

4. Diskussion

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

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in embryonalen Fibroblasten eines OS-Patienten eine generelle Hypophosphorylierung Mikrotubulus-assoziiierter Proteine vorliegt. Diese ist darauf zurückzuführen, dass mutiertes MID1-Protein die Mikrotubulus-assoziierte Phosphatase2A (PP2Ac) nicht ubiquitinieren kann. PP2Ac akkumuliert daher in der Zelle und dephosphoryliert Mikrotubulus-assoziierte Zielproteine. Es ist zurzeit weder bekannt, welche Mikrotubulus-assoziierten Proteine von PP2Ac dephosphoryliert werden, noch wie die Hypophosphorylierung Mikrotubulus-assoziiierter Proteine zur Entstehung von OS beiträgt. In der Literatur gibt es Berichte, die die Folgen einer Inhibierung von PP2Ac beschreiben. Die Inhibierung von PP2Ac bewirkt das Gegenteil der Akkumulation von PP2Ac, es kommt zur Hyperphosphorylierung Mikrotubulus-assoziiierter Proteine und zur Destabilisierung der Mikrotubuli. In diesem Zusammenhang wurde auch gezeigt, dass eine reduzierte Aktivität der Mikrotubulus-assoziierten PP2Ac in neurodegenerativen Krankheiten wie z.B. Alzheimer zur Hyperphosphorylierung des τ -Proteins, zur Mikrotubulus-Destabilisierung, zur Modifikation der Struktur von Synapsen und zur Neurodegeneration führt (Sontag 2001).

Auch bei der Tumorgenese spielt PP2A anscheinend eine entscheidende Rolle. Mehrere PP2A Inhibitoren fördern die Entstehung von Tumoren. Es wurde ferner gezeigt, dass die Expression und die Aktivität von PP2A in Brustkrebszellen, die Resistenz gegen das Krebs-Medikament Adriamycin zeigen, herabgesetzt ist (Ratnasinghe et al. 1998; Sontag 2001). Da PP2Ac in OS-Patienten akkumuliert, wäre es denkbar, dass OS-Patienten seltener an manchen Krebsarten erkranken und seltener Alzheimer entwickeln.

Um die Konsequenzen der Hypophosphorylierung von Mikrotubulus-assoziierten Proteinen in OS-Patienten zu untersuchen, müssten diese Proteine als nächstes isoliert und identifiziert werden.

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

In Immunfluoreszenz-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die durch MID1 vermittelte Assoziation von $\alpha 4$ an Mikrotubuli durch eine Punktmutation in der BBox2 von MID1 verhindert wird. Bekannterweise bindet MID1 über die BBox1 an $\alpha 4$ (Trockenbacher et al. 2001). Der BBox2 konnte bisher hingegen keine Funktion zugeordnet werden. Auch in verwandten Proteinen der RBCC-Familie gibt es keine Hinweise auf eine spezifische Funktion der BBox2. Die Ergebnisse der hier durchgeführten Immunfluoreszenz-Experimente weisen darauf hin, dass die BBox2 des MID1-Proteins einen Einfluss auf die Bindung der BBox1 an $\alpha 4$ ausübt. Wahrscheinlich bewirkt die Punktmutation, die den Austausch der Aminosäure Glutamin durch Arginin an Position 192 der Aminosäuresequenz zur Folge hat, eine Konformationsänderung im MID1-Protein. Möglicherweise wird dadurch die $\alpha 4$ -Bindungsstelle der BBox1 sterisch inhibiert. Als Konsequenz kann MID1 nicht mehr an das $\alpha 4$ -Protein binden. Daher kann $\alpha 4$ nicht mehr mit Mikrotubuli assoziieren.

Weitere Hinweise auf einen Einfluss der BBox2 auf die Bindungsaffinität der BBox1 an $\alpha 4$ liefern trunkierte MID1-Proteine, denen die BBox2 fehlt. Derart trunkierte Proteine weisen eine stark erhöhte Bindungsaffinität zu $\alpha 4$ auf. Dieses Phänomen wird in Abschnitt 4.3.5 detailliert diskutiert.

4.3 Erkennung von Mutationen in der mRNS

Durch Northern- und Southernblot-Analyse wurde eine Duplikation von Exon 1 des *MID1*-Gens in einem OS-Patienten und seiner Mutter identifiziert. Genomische Veränderungen dieser Art können durch DNA-basierte Methoden wie SSCP oder DHPLC nicht detektiert werden, da diese auf der PCR-Amplifikation von Exons basieren.

Die RNA des betreffenden Patienten war untersucht worden, da er das klassische Bild des OS zeigte. Aus seinem Stammbaum ließ sich auf einen X-chromosomalen Erbgang schließen. In SSCP- und DHPLC-Untersuchungen war keine Veränderung im *MID1*-Gen gefunden worden.

Genomische Veränderungen werden häufig in Patienten mit monogenen Erkrankungen beobachtet. Während Duplikationen ganzer Gene in den meisten Fällen zu erhöhter Expression und zu „gain-of-function“ Phänotypen führen (Lupski et al. 1991; Anderson et al.

1999), können intragenische Duplikationen die Funktion des Proteins zerstören (Pousi et al. 1994). Die Duplikation von Exon 1 des *MIDI*-Gens im vorliegenden Fall bewirkt die Integration eines vorzeitigen Stopkodons, das am Anfang der zweiten Kopie von Exon 1 lokalisiert ist. Normalerweise werden Transkripte, die vorzeitige Stopkodons enthalten, über NMD degradiert. Übereinstimmend hiermit war die Expression der *MIDI*-Transkripte in den Fibroblasten des OS-Patienten im Vergleich zu seiner Mutter und einer männlichen Kontrolle stark herunterreguliert. Um zu zeigen, dass die Transkripte des OS-Patienten tatsächlich durch NMD herunterreguliert werden, müssten Experimente mit Translationsinhibitoren durchgeführt werden. Da NMD ein translationsabhängiger Mechanismus ist, wäre zu erwarten, dass die Transkripte des OS-Patienten bei Zugabe von Translationsinhibitoren stabilisiert werden.

Die Detektion der genomischen Duplikation im *MIDI*-Gen zeigt, dass derartige Defekte in OS-Patienten mit X-chromosomalem OS, die keine Mutationen im offenen Leserahmen von *MIDI* aufweisen, existieren. Diagnostik durch Northernblot-Analysen bietet eine gute Möglichkeit, diese Defekte zu detektieren.

