

1 Einleitung

1.1 Die Bedeutung des humanen Genoms

Fast alle Informationen, die zur fehlerfreien Entwicklung und (Gesund-) Erhaltung des menschlichen Organismus benötigt werden, liegen in unserem Erbgut verschlüsselt vor. Daher war die Veröffentlichung einer vorläufigen Sequenz des humanen Genoms im Jahre 2001 ein wichtiger Meilenstein auf dem Weg für ein umfassenderes Verständnis der molekularen Vorgänge in unserem Körper (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001; Venter *et al.*, 2001). Durch die eingehende Untersuchung des Humangenoms kann man zukünftig weitreichende Erkenntnisse auf vielen Gebieten der Wissenschaft erwarten. Vergleiche mit bereits vollendeten (*Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana*) oder vorläufigen Genomsequenzen (*Mus musculus*) höherer Eukaryonten werden helfen, die Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen ihnen und dem Menschen zu erkennen und zu verstehen. Die ersten positiven Auswirkungen der Genomsequenzierung haben sich bereits im Bereich der molekularen Medizin und Humangenetik gezeigt. Nicht weniger als 30 krankheitsassoziierte Gene wurden mit Hilfe der vorläufigen Sequenzen ermittelt (siehe International Human Genome Sequencing Consortium, 2001, Referenzen 389-422). Diese große Zahl an identifizierten Genen ist einfach zu erklären. Eines der wichtigsten Anwendungsgebiete der Humangenetik ist die Identifikation von „Krankheits“-Genen, deren Genprodukt unbekannt ist, deren Funktion aber durch das Auftreten von erblichen Krankheitssymptomen abgeleitet werden kann. Mit Hilfe der Kopplungsanalyse wird das gesuchte Gen einer chromosomalen Region zugeordnet, die üblicherweise mehrere Kandidatengene enthält. Erst durch das Vorliegen der Genomdaten konnten die Sequenzen aller Gene in einer solchen Region leicht ermittelt und somit die Anzahl der zu untersuchenden Kandidaten stark eingegrenzt werden.

Es kommt häufiger vor, daß die Identifikation einer Mutation nur der erste Schritt auf dem Weg zum Verständnis einer hereditären Erkrankung ist (Maquat, 2001; Mendell und Dietz, 2001). Im einfachsten Fall befindet sich eine krankmachende

Mutation im kodierenden Bereich des betroffenen Gens und verändert eine oder mehrere Aminosäuren („Missense“-Mutationen, Deletionen, Insertionen, „Frameshift“-Mutationen). Dann lassen sich oftmals die veränderten Bereiche mit essentiellen Funktionen des Proteins korrelieren, z.B. den enzymatisch aktiven Regionen oder Bindungsstellen für wichtige Interaktionspartner. Manchmal sind die Auswirkungen der Mutationen weniger offensichtlich, etwa bei der Veränderung von essentiellen Phosphorylierungsstellen oder Lokalisations-signalen. Speziell bei Mutationen innerhalb des offenen Leserahmens („open reading frame“ – ORF) kann es vorkommen, daß die Auswirkungen der Mutationen offensichtlich erscheinen, am Ende jedoch gänzlich andere Mechanismen für die pathophysiologischen Konsequenzen entscheidend sind. Ein wichtiges Beispiel hierfür sind Nonsense-Mutationen (NS-Mutationen), die zum vorzeitigen Abbruch der Proteintranslation führen. Es lag nahe, die phänotypischen Auswirkungen solcher Mutationen mit nicht funktionellen oder dominant-negativen, weil C-terminal verkürzten Proteinen zu erklären. In Wirklichkeit weisen die meisten NS-mutierten mRNAs im Vergleich zur korrespondierenden nicht-mutierten mRNA eine signifikant verringerte Stabilität auf, so daß praktisch kein Translationsprodukt entsteht. Dieser Vorgang des Nonsense-vermittelten mRNA-Abbaus („nonsense-mediated mRNA decay“ – NMD) bewirkt, daß im menschlichen Organismus kaum C-terminal verkürzte Proteine entstehen (Frischmeyer und Dietz, 1999; Hentze und Kulozik, 1999; Maquat, 1995). Als Folge des Verlusts der Genexpression eines NS-mutierten Allels kann eine Haploinsuffizienz auftreten, die für die Erkrankung verantwortlich sein kann. Alternativ gibt es eine weit größere Zahl von Beispielen, bei denen die Folgen dominant-negativer Proteinfragmente vermieden werden, wodurch ein Schutz Heterozygoter vor schweren hereditären Erkrankungen realisiert wird (Kugler *et al.*, 1995).

Wesentlich komplexere Auswirkungen auf die Genexpression können auftreten, wenn die krankmachenden Mutationen nicht im kodierenden Bereich des Gens lokalisiert sind. Eine Ausnahme bilden Mutationen in Promotor-Bereichen oder anderen transkriptional regulativen Sequenzen. Diese sind zwar schwer zu identifizieren, jedoch sind ihre Wirkungen meist entweder einfach aktivierend

oder hemmend. Andererseits kann es vorkommen, daß Mutationen in den untranslatierten Regionen (UTRs) oder den Introns von Genen unvorhersehbare Folgen für die Expression des betroffenen Gens haben. Es werden immer mehr regulative Sequenzen in mRNAs identifiziert, so daß es nicht verwundert, wenn durch Mutationen immer wieder solche Sequenzen in ihrer Wirkungsweise beeinträchtigt werden.

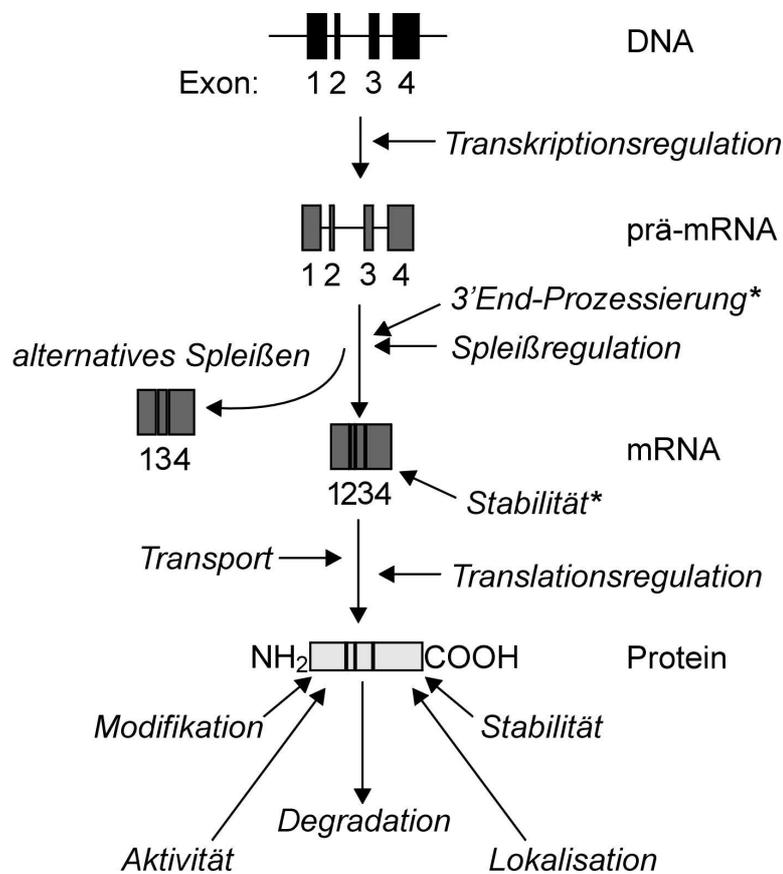


Abbildung 1: Die Kontrolle der Genexpression erfolgt auf verschiedenen Ebenen. Posttranskriptionale Mechanismen greifen regulierend auf mRNAs und Proteine ein. So haben die Regulation der 3'End Prozessierung, des Spleißens, des Transports, der Stabilität sowie der Translation einen Einfluß auf die Expression auf mRNA-Ebene. Auf Protein-Ebene bestimmen posttranslationale Modifikationen über die Aktivität, die Degradation und Stabilität sowie die Lokalisation des Proteins. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Mechanismen der 3'End-Prozessierung und der mRNA-Stabilität sind im Schema gekennzeichnet (*).

