

5 Diskussion

5.1 Untersuchung des molekularen Mechanismus der Prothrombin 20210 G→A Mutation

Aufgrund der potentiell auftretenden Komplikationen stellen venöse Thrombosen eine ernstzunehmende Bedrohung für die menschliche Gesundheit dar und führen darüber hinaus in den meisten Fällen zu relevanten Spätfolgen. Hereditäre Thrombophilien, ausgelöst durch die Inaktivierung von plasmatischen Inhibitoren der Blutgerinnung, sind jedoch sehr selten. Viel weiter verbreitet sind Mutationen in gerinnungsaktivierenden Faktoren, die ebenfalls zu einer Verstärkung der Gerinnung führen. Die zwei wichtigsten Vertreter dieser Klasse von Thrombophilie-Mutationen sind Faktor V Leiden und Prothrombin 20210 G→A. Beide bewirken eine moderate bis deutliche Erhöhung des Thromboserisikos bereits bei Heterozygoten und haben eine weite Verbreitung in der Bevölkerung (Lane und Grant, 2000). Im Gegensatz zur Faktor V Leiden-Thrombophilie, deren molekulare Grundlage längst bekannt ist, blieb der Mechanismus der Prothrombin 20210 G→A Mutation jahrelang rätselhaft. Ein Hinweis auf den molekularen Mechanismus ergab sich aus der Beobachtung, daß heterozygote Träger des 20210A Allels eine etwa 25-30% erhöhte Prothrombinkonzentration im Plasma aufweisen, die einen Zustand erhöhter Blutgerinnung auszulösen scheint (Makris *et al.*, 1997; Poort *et al.*, 1996; Tosoetto *et al.*, 1999).

5.1.1 Ein neuartiger Mechanismus einer hereditären Erkrankung

Die Entschlüsselung des molekularen Mechanismus der Prothrombin 20210 G→A Mutation wurde ermöglicht durch die Entwicklung und Etablierung eines einfach zu handhabenden experimentellen Systems. Die Insertion der 3'UTR und 3'flankierender Sequenzen des Prothrombins in das heterologe Reportergen β -Globin erlaubt die Untersuchung der quantitativen und funktionellen Auswirkungen der G→A Mutation auf die mRNA- und Proteinexpression. Die Validierung des experimentellen Systems ergab, daß nach Transfektion der Konstrukte in HeLa-Zellen etwa 1,8fach mehr mRNA und Protein von dem

Konstrukt mit der Mutation exprimiert wird. Dies entspricht den *in vivo* Beobachtungen bei heterozygoten Trägern der Mutation, denn die transfizierten Zellen weisen einen quasi-homozygoten Status auf. Damit konnte belegt werden, daß dieses experimentelle System in der Lage ist, die quantitativen Unterschiede der Prothrombinexpression im menschlichen Organismus abzubilden. Die weitere Charakterisierung der Unterschiede bei der Expression der mRNAs belegte, daß ein posttranskriptionaler Mechanismus der Expressionsregulation vorliegt, da vergleichbare Mengen beider prä-mRNA Spezies im Zellkern gefunden wurden. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß keine strukturellen Unterschiede zwischen den mRNAs bestehen, d. h. sie unterschieden sich weder in der Länge der Poly(A)-Schwänze noch in der Position der Polyadenylierung. Es stellte sich vielmehr heraus, daß ein funktioneller Unterschied bei der 3'End-Prozessierung für die unterschiedliche Expressionsstärke von $F2^*G$ und $F2^*A$ mRNAs verantwortlich ist. Die Prozessierung des 3'Endes verläuft offenbar am A-Nukleotid mehr als doppelt so effizient wie am G-Nukleotid. Dies erklärt, warum mehr korrekt prozessierte, reife mRNA bei einem A, als bei einem G an der Spaltungsstelle entsteht. Eine erhöhte Effizienz der 3'End-Prozessierung konnte damit als neuer genetischer Mechanismus einer hereditären Erkrankung präsentiert werden.

Diese Entdeckung hat einige sehr interessante Aspekte, die besonders hervorgehoben werden müssen. Der Effekt, der durch diese Funktionssteigerungs-Mutation („gain-of-function-mutation“) ausgelöst wird, ist mit einer etwa 1,8fachen Expressionserhöhung recht moderat. Es ist ziemlich erstaunlich, daß eine so geringe Aktivierung der mRNA-Prozessierung für eine so häufige und gefährliche Erkrankung prädisponieren kann.

Die hier gezeigten Daten sprechen für eine ineffiziente Nutzung des normalen Prothrombin 3'End-Prozessierungssignals. Dies könnte bedeuten, daß dieser Schritt der prä-mRNA-Prozessierung genutzt wird, um die Expression des Prothrombin-Proteins auf ein niedriges Niveau einzustellen, damit so die Faktoren der Blutgerinnung im Gleichgewicht gehalten werden können. Für eine Regulation der Genexpression des Prothrombins über die 3'End-Prozessierung

liegen zwar noch keine endgültigen Beweise vor, jedoch deuten viele der Beobachtungen in diese Richtung.