4.4 Regulation der MID1-Expression durch alternatives Spleißen und regulatorische RNAs

In etwa 75% der X-chromosomalen OS-Fälle konnten Mutationen im *MIDI*-Gen gefunden werden (Schweiger und Schneider 2003). Nach wie vor ist unklar, warum Mutationen in diesem ubiquitär exprimierten Gen ausschließlich Defekte in Organen der ventralen Mittellinie hervorrufen. Möglicherweise ist die *MIDI*-Expression diversen gewebs- und entwicklungspezifischen Regulationsmechanismen unterworfen. Alternatives Spleißen oder das Vorhandensein nicht exprimierter regulatorischer Elemente im *MIDI*-Gen könnten zu einer derartigen Regulation beitragen.

In dieser Arbeit sollten durch Nix-Analyse und RT-PCR-Experimente alternativ gespleißte Transkripte im *MIDI*-Gen identifiziert werden. Ausserdem sollten durch Homologievergleiche (PipMaker-Analyse) zwischen Mensch und Maus konservierte Bereiche im *MIDI*-Gen identifiziert und untersucht werden. Eine Konservierung zwischen verschiedenen Spezies weist auf eine funktionelle Bedeutung der entsprechenden Sequenzen hin.

4.4.1 Alternativ gespleißte Transkripte im *MIDI*-Gen von Mensch, Maus und Fugu

Im Rahmen dieser Arbeit konnten sowohl im Menschen als auch in der Maus alternativ gespleißte Exons im *MIDI*-Gen identifiziert werden. Im Menschen wurden 14 alternativ gespleißte *MIDI*-Exons gefunden, in der Maus 6.

Auch das *MIDI*-Gen im Fugu-Fisch unterliegt alternativem Spleißen. Dort sind fünf verschiedene alternativ gespleißte Exons bekannt, fExon 1a – fExon 1e.

Alle drei Organismen weisen ein äußerst komplexes alternatives Spleißmuster auf. Die Exons 1a, 1b, 1c, 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f, 2g, 3a und 4a im Menschen, mExon 2a, mExon 2b, mExon 2c, mExon 4a und mExon 4b in der Maus und fExon 1a-fExon 1e in Fugu werden als sogenannte Kassettenexons in alternativ gespleißte Transkripte integriert. Kassettenexons sind Exons, die alternativ in eine mRNA gespleißt werden können. Die meisten dieser Exons im *MIDI*-Gen führen Stopkodons in die jeweiligen Sequenzen ein. Zusätzliche Komplexität wird durch die Nutzung alternativer 3' und 5' Spleißstellen in manchen der alternativ gespleißten Exons und in manchen der bereits bekannten *MIDI*-Exons erreicht (z.B. Ex4a.2, Ex2e.3). Einige der alternativen Spleißstellen sind sogenannte „Nichtkonsensus-Spleißstellen“, die nicht der GT-AG Regel folgen (Ex1a.2, Ex2d.10, Ex2d.11, Ex2e.6, Ex2e.7, Ex3a.3, Ex4a.3, Exi6.3, mEx2b.5, mEx2b.7 und mExi2.3). In der Literatur werden solche Nichtkonsensus Spleißstellen beschrieben (Senapathy et al. 1990; Jackson 1991). In seltenen Fällen erscheint an der 5' Spleißstelle ein GC anstelle eines GT. Diese Ausnahme kommt in Ex1a.2 vor. In dieser Spleißvariante erscheint eine GC-Spleißstelle. Ausserdem sind in der Literatur sogenannte AT-AC Spleißstellen beschrieben (Mount 2000). Abgesehen von Ex1a.2 stimmen die Nichtkonsensus-Spleißstellen der alternativ gespleißten Exons im *MIDI*-Gen mit keiner der beiden Ausnahmen überein. Möglicherweise gibt es Nichtkonsensus-Spleißstellen, die bisher noch nicht beschrieben wurden. Andererseits könnte es sich bei den alternativ gespleißten Exons mit Nichtkonsensus-Spleißstellen im *MIDI*-Gen auch um PCR- oder Klonierungsartefakte handeln.

Ein weiteres Phänomen, das in allen drei Spezies Mensch, Maus und Fugu beobachtet wurde, ist die Nutzung alternativer Polyadenylierungssignale im *MIDI*-Gen (z.B. Ex2d.7, mEx2a.4). Im Menschen wird das Ende der jeweiligen Transkripte in sieben von den 11 identifizierten alternativen Polyadenylierungsstellen durch sogenannte alternative PolyA-Signale markiert, die zwischen 10 und 30 bp stromaufwärts des PolyA-Schwanzes liegen. Alternative Polyadenylierungssignale weichen von der Konsensus-Sequenz AATAAA bzw. ATATAA ab. Die Existenz alternativer Polyadenylierungssignale ist anscheinend nicht ungewöhnlich.

Beaudoing et al. untersuchten die 3'Enden von 5600 hypothetischen mRNAs in EST-Datenbanken. Sie fanden nur in 73% der 3'Fragmente die bisher bekannten Polyadenylierungssignale aataaa und attaaa. In 14,9% wurden insgesamt 10 verschiedene Varianten gefunden, die sich jeweils durch eine Base von der Konsensus-Sequenz aataaa unterschieden. Auffallend war, dass in RNAs, die mehrere 3'Enden enthielten, meistens das am weitesten 3' gelegene Signal die Konsensus-Sequenz AATAAA enthielt. Aufgrund der EST-Daten wird angenommen, dass Polyadenylierungssignale, die von der Konsensus-Sequenz abweichen, weniger effektiv genutzt werden können. Möglicherweise wird so die Menge an spezifischen mRNA-Isoformen reguliert (Beaudoing et al. 2000).

Im Maus-*midl*-Gen wurde darüberhinaus das Phänomen des „Intron retention“ beobachtet. In Isoform mEx2b.3 wird das zwischen mExon 2b und mExon 3 lokalisierte Intron nicht herausgeschnitten, sondern verbleibt in der mRNA.

Im humanen *MIDI*-Gen gibt es ausserdem Hinweise auf die Nutzung alternativer Translationsstarts (Ex4a.10; Abb.8).

