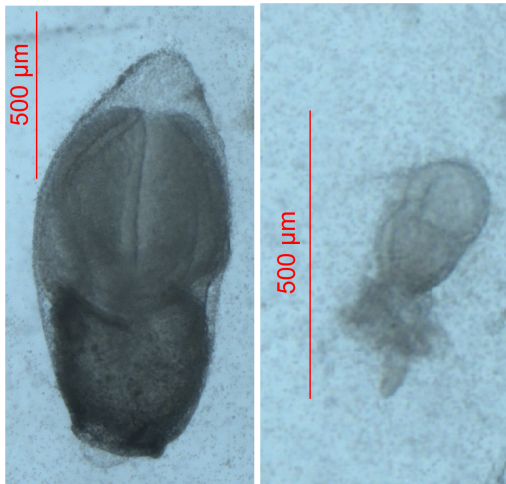
duktion der spezifischen Aktivität von TRIT1 führt. Die Aktivität ist jedoch nicht vollständig verloren.

### 3.2 TRIT1 MAUSMODELLE

Zur Untersuchung des Einflusses fehlender tRNA-Isopentenylierung auf Säugetiere wurde ein konditionales *knock-out* Mausmodell verwendet (siehe Kap. 2.2). Hierfür wurde das Cre/loxP-System verwendet, um *Trit1* spezifisch in Hepatozyten und corticalen Neuronen zu deletieren. Die zellspezifische Deletion erlaubt die Betrachtung organspezifischer Antworten auf fehlende Isopentenylierung. Dies hat zum Einen den Vorteil, dass unerwünschte Kompensationen anderer Organe vermindert werden und zum Anderen, dass die Versuchstiere weniger stark ausgeprägte Phänotypen vorweisen. Globale *Trit1*-Defizienz führt bereits im Embryonalstadium zum Tod der Versuchstiere. Hepatozytenspezifische *knock-out* Mäuse zeigen hingegen keinen sichtbaren Phänotypen, während in Neuronen deletiertes *Trit1* zu Mikrocephalie, auditorisch induzierten epileptischen Anfällen und vermindertem Körper- sowie Gehirngewicht führt. In den folgenden Abschnitten werden die verschiedenen Mausmodelle beschrieben und phänotypisiert.

#### 3.2.1 IN DER KEIMBAHN INAKTIVIERTES *TRIT1* IST EMBRYONAL LETAL

Trotz konditionalem *knock-out* besteht durch eine Phosphoglyceratkinase (PgK1) kontrollierte Cre-Rekombinase die Möglichkeit einer globalen Rekombination. Hierbei wird die Cre-Rekombinase, welche im Muttertier vorhanden ist, während der Schwangerschaft in der diploiden Phase exprimiert. Dies führt zur Rekombination *loxP*-flankierter Bereiche in allen Zellen des Nachwuchses, was zu einer globalen Deletion des Gens in den Embryonen führt.



**Abbildung 3.7: Embryos im Stadium E8.5.** Es sind zwei Embryos (links  $Trit1^{wt/wt; PgK^+}$ , rechts  $Trit1^{fl/fl; PgK^+}$ ) im Alter von E8.5 dargestellt. Der Kontrollembryo ist normal entwickelt, während der Embryosack des  $Trit1^{fl/fl; PgK^+}$  Embryos stark verkleinert ist.

Es wurden keine  $Trit1^{fl/fl; PgK^+}$  Mäuse geboren. Inspektionen der Embryos im Stadium E8.5 demonstrieren eine normale Entwicklung der Kontrollen, während die  $Trit1^{fl/fl; PgK^+}$  Embryos stark verkleinert sind (Abb. 3.7). Dies unterstützt die Annahme, dass globale  $Trit1$ -Deletion bereits im Embryostadium mortal ist.

### 3.2.2 DER PHÄNOTYP IST ORGANSPEZIFISCH UNTERSCHIEDLICH STARK AUSGEPRÄGT.

Aufgrund embryonaler Mortalität von  $Trit1$ -Inaktivierung in der Keimbahn von Mäusen wurde ein hepatozyten- und neuronspezifisches Mausmodell verwendet (siehe Kap. 2.2). Hierbei steht die Cre-Rekombinase unter Einfluss des Albumin (Alb) bzw. des  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (Camk) Promotors. Alb wird spezifisch in Hepatozyten exprimiert, während Camk spezifisch in corticalen Neuronen des Vorderhirns exprimiert wird.

$Trit1^{fl/fl; Alb^+}$  Mäuse besitzen keinen augenscheinlichen Phänotypen. Größe und Gewicht unterscheiden sich ebenfalls nicht signifikant (Abb. 3.8). Ebenso konnten keine sichtbaren Unterschiede der Leber erkannt werden. Die  $Trit1^{fl/fl; Camk^+}$  Mäuse hingegen demonstrieren

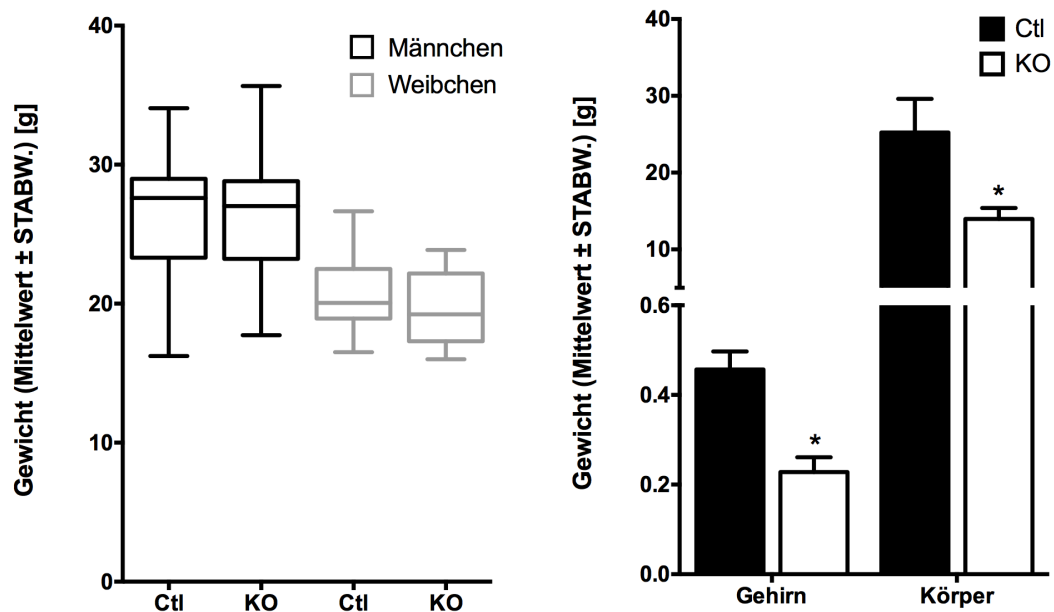
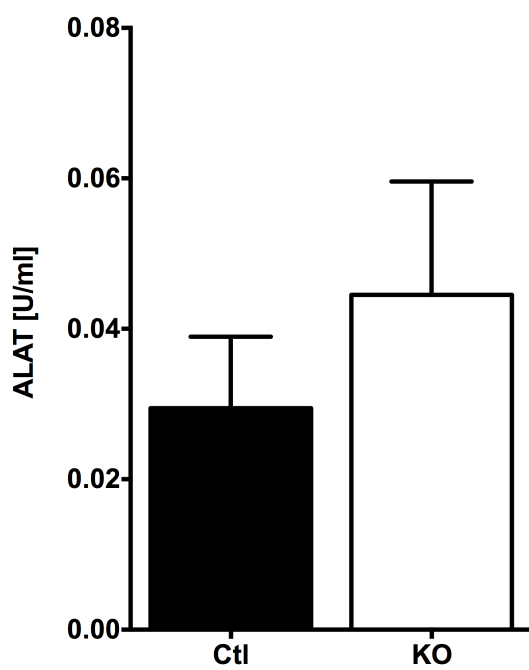


Abbildung 3.8: Körper- und Hirngewicht von *Trit1*-deletierten Mäusen und Kontrollen. Links dargestellt ist das Körpergewicht von ausgewachsenen *Trit1*<sup>fl/fl; Alb+</sup> Mäusen (n = 20) mit einem Alter von mindestens 60 Tagen. Die Genotypen sind jeweils in Männchen und Weibchen unterteilt. Rechts ist das Körper- und Hirngewicht von *Trit1*<sup>fl/fl; Camk+</sup> Männchen (n = 10) in einem Alter von 50 Tagen aufgetragen. Dargestellt sind die Mediane mit oberem und unterem Quartil (links) sowie die Mittelwerte (rechts) ± Standardabweichung. Signifikante Ergebnisse (t-Test, p < 0,05) sind mit einem Stern gekennzeichnet.

auditorisch induzierte epileptische Anfälle mit einem ausgeprägten Phänotypen. Das Körper- und das Hirngewicht sind signifikant reduziert.

Im Blutplasma hepatozytenspezifischer *Trit1*-defizienter Mäuse wurde eine leicht erhöhte Transaminaseaktivität (Alanin-Aminotransferase, ALAT) gemessen, die sich jedoch in einem nicht pathologischen Normalbereich befindet und keinen signifikanten Unterschied zu der Aktivität in den Kontrollen besitzt (Abb. 3.9). Dies lässt darauf schließen, dass die Zellintegrität der Leber nicht gestört ist.





**Abbildung 3.9: Aktivität der Alanin-Aminotransferase im Blutplasma von hepatozytenspezifischen *Trit1*-defizienten Mäusen.** Die Darstellung zeigt die ALAT-Aktivität im Blutplasma hepatozytenspezifischer *Trit1*-defizienter Mäuse und zugehöriger Kontrollen (n = 5). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Es wurde kein signifikanter Unterschied (t-Test,  $p < 0.05$ ) gemessen.

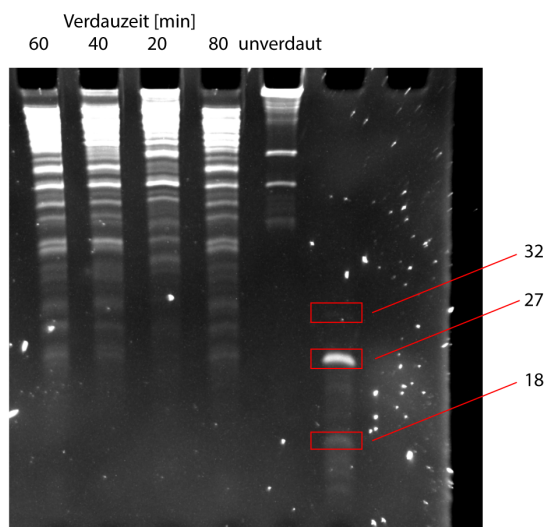
### 3.3 RIBOSOMALES PROFILING

Mögliche Einflüsse auf die Translationsmaschinerie durch nicht vorhandenes  $i^6A$  wurde mittels Ribo-Seq untersucht. Ribo-Seq ermöglicht den Aufenthaltsort der Ribosomen auf den translatierten mRNAs auf das Nukleotid genau zu bestimmen (siehe Kap. 2.3.8). Um dies zu bewerkstelligen wird die RNA mit RNase I verdaut. Bereiche der mRNA, die sich während des Verdau zwischen den ribosomalen UE befinden, sind vor dem Verdau geschützt. Diese Oligonukleotide (RPFs), im Mittel zwischen 28 und 30 Basen lang, werden aufgereinigt und anschließend sequenziert. Die so erhaltenen Daten werden, nach verschiedenen Prozessierungsschritten, gegen ein Transkriptom kartiert, um das sequenzierte RPF auf der zugehörigen mRNA nukleotidgenau ausrichten zu können. So ist es möglich verschiedene Faktoren, wie z.B. die Besetzzeit von bestimmten Codons oder das Leseraster, zu bestimmen. Eine detaillierte Erläuterung der Prozessierung der Daten und der selbst entwickelten Algorithmen zur Analyse ist in Kapitel 2.4 zu finden.

#### 3.3.1 DIE OPTIMALE VERDAUZEIT FÜR LEBERGEWEBE BETRÄGT 60 MINUTEN

Die Proben wurden, wie in Kapitel 2.3.8 beschrieben, mit einem speziellen Lysepuffer behandelt, um eine Denaturierung der ribosomalen Proteine zu verhindern. Der anschließende RNase I Verdau hat einen starken Einfluss auf die Qualität der Sequenzierungsdaten. Deshalb wurde zuerst ein Test mit verschiedenen langen Verdauzeiten durchgeführt, um die optimale Inkubationszeit zu bestimmen. Die nach dem Verdau per Ultrazentrifugation aufgerei-

**Abbildung 3.10: Test der RNase I Verdauzeit.** Dargestellt sind fünf Proben mit unterschiedlicher Verdauzeit. Es wurden 900 ng RNA pro Probe aufgetragen. Mit längerer Verdauzeit nimmt die Fragmentierung der RNA zu. Die unverdaute Probe zeigt klare ribosomale RNA Banden. Zur Größenbestimmung wurden RNA Oligonukleotide verschiedener Längen als Marker verwendet.



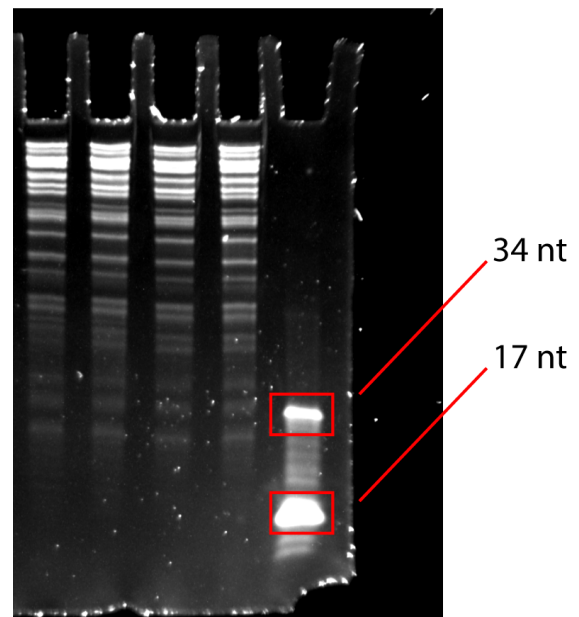
nigten RPFs wurden durch ein denaturierendes 15 % Urea Polyacrylamid Gel aufgetrennt (Abb. 3.10). Mit längerer Verdauzeit steigt die Anzahl der Fragmente mit der Größe von 27 - 30 Nukleotiden. Nach 80 Minuten ist eine Schwächung des Signals gegenüber einer Verdauzeit von 60 Minuten erkennbar, was auf einen Überverdau hindeutet. Aufgrund des Ergebnisses wurde sich dazu entschieden, eine Verdauzeit von 60 Minuten für die zu analysierenden Leberproben zu verwenden.

Die Proben besitzen ein gleichmäßiges Muster nach dem Verdau mit RNase I (Abb. 3.11). Ebenso sind die RPFs, die sich im Bereich zwischen 34 und 17 Nukleotiden befinden, für alle Proben in einer scharfen Bande zu sehen. Die RNA Konzentration und Reinheit wurde mittels Nanodrop bestimmt und die Fragmente zwischen 20 und 40 Nukleotiden anschließend zur Sequenzierung verwendet (Tab. 3.1).

60 min Verdau

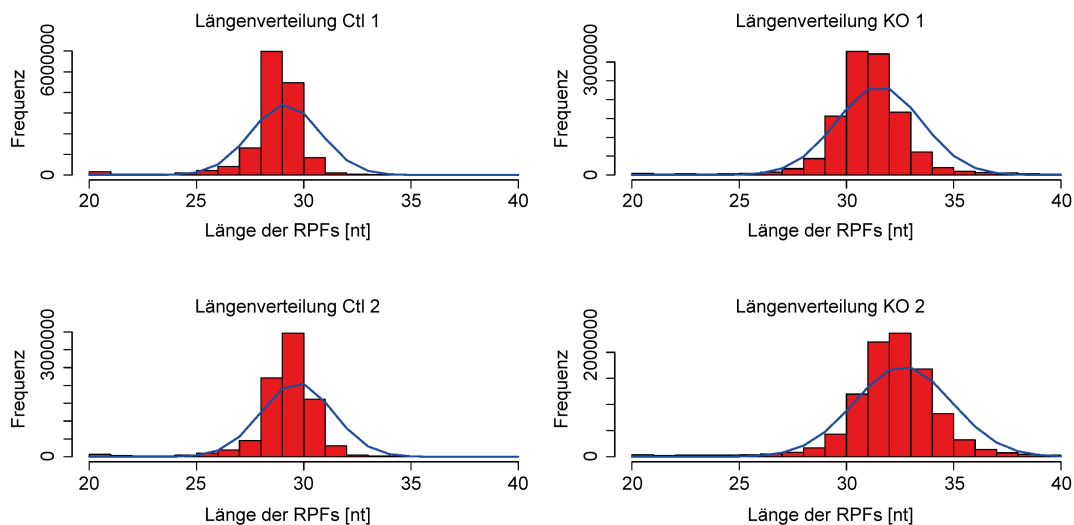
Ctl 1 Ctl 2 KO 1 KO 2 M

**Abbildung 3.11: Verdau der Proben für Ribo-Seq.** Das Gel wurde mit 900 ng RNA pro Probe beladen. Es wurden je zwei Kontrollen (Ctl) und zwei *Trit1*-defiziente (KO) Proben verdaut. Das Fragmentmuster aller Proben ist ähnlich, was auf gleichmäßigen Verdau hindeutet. Der Marker erlaubt die Identifizierung von Fragmenten zwischen 17 und 34 Nucleotiden, was der Bereich ist, in welchem die RPFs erwartet sind.



Probe	Konzentration [ng/μl]	260/280
Ctl 1	436.7	2.07
Ctl 2	369.5	2.06
KO 1	649.9	2.13
KO 2	563.2	2.13

**Tabelle 3.1: Konzentration und Qualität der RPFs.** Dargestellt sind die Nanodrop Ergebnisse der verdauten RNA-Proben. Die Reinheit der RNA wurde über den 260/280-Wert bestimmt. 260/280 > 2.0 deutet auf reine RNA hin.



**Abbildung 3.12: Größenverteilung cytoplasmatischer RPFs.** Es ist die Verteilung der Menge von RPFs gegen die entsprechende Nukleotidlänge aufgetragen. Die Längenverteilung der RPFs von Kontrollen (links) zeigen ein Maximum im Bereich von 28-30 Basen und eine schmale Verteilung. Die RPF Größen der *Trit1*-defizienten Proben (rechts) sind breiter verteilt und besitzen eine mittlere Größe von 31-33 Basen.

### 3.3.2 DIE GRÖSSENVERTEILUNG VON RPFs IST HETEROGEN

Da es technische und biologische Variation der Nukleotidlänge der RPFs geben kann, wurde in einem ersten Schritt die Größenverteilung ermittelt (siehe Kap. 2.4.9). Zur weiteren Analyse wurden die RPFs mit den Größen verwendet, die sich im Bereich des Mittelwerts  $\pm$  Standardabweichung der Verteilung befinden. Dies ermöglicht eine objektive probenspezifische Betrachtung der Verteilungen und zu verwendenden RPF Größen (Abb. 3.12).

Die Verteilung der Replikate innerhalb einer Gruppe ist ähnlich. Es ist ein Unterschied zwischen der Verteilung der Kontrollgruppe und der deletierten Gruppe zu erkennen. Die Länge der RPFs der *Trit1*-defizienten Gruppe ist im Mittel größer und besitzt eine breitere Verteilung als die Kontrollgruppe. Die für weitere Analysen verwendeten Größen sind in

Tabelle 3.2 dargestellt.

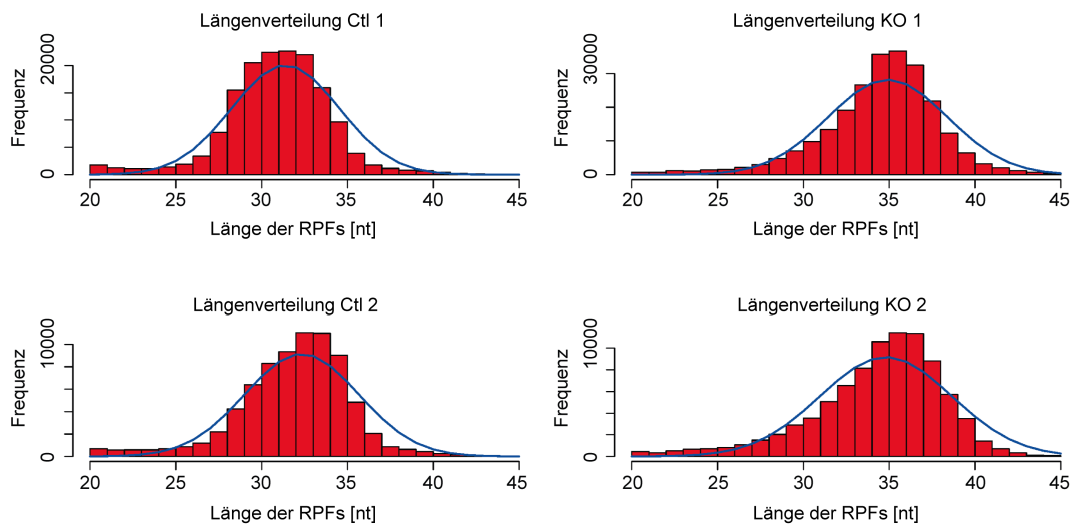
Probe	RPF Größen
Ctl 1	28, 29, 30, 31, 32
Ctl 2	28, 29, 30, 31, 32
KO 1	29, 30, 31, 32, 33, 34
KO 2	29, 30, 31, 32, 33, 34

**Tabelle 3.2: Zur Analyse verwendete Größen cytoplasmatischer RPFs.** Verwendete RPF Größen, welche sich im Bereich des Mittelwerts  $\pm$  Standardabweichung der Größenverteilung cytoplasmatischer RPFs befinden.

Die Größenverteilung mitochondrialer Ribosomen ist breiter als bei den cytoplasmatischen Ribosomen mit Maxima bei längeren RPFs (Abb. 3.13). Es ist jedoch das gleiche Verhalten zu beobachten wie bei den cytoplasmatischen RPFs: die Maxima der Verteilung mitochondrialer RPFs von den *Trit1*-defizienten Proben sind weiter in den Bereich der längeren RPFs verschoben. Die für mitochondriale RPFs verwendeten Größen sind in Tabelle 3.3 aufgelistet.

Probe	RPF Größen
Ctl 1	28, 29, 30, 31, 32, 33, 34
Ctl 2	28, 29, 30, 31, 32, 33, 34
KO 1	32, 33, 34, 35, 36, 37, 38
KO 2	32, 33, 34, 35, 36, 37, 38

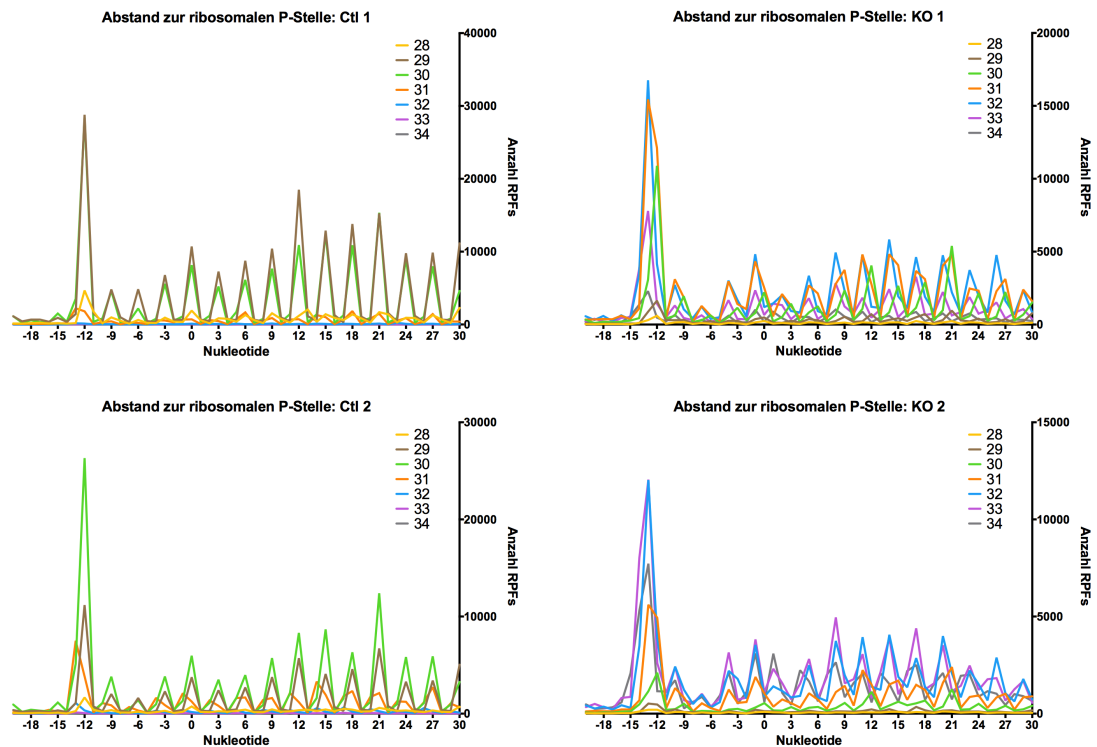
**Tabelle 3.3: Zur Analyse verwendete Größen mitochondrialer RPFs.** Verwendete RPF Größen, welche sich im Bereich des Mittelwerts  $\pm$  Standardabweichung der Größenverteilung mitochondrialer RPFs befinden.



**Abbildung 3.13: Größenverteilung mitochondrialer RPFs.** Es ist die Verteilung der Menge von RPFs gegen die entsprechende Nukleotidlänge aufgetragen. Die Längenverteilung der RPFs von Kontrollen (links) zeigen eine mittlere Größe von 32-33 Basen. Die RPF Größen der deletierten Proben (rechts) sind breiter verteilt und besitzen eine mittlere Größe von 35-36 Basen.

### 3.3.3 DER ABSTAND ZUR P-STELLE IN CYTOPLASMATISCHEN RPFs IST ABHÄNGIG VON DER RPF LÄNGE

Um eine Aussage über den Translationszustand einzelner Codons treffen zu können, ist es unerlässlich die genaue Position der P-Stelle - und somit auch der A-Stelle - jedes RPF zu berechnen (siehe Kap. 2.4.9). Alle im Initiationsbereich befindlichen RPFs wurden mit ihren 5'-Enden relativ zum Startcodon auf die zugehörigen Transkripte kartiert. Nach der Bestimmung der positionsspezifischen Summen aller 5'-Enden in der Startregion wurden diese in Abhängigkeit der Entfernung zum Startcodon dargestellt (Abb. 3.14). Die Berechnung wurde gruppenspezifisch für die jeweils zu verwendenden Größen durchgeführt. Für jede verwendete Größe wurde das größte Maximum vor dem Startcodon als der Abstand zur P-



**Abbildung 3.14: Abstand zur P-Stelle cytoplasmatischer RPFs.** Dargestellt ist die Menge an RPFs pro Nucleotid im Initiationsbereich für die zuvor ermittelten zu verwendenden RPF Größen cytoplasmatischer RPFs (28-34 Nucleotide). Das erste Nucleotid des Startcodons ist an der Stelle 0. Die Periodizität der Kontrollen (links) ist stärker ausgeprägt als bei den *Trit1*-defizienten Proben (rechts).

Stelle definiert (Tab. 3.4). Im gleichen Zuge wurde auch untersucht, ob es sich bei den verwendeten Größen um RPFs handelt, da translatierende Ribosomen eine Triplet-Periodizität aufweisen.

Es lässt sich bei jeder verwendeten Größe eine Triplet-Periodizität erkennen, weshalb diese als RPFs definiert - und somit für die weiteren Analysen verwendet - werden. Jedoch ist auch klar ersichtlich, dass die Periodizität in den Kontrollen besser ausgeprägt ist als in den *Trit1*-defizienten Proben, was auf eine Beeinflussung der Translationsmaschinerie hindeutet.

