UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Humangenetik

Direktor der Einrichtung: Prof. Dr. med. Andreas Gal

Das Fragile X Syndrom: Untersuchung neuer Interaktionspartner des RNA-bindenden Proteins FMRP

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Maren Prunnbauer aus Kassel

Hamburg 2011

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 14.05.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. S. Kindler

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. A. Neu

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: PD Dr. F Pröls

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis III
AbbildungsverzeichnisV
TabellenverzeichnisVII
AbkürzungsverzeichnisVIII
1. Einleitung12
1.1. Das Fragile X-Syndrom12
1.2. Das Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP)15
1.3. Das humane Up-frameshift suppressor 1 homologe Protein (UPF1) 18
1.4. Das Proteinprodukt des humanen Moloney Leukemia Virus 10 Gens
(MOV10)
1.5. Arbeitshypothese und Fragestellung 25
2. Material und Methoden
2.1. Materialien
2.1.1. Chemikalien
2.1.2. Bakterienstämme, Zelllinien, Labortiere
2.1.3. Restriktionsenzyme
2. 1.4. Plasmu-DNA
2.1.4.2. Konstruierte Vektoren
2.1.4.3. Weitere eingesetzte Vektoren27
2.1.5. Kits 28
2.1.6. Oligonukleotide
2.1.7.1. Primäre Antikörper
2.1.7.2. Sekundäre Antikörper
2.2. Molekularbiologische Methoden29
2.2.1. Polymerasekettenreaktion
2.2.2. Quantifizierung von DNA
2.2.3. DNA-Gelelektrophorese, Isolierung und Aufreinigung von DNA-
2.2.4. Restriktion von DNA mit Endonukleasen
2.2.5. Ligation von DNA
2.2.6. Präparation und Transformation chemisch kompetenter Bakterien 31
2.2.7. Klonierung von DNA-Fragmenten und Sequenzierung
2.3. Zellbiologische Methoden
2.3.1. Kultivierung und transiente Transfektion von HEK293-Zellen
U2OS-Zellen
2.3.3. Fluoreszenzmikroskopie34
2.4. Proteinchemische Methoden35
2.4.1. Gewinnung von Proteinextrakten aus HEK293-Zellen

2.4.4. Transfer und immunzytochemische Detektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembran (Western Blot)	36
3. Ergebnisse	38
3.1. Konstruktion eukaryotischer Expressionsvektoren	38
3.2. Immunpräzipitation und Analyse mittels Western Blot	43
3.3. Analyse der subzellulären Lokalisation der Fusionsproteine UPF1, MOV10 und FMRP in U2OS-Zellen	51
4. Diskussion	61
5. Zusammenfassung	69
6. Literaturverzeichnis	70
7. Danksagung	82
8. Lebenslauf	83
9. Eidesstattliche Versicherung	85

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Erscheinungsbilder des Fragilen X Syndroms	. 12
Abb. 2: Pathomechanismus des Fragilen X-Syndroms und des Fragile X Tremor/Ataxia Syndrome	. 14
Abb. 3: Aufbau des FMR1 Proteins	. 16
Abb. 4: Funktion von FMRP in Neuronen	. 17
Abb. 5: Aufbau des UPF1 Proteins	. 19
Abb. 6: Helikase-Motive des humanen UPF1 Proteins	. 20
Abb. 7: Ablauf des Nonsense-mediated mRNA Decay (NMRD)	. 21
Abb. 8: Regulation der mRNA-Stabilität und der Translation durch kleine RNAs	. 23
Abb. 9: Aminosäuresequenz-Vergleich der Proteine UPF1 und MOV10	. 39
Abb. 10: Konstruktion des p <i>UPF1-</i> mRFP Vektors	. 40
Abb. 11: Konstruktion des p <i>MOV10</i> -mRFP Vektors	. 41
Abb. 12: Übersicht der hergestellten Fusionsproteine	. 42
Abb. 13: Western-Blot zur Analyse der Interaktion zwischen UPF1-mRFP un FMRP-EGFP	i d 44
Abb. 14: Western-Blot zur Analyse der Interaktion zwischen MOV10-mRFP u FMRP-EGFP	und 46
Abb. 15: Western-Blot zur Analyse der Interaktion zwischen UPF1-HD-mRFI und FMRP-EGFP	5 48
Abb. 16: Western-Blot zur Analyse der Interaktion zwischen MOV10-HD-mR und FMRP-EGFP	FP 50
Abb. 17: Subzelluläre Verteilung des Fusionsproteins UPF1-mRFP in U2OS- Zellen	51
Abb. 18: Subzelluläre Verteilung der Fusionsproteine UPF1-mRFP und FMR EGFP in U2OS-Zellen nach Kotransfektion	P- . 52
Abb. 19: Subzelluläre Verteilung von UPF1-HD-mRFP in U2OS-Zellen	. 53
Abb. 20: Subzelluläre Verteilung von UPF1-HD-mRFP und FMRP-EGFP in U2OS-Zellen nach Kotransfektion	. 53
Abb. 21: Vergleich der subzellulären Verteilung der Fusionsproteine UPF1- mRFP und UPF1-HomReg-mRFP	. 54
Abb. 22: Subzelluläre Verteilung von MOV10-mRFP in U2OS-Zellen	. 55
Abb. 23: Subzelluläre Verteilung der Fusionsproteine MOV10-mRFP und FMRP-EGFP in U2OS-Zellen nach Kotransfektion	. 56
Abb. 24: Subzelluläre Verteilung von MOV10-HD-mRFP in U2OS-Zellen	. 56
Abb. 25: Subzelluläre Verteilung der Fusionsproteine MOV10-HD-mRFP und FMRP-EGFP.	 57
Abb. 26: Vergleich der subzellulären Verteilung der Fusionsproteine MOV10 mRFP und MOV10-HD-mRFP)- . 58

Abb. 27: Verglei	eich der subzellulären Verteilung der beiden Fusion	sproteine
UPF1-	-HD-mRFP und MOV10-HD-mRFP	58
Abb. 28: Subzel	elluläre Lokalisation des Fusionsproteins FMRP-EGI	FP in U2OS-
Zellen	n	59
Abb. 29: Verglei EGFP Fusior	eich der subzellulären Lokalisation des Fusionsprot P bei gleichzeitiger Expression unterschiedlicher onsproteine	eins FMRP- 60
Abb. 30: Schem Intera Helika	natische Darstellung des unterschiedlichen aktionsverhaltens zwischen dem vollständigen MOV ase-Domäne (HD) von MOV10	/10 und der 62

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über verwendete Bakterienstämme und Zelllinien	. 26
Tabelle 2: Übersicht über verwendete Restriktionsendonukleasen	. 26
Tabelle 3: Übersicht über verwendete Grundvektoren	. 27
Tabelle 4: Übersicht über konstruierte Vektoren	. 27
Tabelle 5: Übersicht über weitere eingesetzte Vektoren	. 27
Tabelle 6: Verwendete Oligonukleotide	. 28
Tabelle 7: Eingesetzte primäre Antikörper	. 29
Tabelle 8: Eingesetzte sekundäre Antikörper	. 29
Tabelle 9: PCR-Bedingungen	. 30

Abkürzungsverzeichnis

A3G	APOBEC3G
Abb.	Abbildung
AGO	Argonaut
AK	Antikörper
armi	Armitage
as	Aminosäure(n)
As	anti-sense
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
С	Cytosin-Nukleotid
cDNA	complementary DNA
СН	Cystein-Histidin
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DCR	Dicer
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoyxribonukleosidtriphosphat
dsRNA	doppelsträngige ribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EIF2C2	eukaryotic translation initiation factor 2C2
EJC	Exon-Junction Complex
eRF	eukaryotic Release Factor
evtl.	eventuell
FCS	fetales Kälberserum
Fmr1	Fragile X linked mental retardation gene 1 [Homo sapiens]
FMRP	Fragile X Mental Retardation Protein [Homo sapiens]
FXTAS	Fragile X Tremor/ Ataxia Syndrome
FXS	Fragiles X Syndrom
G	Guanin-Nukleotid

g	Erdschwerebeschleunigung		
h	Stunde/n		
HD	Helikase-Domäne		
HEK	human embryonal kidney		
hnRNA	heterogeneous nuclear ribonucleic acid		
HRP	horse radish peroxidase		
kDa	Kilodalton		
КН	Ribonukleoprotein K Homolog		
KIF5	Kinesin Superfamily 5 protein		
LB	lysogener broth		
Μ	Molar, Mol/ Liter		
μ	Mikro (10 ⁻⁶)		
mA	milli-Amper		
mGluR	metabotroper Glutamat-Rezeptor		
min	Minute		
miRNA	micro ribonucleic acid		
MOV10	Proteinprodukt des humane <i>Moloney Leukemia Virus</i> 10 Gens		
mRFP	monomeric red fluorescent protein		
mRNA	messenger ribonucleic acid		
mRNP	messenger Ribonukleoprotein		
MW	Molekulargewicht		
n	Nano (10 ⁻⁹)		
NES	Nuclear export signal		
NKR	N-terminal gelegene konservierte Region		
NLS	Nuclear localization signal		
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat		
NMRD	nonsense-mediated mRNA decay		
nt	Nukleotid		
N-Terminus	Amino-Terminus		
NTPase	Nukleosidtriphosphatase		
OD	Optische Dichte		
o.g.	oben genannt		
ORF	open reading frame		
р	pico (10 ⁻¹²)		
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese		
p bodies	processing bodies		

PBS	phosphate buffered saline		
PBST	phosphate buffered saline mit Tween		
PCR	polymerase chain reaction		
PFA	Paraformaldehyd		
рН	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff- Protonen-Konzentration		
PMFS	Phenylmethylsulfonylfluorid		
POF	premature ovarian failure		
pre-miRNA	precursor micro ribonucleic acid		
PTC	premature termination codon		
RENT 1	Regulator of Nonsense Transcripts-1		
RGG	Arginin Glycin Glycin repeats		
RISC	RNA-induced silencing complex		
RNA	ribonucleic acid		
RNAi	RNA interference/ RNA Interferenz		
RNP	Ribonukleoprotein		
rpm	rounds per minute		
RT	Raumtemperatur		
S	sense		
sec	Sekunden		
Sen 1p	tRNA-splicing endonuclease positive effector protein		
SDS	Sodiumdodecylsulfat		
SMG-1	Suppressor of Morphogenic effect on Genitalia-1 Protein		
siRNA	short interfering RNA		
STAU	Staufen		
SURF-Komplex	Proteinkomplex aus SMG-1, UPF1 und eRF1+3		
SQ	Serin-Glutamin		
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer		
U2OS-Zellen	human bone Osteosarcoma Epithelial Cells		
u.a.	unter anderem		
U	unit		
UPF1	humanes Up-frameshift suppressor 1 homolog protein		
UPF2	humanes Up-frameshift suppressor 2 homolog protein		
UTR	untranslatierte Region		
V	Volt		
v.a.	vor allem		
v/v	Volumen pro Volumen		

Abkürzungsverzeichnis

WB	Western Blot
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel
Zn	Zink

1. Einleitung

1.1. Das Fragile X-Syndrom

Das Fragile X Syndrom (FXS) wurde 1943 erstmalig von J.P. Martin und J. Bell beschrieben und ist deshalb auch unter dem Namen Martin-Bell-Syndrom bekannt (Martin und Bell, 1943). Der Name FXS leitet sich von dem zytogenetischen Erscheinungsbild betroffener X-Chromosomen ab, die unter bestimmten experimentellen Bedingungen an der Position Xq27.3 in der Metaphase nicht vollständig kondensieren und dadurch dort eine brüchig erscheinende Stelle aufweisen (Sutherland, 1977; Harrison et al., 1983) (**Abb. 1 A**).



Abb. 1: Erscheinungsbilder des Fragilen X Syndroms

(A) Elektronenmikroskopische-Darstellung eines X-Chromosom eines FXS Patienten in der Metaphase. Der Pfeil zeigt auf die brüchig wirkende Stelle an der Position Xq27.3 (modifiziert nach Harrison et al., 1983). Fotos von Patienten mit FXS beider Geschlechter als Kinder, Heranwachsende und im Erwachsenenalter (B). Die im Text beschriebenen fazialen Auffälligkeiten sind im Erwachsenenalter am deutlichsten ausgeprägt (Busselmaier und Tariverdian, 2007; Garber et al. 2008).

Das FXS ist eine der häufigsten Ursachen für genetisch bedingte geistige Retardierung (Bell et al., 1991), wobei die Einschränkungen von leichter Lernbehinderung bis zu schwerer kognitiver Beeinträchtigung reichen. Außerdem sind bei den Patienten häufig autistische Verhaltensweisen, Hyperaktivität und andere Verhaltensauffälligkeiten zu beobachten (Hagerman et al., 1986; Reiss und Freund, 1992). Weitere klinische Merkmale sind ein Makroorchidismus bei

Einleitung

postpubertären männlichen Betroffenen und gewisse faziale Auffälligkeiten, wie ein längliches, schmales Gesicht mit großen, teilweise abstehenden Ohren, einem vorspringenden Kinn und einer vorstehenden Stirn (Hagerman et al., 1991; de Vries et al., 1998). Vor allem die fazialen Merkmale sind bei betroffenen Kindern und Frauen meist weniger stark ausgeprägt als bei betroffenen erwachsenen Männern (de Vries et al., 1998) (**Abb. 1B**). Die durchschnittliche Häufigkeit dieser Erkrankung liegt bei 1: 4000 bei Männer und 1: 8000 bei Frauen (Turner et al., 1996; Warren und Sherman 2001). Durch die zufällige X-Chromosom-Inaktivierung in den einzelnen Zellen der Frau, kommt es bei weiblichen Betroffenen zu einer sehr variablen Ausprägung der Erkrankung (de Vries et al., 1996).

Verursacht wird die Erkrankung in fast allen bekannten Fällen durch Verlängerung eines Genabschnitts im ersten Exon des *Fragile X Mental Retardation 1* Gens (*FMR1*), der aus repetitiven Cytosin-Guanin-Guanin(CGG)-Trinukleotiden besteht (Verkerk et al., 1991). Dieser Abschnitt kodiert einen Teil der 5' untranslatierten Region (UTR) der *FMR1 messsenger* Ribonukleinsäure (mRNA) (Ashley et al., 1993A). Wird eine bestimmte Anzahl von CGG-Tripletts überschritten, werden in der genomischen Desoxyribonukleinsäure (DNA) die Cytosinreste der repetitiven Sequenz sowie des stromaufwärts gelegenen Promotors methyliert, was zur Abschaltung des *FMR1*-Gens auf Transkriptionsebene führt (Pieretti et al., 1991; Bell et al., 1991; Sutcliff et al., 1992). Bei Patienten mit FXS sind daher i. d. R. weder die *FMR1* mRNA noch das *Fragile X Mental Retardation* Protein (FMRP) nachweisbar (Pieretti et al., 1991; Siomi et al 1993; Robertson und Wolffe, 2000) (Abb. 2).

In der normalen Bevölkerung umfasst der repetitive Bereich des *FMR1* Gens 6 bis 54 CGG-Motive (Fu et al., 1991). Bei Längen zwischen 45 und 54 CGG-Trinukleotidblöcken spricht man von einer intermediären Mutation und bei 55 bis 200 CGG-Trinukleotidblöcken von einer Prämutation (Fu et al., 1991). Das FXS entsteht erst bei einer Trinukleotidexpansion auf über 200 CGG-Tripletts, einer sogenannten Vollmutation (Fu et al., 1991). Da Gene, die eine Prämutation tragen, bei der Vererbung instabil sind, kann es zu einer Expansion der repetitiven Region und dadurch zum Auftreten des FXS in der folgenden Generation kommen (Fu et al., 1991; Oberle et al., 1991; Kremer et al., 1991; Nolin et al., 1996). Eine abweichende Ursache, die zu einer Form des FXS führt, wurde bei einem Patienten beobachtet, beim dem es durch eine Punktmutation zu einem Aminosäureaustausch in der Ribonukleoprotein K homologen (KH2)-Domäne von FMRP kam (De Boulle et al., 1993).



Abb. 2: Pathomechanismus des Fragilen X-Syndroms und des *Fragile X Tremor/Ataxia*

Syndrome

Schematische Darstellung möglicher Veränderungen in der repetitiven Sequenz der 5' UTR im ersten Exon des *FMR1*-Gens und der daraus resultierenden pathogenetischen Mechanismen. Bei *FMR1*-Genen, die eine Prämutation enthalten, kommt es zu einer vermehrten Bildung von *FMR1*-mRNAs, die eine toxische Wirkung auf Neurone haben können. Die Synthese von FMRP hingegen ist vermindert. Diese Konstellation führt bei etwa 10% der männlichen Prämutationsträgern zur Ausbildung des *Fragile X Tremor/Ataxia Syndrome* (FXTAS) und bei etwa 15-25% der weiblichen Prämutationsträgerinnen zu einer vorzeitigen Menopause (POF). Bei *FMR1*-Genen mit einer Vollmutation kommt es zur Methylierung der Cytosin-Reste in der repetitiven Region und des Promotors, was zu einer Abschaltung des *FMR1*-Gens führt und mit dem Fehlen von *FMR1* mRNA und FMRP in der Zelle einhergeht. Diese Veränderungen verursachen das FXS (modifiziert nach Zalfa und Bagni, 2004).

Träger von Prämutationen können von einer progressiven, multisystemischen neurologischen Störung betroffen sein, die als *Fragile X Tremor/Ataxia Syndrome* (FXTAS) bezeichnet wird (Hagerman et al., 2001; Jacquemont et al., 2003). Diese Erkrankung tritt erst im fortgeschrittenen Alter auf und äußert sich durch eine

Einleitung

zerebelläre Ataxie und/oder einen Intentionstremor. Außerdem können Hirnatrophie, Gedächtnisstörungen, Parkinsonismus sowie periphere Neuropathien auftreten (Hagerman und Hagerman 2004; Amiri et al., 2008). Im Gegensatz zum FXS, bei dem es sich um eine neuronale Entwicklungsstörung handelt, liegt beim FXTAS eine neurodegenerative Störung vor (Jaquemont et al., 2007). Bei Patienten mit FXTAS konnten erhöhte *FMR1* mRNA Spiegel gemessen werden bei grenzwertigen bis erniedrigten Konzentrationen von FMRP (Hagerman et al., 2001; Jacquemont et al., 2003). Die erhöhten *FMR1* mRNA Spiegel scheinen eine toxischen Wirkung auf gewisse Zellen zu haben (Amiri et al., 2008). Weibliche Prämutationsträger haben außerdem ein erhöhtes Risiko für ein Eintreten der Menopause vor dem 40. Lebensjahr (*premature ovarian failure* (POF)) (Schwartz et al., 1994; Murray et al., 1998; Allingham-Hawkins et al., 1999).

1.2. Das Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP)

Das Genprodukt, des aus 17 Exons bestehenden FMR1-Gens, ist das Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP) (Eichler et al 1993). Es wird in vielen fetalen und reifen Geweben exprimiert mit höchsten Konzentrationen im Gehirn und Hoden (Devys et al., 1993, Hinds et al., 1993). Es gehört zur Familie der RNA-bindenden Proteine, die an vielen Regulationsschritten des mRNA Metabolismus, wie Spleißen, Translation und mRNA Stabilität beteiligt sind (Ashley et al., 1993B; Siomi et al., 1993; Bagni und Greenough, 2005; Bassell und Warren, 2008). Als RNA-bindende Motive besitzt FMRP zwei Ribonukleoprotein K homologe Domänen (KH Domänen) und eine Region, die viele Arginin- und Glycin-Reste (RGG-Box) beinhaltet (Siomi et al 1993; Kiledjian und Dreyfuss, 1992; Adinolfi et al., 1999) (Abb. 3). Außerdem ist ein Teil des Amino(N)-Terminus von FMRP ebenfalls in der Lage, RNA zu binden, enthält aber kein gängiges RNA-Bindungsmotiv (Adinolfi et al., 1999, 2003; Bagni and Greenough, 2005). An die KH2 Domäne von FMRP können u.a. RNAs binden, die eine komplexe Tertiärstruktur besitzen, die als Kissing Complex bezeichnet wird (Darnell et al., 2005). Die RGG-Box wiederrum erkennt sogenannte G-Quartetts, eine spezielle intramolekulare Sekundärstruktur in Ziel-mRNA-Molekülen (Darnell et al., 2001). Es wurden eine Reihe von mRNAs gefunden, die mit hoher Affinität an FMRP binden (Darnell et al., 2001; Brown et al., 2001), darunter auch die eigene (FMR1) mRNA (Schaeffer et al., 2001). Einige dieser mRNAs kodieren Proteine, die

an der synaptischen oder neuronalen Entwicklung beteiligt sind (Darnell et al., 2001). Außerdem assoziiert FMRP mit nicht-kodierenden RNAs (Zalfa et al., 2003) und microRNAs (miRNAs) (Jin et al., 2004B).

Zudem besitzt FMRP sowohl ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) als auch ein nukleäres Exportsignal (NES) (**Abb. 3**), was eine Bewegung des Proteins zwischen Kern und Zytoplasma ermöglicht und evtl. zum FMRP-abhängigen Export von mRNA aus dem Kern dient (Eberhart et al., 1996; Fridell et al., 1996; Feng et al., 1997B). Obwohl kleine Mengen an FMRP im Nukleus nachgewiesen wurden, kommt es vor allem im Zytoplasma vor (Verheij et al., 1993; Devys et al., 1993; Feng et al., 1997B).



Abb. 3: Aufbau des FMR1 Proteins

Schematische Darstellung des FMR1 Proteins mit den RNA-bindenden Motiven KH1 und KH2 und der RGG Box, sowie den für den Kerntransport benötigten Motiven NLS (Kernlokalisationssignal) und NES (Kernexportsignal). Die Zahlen geben jeweils den Beginn bzw. das Ende eines Motivs in der Aminosäuresequenz an (modifiziert nach Oostra and Chiurazzi, 2001).