Einen Hinweis auf die Bedeutung komplexer alternativer Spleißmuster lieferte die Sequenzierung des menschlichen Genoms. Bei Bekanntwerden der gesamten genomischen Sequenz musste die Anzahl der vorhergesagten Gene drastisch von bis zu 100.000 auf ca. 30.000 – 40.000 reduziert werden (Lander et al. 2001). Die entstandene Diskrepanz zwischen der relativ geringen Anzahl an Genen und der Vielfalt des Proteoms könnte durch alternatives Spleißen erklärt werden (Wolfsberg et al. 2001; Stamm 2002).

Von den alternativ gespleißten *MIDI*-Exons in Mensch und Maus sind zwei (Exon 2e/mExon 2b und Exon 4a/mExon 4b) zwischen beiden Spezies in ihrer Nukleinsäuresequenz homolog. Ausserdem ist die Verkürzung von Exon 1 um 114 bp durch die Nutzung einer alternativen Spleißstelle zwischen Mensch und Maus konserviert (im Menschen z.B. in der Isoform Ex2d.7, in der Maus in Isoform mExi2.2). Die möglichen Konsequenzen der 114 bp Deletion werden im Kapitel 4.3.4 diskutiert.

Da konservierte Sequenzen während der Evolution unter hohem Selektionsdruck stehen, ist anzunehmen, dass sie funktionelle Relevanz besitzen. Andererseits ist es, wie das Beispiel des *ADAR2*-Gens zeigt, aber auch nicht ungewöhnlich, dass alternativ gespleißte Exons Spezies-spezifisch exprimiert werden (Slavov und Gardiner 2002). Spezies-spezifische Spleißmuster werden damit erklärt, dass alternatives Spleißen ein vorteilhafter Mechanismus sei, mit dem während der Evolution neue Proteinsequenzen getestet werden können. Eine einzelne Punktmutation kann ein neues Exon erschaffen oder ein bereits vorhandenes verlängern. Da

alternativ gespleißte Transkripte oft nur einen Bruchteil der eigentlichen mRNA ausmachen, können Mutationen, die das Spleiß-Muster verändern, neue Proteine erschaffen, ohne dass das Wildtyp-Protein verloren geht (Black 2003). Das im *MIDI*-Gen von Mensch, Maus und Fugu gefundene alternative Spleißmuster stützt diese Theorie. Die meisten der dort identifizierten alternativen Exons sind nicht zwischen Mensch und Maus konserviert. Auch gibt es keine konservierten Sequenzen außerhalb der bekannten 9 *MIDI*-Exons zwischen Mensch und Fugu oder zwischen Maus und Fugu. Um zu klären, ob die neuen Exons, die keine Sequenzhomologien zeigen, tatsächlich spezifisch im Menschen exprimiert werden, müssten Homologievergleiche mit näher verwandten Spezies durchgeführt werden. Trotz der nur gering vorhandenen Homologie auf Nukleinsäureebene in den drei Organismen Mensch, Maus und Fugu ist die Komplexität des Spleißmusters allen drei Organismen gemein. Auch gibt es Hinweise auf die Existenz funktionell ähnlicher *MIDI*-Isoformen (trunkierte Proteine, Transkripte mit vorzeitigen Stopkodons). Man kann daher von einer funktionellen Konservierung der identifizierten *MIDI*-Isoformen sprechen.

4.4.2 Gewebsspezifische Expression der alternativ gespleißten MIDI-Transkripte in Mensch und Maus

Die gewebsspezifische Expression der identifizierten alternativ gespleißten humanen *MIDI*-Isoformen wurde mit Hilfe von fetalen und adulten Gewebe-Northernblots untersucht. Auf diese wurden zwei verschiedene Proben hybridisiert. Erstens wurde ein Oligo-pool hybridisiert, bestehend aus 28-mer Oligonukleotiden, die komplementär zu den Exons 1a, 2c, 2d, 2f und 3a sind. Zweitens wurde eine einzelsträngige RNA-Probe, die komplementär zu Exon 4a ist, hybridisiert. Ausserdem wurden RT-PCR-Experimente in verschiedenen Geweben durchgeführt.

Die gewebsspezifische Exprimierung der identifizierten alternativ gespleißten Maus-*midl*-Isoformen wurde mit RT-PCR-Experimenten in verschiedenen adulten Geweben sowie in den fetalen Entwicklungsstadien E13, E15 und E19 untersucht.

Sowohl im humanen als auch im Maus-*midl*-Gen konnte gewebsspezifische Expression der alternativ gespleißten *MIDI*-Isoformen gezeigt werden. Vergleicht man die Expression der alternativ gespleißten *MIDI*-Isoformen, die durch die RT-PCR-Experimente erhalten wurden, untereinander, fällt auf, dass nahezu jede Isoform ein eigenes spezifisches Expressionsmuster besitzt. Trotzdem weisen einige der Isoformen Gemeinsamkeiten in ihrer Expression auf. Im

Menschen werden die alternativ gespleißten Isoformen von Exon 1a neben adultem Testis anscheinend nur in fetalen Geweben exprimiert. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass *MIDI*-Isoformen, die Exon 1a enthalten, eine wichtige Rolle während der Embryonalentwicklung spielen.

MIDI-Isoformen, die Exon 2d oder Exon 2f enthalten, werden vor allem in fetalen und adulten Fibroblasten gefunden, was auf die gewebsspezifische Funktion dieser Isoformen hinweist. Die Isoform Ex2f.8 wird hingegen ubiquitär exprimiert.

Die Hybridisierungen der Gewebe-Northernblots mit dem Oligo-Pool der Exons 1a, 2c, 2d, 2f und 3a zeigen dramatische Unterschiede in der Expressionsstärke der detektierten Banden zwischen einzelnen Geweben.

Im Gegensatz hierzu zeigen die Hybridisierungen der fetalen und adulten Gewebe-Northernblots mit einer RNA-Probe, die Isoformen von Exon 4a detektiert, eine ubiquitär exprimierte Bande, die sich in ihrer Stärke zwischen den verschiedenen Geweben nicht wesentlich unterscheidet. Die durchgeführten RT-PCR-Experimente zeigen hingegen eine gewebsspezifische Expression von Exon 4a. Es gibt verschiedene Erklärungen für diese Diskrepanz. So könnten erstens gewebsspezifisch exprimierte Exon 4a-Isoformen vergleichbarer Transkriptgrößen haben, die auf Northernblots nicht unterschieden werden können. Zweitens könnte ein durch die RT-PCR-Experimente nicht identifiziertes Transkript existieren, das ubiquitär exprimiert wird und auf den Northernblots zu sehen ist. Oder die in der RT-PCR identifizierten gewebsspezifischen Exon 4a-Isoformen könnten vorzeitige Stopkodons enthalten und über NMD reguliert werden, was ihre Detektion auf den Northernblots erschweren würde. Ausserdem ist nicht auszuschließen, dass die Exon 4a-Transkripte in manchen Geweben besser amplifiziert werden konnten als in anderen (z.B. aufgrund von Qualitätsunterschieden in der Gesamt-RNA dieser Gewebe).

