

### 1. Einleitung

#### 1.1 Opitz BBB/G Syndrom

Das Opitz BBB/G Syndrom ist eine heterogene Erbkrankheit, die durch Fehlbildungen der vorderen Mittellinie gekennzeichnet ist. Das Opitz BBB/G Syndrom wurde zum ersten Mal von John Opitz beschrieben, zunächst jedoch als zwei getrennte Syndrome: das BBB Syndrom (Opitz 1969) und das G Syndrom (Opitz 1969). Weitere klinische Studien zeigten, dass beide Syndrome als eine klinische Einheit zusammengefasst werden können.

OS-Patienten haben vielfältige Fehlbildungen. Bei den meisten Patienten sind Hypertelorismus (vergrößerter Augenabstand) und Hypospadie (untere Harnröhrenspalte) zu beobachten. Manche der Patienten weisen zusätzliche Symptome auf. Zu diesen zählen Dysphagie, laryngo-tracheale Abnormalitäten, Lippen-Kiefer-Gaumenspalten, Herzfehler, imperforierte Ani und mentale Retardierung.

#### 1.2 Das MID1-Gen

Durch Kopplungsstudien konnten zwei verschiedene Loci identifiziert werden – einer auf Chromosom 22, und ein zweiter auf dem X-Chromosom. Während das Gen auf Chromosom 22 bisher nicht bekannt ist, konnten in Familien mit X-chromosomalem Erbgang Mutationen im *MID1*-Gen identifiziert werden (Quaderi et al. 1997).

Unabhängig hiervon wurde *MID1* von einer anderen Arbeitsgruppe in der Maus kloniert und *fxy* genannt.

Das *MID1*-Gen in Mensch und Maus besteht aus neun kodierenden Exons und umfasst einen Bereich von mindestens 400kb. Im Gegensatz zum humanen *MID1* liegen bei *Mus musculus* zwei Drittel des 3' Bereiches des Gens in der pseudoautosomalen Region. Infolgedessen entgeht das *mid1*-Gen in *Mus musculus* der X-Inaktivierung, im Menschen jedoch nicht.

*MID1* enthält in Mensch, Maus und Ratte alternativ gespleißte Exons des 5'UTRs. Im Menschen wurden bisher fünf verschiedene Promotorregionen identifiziert, fünf verschiedene alternative erste Exons werden als Transkriptionsstart benutzt (Landry und Mager 2002). Der am weitesten distal gelegene Promotor ist mehr als 250kb vom ersten kodierenden Exon entfernt. Die Entfernungen der übrigen Promotoren vom ersten kodierenden Exon betragen

109 bis 9kb. Zwei der Promotoren sind gewebespezifisch im Fettgewebe und in der Plazenta aktiv, die anderen sind ubiquitär aktiv (Landry und Mager 2002).

In der Maus und der Ratte wird *mid1* von wenigstens sechs verschiedenen Promotoren transkribiert, drei davon sind im Menschen konserviert (Landry und Mager 2002).

### 1.3 Mutationen im MID1-Gen

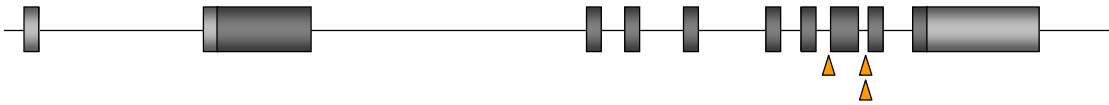
Während durch unsere und eine weitere Gruppe (Cox et al. 2000) in 75% der familiären, X-chromosomal assoziierten OS-Fälle Mutationen im *MID1*-Gen detektiert werden konnten, wurden durch eine weitere Gruppe (Gaudenz et al. 1998) nur in 36% der familiären OS-Fälle Mutationen im *MID1*-Gen identifiziert. Die Detektionsrate in sporadischen OS-Fällen wies eine noch höhere Diskrepanz zwischen den drei Gruppen auf. Während Cox et al. in 36% der sporadischen OS-Fälle Mutationen im *MID1*-Gen fanden, detektierten Gaudenz et al. (6%) und unsere Gruppe (15%) wesentlich weniger Mutationen.

Die meisten Mutationen (68%) im offenen Leserahmen des *MID1*-Gens sind im C-terminalen Bereich lokalisiert. Die restlichen Mutationen sind über das gesamte Protein mit Ausnahme des RING-Fingers verteilt. Die meisten Mutationen (68%) sind Nonsense und Frameshift Mutationen. Darüber hinaus wurden aber auch Missense Mutationen (18%), in Frame Deletionen (14%) und in Frame Insertionen (3,6%) beobachtet (Abb.1.1).

