

3. Ergebnisse

3.1 Auswirkungen bekannter MID1-Mutationen auf die PP2A-abhängige Phosphorylierung Mikrotubulus-assoziiierter Proteine in embryonalen Fibroblasten von OS-Patienten

Wie wir kürzlich zeigen konnten, wirkt MID1 als Ubiquitin-Ligase und katalysiert die Polyubiquitinierung Mikrotubulus-assoziiierter PP2A (PP2Ac) (Trockenbacher et al. 2001). Die Spezifität dieser Reaktion wird durch die Bindung der BBox 1 an eine regulatorische Untereinheit der PP2Ac, das $\alpha 4$ -Protein, gewährleistet. PP2Ac wird durch Polyubiquitinierung für die Degradierung im Proteasom markiert. Mutiertes MID1 in OS-Patienten bindet nicht mehr an Mikrotubuli, sondern bildet, eventuell aufgrund herabgesetzter Löslichkeit, zytoplasmatische Aggregate. Es konnte gezeigt werden, dass dadurch die Ligase-Aktivität des mutierten MID1 und somit die Polyubiquitinierung und Degradierung von PP2Ac beeinträchtigt wird. Als Konsequenz akkumuliert PP2Ac in Fibroblastenzelllinien von OS-Patienten. Die biologischen Auswirkungen dieses Vorgangs bzw. die Entstehung des Phänotyps in OS-Patienten sind jedoch nach wie vor nicht geklärt.

Da die Akkumulation von PP2Ac in OS-Patienten eine Veränderung der PP2A-regulierten Phosphorylierung von Mikrotubulus-assoziierten Zielproteinen nahelegt, sollte diese in der embryonalen Fibroblastenzelllinie eines OS-Patienten (17/98) untersucht werden und mit der PP2A-abhängigen Phosphorylierung Mikrotubulus-assoziiierter Proteine in embryonalen Fibroblastenzelllinien dreier gesunder Kontrollen verglichen werden.

Dazu wurden gereinigte Mikrotubuli der Fibroblastenzelllinie 17/98 und der drei gleichaltrigen Kontroll-Fibroblastenzelllinien durch zweidimensionale SDS Gelelektrophorese aufgetrennt und Westernblot-Experimente mit einer Kombination aus Phosphoserin- und Phosphothreonin-Antikörpern durchgeführt. Wie erwartet zeigten die Fibroblasten 17/98 eine generelle Hypophosphorylierung Mikrotubulus-assoziiierter Proteine (Abb 3.1).

Um nachzuweisen, dass die auf dem Westernblot beobachteten Signale phosphospezifisch sind, wurde ein weiterer Blot mit alkalischer Phosphatase vorbehandelt. Keines der vorher beobachteten Signale wurde auf diesem Blot detektiert (Abb 3.1).

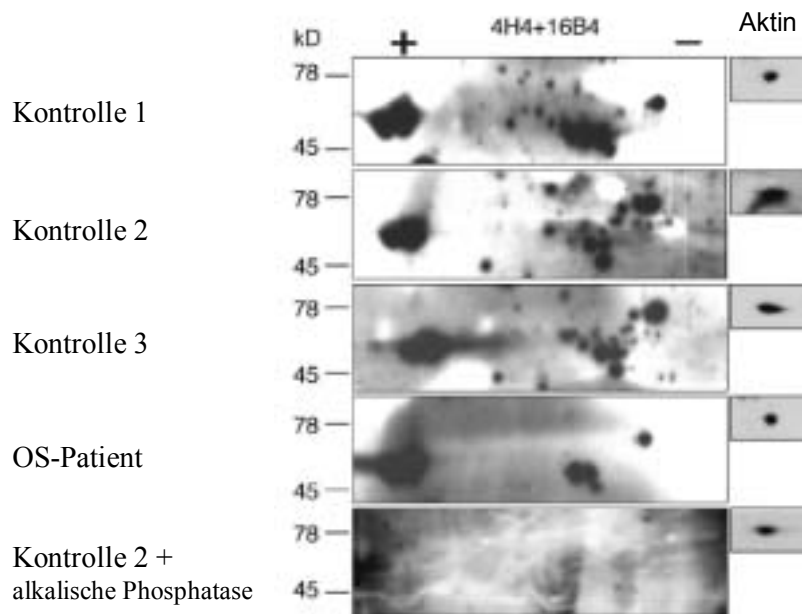


Abbildung 3.1: Hypophosphorylierung mikrotubulus-assoziiierter Proteine in embryonalen Fibroblasten eines OS-Patienten

Dargestellt sind zweidimensionale Westernblots aufgereinigter Mikrotubuli (20 µg Protein/Blot) von drei Kontrollzelllinien und einer Zelllinie von einem Fetus mit OS. Die beiden Phospho-spezifischen Antikörper 4H4 und 16B4 wurden gepoolt. Die Spezifität der Antikörper wird durch die Präinkubation mit alkalischer Phosphatase bestätigt. Die Detektion von Aktin zeigt die gleichmäßige Beladung der Gele.

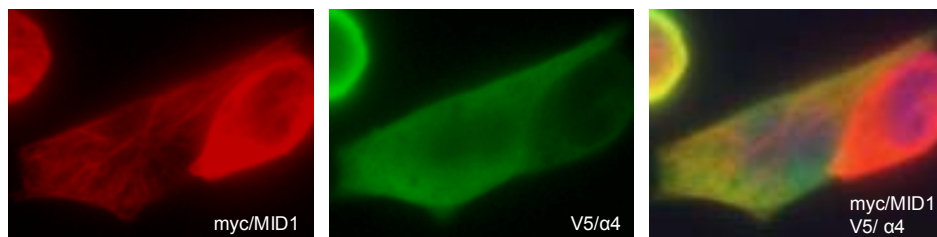
3.2 Auswirkungen einer Punktmutation in der BBox2 des MID1-Proteins auf die Mikrotubulus-Assoziation von $\alpha 4$

Der BBox2 des MID1-Proteins konnte bisher keine Funktion zugordnet werden. Die BBox2 könnte wie die BBox1 eigene Protein-Bindungspartner besitzen. Andererseits könnte sie einen Einfluss auf die Bindung der BBox1 an $\alpha 4$ ausüben. Es war zu erwarten, dass die Primärsequenz der BBox2 eine wichtige Rolle bei der Wahrnehmung ihrer Funktionen spielt. In der BBox2 der *MID1*-cDNA, die in die vor dem P_{CMV} Promotor liegende Klonierungsstelle des pBudCE4 Vektor kloniert worden ist, ist durch eine Punktmutation von A zu G die Aminosäure Glutamin an Position 192 durch Arginin ausgetauscht worden. Das $\alpha 4$ -Protein ist in diesem Konstrukt in die vor dem EF-1 α Promotor gelegene Klonierungsstelle kloniert. In Immunfluoreszenz-Experimenten in COS7-Zellen sollte untersucht werden, ob das mutierte

MID1-Protein genauso wie das Wildtyp MID1-Protein die Assoziation von $\alpha 4$ mit Mikrotubuli bewirken kann.

Die Immunfluoreszenz-Experimente zeigten, dass zwar das Wildtyp MID1-Protein die Assoziation von $\alpha 4$ mit Mikrotubuli bewirkt, nicht jedoch das MID1-Protein, das die Mutation in der BBox2 enthält. Das $\alpha 4$ -Protein zeigte hier eine diffuse zytoplasmatische Lokalisation (Abb. 3.2).

A



B

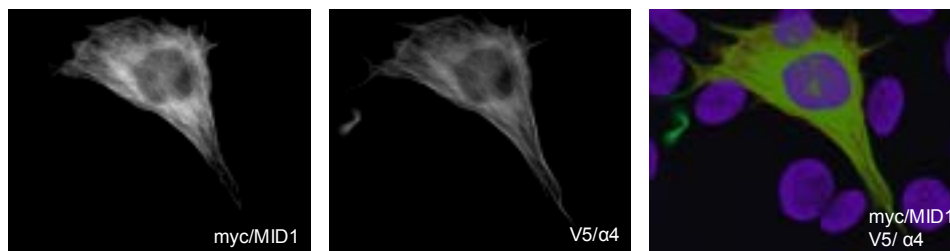


Abbildung 3.2 Lokalisationsstudien von MID1 und $\alpha 4$ in COS7-Zellen

Myc-markiertes MID1 und V5-markiertes $\alpha 4$ wurden in COS7-Zellen überexprimiert. Das überexprimierte MID1-Protein in A. weist eine Punktmutation in der BBox2 auf. Die Mikrotubulus-Assoziation von $\alpha 4$ ist gestört. B. zeigt die positive Kontrolle mit nicht mutiertem MID1-Protein. Sowohl MID1 als auch $\alpha 4$ assoziieren hier mit Mikrotubuli.

3.3 Erkennung von Mutationen in der *MIDI*-mRNS

Weder mit SSCP noch mit DHPLC- Analyse der DNA des OS-Patienten ML konnte eine Mutation im offenen Leserahmen des *MIDI*-Gens oder in Exon-flankierenden Intron-Sequenzen identifiziert werden. Um mögliche größere genomische Veränderungen, die die Expression des *MIDI*-Gens bei dem entsprechenden Patienten beeinflussen könnten, aufzudecken, wurde die *MIDI*-Expression des OS-Patienten ML und seiner Mutter in Fibroblasten untersucht. Northern-Blot-Analyse von PolyA⁺ RNA aus Fibroblasten einer gesunden Kontroll-Person zeigte drei verschiedene *MIDI*-Transkripte von 7kb, 4.5kb und 3.5kb (Abb. 3.3.A). Während die ubiquitär exprimierte 7kb und 3.5kb Bande schon vorher auf Gewebe-Northern-Blots beobachtet worden waren, konnte die 4.5kb Bande bisher in keinem anderen Gewebe detektiert werden. Interessanterweise waren in Fibroblasten des Patienten ML alle drei Transkripte um etwa 600-700bp vergrößert (Abb. 3.3.A). Auffällig war auch, dass die Expression der vergrößerten Transkripte im Vergleich zur gesunden Kontrolle stark reduziert war. In der Mutter des Patienten, die milden Symptome des Syndroms wie Hypertelorismus und eine laryngo-tracheale Fistel zeigt, waren sowohl Transkripte normaler Größe als auch die vergrößerten Transkripte vorhanden. 5'Race-Experimente mit Primern in Exon 1 des *MIDI*-Gens erbrachten ein PCR-Produkt von 400bp in der Kontrollzelllinie. In der Patientenzelllinie hingegen wurden zwei Produkte von 400 und 1000bp amplifiziert (Abb. 3.3.B). Die Sequenzierung des 1000bp Produktes ergab eine Duplikation von Exon 1 des *MIDI*-Gens (Abb. 3.3.C). Das 400bp-Produkt resultierte aus der Bindung des Primers an die erste Kopie von Exon 1, wohingegen das 1000bp-Produkt aus der Bindung des Primers an die zweite Kopie von Exon 1 resultierte.

Da die Duplikation von Exon 1 im Patienten ML höchstwahrscheinlich von einer genomischen Duplikation herrührte, wurden Southern-Blot-Analysen des auf Exon1 folgenden Intron 1 durchgeführt. Genomische DNA von ML und einer männlichen Kontrolle wurde mit den Enzymen *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *XbaI* und *BsaBI* geschnitten. Intron 1 überspannende PCR-Proben wurden auf Southern Blots mit den geschnittenen DNAs hybridisiert. Aberrante Banden in der Patienten-DNA konnten auf Southernblots genomischer DNA, die mit den Enzymen *PstI* und *BsaBI* geschnitten worden war, detektiert werden (Abb. 3.3.D). Durch Vergleich der genomischen Sequenz des *MIDI*-Gens mit den verwendeten Enzymen und PCR-Produkten, konnte die genomische Region, die einen der beiden Duplikationsbruchpunkte enthält, auf ein 4,4kb Intervall eingegrenzt werden (Abb. 3.3.E).

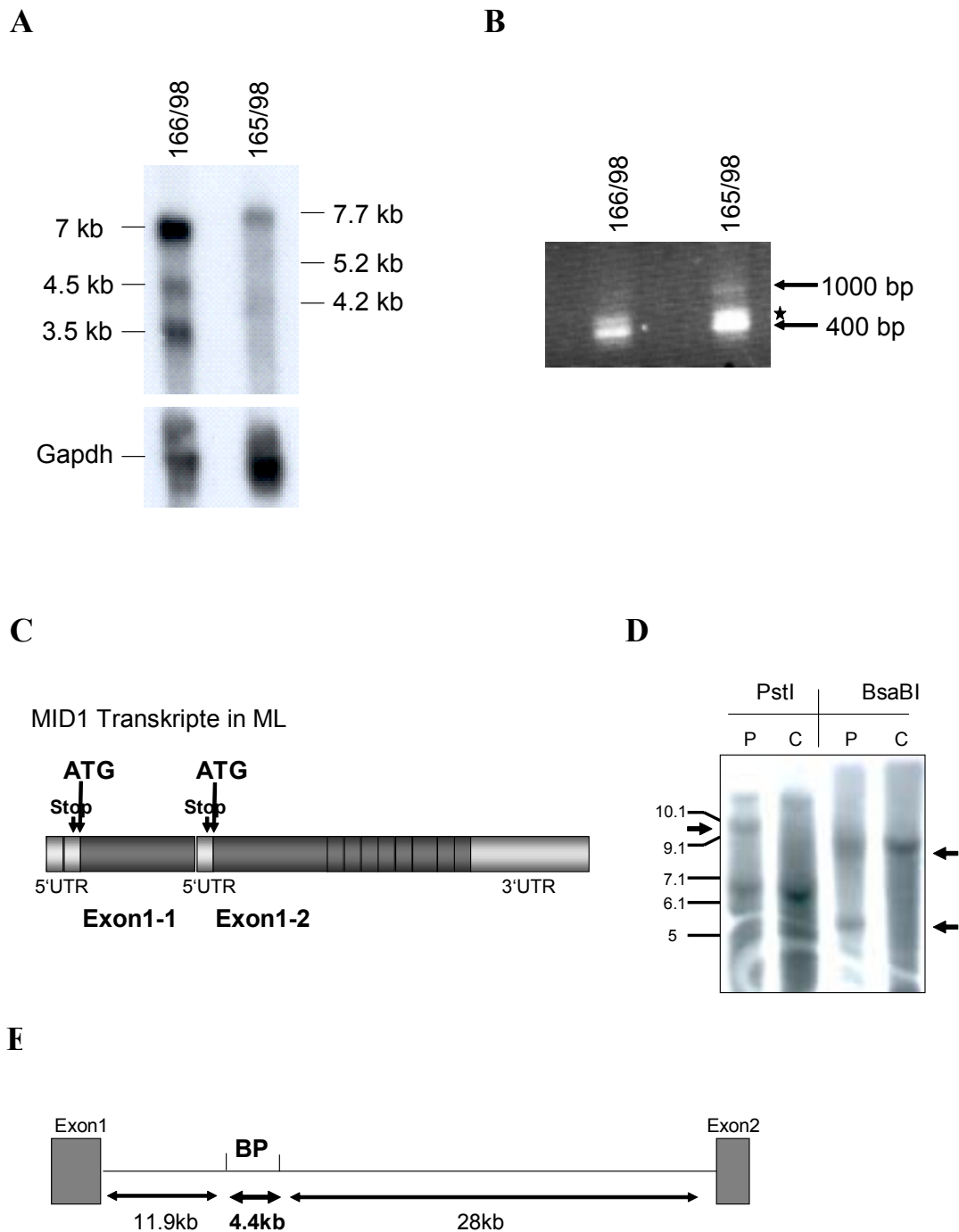


Abbildung 3.3: Identifizierung der intragenischen Duplikation im *MIDI*-Gen des OS-Patienten ML

A. zeigt den Northernblot mit den um 600-700 bp vergrößerten *MIDI*-Transkripten des OS-Patienten ML (165/98) im Vergleich zu einer männlichen Kontrolle (166/98). B. zeigt die in der 5'Race identifizierte Duplikation im *MIDI*-Gen von ML und C. die schematische Darstellung dieser Duplikation. In D ist der Southernblot dargestellt, der zur Identifizierung eines der beiden Bruchpunkte in Intron 1 des *MIDI*-Gen führte. Aberante Banden sind durch Pfeile markiert. Die Lage des Bruchpunktes (BP) ist in E. schematisch dargestellt.

3.4 Regulation von MID1

Die Expression von Genen kann von verschiedenen genomischen Elementen, transkribiert oder nicht transkribiert, beeinflusst werden. Während zu den transkribierten Elementen vor allem regulatorische RNAs und alternativ gespleißte Transkripte zählen, gehören zu den nicht transkribierten Bereichen regulatorische Elemente wie z.B. Enhancer- oder Silencer-Elemente. Um bisher unbekannte transkribierte und nicht transkribierte regulatorische Elemente im *MIDI*-Gen zu identifizieren, wurde von zwei verschiedenen Ansätzen ausgegangen. Erstens sollte sowohl das inzwischen vollständig sequenzierte humane *MIDI*-Gen als auch das teilweise sequenzierte Maus-*mid1*-Gen mit dem Softwareprogramm Nix ausgewertet werden. Dieses Programm ermöglicht die Vorhersage von Exon-, Promotor-, polyA-Signal- und CpG-Inselbereichen. Uns interessierten vor allem die Exonvorhersagen. Zweitens wurde die humane genomische *MIDI*-Sequenz mit den verfügbaren Bereichen der Mausequenz mit dem Softwareprogramm PipMaker verglichen. PipMaker vergleicht Sequenzen verschiedenen Ursprungs und zeigt Bereiche hoher Homologie an. So gefundene konservierte Bereiche haben oft funktionelle Relevanz. Sowohl die vorhergesagten Exons als auch die identifizierten konservierten Sequenzen wurden mit verschiedenen Techniken wie RT-PCR, 5' und 3' Race und NorthernBlot-Analyse auf eine mögliche Expression untersucht. Durch diese Techniken identifizierte exprimierte wie nicht exprimierte Sequenzen sollten funktionell weiter charakterisiert werden.

3.4.1 Nix-Analyse des *MIDI*-Gens

Um alternativ gespleißte Exons im *MIDI*-Gen zu identifizieren, wurde sowohl die humane genomische *MIDI*-Sequenz als auch die verfügbare genomische Sequenz der Maus mit dem Softwareprogramm Nix ausgewertet. Nix arbeitet mit verschiedenen Exonvorhersageprogrammen wie GRAIL, Genefinder, Genemark, Fex, Hexon und Fgene. Jedes dieser Programme für sich alleine kann keine 100%ige Vorhersage treffen, jedoch steigt aufgrund unterschiedlicher Vorhersageparameter die Zuverlässigkeit der Vorhersage, wenn sie durch mehrere Programme getroffen wird. Vorhergesagte Exons im *MIDI*-Gen wurden aus diesem Grund nur weiter untersucht, wenn sie von mindestens drei Programmen identifiziert worden waren.

3.4.1.1 Nix-Analyse des humanen *MIDI*-Gens

In der Nix-Analyse des humanen *MIDI*-Gens wurden insgesamt acht alternative Exons identifiziert und nach ihrer genomischen Anordnung als Exons I, II, III, IV, V, VI, VII und VIII bezeichnet. Alle alternativen Exons wurden von mindestens drei verschiedenen Exonvorhersageprogrammen identifiziert (Abb.3.4.A). Ihre Länge variierte zwischen 57 und 382 bp.

