

# Molekulare Charakterisierung des *MID1*-Gens

DISSERTATION

**Zur Erlangung des akademischen Grades**

**d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m**

**(Dr. rer. nat.)**

**am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie**

**der Freien Universität Berlin**

vorgelegt von

Jennifer Winter

geboren am 20. November 1972 in Marburg

Berlin, Mai 2003

**1. Gutachter: Professor Dr. Hans-Hilger Ropers**

**2. Gutachter: Professor Dr. Volker A. Erdmann**

**Promotionsdatum: 14.11.2003**

# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Einleitung</b> .....   | <b>4</b>  |
| 1.1 Opitz BBB/G Syndrom .....  | 4         |
| 1.2 Das MID1-Gen .....   | 4         |
| 1.3 Mutationen im MID1-Gen .....   | 5         |
| 1.4 Das MID1-Protein .....   | 5         |
| 1.5 Die Funktion des MID1-Proteins .....   | 8         |
| 1.6 MID2 .....   | 9         |
| 1.7 Expression von MID1 in der Maus .....  | 10        |
| 1.8 MID1 in Fugu rubripes .....  | 11        |
| 1.9 Alternatives Spleißen .....  | 11        |
| 1.10 Durch vorzeitiges Stopkodon-vermittelter mRNA-Abbau .....   | 13        |
| 1.11 Alternativ gespleißte Transkripte mit vorzeitigen Stopkodons .....                                      | 14        |
| 1.12 Regulatorische RNAs .....   | 15        |
| 1.13 Fragestellung und Zielsetzung .....   | 15        |
| <b>2. Material und Methoden</b> .....  | <b>17</b> |
| 2.1 Materialien und Chemikalien .....  | 17        |
| <b>2.1.1 Chemikalien</b> .....   | 17        |
| <b>2.1.2 Puffer und Lösungen</b> .....   | 18        |
| <b>2.1.3 Enzyme</b> .....  | 21        |
| <b>2.1.4 Primer</b> .....  | 22        |
| <b>2.1.5 Vektoren</b> .....  | 24        |
| <b>2.1.6 Zelllinien</b> .....  | 24        |
| <b>2.1.7 Biologisches Material</b> .....   | 25        |
| 2.2 Methoden .....   | 25        |
| <b>2.2.1 Molekularbiologische Methoden</b> .....   | 25        |
| 2.2.1.1 DNA-Agarose-Gelelektrophorese .....  | 25        |
| 2.2.1.2 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese .....   | 25        |
| 2.2.1.3 Isolierung genomischer DNA aus Fibroblasten .....  | 25        |
| 2.2.1.4 Plasmid-DNA-Isolierung .....   | 26        |
| 2.2.1.5 DNA-Isolierung aus Agarose .....   | 26        |
| 2.2.1.6 Aufreinigung von PCR-Produkten .....   | 27        |
| 2.2.1.7 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zelllinien .....   | 27        |
| 2.2.1.8 Isolierung von Gesamt-RNA aus Mausegeweben .....   | 27        |
| 2.2.1.9 Isolierung von PolyA <sup>+</sup> RNA aus Gesamt-RNA .....   | 27        |
| 2.2.1.10 Standard PCR .....  | 27        |
| 2.2.1.11 RT-PCR .....  | 28        |
| 2.2.1.12 3' und 5' Race .....  | 29        |
| 2.2.1.13 In vitro Mutagenese der Isoform Ex2d.7 (im pGemT easy Vektor) .....                                 | 29        |
| 2.2.1.14 Sequenzierung .....   | 30        |
| 2.2.1.15 TA-Klonierung von PCR-Produkten .....   | 30        |
| 2.2.1.16 Klonierung der MID1-Konstrukte in den pBTM116 Vektor .....  | 31        |
| 2.2.1.17 Umklonierung der Isoformen Ex2d.7, Ex2f.1 und Exi6.1 vom pBTM116 Vektor in den pBudCE4 Vektor ..... | 32        |
| 2.2.1.18 Southernblot .....  | 32        |
| 2.2.1.19 Markierung und Aufreinigung radioaktiver DNA-Sonden für die Southernblot Hybridisierung .....       | 33        |
| 2.2.1.20 Southernblot-Hybridisierung .....   | 33        |