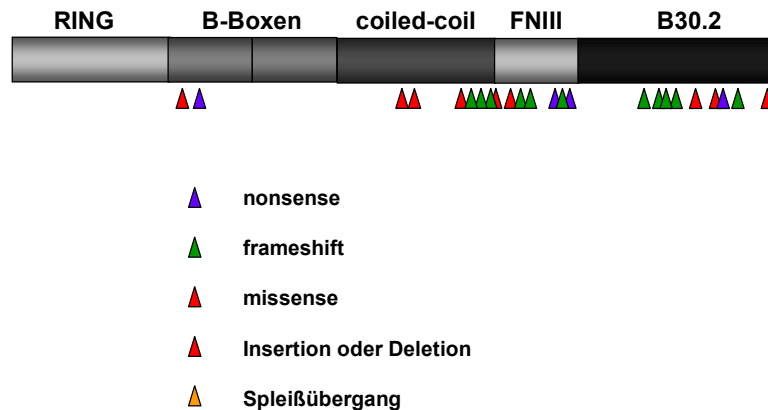
### 1.4 Das MID1-Protein

Das *MID1*-Gen kodiert für ein 72kDa großes Protein, das durch ein sogenanntes RING-BBox-coiled-coil (RBCC) Motiv charakterisiert ist. Das RBCC-Motiv wird aufgrund der Dreiteilung in RING-Finger, B-Boxen und coiled-coil Domäne auch als TRIM („tripartite motif“) bezeichnet. Es wird in einer wachsenden Anzahl von Proteinen vorgefunden, die wichtige Rollen während der Zelldifferenzierung, Entwicklung, Oncogenese und Apoptose spielen. Der N-Terminus des MID1-Proteins besteht aus einer RING-Finger-Domäne. RING-Finger-Domänen beinhalten ein Cys-His-Motiv mit der Konsensus-Sequenz C3HC4. Das Cys-His-Motiv ermöglicht aufgrund seiner kreuzförmig verstreuten Struktur die Anlagerung von zwei

## Das MID1-Gen



## Das MID1-Protein

**Abbildung 1.1: Die Verteilung der gefundenen Mutationen im MID1-Gen**

Dargestellt sind das humane *MID1*-Gen und MID1-Protein. Die verschiedenen Arten von Mutationen sind als farbige Dreiecke eingezeichnet.

Zink-Ionen (Abb. 1.2 A). Der RING-Finger des MID1-Proteins stimmt mit der Konsensus-Sequenz des Cys-His-Motivs perfekt überein (Abb. 1.2 B).

Die RING-Finger-Domäne ist mit den BBoxen über eine Region von ungefähr 45 Aminosäuren verbunden. Wie der RING-Finger beinhalten auch die BBoxen Cys-His-Motive, allerdings mit der Konsensus-Sequenz  $\text{CHC}_3\text{H}_2$ . Sowohl von RING-Fingern als auch von BBoxen wird angenommen, dass sie in Protein-Interaktionen involviert sind (Schweiger und Schneider 2003). Dies konnte im Falle des MID1-Proteins bestätigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die BBox1 das  $\alpha 4$  Protein, eine regulatorische Untereinheit der Phosphatase2A, bindet (Liu et al. 2001; Trockenbacher et al. 2001). An die beiden BBoxen des MID1-Proteins schließt eine coiled-coil Domäne von ungefähr 100 Aminosäuren Länge an. Coiled-coils werden durch zwei oder mehr alpha Helices gebildet, die in paralleler oder antiparalleler Orientierung aneinander liegen. Die coiled-coil Domäne des MID1-Proteins vermittelt vermutlich seine Tendenz zur Homo- und Heterodimerisierung. Heterodimerisierung wurde mit dem MID2-Protein, einem nahen Verwandten des MID1-Proteins, gezeigt (Short et al. 2002). Studien zur Heterooligomerisierung von Mitgliedern der TIF Familie

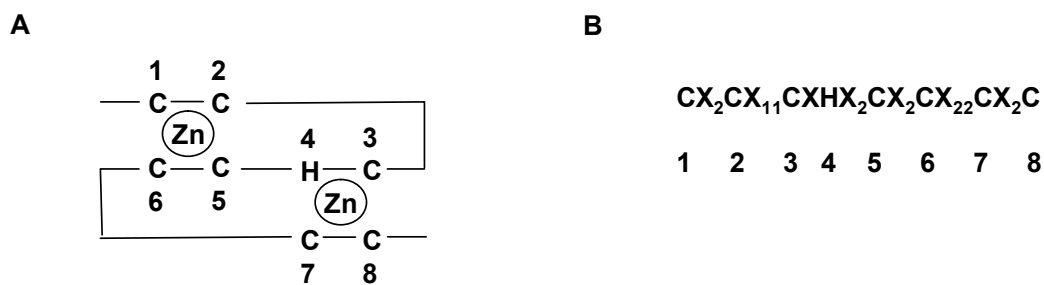
## 1. Einleitung

(transkriptionelle Cofaktoren), die eine Unterfamilie der RBCC/TRIM Familie ist, deuten an, dass es sich bei der Heterooligomerisierung um ein generelles Phänomen des RBCC Proteinmotivs handeln könnte (Peng et al. 2002).