FMRP interagiert nicht nur mit RNAs sondern auch mit anderen Proteinen und bildet Komplexe (Ceman et al., 1999). Unter anderem ist FMRP Teil eines *messenger* Ribonukleoprotein (mRNP)-Komplexes und assoziiert im Zytoplasma mit Polysomen (Feng et al., 1997A+B; Khandjian et al., 1996; Tamanini et al., 1996), was für seine Beteiligung am mRNA Metabolismus spricht (Bagni und Greenough, 2005; De Rubeis und Bagni, 2010). Außerdem konnte die Interaktion zwischen FMRP und Argonaut (AGO) Proteinen nachgewiesen werden, die Teil eines Komplexes bilden, der an der Regulation der Translation mittels miRNAs beteiligt ist (Jin et al., 2004B; Bagni und Greenough, 2005). Der Nachweis von FMRP in verschieden schweren Zellkomplexen könnte darauf hinweisen, dass es mehrere FMRP-enthaltende Komplexe gibt, die abhängig vom zellulären Kontext und Entwicklungszustand verschiedene Funktionen wie mRNA-Transport, Stabilitätskontrolle sowie Inhibition oder Aktivierung der Translation ausüben (Bagni und Greenough, 2005; De Rubeis und Bagni, 2010).

In Neuronen ist FMRP sowohl im Zellkörper, entlang der Dendriten als auch an der Basis der Synapsen nachweisbar (Antar et al., 2004; Feng et al., 1997B; Ferrari et al., 2007). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass FMRP eine Reihe von dendritischen mRNAs bindet und dadurch an der lokalen Proteinsynthese an Synapsen beteiligt ist (Bassell und Warren, 2008) (**Abb. 4**).



Abb. 4: Funktion von FMRP in Neuronen

FMRP gelangt mittels seines NLS in den Zellkern, interagiert dort mit Proteinen und RNA/mRNA (1) und bildet so RNP-Komplexe, in denen es die gebundene RNA/mRNA aus dem Kern ins Zytoplasma transportiert. Im Zytoplasma kommt es zu einer Interaktion mit weiteren Proteinen und Komplexbildung. Diese wandern dann entlang der Dendriten zu den Synapsen. An den Synapsen findet aktivitätsabhängig die Translation der gebundenen mRNAs statt. Außerdem ist FMRP an der RNA Interferenz (RNAi) im Kern beteiligt (2) und assoziiert dort mit kleinen, nicht-kodierenden RNAs und spezifischen Proteinen (aus Bagni und Greenough, 2005).

FMR1 mRNA und FMRP werden in Form von Ribonukleoprotein(RNP)-Granula in die Dendriten transportiert, wo dann die Translation gebundener mRNAs stattfindet (Antar et al., 2004; Ferrari et al., 2007; Weiler et al., 2004). Der Transport erfolgt entlang von Mikrotubuli durch die Interaktion mit dem Motorprotein der Kinesin Superfamilie 5 (KIF5) (Dictenberg et al., 2008; Kanai et al., 2004; Antar et al., 2005). Dies ist ein aktiver und bidirektionaler Transport, der durch neuronale Aktivität reguliert wird (Kanai et al., 2004; Ling et al., 2004; Ferrari et al., 2007; Bassell und Warren, 2008). Während des Transports findet keine Translation statt (Bagni and Greenough, 2005; Costa-Mattioli et al., 2009). Erst wenn die Granula die Synapse erreicht haben, kann die Suppression der Translation durch neuronale Stimulation

Einleitung

aufgehoben werden (De Rubeis und Bagni, 2010). Werden an exzitatorischen Synapsen metabotrope Glutamat-Rezeptoren (mGluR) aktiviert, kommt es zu einer vermehrten Translation von mRNAs, z.B. der *FMR1* mRNA, und einem Anstieg der lokalen Protein-Konzentration (Weiler et al., 1997, 2004).

Eine verminderte Expression des FMR1-Gens oder das Fehlen von FMRP führt zu einer abnormen neuronalen Entwicklung. Morphologisch auffällig sind bei den Neuronen von FXS-Patienten vor allem die knopf- oder pilzförmigen Ausstülpungen der Dendriten, die auch als dendritische Dornfortsätze bezeichnet werden. Diese sind länger und dünner, unreif und in höherer Dichte vorhanden als bei nicht betroffenen Personen (Irwin et al., 2000, 2001). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass FMRP nicht für die initiale Entwicklung, sondern eher für die selektive Reifung und gezielte Elemination einzelner Synapsen gebraucht wird (Churchill et al., 2002). Die gezielte lokale Synthese von Proteinen ist eine wichtige Komponente verschiedener Formen der synaptischen Plastizität. Sie gibt Neuronen die Möglichkeit, neue Proteine genau dort und zu dem Zeitpunkt zur Verfügung zu stellen wenn sie gebraucht werden, um die Aktivität von Synapsen zu modifizieren (Steward und Schuman, 2003). Allgemein lässt sich sagen, dass FMRP vermutlich als Regulator der Proteinbiosynthese an Synapsen agiert und dadurch an der aktivitäts-abhängigen Reifung und am Umbau der postsynaptischen Elemente exzitatorischer Synapsen beteiligt ist (Churchill et al., 2002; Zalfa et al., 2003).

1st3rd Das humane Up-frameshift suppressor 1 homologe Protein (UPF1)

Helikasen sind Nukleinsäure-abhängige Nukleosidtriphosphatasen (NTPasen), die Nukleinsäure-Doppelstränge entwinden, indem sie unidirektional an einem der beiden Stränge entlang wandern (Hall und Matson, 1999). Für die Replikation des Genoms werden DNA Helikasen benötigt, die den Replikationsursprung öffnen und den DNA-Doppelstrang entwinden (Gai et al., 2010). RNA Helikasen werden für verschiedene Prozesse benötigt wie die Transkription, den Beginn der Translation, das Spleißen von *heterogeneous nuclear* RNAs (hnRNAs) und die Stabilisierung von Transkripten (Jankowsky, 2011). Das *Up-frameshift suppressor* Protein der Hefe (Upf1p) ist eine Adenosintriphosphat(ATP)-abhängige 5'-3' Helikase, die sowohl RNA als auch DNA als Substrat nutzen kann und am mRNA *Surveillance*

bzw. dem *Nonsense-mediated mRNA Decay* (NMRD) beteiligt ist (Czaplinski et al., 1995; Wenig et al., 1996A+B).

Alle Eukaryoten besitzen in ähnlicher Art und Weise die Fähigkeit zum NMRD, das heisst, sie können Transkripte mit einer Mutation, die zu einem vorzeitigen Stopp-Codon (premature termination codon (PTC)) führt, erkennen und abbauen. Dieser Prozess ist evolutionär hoch konserviert und dient als Schutz der Zelle vor der Synthese unvollständiger Proteine mit möglicherweise schädlichen Funktionen. Ursache für das Auftreten von PTCs können zufällige Nonsens- oder Frameshift-Mutationen sein (Chang et al., 2007). Der Ablauf des NMRD wurde vor allem in der Hefe Saccharomyces cerevisae untersucht. Hierbei wurde Upf1p als ein entscheidender Faktor dieses Mechanismus entdeckt (Leeds et al., 1992). Beim Menschen wurde ein Protein identifiziert, dass eine starke Homologie zum Upf1 Protein der Hefe besitzt und als RENT1 (Regulator of Nonsense Transcripts-1)(Perlick et al, 1996) bzw. UPF1 (humanes Homolog des Upf1 Protein) (Applequist et al., 1997) bezeichnet wird. Das entsprechende Gen UPF1 besteht aus einem offenen Leserahmen (Open-Reading Frame (ORF)) von 3354 Basenpaaren (bp) und liegt auf Chromosom 19 (Perlick et al., 1996). Das Polypeptid umfasst 1118 Aminosäurem (as) und besitzt ein berechnetes Molekulargewicht (MW) von 123 Kilodalton (kDa) (Applequist et al., 1997).



Abb. 5: Aufbau des UPF1 Proteins

Schematische Darstellung des UPF1 Proteins mit seiner N-terminal gelegenen konservierten Region (NKR), seiner CH-reichen Region mit drei Zink-bindenden Motiven (Zn-Motive), der aus sieben Domänen bestehenden RNA Helikase-Domäne mit Adenosintriphosphatase (ATPase) sowie dem C-Terminus mit seinem hohen Anteil an Serin- und Glutamin-Resten (SQ). Die Balken oberhalb des Proteins markieren die Regionen, in denen die putativen NES (Kernexportsignal) und NLS (Kernlokalisationssignal) liegen. Die Zahlen geben jeweils den Beginn bzw. das Ende eines Motivs in der Aminosäuresequenz an (aus Singh und Lykke-Andersen, 2006)

Der zentrale Teil von UPF1 reicht von as 489 bis 875 und beinhaltet 7 typische RNA-Helikase Motive (Applequist et al., 1997) (**Abb. 5**, **Abb. 6**). Diese Motive kommen in der gleichen Reihenfolge auch im Upf1p der Hefe (Leeds et al., 1992;

Altamura et al., 1992) und in anderen Proteinen der Superfamilie I der DNA/RNA Helikasen vor (Applequist et al., 1997; Linder und Daugeron, 2000; Fairman-Wiliams et al., 2010). Durch die deutliche Ähnlichkeit der Helikase-Domänen (HD) von UPF1, Upf1p, MOV10 und Sen1 bilden diese Proteine eine eigene Untergruppe innerhalb der Superfamilie I der Helikasen (Perlick et al, 1996; Fairman-Wiliams et al., 2010). Das UPF1 Protein besitzt neben seiner 5'-3' Helikase Aktivität auch eine Nukleinsäure-abhängige Adenosintriphosphatase (ATPase) Aktivität, sowie die Fähigkeit RNA zu binden, die durch den Kofaktor ATP moduliert wird (Bhattacharya et al., 2000). Veränderungen in dieser homologen, putativen Helikase-Domäne führen zu einem Verlust der Helikase-Funktion und damit zum eingeschränkten NMRD in der Zelle (Sun et al., 1998).

Q I. la Ib Ic н 111 Motive der HD NHSQV.....GPPGTGKT.....APSNIAV.....VRL.....TCVG.....IDESTQ..... GDHCQLGP... as-Sequenz V Va IV Vb VI Motive der HD Illa VQYRM GIITPYEGQR IASVDA FQGREKD .. ILSCVR VALTRAR as-Sequenz

Abb. 6: Helikase-Motive des humanen UPF1 Proteins

Die Abbildung zeigt die as-Sequenz der Motive der Helikase-Domäne von UPF1. Die rot beschrifteten Motive sind für die Bindung und Hydrolyse von ATP verantwortlich, die grün beschrifteten Motive dienen der Koordination zwischen Nukleinsäuren und NTP-Bindungsstellen und die blau beschrifteten Motive sind die Bereiche, an denen Nukleinsäuren z.B. in Form von RNA oder DNA binden können (in Anlehnung an Fairman-Williams et al., 2010).

Am N-Terminus enthält das humane Protein zwischen as 123 und 213 eine Cystein-Histidin (CH)-reiche Region, die eine einzigartige Form aus 3 Zink-bindenden Motiven bildet (Zn-Motiv), die für die Bindung des humanen *Up-frameshift suppressor* 2 homolgen Proteins (UPF2) an UPF1 erforderlich ist (Applequist et al., 1997; Kadlec et al., 2006). Der Carboxy(C)-Terminus besitzt einen hohen Anteil an Serin- und Glutamin(SQ)-Resten, an denen das Protein phosphoryliert und dephosphoryliert werden kann, was möglicherweise seine Interaktion mit Bindungspartnern beeinflusst (Yamashita et al., 2001; Pal et al.,2001) (**Abb. 5**).

Genomes UPF1 wird in vielen Geweben exprimiert (Perlick et al., 1996; Applequist et al., 1997), zeigt eine zytoplasmatische Verteilung (Applequist et al., 1997) und liegt in Lösung als Monomer vor (Bhattacharya et al., 2000). Obwohl das UPF1

Proteine kein klassisches NLS bzw. NES aufweist, besitzt es die Fähigkeit zwischen Nukleus und Zytoplasma zu pendeln, was vermuten lässt, dass hier ein atypischer Transportmechanismus vorliegt (Mendell e al., 2002). Diese Eigenschaft ermöglicht dem Protein direkten Einfluss auf frühe Ereignisse der mRNA Biogenese zu nehmen (Mendell et al., 2002).



Abb. 7: Ablauf des Nonsense-mediated mRNA Decay (NMRD)

Bei der im Kern durch Transkription entstandenen hnRNA (*heterogeneous nuclear* RNA) ist durch eine Mutation ein vorzeitiges Stopp-Codon (PTC) aufgetreten (I). Bei der Reifung der hnRNA zur mRNA (Spleißen) entstehen in der Nähe der Verbindungsstelle zweier Exons ein sogenannter *Exon-Junction-Complex* (EJC) (II). Die reife mRNA gelangt ins Zytoplasma, wo sich ein Ribosom an sie anlagert (III) und mit der Translation beginnt (IV). Trifft das Ribosom auf ein Stopp-Codon wird die Translation beendet. Da es sich hier um ein vorzeitiges Stopp-Codon handelt, liegt stromabwärt von diesem Stopp-Codon noch ein EJC. UPF1, ein Bestandteil des SURF Komplexes bindet an das Ribosom und stellt eine Verbindung zum EJC her. Durch diese Interaktion werden weitere Schritte eingeleitet, die zum Abbau der mutierten mRNA führen (V) und so die Zelle vor unvollständigen Proteinen mit möglicherweise schädlicher Wirkung schützt (in Anlehnung an Chang et al., 2007).

Wie bereits zuvor erwähnt, ist das UPF1 Protein ein wichtiger Faktor des NMRD und dabei sowohl an der Identifizierung als auch am Abbau von *nonsense*-mRNAs beteiligt. Beim NMRD nutzt die Zelle zur Unterscheidung zwischen einem *normalen* Stopp-Codon und einem *PTC* den *Exon-Junction Complex* (EJC). Dieser entsteht

beim Spleißen der hnRNA 20-24 Nukleotide stromaufwärts von der neu entstandenen Exon-Exon-Verbindung der reifenden mRNA. Der EJC besteht aus vier Kernproteinen und vielen transienten Faktoren, die teilweise auch nach dem Export der mRNA aus dem Kern, an diese gebunden bleiben. Im Zytoplasma bindet dann ein Ribosom an die mRNA und translatiert diese bis es auf ein Stopp-Codon trifft. Hier kommt es zur Bildung eines Proteinkomplexes aus dem Suppressor with Morphogenic effect on Genitalia-1 Protein (SMG-1), UPF1 und den eukaryotic release Faktoren 1 und 3 (eRF1 + 3), dem sogenannten SURF-Komplex. Handelt es sich bei dem erkannten Stopp-Codon um ein PTC, befindet sich hinter dem SURF-Komplex noch mindestens ein EJC. Ist dies der Fall stellt das UPF1-Protein aus dem SURF-Komplex eine Verbindung zum EJC her. Diese Interaktion leitet weitere, nicht genauer bekannte Vorgänge in der Zelle ein, die zum Abbau der erkannten mutierten mRNA führen. Befindet sich ein frühzeitiges Stopp-Codon im letzten Exon, wird dieses nicht auf diesem Wege erkannt. Neuere Ergebnisse lassen vermuten, dass verschiedene Wege des NMRD nebeneinander existieren und ablaufen (Chang et al., 2007) (Abb. 7).

1.4. Das Proteinprodukt des humanen *Moloney Leukemia Virus* 10 Gens (MOV10)

Das MOV10 Gen liegt auf Chromosom 1 (Nagase et al., 2000) und umfasst 3528 bp mit einer kodierenden Region von 3012 bp (Mooslehner et al., 1991). Es kodierte das Protein MOV10, welches aus 1003 as besteht und ca. 110 kDa schwer ist (Mooslehner et al., 1991). Das MOV10 Protein konnte in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden unter anderem in spezifischen Hirnregionen (Nagase et al., 2000). Es handelt sich bei dem Protein um eine upf-like Helikase, die als Interaktionspartner von AGO-Protein-Komplexen gefunden wurde und ähnlich wie sie in zytoplasmatischen processing bodies (p bodies) lokalisiert ist (Meister et 2005). AGO-Protein-Komplexe spielen eine wichtige Rolle bei der al., posttranskriptionalen Genregulation mittels kleiner RNAs (Jin et al., 2004A). Chendrimada et al. konnten 2007 zeigen, dass MOV10 ein Teil des RNA-induced silencing complex (RISC) ist. Außerdem wurde das MOV10 Protein in Synapsen nachgewiesen, wo es abhängig vom Aktivitätszustand des N-Methyl-D-Aspartat(NMDA)-Rezeptors an Proteasomen abgebaut wird (Banerjee et al., 2009). Die Inaktivierung eines funktionellen RISC durch den Abbau von MOV10 führt zur

Einleitung

Freisetzung der gebundenen mRNA, die dann lokal an dendritischen Dornenfortsätzen translatiert werden kann (Banerjee et al., 2009).

Nicht kodierende RNA Moleküle, die als kleine regulatorische RNAs bezeichnet werden, können gezielt die Stabilität bzw. die Translation von mRNAs regulieren, ein Vorgang der auch als RNA Interferenz (RNAi) bekannt ist. Dabei kann man beim Menschen zwei Klasse kleiner RNAs voneinander unterscheiden. Die eine wird als *short interfering RNA* (siRNA) bezeichnet und ist hauptsächlich an der Regulierung der mRNA-Stabilität beteiligt. Die andere wird als microRNA (miRNA) bezeichnet und ist für die Translationregulation verantwortlich (Meister und Tuschl, 2004).



Abb. 8: Regulation der mRNA-Stabilität und der Translation durch kleine RNAs

Bei der mRNA Regulation durch siRNAs (A) kommt es nach Bindung der siRNA an die ZielmRNA zum Abbau der erkannten mRNA. Bei der Regulation mittels miRNAs (B) hingegen kommt es nach Bindung der miRNA an die Ziel-mRNA zur Hemmung der Translation (modifiziert nach Jinek und Doundra, 2009).

siRNAs entstehen aus langen doppelsträngigen RNA-Molekülen (dsRNA), die z.B. bei der Replikation von Virus-RNA gebildet werden. Dicer (DCR), Proteine mit Endonuklease-Eigenschaften, zerteilen die dsRNA in ca. 21-25 Nukleotid-lange Stücke. Jeder der beiden siRNA-Stränge bindet an ein AGO-Protein, welches das

Einleitung

Zentrum eines RISC bildet. Dieser Komplex enthält eine Vielzahl weiterer Proteine wie z.B. MOV10 bzw. das Ortholog Armitage (armi) der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Der RISC bindet dann mittels der siRNA an die Ziel-mRNAs, wobei eine perfekte Basenpaarung zwischen siRNA und Ziel-mRNA notwendig ist. Die erkannte und am RISC gebundene mRNA wird durch den Proteine-Komplex zerteilt und die RNA-Bruchstücke freigesetzt. Ist keine mRNA mehr an den RISC gebunden, kann dieser erneut an Ziel-mRNA-Moleküle binden (Jinek und Doundra, 2009; Meister und Tuschl, 2004) (**Abb. 8** a).

miRNAs sind kleine RNAs, die von endogenen miRNA-Genen transkribiert werden und zwischen 65 und 70 Nukleotide umfassen. Im Nukleus werden die haarnadelförmigen Strukturen durch einen Proteinkomplex aus den Primärtranskripten (pri-mRNA) herausgeschnitten und dann als precursor miRNAs (pre-miRNAs) bezeichnet. Diese werden ins Zytoplasma transportiert, wo ein DCR die Schlaufe der pre-miRNA abtrennt und dadurch eine doppelsträngige miRNA entsteht. Die miRNA wird auch hier an ein AGO-Protein gebunden und bildet den Kern des RISC. Einer der beiden RNA-Stränge verbleibt im Komplex, der andere wird abgebaut. Mittels der gebundenen miRNA bindet der Komplex innerhalb der 3'-UTR an die Ziel-mRNA-Moleküle, wobei die miRNA und die mRNA innerhalb der hybridisierenden Region nur teilweise komplementär zueinander sind. Diese nicht exakte Basenpaarung verhindert das Zerschneiden der mRNA und führt zu einer Hemmung der Translation. Unter Umständen kann es zur Entfernung des Poly-A-Schwanzes (Deadenylierung) kommen, was dann im Endeffekt zum Abbau der mRNA führt (Jinek und Doundna, 2009; Meister und Tuschl, 2004) (Abb. 8 b). Bemerkenswert ist dabei, dass eine miRNA an unterschiedliche Ziel-mRNA-Moleküle binden und somit regulieren kann (Lim et al, 2005; Thomas et al., 2010).

24

1.5. Arbeitshypothese und Fragestellung

Das Fragile-X-Syndrom (FXS) gehört zu den häufigsten genetisch bedingten Formen der mentalen Retardierung und wird durch die vollständige Inaktivierung des *FMR1*-Gens verursacht. Die genauen zellulären Funktionen und der molekulare Wirkmechanismus von FMRP sind bisher allerdings noch nicht genau bekannt und aktueller Bestandteil der Forschung.

Da erste Ergebnisse der AG Kindler auf eine Interaktion von FMRP mit den RNA-Helikasen UPF1 und MOV10 hinweisen, soll im Rahmen dieser Arbeit die Assoziation der zuvor erwähnten Proteine mit FMRP in kultivierten humanen Zellen genauer untersucht werden. Neue Interaktionspartner könnten Hinweise bezüglich der zellulären Wirkweise von FMRP liefern und helfen den Pathomechanismus des FXS besser zu verstehen.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

Im Folgenden werden die verwendeten Materialien näher beschrieben.

2.1.1. Chemikalien

Alle Chemikalien wurden soweit nicht anders vermerkt von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Sigma-Aldrich (St.Louis, USA), Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), Roche (Penzberg, Deutschland) oder Roth (Karlsruhe, Deutschland) in höchstmöglicher Qualität bezogen. Die verwendeten Enzyme stammten von Fermentas (St.Leon-Rot, Deutschland), Promega (Mannheim, Deutschland) oder Roche.