| 2.2.1.21 Northernblot .....  | 34        |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.2.1.22 Markierung und Aufreinigung radioaktiver DNA-Sonden für die Northernblot-Hybridisierung .....  | 34        |
| 2.2.1.23 Markierung und Aufreinigung radioaktiver RNA-Sonden für die Northernblot-Hybridisierung .....  | 35        |
| 2.2.1.24 Markierung und Aufreinigung von Oligonukleotidproben für die Northernblot-Hybridisierung .....   | 35        |
| 2.2.1.25 Northernblot-Hybridisierung .....  | 36        |
| <b>2.2.2 Proteinbiochemische Methoden</b> .....   | 36        |
| 2.2.2.1 Proteinbestimmung nach Bradford .....   | 36        |
| 2.2.2.2 Westernblot .....   | 37        |
| 2.2.2.3 Immunfluoreszenz .....  | 38        |
| 2.2.2.4 Mikrotubuli-Präparation .....   | 39        |
| 2.2.2.5 2D-Gelelektrophorese .....  | 39        |
| <b>2.2.3 <math>\beta</math>-Galaktosidase-Assay</b> .....   | 40        |
| 2.2.3.1 Hefe-Transformation .....   | 40        |
| 2.2.3.2 ONPG-Flüssigassay .....   | 41        |
| <b>2.2.4 Sequenzanalyse</b> .....   | 42        |
| <b>3. Ergebnisse</b> .....  | <b>44</b> |
| 3.1 Auswirkungen bekannter MID1-Mutationen auf die PP2A-abhängige Phosphorylierung Mikrotubulus-assoziiierter Proteine in embryonalen Fibroblasten von OS-Patienten ..... | 44        |
| 3.2 Auswirkungen einer Punktmutation in der BBox2 des MID1-Proteins auf die Mikrotubulus-Assoziation von $\alpha$ 4 .....   | 45        |
| 3.3 Erkennung von Mutationen in der <i>MID1</i> -mRNS .....   | 47        |
| 3.4 Regulation von MID1 .....   | 49        |
| <b>3.4.1 Nix-Analyse des MID1-Gens</b> .....  | 49        |
| 3.4.1.1 Nix-Analyse des humanen MID1-Gens .....   | 50        |
| 3.4.1.2 NIX-Analyse von MID1 in der Maus .....  | 50        |
| <b>3.4.2 PipMaker-Analyse zwischen Mensch und Maus zur Charakterisierung konservierter Bereiche im MID1-Gen</b> .....   | 50        |
| <b>3.4.3 Exprimierte Sequenzen im humanen MID1-Gen</b> .....  | 52        |
| <b>3.4.4 Exprimierte Sequenzen in der Maus</b> .....  | 68        |
| <b>3.4.5 Gewebsspezifische Expression der alternativen Exons in Mensch und Maus</b> ....  | 73        |
| <b>3.4.6 N-terminal trunkeerte MID1-Proteine</b> .....  | 78        |
| <b>3.4.7 C-terminal trunkeerte MID1-Proteine</b> .....  | 80        |
| <b>3.4.8 Identifizierung von neuen Protein-Domänen in den alternativ gespleißten MID1-Isoformen</b> .....   | 85        |
| <b>3.4.9 NMD als Regulationsmechanismus</b> .....   | 86        |
| <b>3.4.10 Region Id</b> .....   | 89        |
| <b>4. Diskussion</b> .....  | <b>93</b> |
| 4.1 Auswirkungen bekannter MID1-Mutationen auf die PP2A-abhängige Phosphorylierung mikrotubulus-assoziiierter Proteine in embryonalen Fibroblasten von OS-Patienten ..... | 93        |
| 4.2 Auswirkungen einer Punktmutation in der BBox2 des MID1-Proteins auf die Mikrotubulus-Assoziation von $\alpha$ 4 .....   | 94        |
| 4.3 Erkennung von Mutationen in der mRNS .....  | 94        |
| 4.4 Regulation der MID1-Expression durch alternatives Spleißen und regulatorische RNAs .....  | 95        |
| <b>4.4.1 Alternativ gespleißte Transkripte im MID1-Gen von Mensch, Maus und Fugu</b> 96   |           |
| <b>4.4.2 Gewebsspezifische Expression der alternativ gespleißten MID1-Transkripte in Mensch und Maus</b> .....  | 98        |
| <b>4.4.3 N-terminal trunkeerte Proteine</b> .....   | 100       |
| <b>4.4.4 C-terminal trunkeerte Proteine</b> .....   | 101       |

