

Aus dem Charité Centrum für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin
Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Hämatologie / Onkologie
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. G. Henze

Habilitationsschrift

Posttranskriptionelle Regulation der Genexpression in der pädiatrischen Hämatologie und Onkologie

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Kinder- und Jugendmedizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Patrick Hundsdörfer
geboren am 02.April 1971 in Bonn

Eingereicht: **März 2010**
Dekanin: **Prof. Dr. med. A. Grüters-Kießlich**
1. Gutachter: **Herr Prof. Dr. W. Holter**
2. Gutachter: **Herr Prof. Dr. A. Borkhardt**

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Abkürzungen	3
2.	Einleitung	4
2.1	Transkriptionelle Regulation der Genexpression	4
2.2	Posttranskriptionelle Regulation der Genexpression	6
3.	Eigene Arbeiten	11
3.1	Thrombophilie im Kindesalter	11
3.2	Kontrolle der Blutgerinnung	15
3.3	Polyadenylierung eukaryotischer prä-mRNA	17
3.4	Translationsinitiation in eukaryotischen mRNAs	23
3.5	Alternative Translationsinitiation durch <i>internal ribosomal entry</i>	23
3.6	Regulation der Expression des zentralen Apoptoseinhibitors XIAP	29
4.	Diskussion	33
5.	Zusammenfassung	38
6.	Literatur	40
7.	Danksagung	45
8.	Erklärung	46

1. ABKÜRZUNGEN

ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
APAF-1	<i>apoptotic peptidase activating factor-1</i>
CPSF	<i>Cleavage/Polyadenylation specificity factor</i>
CstF	<i>Cleavage stimulating factor</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
eIF	<i>Eukaryotic initiation factor</i>
FVL	Faktor V Leiden
IAP	<i>Inhibitor of apoptosis protein</i>
IRE	<i>Iron responsive element</i>
IRES	<i>Internal ribosomal entry site</i>
IRP	<i>Iron regulatory protein</i>
(m)RNA	<i>(messenger) Ribonucleic acid</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
PABP	Poly(A)-bindendes Protein
PAP	Poly(A) Polymerase
PT	Prothrombin
USE	Upstream sequence element
UTR	<i>Untranslated region</i>
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis

2. EINLEITUNG

Die eukaryotische Genexpression erfolgt in mehreren Schritten. Die im Zellkern vorliegende DNA dient als permanenter Speicher der genetischen Information. Der Abschnitt der DNA mit der gewünschten genetischen Information wird zunächst in RNA transkribiert. Diese dient als transiente Zwischenstufe, wird nach nukleärer Prozessierung ins Zytoplasma exportiert und dort in Protein translatiert (Abb.1).

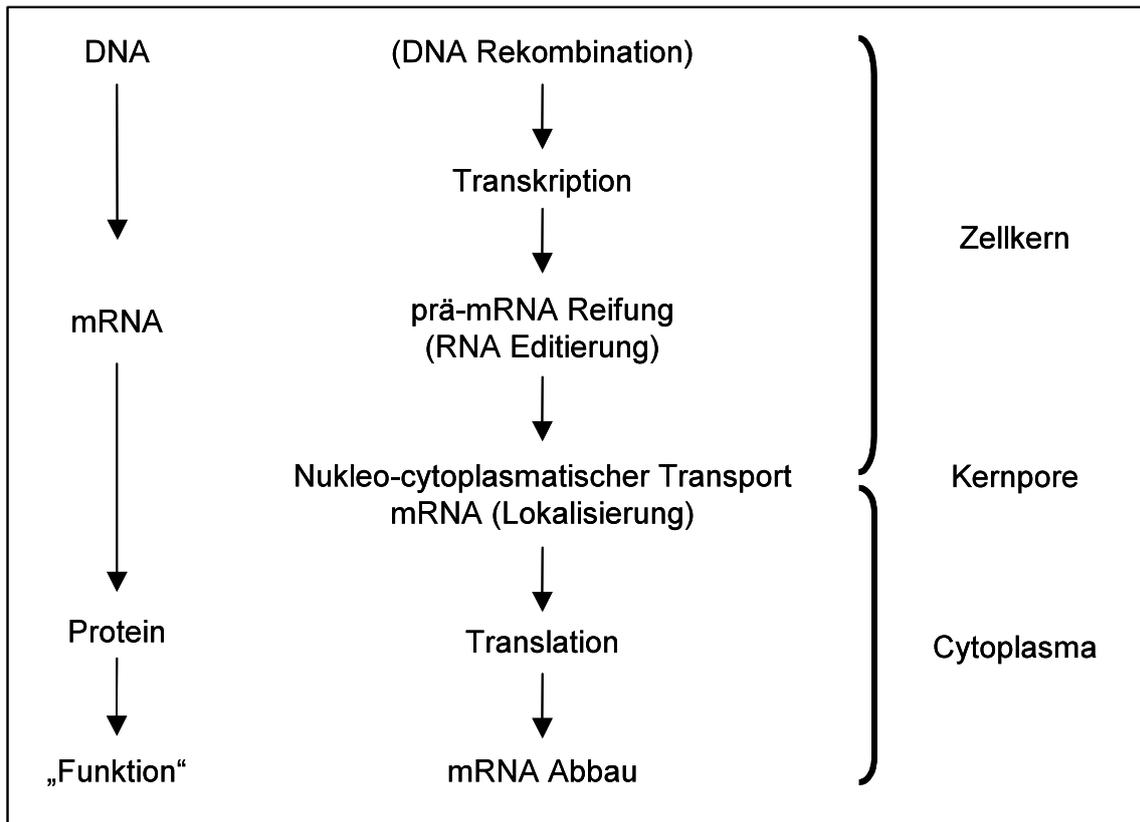


Abb.1: Schematische Darstellung der Genexpression

Die Regulation der Genexpression kann prinzipiell auf allen Ebenen von der Transkription bis zum Abbau der Genprodukte erfolgen.

2.1 Transkriptionelle Regulation der Genexpression

Die Regulation der Transkriptionsinitiation beruht zunächst auf dem Zusammenspiel von in der DNA-Sequenz kodierten Regulatorelementen (Promotor, Enhancer) und Regulatorproteinkomplexen (Transkriptionsfaktoren). Transkriptionsfaktoren können über die Regulatorelemente an zu transkribierende Gene rekrutiert werden und beeinflussen so (positiv oder negativ) die Effizienz der Transkriptionsinitiation (Abb. 2).

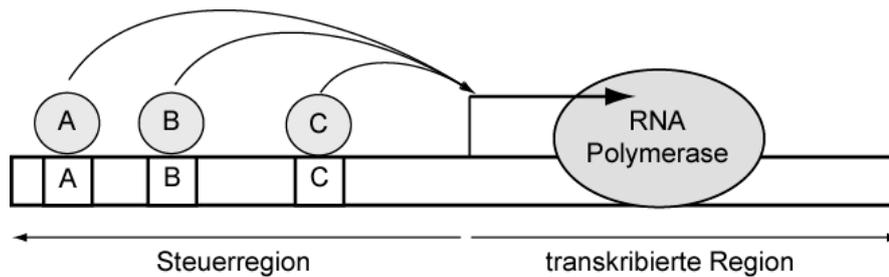


Abb.2: Regulation der Transkriptionsinitiation. Transkriptionsfaktoren (A,B,C) werden an entsprechende Regulatorelemente rekrutiert und beeinflussen die Transkriptionsinitiation [1].

Die Bedeutung einer Dysregulation der Transkription konnte für die Pathogenese und Prognose zahlreicher Erkrankungen der pädiatrischen Onkologie belegt werden.

Die Amplifikation und die daraus folgende Überexpression des MYCN Onkogens wird beim Neuroblastom beschrieben und ist mit einer schlechten Prognose assoziiert [2].

Chromosomale Translokationen können dazu führen, dass starke Promotoren die Transkription von Onkogenen kontrollieren. Eines der bekanntesten Beispiele ist die t(8;14) Translokation beim Burkitt-Lymphom: Hierbei kommt es zu einer Translokation des MYCC Onkogens auf Chromosom 8q24 an das Immunglobulin-Schwerkettengen vom Chromosom 14q32. Das MYCC Onkogen gelangt unter die Kontrolle des Immunglobulin-Schwerketten-Promotors und wird in der Folge überexprimiert [3]. Ähnliche Mechanismen werden auch für andere B-Zell-Lymphome/Leukämien (z.B.: t(2;8): Immunglobulin Kappa-Leichtketten und MYCC oder t(8;22): Immunglobulin Lambda-Leichtketten und MYCC) sowie lymphoblastische T-Zell-Lymphome/Leukämien (z.B.: t(1;14): T-Zellrezeptor $\alpha\delta$ und TAL1 oder t(8;14): T-Zellrezeptor $\alpha\delta$ und MYCC) beschrieben [3].

Ein weiteres Beispiel ist die t(11;22) Translokation bei Tumoren der Ewing-Sarkom Familie. Hier kommt es zur Fusion der C-terminalen Domäne des Transkriptionsfaktors FLI-1 mit der N-terminalen Domäne von EWS, welche ein starkes transkriptionsaktivierendes Potential aufweist. Das Fusionsprotein EWS-FLI1 ist ein starker transkriptioneller Aktivator und führt zur Überexpression zahlreicher Gene, welche Zellproliferation und – überleben unterstützen [4-6].

Eine wichtige Rolle in der Pathogenese maligner Erkrankungen im Kindesalter scheinen auch epigenetische Phänomene zu spielen, im Rahmen derer die Transkriptionsaktivität eines Genortes durch Faktoren beeinflusst wird, die nicht durch die primäre DNA-Sequenz vorgegeben sind. DNA-Methylierung im Bereich von Promotoren führt zur Hemmung der Bindung von Transkriptionsfaktoren und somit zur verminderten Transkription des

entsprechenden Gens. Eine Hypermethylierung und damit Hemmung der Expression des Tumorsuppressorgens RASSF1A wird u.a. für Medulloblastome, supratentorielle primitive neuroektodermale Tumore (sPNET) und atypische teratoide/rhabdoide Tumore (AT/RT) beschrieben. Ein weiterer epigenetischer Mechanismus ist die Histondeacetylierung, durch die es zu einer Chromatinkondensierung kommt und betroffene Genorte unzugänglich für Transkriptionsfaktoren werden. Beim Neuroblastom ist eine Überexpression der Histondeacetylase 8 mit einem fortgeschrittenen Stadium und einer schlechten Prognose assoziiert. Dagegen wird Histondeacetylase 8 im Stadium 4s, in dem es häufig zu einer spontanen Regression der Tumore kommt, nur sehr niedrig exprimiert [7].

2.2 Posttranskriptionelle Regulation der Genexpression

Über die Bedeutung posttranskriptioneller Mechanismen der Genregulation in der pädiatrischen Hämatologie und Onkologie ist weit weniger bekannt.

Nach Transkription der DNA in prä-mRNA im Zellkern wird diese in mehreren Arbeitsschritten verändert, bevor die reife mRNA ins Zytoplasma transportiert wird (Abb.3). Das noch während der Transkription erfolgende *capping* des 5'-Endes der prä-mRNA führt zu einer erhöhten Stabilität der mRNA, einer erhöhten Effizienz der weiteren mRNA-Prozessierung und des mRNA-Transports und ist für die Translationsinitiation von entscheidender Bedeutung.

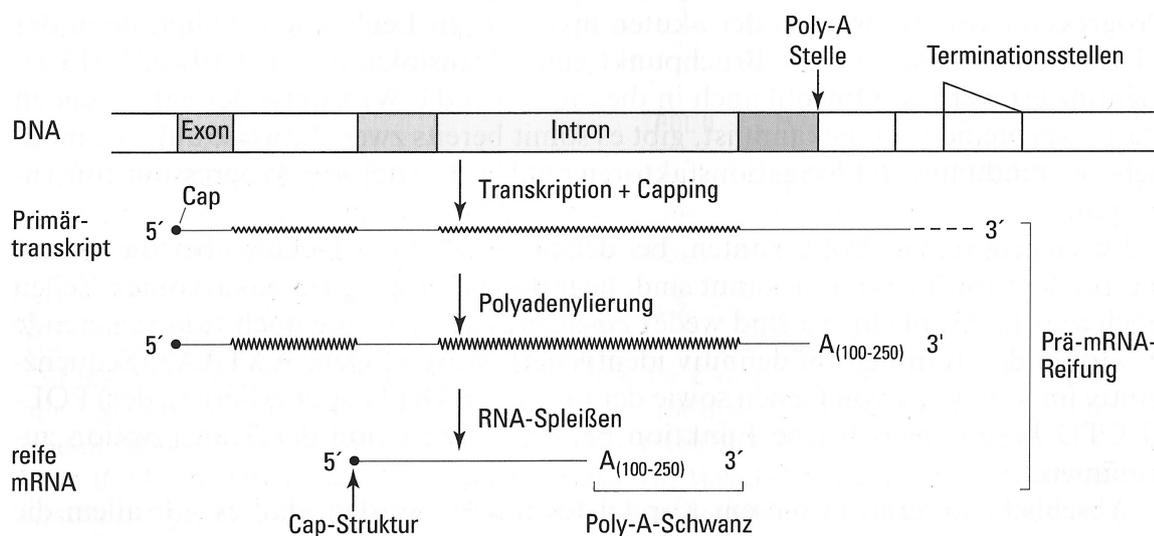


Abb.3: Ablauf der prä-mRNA Prozessierung [1]

In der Folge werden beinahe alle zellulären prä-mRNAs, mit Ausnahme einiger Histonekodierenden und den mitochondrialen mRNAs, an ihrem 3'-Ende gespalten und polyadenyliert. Wie das *capping* führt die Polyadenylierung ebenfalls zu einem verbesserten

nucleo-cytoplasmatischen Transport der mRNA, zur Stabilisierung der mRNA und stimuliert insbesondere die Translationsinitiation an der reifen mRNA.

Bei einer Variante der α -Thalassämie erfolgt aufgrund einer Mutation des Polyadenylierungssignals keine Polyadenylierung der mRNA. Durch die reduzierte mRNA-Stabilität und verminderte Effizienz der Translationsinitiation kommt es somit zu einer fast vollständig fehlenden Expression des α -Globins [8].