2.1.2. Bakterienstämme, Zelllinien, Labortiere

Tabelle 1: Übersicht über verwendete Bakterienstämme und Zelllinien

	Name	Hersteller
Bakterienstämme	Escherichia coli XL-1 Blue	Stratagene
Zelllinie	HEK293-Zellen (human embryonal	American Type Culture
	kidney cells)	Collective (ATCC)
	U2OS-Zellen (human bone	American Type Culture
	osteosarcoma epithelial cells)	Collective (ATCC)

2.1.3. Restriktionsenzyme

Tabelle 2: Übersicht über verwendete Restriktionsendonukleasen

Enzym	Erkennungssequenz	Konzentration	Hersteller
BamHI	5'-G^GATCC-3'	10 u/µl	Fermentas
	3'-CCTAG^G-5'		
HindIII	5'-A^AGCTT-3'	10 u/µl	Fermentas
	3'-TTCGA^A-5'		
Kpnl	5'-GGTAC^C-3'	10 u/µl	Fermentas
	3'-C^CATGG-5'		
Nhel	5'-G^CTAGC-3'	10 u/µl	Fermentas
	3'-CGATC^G-5'		
Xbal	5'-T^CTAGA-3'	10 u/µl	Fermentas
	3'-AGATC^T-5'		
Xhol	5'-C^TCGAG-3'	10 u/µl	Fermentas
	3'-GAGCT^C-5'		

2.1.4. Plasmid-DNA

2.1.4.1. Grundvektoren

Tabelle 3: Übersicht über verwendete Grundvektoren

Plasmid	Hersteller	Verwendungszweck
pEGFP-N1	Clontech	Eukaryotischer Expressionsvektor, der ein Grün- fluoreszierendens Protein <u>(enhanced green</u> <u>fluorescent protein, EGFP)</u> kodiert
pmRFP-N1	Stefan Kindler modifizierter pEGFP-N1	Eukaryotischer Expressionsvektor, der ein Rot- fluoreszierendes Protein (<u>monomeric r</u> ed <u>fluorescent p</u> rotein, mRFP) kodiert

2.1.4.2. Konstruierte Vektoren

Tabelle 4: Übersicht über konstruierte Vektoren

	A
Plasmid	Beschreibung
p <i>UPF1</i> -	Basiert auf pmRFP-N1-Vektor; enthält zusätzlich die gesamte
mRFP	kodierende Region der humanen UPF1 cDNA (NM_002911.3, nt
	276-3629); kodiert das UPF1-mRFP Fusionsprotein
pUPF1-HD-	Basiert auf pmRFP-N1-Vektor; enthält zusätzlich die gesamte
mRFP	kodierende Region der Helikase-Domäne der humanen UPF1 cDNA
	(NM_002911.3, nt 2241-2984; kodiert das UPF1-HD-mRFP
	Fusionsprotein
р <i>МОV10</i> -	Basiert auf pmRFP-N1-Vektor; enthält zusätzlich die gesamte
mRFP	kodierende Region der humanen MOV10 cDNA (NM_020963.3, nt
	386-3395); kodiert das MOV10-mRFP Fusionsprotein
р <i>МОV10</i> -	Basiert auf pmRFP-N1-Vektor; enthält zusätzlich die gesamte
HD-mRFP	kodierende Region der Helikase-Domäne der humanen MOV10
	cDNA (NM_020963.3, nt 2405-3395); kodiert das MOV10-HD-mRFP
	Fusionsprotein

2.1.4.3. Weitere eingesetzte Vektoren

Tabelle 5: Übersicht über weitere eingesetzte Vektoren

Plasmid	Herkunft/ Referenz		
pEGFP-FMRP	Zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe (AG) Rob Willemsen (Schrier et al., 2004)		
pGEM-7Z(+)hUPF1 [E1485]	Zur Verfügung gestellt von HM. Jäck (Applequist et al., 1997)		
pDEST-FLAGpuro3- hMOV10	Zur Verfügung gestellt von Gunter Meister (Meister et al., 2005)		

2.1.5. Kits

Folgende Kits wurden in dieser Arbeit verwendet: QIAquick PCR Purifikation Kit (250) (Qiagen) JETquick PCR Product Purification Kit/250 (Genomed) peqGOLD Gel Extraction Kit (Peqlab) EndoFree®Plasmid Maxi Kit (10) (Qiagen)

2.1.6. Oligonukleotide

Alle eingesetzten Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen synthetisiert. Die gelieferten Oligonukleotide wurden in sterilem ddH₂O gelöst, so dass die Lösung eine Endkonzentration von 100 pmol/µl hatte.

Tabelle 6: Verwendete Oligonukleotide

Die Restriktionsschnittstellen sind gepunktet und die Kozak-Sequenz ist <u>durchgezogen</u> unterstrichen. Das Startcodon ist **fett** markiert.

Name	Sequenz, Verwendungszweck	Schnittstelle
UPF1-3s	AAAA <u>CTCGAGGCCGCCACC</u> ATGCAGCTGATC Klonierung von hUPF1-HomReg in pmRFP-N1	Xhol
UPF1- 4As	TTT <u>GGATCC</u> TTGAGCGGCCCCTCCACCAGC Klonierung von hUPF1-HomReg in pmRFP-N1	BamHI
UPF1- 11s	AAAACGTCTGCCGACGAGAAGC <u>GGTACC</u> Amplifikation der 1606 bp umfassenden C-terminalen Bereich der kodierenden Sequenz von hUPF1	Kpnl
UPF1- 14As	TAATTAATAAAAGCTTAAATACTGGGACAGCC Amplifikation der 1606 bp umfassenden C-terminalen Bereich der kodierenden Sequenz von hUPF1	HindIII
MOV10- 1s	AAAA <u>CTCGAGGCCGCCACC</u> ATGCCCAGTAAG Klonierung von hMOV10 in mRFP-N1	Xhol
MOV10- 2As	TTT <u>GGATCC</u> TTGAGCTCATTCCTCCACTCTGGC Klonierung von hMOV10 in mRFP-N1	BamHI
MOV10- 3s	AAAA <u>CTCGAGGCCGCCACC</u> ATGAGCTGGTGC Klonierung von hMOV10-HomReg in mRFP-N1	Xhol
MOV10- 4As	TTT <u>GGATCC</u> TTGAAGGGACACCCGGTATACCC Klonierung von hMOV10-HomReg in mRFP-N1	BamHI
CMV1-s	TGTCGTAACAACTCCGCCCC Sequenzierung der cDNA in den konstruierten mRFP-N1 Vektoren	
mRFP- seq-As	CGGAGCCCTCCATGCGC Sequenzierung der cDNA in den konstruierten pmRFP- N1 Vektoren	

2.1.7. Antikörper

2.1.7.1. Primäre Antikörper

Tabelle 7: Eingesetzte primäre Antikörper

Name	Verdünnung		Hersteller
	Western Blot	Immunzytochemie	
Anti-GFP rabbit polyclonal serum (A6455)	1:2000		Invitrogen/ Molecular Probes
Anti-RFP, rabbit polyclonal serum	1:2000		AG Kreienkamp
Anti-Tubulin alpha, rabbit polyclonal serum		1:200	Abcam Ab 4074

2.1.7.2. Sekundäre Antikörper

Tabelle 8: Eingesetzte sekundäre Antikörper

Name	Verdünnung		Hersteller
	Western Blot	Immunzytochemie	
HRPO-IgG Goat Anti-rabbit	1:10000		Dianova
AlexaFluor®488- anti-rabbit-IgG		1:500	Molecular Probes
AlexaFluor®546- anti-rabbit-IgG		1:500	Molecular Probes

2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.1. Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation einer spezifischen Sequenz eines DNA-Doppelstranges. Für die Amplifikationen wurde *Pfu* DNA Polymerase (Promega®) eingesetzt.

Allgemeiner Reaktionsansatz:

1 µl cDNA

- 1 µl 10 mM Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)
- 0,2 µl sense(s)-Primer (100 pmol/µl)
- 0,2 µl antisense(As)-Primer (100 pmol/µl)
- 5 µl 10 x *Pfu* DNA Polymerase-Puffer

1 μl *Pfu* DNA Polymerase (2-3 U/μl) <u>41,6 μl ddH₂O</u> Σ 50 μl

Die Amplifikation erfolgte mit Hilfe des *GeneAmp PCRSystem 2400 Thermocycler* (Perkin Elmer) nach dem Programm in **Tabelle 9**.

PCR-Programm	DNA-Amplifikation	Zyklen	Sequenzier-PCR	Zyklen
Initiale	94°C, 4 min		96°C, 5 min	
Denaturierung				
Denaturierung	94°C, 30 sek		96°C, 30 sek	
Primer-	4-6°C unter der Primer-		55°C, 15 sek	
Hybridisierung	Schmelztemperatur	35		29
Kettenverlängerung	72°C, 1 min/kb Länge		60°C, 4 min	
(Elongation)	des gewünschten			
	Produkts			
Endelongation	72°C, 7 min		72°C, 4 min	
	4°C ∞		4°C ∞	

Tabelle 9: PCR-Bedingungen

Die PCR-Produkte wurden nach Abschluss der PCR-Reaktion mit Hilfe des QIAquick® PCR Purifikation Kit (250)(Qiagen) oder des JETquick PCR Purifikation Spin Kit/250 (Genomed) aufgereinigt und als *Insert* für Subklonierungen verwendet.

2.2.2. Quantifizierung von DNA

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte durch photometrische Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm (GeneQuant Spektrometer RNA/DNA Calculator, Amersham Biosciences) oder durch eine vergleichende Abschätzung mittels Agarosegelelektrophorese (2.2.3).

2.2.3. DNA-Gelelektrophorese, Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die DNA-Gelelektrophorese mit 1%igen Agarosegelen wurde zur größenabhängigen Auftrennung von DNA-Fragmenten genutzt (Sambrook et al., 1989). Die verwendete Agarose (Invitrogen Life Technologies) wurde in 1 x TAE (Tris-Acetat-EDTA-Puffer, einfach konzentriert in wässriger Lösung; Sambrook et

Material und Methoden

al.,1989) in 1%iger Konzentration gelöst. Zu der in 1 x TAE gelösten Agarose wurden vor dem Gießen 2 µl Ethidiumbromid (Sigma) zur Detektion der DNA unter UV-Licht zugesetzt. Das feste Gel wurde in eine mit Laufpuffer (1 x TAE) gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt und die Proben, die zuvor mit 6 x DNA Lade-Puffer (10 mM Tris-HCI (7,6); 0,03% Bromphenol blau; 0,03% Xylencyanol FF; 60% Glycerol; 60 mM EDTA) versetzt worden waren, wurden in die Geltaschen gegeben. Zusätzlich wurde ein passender Größenstandard (GeneRuler[™] 100bp Plus DNA Ladder, Fermentas; MassRuler[™] DNA Ladder Mix, Fermentas) aufgetragen und anschließend die Proben bei einer Spannung von 70-120 V aufgetrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die DNA-Fragmente durch das interkallierte Ethidiumbromid am UV-Tisch (UVT 2035, Herolab) sichtbar gemacht, fotografiert und beurteilt. Bei Bedarf wurden bestimmte DNA-Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten und mittels peqGOLD Gel Extraction Kit (Peqlab) isoliert.

2.2.4. Restriktion von DNA mit Endonukleasen

Endonukleasen erkennen spezifisch DNA-Sequenzmuster und schneiden sie in typischer Weise. Sie wurden bei der Subklonierung und zur Kontrolle der fertigen Vektor-Konstrukte eingesetzt. Dazu wurde zu den PCR-Produkten oder der Plasmid-DNA das passende Restriktionsenzym (2.1.3), Restriktionsenzympuffer und ddH₂O zugegeben und damit die Reaktionsbedingungen entsprechend der Herstellerangaben geschaffen. Die Ansätze wurden 60 bis 90 min bei 37° C inkubiert. Durch die Zugabe von Ladepuffer für die Agarose-Gelelektrophorese (2.2.3) wurde die Enzymreaktion beendet.

2.2.5. Ligation von DNA

Durch Endonukleasen linearisierte Vektoren wurden mit einem drei- bis zehnfachen molaren Überschuss eines entsprechend geschnittenen DNA-Fragments und 1 U T4-DNA-Ligase (Invitrogen) nach Herstellerangaben mehrere Stunden bei Raumtemperatur (RT) oder über Nacht bei 4° C inkubiert.

2.2.6. Präparation und Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Kompetente Bakterien (E. coli XL1-Blue, Stratagene) wurden nach der KCM-Methode erzeugt (Mandel, 1970). Hierzu wurde eine 5 ml LB-Vorkultur (engl. Iysogeny <u>b</u>roth) über Nacht bei 37°C geschüttelt und dann zum Animpfen einer 500 ml Hauptkultur eingesetzt. Nach Erreichen einer OD von 0,3-0,6 bei einer Wellenlänge von 600nm wurde die Bakteriensuspension für 1 bis 2 min in Eiswasser gekühlt und anschließend 5 min mit 2700 x g bei 4° C zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 50 ml eiskaltem TSB (LB, ph 6,1; 10% PEG 3350 (w/v); 5% DMSO (v/v); 0,01 M MgSO₄; 0,01 M MgCl₂) resuspendiert, anschließend 10 bis 15 min auf Eis inkubiert, dannach aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die schockgefrorenen Aliquots wurden in -70°C überführt und dort gelagert.

2.2.7. Klonierung von DNA-Fragmenten und Sequenzierung

Für die Transformation wurden zunächst die kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut. Zum Ligationsansatz wurden 20 µl 5 x KCM (0,5 M KCI; 0,15 M CaCl₂; 0,25 M MgCl₂) gegeben und der Ansatz mit ddH₂O auf 100 µl Gesamtmenge aufgefüllt. Zu diesem Ansatz wurden 100 µl aufgetaute kompetente Bakterien hinzugefügt, das ganze 20 min auf Eis inkubiert und anschließend 5 min bei 37° C erwärmt. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium und Inkubation für 40-60 min im 37°C-Schüttler bei 130 x g wurden die Bakterien auf LB-Selektionsplatten (Sambrook et al., 1989) ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Bakterienklone, die auf den LB-Selektionsplatten gewachsen waren, wurden mit Hilfe einer Pipettenspitze aufgenommen und in ein 14 ml Falcon Tube mit 2 ml LB-Medium und dem entsprechenden Antibiotikum (Verdünnung 1:1000) überführt und in 37°C-Schüttler bei 2400 rpm über Nacht inkubiert. Aus den Bakterienkulturen wurden dann die DNA-Plasmide mittels alkalischer Lyse isoliert (Sambrook et al., 1989). Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA, wie sie für die Transfektion von Zellen benötigt wird, wurde eine Präparation mit den EndoFree® Plasmid Maxi Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die konstruierten Vektoren wurden sequenziert und ihre Nukleotidabfolge überprüft. Die Sequenzierung erfolgt nach dem Kettenabbruchverfahren (Sanger et al., 1977).

Hierzu wurde ein Reaktionsansatz hergestellt aus:

- 1 µl gereinigte Plasmid-DNA
- 2 µl 5 x Big Dye Sequenzierpuffer
- 1 µl Primer (2.1.6)
- 1 µI Big Dye Mix (Abi Prism Big Dye Terminator Kit, Applied Biosystems)
- <u>5 µl ddH₂O</u>
- ∑ 10 µl

Nach erfolgter PCR wurde eine Natrium-Acetat(Na-Ac)-Fällung durchgeführt. Dafür wurden 40 μ I H₂O, 5 μ I 3 M Na-Ac und 125 μ I 100%iges Ethanol zu der Sequenz-PCR zugegeben und gemischt. Dieser Ansatz wurde bei RT 20 min bei 14000 x g zentrifugiert und danach der Überstand abgenommen. Dann wurden 300 μ I 70%iger Ethanol zugefügt und wieder 5 min mit 14000 x g bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder entfernt und das entstandene Pellet bei 37°C getrocknet. Die getrocknete DNA wurde bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

2.3. Zellbiologische Methoden

2.3.1. Kultivierung und transiente Transfektion von HEK293-Zellen

Die aus der embryonalen Niere stammenden HEK293-Zellen (<u>human embryonal kidney</u>) wurden auf 10 cm Zellkulturschalen in *Dulbecco's Modified Eale Medium* (DMEM, Gibco) mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) (v/v), (Sigma), in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre kultiviert. Je nach Wachstum wurden die Zellen alle 3 bis 5 Tage passagiert, wozu das Medium abgesaugt, die Zellen mit 5 ml 1x PBS (136,89 mM NaCl; 2,68 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄) gewaschen und dann mit 1 ml Trypsin (0,25% Trypsin (w/v), Invitrogen in 1 x PBS) von der Schale gelöst wurden. Die Wirkung des Trypsins wurde mittels der Zugabe von DMEM/FCS gestoppt und die Zellen wurden durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die Zellsuspension wurde auf vier bis acht Platten verteilt und mit frischem DMEM/FCS auf 8 ml Gesamtmenge pro Platte aufgefüllt. Durch Vor- und Zurückbewegen wurden die Zellen möglichst gleichmäßig verteilt.

Die zwei Tage zuvor in gewünschter Dichte ausplattierten HEK293-Zellen wurden mit Hilfe von TurboFect[™] (Fermentas) nach Herstellerangaben transfiziert. Dazu wurden 10 µg DNA pro Plasmid mit 2 ml DMEM und 20 µl TurboFect gemischt, 20 min bei RT inkubiert und dann vorsichtig zu den Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen weiter bei 37°C kultiviert und ein bis zwei Tage später geerntet (2.4.1).

2.3.2. Kultivierung, transiente Transfektion und zytochemiscxhe Färbung von U2OS-Zellen

Die U2OS-Zellen wurden auf Deckgläschen ausplattiert und in DMEM/FCS in einer 5% igen CO₂-Atmosphäre kultiviert. Bei gewünschter Dichte wurden die Zellen mittels TurboFect (Fermentas) und je 1 µg der konstruierten Vektoren (Tabelle 4) transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurde das Medium von den Deckgläschen entfernt und diese 3 Mal in 1 x PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte für 15 Minuten in 4% Paraformaldehyd (PFA) in 1 x PBS bei RT. Nach erneutem Waschen mit 1 x PBS, wurden die Zellen für zwei Minuten mit 0,2% Triton X-100 in 1 x PBS permeabilisiert. Nach gründlichem Waschen in 1 x PBS wurden die Zellen mit 10% Ziegenserum in 1 x PBS (Blockierlösung) für ein bis zwei Stunden bei RT blockiert. Der primäre Antikörper (AK) wurde in geeigneter Konzentration in Blockierlösung verdünnt (Tabelle 7, Tabelle 8) und die Zellen über Nacht bei 4°C darin inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in 1 x PBS wurde der sekundäre AK in geeigneter Konzentration in Blockierlösung verdünnt (Tabelle 8) und die Zellen wurden darin 1-2 h bei RT inkubiert. Die U2OS-Zellen wurden erneut dreimal mit 1 x PBS gewaschen und mit Prolong®Gold antifade Reagenz (Invitrogen) plus 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, Molecular Probes) auf Objektträgern fixiert. U2OS-Zellen, die zuvor mit zwei Vektoren kotransfiziert worden waren, wurden ohne Zugabe eines AK direkt auf Objektträgern fixiert.

2.3.3. Fluoreszenzmikroskopie

Zur Auswertung und Dokumentation der immunzytochemisch behandelten U2OS-Zellen (2.3.2) wurde das motorisierte Durch- und Auflicht-Fluoreszenz-Mikroskop IX81 (Olympus Optical CO. (Europa) GmbH) mit der Digital Kamera C4742-80-12AG (Hamatsu Pothonics Deutschland GmbH) genutzt. Des Weiteren wurden die Programme Cell^R 3.3 (Olympus Soft Imaging Solution GmbH) für die Aufnahmen am Mikroskop sowie GIMP 2.6.10 (GNU Image Manipulation Program) und TechSmith Snagit 10.0.1 zur Auswertung und Bearbeitung der Bilder verwendet.

2.4. Proteinchemische Methoden

2.4.1. Gewinnung von Proteinextrakten aus HEK293-Zellen

Bei der Zellernte und –präparation wurde generell auf Eis bzw. bei 4°C und mit vorgekühlten Lösungen und Gefäßen gearbeitet.

Das DMEM-Medium, in dem die Zellen kultiviert worden waren, wurde abgesaugt und die Zellen wurden zwei Mal mit 5 ml eiskaltem 1 x PBS gewaschen. Dann wurde 1 ml RIPA-Puffer (10 mM Tris/HCI (pH7,5); 150 mM NaCl; 0,1% SDS; 1% Triton X-100; 1% Na-Desoxycholate; 5 mΜ EDTA) mit 1 mΜ Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und 1 x Protease-Inhibitor Cocktail COMPLETE (Boehringer) auf die Zellen gegeben und diese 15 min auf Eis lysiert. Das Zellysat wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt, weitere 30 min auf Eis inkubiert und während dessen alle 10 min gut gemischt. Das Zelllysat wurde dann 10 min bei 16000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt. Von dem Überstand wurden 50 µl als Input für die Gelelektrophorese (2.4.3) abgenommen und mit 12,5 µl 5 x Lämmli-Puffer (0,5 M DTT; 10% (w/v) SDS; 0,4 M Tris-HCI (pH 6,8); 50% (v/v) Glycin) gemischt, 5 min gekocht und dann auf Eis gestellt bzw. bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.4.2. Affinitätschromatografische Reinigung rekombinanter Proteine

Mit Hilfe der *GFP-Trap*-Methode besteht die Möglichkeit rekombinante, EGFPmarkierte Proteine durch Immunpräzipitation und Zentrifugation zu isolieren. Dazu wird eine EGFP-bindende Agarosematrix in Form kleiner Kügelchen genutzt (*GFP-Trap*[®]_A, Chromotek), die EGFP-markierte Proteine bindet. Die Proteine können nun durch Zentrifugation isoliert und anschließend durch Denaturierung von der Agarosematrix getrennt werden.

Alle Schritte wurden bei 4°C oder auf Eis durchgeführt. Zunächst wurden 15 μ I *GFP-Trap* pro Ansatz in jeweils ein Reaktionsgefäß überführt und mit Dilutionspuffer (10 mM Tris/HCI (pH7,5); 150 mM NaCI; 0,5 mM EDTA) gewaschen. Dazu wurden die Matrix 2 min bei 2700 x g zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Dann wurden 500 μ I eiskalter Dilutionspuffer zugegeben und alles durch invertieren gemischt. Erneut wurde 2 min lang bei 2700 x g zentrifugiert und der Überstand der Überstand wieder entfernt. Das Waschen der Matrix wurde insgesamt drei Mal durchgeführt.