Eine 60 Aminosäuren lange Sequenz verbindet die coiled-coil Region des MID1-Proteins mit einer Fibronectin Typ III Domäne (FNIII). FNIII-Domänen sind ungefähr 100 Aminosäuren lang und bilden  $\beta$ -sandwich Strukturen, die aus zwei antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern bestehen. FNIII-Domänen sind sehr verbreitet und wurden in verschiedenen Proteinen wie etwa Zelladhensions-Molekülen, Zytokinrezeptoren und Chaperonen gefunden (Schweiger und Schneider 2003). Auch die FNIII-Domänen sind typische Protein-Protein Interaktionsdomänen (Bork et al. 1994; Perry et al. 1999).

Im MID1 C-Terminus ist eine weitere Domäne, die B30.2-Domäne, lokalisiert. B30.2-Domänen wurden in zahlreichen RING-Finger-Proteinen, aber auch in nichtverwandten Proteinen gefunden. Zu den nichtverwandten Proteinen zählt neben anderen das Butyrophilin (Quaderi et al. 1997).

Den B30.2-Domänen konnte bisher keine eindeutige Funktion zugeordnet werden. Zahlreiche der in OS-Patienten identifizierten Mutationen im *MID1*-Gen sind in dieser Domäne lokalisiert. Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen in dieser Domäne bei OS-Patienten die zelluläre Lokalisation der MID1-Proteine verändern. Anstatt, wie Wildtyp-Proteine an Mikrotubuli zu binden, bilden Proteine mit solchen Mutationen zytoplasmatische Aggregate (Schweiger et al. 1999).



**Abbildung 1.2: Das Cys-His-Motiv des RING-Fingers**

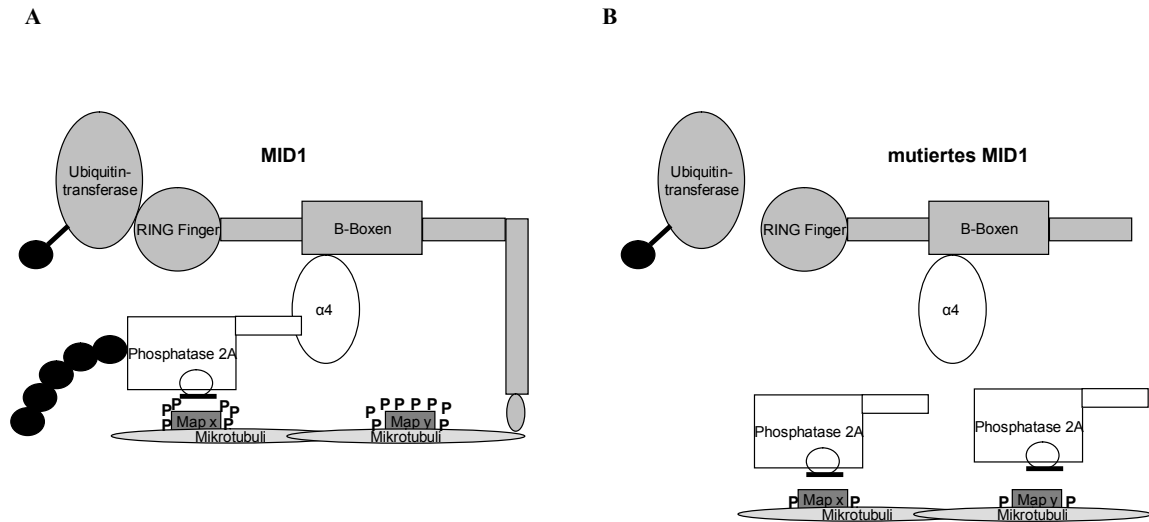
A. Die Anordnung von Cys und His in der RING-Konsensus Sequenz. B. Die Sequenz des RING-Fingers im MID1-Protein.

### 1.5 Die Funktion des MID1-Proteins

MID1 ist ein Mikrotubulus-assoziiertes Protein, das mit seiner BBox1 an das  $\alpha 4$ -Protein, eine regulatorische Untereinheit der Phosphatase2A, bindet. Die Interaktion von  $\alpha 4$  mit MID1 führt zu dessen Mikrotubulus-Assoziation. Andererseits führen hohe Konzentrationen von  $\alpha 4$  in der Zelle zur Freisetzung von MID1 von den Mikrotubuli ins Zytoplasma, was zeigt, dass MID1 und  $\alpha 4$  sich gegenseitig bezüglich ihrer intrazellulären Lokalisation beeinflussen können (Liu et al. 2001).