Die gewebsspezifische Expression von *MIDI* wurde 1997 von Quaderi et al. durch die Hybridisierung der *MIDI*-cDNA auf fetale und adulte Gewebe-Northernblots untersucht (Quaderi et al. 1997). Es wurde gezeigt, dass *MIDI* ubiquitär exprimiert wird. Die Expressionsstärke von *MIDI* variiert jedoch zwischen einzelnen Geweben. In fetalem Gewebe wurde die höchste *MIDI*-Expression in der Niere, gefolgt von Gehirn und Lunge gefunden. In adulten Geweben wurde die stärkste Expression im Herzen, in der Plazenta und im Gehirn beobachtet.

Bei einem Vergleich des Expressionsmuster der alternativ gespleißten Exons 1a, 2c, 2d, 2f und 3a (Ex1a – Ex3a) mit dem Expressionsmuster von *MIDI* fällt auf, dass die Expressionsmuster teilweise überlappen. Diese Überlappung ist vor allem im adulten Herzen

sehr deutlich. Sowohl *MIDI* als auch die alternativ gespleißten Exons Ex1a – Ex3a werden in diesem Gewebe besonders stark exprimiert. In anderen Geweben, wie z.B. in adulter und fetaler Leber, sind wiederum nur die alternativ gespleißten Exons Ex1a – Ex3a, nicht aber die *MIDI*-cDNA, stark exprimiert. In der Plazenta schließlich wird die gesamte *MIDI*-cDNA besonders stark exprimiert. Die Exons Ex1a-Ex3a werden im Vergleich zu anderen Geweben in der Plazenta hingegen nicht so stark exprimiert.

Auch die in der Maus durchgeführten RT-PCR-Experimente zeigen deutlich die gewebsspezifische Expression der identifizierten *midl*-Isoformen. Die Isoformen, die das Maus Exon i2 enthalten, wurden vor allem in den adulten Geweben Gehirn, Niere, Magen und Pankreas gefunden. Die Isoform mEx2a.1 hingegen wird vor allem in den Embryonalstadien exprimiert. Isoformen, die mExon 2b enthalten, werden in sehr unterschiedlichen Geweben exprimiert. Jede einzelne Isoform, die mExon 2b enthält, besitzt anscheinend ein eigenes sehr spezifisches Expressionsmuster. Wie im Menschen deutet sich auch in der Maus an, dass die alternativ gespleißten *midl*-Isoformen spezifische Funktionen wahrnehmen, die auf einzelne Gewebe beschränkt sind.

4.4.3 N-terminal trunkeerte Proteine

Westernblot-Analyse von Zellysat aus embryonalen Fibroblasten mit einem Antiserum, das gegen den C-Terminus von MID1 gerichtet ist, ergab neben der MID1-Bande bei 72 kDa mehrere kleinere Banden. Eine dieser Banden bei ca. 50 kDa konnte mit einem gegen den MID1 C-Terminus gerichteten Protein spezifisch verdrängt werden. Diese Experimente zeigen die Existenz N-terminal trunkeerter MID1-Proteine.

Weitere Hinweise auf N-terminal trunkeerte Proteine kommen von den durchgeführten RT-PCR- und Race-Experimenten. Diese weisen auf die Existenz mindestens eines N-terminal trunkeerenden Transkripts im Menschen hin (Ex4a.7). Ex4a.7 enthält 1170 bp des Intronbereichs, der unmittelbar stromaufwärts von Exon 4a liegt. Das ATG, das im Abstand von 2 Basen auf das letzte Stopkodon eines der drei möglichen Leseraster folgt, liegt im gleichen Raster wie die sich 3' anschließenden MID1-Exons 5-9. Das ATG ist jedoch nicht in eine perfekte Kozak-Sequenz eingebettet. Lediglich die Position -3 enthält das an dieser Stelle vorgeschriebene Purin. Stromaufwärts dieses ATGs sind zahlreiche weitere ATGs in der Sequenz vorhanden. In der Literatur wurde beschrieben, dass die Translation normalerweise

am ersten vorhandenen ATG, das in eine für die Proteintranslation nutzbare Kozak-Sequenz eingebettet ist, initiiert wird (Kozak 1996; Kozak 2002). Von den stromaufwärts vorhandenen ATGs in Ex4a.7 sind wenigstens zwei in eine Sequenz eingebettet, die sowohl an der -3 als auch an der +4 Position mit der Kozak-Sequenz übereinstimmt. Diese sprechen gegen den Start der Translation an dem ATG, das den offenen Leserahmen beginnt.

Wie an den Beispielen mehrerer cDNAs gezeigt werden konnte, ist die Existenz zahlreicher stromaufwärts lokalisierter ATGs häufig auf das Verbleiben des ersten Introns in mRNA-Vorläuferprodukten zurückzuführen. Kozak vermutete, dass es sich um einen posttranskriptionellen Regulationsmechanismus handeln könnte. Das am weitesten 5' lokalisierte Intron wird erst dann aus der RNA herausgeschnitten, wenn das entsprechende Protein in der Zelle benötigt wird (Kozak 1996).

Da 5'Race-Experimente häufig unvollständige Produkte ergeben, ist auch Ex4a.7 möglicherweise unvollständig. Die 5'Race-Experimente müssten daher mit Primern nahe des 5'Endes fortgesetzt werden. So könnte festgestellt werden, ob der stromaufwärts gelegene Bereich in Ex4a.7 ein 5'UTR oder ein in der RNA verbliebenes Intron ist.

4.4.4 C-terminal trunke Proteine

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Existenz C-terminal trunkierender Transkripte im *MIDI*-Gen gezeigt werden. Ähnlich den Westernblot-Experimenten mit C-terminalem *MIDI*-Antiserum wurden Experimente mit einem N-terminalen *MIDI*-Antiserum durchgeführt. Neben der *MIDI*-Bande bei 72 kDa wurden auch in diesem Experiment mehrere kleinere Banden beobachtet, von denen sich einige spezifisch mit einem Peptid aus dem N-Terminus des *MIDI*-Proteins verdrängen ließen.