5.1.2 Auswirkungen der 3'End-Prozessierungseffizienz auf die Prothrombin-Expression

Es wurde mit dieser Arbeit nicht direkt gezeigt, warum die geringe Effizienz des natürlichen Prothrombin 3'End-Prozessierungssignals zu einer Reduzierung von mRNA-Akkumulation und Proteinsynthese im Vergleich zum mutierten 3'End-Prozessierungssignal führt. Es bieten sich aber verschiedene logische Erklärungsmöglichkeiten an. Die mRNAs mit verlängerten 3'Enden, die durch Überlesen des korrekten Prozessierungssignals entstehen, repräsentieren ideale Substrate für einen kürzlich identifizierten Komplex RNA-degradierender Enzyme, das sogenannte Exosom (van Hoof und Parker, 1999). Es ist in der Hefe *S. cerevisiae* bereits gezeigt worden, daß mRNAs mit aberrant prozessierten 3'Enden vom Exosom erkannt und degradiert werden (Burkard und Butler, 2000). Eine ähnliche Funktion des Exosoms höherer Eukaryonten ist aufgrund der hohen Konservierung der einzelnen Untereinheiten sehr wahrscheinlich (Brouwer *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001). Alternativ könnten die 3'verlängerten mRNAs auch durch den Nonsense-vermittelten mRNA-Abbau degradiert werden, der ebenfalls in Hefe mRNA-Spezies mit verlängerten 3'UTRs abbaut (Muhlrad und Parker, 1999). In beiden möglichen Fällen würde der Anstieg an korrekter 3'End-Prozessierung durch die G→A Mutation auch zu einer erhöhten Verfügbarkeit von reifer mRNA im Zytoplasma führen, die zur Translation des Proteins herangezogen werden kann. Dies erklärt die beobachteten Unterschiede der mRNA- und Proteinexpression zwischen den beiden unterschiedlichen Prozessierungssignalen.

5.1.3 Fazit

Die Untersuchung der Thrombophilie-assoziierten G→A Mutation an Position 20210 des Prothrombin Gens führte zur Entdeckung der erhöhten 3'End-Prozessierungseffizienz als neues molekulares Prinzip einer „gain-of-function“ Mutation. Interessanterweise bedeutet in diesem Falle bereits eine quantitativ

geringe Aktivierung der mRNA Prozessierung die Veranlagung für eine weit verbreitete und gefährliche Erkrankung bei Trägern der Mutation.

5.1.4 Ausblick

Die überraschende Entdeckung, daß die Expression des Prothrombins durch die Effizienz der 3'End-Prozessierung verändert werden kann, hat einige wichtige Fragen aufgeworfen. Ist Prothrombin das einzige Gen, dessen 3'End-Prozessierungseffizienz durch natürlich vorkommende Mutationen verändert wird, oder gibt es dafür noch andere Beispiele? Warum verläuft die 3'End-Prozessierung der Prothrombin-mRNA so ineffizient? Was ist der physiologische Vorteil einer ineffizienten 3'End-Prozessierung? Warum ist die 20210 G→A Mutation so weit verbreitet?

Zumindest ein Beispiel für eine weitere aktivierende Mutation der 3'End-Prozessierung im Prothrombin-Gen ist kürzlich beschrieben worden. Nur 11 nt stromab der etablierten 20210 G→A Mutation ist eine neue C→T Mutation an Position 20221 identifiziert worden, die ebenfalls mit erhöhten Prothrombin-Plasmakonzentrationen korreliert (Wylenzek *et al.*, 2001). Zur Identifizierung dieser Mutation führte die genetische Analyse eines Patienten mit schweren Thrombosen, so daß offensichtlich auch die 20221 C→T Mutation das Risiko erhöht, eine Thrombose zu entwickeln. Signifikante Daten liegen aber bislang aufgrund der geringen Verbreitung dieser Mutation nicht vor. Erste Vorexperimente in dem hier vorgestellten experimentellen System mit β -Globin als Reporter gen haben ergeben, daß diese Mutation die mRNA-Expression ähnlich wie die 20210 G→A Mutation signifikant erhöht (Ute Frede, unveröffentlichte Daten). Weitere Experimente deuten auch hier auf eine erhöhte Effizienz der 3'End-Prozessierung als Ursache für diese verstärkte Expression hin. Diese Ergebnisse sowie Daten von gezielten Mutagenesen aus unserem Labor belegen, daß die Expression des Prothrombin-Gens sehr sensibel auf Mutationen in der Nähe der Spaltungsstelle reagiert. Dies befindet sich auch im Einklang mit unserer Hypothese der Expressionregulation des Prothrombingens über die 3'End Prozessierung.

Weitere Untersuchungen scheinen nötig, um die Frage zu klären, warum das physiologische 3'End-Prozessierungssignal des Prothrombins so ineffizient erkannt und genutzt wird. Ein möglicher Grund könnte das Fehlen von flankierenden Hilfssequenzen stromab der Spaltungsstelle sein. Es ist bekannt, daß diese U-reichen Sequenzelemente die Prozessierung erheblich steigern können (Chen *et al.*, 1995; Chou *et al.*, 1994; Wahle und Rueggegger, 1999). Solche Sequenzen sind jedoch im Prothrombin nicht eindeutig identifizierbar. Diese Möglichkeit soll durch gezielte Mutagenesen innerhalb der Prothrombin 3'UTR und der flankierenden Sequenzen untersucht werden, die im experimentellen System quantitativ und funktionell analysiert werden können. Ebenso soll die Bindung verschiedener Komponenten des 3'End-Prozessierungsapparates an das Prothrombin 3'End-Prozessierungssignal erforscht werden. Dadurch könnte geklärt werden, welche Faktoren für die ineffiziente Prozessierung verantwortlich sind. Diese stellen wiederum gute Kandidaten für die *trans*-Regulatoren der Prozessierungseffizienz dar, die anschließend eingehender untersucht werden müssen.

