

4 Ergebnisse

Ich möchte in dieser Arbeit meine Ergebnisse zum molekularen Mechanismus der Prothrombin 20210 G→A Mutation sowie funktionelle Untersuchungen des humanen NMD vorstellen. Aus diesem Grunde ist der Ergebnisteil in drei Unterkapitel aufgeteilt. Zum leichteren Verständnis wird in jedem Kapitel zunächst das experimentelle System vorgestellt sowie die Versuche, mit denen die Eignung des Systems für die geplanten Untersuchungen bestätigt werden konnte.

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

Eine Punktmutation in der 3'untranslatierten Region des Prothrombin-Gens (Gerinnungsfaktor II; *F2*) wurde vor einiger Zeit als verbreiteter Risikofaktor für das Auftreten venöser thromboembolischer Ereignisse (VTE) identifiziert (Poort *et al.*, 1996). Diese G→A Transition an Position 20210 verändert das letzte Nukleotid der mRNA und ist mit erhöhten Prothrombin-Plasmakonzentrationen bei Trägern der Mutation verbunden (Cattaneo *et al.*, 1999; Makris *et al.*, 1997; Poort *et al.*, 1996; Tosetto *et al.*, 1999). Dieser erhöhte Prothrombin-Spiegel im Plasma der Betroffenen scheint eine maßgebliche Rolle bei der Pathogenese zu spielen, da er zu einem Ungleichgewicht zwischen prokoagulatorischen, antikoagulatorischen und fibrinolytischen Faktoren führt (Makris *et al.*, 1997; Poort *et al.*, 1996). Der zugrundeliegende molekulare Mechanismus konnte jedoch bisher nicht aufgeklärt werden. Mit etwa 1-2% Trägern des Allels 20210A (*F2**A) stellt die Mutation einen der häufigsten Risikofaktoren für venöse Thrombosen dar, was die Notwendigkeit der Aufklärung ihrer molekularen Grundlage unterstreicht (Lane und Grant, 2000).

Die G→A Mutation befindet sich in der 3'untranslatierten Region des Prothrombin-Gens, 20 Nukleotide stromabwärts des Poly(A)-Signals, repräsentiert durch das hochkonservierte Hexanukleotid AAUAAA. An dieser Position wird die prä-mRNA im Verlauf der 3'End-Prozessierung endonukleolytisch gespalten und der Poly(A)-Schwanz angehängt (Zhao *et al.*, 1999). Die Funktion dieser Nukleotidposition ist bisher nicht vollständig aufgeklärt worden, ein Einfluß

dieser Position auf die Effizienz der 3'End-Formation konnte aus *in vitro* Daten jedoch nicht abgeleitet werden (Chen *et al.*, 1995; Sheets *et al.*, 1990). Weitere krankheitsassoziierte Mutationen an einer korrespondierenden Position in anderen Genen sind bis heute nicht beschrieben worden.

4.1.1 Experimentelles System

Das Prothrombin-Gen besteht aus 14 Exons und 13 Introns, die mehr als 20 kb genomischer Sequenz umfassen (siehe **Abb. 4**, *Einleitung*). Es ist folglich nicht in einfach zu handhabende Vektoren zur Expression in Eukaryonten klonierbar, um die Auswirkungen der Mutation in einem Zellkultursystem zu untersuchen. Aus diesem Grund wurde ein experimentelles System etabliert, das auf einem

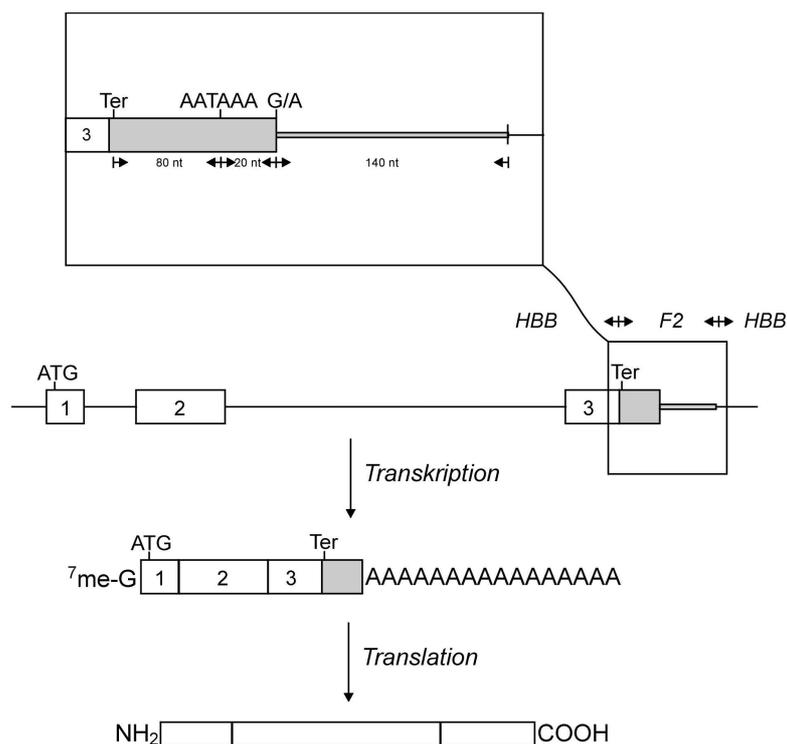


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Hybridkonstrukte aus Prothrombin (*F2*) und β -Globin (*HBB*). In den Hybridkonstrukten wurden die 3'UTR inklusive des Poly(A)-Signals (AATAAA), die Spaltungsstelle sowie 62 nt 3' flankierender Sequenzen inklusive die U-reiche Region des β -Globin-Gens durch die korrespondierenden Sequenzen des Prothrombin-Gens ersetzt, entweder mit einem normalen G (*F2*G*) oder dem mutierten A (*F2*A*) an der Spaltungsstelle. Der von Prothrombin stammende Teil der Konstrukte und der mRNA ist grau dargestellt. Die Konstrukte werden in eine mRNA mit Prothrombin 3'UTR transkribiert, das entstehende Protein enthält keine Prothrombin-Sequenzen.

Hybridkonstrukt aus dem humanen β -Globin-Gen (*HBB*) und dem humanen Prothrombin-Gen (*F2*) beruht. Um den molekularen Mechanismus der erhöhten Prothrombin-Konzentration zu untersuchen, wurde die *HBB* 3'UTR und 62 nt 3'flankierender Sequenzen durch die *F2* 3'UTR mit 140 nt flankierender Sequenzen ersetzt (**Abb. 8**). Auf diese Weise wurde ein erheblicher Teil des großen Prothrombin-Gens durch ein kleines Gen substituiert, das in transfizierten Zellen effizient gespleißt wird und dessen mRNA eine ähnliche Stabilität aufweist (Ross und Pizarro, 1983).

4.1.2 Die *F2* 20210 G→A Mutation führt zu erhöhter mRNA- und Protein-Akkumulation

Zuerst sollte die Funktionalität des experimentellen Systems getestet werden. Hierzu wurde die Expression der Hybridkonstrukte entweder mit einem A an der Spaltungsstelle (*F2**A) oder dem normalen G (*F2**G) in transfizierten HeLa-Zellen untersucht (für eine genaue Beschreibung der Konstrukte siehe *Material und Methoden*). Die Analyse zytoplasmatischer RNA mittels Northern Blot ergab eine im Mittel 1,8fach erhöhte Akkumulation der *F2**A mRNA im Vergleich zur *F2**G mRNA (n = 8; Standardabweichung = 0,27; Werte im Bereich von 1,4 – 2,2fach; siehe **Abb. 9a**). Die Analyse der Proteinexpression derselben transfizierten Zellen zeigte, daß ebenfalls eine größere Menge Protein vom mutierten Konstrukt (*F2**A) im Vergleich zum normalen Konstrukt (*F2**G) entsteht (**Abb. 9b**). Die Erhöhung der Proteinmenge entspricht quantitativ der Erhöhung der mRNA Menge, folglich ist die erhöhte Proteinexpression des *F2**A Konstruktes nicht auf eine verbesserte Translatierbarkeit seiner mRNA zurückzuführen. Diese ersten Ergebnisse, die mit dem experimentellen System gewonnen wurden, korrespondieren mit den 1,25-1,3fach erhöhten Prothrombin Plasmakonzentrationen heterozygoter Träger des 20210A Allels (d. h. einer errechneten 1,5-1,6fachen Erhöhung bei Homozygoten, für die es bislang keine verfügbaren Daten gibt) im Vergleich zu nicht betroffenen Individuen. Das experimentelle System spiegelt somit die Unterschiede der Prothrombin-Expression beim Menschen wider.

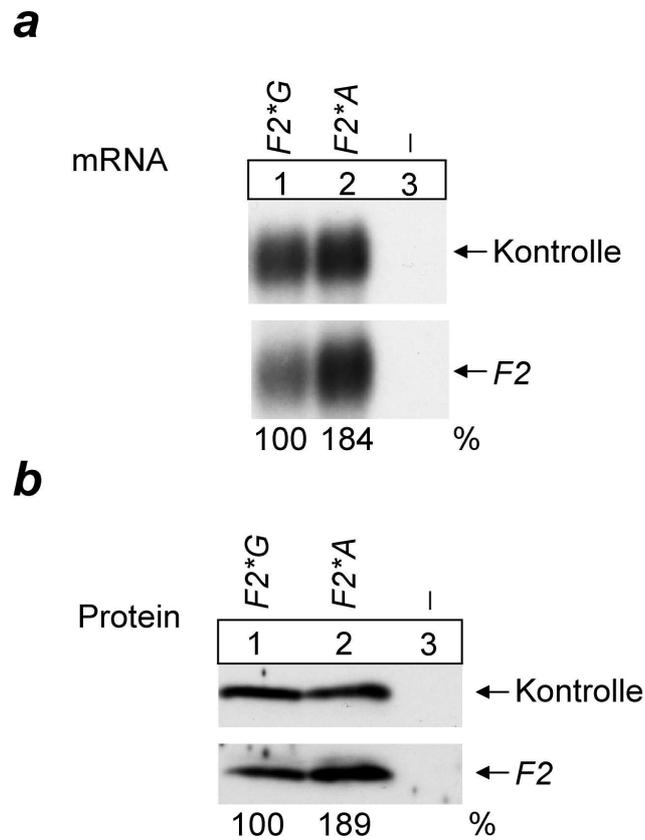


Abbildung 9: **a**, Northern-Blot-Analyse zytoplasmatischer RNA-Präparationen. Die Zellen wurden entweder mit dem normalen *F2*G* (Spur 1) oder dem mutierten *F2*A* (Spur 2) Konstrukt transfiziert. Spur 3 enthält eine RNA-Präparation untransfizierter Zellen. Die Hybridisierung erfolgte mit einer *HBB*-spezifischen cRNA Sonde, die sowohl für die Detektion der *F2*-mRNAs als auch der Kontroll-mRNAs (WT+300) geeignet ist. Die angegebenen Expressionsstärken stellen den Mittelwert aus acht unabhängigen Experimenten dar (siehe Text). **b**, Immunblot von Proteinlysaten derselben Zellen mit einem β -Globin spezifischen Antikörper (Spur 1: *F2*G*; Spur 2: *F2*A*; Spur 3: untransfizierte Zellen). Eine Kreuzreaktivität des Antikörpers mit Proteinen der untransfizierten Zellen wurde nicht beobachtet.

4.1.3 Die *F2 20210 G→A* Mutation erhöht die mRNA Expression auf post-transkriptionaler Ebene

Die 3'-untranslatierte Region ist bislang nicht als transkriptionaler Regulator der Genexpression bekannt. Dennoch mußte ausgeschlossen werden, daß die unterschiedliche Expression der beiden Konstrukte durch unterschiedliche Transkriptionsraten zustande kommt. Zwischen einem transkriptionalen oder post-transkriptionalen Mechanismus als Ursache der erhöhten *F2*A* mRNA Expression

4.1.4 *F2*A* und *F2*G* mRNAs weisen identische Poly(A)-Schwänze und 3'UTRs auf

Die kritische Position der G→A Mutation an der Spaltungsstelle der prä-mRNA impliziert eine Veränderung der 3'End-Prozessierung durch die Mutation. Dies können zum einen strukturelle Veränderungen sein (Länge des Poly(A)-Schwanzes und/oder Position der 3'End-Prozessierung), zum anderen funktionelle Veränderungen (Effizienz der 3'End-Prozessierung). Zuerst wurde die Länge der Poly(A)-Schwänze beider mRNAs mit Hilfe eines LM-PAT Assays untersucht (Salles *et al.*, 1999) (schematische Darstellung des Assays siehe **Abb. 11b**), da ein längerer Poly(A)-Schwanz bei einer mRNA zu einer verbesserten zyttoplasmatischen Stabilität und somit zu einer erhöhten Zahl von translatierbaren Transkripten führen könnte. Die Analyse ergab jedoch identische Poly(A)-Schwanzlängen für beide mRNAs mit einer vergleichbaren Längenverteilung (**Abb. 11a**). Die Spezifität des Assays wurde durch einen *XhoI*-Verdau der LM-PAT-Produkte überprüft, was zusätzlich zu einer erhöhten Auflösung der Signale führt (**Abb 11a**, Spuren 5 & 6). Die erhöhte Expression des mutierten Konstruktes

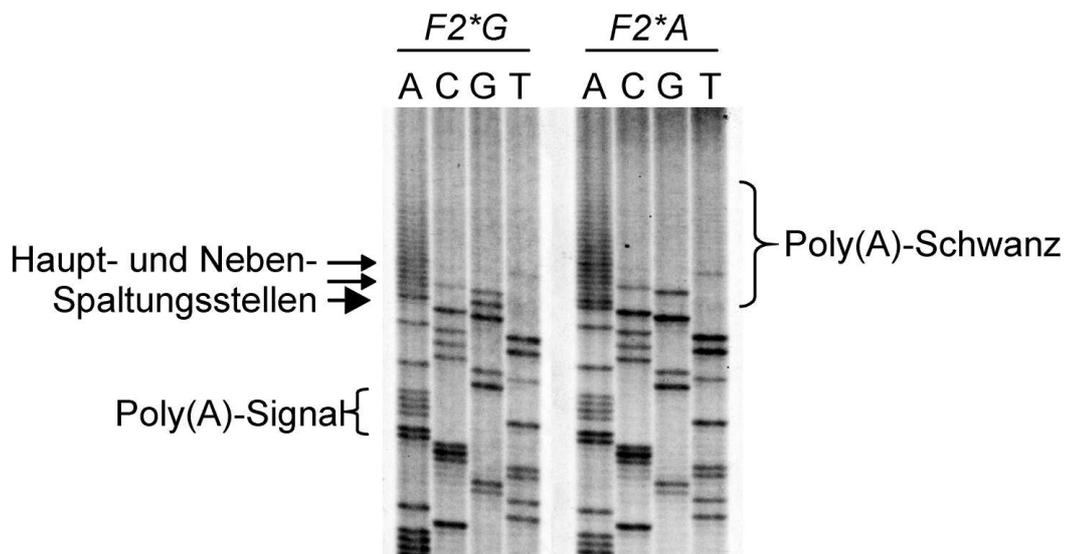


Abbildung 82: RT-PCR Sequenzierung der 3'UTRs der *F2*G*- und *F2*A*-mRNAs. Die Position der Haupt- und Nebenspaltungsstellen und des Poly(A)-Signals ist dargestellt. Der Poly(A)-Schwanz ist in dieser Sequenzreaktion ebenfalls deutlich zu erkennen.

kann also nicht mit einem verlängerten Poly(A)-Schwanz erklärt werden.

Die 3'End-Prozessierung von prä-mRNAs erfolgt an einer möglichst optimalen Spaltungsposition, die aufgrund des Kontextes von Poly(A)-Signal (AAUAAA) und U-reichem Sequenzelement (stromab der Spaltungsstelle gelegen) von den Faktoren des 3'End-Prozessierungsapparates ausgewählt wird (Chou *et al.*, 1994). Es ist bekannt, daß sowohl die Sequenz des Poly(A)-Signals als auch des U-reichen Sequenzelements die Prozessierungseffizienz bestimmen (Chou *et al.*,

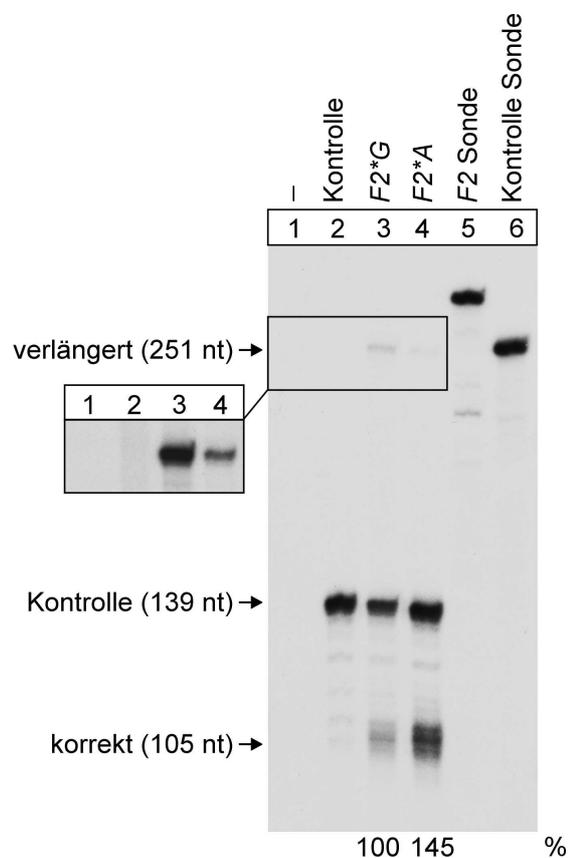


Abbildung 13: Ribonuklease Protektionsanalyse aller Transkripte der *F2*A* und *F2*G* Konstrukte. Die Sonde reicht vom Terminationskodon bis in die 3' flankierenden Sequenzen der Hybrid-mRNAs. Die korrekt prozessierten (105 nt) und die 3' verlängerten (251 nt) Transkripte sind bezeichnet. Die Kontroll-mRNA (*HBB*) ergibt ein protektiertes Fragment von 139 nt. Der eingefügten Kasten enthält eine fünfmal längere Exposition der oberen Banden. Spuren 1 und 2 stellen Analysen der RNA-Präparationen untransfizierter bzw. kontroll-transfizierter Zellen dar. Die Expressionsstärken repräsentieren den Mittelwert von drei unabhängigen Analysen.