Wie viele andere RING-Finger-Proteine erfüllt MID1 die Funktion einer E3 Ubiquitin-Ligase. Das Ubiquitin-System besteht aus drei Arten von Modulatoren, die als E1, E2 und E3 bezeichnet werden (Pickart 2001). Während E1 eine Ubiquitin aktivierende Funktion und E2 eine Ubiquitin konjugierende Funktion zukommt, katalysieren E3-Komplexe den finalen Schritt der kovalenten Bindung von Ubiquitin an spezifische Zielproteine. Die so mit Polyubiquitin markierten Proteine werden durch das Proteasom abgebaut. Mehrere Beobachtungen lassen darauf schließen, dass MID1 Teil eines E3-Komplexes ist und an der Ubiquitin-spezifischen Modifikation der katalytischen Untereinheit mikrotubulus-assoziiierter PP2A beteiligt ist (Trockenbacher et al. 2001). Abb. 1.3 A zeigt ein Modell der Ubiquitin-Ligase Funktion von MID1. Durch Vermittlung des Mikrotubulus-assoziierten RING-Finger-Proteins, MID1, wird eine Ubiquitin-Transferase in unmittelbare Nähe zu der katalytischen Untereinheit der mikrotubulus-assoziierten PP2A gebracht, was zur Übertragung von aktiviertem Ubiquitin auf das Enzym führt (Abb. 1.3 A).

Mutiertes MID1-Protein, wie es in OS-Patienten gefunden wird, hat die Fähigkeit der Mikrotubulus-Assoziation verloren (Schweiger et al. 1999). Es ist wahrscheinlich, dass die E2 Ubiquitin-Transferase nicht mehr in enge Verbindung mit Mikrotubulus-assoziiierter PP2A treten kann. Die Ubiquitinierung von PP2Ac wird verhindert und PP2Ac akkumuliert in der Zelle (Trockenbacher et al. 2001) (Abb. 1.3 B).



**Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der durch MID1 vermittelten Ubiquitinierung von PP2Ac**

Es wird die Funktion des intakten MID1-Proteins gezeigt (A.), die in OS-Patienten durch Mutationen im MID1-Gen unterbrochen wird (B.)

## 1.6 MID2

Bei dem Vergleich von EST-Datenbanken mit der *MID1*-cDNA identifizierten Buchner et al. einen cDNA Klon, der für ein Protein mit hoher Homologie zu MID1 kodiert. Dieses Protein wurde als MID2 bezeichnet. Es weist mit MID1 84% Aminosäure-Homologie und 77% Aminosäure-Identität auf. Die Homologie auf Nukleinsäureebene beträgt 70%. Alle Domänen zwischen MID1 und MID2 sind konserviert. Wie MID1 enthält das MID2-Protein ein RBCC-Motiv, eine FNIII-Domäne und eine B30.2-Domäne (Buchner et al. 1999). Auch MID2 ist Mikrotubulus-assoziiert und bindet das  $\alpha 4$  Protein (Buchner et al. 1999; Short et al. 2002). Expressionsvergleiche zwischen MID1 und MID2 werden durch die hohe Homologie der beiden Proteine erschwert. Expressionsanalyse mit der gesamten *MID1*-cDNA auf multiplen Gewebe-Northernblots zeigte die ubiquitäre Expression zweier Banden bei 7.0kb und bei 3,5kb. Die Expression war auffallend stark in fetaler Niere, adultem Gehirn, adultem Herz und Plazenta (Quaderi et al. 1997). Auch Maus-*mid1* wird ubiquitär exprimiert (Dal Zotto et al. 1998). Keine der verwendeten Proben kann jedoch mit Sicherheit zwischen *MID1/mid1* und *MID2/mid2* unterscheiden. Um *MID1/MID2* bzw. *mid1/mid2* Expressionslevel vergleichen zu können, ist es daher dringend notwendig, Proben zu generieren, die ausserhalb der zwischen beiden Genen homologen Regionen lokalisiert sind (z.B. 3'UTR-Proben).

### 1.7 Expression von MID1 in der Maus

Das humane *MID1* und das Maus-*mid1*-Gen weisen 87% Identität auf Nukleotidebene und 95% Identität auf Aminosäureebene auf. Der einzige Unterschied zwischen humanem und Maus-*mid1* sind 39 zusätzliche Basenpaare in einigen Maus-cDNAs, die für 13 Aminosäuren zwischen Aminosäure 429 und 441 kodieren. Die Insertion folgt dem *mid1*-Leserahmen und geschieht an einem charakteristischen Spleißübergang. Es ist daher von einem alternativ gespleißten Exon auszugehen (Dal Zotto et al. 1998).

