

# **Posttranskriptionale Veränderungen der Genexpression bei hereditären Erkrankungen**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.

des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

durchgeführt im Labor von Prof. Dr. A. E. Kulozik, PhD,  
Universitätsklinikum Charité, Berlin

von Niels Henrik Gehring aus Berlin – Wilmersdorf

Berlin und Heidelberg, den 27.03.2002

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. A. E. Kulozik, PhD  
Universitätsklinikum Heidelberg  
Kinderklinik,  
Ärztlicher Direktor  
Abt. III, Pädiatrische Onkologie und Hämatologie  
Im Neuenheimer Feld 153  
69120 Heidelberg
  
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. V. A. Erdmann  
Freie Universität Berlin  
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
Institut für Chemie/Biochemie  
Thielalle 63  
14195 Berlin

Tag der Disputation: 24.10.2002

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
1.1	Die Bedeutung des humanen Genoms	6
1.2	Kontrolle der Genexpression	9
1.2.1	Das Konzept eines regulierten Transkripts	10
1.3	Die Blutgerinnung	15
1.3.1	Kontrolle der Blutgerinnung	17
1.3.2	Hereditäre Störungen der Blutgerinnung	17
1.4	Nonsens-vermittelter mRNA-Abbau	19
1.4.1	Modelle des NMD	20
1.4.2	Die Rolle des Poly(A)-Schwanzes beim NMD	23
1.4.3	Die Komponenten des NMD beim Menschen	25
<b>2</b>	<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>31</b>
3.1	Mikrobiologische Methoden	31
3.1.1	Bakterienstämme	31
3.1.2	Phagen	31
3.1.3	Herstellung elektrokompenter Bakterien und Elektroporation	31
3.2	Kultur eukaryontischer Zellen	32
3.3	Transfektion eukaryontischer Zellen	32
3.3.1	BBS/Kalziumphosphat Methode	32
3.3.2	HBS/Kalziumphosphat Methode	33
3.4	Plasmid-Konstrukte	34
3.5	In vitro Mutagenese	39
3.5.1	PCR in vitro Mutagenese	40
3.5.2	In vitro Mutagenese mit Uracil-haltiger einzelsträngiger DNA	40
3.6	Sequenzierung von DNA	41
3.7	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	42
3.8	Plasmid-Präparation im Mini-Maßstab	42
3.9	Plasmid-Präparation im Midi-, Maxi- und Mega-Maßstab	42
3.10	RNA-Präparation aus eukaryontischen Zellen	42
3.10.1	Präparation von zytoplasmatischer Gesamt-RNA	42
3.10.2	Präparation nukleärer Gesamt-RNA	43
3.10.3	Fraktionierung von zytoplasmatischer Gesamt-RNA in poly(A)-angereicherte und poly(A)-abgereicherte RNA	43
3.11	Ribonuklease-Protektions-Analyse	43
3.12	RNA-Analyse mittels Northern-Blot	45
3.13	In vitro Transkription	46
3.14	Primer-Extension-Analyse	47
3.14.1	Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden	48
3.15	LM-PAT-Assay	48
3.16	RT-PCR	49

<b>3.17</b>	<b>Proteinextraktion</b>	<b>49</b>
3.17.1	Proteinbestimmung	50
<b>3.18</b>	<b>Immunpräzipitation</b>	<b>50</b>
<b>3.19</b>	<b>Protein-Analyse mittels Immunblot</b>	<b>50</b>
<b>3.20</b>	<b>Puffer und Lösungen</b>	<b>51</b>
<b>3.21</b>	<b>Medien für Bakterienkultur</b>	<b>54</b>
<b>3.22</b>	<b>Reagenzien und Materialien</b>	<b>55</b>
3.22.1	Chemikalien	55
3.22.2	Antikörper	56
3.22.3	Laborkunststoffwaren	56
3.22.4	Enzyme	56
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>57</b>
<b>4.1</b>	<b>Untersuchung des molekularen Mechanismus der Prothrombin 20210 G&gt;A Mutation</b>	<b>57</b>
4.1.1	Experimentelles System	58
4.1.2	Die F2 20210 G>A Mutation führt zu erhöhter mRNA- und Protein-Akkumulation	59
4.1.3	Die F2 20210 G>A Mutation erhöht die mRNA Expression auf post-transkriptionaler Ebene	60
4.1.4	F2*A und F2*G mRNAs weisen identische Poly(A)-Schwänze und 3'UTRs auf	63
4.1.5	Die Mutation F2 20210 G>A bewirkt eine Erhöhung der 3'End-Prozessierungs-effizienz	65
<b>4.2</b>	<b>Rolle des Poly(A)-Schwanzes beim Nonsens-vermittelten mRNA-Abbau</b>	<b>69</b>
4.2.1	Experimentelles System	70
4.2.2	Hybrid-mRNAs aus HBB und H1F3 werden korrekt am 3'Ende prozessiert	71
4.2.3	Hybrid-mRNAs bilden funktionelle Histon 3'Enden	74
4.2.3	Demonstration der eisenabhängigen Translationsregulation im experimentellen System	75
4.2.4	Nicht-polyadenylierte Hybrid-mRNAs mit Histon 3'Enden unterliegen dem Nonsens-vermittelten mRNA-Abbau	77
4.2.5	Die verringerte Expression der Nonsens-mutierten Hybrid-mRNAs ist spleißabhängig	80
<b>4.3</b>	<b>Charakterisierung von Komponenten des Nonsens-vermittelten mRNA-Abbaus</b>	<b>84</b>
4.3.1	Das experimentelle $\lambda$ N/boxB $\beta$ -Globin-System	85
4.3.2	Untersuchung potentieller NMD-Faktoren	92
4.3.3	Funktionelle Analyse von Deletionsmutanten von hUpf3b	92
4.3.4	Punktmutationen im Bereich 421-434 interferieren mit der NMD-Wirkung von hUpf3b	97
4.3.5	Der C-Terminus von hUpf3b ist notwendig aber nicht hinreichend um NMD zu vermitteln	98
4.3.6	Die Aminosäuren 421-434 von hUpf3b vermitteln die Interaktion mit Y14	101

4.3.7	Y14 ist ein starker Vermittler von NMD	103
4.3.8	Y14 ist ein bona fide Mediator des NMD	104
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>107</b>
5.1	Untersuchung des molekularen Mechanismus der Prothrombin 20210 G>A Mutation	107
5.1.1	Ein neuartiger Mechanismus einer hereditären Erkrankung	107
5.1.2	Auswirkungen der 3'End-Prozessierungseffizienz auf die Prothrombin-Expression	109
5.1.3	Fazit	109
5.1.4	Ausblick	110
5.2	Rolle des Poly(A)-Schwanzes beim Nonsens-vermittelten mRNA-Abbau	112
5.2.1	Die Kopplung der Polyadenylierung und anderer RNA-Prozessierungsreaktionen	114
5.2.2	Fazit	114
5.2.3	Ausblick	114
5.3	Charakterisierung von Komponenten des Nonsens-vermittelten mRNA-Abbaus	115
5.3.1	Charakterisierung von hUpf3b-Domänen im NMD	118
5.3.2	Identifizierung von Y14 als bona fide NMD-Mediator	120
5.3.3	Fazit	121
5.3.4	Ausblick	121
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>125</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>127</b>
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>129</b>