1994; Colgan und Manley, 1997). Erstaunlicherweise folgt die Sequenz an der eigentlichen Spaltungsstelle keinem strikten Konsensus, jedoch findet man am häufigsten die CA-Spaltungsstelle, die auch bei der *F2*A* mRNA vorliegt (Wahle und Ruegsegger, 1999) (Zhao *et al.*, 1999). Untersuchungen in einem *in vitro* System haben gezeigt, daß ein CA-Dinukleotid gegenüber einem CG-Dinukleotid bevorzugt als Spaltungsstelle gewählt wird (Chen *et al.*, 1995). Daher wäre es möglich, daß *F2*A* und *F2*G* mRNAs an unterschiedlichen Positionen prozessiert werden. Dies würde bedeuten, daß sich die 3'UTRs der beiden mRNAs in Länge und Zusammensetzung unterscheiden, wodurch eine unterschiedliche Stabilität bedingt sein könnte. Die 3'UTRs beider mRNAs wurden mittels RT-PCR (reverse Transkription - Polymerase Kettenreaktion) Sequenzierung untersucht. Die Sequenz zeigt deutlich, daß bei der Mehrzahl der Transkripte der Poly(A)-Schwanz an der Position des CG- bzw. CA-Dinukleotids angehängt wurde (**Abb. 12**). Nur eine geringe Anzahl von mRNAs beider Konstrukte wird an Positionen 4 bzw. 6 nt weiter stromabwärts polyadenyliert. Die 3'UTRs der beiden mRNAs sind also bis auf die G→A Mutation in Länge und Zusammensetzung identisch.

4.1.5 Die Mutation *F2 20210 G→A* bewirkt eine Erhöhung der 3'End-Prozessierungseffizienz

Als nächstes sollte überprüft werden, ob sich die beiden mRNAs in der Effizienz ihrer 3'End-Prozessierung unterscheiden. RNA-Präparationen von transfizierten HeLa-Zellen wurden mittels Ribonuklease-Protektions-Analyse untersucht, um die 3'Enden aller entstehenden Transkripte zu erfassen. Durch diese Analyse konnten nochmals die quantitativen Unterschiede bei der Expression der reifen *F2*G* bzw. *F2*A* mRNAs bestätigt werden (**Abb 13**, Spuren 3 & 4, vergleiche die mit „korrekt“ bezeichneten Banden). Überraschenderweise wurde von der Sonde eine zweite Spezies von Transkripten detektiert, die nicht an der erwarteten Position 3'End-prozessiert wurde, sondern offenbar verlängerte 3'Enden aufweist (**Abb 13**, Spuren 3 & 4, bezeichnet mit „verlängert“, siehe auch den eingefügten Ausschnitt einer verlängerten Exposition). Die am 3'Ende verlängerten Transkripte könnten durch die ineffiziente Erkennung des *F2*-3'End-

Prozessierungssignals entstehen, wodurch es zu einem Durchlesen der Poly(A)-Stelle kommt.

Besonders bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, daß von den 3'verlängerten Transkripten deutlich mehr bei der *F2*G* mRNA als bei der *F2*A* mRNA entsteht. Dies ist relativ unerwartet, da man bei den korrekt prozessierten Transkripten genau umgekehrt einen Überschuß von mRNAs mit der Mutation beobachtet. Dieses Ergebnis könnte bedeuten, daß die G→A Mutation eine Erhöhung der 3'End-Prozessierungseffizienz zur Folge hat.

Diese Hypothese sollte direkt getestet werden. Dazu wurde ein *in vivo* Kompletions-Assay etabliert, bei dem die verwendeten Konstrukte zwei hintereinander gelegene 3'End-Formations-Signale in Folge tragen, bestehend aus dem Poly(A)-Signal, der Spaltungsstelle und 3'flankierenden Sequenzen (inklusive U-reichen Sequenzelementen, **Abb. 14a**). Die beiden 3'End-

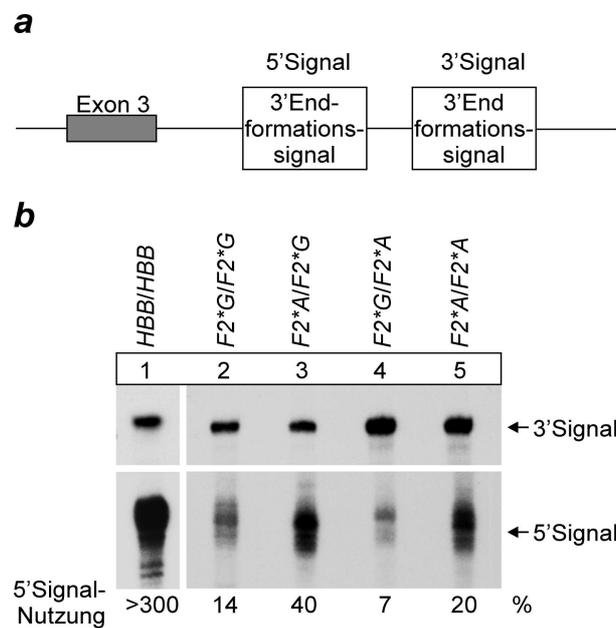


Abbildung 14: **a**, Schematische Darstellung der Kompetitions-Konstrukte mit zwei hintereinander gelegenen 3'End-Formations-Signalen. **b**, HeLa-Zellen wurden mit den jeweils angegebenen Kompetitions-Konstrukten transfiziert und Ribonuklease-Protektions-Analysen von zytoplasmatischer Gesamt-RNA dieser Zellen durchgeführt. Die Sonden reichen über die beiden kompetitierenden Signale, so daß die 3'End-Prozessierungseffizienzen mit nur einer Sonde direkt verglichen werden können. Aufgrund der wesentlich schwächeren Signale wurde der untere Teil der Abbildung viermal länger exponiert als der obere Teil.

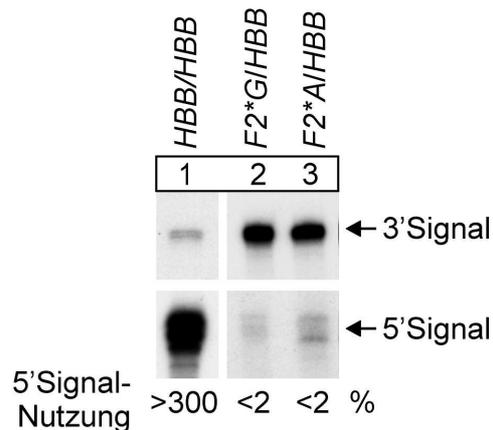


Abbildung 15: Ribonuklease-Protektionsanalyse von Konkurrenzkonstrukten mit jeweils einer Variante einer *F2* 3'End-Prozessierungsstelle (Spur 2: *F2**G; Spur 3: *F2**A) und einer dahinter gelegenen β -Globin 3'End-Prozessierungsstelle, bzw. zwei β -Globin Prozessierungsstellen im direkten Vergleich (Spur 1). Der untere Teil der Abbildung wurde etwa fünfmal länger exponiert als der obere.

Formations-Signale innerhalb einer prä-mRNA können direkt miteinander um die 3'End-Prozessierung konkurrieren, daher kann man die Prozessierungseffizienzen der Signale direkt miteinander vergleichen. Als Kontrolle für die Funktion des Konkurrenz-Assay diente ein Konstrukt mit zwei identischen β -Globin 3'End-Prozessierungs-Signalen (*HBB/HBB*). Die Transkripte dieses Konstruktes wurden in transfizierten Zellen bevorzugt am 5'gelegenen Signal (d. h. am vorderen Signal) prozessiert (Verhältnis >3:1, **Abb. 14b**, Spur 1), was eine hohe Effizienz der β -Globin 3'End-Prozessierung bestätigt (Batt *et al.*, 1994). Im Gegensatz dazu beobachtet man bei Konstrukten mit zwei Prothrombin 3'End-Prozessierungs-Signalen eine verstärkte Verwendung des 3'gelegenen Signals, was auf eine geringe Effizienz des *F2*-Signals hinweist (**Abb. 14b**, Spuren 2-5). Ein direkter Vergleich der *F2**G- und *F2**A-Signale in diesem Assay zeigt deutlich die erhöhte Effizienz des *F2**A-Signals, die 3'End-Prozessierung zu induzieren. Durch diese Ergebnisse kann eindeutig belegt werden, daß die Rate der korrekten 3'End-Prozessierung durch die *F2* 20210 G→A Mutation erhöht wird.

In einem abschließenden Experiment wurden die β -Globin- und Prothrombin-Signale miteinander im Konkurrenz-Assay verglichen. Als Kontrolle diente erneut das Konstrukt mit zwei β -Globin-Signalen, dessen Transkripte – wie auch

schon vorher beobachtet – bevorzugt am 5' gelegenen Signal prozessiert werden. Die Transkripte der beiden Konstrukte mit einem 5' gelegenen *F2*-Signal (entweder mit einem G oder einem A) und einem dahinter liegenden β -Globin-Signal wurden fast ausschließlich am β -Globin-Signal prozessiert (d.h. am 3'gelegenen Signal; **Abb. 15**, Spuren 2 & 3). Dies belegt, daß die 3'End-Prozessierung von Prothrombin im Vergleich zum β -Globin sehr ineffizient abläuft.

Die hier präsentierten Experimente haben zur Identifikation der erhöhten Effizienz der 3'End-Prozessierung als neuartigem molekularen Mechanismus einer hereditären Erkrankung geführt. Sie zeigen ferner die weitreichenden Auswirkungen einer nur geringen Aktivierung der mRNA-Prozessierung auf das Gleichgewicht der Blutgerinnung.

Die nun folgenden beiden Abschnitte werden sich mit Untersuchungen zum Mechanismus des Nonsense-vermittelten mRNA-Abbaus beschäftigen. Zum einen werden Analysen zur Rolle des Poly(A)-Schwanzes beim NMD beschrieben, zum anderen wird ein neues experimentelles System vorgestellt, um Faktoren des NMD zu identifizieren und charakterisieren.

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

Der Poly(A)-Schwanz eukaryontischer mRNAs erhöht sowohl die Effizienz des Spleißens als auch die Effizienz der Translation (Gray *et al.*, 2000; Gray und Wickens, 1998; Minvielle-Sebastia und Keller, 1999; Preiss und Hentze, 1998; Tarun und Sachs, 1995), beides unverzichtbare Voraussetzungen für den humanen NMD. Es wäre daher möglich, daß der Poly(A)-Schwanz ein wichtiges *cis*-agierendes Element innerhalb von NMD-kompetenten mRNPs darstellt. Diese Hypothese wurde in einem experimentellen System untersucht, das die Analyse von nicht-polyadenylierten β -Globin mRNAs (entweder Nonsens-mutiert oder nicht) mit Histon-3'UTRs ermöglicht (für einen Vergleich der charakteristischen Funktionen beider mRNA-3'Enden siehe **Abb. 16**). Fast alle mRNAs in Vertebraten werden an ihrem 3'Ende mit einem Poly(A)-Schwanz versehen. Eine Ausnahme bilden die mRNAs von Histonen des Replikationstyps (Dominski und Marzluff, 1999). Anstatt eines Poly(A)-Schwanzes weisen sie an ihrem 3'Ende eine Sekundärstruktur (sogenannte Stem-Loop-Struktur) auf, über die zellzyklusabhängig die Stabilität der Histon-mRNA reguliert wird. An die Sekundärstruktur des 3'Endes, den sogenannten Histon-Stem-Loop, bindet das

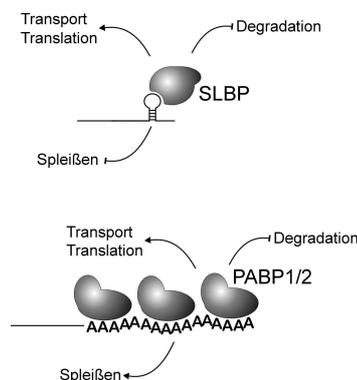


Abbildung 16: Vergleich der Funktion der in Vertebraten vorkommenden mRNA 3'Enden. Sowohl Poly(A)-Schwanz, als auch Histon 3'Ende stimulieren Transport und Translation und schützen das 3'Ende der mRNA vor Degradation. Im Gegensatz zum Histon 3'Ende stimuliert jedoch ein Poly(A)-Schwanz (bzw. der Vorgang der Polyadenylierung im Zuge der 3'End-Prozessierung) den Spleißvorgang.

„stem-loop binding protein“ (SLBP, auch genannt „histone hairpin-binding-protein“, HBP), das für die Prozessierung, den Export und die Stabilitätsregulation der mRNA verantwortlich ist (Dominski *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 1997; Muller und Schumperli, 1997; Wang *et al.*, 1996; Whitfield *et al.*, 2000).

4.2.1 Experimentelles System

Für die Untersuchung von nicht-polyadenylierten mRNAs wurde in einem genomischen β -Globin-Expressionsvektor die 3'UTR des β -Globins-Gens (*HBB*) durch die 3'UTR und 3'flankierenden Sequenzen des H1F3-Histon-Gens (*H1F3*) ersetzt (Abb. 17). Diese Sequenzen enthalten das Histon 3'End-Prozessierungssignal, das für die effiziente Verarbeitung der prä-mRNAs notwendig ist. Es ist bekannt, daß das Histon 3'Ende den nukleocytoplasmatischen Transport, die zytoplasmatische Stabilität und die Translation in einer Poly(A)-unabhängigen Weise fördert (Muller und Schumperli, 1997). Die Verwendung eines Hybridkonstruktes aus *HBB* und *H1F3* hat gegenüber der Untersuchung eines unveränderten Histon-Gens zwei wichtige Vorteile. Histon-Gene werden als mRNAs ohne Introns exprimiert, daher können Nonsense-Mutationen nicht erkannt werden (Brocke *et al.*, 2002; Maquat und Li, 2001; Neuyilik *et al.*, 2001). Man müßte also heterologe Introns in das Histon-Gen

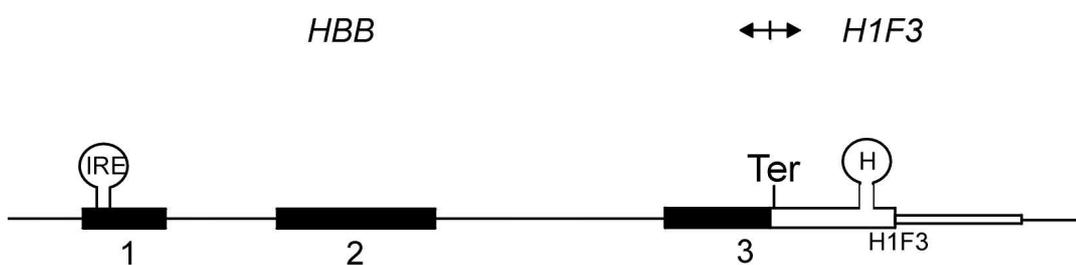


Abbildung 17: Schematische Darstellung des *HBB/H1F3* Hybridgens mit den Modifizierungen in der 5'UTR und 3'UTR. Das Konstrukt besteht aus dem genomischen β -Globin Gen (*HBB*) mit oder ohne einer Nonsense-Mutation an Position 39 (die Konstrukte werden bezeichnet als WT IRE/H1 für das Konstrukt ohne Nonsense-Mutation und NS 39 IRE/H1 für das Konstrukt mit der Nonsense-Mutation, hier nicht abgebildet; Konstrukte mit nicht-funktionellen IREs in der 5'UTR tragen die Bezeichnungen WT Δ C/H1 bzw. NS 39 Δ C/H1). Die intronlosen Varianten enthalten nur einen cDNA ORF (bezeichnet als cWT/H1 und cNS 39/H1). Direkt vor dem Terminationskodon wurde eine *Xho*I Schnittstelle eingefügt, um die heterologen Sequenzen einfügen zu können. Das Terminationskodon, die 3'UTR und 918 nt flankierender Sequenzen stammen vom *H1F3* Gen (hell dargestellt). IRE: iron responsive element; H: Histon *H1F3* Stem-Loop.

einfügen, damit es die Voraussetzungen zur Erkennung eines PTC erfüllt. Es ist offensichtlich, daß damit wiederum eine Reihe von experimentellen Parametern verändert werden, deren Auswirkungen erst einmal analysiert werden müssen. Zusätzlich wurde der Vorgang des NMD im β -Globin-System bereits eingehend untersucht, es steht also ein etabliertes System für den NMD zu Verfügung.

Es wurden zwei Modifikationen der Hybridkonstrukte durchgeführt, um die spezifischen Charakteristika des NMD erkennen zu können. In der 5'UTR wurde ein „iron-responsive element“ (IRE) eingefügt, eine Sequenz, die eine spezifische eisenabhängige Regulation der Translation ermöglicht (Hentze *et al.*, 1987a; Hentze *et al.*, 1987b). Diese Regulation der Translation mit Hilfe des IRE wurde bereits schon einmal verwendet, um die Abhängigkeit des NMD von der aktiven Translation der Nonsense-mutierten mRNA zu zeigen (Thermann *et al.*, 1998). Eine nicht-funktionelle Sequenzvariante (IRE Δ C) diene als Negativkontrolle für die Translationsregulation. Zur Kontrolle der Spleißabhängigkeit des NMD wurde eine Variante des Hybridkonstruktes hergestellt, bei der beide Introns entfernt wurden. Dies sollte zu einer Aufhebung des NMD trotz NS-Mutationen in der mRNA führen.