In situ Hybridisierungen zeigten ein ubiquitäres Expressionsmuster von Maus-*mid1* während der Embryonalentwicklung. Allerdings gab es Unterschiede in der Stärke der Expression in verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien. Auffallend ist die starke Expression von Maus-*mid1* in den Geweben, deren Entwicklung in OS-Patienten abnorm verläuft. Dazu zählen unter anderen das zentrale Nervensystem (ZNS), Oesophagus und Trachea und das Urogenitalsystem (Dal Zotto et al. 1998). Einschränkend muss erwähnt werden, dass aufgrund der hohen Homologie zwischen *mid1* und *mid2* die verwendeten Proben aller Wahrscheinlichkeit nach beide cDNAs detektierten.

Während der frühen embryonalen Entwicklung (E9-E10,5) ist das Maus-*mid1* verstärkt in den frontonasalen Bereichen, den Bronchialbögen und dem zentralen Nervensystem (ZNS) exprimiert. Das sich entwickelnde Herz ist in diesem Stadium das einzige Gewebe, in dem keine *mid1*-Expression nachweisbar ist (Dal Zotto et al. 1998).

Ab E14,5 wird *mid1* stark in der Niere exprimiert.

Ein Expressionspeak von *mid1* ist auch während der Entwicklung des respiratorischen- und des Verdauungssystems zu beobachten. In E14,5 wird *mid1* besonders stark in der Lunge, im Oropharynx, am Übergang von Pharynx in Oesophagus und Trachea und im Larynx exprimiert.

In E16,5 schließlich konnte starke *mid1*-Expression in mukösen und kutanen Regionen des Magens und des Enddarms beobachtet werden. Im Dünndarm ist die *mid1*-Expression auf die Submukosa und Regionen sich entwickelnder Krypten, die regenerierende Zellen enthalten, beschränkt (Dal Zotto et al. 1998).

### 1.8 *MID1* in *Fugu rubripes*

Das Genom des japanischen Kugelfisches *Fugu rubripes* umfasst 400Mb und ist somit 7,5 mal kleiner als das humane Genom (Koop und Nadeau 1996). Trotz seiner Kompaktheit enthält es jedoch etwa die gleiche Anzahl an Genen. Im Gegensatz zum Menschen sind die Introns und die intergenischen Distanzen verhältnismäßig klein.

Das *Fugu-MID1*-Ortholog weist hohe Homologien auf Nukleinsäureebene (75%) und auf Aminosäureebene (91%) zum humanen *MID1*-Gen auf. Wie im Menschen besteht auch das *Fugu-MID1*-Gen aus neun kodierenden Exons. Interessanterweise enthält *Fugu* im intergenischen Bereich des *MID1*-Gens zwischen Exon 1 und Exon 2 fünf alternativ gespleißte Exons (1a-1e). Ex1a-Ex1d werden aneinander gespleißt und folgen 3' auf Exon 1. Bereits Ex1a führt ein vorzeitiges Stopkodon in die Sequenz ein. Die Einführung Theorie vorzeitiger Stopkodons bewirkt den Abbau der RNA über NMD (Nonsense-vermittelter mRNA Abbau) (Frischmeyer und Dietz 1999; Hentze und Kulozik 1999). Das alternative Spleißereignis Exon 1a -1d könnte somit eine wichtige regulatorische Funktion für das *MID1*-Gen haben. Ex1e wird in eine zweite alternativ gespleißte Isoform integriert und folgt ebenfalls 3' auf Exon 1.

### 1.9 Alternatives Spleißen

Alternatives Spleißen ist ein wichtiger Mechanismus, mit dem der Widerspruch zwischen der relativ geringen Anzahl an Genen in eukaryotischen Genomen und der wesentlich höheren Vielfalt der Proteome erklärt werden kann (Graveley 2001; Ladd und Cooper 2002; Modrek und Lee 2002; Roberts und Smith 2002; Kriventseva et al. 2003). Wenigstens ein Drittel, möglicherweise aber die meisten der humanen Gene werden alternativ gespleißt. In der Natur wird jedes denkbare Spleißmuster realisiert. Sogenannte Kassettenexons sind Exons, die alternativ in eine mRNA gespleißt werden können. Es gibt einzelne Kassettenexons oder multiple Kassettenexons, zwischen denen die Spleißmaschinerie wählen kann. Sequenzen zwischen zwei Exons können als Introns herausgeschnitten werden oder in der mRNA verbleiben, ein Vorgang, den man „Intron retention“ nennt. Manche Exons besitzen alternative 5' und/oder 3' Spleißübergänge. Auch die Benutzung alternativer Promotoren oder alternativer Polyadenylierungsstellen wurde gezeigt (Roberts und Smith 2002). Durch das Benutzen alternativer Polyadenylierungsstellen wird die Voraussetzung für die Bildung