1.2 Kontrolle der Genexpression

Das zentrale Dogma der Molekularbiologie besagt: „DNA macht RNA macht Protein“. Diese komprimierte Zusammenfassung beschreibt den Informationsfluß vom genetischen Bauplan (DNA) zu den Effektor-Molekülen (RNA und Protein), die letztlich für die funktionelle Umsetzung der genetischen Informationen zuständig sind. Jeder Schritt der Genexpression ist sehr komplex und unterliegt einer subtilen Regulation (**Abb. 1**). Dies ist sinnvoll, da auf diese Weise bei Ausfall eines Regulationsmechanismus nicht die gesamte Kontrolle der Genexpression zusammenbricht. Zusätzlich bestehen auch Möglichkeiten der genaueren Regulation sowie einer schnelleren Ausführung der gewünschten Veränderungen der Expression. Dies kann man an einem einfachen Beispiel erkennen. Ein üblicher Regulationsmechanismus ist die Veränderung der Transkriptionsrate. Wird weniger mRNA eines Gens hergestellt, entsteht auch weniger Protein – und umgekehrt. Der Nachteil dieser Regulation ist jedoch ihre langsame Umsetzung, denn es vergeht eine gewisse Zeit, bis sich die gewünschte Menge Transkripte eingestellt hat. Daher haben sich viele posttranskriptionelle Regulationsmechanismen entwickelt, die der Zelle eine schnelle Anpassung an veränderte Bedingungen ermöglichen. So existieren allein auf posttranslatonaler Ebene vielfältige, hier im Detail nicht beschriebene, Möglichkeiten der funktionellen Modifikation von Proteinen.

Im zentralen Dogma stellt die RNA lediglich einen Zwischenschritt bei der Übertragung der Informationen von der DNA zum Protein dar. Daher wurde die RNA auch lange Zeit nur als DNA-Abschrift ohne funktionelle Bedeutung betrachtet. Dabei wurde übersehen, daß die RNAs vielen posttranskriptionellen Veränderungen unterzogen werden, die sie zu Molekülen mit diversen strukturellen und funktionellen Eigenschaften machen. Vielleicht am eindrucksvollsten ist es, daß eine Vielzahl unterschiedlicher reifer mRNAs durch alternatives Spleißen einer einzigen prä-mRNA-Spezies entstehen können. Dieser Prozeß ermöglicht es, aus nur einer geringen Zahl von etwa 30.000-40.000 protein-kodierenden Genen innerhalb des humanen Genoms das komplexe menschliche Proteom herzustellen (Graveley, 2001; International Human Genome

Sequencing Consortium, 2001). Zudem bietet die Regulation des alternativen Spleißens die Möglichkeit, die Entstehung unterschiedlicher Proteine eines Gens zu beeinflussen. Im Extremfall können diese sogar antagonistische Wirkungen haben (Forch *et al.*, 2000). Auch der Vorgang der 3'End-Prozessierung eukaryontischer mRNAs kann das alternative Spleißen beeinflussen. In einem einzigartigen Zusammenspiel mit dem Spleißapparat steuert die 3'End-Prozessierungsmaschine die Umschaltung von membrangebundenen auf sekretorische Antikörper der IgM-Klasse (Colgan und Manley, 1997). Anfangs wurde postuliert, daß es sich bei diesem Vorgang um alternatives Spleißen handelt, jedoch konnte schließlich gezeigt werden, daß die Wahl der 3'End-Prozessierungsstelle bei der Regulation dieses alternativen Spleißvorgangs die entscheidende Rolle spielt.

Die Genexpression wird jedoch nicht nur durch solche beträchtlichen Sequenzveränderungen reguliert, sondern vor allem durch eine große Zahl regulativer Sequenzen innerhalb der mRNA. Auf die Mechanismen möchte ich im folgenden etwas genauer eingehen.

1.2.1 Das Konzept eines regulierten Transkripts

Eine eukaryontische mRNA kann grundsätzlich in drei unterschiedliche Abschnitte unterteilt werden: die 5'untranslatierte Region (5'UTR), den kodierenden Bereich, auch offener Leserahmen (ORF) genannt, und die 3'untranslatierte Region (3'UTR). Beide UTRs einer mRNA werden mit funktionellen Modifikationen ausgestattet. Die 5'UTR weist an ihrem 5'Ende eine sogenannte „Kappe“ (cap) auf, dabei handelt es sich um ein 7-Methyl-GTP, das über eine ungewöhnliche 5'-5' Phosphat-Bindung mit der mRNA verbunden ist. Am Ende der 3'UTR wird ein Polyadenylat-Schwanz (Poly(A)-Schwanz) aus bis zu 200 AMP-Resten angefügt. Beide Modifikationen sind essentiell für die Funktion der mRNA, denn gemeinsam wirken sie auf die Prozesse des Transports, der Translation und der Degradation der mRNA ein. So wichtig diese Modifikationen am 5' und 3'Ende sind, so wenig weisen sie Spielraum für Variationen auf. Die Kappe ist stets ein 7-Methyl-GTP und der Poly(A)-Schwanz besteht immer aus AMP-Resten. Interessanterweise läßt sich aber die Effizienz

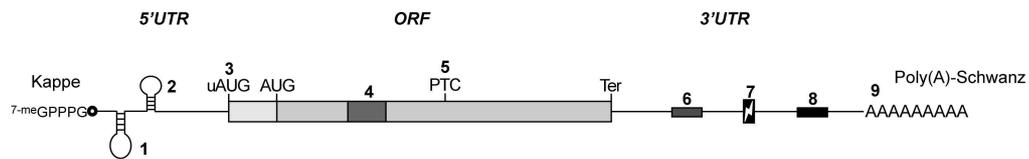


Abbildung 2: Darstellung einiger Möglichkeiten zur Regulation der Genexpression auf mRNA-Ebene. Der allgemeine Aufbau einer eukaryontischen mRNA aus 5'UTR, 3'UTR und offenen Leserahmen (ORF) ist angedeutet, die 5'UTR besitzt an ihrem Anfang eine Kappe, die 3'UTR weist an ihrem Ende einen Poly(A)-Schwanz auf. Die im Text eingehend besprochenen regulativen Elemente einer mRNA sind (1) IRE; (2) IRES; (3) upstream AUG (uAUG); (4) c-fos Instabilitätselement; (5) vorzeitiges Terminationskodon (PTC); (6) AU-reiche Elemente (ARE); (7) endonukleolytische Spaltungsstelle der Transferrin-Rezeptor mRNA; (8) α -Globin Stabilitätselement; (9) Effizienzelemente der 3'End-Prozessierung.

der 3'End-Prozessierung, wie der Vorgang der Modifikation mit einem Poly(A)-Schwanz bezeichnet wird, regulieren, ein Mechanismus, den ich in dieser Arbeit beschreiben werde. Die Synthese der Kappe kann ebenfalls mit unterschiedlicher Effizienz erfolgen, jedoch ist hierfür noch keine physiologische Funktion nachgewiesen worden (D. Bentley, unveröffentlichte Daten).

Man kann über die gesamte Länge einer mRNA verteilt regulative Sequenzen finden, die für die Effizienz der Translation, die Stabilität des Transkriptes oder die zelluläre Lokalisation verantwortlich sind (**Abb. 2**). Die Regulation dieser Vorgänge bietet die Möglichkeit, die Genexpression wesentlich zu verändern, deshalb soll im folgenden auf einige wichtige Beispiele eingegangen werden.

