

8 Zusammenfassung

Das Opitz BBB/G Syndrom (OS) ist eine Erbkrankheit, die durch Fehlbildungen der ventralen Mittellinie, insbesondere Hypertelorismus und Hypospadie, charakterisiert ist. OS ist mit einem autosomalen und einem X-chromosomalen Locus genetisch heterogen. Während das Gen auf dem autosomalen Genlocus noch nicht identifiziert wurde, konnte die X-chromosomale Form auf Mutationen im *MID1*-Gen zurückgeführt werden. Im offenen Leserahmen dieses Gens konnten bei etwa 68% der Patienten mit X-chromosomalem OS Mutationen gefunden werden. Die meisten Mutationen, die bei OS-Patienten identifiziert wurden, befinden sich im 3' Bereich des offenen Leserahmens des *MID1*-Gens und wirken sich somit auf den C-terminalen Bereich des MID1-Proteins aus.

Das MID1-Protein gehört zur RFP-Familie, die eine Unterfamilie der RBCC-Familie ist. Am Ende des N-Terminus befinden sich ein RING-Finger, zwei Bboxen (Bbox1, Bbox2) und eine Coiled-coil Domäne (RBCC-Domäne). Am C-terminalen Ende schließt sich eine FNIII-Domäne und eine B30.2-Domäne (RFP-Domäne) an. Es wurde gezeigt, dass MID1 makromolekulare Komplexe bildet, deren Komponenten zu Beginn dieser Arbeit weitestgehend unbekannt waren. Ähnlich wie andere Proteine der RBCC-Familie besitzt MID1 verschiedene Domänen, die an Proteininteraktionen beteiligt sind. Wir konnten vor kurzem zeigen, dass das Mikrotubulus-assoziierte MID1-Protein mit seiner Bbox1 an das $\alpha 4$ -Protein, einer regulatorischen Untereinheit der Phosphatase 2A (PP2A), bindet. Dies führt zur Übertragung von Ubiquitin auf die katalytische Untereinheit der Mikrotubulus-assoziierten PP2A (PP2Ac) und zu deren Aufbau im Proteasom. Auch MID1 mit Mutationen am C-terminalen Ende bindet an das $\alpha 4$ Protein. Es hat jedoch die Fähigkeit, an Mikrotubuli zu binden, verloren und bildet Aggregate im Zytoplasma. Eine Interaktion mit der Mikrotubulus-assoziierten PP2Ac kann somit nicht mehr stattfinden, was dazu führt, dass die Ubiquitinierung und Degradierung der Mikrotubulus-assoziierten PP2Ac verhindert wird und ihre Zielproteine hypophosphorylieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden grundsätzliche Funktionen von Bbox1 und Bbox2 im Zusammenhang mit MID1- $\alpha 4$ und MID1-Mikrotubuli-Interaktionen im Detail untersucht. Durch Immunfluoreszenz-, Immunprecipitation- und Yeast-Two-Hybrid-Experimente konnte ein neuer Pathomechanismus für OS nachgewiesen werden, der eher auf Mutationen der Bbox1 oder Bbox2-Domänen von MID1 basiert als auf Mutationen des C-Terminus. Während sich die Bbox1 für die Interaktion zwischen MID1 und $\alpha 4$ verantwortlich zeigte, ist die Bbox2 an der Regulierung der Assoziation von MID1 mit $\alpha 4$ und den Mikrotubuli beteiligt.

Als Hauptanliegen dieser Arbeit wurde der MID1-Multiprotein-Komplex mit Hilfe von Affinitätschromatographie und Massenspektrometrie identifiziert und analysiert. Neben der bekannten Assoziation mit Tubulin, konnte gezeigt werden, dass MID1 auch verschiedene

Proteine der kleinen ribosomalen Untereinheit (S3, S8, p40) und andere multifunktionale Proteine wie NPM, RACK1 und ANXA2, welche ebenfalls mit Ribosomen und RNS assoziieren, bindet. Weiterhin wurden Hitzeschock-Proteine, wie Hsp60, Hsc70 und die multifunktionalen Chaperone Hsp90 und p32, im Komplex identifiziert.

Durch weitere Charakterisierung des MID1-Protein-Komplexes, konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass das MID1-Protein, zusammen mit dem mTOR-Zielprotein $\alpha 4$, ein Mikrotubulus-assoziiertes mRNP bildet, welches aktive Polyribosome und RNS enthält, und so den regulierenden Translations-mTOR-Weg mit einer Mikrotubulus-assoziierten Translations-Einheit verbindet. Dieser Komplex reguliert wahrscheinlich den Transport der mRNS zu den Polen der Zelle, was zu asymmetrischer mRNS Lokalisierung und Protein-Produktion führt. Asymmetrische Protein-Translation ist eine wichtige Voraussetzung, damit die Zellen der Neuralleiste migrieren können und polarisierte Zellen in die Epithelial-Mesenchymale-Transition treten können. Beides sind essenzielle Prozesse bei der Entwicklung der ventralen Mittellinie. Daher bereiten die Ergebnisse dieser Arbeit eine molekulare Basis sowohl der Entwicklung der ventralen Mittellinie als auch der Pathogenese von OS.

Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass der MID1/ $\alpha 4$ -Komplex an G-Quartet-Strukturen in den 3'UTR von ephrin-B Molekülen (Liganden und Rezeptoren) bindet. Dies weist darauf hin, dass der MID1/ $\alpha 4$ -Komplex die asymmetrische Translation der ephrin-B Moleküle in Subkompartimenten der Zelle steuert. Die Regulation wichtiger Prozesse der Entwicklung der ventralen Mittellinie durch Ephrine, wie z.B. Zellhaftung und Zellmigration könnte durch diese Steuerung gewährleistet werden. Die Interaktion des MID1-Protein-Komplexes mit mRNS des Ephrin-B1 (*EFNB1*) ist besonders interessant, da mutiertes *EFNB1* zu craniofrontonasaler Dysplasie führt, einer monogenen Störung, die zu einem sehr ähnlichen Phänotypen führt wie OS. Dementsprechend bietet das hier vorgeschlagene Modell auch eine attraktive Erklärung für die offensichtliche phänotypische Übereinstimmung der zwei Krankheiten.