Eine weitere interessante Fragestellung befaßt sich mit der physiologischen Ursache der ineffizienten 3'End-Prozessierung. Bis heute konnte nur für Prothrombin eine Veränderung der 3'End-Prozessierung durch eine Mutation an einer 3'gelegenen Position gezeigt werden. Diese Tatsache sowie die Daten der Kompetitionsanalysen implizieren, daß die 3'End-Prozessierung der Prothrombin-mRNA normalerweise ineffizient abläuft, so daß bereits eine kleine Aktivierung zu einem deutlichen Effekt führt. Daher ist insbesondere die Prothrombin-mRNA für weitere Untersuchungen zur physiologischen Ursache einer ineffizienten 3'End-Prozessierung prädestiniert. Eine Arbeitshypothese für die weiteren Experimente postuliert, daß die Beschränkung der Prothrombin-mRNA auf ein niedriges Expressionsniveau die schnelle Anpassung der Expression an veränderte Gerinnungsanforderungen ermöglichen soll. So könnten Krankheit oder Verletzung die Erzeugung eines prokoagulatorischen Zustands erfordern, der über eine Veränderung der 3'End-Prozessierung der Prothrombin-mRNA erreicht wird. Um dies zu untersuchen, soll ein Zellkultursystem etabliert werden, in dem die Regulation der Prothrombinexpression eingehend untersucht werden kann. Dies

setzt voraus, daß die ausgewählten Zellen endogenes Prothrombin exprimieren, denn nur dann ist eine regulierte Expression wahrscheinlich. Vorexperimente haben gezeigt, daß die Hepatom Zelllinie HepG2 endogenes Prothrombin exprimiert. Daher sollen alle folgenden Versuche unter Verwendung dieser Zelllinie durchgeführt werden. Es soll untersucht werden, ob sich die Expression von Prothrombin in den HepG2-Zellen als Antwort auf verschiedene Stimuli verändert. Sollten solche Veränderungen beobachtet werden, werden weitere Experimente zur Rolle der 3'End-Prozessierung bei dieser Regulation der Genexpression folgen.

Abschließend stellt sich die Frage, warum gerade eine aktivierende Mutation wie *F2 20210 G→A* so weit verbreitet ist, denn sie stellt eigentlich einen evolutionären Nachteil dar (Individuen mit einer deutlich erhöhten Thrombosegefahr sollten üblicherweise aus dem Genpool entfernt werden). Eine mögliche Erklärung wäre natürlich, daß die Lebensweise in einer Zivilisation das individuelle Thromboserisiko anhebt, wodurch überhaupt erst die lebensbedrohlichen Thrombosen in Assoziation mit der *F2 20210 G→A* Mutation auftreten können. Viel wahrscheinlicher ist aber, daß die Mutation gleichzeitig einen geringen evolutionären Vorteil gewährt. So besitzt Thrombin nicht nur Aufgaben bei der Blutgerinnung, sondern auch bei der Entwicklung und Differenzierung von bestimmten Geweben. Diese Funktionen vermittelt es z. B. über den Thrombinrezeptor, der unter anderem bei der Angiogenese eine Rolle spielt. Es wäre also denkbar, daß der evolutionäre Nachteil eines erhöhten Thromboserisikos durch einen Vorteil bei der embryonalen Entwicklung wettgemacht wird. Es sind Untersuchungen geplant, die sich speziell mit der Klärung dieser Frage befassen werden.

5.2 Rolle des Poly(A)-Schwanzes beim Nonsens-vermittelten mRNA-Abbau

Der Poly(A)-Schwanz von eukaryontischen mRNAs hat verschiedene Aufgaben. Die meisten bekannten Funktionen des Poly(A)-Schwanzes werden durch die Poly(A)-bindenden Proteine PABPI und PABPII vermittelt. Sie führen zu einer verbesserten Stabilität und Translationseffizienz der mRNA und aktivieren den

Transport vom Zellkern ins Zytoplasma (Coller *et al.*, 1998; Gray *et al.*, 2000). Zusätzlich bewirkt der Poly(A)-Schwanz eine erhöhte Spleißeffizienz durch Faktoren der 3'End-Prozessierung. Das 3'Ende von mRNAs übt also einen entscheidenden Einfluß auf viele Schritte des mRNA-Metabolismus aus.

Beim Umsatz normaler mRNAs spielt der Poly(A)-Schwanz eine wichtige Rolle (Dehlin *et al.*, 2000; Gao *et al.*, 2000; Wilusz *et al.*, 2001a). Im Gegensatz dazu werden mRNAs mit vorzeitigen Translations-Terminationskodons in der Hefe *S. cerevisiae* ohne vorherige Deadenylierung vom 5'- zum 3'Ende exonukleolytisch degradiert (Muhlrad und Parker, 1994). Dies könnte bedeuten, daß der Poly(A)-Schwanz ein unverzichtbarer Bestandteil einer Nonsense-mutierten mRNA bei der Rekrutierung für den NMD spielt. Da außerdem die Translation und das Spleißen, die zwei essentiellen Prozesse des NMD, durch den Poly(A)-Schwanz positiv beeinflußt werden, schien es wichtig, die Rolle des Poly(A)-Schwanzes beim NMD zu untersuchen.

Ausgangspunkt dieser Untersuchungen war die Expression von mRNAs ohne Poly(A)-Schwanz, die an ihrem 3'Ende eine stabilisierende Histon-Stem-Loop Struktur aufwiesen. Aufgrund unerwünschter Kopetitionen zwischen Spleißen, Polyadenylierung und Histon 3'End-Prozessierung mußte der Validierung der 3'End-Struktur der Hybrid-mRNAs eine entscheidende Rolle zukommen. Der Spleißvorgang und der Vorgang der 3'End-Prozessierung sind so stark gekoppelt, daß intronhaltige mRNAs sehr leicht an kryptischen Poly(A)-Signalen polyadenyliert werden. Dieser Vorgang mußte bei den untersuchten mRNAs durch verschiedene Experimente ausgeschlossen werden, um sicherzugehen, daß ausschließlich nicht polyadenylierte Transkripte in den Experimenten analysiert werden. Nachdem diese wichtigen Kontrollen gezeigt hatten, daß sowohl die intronhaltigen als auch die intronlosen Hybrid mRNAs an den vorgesehenen Histon 3'Enden prozessiert wurden, wurde der Abbau von Nonsense-mutierten Hybrid mRNAs untersucht. Es zeigte sich, daß diese mRNAs auch ohne Poly(A)-Schwanz dem NMD unterliegen, der sowohl spleiß- als auch translationsabhängig ist. In einem zusätzlichen Experiment konnte auch die gute Funktionalität des IRE/IRP-Systems zur Translationsregulation in Abhängigkeit der Eisenkonzentration demonstriert werden.