|  |            |
|--|------------|
| 4.4.5 Identifizierung von neuen Protein-Domänen in den alternativ gespleißten MID1-Isoformen ..... | 104        |
| 4.4.6 Durch Stopkodons vermittelter mRNA-Abbau .....   | 105        |
| 4.4.7 Region 1d .....  | 106        |
| <b>5. Zusammenfassung.....</b>   | <b>110</b> |
| <b>6. Summary .....</b>  | <b>112</b> |
| <b>7. Ausblick.....</b>  | <b>114</b> |
| <b>8. Abkürzungen .....</b>  | <b>116</b> |
| <b>9. Literatur .....</b>  | <b>118</b> |
| <b>10. Danksagung.....</b>   | <b>123</b> |
| <b>11. Publikationen.....</b>  | <b>124</b> |
| <b>12. Curriculum Vitae .....</b>  | <b>125</b> |

## 5. Zusammenfassung

Das Opitz-Syndrom (OS) ist eine heterogene Erbkrankheit, die durch Organfehlbildungen der vorderen Mittellinie charakterisiert ist. OS kann autosomal dominant oder X-chromosomal rezessiv vererbt werden. Der Genlocus der ersten Form liegt auf Chromosom 22, das krankheitsverursachende Gen wurde bis jetzt jedoch nicht identifiziert. Die X-chromosomale Form des OS wird durch Mutationen in dem ubiquitär exprimierten *MIDI*-Gen verursacht. Bisher konnten für etwa 75% der X-chromosomalen Fälle Mutationen in den kodierenden Bereichen dieses Gens identifiziert werden, wobei die meisten dieser Mutationen (68%) im C-terminalen Bereich lokalisiert sind. Die restlichen Mutationen sind über das gesamte Protein mit Ausnahme des RING-Fingers verteilt.

Das *MIDI*-Gen kodiert für ein RING-Finger-Protein, das neben dem RING-Finger zwei Bboxen, eine coiled coil Domäne, eine Fibronectin Typ III Domäne und eine C-terminale B30.2-Domäne enthält. Es besitzt, wie andere RING-Finger-Proteine auch, Ubiquitin-Ligase Aktivität. Über die 1. BBox bindet es an eine regulatorische Untereinheit der Mikrotubulus-assoziierten Phosphatase 2A (PP2Ac), das  $\alpha$ 4-Protein, was zur Übertragung von Ubiquitin auf die PP2Ac führt. Mikrotubulus-assoziierte PP2Ac wird somit für den Abbau im Proteasom markiert.

Mutiertes MID1-Protein in OS-Patienten hat die Fähigkeit, an Mikrotubuli zu binden, verloren und kann daher nicht mehr in Kontakt zu Mikrotubulus-assoziiierter PP2A treten. Die Ubiquitinierung von PP2Ac wird verhindert und PP2Ac akkumuliert in der Zelle. Auf 2D-Gelen konnte im Rahmen dieser Arbeit eine allgemeine Hypophosphorylierung Mikrotubulus-assoziiierter Zielproteine von PP2Ac in embryonalen Fibroblasten von OS-Patienten gezeigt werden. Weitere Untersuchungen könnten diese Zielproteine identifizieren und die Bedeutung ihrer Hypophosphorylierung für die Entstehung von OS klären.

Die Funktion der 2. Bbox des MID1-Proteins war am Anfang dieser Arbeit nicht bekannt. In Immunfluoreszenz-Experimenten konnte im Rahmen dieser Arbeit ein entscheidender Einfluß der 2. BBox auf die Bindungsaffinität der 1. BBox an das  $\alpha$ 4-Protein nachgewiesen werden.

Darüber hinaus wurde durch die Entwicklung einer auf dem Erkennen von Mutationen in der mRNA basierenden Diagnostik für OS-Patienten die Voraussetzung geschaffen, die genetischen Defekte in weiteren Fällen mit X-chromosomalen OS, für die bisher keine *MIDI*-Mutation gefunden wurde, aufzudecken. So konnte in einer Familie mit X-chromosomalem

OS eine Duplikation von Exon 1 des *MIDI*-Gens identifiziert werden. Durch NMD (durch vorzeitige Stopkodons vermittelter mRNA-Abbau) kommt es zum Abbau der *MIDI*-Transkripte in dieser Familie.