Einen speziellen Fall der Translationsregulation kann man bei der Ferritin-mRNA (und einigen wenigen mRNAs des zellulären Eisenhaushalts) beobachten. Sie enthält in der 5'UTR eine Sekundärstruktur, die als „iron responsive element“ (IRE) bezeichnet wird. An das IRE kann das „iron regulatory protein“ (IRP) binden und die Translation spezifisch unterdrücken (Hentze und Kuhn, 1996). Diese Bindung findet jedoch ausschließlich dann statt, wenn die Eisenkonzentration in der Zelle niedrig ist. Bei hohen Eisenkonzentrationen findet keine Bindung statt und die Translation der Ferritin-mRNA kann erfolgen. Auf diese Weise wird immer gerade so viel Ferritin-Protein hergestellt, wie für die Speicherung von Eisen innerhalb der Zelle benötigt wird – ein exzellentes

Beispiel für den ökonomischen Umgang mit den zellulären Ressourcen auf molekularer Ebene. In dieser Arbeit wird dieses System auch verwendet, um spezifisch die Translation einer heterologen mRNA zu regulieren.

Eine weitere Gruppe von Sequenzen findet man recht häufig in 5'UTRs von mRNAs, die sogenannten internen Ribosomen Eintrittsstellen (internal ribosome entry site – IRES). Diese Sequenzen erlauben eine Initiation der Translation unabhängig von der Kappe, die hierfür normalerweise essentiell ist. Die physiologischen Bedeutungen einzelner IRES-Sequenzen sind sehr unterschiedlich, so daß bisher ein einheitliches Modell fehlt. Nachgewiesen ist, daß sie stets einen Einfluß auf die Effizienz der Translation ausüben.

Einen weiteren Ansatzpunkt für eine Translationsregulation bieten kurze ORFs, die vor dem eigentlichen ORF liegen. Diese stromauf lokalisierten ORF werden an sogenannten uAUGs (upstream AUGs) initiiert und sind meist nur sehr kurz. Im Falle des Thrombopoietins regulieren sieben solcher uORFs die Translation der mRNA (Cazzola und Skoda, 2000; Ghilardi *et al.*, 1998). Die Wirkung der uAUGs ist relativ einfach. Durch die Initiation an diesen Positionen verliert das Ribosom teilweise seine Fähigkeit, erneut die Translation zu initiieren. Die Translationseffizienz des eigentlichen ORF wird also erheblich vermindert (Cazzola und Skoda, 2000; Ghilardi *et al.*, 1998). So kann mit einem sehr einfachen Mittel die Menge eines Proteins erheblich eingeschränkt werden.

Viele mRNAs besitzen Sequenzelemente, die eine spezifische Veränderung der Stabilität bewirken und diese Eigenschaft im Experiment auf heterologe Transkripte übertragen können. Einen besonders interessanten Fall der Destabilisierung von mRNAs stellt der bereits vorgestellte Vorgang des Nonsense-vermittelten mRNA-Abbaus dar. Es handelt sich dabei um einen molekularen Überwachungsmechanismus, der zum schnellen Abbau von Transkripten mit vorzeitigen Translations-Terminationskodons („premature translation termination codons“ – PTCs) führt. Untersuchungen zu Charakteristika und Faktoren des NMD werden in dieser Arbeit detailliert beschrieben, daher möchte ich auf dieses Phänomen an dieser Stelle noch nicht näher eingehen. Dieser Mechanismus wird jedoch auch bei einigen natürlichen (d. h. nicht-mutierten) Transkripten verwendet, um ihre Stabilität in Abhängigkeit des eigenen Genprodukts zu regulieren

(Mitrovich und Anderson, 2000; Sureau *et al.*, 2001). Dies wird in einem sehr bemerkenswerten Falle so erreicht, daß ein Spleißereignis hinter dem physiologischen Terminationskodon durch das Translationsprodukt (in diesem Falle das Spleißprotein SC-35) induziert wird. Dadurch wird die mRNA destabilisiert und es entsteht weniger Protein. Es kommt zu einer Autoregulation der Genexpression durch das eigene Genprodukt (Sureau *et al.*, 2001).

Die *c-fos* mRNA bietet gleich zwei anschauliche Beispiele für regulative Sequenzen, die zur Destabilisierung des Transkriptes führen (Grosset *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 1997). Die eine Sequenz befindet sich innerhalb des ORF und die andere in der 3'UTR. Während die ORF-Sequenz bislang nur wenig charakterisiert ist, handelt es sich bei der Sequenz in der 3'UTR um eines der weit verbreiteten AU-reichen Elemente („AU-rich element“ – ARE). Insbesondere mRNAs von Cytokinen weisen häufig AREs in der 3'UTR auf, die zu sehr kurzen Halbwertszeiten dieser mRNAs führen, höchstwahrscheinlich, um die Menge an Cytokinen möglichst genau regulieren zu können (Chen und Shyu, 1995).

Ebenfalls in der 3'UTR liegt ein Element der Destabilisierung bei der Transferrin-Rezeptor mRNA. Dort befindet sich eine endonukleolytische Spaltungsstelle, die nur bei hohen Eisenkonzentrationen erkannt, bei niedrigen Eisenkonzentrationen jedoch vom iron regulatory protein (IRP) geschützt wird (Hentze und Kuhn, 1996). Die Bindung erfolgt auf die gleiche Weise wie bei der Translationsregulation durch das IRP (s.o.), so daß ein *trans*-agierender Faktor gleich zwei unterschiedliche Funktionen übernehmen kann.

Dies waren Beispiele für die spezifische Destabilisierung von Transkripten. Es gibt jedoch auch Sequenzen, die eine mRNA erheblich stabilisieren können. Einen solchen Fall findet man bei der α -Globin mRNA. Eine Sequenz in der 3'UTR führt hier zu einer deutlich erhöhten Lebensdauer der mRNA durch die Bindung eines bestimmten Proteinkomplexes. Wird durch Mutationen die Bindung verhindert, sinkt die Lebensdauer der α -Globin mRNA erheblich (Conne *et al.*, 2000). Es sind also sowohl positive als auch negative Regulationen möglich.

Wie bereits oben angedeutet, findet eine Veränderung der Genexpression auch durch veränderte Effizienzen der 3'End-Prozessierung statt. Die Effizienz der

3'End-Prozessierung wurde bislang nur im Rahmen mechanistischer Untersuchungen experimentell verändert, jedoch zeigte sich bei der Analyse einer natürlich vorkommenden Mutation im Gen für den Gerinnungsfaktor II (Prothrombin), daß die 3'End-Prozessierung auch *in vivo* die Stärke der Genexpression beeinflussen kann. Dieser Mechanismus wird noch ausführlich in dieser Arbeit beschrieben.

Einen weiteren interessanten Ansatz für die Regulation von Genen hat man in *D. melanogaster* gefunden. Dort gibt es einige mRNAs, die erst durch die korrekte zelluläre Lokalisation ihre Funktion bei der Steuerung der Entwicklung ausüben können (Johnstone und Lasko, 2001). Es gibt jedoch auch Hinweise, daß manche humane Transkripte in Assoziation mit bestimmten subzellulären Strukturen wesentlich effizienter reguliert werden können (Zambetti *et al.*, 1990).

Allen hier beispielhaft beschriebenen Mechanismen ist gemeinsam, daß sie auf der Ebene der mRNA in die Genexpression eingreifen. Es ist jedoch zu erwarten, daß die Komplexität der Regulation auf mRNA-Ebene weitaus höher ist als heute bekannt und daß durch das zunehmend erweiterte methodische Spektrum der RNA-Analyse eine wesentlich größere Vielfalt aufgeklärt wird. Dazu soll auch diese Arbeit beitragen.

Ich möchte auf zwei unterschiedliche Mechanismen der Expressionsregulation eingehen. Zuerst möchte ich einen Mechanismus vorstellen, der erst vor kurzem entdeckt wurde. Es handelt sich dabei um einen völlig neuartigen Vorgang der Expressionsveränderung, der an der 3'End-Prozessierung der Prothrombin-mRNA eingreift. Da dieser Vorgang im Rahmen dieser Arbeit identifiziert wurde, werden vor allem die grundlegenden Schritte der Identifikation dargestellt werden.