Die RT-PCR- und 3'Race-Experimente konnten vier C-terminal trunkierende Transkripte im humanen *MIDI*-Gen identifizieren (Ex2d.7, Ex2f.1, Exi6.1, Exi6.2). Es ist davon auszugehen, dass weitere C-terminal trunkierende Transkripte im humanen *MIDI*-Gen existieren, da im Rahmen dieser Arbeit neun weitere alternative Polyadenylierungsstellen identifiziert wurden. Die 3'Race-Experimente in der Maus ergaben ferner, dass auch in diesem Organismus alternative Polyadenylierungsstellen im *MIDI*-Gen existieren. Deren Nutzung würde ebenfalls zur Transkription C-terminal trunkierender *MIDI*-Varianten führen. Da das erste Stopkodon in den C-terminal trunkierenden Transkripten des Menschen und der Maus in den am weitesten 3'gelegenen Exons erscheint, ist davon auszugehen, dass die entsprechenden

Transkripte stabil sind. Auch im Fugu-*MIDI*-Gen sind alternative Polyadenylierungsstellen bekannt, deren Benutzung zur Entstehung C-terminal trunkierender Transkripte führt. Man kann also von einem funktionell konservierten Mechanismus sprechen.

Um Hinweise auf die Funktion der C-terminal trunkierten Protein-Isoformen in der Zelle zu bekommen, sollte zunächst ihre zelluläre Lokalisation untersucht werden. In COS7-Zellen überexprimiert zeigten sie im Gegensatz zum Mikrotubulus-assoziierten MID1-Protein eine diffuse zytoplasmatische Lokalisation. Da MID1 bekannterweise über seinen C-Terminus mit Mikrotubuli assoziiert, ist anzunehmen, dass Ex2d.7, Ex2f.1 und Exi6.1 aufgrund des Fehlens des C-Terminus nicht an Mikrotubuli binden können. Im Gegensatz zu den Spleiß-Isoformen zeigen C-terminal trunkierte MID1-Proteine, die durch Mutationen im *MIDI*-Gen entstanden sind, keine diffus zytoplasmatische Lokalisation. Sie bilden stattdessen zytoplasmatische Aggregate (Schweiger et al. 1999). Möglicherweise ist im Gegensatz zu den natürlich vorkommenden MID1-Isoformen die Löslichkeit der mutierten C-terminal trunkierten MID1-Proteine, wie sie bei OS-Patienten gefunden werden, herabgesetzt.

MID1 bindet mit der BBox1 an eine regulatorische Untereinheit der mikrotubulus-assoziierten Phosphatase 2A, das $\alpha 4$ -Protein (Trockenbacher et al. 2001). Da Ex2d.7, Ex2f.1 und Exi6.1 die BBox1 enthalten, war anzunehmen, dass sie $\alpha 4$ binden können. Ihre Affinität zu $\alpha 4$ wurde in einem β -Galaktosidase Flüssigassay untersucht. Überraschenderweise zeigten Ex2f.1 und Exi6.1 keine oder nur sehr geringe Bindungsaffinität zu $\alpha 4$. Lediglich Ex2d.7 zeigte eine starke Bindungsaffinität zu $\alpha 4$. Diese war in dem β -Galaktosidase-Assay 5,2x höher als die Bindungsaffinität des MID1-Proteins zu $\alpha 4$ und 2,9x höher als die Bindungsaffinität der BBox1 zu $\alpha 4$. In früheren Experimenten zeigten MID1-Deletionsmutanten, die nur aus der BBox1 bestanden, die höchste Bindungsaffinität zu $\alpha 4$ (Trockenbacher et al. 2001). Die stark erhöhte Bindungsaffinität von Ex2d.7 zu $\alpha 4$ könnte daraus resultieren, dass Ex2d.7 die BBox1 enthält, fast die gesamte BBox2 jedoch durch die Benutzung einer alternativen 3'Spleißstelle im Exon 1 deletiert ist. Ein Spleißereignis an dieser alternativen 3'Spleißstelle wurde nicht nur in weiteren humanen *MIDI*-Isoformen beobachtet (z.B. Exi6.2) sondern auch in einer *MIDI*-Isoform der Maus (mExi2.2) gefunden. Die Konservierung des Spleißereignisses an der alternativen 3'Spleißstelle in Exon 1 zwischen Mensch und Maus weist auf die funktionelle Bedeutung dieser verkürzten Variante von Exon 1 des *MIDI*-Gens hin. Es ist denkbar, dass die BBox2 Einfluß auf die Bindung der BBox1 an $\alpha 4$ besitzt. Möglicherweise erhöht die Deletion der BBox2 durch Konformationsänderungen im MID1-Protein die Bindungsaffinität zu $\alpha 4$.

Im Gegensatz dazu bewirkte eine Punktmutation in der BBox2, die zum Austausch der

Aminosäure Glutamin durch Arginin an Position 192 führte, dass $\alpha 4$ nicht mit Mikrotubuli assoziierte. Diese Beobachtung weist ebenfalls darauf hin, dass die BBox2 Einfluß auf die Bindung der BBox1 an $\alpha 4$ besitzt.

Die fehlende Bindungsaffinität von Ex2f.1 und Exi6.1 zu $\alpha 4$ kann möglicherweise ebenfalls mit Konformationsänderungen in den Proteinen erklärt werden. Beide Isoformen enthalten 3' zu Exon 6 60 zusätzliche Aminosäuren. Ex2f.1 enthält ausserdem Exon 2f, das die coiled coil Domäne in dieser Isoform durch Insertion von 50 zusätzlichen Aminosäuren unterbricht. Möglicherweise führen die zusätzlichen Aminosäuren zu Konformationsänderungen, die die Bindung der beiden Isoformen an $\alpha 4$ verhindern. Da Ex2f.1 und Exi6.1 nicht an $\alpha 4$ binden, stellt sich die Frage, welche Funktion sie haben. Möglicherweise binden sie an andere, noch zu identifizierende MID1-Zielproteine. Durch die zusätzlich zu den MID1-Proteindomänen in den Spleißvarianten vorhandenen Aminosäuren könnte es aber auch zur Bindung an Spleißvarianten-spezifische Protein-Interaktionspartner kommen. Die Analyse der zusätzlichen Aminosäuren, die in Ex2f.1 und Exi6.1 durch das alternative Spleißen von Exon 2f und Exon i6 in die Proteinsequenz integriert werden, mit dem Softwareprogramm GeneQuiz, gab jedoch keine Hinweise auf Homologien zu bekannten Proteindomänen. Potentielle Bindungspartner der Isoformen Ex2f.1 und Exi6.1 könnten in einem Yeast-two-Hybrid-Assay identifiziert werden.