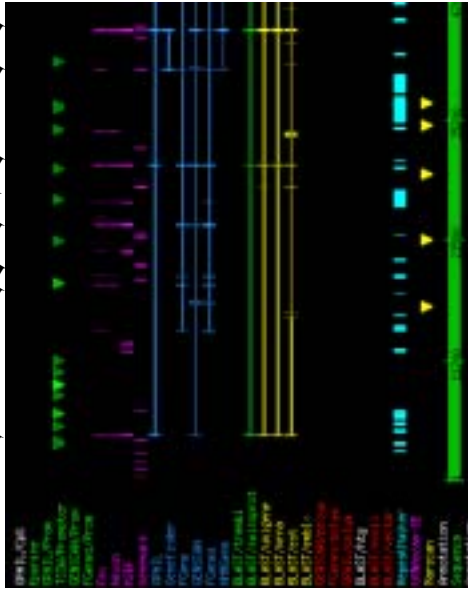
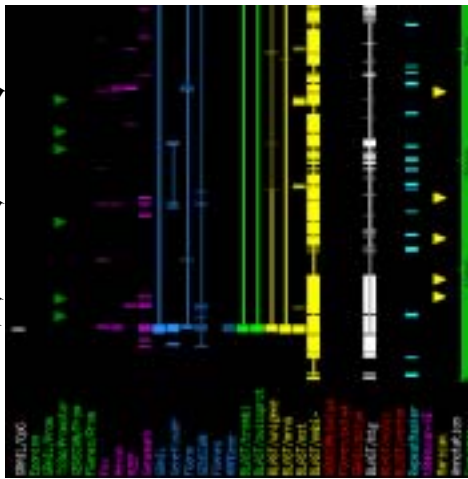
3.4.1.2 NIX-Analyse von *MIDI* in der Maus

Die genomische Sequenz des *mid1*-Gens in der Maus liegt zur Zeit nur in Bruchstücken vor (Golden Path und Celera). Während der 5' Bereich bis Exon 3 vollständig sequenziert ist, liegen für den 3' Bereich von Exon 3 bis Exon 9 nur kurze Bruchstücke vor, zwischen denen Sequenzlücken unbekannter Größe existieren. Daher wurde nur das durchgängig sequenzierte Stück des 5' Bereiches vor Exon 3 durch Nix ausgewertet. Es wurden zwei 87 und 111 bp lange Exons von mehreren Programmen (Abb. 3.4.B) vorhergesagt, die wiederum nach ihrer genomischen Lage als mI und mII bezeichnet wurden. Ein Sequenzvergleich beider Exons mit der humanen *MIDI*-Sequenz zeigte, dass nur mII zwischen Maus und Mensch konserviert ist. Die Homologie beträgt 84,7%.

3.4.2 PipMaker-Analyse zwischen Mensch und Maus zur Charakterisierung konservierter Bereiche im *MIDI*-Gen

Die PipMaker-Analyse stellt Abschnitte hoher Konservierung zwischen zwei orthologen Sequenzen in einer übersichtlichen Grafik dar. Die beiden orthologen Sequenzen waren hier die genomischen *MIDI*-Sequenzen von Mensch und Maus. Wie im Prozent Identitäts-Plot ersichtlich, sind die Sequenzen von Mensch und Maus neben Homologien in den Exons und in kürzeren Intronbereichen (Exon mII, siehe oben) interessanterweise vor allem in einer

A



B

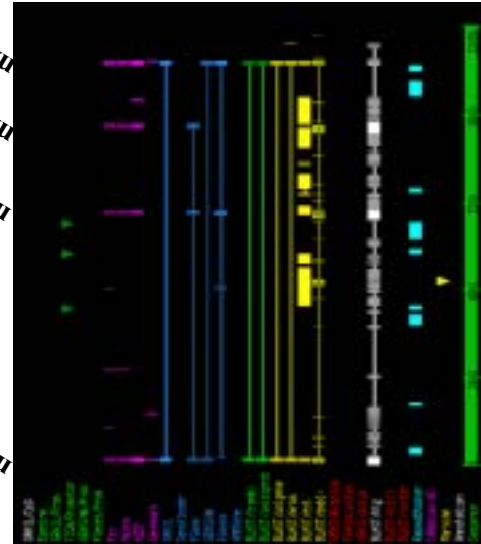


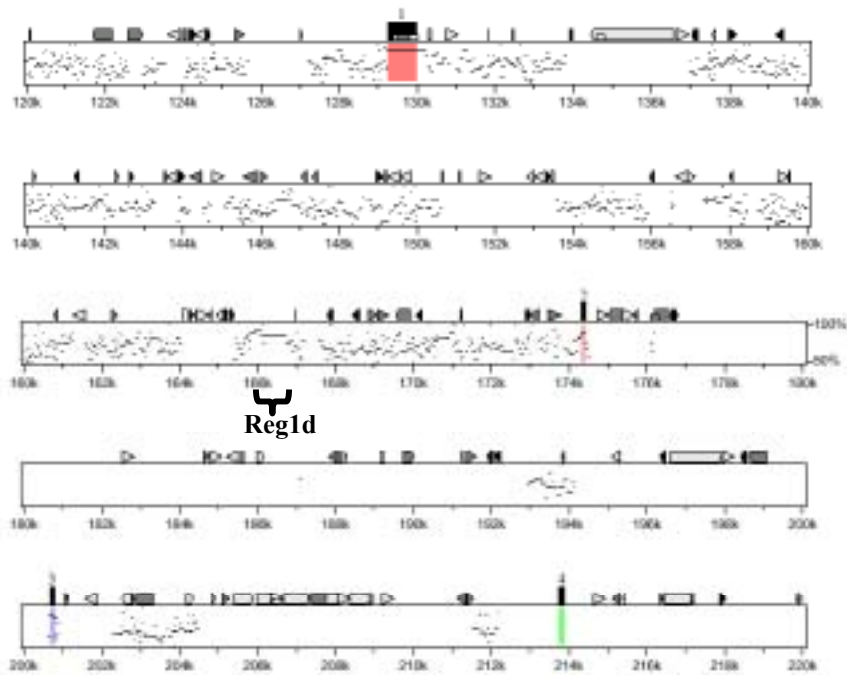
Abbildung 3.4: Nix-Analyse des *MIDI*-Gens in Mensch und Maus
 Vorhergesagte Exons werden als blau- oder pinkfarbene Balken dargestellt. Die Vorhersagen werden als umso sicherer eingestuft, je leuchtender die Farbe des Balkens erscheint.
 A) Nix-Analyse des humanen *MIDI*-Gens
 B) Nix-Analyse des Maus-*midI*-Gens

längeren Region in Intron 1 stark konserviert (Abb.3.5.A). Diese Region – Reg1d – umfasst 1.126 kb und ist zwischen Mensch und Maus zu 84,5% homolog. Da die genomische Region des *mid1*-Gens der Maus zur Zeit nur teilweise sequenziert ist, wurde das humane *MIDI*-Gen ausserdem mit den von Celera in der Maus sequenzierten Bruchstücken in silico verglichen. Dieser Vergleich zeigte die Existenz einer weiteren stark konservierten Region in Intron 4, die als 4* bezeichnet wurde (Abb. 3.5.B). Sie umfasst 276 bp und ist zu 89% zwischen beiden Spezies homolog. Beide Sequenzen wurden in der Nix-Analyse nicht als Exons erkannt.

3.4.3 Exprimierte Sequenzen im humanen *MIDI*-Gen

Um die Expression der vorhergesagten Exons und der konservierten Bereiche zu überprüfen, wurden RT-PCR-Experimente durchgeführt. Wie bereits gezeigt wurde, existieren im Fugu-*MIDI*-Gen alternativ gespleißte Exons im genomisch zwischen Exon 1 und Exon 2 lokalisierten Bereich. RT-PCR-Experimente zeigten, dass diese Exons mit Exon 1 aber nicht mit Exon 2 verbunden sind. Um die Expression der vorhergesagten Exons und der konservierten Sequenzen im humanen *MIDI*-Gen sowie deren Verbindung zu 5' und 3' gelegenen Bereichen der humanen *MIDI*-cDNA zu überprüfen, wurden Primer in diesen Sequenzen in RT-PCR-Experimenten mit Primern in Exon 1 und Exon 5 kombiniert. Da bekannt ist, dass das *MIDI*-Gen sehr schwach exprimiert ist, wurde eine nested PCR angeschlossen. Die cDNA wurde aus testis RNA synthetisiert. Testis hat den Vorteil, dass in diesem Gewebe die meisten Transkripte exprimiert werden. Mögliche falsche negative Ergebnisse aufgrund von gewebsspezifischer Expression sollten so vermieden werden. Die RT-PCR ergab, dass sowohl die Exons I, IV, V, VI, VIII als auch die konservierte Sequenz 4* als alternativ gespleißte *MIDI*-Exons exprimiert werden (Abb. 3.7.A). Die restlichen Vorhersagen konnten von uns nicht bestätigt werden. Es erfolgte eine Umbenennung der exprimierten Sequenzen zu Exon 1a, Exon 2c, Exon 2d, Exon 2f, Exon 3a und Exon 4a (Abb. 3.6). In ihrer Gesamtheit werden sie als neue Exons bezeichnet. Darüber hinaus identifizierte die Nix-Analyse der genomischen *mid1*-Sequenz der Maus u. a. das Exon m2b. Ein Vergleich der Sequenz dieses Exons mit der humanen genomischen *MIDI*-Sequenz zeigte, dass m2b zwischen beiden Spezies zu 84,7% homolog ist. Aufgrund seiner genomischen Anordnung wurde es im Menschen als Exon 2e bezeichnet. Seine Expression im Menschen wurde durch RT-PCR- und Race-Experimente bestätigt.

A



B

```

Score = 313 bits (158), Expect = 1e-81
Identities = 248/278 (89%)
Strand = Plus / Minus

Query: 7193 ttttaatgtttatttttagagagaggctagtaattgattaaactaatccaatatctggaaa 7252
      |||||
Sbjct: 420 ttttcatgtttatttttagagagaggctagtaattgattaaactaatccaagatctggaga 361

Query: 7253 cattctttttaatatttcactttgccttttatgcagtttgaaaatttggagactctcctt 7312
      |||||
Sbjct: 360 cattctttttcatcttcactttgcctttgatgcagtttgaaaattctggagactccctt 301

Query: 7313 tgaagtggatcaggggttgctgtgaaaggaacaacagtttcccagacagatgtgtgaag 7372
      |||||
Sbjct: 300 ggaagtggacaggggagctgtgaaaggaacagacagtttcccagacagatgtgtgaag 241

Query: 7373 aaatgcctagagctaogccttcttgcctggggttagacgtgcocgggcccagactgttaa 7432
      |||||
Sbjct: 240 agatgcctgaagctgtgccttctggccggggttcgatgtgcocgggcccagactgtcaaa 181

Query: 7433 tacacagcaacatgaaatgaaatattcttttctttc 7470
      |||||
Sbjct: 180 tacacagcagcaacatgaaatgaaatattcttttctttc 143

```

Abb. 3.5: Homologievergleich des *MIDI*-Gens zwischen Mensch und Maus

- A. PipMaker-Analyse. Bekannte *MIDI*-Exons (Exons 1, 2, 3, 4) sind durch farbige Balken hervorgehoben. 3' zu Ex2 war in der Maus keine genomische Sequenz verfügbar. Die Reg1d ist durch eine geschweifte Klammer hervorgehoben.
- B. Sequenzvergleich der Region 4* des *MIDI*-Gens zwischen Mensch (Query) und Maus (Sbjct)

Die Region 1d bildet ein eigenes Kapitel und wird im Abschnitt 3.3.8 behandelt.

Nach Bestätigung der Expression der neuen Exons wurde eine Reihe weiterer RT-PCR und Race-Experimente angeschlossen, im Rahmen derer weitere alternativ gespleißte Exons und zahlreiche Isoformen der neuen Exons identifiziert wurden (Abb. 3.6; Abb. 3.7; Abb. 3.8). Bevor im Einzelnen auf identifizierte alternativ gespleißte Transkripte eingegangen wird, folgt eine Auflistung der, zusätzlich zu den beschriebenen RT-PCR-Experimenten, durchgeführten Experimente:

1. Bei Wiederholungen oben beschriebener RT-PCRs wurden weitere Transkripte gefunden (Abb.3.8) Die Amplifikation unterschiedlicher Transkripte bei gleichen Versuchsbedingungen mag an der Komplexität des alternativen Spleißens liegen
2. Die Verbindung der neuen Exons untereinander wurde in RT-PCR-Experimenten mit entsprechenden Primerkombinationen überprüft. Außerdem wurde mit Primern in den neuen Exons und Primern in Ex9 die Verbindung zum *MIDI* 3'Ende untersucht. Auch hier erfolgte die cDNA-Synthese mit total RNA aus adultem Testis.
3. Mit RT-PCR-Experimenten von Gesamt RNA aus adultem Testis, adultem Herz, adulten Fibroblasten, fetaler Leber, fetalem Gehirn und fetalen Fibroblasten sollte die gewebsspezifische Expression der Exons untersucht werden. In diesem Abschnitt sollen diesbezüglich nur die zusätzlich identifizierten Transkripte genannt werden. Auf die Gewebespezifität wird im entsprechenden Kapitel eingegangen.
4. Zur Identifizierung alternativer Transkriptionsstarts und -stops wurden schließlich 3' und 5'Race-Experimente durchgeführt. Die Race-Experimente erfolgten nach SMARTTM. Die cDNA-Synthese erfolgte aus totaler RNA aus adultem Testis.
5. An die Race-Experimente der Exons 2d und 2f schlossen sich erneut RT-PCR-Experimente an.

Im Folgenden werden die identifizierten alternativ gespleißten Transkripte näher erläutert.

Exon 1a:

Durch RT-PCR-Experimente mit Primern in den Exons 1a und 1 wurden sieben verschiedene Isoformen (Ex1a.7 – Ex1a.13) identifiziert (Abb. 3.7 A und 3.8 A). Jede dieser sieben Isoformen enthält ausschliesslich die Exons 1 und 1a, jedoch entstanden durch alternatives

Spleißen im 3' Bereich von Exon 1 und im 5' Bereich von Exon 1a verschieden lange Varianten beider Exons.

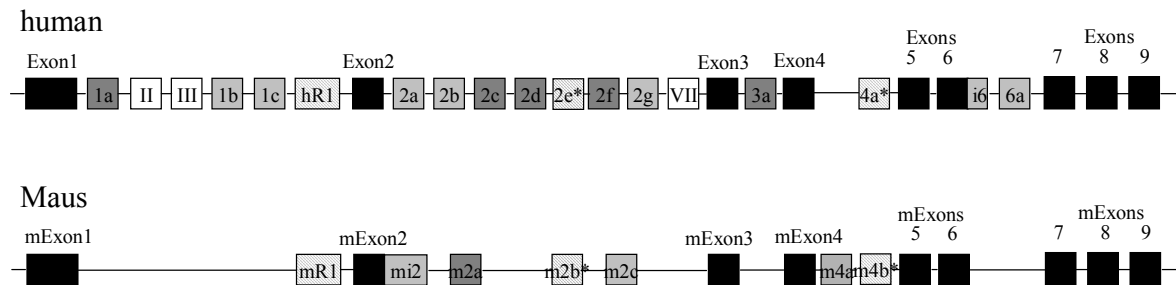


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung aller neu identifizierten alternativ gespleißten Exons in den *MIDI*-Genen von Mensch und Maus

Schwarz: bekannte *MIDI*-Exons 1-9 im Menschen und m1-m9 in der Maus

Dunkelgrau: durch Nix vorhergesagte Exons, deren Expression mit RT-PCR bestätigt werden konnte

Weiß: durch Nix vorhergesagte Exons, deren Expression mit RT-PCR nicht bestätigt werden konnte

Hellgrau: durch RT-PCR und Race-Experimente identifizierte Exons

Hellgrau quergestreift: zwischen Mensch und Maus konservierte Region, deren Expression durch RT-PCR bestätigt wurde

Im 3' Bereich von Exon 1 wurden zwei verschiedene Spleißübergänge benutzt. Einer dieser Übergänge ist der bekannte, der zweite liegt 114bp stromaufwärts im Exon. Seine Benutzung führt zur Deletion besagter 114bp, was auf Proteinebene die Deletion des größten Teils der BBox2 bedeutet. Im 5' Bereich von Exon 1a wurden fünf verschiedene Spleißübergänge verwendet, die Exon 1a um 24 bp verkürzen oder um 237, 131, 126 oder 506 bp verlängern. Exon 1a führt in alle sieben Isoformen Stopkodons ein.

Durch RT-PCR-Experimente mit Primern in Exon 1a und Exon 5 bzw. Exon 9 wurden die Isoformen Ex1a.1 – Ex1a.3 detektiert (Abb. 3.7 A und 3.8 A). In Isoform Ex1a.1 folgen die *MIDI*-Exons 2-9 3' auf Ex1a. Isoform Ex1a.2 enthält neben den *MIDI*-Exons 2-5 noch ein weiteres – bisher unbekanntes – Exon, das als Exon 1b bezeichnet wurde. Exon 1b wird zwischen Exon 1a und Exon 2 gespleißt und führt wie Exon 1a Stopkodons in die Sequenz ein. Isoform Ex1a.3 enthält neben Exon 1a und den Exons 2-5 das zwischen Exon 2 und Exon 3 integrierte Exon 2f. Exon 2f wurde ebenfalls durch Nix identifiziert. Es wird an späterer Stelle ausführlicher über dieses Exon berichtet. Bei der Untersuchung der Verbindung von

Exon 1a zu den neuen Exons 2c, 2d, 2f, 3a und 4a wurden neben Ex1a.3 die Isoformen Ex1a.4 und Ex1a.5 identifiziert (Abb. 3.8 A). In Ex1a.5 weist Exon 1a genau wie in Ex1a.3 Verbindung zu Exon 2f auf, jedoch schließt Exon 2f direkt an Exon 1a an. Exon 2 ist herausgespleißt. In Ex1a.4 ist Exon 1a in ein gemeinsames Transkript mit Exon 2d gespleißt. Wie die 3'Race-Experimente zeigen, besitzt Exon 1a neben der Verbindung zum *MIDI* 3'Ende in Exon 9 ein alternativ gespleißtes 3'Ende. Der identifizierte 3'UTR (Isoform Ex1a.6) schließt genomisch direkt an Exon 1a an. Ein alternatives PolyA-Signal der Sequenz GATAAA liegt 32 bp 5' vor dem PolyA-Schwanz.

Charakteristisch für Exon 1 ist, dass dieses Exon für sich alleine zwar einen offenen Leserahmen besitzt, die identifizierten Isoformen resultieren jedoch in einer Leserasterverschiebung in Exon 1a und somit in der Einführung von Stopkodons. Die übrigen *MIDI*-Exons sind von dieser Leserasterverschiebung nicht betroffen. Somit führt das alternative Spleißen von Exon 1a zur Einführung vorzeitiger Stopkodons in die Sequenz. Dieser Aspekt wird im Kapitel NMD (Abschnitt 3.4.9) wieder aufgegriffen.

Exon 2c:

Die RT-PCR mit Primern in den Exons 2c und 1 erbrachte keine Banden. RT-PCR-Experimente mit Primern in Exon 2c und Exon 5 führten hingegen zur Identifizierung der Isoformen Ex2c.1 – Ex2c.3 (Abb. 3.7 A und 3.8 C). Während in Isoform Ex2c.3 die bekannten *MIDI*-Exons 3-5 an Exon 2c anschließen, ist in Isoform Ex2c.2 neben diesen Exons zusätzlich auch Exon 2f vorhanden. Die dritte Isoform – Ex2c.1 enthält zusätzlich Exon 2d. Wie die RT-PCR-Experimente deutlich zeigen, besitzt Exon 2c Verbindung zu Exon 5 aber nicht zu Exon 1. Es ergeben sich daraus mehrere Möglichkeiten. Exon 2c könnte direkt an ein Exon des *MIDI*-5'UTR gespleißt werden oder es könnte einen eigenen 5'UTR und somit auch einen eigenen Promotor besitzen. In beiden Fällen müsste Exon 2c zum Translationsstart eine Kozak-Sequenz aufweisen. Race-Experimente sollten hier Klarheit schaffen. Sie führten jedoch nicht zum Erfolg, da in der 5'Race nur ein Schmier amplifiziert wurde (Abb.3.7B). Somit können keinerlei Aussagen über das 5'Ende getroffen werden. Ausserdem bleibt unklar, ob Exon 2c Stopkodons in die Sequenz einführt oder ob ein offener Leserahmen fortgesetzt wird.