5.2.1 Die Kopplung der Polyadenylierung und anderer RNA-Prozessierungsreaktionen

Das 3'Ende eukaryonter mRNAs mit seinem ausgedehnten Poly(A)-Schwanz dient nicht nur als Schutz vor exonukleolytischer Degradation durch 3' → 5' Ribonukleasen. Die Faktoren der 3'End-Prozessierung interagieren während der Prozessierungsreaktion mit anderen nukleären Komponenten des mRNA Metabolismus, insbesondere der RNA-Polymerase II und diversen Spleißfaktoren (Minvielle-Sebastia und Keller, 1999). Durch diese Interaktionen erhöht sich die Effizienz der 3'End-Prozessierung, des Spleißens des letzten Introns und der Termination der Transkription. Nachdem der Poly(A)-Schwanz vollständig polymerisiert wurde, stimuliert das PABPII Protein die Translation. Es besteht also ein komplexes Interaktionsnetzwerk zwischen Komponenten des 3'End-Prozessierungsapparates und anderen Komponenten des mRNA-Metabolismus. Der Poly(A)-Schwanz stellt eine Art molekulares Gedächtnis der 3'End-Prozessierung im Nukleus dar, besitzt also eine ganz ähnliche Rolle wie die Exon-Exon-Übergänge beim Spleißen. Während jedoch die Exon-Exon-Verbindungen mit den gebundenen Faktoren eine wichtige Funktion beim NMD übernehmen, scheint der Typ des 3'Endes eines Transkriptes keinen Einfluß auf den NMD zu haben. Dies hat eine große Bedeutung für die Auswahl eines experimentellen Systems zur Analyse des NMD, was in den folgenden Absätzen diskutiert werden soll.

5.2.2 Fazit

Der Typ des 3'Endes von Nonsens-mutierten Transkripten spielt keine erkennbare Rolle bei der Definition von NMD-kompetenten mRNPs in höheren Eukaryonten.

5.2.3 Ausblick

Der NMD in höheren Eukaryonten kann unabhängig vom 3'Ende der Nonsens-mRNA aktiviert werden. Dies hat eine entscheidende Bedeutung für weitere Untersuchungen des NMD. Ein Ziel dieser Untersuchungen wird die Charakterisierung des Ablaufs und der Faktoren des NMD in einem *in vitro* System sein (siehe dazu auch den Ausblick des nächsten Abschnitts der

Diskussion). Man kann nach diesen Untersuchungen davon ausgehen, daß die Transkripte in einem solchen *in vitro* NMD-System nicht polyadenyliert sein müssen. Aus den Daten kann man nicht zwangsläufig schließen, daß die Transkripte beim NMD gar kein organisiertes 3'Ende aufweisen müssen. Man kann dies aber als Ausgangspunkt für weitere Experimente postulieren. Dadurch werden die experimentellen Ansätze wesentlich vereinfacht und die Möglichkeiten der Analyse verbessert. Diese Analyse des Einflusses des Poly(A)-Schwanzes auf den NMD stellt also eine wichtige Voruntersuchung für die spätere Auswahl eines experimentellen Systems für den *in vitro* NMD dar.

5.3 Charakterisierung von Komponenten des Nonsens-vermittelten mRNA-Abbaus

In dieser Arbeit wurde ein experimentelles System vorgestellt, mit dem man Proteine spezifisch an mRNAs rekrutieren kann. Damit können auf eine einfache Weise neue Faktoren des mRNA Metabolismus identifiziert oder bekannte Faktoren charakterisiert werden. Beide Möglichkeiten wurden erfolgreich in dieser Arbeit demonstriert, womit die Funktionsfähigkeit des Systems ausreichend belegt wurde.

Ein wesentlicher Nachteil des häufig verwendeten MS2-Hüllenproteins als RNA-Bindungsdomäne ist seine Größe (130 Aminosäuren). Es ist zu erwarten, daß kleine Proteine, die an eine so große RNA-Bindungsdomäne fusioniert werden, ihre natürliche Funktion einbüßen. Daher ist das MS2-Hüllenprotein nur für große Fusionspartner wirklich gut geeignet, bei kleinen Faktoren oder sogar einzelnen Proteindomänen ist seine Funktion fraglich. Hierfür ist das hier präsentierte System jedoch prädestiniert. Es basiert auf der Interaktion eines kurzen Oligopeptids (22mer) des N-Proteins vom Bakteriophagen λ (λ N-Peptid) mit seiner Bindungssequenz boxB. Dieses System besitzt den Vorteil eines kleinen Fusionspartners mit einer sehr hohen Affinität zu seiner Erkennungssequenz. Daher können auch kleine Proteine oder auch nur einzelne Domänen an RNAs zu Funktionsanalysen rekrutiert werden. Es ist also auch sehr gut geeignet für Studien mit Deletionsmutanten von Proteinen.

Die Funktion des Systems wurde mit dem Protein hUpf3b überprüft, das bereits in einem ähnlichen System mit dem MS2-Hüllenprotein erfolgreich eingesetzt wurde. Wie erwartet, verminderte sich die Expression einer Test-mRNA mit fünf boxB Bindungsstellen deutlich, wenn gleichzeitig ein λ N-hUpf3b Fusionsprotein exprimiert wurde. Darüber hinaus wies diese Expressionsminderung alle Charakteristika des NMD auf, die in diesem System getestet wurden.