Zum anderen möchte ich zwei Studien zum Ablauf des Nonsense-vermittelten mRNA-Abbaus präsentieren, einem Vorgang, der seit seiner ersten Beschreibung (Chang und Kan, 1979) recht eingehend charakterisiert wurde. Daher beschäftigen sich die Experimente dieser beiden Teile mit wesentlich komplexeren Vorgängen als der erste Teil. Gleichzeitig vermittelt dies einen guten Eindruck, welche komplizierten Untersuchungen noch im Rahmen der Charakterisierung der 3'End-Prozessierungseffizienz unternommen werden könnten. Die Experimente zum NMD befassen sich einerseits mit der Rolle des Poly(A)-Schwanzes beim

Nonsense-vermittelten mRNA-Abbau, andererseits mit Faktoren, die verantwortlich für die Erkennung und Degradation von Nonsense-mutierten mRNAs sind.

In den nun folgenden Abschnitten der Einleitung möchte ich kurz die Grundlagen vorstellen, die zum Verständnis sowohl der medizinischen als auch der biologischen Relevanz der Arbeit benötigt werden. Das Verständnis der Blutgerinnung sowie hereditärer Veränderungen der Blutgerinnung sind grundlegend für die „Untersuchung des molekularen Mechanismus der Prothrombin 20210 G→A Mutation“. Die „Rolle des Poly(A)-Schwanzes beim Nonsense-vermittelten mRNA-Abbau“ und „Charakterisierung von Komponenten des Nonsense-vermittelten mRNA-Abbaus“ werden durch die entsprechenden Vorbemerkungen zum Nonsense-vermittelten mRNA-Abbau eingeführt.

1.3 Die Blutgerinnung

Eine Verletzung des Blutgefäßsystems muß möglichst rasch verschlossen werden, da ansonsten permanenter Blutverlust droht. Dafür sorgt ein mehrstufiger Prozeß, die Hämostase. Zwei nacheinander geschaltete Mechanismen werden dabei aktiviert. Zunächst sammeln sich Thrombozyten an der Stelle der Verletzung und bilden eine Art Stopfen. Anschließend bewirkt die Blutgerinnung (Koagulation) einen festen Verschuß der Wunde durch einen Thrombus. Dieser wird durch eine Reihe proteolytischer Reaktionen gebildet, die sogenannte Blutgerinnungskaskade.

Die vielleicht wichtigste Reaktion der Blutgerinnung ist die enzymatische Umwandlung des löslichen Plasmaproteins Fibrinogen (Faktor I) in Fibrin-Polymer, ein faseriges Netzwerk von unlöslichem Protein (**Abb. 3**). Dies erfolgt als letzter Schritt der Blutgerinnungskaskade durch die proteolytische Spaltung des Fibrinogens in Fibrin. Die Fibrinmoleküle aggregieren daraufhin selbsttätig und bilden einen noch recht instabilen Pfropfen. Kovalente Vernetzungen innerhalb des Fibrin-Polymers führen schließlich zu einem festen, unlöslichen Thrombus. Die Signalweiterleitung des ursprünglichen Gerinnungssignals über eine mehrstufige Reaktionskaskade führt zu einer enormen Amplifikation des Signals, was die bemerkenswerte Effizienz der Blutgerinnung erklärt.

Als zentrales Protein der Gerinnungskaskade katalysiert Thrombin (Faktor IIa) die Spaltung des Fibrinogens und integriert dabei die Signale mehrerer Wege

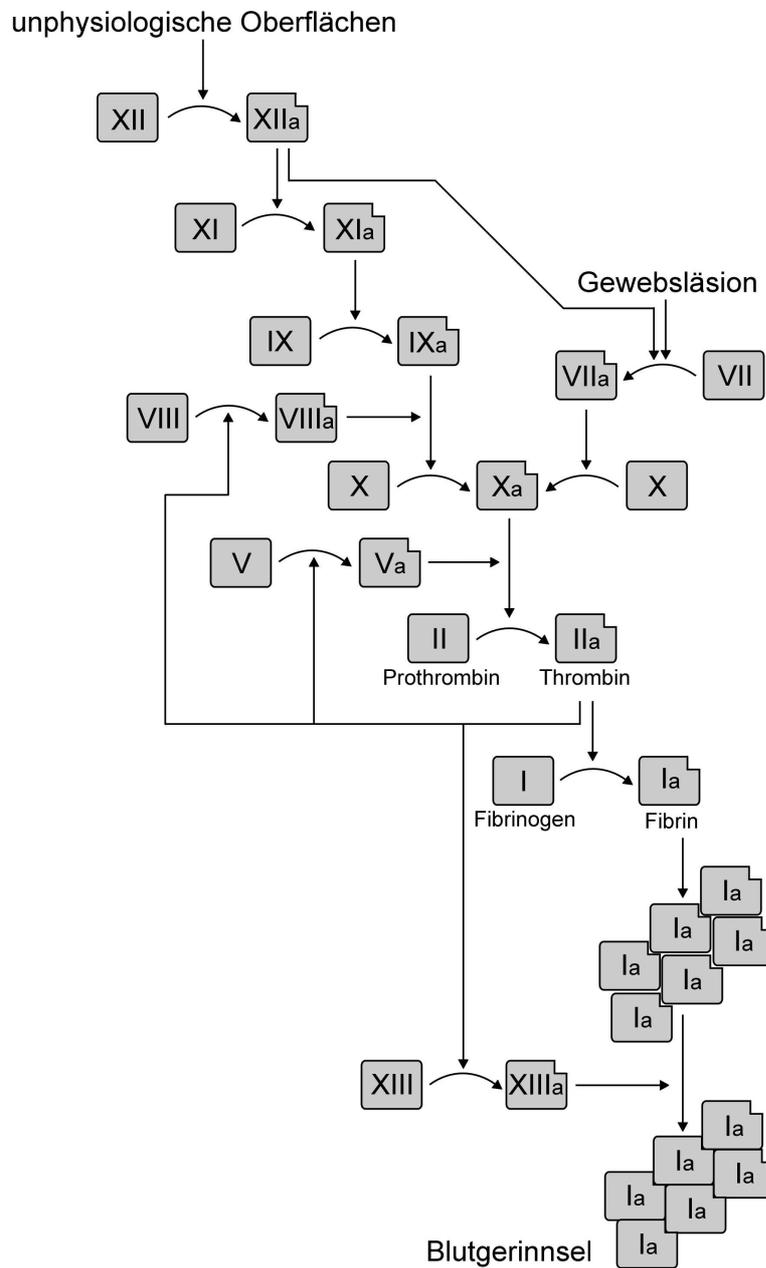


Abbildung 3: Darstellung der Blutgerinnungskaskade. Aktivierte Faktoren (proteolytisch gespalten) werden konventionsgemäß mit einem „a“ gekennzeichnet. Beide Wege der Blutgerinnung (links: intrinsisch; rechts: extrinsisch) werden durch Verletzungen des Blutgefäßsystems aktiviert und unterscheiden sich wesentlich in der Geschwindigkeit der Thrombusbildung (intrinsisch: mehrer Minuten; extrinsisch: wenige Sekunden). Die Faktoren X, II und I gehören beiden Wegen an und stellen die zentralen Faktoren der Blutgerinnung im Menschen dar.

(Abb. 3). Da Thrombin sowohl gerinnungsaktivierende (prokoagulatorische) als auch gerinnungshemmende Wirkungen haben kann, ist es der bedeutendste Regulator des Gleichgewichts der Blutgerinnung (Dang *et al.*, 1995)

1.3.1 Kontrolle der Blutgerinnung

Die Blutgerinnung im menschlichen Organismus befindet sich in einem exakt eingestellten Gleichgewicht zwischen Aktivierung und Hemmung. Dabei halten sich aktivierende Faktoren (prokoagulatorische Faktoren) und hemmende Faktoren (antikoagulatorische Faktoren) die Waage. Eine Störung des Gleichgewichts führt bei Überwiegen der prokoagulatorischen Faktoren zu einer Thromboseneigung und bei Überwiegen der antikoagulatorischen Faktoren zu einer Blutungsneigung. Die Signalverstärkung durch die Blutgerinnungskaskade, die bei der effizienten Aktivierung einen Vorteil darstellt, bedeutet andererseits, daß schon geringe Veränderungen der Aktivität oder Menge eines einzelnen Faktors der Blutgerinnung zu katastrophalen Auswirkungen führen können.