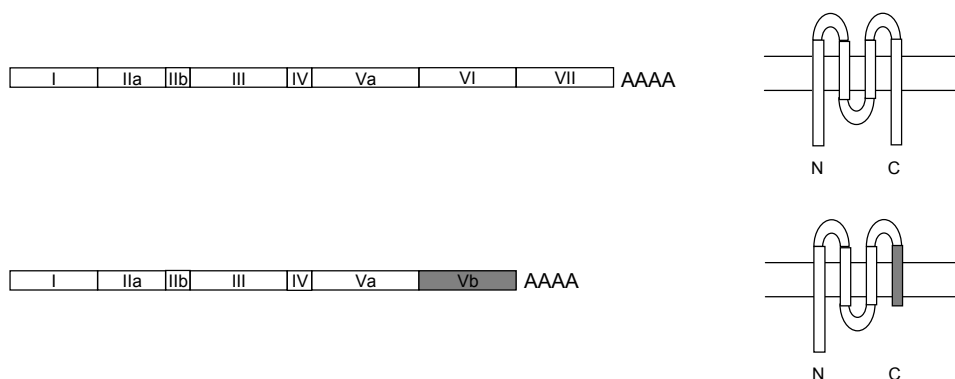


## 1. Einleitung

trunkierter Proteine geschaffen. In einem den  $\beta$ -Ketten des FC $\epsilon$  Rezeptors homologen hypothetischen Protein (Hs.11090) konnte die Benutzung einer alternativen Polyadenylierungsstelle durch Analyse von EST-Daten *in silico* gezeigt werden. Hs.11090 besitzt vier vorhergesagte Transmembrandomänen. Bei der alternativen Terminierung wird der Spleißübergang von Exon Va zu Exon VI ignoriert. Stattdessen wird Exon Va um 142 bp verlängert (Exon Vb; siehe Abb. 1.4). Am Ende der Sequenz ist ein Polyadenylierungssignal vorhergesagt. Die alternative Terminierung führt zum Austausch der kodierenden Exons VI und VII gegen 40 Aminosäuren des Exons Vb. Interessanterweise wird für die ausgetauschte Sequenz eine neue Transmembrandomäne und ein neuer zytoplasmatischer Schwanz vorhergesagt. Da der zytoplasmatische Schwanz in ähnlichen FC-Rezeptor-Ketten eine Schlüsselrolle bei der Erkennung von Signaltransduktionsmolekülen spielt, könnte die alternative Form die Signaltransduktions-Aktivität des Rezeptors modifizieren (Modrek und Lee 2002) (Abb. 1.4).

Alternativem Spleißen wird häufig eine entwicklungs- oder gewebsspezifische Funktion zugeschrieben. Die gerade beschriebene alternativ gespleißte Form von Hs.11090 wurde nur in der Plazenta und in der Niere gefunden, wohingegen die Hauptform in vielen verschiedenen Geweben existiert (Modrek et al. 2001; Modrek und Lee 2002).

Die mögliche Anzahl der Spleißvarianten eines Gens scheint nahezu unbegrenzt zu sein, wie das Beispiel des dem *Down syndrome cell adhesion molecule (Dscam)* homologen Gens in *Drosophila* zeigt. *Dscam* ist ein Mitglied der Ig Superfamilie und in Prozesse des Axon Guidance im sich entwickelnden Gehirn involviert. Es besteht aus 115 Exons, von denen 95 alternativ gespleißt werden. Theoretisch könnte dieses Gen 38.016 verschiedene Isoformen generieren (Schmucker et al. 2000; Celotto und Graveley 2001) und somit die Anzahl der Gene in *Drosophila* um das zwei- bis dreifache übersteigen (Black 2000).



**Abbildung 1.4: Alternatives Spleißen von Hs.11090**

Gezeigt werden zwei alternativ gespleißte und alternativ polyadenylierte mRNA- und Protein-Isoformen