Wie bereits in Kapitel 2.4.9 erläutert, ist eine Berechnung des Abstands zur P-Stelle für



RPF Größe:	27	28	29	30	31	32	33	34
Ctl 1	-	12	12	12	13	13	-	-
Ctl 2	-	12	12	12	13	13	-	-
KO 1	-	-	12	12	13	13	13	13
KO 2	-	-	12	12	13	13	13	13

**Tabelle 3.4: Größenspezifischer Abstand zur P-Stelle cytoplasmatischer RPFs.** Aufgestellt sind die ermittelten Abstände zur ribosomalen P-Stelle cytoplasmatischer RPFs. Die aufgelisteten Größen mit ermitteltem Abstand wurden zur weiteren Analyse verwendet.

mitochondriale RPFs mit dieser Methode nicht möglich. Es wurde daher für alle mitochondrialen RPFs ein Abstand von 14 Nukleotiden zur P-Stelle festgelegt (Pearce et al., 2017).

### 3.3.4 RPFs MIT EINER LÄNGE VON 31 BASEN BESTEHEN AUS ZWEI SPEZIES

Bei der Bestimmung der Abstände zur P-Stelle ist ein Plateau bei den RPFs mit der Größe von 31 Nukleotiden erkennbar (Abb. 3.14). Dies bedeutet, dass fast 50 % dieser RPFs einen Abstand von 12 bzw. 13 Nukleotiden vom 5'-Ende zur P-Stelle besitzen. Zur Überprüfung, ob dieser Unterschied natürlich bedingt ist oder durch einen unterschiedlichen Verdau entsteht, wurden auch die Abstände vom 3'-Ende der RPFs zum Startcodon berechnet. Der Abstand zwischen den Maxima der Größen am 3'-Ende und den Maxima an den 5'-Enden gleicher RPFs ermöglicht den Verdau der Nukleotide der verschiedenen Größen zu vergleichen (Abb. 3.15).

RPFs mit einer Länge von 32 Basen sind am 5'- und am 3'-Ende ein Nukleotid länger als RPFs mit der Länge von 30 Basen. Der größere Anteil von RPFs mit 31 Basen ist 5' um ein Nukleotid länger als die Spezies mit 30 Basen. Ein nicht unerheblicher Anteil ist jedoch am 3'-Ende um eine Base weniger verdaut als RPFs mit einer Größe von 30 Basen. Durch das Aufkommen zweier unterschiedlicher Spezies wurden RPFs mit der Größe 31 nicht für

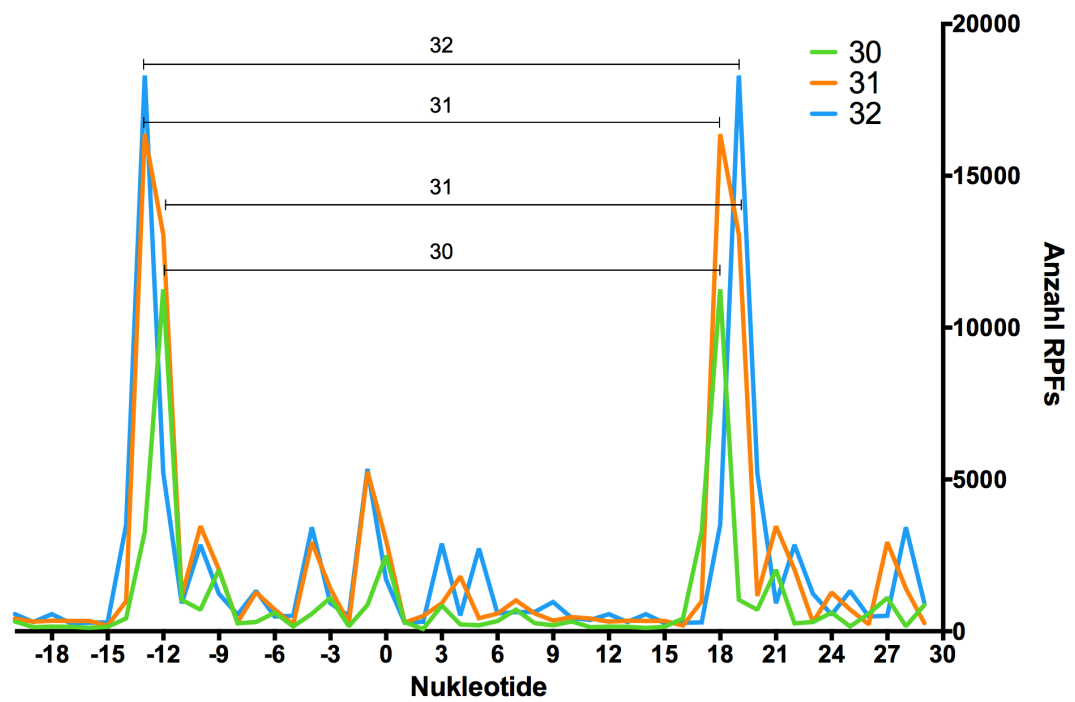


Abbildung 3.15: Analyse des spezifischen Verbaus von RPFs und der Einfluss auf den Abstand zur P-Stelle. Die RPFs wurden mit den 5'- und 3'-Enden im Bereich des Startcodons kartiert und aufsummiert. Die Größen 30 (grün), 31 (orange) und 32 (blau) sind dargestellt. Die Position 0 ist das erste Nukleotid des Startcodons.

subcodon- und codongenaue Analysen verwendet, da die exakte Bestimmung des Leserahmens aufgrund der Unterschiede des Verdaus nicht möglich ist.

### 3.4 FEHLENDE ISOPENTENYLIERUNG FÜHRT ZU VERÄNDERTER EXPRESSION IM CYTOPLASMA UND DEN MITOCHONDRIEN: ISR UND UPR SIND AKTIVIERT.

#### 3.4.1 ENZYME DES FOLAT-ZYKLUS SIND VERSTÄRKT EXPRIMIERT

Durch RT-PCR Analysen wurde verstärkte Expressierung von Markergenen des Folatzyklus gezeigt (Abb. 3.16 und Abb. 3.17). Außerhalb des Mitochondriums lokalisiertes Psat1 (Phosphoserin-Aminotransferase) ist hierbei mit 15 - 20-facher Erhöhung am stärksten verändert. Psph (Phosphoserin-Phosphatase) weist ebenfalls eine Induktion auf. Innerhalb des Mitochondriums ist das Transkriptlevel des Enzyms des letzten Schrittes des Folat-Zyklus, Mthfd1l (Methylentetrahydrofolat-Dehydrogenase 1 like), auch erhöht. Die Enzyme der Zwischenschritte des Folat-Zyklus sind in der Leber nicht verändert. In den Cortexproben neuronenspezifischer *Trit1*-defizienter Proben ist zusätzlich im Mitochondrium lokalisiertes Mthfd2l (Methylentetrahydrofolat-Dehydrogenase 2 like) induziert.

#### 3.4.2 DIFFERENTIELLE EXPRESSION *TRIT1*-DEFIZIENTER LEBERPROBEN

RNA-Sequenzierung hepatozytenspezifischer *Trit1*-defizienter Mäuse offenbart eine Induktion der ISR. Die Transkriptlevel von *Asns* (Asparaginsynthetase), *Sars* (Seryl-tRNA-Synthetase), *Fgf21* (Fibroblasten Wachstumsfaktor 21) und *Mthfd2* (Methylentetrahydrofolat Dehydrogenase 2) sind erhöht (Abb. 3.18). *Ctsl* und *Ctsz* (Cathepsin L und Cathepsin Z (früher *Ctsx*)) spielen eine zentrale Rolle im Proteinkatabolismus und sind ebenfalls induziert. *Fgf21* wird als Marker bei Mitochondriopathien verwendet und wird selbst durch den transkriptio-

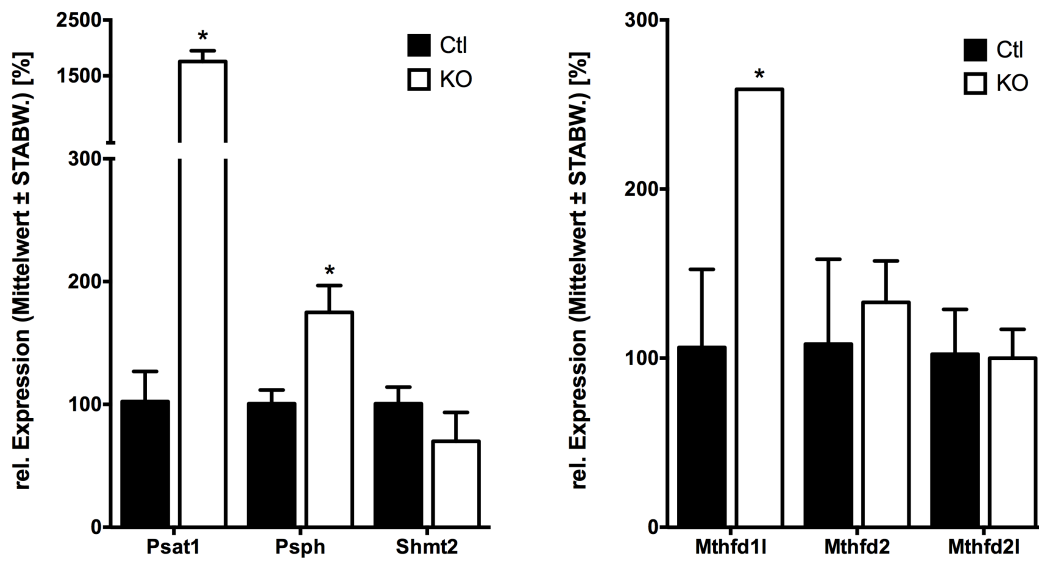


Abbildung 3.16: Transkriptlevel von am Folatzyklus beteiligter Enzyme. Dargestellt sind die RT-PCR Ergebnisse von Lebergewebe hepatozytenspezifischer *Trit1*-defizienter Mäuse mit den zugehörigen Mittelwerten ± Standardabweichung. Ctl = Kontrolle, KO = *Trit1* knock-out. Signifikante Unterschiede (t-Test,  $p < 0.05$ ) sind mit einem Stern gekennzeichnet (n = 3).

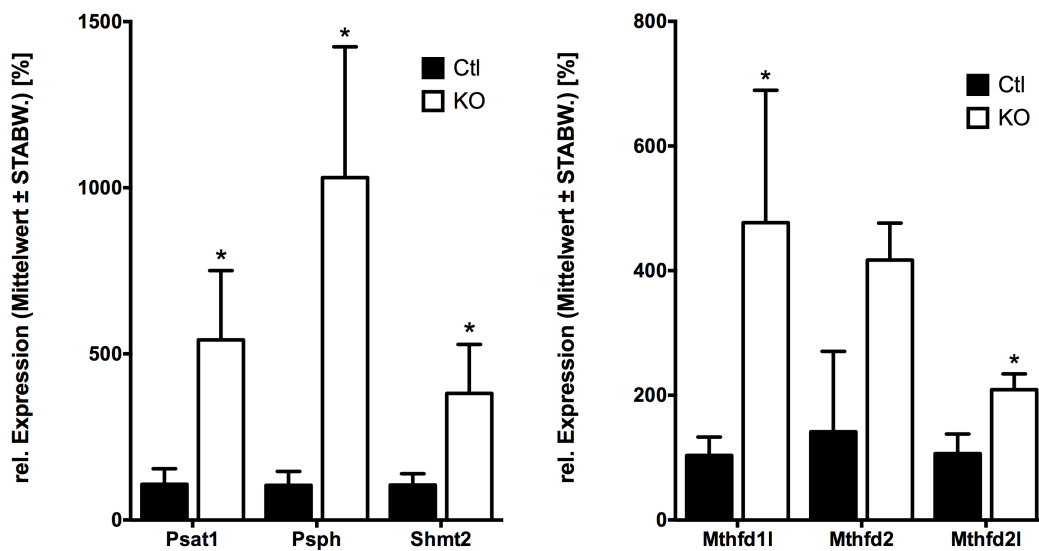
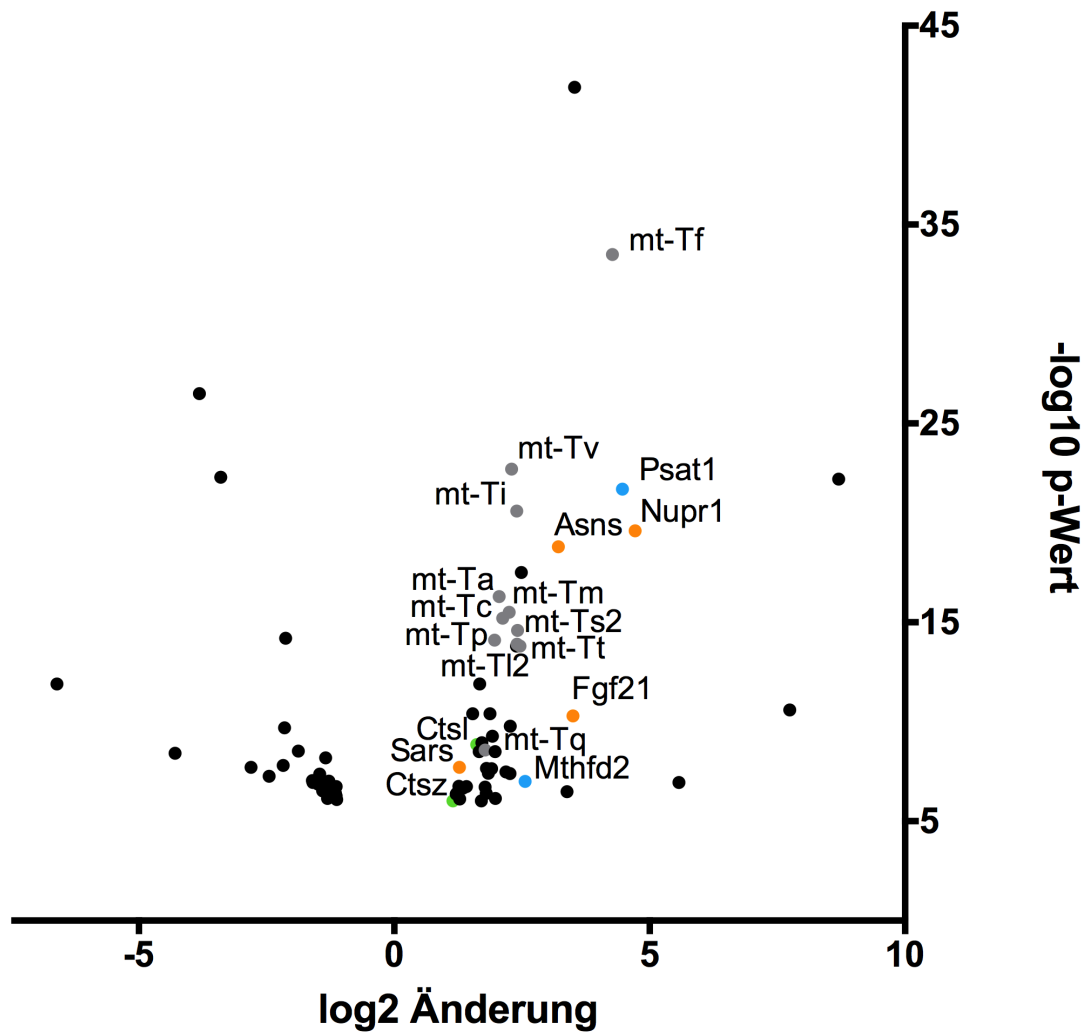


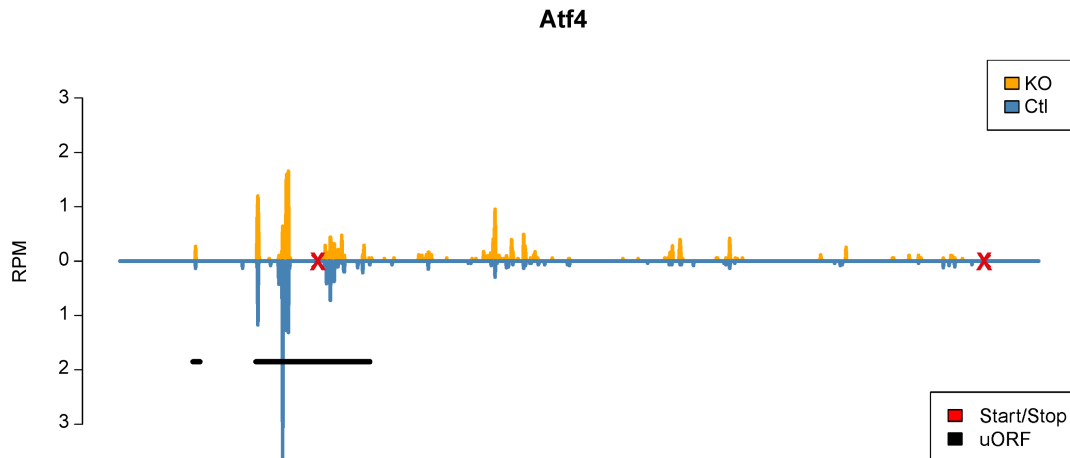
Abbildung 3.17: Transkriptlevel von am Folatzyklus beteiligter Enzyme. Dargestellt sind die RT-PCR Ergebnisse von Cortexgewebe neuronspezifischer *Trit1*-defizienter Mäuse mit den zugehörigen Mittelwerten ± Standardabweichung. Ctl = Kontrolle, KO = *Trit1* knock-out. Signifikante Unterschiede (t-Test,  $p < 0.05$ ) sind mit einem Stern gekennzeichnet (n = 3).

nenen Regulator Nupr1 (Nukleäres Protein 1) aktiviert. Psat1, ein zentrales Protein im Serin und Folatstoffwechsel, liegt ebenfalls verstärkt exprimiert vor.

Auffällig ist, dass die mitochondrial codierten tRNAs Glutamin (mt-Tq), Prolin (mt-Tp), Alanin (mt-Ta), Cystein (mt-Tc), Valin (mt-Tv), Isoleucin (mt-Ti), Leucin 2 (mt-Tl2), Serin 2 (mt-Ts2), Threonin (mt-Tt) und Phenylalanin (mt-Tf) induziert sind.



**Abbildung 3.18: Vulkandarstellung differentiell exprimierter Transkripte in Lebergewebe.** Bei der Vulkandarstellung ist das Signifikanzniveau gegen die Änderung der Expression aufgetragen. Dargestellt sind die signifikant exprimierten Transkripte. Mitglieder des Folatezyklus (blau), des ISR (orange), mitochondriale tRNAs (grau) und Cathepsine (grün) sind markiert. Die Signifikanz ( $q < 0.05$ ) wurde mittels Wald-Test mit multipler Testkorrektur nach Benjamini-Hochberg berechnet ( $n = 2$ ).

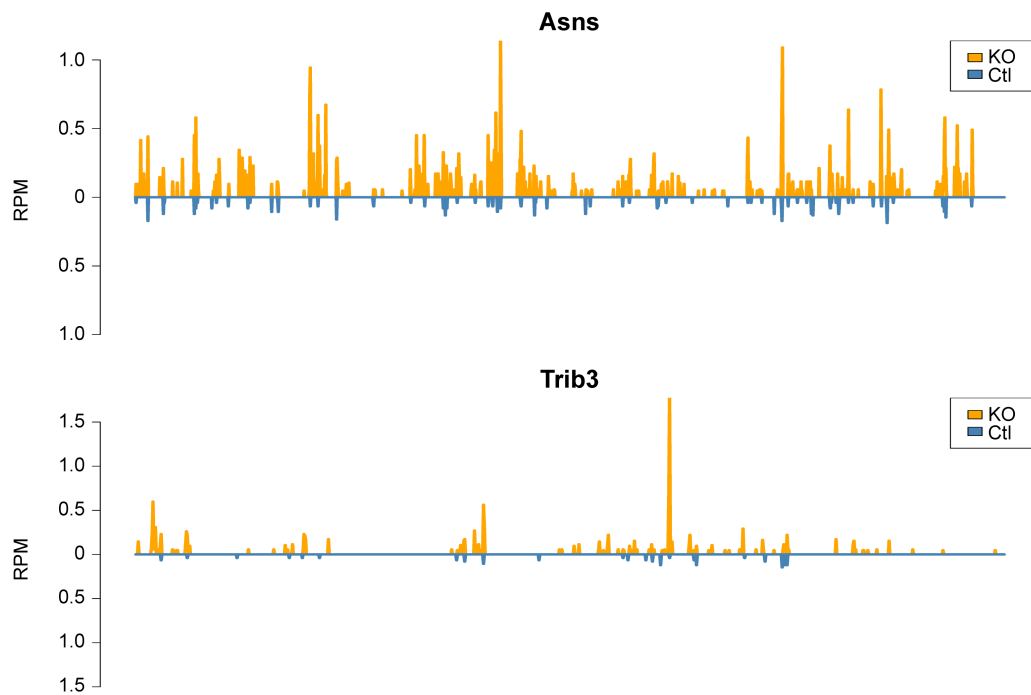


**Abbildung 3.19: Ribosomenprofil von Atf4.** Dargestellt ist das gesamte Atf4 Transkript, inklusive 5'- und 3'-UTR Bereiche. Das Ribosomenprofil von Atf4 zeigt ein erhöhtes Vorkommen von Ribosomen auf der codierenden Sequenz der mRNA bei den *Trit1*-defizienten Leberproben (orange). Die Kontrollen (blau) besitzen mehr Ribosomen im Bereich des zweiten uORF (schwarzer Balken), welcher mit dem Startcodon (erstes rotes Kreuz) überlappt. Das Stopcodon ist ebenfalls mit einem roten Kreuz gekennzeichnet. Dargestellt sind die Mittelwerte der normalisierten RPFs (RPM) aus je zwei Replikaten pro Gruppe.

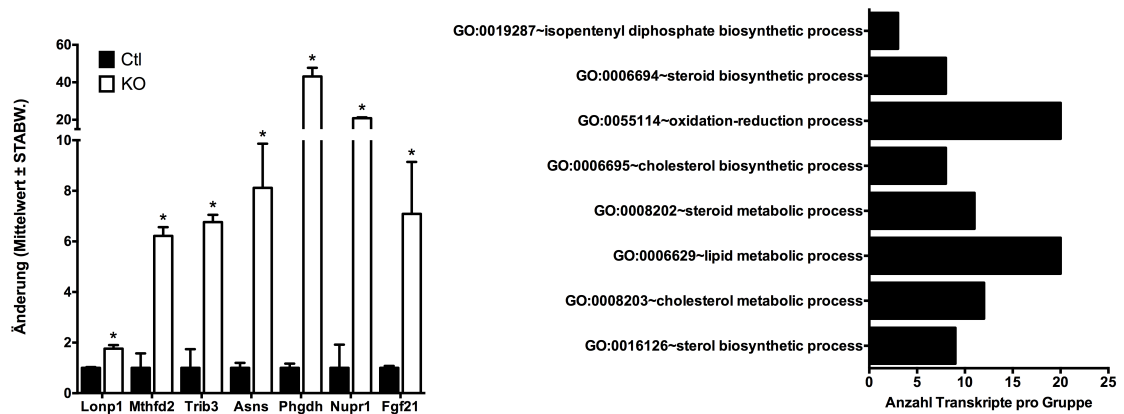
Das Ribosomenprofil des Schlüsseltranskripts des ISR, *Atf4* (*Activating transcription factor 4*), wird durch Suppression des zweiten uORF translational aktiviert (siehe Kap. 0.7, Abb. 3.19). Weitere Transkripte des ISR weisen ebenfalls eine vermehrte Menge an Ribosomen auf. So sind, u.a. *Asns* und *Trib3* (Tribbles Pseudokinase 3) in den *Trit1*-defizienten Proben deutlich stärker mit Ribosomen besetzt als die Kontrollen (Abb. 3.20).

Die genomweite Ermittlung der Anzahl von RPFs, die auf jedes Gen kartieren, zeichnet ein ähnliches Bild wie die Transkriptomanalyse. Die cytoplasmatischen Proteasen *Cts1* und *Ctsz*, sowie die mitochondriale Protease *Lonp1* (Lon-Protease 1), sind verstärkt translatiert. *Phgdh* (Phosphoglycerat-Dehydrogenase), das zentrale Protein des L-Serin Biosynthesewegs, besitzt wie *Sars* (Serin-tRNA Synthetase) eine erhöhte Ribosomenmenge auf der codieren-





**Abbildung 3.20: Ribosomenprofil von Transkripten der ISR.** Dargestellt sind die RPM pro Position auf den codierenden Sequenzen von ISR Transkripten. Die Ribosomenprofile von *Asns* und *Trib3* zeigen ein erhöhtes Vorkommen von Ribosomen auf der codierenden Sequenz der mRNA bei den *Trit1*-defizienten Proben (orange). Die Kontrollen (blau) zeichnen sich durch deutlich weniger Ribosomen auf den Transkripten aus. Dargestellt sind die Mittelwerte der normalisierten RPFs (RPM) aus je zwei Replikaten pro Gruppe.



**Abbildung 3.21: Signifikant differentielle Mengen von Ribosomen auf Transkripten.** Die Ribo-Seq Daten von Leberproben wurden nach differentiellen Mengen von RPFs pro Transkript untersucht. Gezeigt sind signifikant erhöhte Ribosomenmengen auf codierender Sequenzen von Transkripten in *Trit1*-defizienten Proben (links). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Signifikante Unterschiede (Wald-Test mit BH-Korrektur,  $q < 0.05$ ) sind mit einem Stern gekennzeichnet ( $n = 2$ ). Die funktionelle Analyse (rechts) zeigt die Eingruppierung von Transkripten mit signifikant weniger RPFs in den *Trit1*-defizienten Proben in *gene ontology* (GO) Gruppen. Die signifikanten Gruppen (FDR  $< 0.05$ ) sind mit der Anzahl der Gene innerhalb der Gruppe aufgetragen ( $n = 2$ ).

den Sequenz (Abb. 3.21). Die funktionelle Analyse herunter regulierter Transkripte ergibt differentielle Eingruppierungen biologischer Prozesse in einer *gene ontology*-Analyse (Abb. 3.21). Auffällig ist, dass die Lipidsynthese, sowie die Steroidsynthese, stark betroffen sind. Des Weiteren liegt die Biosynthese von Isopentenylresten ebenfalls reduziert vor.

### 3.4.3 DIFFERENTIELLE EXPRESSION *TRIT1*-DEFIZIENTER CORTEXPROBEN

Die transkriptionelle Antwort neuronspezifischer *Trit1*-defizienter Mäuse ist, wie beim Phänotypen schon zu beobachten, stärker ausgeprägt als bei hepatozytenspezifischer *Trit1*-defizienter Mäuse. Die Neurofilamente *Nefl*, *Nefm* und *Nefh* sind herunter reguliert, während die nukleär codierten mitochondrialen Untereinheiten *Sdh*d (Succinatdehydrogenase D, Komplex II), *Cyb5r1* und *Cyb5r2* (NADH-Cytochrome B5 Reductase 1/2, Komplex I), sowie

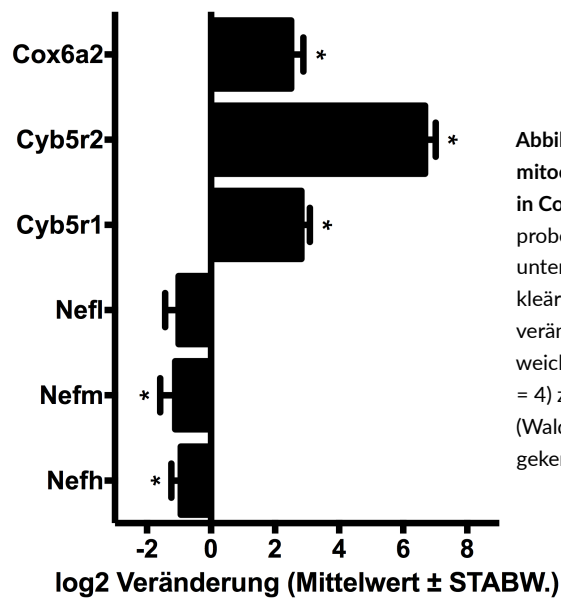
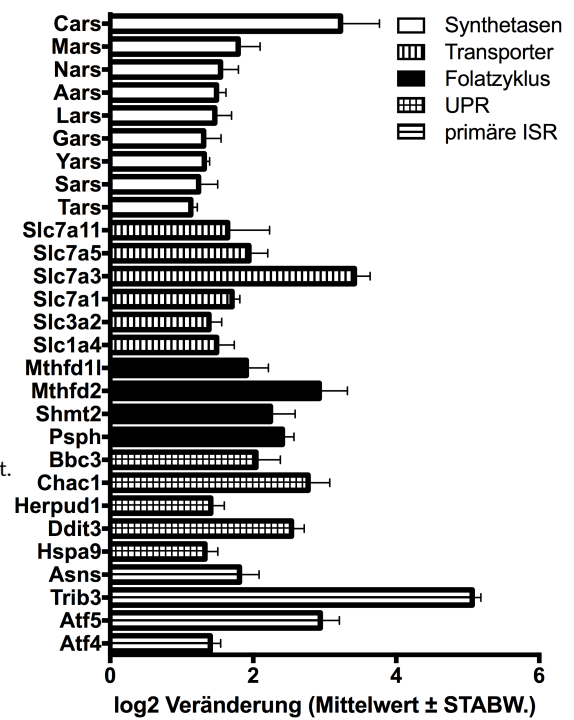


Abbildung 3.22: Transkriptlevel von Neurofilamenten und mitochondrialen Untereinheiten des OXPHOS-Komplexe in Cortexproben. Poly(A) RNA-Sequenzierung von Cortexproben wurde nach differentiell exprimierten Transkripten untersucht. Unter anderem sind Neurofilamente und nukleär codierte mitochondriale Untereinheiten signifikant verändert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Änderung von *Trit1*-defizienten Proben (n = 4) zu den Kontrollen (n = 2). Signifikante Unterschiede (Wald-Test mit BH-Korrektur,  $q < 0.05$ ) sind mit einem Stern gekennzeichnet.