Ein weiterer Arbeitsschritt beinhaltet das Entfernen der nicht für die Proteinsequenz kodierenden Introns (Spleißen). Die Introns müssen mit höchster Präzision herausgeschnitten werden, da es sonst zur Verschiebung des Leserasters und in der Folge zur Translation von trunkierten und/oder funktionslosen Proteinen kommt. Mehr als 15% aller pathologischen (also eine Erkrankung verursachenden) Punktmutationen führen zu Spleißdefekten [9]. Bei einigen Formen der β -Thalassämie führen Mutationen innerhalb von Introns der β -Globin prä-mRNA zur pathologischen Aktivierung von Spleißsignalen, so dass das Intron nicht korrekt herausgeschnitten wird. Häufig entstehen dadurch in der reifen mRNA prä-mature Stop-Codons, so dass ein trunkiertes β -Globin exprimiert wird [10].

Beim alternativen Spleißen wird eine prä-mRNA mit mehreren Introns und Exons so geschnitten, dass mehrere unterschiedliche reife mRNAs entstehen (Abb.4). Die verschiedenen mRNAs können sich in der Länge der Protein-kodierenden Sequenz unterscheiden und so zur Expression unterschiedlich trunkierter Proteine führen. Alternativ gespleißte mRNAs können in denselben Zellen vorkommen, jedoch finden sich auch häufig gewebespezifische oder differenzierungsabhängige Spleißmuster.

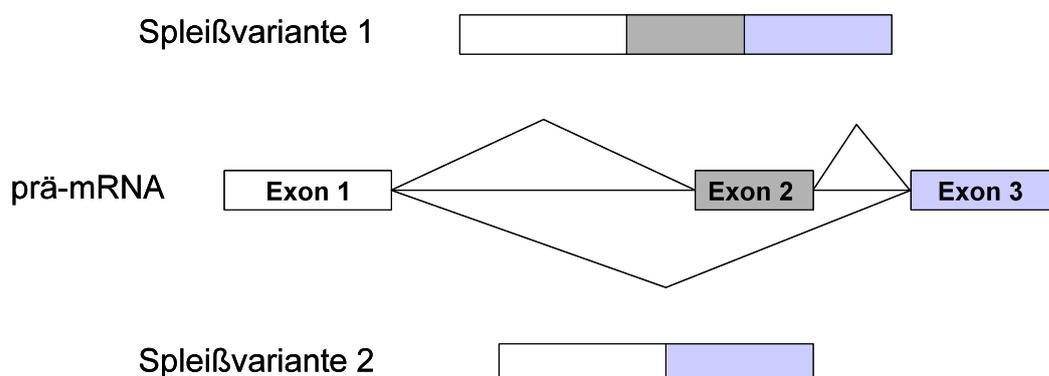


Abb.4: Schematische Darstellung des alternativen Spleißens

Ein Beispiel sind die Spleißvarianten des bcl-x Gens: Die längere bcl-x_l mRNA kodiert für ein Protein mit antiapoptotischer Wirkung, während die kürzere Spleißvariante zur Expres-

sion des pro-apoptischen Proteins bcl-xs führt. Die bcl-xl mRNA findet man vor allem in langlebigen Zellen (z.B. ZNS), während die bcl-xs mRNA vorwiegend in Zellen mit hoher Proliferationsrate (z.B. lymphatisches System) exprimiert wird [11, 12].

Der cytoplasmatische Abbau von mRNAs durch Ribonukleasen ist ein entscheidender Mechanismus der posttranskriptionellen Genregulation. Nur durch den Abbau von mRNAs ist es möglich, Genexpression durch verminderte mRNA-Neusynthese zu senken. Ferner stellt die Degradation von mutierten mRNAs einen wichtigen zellulären Schutzmechanismus dar. Hierbei werden durch Mutationen verursachte prämaturne Stopcodons erkannt und die so veränderten mRNAs abgebaut, bevor es zur Expression von C-terminal verkürzten Proteinen kommt. Ein typisches Beispiel hierfür ist die β -Thalassämie, bei der Mutationen des β -Globingens zur Expression von β -Globin mRNAs mit prämaturnen Stopcodons führen können. Durch den Abbau dieser pathologisch veränderten mRNAs (*nonsense-mediated decay*) wird die Expression eines toxischen, C-terminal verkürzten β -Globins verhindert. Bei Thalassämie-Patienten mit Mutationen des β -Globingens, welche dem *nonsense-mediated decay* entgehen, führt dagegen schon der heterozygote Genotyp für diese Mutationen zur Akkumulierung des toxischen Proteins und nachfolgender schwerer Hämolyse [10].

Ein weiteres Beispiel ist die Kontrolle des Eisenstoffwechsels durch Regulation der Stabilität der Transferrinrezeptor-mRNA. In der 3'-untranslatierten Region (UTR) der Transferrinrezeptor mRNA finden sich *iron responsive elements* (IRE), welche bei niedrigen intrazellulären Eisenkonzentrationen *iron regulatory protein* (IRP) binden (Abb.5). Durch diese IRE/IRP Interaktion wird die mRNA Degradation blockiert, so dass es zu einer erhöhten Translation der mRNA kommt. Durch die vermehrte Expression des Transferrinrezeptors kann nun die Eisenaufnahme gesteigert werden.

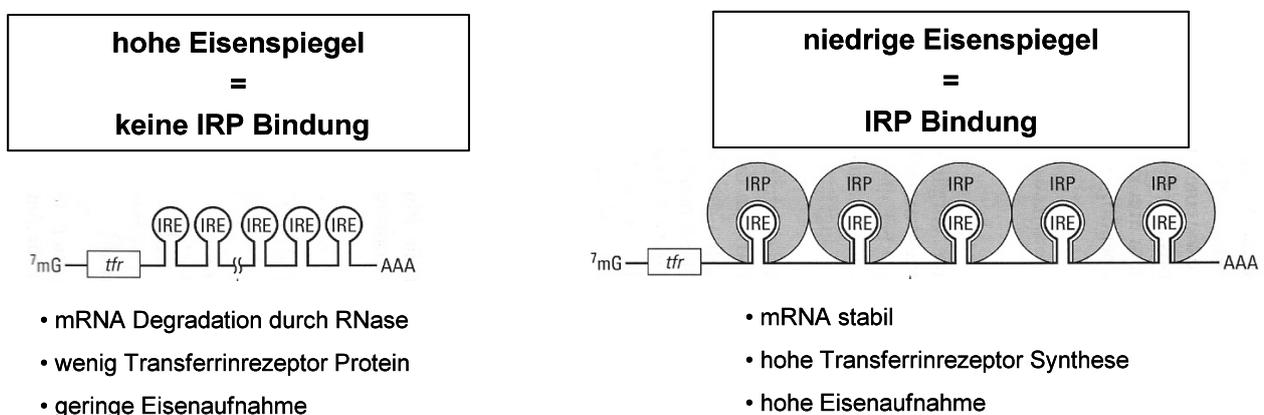


Abb.5 Regulation der Transferrinrezeptor (*tfr*) mRNA-Stabilität [1]

Zusätzlich wird der Eisenstoffwechsel jedoch auch durch einen translationalen Regulationsmechanismus kontrolliert. Bei niedrigen intrazellulären Eisenspiegeln bindet IRP an ein in der 5'-UTR der Ferritin mRNA lokalisiertes IRE und blockiert so die Translationsinitiation an der Ferritin mRNA. Auf diese Weise wird in eisendefizienten Zellen die Synthese des Eisenspeicherproteins Ferritin inhibiert (Abb. 6).

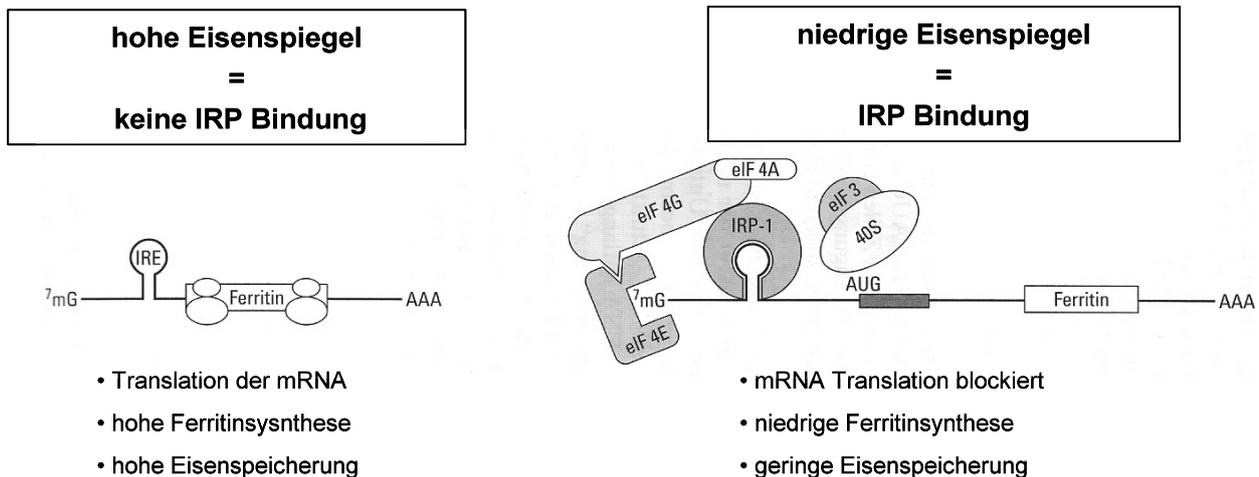


Abb.6 Kontrolle der Ferritin-mRNA Translation [1]

Aktivierung der Proteinsynthese ist ein häufiges Merkmal maligner Zellen. Insbesondere die Überexpression oder (mTOR-vermittelte) Aktivierung des essentiellen Translationsinitiationsfaktors eIF4E, einem wesentlichen Bestandteil des Translationsinitiationskomplexes eIF4F, wird für zahlreiche maligne Erkrankungen beschrieben [13]. Die Formierung von eIF4F ist der limitierende Schritt der Translationsinitiation und überwiegend von der Verfügbarkeit von eIF4E abhängig. Die Verfügbarkeit von eIF4E wird durch eIF4E-binding protein (eIF4E-BP) kontrolliert, da eIF4E nach Bindung an eIF4E-BP nicht zur Formierung von eIF4F beitragen kann. mTOR-vermittelte Phosphorylierung von eIF4E-BP führt zur Dissoziation von eIF4E-BP und eIF4E, so dass vermehrt freies eIF4E für die Translationsinitiation zur Verfügung steht (Abb.7). Durch eIF4E Überexpression oder Aktivierung des mTOR Signalwegs kommt es letztendlich zu einer vermehrten Translation zellulärer Regulationsproteine, welche Proliferation und Überleben der Zelle fördern.

Eine eIF4E-Überexpression, deren Ausmaß prognostische Bedeutung hat, wird beim Neuroblastom beschrieben [14]. Für die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) des Kindesalters und das Osteosarkom ist die Aktivierung des mTOR Signalwegs mit

konsekutiver Phosphorylierung von eIF4E-BP und Stimulation der Translation durch Freisetzung von eIF4E bekannt [15, 16].

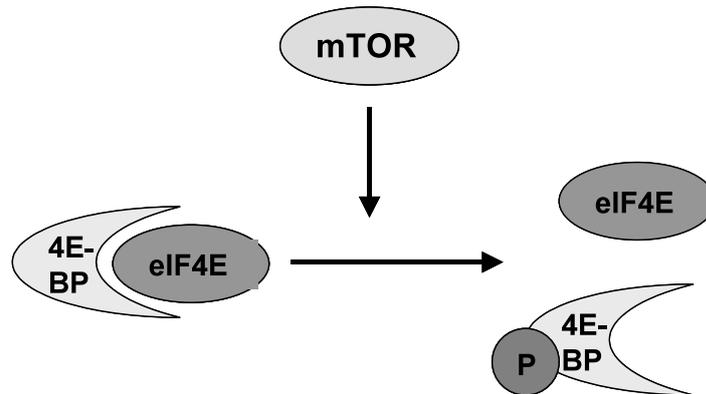


Abb.7 Freisetzung von eIF4E nach Aktivierung des mTOR Signalwegs

Im Rahmen meiner Arbeiten beschäftige ich mich einerseits mit Untersuchungen zur molekulargenetischen Charakterisierung verschiedener posttranskriptioneller Regulationsmechanismen und andererseits mit der Bedeutung dieser Mechanismen für verschiedene hämatologische und onkologische Erkrankungen im Kindesalter.

Eine der häufigsten Ursachen für eine erhöhte Thromboseneigung ist die G20210A Mutation des Prothrombingens. Neben der Durchführung einer prospektiven klinischen Studie zu den Auswirkungen dieser Mutation (sowie der Faktor V Leiden Mutation) im Kindesalter, konnte ich in Zusammenarbeit mit anderen Mitarbeitern den molekularen Mechanismus der gesteigerten Prothrombinexpression aufdecken.

In der Folge konnte ich die Rolle verschiedener Translationsinitiationsproteine für den molekulargenetischen Mechanismus des *internal ribosomal entry*, eines alternativen Translationsinitiationsweges, genauer charakterisieren. Durch *internal ribosomal entry* kann die Expression wichtiger zellulärer Regulationsproteine posttranskriptionell reguliert werden. Ich konnte nachweisen, dass der zentrale Apoptoseinhibitor XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis*) in der akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) des Kindesalters einerseits durch einen posttranskriptionellen Mechanismus hochreguliert ist und andererseits ein vielversprechendes Ziel einer gezielten antineoplastischen Therapie mit XIAP Inhibitoren ist.

3. EIGENE ARBEITEN

3.1 Thrombophilie im Kindesalter

Thrombembolische Ereignisse sind im Kindes- und Jugendalter selten und treten mit einer Häufigkeit von 0.07-0.14 / 10000 Kindern im Alter von 1 Monat bis 18 Jahren und 0.51 / 10000 Kindern in der Neonatalperiode auf [17-19]. Die meisten dieser Ereignisse treten in der Neonatalperiode und im ersten Lebensjahr auf. Die Faktor V Leiden (FVL) Mutation und die Prothrombin G20210A Mutation sind die häufigsten hereditären Risikofaktoren für eine Thrombophilie und sind auch bei Kindern mit einem Risiko für venöse und arterielle Thrombosen assoziiert, auch wenn das Risiko in asymptomatischen Kindern mit heterozygotem Genotyp gering zu sein scheint [20]. Weiterhin lassen verschiedene Einzelfallberichte sowie Berichte über das gehäufte Auftreten in frühgeborenen Kindern mit sehr geringem Geburtsgewicht eine mögliche Rolle dieser Risikogenotypen im Zusammenhang mit pränatalen thrombembolischen Ereignissen annehmen.