4.2.2 Hybrid-mRNAs aus HBB und H1F3 werden korrekt am 3'Ende prozessiert

Es ist seit längerem bekannt, daß nicht-polyadenylierte mRNAs mit Histon 3'UTRs ineffizient gespleißt werden, während gespleißte mRNAs auch an kryptischen Poly(A)-Signalen polyadenyliert werden (Pandey *et al.*, 1990). Daher wurde zuerst analysiert, ob die Hybrid-mRNAs korrekt prozessiert werden (d. h. gespleißt und mit Histon 3'Ende prozessiert, jedoch nicht kryptisch polyadenyliert). Das Fehlen eines Poly(A)-Schwanzes wurde mittels einer Fraktionierung aller zytoplasmatischen RNAs untersucht. Eine Präparation zytoplasmatischer Gesamt-RNA wurde mit Oligo-dT-Zellulose in eine Fraktion mit und eine Fraktion ohne Poly(A)-Schwänze aufgetrennt. Die Fraktionen wurden mit einer geeigneten Sonde im Ribonuklease-Protektions-Assay analysiert, die sowohl mit dem Histon 3'Ende als auch mit β -Globin-Sequenzen hybridisieren kann (**Abb. 18b**). Dadurch kann man das als Kontrolle für variable

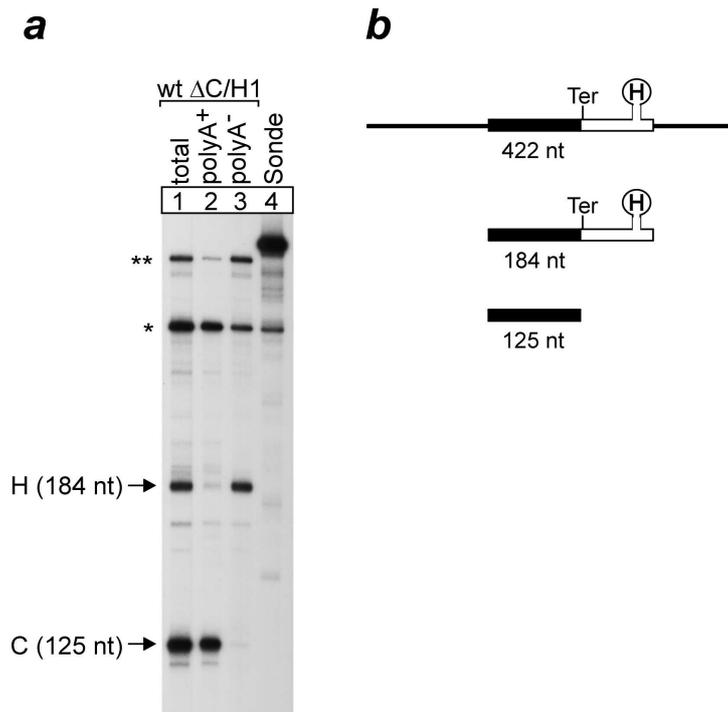


Abbildung 18: **a**, Ribonuklease-Protektions-Analyse einer RNA-Präparation von Zellen, die mit dem Hybridkonstrukt WT Δ C/H1 (d.h. nicht-funktionelles IRE, intronhaltiger ORF ohne Mutation) und normalem β -Globin als Kontrolle transfiziert wurden. Gesamtzytoplasmatische RNA (Spur 1) wurde mit Oligo-dT-Zellulose in eine poly(A)-angereicherte (Spur 2) und eine poly(A)-abgereicherte Fraktion (Spur 3) aufgetrennt. Ein Aliquot der unverdauten Sonde ist in Spur 4 aufgetragen. Die von der Sonde protektierten Fragmente für korrekt 3'End-prozessierte Hybrid-mRNAs (H, 184 nt) und Kontroll-mRNAs (C, 125 nt) sind eingezeichnet. Die zwei zusätzlichen Banden (* und **) entstehen durch aberrante 3'End-Prozessierung (*) bzw. falsches Spleißen (**). **b**, Schematische Darstellung der Sonde mit den erwarteten protektierten Fragmenten. Die 422 nt lange Sonde reicht von Intron 2 über das gesamte Exon 3 mit der Histon 3'UTR bis in die 3' flankierenden Bereiche des Hybridkonstruktes und protektiert daher ein 125 nt langes Fragment der Kontroll-mRNA (β -Globin) und ein 184 nt langes Fragment für die Hybrid-mRNA (*HBB/H1F3*)

Transfektionseffizienzen kotransfizierte β -Globin ebenfalls detektieren. Die Analyse zeigt, daß sowohl die β -Globin Kontroll-mRNA mit dem normalen Poly(A)-Schwanz als auch die Hybrid-mRNA mit dem Histon 3'Ende in der unfraktionierten zytoplasmatischen RNA-Präparation vorliegen (**Abb. 18a**, Spur 1). Wie erwartet, findet man in der Poly(A)-angereicherten Fraktion fast ausschließlich die β -Globin Kontroll-mRNA, in der Poly(A)-negativen Fraktion vor allem die Hybrid-mRNA (**Abb. 18a**, Spuren 2 & 3). Man kann also davon ausgehen, daß die Hybrid-mRNAs die gewünschten nicht polyadenylierten Histon 3'Enden aufweisen.

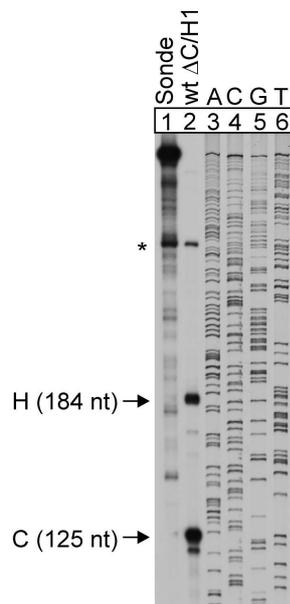


Abbildung 19: Längenbestimmung der protektierten Fragmente der WT Δ C/H1 mRNA mit der Auflösung einer DNA-Sequenzreaktion. Spur 1 zeigt die unverdaute Sonde. Bezeichnung der Fragmente wie in **Abb. 18** eingeführt.

Mit der verwendeten Sonde ist es auch möglich, anhand der Länge der protektierten Fragmente die genaue Position der Histon-Prozessierung zu ermitteln. Im Verlauf der Histon 3'End-Prozessierung bei Vertebraten kommt es zu einer Spaltung direkt angrenzend an der Sequenz ACCCA, die nur wenige Nukleotide stromabwärts des Stem-Loops liegt (Muller und Schumperli, 1997). Durch die genaue Bestimmung der Spaltungsposition ist also zusätzlich zu den Poly(A)-Fraktionierungs-Analysen ein Rückschluß auf die fehlerfreie Prozessierung der Hybrid-mRNAs möglich. Im Ribonuklease-Protektions-Assay werden für die korrekt gespleißte Hybrid-mRNA mit einem Histon 3'Ende ein Fragment von 184 nt erwartet, für die korrekt gespleißte und polyadenylierte Kontroll-mRNA ein Fragment von 125 nt. Die Länge der protektierten Fragmente wurde auf einem hochauflösenden Polyacrylamidgel ermittelt. Zur exakten Bestimmung wurde eine radioaktiv markierte Sequenzreaktion (β -Globin) mit auf das Gel aufgetragen, die eine höhere Genauigkeit der Längenbestimmung als andere herkömmliche Marker erlaubt (**Abb. 19**). Die so ermittelten Längen der protektierten Fragmente entsprachen exakt den erwarteten Fragmentlängen, wodurch die richtige Prozessierungsposition des Histon 3'Endes gezeigt wurde.

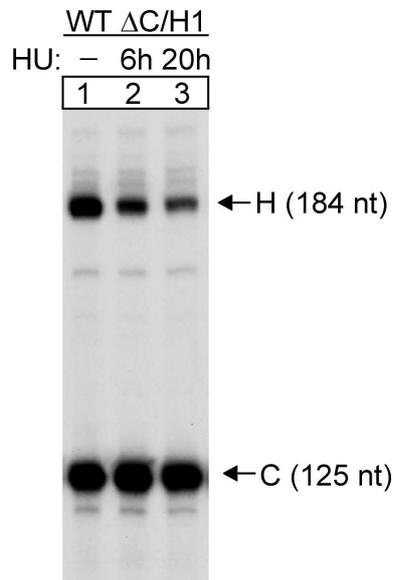


Abbildung 20: Analyse der Zellzyklus-Funktion der Histon 3'Enden in den Hybrid-mRNAs. HeLa-Zellen wurden mit dem Konstrukt WT Δ C/H1 und der Kontrolle β -Globin transfiziert. Zur Blockierung des Eintritts in die S-Phase wurden die Zellen für 6 (Spur 2) oder 20 h (Spur 3) mit Hydroxyharstoff (HU) behandelt, eine unbehandelte Transfektion diente als Negativ-Kontrolle (Spur 1). Die Banden für die Hybrid-mRNAs sind mit H, für die Kontroll-mRNAs mit C bezeichnet.

4.2.3 Hybrid-mRNAs bilden funktionelle Histon 3'Enden

Histon-mRNAs des Replikationstyps werden zellzyklusabhängig destabilisiert, da die Synthese neuer Histonproteine nur während der DNA-Replikation notwendig ist. Diese Destabilisierung ist abhängig von ihrem 3'Ende. Wenn die Hybrid-mRNAs funktionelle Histon 3'Enden aufweisen, sollten sie in Abhängigkeit vom Zellzyklus stabilisiert bzw. destabilisiert werden. Dies ist in einer Population von nicht synchronisierten Zellen nicht direkt erkennbar, jedoch in Zellen, die in einer bestimmten Phase des Zellzyklus arretiert wurden. Für die Untersuchung der Zellzyklusregulation von Histon-mRNAs ist die Blockierung des Zellzyklus vor der S-Phase eine verbreitete Methode. Dazu werden die Zellen mit Hydroxyharnstoff behandelt, einem pharmakologischen Inhibitor der Nukleotidsynthese, der zu einer Anreicherung der Zellen vor der S-Phase führt (Levine *et al.*, 1987). Zur Untersuchung der Funktionalität der Hybrid-mRNAs wurden HeLa-Zellen mit dem Kontroll- und dem Hybrid-Konstrukt transfiziert und für 6 bzw. 20 h mit Hydroxyharnstoff arretiert. In der Ribonuklease-Protektions-Analyse erkennt man deutlich die Abnahme der Hybrid-mRNA Menge nach 6 (**Abb. 20**, Spur 2) bzw. 20 h Behandlung mit Hydroxyharnstoff

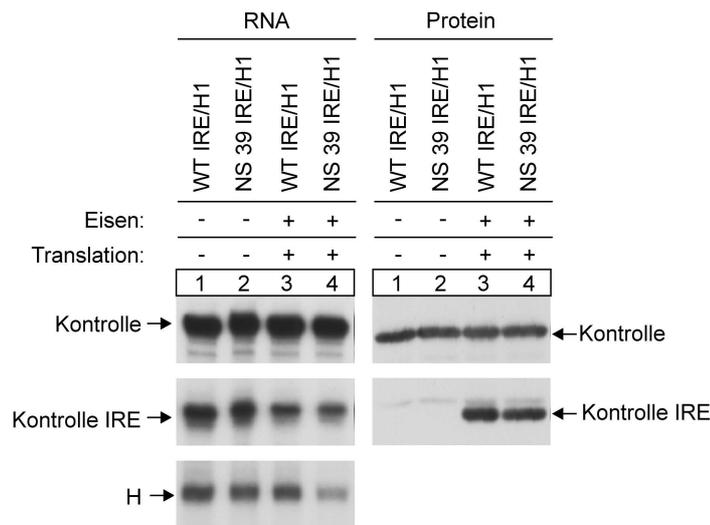


Abbildung 21: Ribonuklease-Protektions-Analyse und Immunblot-Analyse zur Demonstration der spezifischen Translationsregulation über das IRE/IRP-System. HeLa-Zellen wurden mit dem Hybridkonstrukt WT IRE/H1 (Spuren 1 & 3) oder NS 39 IRE/H1 (Spuren 2 & 4) transfiziert. Zusätzlich wurden zwei Kontrollen transfiziert, eine mit IRE (Kontrolle IRE) und eine ohne (Kontrolle). Die Translation der IRE -enthaltenden mRNAs wurde durch Zugabe von Deferoxaminmesilat (Spuren 1 & 2) inaktiviert bzw. durch Zugabe von Häm-Arginat (Spuren 3 & 4) aktiviert. Protein-Lysate und RNA-Präparationen wurden aus denselben Zellen hergestellt.

(**Abb. 20**, Spur 3) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (**Abb. 20**, Spur 1). Dies entspricht dem erwarteten Ergebnis, da die HeLa-Zellen nicht in die S-Phase des Zellzyklus eintreten können und die Histon-Neusynthese nicht stattfinden kann. Die Hybrid-mRNAs weisen also 3'Enden der richtigen Struktur (Länge) auf, die nicht kryptisch polyadenyliert werden. Zusätzlich verhalten sie sich auch funktionell wie normale zelluläre Histon -mRNAs.

4.2.4 Demonstration der eisenabhängigen Translationsregulation im experimentellen System

In den folgenden Experimenten soll ein System zur spezifischen Translationsregulation zum Einsatz kommen, um beim Abbau von NS-mutierten β -Globin-mRNAs ohne Poly(A)-Schwänze die für den NMD charakteristische Translationsabhängigkeit zu überprüfen. Dieses System basiert auf der eisenabhängigen Interaktion des Proteins IRP mit dem IRE in der mRNA. Durch

die Interaktion wird die Translation von mRNAs, die ein funktionelles IRE in ihrer 5'UTR aufweisen spezifisch inaktiviert. Die Bindung findet nicht statt, wenn in der Zelle genug Eisen vorhanden ist. In diesem Falle ist die Translation der IRE-enthaltenden mRNA möglich. Zur Zeit existiert kein anderes System zur Regulation der Translation, das eine ähnlich hohe Spezifität bei vergleichbarer Leistungsfähigkeit bieten kann. Durch die hier dargestellten Experimente wurde

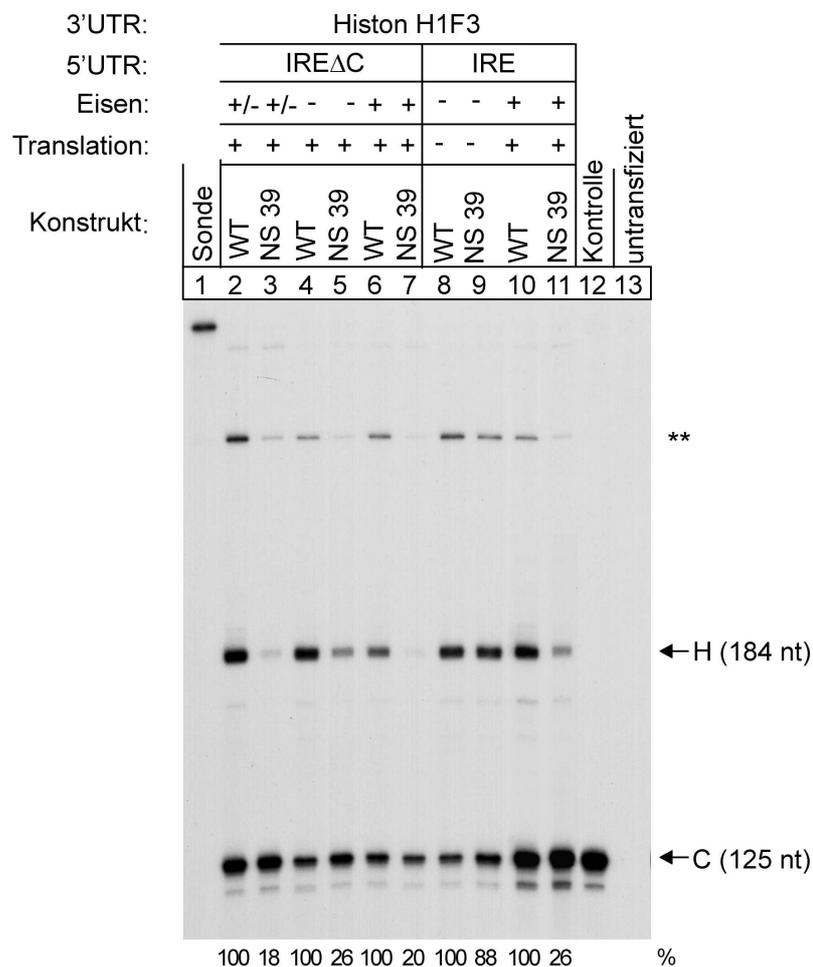


Abbildung 22: Analyse des NMD von Nonsens-mutierten mRNAs mit Histon 3'Enden. Ribonuklease-Protektions-Analyse von HeLa-Zellen, die mit dem Konstrukt WT Δ C/H1 (Spuren 2,4,6), NS 39 Δ C/H1 (Spuren 3,5,7), WT IRE/H1 (Spuren 8, 10) bzw. NS 39 IRE/H1 (Spuren 9, 11) und zusätzlich der β -Globin Kontrolle transfiziert wurden. Die Translation der IRE-enthaltenden mRNAs wurde inaktiviert durch Eisenentzug mit Deferoxaminmesilat (DFO, Spuren 8, 9) oder aktiviert durch Zugabe von Häm-Arginat (Häm; Spuren 10, 11). Transfektionen mit nicht-funktionellen IREs wurden als Kontrolle für die Spezifität auf die gleiche Weise behandelt (Spuren 4 & 5 DFO; Spuren 6 & 7 Häm). Die Expressionsstärken stellen die Mittelwerte mehrerer unabhängiger Experimente dar.

das IRE/IRP-System spezifisch für den Einsatz bei mRNAs mit 3'Histon-Enden validiert. Hierzu wurden Zellen mit den Hybrid-Konstrukten (H) mit funktionellem IRE und zwei verschiedenen Kontroll-Konstrukten transfiziert, eines davon ebenfalls mit funktionellem IRE (Kontrolle IRE) und eines ohne IRE (Kontrolle). Da die Hybridkonstrukte auf Proteinebene ausgesprochen schwach exprimiert werden, war es erforderlich, die Translation durch die Kontrolle mit IRE zu demonstrieren. Außerdem entstehen einige aberrant prozessierte Transkripte von den *HBB/HIF3*-Konstrukten, die zur Proteinproduktion beitragen könnten. Daher kann nicht sicher gesagt werden, ob das im Immunblot detektierte β -Globin-Protein von korrekt oder aberrant prozessierten mRNAs translatiert wurde. Die Auswertung der mRNA- und Proteinexpression ergab das folgende Ergebnis. Die Kontrolle ohne IRE wurde auf RNA- und Protein-Ebene stets gut exprimiert und dies trotz Veränderungen der Eisenkonzentration (**Abb. 21**; obere Banden, Spuren 1-4). Im Gegensatz dazu zeigte die Kontrolle mit IRE zwar auf RNA-Ebene ein gleichmäßiges Expressionsniveau, jedoch wurde nur dann Protein exprimiert, wenn die Translation dieser Kontrolle spezifisch durch die Zugabe von Eisen in Form von Häm-Arginat ermöglicht wurde (**Abb. 21**; mittlere Banden, Spuren 1 & 2 nicht translatiert, Spuren 3 & 4 translatiert). Dies entspricht exakt den erwarteten Ergebnissen einer spezifischen Translationsregulation mit IRE. Gleichzeitig erkennt man bei der Analyse der Hybrid-mRNAs nur dann eine Abnahme der Nonsense-mutierte mRNA, wenn die Translation der IRE-Kontrolle möglich ist (**Abb. 21**: untere Banden, Spuren 3 & 4). Diese translationsabhängige Verringerung der Nonsense-mRNA soll jedoch im folgenden noch eingehend untersucht werden. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Regulation der Translation über das IRE/IRP-System auch in dem hier gewählten experimentellen System gut funktioniert.