Ebenfalls unklar war, wie Mutationen in dem ubiquitär exprimierten *MIDI*-Gen den spezifischen, auf Organe der vorderen Mittellinie beschränkten, Phänotypen des OS hervorrufen. Zur Aufklärung der beteiligten Regulationsmechanismen wurden die genomischen Sequenzen des humanen und des Maus-*mid1*-Gens untersucht und miteinander und mit der genomischen Sequenz des Fugu-*MIDI*-Gens verglichen. Sowohl im Menschen als auch in der Maus und in Fugu konnten zahlreiche alternativ gespleißte Exons identifiziert werden, die einer entwicklungs- und gewebsspezifischen Expression unterliegen.

Zwischen allen drei Organismen, Mensch, Maus und Fugu konnte eine funktionelle Konservierung der alternativ gespleißten Transkripte festgestellt werden. Zum einen konnte die Existenz protein-trunkierender Transkripte bzw. trunkierter Proteine in den drei Organismen gezeigt werden, die als dominant-negative Regulatoren der MID1-Protein-Funktion fungieren.

Zweitens wurden in den drei Spezies Mensch, Maus und Fugu alternativ gespleißte Transkripte identifiziert, die durch das Einführen vorzeitiger Stopkodons in die jeweiligen Sequenzen über NMD abgebaut werden und darüber regulatorisch in die *MIDI*-Expression eingreifen.

Ausser alternativ gespleißten Exons konnte im Intron 1 des *MIDI*-Gens eine zwischen Mensch und Maus homologe Region, Reg 1d, identifiziert werden, die 1.126 bp umfasst. In RT-PCR-Experimenten konnte gezeigt werden, dass Reg 1d zwar exprimiert wird, jedoch weder Verbindung zu den *MIDI*-Exons aufweist noch einen eigenen offenen Leserahmen besitzt. Interessanterweise konnten Northernblot-Analysen zeigen, dass Reg 1d sowohl vom Sense- als auch vom Antisense-Strang transkribiert wird. Möglicherweise ist Reg1d eine regulatorische RNA. Weitere Untersuchungen könnten die regulatorische Verknüpfung von Reg1d und *MIDI* zeigen und so zur weiteren Aufklärung der Entstehung des Phänotypen in OS-Patienten beitragen.

## 6. Summary

Opitz BBB/G syndrome (OS) is a heterogenous hereditary disorder that is characterized by defects in organs derived from the ventral midline. The inheritance of OS can be autosomal dominant or X-chromosomal recessive. The gene for the autosomal form of OS has been assigned to chromosome 22, but it has not been identified yet. The X-chromosomal form of OS is caused by mutations in the ubiquitously expressed *MIDI*-gene. Mutations in the coding regions of the *MIDI*-gene account for approximately 75% of X-chromosomal OS cases. Most mutations (68%) involve the C-terminal part of the protein, and the remaining mutations are spread all over the protein except for the RING finger domain.

Apart from this domain, the gene product of *MIDI* consists of two Bboxes, a coiled coil domain, a Fibronectin type III domain and a C-terminal B30.2 domain. Like other RING finger proteins, the MID1 protein shows ubiquitin ligase activity. With its Bbox 1, it binds to  $\alpha 4$ , a regulatory subunit of microtubule-associated Phosphatase 2A (PP2Ac) thereby causing ubiquitination of PP2Ac and its subsequent degradation via the proteasome.

Mutated MID1 protein in OS patients has lost its ability to bind to microtubules. As a consequence, it cannot interact with microtubule-associated PP2Ac, ubiquitination of PP2Ac is inhibited and PP2Ac accumulates in the cell. We could now show overall hypophosphorylation of microtubule-associated target proteins of PP2Ac in embryonic fibroblasts of an OS patient on 2D gels. Further investigations will identify these proteins and clarify the biological relevance of their hypophosphorylation for the natural history of OS syndrome.

The function of the Bbox2 of the MID1 protein and other RBCC-proteins is unknown. In immunofluorescence experiments that were part of this thesis it was found that a point mutation in the Bbox2 inhibits the association of the  $\alpha 4$ -protein to the microtubules. This indicates that the Bbox2 has a crucial effect on the binding affinity of Bbox1 to the  $\alpha 4$ -protein.