1.3.2 Hereditäre Störungen der Blutgerinnung

Die wohl bekanntesten, aber sehr seltenen Veränderungen der Blutgerinnung stellen die hereditären Gerinnungsstörungen (Koagulopathien) dar. Sie entstehen durch einen angeborenen Mangel oder eine Funktionsstörung von plasmatischen Gerinnungsfaktoren, z. B. Faktor VIII (Haemophilie A) oder Faktor IX (Haemophilie B). Ebenfalls recht seltene hämatologische Erkrankungen stellen auch die schweren Gerinnungsneigungen (Thromboseneigungen, Thrombophilien) dar, die bei einem natürlich vorkommenden Mangel der antikoagulatorischen Faktoren Antithrombin, Protein C und S auftreten (De Stefano *et al.*, 1996; Martinelli, 2001). Wesentlich weiter verbreitet sind jedoch zwei genetische Veränderungen, die auch zu einem signifikant erhöhten Thromboserisiko führen. Eine Mutation der Aminosäure 506 von Gln → Arg im Gen für Gerinnungsfaktor V (genannt Faktor V Leiden) betrifft etwa 5% der europäischen Bevölkerung und bewirkt ein ca. 7fach erhöhtes Thromboserisiko bei heterozygoten Trägern (Koster *et al.*, 1993). Etwa 1-2% der Bevölkerung tragen eine Mutation im Gen für den Gerinnungsfaktor II (Prothrombin, *F2*), die bei heterozygot betroffenen zu einem

um das 2-4fach erhöhte Thromboserisiko führt (Poort *et al.*, 1996). Es handelt sich dabei um eine G→A Transition an der Position 20210 des Prothrombingens (**Abb. 4**). Interessanterweise befindet sich diese Mutation nicht innerhalb des kodierenden Bereiches der mRNA, sondern in der 3'untranslatierten Region (3'UTR). Sie betrifft das letzte Nukleotid des letzten Exons, die Position, an der das primäre Transkript endonukleolytisch gespalten und der Poly(A)-Schwanz angehängt wird. Obwohl diese Mutation bereits 1996 zum ersten Mal mit einem erhöhten Thromboserisiko assoziiert werden konnte, blieb lange Zeit unklar, wodurch das erhöhte Thromboserisiko zustande kommt. Es ist bekannt, daß die Prothrombin 20210 G→A Mutation mit einer erhöhten Prothrombin-Konzentration im Plasma der betroffenen Träger korreliert. Sie beträgt bei Heterozygoten etwa das 1,25-1,3fache der üblichen Konzentration. Dies reicht jedoch offenbar aus, um das empfindliche Gleichgewicht der Blutgerinnung zu stören und die Bildung von Blutgerinnseln zu fördern. Unaufgeklärt blieb aber bislang der zugrunde liegende molekulare Mechanismus der erhöhten Prothrombin-Spiegel.

In dieser Arbeit wurde der molekulare Mechanismus, der zu der erhöhten Prothrombin Konzentration führt, identifiziert und charakterisiert. Es handelt es sich um einen völlig neuartigen Mechanismus, der hier zum ersten Mal als Ursache einer pathologisch relevanten Veränderung der Genexpression beschrieben wird.

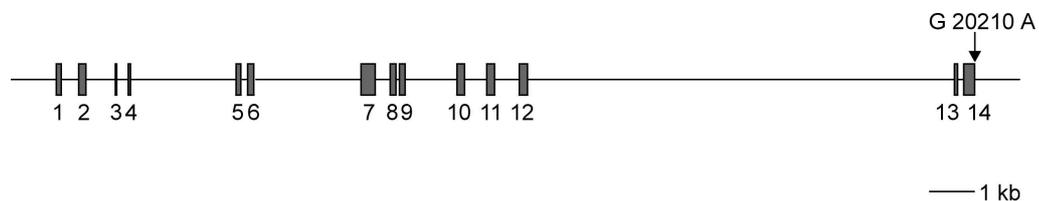


Abbildung 4: Schematische, maßstabsgetreue Darstellung der 14 Exons und 13 Introns des Prothrombin/Faktor II Gens (*F2*). Die Position der Mutation 20210 G→A am Ende von Exon 14 ist eingezeichnet.

1.4 Nonsense-vermittelter mRNA-Abbau

Etwa ein Drittel aller hereditären Erkrankungen werden durch Mutationen verursacht, die ein vorzeitiges Translationsterminationskodon in der kodierenden Region von mRNAs verursachen (Culbertson, 1999; Frischmeyer und Dietz, 1999). Überraschenderweise werden Transkripte mit solchen Nonsense-Kodons nicht in C-terminal verkürzte Proteine translatiert, sondern unterliegen einer schnellen Degradation, dem sogenannten Nonsense-vermittelten mRNA-Abbau. Der physiologische Nutzen eines spezifischen Abbaus von nonsense mRNAs könnte darin liegen, die Zelle vor den potentiell dominant-negativen Wirkungen von C-terminal verkürzten Polypeptiden zu schützen. Die medizinische Relevanz eines solchen Schutzes wird durch NS-Mutationen im β -Globin veranschaulicht, die bei den Betroffenen eine β -Thalassämie auslösen können. Die β -Thalassämie ist die am weitesten verbreitete hereditäre Erkrankung weltweit, wobei die häufigsten Formen aufgrund des Wirkens des NMD rezessiv vererbt werden. Nicht alle natürlich vorkommenden vorzeitigen Stopkodons im β -Globin lösen den NMD aus, so daß es sowohl stabile als auch instabile Nonsense-mRNAs gibt, die sich anhand der Position der Mutation unterscheiden. Da die stabilen mRNAs mit Mutationen an nicht destabilisierenden Positionen völlig normal translatiert werden, kommt es zur Akkumulation von C-terminal verkürzten β -Globin Proteinen. Klinisch manifestieren sich die Unterschiede zwischen den stabilen und den instabilen NS-mutierten β -Globin mRNAs in unterschiedlichen Erbgängen der β -Thalassämien. Patienten mit instabilen mutierten Transkripten zeigen einen rezessiven Erbgang, d. h. Heterozygote haben keine klinischen Symptome, während Homozygote ihr Leben lang transfusionsbedürftig sind. Patienten mit stabilen mutierten Transkripten hingegen unterliegen einem dominanten Erbgang, so daß bereits Heterozygote mittlere bis schwere Thalassämie-Symptome aufweisen können (Hall und Thein, 1994; Thein *et al.*, 1990). Der Abbau der Nonsense-mRNAs schützt Heterozygote demnach anscheinend vor der klinischen Manifestation ihrer Erkrankung. Dies bedeutet folglich, daß die weit überwiegende Zahl der Träger von Nonsense-Mutationen im β -Globin durch den NMD vor einer schweren Erkrankung bewahrt werden. Ähnliche Beobachtungen

existieren auch von anderen Genen (Dietz *et al.*, 1993; Schwabe *et al.*, 2000), aber für eine Korrelation von mRNA Stabilität und klinischer Symptomatik fehlen bisher systematische Daten. Es ist jedoch unzweifelhaft, daß die überwiegende Zahl von Nonsense-Mutationen zu einem Abbau der mutierten mRNAs führt (Frischmeyer und Dietz, 1999; Hentze und Kulozik, 1999; Maquat, 1995).