4.2.5 Nicht-polyadenylierte Hybrid-mRNAs mit Histon 3'Enden unterliegen dem Nonsense-vermittelten mRNA-Abbau

Zunächst wurde untersucht, ob Nonsense-mutierte mRNAs mit Histon 3'UTRs durch den NMD degradiert werden. Der Vergleich von Wildtyp und Nonsense-mutierte Hybrid-mRNAs (jeweils mit einer nicht-funktionellen Variante des

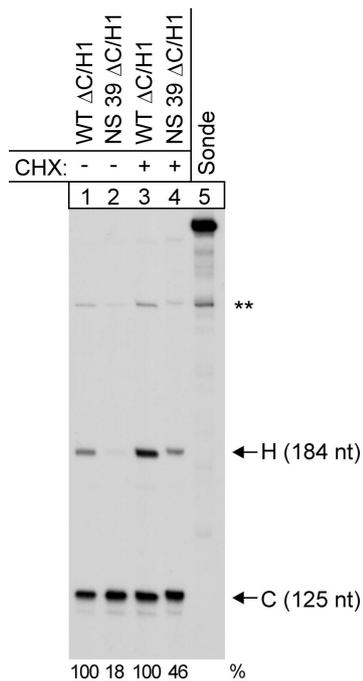


Abbildung 23: Ribonuklease-Protektions-Analyse von RNA-Präparationen aus Zellen, die zur Stabilisierung von Nonsens-mutierten Transkripten mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid (CHX) behandelt wurden (Spuren 3 & 4). Die Zellen waren entweder mit dem Nonsens-mutierten NS 39 Δ C/H1 (Spuren 2 & 4) oder dem nicht-mutierten WT Δ C/H1 Konstrukt (Spuren 1 & 3) sowie der β -Globin Kontrolle transfiziert. Spur 5: unverdaute Sonde.

IRE, d. h. ohne Regulation der Translation) zeigt, daß die NS-mutierte mRNA nur eine Expressionsstärke von etwa 18% der WT mRNA erreicht (**Abb. 22**, Spuren 2 & 3). Das Vorhandensein eines Nonsens-Kodons verringert also die Expression der Hybrid-mRNA. Grundsätzlich könnte diese verminderte RNA-Akkumulation auch eine NMD-unabhängige Ursache haben. Die Translationsabhängigkeit ist eine der zentralen charakteristischen Eigenschaften des NMD. Daher wurde der Einfluß der zytoplasmatischen Translation auf die Akkumulation der NS 39-mutierten Hybrid-mRNAs untersucht. Die Regulation der Translation erfolgte über das oben beschriebene IRE/IRP-System. HeLa-Zellen wurden mit Hybrid-Konstrukten transfiziert, die ein funktionelles IRE in der 5' untranslatierten Region aufweisen. Die Translationsregulation erfolgt entweder durch Eisenentzug mit Deferoxaminmesilat (Desferal, DFO), um die Translation spezifisch zu inaktivieren, oder durch Eisenzugabe mit Häm-Arginat, um die Translation zu aktivieren. Bei aktivierter Translation zeigte die NS 39-mutierte mRNA nur eine Expression von 26% der WT-mRNA (**Abb. 22**, Spuren 10 & 11), was die Ergebnisse mit dem nicht-funktionellen IRE bestätigt. Im Gegensatz dazu akkumulierte die NS-mRNA fast auf WT-Niveau, wenn die Translation spezifisch mit DFO blockiert wurde (**Abb. 22**, Spuren 8 & 9). Die Spezifität der

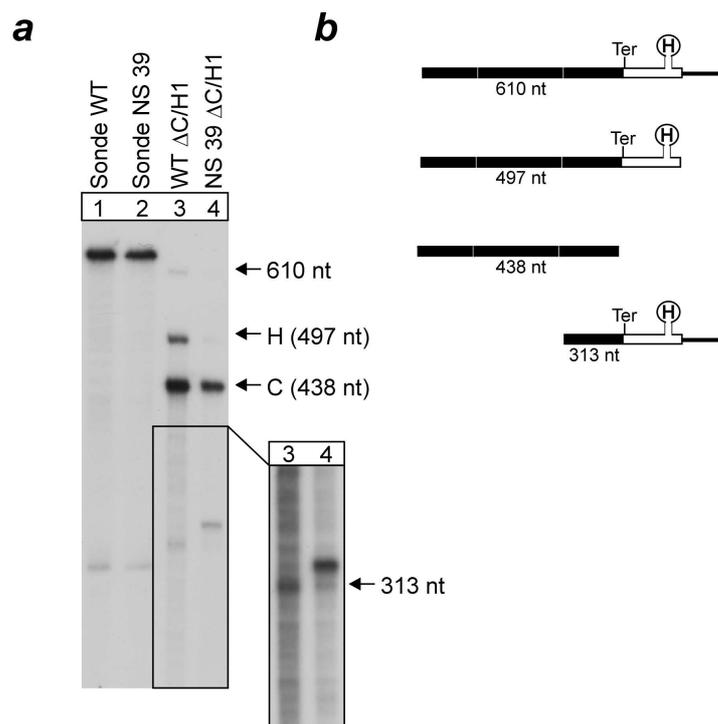


Abbildung 24: **a**, Ribonuklease-Protektions-Analyse mit RNA-Präparationen von Zellen, die mit WT Δ C/H1 (Spur 3) oder NS 39 Δ C/H1 (Spur 4) und der Kontrolle (β -Globin) transfiziert wurden. Für die beiden unterschiedlichen mRNAs wurden zwei verschiedene Sonden verwendet, die unverdaut in Spur 1 (WT-Sonde) und 2 (NS 39 Sonde) aufgetragen wurden. Der eingefügte Kasten zeigt eine etwa fünfmal längere Exposition des eingezeichneten Ausschnitts. **b**, Schematische Darstellung von Sonde und erwarteten protektierten Fragmenten. Die in diesem Experiment verwendete Sonde reicht vom Initiationskodon im ersten Exon bis in die 3' flankierenden Regionen des Histon-Teils. Korrekt 3'End-prozessierte und gespleißte Hybrid-mRNA protektiert ein Fragment von 497 nt, die Kontrolle ein Fragment von 438 nt. Aberrante 3'End-Prozessierung führt zu einem Fragment von 610 nt, fehlerhaftes Spleißen zu einem Fragment von 313 nt.

Translationsregulation wurde dadurch bestätigt, daß Hybrid-mRNAs mit den nicht-funktionellen IREs in der 5'UTR immer einen NMD-Phänotyp zeigen, unabhängig von der Eisenkonzentration in den Zellen (**Abb. 22**: Spuren 4-7). Dies zeigt, daß der Abbau der Nonsens-mutierten mRNAs auch in Abwesenheit eines Poly(A)-Schwanzes die zytoplasmatische Translation benötigt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die nicht-polyadenylierte NS 39-mRNA tatsächlich durch NMD abgebaut wird.

Ursprünglich war die Translationsabhängigkeit des NMD nicht mit der spezifischen Regulation über das IRE/IRP-System gezeigt worden, sondern durch eine globale Inhibition der gesamten zellulären Translation mit Cycloheximid (CHX) oder anderen unspezifischen Inhibitoren der gesamten zellulären

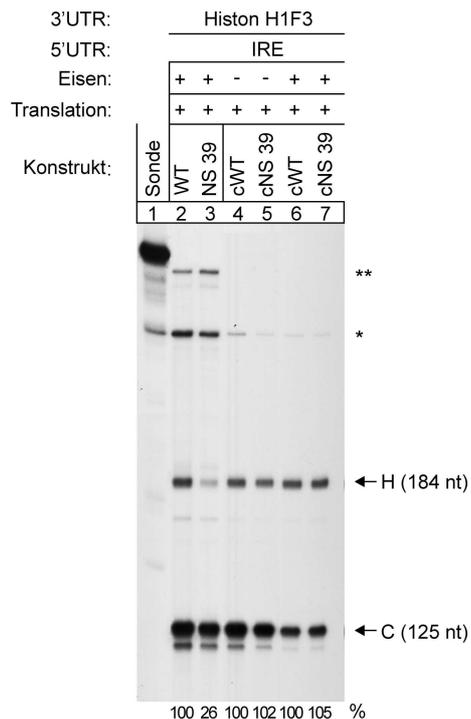


Abbildung 25: Analyse der Spleiß-abhängigen Degradation von Nonsens-mutierten mRNAs mit Histon 3'Enden. Ribonuklease-Protektions-Analyse von HeLa-Zellen, die mit dem intronhaltigen Konstrukten IRE/H1 (Spur 2) bzw. NS 39 IRE/H1 (Spur 3) oder den intronlosen cWT IRE/H1 (Spuren 4, 6) bzw. cNS 39 IRE/H1 (Spuren 5 & 7) sowie dem β -Globin Kontrollkonstrukt transfiziert wurden. Die Translation der IRE-enhaltenden mRNAs wurde inaktiviert bzw. aktiviert durch Eisenentzug mit Deferoxaminmesilat (Spuren 4 & 5) bzw. Zugabe von Häm-Arginat (Spuren 2, 3, 6, 7). Expressionsstärken wurden aus mehreren unabhängigen Experimenten errechnet.

Translation, was zu unerwünschten pleiotropen Effekten führen kann (Carter *et al.*, 1995). Im Gegensatz zum IRE/IRP System werden durch die Translationsinhibition mit CHX Nonsens-mRNAs nicht vollständig, sondern nur leicht stabilisiert. Der translationsabhängige Abbau der NS 39 Hybrid-mRNAs sollte aber zusätzlich noch mittels CHX-Behandlung bestätigt werden. Hierzu wurden Zellen mit WT- und NS 39-Konstrukten (ohne funktionelles IRE, um mögliche konkurrierende Regulation zu vermeiden) transfiziert und für kurze Zeit in Anwesenheit von CHX inkubiert. Durch die CHX-Behandlung stabilisierte sich die Nonsens-mutierte mRNA deutlich (**Abb. 23**; vergleiche Spuren 1 & 2 ohne CHX-Behandlung und Spuren 3 & 4 mit CHX-Behandlung). Dies bestätigt die Beobachtungen des vorigen IRE-Versuchs. Die Translationsabhängigkeit des Abbaus von Nonsens-mutierten mRNAs ohne Poly(A)-Schwanz konnte also mit zwei unabhängigen Methoden gezeigt werden.

4.2.6 Die verringerte Expression der Nonsens-mutierten Hybrid-mRNAs ist spleißabhängig

Neben der Translationsabhängigkeit stellt die Spleißabhängigkeit eine unentbehrliche Voraussetzung des β -Globin-NMD dar (Neu-Yilik *et al.*, 2001; Thermann *et al.*, 1998). Mit der für alle bisherigen Analysen verwendeten Sonde

kann das Spleißen des 2. Introns der Hybrid-mRNA überprüft werden (siehe Schema der Konstrukte **Abb. 17** und Sondenschema **Abb. 18b**). Das Intron 2 ist für den NMD der NS 39-mRNA viel entscheidender als das Intron 1, denn es stellt das 3'gelegene Intron dar, über das der NMD-Apparat vorzeitige von physiologischen Terminationskodons unterscheidet. Dennoch sollte überprüft werden, ob im Kontext des Hybrid-Konstruktes beide Introns effizient aus der prä-mRNA gespleißt werden. Zu diesem Zweck wurden für den folgenden Ribonuklease-Protektions-Assay Sonden eingesetzt, die über die gesamte Länge der mRNAs hybridisieren können (cDNA-Sonden). Für WT- und NS 39-Transfektionen wurden zwei unterschiedliche Sonden benötigt, um Fehlpaarungen an der NS 39-Mutation auszuschließen. Mit diesen Sonden entstehen protektierte Fragmente von 497 nt für die korrekt gespleißte und 3'End-prozessierte Hybrid-mRNA und 438 nt für die Kontroll-mRNA. Ein größeres Fragment von 610 nt würde bei unvollständiger 3'End-Prozessierung der Hybrid-mRNA entstehen, ein kleineres Fragment von 313 nt bei unvollständigem Spleißen (**Abb. 24b**). Die

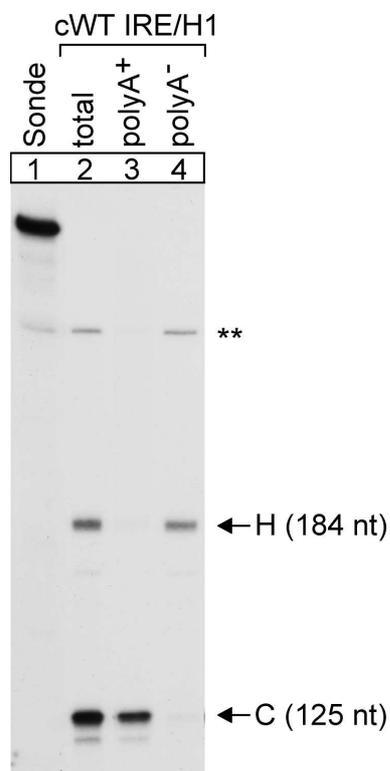


Abbildung 26: Ribonuklease-Protektions-Analyse einer RNA-Präparation aus HeLa-Zellen, die mit dem intronlosen Konstrukt cWT IRE/H1 und der intronhaltigen β -Globin Kontrolle transfiziert wurden. Die zytosolische Gesamt-RNA (Spur 2) wurde mit Oligo-dT-Zellulose in eine poly(A)-angereicherte (Spur 3) und eine poly(A)-abgereicherte Fraktion (Spur 4) aufgetrennt und alle Fraktionen einzeln analysiert.

Analyse zeigt, daß beide Introns der Hybrid-mRNA richtig gespleißt werden, zusätzlich wird das 3'Ende wie erwartet prozessiert (**Abb. 24**; Spur 3). Die mRNA mit der NS 39-Mutation zeigt eine sehr geringe Expression, wie bereits in den Experimenten mit der anderen Sonde beobachtet wurde, was auf eine Einwirkung des NMD zurückzuführen ist (**Abb. 24**; Spur 4). Sehr schwache Banden bei 610 nt und 313 nt zeigen an, daß nur eine geringe Zahl von Transkripten entweder aberrant gespleißt oder aberrant 3'End-prozessiert wird. Eine verlängerte Exposition zeigt keine zusätzlichen Banden, die mit weiteren fehlgespleißten mRNAs korrespondieren. Die etwas oberhalb 313 nt laufende Bande in Spur 4 entsteht offenbar durch eine Fehlpaarung der Sonde (NS 39) mit der Kontroll-mRNA, die zu einem Teilverdau der Kontrollbande führt. Diese Ergebnisse beweisen, daß beide Introns auch im Kontext dieser Hybrid-mRNA mit Histon 3'Ende anstelle des üblichen Poly(A)-Schwanzes vollständig und korrekt gespleißt werden.

Die Spleißabhängigkeit des beobachteten NS 39-mRNA Abbaus wurde mit Hilfe von intronlosen Varianten der Hybridkonstrukte überprüft. Diese Konstrukte enthalten funktionelle IREs in der 5'UTR, um das Verhalten der ungespleißten mRNAs in Abhängigkeit von der Translation ermitteln zu können. Als positive Kontrolle für den NMD dienten die mRNAs von den intronhaltigen Konstrukten (WT bzw. NS 39) bei aktivierter Translation. Diese Kontrollen zeigen für die NS 39-mRNA den erwarteten NMD-Phänotyp (**Abb. 25**: vergleiche Spuren 2 & 3). Im Gegensatz dazu sind die intronlosen NS 39-mRNAs sowohl bei inaktivierter als auch bei aktivierter Translation stets stabil (**Abb. 25** Spuren 4-7). Dies weist eine NMD-Resistenz der ungespleißten NS-mutierten mRNAs ohne Poly(A)-Schwanz nach wie man es auch bei den polyadenylierten mRNA beobachten kann.