Exon 2d, Exon 1c, Exon 2a und Exon 2b:

Wie die RT-PCR-Experimente zeigen, hat Exon 2d sowohl Verbindung zu Exon 1 als auch zu Exon 5 (Abb. 3.7 A). RT-PCR-Experimente mit Primerkombinationen in Exon 2d und Exon 1

fürten zur Identifizierung der Isoformen Ex2d.8, Ex2d.10 und Ex2d.11 (Abb. 3.8.D). In Ex2d.8 schließt Exon 2d an die *MIDI*-Exons 1 und 2 an. Die Isoform Ex2d.10 integriert ein bisher unbekanntes Exon – Exon 1c – zwischen Exon 1 und Exon 2d in die cDNA.

Bemerkenswert ist, dass Exon 2 aus diesem Transkript herausgespleißt ist. Ausserdem ist Exon 2d im 5' Bereich um 36 bp verkürzt. Der 5'Spleißübergang ist in Folge dessen nicht konserviert. Exon 1c setzt den offenen Leserahmen nicht fort, sondern fügt Stopkodons in die Sequenz ein. Isoform Ex2d.11 weist verkürzte Varianten von Exon 1 und Exon 2d auf. Exon 2 ist wie in Ex2d.10 herausgespleißt. Sowohl der 3'Spleißübergang in Exon 1 als auch der 5'Spleißübergang in Exon 2d sind nicht konserviert.

RT-PCRs von Exon 2d zu Exon 5 bzw. zu Exon 9 ergaben die Isoformen Ex2d.1, Ex2d.2 (Primer in Exon 2d und Exon 9) und Ex2d.3 (Abb. 3.8 D). Während in Isoform Ex2d.1 die *MIDI*-Exons 3-5 auf Exon 2d folgen, schließt in den beiden Isoformen Ex2d.2 und Ex2d.3 ein weiteres Exon, Exon 2f, an Exon 2d an. Auf Exon 2f folgen in Ex2d.2 Ex3-9, in Ex2d.3 die Exons 3 und 5. Exon 4 ist herausgespleißt (Abb. 3.8.D). Da Exon 2d – wie Isoform Ex2d.2 zeigt - Anschluß an Exon 9 hat, ist anzunehmen, dass zumindest in diesem Transkript das *MIDI*-3'Ende benutzt wird. In der 3'Race wurde ausserdem ein alternatives 3'Ende (3'In2) identifiziert, das genomisch direkt an Exon 2d anschließt und 9 bp 5' zum Poly-Schwanz das alternative PolyA-Signal ATTAAA aufweist. Über RT-PCR mit Primern in 3'In2 und Exon 1 wurde Isoform Ex2d.7 identifiziert, die Exon 1, Exon 2, Exon 2d und 3'In2 enthält (Abb. 3.8.D). Exon 2d führt nach 42 bp ein Stopkodon in die Sequenz ein. Interessanterweise ist Exon 1 im 3' Bereich um 114bp verkürzt. Die Benutzung des entsprechenden Spleiß-Übergangs war schon in den Isoformen Ex1a.8, Ex1a.11 und Ex1a.12 beobachtet worden (Abb. 3.8 A). Die Folge ist eine fast vollständige Deletion der BBox2 auf Proteinebene. Die 5'Race aus Exon 2d amplifizierte 533 bp des genomisch stromaufwärts gelegenen Bereichs (5'In2). Es könnte sich hier theoretisch um einen alternativen 5'UTR handeln. Bei der Übersetzung der Sequenz in AS fällt jedoch auf, dass es kein ATG mit einer Kozak-Sequenz gibt. Potentielle offene Leserahmen, die mit einem ATG beginnen, enden nach wenigen AS mit einem Stop.

Zur Verifizierung der 5'Race wurden RT-PCR-Experimente mit Primern in 5'In2 und 3'In2 bzw. Exon 5 durchgeführt. In der RT-PCR von 5'In2 zu 3'In2 wurde Isoform Ex2d.6 detektiert (Abb. 3.8 D). Ex2d.6 enthält neben 5'In2, Exon 2d und 3'In2. Da Ex2d.6 keinen längeren offenen Leserahmen besitzt, erscheint eine Übersetzung in Aminosäuren fragwürdig. In der RT-PCR von 5'In2 zu Exon 5 gelang die Identifizierung zweier weiterer Isoformen (Ex2d.4 und Ex2d.5; Abb. 3.8 D) In Ex2d.5 geht 5'In2 direkt in Exon 2d über. 3' an Exon 2d

schließen die *MIDI*-Exons 3-5 an. In Ex2d.4 ist zusätzlich zwischen Exon 2d und Exon 3 Exon 2f integriert (Abb. 3.8.D). Da der Bereich der Isoformen Ex2d.4 und Ex2d.5 stromabwärts von 5'In2 bereits in den Isoformen Ex2d.2 und Ex2d.1 identifiziert wurde, könnte es sich um dieselben Transkripte handeln. Wie weiter oben beschreiben, ist in 5'In2 kein ATG enthalten, das den Beginn eines längeren offenen Leserahmens anzeigen könnte. In Ex2d.4 und Ex2d.5 hingegen existiert ein offener Leserahmen, der 21 bp 5' zu Exon 2d in 5'In2 beginnt. Das erste ATG dieses Leserahmens liegt jedoch 202 bp stromabwärts in Exon 4. Es erscheint daher unwahrscheinlich, dass 5'In2 ein alternativer 5'UTR ist.

In der 5'Race von Exon 2d wurde ausserdem eine weitere Isoform – Ex2d.9 - identifiziert (Abb. 3.8 D). In Ex2d.9 liegen stromaufwärts vor Exon 2d Exon 2, das neue Exon 1c sowie Exon 1. Exon 1c ist in dieser Isoform verglichen mit Ex2d.10 um 156 bp verlängert. Wie in Ex2d.10 führt Exon 1c Stopkodons in die Sequenz ein (Abb. 3.17A und B). Die 3'Race von Exon 1c ergab drei neue Isoformen und wenigstens zwei neue alternative Polyadenylierungsstellen (Abb. 3.8.B). In Isoform Ex1c.1 sind neben Exon 1c das *MIDI*-Exon 2 sowie zwei neue Exons, Exon 2a und Exon 2b, enthalten. Exon 2b weist ein alternatives Polyadenylierungssignal (TATAAA) auf, das unmittelbar stromaufwärts zum PolyA-Schwanz liegt. Die Exons 2a und 2b verlängern den offenen Leserahmen nicht, sondern führen ebenso wie Exon 1c Stopkodons in die Sequenz ein. In Ex1c.3 schließen sich ca. 1.560 bp der stromabwärts gelegenen genomischen Sequenz 3' an Exon 1c an. Unmittelbar 5' des PolyA-Schwanzes liegt das alternative Polyadenylierungssignal TATAAA. In Ex1c.2 schließen sich ca. 310 bp der stromabwärts gelegenen genomischen Sequenz 3' an Exon 1c an. Da im Bereich bis 30 bp stromaufwärts des PolyA-Schwanzes kein Polyadenylierungssignal identifiziert werden konnte, ist es fraglich, ob Ex1c.2 ein vollständiges Produkt ist.

Exon 2e:

Die RT-PCR-Experimente von Exon 2e zu den *MIDI*-Exons 1 bzw. 5 ergaben kein Ergebnis. Die 3'Race identifizierte hingegen die Isoform Ex2e.1 (Abb. 3.8 E). In dieser Isoform schliesst der PolyA-Schwanz direkt an Exon 2e an. Unmittelbar stromaufwärts des PolyA-Schwanzes befindet sich ein Polyadenylierungssignal der Sequenz AATAAA. Es ist daher davon auszugehen, dass das 3'Ende dieses Transkriptes identifiziert wurde.

Exon 2f, Exon 2g und Exon i6:

Auch Exon 2f weist sowohl Verbindung zu Exon 1 als auch zu Exon 5 auf. In der RT-PCR von Exon 2f zu Exon 1 wurden die Isoformen Ex2f.8 und Ex2f.9 detektiert (Abb. 3.7 A und 3.8 F). In Ex2f.8 schließt Exon 2f an die *MIDI*-Exons 1 und 2 an. In Ex2f.9 schließt Exon 2f an die Exons 1 und 2 an, jedoch ist Exon 1 um 114 bp verkürzt. Es wird der gleiche Spleißübergang benutzt wie für die Isoformen Ex1a.8, Ex1a.11 und Ex1a.12 sowie Ex2d.7 beschrieben wurde. Die RT-PCR von Exon 2f zu Exon 5 bzw. Exon 9 ergab die Isoformen Ex2f.4, Ex2f.6 und Ex2f.7 (Abb. 3.7 A und 3.8 F). In Ex2f.4 schliessen die *MIDI*-Exons 3-9 an Exon 2f an, was die Benutzung des *MIDI*-3'Endes in diesem Transkript bestätigt. Die RT-PCR mit Primerkombinationen in Exon 2f und den anderen neuen Exons macht deutlich, dass Exon 2f neben den bereits bekannten Verbindungen zu Exon 1a, Exon 2c und Exon 2d auch Verbindung zu Exon 4a besitzt (Isoform Ex2f.5). Die RT-PCR von Exon 4a zu Exon 1 konnte diese Verbindung bestätigen und erbrachte die Isoformen Ex2f.2 und Ex2f.3 (Abb. 3.8F). Während jedoch in Ex2f.5 ein bisher nicht bekanntes Exon – Exon 2g – auf Exon 2f folgt, fehlt dieses Exon in Ex2f.2 und Ex2f.3. Exon 2g setzt den offenen Leserahmen nicht fort, sondern führt Stopkodons in die Sequenz ein. In Ex2f.3 ist Exon 1 wiederum um 114bp verkürzt.

Die aus Exon 2f durchgeführte 3'Race identifizierte zwei verschiedene Isoformen (Abb. 3.8 F): Während Ex2f.4 bereits in der RT-PCR detektiert wurde, ist Ex2f.1 eine neue Isoform, die ein alternatives 3'Ende aufweist. Auf Exon 2f folgen zunächst die Exons 3-6. 3' an Exon 6 schließen 415 bp des genomisch folgenden Intronbereichs (Exon i6) an. Ca. 21 bp 5' vor dem PolyA-Schwanz befindet sich ein alternatives PolyA-Signal mit der Sequenz TATAAA. Um ein vollständiges Produkt zu erhalten, wurde eine RT-PCR mit Primern in Exon i6 und Exon 1 angeschlossen. Diese RT-PCR identifizierte vier Isoformen – Ex2f.1, Exi6.1, Exi6.2 und Exi6.3 (Abb. 3.8F und I). Während Exi6.1 die *MIDI*-Exons 1-6 und daran anschließend i6 enthält, ist in Ex2f.1 neben diesen Exon 2f in die cDNA integriert. Exon i6.2 enthält wiederum nur die Exons 1-6 und daran anschließend i6, jedoch ist Exon 1 in dieser Variante erneut um 114bp verkürzt. Die Sequenz i6 erweitert den offenen Leserahmen um 180bp. Darauf folgt das erste Stopkodon. Auch Exon 2f wird in den offenen Leserahmen integriert und erweitert ihn um 152bp. Aufgrund des identifizierten alternativen 3'Endes ist bei allen Isoformen (Ex2f.1, Exi6.1, Exi6.2, Exi6.3) die Translation in ein trunkiertes Protein sehr wahrscheinlich. Die Isoformen Exi6.1 und Ex2f.1 wurden daher genau wie die Isoform Ex2d.7 funktionell näher charakterisiert (Abschnitt 3.3.6). Exi6.3 enthält nur die Exons 1 und i6, jedoch in verkürzter Form ohne konservierte Spleißübergänge.

Exon 3a:

Die RT-PCR von Exon 3a zu Exon 1 erbrachte nur einige schwache Banden, die nicht kloniert und sequenziert werden konnten. Es ist daher wahrscheinlich, dass diese Banden unspezifisch waren (Abb.3.7A). In der RT-PCR zur Untersuchung der gewebsspezifischen Expression (siehe Kapitel 3.3.5), die mit Primern in Exon 3a und Exon 1 durchgeführt wurde, konnte hingegen eine Verbindung zu Exon 1 identifiziert werden (Abb. 3.8G). In dieser Isoform – Ex3a.3 - ist Exon 1 im 3'Bereich um ca. 212 bp verlängert. Die Spleißübergänge der beiden Exons sind in dieser Isoform nicht konserviert.

Die RT-PCR von Exon 3a zu Exon 5 ergab die Isoform Ex3a.2 (Abb. 3.7A und Abb. 3.8.G). In Ex3a.2 folgen die *MIDI*-Exons 4 und 5 3' auf Exon 3a.

3'Race-Experimente aus Exon 3a identifizierten ein alternatives 3'Ende (Isoform Ex3a.1) (Abb. 3.7B und Abb. 3.8G). An Exon 3a schließen sich ca. 799 bp des 3' direkt folgenden genomischen Bereichs an. 10-30 bp 5' vor dem PolyA-Schwanz konnte jedoch kein PolyA-Signal detektiert werden.

Ob Exon 3a Stopkodons in die Sequenz einführt oder einen offenen Leserahmen weiterführt, konnte anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht entschieden werden.

Exon 4a und Exon 6a:

Das Gelfoto der RT-PCR von Exon 4a zu Exon 1 zeigt zwei Banden (Abb.3.7A). Die beiden zugrunde liegenden Isoformen Ex4a.8 und Ex4a.10 (Abb. 3.8H) unterscheiden sich dadurch, dass aus Ex4a.10 Exon 3 herausgespleißt wurde, aus Ex4a.8 jedoch nicht. Abgesehen hiervon folgt Exon 4a in beiden Isoformen 3' auf die bekannten *MIDI*-Exons. In einer weiteren RT-PCR wurde ein zusätzliches Transkript identifiziert: Isoform Ex4a.7 unterscheidet sich von Ex4a.8 durch die schon beschriebene Verkürzung von Exon 1 um 114bp (Abb. 3.8 H).

Ausserdem wurden Transkripte identifiziert, in die neben Exon 4a auch Exon 2f hineingespleißt ist (Ex2f.2 und Ex2f.3). Diese Isoformen wurden bei der Beschreibung von Exon 2f bereits erwähnt (Abb. 3.8F).

Die RT-PCR von Exon 4a zu Exon 5 erbrachte die Isoform Ex4a.1, RT-PCR von Exon 4a zu Exon 9 erbrachte die Isoformen Ex4a.2, Ex4a.3 und Ex4a.4 (Abb. 3.7A; Abb. 3.8H). Exon 4a überspannt in Ex4a.1 eine Länge von 500bp und wird somit über den konservierten Bereich von 276bp hinaus exprimiert. Interessanterweise geht Exon 4a ohne Intronbereich direkt in Exon 5 über. In Ex4a.2 ist Exon 4a im 3'Bereich um 329bp verkürzt, weist jedoch konservierte Spleißübergänge auf. In Ex4a.3 ist Exon 4a im 3'Bereich um 224bp verkürzt. Hier ist der Spleißübergang im 3'Bereich von Exon 4a jedoch nicht konserviert und enthält

anstelle eines GT ein GC. In Ex4a.4 umfasst Exon 4a wie in Ex4a.1 eine Länge von 500 bp. In allen drei Isoformen folgen die Exons 5-9 3' auf Exon 4a.

Die 3'Race ausgehend von Exon 4a konnte drei alternative 3'Enden identifizieren: Isoform Ex4a.5 weist Exon 4a in verkürzter Form auf. Die Exons 5 und 6 schließen 3' an Exon 4a an, darauf folgt ein bisher nicht identifiziertes Exon – Exon 6a. Dieses Exon führt Stopkodons in die Sequenz ein und besitzt 16bp vor dem PolyA-Schwanz ein PolyA-Signal (AATAAA). In Isoform Ex4a.6 sind die Exons 4a, 5 und 6 enthalten. 3' auf Exon 6 folgt das bereits unter Exon 2f beschriebene und in den Isoformen Ex2f.1, Exi6.1 und Exi6.2 identifizierte Exon i6. Isoform Ex4a.12 enthält nur Exon 4a. In Exon 4a ist unmittelbar 5' zum PolyA-Schwanz ein alternatives PolyA-Signal der Sequenz AGTAAA vorhanden (Abb. 3.7B; Abb. 3.8H).

Die 5'Race von Exon 4a ausgehend erbrachte Isoform Ex4a.7, die neben Exon 4a 938bp des direkt stromaufwärts zu Exon 4a gelegenen genomischen Bereichs umfasst (Abb. 3.8H). Auf dieses Transkript wird im Kapitel 3.3.6 näher eingegangen.

5'Race-Experimente in der Maus bestätigten, dass das Maushomologe von Exon 4a, mExon 4b, auch in diesem Organismus exprimiert wird (mExon 4b; Abb. 3.9D; Kapitel 3.4.4).

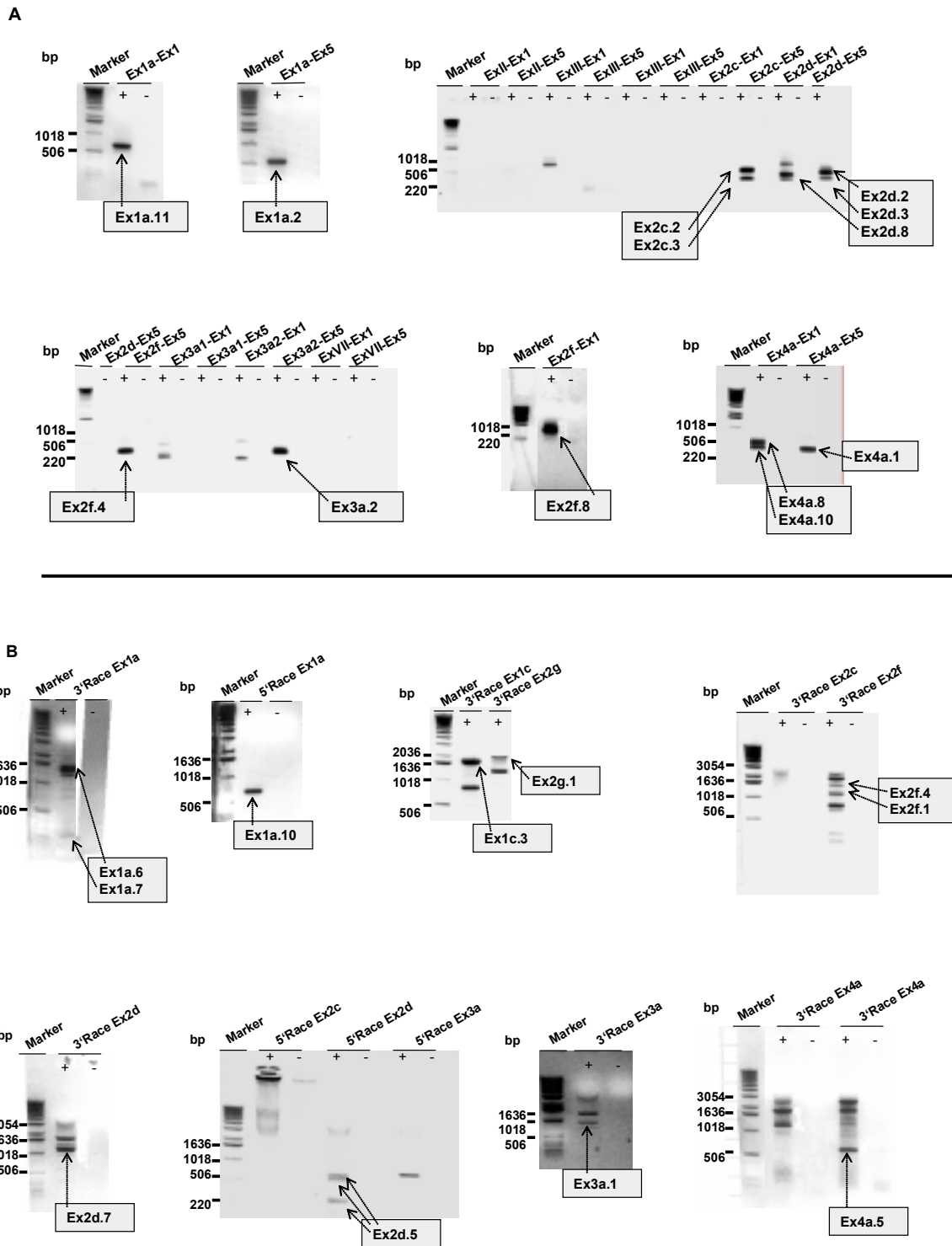


Abbildung 3.7: RT- und Race-PCR-Experimente

Aus der gesamten Menge durchgeführter RT- und Race-PCR Experimente wurden Beispiele gewählt.