Beyond this, we have shown that some of the patients with OS have mutations in the *MIDI* gene which cannot be detected by DNA sequencing. Thus, a duplication of exon 1 of the *MIDI* gene could be found in one OS-family. A premature termination codon at the beginning



of the second copy of exon 1 destabilizes the mRNA according to nonsense-mediated mRNA decay.

Moreover, I have addressed the question how mutations in the *MIDI* gene can lead to the highly tissue-specific OS phenotype despite ubiquitous expression of the *MIDI* gene. To shed more light on mechanisms regulating MID1 protein function, genomic sequences of the human, the murine and the Fugu *MIDI* gene were characterized and compared with each other. Numerous alternatively spliced exons which are subject to tissue- and developmental specific expression could be identified. A functional conservation of alternatively spliced transcripts could be shown between the three organisms, human, mouse and fugu. On the one hand protein-truncating transcripts or rather truncated proteins that regulate the protein function of MID1 in a dominant negative manner could be found in all three organisms. On the other hand, alternatively spliced transcripts that introduce premature termination codons into the respective sequences and are therefore subject to NMD could be found in all three organisms. Thereby, these transcripts act as regulators of *MIDI* expression.

Moreover, a region, Reg1d, with high homology between man and mouse mapping to intron 1 of the *MIDI* gene and spanning a region of 1.126 bp could be identified. Though RT-PCR experiments could show its expression, Reg1d doesn't exhibit a connection to any of the *MIDI* exons. An open reading frame of significant length could not be detected in Reg1d transcripts. Interestingly, northern blot analysis could demonstrate transcription of Reg1d from both strands, sense and antisense, suggesting Reg1d to function as a regulatory RNA-molecule. Future experiments may show that Reg1d and *MIDI* are functionally connected and may further elucidate how the phenotype in OS patients develops.

## 7. Ausblick

Mutiertes MID1 führt zur Akkumulation von PP2Ac in Fibroblastenzellen von OS-Patienten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Akkumulation von PP2A eine Hypophosphorylierung Mikrotubulus-assoziiierter Zielproteine nach sich zieht. In weiteren Experimenten muß geklärt werden, welche Zielproteine durch PP2Ac hypophosphoryliert werden, welche Pathways dadurch involviert werden und welche Konsequenzen sich hieraus für die Zelle ergeben.

In dieser Arbeit konnte ein komplexes alternatives Spleißmuster im Bereich des *MIDI*-Gens identifiziert werden. Für einige der alternativ gespleißten *MIDI*-Varianten konnte gezeigt werden, dass sie regulierend auf die Expression von *MIDI* eingreifen. Als Wirkungsmechanismen konnten die dominant-negative Wirkungsweise trunkierter MID1-Proteine und NMD beschrieben werden. In weiterführenden Studien sollen die Funktionen weiterer alternativ gespleißter *MIDI*-Varianten untersucht werden. Da in einigen dieser Varianten neue Sequenzinformationen enthalten sind, binden diese Varianten möglicherweise an noch zu identifizierende Bindungspartner. Die Identifikation dieser Bindungspartner soll durch Yeast-Two-Hybrid-Experimente und durch Immunpräzipitation der entsprechenden Komplexe erfolgen.

Im Intron 1 des *MIDI*-Gens wurde eine transkribierte Region, Reg 1d, identifiziert, die 1.126 bp umfasst und keine Verbindung zu einem der kodierenden *MIDI*-Exons aufweist. Reg 1d wird sowohl vom sense- als auch vom antisense-Strang transkribiert und weist keinen offenen Leserahmen auf. In zukünftigen Studien soll zunächst eine mögliche funktionelle Verknüpfung der Reg 1d mit der Expression von *MIDI* untersucht werden. Dazu soll durch RT-PCR- und Race-Experimente überprüft werden, ob Reg 1d Verbindung zu einem der *MIDI*-Exons des 5'UTR besitzt, womit eine mögliche Abhängigkeit der Transkription des sense-Transkriptes von einem der beschriebenen *MIDI*-Promotoren erfaßt werden könnte. Anschließend soll mit Hilfe von RNA-FISH untersucht werden, ob antisense- und sense-Transkript der Reg 1d sowie *MIDI* in denselben Zellen exprimiert werden. Experimente zur Lokalisation des sense- und antisense-Transkriptes von Reg 1d in der Zelle könnten Hinweise auf die funktionelle Bedeutung dieser RNAs liefern. Ein möglicher Einfluß auf die Expression verschiedener Gene, u. a. *MIDI* und *MID2* durch sowohl das sense- und antisense- als auch durch ein mögliches doppelsträngiges RNA-Molekül soll durch Expression entsprechender

Konstrukte in verschiedenen Zelllinien untersucht werden. Zur Herstellung eines doppelsträngigen Moleküls soll ein hairpin-Konstrukt benutzt werden. Darüber hinaus könnte die Entwicklung transgener Mausmodelle zur Aufklärung der Funktion von Reg 1d beitragen.