Cox6a2 (Cytochrome C Oxidase Untereinheit VIa Polypeptid 2, Komplex IV) induziert werden (3.22).

Atf4 liegt hier schon auf transkriptioneller Ebene induziert vor. Ebenfalls sind cytosolplasmatisch und mitochondrial lokalisierte Mitglieder des Folatzyklus (PspH, Shmt2, Mthfd2 und Mthfd11) überexprimiert. Mitglieder der UPR, wie z.B. Ddit3 (auch Chop, *DNA Damage Inducible Transcript 3*) und Hspa9 (*Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 9*), sowie Aminosäure-Transporter und -tRNA Synthetasen, sind ebenfalls aktiviert (3.23).

Abbildung 3.23: Transkriptlevel ISR- und UPR-abhängiger Transkripte in Cortexproben. Poly(A) RNA-Sequenzierung von Cortexproben wurde nach differentiell exprimierten Transkripten zwischen *Trit1*-defizienter Proben (n = 4) und Kontrollen (n = 2) untersucht. Schlüssel- und Zieltranskripte der ISR, der UPR und des Folatzyklus sind induziert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung signifikant differentiell exprimierter Transkripte. Die Signifikanz ( $q < 0.05$ ) wurde mit einem Wald-Test und darauf folgender multipler Testkorrektur (BH-Korrektur) berechnet.



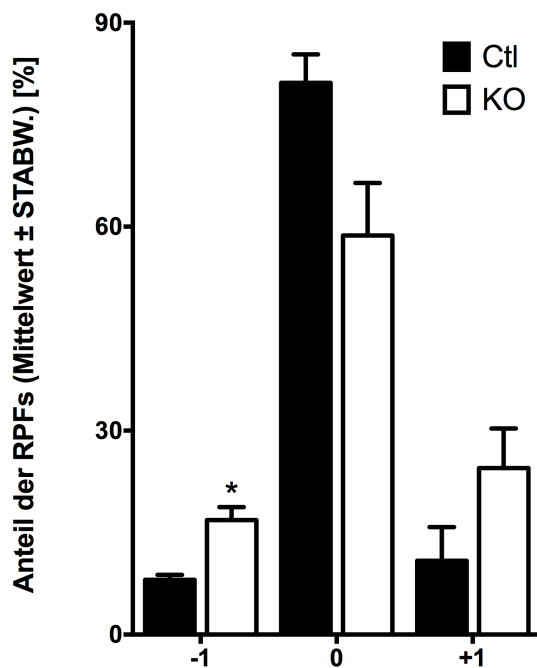


Abbildung 3.24: Globale Leserahmenverteilung translatierender Ribosomen. Der Leserahmen aller Ribosomen innerhalb codierender Sequenzen wurde bestimmt. Ribosomen mit einer Länge von 31 Basen wurden nicht verwendet (siehe Kap. 3.3.4). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Signifikante Unterschiede (t-Test,  $p < 0.05$ ) sind mit einem Stern gekennzeichnet ( $n = 2$ ).

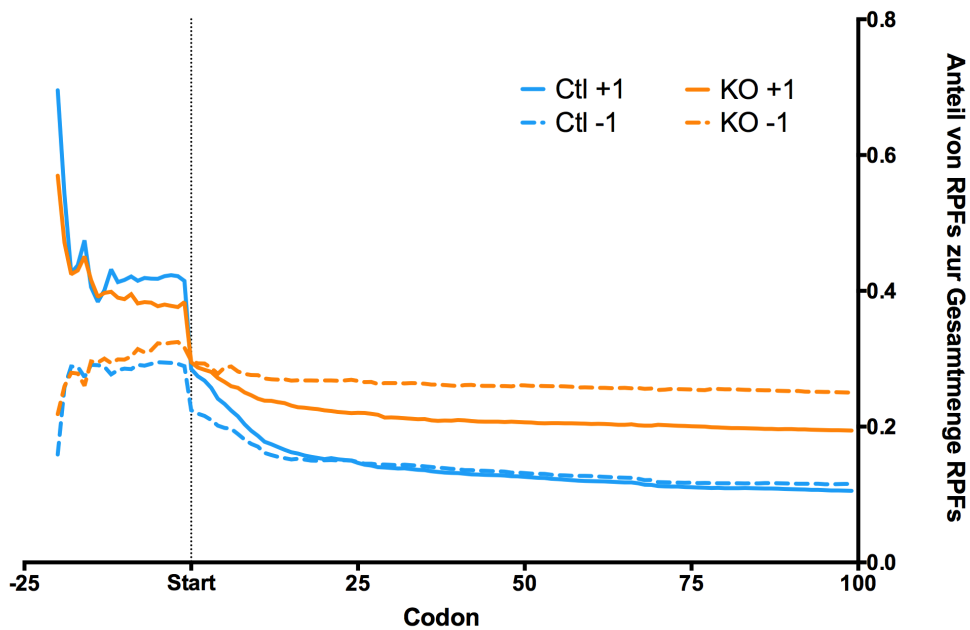
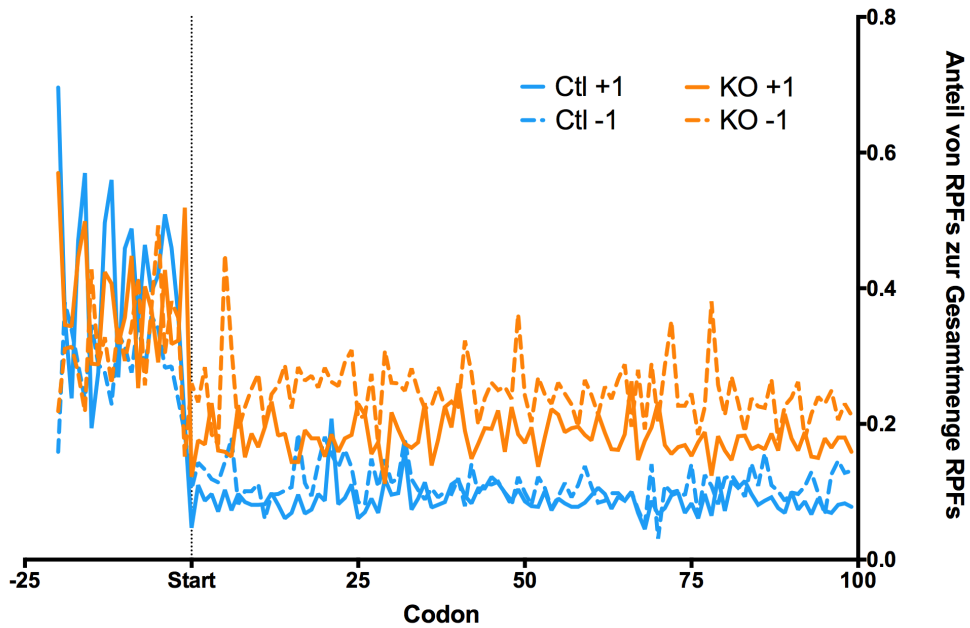
### 3.5 FEHLENDE ISOPENTENYLIERUNG BEEINFLUSST DIE GLOBALE TRANSLATION

#### 3.5.1 GLOBALER ANSTIEG VON LESERAHMENVERSCHIEBUNGEN

Für die korrekte Translation ist die Einhaltung der Codon Triplet-Periodizität von höchster Wichtigkeit. Verschiedene Einflüsse können sich auf die Aufrechterhaltung auswirken, was zu einem Verschieben des Ribosoms um eine Base nach vorne (+1 Verschiebung) oder nach hinten (-1 Verschiebung) führen kann. Diese Ribosomen befinden sich dann in einem falschen Leserahmen (*out-of-frame*) und somit nicht mehr *in-frame*. Der falsche Leserahmen der Ribosomen führt zur Decodierung von falschen Aminosäuren und ebenfalls, bei Decodierung eines *out-of-frame* Stopcodons, zu PTCs (vorzeitige Stopcodons). Eine detaillierte Erklärung der verwendeten Algorithmen ist in Kapitel 2.4.12 zu finden.

Fehlende Isopentenylierung von tRNAs führt zu einer genomweiten Zunahme von +1 und -1 Verschiebungen des Leserahmens (Abb. 3.24). Die Abnahme der *in-frame* Ribosomen liegt bei 20 % im Vergleich zu der Kontrollgruppe.

Um lokale Einflüsse auf die Leserahmenverschiebung bewerten zu können, wurde die Analyse des Leserahmens nicht nur genomweit absolut berechnet, sondern auch positionsspezifisch analysiert (siehe Kap. 2.4.12). Hierbei ist zu erkennen, dass die Ribosomen vor dem Startcodon keinen Leserahmen besitzen, weshalb die Anteile von +1 und -1 Verschiebungen ungefähr bei 2:3 liegen (Abb. 3.25). Das Verhalten beider Gruppen vor dem Startcodon ist sehr ähnlich. Unmittelbar ab dem Startcodon sind Leserahmenverschiebungen in beide Richtungen sichtbar. In den *Trit1*-defizienten Proben sind diese Verschiebungen stärker ausgeprägt als in den Kontrollen. Die Leserahmenverschiebungen steigen und fallen lokal über die Länge des Transkripts, scheinen sich jedoch auf einem Level einzupendeln. Die Maxima und Minima in den *Trit1*-defizienten Proben sind außerdem stärker ausgeprägt als in den Kontrollen.



**Abbildung 3.25: Positionsspezifische Leserahmenverteilung der Ribosomen.** Dargestellt sind die positionsspezifischen Mittelwerte ( $n = 2$ ) der Verhältnisse von +1 und -1 verschobener RPFs, die sich mit der P-Stelle innerhalb des Bereichs von Codon -25 bis zu Codon 100 befinden. Die Position 0 ist das Startcodon. Die Kontrollen (blau, Ctl) haben deutlich geringere Anteile verschobener RPFs, im Gegensatz zu den *Trit1*-defizienten Proben (orange, KO).

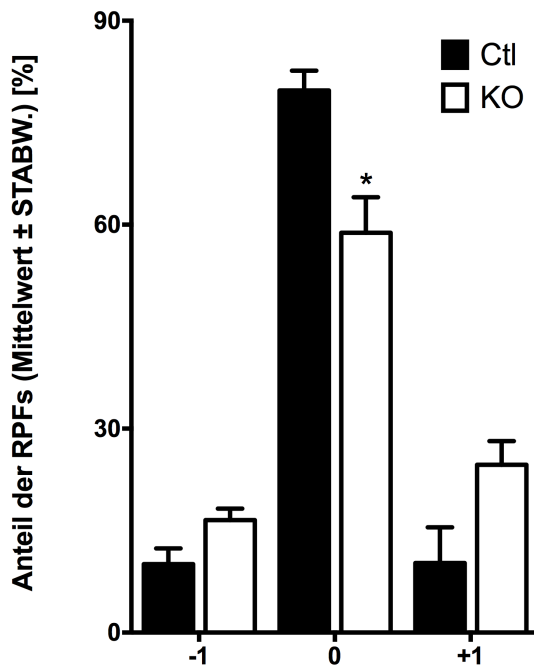


Abbildung 3.26: Leserahmenverteilung der Ribosomen bei Transkripten ohne UCN Codons. Der Leserahmen aller Ribosomen innerhalb codierender Sequenzen, welche keine UCN Codons besitzen, wurde bestimmt. Ribosomen mit einer Länge von 31 Basen wurden nicht verwendet (siehe Kap. 3.3.4). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Signifikante Unterschiede (t-Test,  $p < 0.05$ ) sind mit einem Stern gekennzeichnet ( $n = 2$ ).

### 3.5.2 $^6\text{A}$ -ABHÄNGIGE CODONS SIND NICHT DIREKT VERANTWORTLICH FÜR LESERAHMENVERSCHIEBUNGEN

Um den Einfluss verschiedener Codons auf die Verschiebung des Leserahmens zu ermitteln, wurde obige Analyse mit allen Transkripten, welche keine der gesuchten Codons beinhalten, durchgeführt. Da im Cytoplasma nur die drei  $\text{tRNA}^{\text{Ser}}(\text{UCN})$ , sowie die  $\text{tRNA}^{\text{Ser}}[\text{Sec}]$ ,  $^6\text{A}$  modifiziert sind, wurde der Leserahmen aller RPFs auf Transkripten ohne UCN Codons analysiert (Abb. 3.26). Das Verhältnis der Leserahmenverschiebungen ändert sich nicht. Es ist wie bei der globalen Leserahmenanalyse eine erhöhte Menge an RPFs im +1 und -1 Leserahmen erkennbar, sowie eine signifikant reduzierte Menge von *in-frame* RPFs.



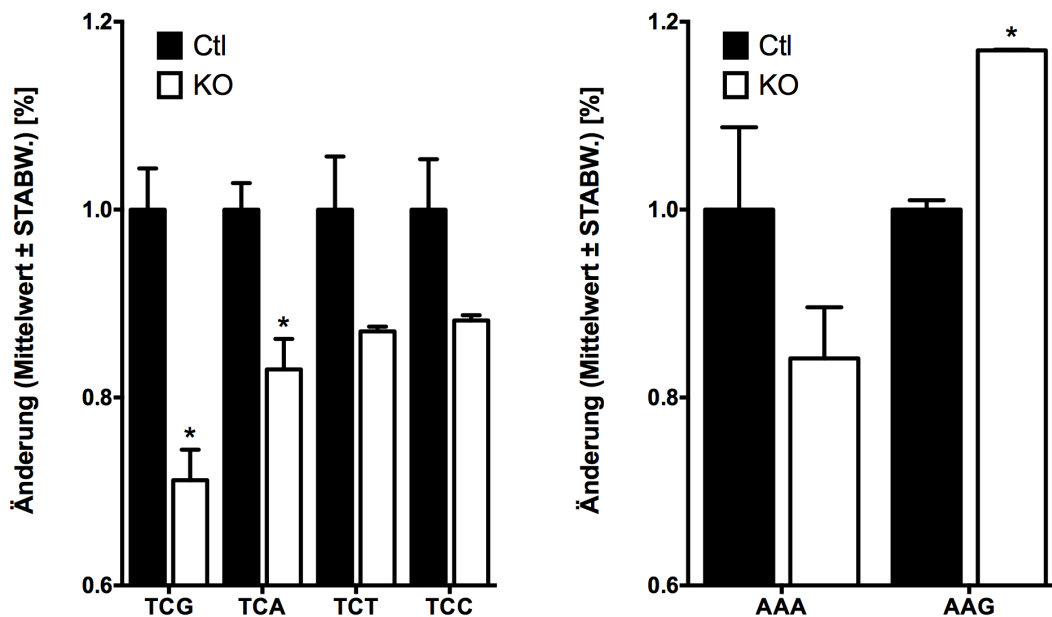


Abbildung 3.27: Besetzzeiten von UCN und AAR Codons im Cytoplasma durch A-Stellen von *in-frame* Ribosomen. Menge an *in-frame* Ribosomen, die mit der A-Stelle auf UCN Codons (links) oder AAR Codons (rechts) sitzen, im Verhältnis zu den Kontrollen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Signifikante Unterschiede (t-Test,  $p < 0.05$ ) sind mit einem Stern gekennzeichnet ( $n = 2$ ).

### 3.5.3 DIE BESETZZEIT VON UCN UND AAR CODONS IST BEEINFLUSST

Durch die exakte Bestimmung der A-Stelle ist es möglich, das entsprechende Codon zu bestimmen. Dies erlaubt eine Aussage darüber zu treffen, ob sich die Besetzzeiten der Codons verändert haben. Beim Vergleich zweier Gruppen erscheinen Codons, die in einer Gruppe langsamer gelesen werden, überproportional oft in dieser Gruppe. Schneller gelesene Codons verhalten sich gegensätzlich. Zur Analyse der Besetzzeit wurden alle RPFs verwendet, die sich innerhalb codierender Sequenzen befinden. Die detaillierte Beschreibung des Algorithmus ist in Kapitel 2.4.11 zu finden. Durch die erhöhte Anzahl an Leserahmenverschiebungen wurden in einer ersten Analyse nur diejenigen RPFs verwendet, welche sich *in-frame* befinden.

Der Großteil der Codons liegt ausgeglichen vor und vorhandene Unterschiede sind relativ gering. Codons, die von den drei tRNA<sup>Ser</sup>(UCN) abhängig sind, sind in den *Trit1*-defizienten Proben weniger stark besetzt als in den Kontrollen (Abb. 3.27). Die Unterschiede bei den UCR Codons (UCA und UCG) sind hierbei stärker und signifikant, während das Signifikanzniveau der UCY Codons (UCU und UCC) unter 0.1 liegt.

Auffällig waren auch Unterschiede innerhalb der Lysin AAR Codonbox. Die cy-tRNA<sup>Lys</sup> besitzt ebenfalls eine Modifikation an A<sub>37</sub>, eine N<sup>6</sup>-Methylthio-Threonylcarbamoylierung (ms<sup>2</sup>t<sup>6</sup>A). Das AAA Codon ist unterrepräsentiert, während die Ribosomen mit der A-Stelle häufiger AAG Codons besetzen.

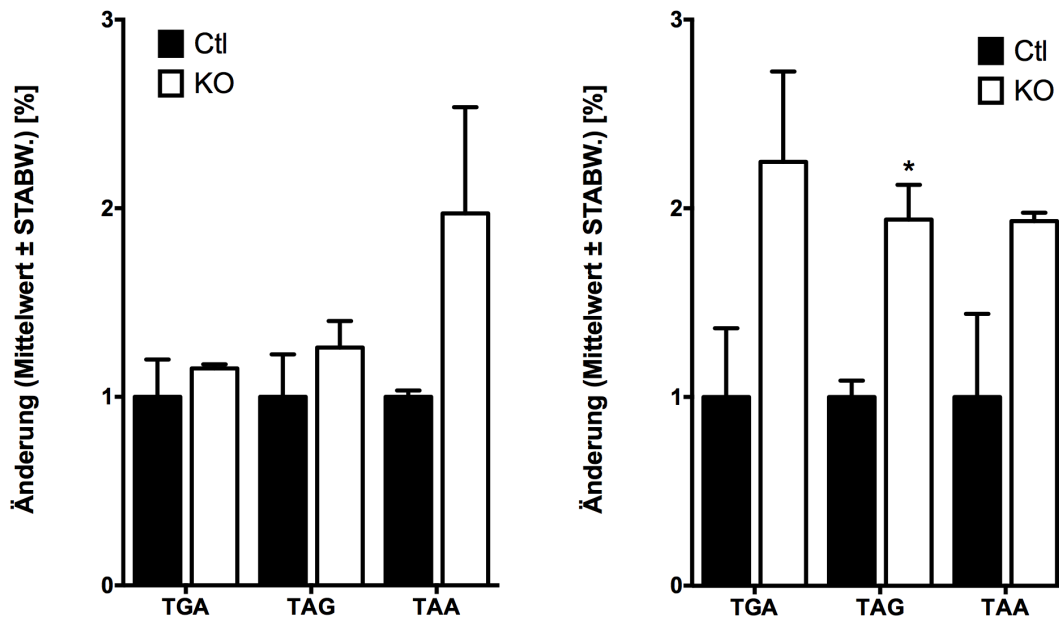


Abbildung 3.28: Besetzzeiten von Stopcodons im Cytoplasma. Ribosomen (links *in-frame*, rechts *in-frame* und *out-of-frame* kombiniert), die mit der A-Stelle auf Stopcodons sitzen, im Verhältnis zu den Kontrollen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Signifikante Unterschiede (t-Test,  $p < 0.05$ ) sind mit einem Stern gekennzeichnet ( $n = 2$ ).

#### 3.5.4 PTCs SIND VERMEHRT VORHANDEN

Bei Betrachtung der Besetzzeiten war auffällig, dass Stopcodons in den *Trit1*-defizienten Proben überrepräsentiert sind (Abb. 3.28). Bei Kombination mit *out-of-frame* Ribosomen sind die Stopcodons UGA und UAG verstärkt in den ribosomalen A-Stellen vorhanden. Dies deutet auf vermehrt PTCs in *Trit1*-defizienten Proben hin.

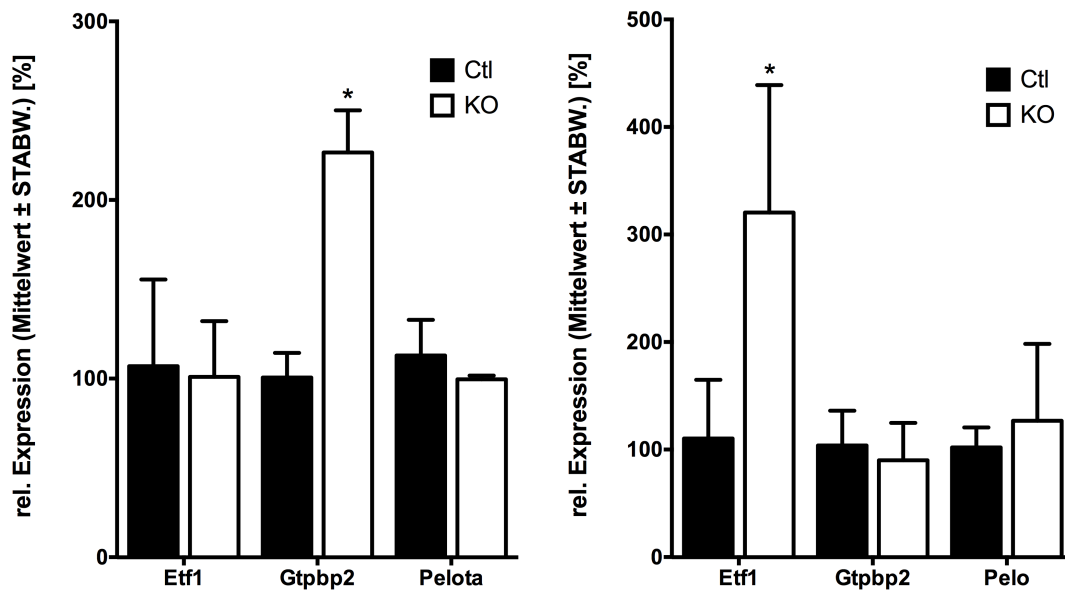


Abbildung 3.29: RT-PCR Analyse von Terminationsspezies. Dargestellt sind die RT-PCR Ergebnisse von hepatozyten-spezifischen (links) und neuronspezifischen *Trit1*-defizienten Mäusen (rechts) mit den zugehörigen Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichung. Signifikante Ergebnisse (t-Test,  $p < 0.05$ ) sind mit einem Stern gekennzeichnet ( $n = 3$ ).

### 3.5.5 RIBOSOMALE RETTUNGSFAKTOREN UND TERMINATIONSFAKTOREN SIND INDUZIERT

Hepatozyten- und neuronspezifische *Trit1*-defiziente Mäuse reagieren unterschiedlich auf fehlendes i6A. In der Leber wird *Gtpbp2* verstärkt exprimiert, während im Gehirn vermehrt *Etf1* gebildet wird (Abb. 3.29, siehe Kap. 0.3.3).

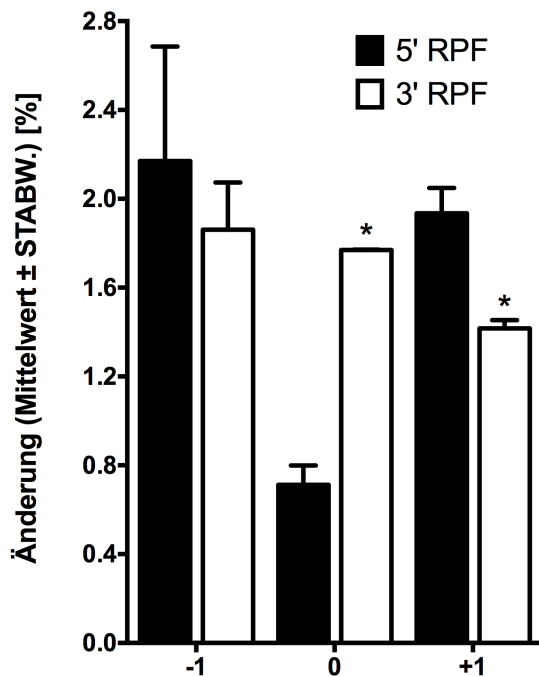


Abbildung 3.30: Analyse von Ribosomen im 3'-UTR Bereich im Cytoplasma. Die Anzahl an Ribosomen im Bereich von  $\pm$  drei Codons von Stopcodons wurde ermittelt. Ribosomen mit einer Länge von 31 Basen wurden nicht verwendet (siehe Kap. 3.3.4). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Signifikante Ergebnisse (t-Test,  $p < 0.05$ ) sind mit einem Stern gekennzeichnet ( $n = 2$ ).