Isoform Exi6.1 könnte auch über seine coiled coil Domäne Heterodimere mit MID1 und/oder mit MID2 bilden. MID1 könnte darauf durch sterische Inhibition von den Mikrotubuli entfernt werden, was erneut einen Regulationsmechanismus implizieren würde. Homodimere zwischen zwei MID1-Proteinen und Heterodimere zwischen MID1 und MID2 werden über die coiled coil Domänen gebildet (Short et al. 2002). Da in Isoform Ex2f.1 die coiled coil Domäne durch Exon 2f unterbrochen wird, ist die Bildung von Heterodimeren zwischen Ex2f.1-MID1 oder -MID2 eher unwahrscheinlich. Die Bildung von Heterodimeren müßte durch Immunfluoreszenz- und Coimmunpräzipitations-Experimente untersucht werden.

Das MID1-Protein besitzt die Funktion einer Ubiquitin-Ligase und katalysiert die Übertragung von Ubiquitin auf PP2Ac (Trockenbacher et al. 2001). Möglicherweise existieren ausser PP2A weitere Proteine, die durch MID1 ubiquitiniert werden. Nach unserem Modell agieren C-terminal trunkierte MID1-Proteine in einem dominant-negativen Wirkungsmechanismus, wenn sie $\alpha 4$ oder andere noch zu identifizierende Mikrotubulus-assoziierte Proteine mit höherer Bindungsaffinität als das MID1-Protein binden können. Die

Bindungspartner werden dadurch von den Mikrotubuli entfernt. MID1 kann daraufhin nicht mehr in Kontakt zu PP2Ac oder anderen Zielproteinen treten, eine Ubiquitinierung bleibt aus. Es kommt zum gain-of-function dieser Proteine.

Die regulatorische Funktion alternativ gespleißter Isoformen in dominant-negativen Wirkungsmechanismen wurde zum Beispiel für Rezeptor-CD40 beschrieben. CD40 ist ein Mitglied der „tumor necrosis factor receptor (TNFR) superfamily“ und ist auf den Oberflächen zahlreicher Zellarten wie z.B. B-Zellen und Makrophagen exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass alternativ gespleißte Isoformen von CD40 die durch CD40 vermittelte Signaltransduktion deaktivieren können. Möglicherweise geschieht dies durch Bindung der alternativen Isoformen, die keine Endodomäne besitzen und somit keine Signale weitergeben können, an CD40L, den Bindungspartner von CD40 (Tone et al. 2001).

Wie das Beispiel von CD40 und die trunkierten Isoformen im *MIDI*-Gen zeigen, ist durch alternatives Spleißen die Möglichkeit gegeben, trunkierte Proteine entstehen zu lassen, die durch das Fehlen spezifischer Domänen die Funktion des Hauptproteins dominant-negativ regulieren können.

4.4.5 Identifizierung von neuen Protein-Domänen in den alternativ gespleißten MIDI-Isoformen

Außer in dem Maus-Exon 2a konnten mit dem Softwareprogramm GeneQuiz in keinem der neuen, alternativ gespleißten humanen und Maus-*mid1*-Exons bekannte Proteindomänen identifiziert werden.

Trotzdem könnten diese Exons funktionelle Domänen enthalten. Andererseits könnten sie die Konformation der sie enthaltenden Proteine beeinflussen und dadurch die Bindung anderer Domänen in diesen Proteinen an potentielle Bindungspartner verstärken oder inhibieren.

Die Analyse der Aminosäuresequenz des Maus-Transkripts mEx2a.6P mit dem Softwareprogramm GeneQuiz zeigte die Existenz einer konservierten Domäne, die die Aminosäuren 84 – 95 umfasst. Diese Domäne, eine sogenannte Cystein „active site“, wird in der Familie der Cystein-Proteinasen vorgefunden. Die Familie der Cystein-Proteinasen besteht vor allem aus den pflanzlichen Thiol-Proteinasen Papain und Actinidin und aus tierischen lysosomalen Thiol-Proteinasen, zu denen die Cathepsine B, H und L zählen (Dufour 1988). Die Cathepsine spielen eine entscheidende Rolle bei der Degradation von

Proteinen und möglicherweise bei der Aktivierung einiger Peptidhormone (Docherty et al. 1982). Neben der Cystein „active site“ sind in den Cystein-Proteinasen weitere konservierte Aminosäuren an der katalytischen Reaktion beteiligt (Dufour 1988). Bis auf die Cystein „active site“ enthält mEx2a.6P keine dieser konservierten Aminosäuren. Ausserdem ist das hypothetische Protein mEx2a.6P mit 111 Aminosäuren nur etwa halb so groß wie die herkömmlichen Cystein-Proteinasen (ca. 210 AS).

Um die Existenz von mEx2a.6P in der Zelle nachzuweisen, müssten die RT-PCR- und Race-Experimente von mEx2a.6 fortgesetzt werden, um das Transkript auf seine Vollständigkeit zu untersuchen. Anschließend könnte versucht werden, für mEx2a.6P spezifische Antikörper herzustellen.

mExon 2a ist zwischen Mensch und Maus in seiner Sequenz nicht konserviert. Die Funktion von mEx2a.6P könnte Maus-spezifisch sein. Andererseits könnte die Funktion von mEx2a.6P im Menschen durch eine andere (noch zu identifizierende) Isoform ausgeübt und ersetzt werden.

4.4.6 Durch Stopkodons vermittelter mRNA-Abbau

NMD wurde bis vor kurzem als ein Mechanismus angesehen, dessen Aufgabe darin besteht, fehlerhafte Transkripte zu eliminieren, die vorzeitige Terminationskodons (PTCs) enthalten (Frischmeyer und Dietz 1999; Hentze und Kulozik 1999). Solche Transkripte können erstens während der Transkription durch den zufälligen Einbau falscher Nukleotide in die RNA entstehen. Zweitens können Mutationen, die Erbkrankheiten verursachen, vorzeitige Terminationskodons in die entsprechenden Transkripte einführen. Am Beispiel der β -Thalassämie konnte gezeigt werden, dass derart mutierte Transkripte durch NMD destabilisiert werden. Die Zelle wird so vor den möglichen dominant-negativen Auswirkungen trunkierter Proteine geschützt. Dementsprechend zeigen heterozygote Individuen mit einer PTC-Mutation im β -Globin Gen keine Symptome der β -Thalassämie (Hentze und Kulozik 1999).