Nachdem sich diese einführenden Experimente erfolgreich präsentierten, wurde das Protein hUpf3b eingehend charakterisiert. Deletionsmutanten verschiedener Regionen von hUpf3b wurden auf ihre Fähigkeit überprüft, NMD zu vermitteln. Dabei stellte sich heraus, daß im wesentlichen zwei Regionen für die NMD-Funktion von hUpf3b essentiell sind. Ein Bereich im C-terminalen Teil von hUpf3b (Aminosäuren 421-434) ist nur einige Aminosäuren lang und reagiert äußerst sensibel auf Deletionen oder Mutationen einzelner Aminosäuren. Ein zweiter Bereich befindet sich in der hochkonservierten Region des Proteins, offenbart seine Funktion jedoch erst bei sehr großen Deletionen und erscheint auch weniger wichtig als die C-terminale Sequenz. Die nähere Untersuchung der Deletionsmutante Δ 421-434 ergab, daß in dieser Region die Interaktion mit dem Protein Y14 lokalisiert ist. Die Interaktion mit dem NMD-Faktor hUpf2 wird durch diese Deletion jedoch nicht beeinträchtigt. Dies legte den Schluß nahe, daß Y14 eine wichtige Rolle beim Abbau von Nonsense-mutierten mRNAs spielt.

Diese Vermutung wurde überprüft, indem die Wirkung eines λ N-Y14 Fusionsproteins auf die Test-mRNA analysiert wurde. Es zeigte sich, daß λ N-Y14 einen noch viel stärkeren Abbau der Test-mRNA induzieren kann als hUpf3b. Auch dieser Abbau wies die Charakteristika des NMD auf, so daß Y14 als *bona fide* Mediator des NMD identifiziert werden konnte. Die Identifizierung von Y14 als starken NMD-Vermittler demonstriert außerdem die Überlegenheit des λ N/boxB-Systems gegenüber dem MS2-basierten System, denn eine funktionelle Untersuchung von Y14 als MS2-Fusionsprotein ergab nur einen sehr geringen Effekt (Lykke-Andersen *et al.*, 2001). Man kann daraus schließen, daß die Funktionalität von Y14 durch die Fusion mit MS2 stark beeinträchtigt wird.

Ebenfalls untersucht wurden zwei andere Komponenten des EJC, RNPS1 und Magoh. Für RNPS1 wurde kein Effekt gefunden, jedoch konnte nicht ausgeschlossen werden, daß dies auf eine unzureichende Expression des

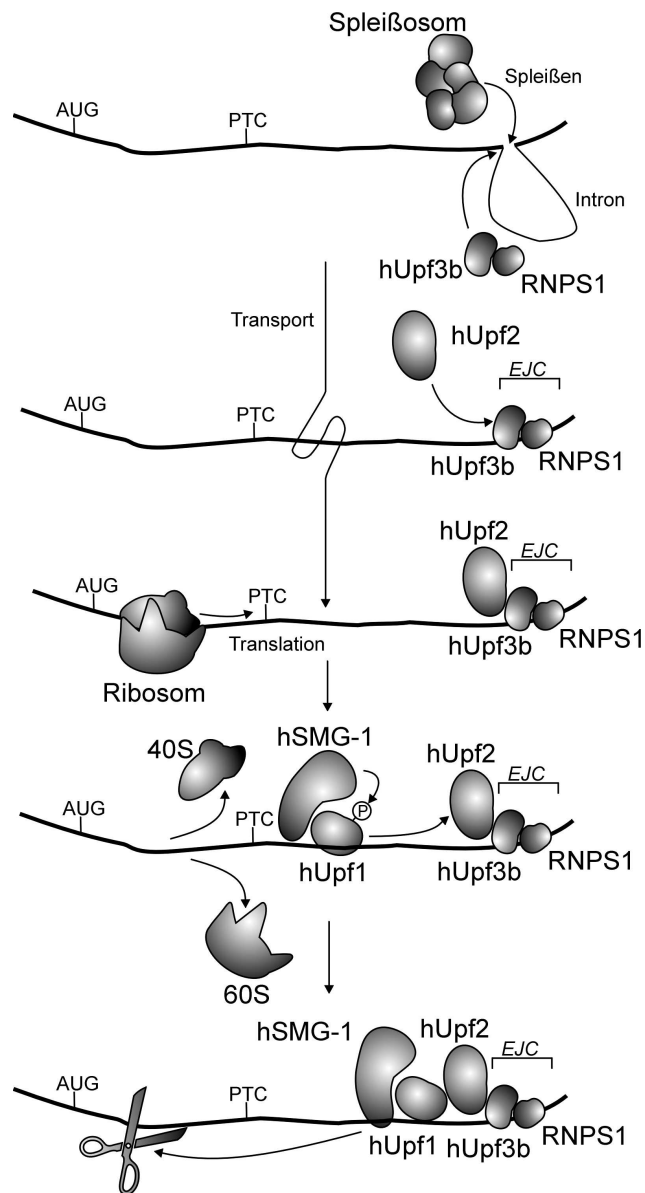


Abbildung 40: Herkömmliches Modell des NMD in höheren Eukaryonten. Gemäß diesem Modell wird durch den Spleißvorgang das Protein RNPS1 in den EJC rekrutiert. Es bindet kurz darauf die NMD-Faktoren hUpf3a und hUpf3b, die damit als erste NMD-Proteine die frühere Spleißstelle markieren. Während des Transportes der mRNA aus dem Zellkern interagiert das hUpf2-Protein mit den beiden hUpf3-Proteinen und stellt die Verbindung zu hUpf1 her, dessen Phosphorylierungszustand von hSMG-1 kontrolliert wird. Die Interaktion von hUpf1 mit dem Marker-Komplex stromab eines Terminationskodons löst den NMD-Mechanismus aus und führt zur schnellen Degradation der mRNA durch bisher unbekannte mRNA-abbauende Faktoren.