Bei den meisten Kindern mit heterozygoten Genotyp für Risikofaktoren und thrombembolischen Ereignissen können zusätzliche erworbene Risikofaktoren identifiziert werden. Dagegen deuten zahlreiche Berichte von spontanen thrombembolischen Ereignissen auf ein besonders hohes Risiko bei Kindern mit homozygotem oder doppelt heterozygotem Genotyp für die Faktor V Leiden Mutation oder die Prothrombin G20210A Mutation hin. Jedoch liegen aktuell keine prospektiven Daten über das individuelle Risikoprofil von nicht-selektionierten Kindern mit homozygotem oder doppelt heterozygotem Genotyp vor. Bei diesen Kindern ist ein besonders hohes Risiko für Früh- oder Fehlgeburtslichkeit sowie postnatale thrombembolische Ereignisse zu erwarten, die bislang nicht auf eine Thrombophilie zurückgeführt wurden.

Aus diesem Grund entwickelten wir zunächst eine molekulargenetische Methode, welche die Bestimmung des Faktor V Leiden und Prothrombin 20210 Genotyps der Neugeborenen im Rahmen des Neugeborenen Screenings in Berlin (etwa 30.000 Neugeborene/Jahr) ermöglicht. Mit Hilfe dieser Methode konnten wir eine prospektive Studie initiieren, welche nach Identifizierung der Neugeborenen mit homozygotem oder doppelt heterozygotem Genotyp für die Faktor V Leiden und Prothrombin G20210A Mutationen aus dem nicht-selektionierten Kollektiv beinahe aller (>98%) Neugeborenen in Berlin, die Beobachtung dieser Kinder während der ersten zwei Lebensjahre zum Ziel hatte. Auf diese Weise sollten erstmals kontrollierte, prospektive Daten zum individuellen Thromboserisiko von Kindern mit diesem Risikogenotyp ermittelt werden.

Klin Padiatr. 2000 Jul-Aug;212(4):159-62.

Design of a prospective neonatal cohort study of homozygous and double heterozygous factor V Leiden and factor II G20210A.

Hundsdoerfer P, Vetter B, Stöver B, Bassir C, Mönch E, Ziemer S, Kulozik AE.

Humboldt University Berlin, Germany.

Abstract

BACKGROUND: Factor V Leiden (FVL) and Factor II (FII) G20210A represent common risk factors for thromboembolic (TE) events. In children, both venous and arterial TE-events have been associated with the presence of FVL and FII G20210A. In most heterozygous children with TE-events other prothrombotic factors can usually be identified. Case reports of children with homozygous FVL, including 3 patients described here, suggest that this genotype may convey a particularly high risk. However, prospective data about the type and frequency of TE-events in such children are lacking.

STUDY DESIGN: We have initiated a prospective neonatal cohort study for the homozygous and double heterozygous genotypes for FVL and FII G20210A. The probands and the heterozygous controls are identified by neonatal screening that involves > 98% of the children born in Berlin and are followed up in a special out-patient clinic to document details of the clinical history, developmental parameters and the occurrence of TE-events.

CONCLUSIONS: This study will provide controlled and unbiased information about the clinical significance of the homozygous and double heterozygous genotypes of these mutations.

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10994543>)

Die Untersuchung dieser Kinder, und der Kontrollgruppe mit einfach heterozygotem Genotyp, umfasst neben regelmäßigen klinischen Untersuchungen, die sonographische Untersuchung des Gehirns und der Nieren und Nebennieren, ausgedehnte laborchemische Untersuchungen zum Ausschluss weiterer prothrombotischer Risikofaktoren sowie die Evaluation der psychomotorischen Entwicklung.

Nach Screening von mehr als 85.000 Proben innerhalb von beinahe 3 Jahren und Einschluss von 129 Kindern mit homozygotem oder doppelt heterozygotem Genotyp für die Faktor V Leiden und Prothrombin G20210A Mutationen (sowie 178 Kindern mit einfach heterozygotem Genotyp in der Kontrollgruppe) in unsere Studie konnten wir erste Schlussfolgerungen zum Thromboserisiko bei Kindern mit homozygotem oder doppelt heterozygotem Genotyp für die Faktor V Leiden und Prothrombin G20210A Mutationen ziehen.

Wir identifizierten die erwartete Anzahl von Neugeborenen mit homozygotem Genotyp für die Faktor V Leiden Mutation und doppelt heterozygotem Genotyp, so dass diese embryonale Genotypen offensichtlich nicht zu einem erhöhten Fehlgeburtsrisiko führen. Für den homozygoten Genotyp für die Prothrombin G20210A Mutation lässt sich sogar ein pränataler Vorteil ableiten, da wir signifikant mehr Neugeborene mit diesem Genotyp als erwartet identifizierten. In unserer Studie zeigten Kinder mit homozygotem oder doppelt heterozygotem Genotyp für die Faktor V Leiden und Prothrombin G20210A Mutationen ein signifikant erhöhtes Thromboserisiko. Die thrombembolischen Ereignisse traten alle in der Prä- oder Perinatalperiode auf.

Thromb Haemost. 2003 Oct;90(4):628-35.

Homozygous and double heterozygous Factor V Leiden and Factor II G20210A genotypes predispose infants to thromboembolism but are not associated with an increase of foetal loss.

Hundsdoerfer P, Vetter B, Stöver B, Bassir C, Scholz T, Grimmer I, Mönch E, Ziemer S, Rossi R, Kulozik AE.

Department of General Paediatrics, Charité, Humboldt University, Berlin, Germany.

Abstract

Prospective and controlled data about the individual risk profile in asymptomatic children with homozygous or double heterozygous risk genotypes for Factor V Leiden (FVL) and factor II (FII) G20210A are currently unavailable. The systematic and prospective observational study presented here was designed to determine the impact of the homozygous and double heterozygous FVL and FII G20210A genotypes on the prenatal and postnatal risk profiles of affected children. Risk infants and heterozygous controls were identified by screening of 85,304 neonates. Follow-up included the comparison of prenatal and postnatal development, ultrasonography of brain and kidneys, and a panel of independent determinants of thrombophilia. The numbers of identified or expected FVL homozygotes and double heterozygotes did not differ significantly (FVL: 116 versus 91, $p=0.08$; FVL/FII: 94 versus 76, $p=0.17$), indicating the absence of a prenatal disadvantage. A prenatal advantage was suggested in FII homozygotes, whose identified number far exceeded the expected (19 versus 4, $p=0.002$). Clinical and/or imaging abnormalities indicated spontaneous thromboembolic events in 4 of 129 risk infants (3%) but in none of the 178 controls ($p=0.02$). Physical and neurological development was normal in both groups during the first 2 years of life. The risk genotypes appear to confer a significant predisposition for spontaneous thromboembolic events in infancy without impeding development within the first two years of life. Foetal risk genotypes do not cause an increased foetal loss rate. Moreover, homozygous FII G20210A appears to be associated with a prenatal advantage.

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14515183>)

3.2 Kontrolle der Blutgerinnung

Die Blutgerinnung ist ein eng kontrollierter Prozess, der, unter physiologischen Bedingungen, die Hämostase bewahrt und intravaskuläre Thrombosen und Embolien verhindert. Sekundäre Hämostase wird durch ein Netzwerk von Endothel, Plasma und Thrombozyten-assoziierten Enzymen aktiviert und reguliert, welches letztendlich zur Umwandlung einer kleinen Menge von Plasma-Fibrinogen in Fibrin führt. Thrombin nimmt in der Regulation der Blutgerinnungskaskade eine Schlüsselrolle ein, da es als prokoagulatorisches Enzym die Blutgerinnungsfaktoren XIII, XI, VIII und V sowie den Thrombin-aktivierbaren fibrinolytischen Inhibitor (TAFI) aktiviert und Fibrinogen spaltet und so in Fibrin umwandelt. Andererseits hat Thrombin durch Aktivierung von Protein C einen antikoagulatorischen Effekt (Abbildung 8).

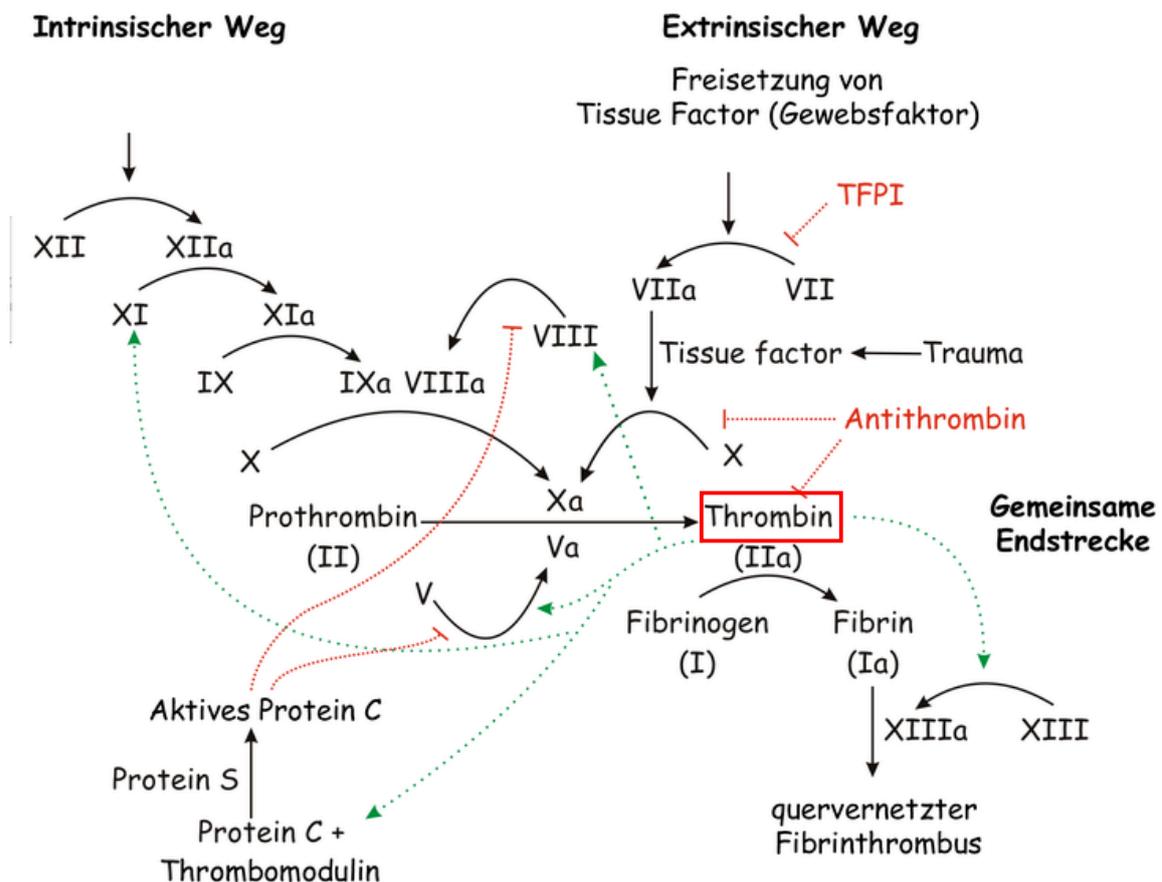


Abb.8: Die Rolle von Thrombin in der Blutgerinnungskaskade

Aktiviertes Protein C katalysiert die Spaltung und Inaktivierung des prokoagulatorischen Gerinnungsfaktors V. Die FVL Mutation führt zu einem Aminosäureaustausch an der wichtigsten Spaltstelle des Faktor V (Arg506Gln), die eine Spaltung durch aktiviertes Protein C an dieser Position unmöglich macht. Daraus resultiert eine verlängerten prokoa-

gulatorischen Wirkung des aktivierten Faktor V und die fehlender Bildung eines antikoagulatorisch wirksamen Faktor V-Fragments, was letztendlich zu einem Übergewicht der Prokoagulation führt und zu einer Thromboseneigung beiträgt (Abb.9) [21, 22].

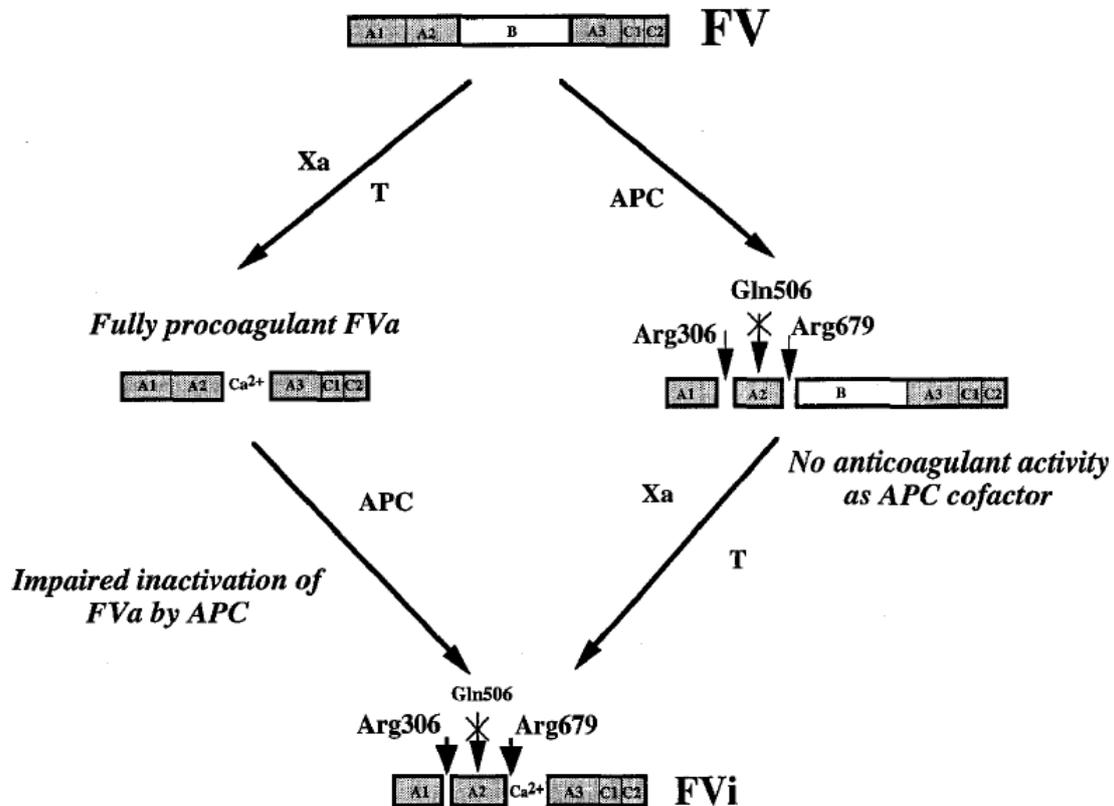


Abb.9: Auswirkungen der FVL Mutation auf die Spaltung des Faktor V durch aktiviertes Protein C (APC)[23]

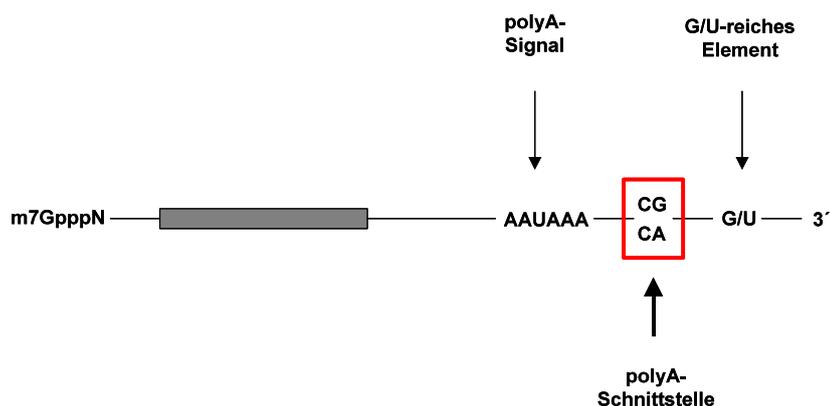


Abb.10: Position der G20210A Mutation in der Prothrombin prä-mRNA

Der molekulare Mechanismus für die erhöhten Prothrombinspiegel bei Merkmalsträgern der Prothrombin G20210A Mutation ist dagegen unklar. Die G20210A Mutation liegt in der 3'-nicht translatierten Region der Prothrombin prä-mRNA und führt somit nicht zu einer Veränderung der Prothrombin-Proteinsequenz, sondern findet sich interessanterweise

genau an der Position, an der die prä-mRNA durch Endonukleasen gespalten und polyadenyliert wird (Abb.10).