Zwei kürzlich erschienene Veröffentlichungen weisen darauf hin, dass NMD ausserdem eine regulatorische Funktion ausübt. Lewis et al. haben alternative mRNA-Isoformen, aus EST-Datenbanken in silico untersucht. Sie fanden, dass 35% der von ihnen untersuchten alternativen Isoformen PTCs enthalten (Lewis et al. 2003). Diese alternativen Transkripte

könnten NMD aktivieren und damit die Transkriptmengen der entsprechenden Gene regulieren. Alternativ gespleißten Isoformen mit PTCs käme somit eine wichtige regulatorische Bedeutung zu.

Diese Hypothese wird von Lamba et al. gestützt. Sie identifizierten alternativ gespleißte Transkripte im *ABCC4*-Gen, die PTCs enthalten. Diese Transkripte sind bei Mensch und Maus konserviert (Lamba et al. 2003).

Wir konnten zeigen, dass einige der alternativen *MIDI*-Transkripte in Mensch, Maus und Fugu PTCs enthalten und NMD auslösen. Auch hier scheint NMD somit eine Genregulationsfunktion auszuüben. Wenn alternative Spleißvorgänge, die zur Transkription von *MIDI*-Varianten mit PTCs führen, in spezifischen Entwicklungsstadien und Geweben bevorzugt werden, würde die Expression von *MIDI* in diesen Stadien und Geweben herunterreguliert. Welche Faktoren die Wahl der verschiedenen Spleißereignisse beeinflussen, ist zurzeit noch unklar.

4.4.7 Region 1d

Die PipMaker-Analyse der *MIDI*-Gene von Mensch und Maus konnte ausser dem konservierten Exon 4a eine 1.126 bp lange Region in Intron 1 identifizieren, die zwischen beiden Spezies zu 84,5 % homolog ist und als Reg1d bezeichnet wurde. In Fugu ist Reg1d im Gegensatz zu den neun kodierenden *MIDI*-Exons nicht konserviert, was zeigt, dass sie in der Evolution spät entstanden ist. RT-PCR-Experimente ergaben, dass Reg1d im Menschen exprimiert wird aber keinen Anschluß an die neun kodierenden Exons des humanen *MIDI*-Gens hat. In Race-Experimenten wurden keine Introns in Reg1d identifiziert. Die Konservierung von Reg1d im Intron 1 des *MIDI*-Gens von Mensch und Maus weist auf eine funktionelle Relevanz der Reg1d hin.

Die PolyA+Northernblot-Analyse mit einzelsträngigen RNA-Proben ergab, dass Reg1d im Menschen sowohl in relativ zum *MIDI*-Gen orientierter Sense- als auch in Antisense-Richtung transkribiert wird. Es konnte weder im Sense- noch im Antisense-Transkript von Reg1d ein durchgängiger offener Leserahmen identifiziert werden, was auf die Funktion von Reg1d als regulatorische RNA hinweist.

Untersuchungen mit Gewebe-Northernblots hatten gezeigt, dass die Expression von Sense- und Antisense-Transkripten von humanem Reg1d nicht in allen Geweben übereinstimmt. Das Sense-Transkript könnte also eine vom Antisense-Transkript unabhängige Funktion

haben. In den Geweben, in denen Sense- und Antisense-Transkript gemeinsam exprimiert werden, könnte andererseits doppelsträngige RNA entstehen.

In der Folge sollen zunächst mögliche Funktionen des Antisense-Transkriptes von Reg1d diskutiert werden. Danach soll auf mögliche Funktionen des Sense-Transkripts sowie auf mögliche Funktionen doppelsträngiger Reg1d-RNA eingegangen werden.

In der Literatur wurde die Existenz von Antisense-Transkripten in mehreren Genen beschrieben (Williams und Fried 1986; Krystal et al. 1990; Kumar und Carmichael 1998; Sleutels et al. 2002). Manche dieser Antisense-Transkripte sind in Gen-Regulationsprozesse wie z.B. genomisches Imprinting, RNA Interferenz, Regulation der Translation oder alternatives Spleißen involviert. Teilweise wurden die Regulationsmechanismen der Antisense-Transkripte näher untersucht. Es zeigte sich, dass es keinen generellen Wirkungsmechanismus gibt, sondern dass jedes Antisense-Transkript in einem einzigartigen Wirkungsmechanismus agiert (Shendure und Church 2002). Aufgrund der Vielfalt an Funktionen und Wirkungsmechanismen kann dem Antisense-Transkript von Reg1d zur Zeit keine eindeutige Funktion zugeordnet werden.

Da die Race-Experimente des Antisense-Transkriptes von Reg1d nicht erfolgreich waren, ist von diesem Transkript bisher nur ein 341 bp umfassendes Teilstück, das im Intron 1 des *MIDI*-Gens liegt, bekannt. So ist noch unklar, ob das Antisense-Transkript zu Teilen der mRNA von *MIDI* komplementär ist und seine Funktion durch Bildung von RNA-Duplexen mit *MIDI* ausüben könnte. Die Bildung solcher Duplexe zwischen Antisense-Transkripten und den von ihnen regulierten Genen wurde für zahlreiche Beispiele gezeigt. Z.B. wurde in *C.elegans* gefunden, dass Antisense-RNAs, die vom *lin-4* Gen transkribiert werden und komplementär zum 3'Ende des von ihnen regulierten *lin-14* Gens sind, die Herunterregulation der Lin-14 Expression bewirken. Es wird angenommen, dass diese Herunterregulation durch die Bildung von Duplexen zwischen *lin-4* und *lin-14* geschieht, die die Translation von *lin-14* stören (Lee et al. 1993; Wightman et al. 1993).

Eine andere Wirkungsweise wurde für Antisense-Transkripte im humanen *N-myc*-Gen postuliert (Krystal et al. 1990). Hier soll durch die Bildung von Duplexen, die Teile von Exon 1 und Intron 1 des *N-myc*-Gens umfassen, das Spleißen von Intron 1 inhibiert werden und so die RNA-Prozessierung beeinflusst werden.