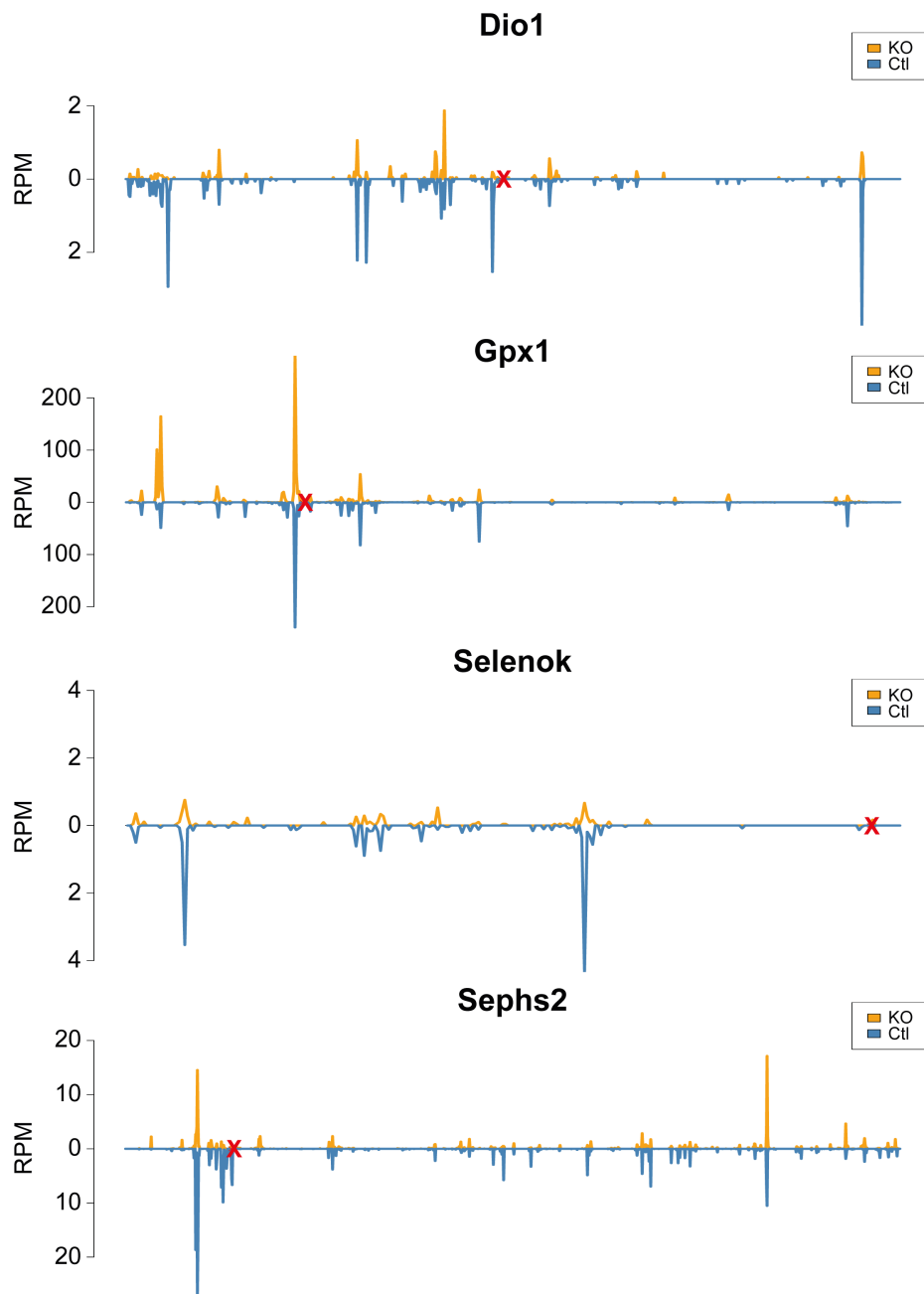
### 3.5.6 ANZAHL DER RIBOSOMEN IM 3'-UTR BEREICH IST ERHÖHT

Im Hinblick auf eine mögliche Austitrierung von Terminationsfaktoren wurde die Menge an Ribosomen im 3'-UTR Bereich von Transkripten in hepatozytenspezifischen *Trit1*-defizienten Mäusen ermittelt (siehe Kap. 2.4.13). Hierbei liegen Ribosomen im richtigen Leserahmen signifikant erhöht im 3'-UTR Bereich vor, während Ribosomen im -1 Leserahmen keinen Unterschied zeigen und im +1 Leserahmen signifikant reduziert sind. Dies könnte auf eine Suppression von Stopcodons hindeuten (Abb. 3.30).

### 3.6 SELENOPROTEINE SIND NICHT SYSTEMISCH BETROFFEN

Da das UGA/Sec Codon von tRNA<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup> decodiert wird, welche eine i<sup>6</sup>A-Modifikation trägt, wurde ein Einfluss auf die Decodierung von Selenoproteinen bei *Trit1*-defizienten Mäusen erwartet. Überraschenderweise konnte kein systemischer Einfluss auf die UGA/Sec Recodierung gefunden werden. Das RNA Level in Leber ist bei keinem Selenoprotein signifikant verändert. Die Anzahl der Ribosomen ist in den leberspezifischen *Trit1*-defizienten Proben bei *Dio1*, *Selenok* und *Sephs2* signifikant reduziert. Die Ribosomenprofile von in Leber exprimierter Selenoproteine zeigen ein differenziertes Bild im Bereich des UGA/Sec Codons (Abb. 3.31).

Es ist eine verminderte RPF Dichte im Bereich des UGA/Sec Codons bei den Selenoproteinen *Dio1* und *Sephs2* erkennbar. Jedoch werden auch RPFs 3' des UGA/Sec Codons detektiert, was auf funktionierende UGA/Sec Recodierung hindeutet. Das in Leber stark exprimierte Selenoprotein *Gpx1* hingegen lässt keinen großen Unterschied im Bereich des UGA/Sec Codons erkennen. *Selenok*, bei dem das UGA/Sec Codon am 3'-Ende sitzt, zeigt über die ganze codierende Sequenz eine reduzierte Menge RPFs. Diese Ambivalenz existiert über alle Selenoproteine hinweg.



**Abbildung 3.31: Ribosomenprofile ausgewählter in Leber exprimierter Selenoproteine.** Dargestellt sind die Ribosomenprofile der codierenden Sequenzen von Dio1, Selenok, Sephs2 und Gpx1 *Trit1*-defizienter Proben (orange) und deren Kontrollen (blau) (n = 2). Die jeweilige Position des UGA/Sec Codons ist durch ein rotes Kreuz markiert. Aufgetragen sind die Mittelwerte der normalisierten RPFs (RPM).

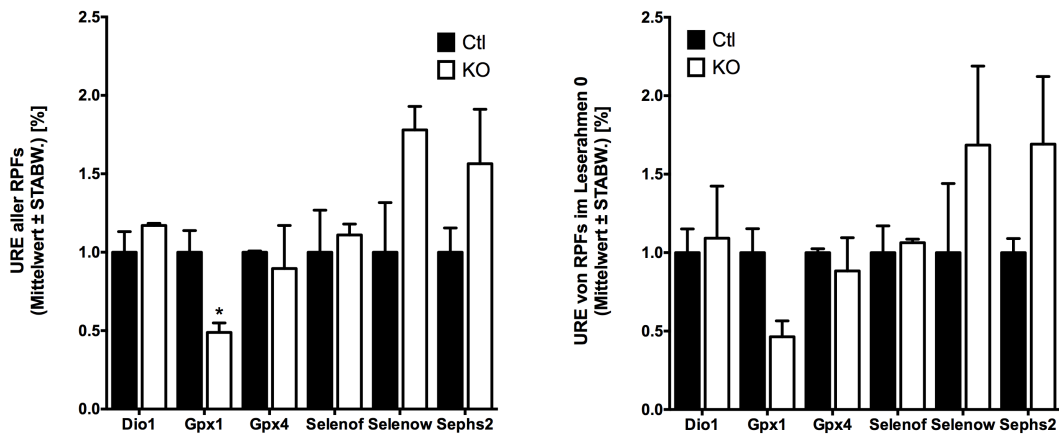


Abbildung 3.32: Effizienz der UGA/Sec Recodierung. Dargestellt ist die URE von in der Leber exprimierter Selenoproteine (links alle RPFs, recht *in-frame* RPFs) mit den zugehörigen Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichung. Signifikante Unterschiede (t-Test,  $p < 0.05$ ) sind mit einem Stern gekennzeichnet ( $n = 2$ ).

### 3.6.1 DIE RECODIERUNG DES UGA/SEC CODONS IST UNTERSCHIEDLICH STARK MODULIERT

Zur objektiven Einschätzung des Einflusses von fehlendem  $i^6A$  auf die UGA/Sec Recodierung wurde die Anzahl der RPFs 5' und 3' des UGA/Sec Codons bestimmt (Abb. 3.32). Das Verhältnis von 3'-RPFs zu 5'-RPFs hilft eine Aussage über die Effizienz der Recodierung treffen zu können (siehe Kap. 2.4.14). Wie schon bei den Profilen zu erkennen war, ergeben die genauen Zahlen der RPFs ein differenziertes Bild. Bei Betrachtung aller Leserahmen besitzt Gpx1 eine signifikant geringere URE (UGA Recodierungs-Effizienz), während Seps2 und Dio1 keine signifikanten Unterschiede zeigen. Bei isolierter Verwendung von *in-frame* RPFs ergibt sich ein ähnliches Bild, was darauf hindeutet, dass eine eventuelle Leserahmenverschiebung am UGA/Sec Codon eine untergeordnete Rolle spielt und Einflüsse nicht aufgrund von Leserahmenverschiebungen am UGA/Sec Codon stattfinden.



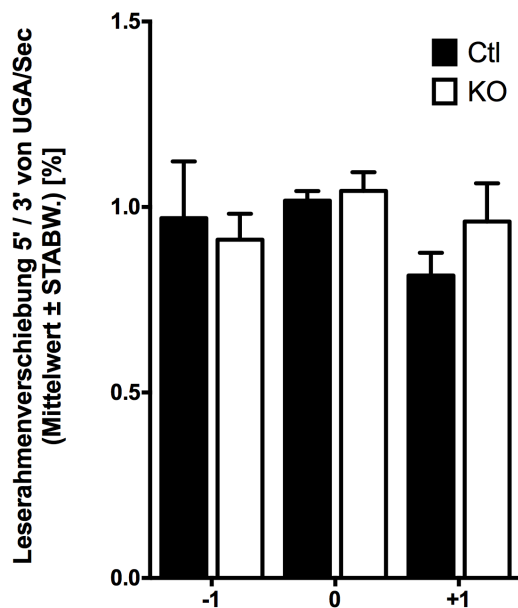


Abbildung 3.33: Einfluss des UGA/Sec Codons auf den Leserahmen von RPFs. Dargestellt ist das Verhältnis der Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der RPFs 5' und 3' des UGA/Sec Codons, für die Leserahmen +1, 0 und -1 separat berechnet. Signifikante Unterschiede (t-Test,  $p < 0.05$ ) sind mit einem Stern gekennzeichnet ( $n = 2$ ).

### 3.6.2 DIE RECODIERUNG DES UGA/SEC CODONS BEEINFLUSST NICHT DEN LESERAHMEN

Um den Einfluss des UGA/Sec Codons auf Leserahmenverschiebungen zu überprüfen, wurden die Leserahmen der RPFs im Bereich des UGA/Sec Codons ( $\pm 10$  Codons) bestimmt (Abb. 3.33, siehe Kap. 2.4.14). Die *Trit1*-defizienten Proben weisen in keinem der drei Leserahmen einen signifikanten Unterschied auf. Aufgrund der erhaltenen Daten kann kein Einfluss des UGA/Sec Codons auf die Verschiebung des Leserahmen nachgewiesen werden.

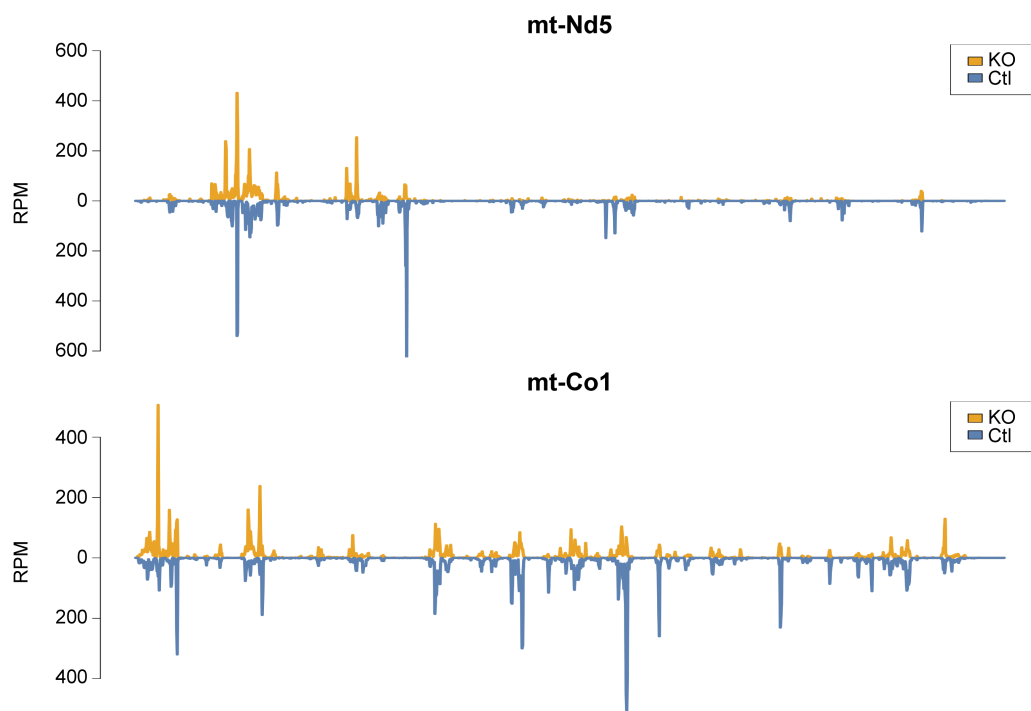
### 3.7 DIE MITOCHONDRIALE TRANSLATION IST GESTÖRT.

#### 3.7.1 RIBOSOMENDICHTE NIMMT AUF MITOCHONDRIALEN TRANSKRIPTEN RICHTUNG 5'-ENDE AB

Mit einem Fokus auf mitochondriale Ribosomen kann die mitochondriale Translation im Detail beobachtet werden. Vor allem UE von Komplex I und Komplex IV zeigen auffällige Unterschiede in der Menge der Ribosomen (Abb. 3.34). In der Startregion der codierenden Sequenz ist eine erhöhte Anzahl RPFs in den *Trit1*-defizienten Proben erkennbar, die jedoch über die Länge des Transkripts, im Vergleich zu den Kontrollen, immer stärker abnimmt.

#### 3.7.2 RIBOSOMEN PAUSIEREN AUF I<sup>6</sup>A- UND T<sup>6</sup>A-ABHÄNGIGEN CODONS IN MITOCHON- DRIEN

Entsprechend der bei der Messung der Besetzzeiten cytoplasmatischer Codons gemachten Beobachtung, sind auch i<sup>6</sup>A- und t<sup>6</sup>A-abhängige Codons mitochondrialer Transkripte durch *Trit1*-Defizienz betroffen (Abb. 3.35). Es ist ebenfalls ersichtlich, dass die Codons innerhalb einer Codonbox nicht gleich stark betroffen sind. So ist bei mt-tRNA<sup>Trp</sup> das UGG Codon stärker beeinflusst als das UGA Codon. In der Codonbox der mt-tRNA<sup>Ser</sup>(UCN) sind die UCY Codons betroffen, während die UCR Codons keine Änderung zeigen. Die t<sup>6</sup>A modifizierte mt-tRNA<sup>Asp</sup>, welche AAY Codons liest, ist betroffen, während die Besetzzeit des mt-tRNA<sup>Lys</sup> Codons AAA nicht verändert vorliegt. Für AAG kann keine Aussage getroffen werden, da keine RPFs im Bereich des Codons gefunden wurden und dieses Codon nur in



**Abbildung 3.34: Ribosomenprofil mitochondrial codierter Transkripte von Komplex I und Komplex IV.** Dargestellt sind die Mittelwerte der normalisierten RPFs (RPM) für leberspezifische *Trit1*-defiziente Proben (orange) und deren Kontrollen (blau) auf den codierenden Sequenzen von mt-Nd5 (NADH:Ubiquinon-Oxidoreduktase Kernuntereinheit 5, UE von Komplex I) und mt-Co1 (Cytochrom-C-Oxidase I, UE von Komplex IV).

den mitochondrialen Transkripten mt-Cytb und mt-Atp6 vorkommt.

### 3.7.3 FEHLGEFALTETE PROTEINE IM MITOCHONDRIUM FÜHREN ZUR INDUKTION DER UPR

Die im Zellkern gebildete und ins Mitochondrium transportierte Protease Lonp1 liegt auf transkriptioneller und translationaler Ebene induziert vor (Abb. 3.36). Ebenfalls wird das mitochondrienspezifische Chaperon Hspa9 überexprimiert.

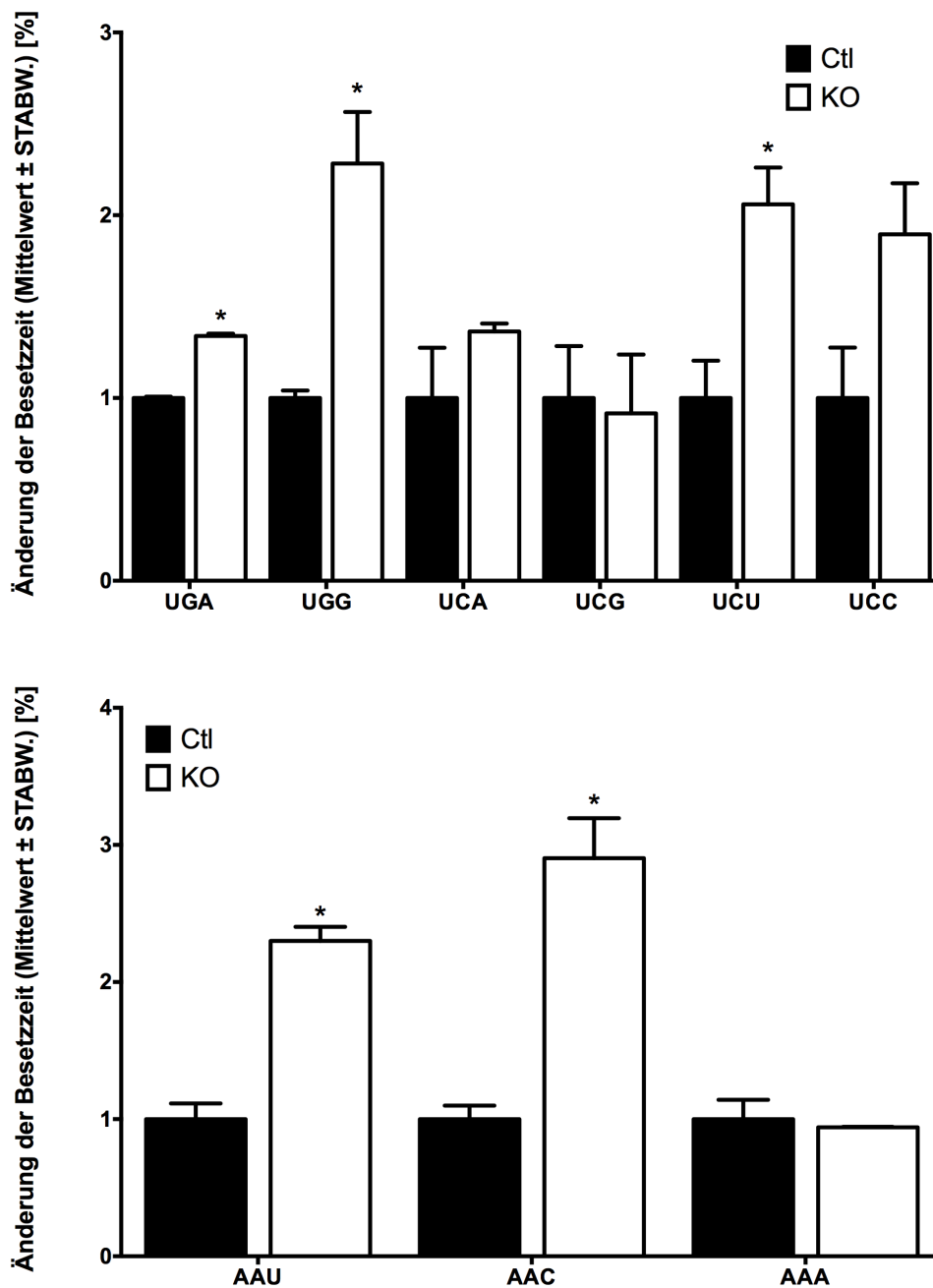


Abbildung 3.35: Ribosomendichte auf  $i^6A$ - und  $t^6A$ -abhängigen mitochondrialen Codons. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Änderung der Codonbesetzzeit von Ribosomen, welche mit der A-Stelle auf  $ms^2i^6A$ -abhängigen Codons (oben) und  $t^6A$ -abhängigen Codons (unten) lokalisiert sind. Signifikante Unterschiede (t-Test,  $p < 0.05$ ) sind mit einem Stern gekennzeichnet ( $n = 2$ ).

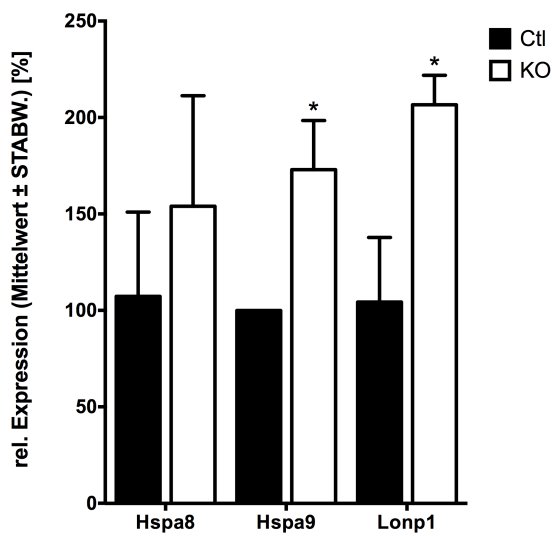
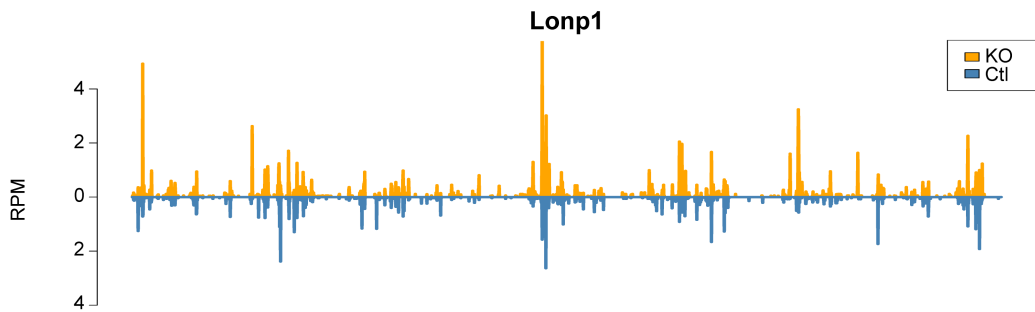
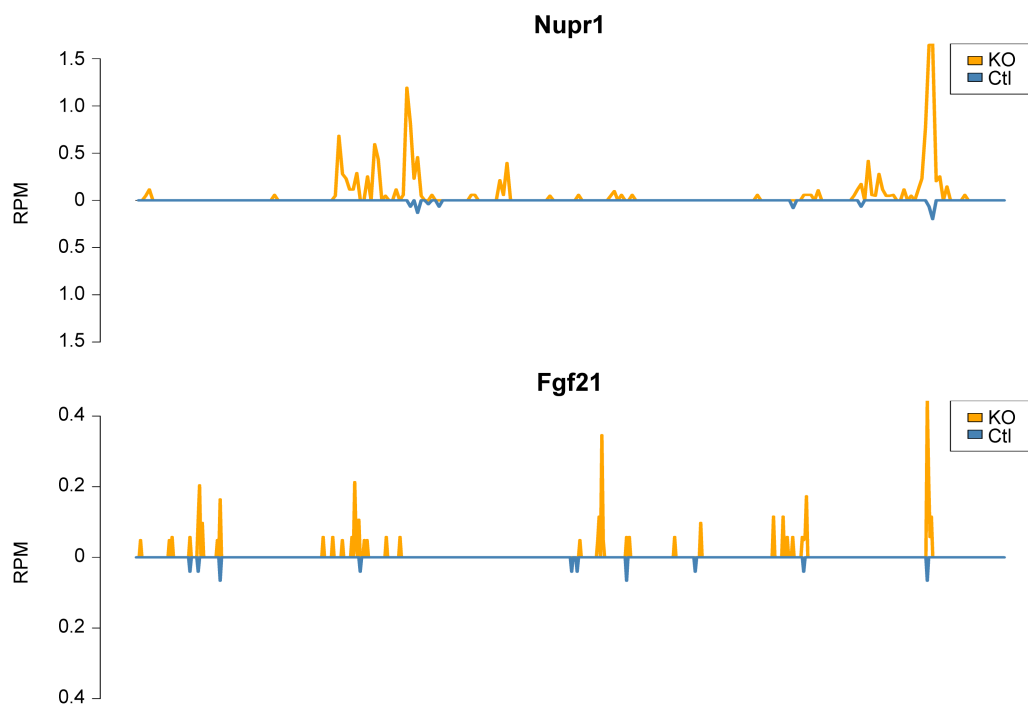


Abbildung 3.36: Expression mitochondrienspezifischer Proteine zur Stabilisierung der Proteinhomöostase im Mitochondrium. Dargestellt sind die RT-PCR Ergebnisse von *Trit1*-defizienten Mäusen (links) mit den zugehörigen Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichung. Signifikante Ergebnisse (t-Test,  $p < 0.05$ ) sind mit einem Stern gekennzeichnet ( $n = 3$ ). Das Ribosomenprofil von *Lonp1* (oben) stellt die Mittelwerte der normalisierten RPFs (RPM) aus je zwei Replikaten der *Trit1*-defizienten Proben (orange), sowie der Kontrollen (blau) dar ( $n = 2$ ).



**Abbildung 3.37: Ribosomenprofil Nupr1 und Fgf21.** Dargestellt sind die Mittelwerte der normalisierten RPFs (RPM) für leberspezifische *Trit1*-defiziente Mäuse (orange) und deren Kontrollen (blau) auf den codierenden Sequenzen von Nupr1 (oben) und Fgf21 (unten) (n = 2).

### 3.8 DIE MITOCHONDRIALE HOMÖOSTASE IST GESTÖRT

Die Mitochondrien wurden aufgrund der beeinträchtigten Translation weitergehend auf korrekte Funktion untersucht. Die Induktion der Faktoren Nupr1 und Fgf21 deuten auf mitochondriale Dysfunktion hin (Abb. 3.37).

#### 3.8.1 DIE OXPHOS-KOMPLEXAKTIVITÄT IST REDUZIERT

In Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. Wolfram Kunz wurde von Dr. Alexei Kudin die Komplexaktivität der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) in Lebermitochondri-

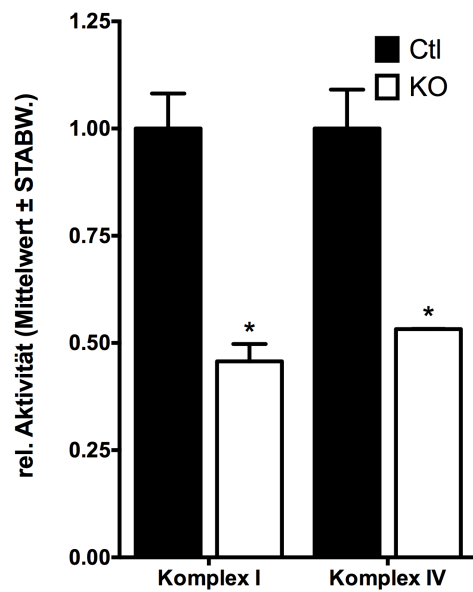


Abbildung 3.38: OXPHOS Komplexaktivität Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Signifikante Ergebnisse (t-Test,  $p < 0.05$ ) sind mit einem Stern gekennzeichnet ( $n = 3$ ).

en von hepatozytenspezifischen *Trit1*-defizienten Mäusen bestimmt (siehe Kap. 2.3.5). Es konnte gezeigt werden, dass durch fehlende  $(m^2)i^6A$  Modifikation ausgelöste gestörte mitochondriale Translation die Komplexaktivität der mitochondrialen OXPHOS reduziert (Abb. 3.38).



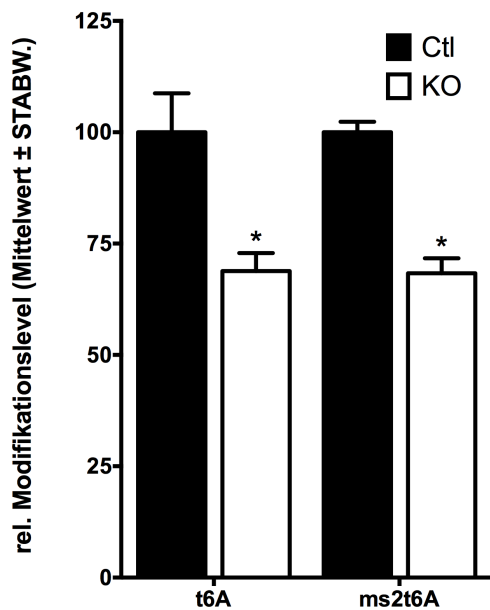


Abbildung 3.39: Massenspektrometrische Bestimmung des  $(ms^2)t^6A$ -Levels von tRNAs. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. Noelia Fradejas Villar. Signifikante Ergebnisse (t-Test,  $p < 0.05$ ) sind mit einem Stern gekennzeichnet ( $n = 2$ ).