## 8. Abkürzungen

|         |  |
|---------|--|
| Abb.    | Abbildung  |
| APS     | Ammoniumpersulfat  |
| AS      | Aminosäure   |
| ATP     | Adenosintriphosphat  |
| bp      | Basenpaare   |
| BSA     | Rinderserum Albumin  |
| °C      | Grad Celsius   |
| cDNA    | complementary DNA (engl.), komplementäre DNA                                     |
| Ci      | Curie  |
| cpm     | counts per minute (engl.), Zählungen pro Minute                                  |
| DABCO   | 1,4-diazobicyclo-2,2,2-octan   |
| DAPI    | 4'-6-Diamidino-2-phenylindol   |
| dATP    | desoxy-Adenosintriphosphat   |
| dCTP    | desoxy-Cytidintriphosphat  |
| DEPC    | Diethylpyrocarbonat  |
| dGTP    | desoxy-Guanosintriphosphat   |
| DHPLC   | denaturing high-performance liquid chromatography                                |
| DNA     | desoxyribonucleic acid (engl.), Desoxyribonukleinsäure                           |
| dNTP    | Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat   |
| DSE     | downstream sequence element  |
| DTT     | Dithiothreitol   |
| dTTP    | desoxy-Thymidintriphosphat   |
| E. coli | Escherichia coli   |
| EDTA    | Ethylendiamintetraacetat   |
| EST     | Expressed Sequence Tag   |
| EtBr    | Ethidiumbromid   |
| g       | Gramm  |
| HEPES   | 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure                                  |
| IPTG    | Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid                                       |
| kb      | Kilobasen  |
| kDa     | kilo Dalton  |
| l       | Liter  |
| LB      | Luria-Bertani  |
| m       | milli  |
| M       | molar  |
| $\mu$   | mikro  |
| MOPS    | 3-Morpholinopropansulfonsäure  |
| mRNA    | messenger RNA (engl.), Boten-RNA   |
| n       | nano   |
| NMD     | nonsense mediated mRNA decay (engl.), Nonsense vermittelter mRNA-Abbau           |
| nt      | nucleotides (engl.), Nukleotide  |
| OD      | optische Dichte  |
| OLB     | oligo labeling buffer (engl.), Oligo-Markierungspuffer                           |
| OS      | Opitz Syndrom  |
| PCR     | polymerase chain reaction (engl.), Polymerase-Kettenreaktion                     |
| PP2A    | Phosphatase 2A   |
| PP2Ac   | PP2A catalytic subunit (engl.), katalytische Untereinheit                        |
| RACE    | rapid amplification of cDNA ends (engl.), schnelle Amplifizierung von cDNA-Enden |
| RBCC    | RING-Bbox-coiled-coil  |
| RNA     | ribonucleic acid (engl.), Ribonukleinsäure                                       |

## 8. Abkürzungen

|                      |  |
|----------------------|--|
| Rpm                  | rounds per minute (engl.), Umdrehungen pro Minute  |
| RT-PCR               | Reverse Transkriptions-PCR   |
| <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>  |
| SDS                  | sodium dodecylsulfate (engl.), Natriumdodecylsulfat  |
| SSCP                 | single strand conformation polymorphism (engl.), Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus |
| T <sub>A</sub>       | annealing temperature (engl.), Anlagerungstemperatur                                       |
| Tab.                 | Tabelle  |
| Taq                  | <i>Thermus aquaticus</i>   |
| TEMED                | N,N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin   |
| TRIM                 | tripartite motif   |
| Tris                 | Tris(hydroxymethyl)aminomethan   |
| TV                   | Testvolumen  |
| UTP                  | Uridintriphosphat  |
| UTR                  | untranslated region (engl.), untranslatierte Region  |
| v/v                  | volume per volume (engl.), Volumen pro Volumen   |
| w/v                  | weight per volume (engl.), Gewicht pro Volumen   |

## 10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Dr. Susann Schweiger für die intensive Betreuung dieser Arbeit, für ihre stete Diskussionsbereitschaft und ihre Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Hans-Hilger Ropers möchte ich dafür danken, dass er mir die Durchführung dieser Arbeit in seiner Abteilung ermöglichte. Ausserdem möchte ich ihm und Herrn Prof. Dr. Volker A. Erdmann für die Begutachtung dieser Arbeit danken.