Eine weitere Funktion von Reg1d könnte das sogenannte „intrinsic pausing“ sein, das am Beispiel des *c-myc*-Gens detailliert untersucht wurde (Nepveu und Marcu 1986; Kerppola und Kane 1988; Siebenlist et al. 1988). Es handelt sich hierbei um einen Regulationsmechanismus

auf Transkriptionsebene. Kurze Antisense-Transkripte innerhalb eines Introns des *c-myc*-Gens lösen einen Transkriptionsstopp durch reversible Blockade der RNA-Polymerase II aus.

Um Hinweise auf den Wirkungsmechanismus des Antisense-Transkripts von Reg1d zu bekommen, müssten zunächst die Race-Experimente mit anderen Primern wiederholt werden. Die Banden von 1 kb, 1,35 kb und 2 kb auf den PolyA+Northernblots zeigen, dass wenigstens drei verschiedene Isoformen des Antisense-Transkripts von Reg1d existieren. Eine weitere Bande bei 7,5 kb im Dünndarm ist möglicherweise unspezifisch. Es wäre interessant zu erfahren, inwiefern sich die drei Transkripte in ihrer Sequenz unterscheiden.

Im Gegensatz zu Antisense-Transkripten wurde die Existenz von Sense-Transkripten, die innerhalb anderer Gene lokalisiert sind oder mit diesen überlappen, in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Es ist unklar, von welchem Promoter die Transkription des Sense-Transkriptes von Reg1d gesteuert wird. Wird einer der fünf beschriebenen *MIDI*-Promotoren verwendet, müsste das Sense-Transkript an eines der 5'UTR-Exons von *MIDI* gespleißt werden. In RT-PCR-Experimenten wurde die Verbindung von Reg1d zu dem am weitesten 3' gelegenen Exon des *MIDI*-5'UTR untersucht. Es wurde keine Verbindung zu diesem Exon gefunden. Auch die mit dem Sense-Transkript von Reg1d durchgeführten 5'Race-Experimente konnten keine Verbindung zu einem der 5'UTR-Exons von *MIDI* identifizieren. Da 5'Race-Produkte häufig unvollständig sind, müssten diese allerdings mit Primern nahe des 5' Endes der bisher bekannten Sequenz fortgesetzt werden. Einen Hinweis darauf, dass das Produkt der 5'Race unvollständig sein könnte, gibt der Vergleich der durch 5'Race-, RT-PCR- und 3'Race-Experimente identifizierte Transkriptgröße von 2.058 kb mit Transkriptgrößen, die auf dem adulten Gewebe-Northernblot beobachtet wurden. Dort sind Transkripte von 1,5 und 4,6 kb zu sehen.

Einschränkend muss erwähnt werden, dass der Gewebe-Northernblot keine PolyA+RNA aus adultem Testis enthielt und es sich bei dem 2.058 kb Transkript um ein Testis-spezifisches Transkript handeln könnte. Um das 5'Ende des Sense-Transkriptes zweifelsfrei zu identifizieren, müssten RT-PCR-Experimente mit Primern in Reg1d und den 5'UTR-Exons von *MIDI* sowie weitere 5'Race-Experimente durchgeführt werden.

Falls die Expression des Sense-Transkriptes von Reg1d nicht durch einen der fünf *MIDI*-Promotoren gesteuert wird, müsste das Sense-Transkript von Reg1d von einem eigenen Promotor transkribiert werden, der wahrscheinlich innerhalb des *MIDI*-Gens lokalisiert ist.

Hinsichtlich der Funktion des Sense-Transkriptes von Reg1d ergeben sich mehrere Möglichkeiten. Es könnte, ähnlich wie das Antisense-Transkript, regulierend auf die *MIDI*-Expression einwirken. Vorstellbar wäre allerdings auch, dass das Sense-Transkript von Reg1d durch Bildung von RNA-Duplexen mit dem Antisense-Transkript dessen Expression bzw. Funktion reguliert. Andererseits könnte auch das Antisense-Transkript die Funktion des Sense-Transkriptes regulieren. Die Konsequenz der gegenseitigen Regulation von Sense- und Antisense-Transkript wäre die Bildung doppelsträngiger Reg1d-RNA.

Die Funktion doppelsträngiger RNA wird von ihrer Lokalisation in der Zelle bestimmt. Von den meisten viralen doppelsträngigen RNAs wird eine zytoplasmatische Lokalisation angenommen (Kumar und Carmichael 1998). Von den meisten in der Zelle natürlich vorkommenden doppelsträngigen RNAs wird hingegen angenommen, dass sie im Nukleus agieren. Das Vorkommen zytoplasmatischer RNA-Duplexe induziert die Synthese von Interferonen (Marcus 1981; Kalvakolanu und Borden 1996). Interferone sind multifunktionelle Zytokine, die Immunfunktionen modulieren und das Wachstum von Tumorzellen und die Multiplikation von Viren inhibieren können (Kumar und Carmichael 1998).

So weit bekannt ist, induzieren nukleare RNA-Duplexe die Synthese von Interferonen nicht. RNA-Duplexe im Nukleus katalysieren wahrscheinlich Adenosin-Modifikationen durch Adenosin-Deaminasen (ADARs) (Bass et al. 1997). Adenosin wird dabei zu Inosin editiert (Bass und Weintraub 1988; Wagner et al. 1989; Nishikura 1992). Für lange, perfekte RNA-Duplexe wird postuliert, dass ein extensives Adenosin zu Inosin Editing geschieht. Die resultierende RNA enthält I-U Basenpaare, wodurch die RNA-Duplexe instabil werden und sich möglicherweise teilweise oder ganz entwinden. Es wird angenommen, dass derart modifizierte lange RNA-Moleküle im Nukleus zurückgehalten und degradiert werden (Kumar und Carmichael 1998).

Um die Existenz doppelsträngiger Reg1d-RNA zu zeigen, müssten weitere Experimente durchgeführt werden. Zunächst könnte untersucht werden, ob Sense- und Antisense-Transkript nicht nur in denselben Geweben, sondern vor allem in ein und derselben Zelle in diesen Geweben exprimiert werden.

Um Hinweise auch auf die Funktion bzw. das Schicksal der RNA-Duplexe von Reg1d zu bekommen, müsste die Lokalisation dieser Duplexe in der Zelle untersucht werden.