Das gesamte Proteingemisch wurde dann zu den 15 µl gewaschener Matrix gegeben und das Ganze für ca. 2 h bei 4°C auf dem Rotator inkubiert. Bei einigen Proben wurde zusätzlich RNase A (Qiagen) in einem Verhältnis von 1:2000 zugegeben und so die in der Probe vorhandene RNA abgebaut. Anschließend wurde die Matrix-Suspension bei 2000 x g für 2 min zentrifugiert, der Überstand entfernt, die Matrix in 1ml Dilutionspuffer resuspendiert, in ein 12 ml Falcon-Tube überführt und 9 ml frischer Dilutionspuffer hinzugefügt. Die Matrix wurden erneut bei 2700 x g 2 min zentrifugieren, der Überstand entfernt und die Matrix wieder in Dilutionspuffer resuspendieren. Dieser Waschschritt wurde insgesant 8 Mal durchgeführt Nach dem letzten Waschdurchgang wurde die Matrix in 1ml Dilutionspuffer resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt, zentrifugiert und der Überstand entfernt. Um die Proteine von der Matrix zu lösen, wurden sie nach dem letzten Waschschritt mit 30 µl 2 x Lämmli resuspendiert, 10 min gekocht und dann auf Eis gestellt. Um die Matrix aus der Probe zu entfernen, wurde die Probe 2 min bei 2700 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und für die Gelelektrophorese (2.4.3) verwendet.

2.4.3. Sodiumdodexylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur größenabhängigen Auftrennung von Proteinen wurden 8%ige SDS-Polyacrylamid-Gele (Sambrook et al., 1989) genutzt, die in das Tetra Cell System (BioRad) eingesetzt wurden, dass mit SDS-Laufpuffer (192 mM Glycin; 25 mM Tris-Base; 0,1% (w/v) SDS) gefüllt war. Die SDS-Polyacrylamid-Gele wurden mit 7 µl eines Größenmarkers (PageRuler[™] Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas) und den entsprechenden Proteinproben (2.4.1 und 2.4.2) beladen. Unter Beobachtung der Markerbanden wurden die Proteine bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt.

2.4.4. Transfer und immunzytochemische Detektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembran (Western Blot)

Zur immunologischen Detektion von Proteinen wurden diese von einem SDS-Polyacrylamid-Gel (2.4.3) auf eine Nitrozellulosemembran (PROTAN® *Nitrozellulose Transfer Membrane*, Whatman®) übertragen. Der Transfer erfolgte mittels *Wet Blot* Verfahrens und entsprechender *Wet Blot*-Kammer (BioRad) nach Herstellerangaben. Dazu wurden das SDS-Polyacrylamid-Gel, das Whatman-Papier und die Nitrozellulosemembran im Transferpuffer (20% (v/v) Methanol; 192 mM
Glycin; 25 mM Tris-Base; 0,05% (w/v) SDS) äquilibriert, übereinander geschichtet und bei 100 V 90 min geblottet. Zur Kontrolle der Proteinübertragung wurde die Membran nach dem Blotten mit Ponceau Lösung (Ponceau S Solution, Sigma) gefärbt. Anschließend wurde die Membran 1 h bei RT in 10% Milchpulver in PBST (1 x PBS + 0,3% Tween 20) geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Danach die Inkubation der Membran mit dem entsprechenden primären AK (Tabelle 7), verdünnt in 10% Milchpulver in PBST, über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimalig 10 min mit PBST gewaschen. Als sekundäre AK wurden horseradish peroxidase(HRP)- gekoppelte IgG-AK (Tabelle 8), verdünnt in PBST, eingesetzt und die Membran 1 h bei RT darin geschwenkt. Im Anschluss wurde die Membran erneut dreimalig 10 min in PBST gewaschen. Zu Schluss wurden die antikörpermarkierten Proteine mittels ECL-System (SuperSignal®West Pico Stable Peroxide Solution bzw. Dura plus SuperSignal®West Pico bzw. Dura Luminol/Enhancer Solution, Thermo Scientific) detektiert. Das entstandene Signal wurde mit Hilfe eines digitalen Belichtungsgerät (Molecular Imager, Universal Hood II, 720BR/01794, BioRad) und der Software Quantity one aufgenommen. Die Auswertung und Bearbeitung der Bilder erfolgte mit GIMP 2.6.10 (GNU Image Manipulation Program) und TechSmith Snagit 10.0.1.

3. Ergebnisse

In einer bis jetzt nicht veröffentlichten medizinischen Doktorarbeit der AG Kindler wurden im Rahmen einer affinitätschromatografischen Reinigung von FMRP mehrere Proteine als mögliche Interaktionspartner gefunden. Die kofraktionierten Proteine wurden daraufhin massenspektrometrisch analysiert. Dabei wurden die Proteine UPF1 und MOV10 als mögliche Interaktionspartner identifiziert. Deren Interaktion mit FMRP soll in dieser Arbeit näher analysiert werden.

3.1. Konstruktion eukaryotischer Expressionsvektoren

Zur genaueren Untersuchung der vermuteten Interaktion von FMRP mit den oben genannten Proteinen wurden zunächst eukaryotische Expressionsvektoren konstruiert, um die entsprechenden Proteine später in eukaryotischen Zellen gezielt exprimieren zu können. Dabei sollte mittels der rekombinaten Proteine untersucht werden, ob die vermutete Interaktion zwischen FMRP und UPF1 bzw. FMRP und MOV10 in HEK 293-Zellen nachweisbar ist. Der Vektor pFMRP-EGFP (**Tabelle 5**), der das Fusionsprotein FMRP-EGFP kodiert, lag bereits vor (Schrier et al., 2004; Petrenz, 2010).

Für die Herstellung der anderen Expressionsvektoren wurde zunächst jeweils die gesamte kodierende Region der Gene *UPF1* (NM_002911.3, nt 276-3629) und *MOV10* (NM_020963.3, 386-3395) in den Vektor pmRFP-N1 eingebracht (**Tabelle 3** und **Tabelle 4**). Bei diesem Plasmid handelt es sich um ein Derivat des Vektors pEGFP-N1 (Clontech) bei dem die GFP-kodierende Region gegen die entsprechende Region der *mRFP* cDNA ausgetauscht wurde (**Tabelle 3**). Da UPF1 und MOV10 eine ähnlich aufgebaute Helikase-Domäne (HD) besitzen und dadurch beide zur gleichen Subgruppe der DNA/RNA Helikasen Superfamilie I (Leeds et al, 1992; Fairman-Williams et al., 2010) gehören, sollte im zweiten Abschnitt untersucht werden, ob diese Region für die Interaktion der Proteine mit FMRP verantwortlich ist. Ein Vergleich der as-Sequenzen von UPF1 (NP_002902) und MOV10 (NP_066014) ergab eine Übereinstimmung von 33% zwischen den as 656 bis 894 von UPF1 und den as 674 bis 940 von MOV10 (European Bioinformatics Institute, EMBL-EBI; EMBOSS Matcher - Pairwise Sequence Alignment) (**Abb. 9**).

Deshalb wurden die entsprechenden cDNA-Regionen, die diesen Teil der HD von UPF1 (NM_002911.3, nt 2241-2984) und MOV10 (NM_020963.3, nt 2405-3395)

kodieren, ebenfalls in den zuvor erwähnten pmRFP-N1 Vektor eingebracht (siehe **Tabelle 4**).

UPF1	656	QLILV <mark>GDHCQLGP</mark> VVMCKKAAKAGLSQSLFERLVVLGIRP-
MOV10	674	QLVLA <mark>GDPRQLGP</mark> VLRSPLTQKHGLGYSLLERLLTYNSLYKKGPDGYDPQ
		llla
UPF1	696	IRLQ <mark>VQYRM</mark> HPALSAFPSNIFYEGSLQNGVTAADRVKKGFDFQWPQPD
		· · · · <u>· · · · · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·</u>
MOV10	724	FITKLL <mark>RNYRS</mark> HPTILDIPNQLYYEGELQACADVVDRERFCRWAGLPRQG
UPF1	744	KPMFFYVTQGQEEIASSGTSYLNRTEAANVEKITTKLLKAGAK
		. : . : : . ! . .
MOV10	774	FPIIFHGVMGKDEREGNSPSFFNPEEAATVTSYLKLLLAPSSKKGKARLS
		IV V Va
11011	707	DDAT CT TTDYECOD CYL MAY ACCOUNTE A CUDA FOCDER
OFFI	/8/	PDQ1G111F1EGQK21D/QIMQF3G3DHIKDIQE/E
OFFI	/8/	
MOV10	824	PDQIGITIPTEGOR State
MOV10	824	PDQIGITIPTESQR STATUSTAGE SUBTICE I: I: PRSVGVISPYRKQV EKIRYCITKLDRELRGLDDIKDLK Vb VI
MOV10 UPF1	824 835	PDQIGITFFEGQK Stargerses I: I PRSVGVISPYRKQV EKIRYCITKLDRELRGLDDIKDLK Vb VI DFIILSCVR ANEHQGIGFLNDPRRLN VALTRAR YGVIIVGNPK
MOV10 UPF1	824 835	PDQIGITFIEGQK Start of the second
MOV10 UPF1 MOV10	 824 835 874 	PDQIGITFFEGQKS11VQINQFSGSLATKLIQEVEIRSVDAFQGKEK : : . PRSVGVISPYRKQV EKIRYCITKLDRELRGLDDIKDLK VGSVEEFQGQER Vb VI DFIILSCVR ANEHQGIGFLNDPRRLN VALTRAR YGVIIVGNPK SVILISTVR SQSFVQLDLDFNLGFLKNPKRFN
MOV10 UPF1 MOV10	824835874	<pre>PDQIGITIFIEGQKSTEVQINQFSGSERTKE=TQEVEIRSVDAFQGKEK : : : . . : : PRSVGVISPYRKQV EKIRYCITKLDRELRGLDDIKDLKVGSVEEFQGQER Vb VI DFIILSCVRANEHQGIGFLNDPRRLNVALTRARYGVIIVGNPK :: . ::</pre>
MOV10 UPF1 MOV10 UPF1	 87 824 835 874 878 	PDQIGITIFIEGQKSTRVQTMQFSQSERTKE=fqEversodAFQGKEK : : PRSVGVISPYRKQV EKIRYCITKLDRELRGLDDIKDLK VGSVEEFQQQER Vb Vb DFIILSCVRANEHQGIGFLNDPRRLNVALTRAR YGVIIVGNPK :: SVILISTVRSSQSFVQLDLDFNLGFLKNPKRFNVAVTRAK ALSKQPLWNHLLNYYKE
MOV10 UPF1 MOV10 UPF1	824 835 874 878	<pre>PDQIGITIFIEGQKSTEVQTMQFSGSTERRE=TQEVETRSVDAFQGREA : : . . : : PRSVGVISPYRKQV EKIRYCITKLDRELRGLDDIKDLKVGSVEEFQGQER Vb DFIILSCVRANEHQGIGFLNDPRRLNVALTRAR YGVIIVGNPK :: . :: SVILISTVRSSQSFVQLDLDFNLGFLKNPKRFNVAVTRAKALLIIVGNPL ALSKQPLWNHLLNYYKE 894 . . .:. </pre>

Abb. 9: Aminosäuresequenz-Vergleich der Proteine UPF1 und MOV10

Beim Sequenz-Vergleich der beiden Proteine UPF1 und MOV10 zeigt sich eine Übereinstimmung der as-Sequenz von 33% im C-terminalen Teil der HD, der die Motive III bis VI umfasst (gelb hinterlegt). Die identischen as sind mit einem Balken (I) markiert. In 48,3% kommen in diesem Abschnitt as mit ähnlichen Eigenschaften vor, die hier mit einem Doppelpunkt (:) gekennzeichnet sind (European Bioinformatics Institute, EMBL-EBI; EMBOSS Matcher - Pairwise Sequence Alignment). Anhand dieses Vergleichs wurden die cDNA-Abschnitte ausgewählt, die in die eukaryotischen Expressionsvektoren eingebracht wurden.

Für die Konstruktion der benötigten Expressionsvektoren wurde das Plasmid E1485 [pGEM-7Z(+)hUPF1] (Applequist et al., 1997) (**Tabelle 5**) in chemokompetenten Bakterien vermehrt, isoliert und die kodierende Sequenz der *UPF1*-cDNA mit den Restriktionsenzymen Xbal und BamHI aus dem Vektor ausgeschnitten (**Abb. 10 I**). Der Restriktionsansatz wurde in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und das 3543 bp große DNA-Fragment, das der gesamten kodierenden Region des *UPF1*-Gens entspricht, wurde aus dem Gel isoliert und aufgereinigt. Der pmRFP-N1 Vektor wurde in zwei Schritten mit den Restriktionsenzymen BamHI und Nhel linearisiert und mit dem *UPF1* cDNA-Fragment ligiert. Der neu entstandene Vektor wurde fortan als p*UPF1*-(mRFP) bezeichnet (**Abb. 10 II**). Da das ausgeschnittene *UPF1* cDNA-Fragment am Ende seiner Sequenz ein Stopp-Codon

(TAA) enthielt, wurde dieses und die stromabwärts gelegene 3'-UTR aus dem Vektor entfernt. Dazu wurde der Vektor pUPF1-(mRFP) mit den Restriktionsenzymen Kpnl und Hindlll in zwei ca. 7000 bp und 1681 bp große Fragmente geschnitten. Diese wurden im Agarosegel aufgetrennt und das 7000 bp große Fragment wurde isoliert und gereinigt. Das 1681 bp große Fragment enthielt den 3'-gelegenen Abschnitt der kodierenden Region der UPF1-cDNA und die 3'-UTR, die im nächsten Schritt durch ein neu synthetisiertes DNA-Fragment ersetzt wurde. Mittels PCR mit den Oligonukleotiden hUPF1-11s und -14as wurden die letzen 1606 bp der kodierenden Region der UPF1-cDNA ohne Stopp-Codon amplifiziert (Abb. 10 II + III). Das Fragment wurde passend zum Vektor mit den entsprechenden Restriktionsenzymen KpnI und HindIII geschnitten, gereinigt und mit dem linearisierten 7000bp großen Teil des pUPF1-(mRFP) Vektor ligiert, so dass am Ende der gewünschte Expressionsvektor pUPF1-mRFP entstand (Abb. 10 IV). Dieser kodiert das Fusionsprotein UPF1-mRFP (Abb. 12 I).



Abb. 10: Konstruktion des pUPF1-mRFP Vektors

Schematische Darstellung eines Abschnittes des Vektors pGEM-7Z(+)hUPF1 mit der kodierenden Region der humanen *UPF1*-cDNA mit Startkodon (ATG), Stoppkodon (TAA) und 3'-UTR, sowie den Restriktionsschnittstellen Xbal und BamHI (I). Über die Schnittstellen Xbal und BamHI wurde die kodierende Region aus dem Vektor (I) ausgeschnitten und in den linearisierten pmRFP-N1 Vektors eingefügt, so dass der Vektor p*UPF1*-(mRFP) entstand (II). Mit Hilfe der Oligonukleotide UPF1-11s (\rightarrow) und UPF1-14as (\leftarrow) wurde ein 1606 bp großes Fragment aus der 3'-Region des Gens amplifiziert mit Verlust des Stoppkodons (III). Mittels der Restriktionsenzyme KpnI und HindIII wurde ein 1681 bp großes Fragment aus dem p*UPF1*-(mRFP) Vektor ausgeschnitten und der neu synthetisierte 1606 bp große cDNA-Abschnitt über dieselben Schnittstellen eingebracht, so dass der gewünscht Vektor p*UPF1*-mRFP(IV) entstand.

Für die Konstruktion des Vektors p*MOV10*-mRFP Vektors wurde das Plasmid pDEST-FLAGpuro3-hMOV10 (Meister et al., 2005) in kompetente E.coli Bakterien eingebracht, vermehrt, isoliert und als Matrize für eine PCR eingesetzt. Mit den Oligonukleotiden MOV10-1s und -2as, die die gesamte kodierende Region des *MOV10*-Gens einfassen, konnte die *MOV10*-cDNA amplifizert werden (**Abb. 11 I**). Das Amplifikat wurde gereinigt, mit den Restriktionsenzymen Xhol und BamHI geschnitten, wieder gereinigt und mit dem entsprechend linearisierten Vektor pmRFP-N1 ligiert, so dass der Vektor p*MOV10*-mRFP entstand (**Abb. 11 II**). Dieser Vektor kodiert das Fusionsprotein MOV10-mRFP (**Abb. 12 II**).



Abb. 11: Konstruktion des pMOV10-mRFP Vektors

Schematische Darstellung eines Abschnittes des Vektors pDEST-FLAGpuro3-hMOV10 mit der kodierenden Region der humanen *MOV10* cDNA mit Startkodon (ATG), Stoppkodon (TGA) sowie den Restriktionsschnittstellen XhoI und BamHI (I). Mit Hilfe der Oligonukleotide MOV10-1s (\rightarrow) und MOV10-2as (\leftarrow) und dem o.g. Vektor als Matrize wurde die gesamte kodierende Region des *MOV10*-Gens amplifiziert und über die Schnittstellen XhoI und BamHI in den entsprechenden linearisierten pmRFP-N1 Vektor eingebracht. Dadurch entstand der gewünschte Vektor p*MOV10*-mRFP (II).

Für die Amplifikation der cDNA-Abschnitte, die die HD kodieren, wurden die Oligonukleotide UPF1-3s und UPF1-4as, sowie MOV10-3s und MOV10-4as eingesetzt. Diese Genabschnitte wurden fortan als *UPF1-HD* bzw. *MOV10-HD* bezeichnet. Die 777 bp (*UPF1-HD*) bzw. 861 bp (*MOV10-HD*) großen PCR-Produkte wurden mittels QIAquick PCR-Purification Kit(250) (Qiagen) gereinigt. Die gereinigten DNA-Produkte wurden über die Schnittstellen Xhol und BamHI in den entsprechend linearisierten pmRFP-N1 Vektor eingebracht.

In allen neu konstruierten Vektoren wurden die entsprechenden neu eingebrachten cDNA-Regionen sowie die flankierenden Bereiche sequenziert.

Die hergestellten Vektoren kodieren die Fusionsproteine UPF1-mRFP, MOV10mRFP, UPF1-HD-mRFP, MOV10-HD-mRFP und FMRP-EGFP und sind in **Abb. 12** schematisch dargestellt.



Abb. 12: Übersicht der hergestellten Fusionsproteine

Schematische Darstellung der durch die konstruierten Vektoren synthetisierten Fusionsproteine (I) UPF1-mRFP, (II) MOV10-mRFP, (III) UPF1-HD-mRFP, (IV) MOV10-HD-mRFP und (V) FMRP-EGFP. Alle fünf Fusionsproteine besitzen eine carboxyterminal gelegene "fluoreszierende" Domäne (*monomeric red fluorescent protein* (mRFP) bzw. *enhanced green fluorescent protein* (EGFP)).

Die hergestellten Expressionvektoren können zur gezielten Synthese des zu untersuchenden Proteins bzw. von Abschnitten des Proteins in Zellen genutzt werden. Dadurch ist es möglich große Mengen dieses Proteins für die folgenden Versuche herzustellen.

Die an die Proteine UPF1 und MOV10 zusätzlich angefügte "fluoreszierende" Domäne ermöglicht u.a. die Detektion der Proteine in den Zellen mittels Fluoreszenzmikroskop. Dies ist einerseits eine gute Kontrolle, ob das Protein in der Zelle synthetisiert worden ist und dient anderseits zur genaueren Lokalisation des Proteins in der Zelle, ohne das eine zusätzliche immunzytochemische Färbung nötig ist. Außerdem wurde die EGFP-Domäne genutzt um das Fusionsprotein FMRP-EGFP selektiv aus dem Zellhomogenat zu isolieren. Dazu wurden Antikörper (AK) gegen GFP genutzt, die an Agarosekügelchen gebunden sind und als *GFP-Trap* bezeichnet werden. Des Weiteren war es durch die angehängte Domäne möglich, die Fusionsproteine im Western Blot über GFP- bzw. RFP-AK zu detektieren.

3.2. Immunpräzipitation und Analyse mittels Western Blot

Für die Untersuchung der Interaktion zwischen den Proteinen UPF1 bzw. MOV10 und FMRP wurden HEK293-Zellen mit den konstruierten Vektoren transfiziert, um die zu untersuchenden Fusionsproteine in den Zellen in hoher Konzentration synthetisieren zu lassen. Durch die fluoreszierende Eigenschaft der Fusionsproteine konnte die Proteinkonzentration am Fluoreszenzmikroskop grob abgeschätzt werden.

Die auf 10 cm Kulturschalen gewachsenen HEK293-Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 70 % transfiziert. Dazu wurden pro Platte 2 ml DMEM mit 10 µg pUPF1-mRFP Vektor bzw. pMOV10-mRFP Vektor und 10 µg pFMRP-EGFP Vektor sowie 20 µl TurboFect gemischt, inkubiert und nach 20 min vorsichtig zu den Zellen gegeben. Als Kontrolle wurde zusätzlich eine Kotransfektion des pUPF1-mRFP Vektors bzw. pMOV10-mRFP Vektors mit dem Vektor EGFP-N1 anstatt des pFMRP-EGFP Vektors durchgeführt. Die Zellen wurden je nach Wachstum und Intensität der Fluoreszenz nach 48 bis 72 Stunden post transfectionem geerntet, lysiert und das gesamte Proteingemisch (Homogenat) einer Kulturschale für eine Immunpräzipitation eingesetzt. Zum Proteingemisch wurden 15 µl GFP-Trap hinzugegeben. Hierbei handelt es sich um Agarosekügelchen an die AK gegen GFP gekoppelt sind. Die AK binden selektiv an GFP/EGFP und ermöglichen die Isolierung dieser Proteine. Außerdem wurde in einigen Homogenat-Proben die RNA durch die Zugabe von RNAse A vollständig abgebaut, um einen Hinweis zu bekommen, welche Interaktionen RNA-abhängig sind. Für die Analyse der Ergebnisse der Immunpräzipitation wurden das Zellhomogenat (Input) und das Eluat der Immunpräzipitation (Präzipitat) auf ein 0,75 mm dickes 8% iges Polyacrylamid-Gel aufgetragen und die Proteine im Gel der Größe nach aufgetrennt. Danach wurden die Proteine aus den Acrylamid-Gelen im Wet-Blot-Verfahren auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Anschließend wurden die rekombinanten Proteine mittels anti-GFP-AK bzw. anti-RFP-AK (Tabelle 7) detektiert.

Die Membran in **Abb. 13** zeigt die erfolgreiche Synthese der rekombinaten Proteine UPF1-mRFP, FMRP-EGFP und EGFP in HEK293-Zellen sowie das Ergebnis der Immunpräzipitation dieser Fusionsproteine. In den Ausgangshomogenaten (Input) erkennt der GFP-AK das bei 110 kDA laufende, rechnerisch 99,1 kDa schwere Fusionsprotein FMRP-EGFP (Spur 8) sowie das 28 kDa schwere EGFP (Spur 9).