### 1.10 Durch vorzeitige Stopkodons vermittelter mRNA-Abbau

Etwa ein Drittel aller genetischen Erbkrankheiten und viele Krebsformen werden durch Frameshift- oder Nonsense-Mutationen verursacht, die vorzeitige Stopkodons generieren (Frischmeyer und Dietz 1999). Anders als erwartet werden die meisten Transkripte mit vorzeitigen Stopkodons nicht in trunkierte Proteine übersetzt. Sie werden vielmehr erkannt und über NMD (durch vorzeitige Stopkodons vermittelter mRNA-Abbau) degradiert. NMD ist ein phylogenetisch konservierter Mechanismus, der intensiv in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* studiert wurde. In *S.cerevisiae* wird ein vorzeitiges von einem normalen Stopkodon durch ein bestimmtes Sequenzelement, das sogenannte „downstream sequence element“ (DSE) unterschieden. Nonsense-Kodons die 5' des DSE liegen, destabilisieren die mRNA. 3' des DSE liegende Nonsense-Kodons führen hingegen nicht zur mRNA-Degradierung. Nach dem aktuellen Modell bindet das Protein Hrp1p bereits im Zellkern an das DSE von Hefe-mRNAs. Anschließend gelangt es mit der RNA ins Zytoplasma und markiert hier die Grenze zwischen vorzeitigen und normalen Stopkodons (Gonzalez et al. 2000). Bei der Translation stoppt das Ribosom an dem vorzeitigen Stopkodon. Daraufhin wird ein sogenannter „surveillance complex“, der neben anderen auch Upf-Proteine enthält, rekrutiert. Die Upf-Proteine suchen den stromabwärts des Stopkodons gelegenen Bereich nach dem DSE mit dem daran gebundenen Hrp1p ab. Wenn sich ein DSE in der kritischen Distanz von ~200bp stromabwärts des Stopkodons befindet, wird das Stopkodon als vorzeitig erkannt und das Enzym Dcp1p assoziiert mit der mRNA. Dieses entfernt die 5'Kappe der mRNA, und die Exonuklease Xrn1p kann dann die mRNA degradieren. Nach heutigen Vorstellungen läuft der Prozess des NMD in höheren Eukaryonten ähnlich wie in der Hefe ab (Lykke-Andersen et al. 2000). Allerdings haben höhere Eukaryonten keine DSE-Sequenzen. In diesen Organismen werden vorzeitige Stopkodons durch die Anwesenheit stromabwärts liegender Introns erkannt. Dabei spielt die Position des Stopkodons relativ zur am weitesten 3'gelegenen Spleißstelle eine entscheidende Rolle. Stopkodons, die stromaufwärts weiter als 55 nt von dieser Spleißstelle entfernt sind, werden als vorzeitig erkannt und die mRNA wird abgebaut. Liegen die Stopkodons in einem geringeren Abstand zur letzten Spleißstelle, werden sie nicht als vorzeitig erkannt. Stop-Mutationen in diesen Bereichen von mRNAs führen zu stabilen Transkripten (Frischmeyer und Dietz 1999; Hentze und Kulozik 1999)

### 1.11 Alternativ gespleißte Transkripte mit vorzeitigen Stopkodons

NMD wurde zunächst als Reparaturmechanismus beschrieben. Vorzeitige Stopkodons können durch genomische Mutationen oder durch fehlerhaftes Spleißen entstehen. Um den Organismus vor möglichen dominant-negativ wirkenden trunkierten Proteinen zu schützen, werden die entsprechenden Transkripte durch NMD abgebaut.

Am Beispiel des humanen *ABCC4*-Gens konnte gezeigt werden, dass nicht nur mutierte sondern auch alternativ gespleißte Transkripte mit vorzeitigen Stopkodons existieren, die durch NMD erkannt und abgebaut werden (Lamba et al. 2003).

Bei einer *in silico* Untersuchung alternativ gespleißter Transkripte im Menschen anhand von EST-Daten wurde zudem gefunden, dass ein Drittel aller untersuchten Transkripte vorzeitige Stopkodons enthält und mögliche Ziele für NMD darstellt (Lewis et al. 2003). Eine funktionelle Bedeutung der durch NMD abgebauten alternativ gespleißten Transkripte ist somit wahrscheinlich. Weitere Hinweise darauf kommen auch aus *C.elegans*. Dort wurden alternativ gespleißte Varianten von vier ribosomalen Proteinen gefunden (*rpl-3*, *rpl-7a*, *rpl-10a*, *rpl-12*), in die vorzeitige Stopkodons eingeführt werden und die dadurch Angriffspunkt für NMD werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Sequenzen und das alternative Spleißen dieser Transkripte in anderen Nematoden konserviert sind (Mitrovich und Anderson 2000). Wie weiter gezeigt werden konnte, sind die alternativ gespleißten Exons des *ABCC4*-Gens, die vorzeitige Stopkodons einführen zwischen Mensch und Maus konserviert. Die Konservierung dieser Sequenzen lässt ihre Entstehung durch fehlerhaftes Spleißen als extrem unwahrscheinlich erscheinen (Lamba et al. 2003).

Auch der Entstehung vorzeitiger Stopkodons in stabilen, nicht dem NMD unterliegenden, Transkripten kommt durch die mögliche Entstehung trunkierter Proteine eine funktionelle Bedeutung zu.