3.3 Polyadenylierung eukaryotischer prä-mRNA

Die Prozessierung des 3'-Endes beinahe aller eukaryotischer prä-mRNAs vor dem nukleocytoplasmatischen Export beinhaltet die Abspaltung des 3'-Endes der prä-mRNA und die nachfolgende Polyadenylierung. Für diesen Poly(A)-Schwanz gibt es im zugehörigen Gen keine komplementäre Poly(T)-Region, sondern er wird im Zellkern von einem komplexen Prozessierungsapparat angehängt (Abb.11).

Die 3'-nicht translatierte Region der prä-mRNA enthält verschiedene Signalsequenzen, die für die Anordnung des Prozessierungsapparat notwendig sind. Die polyA-Schnittstelle wird üblicherweise durch ein CA-Dinukleotid definiert. Etwa 10-30 Nukleotide oberhalb der polyA-Schnittstelle befindet sich das polyA-Signal, ein hochkonserviertes Sequenzmotiv (AAUAAA). Die Effektivität der Polyadenylierung wird weiterhin durch variable Sequenzelemente etwa 30 Nukleotide oberhalb des polyA-Signals (*upstream element*, USE) und eine G/U-reiche Region etwa 30 Nukleotide unterhalb der polyA-Schnittstelle (*downstream element*, DSE) reguliert.

Nach Erkennung der einzelnen Sequenzelemente und nachfolgender Anordnung eines Multiproteinkomplexes wird die prä-mRNA an der polyA-Schnittstelle (3' des CA-Dinukleotids) durch die Endonuklease CPSF-73 (cleavage/polyadenylation specificity factor-73) gespalten. Danach erfolgt die Polyadenylierung des 3'-Endes der prä-mRNA durch die polyA-Polymerase (PAP). Für die Synthese des etwa 250 Adenin-Nukleotide umfassenden polyA-Schwanzes ist die Interaktion von PAP mit dem CPSF-Komplex und dem nukleären polyA-bindenden Protein (PABPN) essentiell. Nach Polyadenylierung und während des nukleocytoplasmatischen Transports der reifen mRNA wird PABPN durch das cytoplasmatische polyA-bindenden Protein (PABPC) ausgetauscht. Als Teil des Translationsinitiationskomplexes führt PABPC in der Folge durch Interaktion mit eIF4G (*eukaryotic initiation factor 4G*) zur Zirkularisierung der mRNA und schafft somit die Voraussetzung für die effiziente Anordnung des Translationsinitiationskomplexes.

Die exakte Funktion dieser 3'-End-Prozessierung ist nicht vollständig geklärt. Es gibt jedoch mRNAs mit mehreren PolyA-Signalen, deren differentielle Nutzung zur Expression von unterschiedlichen Protein-kodierenden Sequenzen führt. Ein Beispiel hierfür ist posttranskriptionelle Regulation der Genexpression der Immunglobuline der M-Klasse.

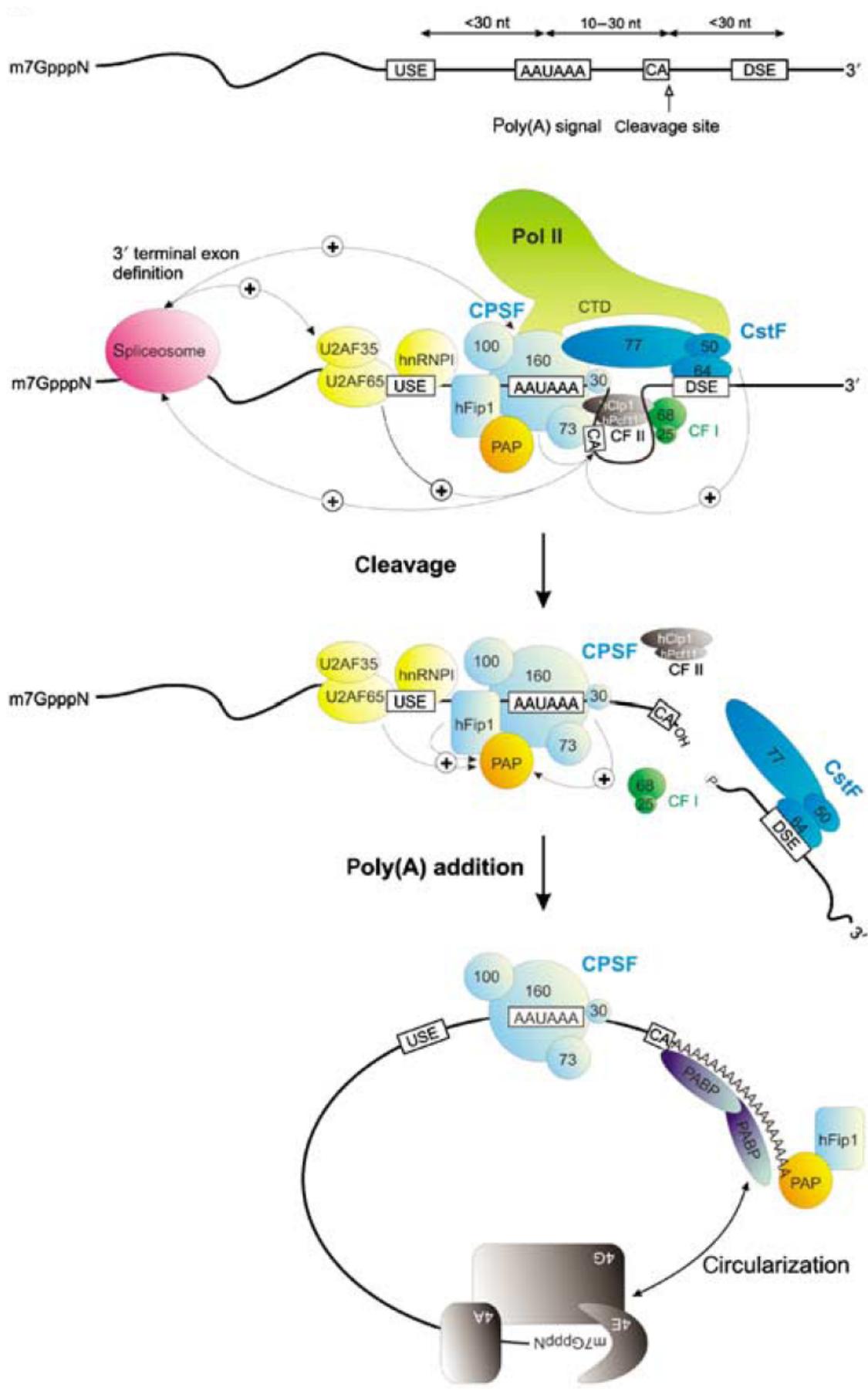


Abb.11: Polyadenylierung eukaryotischer prä-mRNA [24]

Das IgM Gen kodiert sowohl für die membranständige (IgM_m) als auch die sezernierte Form (IgM_s) des Proteins. Die IgM prä-mRNA enthält 2 unterschiedlich starke PolyA-Signale, die je nach Konzentration eines limitierenden Co-Faktors (CSTF, *cleavage stimulating factor*) genutzt werden. So kommt es zur Entstehung zweier unterschiedlicher mRNAs, welche für die membranständige und die sezernierte Form der Immunglobuline kodieren (Abb.12).

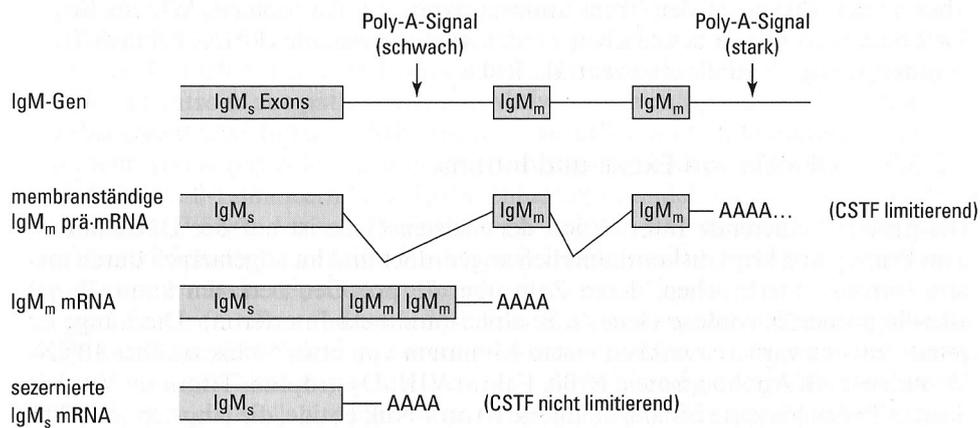


Abb.12: Regulation der IgM Expression durch alternative Polyadenylierung [1]

Unsere Untersuchungen zeigten, dass die Prothrombin G20210A Mutation zur verbesserten Erkennung der Spaltposition innerhalb der 3'-UTR der Prothrombin prä-mRNA und letztendlich zu vermehrten Vorliegen von korrekt prozessierter mRNA im Zytoplasma und somit erhöhter Proteinsynthese führt. Verbesserte 3'-UTR Prozessierung wurde somit als neuer molekularer Mechanismus identifiziert, welcher zu pathologischer Genexpression führt, und erklärt somit die Rolle der Prothrombin G20210A Mutation in der Pathogenese der Thrombophilie.

Nat Genet. 2001 Aug;28(4):389-92.

Increased efficiency of mRNA 3' end formation: a new genetic mechanism contributing to hereditary thrombophilia.

Gehring NH, Frede U, Neu-Yilik G, Hundsdorfer P, Vetter B, Hentze MW, Kulozik AE.

Department of Pediatrics, Charité, Humboldt University, Berlin, Germany.

Abstract

The G→A mutation at position 20210 of the prothrombin or coagulation factor II gene (F2) represents a common genetic risk factor for the occurrence of thromboembolic events. This mutation affects the 3'-terminal nucleotide of the 3' untranslated region (UTR) of the mRNA and causes elevated prothrombin plasma concentrations by an unknown mechanism. Here, we show that the mutation does not affect the amount of pre-mRNA, the site of 3' end cleavage or the length of the poly(A) tail of the mature mRNA. Rather, we demonstrate that the physiological F2 3' end cleavage signal is inefficient and that F2 20210 G→A represents a gain-of-function mutation, causing increased cleavage site recognition, increased 3' end processing and increased mRNA accumulation and protein synthesis. Enhanced mRNA 3' end formation efficiency emerges as a novel principle causing a genetic disorder and explains the role of the F2 20210 G→A mutation in the pathogenesis of thrombophilia. This work also illustrates the pathophysiologic importance of quantitatively minor aberrations of RNA metabolism.

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11443298>)

Die Spezifität und Effizienz der 3'-End Prozessierung wird durch die Bindung eines Multiproteinkomplexes an das 3'-End Prozessierungssignal bestimmt. Das hochkonservierte Polyadenylierungssignal AAUAAA oberhalb der Spaltstelle wird durch ein CPSF erkannt, welches die exakte Spaltposition 15-20 Nukleotide weiter unterhalb bestimmt. Das zweite kanonische Sequenzelement wird durch einen hohen Gehalt an Uridin-Nukleotiden und befindet sich 10-30 Nukleotide unterhalb der Spaltstelle. An dieses Element bindet ein CstF, welches die Effizienz der 3'-UTR Prozessierung verbessert. Die Spaltstelle selbst liegt präferenziell direkt 3' eines CA-Dinukleotides. Mutationen im Bereich des Polyadenylierungssignals führen üblicherweise zu einem Verlust der Funktion. Dagegen ist die Prothrombin G20210A Mutation die einzig bekannte Mutation der 3'-UTR Spaltstelle und resultiert in verbesserter 3'-UTR Prozessierung.

Eine systematische Analyse des gesamten 3'-UTR Prozessierungssignals führte zum Nachweis einer ungewöhnlichen Architektur nicht-kanonischer Sequenzelemente, welche eine Anfälligkeit für Mutationen, die zur einer Verstärkung der 3'-UTR Prozessierung führen, vermuten lassen.

Blood. 2004 Jul 15;104(2):428-35. Epub 2004 Apr 1.

The prothrombin 3'end formation signal reveals a unique architecture that is sensitive to thrombophilic gain-of-function mutations.

Danckwardt S, Gehring NH, Neu-Yilik G, Hundsdoerfer P, Pforsich M, Frede U, Hentze MW, Kulozik AE.

Molecular Medicine Partnership Unit, Im Neuenheimer Feld 153, 69120 Heidelberg, Germany.