Die Prozessierung des 3'Endes einer mRNA kann durch das Vorhandensein von Introns beeinflusst werden (Pandey *et al.*, 1990). Es wäre daher grundsätzlich denkbar, daß die korrekte Prozessierung der Histon 3'Enden in den intronlosen mRNAs nicht aufrechterhalten wird. Daher wurde auch für die intronlosen Transkripte eine Poly(A)-Fraktionierung durchgeführt. Wie bei den intronhaltigen Hybrid-mRNAs bleibt die korrekte 3'End-Prozessierung auch ohne Introns

erhalten, da die polyadenylierte Kontroll-mRNA ausschließlich in der Poly(A)-angereicherten Fraktion sichtbar ist (**Abb. 26**; Spur 3), und die Hybrid-mRNA nur in der Poly(A)-negativen Fraktion (**Abb. 26**; Spur 4). Es tritt also auch nach Entfernen der Introns aus den Hybridkonstrukten keine Veränderung der 3'End-Prozessierung auf. Diese Ergebnisse zeigen somit, daß der Abbau von Nonsense-mRNAs mit Histon 3'UTRs nicht nur translationsabhängig, sondern auch spleißabhängig ist. Bei beiden Prozessen handelt es sich um charakteristische Elemente des NMD-Mechanismus. Daraus ergibt sich, daß die verminderte Akkumulation NS-mutierter mRNAs mit Histon 3'Enden durch *bona fide* NMD verursacht wird.

4.3 Charakterisierung von Komponenten des Nonsens-vermittelten mRNA-Abbaus

In der Zelle liegen mRNAs immer als Komplexe mit Proteinen vor, die wesentlich die Funktion der mRNAs beeinflussen. Sie schützen die mRNAs vor Degradation, unterstützen den Transport ins Zytoplasma, steigern die Translationseffizienz und regulieren praktisch alle Schritte des mRNA Stoffwechsels (Dreyfuss *et al.*, 1993; Shyu und Wilkinson, 2000; Siomi und Dreyfuss, 1997; Wilkinson und Shyu, 2001). Die Komplexe von mRNAs und Proteinen bezeichnet man aufgrund ihrer Zusammensetzung als Boten-Ribonukleoproteine („messenger ribonukleoproteins“ - mRNP). Die Zusammensetzung eines mRNPs unterliegt ständiger Umgestaltung, abhängig von der Umgebung, in der sich das mRNP befindet, z. B. unterscheiden sich nukleäre mRNPs erheblich von zytoplasmatischen mRNPs. Manche Veränderungen des mRNPs werden gezielt vorgenommen, um die nächsten Schritte des mRNA-Metabolismus effizienter durchzuführen. Ein Beispiel für einen solchen Vorgang ist der Spleißprozeß. Interessanterweise sind die Vorgänge des Spleißens und des Transports von mRNAs in höheren Eukaryonten gekoppelt. Solch eine Kopplung soll eventuell verhindern, daß ungespleißte prä-mRNAs ins Zytoplasma gelangen, wo sie nicht korrekt translatiert würden. Überraschenderweise sind jedoch die Komponenten des mRNA-Exports zwischen Mensch und Hefe konserviert, obwohl nur eine sehr geringere Zahl von Hefe-Genen ein Intron enthält. Daher kann man vermuten, daß diese konservierten Faktoren in der Hefe eine andere Aufgabe (oder zumindest zusätzliche Aufgaben) haben. Wie bereits in der Einleitung angedeutet, gibt es eine Reihe von Proteinen, die durch das Spleißen in einem großen Komplex (EJC) nahe des Exon-Exon-Übergangs assemblieren und dort gebunden bleiben, selbst nachdem das Spleißosom bereits abdissoziiert ist. Einige dieser Proteine waren bereits vorher als Aktivatoren des Spleißprozesses bekannt, andere wurden erst durch weitere Untersuchungen identifiziert. Insbesondere die Vorgänge des Transports und des NMD werden durch diese Faktoren beeinflusst. Die bisher bekannten Komponenten des EJC sind Y14 (Kataoka *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001b; Le Hir *et al.*, 2000a), RNPS1 (Le Hir *et al.*, 2001; Le Hir *et al.*, 2000a;

Lykke-Andersen *et al.*, 2001), DEK (Le Hir *et al.*, 2000a; McGarvey *et al.*, 2000), SRm160 (Le Hir *et al.*, 2000a), Magoh (Kataoka *et al.*, 2001), Aly/REF (Le Hir *et al.*, 2000a; Zhou *et al.*, 2000) und UAP56 (Gatfield *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2001). Interaktionspartner der aufgezählten Proteine werden ebenfalls in den EJC rekrutiert, hier sind insbesondere TAP/p15 (Kim *et al.*, 2001b; Le Hir *et al.*, 2001) und hUpf3a bzw. hUpf3b zu nennen (Kim *et al.*, 2001a; Lykke-Andersen *et al.*, 2000; Lykke-Andersen *et al.*, 2001). Auch wenn die Funktion einiger Proteine bekannt ist, so liegen für viele andere keine funktionellen Daten vor. So spielen UAP56, Aly/REF und das heterodimere TAP/p15 eine wichtige Rolle beim Export von mRNAs (Gatfield *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2000) und hUpf3a und hUpf3b sowie RNPS1 üben Funktionen beim Nonsense-vermittelten mRNA-Abbau aus (Lykke-Andersen *et al.*, 2000; Lykke-Andersen *et al.*, 2001). Das Protein Y14 könnte eine besondere Rolle spielen, denn es interagiert mit vielen Komponenten des EJC und ist das einzige Protein des EJC, das auch noch im Zytoplasma sehr effizient an die mRNA gebunden ist. Eine Aufgabe innerhalb des NMD ist postuliert worden, jedoch konnten für Y14 nur quantitativ geringe Effekte nachgewiesen werden, die eine NMD-Funktion nicht sicher belegen konnten (Lykke-Andersen *et al.*, 2001).

Hier wurden funktionelle Komponenten des Nonsense-vermittelten mRNA-Abbaus identifiziert und charakterisiert. Dazu wurde ein experimenteller Ansatz gewählt, der eine spezifische Rekrutierung mit hoher Affinität von Proteinen an die β -Globin mRNA ermöglicht.

4.3.1 Das experimentelle λ N/boxB β -Globin-System

Es sollte ein experimentelles System entwickelt werden, das die einfache und schnelle Charakterisierung von Faktoren des Nonsense-vermittelten mRNA-Abbaus ermöglicht. Es gibt eine ganze Reihe von Faktoren, die möglicherweise eine Rolle innerhalb des NMD spielen. Gute Kandidaten für potentielle NMD-Faktoren stellen die Komponenten des EJC und die humanen Homologe der Upf-Proteine aus *S. cerevisiae* dar. Ebenfalls in Frage kommen viele sogenannte „shuttle“-Proteine, die eine Rolle während des Spleißvorganges spielen, zugleich aber auch zwischen Zellkern und Zytoplasma hin und her transportiert werden

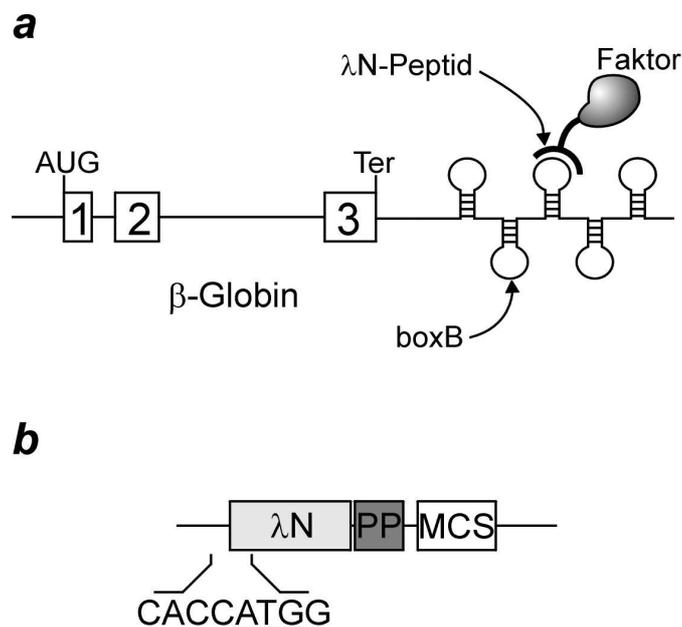


Abbildung 27: **a**, Schematische Darstellung des β -Globin Test-Konstruktes mit fünf boxB Bindungsstellen in der 3'UTR. Die Bindung eines λ N-Fusionsproteins an die boxB-Struktur ist angedeutet. **b**, Aufbau des Vektors zur Expression N-terminal λ N-fusionierter Faktoren. Der Kozak-Konsensus des Initiationskodons ist gezeigt. PP: Di-Prolin-Motiv zur Unterdrückung unerwünschter Strukturen; MCS: multiple cloning site.

(Caceres *et al.*, 1998). Die Bedeutung dieser Kandidaten für den NMD kann aber nur ermittelt werden, wenn man ihren spezifischen Einfluß auf die Stabilität der mit ihnen assoziierten mRNAs analysieren kann. Die Anforderungen an das experimentelle System sind einfach zu definieren. Man muß damit einen Faktor an eine Position innerhalb der mRNA binden können, an der er den NMD-Mechanismus auslöst, wenn es sich um ein funktionelles Äquivalent eines natürlich vorkommende NMD-Faktors handelt. Um Proteine ganz spezifisch an RNAs zu binden und funktionelle Untersuchungen durchzuführen, kann man die jeweiligen Proteine mit einer RNA-bindenden Domäne eines heterologen Proteins fusionieren. In die Test-mRNA werden die entsprechenden Bindungsstellen für die RNA-bindende Domäne eingefügt. Werden die Test-mRNA und das Fusionsprotein gleichzeitig innerhalb einer Zelle exprimiert, bindet das Fusionsprotein an die Bindungssequenzen innerhalb der Test-mRNA. Dies erlaubt eine Analyse der biologischen Funktionen des fusionierten Proteins.

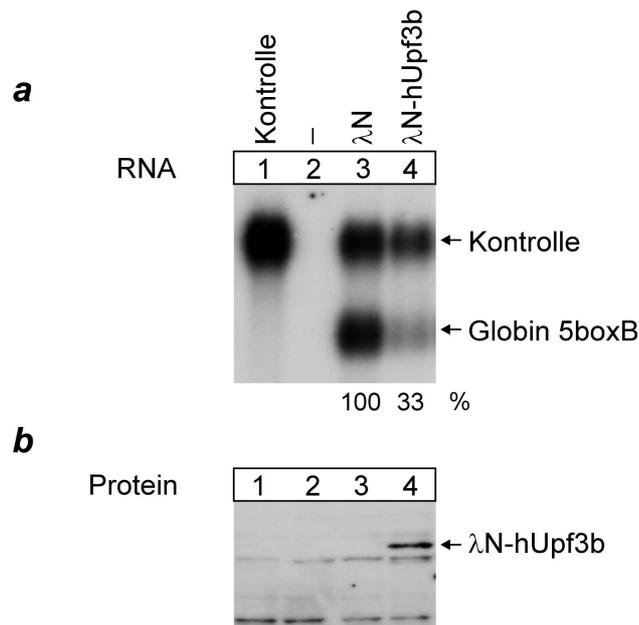


Abbildung 28: **a**, Northern-Blot-Analyse von RNA-Präparationen transfizierter Zellen mit dem β -Globin 5boxB Konstrukt (Spuren 3 & 4) und einem Kontroll-Konstrukt (WT300+eIII – siehe Material und Methoden; Spuren 1, 3, 4). Die kotransfizierten λ N-Konstrukte waren entweder nur λ N-Peptid (Spur 3, Negativ-Kontrolle) oder λ N-hUpf3b WT (Spur 4, Positiv-Kontrolle). Spur 2: RNA-Präparation von untransfizierten Zellen. Die Expressionstärken stellen Mittelwerte mehrerer unabhängiger Experimente dar. **b**, Immunblot von Proteinlysaten derselben transfizierten Zellen mit einem λ N-spezifischen Antikörper. Die Position der λ N-hUpf3b Bande ist eingezeichnet.

Die spezifische Interaktion von RNA-bindenden Proteindomänen mit ihren RNA-Bindungssequenzen wurde bereits einige Male verwendet, um Faktoren als Fusionsproteine zu funktionellen Untersuchungen an RNAs zu binden (Coller *et al.*, 1998; Gray *et al.*, 2000; Long *et al.*, 2000; Lykke-Andersen *et al.*, 2000). Von entscheidender Bedeutung für die Funktion eines solchen Ansatzes ist, daß die Fusion mit der RNA-Bindungsdomäne nicht mit der normalen Funktion des Fusionspartners interferiert. Es ist offensichtlich, daß sowohl Größe als auch Zusammensetzung der RNA-Bindungsdomäne dabei eine Rolle spielen können. Häufig wird für diese „tethering“-Studien das Hüllenprotein des MS2-Phagen verwendet, denn es weist eine hohe Affinität für seine Bindungsstelle in der RNA auf. Ein Nachteil für die Fusionierung insbesondere von kleinen Proteinen stellt seine nicht unerhebliche Größe dar (130 Aminosäuren). Eine RNA-Bindedomäne, die im Gegensatz dazu sehr klein ist und zusätzlich eine hohe Affinität für ihre

Bindestelle aufweist, besitzt das N-Protein des Bakteriophagen Lambda (Cai *et al.*, 1998; Cilley und Williamson, 1997; Legault *et al.*, 1998; Mogridge *et al.*, 1995). Die RNA-Bindedomäne dieses Proteins, das sogenannte λ N-Peptid, ist nur 22 Aminosäuren lang und ist bereits in funktionellen Assays erfolgreich angewendet worden (De Gregorio *et al.*, 2001; De Gregorio *et al.*, 1999).

Das hier vorgestellte System besteht aus fünf Bindungsstellen für das λ N-Peptid, den sogenannten boxB, die in einem Abstand von mehr als 50 nt stromab des β -Globin Terminationskodons in die 3'UTR inseriert wurden (**Abb. 27a**). Diese Insertionsstelle wurde gewählt, da ein an dieser Position eingefügtes artifizielles Intron zum Abbau der ansonsten normalen β -Globin mRNA mittels NMD führt (Neu-Yilik *et al.*, 2001; Thermann *et al.*, 1998). Das normale Terminationskodon wird in diesem Kontext fälschlicherweise als vorzeitig interpretiert, was zu einer raschen Degradation führt. Man kann also davon ausgehen, daß diese Stelle für die Positionierung von Faktoren des NMD über eine artifizielle λ N/boxB-Bindung gut geeignet ist. Durch die Verwendung mehrerer boxB-Bindungsstellen sollte die Wahrscheinlichkeit einer Bindung erhöht werden, um einen möglichst eindeutigen Effekt bei der Auswertung zu erhalten. In einem ähnlichen experimentellen Ansatz, in dem jedoch das MS2-Hüllenprotein eingesetzt wurde, konnte die Funktion eines solchen Systems mit den Proteinen der hUpf-Familie gezeigt werden (Lykke-Andersen *et al.*, 2000; Lykke-Andersen *et al.*, 2001).

Für die Charakterisierung der Faktoren im weiteren Verlauf der Experimente war es nötig, einige Varianten des normalen β -Globin Test-Konstruktes mit 5boxB-Sequenzen herzustellen. Diese werden jeweils im Rahmen der entsprechenden Experimente vorgestellt. Alle Faktoren, die mit Hilfe des λ N/boxB-Systems untersucht werden sollten, wurden in einen Vektor inkloniert, der bereits die Sequenz des λ N-Peptides in einem guten Translationsinitiations-Konsensus enthielt (**Abb. 27b**). Zwischen dem λ N-Peptid und dem inklonierten Faktor befinden sich Sequenzen, die für ein di-Prolin-Motiv kodieren, um die Ausbildung von unerwünschten Sekundär- bzw. Tertiärstrukturen zwischen λ N-Peptid und Fusionspartner zu unterbinden.

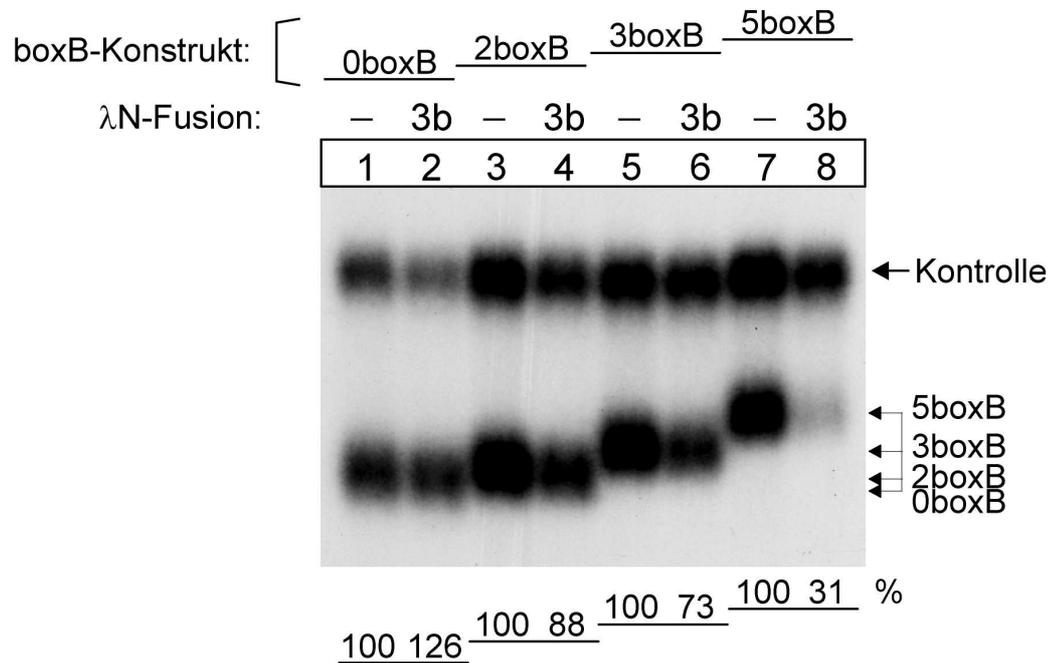


Abbildung 29: Untersuchung zur Translationsabhängigkeit der λN-hUpf3b vermittelten Expressionsverminderung. HeLa-Zellen wurden mit 5boxB Testkonstrukten entweder mit funktionellem IRE (Spuren 1-4) oder nicht-funktionellem IRE-ΔC (Spuren 5-8) transfiziert sowie der WT300+eIII Kontrolle und den angegebenen λN-Konstrukten (- entspricht nur λN-Peptid ohne Fusionspartner). Die Translation der IRE-haltigen mRNAs wurde mit Deferoxaminmesilat (Spuren 1 & 3) bzw. Häm-Arginat (Spuren 2 & 4) spezifisch reguliert. Als Kontrolle wurden Zellen, die mit nicht-funktionellen IRE-ΔC Konstrukten transfiziert waren auf die gleiche Weise behandelt (Spuren 5 & 7: DFO; Spuren 6 & 8: Häm). Expressionsstärken beziehen sich auf die identisch behandelte Negativkontrolle.