43

Ergebnisse

Diese Banden bestätigen, dass diese Proteine in den transfizierten Zellen synthetisiert wurden und im Zellhomogenat enthalten waren, das dann für die Immunpräzipitation eingesetzt wurde. Neben diesen Banden detektiert der GFP-AK in Spuren 8 und 9 ein weiteres ca. 70 kDa schweres Protein, bei dem es sich vermutlich um ein zelleigenes Protein handelt, das durch eine Kreuzreaktivität des GFP-AK detektiert wird. Während der Immunpräzipitation bindet sowohl FMRP-EGFP als auch EGFP an die GFP-AK der *GFP-Trap*, wodurch eine selektive Isolierung dieser Proteine ermöglicht wird. Der Nachweis einer Proteinbande in Spur 6 und Spur 7 zeigt, dass die Proteine FMRP-EGFP (Spur 6) und EGFP (Spur 7) erfolgreich präzipitiert wurden.



Abb. 13: Western-Blot zur Analyse der Interaktion zwischen UPF1-mRFP und FMRP-EGFP

Die Abb. 13 zeigt die auf der Nitrozellulose-Membran mittels anti-RFP-AK (Spur 1-5) bzw. anti-GFP-AK (Spur 6-9) detektierten Proteine. Als Input (Spur 1,2,8,9) wurden jeweils 4 µl der Zellhomogenate aufgetragen, die danach zur Immunpräzipitation eingesetzt wurden. Die Präzipitate (Spur 3-7), von denen jeweils 10 µl aufgetragen wurden, enthalten die Proteine, die bei der Immunpräzipitation gebunden wurden. Spur 1 und 2 zeigt das 149 kDa schwere Fusionsprotein UPF1-mRFP. Spur 3 dient zur Kontrolle und zeigt keine Proteinbande. In Spur 4 und 5 stellt sich das kopräzipitierte Fusionsprotein UPF1-mRFP dar, wobei es in Spur 4 durch die Zugabe von RNAses A zu einem Intensitätsverlust der Proteinbande kommt. In der Mitte der Membran wurden 7 µl eine Größenmarker (M) (PageRulerTMPlus Prestained Protein Ladder, Fermentas) aufgetragen. Das in Höhe von 110 kDa laufende Fusionsprotein FMRP-EGFP kann vor (Spur 8, oberste Bande) und nach (Spur 6) der Präzipitation nachgewiesen werden. Das zur Kontrolle verwendete 28 kDa schwere EGFP ist ebenfalls vor (Spur 9) und nach (Spur 7) der Präzipitation zu detektieren.

Ergebnisse

Auf der linken Seite des Markers (M) wurden die gleichen Proben wie auf der rechten Seite aufgetragen. Hier wurde aber zum Nachweis der rekombinanten Proteine ein RFP-AK verwendet. Dabei wird deutlich, dass beide Zellhomogenate (Spur 1 und 2) das 149 kDa schwere Fusionsprotein UPF1-mRFP enthalten. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass bei der Isolation von FMRP-EGFP auch das Fusionsprotein UPF1-mRFP kopräzipitiert wird (Spur 5). In Spur 4 sieht man im Vergleich zu Spur 5 eine leicht abgeschwächte Bande des Fusionsproteins UPF1-mRFP, was vermuten lässt, dass der Abbau der RNA durch die Zugabe von RNAse A die Präzipitation von UPF1-mRFP mittels FMRP-EGFP nur in einem geringen Maß beeinflusst. Dieses Ergebnis lässt annehmen, dass FMRP und UPF1 mittels einer Protein-Protein-Interaktion miteinander assoziieren. Jedoch gibt die durchgeführte Immunpräzipitation keine Informationen darüber, ob die beobachtete Interaktion direkt zwischen UPF1 und FMRP abläuft oder über andere, zwischengeschaltete Proteine vermittelt wird. Spur 3 dient als Kontrolle und zeigt keine Bande. Hier wurde das Präzipitat der Probe aufgetragen, die die Fusionproteine UPF1-mRFP und EGFP enthielt. Da hier keine Bande des UPF1mRFP Proteins detektiert werden kann, festigt dieses Ergebnis die Annahme, dass UPF1-mRFP nicht mit EGFP interagiert und der FMRP-Teil des Fusionsproteins für die Interaktion mit UPF1-mRFP verantwortlich ist.

Die Membran in Abb. 14 zeigt die erfolgreiche Synthese der rekombinaten Proteine MOV10-mRFP, FMRP-EGFP und EGFP in HEK293-Zellen sowie das Ergebnis der Immunpräzipitation dieser Fusionsproteine. In den Ausgangshomogenaten erkennt der GFP-AK das bei 110 kDa laufende Fusionsprotein FMRP-EGFP (Spur 8) sowie das 28 kDa schwere EGFP (Spur 9). Diese Banden bestätigen, dass diese Proteine im Zellhomogenat enthalten waren, das dann für die Immunpräzipitation eingesetzt wurde. Neben diesen Banden zeigt sich in beiden Spuren eine weitere Bande, die sich auf Höhe des 70 kDa Markers befindet. Diese Bande kommt vermutlich durch eine Kreuzreaktivität des GFP-AK mit einem zelleigenen Protein zustande. Im aufgetragenen Präzipitaten in Spur 6 stellt sich eine Bande in Höhe von 110 kDa dar und in Spur 7 in Höhe von 28 kDa. Diese Banden bestätigen die erfolgreiche Präzipitation der Proteine FMRP-EGFP und EGFP. Mit Hilfe eines RFP-AK konnte nachgewiesen werden, dass beide Zellhomogenate (Spur 1 und 2) das 139 kDa schwere Fusionsprotein MOV10-mRFP enthalten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass bei der Isoloation von FMRP-EGFP auch das Fusionsprotein MOV10mRFP kopräzipitiert wurde (Spur 5). In Spur 4 kann das Fusionsprotein MOV10mRFP nicht mehr detektiert werden, was vermuten lässt, dass der Abbau der RNA durch die Zugabe von RNAse A die Präzipitation von MOV10-mRFP mittels FMRP-EGFP verhindert. So gibt dieses Ergebnis einen Hinweis darauf, dass die Interaktion zwischen FMRP und MOV10 RNA-vermittelt ist und durch die Zugabe von RNAse gestört wird. Spur 3 dient als Kontrolle und zeigt keine Bande. Hier wurde das Präzipitat der Probe aufgetragen, die die Fusionproteine MOV10-mRFP und EGFP enthielt. Da hier keine Bande des MOV10-mRFP Proteins detektiert werden kann, festigt dieses Ergebnis die Annahme, dass MOV10-mRFP nicht mit EGFP interagiert und der FMRP-Teil des Fusionsproteins für die Interaktion mit MOV10mRFP verantwortlich ist.



Abb. 14: Western-Blot zur Analyse der Interaktion zwischen MOV10-mRFP und FMRP-EGFP

Die **Abb. 14** zeigt die auf der Nitrozellulose-Membran mittels anti-RFP-Antikörper (Spur **1-5**) bzw. anti-GFP-Antikörper (Spur **6-9**) detektierten Proteine. Als **Input** (Spur **1,2,8,9**) wurden jeweils 4 µl der Zellhomogenate aufgetragen, die danach zur Immunpräzipitation eingesetzt wurden. Die **Präzipitate** (Spur **3-7**), von denen jeweils 10 µl aufgetragen wurden, enthalten die Proteine, die bei der Immunpräzipitation gebunden wurden. Spur **1 und 2** zeigt das 139 kDa schwere Fusionsprotein MOV10-mRFP. Spur **3** dient zur Kontrolle und zeigt keine Proteinbande. In Spur **4** kann nach der Zugabe von RNAses A kein MOV10-mRFP mehr kopräzipitiert werden. Ohne Zugabe von RNAse A hingegen gelingt die Kopräzipitation des Fusionsprotein MOV10-mRFP (Spur **5**). In der Mitte der Membran wurden 7 µl eine Größenmarker (**M**) (PageRulerTMPlus Prestained Protein Ladder, Fermentas) aufgetragen. Das in Höhe von 110 kDa laufende Fusionsprotein FMRP-EGFP kann vor (Spur **8**, oberste Bande) und nach (Spur **6**) der Präzipitation nachgewiesen werden. Das zur Kontrolle verwendete 28 kDa schwere EGFP ist ebenfalls vor (Spur **9**) und nach (Spur **7**) der Präzipitation zu detektieren.

Ergebnisse

Da die Proteine UPF1 und MOV10 zu der Familie der *upf-like* DNA/RNA Helikasen gehören (Fairman-Williams et al., 2010), besitzen beide Proteine eine aus sieben Motiven aufgebaute Helikase-Domäne mit einer deutlichen Aminosäure-Übereinstimmung (**Abb. 6**, **Abb. 9**). Aufgrund dieser Ähnlichkeit der beiden Proteine bestand die Vermutung, dass die HD eventuell für die Interaktion mit FMRP verantwortlich ist. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurden die zuvor beschriebenen Versuche noch einmal mit Vektoren durchgeführt, die Fusionsproteine kodieren, die einen Teil der HD von UPF1 bzw. MOV10 enthalten (**Abb. 12 III** und **IV**).

Nach der Transfektion der HEK293-Zellen mit dem *pUPF1-HD*-mRFP Vektor wurde nur ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal in den transfizierten Zellen beobachtet, was einen Hinweis auf eine sehr geringe Syntheserate bzw. Stabilität des Fusionsproteins gab. Diese Beobachtung betraf nicht nur das UPF1-HD-mRFP Fusionsprotein, sondern auch die von den kotransfizierten Vektoren kodierten Proteine. So wurden FMRP-EGFP bzw. EGFP bei gleichzeitiger Synthese mit hUPF1-HD-mRFP weniger exprimiert als ohne das UPF1-HD-mRFP Fusionsprotein. Unklar war dabei, ob das UPF1-HD-mRFP Fusionsprotein schlecht synthetisiert oder vermehrt abgebaut wurde und wie es die Synthese bzw. den Abbau der anderen Proteine beeinflusste.

Trotz der schwachen Fluoreszenz der transfizierten HEK293-Zellen enthielten sie ausreichende Mengen an Fusionsproteinen, um die Immunpräzipitation mittels *GFP*-T*rap* durchzuführen. Auch hier (**Abb. 15**) konnten, wie bereits bei den anderen Western Blots beschrieben, im Zellhomogenat die Proteine FMRP-EGFP (Spur 8) und EGFP (Spur 9) nachgewiesen werden. Das alleinige Erscheinen der FMRP-EGFP-Bande in Spur 6 und der EGFP-Bande in Spur 7 spricht für eine erfolgreich durchgeführte Präzipitation der Proteine. Betrachtet man nun die Intensität der beiden Banden in Spur 8 fällt auf, dass die Bande, die vermutlich durch eine Kreuzreaktivität des GFP-AKs zustande kommt und bei ca. 70 kDa lauft, viel kräftiger ist als die FMRP-EGFP-Bande. Vergleicht man dieses Ergebnis mit den zuvor durchgeführten Versuchen (**Abb. 13**, **Abb. 14**), sie man, dass dort die Banden in der Spur 8 eine ähnliche Intensität aufweisen. Dies lässt vermuten, dass die Konzentration von FMRP-EGFP im Zellhomogenat relativ gering war, was gut zu der oben beschriebenen Beobachtung der stark reduzierten Fluoreszenz in den mit pUPF1-HD-mRFP transfizierten Zellen passt.



Abb. 15: Western-Blot zur Analyse der Interaktion zwischen UPF1-HD-mRFP und FMRP-EGFP

Die Abb. 15 zeigt die auf der Nitrozellulose-Membran mittels anti-RFP-Antikörper (Spur 1-5) bzw. anti-GFP-Antikörper (Spur 6-9) detektierten Proteine. Als Input (Spur 1,2,8,9) wurden jeweils 4 µl der Zellhomogenate aufgetragen, die danach zur Immunpräzipitation eingesetzt wurden. Die Präzipitate (Spur 3-7), von denen jeweils 10 µl aufgetragen wurden, enthalten die Proteine, die bei der Immunpräzipitation gebunden wurden. Spur 1 und 2 zeigt das ca. 55 kDa schwere Fusionsprotein UPF1-HD-mRFP. Spur 3 dient zur Kontrolle und zeigt keine Proteinbande. In Spur 4 und 5 stellt sich das kopräzipitierte Fusionsprotein UPF1-HD-mRFP dar, wobei es in Spur 4 durch die Zugabe von RNAses A zu keiner Veränderung der Proteinbande kommt. In der Mitte der Membran wurden 7 µl eine Größenmarker (M) (PageRuler[™]Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas) aufgetragen. Das in Höhe von 110 kDa laufende Fusionsprotein FMRP-EGFP kann vor (Spur 8, oberste Bande) und nach (Spur 6) der Präzipitation nachgewiesen werden. Das zur Kontrolle verwendete 28 kDa schwere EGFP ist ebenfalls vor (Spur 9) und nach (Spur 7) der Präzipitation zu detektieren.

Auf der linken Seite der Membran (**Abb. 15**) sieht man auf Höhe der 55 kDA Markerbande das Fusionsprotein UPF1-HD-mRFP, das eine rechnerische Größe von 53,7 kDa besitzt. Auffällig sind die Nebenbanden in den Spuren 1 und 2, die vermutlich durch Kreuzreaktivität des polyklonalen RFP-AK mit zelleigenen Proteinen zustande kommen. In den Spuren, in denen das Präzipitat aufgetragen wurde, zeigt sich, dass das Fusionsprotein UPF1-HD-mRFP zusammen mit FMRP-EGFP präzipitiert wurde (Spur 5) und die Zugabe von RNAse A diese Interaktion nicht beeinflusst (Spur 4). Spur 3 dient als Kontrolle und zeigt keine Bande. Hier wurde das Präzipitat der Probe aufgetragen, die die Fusionproteine UPF1-HDmRFP und EGFP enthielt. Da hier keine Bande des UPF1-HD-mRFP Proteins Ergebnisse

detektiert werden konnte, festigt dieses Ergebnis die Annahme, dass UPF1-HDmRFP nicht mit EGFP interagiert und der FMRP-Teil des Fusionsproteins für die Interaktion mit UPF1-HD-mRFP verantwortlich ist. Da es sich bei dem Fusionsprotein UPF1-HD-mRFP um einen Teilabschnitt des UPF1 Proteins handelt, lässt dieses Ergebnis den Schluss zu, dass bei der Interaktion zwischen den Proteinen UPF1 und FMRP die HD des UPF1 Proteins eine entscheidende Rolle bei der Assoziation der beiden Proteine spielt. Unklar bleibt, ob UPF1 bzw. dessen HD direkt an FMRP bindet, oder ob diese Interaktion über weitere Proteine vermittelt wird.

Nach der Transfektion der HEK293-Zellen mit dem *pMOV10-HD*-mRFP Vektor und dem FMRP-EGFP bzw. EGFP-N1 Vektor zeigte sich ein mit den vollständigen Fusionsproteinen vergleichbares Fluoreszenzsignal in den Zellen. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass das Fusionsprotein MOV10-HD-mRFP trotz der Ähnlichkeit zum UPF1-HD-mRFP Fusionsprotein keinen Einfluss auf die Synthese bzw. den Abbau der eigenen oder gleichzeitig synthetisierten Fusionsproteine in HEK293-Zellen nimmt.

Auch in diesem Western Blot (Abb. 16) konnten die Proteine FMRP-EGFP (Spur 8) und EGFP (Spur 9) im Zellhomogenat nachgewiesen werden. Für die erfolgreiche Durchführung der Immunpräzipitation mittels GFP-Trap spricht der alleinige Nachweis von FMRP-EGFP in Spur 6 und EGFP in Spur 7. Auf der linken Seite des Markers wurde das 57 kDa schwere Fusionsprotein MOV10-HD-mRFP mittels RFP-AK in den Zellhomogenat-Proben (Spur 1 und 2) nachgewiesen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass bei der Isolation von FMRP-EGFP auch das Fusionsprotein MOV10-HD-mRFP kopräzipitiert wurde (Spur 5). Sowohl in Spur 4, als auch in Spur 5 kann eine Bande des Fusionsproteins MOV10-HD-mRFP detektiert werden, was vermuten lässt, dass der Abbau der RNA durch RNase A die Interaktion zwischen der HD von MOV10 und FMRP nicht beeinflusst und es sich somit um eine Protein-Protein-Interaktion handelt. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die zuvor gezeigte Interaktion zwischen MOV10 und FMRP weiterhin bestehen bleibt, wenn nur die HD des MOV10 Proteins als Interaktionsbereich zur Verfügung steht. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die HD an der Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen beteiligt ist. Spur 3 dient als Kontrolle und zeigt keine Bande. Hier wurde das Präzipitat der Probe aufgetragen, welches die Fusionproteine MOV10-HDmRFP und EGFP enthielt. Da hier keine Bande des MOV10-HD-mRFP Proteins

49

detektiert werden konnte, festigt dieses Ergebnis die Annahme, dass MOV10-HDmRFP nicht mit EGFP interagiert und der FMRP-Teil des Fusionsproteins für die Interaktion mit MOV10-HD-mRFP verantwortlich ist. Auffällig an diesem Ergebnis ist, dass es sich bei der Interaktion zwischen FMRP und der HD von MOV10 um eine Protein-Protein-Interaktion zu handeln scheint, die durch die Zugabe von RNase A nicht beeinflusst wird. Denn bei der zuvor gezeigten Interaktion zwischen dem vollständigen MOV10 Protein und FMRP konnte eine RNA-vermittelte Interaktion nachgewiesen werden (**Abb. 14**, Spur 4).



Abb. 16: Western-Blot zur Analyse der Interaktion zwischen MOV10-HD-mRFP und FMRP-EGFP

Die **Abb. 16** zeigt die auf der Nitrozellulose-Membran mittels anti-RFP-Antikörper (Spur **1-5**) bzw. anti-GFP-Antikörper (Spur **6-9**) detektierten Proteine. Als **Input** (Spur **1,2,8,9**) wurden jeweils 4 µl der Zellhomogenate aufgetragen, die danach zur Immunpräzipitation eingesetzt wurden. Die **Präzipitate** (Spur **3-7**), von denen jeweils 10 µl aufgetragen wurden, enthalten die Proteine, die bei der Immunpräzipitation gebunden wurden. Spur **1 und 2** zeigt das 57 kDa schwere Fusionsprotein MOV10-HD-mRFP. Spur **3** dient zur Kontrolle und zeigt keine Proteinbande. In Spur **4 und 5** stellt sich das kopräzipitierte Fusionsprotein MOV10-HD-mRFP dar, wobei es in Spur **4** durch die Zugabe von RNAses A zu keiner Veränderung der Proteinbande kommt. In der Mitte der Membran wurden 7 µl eine Größenmarker (**M**) (PageRuler[™]Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas) aufgetragen. Das in Höhe von 110 kDa laufende Fusionsprotein FMRP-EGFP kann vor (Spur **8**, oberste Bande) und nach (Spur **6**) der Präzipitation nachgewiesen werden. Das zur Kontrolle verwendete 28 kDa schwere EGFP ist ebenfalls vor (Spur **9**) und nach (Spur **7**) der Präzipitation zu detektieren.

3.3. Analyse der subzellulären Lokalisation der Fusionsproteine UPF1, MOV10 und FMRP in U2OS-Zellen

Zur Untersuchung der subzellulären Verteilung der Fusionsproteine (**Abb. 12**) wurden U2OS-Zellen mit den entsprechenden Vektoren transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen fixiert. Anschließend wurde das Mikrotubulus-Zytoskelett mit einem polyklonalen Antikörper gegen α-Tubulin immunzytochemisch markiert. Die Fusionsproteine wurden mittels ihrer Autofluoreszenz detektiert.

Das Fusionsprotein UPF1-mRFP verteilt sich über das gesamte Zytoplasma der U2OS-Zelle und bildet dort feine Granula. Um den Zellkern herum ist eine dezenten Mehranreicherung des rekombinaten Proteins zu beobachten (**Abb. 17 A**, **a** und **Abb. 18 A**, **a**). Der Zellkern hingegen zeigt nur eine schwache Färbung, was für eine geringe Proteinkonzentration im Nukleus spricht. Im grünen Kanal erkennt man die linienförmigen Mikrotubuli, die einen Teil des Zellskeletts bilden (**Abb. 17 B**, **b**).



Abb. 17: Subzelluläre Verteilung des Fusionsproteins UPF1-mRFP in U2OS-Zellen

A: Darstellung der Autofluoreszenz von UPF1-mRFP im roten Kanal und Kernfärbung mit DAPI (blau). **B:** Darstellung des endogenen α-Tubulins mittels immunzytochemischer Färbung im grünen Kanal und Kernfärbung mit DAPI (blau). **C:** Überlagerung aller Kanäle. **a+b+c:** Vergrößerung des im Bild B markierten Bildausschnittes.

In **Abb. 18** ist im grünen Kanal das Fusionsprotein FMRP-EGFP zu sehen, das eine ähnliche zelluläre Verteilung wie UPF1-mRFP zeigt. FMRP-EGFP liegt ebenfalls in Form von kleinen Granula im gesamten Zytosol vor, wobei es vor allem in der Nähe des Zellkerns zur Bildung größerer Granula bis hin zu Aggregaten kommt. Im

Vergleich zu UPF1-mRFP ist es weniger homogen verteilt (siehe **Abb. 18 B, b**). Die zu beobachtende Aggregatbildung könnte durch die Überexpression des Fusionsproteins zustande kommen. In der Überlagerung von grünem und rotem Kanal kommt es zu einer deutlichen gelb-orangen Färbung des Zytosols der Zelle (**Abb. 18 C, c**), was für eine Kolokalisation der beiden Fusionsproteine spricht.



Abb. 18: Subzelluläre Verteilung der Fusionsproteine UPF1-mRFP und FMRP-EGFP in U2OS-Zellen nach Kotransfektion

A: Darstellung der Autofluoreszenz des Fusionsproteins UPF1-mRFP im roten Kanal und Kernfärbung mittels DAPI (blau). **B:** Darstellung der Autofluoreszenz des Fusionsproteins FMRP-EGFP im grünen Kanal und Kernfärbung mittels DAPI (blau). **C:** Überlagerung aller Kanäle. **a+b+c:** Vergrößerung des in Bild B markierten Ausschnittes.

Das Fusionsprotein UPF1-HD-mRFP kommt in der U2OS-Zelle sowohl im Kern als auch im Zytosol vor. Es bildet feine Granula, die homogen über die gesamte Zelle verteilt sind. Auffällig ist die vermehrte perinukleäre Intensität, die für eine erhöhte Proteinkonzentration in diesem Teil der Zelle spricht (**Abb. 19 A, a** und **Abb. 20 A, a**).