Abstract

The functional analysis of the common prothrombin 20210 G>A(F2 20210(*)A) mutation has recently revealed gain of function of 3'end processing as a novel genetic mechanism predisposing to human disease. We now show that the physiologic G at the cleavage site at position 20210 is the functionally least efficient nucleotide to support 3'end processing but has evolved to be physiologically optimal. Furthermore, the F2 3'end processing signal is characterized by a weak downstream cleavage stimulating factor (CstF) binding site with a low uridine density, and the functional efficiency of F2 3'end processing can be enhanced by the introduction of additional uridine residues. The recently identified thrombosis-related mutation (F2 20221(*)T) within the CstF binding site up-regulates F2 3'end processing and prothrombin biosynthesis in vivo. F2 20221(*)T thus represents the first example of a likely pathologically relevant mutation of the putative CstF binding site in the 3'flanking sequence of a human gene. Finally, we show that the low-efficiency F2 cleavage and CstF binding sites are balanced by a stimulatory upstream uridine-rich element in the 3'UTR. The architecture of the F2 3'end processing signal is thus characterized by a delicate balance of positive and negative signals. This balance appears to be highly susceptible to being disturbed by clinically relevant gain-of-function mutations.

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15059842>)

3.4 Translationsinitiation in eukaryotischen mRNAs

Eukaryotische Translationsinitiation benötigt die Bindung der ribosomalen 40S Untereinheit an die mRNA. Bei den meisten zellulären mRNAs erfolgt dies nach Erkennung der 5'-cap Struktur (7mGpppN) durch das cap-bindende Protein eIF4E (*eukaryotic initiation factor 4E*). Nahezu alle eukaryotischen mRNAs besitzen einen 3'-poly(A)-Schwanz, der synergistisch mit der 5'-cap Struktur die Translationsinitiation unterstützt. Dieser Synergismus konnte in Hefe, Pflanzen und Säugetierzellen nachgewiesen werden und wird zumindest zum Teil durch die gleichzeitige Interaktion von eIF4G mit an die 5'-cap Struktur gebundenem eIF4E und mit an den poly(A)-Schwanz gebundenem PABP vermittelt. Diese Interaktion führt zur Zirkularisierung der mRNA und unterstützt die Bindung der ribosomalen 40S Untereinheit (Abb. 13).

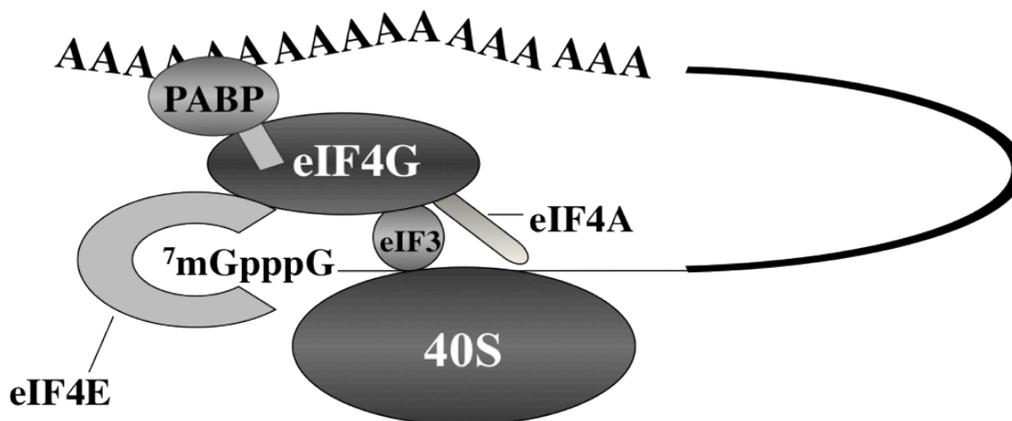


Abb.13: Cap-abhängige Translationsinitiation

Nach Bindung des 43S-Präinitiationskomplexes (ribosomale 40S-Untereinheit mit eIF2 und eIF3 sowie der Initiator tRNA_{Met}) bewegt sich dieser Komplex in 3'-Richtung (*scanning*), um mittels Kodon/Antikodon Interaktion das AUG Initiationskodon zu identifizieren. Am AUG Initiationskodon bindet nach Freisetzung von eIF2 und eIF3 die ribosomale 60S-Untereinheit, was zur Vervollständigung des zur translationskompetenten 80S-Ribosoms führt.

3.5 Alternative Translationsinitiation durch *internal ribosomal entry*

Translation kann auch durch einen 5'-unabhängigen Mechanismus durch sogenannte *internal ribosomal entry sequences* (IRES) initiiert werden. Dieser alternative Translationsinitiationsmechanismus wurde zuerst für picornvirale RNAs nachgewiesen. Picornvirale RNA trägt keine Cap-Struktur an ihrem 5'-Ende und die

5'-untranslatierte Region (UTR) enthält Strukturen, welche eine Cap-abhängige Translationsinitiation behindern. Im Bereich der 5'-UTR bildet diese RNA eine stabile dreidimensionale Struktur (IRES) aus, durch welche die ribosomale 40S Untereinheit so positioniert wird, dass die Translation initiiert werden kann.

Auch in einer zunehmenden Zahl eukaryotischer mRNAs wurden IRESes identifiziert und die physiologische Bedeutung von IRES-vermittelter Translation zellulärer mRNAs wird für verschiedene biologische Prozesse wie Zellzyklus, Apoptose, Wundheilung und Angiogenese klar. Dieser alternative Translationsmechanismus ist wahrscheinlich dann von besonderer Bedeutung, wenn cap-abhängige Translation inhibiert wird, z.B. während der Mitose oder in Situationen zellulären Stresses (z.B. Apoptose).

Im Gegensatz zu viralen IRESes ist nur sehr wenig über den Mechanismus der Translationsinitiation durch zelluläre IRESes bekannt. Obwohl die Bedeutung verschiedener IRES-bindender Proteine und eIF2 α -Phosphorylierung für die IRES-Funktion beschrieben wurde [25-28], bleibt noch viele Fragen zum molekularen Mechanismus der IRES-vermittelten Translationsinitiation offen.

Unsere Untersuchungen konzentrierten sich zunächst auf den Einfluss des poly(A)-Schwanzes am 3'-Ende der mRNA auf die durch zelluläre IRESes vermittelte Translationsinitiation. Für unsere Untersuchungen verwendeten wir ein einzigartiges zellfreies *in vitro* Translationssystem (HeLa Zellextrakte), welches in der Arbeitsgruppe von Prof. M. Hentze entwickelt wurde [29]. In diesem zellfreien System lässt sich die Translation von mRNAs *in vitro* rekapitulieren und Translationsmechanismen (z.B. durch Depletion von Proteinen oder Zugabe rekombinanter Proteine) exakt untersuchen. In diesem biochemischen System werden *in vitro* transkribierte mRNAs direkt translatiert, so dass die typischen Probleme von DNA-Transfektionsexperimenten (wie geringe Transfektionseffizienz, kryptische Promotoraktivität oder alternatives *splicing*) umgangen werden können.

Wir konnten zeigen, dass der poly(A)-Schwanz die Translationsinitiation durch zelluläre IRESes *in vivo* und *in vitro* verstärkt. Im Gegensatz zur cap-abhängigen Translation zeigte sich der stimulierende Effekt des poly(A)-Schwanzes als unabhängig von PABP und intaktem eIF4G, was eine unterschiedliche Zusammensetzung von molekularen Interaktionen vermuten lässt. Zusätzlich zeigen wir, dass IRES-vermittelte Translation nicht nur eIF4A benötigt, sondern auch durch die eIF4A-Aktivität in HeLa-Zellextrakten limitiert wird.

Mol Cell. 2004 Sep 24;15(6):925-35.

Enhancement of IRES-mediated translation of the c-myc and BiP mRNAs by the poly(A) tail is independent of intact eIF4G and PABP.

Thoma C, Bergamini G, Galy B, Hundsdoerfer P, Hentze MW.

EMBL Heidelberg, Gene Expression Programme, Meyerhofstrasse 1, D-69117 Heidelberg, Germany.

Abstract

The poly(A) tail at the 3' end of mRNAs enhances 5' cap-dependent translation initiation. We show that it also enhances IRES-directed translation of two cellular mRNAs in vitro and in vivo. The underlying mechanisms, however, differ fundamentally. In contrast to cap-dependent translation, IRES-driven translation continues to be enhanced by the poly(A) tail following proteolytic cleavage of eIF4G. Moreover, the poly(A) tail stimulates IRES-mediated translation even in the presence of PAIP2 or following effective depletion of the poly(A) binding protein (PABP) from HeLa cell extracts. The PABP-eIF4G bridging complex that is critical for cap-dependent translation is thus dispensable for the enhancement of the IRESs by the poly(A) tail. The polyadenylated mRNA translation from cellular IRESs is also profoundly sensitive to eIF4A activity in vitro. These mechanistic and molecular distinctions implicate the potential for a new layer of translational control mechanisms.

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15383282>)

Der eukaryotischen Initiationsfaktor eIF4G spielt eine übergeordnete Rolle für die cap-vermittelte Rekrutierung der kleinen ribosomalen Untereinheit. Die Funktion von eIF4G beinhaltet die Zirkularisierung der mRNA durch Interaktion dem cap-bindenden Protein eIF4E und dem poly(A)-bindenden Protein PABP, Rekrutierung der RNA-Helikase eIF4A an das 5'-Ende der mRNA und Assoziation von mRNA und ribosomaler 40S Untereinheit über eIF3 (Abb.13).

Virale IRESes funktionieren über verschiedene molekulare Mechanismen und benötigen unterschiedliche kanonische Initiationsfaktoren. Durch das Hepatitis C Virus IRES- und das *cricket paralysis virus* IRES-vermittelte Translation ist vollständig eIF4G-unabhängig, wohingegen das IRES des Enzephalomyokarditis-Virus (EMCV) eIF4G direkt (und unabhängig von eIF4E) bindet und so ein direkte Rekrutierung der ribosomalen 40S Untereinheit ermöglicht.

eIF4G kann in 3 Domänen aufgeteilt werden: Das N-terminale Fragment umfasst die eIF4E- und PABP-bindenden Regionen, das mittlere Fragment interagiert mit eIF4A und eIF3, und im C-terminalen Fragment liegen ein weitere Bindungsstelle für eIF4A sowie eine für die Mnk1-Kinase.

Die eIF3/eIF4A-Bindungsregion im mittleren Fragment ist hochgradig in vielen verschiedenen Spezies und im eIF4G-verwandten Protein p97 konserviert (Abb.14).

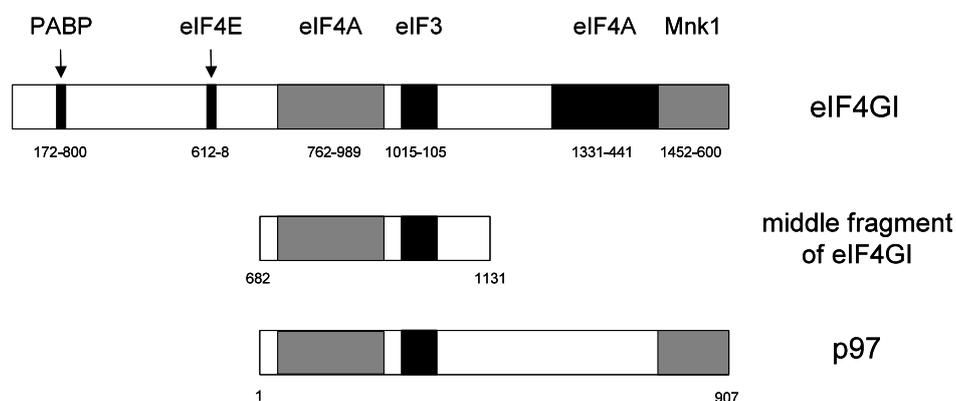


Abb.14: Schematische Darstellung von eIF4GI und p97

IRES-vermittelte Translationsinitiation reguliert die Translation von pro- und antiapoptotischen Proteinen (z.B. APAF-1, XIAP, c-IAP). Das eIF4G-verwandte Protein p97 wurde sowohl als Inhibitor der generellen Translation als auch als Modulator der Apoptose beschrieben und kann ebenfalls IRES-vermittelt translatiert werden.

Unsere Untersuchungen zeigen, dass das mittlere Fragment von eIF4GI (mit der konservierten eIF3/eIF4A-Bindungsregion) die eIF4GI-Funktion in der XIAP IRES-vermittelte Translation vollständig übernehmen kann. Das eIF4G-verwandte Protein p97 scheint die IRES-vermittelte Translation sogar erheblich stärker stimulieren zu können als eIF4GI oder sein mittleres Fragment.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Sep 20;102(38):13421-6. Epub 2005 Sep 7.

Eukaryotic translation initiation factor 4G1 and p97 promote cellular internal ribosome entry sequence-driven translation.

Hundsdoerfer P, Thoma C, Hentze MW.

Gene Expression Unit, European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, D-69117 Heidelberg, Germany.

Abstract

Numerous cellular mRNAs encoding proteins critical during cell stress, apoptosis, and the cell cycle seem to be translated by means of internal ribosome entry sequences (IRES) when cap-dependent translation is compromised. The underlying molecular mechanisms are largely unknown. Using a HeLa-based cell-free translation system that mirrors the function of cellular IRESs in vitro, we recently demonstrated that translation from the c-myc IRES continues after proteolytic cleavage of eukaryotic translation initiation factor (eIF) 4G. To address the role of eIF4G in cellular IRES-driven translation directly, we immunodepleted eIF4G1 from the HeLa cell translation extracts. After efficient depletion of eIF4G1 (>90%), both cap-dependent and c-myc IRES-dependent translations are diminished to residual levels (<5%). In striking contrast to cap-dependent translation, c-myc IRES-dependent translation is fully restored by addition of the conserved middle fragment of eIF4G1, harboring the eIF3- and eIF4A-binding sites. p97, an eIF4G-related protein that has been described both as an inhibitor of translation and as a modulator of apoptosis, not only suffices to also rescue c-myc IRES-driven (but not cap-dependent) translation, but it even superinduces IRES-mediated translation 3-fold compared with nondepleted extracts. Interestingly, both p97 and the middle fragment of eIF4G1 also rescue translation driven by proapoptotic (p97) and antiapoptotic [X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) and cellular inhibitor of apoptosis 1 (c-IAP1)] IRESs, reflecting a broader role of these polypeptides in cellular IRES-mediated translation and indicating their importance in apoptosis.