### 3.9 DAS $(ms^2)t^6A$ LEVEL IST GLOBAL VERMINDERT

Die Beantwortung einer wichtigen Frage blieb bisher aus: warum sind neben  $(ms^2)i^6A$ -abhängige Codons auch  $(ms^2)t^6A$ -abhängige Codons im Cytoplasma sowie den Mitochondrien betroffen? Bei der massenspektrometrischen Bestimmung des  $i^6A$ -Levels von tRNAs wurden, im Hinblick auf die vorgelegten Ergebnisse der Codonbesetzzeiten im Cytoplasma und den Mitochondrien und der Leserahmenverschiebung direkt ab Initiation, auch die  $(ms^2)t^6A$ -Level der tRNAs bestimmt. Hierbei wurde eine 25 % Reduktion des  $t^6A$ - sowie des  $(ms^2)t^6A$ -Levels in tRNAs detektiert (Abb. 3.39).



*Valid criticism does you a favor.*

Carl Edward Sagan

# 4

## Diskussion

Bakterien und Hefen, die durch Mutationen nicht in der Lage sind tRNAs mit  $i^6A$  zu modifizieren, leiden im Allgemeinen an einem Wachstumsdefekt. Das Gleiche gilt für das bisher einzige Tiermodell, *C. elegans* mit mutiertem *gro-1* (Lemieux et al., 2001). Die Komplementation von *gro-1* führte mit einem Gen, das eine mitochondriale Zielsequenz beinhaltet, zum Erfolg. Dies zeigt, dass tRNA-Isopentenylierung von mt-tRNAs überaus wichtig für den Phänotypen ist (Lemieux et al., 2001). Die Daten dieser Arbeit sind konsistent mit

der Annahme, dass das *Trit1*-Gen als einziges Gen eine tRNA-Isopentenyltransferase in Säugtieren codiert. Ebenso codiert das selbe Gen die zytoplasmatische als auch die mitochondriale Form. Passend dazu lassen Patienten mit einer bi-allelischen Mutation in der tRNA-Isopentenyltransferase mitochondriale Dysfunktionen erkennen, die durch einen neurologischen Phänotypen charakterisiert sind (Yarham et al., 2014; Kernohan et al., 2017).

Die mod5 Mutante in Bäckerhefe neigt zu keinem Wachstums-Phänotypen, jedoch zu einer reduzierten Effizienz der tRNA<sup>Tyr</sup> UAA Suppression (Laten et al., 1978). *Tit1*-Defizienz in *S. cerevisiae* führt zu vermehrten Leserahmenverschiebungen und Atmungskettendefekten (Cherkasova et al., 2013; Lamichhane et al., 2016). Hefen könnten jedoch nicht das optimale Modell sein, um die Pathologie von pathogenen *TRIT1* Varianten zu untersuchen, da die i<sup>6</sup>A Modifikation nicht weiter thiomethyliert wird (Schweizer et al., 2017). Diese Hypermodifikation scheint jedoch laut kristallographischen Studien von großer Wichtigkeit für die Stabilisierung von Codon:Anticodon Interaktionen zu sein (Jenner et al., 2010).

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Rolle der tRNA-Isopentenylierung in Mäusen untersucht. Durch nukleotidgenaue Positionsbestimmung von Ribosomen mittels Ribosomalem Profiling konnte eine detaillierte Analyse der Translation in Mäusen durchgeführt werden (siehe Kap. 3.5). Wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben, wurden vermehrt Leserahmenverschiebungen detektiert. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Anzahl RPFs - sowohl im korrekten als auch im falschen Leserahmen - 3' von Stopcodons lokalisiert sind (siehe Kap. 3.5.4). Die Hochregulation zentraler Proteine der ISR deuten auf ei-

ne beeinträchtigte Translation im Zytosol und den Mitochondrien hin. Ebenfalls wird eine Stressantwort durch falsch gefaltete Proteine (UPR) ausgelöst (siehe Kap. 3.4). Funktionelle Untersuchungen der Mitochondrien zeigen eine klare Beeinträchtigung der oxidativen Phosphorylierung (siehe Kap. 3.8.1). Kürzlich wurde in *Drosophila* eine Verbindung zwischen mitochondrialer Translation und mitochondrialem DNA Level gefunden, welche auf der Bindung von SLIMP (ein Analog der seryl-tRNA Synthetase (SerRS2)) mit mt-tRNAs beruht (Picchioni et al., 2019). Dieses SLIMP ist sowohl essentiell für Aminoacylierung der mt-tRNA<sup>Ser</sup> durch SerRS2, als auch bei der Verhinderung der Akkumulation mitochondrialer DNA beteiligt (Picchioni et al., 2019). Da tRNAs in den Mitochondrien als Introns verwendet werden, könnte eine gesteigerte Expression der mt-tRNAs auf eine gesteigerte Expression mitochondrial codierter Gene hindeuten.

Während in Hefe der GCN4-abhängige Weg durch den Mangel von Aminosäuren durch die Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  induziert ist, zeigen Mäuse die Aktivierung einer ähnlichen Stressantwort durch die Aktivierung von Atf4 (Vattem and Wek, 2004; Lu et al., 2004). In beiden Fällen liegt die initiale Regulation auf dem Level der Translation durch kleine uORF Bereiche im 5'-UTR der mRNA (siehe Kap. 0.7, Abb. 3.19). Weiterführend induzieren nachgeschaltete Transkriptionsfaktoren die Expression von Aminosäuretransportern, Enzymen der Aminosäure-Biosynthese und Aminoacyl-tRNA Synthetasen. Die Induktion der genannten Gruppen ist konsistent mit den bisher in der Literatur beschriebenen Funden (siehe Kap. 3.4). Es wurde eine Verbindung von GCN4 und verlängerter Lebenserwartung in *S. cerevisiae*

*siae* nachgewiesen (Mittal et al., 2017). Da die in dieser Arbeit verwendeten Mäuse keine spezielle Diät hatten, kann von ausreichender Versorgung mit Aminosäuren ausgegangen werden. Die Stressantwort müsste in diesem Fall entweder auf der Ebene der Biosynthese von spezifischen Aminosäuren liegen, oder in einem fehlerhaften Signal, welches aktivierend wirkt. Durch Mangel an Aminosäuren steigt die Konzentration unbeladener tRNAs an, was mittels Microarray-Studien in *E. coli* gezeigt wurde (Dittmar et al., 2005). In Hefen und Mäusen phosphoryliert die Proteinkinase GCN2 (in Mäusen auch Eif2ak4) eIF2 $\alpha$  und wird selbst durch unbeladene tRNAs aktiviert (Ramirez et al., 1992; Dong et al., 2000; Zhang et al., 2002). In einer vor Kurzem veröffentlichten Studie wurden die Effekte durch Mangel einzelner Aminosäuren auf die Translation in HEK293T Zellen untersucht (Mazor et al., 2018). Ein Methionin-Mangel hatte hierbei den größten Effekt auf die Herunterregulation der Translation, wobei bemerkenswerterweise jedoch kein Effekt von Methionin-Mangel auf die Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  nachgewiesen werden konnte. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass durch die geringe Menge Methionin die Translation ohnehin nur in geringer Rate initiiert werden kann. Ribo-Seq Analysen ergaben, dass Methionin-Mangel primär die Erkennung des Startcodons beeinträchtigt, wobei sich die Ribosomen in Anwesenheit von Cycloheximid auf dem Startcodon vermehrt im -1 Leseraster befinden (Mazor et al., 2018). In einer weiteren Studie wurde eine *Gcn2*-defiziente Mauslinie erzeugt, welche bei normaler Diät keinen Phänotypen ausbildet (Zhang et al., 2002). Die prä- und neonatale Mortalität des Nachwuchses korreliert negativ mit nicht ausreichender Versorgung der Muttertiere mit

Leucin, Tryptophan oder Glycin. Die *Gcn2*-defizienten Mäuse sind jedoch nicht in der Lage eIF2 $\alpha$  zu phosphorylieren (Zhang et al., 2002). In Hefe wurde nachgewiesen, dass GCN2 zur Aktivierung die direkte Interaktion mit einem GCN1-GCN20 Komplex an elongierenden Ribosomen benötigt (Marton et al., 1997; Sattlegger and Hinnebusch, 2005). Das in Bakterien vorkommende Protein relA, welches durch unbeladene tRNAs in der A-Stelle aktiviert wird, wurde in einer Studie durch Kryoelektronenmikroskopie ebenfalls als Bindungspartner von Ribosomen und unbeladenen tRNAs nachgewiesen (Haseltine and Block, 1973; Agirrezabala et al., 2013).

An diesem Punkt muss die unterschiedliche Natur der RPFs in den *Trit1*-defizienten Proben angesprochen werden. Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die RPFs eine weitere Größenverteilung aufweisen und eine größere mittlere Länge besitzen (siehe Kap. 3.3.2). Aufgelaufene RPFs sind in embryonalen Stammzellen von Mäusen mit einer größeren Länge als nicht aufgelaufene RPFs beschrieben (Ingolia et al., 2011). Ebenfalls wurden *in vitro* größere RPFs auf Stopcodons gefunden (Alkalaeva et al., 2006). Aufgrund der erhöhten Leserahmenverschiebungen und damit einhergehenden PTCs liegt die Vermutung nahe, dass die längeren RPFs durch Auflaufen entstehen. Jedoch wurden die längeren RPFs über alle Transkripte und Positionen verteilt gefunden, weshalb die Erklärung durch aufgelaufenen Ribosomen in der vorliegenden Arbeit nicht Stand hält. Aus diesem Grund könnten andere Einflüsse vorliegen. Wie vorgehend bereits erwähnt, binden verschiedene, am ISR beteiligte Faktoren, zur Erkennung nicht beladener tRNAs an die Ribosomen. Also könnte auch die Aktivierung

der ISR zu größeren RPFs führen. Humane Zellen, bei denen die ISR durch Behandlungen mit  $\text{NaAsO}_2$  aktiviert wurde, besitzen keinen Unterschied in der Größe der RPFs zwischen behandelten und unbehandelten Zellen (Andreev et al., 2015). Dies legt nahe, dass die Aktivierung des ISR durch oxidativen Stress keine Auswirkung auf die Ribosomengröße hat. Der Verdacht, dass die ISR Einfluss auf die Größe der RPFs nehmen könnte, muss deshalb jedoch noch nicht verworfen werden. Wie bereits in Kapitel 0.7 beschrieben, führen auch andere Stresssignale zur Aktivierung. Die Induzierung von tRNA-Synthetasen könnten so auf einen Mangel an Aminosäuren oder unbeladene tRNAs hindeuten, was einen Großteil der Ribosomen betreffen würde (siehe Kap. 3.4). Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden die öffentlich zugänglichen Daten des Ribosomalen Profiling (GEO: GSE112643) von Mazor et al. (2018), welche mit verschiedenen AS-Defizienzen behandelt wurden, im Hinblick auf die Größenverteilung von RPFs untersucht. Es konnte jedoch kein Unterschied in der Größenverteilung zwischen der Kontrollgruppe und den einzelnen AS-defizienten Gruppen gezeigt werden. Ebenfalls konnten auch keine Unterschiede in der mittleren Größe von RPFs auf ISR-Transkripten im Vergleich zu allen RPFs gefunden werden (Abb. A.2). Da die Proben in der vorliegenden Arbeit gemeinsam und in der gleichen Weise präpariert wurden, ist es äußerst unwahrscheinlich, dass die heterogene Größenverteilung durch ungleichmäßigen Verdau entstanden ist (siehe Kap. 3.3.2). Im Besonderen wäre es noch umso bemerkenswerter, da die Größenverteilung innerhalb der Gruppen homogen ist. Neuere Studien zeigten auch eine veränderte Proteinzusammensetzung translatierender Ribosomen, abhängig von



der zu translatierenden mRNA (Shi et al., 2017). Ebenfalls wurden hunderte verschiedene ribosomal-assoziierte Proteine gefunden, welche zu einer Diversifikation eukaryotischer Ribosomen führen (Simsek et al., 2017). Es sollte auch nicht außer Acht gelassen werden, dass die rRNA selbst posttranskriptional modifiziert wird (Simsek and Barna, 2017). Weitergehende Analysen zur Identifizierung ribosomal gebundener Faktoren könnten in Zukunft daher weitere Einblicke auf den Zustand von Ribosomen bei *Trit1*-Defizienz geben. Zukünftig könnte auch die rRNA auf Unterschiede im Modifikationslevel hinsichtlich der unterschiedlichen Größen untersucht werden.

Bei der Bestimmung der Abstände vom 5'-Ende eines RPFs zur der entsprechenden P-Stelle wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche Spezies bei einer Länge von 31 Nukleotiden gefunden (siehe Kap. 3.3.4). Ein Teil besitzt ein Nukleotid mehr am 5'-Ende und der andere Teil ein zusätzliches Nukleotid am 3'-Ende. Es wurde bis jetzt keine Möglichkeit gefunden, RPFs mit der Größe von 31 Basen, welche sich auf der codierenden Sequenz befinden, einer der beiden Spezies zuzuordnen. Zur Bestimmung wird ein Anhaltspunkt, wie z.B. das Startcodon, benötigt. Somit kann nicht zugeordnet werden, ob die zusätzliche Base am 5'-Ende oder am 3'-Ende sitzt, ob sich das Ribosom also im korrekten Leserahmen befindet, oder eine Verschiebung vorliegt. Aus diesem Grund wurden RPFs mit der Größe von 31 Basen nicht für subcodon-spezifische Analysen verwendet.

Doch was ist die grundlegende Signifikanz der tRNA Isopentenylierung auf die Translation in Säugern? Es wurde gezeigt, dass tRNA-Modifikationen die Genauigkeit und Ge-

schwindigkeit der Translation beeinflussen. Die unerwartete Verringerung der Besetzzeit von A-Stellen auf betroffenen Codons in den *Trit1*-defizienten cytoplasmatischen Ribosomen könnte auf eine weniger stringente Ablehnung von nicht passenden tRNAs hindeuten, was eine erhöhte Decodierung von hypomodifizierten tRNAs zur Folge hätte. Fehlende tRNA-Modifikationen hatten erhöhte UPR durch falsch gefaltete Proteine zur Folge (Nedialkova and Leidel, 2015). Die cytoplasmatische Translation ist ein relativ einfaches System für Studien zum Einfluss der tRNA-Isopentenylierung, da nur cy-tRNAs<sup>Ser(UCN)</sup> und cy-tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> in Mäusen isopentenyliert sind. Folglich sollte die Annahme sein, dass alle Effekte fehlender Isopentenylierung von tRNAs auf die cytoplasmatische Translation von diesen tRNAs ausgeht. Mittels Reporterogenen wurde eine erhöhte Verschiebung des Leserahmens in *MiaA*- und *MiaB*-defizienten *E. coli* gezeigt (Urbonavičius et al., 2001). In dieser Arbeit wurde dargelegt, dass Leserahmenverschiebungen nicht spezifisch durch hypomodifizierte tRNA<sup>[Ser]Sec</sup> induziert werden, da sich die Fraktionen von verschobenen RPFs 5' und 3' des UGA/Sec Codons nicht unterscheiden (siehe Kap. 3.6.2). Darüber hinaus tritt eine Leserahmenverschiebung auch bei Transkripten ein, die keine UGA/Sec Codons beinhalten. Zusätzlich zeigen Transkripte ohne cy-tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>-abhängige Codons ebenfalls Leserahmenverschiebungen in gleicher Stärke wie Transkripte mit diesen Codons (siehe Kap. 3.5.2). Aus diesem Grund müsste der Effekt auf den Leserahmen in der cytoplasmatischen Translation indirekt sein. Ein Einfluss bedingt durch Adaption der Ribosomen oder zusätzlicher Faktoren kann nicht ausgeschlossen werden. Ein Möglicher Mechanismus könnten tRNAs sein, die keine

Substrate von *Trit1* sind. Die Hypothese wird durch die verminderte Besetzzeit der A-Stelle durch AAA Codons gestützt (siehe Kap. 2.4.11).

Das AAA Codon ist fehleranfällig für Leserahmenverschiebungen und wird durch die tRNA<sup>Lys</sup> gelesen, die mit ms<sup>2</sup>t<sup>6</sup>A<sub>37</sub> modifiziert ist. Diese Befunde zeigen viele Gemeinsamkeiten mit den Ergebnissen, die für Hefen bei beeinträchtigter t<sup>6</sup>A Formierung gefunden wurden. So führt die Mutation von *Sua5* und *Tsc2*, welche in der Bildung von t<sup>6</sup>A involviert sind, zu einer Verschiebung des Leserahmens, zur Suppression von Stopcodons und zur Aktivierung der UPR (Lin et al., 2009; Glavic et al., 2015). Um die Hypothese zu untermauern wurde die Menge an t<sup>6</sup>A und ms<sup>2</sup>t<sup>6</sup>A modifizierter tRNAs bestimmt und eine signifikante Reduktion in *Trit1*-defizienten Lebern gefunden (siehe Kap. 3.9). Durch die gestörte mitochondriale Funktion in *Trit1*-defizienten Mäusen könnte eine Reduktion des CO<sub>2</sub> Levels zu einer Verminderung der t<sup>6</sup>A Formierung führen, welche vom CO<sub>2</sub> Level abhängt (Lin et al., 2018). Der k<sub>M</sub>-Wert von CO<sub>2</sub> für die Threonyl-Carbamoylierungsreaktion ist im Bereich der zellulären CO<sub>2</sub>-Konzentration und somit empfindlich gegenüber der mitochondrialen Aktivität (Lin et al., 2018). Ein Einfluss von mt-tRNAs auf cytoplasmatische Prozesse wurde bereits für mt-tRNA<sup>Thr</sup> in Menschen beschrieben, welche an der Induktion der Apoptose beteiligt ist (Marnef et al., 2016). Dies untermauert die Vermutung, dass Mitochondrien auch einen direkten Effekt auf die cytoplasmatische Translation haben können.

In Mitochondrien sind modifizierte tRNAs überaus wichtig, da nur eine tRNA pro Codon verwendet wird und die mt-tRNAs dementsprechend eine höhere Flexibilität in der

Decodierung der Wobble-Base benötigen (Suzuki et al., 2011; Torres et al., 2014; Wei et al., 2015; Lin et al., 2018). So müssen die mt-tRNAs bis zu vier verschiedene Wobble-Basen erkennen können. Mehrere mt-tRNAs sind mit  $i^6A$  modifiziert und werden weitergehend zu  $ms^2i^6A$  thiomethyliert. *Cdk5rap1*-defizienten Mäusen fehlt diese Hypermodifikation, weshalb eine mitochondriale Dysfunktion ausgebildet wird (Wei et al., 2015). Die stärker ausgeprägte Pathologie von *Trit1*-Defizienz im Vergleich zu *Cdk5rap1*-Defizienz illustriert, dass  $i^6A$  eine wichtige Funktion über die Thiomethylierung hinaus hat. Ribosomales Profiling von mitochondrialen Transkripten zeigte veränderte Besetzzeiten der ribosomalen A-Stellen für Codons, die von isopentenylierten mt-tRNAs gelesen werden (siehe Kap. 3.7.2). Im Allgemeinen wurde demonstriert, dass die Besetzzeiten von Codons, die eine Wobble-Basenpaarung benötigen, stärker betroffen sind als das alternative Codon, welches durch eine Watson-Crick Basenpaarung an der Wobble-Position decodiert wird. So werden im Mitochondrium die Serin (UCN) Codons durch nur eine tRNA mit dem Anticodon AGU decodiert. Die Watson-Crick Basenpaarung A:U sowie G:U sind von Natur aus möglich und brauchen dementsprechend keine regulatorischen Einflüsse zur Basenpaarung an der Wobble-Position. Die Wobble-Paarungen U:U und C:U hingegen, werden durch fehlende Isopentenylierung stärker beeinflusst. Alles in allem konnte gezeigt werden, dass der Verlust der  $i^6A$ -Modifikation an Position 37 in mt-tRNAs klar die Codon:Anticodon Interaktion in den Mitochondrien von Säugetieren beeinflusst.

Die mitochondrialen Translation ist in *Trit1*-defiziente Hepatozyten gestört. Unregelmä-

ßige Translation der mitochondrial codierten integralen Membranproteine oder der Verlust des korrekten Leserahmens, was zu PTCs führt, ist mit der Beobachtung konsistent, dass die RPF Dichte zum 3'-Ende der mt-mRNA hin abnimmt (siehe Kap. 3.7.1). Diese Interpretation wird weiterhin durch die Induktion des Chaperons Hspa9 und der Protease Lonp1 gestützt, da diese Proteine Marker der mitochondrialen UPR sind, was auf Proteinstress und der damit einhergehenden Degradierung fehlerhafter Proteine in den Mitochondrien hindeutet (siehe Kap. 3.7.3) (Bezawork-Geleta et al., 2015). Mitochondriale Dysfunktion wurde bereits in *Cdk5rap1*-defizienten Mäusen beobachtet (Wei et al., 2015). Jedoch können die in dieser Arbeit gefundenen Effekte nicht ausschließlich auf fehlendem  $m^2i^6A$  beruhen, da auch das  $t^6A$ -Level in *Trit1*-defizienten Lebern verringert ist. Anders als bei mt-tRNAs die  $m^2i^6A$  tragen, zeigten mt-tRNAs mit fehlender  $t^6A$ -Modifikation einen stärkeren Effekt auf Codons, die eine Watson-Crick Basenpaarung an der Wobble-Position eingehen (siehe Kap. 3.7.2). Ein Unterschied in den betroffenen tRNAs besteht darin, dass isopentenylierte mt-tRNAs ein A an Position 36 tragen, während  $t^6A$ -modifizierte tRNAs ein U an der gleichen Position tragen. Die in dieser Arbeit gefundenen erhöhten mt-tRNA Level können auch auf eine verstärkte mitochondriale Transkription hindeuten, da mt-tRNAs auch als Introns im mitochondrialen Genom dienen und damit verstärkt gebildet werden (siehe Kap. 3.4.2).

Die Erhöhung von Mthfd2 und Mthfd11 könnte auf einen erhöhten Bedarf an  $fMet$ -tRNA<sup>Met</sup><sub>i</sub> in den Mitochondrien hindeuten. Diese Idee wird durch die Induktion der Enzyme der Serin-Biosynthese gestützt, da Serin als Methyl-Donor für Folat dient (siehe Kap.

3.4.1). Erhöhte Mthfd2-Level sind mit nicht ausbalanciertem Folat-Zyklus, abweichender Nukleotid-Synthese und der Induktion von *de-novo* Serin assoziiert (Khan et al., 2017). Eine Änderung der Folat-abhängigen Taurinomethylierung durch Veränderung der am Folatzyklus beteiligten Gene wurde beschrieben (Morscher et al., 2018). Im Rahmen dieser Arbeit wurden ebenfalls signifikante Effekte auf die Besetzzeit von Codons, welche von taurinomethylierten mt-tRNAs gelesen werden, beobachtet (Abb. A.4). Die Besetzzeit der von den mt-tRNAs Leu (UUR), Gln (CAR) und Glu (GAR) gelesenen Codons zeigt eine Änderung im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Ein Grund für den Phänotyp der neuronspezifischen *Trit1*-defizienten Maus könnte ein, aufgrund verstärkter Bildung von fMet, verringertes L-Serin Level sein (van der Crabben et al., 2013). Diesen Gedanken weiter geführt, wäre dies auch eine Erklärung für die Induktion der Seryl-aaRS (Sars), um verstärkt tRNAs mit Serin beladen zu können.

Im Cytoplasma wurde eine Erhöhung von Gtpbp2 in Hepatozyten gefunden (siehe Kap. 3.5.5). Induzierung von ribosomalen Befreiungsfaktoren ist von Nöten, da eine erhöhte Anzahl unproduktiver Ribosomen aufgrund von z.B. Leserahmenverschiebungen und damit einhergehender PTCs auftreten kann (Schuller and Green, 2018). Wenn eine verstärkte Leserahmenverschiebung vorhanden ist, könnte der Terminationsfaktor Etf1 austitriert werden, was eine Erhöhung ribosomaler Befreiungsfaktoren zur Folge hätte. Da kein Ribosomales Profiling in neuron-spezifischen *Trit1*-defizienten Mäusen gemacht wurde, kann für dieses Gewebe keine finale Aussage über das Aufkommen von Leserahmenverschiebungen getätigt

werden. Bei der berechtigten Annahme von Leserahmenverschiebungen in *Trit1*-defizienten Neuronen wäre es jedoch außerordentlich bemerkenswert, dass die neuronale Antwort keine Induktion von ribosomalen Befreiungsfaktoren wie in Hepatozyten ist, sondern die Induktion des translationalen Terminationsfaktors Etf1 (siehe Kap. 3.5.5). Bemerkenswert ist auch, dass schon beschrieben wurde, dass hängengebliebene Ribosomen eine Ursache von Neurodegeneration sind und eine Induktion von *Pelo* und *Gtpbp2* zur Folge haben (Ishimura et al., 2014). Eine Austitrierung der ribosomalen Befreiungsfaktoren führt zu einer Akkumulation von post-terminalen Ribosomen mit reinitiierten Ribosomen im 3'-UTR (Young et al., 2015). Die große Zahl an Ribosomen, deren Leserahmen verschoben ist und die somit verstärkt auf PTCs sitzen, führt zu einem erhöhten Bedarf an ribosomalen Befreiungsfaktoren. Dies könnte das in dieser Arbeit gefundene verstärkte Auftreten von Ribosomen im 3'-UTR Bereich erklären (siehe Kap. 3.5.6).

Der molekularbiologische Vergleich von Cortex- und Lebergewebe führt zu einer elementaren und offensichtlichen Schlussfolgerung aus den Ergebnissen der Daten. Zelltypen aus multizellulären Organismen haben unterschiedliche Antworten auf Stimuli während der Differenzierung (Mills et al., 2016). So kann auch ein genetischer mitochondrialer Defekt, der in allen Zelltypen vorhanden ist, einen unterschiedlichen Phänotypen in unterschiedlichen Organen hervorrufen (Suomalainen and Battersby, 2018).

Der moderate Effekt auf die Selenoproteinexpression durch Änderungen der UGA/Sec Recodierung war kleiner als anhand früherer *in vitro* Daten erwartet wurde (Warner et al.,

2000; Kryukov et al., 2002) (siehe Kap. 3.6.1). Dies ist dahingehend überraschend, da kristallisierte tRNA<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup> ohne post-transkriptionale Modifikationen eine ungeordnete Anticodon-Schleife aufweist (Ganichkin et al., 2011). Die überwiegend normale Selenoproteinmenge in *Trit1*-defizientem Leber- und Cortextgewebe impliziert eine untergeordnete Signifikanz von tRNA<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup> auf die Selenoproteinexpression (siehe Anhang A.3). Dieses Ergebnis könnte im Kontrast zu verringerter Selenoproteinexpression stehen, welche für nicht isopentenylierte A37G tRNA<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup> Transgene gefunden wurden (Carlson et al., 2005). Die Expression von tRNAs ist oft, vor allem für die tRNA<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup>, kritisch. In Mäusen wird sie nur von einem Gen exprimiert (Lee et al., 1989). Eventuell ist diese Mutante hypomorph, wie es im Beispiel einer tRNA<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup> Mutation in einem Patienten beschrieben ist, bei welchem die Selenoproteinexpression gestört ist (Schoenmakers et al., 2016). Es besteht auch immer noch die Möglichkeit, dass die beobachteten Effekte in der Zellkultur durch limitierte Selen-Verfügbarkeit hervorgerufen werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass *Trit1*-defiziente Mäuse unter limitierter Selen-Diät einen stärkeren Effekt auf die Selenoproteinexpression zeigen. Ein Mechanismus, der oft genannt wird, um Effekte beeinträchtigter tRNAs auszugleichen, ist die Überexprimierung von tRNAs (Esberg et al., 2006; Nedialkova and Leidel, 2015). Für tRNA<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup> konnte dies jedoch nicht gezeigt werden. Aus diesen Gründen erscheint tRNA<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup> nicht als kritische Komponente der UGA/Sec Recodierung.