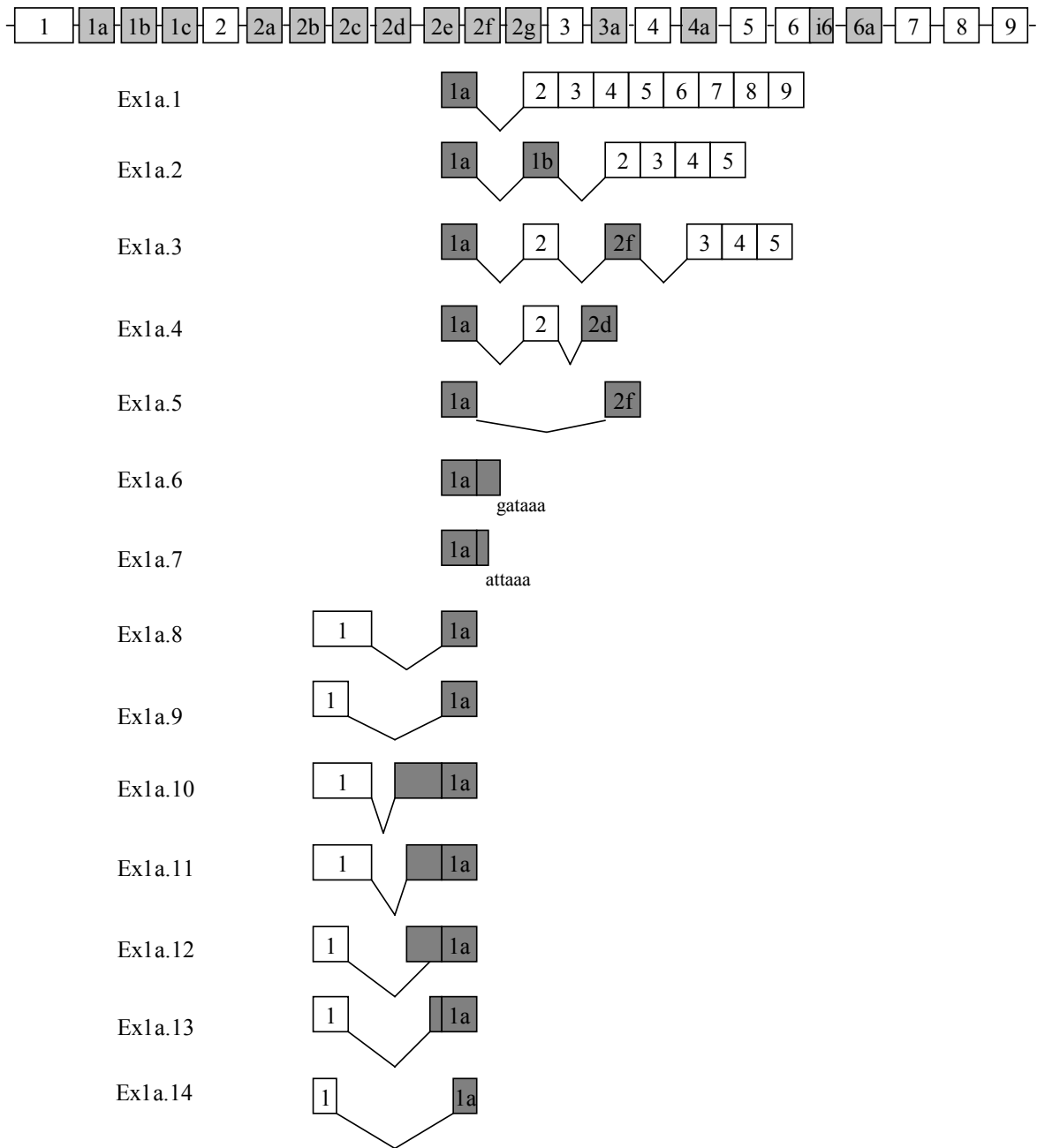
Daher sind nicht alle identifizierten Isoformen in der Abbildung enthalten.

A. RT-PCR-Experimente mit Primern in den Exons 1a, II, III, 2c, 2d, 2f, VI, 3a und 4a kombiniert mit Primern in den Exons 1 oder 5.

B. 3' und 5'Race der Exons 1a, 1c, 2c, 2d, 2g, 3a und 4a

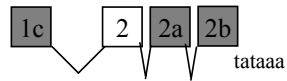
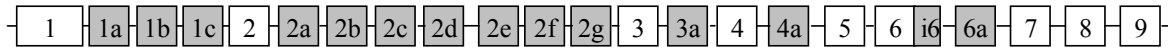
A

Exon 1a (human)



B

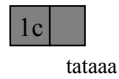
Exons 1c, 2a and 2b (human)



Ex1c.1



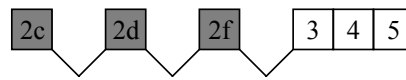
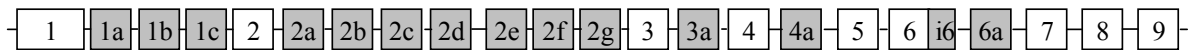
Ex1c.2



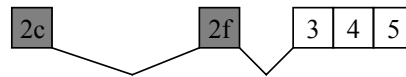
Ex1c.3

C

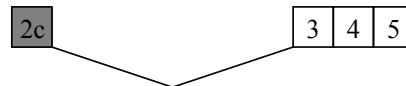
Exon 2c (human)



Ex2c.1



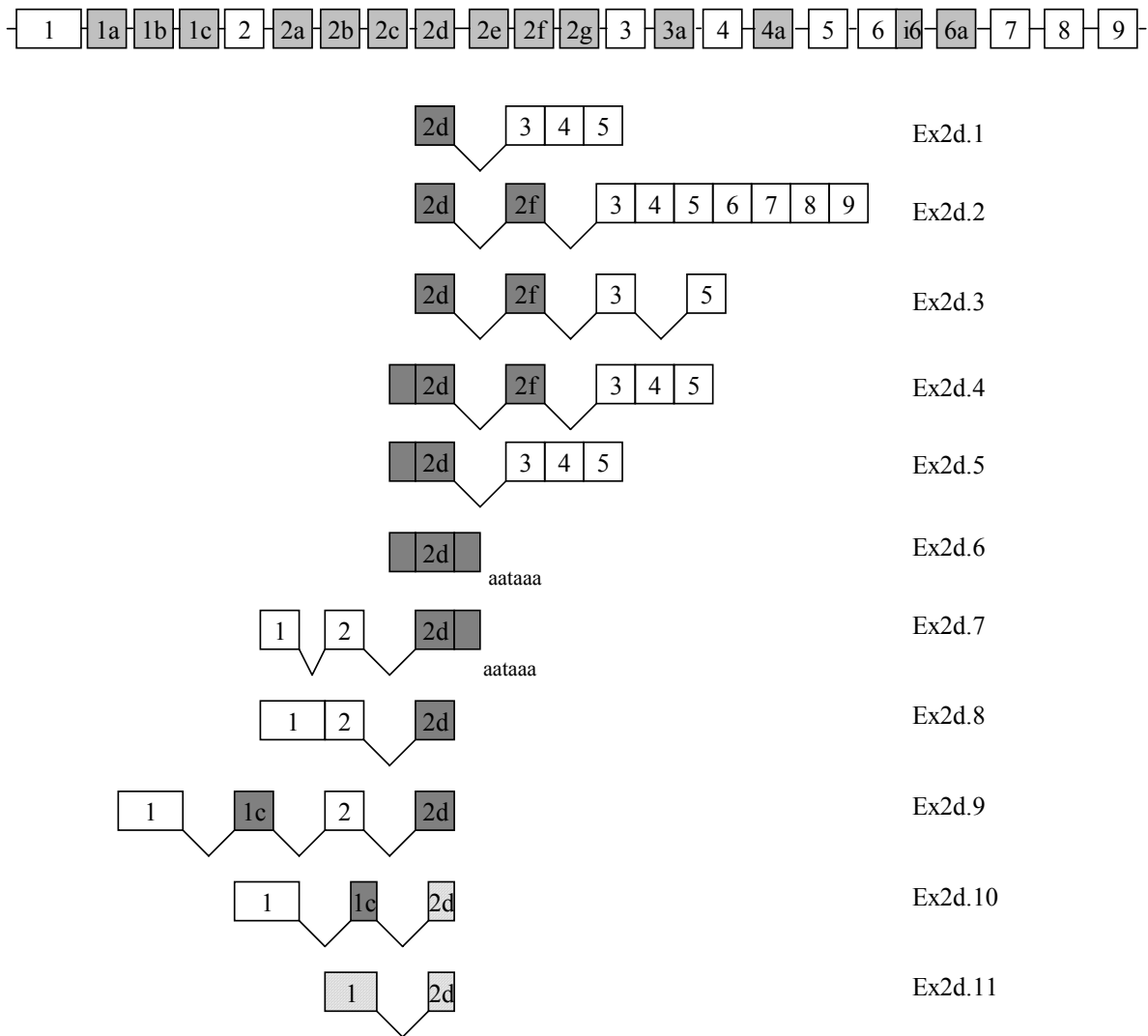
Ex2c.2



Ex2c.3

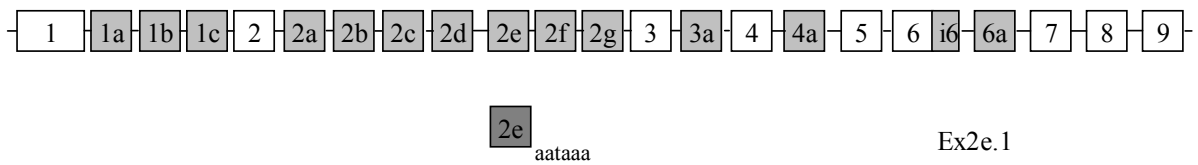
D

Exon 2d (human)



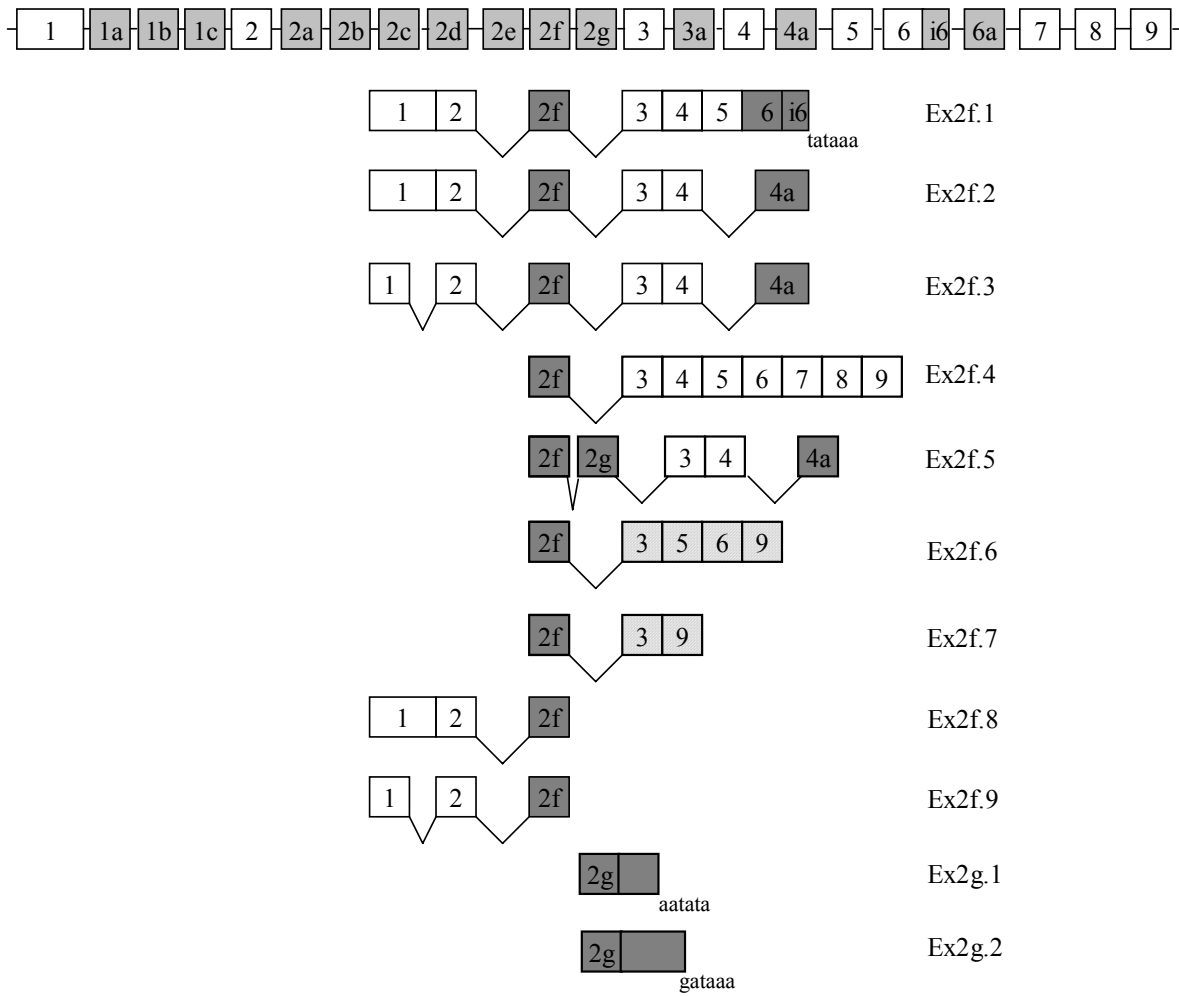
E

Exon 2e (human)



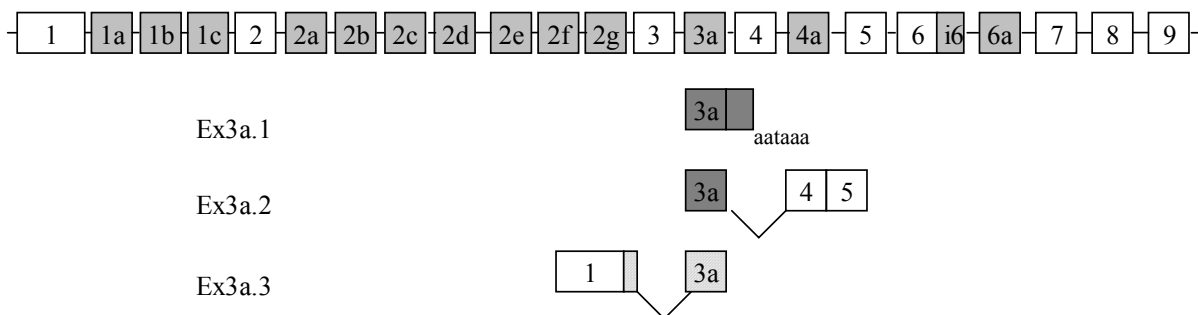
F

Exons 2f and 2g (human)



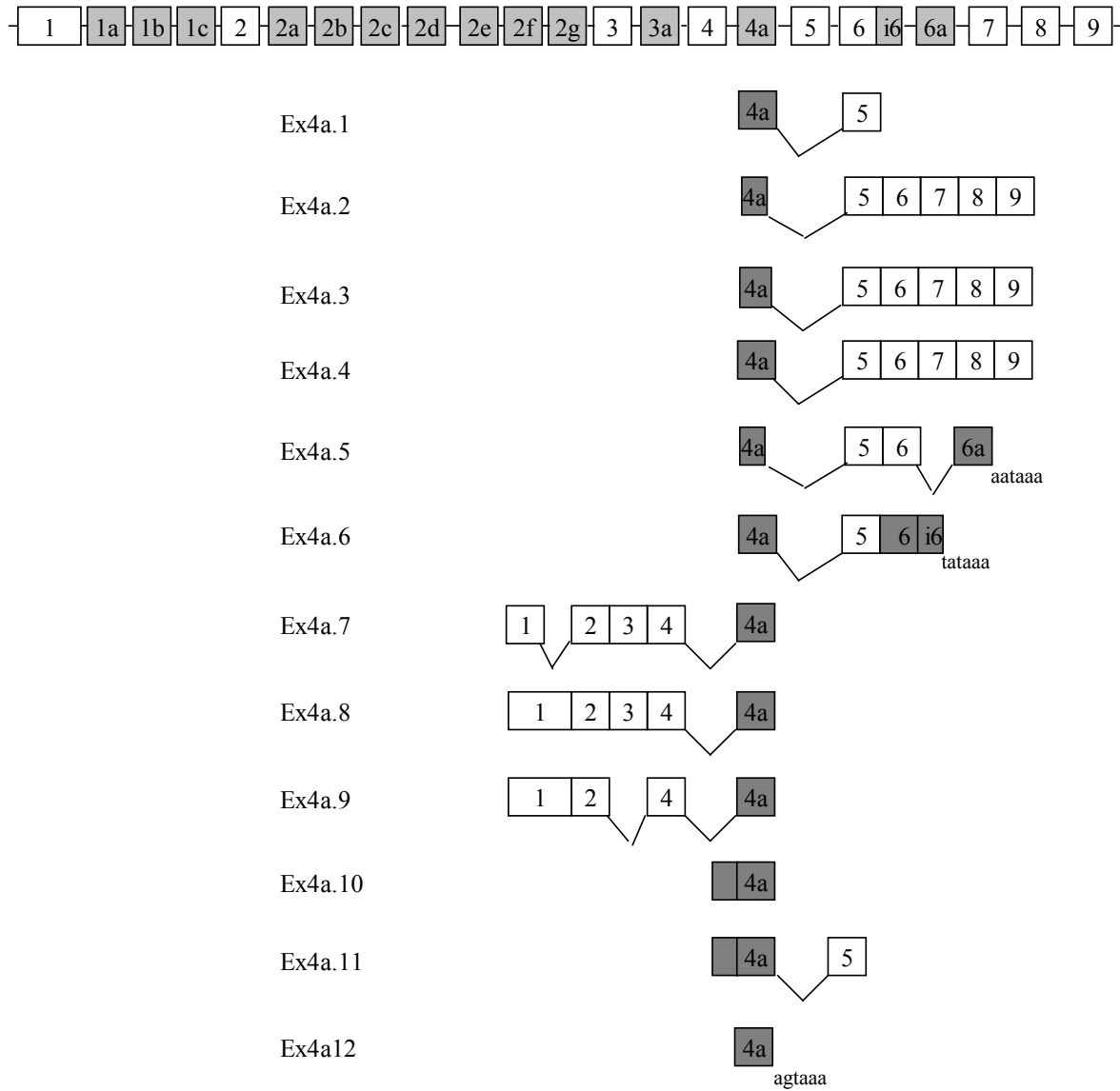
G

Exon 3a (human)

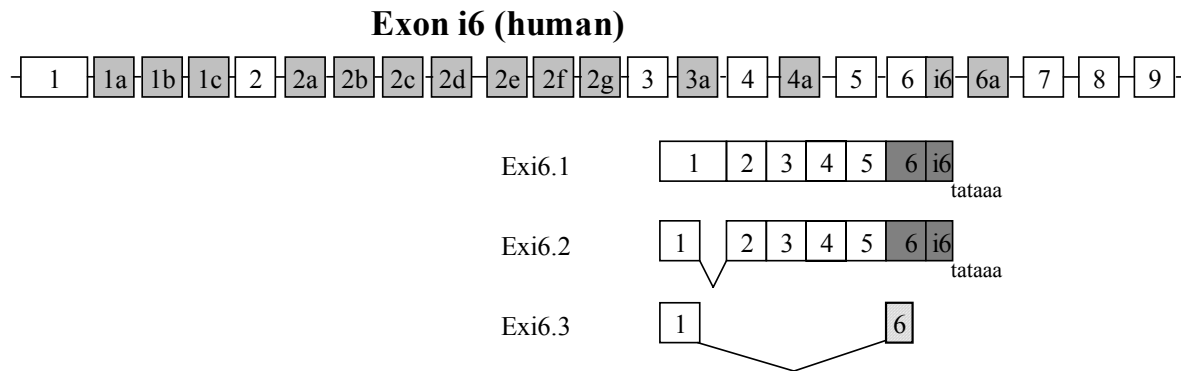


H

Exons 4a and 6a (human)



I

**Abbildung 3.8: alternativ gespleißte Transkripte im *MIDI*-Gen**

Dargestellt sind sämtliche im Rahmen der RT-PCR und Race-Experimente identifizierte Transkripte

A. Exon 1a; B. Exon 1c, Exon 2a, Exon 2b; C. Exon 2c; D. Exon 2d; E. Exon 2e; F. Exon 2f, Exon 2g; G. Exon 3a; H. Exon 4a, Exon 6a; I. Exon i6

3.4.4 Exprimierte Sequenzen in der Maus

In der Maus wurden zwei alternativ gespleißte Exons – mI und mII - durch Nix vorhergesagt (Abb. 3.4 B). Die Expression beider Exons sollte durch RT-PCR mit Primerkombinationen in mI oder mII und den Maus-*mid1*-Exons 1 und 5 überprüft werden. Die cDNA-Synthese erfolgte aus Gesamt RNA gewonnen aus Mausembryonen e19. Aufgrund der schwachen Expression des *mid1*-Gens wurde eine nested PCR angeschlossen. Die Expression beider Exons konnte über diese RT-PCR-Experimente bestätigt werden. Es erfolgte eine Umbenennung zu mExon 2a und mExon 2b (Abb. 3.6).