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16174738>)

3.6 Regulation der Expression des zentralen Apoptoseinhibitors XIAP

Die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) ist die häufigste maligne Erkrankung des Kindes- und Jugendalters. In den letzten Jahrzehnten wurden große Fortschritte in der Behandlung der ALL des Kindesalters gemacht und aktuell können durch Risiko-adaptierte Therapieansätze Heilungsraten von 80-85% erreicht werden. Jedoch erkranken 20-25% der Kinder an einem Rezidiv der ALL. Für diese Kinder liegt die Wahrscheinlichkeit für ein Langzeitüberleben nur bei etwa 35%. Resistenz gegenüber Glukokortikoid-induzierter Apoptose ist einer der wichtigsten Risikofaktoren für das Auftreten eines Rezidivs und eine schlechte Prognose in der ALL des Kindesalters.

Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltods. Im Gegensatz zum anderen bedeutenden Mechanismus des Zelltods, der Nekrose, wird die Apoptose von der betroffenen Zelle selbst durchgeführt, ist also Teil des zellulären Stoffwechsels. Dadurch unterliegt diese Form des Zelltods strenger Kontrolle und es wird gewährleistet, dass die betreffende Zelle ohne Schädigung des Nachbargewebes zugrundegeht. Die exakte Regulation pro- und antiapoptotischer Signale ist für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts einer Zellpopulation zwischen Zellproliferation und Zelluntergang von entscheidender Bedeutung. Dysregulation der Apoptose ist ein Kennzeichen maligner Erkrankungen und wurde als wichtiger Faktor in der Entwicklung und Therapieresistenz zahlreicher maligner Erkrankungen nachgewiesen [30].

Apoptose kann über zwei verschiedene Signalkaskaden initiiert werden (Abb.15). Der extrinsische Weg wird durch Aktivierung von membranständigen Rezeptoren der TNF-Rezeptorfamilie (*death receptors*, DR) durch Bindung von TNF- α (*tumor necrosis factor- α*) oder anderen Zytokinen eingeleitet. Nach Aktivierung von Caspase 8 erfolgt dann die Aktivierung der Effektorcaspasen 3,6 und 7 und die Ausführung der Apoptose. Beim intrinsischen Weg der Apoptose kommt es z.B. durch Schädigung der DNA und nachfolgender Aktivierung von p53 letztendlich zur Freisetzung von mitochondrialem Cytochrom C. Dies führt nach Aktivierung von APAF-1 (*apoptotic peptidase activating factor-1*) zur Aktivierung von Caspase 9 und in der Folge wiederum der Effektorcaspasen 3,6 und 7.

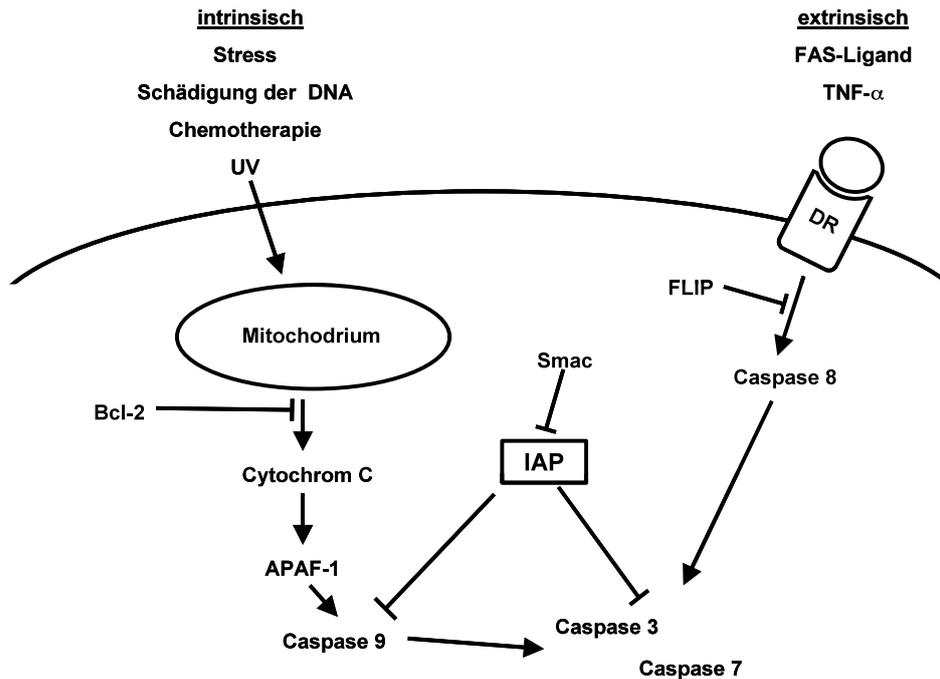


Abb.15: Signalwege der Apoptose

Die Proteine der *inhibitor of apoptosis protein* (IAP) Familie sind zentrale Inhibitoren der Apoptose. IAP-kodierende Sequenzen wurden erstmals 1993 im Genom von Baculoviren entdeckt. [31, 32] Dabei wurde festgestellt, dass IAPs an der Unterdrückung des Zelltodes von Baculovirus-infizierten Wirtszellen beteiligt sind. Seitdem wurden viele weitere IAP-Vertreter in unterschiedlichen Spezies gefunden. Diesen IAPs gemein ist das Vorhandensein von mindestens einer BIR-Domäne (*Baculovirus IAP repeat*), die aus etwa 70 Aminosäuren besteht und für die Hemmung der Apoptose verantwortlich ist (Abb.16).

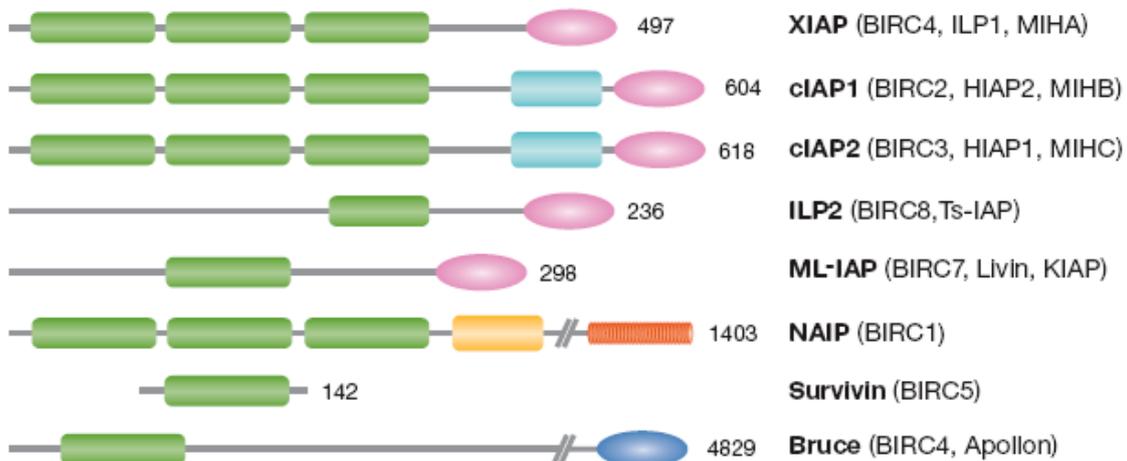


Abb.16: Proteine der *Inhibitor of Apoptosis Protein* (IAP) Familie [29]

XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis*) ist das potenteste und am besten charakterisierte Mitglied der IAP Familie und wird aus diesem Grund als Schlüsselement der Apoptoseregulation angesehen. XIAP blockiert durch direkte Bindung an die Caspasen 3, 7 und 9 (Abb.17), anders als viele andere Inhibitoren der Apoptose wie bcl-2, sowohl die *death receptor*- als auch die mitochondrial vermittelte Apoptoseaktivierung [33, 34].

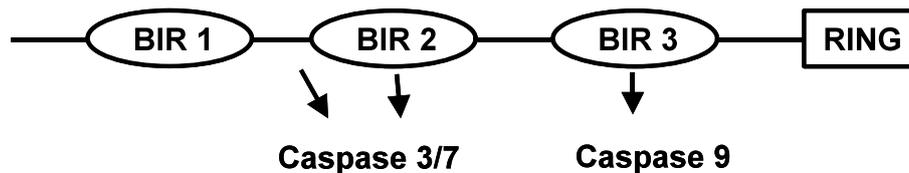


Abb. 17: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen von XIAP

Für einige maligne Erkrankungen wurde bereits ein Zusammenhang von hoher XIAP Expression und Resistenz gegenüber Chemotherapie-induzierter Apoptose sowie schlechter Prognose berichtet [35-38]. Aus diesem Grund ist XIAP ein erfolgsversprechender Angriffspunkt für innovative, zielgerichtete Strategien antineoplastischer Therapie.

Entsprechend der wichtigen funktionellen Bedeutung von XIAP wird die XIAP Expression auf mehreren Ebenen reguliert. Die transkriptionelle Aktivierung erfolgt hauptsächlich durch Stimulation des NF- κ B Signalwegs [39, 40]. Außerdem kann die XIAP Expression posttranskriptionell durch IRES-vermittelte Translation reguliert werden [41]. Während verschiedener Arten von Zellstress (u.a. Apoptose) gewährleistet die IRES-vermittelte Translationsinitiation die XIAP Expression [41-45]. Dem Mechanismus der IRES-vermittelten Translationsregulation könnte somit eine besondere Bedeutung in der Kontrolle der Apoptose durch XIAP zukommen [26, 46]. Zusätzlich wird die XIAP Proteinaktivität durch Interaktion mit mindestens 3 spezifischen Antagonisten (SMAC/Diablo, HtrA2/Omi, XAF-1) kontrolliert [47-50].

Unsere Untersuchungen zeigen erstmals eine posttranskriptionelle Hochregulierung der XIAP Proteinexpression in der ALL des Kindesalters, die möglicherweise durch alternative Translationsinitiation über *internal ribosomal entry* bedingt ist. Zusätzlich konnten wir für T-ALL Patienten eine Assoziation von XIAP Expression und Ansprechen auf die Glukokortikoidtherapie und Prognose nachweisen.

XIAP expression is post-transcriptionally upregulated in childhood ALL and is associated with glucocorticoid response in T-cell ALL.

Hundsdoerfer P, Dietrich I, Schmelz K, Eckert C, Henze G.

Department of Pediatric Oncology/Hematology, Charité Universitätsmedizin, Berlin, Germany. patrick.hundsdoerfer@charite.de

Abstract

BACKGROUND: Resistance to glucocorticoid induced apoptosis is one of the major risk factors for relapse and poor outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). Overexpression of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) has been shown to be associated with chemotherapy resistance in several malignancies.

PROCEDURE: XIAP protein and mRNA expression were determined in leukemic blasts of 51 childhood ALL patients and normal bone marrow mononuclear cells. XIAP expression was correlated with glucocorticoid response and outcome.

RESULTS: XIAP protein but not mRNA expression was found to be highly increased in childhood ALL compared to control bone marrow mononuclear cells (MNC) (median: 3.5 vs. 0.14 ng/10(5) MNC, $P < 0.0001$) indicating a post-transcriptional regulation of XIAP expression. In patients with T-cell ALL, poor prednisone response was associated with increased XIAP expression (median: 2.8 in good vs. 5.8 in poor responders; $P = 0.005$). Similarly, T-cell ALL patients suffering adverse events showed higher initial XIAP levels than patients in continuous complete remission (CCR) (median: 2.7 in patients in CCR vs. 5.6 in patients suffering adverse events; $P = 0.007$). XIAP inhibition using the low-molecular-weight SMAC mimetic LBW242 resulted in a significant increase of prednisone-induced apoptosis in vitro.

CONCLUSION: In childhood ALL compared to control bone marrow, the expression of the apoptosis inhibitor XIAP is highly increased by post-transcriptional regulation. The association with poor in vivo glucocorticoid response and outcome in T-cell ALL suggests XIAP inhibition as a promising novel approach for the treatment of resistant ALL.

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20582956>)

4. DISKUSSION

Die eukaryotische Genexpression kann auf transkriptioneller Ebene (also durch Modulation der mRNA-Spiegel) oder durch posttranskriptionelle Mechanismen reguliert werden. Die transkriptionelle Dysregulation der Genexpression wurde bereits als wichtiger pathogener Faktor für viele maligne Erkrankungen identifiziert. Über die Rolle posttranskriptioneller Mechanismen, welche die verschiedenen Schritte der prä-mRNA Prozessierung, die mRNA Stabilität, die mRNA Translation und letztendlich auch die Proteinstabilität umfassen, für Erkrankungen der pädiatrischen Hämatologie und Onkologie ist dagegen bislang nur wenig bekannt.

Die vorgelegte Habilitationsschrift beschreibt die molekulargenetische Charakterisierung verschiedener posttranskriptioneller Regulationsmechanismen der Genexpression und deren Bedeutung für Erkrankungen der pädiatrischen Hämatologie und Onkologie. Es handelt sich hierbei um den Effekt der Prothrombin G20210A Mutation auf die Regulation der mRNA-Prozessierung und den Zusammenhang mit dem Auftreten einer Thromboseneigung im Kindesalter. Weiterhin wird die molekulargenetische Charakterisierung eines alternativen Translationsinitiationsmechanismus (IRES) und die Rolle dieses Mechanismus für die Expression des zentralen Apoptoseinhibitors XIAP in der ALL des Kindesalters beschrieben.

Unsere Untersuchungen zeigten, dass das Risiko für das Auftreten thromboembolischer Ereignisse bei Kindern mit Risikogenotyp (homozygoter oder doppelt heterozygoter Genotyp für die FVL und PT G20210A Mutationen) höher als erwartet [17, 18, 51] und signifikant höher als bei Kindern ohne Risikogenotyp ist. Unsere Daten zeigen jedoch eindeutig, dass aufgrund des Fehlens thromboembolischer Ereignisse außerhalb der Prä- / Perinatalperiode und der normalen Entwicklung der Kinder mit einem Risikogenotyp, weder eine Indikation zur Fortsetzung des neonatalen Screenings noch für die Durchführung einer prophylaktischen Antikoagulationstherapie besteht.

Überraschenderweise zeigte sich, dass ein fetaler Risikogenotyp nicht, wie in einzelnen Berichten beschrieben [52-54], mit einem erhöhten Risiko für eine Früh- oder Fehlgeburtlichkeit einhergeht. Für den homozygoten PT G20210A Genotyp konnte sogar ein fetaler Überlebensvorteil nachgewiesen werden, der möglicher-

weise auf eine verbesserte Implantationseffizienz durch einer verringerte Blutungsneigung, wie für Schwangere mit FVL beschrieben [55], zurückzuführen ist.