Zunächst wurde die Funktionalität des experimentellen Systems überprüft. Als positive Kontrolle wurde das Protein hUpf3b verwendet, denn eine Funktion dieses Faktors für den NMD wurde bereits gezeigt (Lykke-Andersen *et al.*, 2000). Die Expression des λN-Peptids ohne Fusionspartner sollte *per definitionem* keinen Einfluß auf die Stabilität der Test-mRNA haben und diente daher als Negativkontrolle. Die Northern-Blot-Analyse zeigte, daß die Expression des λN-hUpf3b Fusionsproteins im Vergleich zum λN-Peptid alleine zu einer deutlich verminderten Akkumulation der 5boxB Test-mRNA führt (**Abb. 28a**, vergleiche Spuren 3 & 4). Eine Immunblot-Analyse derselben Transfektion zeigt eine gute Expression des λN-hUpf3b Fusionsproteins in den HeLa-Zellen, die aufgrund des

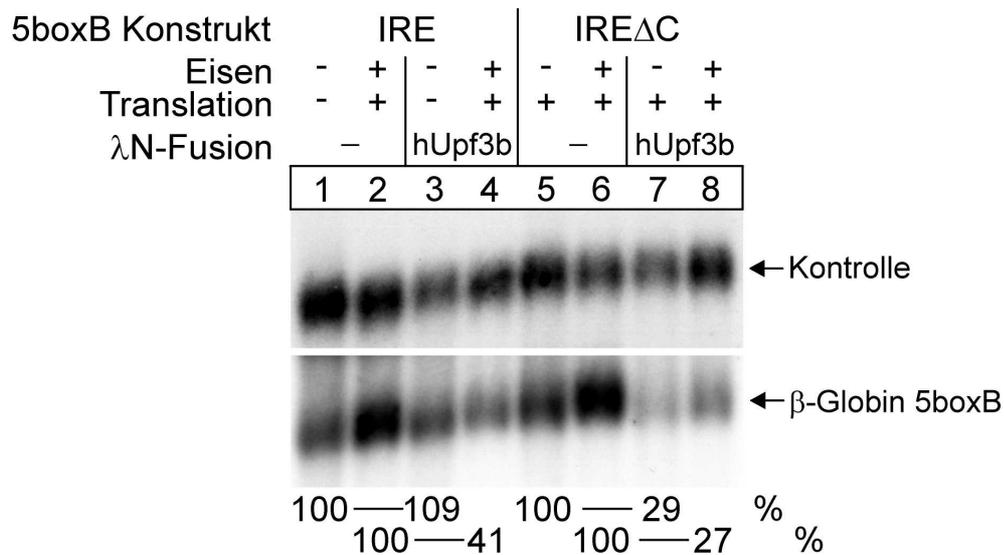


Abbildung 30: Northern-Blot-Analyse der RNA-Präparationen von HeLa-Zellen, die mit λ N-Peptid (Spuren 1, 3, 5, 7) oder λ N-hUpf3b (Spuren 2, 4, 6, 8) sowie einer Kontrolle und verschiedenen Test-Konstrukten transfiziert wurden. Die verwendeten Test-Konstrukte enthielten eine unterschiedliche Anzahl an boxB-Sequenzen: Keine boxB (Spuren 1 & 2), 2 boxB (Spuren 3 & 4), 3 boxB (Spuren 5 & 6) oder 5 boxB (Spuren 7 & 8). Die Expressionstärke bezieht sich immer auf die Negativkontrolle mit der gleichen Anzahl boxB Sequenzen.

deutlichen Effekts auch so erwartet wurde. In weiteren Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß sich die Verminderung der 5boxB-mRNA reziprok zur Menge an kotransfiziertem λ N-hUpf3b verhält, d. h. je mehr λ N-hUpf3b transfiziert wird, desto weniger 5boxB-mRNA kann man nachweisen (Daten nicht gezeigt). Dies legt eine bestimmte Menge von λ N-hUpf3b fest, die mindestens bei allen weiteren Versuchen eingesetzt werden muß. Ein weiterer notwendiger Vorversuch sollte zeigen, ob der Abbau der Test-mRNA von der Position des Translationsterminationskodons relativ zu den boxB Sequenzen abhängt. Hierzu wurde eine Variante des Test-Konstrukts hergestellt, in der das normale Terminationskodon mutiert wurde, wodurch die Translation erst inmitten der 5boxB Bindungsstellen terminiert. Die solchermaßen mutierte Test-mRNA wird durch Koexpression von λ N-hUpf3b nicht destabilisiert (Daten nicht gezeigt), was für einen NMD-Prozeß als Ursache des beobachteten Abbaus spricht. Als letztes wurde schließlich untersucht, ob die Verringerung der 5boxB-mRNA in

Abhängigkeit von ihrer Translation auftritt. Dazu wurde als weitere Variante das 5boxB Testkonstrukt mit einem funktionellem IRE in der 5'UTR ausgestattet, um spezifisch die Translation über das IRE/IRP System zu regulieren. Als Kontrolle für die Regulation wurde ein Konstrukt mit nicht-funktionellem IRE hergestellt. Die Analyse der Translationsabhängigkeit ergab, daß nur dann eine Verringerung der 5boxB mRNA bei gleichzeitiger Expression von λ N-hUpf3b zu beobachten war, wenn das IRE-Testkonstrukt auch translatiert wurde, d. h. wenn dem Zellkulturmedium Eisen zugefügt wurde (**Abb. 29**: vergleiche Spuren 2 & 4). In Anwesenheit des Eisen-Chelators Deferoxaminmesilat (DFO) kann man keine Abnahme der Test-mRNA feststellen, da sie nicht translatiert wird (**Abb. 29**: vergleiche Spuren 1 & 3). Die 5boxB-mRNA mit nicht-funktionellem IRE zeigt sowohl bei einem Eisenüberschuss als auch bei einem Eisenentzug stets eine deutlich verringerte Expression, sobald λ N-hUpf3b ko-exprimiert wurde (**Abb. 29**: Spuren 5-8.). Die Expression des λ N-hUpf3b Fusionsproteins wurde durch die Veränderung der Eisenkonzentration nicht modifiziert, was mittels eines Western Blots überprüft wurde (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtungen belegen, daß die Verringerung der 5boxB-mRNA Menge durch den Nonsens-vermittelten mRNA-Abbau erfolgt.

Als nächstes sollte überprüft werden, ob der hier beobachtete NMD ausschließlich durch die spezifische Bindung des λ N Fusionsproteins zustande kommt. Es wurden eine Reihe neuer Testkonstrukte verwendet, die entweder keine, zwei oder drei boxBs in der 3'UTR enthielten. Zusätzlich wurde auch das Konstrukt mit 5boxBs eingesetzt. Nur wenn alleine die spezifische Interaktion des λ N-hUpf3b mit den boxB Bindungsstellen zum NMD führt, wird man Unterschiede bei der Degradation der Test-mRNAs mit unterschiedlichen Anzahlen von boxBs sehen. Sollte λ N-hUpf3b jedoch unspezifisch an anderen Stellen innerhalb der mRNA binden und dadurch NMD auslösen, müßten alle Test-mRNAs einen erkennbaren Abbau aufweisen. Der Versuch zeigte jedoch eindeutig, daß eine mRNA ohne boxB-Sequenzen überhaupt nicht durch die Ko-Expression von λ N-hUpf3b beeinflusst wird (**Abb. 30**; Spuren 1 & 2). Die mRNAs mit zwei bzw. drei boxBs zeigen einen Abbau auf 88 bzw. 73% (**Abb. 30**; Spuren 3 & 4 bzw. 5 & 6), also

einen deutlich geringeren Effekt als die mRNA mit 5boxBs, die auf 31% abgebaut wird (**Abb. 30**; Spuren 7 & 8). Die vergleichbare Expression des λ N-hUpf3b-Proteins in allen Ansätzen wurde überprüft (Daten nicht gezeigt). Durch diese Ergebnisse konnte belegt werden, daß der Abbau der Test-mRNAs nur durch die spezifische Interaktion zwischen λ N-Peptid und boxB zustande kommt.

4.3.2 Untersuchung potentieller NMD-Faktoren

Durch die oben beschriebenen Experimente konnte gezeigt werden, daß in dem experimentellen System die funktionelle Untersuchung von NMD-Faktoren möglich ist. In einem ersten Ansatz wurden einige Faktoren analysiert, die potentiell gute Kandidaten für NMD-Faktoren darstellen, da sie sowohl zwischen Zellkern und Zytoplasma pendeln als auch am Spleißprozeß beteiligt sind. Unter den ausgewählten Proteinen war jedoch keines, das einen spezifischen NMD-Effekt zeigte. Eine tabellarische Zusammenfassung der beobachteten Ergebnisse mit den letztlich nicht-funktionellen Kandidaten-Proteinen ist in **Tabelle 1** dargestellt.

Tabelle 1: Beschreibung der Effekte verschiedener RNA-bindender Proteine im λ N/boxB β -Globin-System

Faktor	Beobachtung
9G8	schlechte Expression, kein Effekt
HnRNP A1	unspezifische Expresssionminderung von Test- und Kontroll-mRNAs
HnRNP D	leichte Expressionsreduktion der Test-mRNA, abhängig von Translation
HnRNP K	kein Effekt
HRH1	kein Effekt
Hrp1	kein Effekt
SRp20	unspezifische Expressionsminderung von Test- und Kontroll-mRNAs
U5-116	kein Effekt

4.3.3 Funktionelle Analyse von Deletionsmutanten von hUpf3b

Die bisher präsentierten Daten zur funktionellen Untersuchung von hUpf3b belegen eine Rolle dieses Proteins beim NMD. Eine wichtige bisher ungelöste Frage betrifft die Reihenfolge, mit der die verschiedenen Faktoren des NMD aktiviert werden und an welcher Stelle hUpf3b in den Ablauf eingreift. Auch

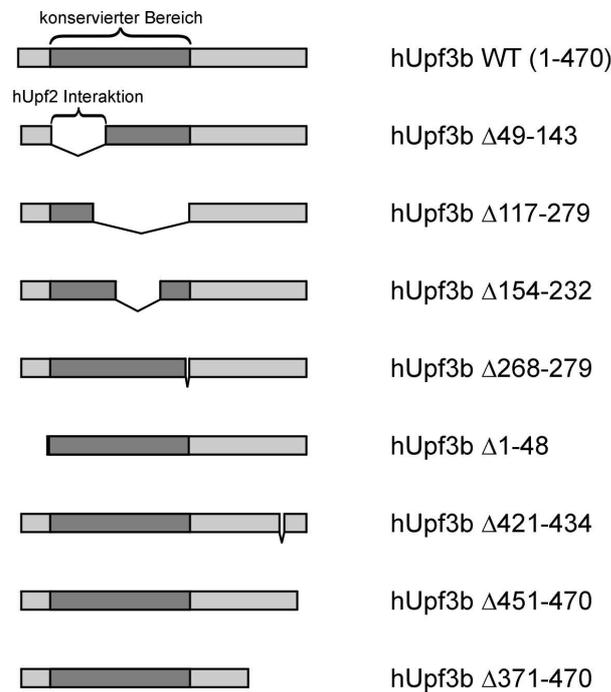


Abbildung 31: Schematische Darstellung der Deletionsmutanten, die in dieser Arbeit untersucht wurden. Die Aminosäuren 49-143 enthalten die hUpf2 Bindungsstelle, die Aminosäuren 49-279 stellen den höchstkonservierten Bereich von hUpf3b (sowohl mit hUpf3a aus dem Menschen als auch mit Upf3 aus *S. cerevisiae*) dar.

durch die Aufklärung der Interaktionen von hUpf3b mit anderen Bestandteilen des NMD-Apparates wären wichtige Aufschlüsse über die Funktionsweise des NMD zu erwarten. Die Abfolge hUpf3a/b \rightarrow hUpf2 \rightarrow hUpf1 ist aufgrund der Lokalisation der Proteine innerhalb der Zelle postuliert worden (Lykke-Andersen *et al.*, 2000), jedoch fehlen bisher Daten, die diese Hypothese direkt stützen können. Mit dem hier vorgestellten experimentellen System sollen die notwendigen NMD-Regionen des hUpf3b Proteins identifiziert werden. Dadurch könnte sich aufklären, an welches Protein das NMD-Signal von hUpf3b tatsächlich weitergeleitet wird.

Der funktionelle Domänenaufbau von hUpf3b ist bisher nur durch Datenbankanalysen und einige begrenzte Interaktionsstudien untersucht worden. Die Aminosäuren 49-279 stellen mit nur etwa 21% identischen Aminosäuren im

Vergleich zwischen dem Protein des Menschen und der Bäckerhefe den höchstkonservierten Bereich dar (Lykke-Andersen *et al.*, 2000). Dieser Bereich umfaßt eine RRM-ähnliche (RNA-bindende Domäne) Sequenz (Lykke-Andersen *et al.*, 2000) sowie die hUpf2 Interaktionsstelle (Serin *et al.*, 2001). Außerdem liegen in dieser Region zahlreiche nukleäre Lokalisationssignale (nuclear localisation signal – NLS) sowie eine postulierte nukleäre Exportsequenz (nuclear export sequence – NES). Weitere funktionell definierte Domänen von hUpf3b sind bislang nicht identifiziert worden. Zusätzlich zu der ausgedehnten N-terminalen konservierten Region konnte ich eine weitere kleine Region im C-terminalen Bereich von hUpf3b identifizieren, die zwischen den beiden humanen Proteinen hUpf3a und hUpf3b hoch konserviert ist, im Hefe Upf3p jedoch nicht vorkommt. Die Analyse von Deletionsmutanten in verschiedenen Bereichen von hUpf3b sollte die Funktion der einzelnen Regionen für den NMD aufklären. Dazu wurden die folgenden Deletionen eingeführt (**Abb. 31**): zwei C-terminale Deletionen von 20 bzw. 100 Aminosäuren, eine N-terminale Deletion von 48 Aminosäuren sowie interne Deletionen der Aminosäuren 49-143 (hUpf2 Bindedomäne), 117-279 (konservierter Bereich und RRM-ähnliche Domäne), 154-232 (konservierter Bereich), 268-279 (hochkonservierte NLS) und 421-434 (Bereich mit hoher Konservierung zwischen hUpf3a und 3b am C-Terminus). Diese Deletionsmutanten wurden gemeinsam mit der 5boxB-mRNA ko-exprimiert, um ihre Fähigkeit zur Vermittlung von NMD zu überprüfen. Fast alle Mutanten waren in der Lage, die Degradation der Test-mRNA zu induzieren (**Abb. 32a**), lediglich die Mutanten $\Delta 421-434$ und $\Delta 351-470$ haben diese Fähigkeit verloren (**Abb. 32a**; Spuren 8 & 10). Eine etwas verringerte NMD-Kompetenz zeigte die Mutante $\Delta 117-279$ (**Abb. 32a**; Spur 4), jedoch war der Effekt wesentlich schwächer ausgeprägt als bei den beiden anderen Deletionen. Den zwischen hUpf3a und hUpf3b konservierten Aminosäuren 421-434 kommt somit eine NMD vermittelnde Wirkung zu. In diesem Zusammenhang ist auch bemerkenswert, daß die Mutante mit deletierter hUpf2 Interaktionsdomäne einen starken NMD vermittelt, so daß offensichtlich diese Interaktion bei direkter Bindung von hUpf3b an die mRNA keine wesentliche Rolle spielt.