## A.1 SCHMELZKURVEN DER FÜR DIE RT-PCR VERWENDETEN PRIMER

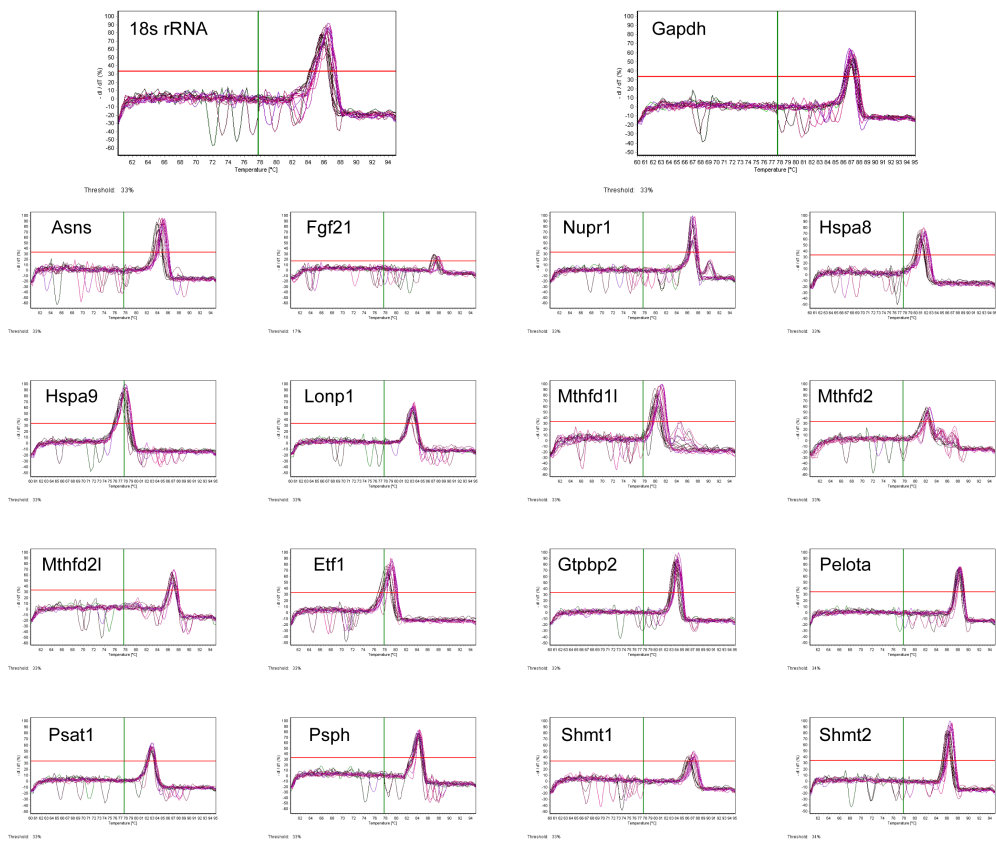


Abbildung A.1: Schmelzkurvenanalyse der verwendeten RT-PCR Primer.

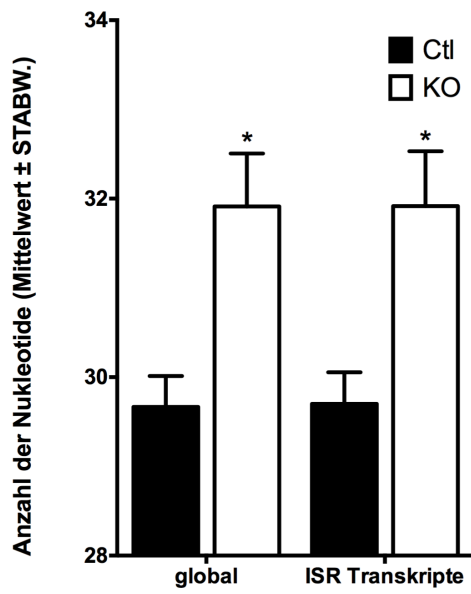
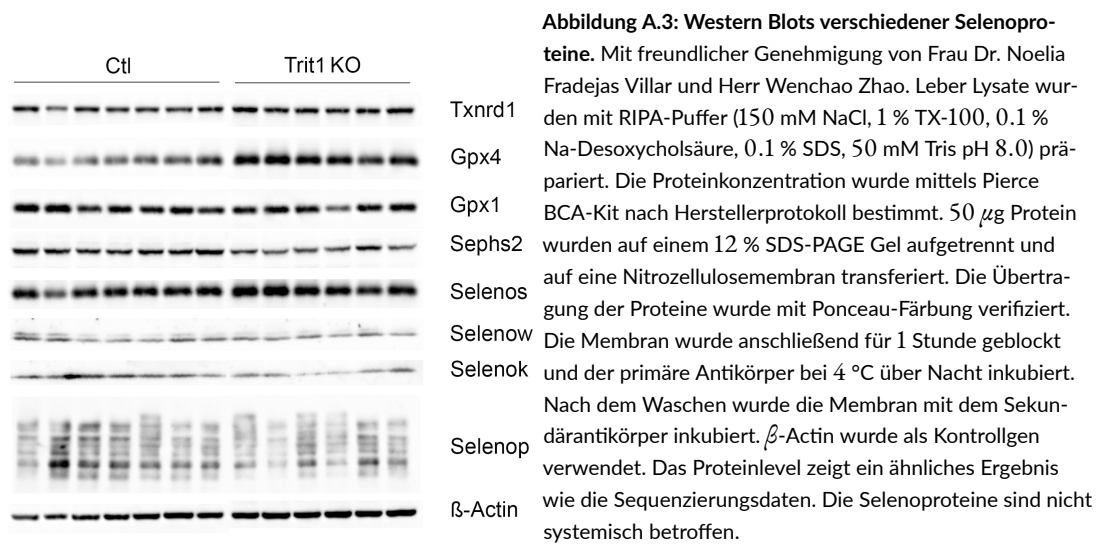


Abbildung A.2: Mittlere RPF Größe auf ISR Transkripten im Vergleich zur globalen mittleren Größe. Es ist die mittlere RPF Größe von allen RPFs auf CDS von ISR Transkripten und allen Transkripten dargestellt.

## A.2 RPF GRÖSSENVERTEILUNG AUF ISR TRANSKRIPTEN



### A.3 SELENOPROTEINE PROTEINEXPRESSION

Antikörper	Verdünnung	Händler
$\beta$ -Actin	1 : 25000	Sigma A3854
Gpx1	1 : 1000	Abcam ab22604
Gpx4	1 : 1000	Abcam ab125066
Txnrd1	1 : 1000	Abcam ab124954
Selenos	1 : 1000	Sigma HPA010025
Selenow	1 : 1000	Rockland 600401A29
Selenok	1 : 1000	Sigma HPA008196
Sephs2	1 : 1000	Sigma HPA047931
Selenop	1 : 1000	Sigma HPA036287

Tabelle A.1: Verwendete Antikörper.

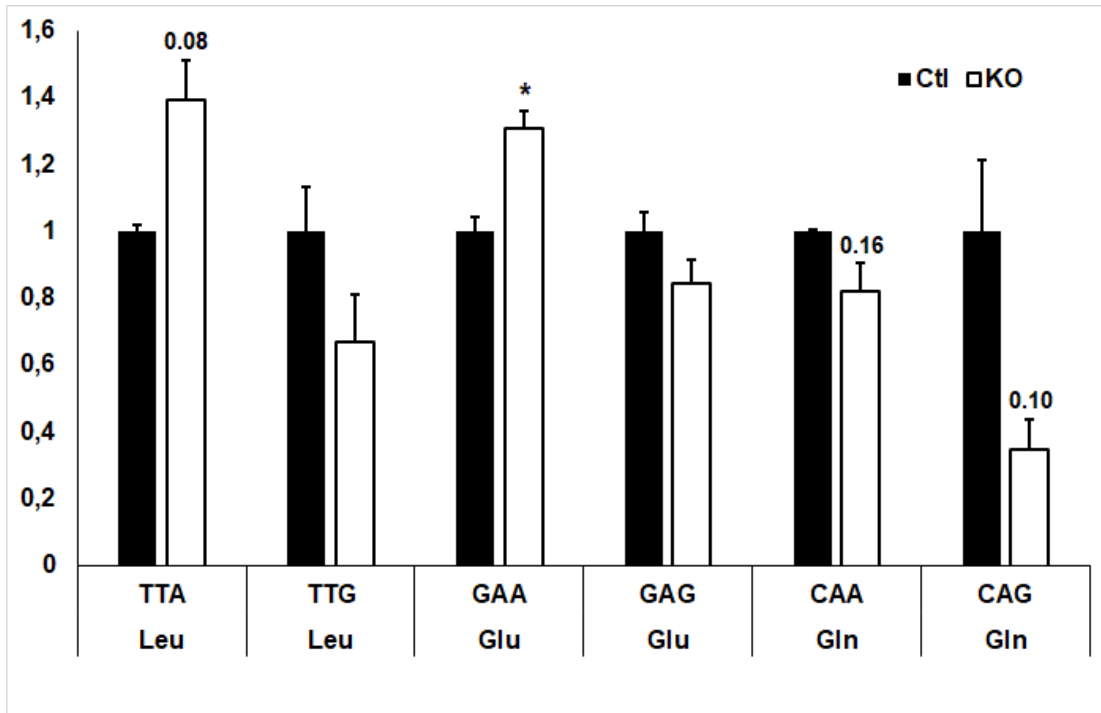


Abbildung A.4: Besetzzeit von UUR, GAR und CAR Codons durch A-Stellen mitochondrialer Ribosomen. Menge an Ribosomen, die mit der A-Stelle auf UUR Codons (links), GAR Codons (mitte) oder CAR Codons (rechts) sitzen, im Verhältnis zu den Kontrollen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Signifikante Unterschiede (t-Test,  $p < 0.05$ ) sind mit einem Stern gekennzeichnet ( $n = 2$ ).

#### A.4 CODONBESETZZEITEN MITOCHONDRIALER CODONS



# Literaturverzeichnis

Xabier Agirrezabala, Israel S Fernández, Ann C Kelley, David Gil Cartón, Venki Ramakrishnan, and Mikel Valle. The ribosome triggers the stringent response by RelA via a highly distorted tRNA. *EMBO reports*, 14(9):811–6, sep 2013. ISSN 1469-3178. doi: 10.1038/embor.2013.106.

Elena Z Alkalaeva, Andrey V Pisarev, Lyudmila Y Frolova, Lev L Kisselev, and Tatyana V Pestova. In vitro reconstitution of eukaryotic translation reveals cooperativity between release factors eRF1 and eRF3. *Cell*, 125(6):1125–36, jun 2006. ISSN 0092-8674. doi: 10.1016/j.cell.2006.04.035.

Alexey Amunts, Alan Brown, Jaan Toots, Sjors H W Scheres, and V Ramakrishnan. Ribosome. The structure of the human mitochondrial ribosome. *Science (New York, N.Y.)*, 348(6230):95–98, apr 2015. ISSN 1095-9203. doi: 10.1126/science.aaa1193.

Simon Anders and Wolfgang Huber. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome biology*, 11(10):R106, 2010. ISSN 1474-760X. doi: 10.1186/gb-2010-11-10-r106.

Simon Anders, Paul Theodor Pyl, and Wolfgang Huber. HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 31(2):166–169, jan 2015. ISSN 14602059. doi: 10.1093/bioinformatics/btu638.

J S Anderson and R P Parker. The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *The EMBO journal*, 17(5):1497–506, mar 1998. ISSN 0261-4189. doi: 10.1093/emboj/17.5.1497.

S Anderson, A T Bankier, B G Barrell, M H de Bruijn, A R Coulson, J Drouin, I C Eperon, D P Nierlich, B A Roe, F Sanger, P H Schreier, A J Smith, R Staden, and I G Young. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290(5806):457–65, apr 1981. ISSN 0028-0836.

Dmitry E Andreev, Patrick B F O'Connor, Ciara Fahey, Elaine M Kenny, Ilya M Terenin, Sergey E Dmitriev, Paul Cormican, Derek W Morris, Ivan N Shatsky, and Pavel V Baranov. Translation of 5' leaders is pervasive in genes resistant to eIF2 repression. *eLife*, 4:e03971, jan 2015. ISSN 2050-084X. doi: 10.7554/eLife.03971.

Simon Andrews. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data., 2010.

Takashi Aoyama and Atsuhiko Oka. Cytokinin signal transduction in plant cells. *Journal of plant research*, 116(3):221–31, jun 2003. ISSN 0918-9440. doi: 10.1007/



s10265-003-0094-6.

Gemma C Atkinson, Sandra L Baldauf, and Vasili Hauryliuk. Evolution of non-stop, no-go and nonsense-mediated mRNA decay and their termination factor-derived components. *BMC evolutionary biology*, 8:290, oct 2008. ISSN 1471-2148. doi: 10.1186/1471-2148-8-290.

Pavan K Auluck, H Y Edwin Chan, John Q Trojanowski, Virginia M Y Lee, and Nancy M Bonini. Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a *Drosophila* model for Parkinson's disease. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5556):865–8, feb 2002. ISSN 1095-9203. doi: 10.1126/science.1067389.

Kristian E Baker and Roy Parker. Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression. *Current opinion in cell biology*, 16(3):293–9, jun 2004. ISSN 0955-0674. doi: 10.1016/j.ceb.2004.03.003.

Thomas Becker, Jean-Paul Armache, Alexander Jarasch, Andreas M Anger, Elizabeth Villa, Heidemarie Sieber, Basma Abdel Motaal, Thorsten Mielke, Otto Berninghausen, and Roland Beckmann. Structure of the no-go mRNA decay complex Dom34-Hbs1 bound to a stalled 80S ribosome. *Nature structural & molecular biology*, 18(6):715–20, jun 2011. ISSN 1545-9985. doi: 10.1038/nsmb.2057.

Adam Ben-Shem, Lasse Jenner, Gulnara Yusupova, and Marat Yusupov. Crystal structure of the eukaryotic ribosome. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6008):1203–9, nov 2010. ISSN

1095-9203. doi: 10.1126/science.1194294.

Adam Ben-Shem, Nicolas Garreau de Loubresse, Sergey Melnikov, Lasse Jenner, Gulnara Yusupova, and Marat Yusupov. The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science (New York, N.Y.)*, 334(6062):1524–9, dec 2011. ISSN 1095-9203. doi: 10.1126/science.1212642.

Mario H Bengtson and Claudio A P Joazeiro. Role of a ribosome-associated E3 ubiquitin ligase in protein quality control. *Nature*, 467(7314):470–3, sep 2010. ISSN 1476-4687. doi: 10.1038/nature09371.

Yoav Benjamini and Yosef Hochberg. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 57(1):289–300, jan 1995. ISSN 00359246. doi: 10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x.

Heike Betat, Christiane Rammelt, and Mario Mörl. tRNA nucleotidyltransferases: ancient catalysts with an unusual mechanism of polymerization. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 67(9):1447–63, may 2010. ISSN 1420-9071. doi: 10.1007/s00018-010-0271-4.

Ayenachew Bezawork-Geleta, Erica J Brodie, David A Dougan, and Kaye N Truscott. LON is the master protease that protects against protein aggregation in human mitochondria.

dria through direct degradation of misfolded proteins. *Scientific reports*, 5:17397, dec 2015. ISSN 2045-2322. doi: 10.1038/srep17397.

G R Björk, J U Ericson, C E Gustafsson, T G Hagervall, Y H Jönsson, and P M Wikström. Transfer RNA modification. *Annual review of biochemistry*, 56:263–87, 1987. ISSN 0066-4154. doi: 10.1146/annurev.bi.56.070187.001403.

Onn Brandman, Jacob Stewart-Ornstein, Daisy Wong, Adam Larson, Christopher C Williams, Gene-Wei Li, Sharleen Zhou, David King, Peter S Shen, Jimena Weibezahn, Joshua G Dunn, Silvi Rouskin, Toshifumi Inada, Adam Frost, and Jonathan S Weissman. A ribosome-bound quality control complex triggers degradation of nascent peptides and signals translation stress. *Cell*, 151(5):1042–54, nov 2012. ISSN 1097-4172. doi: 10.1016/j.cell.2012.10.044.

Gloria A Brar. Beyond the Triplet Code: Context Cues Transform Translation. *Cell*, 167(7):1681–1692, dec 2016. ISSN 1097-4172. doi: 10.1016/j.cell.2016.09.022.

J J Burbaum and P Schimmel. Structural relationships and the classification of aminoacyl-tRNA synthetases. *The Journal of biological chemistry*, 266(26):16965–8, sep 1991. ISSN 0021-9258.

Brian Bushnell. BBTools, 2014.

Lisa D Cabrita, Christopher M Dobson, and John Christodoulou. Protein folding on the ribosome. *Current opinion in structural biology*, 20(1):33–45, feb 2010. ISSN 1879-033X. doi: 10.1016/j.sbi.2010.01.005.

Bradley A. Carlson, Xue Ming Xu, Vadim N. Gladyshev, and Dolph L. Hatfield. Selective rescue of selenoprotein expression in mice lacking a highly specialized methyl group in selenocysteine tRNA. *Journal of Biological Chemistry*, 280(7):5542–5548, 2005. ISSN 00219258. doi: 10.1074/jbc.M411725200.

Thomas R Cech and Joan A Steitz. The noncoding RNA revolution-trashing old rules to forge new ones. *Cell*, 157(1):77–94, mar 2014. ISSN 1097-4172. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.008.

Sutapa Chakrabarti, Uma Jayachandran, Fabien Bonneau, Francesca Fiorini, Claire Basquin, Silvia Domcke, Hervé Le Hir, and Elena Conti. Molecular mechanisms for the RNA-dependent ATPase activity of Upf1 and its regulation by Upf2. *Molecular cell*, 41(6):693–703, mar 2011. ISSN 1097-4164. doi: 10.1016/j.molcel.2011.02.010.

C M Chen and D K Melitz. Cytokinin biosynthesis in a cell-free system from cytokinin-autotrophic tobacco tissue cultures. *FEBS letters*, 107(1):15–20, nov 1979. ISSN 0014-5793.

Chunlai Chen, Benjamin Stevens, Jaskiran Kaur, Zeev Smilansky, Barry S Cooperman, and Yale E Goldman. Allosteric vs. spontaneous exit-site (E-site) tRNA dissociation early

in protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(41):16980–5, oct 2011. ISSN 1091-6490. doi: 10.1073/pnas.1106999108.

Peng Chen, Gunilla Jäger, and Bo Zheng. Transfer RNA modifications and genes for modifying enzymes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC plant biology*, 10:201, sep 2010. ISSN 1471-2229. doi: 10.1186/1471-2229-10-201.

V. A. Cherkasova, P. J. Farabaugh, J. R. Iben, R. J. Maraia, N. H. Blewett, T. N. Lamichhane, T. J. Begley, and A. K. Crawford. Lack of tRNA Modification Isopentenyl-A<sub>37</sub> Alters mRNA Decoding and Causes Metabolic Deficiencies in Fission Yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 33(15):2918–2929, 2013. ISSN 0270-7306. doi: 10.1128/mcb.00278-13.

Aleksander Chlebowski, Michał Lubas, Torben Heick Jensen, and Andrzej Dziembowski. RNA decay machines: The exosome. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(6-7):552–560, 2013. ISSN 18749399. doi: 10.1016/j.bbagr.2013.01.006.

Ana Conesa, Pedro Madrigal, Sonia Tarazona, David Gomez-Cabrero, Alejandra Cervera, Andrew McPherson, Michał Wojciech Szczęśniak, Daniel J Gaffney, Laura L Elo, Xuegong Zhang, and Ali Mortazavi. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome biology*, 17:13, jan 2016. ISSN 1474-760X. doi: 10.1186/s13059-016-0881-8.

P R Copeland, J E Fletcher, B A Carlson, D L Hatfield, and D M Driscoll. A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenopro-

tein mRNAs. *The EMBO journal*, 19(2):306–14, jan 2000. ISSN 0261-4189. doi: 10.1093/emboj/19.2.306.

Catherine Creppe, Juliette D. Godin, Bénédicte Franco, Laurent Nguyen, Sandra Huysseune, Guérin Duysens, Nicolas Thelen, Pierre-Paul Prévot, Danny D. Nedialkova, Brigitte Malgrange, Laurence Borgs, Pierre Close, Sophie Laguesse, Gabsang Lee, Nathalie Krusy, Marc Thiry, Sebastian A. Leidel, and Alain Chariot. A Dynamic Unfolded Protein Response Contributes to the Control of Cortical Neurogenesis. *Developmental Cell*, 35(5): 553–567, 2015. ISSN 15345807. doi: 10.1016/j.devcel.2015.11.005.

F Crick. Central dogma of molecular biology. *Nature*, 227(5258):561–3, aug 1970. ISSN 0028-0836.

Quentin Defenouillère, Yanhua Yao, John Mouaikel, Abdelkader Namane, Aurélie Galopier, Laurence Decourty, Antonia Doyen, Christophe Malabat, Cosmin Saveanu, Alain Jacquier, and Micheline Fromont-Racine. Cdc48-associated complex bound to 60S particles is required for the clearance of aberrant translation products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(13):5046–51, mar 2013. ISSN 1091-6490. doi: 10.1073/pnas.1221724110.

Erez Dekel and Uri Alon. Optimality and evolutionary tuning of the expression level of a protein. *Nature*, 436(7050):588–92, jul 2005. ISSN 1476-4687. doi: 10.1038/nature03842.

Stephen B. DelCardayré and Ronald T. Raines. The extent to which ribonucleases cleave ribonucleic acid. *Analytical Biochemistry*, 225(1):176–178, feb 1995. ISSN 00032697. doi: 10.1006/abio.1995.1132.

Thomas E Dever and Rachel Green. The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(7):a013706, jul 2012. ISSN 1943-0264. doi: 10.1101/cshperspect.a013706.

M E Dihanich, D Najarian, R Clark, E C Gillman, N C Martin, and A K Hopper. Isolation and characterization of MOD5, a gene required for isopentenylolation of cytoplasmic and mitochondrial tRNAs of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 7(1):177–184, 1987. ISSN 0270-7306 (Print) 0270-7306 (Linking).

Daria Diodato, Daniele Ghezzi, and Valeria Tiranti. The Mitochondrial Aminoacyl tRNA Synthetases: Genes and Syndromes. *International journal of cell biology*, 2014: 787956, 2014. ISSN 1687-8876. doi: 10.1155/2014/787956.

Kimberly A Dittmar, Michael A Sørensen, Johan Elf, Måns Ehrenberg, and Tao Pan. Selective charging of tRNA isoacceptors induced by amino-acid starvation. *EMBO reports*, 6(2):151–7, feb 2005. ISSN 1469-221X. doi: 10.1038/sj.embor.7400341.

Alexander Dobin, Carrie A Davis, Felix Schlesinger, Jorg Drenkow, Chris Zaleski, Sonali Jha, Philippe Batut, Mark Chaisson, and Thomas R Gingeras. STAR: ultrafast universal

RNA-seq aligner. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 29(1):15–21, jan 2013. ISSN 1367-4811. doi: 10.1093/bioinformatics/bts635.

Christopher M Dobson. Protein folding and misfolding. *Nature*, 426(6968):884–90, dec 2003. ISSN 1476-4687. doi: 10.1038/nature02261.

Meenakshi K Doma and Roy Parker. Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature*, 440(7083):561–4, mar 2006. ISSN 1476-4687. doi: 10.1038/nature04530.

J Dong, H Qiu, M Garcia-Barrio, J Anderson, and A G Hinnebusch. Uncharged tRNA activates GCN2 by displacing the protein kinase moiety from a bipartite tRNA-binding domain. *Molecular cell*, 6(2):269–79, aug 2000. ISSN 1097-2765.

Silke Dorner, Julie L Brunelle, Divya Sharma, and Rachel Green. The hybrid state of tRNA binding is an authentic translation elongation intermediate. *Nature structural & molecular biology*, 13(3):234–41, mar 2006. ISSN 1545-9993. doi: 10.1038/nsmb1060.

Timo Eichner, Arnout P Kalverda, Gary S Thompson, Steve W Homans, and Sheena E Radford. Conformational conversion during amyloid formation at atomic resolution. *Molecular cell*, 41(2):161–72, jan 2011. ISSN 1097-4164. doi: 10.1016/j.molcel.2010.11.028.



Basma El Yacoubi, Marc Bailly, and Valérie de Crécy-Lagard. Biosynthesis and Function of Posttranscriptional Modifications of Transfer RNAs. *Annual Review of Genetics*, 46(1): 69–95, 2012. ISSN 0066-4197. doi: 10.1146/annurev-genet-110711-155641.

G Eriani, M Delarue, O Poch, J Gangloff, and D Moras. Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature*, 347(6289): 203–6, sep 1990. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/347203a0.

Anders Esberg, Bo Huang, M. J O Johansson, and Anders S. Byström. Elevated Levels of Two tRNA Species Bypass the Requirement for Elongator Complex in Transcription and Exocytosis. *Molecular Cell*, 24(1):139–148, 2006. ISSN 10972765. doi: 10.1016/j.molcel.2006.07.031.

N Fradejas, B A Carlson, E Rijntjes, N P Becker, R Tobe, and U Schweizer. Mammalian Trit1 is a tRNA([Ser]Sec)-isopentenyl transferase required for full selenoprotein expression. *Biochem J*, 450(2):427–432, 2013. ISSN 1470-8728 (Electronic) 0264-6021 (Linking). doi: 10.1042/BJ20121713.

Noelia Fradejas-Villar, Sandra Seeher, Christine B. Anderson, Michael Doengi, Bradley A. Carlson, Dolph L. Hatfield, Ulrich Schweizer, and Michael T. Howard. The RNA-binding protein Secisbp2 differentially modulates UGA codon reassignment and RNA decay. *Nucleic Acids Research*, 45(7):4094–4107, 2017. ISSN 13624962. doi: 10.1093/nar/gkw1255.

Joachim Frank, Haixiao Gao, Jayati Sengupta, Ning Gao, and Derek J Taylor. The process of mRNA-tRNA translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(50):19671–8, dec 2007. ISSN 1091-6490. doi:10.1073/pnas.0708517104.

Pamela A Frischmeyer, Ambro van Hoof, Kathryn O'Donnell, Anthony L Guerrierio, Roy Parker, and Harry C Dietz. An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5563):2258–61, mar 2002. ISSN 1095-9203. doi:10.1126/science.1067338.

L Frolova, X Le Goff, G Zhouravleva, E Davydova, M Philippe, and L Kisselev. Eukaryotic polypeptide chain release factor eRF3 is an eRF1- and ribosome-dependent guanosine triphosphatase. *RNA (New York, N.Y.)*, 2(4):334–41, apr 1996. ISSN 1355-8382.

Oleg M. Ganichkin, Ekaterina A. Anedchenko, and Markus C. Wahl. Crystal structure analysis reveals functional flexibility in the selenocysteine-specific tRNA from mouse. *PLoS ONE*, 6(5):e20032, 2011. ISSN 19326203. doi:10.1371/journal.pone.0020032.

Yong-Gui Gao, Maria Selmer, Christine M Dunham, Albert Weixlbaumer, Ann C Kelley, and V Ramakrishnan. The structure of the ribosome with elongation factor G trapped in the posttranslocational state. *Science (New York, N.Y.)*, 326(5953):694–9, oct 2009. ISSN 1095-9203. doi:10.1126/science.1179709.

Niels H Gehring, Styliani Lamprinaki, Andreas E Kulozik, and Matthias W Hentze. Disassembly of exon junction complexes by PYM. *Cell*, 137(3):536–48, may 2009. ISSN 1097-4172. doi: 10.1016/j.cell.2009.02.042.

Maxim V. Gerashchenko and Vadim N. Gladyshev. Translation inhibitors cause abnormalities in ribosome profiling experiments. *Nucleic Acids Research*, 42(17):e134–e134, sep 2014. ISSN 13624962. doi: 10.1093/nar/gku671.