Fusionsproteins zurückzuführen ist. Magoh zeigte eine vergleichbare Expressionsminderung wie hUpf3b, jedoch wies diese nicht die Charakteristika des NMD auf, so daß offenbar ein anderer Mechanismus für diese beobachteten Effekte verantwortlich ist.

Zusätzlich wurden (und werden) noch andere Faktoren des mRNA Metabolismus und Komponenten des EJC im λ N-System untersucht, die aber bislang keine spezifischen Ergebnisse zeigten.

Es bleibt festzuhalten, daß die Interaktion zwischen dem λ N-Peptid und seiner Erkennungssequenz boxB seine entscheidenden Vorteile – die geringe Größe des RNA-bindenden Peptides und die hohe Affinität – hier außerordentlich gut demonstrieren konnte. Es erscheint darüber hinaus unzweifelhaft, daß die schnelle funktionelle Charakterisierung von Faktoren durch dieses System erheblich vereinfacht und verbessert wurde.

5.3.1 Charakterisierung von hUpf3b-Domänen im NMD

Im gegenwärtigen Modell des NMD wurden die bislang bekannten NMD-Faktoren hUpf1-3 und RNPS1 gemäß ihrer Lokalisation innerhalb der Zelle in eine hypothetische Reihenfolge gebracht (**Abb. 40**). Dieses Modell wurde durch etablierte Interaktionen der Faktoren untereinander gestützt. Nach diesem Modell werden hUpf3a und hUpf3b bereits im Zellkern an den EJC rekrutiert und repräsentieren damit wahrscheinlich den ersten NMD-spezifischen Marker der Exon-Exon-Grenze (Lykke-Andersen *et al.*, 2000). Unterstützt wurde dieses Modell durch Experimente, die zeigten, daß RNPS1, ein Protein des EJC, spezifisch mit hUpf3a und 3b interagieren kann, weshalb diese Interaktion als ersten Schritt des NMD postuliert wurde (Lykke-Andersen *et al.*, 2001). Die Funktion dieser Interaktion für den NMD wurde dadurch gezeigt, daß RNPS1 zu einem NMD-vermittelten Abbau von mRNAs führt, wenn es experimentell als Marker an die 3'UTR der mRNA rekrutiert wird (Lykke-Andersen *et al.*, 2001). Weiterhin bindet nach diesem Modell während des Exports aus dem Nukleus hUpf2 an die hUpf3-Proteine des EJC. Damit stellt es die Verbindung zu hUpf1 her, da es sowohl mit hUpf1 als auch mit hUpf3a/3b interagieren kann. Die Rolle von hUpf1 beim Vorgang des NMD ist bislang nur rudimentär verstanden. Man

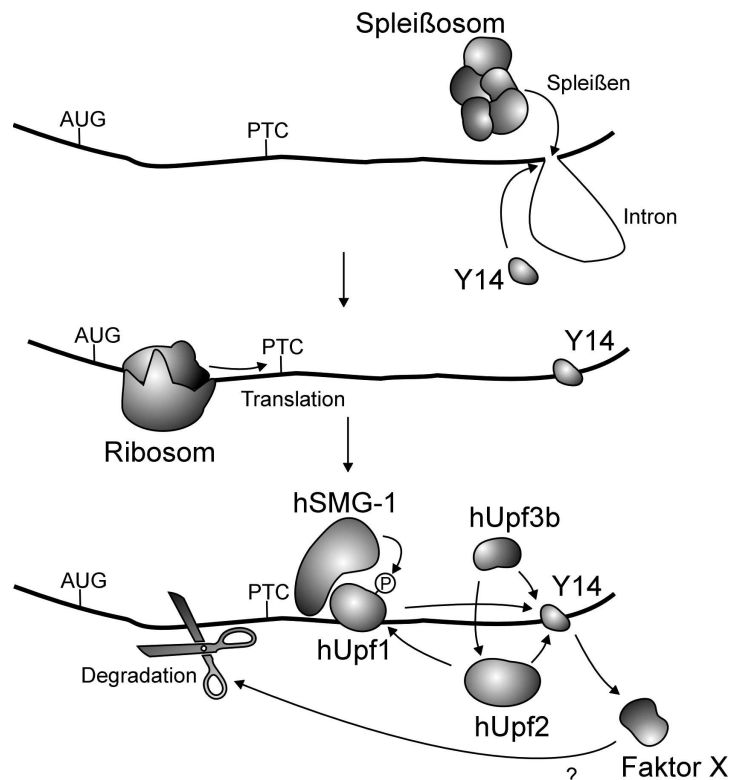


Abbildung 41: Modifiziertes Modell des humanen NMD. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten legen nahe, daß Y14 eine wichtige beim NMD im Menschen spielt. Man kann postulieren, daß Y14 durch den Vorgang des Spleißens an die mRNA gebunden wird und hier auch noch verbleibt, wenn die mRNA ins Zytoplasma transportiert wird. Im Zytoplasma hat Y14 die wichtige Aufgabe, den Exon-Exon-Übergang für Faktoren des NMD zu markieren, die mit Y14 und den anderen NMD-Proteinen interagieren können. Unbekannte Faktoren (Faktor X) könnten auch direkt von Y14 aktiviert werden, um die Degradation der mRNA auszuführen. Die Rolle der hUpf-Protein Interaktionen bleibt unsicher.