Im Gegensatz zur FVL Mutation liegt sich die PT G20210A Mutation nicht innerhalb der translatierten (also Protein-kodierenden) Region und führt somit nicht zu einer Änderung der Proteinsequenz. Der Mechanismus, durch den die PT G20210A Mutation zu erhöhten Prothrombinspiegeln [56] und letztendlich einer erhöhten Thromboseneigung führt war nicht bekannt. Wir konnten erstmals zeigen, dass die PT G20210A Mutation zu einer effektiveren Abspaltung der 3'-Region und somit einer verbesserten prä-mRNA Prozessierung und letztendlich erhöhten Spiegeln reifer mRNA für die Proteinsynthese führt.

Die systematische Analyse der die PT prä-mRNA 3'-End-Prozessierung regulierenden Signale zeigte eine ungewöhnliche Anordnung von starken und schwachen Sequenzelementen. Während die Spaltstelle der prä-mRNA und die Bindungsstelle für den *cleavage stimulating factor* (CstF) funktionell wenig effizient sind, konnten wir ein zusätzliches stimulatorisches Sequenzelement oberhalb der Spaltstelle identifizieren. Diese Sequenzelemente werden in viralen Genen als *upstream sequence elements* (USE) bezeichnet, über die Funktion für die 3'-End-Prozessierung in eukaryotischen Zellen ist wenig bekannt [57-59]. Möglicherweise unterstützen USEs die Stabilisierung des *cleavage/polyadenylation stimulating factor* (CPSF) und führen so zur Stimulation der Poly(A)-Polymerase [58, 60]. Die prä-mRNA 3'-End-Prozessierung kann während verschiedener Phasen des Zellzyklus [61], Wachstumsphasen [62], gewebespezifisch [63], in verschiedenen Stadien der Entwicklung [64] modifiziert werden. Interessant bleibt die Frage, ob die insgesamt wenig effiziente 3'-End Prozessierung der Prothrombin prä-mRNA und somit geringe Proteinsynthese in physiologischen Stresssituationen hochreguliert werden kann.

Aus unseren Arbeiten zur molekularbiologischen Charakterisierung der durch zelluläre IRESes vermittelten Translationsinitiation lässt sich (für die untersuchten IRESes) folgendes Modell ableiten (Abb.18): Die IRES-vermittelte Translation wird 5'-unabhängig initiiert und benötigt aus diesem Grund keine 5'-Cap Struktur. Daher ist auch eine Interaktion des Cap-bindenden Proteins eIF4E mit eIF4GI nicht notwendig. Dagegen wird die IRES-vermittelte Translation durch den poly(A)-Schwanz der mRNA stimuliert, jedoch unabhängig vom poly(A)-bindenden Protein (PABP), welches für die Stimulation der Cap-abhängigen Translation notwendig ist.

Ob und welches Protein eine Bindung von poly(A)-Schwanz an eIF4GI vermittelt ist bislang unklar. Für IRES-vermittelte eukaryotische Translationsinitiation wird nicht das intakte sondern lediglich das mittlere Fragment des eIF4GI Proteins benötigt.

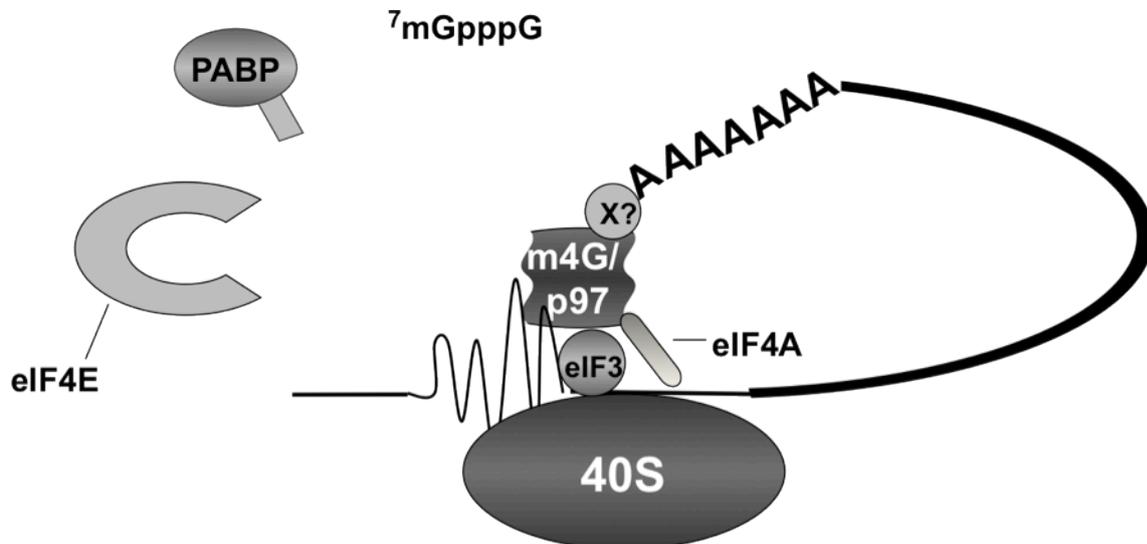


Abb.18: Modell der IRES-vermittelten eukaryotischen Translationsinitiation

Das zelluläre Protein p97, dessen N-terminaler Anteil große Homologien mit dem mittleren Fragment von eIF4GI aufweist, scheint die Funktion von eIF4GI in der IRES- vermittelten Translationsinitiation ersetzen zu können. Das Fehlen der Bindungsregionen für eIF4E und PABP im p97 Protein bestätigt, dass diese Proteine sowie die 5'-Cap-Struktur der mRNA für die IRES-vermittelte Translationsinitiation nicht benötigt werden. Rekombinantes, prokaryotisch synthetisiertes p97 Protein scheint einen sehr viel stärkeren stimulatorischen Effekt auf die IRES-vermittelte Translationsinitiation zu haben, als endogenes, eukaryotisch synthetisiertes Protein. Da im Rahmen der Aktivierung des p97 Proteins während der Apoptoseinduktion ein C-terminales Fragment abgespalten wird, liegt die Vermutung nahe, dass während der eukaryotischen Proteinsynthese durchgeführte posttranslationelle Modifikationen (z.B. Phosphorylierung, Methylierung) im Bereich des C-terminalen Anteils zur einer p97-Inaktivierung führen.

Die Prüfung dieser Hypothese sowie die Identifikation der Regionen im p97 Protein, welche zu dem gegenüber eIF4GI deutlich verstärkten stimulatorischen Effekt auf die IRES-vermittelte Translationsinitiation beitragen, sind Gegenstand unserer aktuellen und zukünftigen wissenschaftlichen Projekte.

Ob IRES-vermittelte Translationsinitiation zur der ganz erheblich erhöhten posttranskriptionellen Hochregulation der XIAP Expression in der ALL des Kindesalters beiträgt, ist bislang nicht geklärt. Insbesondere eine erhöhte XIAP Proteinstabilität (z.B. durch XIAP Phosphorylierung oder Mutationen im Bereich der Caspase-Spaltstelle, der Phosphorylierungsregion oder der RING Domäne) kommt als alternativer Mechanismus in Frage.

Auch wenn der Mechanismus bislang nicht vollständig aufgeklärt werden konnte, konnten wir dennoch erstmals eine starke, posttranskriptionell regulierte XIAP Überexpression in der ALL des Kindesalters nachweisen. Insbesondere die Assoziation von hohen XIAP Spiegeln mit schlechten Ansprechen auf die Prednison-Therapie und erhöhtem Risiko für das Auftreten von Rezidiven bei Patienten mit T-ALL, macht XIAP zu einem erfolgsversprechenden Angriffspunkt für innovative, zielgerichtete Strategien für die Behandlung der therapierefraktären ALL des Kindesalters.

Es wurden Wirkstoffe entwickelt, die auf unterschiedlichen Ebenen in die XIAP Expression eingreifen und die XIAP Aktivität hemmen können. Bindung eines komplementären Oligonukleotids (AEG35156, Aegera) an XIAP mRNA resultiert in deren Degradation und in der Folge reduzierter XIAP Proteinexpression [65]. Verschiedene synthetische Peptide, welche XIAP direkt binden, bewirken eine Hemmung der anti-Caspase-Aktivität des XIAP Proteins [66-69]. Der Proteasom-inhibitor Bortezomib führt in niedriger Dosierung zu einer selektiven Reduktion der XIAP Expression, die nicht über die NFκB Kaskade vermittelt wird [70]. Der Effekt von AEG35156 wird bereits in zahlreichen Phase I/II Studien für maligne Erkrankungen des Erwachsenenalters getestet. Über den Einsatz von AEG35156 in der Therapie der AML des Erwachsenenalters liegen bereits erste Berichte vor, die XIAP Inhibition durch AEG35156 als vielversprechenden neuen Therapieansatz belegen [71].

Die weitere Charakterisierung des molekulargenetischen Mechanismus der XIAP Überexpression in der ALL des Kindesalters sowie die Testung der Effektivität einer XIAP Inhibition für die Apoptoseinduktion in therapierefraktären Leukämien sind Gegenstand unserer aktuellen und zukünftigen Untersuchungen.

Wir konnten erstmals zeigen, dass die G20210A Mutation des Prothrombingens, eine der häufigsten Ursachen einer hereditären Thrombophilie, eine außergewöhnliche

gain of function Mutation darstellt. Durch diese Mutation wird die Effektivität der prä-mRNA Prozessierung durch Verbesserung der korrekten Abspaltung des 3'-Endes der PT prä-mRNA, dem entscheidenden Schritt vor der Polyadenylierung der mRNA, gesteigert. Dies führt zu erhöhten Spiegeln einer korrekt prozessierten PT mRNA und letztendlich zur erhöhten PT Synthese.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die eukaryotische Genexpression wird durch verschiedene transkriptionelle und posttranskriptionelle Mechanismen reguliert. Die transkriptionelle Dysregulation der Genexpression wurde bereits als wichtiger pathogener Faktor für viele maligne Erkrankungen identifiziert, während über die Rolle posttranskriptioneller Regulation der Genexpression für Erkrankungen der pädiatrischen Hämatologie und Onkologie bislang nur wenig bekannt ist.

Die vorgelegte Habilitationsschrift beschreibt meine Untersuchungen zur molekulargenetischen Charakterisierung verschiedener posttranskriptioneller Regulationsmechanismen und andererseits mit der Bedeutung dieser Mechanismen für verschiedene hämatologische und onkologische Erkrankungen im Kindesalter.

Durch neonatales Screening von mehr als 98% der Neugeborenen in Berlin, konnten wir nachweisen, dass eine hereditäre Thrombophilie durch die PT G20210A oder die FVL Mutationen zu einem erhöhten Risiko prä- oder perinataler thrombotischer Ereignisse bei homozygoten oder doppelt heterozygoten Merkmalsträgern führt, jedoch zu keiner Thrombophilie in den ersten beiden Lebensjahren führt. Überraschenderweise zeigte sich außerdem, dass ein homozygoter Genotyp für die PT G20210A Mutation nicht mit einem erhöhten Risiko für eine Früh- oder Fehlgeburtlichkeit einhergeht, sondern im Gegenteil einen fetalen Überlebensvorteil, möglicherweise aufgrund einer verbesserten Implantationseffizienz, darstellt.

Die Expression vieler zellulärer Regulationsproteine wird über einen alternativen Translationsinitiationsmechanismus, welcher eine Proteinsynthese auch in Phasen zellulären Stresses möglich macht, reguliert. Unsere molekulargenetische Charakterisierung der internal ribosomal entry site (IRES)-vermittelten Translationsinitiation führte zu einem Modell, welches ohne mehrere für die generelle Translationsinitiation essentielle Proteine auskommt. Auch die Expression von XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*), eines der zentralen Regulationsproteine der Apoptose, kann durch IRES-vermittelte Translationsinitiation kontrolliert werden. Für die ALL des Kindesalters konnten wir eine starke XIAP Überexpression nachweisen, die durch einen posttranskriptionellen Regulationsmechanismus zustande kommt und für T-ALL Patienten mit einem schlechtem Ansprechen auf die Therapie und erhöhtem Risiko für Rezidive einhergeht. Ob IRES-vermittelte Translationsinitiation hierzu beiträgt, muss zum gegenwärtigen Zeitpunkt offen bleiben.

Erste Daten zur medikamentösen XIAP Inhibition in ALL Zelllinien lassen diese als einen vielversprechenden neuen Ansatz für die Behandlung der therapierefraktären ALL des Kindesalters erscheinen.

6. LITERATUR

1. Kulozik AE, Hentze M, Hagemeyer C, and Bartram CR, *Molekulare Medizin*. 2000, Berlin; New York: Walter de Gruyter. 497.
2. Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, and Bishop JM: Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 1984;224:1121-4.
3. Cline MJ: The molecular basis of leukemia. *N Engl J Med* 1994;330:328-36.
4. Bailly RA, Bosselut R, Zucman J, Cormier F, Delattre O, Roussel M, Thomas G, and Ghysdael J: DNA-binding and transcriptional activation properties of the EWS-FLI-1 fusion protein resulting from the t(11;22) translocation in Ewing sarcoma. *Mol Cell Biol* 1994;14:3230-41.
5. May WA, Lessnick SL, Braun BS, Klemsz M, Lewis BC, Lunsford LB, Hromas R, and Denny CT: The Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than FLI-1. *Mol Cell Biol* 1993;13:7393-8.
6. Ordonez JL, Osuna D, Herrero D, de Alava E, and Madoz-Gurpide J: Advances in Ewing's sarcoma research: where are we now and what lies ahead? *Cancer Res* 2009;69:7140-50.
7. Oehme I, Deubzer HE, Wegener D, Pickert D, Linke JP, Hero B, Kopp-Schneider A, Westermann F, Ulrich SM, von Deimling A, Fischer M, and Witt O: Histone deacetylase 8 in neuroblastoma tumorigenesis. *Clin Cancer Res* 2009;15:91-9.
8. Higgs DR, Goodbourn SE, Lamb J, Clegg JB, Weatherall DJ, and Proudfoot NJ: Alpha-thalassaemia caused by a polyadenylation signal mutation. *Nature* 1983;306:398-400.
9. Krawczak M, Reiss J, and Cooper DN: The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet* 1992;90:41-54.
10. Danckwardt S, Neu-Yilik G, Thermann R, Frede U, Hentze MW, and Kulozik AE: Abnormally spliced beta-globin mRNAs: a single point mutation generates transcripts sensitive and insensitive to nonsense-mediated mRNA decay. *Blood* 2002;99:1811-6.
11. Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A, Wang HG, Irie S, Fong L, and Reed JC: Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bcl-X expression. *Cancer Res* 1994;54:5501-7.
12. Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunez G, and Thompson CB: bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993;74:597-608.
13. Graff JR, Konicek BW, Carter JH, and Marcusson EG: Targeting the eukaryotic translation initiation factor 4E for cancer therapy. *Cancer Res* 2008;68:631-4.
14. Parker A, Anderson C, Weiss KL, Grimley M, and Sorrells D: Eukaryotic initiation factor 4E staining as a clinical marker in pediatric neuroblastoma. *J Pediatr Hematol Oncol* 2004;26:484-7.
15. Wan X, Mendoza A, Khanna C, and Helman LJ: Rapamycin inhibits ezrin-mediated metastatic behavior in a murine model of osteosarcoma. *Cancer Res* 2005;65:2406-11.