Maxim V. Gerashchenko and Vadim N. Gladyshev. Ribonuclease selection for ribosome profiling. *Nucleic Acids Research*, 45(2):e6, jan 2017. ISSN 13624962. doi: 10.1093/nar/gkw822.

R Giegé, M Sissler, and C Florentz. Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. *Nucleic acids research*, 26(22):5017–35, nov 1998. ISSN 0305-1048. doi: 10.1093/nar/26.22.5017.

Richard Giegé, Frank Jühling, Joern Pütz, Peter Stadler, Claude Sauter, and Catherine Florentz. Structure of transfer RNAs: Similarity and variability. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 3(1):37–61, 2012. ISSN 17577004. doi: 10.1002/wrna.103.

Alvaro Glavic, Guilhem Chalancon, Olivier Namy, Patrick Thiaville, Agnes Baudin-Baillieu, Valerie de Crecy-Lagard, Rachel Legendre, Diego Rojas-Benitez, and Isabelle Hatin. Global translational impacts of the loss of the tRNA modification t6A in yeast. *Microbial Cell*, 3(1):29–45, 2015. ISSN 23112638. doi: 10.15698/mic2016.01.473.

Anna Golovko, Folke Sitbon, Elisabeth Tillberg, and Björn Nicander. Identification of a tRNA isopentenyltransferase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology*, 49 (2):161–9, may 2002. ISSN 0167-4412.

Huan Gong, Liang Sun, Beidong Chen, Yiwen Han, Jing Pang, Wei Wu, Ruomei Qi, and Tie-Mei Zhang. Evaluation of candidate reference genes for RT-qPCR studies in three metabolism related tissues of mice after caloric restriction. *Scientific reports*, 6:38513, 2016. ISSN 2045-2322. doi: 10.1038/srep38513.

Michael Graf, Paul Huter, Cristina Maracci, Miroslav Peterek, Marina V Rodnina, and Daniel N Wilson. Visualization of translation termination intermediates trapped by the Apidaecin 137 peptide during RF3-mediated recycling of RF1. *Nature communications*, 9 (1):3053, 2018. ISSN 2041-1723. doi: 10.1038/s41467-018-05465-1.

Marc Graille and Bertrand Séraphin. Surveillance pathways rescuing eukaryotic ribosomes lost in translation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(11):727–35, 2012. ISSN 1471-0080. doi: 10.1038/nrm3457.

Basil J Greber and Nenad Ban. Structure and Function of the Mitochondrial Ribosome. *Annual review of biochemistry*, 85:103–32, jun 2016. ISSN 1545-4509. doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014343.

R Green and H F Noller. Ribosomes and translation. *Annual review of biochemistry*, 66: 679–716, 1997. ISSN 0066-4154. doi: 10.1146/annurev.biochem.66.1.679.

Henri Grosjean and Eric Westhof. An integrated, structure- and energy-based view of the genetic code. *Nucleic acids research*, 44(17):8020–40, 2016. ISSN 1362-4962. doi: 10.1093/nar/gkw608.

Min Guo, Paul Schimmel, and Xiang-Lei Yang. Functional expansion of human tRNA synthetases achieved by structural inventions. *FEBS letters*, 584(2):434–42, jan 2010. ISSN 1873-3468. doi: 10.1016/j.febslet.2009.11.064.

Ross H. Hall, Morris J. Robins, Lubomyr Stasiuk, and Roosevelt Thedford. Isolation of N6-( $\gamma,\gamma$ -Dimethylallyl)adenosine from Soluble Ribonucleic Acid. *Journal of the American Chemical Society*, 88(11):2614–2615, 1966. ISSN 15205126. doi: 10.1021/ja00963a061.

H P Harding, I Novoa, Y Zhang, H Zeng, R Wek, M Schapira, and D Ron. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Molecular cell*, 6(5):1099–108, nov 2000. ISSN 1097-2765.

Heather P Harding, Yuhong Zhang, Huiqing Zeng, Isabel Novoa, Phoebe D Lu, Marcella Calfon, Navid Sadri, Chi Yun, Brian Popko, Richard Paules, David F Stojdl, John C Bell, Thore Hettmann, Jeffrey M Leiden, and David Ron. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Molecular cell*, 11(3): 619–33, mar 2003. ISSN 1097-2765.

F U Hartl. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381(6583):571–9, jun 1996. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/381571a0.

F Ulrich Hartl, Andreas Bracher, and Manajit Hayer-Hartl. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, 475(7356):324–32, jul 2011. ISSN 1476-4687. doi: 10.1038/nature10317.

W A Haseltine and R Block. Synthesis of guanosine tetra- and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(5):1564–8, may 1973. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.70.5.1564.

Jean Hausser, Avi Mayo, Leeat Keren, and Uri Alon. Central dogma rates and the trade-off between precision and economy in gene expression. *Nature communications*, 10(1):68, 2019. ISSN 2041-1723. doi: 10.1038/s41467-018-07391-8.

Feng He and Allan Jacobson. Nonsense-Mediated mRNA Decay: Degradation of Defective Transcripts Is Only Part of the Story. *Annual review of genetics*, 49:339–66, 2015. ISSN 1545-2948. doi: 10.1146/annurev-genet-112414-054639.

John W B Hershey, Nahum Sonenberg, and Michael B Mathews. Principles of translational control: an overview. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(12), dec 2012. ISSN 1943-0264. doi: 10.1101/cshperspect.a011528.

R W HOLLEY, J APGAR, G A EVERETT, J T MADISON, M MARQUISEE, S H MERRILL, J R PENSWICK, and A ZAMIR. STRUCTURE OF A RIBONUCLEIC ACID. *Science (New York, N.Y.)*, 147(3664):1462–5, mar 1965. ISSN 0036-8075.

R Horgan. A new cytokinin metabolite. *Biochemical and biophysical research communications*, 65(1):358–63, jul 1975. ISSN 0006-291X.

Y M Hou and P Schimmel. A simple structural feature is a major determinant of the identity of a transfer RNA. *Nature*, 333(6169):140–5, may 1988. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/333140a0.

Lulu Huang, Chih-Hong Lou, Waikin Chan, Eleen Y Shum, Ada Shao, Erica Stone, Rachid Karam, Hye-Won Song, and Miles F Wilkinson. RNA homeostasis governed by cell type-specific and branched feedback loops acting on NMD. *Molecular cell*, 43(6):950–61, sep 2011. ISSN 1097-4164. doi: 10.1016/j.molcel.2011.06.031.

Nele Hug, Dasa Longman, and Javier F Cáceres. Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway. *Nucleic acids research*, 44(4):1483–95, feb 2016. ISSN 1362-4962. doi: 10.1093/nar/gkw010.

Jeffrey A. Hussmann, Stephanie Patchett, Arlen Johnson, Sara Sawyer, and William H. Press. Understanding Biases in Ribosome Profiling Experiments Reveals Signatures of Translation Dynamics in Yeast. *PLoS Genetics*, 11(12):e1005732, dec 2015. ISSN 15537404. doi: 10.1371/journal.pgen.1005732.

Yuji Inagaki, Christian Blouin, Edward Susko, and Andrew J Roger. Assessing functional divergence in EF-1alpha and its paralogs in eukaryotes and archaeobacteria. *Nucleic acids research*, 31(14):4227–37, jul 2003. ISSN 1362-4962.

Nicholas T. Ingolia, Sina Ghaemmaghami, John R.S. Newman, and Jonathan S. Weissman. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science*, 324(5924):218–223, apr 2009. ISSN 00368075. doi: 10.1126/science.1168978.

Nicholas T. Ingolia, Liana F. Lareau, and Jonathan S. Weissman. Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. *Cell*, 147(4):789–802, nov 2011. ISSN 00928674. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.002.

Ryuta Ishimura, Gabor Nagy, Ivan Dotu, Huihao Zhou, Xiang-Lei Yang, Paul Schimmel, Satoru Senju, Yasuharu Nishimura, Jeffrey H. Chuang, and Susan L. Ackerman. RNA function. Ribosome stalling induced by mutation of a CNS-specific tRNA causes neurodegeneration. *Science (New York, N.Y.)*, 345(6195):455–9, jul 2014. ISSN 1095-9203. doi: 10.1126/science.1249749.

Sayoko Ito-Harashima, Kazushige Kuroha, Tsuyako Tatematsu, and Toshifumi Inada. Translation of the poly(A) tail plays crucial roles in nonstop mRNA surveillance via translation repression and protein destabilization by proteasome in yeast. *Genes & development*, 21(5):519–24, mar 2007. ISSN 0890-9369. doi: 10.1101/gad.1490207.



Richard J Jackson, Christopher U T Hellen, and Tatyana V Pestova. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(2):113–27, feb 2010. ISSN 1471-0080. doi: 10.1038/nrm2838.

Paula Elizabeth Jameson and Jiancheng Song. Cytokinin: a key driver of seed yield. *Journal of experimental botany*, 67(3):593–606, feb 2016. ISSN 1460-2431. doi: 10.1093/jxb/erv461.

Lasse B. Jenner, Natalia Demeshkina, Gulnara Yusupova, and Marat Yusupov. Structural aspects of messenger RNA reading frame maintenance by the ribosome. *Nature Structural and Molecular Biology*, 17(5):555–560, 2010. ISSN 15459993. doi: 10.1038/nsmb.1790.

Simpson Joseph. After the ribosome structure: how does translocation work? *RNA (New York, N.Y.)*, 9(2):160–4, feb 2003. ISSN 1355-8382.

Jianhua Ju, Yongjun Dang, Shridhar Bhat, Rachel Green, Ben Shen, William C Merrick, Daniel E Eyler, Jun O Liu, and Tilman Schneider-Poetsch. Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nature Chemical Biology*, 6(3): 209–217, mar 2010. ISSN 1552-4450. doi: 10.1038/nchembio.304.

Frank Jühling, Mario Mörl, Roland K. Hartmann, Mathias Sprinzl, Peter F. Stadler, and Joern Pütz. tRNAdb 2009: Compilation of tRNA sequences and tRNA ge-

nes. *Nucleic Acids Research*, 37(SUPPL. 1):D159–62, 2009. ISSN 13624962. doi: 10.1093/nar/gkn772.

T Kakimoto. Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate:ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant & cell physiology*, 42(7):677–85, jul 2001. ISSN 0032-0781. doi: 10.1093/pcp/pce112.

Katarzyna Kalisiak, Tomasz M Kuliński, Rafał Tomecki, Dominik Cysewski, Zbigniew Pietras, Aleksander Chlebowski, Katarzyna Kowalska, and Andrzej Dziembowski. A short splicing isoform of HBS1L links the cytoplasmic exosome and SKI complexes in humans. *Nucleic acids research*, 45(4):2068–2080, 2017. ISSN 1362-4962. doi: 10.1093/nar/gkw862.

Donna Karolchik, Angela S Hinrichs, Terrence S Furey, Krishna M Roskin, Charles W Sugnet, David Haussler, and W James Kent. The UCSC Table Browser data retrieval tool. *Nucleic acids research*, 32(Database issue):D493–6, jan 2004. ISSN 1362-4962. doi: 10.1093/nar/gkh103.

Isao Kashima, Akio Yamashita, Natsuko Izumi, Naoyuki Kataoka, Ryo Morishita, Shini-  
chi Hoshino, Mutsuhito Ohno, Gideon Dreyfuss, and Shigeo Ohno. Binding of a novel  
SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1  
phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes & development*, 20(3):  
355–67, feb 2006. ISSN 0890-9369. doi: 10.1101/gad.1389006.

W James Kent, Charles W Sugnet, Terrence S Furey, Krishna M Roskin, Tom H Pringle, Alan M Zahler, and David Haussler. The human genome browser at UCSC. *Genome research*, 12(6):996–1006, jun 2002. ISSN 1088-9051. doi: 10.1101/gr.229102.

Kristin D. Kernohan, David A. Dymment, Mihaela Pupavac, Zvi Cramer, Arran McBride, Genevieve Bernard, Isabella Straub, Martine Tetreault, Taila Hartley, Lijia Huang, Erick Sell, Jacek Majewski, David S. Rosenblatt, Eric Shoubbridge, Aziz Mhanni, Tara Myers, Virginia Proud, Samanta Vergano, Brooke Spangler, Emily Farrow, Jennifer Kussman, Nicole Safina, Carol Saunders, Kym M. Boycott, and Isabelle Thiffault. Matchmaking facilitates the diagnosis of an autosomal-recessive mitochondrial disease caused by biallelic mutation of the tRNA isopentenyltransferase (TRIT1) gene. *Human Mutation*, 38(5): 511–516, 2017. ISSN 10981004. doi: 10.1002/humu.23196.

Stephanie Kervestin and Allan Jacobson. NMD: a multifaceted response to premature translational termination. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(11):700–12, nov 2012. ISSN 1471-0080. doi: 10.1038/nrm3454.

Nahid A. Khan, Joni Nikkanen, Shuichi Yatsuga, Christopher Jackson, Liya Wang, Swagat Pradhan, Riikka Kivelä, Alberto Pessia, Vidya Velagapudi, and Anu Suomalainen. mTORC1 Regulates Mitochondrial Integrated Stress Response and Mitochondrial Myopathy Progression. *Cell Metabolism*, 26(2):419–428.e5, aug 2017. ISSN 19327420. doi: 10.1016/j.cmet.2017.07.007.

S H Kim, F L Suddath, G J Quigley, A McPherson, J L Sussman, A H Wang, N C Seeman, and A Rich. Three-dimensional tertiary structure of yeast phenylalanine transfer RNA. *Science (New York, N.Y.)*, 185(4149):435–40, aug 1974. ISSN 0036-8075.

Yujin E Kim, Mark S Hipp, Andreas Bracher, Manajit Hayer-Hartl, and F Ulrich Hartl. Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annual review of biochemistry*, 82:323–55, 2013. ISSN 1545-4509. doi: 10.1146/annurev-biochem-060208-092442.

Lev Kisselev, Måns Ehrenberg, and Ludmila Frolova. Termination of translation: interplay of mRNA, rRNAs and release factors? *The EMBO journal*, 22(2):175–82, jan 2003. ISSN 0261-4189. doi: 10.1093/emboj/cdg017.

Sebastian Klinge, Felix Voigts-Hoffmann, Marc Leibundgut, Sofia Arpagaus, and Nenad Ban. Crystal structure of the eukaryotic 60S ribosomal subunit in complex with initiation factor 6. *Science (New York, N.Y.)*, 334(6058):941–8, nov 2011. ISSN 1095-9203. doi: 10.1126/science.1211204.

Eugene V Koonin. Does the central dogma still stand? *Biology direct*, 7:27, aug 2012. ISSN 1745-6150. doi: 10.1186/1745-6150-7-27.

Oksana Koshla, Oleksandr Yushchuk, Iryna Ostash, Yuriy Dacyuk, Maksym Myronovskiy, Gunilla Jäger, Roderich D Süßmuth, Andriy Luzhetskyy, Anders Byström, Leif A Kirsebom, and Bohdan Ostash. Gene *miaA* for post-transcriptional modification of

tRNA<sup>XXXA</sup> is important for morphological and metabolic differentiation in *Streptomyces*. *Molecular microbiology*, apr 2019. ISSN 1365-2958. doi: 10.1111/mmi.14266.

Y Kouroku, E Fujita, I Tanida, T Ueno, A Isoai, H Kumagai, S Ogawa, R J Kaufman, E Kominami, and T Momoi. ER stress (PERK/eIF2 $\alpha$  phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC<sub>3</sub> conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell death and differentiation*, 14(2):230–9, feb 2007. ISSN 1350-9047. doi: 10.1038/sj.cdd.4401984.

M Kozak. Point mutations close to the AUG initiator codon affect the efficiency of translation of rat preproinsulin in vivo. *Nature*, 308(5956):241–6, 1984. ISSN 0028-0836.

M Kozak. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic acids research*, 15(20):8125–48, oct 1987. ISSN 0305-1048. doi: 10.1093/nar/15.20.8125.

G. V. Kryukov, B. J. Lee, G. F. Combs, D. L. Hatfield, K. E. Hill, V. N. Gladyshev, D. B. Mansur, J. W. Harney, B. A. Carlson, M. J. Berry, M. E. Moustafa, A. M. Diamond, M. A. El-Saadani, L. Feigenbaum, R. F. Burk, and Q.-A. Sun. Selective Inhibition of Selenocysteine tRNA Maturation and Selenoprotein Synthesis in Transgenic Mice Expressing Isopentenyladenosine-Deficient Selenocysteine tRNA. *Molecular and Cellular Biology*, 21(11):3840–3852, 2002. ISSN 0270-7306. doi: 10.1128/mcb.21.11.3840-3852.2001.

Tatsuaki Kurosaki, Maximilian W Popp, and Lynne E Maquat. Quality and quantity control of gene expression by nonsense-mediated mRNA decay. *Nature reviews. Molecular cell biology*, apr 2019. ISSN 1471-0080. doi: 10.1038/s41580-019-0126-2.

Vyacheslav M Labunskyy, Dolph L Hatfield, and Vadim N Gladyshev. Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles. *Physiological reviews*, 94(3):739–77, jul 2014. ISSN 1522-1210. doi: 10.1152/physrev.00039.2013.

T. N. Lamichhane, S. Mattijssen, and R. J. Maraia. Human Cells Have a Limited Set of tRNA Anticodon Loop Substrates of the tRNA Isopentenyltransferase TRIT1 Tumor Suppressor. *Molecular and Cellular Biology*, 33(24):4900–4908, 2013. ISSN 0270-7306. doi: 10.1128/mcb.01041-13.

Tek N. Lamichhane, Aneeshkumar G. Arimbasseri, Keshab Rijal, James R. Iben, Fan Yan Wei, Kazuhito Tomizawa, and Richard J. Maraia. Lack of tRNA-i6A modification causes mitochondrial-like metabolic deficiency in *S. pombe* by limiting activity of cytosolic tRNA<sup>Tyr</sup>, not mito-tRNA. *Rna*, 22(4):583–596, 2016. ISSN 14699001. doi: 10.1261/rna.054064.115.

Liana F Lareau, Dustin H Hite, Gregory J Hogan, and Patrick O Brown. Distinct stages of the translation elongation cycle revealed by sequencing ribosome-protected mRNA fragments. *eLife*, 3, may 2014. ISSN 2050084X. doi: 10.7554/elife.01257.

Howard Laten, John Gorman, and Robert M. Bock. Isopentenyladenosine deficient tRNA from an antisuppressor mutant of *saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research*, 5(11):4329–4342, 1978. ISSN 03051048. doi:10.1093/nar/5.11.4329.

H Le Hir, D Gatfield, E Izaurralde, and M J Moore. The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. *The EMBO journal*, 20(17):4987–97, sep 2001. ISSN 0261-4189. doi:10.1093/emboj/20.17.4987.

Hervé Le Hir and Bertrand Séraphin. EJC's at the heart of translational control. *Cell*, 133(2):213–6, apr 2008. ISSN 1097-4172. doi:10.1016/j.cell.2008.04.002.

Alice Lebreton, Rafal Tomecki, Andrzej Dziembowski, and Bertrand Séraphin. Endonucleolytic RNA cleavage by a eukaryotic exosome. *Nature*, 456(7224):993–6, dec 2008. ISSN 1476-4687. doi:10.1038/nature07480.

B J Lee, P J Worland, J N Davis, T C Stadtman, and D L Hatfield. Identification of a selenocysteyl-tRNA(Ser) in mammalian cells that recognizes the nonsense codon, UGA. *The Journal of biological chemistry*, 264(17):9724–7, jun 1989. ISSN 0021-9258.

Yun-Young Lee, Randal C Cevallos, and Eric Jan. An upstream open reading frame regulates translation of GADD34 during cellular stresses that induce eIF2alpha phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*, 284(11):6661–73, mar 2009. ISSN 0021-9258. doi:10.1074/jbc.M806735200.

J Lemieux, B Lakowski, A Webb, Y Meng, A Ubach, F Bussiere, T Barnes, and S Hekimi. Regulation of physiological rates in *Caenorhabditis elegans* by a tRNA-modifying enzyme in the mitochondria. *Genetics*, 159(1):147–157, 2001. ISSN 0016-6731 (Print) 0016-6731 (Linking).

Gene-Wei Li, David Burkhardt, Carol Gross, and Jonathan S Weissman. Quantifying absolute protein synthesis rates reveals principles underlying allocation of cellular resources. *Cell*, 157(3):624–35, apr 2014. ISSN 1097-4172. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.033.

Heng Li, Bob Handsaker, Alec Wysoker, Tim Fennell, Jue Ruan, Nils Homer, Gabor Marth, Goncalo Abecasis, Richard Durbin, and 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 25(16):2078–9, aug 2009. ISSN 1367-4811. doi: 10.1093/bioinformatics/btp352.

Robert N Lightowlers, Agata Rozanska, and Zofia M Chrzanowska-Lightowlers. Mitochondrial protein synthesis: figuring the fundamentals, complexities and complications, of mammalian mitochondrial translation. *FEBS letters*, 588(15):2496–503, aug 2014. ISSN 1873-3468. doi: 10.1016/j.febslet.2014.05.054.

C. A. Lin, S. R. Ellis, and H. L. True. The Sua5 Protein Is Essential for Normal Translational Regulation in Yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 30(1):354–363, 2009. ISSN 0270-7306. doi: 10.1128/mcb.00754-09.



Huan Lin, Kenryo Miyauchi, Tai Harada, Ryo Okita, Eri Takeshita, Hirofumi Komaki, Kaoru Fujioka, Hideki Yagasaki, Yu Ichi Goto, Kaori Yanaka, Shinichi Nakagawa, Yuriko Sakaguchi, and Tsutomu Suzuki. CO<sub>2</sub>-sensitive tRNA modification associated with human mitochondrial disease. *Nature Communications*, 9(1):1875, 2018. ISSN 20411723. doi: 10.1038/s41467-018-04250-4.

Wenzhong Liu, Yubin Xie, Jiyong Ma, Xiaotong Luo, Peng Nie, Zhixiang Zuo, Urs Lahrmann, Qi Zhao, Yueyuan Zheng, Yong Zhao, Yu Xue, and Jian Ren. IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 31(20):3359–61, oct 2015. ISSN 1367-4811. doi: 10.1093/bioinformatics/btv362.

Christian Lorenz, Christina E Lünse, and Mario Mörl. tRNA Modifications: Impact on Structure and Thermal Adaptation. *Biomolecules*, 7(2), 2017. ISSN 2218-273X. doi: 10.3390/biom7020035.

Michael I. Love, Wolfgang Huber, and Simon Anders. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12):550, dec 2014. ISSN 1474760X. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.

S C Low and M J Berry. Knowing when not to stop: selenocysteine incorporation in eukaryotes. *Trends in biochemical sciences*, 21(6):203–8, jun 1996. ISSN 0968-0004.

Phoebe D Lu, Heather P Harding, and David Ron. Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *The Journal of cell biology*, 167(1):27–33, oct 2004. ISSN 0021-9525. doi: 10.1083/jcb.200408003.

Nicole Mai, Zofia M A Chrzanowska-Lightowlers, and Robert N Lightowlers. The process of mammalian mitochondrial protein synthesis. *Cell and tissue research*, 367(1):5–20, jan 2017. ISSN 1432-0878. doi: 10.1007/s00441-016-2456-0.

Aline Marnef, Beáta E Jády, and Tamás Kiss. Human polypyrimidine tract-binding protein interacts with mitochondrial tRNA(Thr) in the cytosol. *Nucleic acids research*, 44(3): 1342–53, feb 2016. ISSN 1362-4962. doi: 10.1093/nar/gkv1355.

Marcel Martin. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet journal*, 17(1):10, may 2014. ISSN 2226-6089. doi: 10.14806/ej.17.1.200.

M J Marton, C R Vazquez de Aldana, H Qiu, K Chakraborty, and A G Hinnebusch. Evidence that GCN1 and GCN20, translational regulators of GCN4, function on elongating ribosomes in activation of eIF2alpha kinase GCN2. *Molecular and cellular biology*, 17(8):4474–89, aug 1997. ISSN 0270-7306. doi: 10.1128/mcb.17.8.4474.

Kevin M Mazor, Leiming Dong, Yuanhui Mao, Robert V Swanda, Shu-Bing Qian, and Martha H Stipanuk. Effects of single amino acid deficiency on mRNA translation are

markedly different for methionine versus leucine. *Scientific reports*, 8(1):8076, may 2018.

ISSN 2045-2322. doi: 10.1038/s41598-018-26254-2.

Nicholas J McGlincy and Nicholas T Ingolia. Transcriptome-wide measurement of translation by ribosome profiling. *Methods (San Diego, Calif.)*, 126:112–129, 2017. ISSN

1095-9130. doi: 10.1016/j.ymeth.2017.05.028.

Eric W. Mills, Jamie Wangen, Rachel Green, and Nicholas T. Ingolia. Dynamic Regulation of a Ribosome Rescue Pathway in Erythroid Cells and Platelets. *Cell Reports*, 17(1):

1–10, 2016. ISSN 22111247. doi: 10.1016/j.celrep.2016.08.088.

P Mitchell, E Petfalski, A Shevchenko, M Mann, and D Tollervey. The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases.

*Cell*, 91(4):457–66, nov 1997. ISSN 0092-8674.

Nitish Mittal, Joao C Guimaraes, Thomas Gross, Alexander Schmidt, Arnau Vina-

Vilaseca, Danny D Nedialkova, Florian Aeschmann, Sebastian A Leidel, Anne Spang,

and Mihaela Zavolan. The Gcn4 transcription factor reduces protein synthesis capacity

and extends yeast lifespan. *Nature communications*, 8(1):457, 2017. ISSN 2041-1723. doi:

10.1038/s41467-017-00539-y.

Kaori Miyawaki, Miho Matsumoto-Kitano, and Tatsuo Kakimoto. Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in Arabidopsis: tissue specificity and regula-

tion by auxin, cytokinin, and nitrate. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 37 (1):128–38, jan 2004. ISSN 0960-7412.

Kaori Miyawaki, Petr Tarkowski, Miho Matsumoto-Kitano, Tomohiko Kato, Shus-ei Sato, Danuse Tarkowska, Satoshi Tabata, Göran Sandberg, and Tatsuo Kakimoto. Roles of Arabidopsis ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(44):16598–603, oct 2006. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.0603522103.

D Moazed and H F Noller. Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome. *Nature*, 342(6246):142–8, nov 1989. ISSN 0028-0836. doi: 10.1038/342142a0.

Fuad Mohammad, Rachel Green, and Allen R Buskirk. A systematically-revised ribosome profiling method for bacteria reveals pauses at single-codon resolution. *eLife*, 8, feb 2019. ISSN 2050-084X. doi: 10.7554/elife.42591.

David WS Mok and Machteld C Mok. CYTOKININ METABOLISM AND ACTION. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 52:89–118, jun 2001. ISSN 1040-2519. doi: 10.1146/annurev.arplant.52.1.89.

Peter B Moore and Thomas A Steitz. The roles of RNA in the synthesis of protein. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(11):a003780, nov 2011. ISSN 1943-0264. doi:

10.1101/cshperspect.a003780.

Raphael J. Morscher, Gregory S. Ducker, Sophia Hsin Jung Li, Johannes A. Mayer, Zemer Gitai, Wolfgang Sperl, and Joshua D. Rabinowitz. Mitochondrial translation requires folate-dependent tRNA methylation. *Nature*, 554(7690):128–132, 2018. ISSN 14764687. doi: 10.1038/nature25460.

Frank V. Murphy, Venki Ramakrishnan, Andrzej Malkiewicz, and Paul F. Agris. The role of modifications in codon discrimination by tRNA<sup>Lys</sup>UUU. *Nature Structural and Molecular Biology*, 11(12):1186–1191, 2004. ISSN 15459985. doi: 10.1038/nsmb861.

T Nagaike, T Suzuki, Y Tomari, C Takemoto-Hori, F Negayama, K Watanabe, and T Ueda. Identification and characterization of mammalian mitochondrial tRNA nucleotidyltransferases. *The Journal of biological chemistry*, 276(43):40041–9, oct 2001. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M106202200.

Danny D. Nedialkova and Sebastian A. Leidel. Optimization of Codon Translation Rates via tRNA Modifications Maintains Proteome Integrity. *Cell*, 161(7):1606–1618, 2015. ISSN 10974172. doi: 10.1016/j.cell.2015.05.022.