Eine mögliche Erklärung für die ungewöhnliche Stabilität der 5boxB-mRNA bei Ko-Expression der $\Delta 421-434$ Mutante könnte grundsätzlich darin begründet sein,

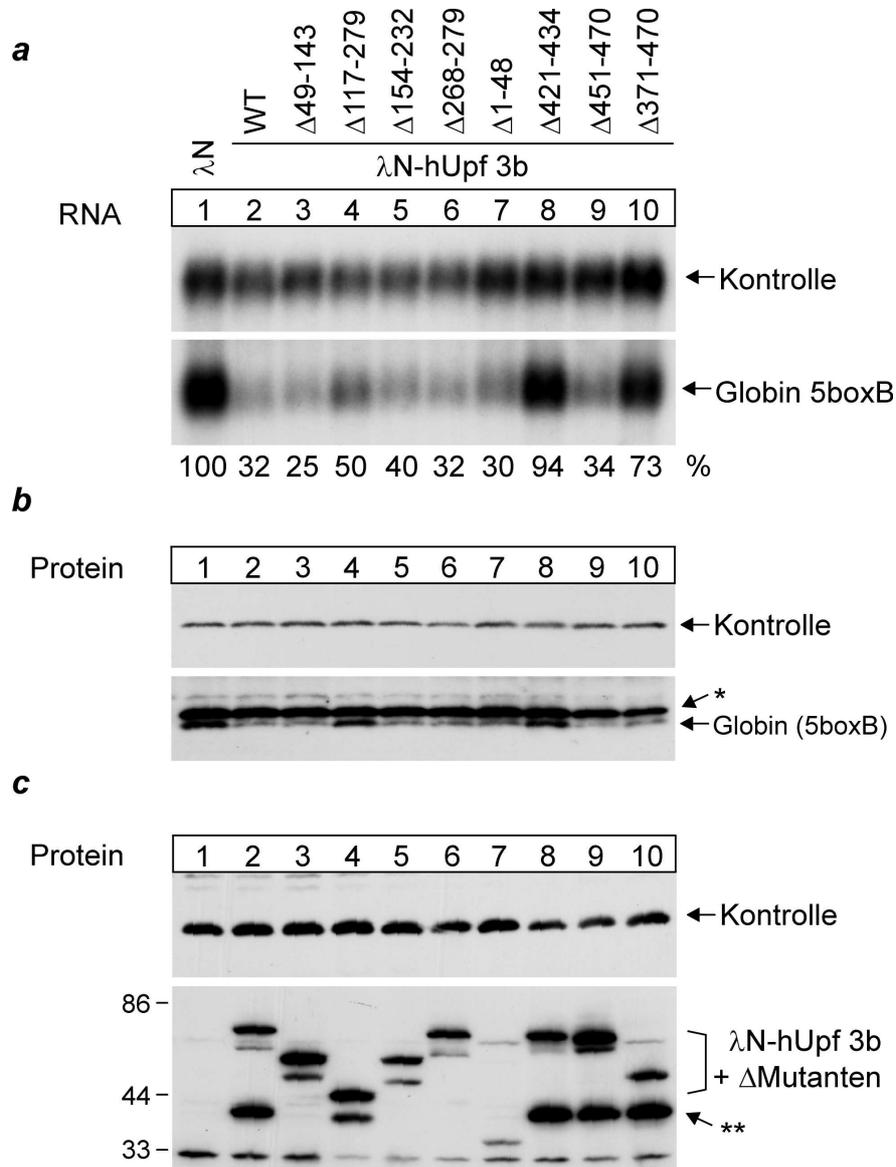


Abbildung 32: **a**, Northern-Blot-Analyse von zytoplasmatischer Gesamt-RNA aus HeLa-Zellen, die mit den in Abb. 31 dargestellten Deletionsmutanten von λN -hUpf3b sowie einem Kontroll- und dem 5boxB-Konstrukt transfiziert wurden. Die Expressionsstärken der Test-mRNAs stellen einen Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Experimenten dar (WT und $\Delta 421-434$ $n > 8$). **b**, Immunblot-Analyse von Proteinlysaten derselben Zellen mit einem β -Globin spezifischen Antikörper. Die Bande des Translationsproduktes des Kontroll- und Testkonstruktes ist eingezeichnet. Eine unspezifische Hintergrundbande läuft knapp oberhalb des Produktes der Test-mRNA und ist markiert (*). **c**, Immunblot-Analyse der Expression aller λN -Fusionsproteine mit einem λN -spezifischen Antikörper (Kontrolle: β -Globin spezifischer Antikörper). Ein prominentes Degradationsprodukt (**) wurde in allen Versuchen beobachtet, tritt jedoch nicht in allen Spuren auf. Die Größe der detektierten Banden wurde mit Hilfe eines Protein-Standards ermittelt (schematisch auf der linken Seite angedeutet).

daß diese Mutante die Translation der mRNA inhibiert und dadurch kein NMD auftreten kann. Es gibt einige Beispiele für die Translationsregulation via 3'UTR, weswegen diese Möglichkeit durchaus vorstellbar erscheint (Ostareck *et al.*, 1997; Ostareck-Lederer *et al.*, 1998). Um dies zu überprüfen, wurde die Translation der 5boxB-mRNA untersucht und das Translationsprodukt β -Globin mittels Immunblot nachgewiesen. Die Auswertung zeigte, daß die Menge an Translationsprodukten in allen Spuren sehr gut mit der Menge an Transkripten korreliert (**Abb. 32b**; vergleiche die Banden des Northern Blots **Abb. 32a** mit den Banden des Immunblots **Abb. 32c**). Dies beweist, daß in diesem Ansatz alle Transkripte einer vergleichbaren Translation unterliegen und daher auch NMD-kompetent sein sollten.

Eine andere mögliche Erklärung für den Verlust der NMD-Kompetenz der Deletionsmutanten könnte natürlich ihre verringerte oder nicht vorhandene Expression sein. Daher wurde die zytoplasmatische Expression aller verwendeten Fusionsproteine überprüft. Die Immunblot-Analyse mit einem Antikörper gegen das λ N-Peptid zeigt, daß alle Fusionsproteine eine vergleichbare Expressionsstärke aufweisen, mit Ausnahme der Mutante Δ 1-48, die nur sehr schwach exprimiert wird (**Abb. 32c**). Dies könnte durch Deletion einer nukleären Exportsequenz zu erklären sein, die in dieser Region lokalisiert ist (Serin *et al.*, 2001). Trotz ihrer schwachen Expression bewirkt die Δ 1-48 Mutante einen deutlichen NMD-Phänotyp. Die unterschiedlichen NMD-Kompetenzen der Deletionsmutanten können also nicht durch unterschiedliche Expressionsstärken erklärt werden.

Eine grundsätzliche Erklärungsmöglichkeit für den Effekt der hUpf3b Δ 421-434 Mutante könnte in einem dominant-negativen Effekt dieser Mutante auf die zelluläre NMD-Kompetenz liegen. Ein solcher Mechanismus ist für eine Punktmutante von hUpf1 bekannt (Sun *et al.*, 1998). Eine derartige pleiotrope Inhibierung des gesamten zellulären NMD wurde überprüft, indem das hUpf3b-Protein mit der 421-434 Deletion gemeinsam mit β -Globin WT- und NS 39-mRNAs exprimiert wurde, die keine Bindungsstellen für das λ N-Peptid aufwiesen. Sollte das Protein einen NMD-inhibierenden Effekt haben, würde dies

den Abbau des exzellenten NMD-Substrats NS 39 β -Globin beeinflussen. Es zeigte sich jedoch, daß die NS 39-mRNA durch die Mutante nicht stabilisiert wurde, sondern den üblichen Abbau in einer normalen Stärke zeigte (Daten nicht gezeigt). Dies beweist, daß die Mutante Δ 421-434 von hUpf3b nicht mit dem Ablauf des zellulären NMD *per se* interferiert, sondern keine spezifische NMD-Aktivierung vermitteln kann.

4.3.4 Punktmutationen im Bereich 421-434 interferieren mit der NMD-Wirkung von hUpf3b

Es gibt Hinweise dafür, daß die Deletion von größeren Regionen eines Proteins Auswirkungen auf die korrekte Faltung des gesamten Proteins haben kann. Dies bedeutet, daß die Deletion eines Bereiches auch die Funktion von weiter

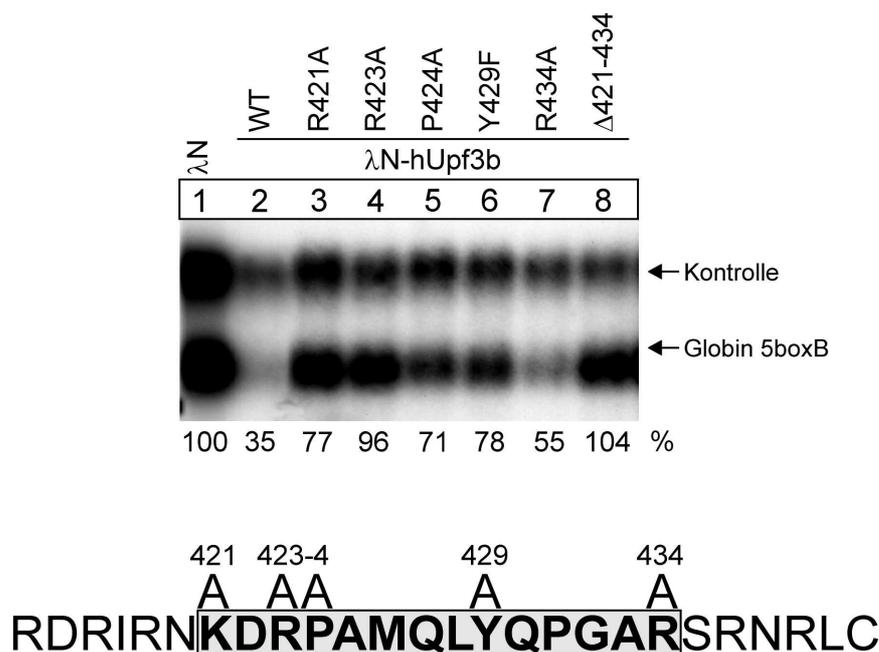


Abbildung 33: Punktmutationen wurden in λ N-hUpf3b innerhalb der Aminosäuren 421-434 eingefügt. Eine schematische Darstellung dieser Punktmutationen befindet sich im unteren Teil der Abbildung. Der Northern-Blot zur Analyse der NMD-Wirkung der Mutanten ist darüber abgebildet. Die RNA-Präparationen stammen von Zellen, die entweder mit den Punktmutanten (Spuren 3-7), dem λ N-Peptid allein (Spur 1, Negativkontrolle), λ N-hUpf3b WT (Spur 2, Positivkontrolle) oder der Deletionsmutante Δ 421-434 (Spur 8, Kontrolle für einen deutlichen NMD-Verlust) transfiziert wurden. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und ein Mittelwert der Expressionsstärken daraus errechnet.

entfernten Domänen innerhalb eines Proteins beeinträchtigen kann. Es wäre also möglich, daß die Deletion $\Delta 421-434$ keine spezifisch erforderliche Funktionsdomäne von hUpf3b entfernt, sondern mit der korrekten Faltung des ganzen Proteins interferiert. Dies wurde überprüft, indem in der Region 421-434 nur einzelne Aminosäuren verändert und die Auswirkung dieser Punktmutationen auf den NMD ermittelt wurden. Diese Analyse zielte vor allem auf Aminosäuren, denen mit erhöhter Wahrscheinlichkeit eine funktionelle oder strukturelle Rolle innerhalb einer Proteinsequenz zukommt. Hier wurden die folgenden Punktmutationen untersucht (**Abb. 33**, unteres Schema): Lysin421→Alanin; Arginin423→Alanin; Prolin424→Alanin; Tyrosin429→Phenylalanin; Arginin434→Alanin. Die Punktmutanten wurden mit der 5boxB Test-mRNA gemeinsam exprimiert. Dabei zeigte sich, daß nur die Mutante Arginin434→Alanin noch eine NMD-Aktivierung ähnlich dem hUpf3b WT zeigte, während alle anderen Punktmutanten eine deutlich verringerte NMD-Funktion aufwiesen (**Abb. 33**). Die Expressionanalyse mit einem λ N-spezifischen Antikörper ergab, daß die verringerte NMD-Funktion der Punktmutanten nicht auf ihre verringerte Expression zurückzuführen ist (Daten nicht gezeigt). Man kann also aufgrund dieser Daten davon ausgehen, daß die Aminosäuren 421-434 des hUpf3b-Proteins eine NMD-vermittelnde Funktion aufweisen, die sowohl durch Deletion der gesamten Sequenz als auch durch Mutation einzelner Aminosäuren in ihrer Funktionalität gestört wird. Dies ist damit die erste Untersuchung, die einer Sequenz des Proteins hUpf3b eine eindeutige Funktion beim Nonsense-vermittelten mRNA-Abbau zuweisen kann.

4.3.5 Der C-Terminus von hUpf3b ist notwendig aber nicht hinreichend um NMD zu vermitteln

Die bisher gezeigten Daten sprechen dafür, daß dem C-Terminus von hUpf3b eine NMD-aktivierende Wirkung innewohnt. Mutationen können diese Wirkung aufheben und zeigen damit, daß der C-Terminus notwendig für die NMD-Funktion von hUpf3b ist. Es könnte also sein, daß ausschließlich C-terminale Sequenzen beim NMD eine Rolle spielen und dem restlichen Protein nur

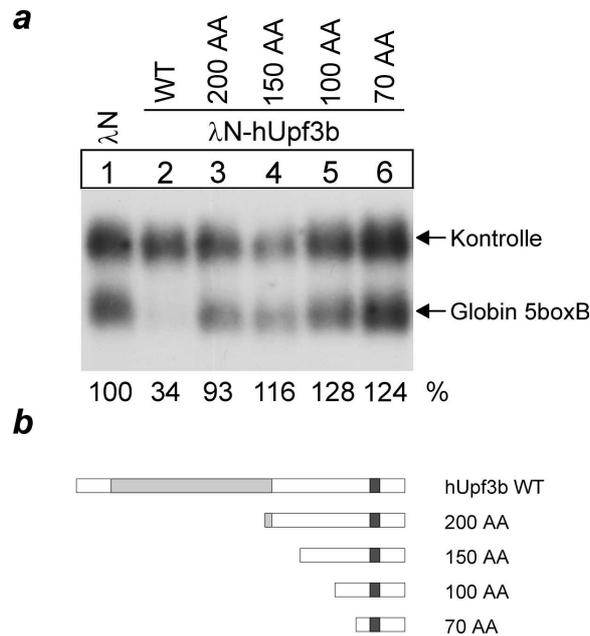


Abbildung 34: **a**, HeLa-Zellen wurden entweder mit kleinen λ N-fusionierten Fragmenten des hUpf3b C-Terminus (Spur 3: 200 Aminosäuren; Spur 4 : 150 AA; Spur 5: 100 AA; Spur 6: 70 AA), λ N-Peptid alleine (Spur 1) oder λ N-hUpf3b Wildtyp (Spur 2) transfiziert und die Wirkung auf die 5boxB mRNA-Expression mittels Northern-Blot analysiert. Die prozentuale Expressionsstärke wurde mit drei unabhängigen Experimenten ermittelt. **b**, Schematische Darstellung der verwendeten Fragmente des hUpf3b C-Terminus. Die Länge der Fragmente betrug 200, 150, 100 und 70 Aminosäuren, alle enthielten die wichtige Region 421-434 (als dunkler Kasten dargestellt; heller Kasten: hochkonservierter N-terminaler Bereich).

verzichtbare regulative Aufgaben zukommen. Dies würde bedeuten, daß der C-Terminus nicht nur notwendig, sondern auch hinreichend für den hUpf3b-vermittelten NMD ist. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden C-terminale Fragmente von hUpf3b als λ N-Fusionsproteine exprimiert, um ihre Auswirkung auf die Stabilität der 5boxB mRNA zu analysieren. Die verwendeten Fragmente waren 200, 150, 100 und 70 Aminosäuren lang und enthielten alle die Aminosäuren 421-434 von hUpf3b (**Abb. 34b**). Die Auswertung der Experimente ergab, daß der C-Terminus von hUpf3b offensichtlich nicht ausreicht, um einen deutlichen Abbau der 5boxB mRNA zu induzieren (**Abb. 34a**). Andererseits bewirkte das längste Fragment von 200 C-terminalen Aminosäuren jedoch eine Reduktion, die etwas stärker als bei den kürzeren Peptiden ausfiel, so daß

zumindest eine teilweise NMD-Funktion erkennbar ist. (**Abb. 34a**; Spur 3). In diesem Zusammenhang ist auch die Mutante $\Delta 117-279$ von Bedeutung, denn auch sie weist nur eine eingeschränkte NMD-Funktion auf. Offenbar ist also der C-Terminus von hUpf3b nicht alleine für die vollständige NMD-Vermittlung verantwortlich.

Abschließend bleibt festzustellen, daß zwei Regionen von hUpf3b für die NMD-Vermittlung notwendig sind. Ein Bereich am C-Terminus enthält die Aminosäuren 421-434 und ist äußerst sensitiv gegenüber Mutationen, ein zweiter Bereich innerhalb der konservierten Region (49-279) wird nur bei größeren Deletionen in seiner Funktion eingeschränkt.

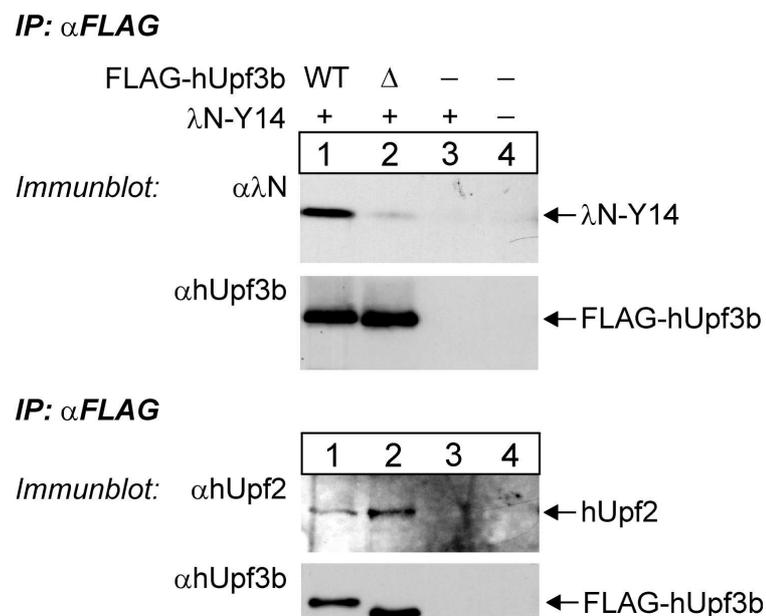


Abbildung 35: Immunpräzipitationen zur Analyse der Proteininteraktionen von hUpf3b WT und $\Delta 421-434$. HeLa-Zellen wurden mit einem Expressionsvektor für FLAG-hUpf3b Wildtyp (WT, Spur 1), FLAG-hUpf3b $\Delta 421-434$ (Δ , Spur 2) sowie λ N-Y14 (Spuren 1-3) transfiziert. Aus den Proteinlysaten wurden mit α FLAG-Agarose die hUpf3b-Komplexe immunpräzipitiert und alle gebundenen Proteine mittels SDS-PAGE (oberes Gel: 12%, unteres Gel: 6%) aufgetrennt. Die präzipitierten Proteine wurden mit Antikörpern gegen hUpf3b, λ N (für kotransfiziertes Y14) oder hUpf2 (endogenes Protein) nachgewiesen. Lysate von untransfizierten Zellen wurden in Spur 4 verwendet.