vermutet, daß hUpf1 während des Terminationsvorganges zum Ribosom rekrutiert wird. Nachdem das Ribosom die mRNA verlassen hat, soll hUpf1 die Region 3' des Terminationskodons überprüfen. Findet es dabei einen EJC, dann induziert hUpf1 den Abbau der jeweiligen mRNA. Es wird angenommen, daß hUpf1 ein Teil jenes Überwachungskomplexes ist, der in seiner Gesamtheit für die Überprüfung der mRNA nach der Translation verantwortlich ist. Bisher sind aber keine weiteren Komponenten des Überwachungskomplexes gefunden worden. Allerdings scheint es noch einen weiteren Faktor des humanen NMD zu geben, der erst kürzlich identifiziert wurde und der eine Aufgabe innerhalb des

Überwachungskomplexes haben könnte. Ein Homolog eines NMD-Faktors aus *C. elegans* wurde als Interaktionspartner der hUpf-Proteine entdeckt und als hSMG-1 bezeichnet (Denning *et al.*, 2001; Yamashita *et al.*, 2001). Es handelt sich um eine PIK (phosphatidyl-inositol-3-kinase) verwandte Kinase, die den Phosphorylierungszustand von hUpf1 zu regulieren scheint und dadurch die NMD-Effizienz steuern kann. So konnte gezeigt werden, daß Inhibitoren dieser Kinase zu einem verringerten Abbau von Nonsense-mutierten mRNAs führen. Andererseits führte die Überexpression von hSMG-1 zu einem verstärkten NMD-Phänotyp. Die genauen Wirkmechanismen von hSMG-1 sind aber noch nicht verstanden.

In dieser hier vorgestellten Arbeit konnte nun gezeigt werden, daß das einfache lineare Modell den Ablauf des NMD nicht korrekt wiedergeben kann. In diesem experimentellen System aktiviert das Protein hUpf3b den NMD offenbar nicht über hUpf2, sondern rekrutiert mit Y14 einen anderen essentiellen NMD-Faktor an die mRNA. Die Schlußfolgerungen, die sich aus dieser Beobachtung ergeben, sollen im nächsten Abschnitt diskutiert werden.

5.3.2 Identifizierung von Y14 als bona fide NMD-Mediator

Durch die Untersuchung einer NMD-inkompetenten Deletionsmutante von hUpf3b konnte Y14 als neuer Mediator des NMD identifiziert werden. Dies bedeutet, daß die Funktion des EJC im bisherigen Modell des NMD falsch beurteilt wurde. Bislang wurde der EJC nur als Bindungsplattform für die NMD-Faktoren hUpf3a und hUpf3b und die dadurch vermittelte hUpf2 Interaktion gesehen. Nach den hier gezeigten Daten spielt aber Y14 eine viel wichtigere Rolle als nur die eines Bindungsfaktors. Es ist essentiell für den NMD, der von hUpf3b ausgelöst wird, d. h. nur wenn hUpf3b Y14 binden kann, kann es auch NMD induzieren. Dies könnte bedeuten, daß Y14 den ersten NMD-spezifische Faktor an der Exon-Exon-Grenze darstellt. Zusätzlich löst λ N-Y14 den stärksten NMD-Effekt aller getesteten Faktoren in allen Systemen aus (Lykke-Andersen *et al.*, 2000; Lykke-Andersen *et al.*, 2001). Dies spricht dafür, daß Y14 eines der zentralen Proteine des NMD ist (**Abb. 41**). Unterstützt wird diese Hypothese durch Daten, die zeigen, daß Y14 das einzige aller Proteine innerhalb des EJC ist,

das auch im Zytoplasma stabil mit der RNA assoziiert bleibt, was eine wichtige Signalfunktion für Y14 im Zytoplasma impliziert (Kataoka *et al.*, 2000; Kim und Dreyfuss, 2001; Kim *et al.*, 2001b; Le Hir *et al.*, 2001). Die Rolle der hUpf-Proteine beim NMD bleibt weiter unklar. Es ist wahrscheinlich, daß die postulierte hUpf3a/hUpf3b → hUpf2 Signalweiterleitung nicht benutzt wird, um NMD zu vermitteln. Statt dessen könnte man sich eine Funktion bei der Regulation des NMD vorstellen, um die Effizienz des NMD den Anforderungen anzupassen. Dies würde auch eine Erklärungsmöglichkeit bieten, warum manche Nonsense-mutierten mRNAs nicht abgebaut werden, obwohl das PTC an einer für den NMD erkennbaren Position liegt (Frischmeyer und Dietz, 1999; S. Bahri, K. Beckmann, unveröffentlichte Daten).

5.3.3 Fazit

Die Charakterisierung des Proteins hUpf3b führte zur Identifizierung von Y14 als essentiellen Bestandteil des NMD-Prozesses.

5.3.4 Ausblick

Für eine Reihe von Faktoren sind Funktionen beim mRNA-Abbau postuliert worden. Die experimentellen Ansätze, mit denen diese Funktionen getestet werden können, sind jedoch oftmals sehr schwer auswertbar und darüber hinaus zeitaufwendig. Durch das λ N/boxB Rekrutierung-System, das hier vorgestellt wurde, können funktionelle Analysen wesentlich vereinfacht und beschleunigt werden. Zusätzlich kann man davon ausgehen, daß sich die Vorteile einer kleinen RNA-Bindungsdomäne in Zukunft deutlich zeigen werden. Die Mehrzahl der Faktoren des mRNA-Metabolismus sind unter 60 kDa groß und könnten durch die größere MS2-Bindedomäne in ihrer Funktion beeinträchtigt werden. Es ist daher wahrscheinlich, daß sich das λ N-System gegenüber dem MS2-System durchsetzen wird.

Bislang sind beim Menschen nur wenige Proteine bekannt, die eine Aufgabe innerhalb des NMD übernehmen. Doch schon jetzt zeigt sich deutlich, daß die Funktion der einzelnen Proteine ohne eine eingehende Charakterisierung nicht aufgeklärt werden kann. An erster Stelle wird bei zukünftigen Versuchen also

sicher die funktionelle Charakterisierung der bekannten NMD-Faktoren stehen. Dabei bieten sich auch immer wieder Möglichkeiten, neue Faktoren zu identifizieren.