Nathalie Neriec and Piergiorgio Percipalle. Sorting mRNA Molecules for Cytoplasmic Transport and Localization. *Frontiers in Genetics*, 9, nov 2018. ISSN 1664-8021. doi: 10.3389/fgene.2018.00510.

Walter Neupert. A perspective on transport of proteins into mitochondria: a myriad of open questions. *Journal of molecular biology*, 427(6 Pt A):1135–58, mar 2015. ISSN 1089-8638. doi: 10.1016/j.jmb.2015.02.001.

T W O'Brien. The general occurrence of 55 S ribosomes in mammalian liver mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, 246(10):3409–17, may 1971. ISSN 0021-9258.

Karolina Pakos-Zebrucka, Izabela Koryga, Katarzyna Mnich, Mila Ljubic, Afshin Samali, and Adrienne M Gorman. The integrated stress response. *EMBO reports*, 17(10):1374–1395, 2016. ISSN 1469-3178. doi: 10.15252/embr.201642195.

Lakshmi Reddy Palam, Thomas D Baird, and Ronald C Wek. Phosphorylation of eIF2 facilitates ribosomal bypass of an inhibitory upstream ORF to enhance CHOP translation. *The Journal of biological chemistry*, 286(13):10939–49, apr 2011. ISSN 1083-351X. doi: 10.1074/jbc.M110.216093.

Yan Ling Joy Pang, Kiranmai Poruri, and Susan A. Martinis. tRNA synthetase: TRNA aminoacylation and beyond. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 5(4):461–480, 2014. ISSN 17577012. doi: 10.1002/wrna.1224.

T Pape, W Wintermeyer, and M V Rodnina. Complete kinetic mechanism of elongation factor Tu-dependent binding of aminoacyl-tRNA to the A site of the E. coli ribosome. *The EMBO journal*, 17(24):7490–7, dec 1998. ISSN 0261-4189. doi: 10.1093/emboj/17.24.7490.

Sarah F Pearce, Joanna Rorbach, Lindsey Van Haute, Aaron R D'Souza, Pedro Rebelo-Guiomar, Christopher A Powell, Ian Brierley, Andrew E Firth, and Michal Minczuk. Maturation of selected human mitochondrial tRNAs requires deadenylation. *eLife*, 6, jul 2017. ISSN 2050-084X. doi: 10.7554/eLife.27596.

Phan  lie Perche-Letuv  e, Thibaut Molle, Farhad Forouhar, Etienne Mulliez, and Mohamed Atta. Wybutosine biosynthesis: Structural and mechanistic overview. *RNA Biology*, 11(12):1508–1518, 2014. ISSN 15558584. doi: 10.4161/15476286.2014.992271.

T V Pestova, V G Kolupaeva, I B Lomakin, E V Pilipenko, I N Shatsky, V I Agol, and C U Hellen. Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(13):7029–36, jun 2001. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.111145798.

Daria Picchioni, Albert Antolin-Fontes, Noelia Camacho, Claus Schmitz, Alba Pons-Pons, Marta Rodr  guez-Escrib  , Antigoni Machallekidou, Merve Nur G  ler, Panagiota Siatra, Maria Carretero-Junquera, Alba Serrano, Stacy L Hovde, Philip A Knobel, Eva M Novoa, Maria Sol  -Vilarrubias, Laurie S Kaguni, Travis H Stracker, and Llu  s Ribas de Pouplana. Mitochondrial Protein Synthesis and mtDNA Levels Coordinated through an Aminoacyl-tRNA Synthetase Subunit. *Cell reports*, 27(1):40–47.e5, apr 2019. ISSN 2211-1247. doi: 10.1016/j.celrep.2019.03.022.

Andrey V Pisarev, Christopher U T Hellen, and Tatyana V Pestova. Recycling of eu-

karyotic posttermination ribosomal complexes. *Cell*, 131(2):286–99, oct 2007. ISSN 0092-8674. doi: 10.1016/j.cell.2007.08.041.

Vera P Pisareva, Maxim A Skabkin, Christopher U T Hellen, Tatyana V Pestova, and Andrey V Pisarev. Dissociation by Pelota, Hbs1 and ABCE1 of mammalian vacant 80S ribosomes and stalled elongation complexes. *The EMBO journal*, 30(9):1804–17, may 2011. ISSN 1460-2075. doi: 10.1038/emboj.2011.93.

V Ramakrishnan. Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell*, 108(4): 557–72, feb 2002. ISSN 0092-8674.

M Ramirez, R C Wek, C R Vazquez de Aldana, B M Jackson, B Freeman, and A G Hinnebusch. Mutations activating the yeast eIF-2 alpha kinase GCN2: isolation of alleles altering the domain related to histidyl-tRNA synthetases. *Molecular and cellular biology*, 12(12):5801–15, dec 1992. ISSN 0270-7306. doi: 10.1128/mcb.12.12.5801.

Veronika Reiter, Dorothea M S Matschkal, Mirko Wagner, Daniel Globisch, Andrea C. Kneuttinger, Markus Müller, and Thomas Carell. The CDK5 repressor CDK5RAP1 is a methylthiotransferase acting on nuclear and mitochondrial RNA. *Nucleic Acids Research*, 40(13):6235–6240, 2012. ISSN 03051048. doi: 10.1093/nar/gks240.

Lisa Michelle Restelli, Björn Oettinghaus, Mark Halliday, Cavit Agca, Maria Licci, Lara Sironi, Claudia Savoia, Jürgen Hench, Markus Tolnay, Albert Neutzner, Alexander Schmidt, Anne Eckert, Giovanna Mallucci, Luca Scorrano, and Stephan Frank. Neuronal



Mitochondrial Dysfunction Activates the Integrated Stress Response to Induce Fibroblast Growth Factor 21. *Cell reports*, 24(6):1407–1414, aug 2018. ISSN 2211-1247. doi: 10.1016/j.celrep.2018.07.023.

Koos Rooijers, Fabricio Loayza-Puch, Leo G. Nijtmans, and Reuven Agami. Ribosome profiling reveals features of normal and disease-associated mitochondrial translation. *Nature Communications*, 4(1):2886, dec 2013. ISSN 20411723. doi: 10.1038/ncomms3886.

N Rosenbaum and M L Gefter. Delta 2 -isopentenylpyrophosphate: transfer ribonucleic acid 2 -isopentenyltransferase from Escherichia coli. Purification and properties of the enzyme. *The Journal of biological chemistry*, 247(18):5675–80, sep 1972. ISSN 0021-9258.

Thalia Salinas-Giegé, Richard Giegé, and Philippe Giegé. tRNA Biology in Mitochondria. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3):4518–4559, feb 2015. ISSN 1422-0067. doi: 10.3390/ijms16034518.

Evelyn Sattlegger and Alan G Hinnebusch. Polyribosome binding by GCN1 is required for full activation of eukaryotic translation initiation factor 2{alpha} kinase GCN2 during amino acid starvation. *The Journal of biological chemistry*, 280(16):16514–21, apr 2005. ISSN 0021-9258. doi: 10.1074/jbc.M414566200.

P Schimmel. Aminoacyl tRNA synthetases: general scheme of structure-function relationships in the polypeptides and recognition of transfer RNAs. *Annual review of biochemi-*

*stry*, 56:125–58, 1987. ISSN 0066-4154. doi: 10.1146/annurev.bi.56.070187.001013.

T Martin Schmeing, Amy C Seila, Jeffrey L Hansen, Betty Freeborn, Juliane K Soukup, Stephen A Scaringe, Scott A Strobel, Peter B Moore, and Thomas A Steitz. A pre-translocational intermediate in protein synthesis observed in crystals of enzymatically active 50S subunits. *Nature structural biology*, 9(3):225–30, mar 2002. ISSN 1072-8368. doi: 10.1038/nsb758.

Tilman Schneider-Poetsch and Minoru Yoshida. Along the Central Dogma-Controlling Gene Expression with Small Molecules. *Annual review of biochemistry*, 87:391–420, 2018. ISSN 1545-4509. doi: 10.1146/annurev-biochem-060614-033923.

Daniel R Schoenberg and Lynne E Maquat. Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nature reviews. Genetics*, 13(4):246–59, mar 2012. ISSN 1471-0064. doi: 10.1038/nrg3160.

Erik Schoenmakers, Pascale Guicheney, Ryuta Tobe, Bradley Carlson, Krishna Chatterjee, Carla Moran, Maura Agostini, Greta Lyons, Nadia Schoenmakers, Francesco Muntoni, Sadaf Farooqi, Dolph Hatfield, Rachel Peat, Odelia Rajanayagam, Elena Bochukova, and Evelien Gevers. Mutation in human selenocysteine transfer RNA selectively disrupts selenoprotein synthesis. *Journal of Clinical Investigation*, 126(3):992–996, 2016. ISSN 0021-9738. doi: 10.1172/jci84747.

Anthony P. Schuller and Rachel Green. Roadblocks and resolutions in eukaryotic translation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(8):526–541, 2018. ISSN 14710080. doi: 10.1038/s41580-018-0011-4.

Ulrich Schweizer, Simon Bohleber, and Noelia Fradejas-Villar. The modified base isopentenyladenosine and its derivatives in tRNA. *RNA Biology*, 14(9):1197–1208, 2017. ISSN 15558584. doi: 10.1080/15476286.2017.1294309.

Matthew Scott, Carl W Gunderson, Eduard M Mateescu, Zhongge Zhang, and Terence Hwa. Interdependence of cell growth and gene expression: origins and consequences. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6007):1099–102, nov 2010. ISSN 1095-9203. doi: 10.1126/science.1192588.

Zhen Shi, Kotaro Fujii, Kyle M Kovary, Naomi R Genuth, Hannes L Röst, Mary N Teruel, and Maria Barna. Heterogeneous Ribosomes Preferentially Translate Distinct Subpools of mRNAs Genome-wide. *Molecular cell*, 67(1):71–83.e7, jul 2017. ISSN 1097-4164. doi: 10.1016/j.molcel.2017.05.021.

J Shine and L Dalgarno. The 3'-terminal sequence of Escherichia coli 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(4):1342–6, apr 1974. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.71.4.1342.

Christopher J Shoemaker and Rachel Green. Kinetic analysis reveals the ordered coupling of translation termination and ribosome recycling in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(51):E1392–8, dec 2011. ISSN 1091-6490. doi: 10.1073/pnas.1113956108.

Christopher J Shoemaker and Rachel Green. Translation drives mRNA quality control. *Nature structural & molecular biology*, 19(6):594–601, jun 2012. ISSN 1545-9985. doi: 10.1038/nsmb.2301.

Efraín Siller, Diane C DeZwaan, John F Anderson, Brian C Freeman, and José M Barral. Slowing bacterial translation speed enhances eukaryotic protein folding efficiency. *Journal of molecular biology*, 396(5):1310–8, mar 2010. ISSN 1089-8638. doi: 10.1016/j.jmb.2009.12.042.

Miljan Simonović and Thomas A Steitz. Peptidyl-CCA deacylation on the ribosome promoted by induced fit and the O<sub>3</sub>'-hydroxyl group of A76 of the unacylated A-site tRNA. *RNA (New York, N.Y.)*, 14(11):2372–8, nov 2008. ISSN 1469-9001. doi: 10.1261/rna.1118908.

Deniz Simsek and Maria Barna. An emerging role for the ribosome as a nexus for post-translational modifications. *Current opinion in cell biology*, 45:92–101, 2017. ISSN 1879-0410. doi: 10.1016/j.ceb.2017.02.010.

Deniz Simsek, Gerald C Tiu, Ryan A Flynn, Gun W Byeon, Kathrin Leppek, Adele F Xu, Howard Y Chang, and Maria Barna. The Mammalian Ribo-interactome Reveals Ribosome Functional Diversity and Heterogeneity. *Cell*, 169(6):1051–1065.e18, jun 2017. ISSN 1097-4172. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.022.

H Song, P Mugnier, A K Das, H M Webb, D R Evans, M F Tuite, B A Hemmings, and D Barford. The crystal structure of human eukaryotic release factor eRF1—mechanism of stop codon recognition and peptidyl-tRNA hydrolysis. *Cell*, 100(3):311–21, feb 2000. ISSN 0092-8674.

M Sprinzl and F Cramer. The -C-C-A end of tRNA and its role in protein biosynthesis. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 22:1–69, 1979. ISSN 0079-6603.

I Steinbrecht and W Kunz. [Use of "cycling" technic for random quantitative determination of the degree of reduction of NAD and NADP system in rat liver mitochondria with continuous recording of the measurements]. *Acta Biol Med Ger*, 25(5):731–747, 1970. ISSN 0001-5318 (Print) 0001-5318 (Linking).

N Sternberg and D Hamilton. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *Journal of molecular biology*, 150(4):467–86, aug 1981. ISSN 0022-2836.

Korbinian Strimmer. fdrtool: a versatile R package for estimating local and tail area-based false discovery rates. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 24(12):1461–2, jun 2008. ISSN

1367-4811. doi: 10.1093/bioinformatics/btn209.

Anu Suomalainen and Brendan J. Battersby. Mitochondrial diseases: The contribution of organelle stress responses to pathology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(2): 77–92, 2018. ISSN 14710080. doi: 10.1038/nrm.2017.66.

Tsutomu Suzuki and Takeo Suzuki. A complete landscape of post-transcriptional modifications in mammalian mitochondrial tRNAs. *Nucleic Acids Research*, 42(11):7346–7357, 2014. ISSN 13624962. doi: 10.1093/nar/gku390.

Tsutomu Suzuki, Asutaka Nagao, and Takeo Suzuki. Human Mitochondrial tRNAs: Biogenesis, Function, Structural Aspects, and Diseases. *Annual Review of Genetics*, 45(1): 299–329, 2011. ISSN 0066-4197. doi: 10.1146/annurev-genet-110410-132531.

Y Taya, Y Tanaka, and S Nishimura. 5'-AMP is a direct precursor of cytokinin in *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, 271(5645):545–7, feb 1978. ISSN 0028-0836.

H M Temin. Reverse transcription in the eukaryotic genome: retroviruses, pararetroviruses, retrotransposons, and retrotranscripts. *Molecular biology and evolution*, 2(6):455–68, nov 1985. ISSN 0737-4038. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040365.

Richard J. Temperley, Mateusz Wydro, Robert N. Lightowlers, and Zofia M. Chrzanowska-Lightowlers. Human mitochondrial mRNAs—like members of all families, similar but different. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1797(6-7): 1081–1085, jun 2010. ISSN 00052728. doi: 10.1016/j.bbabi.2010.02.036.

R Thermann, G Neu-Yilik, A Deters, U Frede, K Wehr, C Hagemeyer, M W Hentze, and A E Kulozik. Binary specification of nonsense codons by splicing and cytoplasmic translation. *The EMBO journal*, 17(12):3484–94, jun 1998. ISSN 0261-4189. doi: 10.1093/emboj/17.12.3484.

Adrian Gabriel Torres, Eduard Batlle, and Lluís Ribas de Pouplana. Role of tRNA modifications in human diseases. *Trends in Molecular Medicine*, 20(6):306–314, 2014. ISSN 1471499X. doi: 10.1016/j.molmed.2014.01.008.

Tatsuhisa Tsuboi, Kazushige Kuroha, Kazuhei Kudo, Shiho Makino, Eri Inoue, Isao Kashima, and Toshifumi Inada. Dom34:hbs1 plays a general role in quality-control systems by dissociation of a stalled ribosome at the 3' end of aberrant mRNA. *Molecular cell*, 46(4):518–29, may 2012. ISSN 1097-4164. doi: 10.1016/j.molcel.2012.03.013.

Elena J Tucker, Steven G Hershman, Caroline Köhrer, Casey A Belcher-Timme, Jinal Patel, Olga A Goldberger, John Christodoulou, Jonathon M Silberstein, Matthew McKenzie, Michael T Ryan, Alison G Compton, Jacob D Jaffe, Steven A Carr, Sarah E Calvo, Uttam L RajBhandary, David R Thorburn, and Vamsi K Mootha. Mutations in MTFMT underlie a human disorder of formylation causing impaired mitochondrial translation. *Cell metabolism*, 14(3):428–34, sep 2011. ISSN 1932-7420. doi: 10.1016/j.cmet.2011.07.010.

R M Tujebajeva, P R Copeland, X M Xu, B A Carlson, J W Harney, D M Driscoll, D L

Hatfield, and M J Berry. Decoding apparatus for eukaryotic selenocysteine insertion. *EMBO reports*, 1(2):158–63, aug 2000. ISSN 1469-221X. doi: 10.1038/sj.embor.embor604.

Francesca Tuorto, Carine Legrand, Cansu Cirzi, Giuseppina Federico, Reinhard Liebers, Martin Müller, Ann E Ehrenhofer-Murray, Gunnar Dittmar, Hermann-Josef Gröne, and Frank Lyko. Queuosine-modified tRNAs confer nutritional control of protein translation. *The EMBO journal*, 37(18), sep 2018. ISSN 1460-2075. doi: 10.15252/emj.201899777.

J. Urbonavičius, Q. Qian, J. M B Durand, T. G. Hagervall, and G. R. Björk. Improvement of reading frame maintenance is a common function for several tRNA modifications. *EMBO Journal*, 20(17):4863–4873, 2001. ISSN 02614189. doi: 10.1093/emboj/20.17.4863.

S N van der Crabben, N M Verhoeven-Duif, E H Brilstra, L Van Maldergem, T Coskun, E Rubio-Gozalbo, R Berger, and T J de Koning. An update on serine deficiency disorders. *Journal of inherited metabolic disease*, 36(4):613–9, jul 2013. ISSN 1573-2665. doi: 10.1007/s10545-013-9592-4.

Ambro van Hoof, Pamela A Frischmeyer, Harry C Dietz, and Roy Parker. Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5563):2262–4, mar 2002. ISSN 1095-9203. doi: 10.1126/science.1067272.



Jana V van Vliet-Ostaptchouk, Oluf Pedersen, Unnur Thorsteinsdottir, Jie Zhou, Wing-Yee So, Augustine Kong, Claus Christiansen, Adam Baker, Steinunn Snorraddottir, Vilmundur Gudnason, Guanjie Chen, Torben Jorgensen, Hjordis Bjarnason, Adebawale Adeyemo, Valgerdur Steinthorsdottir, Maggie C Y Ng, Shyamali Ghosh, Unnur Styrkarsdottir, Thorbjorg Jonsdottir, Solveig Gretarsdottir, Muredach P Reilly, Gunnar Sigurdsson, Torben Hansen, Ayo Doumatey, Hanxia Huang, Valur Emilsson, Gitte Andersen, Mark Gurney, Ronald C Y Ma, Yuanxiu Chen, Marten H Hofker, Robert L Wilensky, Cisca Wijmenga, Charles Rotimi, Inga Reynisdottir, Knut Borch-Johnsen, G Bragi Walters, Kari Stefansson, Gudmar Thorleifsson, Kerrie Lashley, Rafn Benediktsson, Yu Bagger, Juliana C N Chan, Daniel J Rader, and Jeffrey R Gulcher. A variant in CDKAL1 influences insulin response and risk of type 2 diabetes. *Nature Genetics*, 39(6):770–775, 2007. ISSN 1061-4036. doi: 10.1038/ng2043.

Krishna M Vattam and Ronald C Wek. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(31):11269–74, aug 2004. ISSN 0027-8424. doi: 10.1073/pnas.0400541101.

Miao Wang and Randal J Kaufman. The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nature reviews. Cancer*, 14(9):581–97, sep 2014. ISSN 1474-1768. doi: 10.1038/nrc3800.

G. J. Warner, J. R. Faust, C. P. Rusconi, and I. E. White. Identification and sequencing

of two isopentenyladenosine-modified transfer RNAs from Chinese hamster ovary cells.

*Nucleic Acids Research*, 26(23):5533–5535, 2002. ISSN 0305-1048. doi: 10.1093/nar/26.23.5533.

Gregory J. Warner, Marla J. Berry, Mohamed E. Moustafa, Bradley A. Carlson, Dolph L. Hatfield, and Jerry R. Faust. Inhibition of selenoprotein synthesis by selenocysteine tRNA([Ser]Sec) lacking isopentenyladenosine. *Journal of Biological Chemistry*, 275(36): 28110–28119, 2000. ISSN 00219258. doi: 10.1074/jbc.M001280200.

Michael R Wasserman, Jose L Alejo, Roger B Altman, and Scott C Blanchard. Multiperspective smFRET reveals rate-determining late intermediates of ribosomal translocation. *Nature structural & molecular biology*, 23(4):333–41, apr 2016. ISSN 1545-9985. doi: 10.1038/nsmb.3177.

Fan Yan Wei, Takeo Suzuki, Sayaka Watanabe, Satoshi Kimura, Taku Kaitsuka, Atsushi Fujimura, Hideki Matsui, Mohamed Atta, Hiroyuki Michiue, Marc Fontecave, Kazuya Yamagata, Tsutomu Suzuki, and Kazuhito Tomizawa. Deficit of tRNA<sup>Lys</sup> modification by Cdkal1 causes the development of type 2 diabetes in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 121(9):3598–3608, 2011. ISSN 00219738. doi: 10.1172/JCI58056.

Fan Yan Wei, Bo Zhou, Takeo Suzuki, Keishi Miyata, Yoshihiro Ujihara, Haruki Horiguchi, Nozomu Takahashi, Peiyu Xie, Hiroyuki Michiue, Atsushi Fujimura, Taku Kaitsuka, Hideki Matsui, Yasutoshi Koga, Satoshi Mohri, Tsutomu Suzuki, Yuichi Oike, and Kazu-

hito Tomizawa. Cdk5rap1-mediated 2-methylthio modification of mitochondrial tRNAs governs protein translation and contributes to myopathy in mice and humans. *Cell Metabolism*, 21(3):428–442, 2015. ISSN 19327420. doi: 10.1016/j.cmet.2015.01.019.

Karolin Wellner, Heike Betat, and Mario Mörl. A tRNA's fate is decided at its 3' end: Collaborative actions of CCA-adding enzyme and RNases involved in tRNA processing and degradation. *Biochimica et biophysica acta. Gene regulatory mechanisms*, 1861(4): 433–441, apr 2018. ISSN 1874-9399. doi: 10.1016/j.bbagr.2018.01.012.

Falk R. Wiedemann, Stefan Vielhaber, Rolf Schröder, Christian E. Elger, and Wolfram S. Kunz. Evaluation of methods for the determination of mitochondrial respiratory chain enzyme activities in human skeletal muscle samples. *Analytical Biochemistry*, 279(1):55–60, 2000. ISSN 00032697. doi: 10.1006/abio.1999.4434.

Marenda A Wilson, Stacie Meaux, and Ambro van Hoof. A genomic screen in yeast reveals novel aspects of nonstop mRNA metabolism. *Genetics*, 177(2):773–84, oct 2007. ISSN 0016-6731. doi: 10.1534/genetics.107.073205.

C Yanofsky. Attenuation in the control of expression of bacterial operons. *Nature*, 289(5800):751–8, feb 1981. ISSN 0028-0836.

John W. Yarham, Tek N. Lamichhane, Angela Pyle, Sandy Mattijssen, Enrico Baruffini, Francesco Bruni, Claudia Donnini, Alex Vassilev, Langping He, Emma L. Blakely, Helen Griffin, Mauro Santibanez-Koref, Laurence A. Bindoff, Ileana Ferrero, Patrick F. Chinne-

ry, Robert McFarland, Richard J. Maraia, and Robert W. Taylor. Defective i6A37 Modification of Mitochondrial and Cytosolic tRNAs Results from Pathogenic Mutations in TRIT1 and Its Substrate tRNA. *PLoS Genetics*, 10(6):e1004424, 2014. ISSN 15537404. doi: 10.1371/journal.pgen.1004424.

Hasmik Yepiskoposyan, Florian Aeschmann, Daniel Nilsson, Michal Okoniewski, and Oliver Mühlemann. Autoregulation of the nonsense-mediated mRNA decay pathway in human cells. *RNA (New York, N.Y.)*, 17(12):2108–18, dec 2011. ISSN 1469-9001. doi: 10.1261/rna.030247.111.

Sara K Young, Jeffrey A Willy, Cheng Wu, Matthew S Sachs, and Ronald C Wek. Ribosome Reinitiation Directs Gene-specific Translation and Regulates the Integrated Stress Response. *The Journal of biological chemistry*, 290(47):28257–71, nov 2015. ISSN 1083-351X. doi: 10.1074/jbc.M115.693184.

H. G. Zachau, D. Dütting, and H. Feldmann. Nucleotide Sequences of two Serine-Specific Transfer Ribonucleic Acids. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 5(4):422–422, 1966. ISSN 15213773. doi: 10.1002/anie.196604221.

Daniel R. Zerbino, Premanand Achuthan, Wasii Akanni, M. Ridwan Amode, Daniel Barrell, Jyothish Bhai, Konstantinos Billis, Carla Cummins, Astrid Gall, Carlos García Girón, Laurent Gil, Leo Gordon, Leanne Haggerty, Erin Haskell, Thibaut Hourlier, Osa-gie G. Izuogu, Sophie H. Janacek, Thomas Juettemann, Jimmy Kiang To, Matthew R.

Laird, Ilias Lavidas, Zhicheng Liu, Jane E. Loveland, Thomas Maurel, William McLaren, Benjamin Moore, Jonathan Mudge, Daniel N. Murphy, Victoria Newman, Michael Nuhn, Denye Ogeh, Chuang Kee Ong, Anne Parker, Mateus Patricio, Harpreet Singh Riat, Helen Schuilenburg, Dan Sheppard, Helen Sparrow, Kieron Taylor, Anja Thormann, Alessandro Vullo, Brandon Walts, Amonida Zadissa, Adam Frankish, Sarah E. Hunt, Myrto Kostadima, Nicholas Langridge, Fergal J. Martin, Matthieu Muffato, Emily Perry, Magali Ruffier, Dan M. Staines, Stephen J. Trevanion, Bronwen L. Aken, Fiona Cunningham, Andrew Yates, and Paul Flicek. Ensembl 2018. *Nucleic Acids Research*, 46 (D1):D754–D761, jan 2018. ISSN 13624962. doi: 10.1093/nar/gkx1098.

Gong Zhang and Zoya Ignatova. Folding at the birth of the nascent chain: coordinating translation with co-translational folding. *Current opinion in structural biology*, 21(1):25–31, feb 2011. ISSN 1879-033X. doi: 10.1016/j.sbi.2010.10.008.

Gong Zhang, Magdalena Hubalewska, and Zoya Ignatova. Transient ribosomal attenuation coordinates protein synthesis and co-translational folding. *Nature structural & molecular biology*, 16(3):274–80, mar 2009. ISSN 1545-9985. doi: 10.1038/nsmb.1554.

J Zhang, X Sun, Y Qian, and L E Maquat. Intron function in the nonsense-mediated decay of beta-globin mRNA: indications that pre-mRNA splicing in the nucleus can influence mRNA translation in the cytoplasm. *RNA (New York, N.Y.)*, 4(7):801–15, jul 1998. ISSN 1355-8382.

Peichuan Zhang, Barbara C McGrath, Jamie Reinert, DeAnne S Olsen, Li Lei, Sangeeta Gill, Sheree A Wek, Krishna M Vattem, Ronald C Wek, Scot R Kimball, Leonard S Jefferson, and Douglas R Cavener. The GCN2 eIF2alpha kinase is required for adaptation to amino acid deprivation in mice. *Molecular and cellular biology*, 22(19):6681–8, oct 2002. ISSN 0270-7306. doi: 10.1128/mcb.22.19.6681-6688.2002.

Fangzhou Zhao, Chien-hung Yu, and Yi Liu. Codon usage regulates protein structure and function by affecting translation elongation speed in *Drosophila* cells. *Nucleic acids research*, 45(14):8484–8492, aug 2017. ISSN 1362-4962. doi: 10.1093/nar/gkx501.

G Zhouravleva, L Frolova, X Le Goff, R Le Guellec, S Inge-Vechtomov, L Kisselev, and M Philippe. Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3. *The EMBO journal*, 14(16):4065–72, aug 1995. ISSN 0261-4189.