Weitere Experimente zur Charakterisierung der beiden identifizierten Exons wurden angeschlossen: Die RT-PCR mit Primern in mExon 2a oder mExon 2b und mExon 5 wurde mit verschiedenen Geweben durchgeführt. Auf die Gewebsspezifität wird im Abschnitt 3.3.5 eingegangen, hier sollen nur die identifizierten Transkripte genannt werden. Die Kenntnis der vielfältigen alternativen 3' und 5' Enden der humanen Isoformen, ließ eine ähnliche Situation in der Maus vermuten. Aus diesem Grund wurden auch 3' und 5' Race-Experimente durchgeführt.

Die Expression des zwischen Mensch und Maus homologen Exons 4a (in der Maus als mExon 4b bezeichnet) wurde mit RT-PCR- und Race-Experimenten bestätigt.

Um weitere alternative Spleißvarianten zu identifizieren, wurde ausserdem 3'Race-Experimente ausgehend vom *mid1* Maus-Exon 1 durchgeführt.

Die 3' und 5'Race-Experimente erfolgten nach der SMARTTM Methode, wobei die cDNA aus Gesamt RNA, gewonnen aus e19 Mausembryonen, synthetisiert wurde. Nachfolgend werden die identifizierten Isoformen im Einzelnen besprochen.

mExon 2a:

Die RT-PCR mit Primern in mExon 2a und mExon 1 konnte keine Bande amplifizieren.

Die RT-PCR-Experimente mit Primerkombinationen in den Maus-Exons mExon 2a und mExon 5 identifizierten drei verschiedene Isoformen (Abb. 3.9 A). In mEx2a.1 ist mExon 2a vor die Exons m3-m5 gespleißt. In mEx2a.2 ist mExon 2a vor die Exons 3 und 5 gespleißt, Ex4 ist herausgespleißt. In mEx2a.3 schließlich ist mExon 2a um 479bp verlängert, was zur Einführung eines vorzeitigen Stopkodons in die Sequenz führt.

Die 3'Race detektierte ein alternativ gespleißtes 3'Ende (Isoform mEx2a.4; Abb. 3.9 A). In dieser Isoform schließen 610bp des stromabwärts auf mExon 2a unmittelbar folgenden genomischen Bereichs an mExon 2a an. Das PolyA-Signal (AATAAA) liegt komplementär zum PolyA-Primer in einer A-reichen Sequenz. Möglicherweise hat der PolyA-Primer diese Sequenz anstelle des PolyA-Schwanzes gebunden. Das würde bedeuten, dass mEx2a.4 unvollständig ist, die 3'Race-Experimente müssten deshalb noch fortgesetzt werden.

Die 5'Race erbrachte Isoform mEx2a.5 (Abb. 3.9 A). Legt man die durch Nix vorhergesagten 5'Enden von mExon 2a zugrunde, schließt mExon 2a in dieser Isoform an 470 bzw. 509 bp genomisch unmittelbar stromaufwärts lokalisierter Sequenz an. Eine exaktere Bestimmung des mExon 2a 5'Endes ist aufgrund der fehlenden Verbindung zu mExon 1 nicht möglich. Die Proteinsequenz von mEx2a.5 besitzt nur sehr kurze offene Leserahmen von 61, 66 oder 111 AS ab dem ersten ATG. Darauf folgen in allen drei Leserahmen mehrere Stopkodons. Keines der ATGs folgt den wichtigen Kriterien einer Kozak-Sequenz. Es ist daher fraglich, ob hier wirklich ein alternatives 5'Ende identifiziert wurde. Möglicherweise ist Isoform mEx2a.5 unvollständig. Zur weiteren Klärung müssten die 5'Race-Experimente fortgesetzt werden.

mExon 2b, mExon 2c und mExon 4a:

mExon 2b weist sowohl Verbindungen zu mExon 1 als auch zu mExon 5 auf. Die RT-PCR mit Primern in mExon 2b und mExon 1 führte zur Identifizierung der Isoform mEx2b.9 (Abb.

3.9 B). In ihr liegen die Maus-Exons 1,2 und 2b vor. mExon 2 ist allerdings im 3' Bereich um 211 bp und mExon 2b – nimmt man das durch Nix vorhergesagte 5' Ende an - im 5' Bereich um 607 bp verlängert. Das führt dazu, dass die Spleißübergänge zwischen mExon 2 und mExon 2b nicht konserviert sind. Der verlängerte 3' Bereich von mExon 2 führt in der Isoform mEx2b.9 Stopkodons in die Sequenz ein.

Die RT-PCR-Experimente mit Primern in den Exons mExon 2b und mExon 5 ergaben acht verschiedene Isoformen (Abb. 3.9 B). In mEx2b.2 folgen die MID1-Exons 3-5 3' auf mExon 2b. mEx2b.8 unterscheidet sich von diesem Transkript durch Herausspleißen von mExon 4. In mEx2b.4 folgt auf mExon 2b ein bisher unbekanntes Exon – mExon 2c – und in mEx2b.1 folgt auf mExon 4 ein weiteres bisher unbekanntes Exon – mExon 4a. Sowohl mExon 2c als auch mExon 4a führen vorzeitige Stopkodons in die Sequenz ein. Isoform mEx2b.3 ist ebenfalls dieser Gruppe von Transkripten zuzuordnen, da es neben den Exons m2b und m3-m5 den gesamten genomischen zwischen m2b und 3 lokalisierten Bereich enthält. Auch dieser Bereich führt vorzeitige Stopkodons in die Sequenz ein. Isoformen mEx2b.5 – mEx2b.7 weisen alternativ gespleißte 3' Bereiche von mExon 2b auf, was ebenfalls zur Einführung vorzeitiger Stopkodons in die jeweiligen Transkripte führt. Die Spleißübergänge dieser mExon 2b-Varianten sind nicht konserviert. mEx2b.5 enthält ausserdem eine im 5' Bereich verkürzte Variante von Exon 4 und mEx2b.7 eine im 5' Bereich verlängerte Variante von mExon 3. Die Spleißübergänge dieser Varianten sind ebenfalls nicht konserviert.

Mit mExon 2b durchgeführte 3' Race-Experimente identifizierten ein alternatives 3' Ende (Isoform mEx2b.10; Abb. 3.9 B). In mEx2b.10 schließen 730bp der unmittelbar auf mExon 2b folgenden genomischen Sequenz an mExon 2b an. Im Bereich 10 – 30 bp 5' vor dem PolyA-Schwanz gibt es kein PolyA-Signal. Allerdings endet das Transkript mit einer A-reichen Sequenz. Möglicherweise hat der in der 3' Race verwendete PolyA-Primer an diese A-reiche Sequenz gebunden. Dann könnte es sich um ein unvollständiges Produkt handeln und ein weiteres PolyA-Signal stromabwärts in der Sequenz existieren.

Die von mExon 2b ausgeführte 5' Race ergab keine spezifischen Produkte.

mExon i2:

Die von mExon 1 aus durchgeführte 3' Race ergab ein alternatives 3' Ende (Isoform mExi2.1; Abb. 3.9 C). In mExi2.1 schließen 1,22 kb der unmittelbar stromabwärts gelegenen genomischen Sequenz an mExon 2 an. Unmittelbar vor dem PolyA-Schwanz ist ein PolyA-Signal lokalisiert, was für die Vollständigkeit dieses Transkripts spricht. Zur weiteren

Charakterisierung wurde RT-PCR-Experimente mit Primern in mExon i2 und mExon 1 durchgeführt. Dabei wurden neben dem Produkt der 3'Race folgende Isoformen identifiziert (Abb. 3.9 C): In Isoform mExi2.2 ist mExon 1 um 114bp verkürzt. Interessanterweise wurde diese Exon 1-Variante auch schon im Menschen mehrfach detektiert (z.B. Ex1a.8, Ex1a.11, Ex1a.12, Ex2d.7, Ex2e.9, Ex4a.5 und Exi6.2). Sowohl im Menschen als auch in der Maus erscheinen als letzte drei Aminosäuren vor der Deletion D,E und K, was deutlich zeigt, dass es sich um eine konservierte Variante handelt.

In mExi2.3 ist mExon 1 zwar in voller Länge vorhanden, mExon 2 ist jedoch 3' um ca. 55bp stark verkürzt. mExon i2 ist 5' um ca. 180 bp verkürzt. Da die Spleißübergänge nicht konserviert sind, können keine exakteren Angaben über die Anzahl der bp gemacht werden.

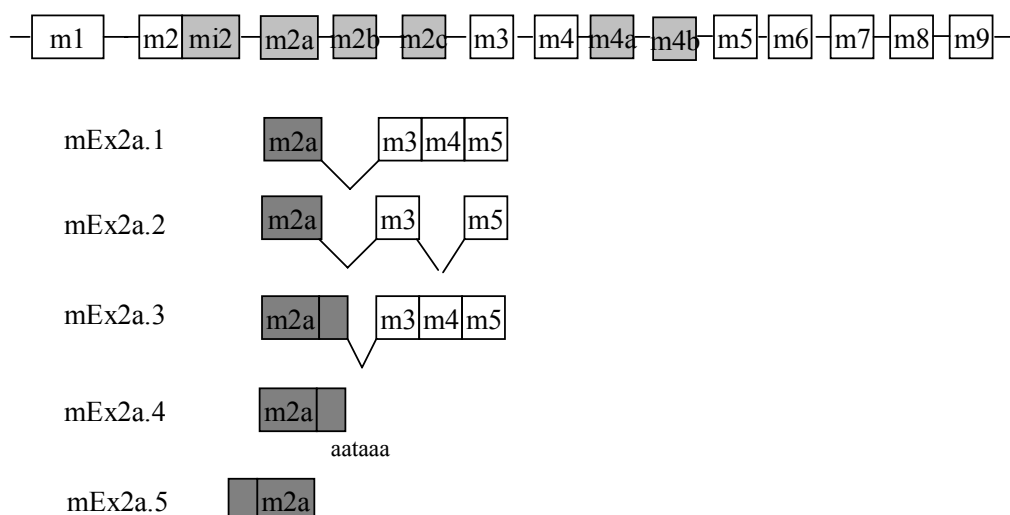
mExon 4b:

Weder die mit Primern aus mExon 4b durchgeführten RT-PCR-Experimente noch die 3'Race ergaben spezifische Produkte. Die aus mExon 4b durchgeführte 5'Race identifizierte ein 207 bp langes Produkt, das als Isoform mEx4b.1. bezeichnet wurde (Abb. 3.9 D). In mEx4b.1 schließen sich ca. 140 bp der stromaufwärts von mExon 4b lokalisierten genomischen Sequenz 5' an dieses Exon an. Ob mExon 4b wie Exon 4a im Menschen Anschluß an *mid1*-Exons besitzt, kann zurzeit nicht entschieden werden.

Zur Klärung müssten weitere RT-PCR- und 3'Race-Experimente mit anderen Primern durchgeführt werden.

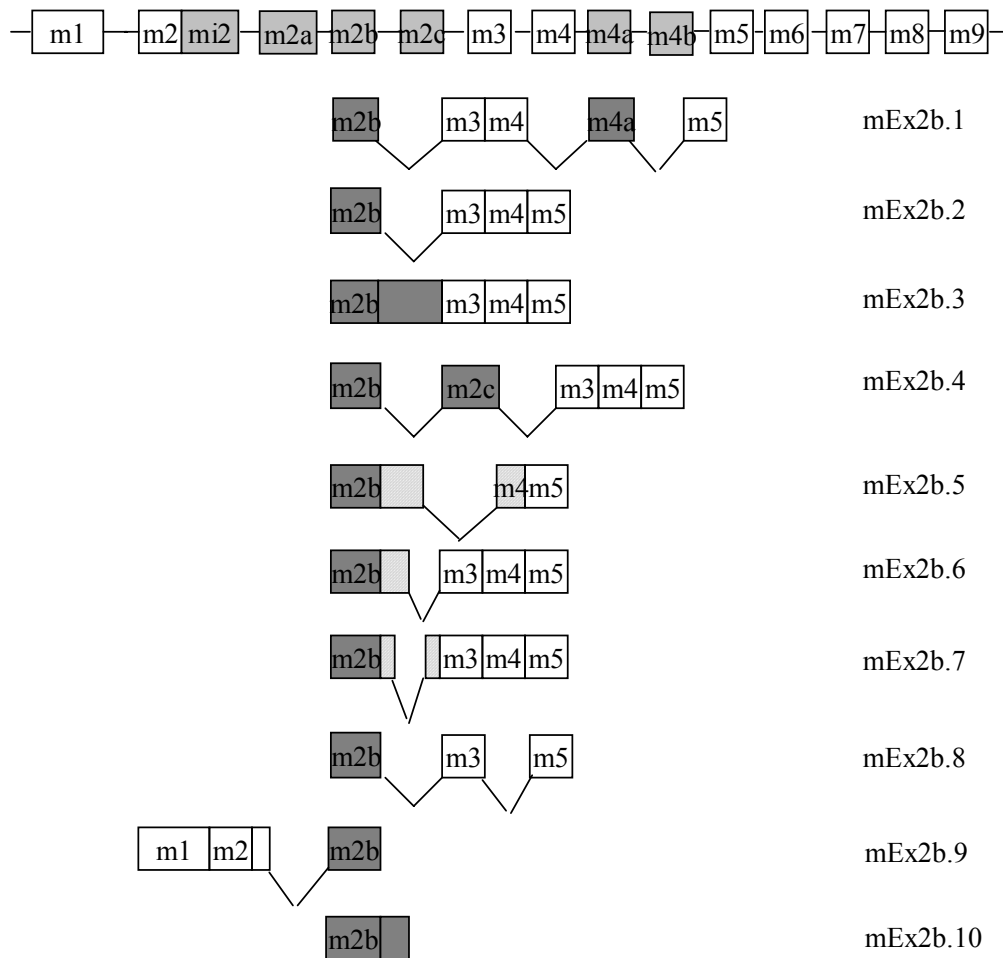
A.

Exon m2a (Maus)



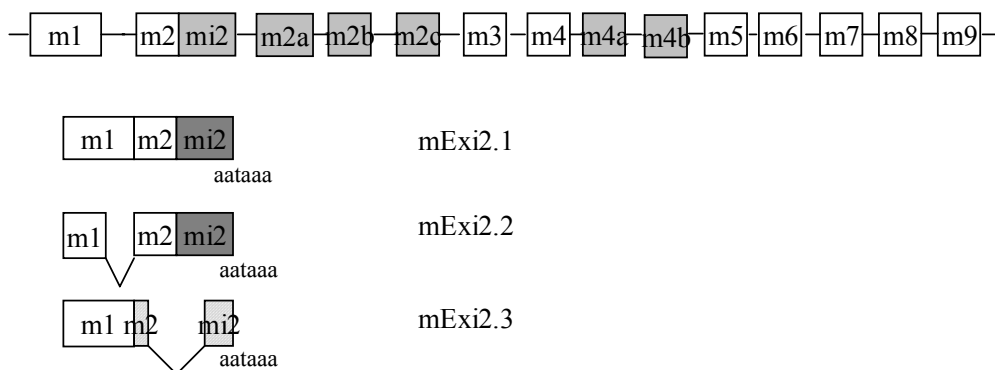
B.

Exons m2b, m2c and m4a (Maus)

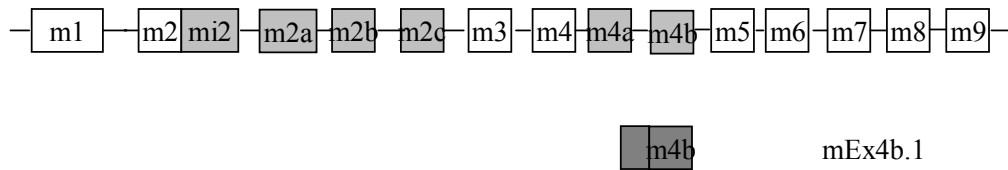


C.

Exon mi2 (Maus)



D.

Exon m4b (Maus)**Abbildung 3.9: alternativ gespleißte Transkripte im *mid1*-Gen der Maus**

Es sind sämtliche durch RT-PCR- und Race-Experimente identifizierte Isoformen dargestellt

A. mExon 2a; B. mExon 2b, mExon 2c, mExon 4a; C. mExon i2; D. mExon 4b

3.4.5 Gewebsspezifische Expression der alternativen Exons in Mensch und Maus

Durch RT-PCR (human und Maus) und Northernblot-Analyse (human) sollte das Expressionsmuster der alternativ gespleißten Exons in Mensch und Maus untersucht werden. Zunächst soll die gewebsspezifische Expression der einzelnen Exons im Menschen beschrieben werden, danach die in der Maus. Für gewebsspezifische RT-PCR-Experimente im Menschen standen uns adulter Testis, adultes Herz und adulte Fibroblasten sowie fetales Gehirn, fetale Leber und fetale Fibroblasten zur Verfügung. Die Primer kombinierten die Exons 1a, 2c, 2d, 2f, 3a und 4a mit dem *MIDI*-Exon 1. Primer in Exon 1a wurden ausserdem mit Primern in Exon 5 kombiniert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Generell kann festgestellt werden, dass die Expression der alternativ gespleißten Transkripte gewebsspezifisch erfolgt. In Exon 1a wurden zehn verschiedene Transkripte identifiziert. Auffallend ist, dass diese zehn Transkripte nur in den Geweben Testis, fetales Gehirn und fetale Leber exprimiert werden. Ex1a.1 und Ex1a.8 werden in allen drei Geweben exprimiert, Ex1a.2, Ex1a.3, Ex1a.13 und Ex1a.14 sind Testis spezifisch, Ex1a.11 und Ex1a.12 werden in Testis und fetalem Gehirn exprimiert, Ex1a.9 ist spezifisch für fetales Gehirn und Ex1a.8 wird in fetalem Gehirn und fetaler Leber exprimiert. Es wurde keine Expression in einem der anderen hier getesteten Gewebe beobachtet.

Wie schon weiter oben beschrieben konnten wir keine Verbindung von Exon 2c zu Exon 1 feststellen. Dies gilt für alle getesteten Gewebe, sodass zur Gewebsspezifität von Exon 2c

keine Aussagen getroffen werden können. Weitere RT-PCR-Experimente mit Primern in Exon 2c und Exon 5 könnten hier Klarheit schaffen.