Eine Arbeit, die sich in relativ kurzer Zeit realisieren lassen wird, ist, eine vergleichbare Charakterisierung – wie sie für hUpf3b durchgeführt wurde – auch bei hUpf3a vorzunehmen. Es ist sehr wahrscheinlich, daß in hUpf3a die Y14 Bindung von der homologen Sequenz zu den Aminosäuren 421-434 von hUpf3b vermittelt wird. Sollten Unterschiede auftreten, lassen sich diese durch „domain-swapping“ Experimente zwischen den beiden hUpf3-Proteinen gezielt analysieren.

Es bietet sich ebenfalls an, das hier als Komponente des NMD identifizierte Y14 durch Deletionsmutationen zu analysieren. Dies ist eine besonders interessante Untersuchung, da Y14 trotz seiner nur sehr geringen Größe (170 Aminosäuren) eine ganze Reihe von Protein-Protein Interaktionen eingehen kann. Es wird sich hoffentlich im Verlauf dieser Untersuchungen herausstellen, auf welche Weise Y14 diese vielen Bindungen vermittelt.

Ein umfassenderes Projekt stellt die Etablierung eines NMD-Systems *in vitro* dar. Dies bedeutet, die Eigenschaften des NMD in einem zellfreien System nachzustellen, also der spezifische Abbau von Nonsense-mutierten mRNAs in Abhängigkeit vom Spleißen und der Translation. Ein besonders wichtiger Aspekt ist dabei die sequentielle Durchführung von *in vitro* Spleißreaktion und *in vitro* Translationsreaktion, ohne eine zwischenzeitliche Aufreinigung der Transkripte, da sonst sicherlich die spleißabhängigen Marker des NMD entfernt würden. Ein etwas einfacheres *in vitro* System ließe sich kreieren, indem der Vorgang des Spleißens durch die artifizielle Rekrutierung von Faktoren über das λ N/boxB System ersetzt wird. Ein solches ein-Schritt *in vitro* System wäre ein sehr guter Ausgangspunkt, um das komplexe zwei-Schritt System zu etablieren. Die Schaffung eines Systems zur Untersuchung des NMD in einem zellfreien System wird für die Charakterisierung der notwendigen Vorgänge des NMD essentiell sein, denn kein anderes System läßt sich in einem ähnlichen Umfang experimentell manipulieren. Die weiteren Stärken des *in vitro* NMD werden in der einfachen Handhabung und guten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse liegen,

beides wesentliche Voraussetzungen, um größere Studien durchführen zu können. Am Ende einer genauen Analyse des NMD wird hoffentlich die Möglichkeit stehen, gezielt die Vorgänge des mRNA-Metabolismus zu steuern und auf Nonsense-Mutationen basierende Erbkrankheiten phänotypisch mildern zu können. Der NMD scheint eine wichtige Rolle bei der Regulation sowohl von natürlich vorkommenden Transkripten als auch von Nonsense-mutierten mRNAs zu spielen. Daher wird die Identifizierung und Charakterisierung natürlicher NMD-Substrate ein wichtiges Projekt für die Zukunft darstellen. Man kann vermuten, daß die natürlichen NMD-Substrate insgesamt einer starken Expressionsbeschränkung unterliegen. Besonders wichtig ist es also herauszufinden, auf welche Weise diese Expressionssuppression physiologisch aufgehoben werden kann, denn nur dann ist eine gezielte Expressionsregulation möglich.

Nicht immer läßt sich die phänotypische Ausprägung einer hereditären Erkrankung gut mit dem Genotyp korrelieren. Wenn es sich in so einem Fall um eine Erbkrankheit handelt, die durch eine Nonsense-Mutation ausgelöst wird, könnte dies an Unterschieden bei der individuellen NMD-Kompetenz liegen. Nicht notwendigerweise muß jeder Mensch einen gleich starken NMD von PTC-haltigen mRNAs vermitteln, so daß man unter Umständen „gute“ und „schlechte“ NMD-Vermittler identifizieren kann. Eine „gute“ bzw. „schlechte“ NMD-Kompetenz kann ganz verschiedene Auswirkungen für die Betroffenen haben. So würden „gute“ NMD-Vermittler NS-mutierte mRNA mit hoher Effizienz abbauen und wären somit vor potentiellen dominant-negativen Auswirkungen C-terminal verkürzter Polypeptide geschützt. Andererseits könnten „schlechte“ NMD-Vermittler einen Vorteil haben, wenn die von ihnen gebildeten verkürzten Proteine noch eine physiologische Aktivität aufweisen (Dietz und Hamosh, 1996; Howard *et al.*, 1996). In diesem Falle würden die „guten“ NMD-Vermittler die Entstehung funktionsfähiger Proteine unterdrücken und würden auch eine entsprechend schwerere Erkrankung ausprägen. In diesem Zusammenhang sind kürzlich veröffentlichte Untersuchungen interessant, die zeigen, daß aus einer prä-mRNA durch Aktivierung einer kryptischen Spleißstelle zwei unterschiedliche reife Transkripte entstehen können, die zwar beide durch eine Verschiebung des Leserahmens NS-Mutationen aufweisen, aber dennoch unterschiedlich stark durch

den NMD abgebaut werden (Danckwardt *et al.*, 2002). Es scheint also Mechanismen zu geben, die den Abbau von Nonsense-mRNAs durch den NMD beeinflussen können. Dies würde auch Auswirkungen für klinische Anwendungen haben, denn vielleicht kann man in der Zukunft die individuelle NMD-Kompetenz von Patienten durch pharmazeutische Manipulationen in die jeweils „bessere“ Richtung verändern.