1.4.1 Modelle des NMD

Das Phänomen des NMD ist phylogenetisch stark konserviert. Auch in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* unterliegen PTC-mutierte mRNA einer deutlich erhöhten Abbaurate. Am PGK-1 Gen wurde gezeigt, daß die Degradation PTC-mutierter mRNA von der Position des PTC innerhalb des kodierenden Bereichs bestimmt wird. Mutationen in den ersten zwei Dritteln des offenen Leserahmens führen zur mRNA Degradation, PTCs im letzten Drittel jedoch nicht (Zhang *et al.*, 1995). Weitere Analysen ergaben, daß ein bestimmtes Sequenzelement für die Destabilisierung PTC-mutierter Transkripte verantwortlich ist, das sogenannte „downstream sequence element“ (DSE). Nonsense-Kodons, die 5' vom DSE liegen, destabilisieren die mRNA. Die Nonsense-Mutationen 3' des DSE führen nicht zur mRNA Degradation (Gonzalez *et al.*, 2000; Ruiz-Echevarria *et al.*, 1996; Ruiz-Echevarria *et al.*, 1998a; Zhang *et al.*, 1995).

Der NMD in der Hefe ist von einigen *trans*-agierenden Faktoren abhängig, die mit Upf1p, Upf2p und Upf3p bezeichnet werden. Mutationen, die eines dieser Proteine funktionell inaktivieren, führen zur unnatürlichen Stabilisierung von Nonsense-mutierten mRNAs (Cui *et al.*, 1996; Cui *et al.*, 1995; He *et al.*, 1993; Leeds *et al.*, 1991; Ruiz-Echevarria *et al.*, 1998b). Der Umsatz von Wildtyp-(WT) Transkripten wird jedoch nicht verändert. Diese NMD-Faktoren der Bäckerhefe wurden teilweise recht eingehend funktionell charakterisiert (Bhattacharya *et al.*, 2000; Czaplinski *et al.*, 1998; Czaplinski *et al.*, 1995; Shirley *et al.*, 1998; Weng *et al.*, 1996a; Weng *et al.*, 1996b; Weng *et al.*, 1998). Die zusätzliche Identifikation weiterer Proteine, die am NMD in der Hefe beteiligt sind (Dcp1p, Xrn1p, Hrp1p) führte zur Entwicklung eines mechanistischen NMD-Modells (**Abb. 5**). Demzufolge bindet das Protein Hrp1p bereits im Zellkern während des

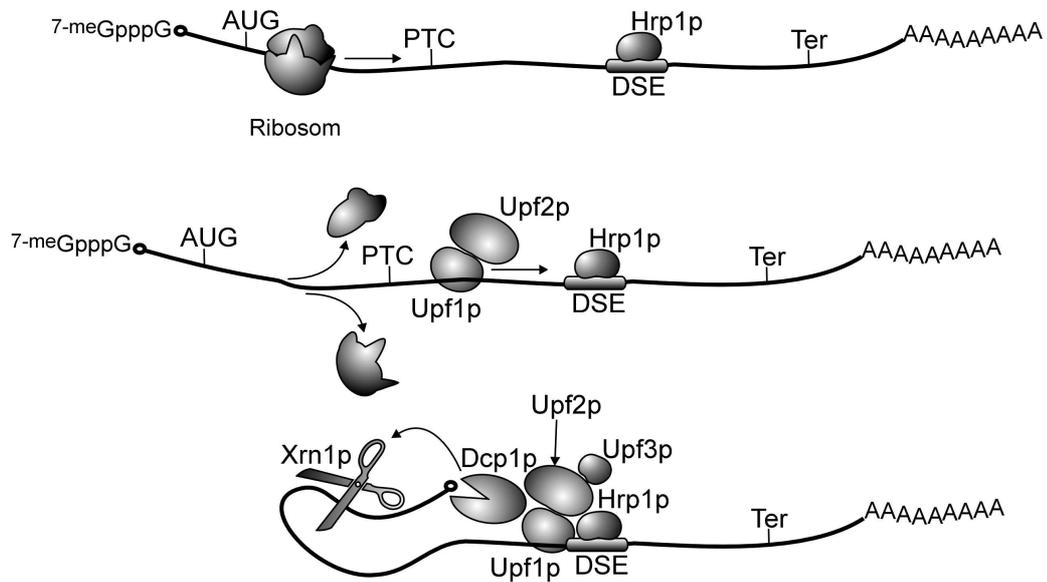


Abbildung 5: Modell des NMD in der Bäckerhefe *S. cerevisiae*. Das translatierende Ribosom terminiert am PTC. Dadurch wird das Upf1p Protein rekrutiert und analysiert zusammen mit Upf2p in einem postulierten Überwachungskomplex die stromab gelegene Region der mRNA. Trifft es dabei auf ein DSE mit daran gebundenem Hrp1p, wird die Kappe von der mRNA durch das „Decapping“-Enzym (Dcp1p) entfernt und die mRNA unter Beteiligung der Exonuklease Xrn1p abgebaut. Die Funktion des essentiellen NMD-Faktors Upf3p ist bisher nicht aufgeklärt. DSE: „Downstream Sequence Element“.

Prozesses der 3'End-Prozessierung an das DSE in Hefe-mRNAs, gelangt mit der RNA ins Zytoplasma und markiert hier die Grenze zwischen vorzeitigen und normalen Terminationskodons (Gonzalez *et al.*, 2000). Das translatierende Ribosom terminiert am Nonsense-Kodon, woraufhin ein Überwachungskomplex („surveillance complex“ – SC) aus den Upf-Proteinen (oder nur Upf1p) die Region 3' des Terminationskodons absucht. Trifft der SC während dieses Scanning-Prozesses auf ein DSE mit dem daran gebundenem Hrp1p, wird ein Enzym (Dcp1p) an die mRNA rekrutiert, das für die Entfernung der mRNA-Kappenstruktur verantwortlich ist. Nach Entfernen der Kappe degradiert die Exonuklease Xrn1p die mRNA in 5' → 3' Richtung (Czaplinski *et al.*, 1999; Ruiz-Echevarria *et al.*, 1996).

Untersuchungen zum NMD höherer Eukaryonten wurden vor allem im Fadenwurm *C. elegans* und bei menschlichen Genen durchgeführt. Dabei zeigte

sich, daß in den Transkripten dieser Organismen keine *cis*-agierenden Sequenzen ähnlich dem Hefe-DSE existieren (Brocke *et al.*, 2002; Maquat und Li, 2001; Neu-Yilik *et al.*, 2001). Statt dessen repräsentiert die am weitesten 3'gelegene Spleißstelle ein funktionelles Äquivalent des Hefe-DSE und wird zur Unterscheidung von vorzeitigen und physiologischen Terminationskodons verwendet (Carter *et al.*, 1996; Thermann *et al.*, 1998; Zhang und Maquat, 1996; Zhang *et al.*, 1998a; Zhang *et al.*, 1998b). Üblicherweise werden in höheren Eukaryonten ausschließlich solche Nonsense-Kodons als vorzeitig erkannt, die mehr als 55 nt vor der letzten (d. h. der am weitesten 3'gelegenen) Spleißstelle lokalisiert sind (Thermann *et al.*, 1998). Nonsense-Mutationen, die in einem zu geringen Abstand (< 55 nt) vor der Spleißstelle liegen oder sich sogar hinter der letzten Spleißstelle befinden, werden nicht als vorzeitig erkannt und die mRNA bleibt trotz einer Mutation stabil.