Weitere Hinweise für die funktionelle Bedeutung alternativ gespleißter Exons, die vorzeitige Stopkodons einführen, kommen aus dem alternativ gespleißten Exon  $\alpha$  des *mdm2*-Gens. Die N-terminale Region von *mdm2* bindet das Tumor-Suppressor-Protein p53 und bewirkt dessen Abbau im Proteasom. Das Exon  $\alpha$  führt ein vorzeitiges Stopkodon in das alternativ gespleißte Transkript *mdm2 $\alpha$*  ein. Durch *in vitro* Translations-Experimente konnte gezeigt werden, dass Exon  $\alpha$  den Stopp der Translation bewirkt. Danach beginnt die Translation an einem stromabwärts gelegenen AUG-Kodon von neuem. Es entsteht ein N-terminal trunkiertes Protein, das p53 nicht mehr binden kann (Veldhoen et al. 1999).

### 1.12 Regulatorische RNAs

Neben mRNAs, rRNAs und tRNAs gibt es weitere Formen von regulatorischen RNAs, die nicht für Proteine kodieren. Regulatorische RNAs sind variabel in ihrer Länge und zeichnen sich durch die Abwesenheit eines längeren offenen Leserasters aus. Ihre Hauptfunktion liegt wahrscheinlich in der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression. Regulatorische RNAs kommen sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten vor. Sie spielen wichtige Rollen bei der Kontrolle des Zell-Wachstums und bei der Zell-Differenzierung.

Je nach ihrer Herkunft, Funktion oder Eigenschaften kann man regulatorische RNAs in folgende fünf Gruppen unterteilen (Erdmann et al. 2001):

- 1) DNA Marker. Diese RNAs sind an der Dosiskompensation und am Imprinting beteiligt, z.B. *Xist*, *H19*
- 2) Gen-Regulatoren. RNAs, die die Aktivität von Genen durch verschiedene Mechanismen wie z.B. silencing oder RNA-RNA Interaktionen beeinflussen, z.B. *NTT*, *lin-4*, *let-7*
- 3) Abiotische Streß-Signale. RNAs, die als Antwort auf abiotischen Stress synthetisiert werden, z.B. *gadd7/adapt15*
- 4) Biotische Streß-Signale. RNAs, die als Antwort auf biologische Streß-Signale wie z.B. Zytokine synthetisiert werden, z.B. *His-1*, *CR20*
- 5) Sonstige RNAs mit unterschiedlicher Herkunft und Funktion, z.B. *Bsr*, *BCI*

Die Kenntnisse über Struktur und Funktion regulatorischer RNA sind zur Zeit noch lückenhaft. Es ist anzunehmen, dass die oben angegebene Einteilung noch weiter zu vervollständigen sein wird (Erdmann et al. 2001).

### 1.13 Fragestellung und Zielsetzung

1. Aufgrund der Beeinträchtigung der Ligase-Funktion des mutierten MID1, kann PP2Ac nicht polyubiquitiniert und degradiert werden und akkumuliert in Fibroblastenzellen von OS-Patienten. Wie diese Akkumulation zur Entstehung von OS beiträgt ist nach wie vor unklar. Die Hypophosphorylierung Mikrotubulus-assoziiierter Proteine erscheint als unmittelbare Konsequenz wahrscheinlich und sollte mit Hilfe von zweidimensionaler Gelelektrophorese und Westernblot-Analysen nachgewiesen werden.

## 1. Einleitung

2. Mit Hilfe gängiger Verfahren zur Mutationsanalyse genomischer DNA wie SSCP konnten bisher in nur 75% der OS-Familien mit X-chromosomalem Erbgang Mutationen im *MIDI*-Gen identifiziert werden. Größere genomische Veränderungen wie genomische Inversionen, Duplikationen oder intronische Veränderungen, die das Spleissen beeinflussen könnten, werden mit diesen Methoden nicht erkannt. Um das Vorliegen solcher Mutationen bei Patienten mit OS und möglichem X-chromosomalem Erbgang abzuklären, sollte eine auf RNA basierende Diagnostik für OS-Patienten entwickelt werden.

3. Zu Beginn dieser Arbeit war völlig unklar, wie Mutationen in dem ubiquitär exprimierten *MIDI*-Gen den spezifisch auf Organe der ventralen Mittellinie beschränkten Phänotyp des Opitz-Syndroms hervorrufen können. Eine Möglichkeit ist, dass die MID1-Proteinfunktion diversen gewebspezifischen Regulationsmechanismen wie z.B. alternativem Spleißen unterworfen ist. Mögliche Regulationsmechanismen sollten daher durch die Analyse der genomischen humanen, Maus- und Fugu-*MIDI* Sequenz aufgedeckt werden.