Exon 2d wird neben adultem Testis nur noch in fetalen und adulten Fibroblasten exprimiert. Es gibt sowohl Transkripte, die nur in adulten Fibroblasten (Ex2d.10), nur in fetalen Fibroblasten (Ex2d.8) oder nur in adultem Testis (Ex2d.9) erscheinen als auch ein Transkript (Ex2d.11), das in adultem Testis und fetalen Fibroblasten exprimiert wird.

Die mit Primern in Exon 2f und Exon 1 durchgeführte RT-PCR erfasste ein ubiquitär exprimiertes Transkript (Ex2f.8). Daneben gibt es ein Testis spezifisches (Ex2f.1) Transkript, zwei Transkripte mit ausschliesslicher Expression in fetalen Fibroblasten (Ex2f.3 und Ex2f.9) und ein Transkript, das sowohl in fetalen Fibroblasten als auch in fetaler Leber (Ex2f.2) gefunden wurde. Das ubiquitär exprimierte Transkript Ex2f.8 entstand durch die RT-PCR von Exon 2f zu Exon 1 und enthält die Exons 1, 2 und 2f. 3' zu Exon 2f wird dieses Transkript wahrscheinlich alternativ gespleißt fortgesetzt, wie die Beispiele Ex2f.1, Ex2f.2 und Ex2f.4 zeigen.

Die mit Primern in Exon 3a und Exon 1 durchgeführte RT-PCR ergab lediglich die Isoform Ex3a.3, die ausschließlich in Testis gefunden wurde.

Die RT-PCR von Exon 4a zu Exon 1 identifizierte vier Transkripte, von denen zwei (Ex2f.2 und Ex2f.3) schon bei Exon 2f beschrieben wurden. Die anderen beiden – Ex4a.5 und Ex4a.6 – werden in adultem Testis, fetalen und adulten Fibroblasten, Ex4a.6 ausserdem in fetalem Gehirn exprimiert.

Die RT-PCR mit Primern in Exon i6 und Exon 1 erbrachte drei verschiedene Transkripte. Exi6.1 wird in allen getesteten Geweben außer in fetalen Fibroblasten exprimiert, Exi6.2 in adultem Testis und adulten Fibroblasten, Exi6.3 in adultem Testis, adulten Fibroblasten, fetaler Leber und fetalen Fibroblasten.

Um die Größe der alternativ gespleißten Produkte und die Stärke ihrer Expression in den einzelnen Geweben zu bestimmen, wurden Northernblots mit verschiedenen fetalen und adulten Geweben mit einem Pool aus Oligonukleotidproben der Exons 1a, 2c, 2d, 2f und 3a hybridisiert (Abb. 3.10 A). Zur Zuordnung der Banden zu den einzelnen Exons wurden anschließend Northernblots mit Oligonukleotidproben der einzelnen Exons hybridisiert (Abb. 3.10 C). Die PolyA⁺-RNA zur Herstellung dieser Northernblots war aus der embryonalen Fibroblastenzelllinie 18/98 gewonnen worden. Eine Oligonukleotidprobe des Exons 4a war in dem Pool nicht enthalten. Exon 4a wurde stattdessen als einzelsträngige RNA-Probe auf adulte und fetale multiple Gewebe-Northernblots hybridisiert (Abb. 3.10 D).

Die Hybridisierung des Oligopools auf adulte und fetale multiple Gewebe-Northernblots ergab folgendes Bild: Die stärkste Bande war bei 2kb zu beobachten. Sie erschien in allen fetalen und adulten Geweben, jedoch mit dramatischen Intensitätsunterschieden. So war auf dem adulten Blot die stärkste Expression in Herz und Leber, gefolgt von Skelettmuskel und Niere, Gehirn, Plazenta, Colon, Dünndarm, Lunge und peripheren Blutleukozyten zu detektieren. Deutlich schwächere Expression des 2kb-Transkripts wurde in der Milz und im Thymus festgestellt (Abb. 3.10 A). Der fetale Blot zeigte ein ähnliches Bild. Die Expression war hier am stärksten in der Leber und in der Niere, gefolgt von Gehirn und Lunge. Neben der 2kb Bande war in allen fetalen und adulten Geweben eine weitere starke Bande zu beobachten, deren Größe bei ca. 1kb lag. Die stärkste Expression dieser Transkripte wurde in adulter Plazenta, Leber, Skelettmuskel, Herz und Niere beobachtet. Deutlich schwächer war diese Bande in adulter Lunge, peripheren Blutleukozyten, Dünndarm, Colon, Gehirn, Milz und Thymus. Ähnlich ist die Situation wiederum auf dem fetalen Blot. Das Expressionsmuster gleicht hier dem der 2kb Bande (Abb. 3.10 A).

Neben diesen beiden prominenten Banden sind weitere schwächere Transkripte auf den Blots zu sehen, die teils ubiquitär, teils aber auch gewebespezifisch exprimiert werden. Eine auf dem adulten Blot ubiquitär exprimierte Bande erscheint bei ca. 5kb. Auf dem fetalen Blot ist sie nur in der Lunge detektierbar. In den Spuren der übrigen fetalen Gewebe kann diese Bande nicht mit Sicherheit vom Hintergrund getrennt werden (Abb. 3.10 A).

Weitere schwache Banden erscheinen bei ca. 4kb in den adulten Geweben Skelettmuskel und Leber und bei ca. 3kb in den adulten Geweben Niere und Plazenta. Die Ergebnisse der Gewebeblots bestätigen die gewebsspezifische Expression der alternativ gespleißten Exons. Die Hybridisierung der Aktin-Probe zeigte die gleichmäßige Beladung der multiplen Gewebe-Northernblots mit RNA (Abb. 3.10 B). Um detektierte Banden einzelnen Exons zuordnen zu können, wurden anschließend Northernblots aus fetaler Fibroblasten-PolyA⁺-RNA angefertigt und diese jeweils einzeln mit den jeweiligen Oligonukleotidproben der im Pool enthaltenen Exons hybridisiert (Abb. 3.10 C). Auf diesen Blots erschienen die schon auf den Gewebeblots beobachteten Banden bei 1 und 2kb. Ausserdem gab es eine fibroblastenspezifische Bande bei ca. 4,4kb. Auffallend war, dass auf bei der Hybridisierung mit Oligonukleotidproben der Exons 2c, 2d, 2f und 3a ein ähnliches Bandenmuster erschien. Um die Spezifität dieses Bandenmusters zu überprüfen, wurde parallel eine Hybridisierung mit einem sense-Oligonukleotid durchgeführt. Der entsprechende Blot zeigte keine Banden, die Spezifität des Bandenmusters war somit belegt. Zwei verschiedene Erklärungen können für die

	<i>testis</i>	<i>heart</i>	<i>fibroblasts</i>	<i>fetal brain</i>	<i>fetal liver</i>	<i>fetal fibroblasts</i>
Ex1a.1	x			x	x	
Ex1a.2	x					
Ex1a.3	x					
Ex1a.8				x	x	
Ex1a.9				x		
Ex1a.10	x					
Ex1a.11	x			x		
Ex1a.12	x			x		
Ex1a.13	x					
Ex1a.14	x					
Ex2d.8						x
Ex2d.9	x					
Ex2d.10			x			
Ex2d.11	x					x
Ex2f.1	x					
Ex2f.2					x	x
Ex2f.3						x
Ex2f.8	x	x	x	x	x	x
Ex2f.9						x
Ex3a.3	x					
Ex4a.5	x		x			x
Ex4a.6	x		x	x		x
Exi6.1	x	x	x	x	x	
Exi6.2	x		x			
Exi6.3	x		x		x	x

Tabelle 3.1: Ergebnisse der RT-PCR-Experimente zur Gewebsspezifität alternativ gespleißter MID1-Isoformen im Menschen

Ein x zeigt die Expression der jeweiligen Isoform im entsprechenden Gewebe.

überlappenden Bandenmuster angeführt werden. Erstens könnten Transkripte existieren, in die die Exons 2c, 2d, 2f und 3a gemeinsam hineingespleißt werden. Zweitens könnten Transkripte ähnlicher Größe existieren.

Um die Gewebsspezifität von Exon 4a zu untersuchen, wurde eine einzelsträngige RNA-Probe auf die Gewebe-Northernblots hybridisiert. Wie in Abb. 3.10 D deutlich zu erkennen ist, erschien sowohl auf dem adulten multiplen Gewebe-Northernblot als auch auf dem fetalen eine Bande bei ca. 6,5kb. Da diese Bande in allen Geweben detektiert wurde, ist von einer ubiquitären Expression auszugehen.

Um die Gewebsspezifität der in der Maus alternativ gespleißten Exons mi2, m2a und m2b zu untersuchen, wurde GesamtRNA aus Mausembryonen der Stadien e13, e15 und e19 isoliert. Ausserdem wurde GesamtRNA aus folgenden Organen sechs bis acht Wochen alter weiblicher Mäuse präpariert: Herz, Gehirn, Muskel, Lunge, Milz, Niere, Magen, Leber, Pankreas und Colon. GesamtRNA aus Maus-Testis wurde käuflich erworben (Clontech).

Durch die große Anzahl vorhandener Gewebe war eine umfassende Analyse der Gewebsspezifität in der Maus möglich. Zur Feststellung der Gewebsspezifität wurden RT-PCR-Experimente mit Primern in den Maus Exons i2, 2a und 2b mit Primern in mExon 1 kombiniert durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Auf den ersten Blick ist zu erkennen, dass - wie im Menschen – die alternativ gespleißten Exons des Maus-*mid1*-Gens gewebsspezifisch exprimiert werden. Wie im Menschen ist auch in der Maus die Expression der identifizierten Isoformen auf unterschiedliche Gewebe verteilt, sodass ein äußerst komplexes Muster entsteht. Auffallend ist, dass die Isoformen mExi2.1 und mExi2.2 beide in den Geweben Gehirn, Niere, Magen und Pankreas exprimiert werden. mExi2.1 wurde ausserdem in e19 gefunden. Das Transkript mEx2.3 wird hingegen Muskel-spezifisch exprimiert.

Die Expressionsstudien der Maus Exons 2a und 2b deuten ebenfalls auf die funktionelle Bedeutung der einzelnen Isoformen in spezifischen Geweben hin. mEx2a.1 ist die einzige Isoform, die in allen getesteten Embryonalstadien exprimiert wurde. Ausserdem wurde sie in Testis, Herz, Niere und Leber gefunden. mEx2a.2 wurde in Testis und Niere exprimiert. mEx2a.3 hingegen wird ausschließlich im Gehirn exprimiert.

Expression der Isoform mEx2b.1 wurde ausschließlich in e19 gefunden, Expression der Isoform mEx2b.2 hingegen in e13, Niere und Colon.

Das Expressionsmuster des Transkripts mEx2b.3 ist wiederum ganz anders. Es wurde in Herz, Gehirn und Lunge detektiert, nicht aber in den Embryonalstadien. mEx2b.4 wurde in Milz und Leber gefunden, mEx2b.8 ist Testis-spezifisch. Die drei übrigen Transkripte (mEx2b.5, mEx2b.6 und mEx2b.7) wurden jeweils nur in einem Gewebe gefunden – mEx2b.5 in Muskel, mEx2b.6 in Colon und mEx2b.7 in e15.

	e13	e15	e19	Testis	Herz	Gehirn	Muskel	Lunge	Milz	Niere	Magen	Leber	Pankreas	Colon
mExi2.1			x			x				x	x		x	
mExi2.2						x				x	x		x	
mExi2.3							x							
mEx2a.1	x	x	x	x	x					x		x		
mEx2a.2				x						x				
mEx2a.3						x								
mEx2b.1			x											
mEx2b.2	x									x				x
mEx2b.3					x	x		x						
mEx2b.4									x			x		
mEx2b.5							x							
mEx2b.6														x
mEx2b.7		x												
mEx2b.8				x										

Tabelle 3.2: RT-PCR zur gewebsspezifischen Expression alternativ gespleißter *mid1*-Transkripte in der Maus

Die RT-PCR-Experimente wurden durchgeführt mit Primerkombinationen in mExon i2 und mExon 1 oder mExon 2a sowie mExon 2b und mExon 5.

3.4.6. N-terminal trunkeerte *MID1*-Proteine

5' und 3'Race-Experimente einiger Exons wiesen auf die Existenz trunkierender Transkripte hin.

So enthielt das PCR-Produkt der 5'Race aus Exon 4a (Isoform Ex4a.10) 938bp des Intronbereichs, der im 5'Bereich unmittelbar vor Exon 4a liegt (Abb. 3.8 H). Dieser Intron-Bereich zeichnet sich durch Stop-Kodons in allen drei möglichen Leserastern aus. Ein offener Leserahmen mit einem ATG als möglichen Translationsstart, das im Abstand von zwei Basen auf das letzte Stopkodon folgt, beginnt 285 Nukleotide vor dem Beginn von Exon 5 in Exon 4a (Abb. 3.11 A und B). Er liegt im gleichen Raster wie der Leserahmen der sich 3'anschließenden *MID1*-Exons 5-9. Die Sequenz, die das ATG umgibt, entspricht jedoch nur teilweise der Kozak-Sequenz. Lediglich die Position -3 enthält mit Adenin das an dieser Stelle vorgeschriebene Purin. Trotzdem könnte hier ein alternatives N-terminal trunkeertes *MID1*-Protein abgelesen werden. Abb. 3.11 B zeigt einen Teil der Aminosäuresequenz dieses hypothetischen Proteins.

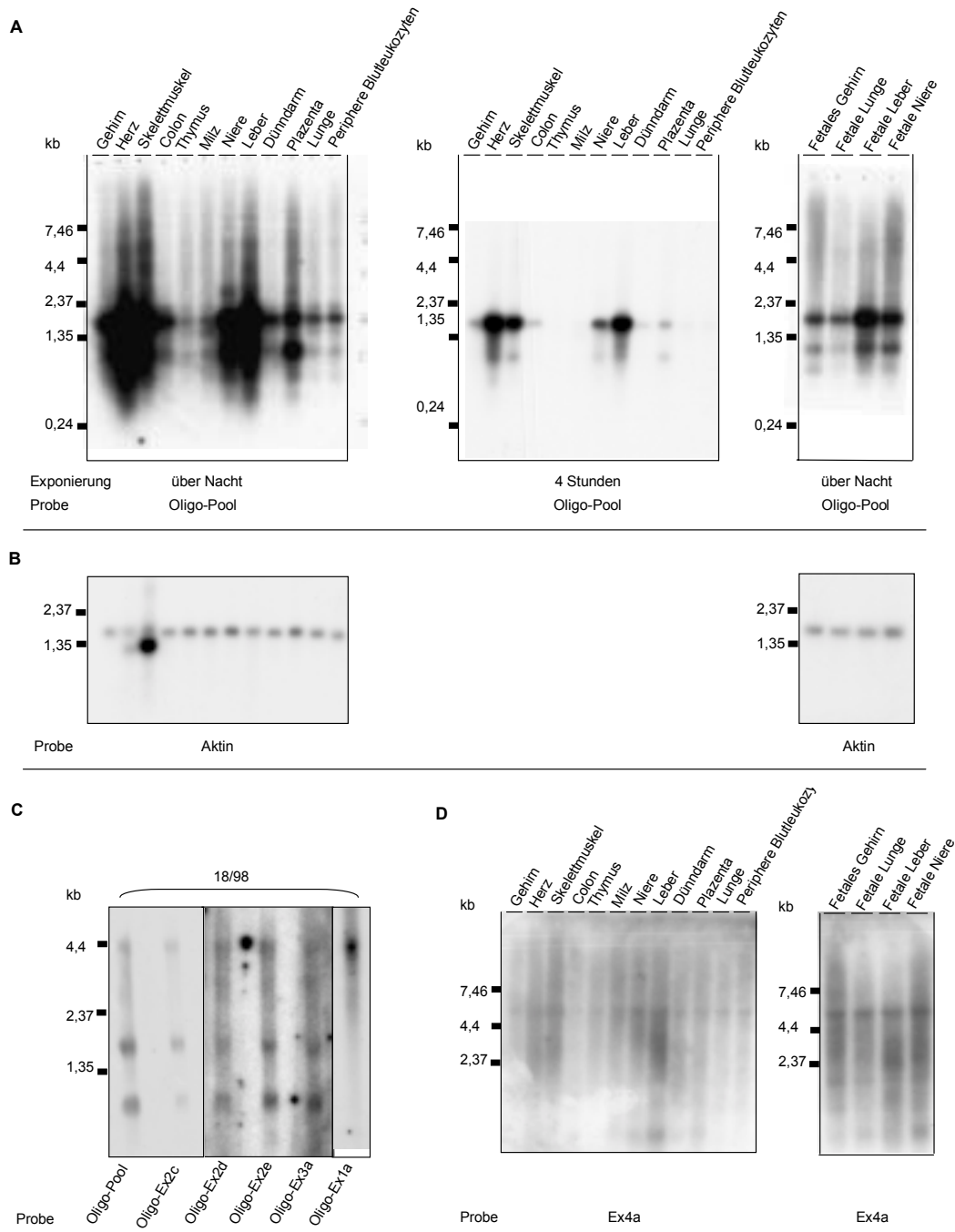


Abbildung 3.10: Northernblot-Analyse zur Gewebsspezifität

- Ein adulter sowie ein fetaler Gewebe-Northernblot wurden mit einem Oligonukleotidpool der Exons 1a, 2c, 2d, 2f und 3a hybridisiert. Der adulte Gewebe-Northernblot wird aufgrund der unterschiedlichen Signalstärke nach zwei verschiedenen Expositionszeiten gezeigt.
- Zum Vergleich der aufgetragenen RNA-Mengen wurden die in A. gezeigten Blots mit einer Aktin-Probe hybridisiert.
- Um die in A. beobachteten Banden den einzelnen Exons zuordnen zu können, wurden Northernblots aus PolyA+RNA einer embryonalen Fibroblastenzelllinie (18/98) angefertigt und mit den Oligonukleotiden der Exons 1a, 2c, 2d, 2f und 3a einzeln hybridisiert.
- Eine das Ex4a spezifisch detektierende einzelsträngige RNA-Probe wurde auf die adulten und fetalen Gewebe-Northernblots hybridisiert.

N-terminal trunkierte Proteine sollten mit Westernblots nachgewiesen werden (Abb. 3.13). Zu diesem Zweck wurde gesamtes Zellysate aus embryonalen Fibroblasten auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen. Das Gel wurde nach dem Gellauf auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Detektion der trunkierten Proteine sollte mit einem gegen den C-Terminus von MID1 gerichteten Antiserum erfolgen. Dieses Antiserum (A1) wurde durch Immunisierung zweier Kaninchen mit einem C-terminalen MID1-Protein (Aminosäuren 311-667) erhalten. A1 detektierte neben den zwei MID1-Banden bekannter Größe (72 kDa) weitere größere und kleinere Banden (Abb. 3.13). Um die Spezifität der Detektion zu überprüfen, wurde eine zweite Spur des SDS-Gels mit embryonalem Fibroblastenlysate geladen und geblottet. Diese Spur wurde zusätzlich zu dem C-terminalen Antiserum mit dem zur Immunisierung verwendeten Protein inkubiert. Spezifische Antigen-Antikörper Bindungen sollten so blockiert werden. Neben der durch A1 detektierten MID1-Bande von 72 kDa wurden so Banden von 50 kDa und 20-40 kDa verdrängt (Abb. 3.13). Die spezifische Verdrängung gerade der kleineren durch A1 detektierten Banden weist eindeutig auf die Existenz trunkierter MID1-Proteine hin. Eine mögliche Kreuzreaktivität des C-terminalen Antiserums mit homologen Proteinen kann nicht völlig ausgeschlossen werden. Um die Spezifität der Banden letztendlich zu beweisen, müssten die Proteine daher aufgereinigt und entweder einer massenspektroskopischen Analyse unterzogen oder ansequenziert werden.

3.4.7 C-terminal trunkierte MID1-Proteine

Die 3'Race-Experimente aus den alternativen Exons 2d und 2f und anschließende RT-PCR-Experimente identifizierten alternative 3'Enden im humanen *MID1*-Gen (Isoformen Ex2d.7, Ex2f.1, Exi6.1 und Exi6.2) und im Maus-*mid1*-Gen (mExi2.1-mExi2.3; Abb. 3.12).