16. Mungamuri SK, Yang X, Thor AD, and Somasundaram K: Survival signaling by Notch1: mammalian target of rapamycin (mTOR)-dependent inhibition of p53. *Cancer Res* 2006;66:4715-24.
17. van Ommen CH, Heijboer H, Büller HR, Hirasing RA, Heijmans HSA, and Peters M: Venous thromboembolism in childhood: A prospective two-year registry in the Netherlands. *J Pediat* 2001;139:676-681.
18. Andrew M, David M, Adams M, Ali K, Anderson R, Barnard D, Bernstein M, Brisson L, Cairney B, DeSai D, and et al.: Venous thromboembolic complications (VTE) in children: first analyses of the Canadian Registry of VTE. *Blood* 1994;83:1251-7.
19. Nowak-Gottl U, von Kries R, and Gobel U: Neonatal symptomatic thromboembolism in Germany: two year survey. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1997;76:F163-7.
20. Tormene D, Simioni P, Prandoni P, Franz F, Zerbinati P, Tognin G, and Girolami A: The incidence of venous thromboembolism in thrombophilic children: a prospective cohort study. *Blood* 2002;100:2403-5.
21. Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, and Reitsma PH: Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature* 1994;369:64-7.
22. Dahlback B: Inherited thrombophilia: resistance to activated protein C as a pathogenic factor of venous thromboembolism. *Blood* 1995;85:607-14.
23. Dahlback B: Procoagulant and anticoagulant properties of coagulation factor V: factor V Leiden (APC resistance) causes hypercoagulability by dual mechanisms [In Process Citation]. *J Lab Clin Med* 1999;133:415-22.
24. Danckwardt S, Hentze MW, and Kulozik AE: 3' end mRNA processing: molecular mechanisms and implications for health and disease. *Embo J* 2008;27:482-98.
25. Hellen CU, and Sarnow P: Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev* 2001;15:1593-612.
26. Holcik M, and Sonenberg N: Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:318-27.
27. Yaman I, Fernandez J, Liu H, Caprara M, Komar AA, Koromilas AE, Zhou L, Snider MD, Scheuner D, Kaufman RJ, and Hatzoglou M: The zipper model of translational control: a small upstream ORF is the switch that controls structural remodeling of an mRNA leader. *Cell* 2003;113:519-31.
28. Gerlitz G, Jagus R, and Elroy-Stein O: Phosphorylation of initiation factor-2 alpha is required for activation of internal translation initiation during cell differentiation. *Eur J Biochem* 2002;269:2810-9.
29. Bergamini G, Preiss T, and Hentze MW: Picornavirus IRESes and the poly(A) tail jointly promote cap-independent translation in a mammalian cell-free system. *Rna* 2000;6:1781-90.
30. Hanahan D, and Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
31. Birnbaum MJ, Clem RJ, and Miller LK: An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *J Virol* 1994;68:2521-8.
32. Crook NE, Clem RJ, and Miller LK: An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol* 1993;67:2168-74.

33. Eckelman BP, Salvesen GS, and Scott FL: Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep* 2006;7:988-94.
34. Holcik M, and Korneluk RG: XIAP, the guardian angel. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:550-6.
35. Muris JJ, Cillessen SA, Vos W, van Houdt IS, Kummer JA, van Krieken JH, Jiwa NM, Jansen PM, Kluin-Nelemans HC, Ossenkoppele GJ, Gundy C, Meijer CJ, and Oudejans JJ: Immunohistochemical profiling of caspase signaling pathways predicts clinical response to chemotherapy in primary nodal diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 2005;105:2916-23.
36. Tamm I, Richter S, Oltersdorf D, Creutzig U, Harbott J, Scholz F, Karawajew L, Ludwig WD, and Wuchter C: High expression levels of x-linked inhibitor of apoptosis protein and survivin correlate with poor overall survival in childhood de novo acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2004;10:3737-3744.
37. Mizutani Y, Nakanishi H, Li YN, Matsubara H, Yamamoto K, Sato N, Shiraishi T, Nakamura T, Mikami K, Okihara K, Takaha N, Ukimura O, Kawauchi A, Nonomura N, Bonavida B, and Miki T: Overexpression of XIAP expression in renal cell carcinoma predicts a worse prognosis. *Int J Oncol* 2007;30:919-25.
38. Ramp U, Krieg T, Caliskan E, Mahotka C, Ebert T, Willers R, Gabbert HE, and Gerharz CD: XIAP expression is an independent prognostic marker in clear-cell renal carcinomas. *Hum Pathol* 2004;35:1022-8.
39. Dai Y, Rahmani M, Dent P, and Grant S: Blockade of histone deacetylase inhibitor-induced RelA/p65 acetylation and NF-kappaB activation potentiates apoptosis in leukemia cells through a process mediated by oxidative damage, XIAP downregulation, and c-Jun N-terminal kinase 1 activation. *Mol Cell Biol* 2005;25:5429-44.
40. Stehlik C, de Martin R, Kumabashiri I, Schmid JA, Binder BR, and Lipp J: Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *J Exp Med* 1998;188:211-216.
41. Holcik M, Lefebvre C, Yeh C, Chow T, and Korneluk RG: A new internal-ribosome-entry-site motif potentiates XIAP-mediated cytoprotection. *Nat Cell Biol* 1999;1:190-2.
42. Holcik M, Yeh C, Korneluk RG, and Chow T: Translational upregulation of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) increases resistance to radiation induced cell death. *Oncogene* 2000;19:4174-7.
43. Nevins TA, Harder ZM, Korneluk RG, and Holcik M: Distinct regulation of internal ribosome entry site-mediated translation following cellular stress is mediated by apoptotic fragments of eIF4G translation initiation factor family members eIF4G1 and p97/DAP5/NAT1. *J Biol Chem* 2003;278:3572-9.
44. Yoon A, Peng G, Brandenburger Y, Zollo O, Xu W, Rego E, and Ruggero D: Impaired control of IRES-mediated translation in X-linked dyskeratosis congenita. *Science* 2006;312:902-6.
45. Ungureanu NH, Cloutier M, Lewis SM, de Silva N, Blais JD, Bell JC, and Holcik M: Internal ribosome entry site-mediated translation of Apaf-1, but not XIAP, is regulated during UV-induced cell death. *J Biol Chem* 2006;281:15155-63.
46. Holcik M: Translational upregulation of the X-linked inhibitor of apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1010:249-58.

47. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, and Vaux DL: Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000;102:43-53.
48. Du C, Fang M, Li Y, Li L, and Wang X: Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000;102:33-42.
49. Liston P, Fong WG, Kelly NL, Toji S, Miyazaki T, Conte D, Tamai K, Craig CG, McBurney MW, and Korneluk RG: Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity. *Nat Cell Biol* 2001;3:128-133.
50. Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, and Takahashi R: A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* 2001;8:613-21.
51. Nowak-Gottl U, Dubbers A, Kececioglu D, Koch HG, Kotthoff S, Runde J, and Vielhaber H: Factor V Leiden, protein C, and lipoprotein (a) in catheter-related thrombosis in childhood: a prospective study. *J Pediatr* 1997;131:608-12.
52. Gopel W, Kim D, and Gortner L: Prothrombotic mutations as a risk factor for preterm birth. *Lancet* 1999;353:1411-2.
53. von Kries R, Junker R, Oberle D, Kosch A, and Nowak-Gottl U: Foetal growth restriction in children with prothrombotic risk factors. *Thromb Haemost* 2001;86:1012-1016.
54. Infante-Rivard C, Rivard G-E, Yotov WV, Genin E, Guiguet M, Weinberg C, Gauthier R, and Feoli-Fonseca JC: Absence of association of thrombophilia polymorphisms with intrauterine growth restriction. *N Engl J Med* 2002;347:19-25.
55. Gopel W, Ludwig M, Junge AK, Kohlmann T, Diedrich K, and Moller J: Selection pressure for the factor-V-Leiden mutation and embryo implantation. *Lancet* 2001;358:1238-1239.
56. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, and Bertina RM: A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 1996;88:3698-703.
57. Moreira A, Takagaki Y, Brackenridge S, Wollerton M, Manley JL, and Proudfoot NJ: The upstream sequence element of the C2 complement poly(A) signal activates mRNA 3' end formation by two distinct mechanisms. *Genes Dev* 1998;12:2522-34.
58. Brackenridge S, and Proudfoot NJ: Recruitment of a basal polyadenylation factor by the upstream sequence element of the human lamin B2 polyadenylation signal. *Mol Cell Biol* 2000;20:2660-9.
59. Natalizio BJ, Muniz LC, Arhin GK, Wilusz J, and Lutz CS: Upstream elements present in the 3'-untranslated region of collagen genes influence the processing efficiency of overlapping polyadenylation signals. *J Biol Chem* 2002;277:42733-40.
60. Kaufmann I, Martin G, Friedlein A, Langen H, and Keller W: Human Fip1 is a subunit of CPSF that binds to U-rich RNA elements and stimulates poly(A) polymerase. *Embo J* 2004;23:616-26.

61. Stein GS, Stein JL, van Wijnen AJ, and Lian JB: Regulation of histone gene expression. *Curr Opin Cell Biol* 1992;4:166-73.
62. Sparks KA, and Dieckmann CL: Regulation of poly(A) site choice of several yeast mRNAs. *Nucleic Acids Res* 1998;26:4676-87.
63. Lou H, and Gagel RF: Alternative RNA processing--its role in regulating expression of calcitonin/calcitonin gene-related peptide. *J Endocrinol* 1998;156:401-5.
64. Barabino SM, and Keller W: Last but not least: regulated poly(A) tail formation. *Cell* 1999;99:9-11.
65. LaCasse EC, Cherton-Horvat GG, Hewitt KE, Jerome LJ, Morris SJ, Kandimalla ER, Yu D, Wang H, Wang W, Zhang R, Agrawal S, Gillard JW, and Durkin JP: Preclinical characterization of AEG35156/GEM 640, a second-generation antisense oligonucleotide targeting X-linked inhibitor of apoptosis. *Clin Cancer Res* 2006;12:5231-41.
66. Ziegler DS, Wright RD, Kesari S, Lemieux ME, Tran MA, Jain M, Zawel L, and Kung AL: Resistance of human glioblastoma multiforme cells to growth factor inhibitors is overcome by blockade of inhibitor of apoptosis proteins. *J Clin Invest* 2008;118:3109-22.
67. Cillessen SA, Reed JC, Welsh K, Pinilla C, Houghten R, Hooijberg E, Deurhof J, Castricum KC, Kortman P, Hess CJ, Ossenkoppele GJ, Meijer CJ, and Oudejans JJ: Small-molecule XIAP antagonist restores caspase-9-mediated apoptosis in XIAP-positive diffuse large B-cell lymphoma cells. *Blood* 2007.
68. Schimmer AD, Welsh K, Pinilla C, Wang Z, Krajewska M, Bonneau MJ, Pedersen IM, Kitada S, Scott FL, Bailly-Maitre B, Glinsky G, Scudiero D, Sausville E, Salvesen G, Nefzi A, Ostresh JM, Houghten RA, and Reed JC: Small-molecule antagonists of apoptosis suppressor XIAP exhibit broad antitumor activity. *Cancer Cell* 2004;5:25-35.
69. Fulda S, Wick W, Weller M, and Debatin KM: Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo. *Nat Med* 2002;8:808-815.
70. Kashkar H, Deggerich A, Seeger JM, Yazdanpanah B, Wiegmann K, Haubert D, Pongratz C, and Kronke M: NF- κ B independent down-regulation of XIAP by bortezomib sensitizes HL B-cells against cytotoxic drugs. *Blood* 2006.
71. Schimmer AD, Estey EH, Borthakur G, Carter BZ, Schiller GJ, Tallman MS, Altman JK, Karp JE, Kassis J, Hedley DW, Brandwein J, Xu W, Mak DH, LaCasse E, Jacob C, Morris SJ, Jolivet J, and Andreeff M: Phase I/II trial of AEG35156 X-linked inhibitor of apoptosis protein antisense oligonucleotide combined with idarubicin and cytarabine in patients with relapsed or primary refractory acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2009;27:4741-6.

7. DANKSAGUNG

An erster Stelle gilt mein Dank meinen Mentoren Herrn Prof. Dr. G. Henze, Herrn Prof. Dr. A.E. Kulozik und Herrn Prof. Dr. M. Hentze, ohne die das Zustandekommen dieser Habilitationsarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Prof. Dr. G. Henze und Herrn Prof. Dr. A.E. Kulozik danke ich für die hervorragenden Arbeitsbedingungen und die fortgesetzte persönliche Förderung, die meine wissenschaftliche neben der klinischen Ausbildung ermöglichte. Weiterhin danke ich ihnen für ihre fortwährenden kompetenten Anleitungen in allen klinischen wie wissenschaftlichen Fragen.

Herrn Prof. Dr. M. Hentze danke ich für die Möglichkeit einer fundierten molekularbiologischen Ausbildung sowie für viele geduldige Erläuterungen der Mysterien der Molekularbiologie.

Ich danke den Mitgliedern der Arbeitsgruppen von Prof. Henze, Prof. Kulozik und Prof. Hentze für ihre jederzeit offene und hilfsbereite Art. Besonders erwähnen möchte ich Dunja Ferring-Appel, Christian Thoma und Bruno Galy, mit denen mich nicht nur zahllose wissenschaftliche und nicht-wissenschaftliche Diskussionen verbinden.

Meiner Familie danke ich für ihr liebevolles Verständnis für meine häufige körperliche und/oder geistige Abwesenheit. Ohne den außergewöhnlichen Rückhalt, den mir meine Familie jederzeit gewährte, wäre die Arbeit für diese Habilitationsschrift in keiner Phase denkbar gewesen.

Für die Bereitstellung der finanziellen Mittel zur Umsetzung der experimentellen Arbeiten danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Berliner Krebsgesellschaft, der Deutschen José Carreras Leukämienstiftung sowie der universitären Forschungsförderung der Forschungskommission der Charité.

8. ERKLÄRUNG

Eidesstattliche Versicherung

gemäß Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité Berlin

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 05.01.2011

Dr. Patrick Hundsdörfer