Bei meiner Arbeitsgruppe möchte ich mich für die besonders freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die sehr gute Hilfsbereitschaft bedanken. Vanessa Suckow danke ich für die gründliche Einarbeitung in zahlreiche Methoden und Zofia Kijas für ihre hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung nicht enden wollender RT-PCR-Experimente. Sybille Krauß und Beatriz Aranda danke ich für die herzliche Atmosphäre.

Für die Hilfe in der Zellkultur möchte ich mich bei Susanne Freier bedanken. Dr. Vera Kalscheuer danke ich für ihre Hilfestellung in allen molekularbiologischen Fragen. Dr. Rainer Schneider und Dr. Alexander Trockenbacher danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich jederzeit ermutigt und unterstützt haben

## 11. Publikationen

Trockenbacher, A., V. Suckow, J. Foerster, **J. Winter**, S. Krauß, H-H. Ropers, R. Schneider and S. Schweiger (2001). "MID1, mutated in Opitz syndrome, encodes an ubiquitin ligase that targets phosphatase 2A for degradation." Nat Genet **29**(3): 287-94.

**Winter, J.**, T. Lehmann, V. Suckow, Z. Kijas, A. Kulozik, V. Kalscheuer, B. Hamel, K. Devriendt, J. Opitz, S. Lenzner, H-H. Ropers and S. Schweiger (2003). "Duplication of the MID1 first exon in a patient with Opitz G/BBB syndrome." Hum Genet **112**(3): 249-54.

**Winter, J.**, S. Krauß, T. Lehmann, A. Trockenbacher, Z. Kijas, V. Suckow, V. Kalscheuer, H-H. Ropers, R. Schneider and S. Schweiger (2002). "Alternative splicing of the MID1 gene, mutated in Opitz BBB/G syndrome, leads to the introduction of premature termination codons: implications for regulatory mechanisms of MID1 gene expression." Medizinische Genetik 3/02: 325; *13. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik gemeinsam mit der Österreichischen Gesellschaft für Humangenetik, der Schweizerischen Gesellschaft für Medizinische Genetik und dem Deutschen Humangenomprojekt, 29.9.-2.10.2002, Leipzig, Poster Präsentation*

### zur Publikation eingereicht:

**Winter J.**, T. Lehmann, S. Krauß, A. Trockenbacher, Z. Kijas, J. Foerster, V. Suckow, M-L. Yaspo, A. Kulozik, V. Kalscheuer, H-H. Ropers, R. Schneider and S. Schweiger "Regulation of the MID1 protein function is fine-tuned by a complex pattern of alternative splicing."

## 12. Curriculum Vitae

Jennifer Winter

geboren am 20.11.1972

in Marburg/Lahn

ledig

### Schulbildung

1979-1983: Grundschule Krankenhagen

1983-1985: Orientierungsstufe Rinteln

1985-1992: Gymnasium Ernestinum, Rinteln

### Schulabschluß

Abitur im Sommer 1992

### Berufsausbildung

1992-1994: Ausbildung bei der Sparkasse Rinteln zur Sparkassenkauffrau  
Abschluß als Sparkassenkauffrau

### Studium

1994-2000: Studium der Biologie (Diplom) an der Universität Bielefeld  
Diplomarbeit am Deutschen Rheuma-Forschungszentrum, Berlin, in der  
Arbeitsgruppe Molekulare Immunologie unter der Leitung von Dr.  
Monika Brunner mit dem Thema: Die Rolle der Protein-Tyrosin-  
Phosphatase SHP-2 bei der Signaltransduktion in T-Zellen

### Doktorarbeit

2000-2003: Anfertigung der vorliegenden Promotionsarbeit am Max-Planck Institut für  
molekulare Genetik, Berlin, im Labor von Dr. Susann Schweiger in der Abteilung von Prof.  
Dr. H.-H. Ropers