Die humane Variante Ex2d.7 enthält 1073bp des genomischen Intronbereichs (In2b), der sich Exon 2d im 3'Bereich unmittelbar anschließt. 5bp 5' vor dem PolyA-Schwanz befindet sich das alternative PolyA-Signal ATTAAA.

Isoform Ex2f.1 enthält die Exons 1, 2, 2f, 3, 4, 5 und 6. An Exon 6 schließen 415bp der genomisch 3' unmittelbar folgenden Intronsequenz (i6) an. Das alternative PolyA-Signal TATAAA befindet sich ca. 21bp 5' vor dem PolyA-Schwanz.

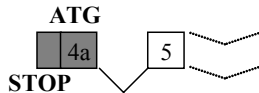
Isoform Exi6.1 unterscheidet sich von Ex2f.1 lediglich durch Herausspleißen des Exons 2f.

Exi6.2 enthält die um 114 bp verkürzte Variante von Exon 1 (Abb. 3.12).

In den drei Maus-Isoformen mExi2.1-mExi2.3 schliessen 1,22 kb der unmittelbar stromabwärts gelegenen genomischen Sequenz an mExon 2 an. Unmittelbar vor dem PolyA-Schwanz befindet sich ein Polyadenylierungssignal der Sequenz AATAAA (Abb. 3.12).

A

N-terminal trunkierende Isoform Ex4a.11



B

```

...NSPPCCQCLA LWP CINEHQF S*LENK*LDL VLNCFKVVSL LKNSQHPTQY
SAYNSS*ECC LWNLT KYQTQ QDY*SSII*Y AQKWYASCHN SLVFKRSTCI
FESKCSLLIT EPSK*T*EYI EGD*DTPVPC FLVYT*EL*P ENLNEEK*C
IHWGDL*ESS *IFSTASAGN MVQENEYKEK ENEPDKKLPF *CLF*REASN
*LN*SNIWKH SFLIFTLPFM Exon 4a
QFEILETLL* SGSGLRLKGT NSFPDRCVKK
CLELRASCWG *T*PGQTVKY TAT*NMNILL LSQGIFPDS KKEEGKPFCC
FLQFLHFFLK LAFICFMLLC CDILRCLLKL MCKKALFKRY LFSFSFSFLC
Exon 5
SDVESHLDIS ETLFCLHYRV SMATASSQVL IPEINLNDTF DTFALDFSRE
KKLLEC...

```

Abbildung 3.11: Die N-terminal trunkierende Isoform Ex4a.11

In A. ist Ex4a.11 schematisch dargestellt. B. zeigt einen Ausschnitt der Sequenz von Ex4a.11. Das offene Leseraster wird durch den unterstrichenen Bereich hervorgehoben. Die Pfeilköpfe markieren den Beginn von Exon 4a und von Exon 5.

Wie die N-terminal trunkierten Proteine (Abschnitt 3.4.6) sollten die C-terminal trunkierten Proteine mit Westernblots nachgewiesen werden (Abb. 3.13). Das Antiserum 2 (A2) wurde durch die Immunisierung zweier Kaninchen mit einem N-terminalen MID1-Protein (Aminosäuren 64-113) erhalten. Die Herstellung des Westernblots erfolgte wie in Abschnitt 3.4.6 beschrieben.

A2 detektierte eine starke Bande bei 90 kDa, die beiden MID1-Banden bei 72 kDa und mehrere kleinere Banden (Abb. 3.13). Nach der zusätzlichen Inkubation einer zweiten Spur

des Westernblots mit dem zur Immunisierung verwendeten Protein wurden die 90 kDa Bande, die beiden MID1-Banden bei 72 kDa und kleinere Banden bei 50 und 30-40 kDa verdrängt (Abb. 3.13).

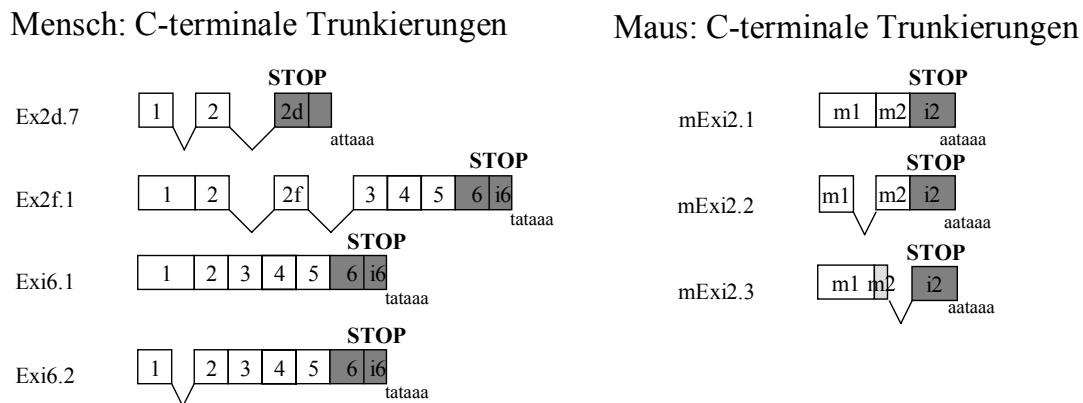


Abbildung 3.12: C-terminal trunkierende Transkripte in den MID1-Genen von Mensch und Maus

Dargestellt sind alle im Rahmen dieser Arbeit identifizierten trunkierenden MID1-Transkripte von Mensch und Maus. Das Erscheinen des ersten Stopkodons in den jeweiligen Transkripten ist durch ein Stop markiert.

Die spezifische Verdrängung der durch A2 detektierten Banden weist auf die Existenz C-terminal trunkierter MID1-Proteine hin. Eine mögliche Kreuzreaktivität des N-terminalen Antiserums mit homologen Proteinen ist dennoch möglich. Um die Spezifität der Banden letztendlich zu beweisen, müssten die Proteine daher aufgereinigt und entweder einer massenspektroskopischen Analyse unterzogen oder ansequenziert werden.

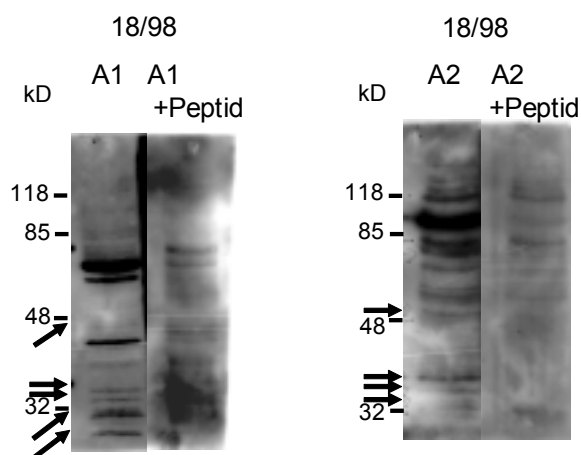


Abbildung 3.13: Detektion trunkierter Proteine mit Antiseren gegen den MID1 C- oder N-Terminus

Die Gele wurden mit Lysat aus embryonalen Fibroblasten (18/98) geladen, auf PVDF-Membranen geblottet und mit Antiseren, die gegen den MID1 C-Terminus (A1) oder gegen den MID1 N-Terminus (A2) gerichtet sind, inkubiert. Die mit Pfeilen markierten Banden ließen sich durch Präinkubation der Antiseren mit den zur Herstellung verwendeten Peptiden spezifisch verdrängen. Die Verdrängung der durch A1 detektierten Banden von 20-40 kD ist nach dem Einscannen des Blots nur schwer zu erkennen. Der Originalblot zeigt die Verdrängung hingegen deutlich.

Es hätte gezeigt werden können, dass das MID1-Protein über seinen C-Terminus an Mikrotubuli bindet. C-terminal trunkierte MID1-Proteine haben die Fähigkeit, an Mikrotubuli zu binden, verloren und bilden stattdessen - möglicherweise aufgrund herabgesetzter Löslichkeit - zytoplasmatische Klumpen. Wir erwarteten daher, dass auch die alternativ gespleißten C-terminal trunkierten MID1-Transkripte Ex2d.7, Ex2f.1 und Exi6.1 nicht an Mikrotubuli binden würden. Diese Hypothese sollte mit Immunfluoreszenz überprüft werden. Ex2d.7, Ex2f.1 und Exi6.1 wurden in die Klonierungsstelle P_{CMV} des pBudCE4 Vektors kloniert und in COS7-Zellen mit einem C-terminalen myc-tag überexprimiert. Als positive Kontrolle diente in den pBud-Vektor kloniertes MID1, mit dem auf gleiche Art und Weise verfahren wurde. Wie Abb. 3.14 zeigt, banden die so untersuchten Proteinisoformen, im Gegensatz zum full length MID1-Protein, nicht an Mikrotubuli. Im Gegensatz zu C-terminal trunkierten Transkripten, die in Folge von *MID1*-Mutationen in OS-Patienten entstehen, erfolgt hier jedoch keine Bildung zytoplasmatischer Klumpen. Stattdessen sind die Isoformen diffus im Zytoplasma verteilt (Abb. 3.14).

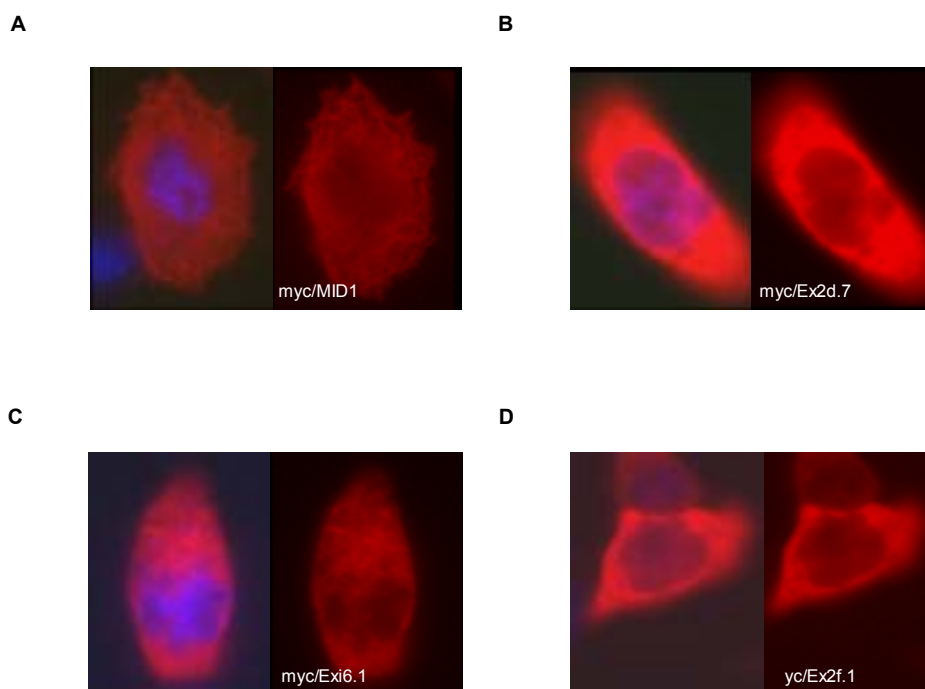


Abbildung 3.14: Lokalisationsstudien ausgewählter Isoformen in COS-7 Zellen

Die myc-markierten Konstrukte wurden in CO7-Zellen überexprimiert. Zu sehen sind zelluläre Lokalisationen von A. MID1, B. Ex2d.7, C. Exi6.1 und D. Ex2f.1

Aus vorhergehenden Untersuchungen (Liu et al. 2001; Trockenbacher et al. 2001) war bekannt, dass das MID1-Protein über die BBox1 an seinen Interaktionspartner alpha4 bindet. Da alle drei C-terminal trunkeerten Isoformen diese Domäne beinhalten, wurde von uns angenommen, dass sie alpha4 binden können.

Um die Bindungsaffinität der trunkeerten Proteine zu alpha4 zu messen, wurde ein auf dem Yeast-Two-Hybrid System basierender Flüssigassay durchgeführt (Abb. 3.15). In diesem Assay wird die β -Galaktosidase-Aktivität cotransformierter Zellen nach der *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (ONPG) Methode bestimmt. Wie dieser Assay zeigte, sind die trunkeerten Proteine Ex2f.1 und Exi6.1 interessanterweise nicht bzw. nur sehr schwach in der Lage, alpha4 zu binden (Abb. 3.15).

Das trunkeerte Protein Ex2d.7 weist hingegen eine sehr hohe Bindungsaffinität zu alpha4 auf, die im Vergleich zu MID1 um 5,2x erhöht ist (Abb. 3.15). Überraschenderweise ist diese sogar noch 2,9x höher als die Bindungsaffinität der BBox1 alleine. BBox1 wurde als die alpha4 bindende Domäne des MID1-Proteins identifiziert und zeigte in früheren Versuchen - durchgeführt mit verschiedenen MID1-Deletionsmutanten - die höchste Affinität. Durch die, mit dem full length MID1-Protein verglichene, deutlich höhere Bindungsaffinität des trunkeerten Proteins Ex2d.7 könnte diese Isoform über eine dominant-negative Wirkungsweise die MID1-Proteinfunktion regulieren (siehe Diskussion; Kapitel 4.4.4).

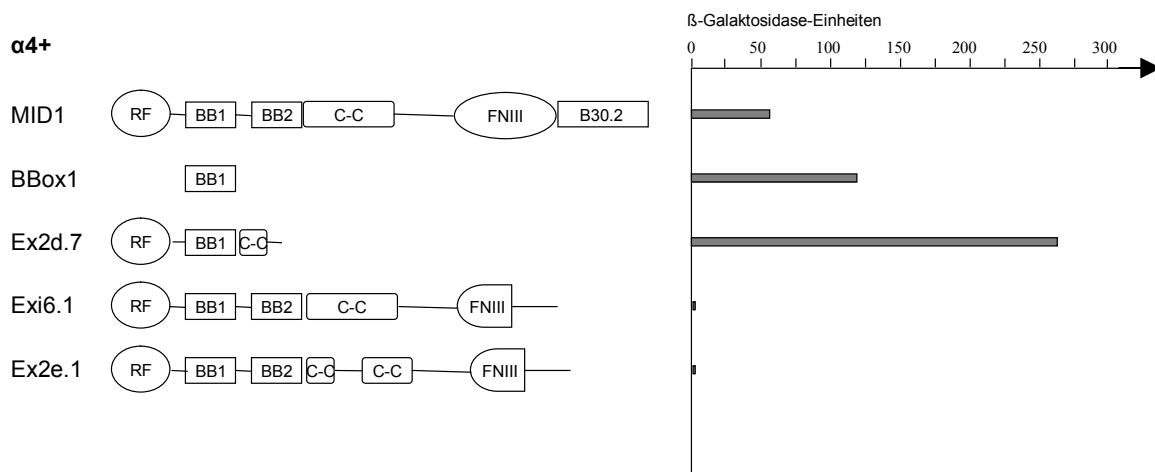


Abbildung 3.15: β -Galaktosidase-Assay

Die Interaktionsstärke zwischen $\alpha 4$ und den verschiedenen MID1-Proteinen wird durch die Aktivität eines β -Gal Reportergens bestimmt und in Form von β -Galaktosidase-Einheiten dargestellt.

3.4.8 Identifizierung von neuen Protein-Domänen in den alternativ gespleißten *MID1*-Isoformen

In den Kapiteln 3.4.6 und 3.4.7 wurde die Existenz trunkierender *MID1*-Transkripte im Menschen und in der Maus gezeigt, in die einige der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten neuen Exons gespleißt werden. Diese Exons erweitern die offenen Leserahmen der trunkierenden *MID1*-Transkripte, sodass anzunehmen ist, dass bei der Translation trunkierte *MID1*-Isoformen entstehen, die neue Proteinsequenzen enthalten. Es ist ausserdem anzunehmen, dass die neuen Proteinsequenzen spezifische Funktionen erfüllen. Um diese Funktionen zu untersuchen, sollten diese Proteinsequenzen mit dem Softwareprogramm GeneQuiz analysiert werden. Das Softwareprogramm GeneQuiz untersucht Proteinsequenzen nach Hinweisen auf ihre Sekundärstruktur, Funktion und Proteinfamilie.

Nur für die Proteinsequenz von mExon 2a erbrachte diese Analyse Hinweise auf seine mögliche Funktion (Abb. 3.16). Den Proteinsequenzen der übrigen Exons konnte keine Funktion zugeordnet werden.

mExon 2a ist in verschiedene *mid1*-Isoformen integriert. In den Isoformen mEx2a.1 – mEx2a.3 weist mExon 2a Verbindung zu mExon 5 des *mid1*-Gens auf (Abb. 3.9 A). Die 3'Race-Experimente identifizierten zusätzlich ein alternatives 3'Ende, das stromabwärts direkt an mExon 2a anschließt (mEx2a.4; Abb.3.16 A). 5'Race-Experimente identifizierten ausserdem einen möglichen eigenen 5'UTR von mExon 2a, der stromaufwärts direkt an mExon 2a anschließt (mEx2a.5; Abb. 3.16 A). Dieser 5'UTR ist der einzige, der für mExon 2a identifiziert werden konnte. In den mit mExon 2a durchgeführten RT-PCR-Experimenten war keine Verbindung zum Exon 1 von *mid1* gefunden worden. Verbindet man die Isoformen mEx2a.4 und mEx2a.5 miteinander, so entsteht ein hypothetisches Transkript, das keine Verbindung zu *mid1* aufweist (mEx2a.6; Abb. 3.16 A). Die Aminosäuresequenzen dieses Transkriptes wurden in allen drei möglichen Leserastern analysiert. Ein Leseraster enthält einen offenen Leserahmen. Dieser offene Leserahmen könnte an dem ersten Methionin an der Position 21 beginnen und sich über 111 Aminosäuren hinweg bis zum ersten Stopkodon fortsetzen (Abb. 3.16 A). Das Methionin an der Position 21 ist allerdings nicht in eine Kozak-Sequenz eingebettet. Weder die -3 noch die +4 Position stimmen mit den Kriterien der Kozak-Sequenz überein.

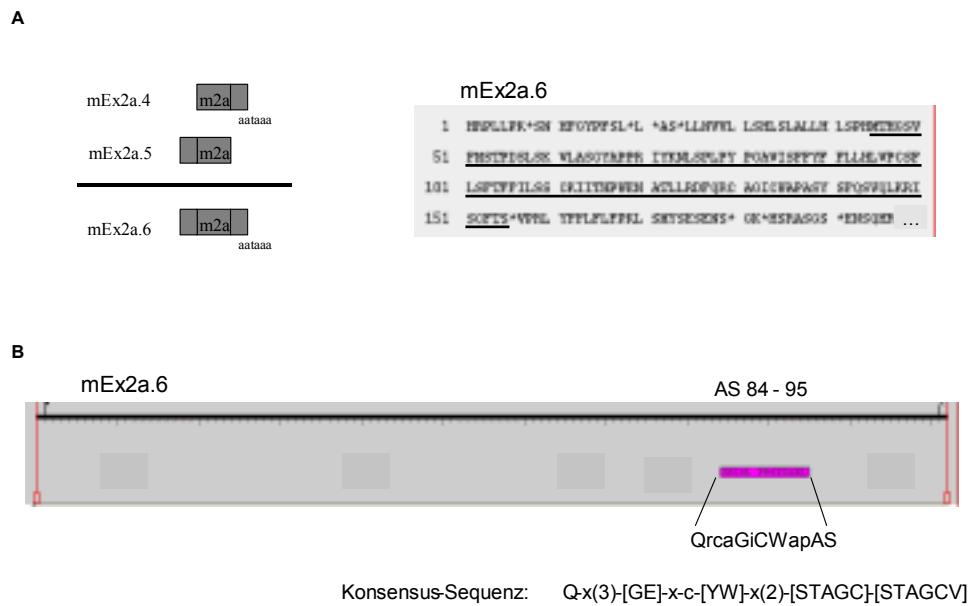


Abbildung 3.16: Identifizierung einer Thiol-Protease Domäne in einem möglichen offenen Leserahmen von mExon 2a

In Abb.A sind die Isoformen mEx2a.4, mEx2a.5 und die aus diesen Isoformen zusammengesetzte hypothetische Isoform mEx2a.6 sowie der mögliche offene Leserahmen von mEx2a.6 schematisch dargestellt (A.). In Abb.B wird die Identifizierung der Thiol-Protease Domäne durch das im GeneQuiz Server enthaltene Softwareprogramm Prosite gezeigt.