Abb. 20 veranschaulicht in Bild B, dass sich FMRP-EGFP bei der Koexpression mit UPF1-HD-mRFPs weiterhin in vielen kleinen Granula vor allem im Zytoplasma befindet. Das zum vollständigen UPF1 Protein abweichende Verhalten des Proteins UPF1-HD-mRFP scheint also kein Einfluss auf die zelluläre Verteilung von FMRP-EGFP zu nehmen. Die Überlagerung des roten und grünen Kanals zeigt aber

trotzdem eine deutliche Gelbfärbung, was auf eine hohe Kolokalisation der beiden Fusionsproteine hinweist.



Abb. 19: Subzelluläre Verteilung von UPF1-HD-mRFP in U2OS-Zellen

A: Darstellung der Autofluoreszenz des Fusionsproteins UPF1-HD-mRFP im roten Kanal und Kernfärbung mittels DAPI. **B:** Immunfärbung des endogenen α-Tubulins im grünen Kanal und Kernfärbung mittels DAPI. **C:** Überlagerung aller Kanäle. **a+b+c:** Vergrößerung des in Bild A markierten Bildausschnitts.



Abb. 20: Subzelluläre Verteilung von UPF1-HD-mRFP und FMRP-EGFP in U2OS-Zellen nach Kotransfektion

A: Darstellung der Autofluoreszenz des Fusionsproteins UPF1-HD-mRFP im roten Kanal und Kernfärbung mittels DAPI. **B:** Darstellung der Autofluoreszenz des Fusionsprotein FMRP-EGFP im grünen Kanal und Kernfärbung mittels DAPI. **C:** Überlagerung aller Kanäle. **a+b+c:** Vergrößerung des in Bild B markierten Ausschnittes.

Die im Vergleich zum vollständigen UPF1 Protein veränderte zelluläre Lokalisation von UPF1-HD-mRFP lässt sich durch die verkürzte Form des Proteins erklären. Denn der Bereich zwischen as 489 und 875 des UPF1 Proteins enthält neben der HD auch ein NLS, ein NES befindet sich hingegen im N-terminalen Abschnitt des Proteins (Abb. 5). So besitzt das UPF1-HD-mRFP Protein nur noch ein NLS, das dem Protein zwar den Transport in den Kern, aber nicht mehr den Export ins Zytosol ermöglicht, da ihm das NES fehlt. Bei den Zellen, die das gesamte UPF1 Protein als Fusionsprotein exprimieren, liegt es präferenziell im Zytosol vor und ist kaum im Zellkern nachweisbar (Abb. 17 A, a und Abb. 18 A, a). Da das vollständige UPF1 Protein sowohl ein putatives NLS als auch ein putatives NES enthält (Abb. 5), besitzt es vermutlich die Fähigkeit zwischen Kern und Zytoplasma zu pendeln. Da sich das Fusionsprotein UPF1-mRFP in den untersuchten Zellen vor allem im Zytoplasma darstellt, besteht die Vermutung, dass das Protein hauptsächlich im Zytoplasma vorliegt und nur für kurze Zeit in den Kern transportiert wird, um dort eventuell mRNAs oder Proteine zu binden und so aus dem Kern ins Zytosol zu bringen.



Abb. 21: Vergleich der subzellulären Verteilung der Fusionsproteine UPF1-mRFP und UPF1-HomReg-mRFP

Darstellung der Autofluoreszenz des Fusionsproteins UPF1-mRFP (A) mit Kernfärbung mittels DAPI und (a) ohne Kernfärbung. Darstellung der Autofluoreszenz des Fusionsproteins UPF1-mRFP im roten Kanal in kotransfizierten Zellen (B) mit und (b) ohne Kernfärbung. Darstellung der Autofluoreszenz des Fusionsproteins UPF1-HD-mRFP (C) mit und (c) ohne Kernfärbung. Darstellung der Autofluoreszenz des Fusionsproteins UPF1-HD-mRFP (C) mit und (c) ohne Kernfärbung. Darstellung der Autofluoreszenz des Fusionsproteins UPF1-HD-mRFP (C) mit und (c) ohne Kernfärbung. Darstellung der Autofluoreszenz des Fusionsproteins UPF1-HD-mRFP im roten Kanal in kotransfizierten Zellen (D) mit und (d) ohne Kernfärbung.

Beim Vergleich zwischen alleinigem Vorliegen der Fusionsproteine UPF1-mRFP (**Abb. 21 A, a**) bzw. UPF1-HD-mRFP (**Abb. 21 C, c**) und der Koexpression mit dem Fusionsprotein FMRP-EGFP (**Abb. 21 B, b** bzw. **D, d**) lassen sich keine Unterschiede der subzellulären Verteilung erkennen. Das heißt, dass die Koexpression von FMRP die subzelluläre Verteilung von UPF1 bzw. UPF1-HD nicht beeinflusst.



Abb. 22: Subzelluläre Verteilung von MOV10-mRFP in U2OS-Zellen

A: Darstellung der Autofluoreszenz des Fusionsproteins MOV10-mRFP im roten Kanal und Kernfärbung mit DAPI. **B:** Immunzytochemische Markierung der Mikrotubuli mittels α-Tubulin, dargestellt im grünen Kanal. **C:** Überlagerung aller Kanäle. **a+b+c:** Vergrößerung des in Bild A markierten Bildausschnitts.

Das Fusionsprotein MOV10-mRFP zeigt in den U2OS-Zellen ebenfalls ein relativ homogenes fein-granuläres Verteilungsmuster und kommt im gesamten Zytoplasma vor mit Tendenz zur perinukleären Anreicherung (**Abb. 22 A**, **a und Abb. 23 A**, **a**). Die zelluläre Lokalisation von FMRP-EGFP entspricht weitestgehend der Verteilung des MOV10-mRFP Proteins, wobei FMRP-EGFP eher dazu neigt Aggregate zu bilden (**Abb. 23 B**, **b**). Das sehr ähnliche Verteilungsmuster dieser beiden Proteine führt zu einer deutlichen Gelbfärbung der Zelle bei der Überlagerung des roten und grünen Kanals. Dies spricht für eine überwiegende Kolokalisation und Interaktion der beiden Proteine in der Zelle, die sich vermutlich überwiegend im Zytoplasma abspielt.



Abb. 23: Subzelluläre Verteilung der Fusionsproteine MOV10-mRFP und FMRP-EGFP in U2OS-Zellen nach Kotransfektion

A: Darstellung der Autofluoreszenz des Fusionsproteins MOV10-mRFP im roten Kanal und Kernfärbung mittels DAPI. **B**: Darstellung der Autofluoreszenz des Fusionsproteins FMRP-EGFP im grünen Kanal und Kernfärbung mittels DAPI. **C**: Überlagerung aller Kanäle. **a+b+c**: Vergrößerung des in Bild B markierten Bildausschnittes.



Abb. 24: Subzelluläre Verteilung von MOV10-HD-mRFP in U2OS-Zellen

A: Darstellung der Autofluoreszenz des Fusionsproteins MOV10-HD-mRFP ohne (**A**) und mit (**A1**) Kernfärbung mit DAPI. **B:** Darstellung der immunchemischen Markierung des Zytoskeletts der U2OS-Zelle mittels α -Tubulin Antikörper und Kernfärbung mit DAPI. **C:** Überlagerung aller Kanäle. **a+a1+b+c:** Vergrößerung des in Bild A1 markierten Bildausschnitts.

Ergebnisse

Das Fusionsprotein MOV10-HD-mRFP, dass starke Ähnlichkeit mit der HD des humanen UPF1 Proteins hat, liegt ebenfalls in granulärer Form in der Zelle vor. Der größte Teil des Proteins sammelt sich im Zellkern und nur ein geringer Teil des rekombinanten Proteins liegt über das Zytoplasma verteilt vor (**Abb. 24 A, a** und **Abb. 25 A, A1, a**). Im grünen Kanal stellt sich die bereits zuvor gesehene Verteilung von FMRP-EGFP dar. Es kommt vor allem im Zytoplasma vor und bildet verschieden große Granula (**Abb. 25 B, B1, b**). Bei der Überlagerung des roten und grünen Kanals bleibt eine deutliche Gelbfärbung aus, was gegen eine Kolokalisation der beiden Proteine spricht.



Abb. 25: Subzelluläre Verteilung der Fusionsproteine MOV10-HD-mRFP und FMRP-EGFP

A: Darstellung der Autofluoreszenz des Fusionsproteins MOV10-HD-mRFP ohne (A) und mit (A1) Kernfärbung mittels DAPI. B: Darstellung der Autofluoreszenz des Fusionsprotein FMRP-EGFP ohne (B) und mit (B1) Kernfärbung mittels DAPI C: Überlagerung des roten und grünen Kanals C1: Überlagerung aller Kanäle **a+b+c**: Vergrößerung des in Bild B markierten Ausschnittes.

Im Vergleich zum vollständigen MOV10-mRFP Protein kommt das MOV10-HDmRFP Fusionsprotein in hoher Konzentration im Zellkern vor (**Abb. 26**). Da das MOV10-HD-mRFP Protein als funktionellen Teil des MOV10 nur die HD besitzt, die starke Ähnlichkeit mit der HD des UPF1 Proteins aufweist und wie diese zu den *upf1-like* Helikasen der Helikasen Superfamilie I gehört, überrascht es nicht, dass sich diese beiden Fusionsproteine ähnlich verhalten (**Abb. 27**).



Abb. 26: Vergleich der subzellulären Verteilung der Fusionsproteine MOV10-mRFP und MOV10-HD-mRFP

Darstellung der Autofluoreszenz des Fusionsproteins MOV10-mRFP (**A**) mit Kernfärbung mittels DAPI und (**a**) ohne Kernfärbung. Darstellung der Autofluoreszenz des Fusionsproteins MOV10-mRFP im roten Kanal in kotransfizierten Zellen (**B**) mit und (**b**) ohne Kernfärbung. Darstellung der Autofluoreszenz des Fusionsproteins MOV10-HD-mRFP (**C**) mit und (**c**) ohne Kernfärbung. Darstellung der Autofluoreszenz des Fusionsproteins MOV10-HD-mRFP (**C**) mit und (**c**) ohne Kernfärbung. Darstellung der Autofluoreszenz des Fusionsproteins MOV10-HD-mRFP (**C**) mit und (**c**) ohne Kernfärbung. Darstellung der Autofluoreszenz des Fusionsproteins MOV10-HD-mRFP (**b**) mit und (**c**) ohne Kernfärbung.



Abb. 27: Vergleich der subzellulären Verteilung der beiden Fusionsproteine UPF1-HDmRFP und MOV10-HD-mRFP

A: Darstellung der Autofluoreszenz des Fusionsproteins MOV10-HD-mRFP. **B:** Darstellung der Autofluoreszenz des Fusionsproteins MOV10-HD-mRFP im roten Kanal in kotransfizierten Zellen. **C:** Darstellung der Autofluoreszenz des Fusionsproteins UPF1-HD-mRFP. **D:** Darstellung der Autofluoreszenz des Fusionsproteins UPF1-HD-mRFP im roten Kanal in kotransfizierten Zellen.

Vergleicht man die subzelluläre Verteilung der beiden HD-Fusionsproteine wird deutlich, dass beide rekombinaten Proteine die Tendenz haben sich im Zellkern anzureichern (**Abb. 27**). Da diese beiden Proteinabschnitte zu 33% identisch sind,

ist ein ähnliches Verhalten in gewissem Maße zu erwarten. Das bereits bekannte NLS des UPF1 Proteins befindet sich in der HD, gehört aber nicht zu den typischen NLS und seine Sequenz ist nicht genau bekannt. Die durch die Autofluoreszenz dargestellte Proteinverteilung von MOV10-HD-mRFP führt zu der Annahme, dass auch die HD des MOV10 Proteins ein entsprechendes NLS bei gleichzeitigem Fehlen eines NES besitzt.



Abb. 28: Subzelluläre Lokalisation des Fusionsproteins FMRP-EGFP in U2OS-Zellen

A: Darstellung der Autofluoreszenz des Fusionsproteins FMRP-EGFP ohne (A) und mit (A1) Kernfärbung mittels DAPI. **B:** Darstellung der immunchemischen Markierung des endogenen α-Tubulins im roten Kanal ohne (B) und mit (B1) Kernfärbung mittels DAPI. **C:** Überlagerung des roten und grünen Kanals. **C1:** Überlagerung aller Kanäle. **a+b+c:** Vergrößerung des in Bild A markierten Bildauschnittes.

Auch bei der alleinigen Expression des Fusionsprotein FMRP-EGFP findet man die zuvor beobachtete, vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation des Proteins mit Bildung unterschiedlich großer Granulae, die vermehrt perinukleär gelegen sind (**Abb. 28 A, A1, a**). Im roten Kanal sind hier die filigranen Fillamente des Mikrotubulus-Zytoskelettes zu erkennen. In der Überlagerung der beiden Kanäle (**Abb. 28 B, B1, b**) kommt es kaum zu einer Gelbfärbung, was eine Kolokalisation von FMRP-EGFP mit dem Mikrotubuli-System unwahrscheinlich macht.

Wie in den anderen Teilabschnitten bereits erwähnt, sind keine Unterschiede des zellulären Verteilungsmuster des Fusionsproteins FMRP-EGFP zu beobachten, egal

Ergebnisse

ob es alleine oder gleichzeitigen mit anderen Fusionsproteinen in den U2OS-Zellen exprimiert wird (**Abb. 29**).



Abb. 29: Vergleich der subzellulären Lokalisation des Fusionsproteins FMRP-EGFP bei gleichzeitiger Expression unterschiedlicher Fusionsproteine

Darstellung der Autofluoreszenz des Fusionsproteins FMRP-EGFP im grünen Kanal bei gleichzeitiger Expression der Fusionsproteine (**A**) UPF1-mRFP, (**B**) UPF1-HD-mRFP, (**C**) MOV10-HD-mRFP und (**D**) MOV10-mRFP. **E:** Darstellung der Autofluoreszenz des Fusionsproteins FMRP-EGFP im grünen Kanal bei alleiniger Expression.

FMRP gehört zur Familie der RNA-bindenden Proteine und spielt vermutlich eine Rolle bei der Regulation des mRNA-Metabolismus, wie der Regulation der Translation und der mRNA-Stabilität (Bagni und Greenough, 2005; Bassell and Warren, 2008). Die genaue Funktionsweise von FMRP ist dabei noch nicht bekannt und ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Um genauer verstehen zu können, welche Funktionen FMRP in der Zelle erfüllt, ist es wichtig zu erfahren, mit welchen Proteinen und RNA-Molekülen FMRP interagiert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, das MOV10 mit FMRP in Säugerzellen interagiert. Diese Assoziation zwischen den beiden Fusionsproteinen FMRP-EGFP und MOV10-mRFP konnte allerdings nur in Anwesenheit von RNA nachgewiesen werden, was vermuten lässt, dass die beiden Proteine mittels RNA in Verbindung treten. Des Weiteren konnte die Bindung von FMRP an UPF1 gezeigt werden, bei der es sich um eine RNA-unabhängige Wechselwirkung handelt. Nach der Bestätigung der Interaktion zwischen UPF1-mRFP und FMRP-EGFP sollte genauer untersucht werden, welcher Teil des hUPF1 Proteins für die Bindung an FMRP verantwortlich ist. Bei der erneuten Durchführung des Versuchs mit einer verkürzten Variante des UPF1 Proteins, die aus einem Teil der Helikase-Domäne bestand (UPF1-HD), konnte gezeigt werden, dass die Assoziation mit FMRP weiterhin bestehen bleibt. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die Helikase-Domäne (HD) eine entscheidende Rolle für die Interaktion von UPF1 mit FMRP spielt und wahrscheinlich die Proteinbindungsstelle enthält. Bei der verkürzten Variante des MOV10 Proteins (MOV10-HD), konnte ebenfalls die Bindung an FMRP weiterhin nachgewiesen werden. Unerwartet war hier, dass die Interaktion des MOV10-HDmRFP Fusionsproteins mit FMRP-EGFP im Gegensatz zur Assoziation des vollständigen MOV10 mit FMRP RNase-unabhängig war. Somit verhielt sich die HD von MOV10 anders als das entsprechende vollständige Protein. So scheint die HD des MOV10 Proteins eine FMRP-Bindungsstelle zu besitzen, die eventuell bei der vollständigen Form des Proteins durch einen anderen Teil des Proteins "maskiert" wird und deshalb nicht oder nur teilweise für die Bindung an FMRP zur Verfügung steht. Vorstellbar wäre, dass MOV10 ähnlich einem Klappmesser in sich selbst zurückgefaltet vorliegt und dadurch die Proteinbindungsstelle innerhalb der HD nicht zugänglich ist. Diese Art der intramolekularen Rückfaltung (Di Paolo et al., 1999) und eine Form der Autoinhibition durch Interaktion zweier Domänen eines Proteins

(MacDonald et al., 2010) wurden bereits für andere Proteine beschrieben. Die von uns beobachtete RNA-abhängige Interaktion von MOV10 und FMRP ließe sich dann wie folgt erklären (siehe **Abb. 30**). Durch die Bindung von RNA an MOV10 verändert das Protein seine Konformation, die intramolekulare Rückfaltung wird aufgehoben und die Proteinbindungsstelle innerhalb der HD wird freigegeben. Wird aber wie in unserem Versuch die gesamte RNA in dem Ansatz durch RNase A abgebaut, bleibt MOV10 in seiner ursprünglichen, "zusammengeklappten" Form und kann nicht an FMRP binden. Ist das Protein jedoch auf die HD reduziert, bleibt die Rückfaltung aus. Dies führt dazu, dass die FMRP-Bindungsstelle die ganze Zeit zugänglich ist, und es in unserem Versuchsaufbau zu einer RNA-unabhängigen Interaktion zwischen MOV10-HD-mRFP und FMRP-EGFP kommt.



Abb. 30: Schematische Darstellung des unterschiedlichen Interaktionsverhaltens zwischen dem vollständigen MOV10 und der Helikase-Domäne (HD) von MOV10

Liegt das vollständige MOV10 Protein in der Zelle vor, kommt es zu einer Rückfaltung des Proteins und einer eventuellen Interaktion eines N-terminalen Anteils des Proteins (autoinhibitorische HD-Bindungsdomäne) mit der Helikase-Domäne. Die intramolekulare Interaktion führt zu einer Blockade der FMRP-Bindungsstelle (FMRP-BS), die innerhalb der Helikase-Domäne lokalisiert ist. Bindet RNA an das Protein, kommt es zu einer Konformationsänderung und die FMRP-BS wird freigegeben. Jetzt kann FMRP entweder direkt oder mittels weiterer Proteine (?) an MOV10 binden. Besteht das Protein hingegen nur aus der Helikase-Domäne, ist die FMRP-BS immer frei zugänglich und FMRP kann RNA-unabhängig an die Helikase-Domäne binden.

In weiteren Versuchen könnte die intramolekulare Struktur des MOV10 Proteins weiter untersucht werden, um die Hypothese der intramolekularen Rückfaltung zu festigen und ggf. den Bereich von MOV10 festzulegen, der mit der Helikase-Domäne interagiert. Außerdem wäre es interessant herauszufinden, welcher Teil der HD für die FMRP-Bindung verantwortlich ist.

Auffällig war bei den Versuchen und Auswertungen mittels Western Blot, dass die Banden der kopräzipitierten Fusionsproteine (UPF1-mRFP und MOV10-mRFP) im Verhältnis zu den entsprechenden Proteinbanden der Homogenate immer relativ schwach waren. Diese Beobachtung lässt sich nicht aus einer niedrigen Gesamtmenge des Fusionsproteins im Zellhomogenat erklären, denn dort zeigten sich im Vergleich zum Präzipitat starke Signale. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass nur ein geringer Teil des vorhandenen Fusionsproteins mit FMRP-EGFP interagiert. Ein Grund hierfür könnte darin bestehen, dass die Interaktion mit FMRP-EGFP nicht direkt stattfindet, sondern über ein oder mehrere andere Proteine vermittelt wird. Diese möglichen endogenen Brückenproteine liegen in den transfizierten Zellen im Vergleich zu den beiden rekombinanten Proteinen vermutlich nur in relativ geringen Konzentrationen vor und würden damit den limitierenden Faktor für die Assoziation bilden. Da sowohl FMRP (Jin et al., 2004B), MOV10 (Meister et al., 2005; Qi et al., 2008) als auch UPF1 (Jin et al., 2009) mit AGO-Proteinen interagieren, stellen diese Proteine eine mögliche Verbindung da, über die die Interaktion zwischen UPF1 und FMRP bzw. MOV10 und FMRP vermittelt werden könnte. Ein anderes Protein, das als Bindeglied für die Interaktion zwischen FMRP und UPF1 in Frage kommen würde, ist das Protein Staufen 1 (STAU 1), das sowohl mit Upf1 (Kim et al., 2005) interagiert, als auch zusammen mit FMRP in einem zellulärem Komplex vorliegt (Ohashi et al., 2002; Barbee et al., 2006).

Bei der Analyse der subzellulären Verteilung zeigte das Fusionsprotein MOV10mRFP eine überwiegend zytoplasmatische Lokalisation. Ähnliche Verteilungsmuster wurden bereits in anderen Arbeitsgruppen beobachtet (Meister et al., 2005; Burdick et al., 2010). Hier scheint das Fusionsprotein ein abweichendes Verhalten zum endogenen MOV10 Protein zu zeigen, das vor allem, aber nicht ausschließlich, im Zellkern vorzukommen scheint (El Messaoudi-Aubert et al., 2010). Bei der immunochemischen Darstellung von endogenem MOV10 in Hippokampusneuronen von Ratten, zeigte sich hingegen eine granuläre Verteilung im Zellkern und über das gesamte Soma (Petrenz, 2010). Auch das Fusionsprotein FMRP-EGFP kommt vor

allem im Zytosol der Zelle vor und zeigt einer deutliche Kolokalisation mit MOV10mRFP. Diese granuläre Verteilung von FMRP über das gesamte Zytoplasma entspricht auch der subzellulären Verteilung des endogenen Proteins (Didiot et al., 2009). Bei der Darstellung der subzellulären Lokalisation des UPF1-mRFP Proteins in U2OS-Zellen war das Fusionsproteins über das gesamte Zytosol verteilt und lag perinukleär in erhöhter Konzentration vor. Ähnliche Ergebnisse lieferte die immunzytochemische Färbung von endogenem UPF1/RENT1 in HeLa-Zellen (Mendell et al., 2002). Bei der Koexpression von UPF1-mRFP und FMRP-EGFP kam es zu einer erkennbaren Kolokalisation der beiden Fusionsproteine im Zytosol. Diese Kolokalisation zeigte sich vor allem in den Bereichen, in denen sich Protein-Granula gebildet hatten. Durch Detektion der endogenen Proteine könnte untersucht werden, ob dieses Verteilungsmuster der natürlichen zellulären Lokalisation der Proteine entspricht, oder ob dieses durch die Überexpression der Fusionsproteine zustande kommt.