Ebenso wie der NMD in *S. cerevisiae* ist der NMD beim Menschen translationsabhängig (Belgrader *et al.*, 1993; Carter *et al.*, 1995; Thermann *et al.*, 1998). Entsprechend der konventionellen Vorstellung wäre eine Komponente des NMD, die durch die translatierenden Ribosomen repräsentiert wird, damit notwendigerweise im Zytoplasma lokalisiert. Allerdings gibt es auch Daten, die für eine ribosomale Translation im Zellkern sprechen (Hentze, 2001; Iborra *et al.*, 2001)

Ob mRNAs bereits im Zellkern translatiert werden, könnte eine große Bedeutung für das Modell des humanen NMD haben. Bisher ging man davon aus, daß zwei räumlich getrennte Vorgänge, das nukleäre Spleißen und die zytoplasmatische Translation, während des Vorgangs des NMD gemeinsam zur Erkennung eines PTCs beitragen können. Sollte die Translation bereits im Nukleus stattfinden, wären jedoch beide Vorgänge in nur einem zellulären Kompartiment vereint und die Erkennung der Intron-Position könnte sich wesentlich einfacher gestalten. Das zur Zeit bevorzugte Modell des humanen NMD (das sogenannte „marker-model“) kann aber beide Möglichkeiten erklären, denn es ist in der Lage zu beschreiben, auf welche Weise ein bereits abgeschlossener nukleärer Spleißvorgang die Position der Exon-Exon-Grenze zum Zeitpunkt der zytoplasmatischen Translation markieren kann. Nach diesem Modell werden durch den Spleißvorgang bestimmte

Faktoren an die Exon-Exon Grenze rekrutiert, die als eine Art Marker an dieser Position gebunden bleiben, selbst nachdem das Spleißosom die mRNA bereits verlassen hat (Hentze und Kulozik, 1999; Maquat, 1995). Ein solcher gebundener Faktor wird durch das translatierende Ribosom von der mRNA abgestreift, wenn er innerhalb des ORFs lokalisiert ist. Wenn der ORF durch eine Nonsense-Mutation verkürzt ist, dann befindet sich der Marker in der 3'untranslatierten Region der mRNA und kann im Verlauf der Translation nicht entfernt werden. Ein postulierter Überwachungskomplex sucht die mRNA im Anschluß an die Translationstermination in 3'Richtung nach Marker-Proteinen des Spleißvorgangs ab. Die Interaktion zwischen dem Marker und dem Überwachungskomplex löst schließlich die rasche Degradation der mRNA, den NMD, aus (Culbertson, 1999; Hentze und Kulozik, 1999; Lykke-Andersen, 2001; Schell *et al.*, 2002). Mit Hilfe dieses Modells kann man die Wirkung eines nukleären Spleißvorgangs auf die Translation im Zytoplasma erklären (**Abb. 6**). Durch die Identifikation einiger *trans*-agierender Faktoren des NMD beim Menschen sowie von Komponenten eines spleißvermittelten Komplexes an den Exon-Exon Grenzen wurden einige der postulierten Vorgänge indirekt bestätigt. Da eine Reihe von Faktoren in dieser Arbeit untersucht wurden, werde ich auf deren Eigenschaften im Abschnitt „Die Komponenten des NMD beim Menschen“ detailliert eingehen.

1.4.2 Die Rolle des Poly(A)-Schwanzes beim NMD

Die Verkürzung bzw. der Abbau des Poly(A)-Schwanzes spielt eine zentrale Rolle beim Umsatz der meisten zellulären mRNAs mit korrekten Terminationskodons (Dehlin *et al.*, 2000; Gao *et al.*, 2000; Wilusz *et al.*, 2001a; Wilusz *et al.*, 2001b). Nachdem der Poly(A)-Schwanz durch Deadenylierung bis auf eine bestimmte Länge (~20 AMP-Reste) verkürzt wurde, wird die Kappe der mRNA abgespalten und die mRNA 5'→3' bzw. 3'→5' exonukleolytisch degradiert (Beelman und Parker, 1995). Daten aus der Hefe belegen, daß bei mRNAs mit Nonsense-Mutationen im Unterschied dazu die Kappenstruktur ohne vorherige Deadenylierung entfernt und die mRNAs abgebaut werden (Muhlrad und Parker, 1994). Dies könnte bedeuten, daß die vollständige Erhaltung des Poly(A)-Schwanzes eine wichtige Rolle beim Abbau von Nonsense-mutierten mRNAs

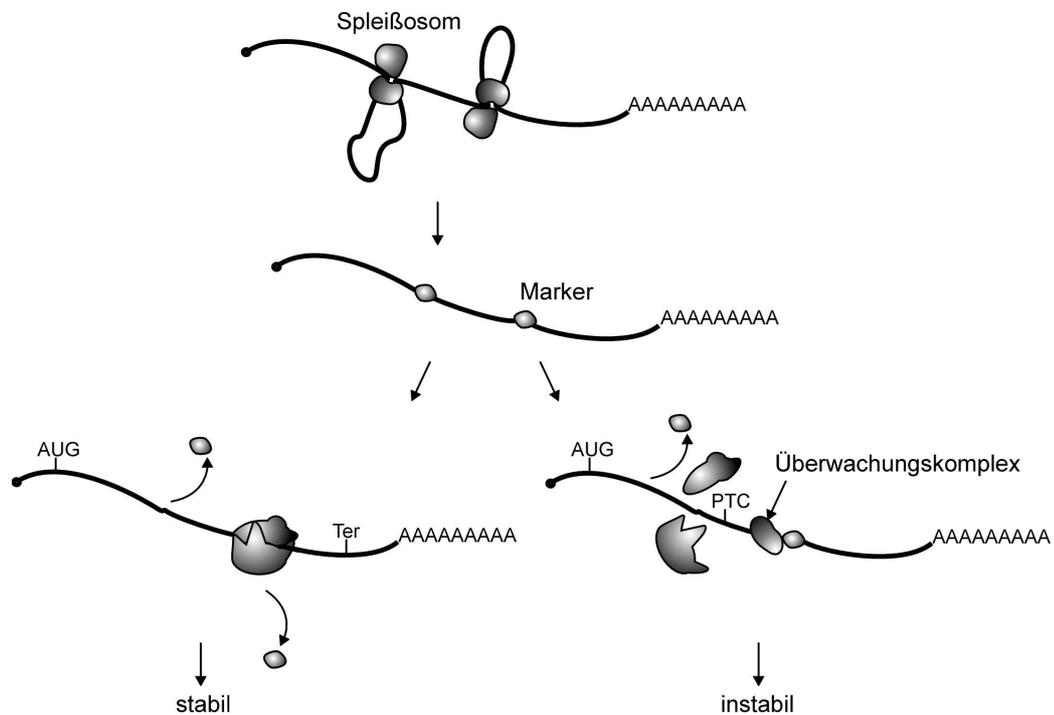


Abbildung 6: Das „Marker“-Modell des humanen NMD. Während des Spleißvorganges im Zellkern werden ein oder mehrere „Marker“-Protein(e) an die Exon-Exon Grenzen rekrutiert. Diese bleiben während des Transportes mit der mRNA assoziiert und gelangen so ins Zytoplasma. Während der ersten Translationsrunde werden alle Marker vor oder innerhalb des ORF durch das translaterende Ribosom entfernt. Die mRNA bleibt stabil, wenn sämtliche Marker abgestreift wurden. Durch Nonsense-Mutationen kann es dazu kommen, daß die Translation bereits vor dem letzten Marker terminiert. Ein sich daraufhin bildender postulierter Überwachungskomplex überprüft die 3' gelegenen Regionen der mRNA. Die Präsenz eines Markers in diesem Abschnitt führt zur Aktivierung des NMD – die mRNA wird rasch degradiert.

spielt. Zusätzlich erhöht der Poly(A)-Schwanz die Effizienz des Spleißens und der Translation (Gray *et al.*, 2000; Preiss und Hentze, 1998; Tarun und Sachs, 1995), beides unverzichtbare zentrale Voraussetzungen des NMD. Ein Poly(A)-Schwanz am 3'Ende einer mRNA kann also ein essentieller Bestandteil NMD-kompetenter mRNAs sein.

Aus diesem Grunde wurde in einem Teil dieser Arbeit die Rolle des Poly(A)-Schwanzes beim humanen NMD untersucht.