Interessanterweise identifizierte das in GeneQuiz enthaltene Softwareprogramm Prosite eine konservierte Domäne, die die Aminosäuren 84 – 95 des offenen Leserahmens umfasst (Abb. 3.16 B). Es handelt sich bei dieser Domäne um eine in Eukaryonten vorkommende Cystein „active site“ einer Thiol-Protease. Die Aminosäuren 84 – 95 des offenen Leserahmens von mEx2a.6 stimmen mit der Konsensus-Sequenz perfekt überein (Abb. 3.16 B).

3.4.9 NMD als *Regulationsmechanismus*

Stopkodons, die mehr als 50 bp stromaufwärts des letzten Intron-Exon-Übergangs liegen, sind nach den Regeln des NMD (durch vorzeitige Stopkodons vermittelter mRNA-Abbau) vorzeitige Stopkodons und führen zur Destabilisierung des jeweiligen Transkripts. Die diesen

Kriterien entsprechenden, in Mensch und Maus identifizierten, Stopkodons sowie die dazugehörigen Transkripte sind in Abb. 3.17 A abgebildet.

Die Existenz vorzeitiger Stopkodons in diesen *MIDI*-Spleißvarianten wies darauf hin, dass diese Transkripte über NMD reguliert werden könnten. Mit Northernblot-Analyse sollte gezeigt werden, ob diese Annahme stimmt.

NMD ist bekannterweise ein translationsabhängiger Mechanismus. Wird die Translation inhibiert, reichern sich Zieltranskripte des NMDs in der Zelle an.

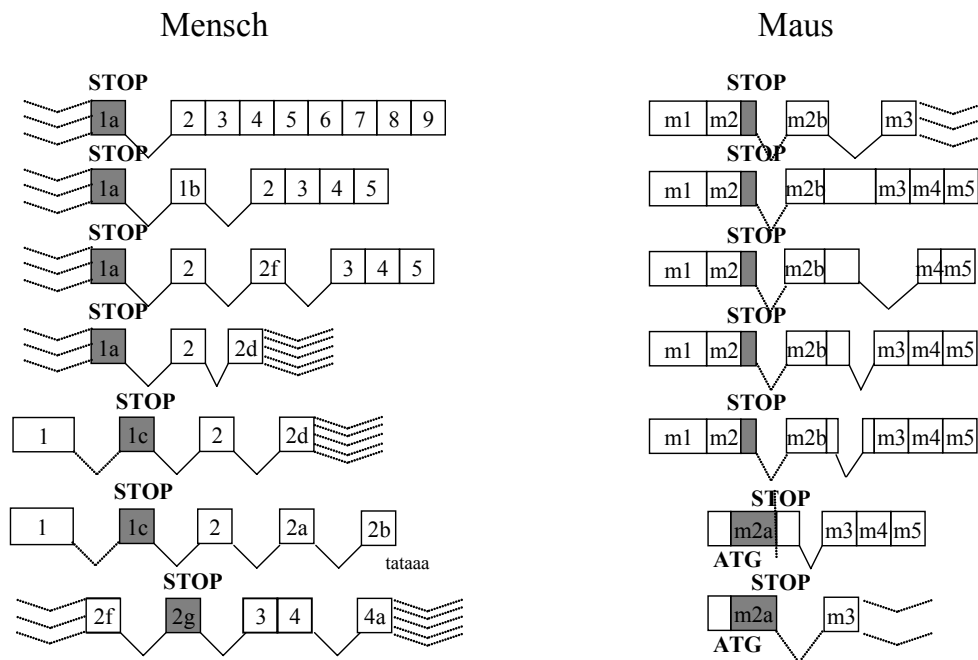
Zur Untersuchung des NMDs in den *MIDI*-Isoformen wurden humane kindliche Fibroblasten für vier Stunden mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid inkubiert. Ein zweiter Ansatz wurde ohne Cycloheximid inkubiert. Anschließend wurde aus den mit und ohne Cycloheximid inkubierten Fibroblasten PolyA⁺-RNA isoliert und Northernblots hergestellt. Das humane Exon 1c führt vorzeitige Stopkodons in einige der identifizierten Isoformen ein (Abb. 3.17 B). Es wurde eine RNA-Probe dieses Exons generiert und auf die Fibroblasten PolyA⁺-Northernblots hybridisiert (Abb. 3.17 C).

Die Hybridisierung der Fibroblasten-Northernblots mit der RNA-Probe von Exon 1c zeigt eine starke Bande bei ca. 2kb und zwei schwächere bei ca. 4,5 und 6,5 kb. Die Intensität dieser Banden unterschied sich nicht oder nur sehr gering zwischen den Zellen, die mit Cycloheximid oder ohne Cycloheximid behandelt worden waren (Abb. 3.17 C). Dieses Ergebnis zeigt, dass die zugrunde liegenden Transkripte nicht durch NMD abgebaut werden.

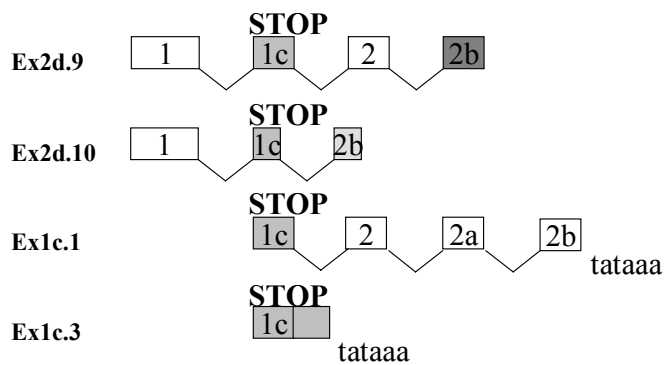
Ausser diesen Transkripten erschien noch eine weitere Bande bei ca. 3,5 kb (Abb. 3.17 C). Diese war allerdings nur in der Spur detektierbar, die PolyA⁺-RNA aus Zellen, die mit Cycloheximid behandelt worden waren, enthielt. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass das zugrunde liegende Transkript vorzeitige Stopkodons enthält und über NMD abgebaut wird. Die Beladung der Northernblots mit gleichen RNA-Mengen wurde durch die Hybridisierung einer Aktin-Probe bestätigt (Abb. 3.17 C).

Die Northernblot-Analyse zeigt, dass durch alternatives Spleißen von Exon 1c sowohl *MIDI*-Isoformen entstehen, die nicht über NMD abgebaut werden als auch solche, die durch NMD reguliert werden. Dieses Ergebnis wird dadurch bestätigt, dass sowohl Isoformen von Exon 1c identifiziert worden waren, die für C-terminal trunkierende Transkripte kodieren, als auch Isoformen, die vorzeitige Stopkodons in die Sequenz einführen (Abb. 3.17 B).

A



B



C

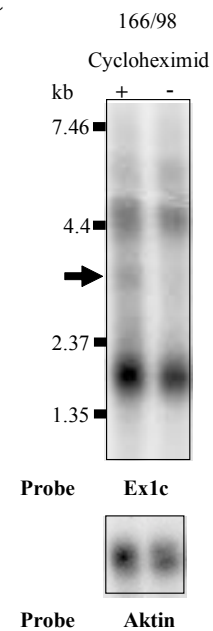


Abbildung 3.17: Analyse der Regulation von *MIDI*-Isoformen über NMD

A. zeigt die im Menschen und in der Maus identifizierten *MIDI*-Isoformen, die vorzeitige Stopkodons in die jeweiligen Sequenzen einführen. Die Region, in der das erste Stopkodon auftritt, ist mit einem STOP markiert. In B. sind die identifizierten Exon 1c-Isoformen schematisch dargestellt. C. zeigt die Northernblot-Analyse der mit und ohne Cycloheximid inkubierten Zellen. Der Pfeil markiert die Bande des über NMD regulierten Exon 1c-Transkriptes.

3.4.10 Region 1d

Im Rahmen der PipMaker-Analyse der humanen und Maus-*mid1*-Sequenz wurde ein zwischen beiden Spezies konservierter Bereich im Intron 1 gefunden. Dieser Bereich wurde als Reg1d bezeichnet. Er erstreckt sich über 1.126 bp und ist zwischen beiden Spezies zu 84,5% homolog (Abb. 3.5 A).

Der Reg1d wird ein eigenes Kapitel gewidmet, da aufgrund der durchgeführten Experimente anzunehmen ist, dass sie ein sogenanntes „Gen im Gen“ ist. In RT-PCR-Experimenten mit RNA auf humanem adultem Testis und e11, e13, e15 und e19 Mausembryonen konnte mit internen Primern in der konservierten Reg1d ein spezifisches Produkt erzielt werden. Da der negative RT-Ansatz keine Bande zeigte, konnte eine genomische Kontamination ausgeschlossen werden. RT-PCR-Experimente mit humanem Testis mit Primerkombinationen in Reg1d und den *MIDI*-Exons 1-9 sowie den neuen Exons 1a-4a erbrachten hingegen keine Produkte. Diese Ergebnisse deuteten auf eine Expression der Reg1d als unabhängiges Transkript hin. Da keine Verbindung zum *MIDI*-Gen besteht, konnte zunächst auch die Transkript-Orientierung nicht festgestellt werden. Erschwerend kam hinzu, dass anscheinend kein langer offener Leserahmen existierte. Um die Orientierung des Transkripts festzustellen, wurden einzelsträngige RNA-Sonden auf adulte und fetale multiple Gewebe-Northernblots von Clontech hybridisiert (Abb. 3.18 A und B).

Interessanterweise identifizierte die Northernblot-Analyse Banden mit beiden Proben. Dieses Ergebnis weist auf eine Transkription beider DNA-Stränge hin. Die Expressionsmuster der beiden Transkripte, sense und antisense, stimmten dabei nur teilweise überein.

Der mit der relativ zur *MIDI*-Transkriptionsrichtung orientierten sense-Probe hybridisierte adulte Gewebe-Blot wies starke Banden bei ca. 1kb auf. Die Expression dieses Transkripts war am stärksten in Herz und Leber, gefolgt von Skelettmuskel und Niere. Schwächere Expression konnte ausserdem in Gehirn, Colon, Dünndarm, Plazenta und Thymus beobachtet werden. In den übrigen Geweben konnte die 1kb Bande nicht detektiert werden, was andeutet, dass das Transkript in diesen Geweben gar nicht oder unterhalb des Detektionslimits exprimiert wird (Abb. 3.18 A).

Schwächere Banden konnten ausserdem bei 1,35 und 2kb detektiert werden. Die stärkste Expression der 2kb-Bande erfolgte in Skelettmuskel, gefolgt von Leber, Herz, Colon und Gehirn, Dünndarm und Plazenta. In Thymus, Niere, Lunge und peripheren Blutleukozyten konnte die 2kb Bande nicht detektiert werden. Die 1,35kb Bande wurde am stärksten in Skelettmuskel und neben diesem Gewebe nur noch in Herz exprimiert. In Dünndarm ist

ausserdem eine Bande bei ca 7,5kb zu erkennen. Da sie nur in diesem Gewebe erscheint und sehr schwach ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich möglicherweise um ein unspezifisches Signal handelt. Zur Spezifizierung dieser Bande müsste eine erneute Hybridisierung erfolgen. Auf dem fetalen Blot wurden nur die 1kb und 2kb Bande detektiert, die 1kb Bande in fetaler Leber und fetaler Niere und die 2kb Bande in fetaler Leber (Abb. 3.18 A). Da ausser diesen beiden Geweben nur noch RNA aus zwei weiteren Geweben – fetaler Lunge und fetalem Gehirn – auf dem Blot waren, kann über weitere Gewebe keine Aussage getroffen werden. Zusammengefasst ergibt sich folgendes Bild: In adulten Geweben existieren wenigstens drei verschiedene Transkripte, die einer gewebsspezifischen Expression unterliegen. In fetalen Geweben werden mindestens zwei verschiedene Transkripte exprimiert, auch hier ist die Expression gewebsspezifisch.

Bei der Hybridisierung der relativ zu *MIDI* orientierten antisense-Probe auf den adulten Gewebe-Blot, fällt zunächst eine ca. 1,5kb große Bande in Auge, die in Skelettmuskel erscheint (Abb. 3.18 B). Diese Bande ist die insgesamt am stärksten exprimierte auf diesem Blot und kommt ausschließlich in diesem Gewebe vor. Neben dieser Bande gibt es ein weiteres, sehr schwach exprimiertes Transkript von ca. 4,6kb, das in den Geweben Skelettmuskel, Herz, Leber und Niere erscheint. Interessanterweise ist das Hybridisierungsmuster des fetalen Blots ein anderes. Neben einer schwachen Bande bei ca. 2kb, die in allen vier Geweben erscheint, wurde eine weitere Bande bei ca. 1,5kb detektiert (Abb. 3.18 B). Es könnte sich hier um das zuvor schon in adultem Skelettmuskel detektierte Transkript handeln. Diese Bande wurde nur in fetaler Leber sowie fetaler Niere beobachtet. Diese Ergebnisse zeigen, dass auch die Expression der in sense zur *MIDI*-Transkriptionsrichtung orientierten Transkripte gewebsspezifisch ist. Da sich die Gewebe, in denen sense und antisense Transkripte exprimiert werden, nicht vollständig decken, scheint die Existenz einzelsträngiger RNA-Transkripte in manchen Geweben und die Existenz doppelsträngiger RNA-Moleküle in anderen Geweben plausibel zu sein.

Durch die RT-PCR-Experimente war uns bisher nur ein kleiner Teil der *Reg1d*-Sequenz bekannt. Transkriptionsstart und –stop sollten durch Race-Experimente identifiziert werden. Da die Expression der *Reg1d* in sense und antisense zur *MIDI*-cDNA gezeigt worden war, erfolgten 3' und 5' Race sowohl vom sense- als auch vom antisense-Transkript ausgehend. 3' Race-Experimente des sense-Transkripts ergaben Isoform 1. Hier schließen sich über den zwischen Mensch und Maus konservierten Bereich hinausgehend 223bp der 3' direkt auf *Reg1d* folgenden genomischen Sequenz an. Das PolyA-Signal AATAAA liegt in einer A-reichen Sequenz, die komplementär zum PolyA-Primer erscheint. Somit ist nicht

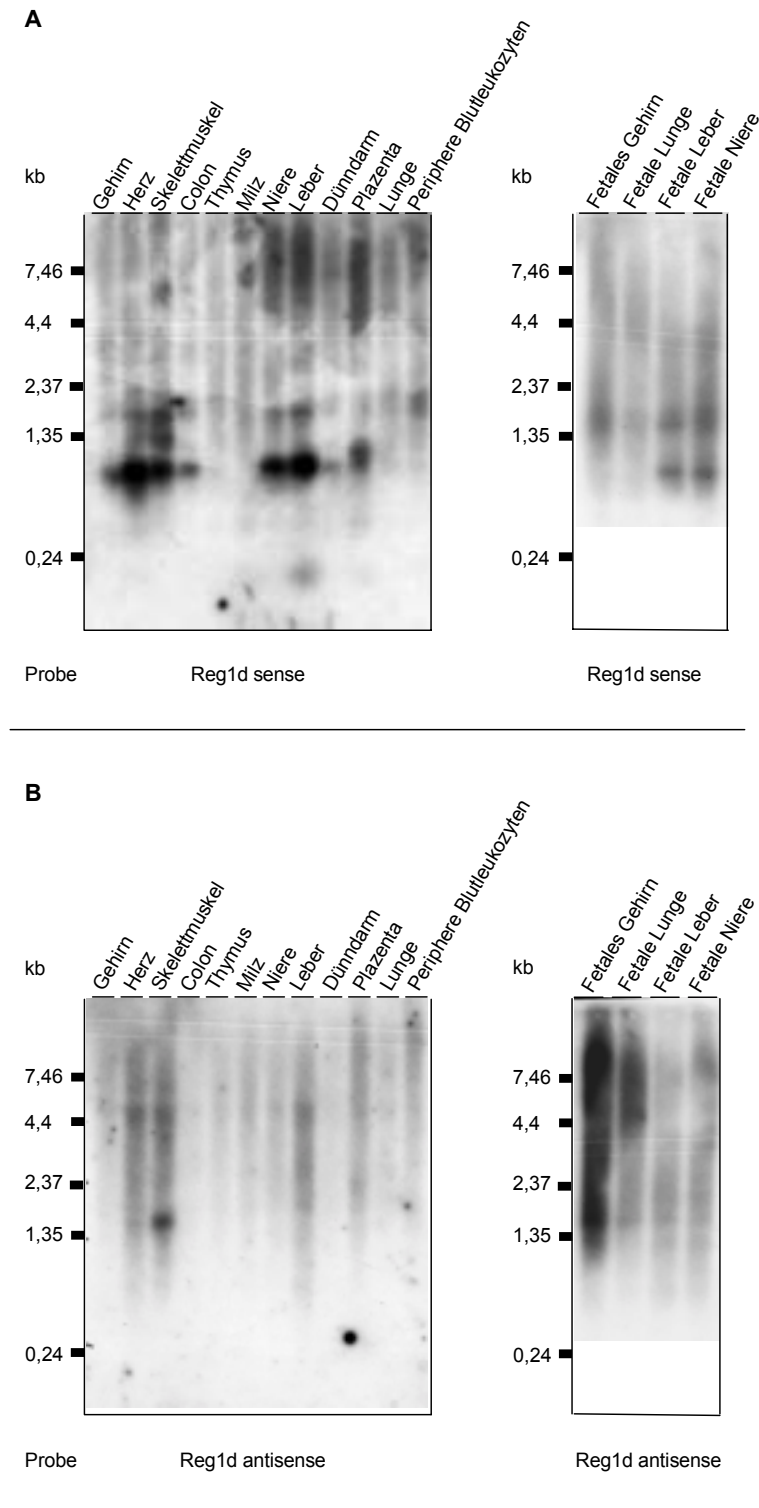


Abbildung 3.18: Northernblot-Analyse der Region 1d

Adulte und fetale Gewebe-Northernblots wurden mit einzelsträngigen RNA-Proben der Region 1d hybridisiert. A. zeigt die Hybridisierung einer relativ zur *MIDI*-Transkriptionsrichtung orientierten sense Probe der Region 1d, B. die Hybridisierung einer antisense Probe.

auszuschließen, dass der PolyA-Primer diese A-reiche Sequenz anstelle des PolyA-Schwanzes gebunden hat und das Produkt unvollständig ist. Zur Klärung müssten die 3'Race-Experimente fortgesetzt werden.

5'Race-Experimente des sense-Transkripts konnte Isoform 2 identifizieren. In dieser Isoform setzt sich der konservierte Bereich der Reg1d im 5'Bereich in 709bp genomisch angrenzende Sequenz fort. Da in der 5'Race häufig unvollständige Produkte detektiert werden, müssten auch diese Experimente noch weiter fortgesetzt werden. Die bisher durchgeführten Experimente ergaben, dass das sense-Transkript der Reg1d ein Transkript ohne Introns ist, dem ein längerer offener Leserahmen fehlt.

Die mit dem relativ zur *MIDI*-Transkriptionsrichtung orientierten antisense-Transkript durchgeführten Race-Experimente brachten keine Ergebnisse. Die 3'Race ergab ein als artifiziell einzustufendes Produkt, in dem sich die Reg1d zunächst ca. 300bp über den konservierten Bereich hinaus in 5'Richtung fortsetzt. 5' an diese 300bp schließt jedoch Sequenz an, für die auf dem X-Chromosom keine komplementäre Sequenz gefunden werden konnte. Die Sequenzanalyse ergab vielmehr Übereinstimmungen dieser Sequenz mit dem Klon RP11-758G22 auf Chromosom 3.

Die 5'Race-Experimente ergaben überhaupt keine Banden. Diese Experimente müssen daher mit anderen Primern wiederholt werden.