Bei der Darstellung der subzellulären Lokalisation von UPF1-HD-mRFP in U2OS-Zellen kam es im Vergleich zum vollständigen UPF1 Protein zu einer vermehrten Akkumulation von UPF1-HD-mRFP im Zellkern bei weiterhin gleichmäßigem Vorkommen im Zytoplasma. In immunzytochemischen Experimenten in HeLa-Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass UPF1 Varianten, denen die as 55-416 fehlen, vermehrt im Kern vorkommen (Mendell et al., 2002). Dies Verhalten spricht für das Fehlen eines NES in diesen Mutanten. UPF1 Mutanten, denen die as 596-697 fehlten, zeigten hingegen ein ausschließlich zytoplasmatisches Vorkommen. Hier kam es durch die Behandlung der Zellen mit Leptomycin B, eine Substanz die die Zellkernporen für den Export blockiert, zu keiner Veränderung der zellulären Verteilung (Mendell et al., 2002). Diese Beobachtung spricht für das Vorliegen eines NLS in dem fehlenden Proteinabschnitt. Ein Motiv-Scan konnte aber kein klassisches NES oder NLS ermitteln, so dass es sich vermutlich um ein atypischen Transportmechanismus handelt (Mendell et al., 2002). Da unser rekombinantes UPF1-HD-mRFP Protein aus den as 656-894 (NP 002902) von UPF1 besteht, besitzt es vermutlich nur ein NLS, aber kein NES. Deshalb kann das in den Kern transportierte UPF1-HD-mRFP den Kern nicht mehr verlassen und reichert sich dort an. Das MOV10-HD-mRFP Fusionsprotein weist eine ähnliche subzelluläre Verteilung auf wie das UPF1-HD-mRFP Protein, wobei MOV10-HD eine noch deutlichere Tendenz zeigt, sich im Kern anzureichern. Dieses analoge Verhalten der beiden verkürzten Proteinvarianten hängt vermutlich mit der doch deutlichen

molekularbiologischen Übereinstimmung dieser beiden HD zusammen (**Abb. 9**). Bei dem Motiv-Scan des MOV10 Proteins konnte aber kein NLS in der Proteinsequenz ermittelt werden, so dass die Vermutung besteht, dass es sich wie im Fall von UPF1 um einen atypischen Transportmechanismus handelt.

Da sich FMRP und seine Interaktionspartner vor allem im Zytosol aufhalten, erfolgt die Wechselwirkung zwischen ihnen präferenziell im Zytosol der Zelle. Es wäre aber auch denkbar, dass die Proteine bereits im Kern miteinander interagieren und diese Assoziation bis ins Zytosol erhalten bleibt, denn alle drei Proteinen (FMRP, UPF1, MOV10) besitzen die Fähigkeit sich zwischen Zytosol und Kern hin und her zu bewegen. Um den Ort der Interaktion genauer zu bestimmen, könnten bei folgenden Experimenten die Zellen vor der Immunpräzipitation in eine Kern- und eine Zytosolfraktion aufgetrennt werden.

Alle drei untersuchten Proteine spielen eine Rolle bei der Regulation des RNA-Metabolismus und der Translation. Dabei wird vermutet, dass FMRP für die Regulation der Translation den molekularen Mechanismus der RNAi nutzt. Diese Vermutung wird durch die Tatsache unterstützt, dass FMRP sowohl in Drosophila als auch in Säugetieren mit miRNAs assoziiert ist (Jin et al, 2004B; Caudy et al., 2002; Ishizuka et al., 2002; Jin et al., 2004A). Außerdem interagiert FMRP mit dem AGO-Protein eukaryotic translation initiation factor 2C2 (EIF2C2) in Säugern, das ein Bestandteil miRNA-enthaltender mRNP-Komplexe darstellt (Jin et al, 2004B). Zusätzlich assoziiert FMRP mit DCR-Komplexen, was vermuten lässt, dass FMRP auch an der Prozessierung von miRNA-Vorstufen beteiligt sein könnte (Caudy et al., 2002; Ishizuka et al., 2002, Jin et al, 2004B). In der Fruchtfliege Drosophila melanogaster konnte gezeigt werden, dass dFMR, das Homolog von FMRP, mit dem Protein Argonaut 2 (AGO2) und dem RISC assoziiert (Caudy et al., 2002; Ishizuka et al., 2002; Jin et al., 2004A). Außerdem konnte AGO2 in dFMRenthaltenden Staufen(STAU)-Granula nachgewiesen werden (Barbee et al., 2006). Auch in Säugetierzellen konnte gezeigt werden, dass FMRP in vivo mit miRNAs und Bestandteilen des miRNA Signalwegs, unter anderem DCR und dem Ortholog des Argonaut Protein 1 (AGO1) interagiert (Jin et al, 2004B). Im Drosophila melanogaster-Model spielt AGO1 eine entscheidende Rolle für die biologische Funktion von dFMR bei der Entwicklung von Neuronen und Synapsen (Jin et al, 2004B). Diese Beobachtungen passen zur Vermutung, dass FMRP/dFMR an der

Translationsregulation mittels miRNAs beteiligt ist (Kosik und Krichevsky, 2005; Barbee et al., 2006).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass UPF1, das vor allem als Hauptfaktor des NMD bekannt ist, auch am RNA silencing beteiligt ist (Jin et al., 2009). So wurde eine RNA-unabhängige Interaktion von UPF1 mit den AGO-Proteinen 1 und 2 nachgewiesen und eine Kolokalisation in p bodies gezeigt (Jin et al., 2009, Höck und Meiser, 2008). Als p bodies werden zytoplasmatische Komplexe bezeichnet, die aus einer Vielzahl von Proteinen und RNAs bestehen (Jin et al., 2009). Ein Teil der Proteine, die die p bodies bilden, sind am mRNA Abbau sowie an der Translationsregulation beteiligt. Die enthaltenen mRNAs werden dort gespeichert, um sie ggf. später in Proteine zu translatieren oder sie werden dort abgebaut (Kiebler und Bassell, 2006, Barbee et al., 2006). In Hefezellen vermittelt Upf1p den Transport von mRNAs in *p* bodies, die dort akkumulieren (Sheth und Parker, 2006). Dies lässt vermuten, dass Upf1p an der Repression der Translation beteiligt ist (Barbee et al., 2006, Sheth und Parker, 2006; Muhlrad und Parker, 1999). Beim Menschen greift UPF1 vermutlich in die RNA Regulation ein, indem es die Bindung des RISC an das Ziel-mRNA-Molekül erleichtert und so den Abbau der mRNAs beschleunigt (Jin et al., 2009). Außerdem wurde gezeigt, dass UPF1 in Stauenthaltenden Granula vorkommt (Barbee et al., 2006), was einerseits darauf hinweisen könnte, dass diese Granula auch am NMD beteiligt sind, andererseits auch ein weiterer Anhaltspunkt für eine Beteiligung von UPF1 in der Translationsregulation unabhängig vom NMRD sein könnte.

Auch die putative RNA Helikase *Armitage* (armi), das MOV10 Ortholog der Fruchtfliege, wird für die Bildung des RISC benötigt. Dabei sorgt *armi* für die Anlagerung der siRNA an den funktionalen RISC (Tomari et al., 2004). Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass MOV10 beim Menschen ebenfalls am Aufbau des RISC beteiligt ist. Diese Schlussfolgerung wird durch die Tatsache, dass MOV10 mit reifen, miRNA-enthaltenden AGO Protein-Komplexen interagiert (Meister et al., 2005), weiter gefestigt. Zudem kolokalisieren sowohl AGO1 als auch AGO2 mit dem MOV 10 Protein in *p bodies* (Meister et al., 2005).

Mehrere Arbeitsgruppen konnten das gemeinsame Vorkommen von Proteinen nachweisen, die an der Translationsregulation beteiligt sind. In *Drosophila* Neurone z.B. wurden RNP-Partikel isoliert, die neben dem RNA-bindenden Protein STAU auch FMRP, AGO-Proteine und Upf1p enthielten, ähnlich wie es auch in *p* bodies

andere Zellen beobachtet wurde (Barbee et al., 2006). Auch im Nervensystem von Säugetieren wurden STAU-enthaltende RNP-Partikel gefunden, die an der Regulation der Translation und/oder dem Transport dendritisch lokalisierter mRNAs beteiligt sind und (häufig) FMRP enthalten (Kiebler und Bassell, 2006; Barbee et al., 2006). Auch Villace et al. isolierten 2004 einen großen STAU-enthaltenden Komplex, der neben Ribosomen und FMRP weitere Proteine enthielt, die an der Kontrolle der Proteinsynthese beteiligt sind. Es zeigte sich, dass diese STAUenthaltenden Granula essentielle Strukturen beim Transport und der regulierten Translation von humanen mRNAs in vivo sind (Villace et al., 2004). Auch das Protein APOBEC3G (A3G), ein RNA-Editing Enzym, ist mit einer Vielzahl von Proteinen assoziiert, die fast alle die Eigenschaft besitzen RNA und/oder DNA zu binden und Bestandteile von RNP-Komplexen darstellen. Zu diesen mit A3G interagierenden Proteinen gehören auch STAU, UPF1, FMRP und MOV10, wobei die Interaktion fast aller Proteine zumindest teilweise RNA-abhängig ist (Kozak et al., 2006; Gallois-Montbrun et al., 2007). Dies zeigt, dass in verschiedenen Spezies und verschiedenen Zelltypen Proteinkomplexe isoliert werden konnten, die teilweise aus den gleichen Proteinen zusammengesetzt waren und die vermutlich an der Translationregulation, der Stabilität oder dem Abbau von mRNAs beteiligt sind.

Diese Beobachtungen verdeutlichen, dass die beiden Proteine UPF1 und MOV10 nicht nur beide zu den upf1-like RNA/DNA Helikasen der Superfamilie I gehören (Fairman-Williams et al., 2010; Burdick et al., 2010), sondern auch mit den gleichen Proteinen bzw. Zellkomplexen assoziieren und vermutlich deshalb auch an ähnlichen Prozessen in der Zelle beteiligt sind. Neben der gemeinsamen HD, die für eine Protein-Protein-Interaktion mit FMRP ausreichend ist, besitzen beide Proteine weitere, voneinander noch andere Domänen, die ihnen abweichende Eigenschaften verleihen. Im UPF1 Protein sind neben der HD bereits weitere Domänen identifiziert und funktional untersucht worden (Abb. 5). Beim MOV10 hingegen wurden bis jetzt keine weiteren Domänen beschrieben. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass MOV10 innerhalb seiner Helikase-Domäne ein NLS besitzt.

Sowohl UPF1 als auch MOV10 sind an der Regulation des mRNA-Metabolismus beteiligt und kommen je nach Organismus und Zelle in unterschiedlichen Komplexen vor. Der Nachweis der Interaktion zwischen UPF1 und FMRP sowie zwischen MOV10 und FMRP verstärken die Vermutung, dass FMRP ebenfalls an

der Regulation des mRNA-Metabolismus beteiligt ist und dafür den zellulären Mechanismus der RNAi nutzt. Es könnte zum Beispiel so ablaufen, dass die Anlagerung von FMRP an den RISC durch die direkte oder indirekte Bindung an UPF1 bzw. MOV10 erleichtert wird und FMRP durch die Bindung an den RISC seinen mRNA-Liganden vor der Translation sowie dem Abbau schützt. Dieser RISC-Komplex könnte dann an den Ort seiner Bestimmung gelangen, z.B. den Synapsen in Neuronen. Die Wanderung und Festlegung des Bestimmungsortes könnte mit der Aktivität der Zielsynapse zusammenhängen, wie es für FMRP bereits beschrieben ist. Hat der Komplex die Synapse erreicht, kommt es dort z.B. durch Abbau von gewissen Komponenten des Komplexes (MOV10) zum Zerfall des Komplexes (Banerjee et al., 2010). FMRP wird mit seinem Liganden freigegeben und die gebundene mRNA kann am Bestimmungsort translatiert werden, und es erfolgt eine ortsspezifische Proteinbiosynthese.

Um die Interaktion zwischen FMRP und UPF1 bzw. MOV10 zu präzisieren, wäre es interessant zu zeigen, welcher Teil der HD von UPF1 und MOV10 als Protein-Bindungsstelle dient und ob es sich dabei um denselben, möglicherweise hoch konservierten Teil der HD bei beiden Proteinen handelt. Des Weiteren wäre es ein Ziel für die weitere Forschung den Proteinabschnitt von FMRP genauer zu bestimmen, der als Protein-Bindungsstelle fungiert. Da durch die in dieser Arbeit eingesetzte Analyseverfahren nicht gezeigt werden kann, ob es sich bei der nachgewiesenen Interaktion um eine direkte oder über weitere Proteine vermittelte Interaktion handelt, könnte dies ein weiterer Ansatzpunkt für zukünftige Untersuchungen sein. Hier wäre es interessant herauszufinden, ob FMRP direkt mit UPF1 bzw. MOV10 interagiert, oder ob diese Interaktion über ein oder mehrere Proteine vermittelt wird.

Zur Verifizierung der bis dato erlangten Ergebnisse wäre es sinnvoll, die Versuche noch einmal mit endogenen Proteinen durchzuführen, um sicher zu gehen, dass sich die verwendeten Fusionsproteine identisch zu den endogenen Proteinen Verhalten.

68

5. Zusammenfassung

Das Fragile-X-Syndrom ist eine der häufigsten Ursachen für genetisch bedingte mentale Retardierung beim Menschen. Diese Erkrankung wird durch das Fehlen des *Fragile X Mental Retardation Protein* (FMRP) verursacht. FMRP ist ein RNAbindendes Protein, das am mRNA-Metabolismus und der Translationsregulation beteiligt ist und mit anderen Proteinen Komplexe bildet. Um die zellulären Funktionen und den molekulare Wirkmechanismus von FMRP genauer zu charakterisieren, ist es von Bedeutung zu wissen, mit welchen Proteinen und Zellkomponenten FMRP interagiert, um somit Rückschlüsse ziehen zu können, an welchen Regulationsmechanismen FMRP in der Zelle beteiligt ist.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass rekombinantes FMRP sowohl mit UPF1 als auch mit MOV10 interagiert. Im Unterschied zur Bindung von FMRP an MOV10 erwies sich die Interaktion zwischen FMRP und UPF1 als RNA-unabhängig. Beim MOV10 sorgt die RNA vermutlich für die Aufhebung einer intramolekularen Rückfaltung des Proteins und damit zur Freigabe der FMRP Bindungsstelle.

Außerdem konnte mittels Immunzytochemie bestätigt werden, dass alle untersuchten Proteine (FMRP, UPF1 und MOV10) vor allem im Zytoplasma von Säugetierzellen vorkommen. Zudem konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass MOV10 ein NLS besitzt, das in der HD im Bereich zwischen as 674 und 940 lokalisiert ist. Bei den Proteinen UPF1 und FMRP waren bereits ein Kernlokalisationssignal (NLS) und Kernexportsignal (NES) beschrieben. Aus dieser Beobachtung ergibt sich die Möglichkeit, dass die oben beschriebenen Interaktionen sowohl im Zytoplasma als auch im Kern ablaufen könnten.

6. Literaturverzeichnis

- Adinolfi S, Bagni C, Musco G, Gibson T, Mazzarella L, Pastore A (1999) Dissecting FMR1, the protein responsible for fragile X syndrome, in its structural and functional domains. RNA 5(9):1248-1258.
- Adinolfi S, Ramos A, Martin SR, Dal Piaz F, Pucci P, Bardoni B, Mandel JL, Pastore A (2003) The N-terminus of the fragile X mental retardation protein contains a novel domain involved in dimerization and RNA binding. Biochemistry 42(35):10437-10444
- Allingham-Hawkins DJ, Babul-Hirji R, Chitayat D, Holden JJ, Yang KT, Lee C, Hudson R, Gorwill H, Nolin SL, Glicksman A, Jenkins EC, Brown WT, Howard-Peebles PN, Becchi C, Cummings E, Fallon L, Seitz S, Black SH, Vianna-Morgante AM, Costa SS, Otto PA, Mingroni-Netto RC, Murray A, Webb J, Vieri F, et al. (1999) Fragile X premutation is a significant risk factor for premature ovarian failure: the International Collaborative POF in Fragile X study--preliminary data. Am J Med Genet. 83(4):322-325.
- Altamura N, Groudinsky O, Dujardin G, Slonimski PP (1992) NAM7 nuclear gene encodes a novel member of a family of helicases with a Zn-ligand motif and is involved in mitochondrial functions in Saccharomyces cerevisiae. J Mol Biol. 224(3):575-587.
- Amiri K, Hagerman RJ, Hagerman PJ (2008) Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome: an aging face of the fragile X gene. Arch Neurol. 65(1):19-25.
- Antar LN, Afroz R, Dictenberg JB, Carroll RC, Bassell GJ (2004) Metabotropic glutamate receptor activation regulates fragile x mental retardation protein and FMR1 mRNA localization differentially in dendrites and at synapses. J Neurosci. 24(11):2648-2655.
- Antar LN, Dictenberg JB, Plociniak M, Afroz R, Bassell GJ (2005) Localization of FMRP-associated mRNA granules and requirement of microtubules for activity-dependent trafficking in hippocampal neurons. Genes Brain Behav. 4(6):350-359.
- Applequist SE, Selg M, Raman C, Jäck HM (1997) Cloning and characterization of HUPF1, a human homolog of the Saccharomyces cerevisiae nonsense mRNA-reducing UPF1 protein. Nucleic Acids Res. 25(4):814-821.
- Ashley CT, Sutcliffe JS, Kunst CB, Leiner HA, Eichler EE, Nelson DL, Warren ST (1993) Human and murine FMR-1: alternative splicing and translational initiation downstream of the CGG-repeat. Nat Genet. 4(3):244-251.

- Ashley CT Jr, Wilkinson KD, Reines D, Warren ST (1993) FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding. Science. 262(5133):563-566.
- Bagni C, Greenough WT (2005) From mRNP trafficking to spine dysmorphogenesis: the roots of fragile X syndrome. Nat Rev Neurosci. 6(5):376-387.
- Banerjee S, Neveu P, Kosik KS (2009) A coordinated local translational control point at the synapse involving relief from silencing and MOV10 degradation. Neuron. 64(6):871-884.
- Barbee SA, Estes PS, Cziko AM, Hillebrand J, Luedeman RA, Coller JM, Johnson N, Howlett IC, Geng C, Ueda R, Brand AH, Newbury SF, Wilhelm JE, Levine RB, Nakamura A, Parker R, Ramaswami M (2006) Staufen- and FMRP-containing neuronal RNPs are structurally and functionally related to somatic P bodies. Neuron. 52(6):997-1009.
- Bassell GJ, Warren ST (2008) Fragile X syndrome: loss of local mRNA regulation alters synaptic development and function. Neuron. 60(2):201-214.
- Bell MV, Hirst MC, Nakahori Y, MacKinnon RN, Roche A, Flint TJ, Jacobs PA, Tommerup N, Tranebjaerg L, Froster-Iskenius U, et al. (1991) Physical mapping across the fragile X: hypermethylation and clinical expression of the fragile X syndrome. Cell. 64(4):861-866.
- Bhattacharya A, Czaplinski K, Trifillis P, He F, Jacobson A, Peltz SW (2000) Characterization of the biochemical properties of the human Upf1 gene product that is involved in nonsense-mediated mRNA decay. RNA. 6(9):1226-1235.
- Brown V, Jin P, Ceman S, Darnell JC, O'Donnell WT, Tenenbaum SA, Jin X, Feng Y, Wilkinson KD, Keene JD, Darnell RB, Warren ST (2001) Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. Cell. 107(4):477-487.
- Burdick R, Smith JL, Chaipan C, Friew Y, Chen J, Venkatachari NJ, Delviks-Frankenberry KA, Hu WS, Pathak VK (2010) P body-associated protein Mov10 inhibits HIV-1 replication at multiple stages. J Virol. 84(19):10241-10253.
- Buselmaier W, Tariverdian G (2007) Humangenetik, 4. Aufl., Springer, Heidelberg, 200
- Caudy AA, Myers M, Hannon GJ, Hammond SM (2002) Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. Genes Dev. 16(19):2491-2496.

- Ceman S, Brown V, Warren ST (1999) Isolation of an FMRP-associated messenger ribonucleoprotein particle and identification of nucleolin and the fragile X-related proteins as components of the complex. Mol Cell Biol. 19(12):7925-7932.
- Chang YF, Imam JS, Wilkinson MF (2007) The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. Annu Rev Biochem. 76:51-74.
- Chendrimada TP, Finn KJ, Ji X, Baillat D, Gregory RI, Liebhaber SA, Pasquinelli AE, Shiekhattar R (2007) MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. Nature. 447(7146):823-828.
- Churchill JD, Beckel-Mitchener A, Weiler IJ, Greenough WT (2002) Effects of Fragile X syndrome and an FMR1 knockout mouse model on forebrain neuronal cell biology. Microsc Res Tech. 57(3):156-158.
- Costa-Mattioli M, Sossin WS, Klann E, Sonenberg N (2009) Translational control of long-lasting synaptic plasticity and memory. Neuron. 61(1):10-26.
- Czaplinski K, Weng Y, Hagan KW, Peltz SW (1995) Purification and characterization of the Upf1 protein: a factor involved in translation and mRNA degradation. RNA. 1(6):610-623.
- Darnell JC, Jensen KB, Jin P, Brown V, Warren ST, Darnell RB (2001) Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. Cell. 107(4):489-499.
- Darnell JC, Fraser CE, Mostovetsky O, Stefani G, Jones TA, Eddy SR, Darnell RB (2005) Kissing complex RNAs mediate interaction between the Fragile-X mental retardation protein KH2 domain and brain polyribosomes. Genes Dev. 19(8):903-918.
- De Boulle K, Verkerk AJ, Reyniers E, Vits L, Hendrickx J, Van Roy B, Van den Bos F, de Graaff E, Oostra BA, Willems PJ (1993) A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. Nat Genet. 3(1):31-35.
- De Rubeis S, Bagni C (2010) Fragile X mental retardation protein control of neuronal mRNA metabolism: Insights into mRNA stability. Mol Cell Neurosci. 43(1):43-50.
- de Vries BB, Wiegers AM, Smits AP, Mohkamsing S, Duivenvoorden HJ, Fryns JP, Curfs LM, Halley DJ, Oostra BA, van den Ouweland AM, Niermeijer MF (1996)
Mental status of females with an FMR1 gene full mutation. Am J Hum Genet. 58(5):1025-1032.