4.3.6 Die Aminosäuren 421-434 von hUpf3b vermitteln die Interaktion mit Y14

Die Anfälligkeit von hUpf3b gegenüber Mutationen innerhalb des Bereiches von 421-434 legt nahe, daß dadurch eine Protein-Protein-Interaktion gestört wird, die für die Signalweiterleitung bzw. die Signalaufnahme im Nonsense-vermittelten mRNA-Abbau eine entscheidende Rolle spielt. Bisher war postuliert worden, daß hUpf3a und hUpf3b an den EJC gebunden werden und ein Signal an hUpf2 weiterleiten (Kim *et al.*, 2001a; Lykke-Andersen, 2001; Lykke-Andersen *et al.*, 2000; Lykke-Andersen *et al.*, 2001). Es ist jedoch unwahrscheinlich, daß die Aminosäuren 421-434 für die Bindung an hUpf2 verantwortlich sind, da die Interaktion von hUpf3b mit hUpf2 innerhalb der Aminosäuren 49-143 lokalisiert wurde (Serin *et al.*, 2001). Nun muß geklärt werden, welche Interaktion durch die Aminosäuren 421-434 vermittelt wird. Bislang sind nur einige Bindungspartner von hUpf3b identifiziert worden und zwar hUpf2 (Serin *et al.*, 2001), Y14 (Kim *et al.*, 2001a) und RNPS1 (Lykke-Andersen *et al.*, 2001). Zur Untersuchung der Interaktion zwischen diesen Proteinen und hUpf3b wurden FLAG-hUpf3b Fusionsproteine in HeLa-Zellen transient gemeinsam mit dem potentiellen Interaktionspartner Y14 (als λ N-Fusionsprotein) ko-exprimiert. Das FLAG-hUpf3b wurde mit Antikörpern gegen das FLAG-Epitop präzipitiert und die aufgereinigten Komplexe in dieser Immunblot-Analyse mit α - λ N, α -hUpf2 und α -hUpf3b Antikörpern untersucht. Eine Ribonuklease A-Behandlung der für die Immunpräzipitation verwendeten Lysate stellte sicher, daß ausschließlich direkte Wechselwirkungen zwischen den Proteinen ohne stabilisierende RNA-Interaktionen untersucht werden können. Ein Vergleich der Präzipitationen von FLAG-hUpf3b WT und FLAG-hUpf3b Δ 421-434 ergab, daß beide Proteine gleich stark mit hUpf2 (endogenes Protein) interagieren, die Bindung an Y14 (ko-transfiziert) durch die Deletion jedoch aufgehoben wird (**Abb. 35**). Aus diesen Daten läßt sich schließen, daß Y14 ein Mediator des NMD ist, der in der Signalkaskade unseres experimentellen Systems distal von hUpf3b angesiedelt ist. Die Deletion der Bindungsstelle für Y14 in hUpf3b unterbindet offenbar die Rekrutierung von Y14 und damit die Degradation der 5boxB Test-mRNA. Die

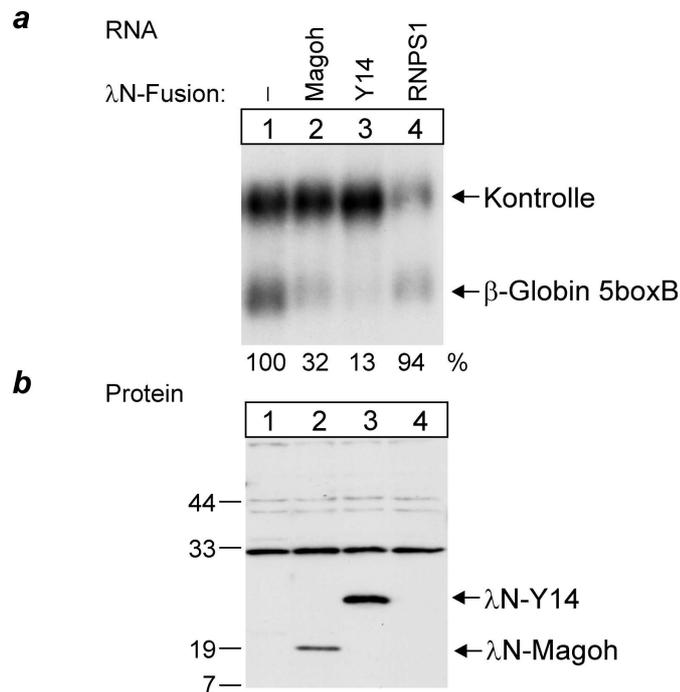


Abbildung 36: **a**, HeLa-Zellen wurden mit λN-Y14 (Spur 3), λN-Magoh (Spur 2) und λN-RNPS1 (Spur 4) Konstrukten transfiziert und die Expression der 5boxB mRNA mittels Northern-Blot analysiert. Die Transfektion für Spur 1 wurde mit dem λN-Peptid ohne Fusionspartner durchgeführt. **b**, Immunblot-Analyse der Expression der Fusionsproteine in Zelllysaten derselben Transfektion. Die Analyse erfolgte mit einem λN-spezifischen Antikörper. Auch bei längeren Expositionen wurde kein Signal für λN-RNPS1 erhalten. Die Laufhöhen eines Protein-Größenstandards sind schematisch angedeutet.

bisherige Hypothese, daß Y14 und RNPS1 zu einer Rekrutierung von hUpf3b an die mRNA und einer nachfolgenden hUpf2- und hUpf1-Aktivierung führen, kann damit widerlegt werden.

Weitere Daten unterstützen diese Hypothese einer Signalweiterleitung über Y14 und nicht über hUpf2. Eine der in dieser Arbeit untersuchten Deletionsmutanten von hUpf3b ($\Delta 49-143$) vermittelt noch immer deutlich NMD, obwohl die postulierte hUpf2-Bindungsstelle nicht mehr vorhanden ist. Weitere Untersuchungen mit dieser Mutanten werden folgen, um diese ersten Daten zu unterstützen.

4.3.7 Y14 ist ein starker Vermittler von NMD

Wenn die Interaktion von hUpf3b mit Y14 notwendig für den NMD ist, dann kann man vermuten, daß Y14 auch alleine zur Degradation der Test-mRNA führen kann. Daher wurde Y14 als λ N-Fusionsprotein exprimiert und die Auswirkung auf die 5boxB-mRNA analysiert. Der Versuch zeigt eine sehr starke Verminderung der 5boxB-mRNA durch λ N-Y14 (**Abb. 36a**; Spur 3). Dieser Abbau ist wesentlich stärker als der von hUpf3b induzierte Abbau. Im gleichen Experiment wurden auch λ N-Fusionsproteine von Magoh (ein Interaktionspartner von Y14 und Komponente des EJC) und RNPS1 (EJC-Komponente) untersucht. Während Magoh zu einer mit hUpf3b vergleichbaren Verringerung bei der Test-mRNA führte (**Abb. 36a**; Spur 2), war bei RNPS1 kein Effekt zu beobachten (**Abb. 36a**; Spur 4). Eine mögliche Erklärung dafür ergibt sich aus der Expressionsanalyse der Fusionsproteine. Sowohl λ N-Y14 als auch λ N-Magoh werden gut exprimiert, dagegen ist λ N-RNPS1 nicht detektierbar (**Abb. 36b**). Es

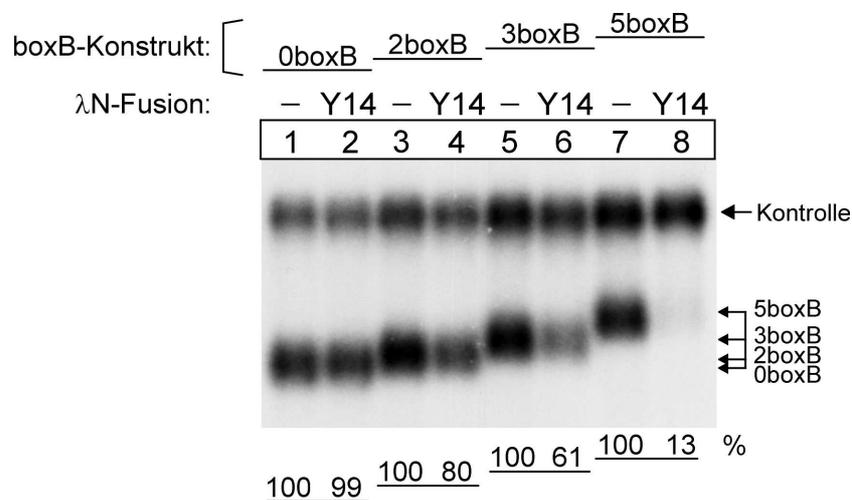


Abbildung 37: Northern-Blot-Analyse der RNA-Präparationen von HeLa-Zellen, die mit λ N-Peptid (Spuren 1, 3, 5, 7) oder λ N-Y14 (Spuren 2, 4, 6, 8) sowie einer Kontrolle (WT300+eIII) und Test-Konstrukten mit unterschiedlichen Anzahlen von boxB Sequenzen in der 3'UTR (0 boxB: Spuren 1&2, 2 boxB: Spuren 3&4, 3 boxB: Spuren 5&6 oder 5 boxB: Spuren 7&8) transfiziert wurden. Die Expressionstärke bezieht sich immer auf die Negativkontrolle mit der gleichen Anzahl boxB Sequenzen.

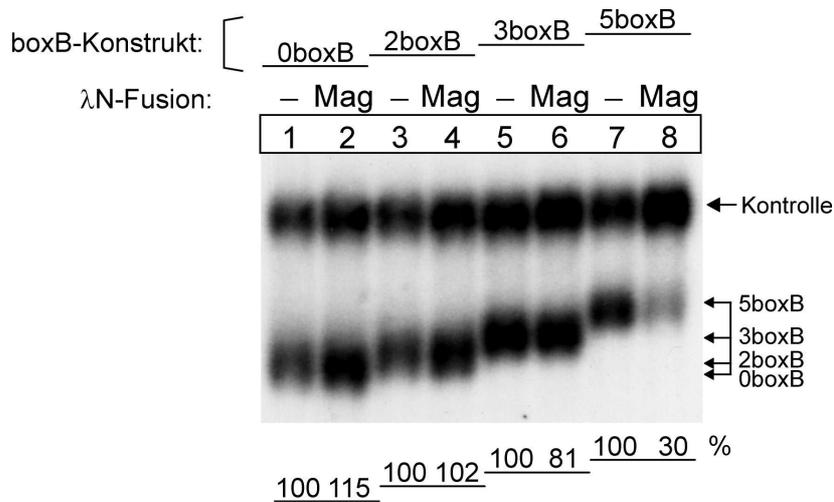


Abbildung 38: Northern-Blot-Analyse von RNA-Präparationen aus HeLa-Zellen, die mit λN-Peptid (Spuren 1, 3, 5, 7) oder λN-Magoh (Spuren 2, 4, 6, 8) sowie der Kotransfektions-Kontrolle (WT300+eIII) und Test-Konstrukten mit unterschiedlichen Anzahlen von boxB Sequenzen in der 3'UTR (0 boxB: Spuren 1 & 2, 2 boxB: Spuren 3 & 4, 3 boxB: Spuren 5 & 6 oder 5 boxB: Spuren 7 & 8) transfiziert wurden. Die angegebene Expressionstärke bezieht sich auf die Negativkontrolle mit der gleichen Zahl boxB Sequenzen.

bleibt zu klären, ob RNPS1 tatsächlich nicht exprimiert wird oder ob es mit dem hier verwendeten Lysepuffer nicht solubilisiert wird. Diese mögliche Erklärung ergab sich aus der Beobachtung, daß RNPS1 in einem anderen Experiment mit einem alternativen Lysepuffer detektiert werden konnte.

Die hier gezeigten Versuche haben die Identifikation zweier weiterer Proteine ermöglicht, die zur Verminderung der Test-mRNA im experimentellen System führen. Die weitere Charakterisierung dieser Verminderung soll zeigen, ob es sich dabei um NMD handelt.

4.3.8 Y14 ist ein bona fide Mediator des NMD

Eine ausgeprägte Verminderung der 5boxB-mRNA tritt bei gleichzeitiger Expression des λN-Y14 Fusionsproteins auf. Einen etwas schwächeren Effekt beobachtet man für λN-Magoh. Es bleibt zu klären, ob diese Verminderungen der Test-mRNAs die Kriterien des NMD im Sinne einer Abhängigkeit von der Position, von der Aktivität des Spleißprozesses (in diesem System ersetzt durch

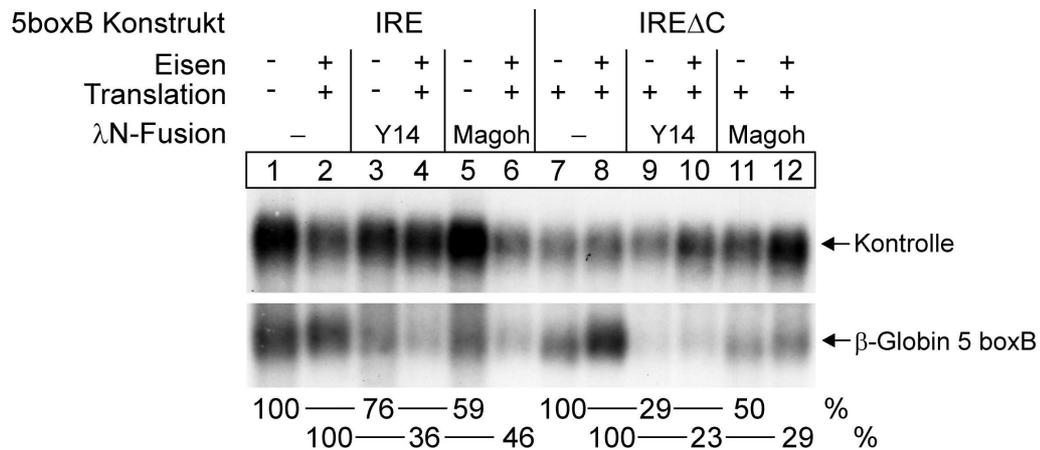


Abbildung 39: Untersuchung zur Translationsabhängigkeit der λ N-Y14 und λ N-Magoh vermittelten Expressionsverminderung der 5boxB Test-mRNA. HeLa-Zellen wurden mit 5boxB-Testkonstrukten entweder mit funktionellem IRE (Spuren 1-6) oder nicht-funktionellem IRE- Δ C (Spuren 7-12) transfiziert sowie der Kontrolle WT300+eIII und den jeweils angegebenen λ N-Konstrukten (- entspricht nur λ N-Peptid ohne Fusionspartner). Die Translation der IRE-haltigen mRNAs wurde mit Deferoxaminmesilat (Spuren 1, 3, 5) bzw. Häm-Arginat (Spuren 2, 4, 6) spezifisch reguliert. Die mit nicht-funktionellen IRE- Δ C Konstrukten transfizierten Zellen wurden auf die gleiche Weise behandelt, um für unspezifische Effekte der Behandlung zu kontrollieren. Die angegebenen Expressionsstärken beziehen sich auf die identisch behandelte Negativkontrolle.

die λ N-Rekrutierung an die boxB-Sequenzen) und von der Translation erfüllen. Zuerst wurde die Spezifität der Interaktion mit Konstrukten analysiert, die keine, zwei oder drei boxB Sequenzen in der 3'UTR aufweisen. Dadurch wird untersucht, ob nur die spezifische Interaktion von λ N und boxB den beobachteten Effekt vermittelt. Wie bereits für λ N-hUpf3b gezeigt, ist auch bei λ N-Y14 und λ N-Magoh die vermindernde Wirkung auf die Test-mRNAs direkt abhängig von der Anzahl von boxBs (**Abb. 37** und **38**). Besonders bemerkenswert ist, daß λ N-Y14 bereits bei nur zwei boxB Sequenzen eine signifikante Verminderung der Test-mRNA erzeugt (**Abb. 37**, vergleiche Spuren 3 & 4). Dies spricht für die besonders hohe Effizienz von Y14 im experimentellen System bzw. für die besonders effiziente Bindung des Fusionsproteins an die boxB-Sequenzen. Insbesondere im Vergleich zu den nur schwachen Effekten eines MS2-Y14

Fusionsproteins (Lykke-Andersen *et al.*, 2001) zeigt sich hier die Überlegenheit dieses experimentellen Systems. Diese Ergebnisse beweisen, daß der Abbau ausschließlich spezifisch durch die λ N-Peptid/boxB Interaktion vermittelt wird.

Als nächstes soll geklärt werden, ob die Fusionsproteine λ N-Y14 und λ N-Magoh die Kriterien des NMD erfüllen können. Hierzu wurden wiederum 5boxB Konstrukte verwendet, die entweder ein funktionelles IRE oder ein nicht-funktionelles IRE in der 5'UTR enthielten. Durch Veränderung der Eisenkonzentration im Kulturmedium der transfizierten Zellen wurde spezifisch die Translation der Testkonstrukte reguliert. Die Auswertung des Experiments ergab für die beiden Fusionsproteine unterschiedliche Ergebnisse. Während die durch λ N-Y14 ausgelöste Test-mRNA Reduktion nur bei aktivierter Translation auftrat (NMD-Kriterium erfüllt), war der Effekt von λ N-Magoh unabhängig von der Translation der Test-mRNA (NMD-Kriterium nicht erfüllt; **Abb. 39**). Dies könnte darauf hindeuten, daß λ N-Magoh auf einen früheren Schritt des mRNA-Metabolismus einwirkt. Bei λ N-Y14 jedoch belegen die Daten eine direkte Rolle als Vermittler des NMD.

Insgesamt konnte in dem hier vorgestellten experimentellen System die Analyse funktioneller Domänen von RNA-bindenden Proteinen am Beispiel von hUpf3b demonstriert werden. Das hier verwendete kurze λ N-Peptid interferiert dabei nicht mit der Funktion von kleinen oder durch Deletionen verkürzten Proteinen. Zum anderen konnte ein neuer Faktor identifiziert werden, der eine Rolle beim NMD spielt. Auch hier ist vermutlich entscheidend, daß die RNA-Bindedomäne nur so klein ist, daß sie die Funktion der Fusionspartner nicht stört.