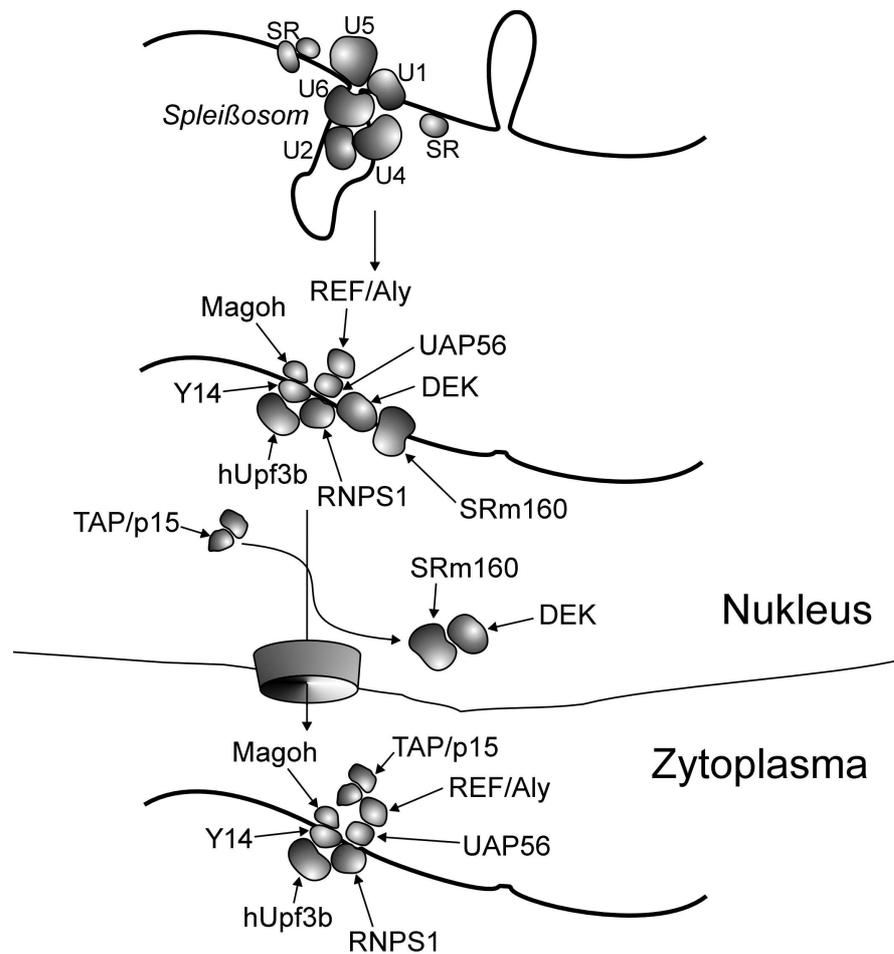


Abbildung 7: Die Zusammensetzung eines mRNP wird durch den Vorgang des Spleißens (katalysiert durch das Spleißosom mit den Untereinheiten U1, U2, U4, U5 und U6 sowie anderen Faktoren, z. B. den SR-Proteinen) verändert. Dadurch binden am neugebildeten Exon-Exon Übergang die Proteine des „exon-exon junction complex“, EJC: Y14, Magoh, REF/Aly, SRm160, UAP56, DEK und RNPS1. Sie dienen als Bindungsplattform für mRNA-Exportfaktoren (TAP/p15) und Faktoren des NMD (hUpf3a/hupf3b). Einige Komponenten des EJC begleiten die mRNA bis ins Zytoplasma (Y14, Magoh, RNPS1), andere verlassen den Komplex noch vor dem Transport durch die Kernpore (SRm160, DEK).

1.4.3 Die Komponenten des NMD beim Menschen

Das „Marker“-Modell des humanen NMD (s. o.) wurde entwickelt, um die gleichzeitige Abhängigkeit des NMD-Prozesses von einem nukleären und einem zytoplasmatischen Vorgang zu erklären. Zum Zeitpunkt der Ausarbeitung des Modells waren jedoch die Faktoren noch nicht identifiziert, die als spleiß-

abhängige Marker der Exon-Exon Grenzen postuliert wurden. Erste Hinweise für eine Veränderung der Zusammensetzung des mRNP („messenger ribonucleoprotein“) durch den Spleißprozeß ergaben sich aus der Beobachtung, daß gespleißte mRNAs wesentlich effizienter aus dem Kern transportiert werden, als ihre nicht-gespleißten, intronlosen Gegenstücke (Luo und Reed, 1999). Daraus wurde gefolgert, daß bestimmte Export-Faktoren durch das Spleißosom zur mRNA gebracht wurden. Nur kurze Zeit später konnte tatsächlich gezeigt werden, daß eine Reihe von Faktoren während des Spleißens an die mRNA binden und auch noch dort verbleiben, nachdem das Spleißosom seine Arbeit beendet hat (Le Hir *et al.*, 2000b). Unter diesen Faktoren fanden sich die mRNA-Export-Faktoren Aly/REF und UAP56 (Le Hir *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2000), die Spleißfaktoren SRm160 und RNPS1 – UAP56 spielt auch eine Rolle während des Spleißvorgangs – (Le Hir *et al.*, 2000a; Le Hir *et al.*, 2000b), die zwei NMD-Faktoren der hUpf3 Proteinfamilie hUpf3a und hUpf3b (Kim *et al.*, 2001a) sowie Y14, Magoh und DEK mit bislang unbekannter Funktion (Kataoka *et al.*, 2001; Kataoka *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001b; McGarvey *et al.*, 2000). Diese Faktoren zeigen untereinander vielfältige Interaktionen, so daß eine genaue Zuordnung der Funktionen zu einzelnen Proteinen zur Zeit schwierig ist. Diese Proteine, die alle durch den Spleißprozeß an Exon-Exon Übergänge von mRNAs rekrutiert werden, bilden zusammen den sogenannten Exon-Exon-Verbindungs-Komplex (exon-exon junction complex – EJC; **Abb. 7**). Es wird vermutet, daß einige der EJC-Komponenten eine Rolle beim NMD spielen könnten. Als Hinweis für eine Rolle der EJC-Komponenten Y14 und RNPS1 als Marker des NMD wurde ihre Interaktion mit den beiden NMD-Faktoren hUpf3a und hUpf3b gewertet (Kim *et al.*, 2001a; Lykke-Andersen *et al.*, 2001). Mit einem funktionellen Ansatz wurde für beide Proteine getestet, ob sie mRNAs für den NMD rekrutieren können. Dabei stellte sich heraus, daß für RNPS1 diese Funktion nachgewiesen werden konnte, für Y14 hingegen wurde nur ein sehr schwacher Effekt gezeigt (Lykke-Andersen *et al.*, 2001). Bisher konnte also bewiesen werden, daß neben den hUpf-Proteinen beim Menschen nur das Protein RNPS1 eine eindeutige Funktion innerhalb des NMD übernehmen kann.

Von den Homologen der Upf-Proteine aus *S. cerevisiae* wurde das humane hUpf1, auch genannt RENT1 (für regulator of nonsense transcripts), als erstes kloniert (Applequist *et al.*, 1997; Perlick *et al.*, 1996). Untersuchungen mit einer dominant-negativen Variante des hUpf1 bewiesen, daß es ein Faktor des humanen NMD-Apparates ist (Sun *et al.*, 1998). Erst viel später wurden humane Homologe der anderen beiden Upf-Proteine identifiziert, hUpf2 bzw. RENT2, und die eng verwandten Proteine hUpf3a und hUpf3b, auch als hUpf3 und hUpf3X bezeichnet (Lykke-Andersen *et al.*, 2000; Mendell *et al.*, 2000; Serin *et al.*, 2001). Eine Funktion dieser Proteine innerhalb des NMD-Prozesses konnte sowohl für hUpf2 als auch für hUpf3a und hUpf3b gezeigt werden (Lykke-Andersen *et al.*, 2000; Mendell *et al.*, 2000).

In dieser Arbeit wurde das Protein hUpf3b und seine NMD-Funktion eingehend charakterisiert sowie neue Faktoren des NMD beim Menschen identifiziert.