- de Vries BB, Halley DJ, Oostra BA, Niermeijer MF (1998) The fragile X syndrome. J Med Genet. 35(7):579-589.
- Devys D, Lutz Y, Rouyer N, Bellocq JP, Mandel JL (1993) The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. Nat Genet. 4(4):335-340.
- Dictenberg JB, Swanger SA, Antar LN, Singer RH, Bassell GJ (2008) A direct role for FMRP in activity-dependent dendritic mRNA transport links filopodial-spine morphogenesis to fragile X syndrome. Dev Cell. 14(6):926-939.
- Didiot MC, Subramanian M, Flatter E, Mandel JL, Moine H 2009) Cells lacking the fragile X mental retardation protein (FMRP) have normal RISC activity but exhibit altered stress granule assembly. Mol Biol Cell. 20(1):428-437.
- Di Paolo C, Hefti HP, Meli M, Landis H, Pavlovic J (1999) Intramolecular backfolding of the carboxyl-terminal end of MxA protein is a prerequisite for its oligomerization. J Biol Chem. 274(45):32071-32078.
- Eberhart DE, Malter HE, Feng Y, Warren ST (1996) The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals. Hum Mol Genet. 5(8):1083-1091.
- Eichler EE, Richards S, Gibbs RA, Nelson DL (1993) Fine structure of the human FMR1 gene. Hum Mol Genet. 2(8):1147-1153.
- El Messaoudi-Aubert S, Nicholls J, Maertens GN, Brookes S, Bernstein E, Peters G (2010) Role for the MOV10 RNA helicase in polycomb-mediated repression of the INK4a tumor suppressor. Nat Struct Mol Biol. 17(7):862-868.
- European Bioinformatics Institute, EMBL-EBI; EMBOSS Matcher Pairwise Sequence Alignment. Online im Internet: <u>http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_matcher/</u> [26.09.2011, 10:27]

Fairman-Williams ME, Guenther UP, Jankowsky E (2010) SF1 and SF2 helicases: family matters. Curr Opin Struct Biol. 20(3):313-324.

Feng Y, Absher D, Eberhart DE, Brown V, Malter HE, Warren ST (1997) FMRP associates with polyribosomes as an mRNP, and the I304N mutation of severe fragile X syndrome abolishes this association. Mol Cell. 1(1):109-118.

- Feng Y, Gutekunst CA, Eberhart DE, Yi H, Warren ST, Hersch SM (1997) Fragile X mental retardation protein: nucleocytoplasmic shuttling and association with somatodendritic ribosomes. J Neurosci. 17(5):1539-1547.
- Ferrari F, Mercaldo V, Piccoli G, Sala C, Cannata S, Achsel T, Bagni C (2007) The fragile X mental retardation protein-RNP granules show an mGluR-dependent localization in the post-synaptic spines. Mol Cell Neurosci. 34(3):343-354.
- Fridell RA, Benson RE, Hua J, Bogerd HP, Cullen BR (1996) A nuclear role for the Fragile X mental retardation protein. EMBO J. 15(19):5408-5414.
- Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, Verkerk AJ, Holden JJ, Fenwick RG Jr, Warren ST, et al. (1991) Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. Cell. 67(6):1047-1058.
- Gai D, Chang YP, Chen XS (2010) Origin DNA melting and unwinding in DNA replication. Curr Opin Struct Biol. 20(6):756-762.
- Gallois-Montbrun S, Kramer B, Swanson CM, Byers H, Lynham S, Ward M, Malim MH (2007) Antiviral protein APOBEC3G localizes to ribonucleoprotein complexes found in P bodies and stress granules. J Virol. 81(5):2165-2178.
- Garber KB, Visootsak J, Warren ST (2008) Fragile X syndrome. Eur J Hum Genet. 16(6):666-672.
- Hagerman RJ, Amiri K, Cronister A (1991) Fragile X checklist. Am J Med Genet. 38(2-3):283-287.
- Hagerman PJ, Hagerman RJ (2004) The fragile-X premutation: a maturing perspective. Am J Hum Genet. 74(5):805-816.
- Hagerman RJ, Jackson AW 3rd, Levitas A, Rimland B, Braden M (1986) An analysis of autism in fifty males with the fragile X syndrome. Am J Med Genet. 23(1-2):359-374.
- Hagerman RJ, Leehey M, Heinrichs W, Tassone F, Wilson R, Hills J, Grigsby J, Gage B, Hagerman PJ (2001) Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. Neurology. 57(1):127-130.
- Hall MC, Matson SW (1999) Helicase motifs: the engine that powers DNA unwinding. Mol Microbiol. 34(5):867-877.

- Harrison CJ, Jack EM, Allen TD, Harris R (1983) The fragile X: a scanning electron microscope study. J Med Genet. 20(4):280-285.
- Hinds HL, Ashley CT, Sutcliffe JS, Nelson DL, Warren ST, Housman DE, Schalling M (1993) Tissue specific expression of FMR-1 provides evidence for a functional role in fragile X syndrome. Nat Genet. 3(1):36-43.

Höck J, Meister G (2008) The Argonaute protein family. Genome Biol. 9(2):210.

- Irwin SA, Galvez R, Greenough WT (2000) Dendritic spine structural anomalies in fragile-X mental retardation syndrome. Cereb Cortex. 10(10):1038-1044.
- Irwin SA, Patel B, Idupulapati M, Harris JB, Crisostomo RA, Larsen BP, Kooy F, Willems PJ, Cras P, Kozlowski PB, Swain RA, Weiler IJ, Greenough WT (2001) Abnormal dendritic spine characteristics in the temporal and visual cortices of patients with fragile-X syndrome: a quantitative examination. Am J Med Genet. 98(2):161-167.
- Ishizuka A, Siomi MC, Siomi H (2002) A Drosophila fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins. Genes Dev. 16(19):2497-2508.
- Jacquemont S, Hagerman RJ, Leehey M, Grigsby J, Zhang L, Brunberg JA, Greco C, Des Portes V, Jardini T, Levine R, Berry-Kravis E, Brown WT, Schaeffer S, Kissel J, Tassone F, Hagerman PJ (2003) Fragile X premutation tremor/ataxia syndrome: molecular, clinical, and neuroimaging correlates. Am J Hum Genet. 72(4):869-878.
- Jacquemont S, Hagerman RJ, Hagerman PJ, Leehey MA (2007) Fragile-X syndrome and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome: two faces of FMR1. Lancet Neurol. 6, 45-55.
- Jankowsky E (2011) RNA helicases at work: binding and rearranging. Trends Biochem Sci. 36(1):19-29.
- Jin P, Alisch RS, Warren ST (2004) RNA and microRNAs in fragile X mental retardation. Nat Cell Biol. 6(11):1048-1053.
- Jin P, Zarnescu DC, Ceman S, Nakamoto M, Mowrey J, Jongens TA, Nelson DL, Moses K, Warren ST (2004) Biochemical and genetic interaction between the fragile X mental retardation protein and the microRNA pathway. Nat Neurosci. 7(2):113-117.

- Jin H, Suh MR, Han J, Yeom KH, Lee Y, Heo I, Ha M, Hyun S, Kim VN (2009) Human UPF1 participates in small RNA-induced mRNA downregulation. Mol Cell Biol. 29(21):5789-5799.
- Jinek M, Doudna JA (2009) A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. Nature 457:405-412.
- Kadlec J, Guilligay D, Ravelli RB, Cusack S (2006) Crystal structure of the UPF2interacting domain of nonsense-mediated mRNA decay factor UPF1. RNA. 12(10):1817-1824.
- Kanai Y, Dohmae N, Hirokawa N (2004) Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. Neuron. 43(4):513-525.
- Khandjian EW, Corbin F, Woerly S, Rousseau F (1996) The fragile X mental retardation protein is associated with ribosomes. Nat Genet. 12(1):91-93.

Kiebler MA, Bassell GJ (2006) Neuronal RNA granules: movers and makers. Neuron. 51(6):685-690.

Kiledjian M, Dreyfuss G (1992) Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. EMBO J. 11(7):2655-2664.

Kim YK, Furic L, Desgroseillers L, Maquat LE (2005) Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. Cell. 120(2):195-208.

- Kosik KS, Krichevsky AM (2005) The Elegance of the MicroRNAs: A Neuronal Perspective. Neuron. 47(6):779-782.
- Kozak SL, Marin M, Rose KM, Bystrom C, Kabat D (2006) The anti-HIV-1 editing enzyme APOBEC3G binds HIV-1 RNA and messenger RNAs that shuttle between polysomes and stress granules. J Biol Chem. 281(39):29105-29119.
- Kremer EJ, Pritchard M, Lynch M, Yu S, Holman K, Baker E, Warren ST, Schlessinger D, Sutherland GR, Richards RI (1991) Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)n. Science. 252(5013):1711-1714.
- Leeds P, Wood JM, Lee BS, Culbertson MR (1992) Gene products that promote mRNA turnover in Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell Biol. 12(5):2165-2177.

- Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. Nature. 433(7027):769-773.
- Linder P, Daugeron MC (2000) Are DEAD-box proteins becoming respectable helicases? Nat Struct Biol. 7(2):97-99.
- Ling SC, Fahrner PS, Greenough WT, Gelfand VI (2004) Transport of Drosophila fragile X mental retardation protein-containing ribonucleoprotein granules by kinesin-1 and cytoplasmic dynein. Proc Natl Acad Sci USA. 101(50):17428-17433.
- MacDonald C, Munson M, Bryant NJ (2010) Autoinhibition of SNARE complex assembly by a conformational switch represents a conserved feature of syntaxins. Biochem Soc Trans. 38(Pt 1):209-212.

Martin JP, Bell J (1943) A pedigree of mental defect showing sex linkage. J Neurol Neurosurg Psychiatry 6:154-156

- Mendell JT, ap Rhys CM, Dietz HC (2002) Separable roles for rent1/hUpf1 in altered splicing and decay of nonsense transcripts. Science. 298(5592):419-422.
- Meister G, Tuschl T (2004) Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. Nature. 431(7006):343-349.
- Meister G, Landthaler M, Peters L, Chen PY, Urlaub H, Lührmann R, Tuschl T (2005) Identification of novel argonaute-associated proteins. Curr Biol. 15(23):2149-2155.
- Mooslehner K, Müller U, Karls U, Hamann L, Harbers K (1991) Structure and expression of a gene encoding a putative GTP-binding protein identified by provirus integration in a transgenic mouse strain. Mol Cell Biol. 11(2):886-893.
- Muhlrad D, Parker R (1999) Aberrant mRNAs with extended 3' UTRs are substrates for rapid degradation by mRNA surveillance. RNA. 5(10):1299-1307.
- Murray A, Webb J, Grimley S, Conway G, Jacobs P (1998) Studies of FRAXA and FRAXE in women with premature ovarian failure. J Med Genet. 35(8):637-640.
- Nagase T, Kikuno R, Nakayama M, Hirosawa M, Ohara O (2000) Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XVIII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. DNA Res. 7(4):273-281.

- Nolin SL, Lewis FA 3rd, Ye LL, Houck GE Jr, Glicksman AE, Limprasert P, Li SY, Zhong N, Ashley AE, Feingold E, Sherman SL, Brown WT (1996) Familial transmission of the FMR1 CGG repeat. Am J Hum Genet. 59(6):1252-1261.
- Oberle I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, Boue J, Bertheas M, Mandel J (1991) Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. Science. 1991 252(5009):1097-1102.
- Ohashi S, Koike K, Omori A, Ichinose S, Ohara S, Kobayashi S, Sato TA, Anzai K (2002) Identification of mRNA/protein (mRNP) complexes containing Puralpha, mStaufen, fragile X protein, and myosin Va and their association with rough endoplasmic reticulum equipped with a kinesin motor. J Biol Chem. 277(40):37804-37810.
- Oostra BA, Chiurazzi P (2001) The fragile X gene and its function. Clin Genet. 60(6):399-408.
- Pal M, Ishigaki Y, Nagy E, Maquat LE (2001) Evidence that phosphorylation of human Upfl protein varies with intracellular location and is mediated by a wortmannin-sensitive and rapamycin-sensitive PI 3-kinase-related kinase signaling pathway. RNA. 7(1):5-15.
- Perlick HA, Medghalchi SM, Spencer FA, Kendzior RJ Jr, Dietz HC (1996) Mammalian orthologues of a yeast regulator of nonsense transcript stability. Proc Natl Acad Sci USA. 93(20):10928-10932.
- Petrenz NM (2010) Das Fragile-X-Syndrom: Vergleichende Analyse der zellulären Proteininteraktionsmuster der physiologischen und einer pathogenen Form des Proteins FMRP. Med. Dissertation, Universität Hamburg.
- Pieretti M, Zhang FP, Fu YH, Warren ST, Oostra BA, Caskey CT, Nelson DL (1991) Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. Cell. 66(4):817-822.
- Qi HH, Ongusaha PP, Myllyharju J, Cheng D, Pakkanen O, Shi Y, Lee SW, Peng J, Shi Y (2008) Prolyl 4-hydroxylation regulates Argonaute 2 stability. Nature. 455(7211):421-424.
- Ramocki MB, Zoghbi HY (2008) Failure of neuronal homeostasis results in common neuropsychiatric phenotypes. Nature. 455(7215):912-918.

- Reiss AL, Freund L (1992) Behavioral phenotype of fragile X syndrome: DSM-III-R autistic behavior in male children. Am J Med Genet. 43(1-2):35-46.
- Robertson KD, Wolffe AP (2000) DNA methylation in health and disease. Nat Rev Genet. 1(1):11-19.
- Schaeffer C, Bardoni B, Mandel JL, Ehresmann B, Ehresmann C, Moine H (2001) The fragile X mental retardation protein binds specifically to its mRNA via a purine quartet motif. EMBO J. 20(17):4803-4813.
- Schrier M, Severijnen LA, Reis S, Rife M, van't Padje S, van Cappellen G, Oostra BA, Willemsen R. (2004) Transport kinetics of FMRP containing the I304N mutation of severe fragile X syndrome in neurites of living rat PC12 cells. Exp Neurol. 189(2):343-353.
- Schwartz CE, Dean J, Howard-Peebles PN, Bugge M, Mikkelsen M, Tommerup N, Hull C, Hagerman R, Holden JJ, Stevenson RE (1994) Obstetrical and gynecological complications in fragile X carriers: a multicenter study. Am J Med Genet. 51(4):400-402.
- Sheth U, Parker R (2006) Targeting of aberrant mRNAs to cytoplasmic processing bodies. Cell.125(6):1095-1109.
- Singh G, Lykke-Andersen J (2006) Human Upf proteins in NMD. L.E. Maquat, Editor, Nonsense-Mediated mRNA Decay, Landes Bioscience, Georgetown, TX, pp. 59–70.[Online im Internet] URL: <u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6105/</u> [Stand 13.09.2011, 12:08]
- Siomi H, Siomi MC, Nussbaum RL, Dreyfuss (1993) The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. Cell. 74(2):291-298.
- Steward O, Schuman EM (2003) Compartmentalized synthesis and degradation of proteins in neurons. Neuron. 40(2):347-359.
- Sun X, Perlick HA, Dietz HC, Maquat LE (1998) A mutated human homologue to yeast Upf1 protein has a dominant-negative effect on the decay of nonsensecontaining mRNAs in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci USA. 95(17):10009-10014.
- Sutcliffe JS, Nelson DL, Zhang F, Pieretti M, Caskey CT, Saxe D, Warren ST (1992) DNA methylation represses FMR-1 transcription in fragile X syndrome. Hum Mol Genet. 1(6):397-400.

- Sutherland GR (1977) Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. Science. 197(4300):265-266.
- Tamanini F, Meijer N, Verheij C, Willems PJ, Galjaard H, Oostra BA, Hoogeveen AT (1996) FMRP is associated to the ribosomes via RNA. Hum Mol Genet. 5(6):809-813.
- Thomas M, Lieberman J, Lal A (2010) Desperately seeking microRNA targets. Nat Struct Mol Biol. 17(10):1169-1174.
- Tomari Y, Du T, Haley B, Schwarz DS, Bennett R, Cook HA, Koppetsch BS, Theurkauf WE, Zamore PD (2004) RISC assembly defects in the Drosophila RNAi mutant armitage. Cell. 116(6):831-841.
- Turner G, Webb T, Wake S, Robinson H (1996) Prevalence of fragile X syndrome. Am J Med Genet. 64(1):196-197.
- Verheij C, Bakker CE, de Graaff E, Keulemans J, Willemsen R, Verkerk AJ, Galjaard H, Reuser AJ, Hoogeveen AT, Oostra BA (1993) Characterization and localization of the FMR-1 gene product associated with fragile X syndrome. Nature. 363(6431):722-724.
- Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang FP, et al. (1991) Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. Cell. 65(5):905-914.
- Villacé P, Marión RM, Ortín J (2004) The composition of Staufen-containing RNA granules from human cells indicates their role in the regulated transport and translation of messenger RNAs. Nucleic Acids Res. 32(8):2411-2420.
- Warren ST, Sherman SL (2001) The fragile X syndrome. In Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Valle, D., Childs, B., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (eds), The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease. McGraw-Hill Companies, New York, Vol. I, pp. 1257–1290.
- Weiler IJ, Irwin SA, Klintsova AY, Spencer CM, Brazelton AD, Miyashiro K, Comery TA, Patel B, Eberwine J, Greenough WT (1997) Fragile X mental retardation protein is translated near synapses in response to neurotransmitter activation. Proc Natl Acad Sci USA. 94(10):5395-5400.

- Weiler IJ, Spangler CC, Klintsova AY, Grossman AW, Kim SH, Bertaina-Anglade V, Khaliq H, de Vries FE, Lambers FA, Hatia F, Base CK, Greenough WT (2004) Fragile X mental retardation protein is necessary for neurotransmitter-activated protein translation at synapses. Proc Natl Acad Sci USA. 101(50):17504-17509.
- Weng Y, Czaplinski K, Peltz SW (1996) Genetic and biochemical characterization of mutations in the ATPase and helicase regions of the Upf1 protein. Mol Cell Biol. 16(10):5477-5490.
- Weng Y, Czaplinski K, Peltz SW (1996) Identification and characterization of mutations in the UPF1 gene that affect nonsense suppression and the formation of the Upf protein complex but not mRNA turnover. Mol Cell Biol. 16(10):5491-5506.
- Yamashita A, Ohnishi T, Kashima I, Taya Y, Ohno S (2001) Human SMG-1, a novel phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase, associates with components of the mRNA surveillance complex and is involved in the regulation of nonsense-mediated mRNA decay. Genes Dev. 15(17):2215-2228.
- Zalfa F, Bagni C (2004) Molecular insights into mental retardation: multiple functions for the Fragile X mental retardation protein? Curr Issues Mol Biol. 6(2):73-88.
- Zalfa F, Giorgi M, Primerano B, Moro A, Di Penta A, Reis S, Oostra B, Bagni C (2003) The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses. Cell. 112(3):317-327.

7. Danksagung

Ich danke allen Personen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt und ertragen haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Stefan Kindler für die gute und engagierte Betreuung, die fachliche Anleitung und die Möglichkeit den Alltag im Labor kennen zu lernen.

Dem Institutsdirektor Prof. Dr. Andreas Gal für die Möglichkeit der Promotion in seinem Institut.

Allen Mitarbeitern und Doktoranden der Arbeitsgruppe Kindler und Kreienkamp, insbesondere Dr. Janin Schütt-Ölschläger und Claudia Schob, für die stets hilfsbereite Vermittlung von labortechnischen Methoden, Einweisung in Geräte und Labor-Equipment und die Weitergabe von Tipps und Tricks in der Durchführung der Laborarbeiten.

Meinem Freund Martin für die regelmäßige Ermutigung und die Unterstützung bei technischen Problemen.

Und ganz besonders meiner Mutter, die mich immer wieder bestärkt, ermutigt und unterstützt hat.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Maren Prunnbauer
Geburtsdatum	16.08.1983
Geburtsort	Kassel
Familienstand	ledig

Ausbildung

1990 – 2003	Albert-Schweitzer-Schule und Jakob-Grimm-Schule in Rotenburg a. d. F., Abschluss: Abitur (1,7)
2003 – 2010	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
09/2005	Erster Abscnitt der ärztlichen Prüfung (2,5)
04/2010	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (1,5)

Famulaturen

08 - 09/2006	Abteilung für Allgemeine- und Viszeralchirurgie,
	Prof. Dr. Gross, AK Barmbek, HH
05 – 06/2007	Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe,
	Prof. Dr. Carstensen, Albertinen-Krankenhaus, HH
07 – 08/2007	Praxis für Radiologie und Nuklearmedizin,
	Dres. Adam, Ahlendorf, Adam und Lauer, HH
09 – 10/2008	Praxis für Neurologie, Dr. med. Witt, HH

Praktisches Jahr

02 – 06/2009	Abteilung für Innere Medizin, Prof. Dr. Müller-Wieland, AK St. Georg, HH
06 – 09/2009	Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe, PD Dr. Binder, Kantonsspital Uri, Schweiz
09 – 11/2009	Faculty of Medicine, Department of Surgery, MD, PhD Ariyakhagorn, University Hospital Chiang Mai, Thailand
11/2009 – 01/2010	Abteilung für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Dr. Meisel, Krankenhaus Winsen (Luhe)

Promotion

Seit 08/2007

Forschungsarbeiten zur Promotion im Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf unter der Leitung von PD Dr. Stefan Kindler zum Thema "Das Fragile X Syndrom: Untersuchung neuer Interaktionspartner des RNA-bindenden Proteins FMRP"

Ärztliche Tätigkeit

Seit 11/2010 Assistenzärztin in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe, Krankenhaus Winsen (Luhe)

9. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: Marcu Pubau