

Aus dem Institut für Humangenetik des
Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Institutsdirektor: Prof. Dr. Andreas Gal

**Das Fragile X-Syndrom:
Charakterisierung unterschiedlicher
FMRP-Isoformen der Ratte
(*Rattus norvegicus*)**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Nelly Schröder
aus Hamburg

Hamburg 2007

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 06.08.2008

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

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

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Andreas Gal

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. Evita Mohr

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildungsverzeichnis | 5 |
| Tabellenverzeichnis | 7 |
| Abkürzungsverzeichnis | 8 |
| 1 Einleitung | 10 |
| 1.1 Arbeitshypothese und Fragestellung..... | 21 |
| 2 Material und Methoden | 22 |
| 2.1 Material..... | 22 |
| 2.1.1 Chemikalien..... | 22 |
| 2.1.2 Bakterienstämme, Zelllinien, Labortiere..... | 22 |
| 2.1.3 Restriktionsenzyme..... | 22 |
| 2.1.4 Plasmid-DNA..... | 23 |
| 2.1.4.1 Grundvektoren..... | 23 |
| 2.1.4.2 Konstruierte Vektoren..... | 23 |
| 2.1.5 Kits..... | 23 |
| 2.1.6 Oligonukleotide..... | 24 |
| 2.1.7 Antikörper..... | 25 |
| 2.1.7.1 Primäre Antikörper..... | 25 |
| 2.1.7.2 Sekundäre Antikörper..... | 25 |
| 2.2 Methoden..... | 26 |
| 2.2.1 Molekularbiologische Methoden..... | 26 |
| 2.2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)..... | 26 |
| 2.2.1.2 Quantifizierung von DNA..... | 27 |
| 2.2.1.3 DNA-Gelelektrophorese, Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten..... | 27 |
| 2.2.1.4 Restriktion von DNA mit Endonukleasen..... | 28 |
| 2.2.1.5 Ligation von DNA-Fragmenten..... | 28 |
| 2.2.1.6 Präparation und Transformation chemisch kompetenter Bakterien..... | 28 |
| 2.2.1.7 Bakterienkultur und Plasmidpräparation..... | 29 |
| 2.2.1.8 DNA-Sequenzierung..... | 29 |
| 2.2.2 Zellbiologische Methoden..... | 29 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2.2.1 Kultivierung und transiente Transfektion von CHO-K1-Zellen..... | 29 |
| 2.2.2.2 Präparation, Kultivierung und transiente Transfektion primärer Hippokampusneurone..... | 30 |
| 2.2.2.3 Immunzytochemie..... | 31 |
| 2.2.2.4 Mikroskopie..... | 32 |
| 2.2.3 Proteinchemische Methoden..... | 32 |
| 2.2.3.1 Gewinnung von Proteinextrakten aus Zellen..... | 32 |
| 2.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)..... | 33 |
| 2.2.3.3 Transfer und immunzytochemische Detektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembran (Western Blot)..... | 33 |
| 3 Ergebnisse | 35 |
| 3.1 Charakterisierung verschiedener FMRP-Isoformen der Ratte (<i>Rattus norvegicus</i>)..... | 35 |
| 3.2 Herstellung eukaryotischer Expressionsvektoren..... | 41 |
| 3.3 Synthese rekombinanter FMRP-Isoformen in eukaryotischen Zellen. | 43 |
| 3.4 Untersuchung der subzellulären Lokalisation verschiedener rFMRP-Isoformen in CHO-K1-Zellen..... | 44 |
| 3.4.1 Assoziation der rFMRP-Isoformen mit dem Zytoskelett..... | 49 |
| 3.4.2 Untersuchung der Assoziation der rFMRP-Isoformen mit dem ER in CHO-K1-Zellen..... | 56 |
| 3.5 Untersuchung der subzellulären Lokalisation der rFMRP-Isoformen in Hippokampusneuronen der Ratte..... | 61 |
| 4 Diskussion | 67 |
| 5 Zusammenfassung | 76 |
| 6 Literaturverzeichnis | 77 |
| Danksagung | 88 |
| Lebenslauf | 89 |
| Eidesstattliche Versicherung | 90 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1.1: Das FMR1-Gen des Menschen..... | 12 |
| Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Struktur von FMRP..... | 16 |
| Abbildung 1.3: Struktur des RNA-G-Quartetts, welches von der RGG-Box von FMRP erkannt wird..... | 17 |
| Abbildung 3.1: Kodierende Region der FMR1-cDNA und die davon abgeleitete FMRP-Sequenz der Ratte (<i>Rattus norvegicus</i>)..... | 36 |
| Abbildung 3.2: FMR1-cDNA-Varianten der Ratte..... | 38 |
| Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der FMR1 Genstruktur im Genom der Ratte..... | 40 |
| Abbildung 3.4: Darstellung der erfolgreich in dem eukaryotischen Expressionsvektor pEGFP-N1 subklonierten rFMR1-cDNA-Regionen. | 42 |
| Abbildung 3.5: Expression von rFMRP-EGFP Fusionsproteinen in CHO-K1-Zellen..... | 43 |
| Abbildung 3.6: Subzelluläre Verteilung von EGFP in CHO-K1-Zellen..... | 45 |
| Abbildung 3.7: Subzelluläre Verteilung von rFMRP-Iso4-EGFP in CHO-K1-Zellen..... | 46 |
| Abbildung 3.8: Subzelluläre Verteilung von rFMRP-Iso7-EGFP in CHO-K1-Zellen..... | 47 |
| Abbildung 3.9: Subzelluläre Verteilung von rFMRP-Iso8-EGFP in CHO-K1-Zellen..... | 48 |
| Abbildung 3.10: Vergleich der subzellulären Verteilung von EGFP und den drei verschiedenen rFMRP-Isoformen in transfizierten CHO-K1-Zellen..... | 49 |
| Abbildung 3.11: Subzelluläre Verteilung von EGFP in extrahierten CHO-K1-Zellen..... | 50 |
| Abbildung 3.12: Subzelluläre Verteilung von rFMRP-Iso4-EGFP in extrahierten CHO-K1-Zellen..... | 51 |
| Abbildung 3.13: Subzelluläre Verteilung von rFMRP-Iso7-EGFP in extrahierten CHO-K1-Zellen..... | 52 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 3.14: Subzelluläre Verteilung von rFMRP-Iso8-EGFP in extrahierten CHO-K1-Zellen..... | 53 |
| Abbildung 3.15: Vergleich der subzellulären Verteilung von EGFP und den drei rFMRP-Isoformen in extrahierten CHO-K1-Zellen..... | 54 |
| Abbildung 3.16: Zusammenfassende Übersicht der beobachteten subzellulären Lokalisationsmuster der drei rFMRP-Fusionsproteine in CHO-K1-Zellen..... | 55 |
| Abbildung 3.17: Subzelluläre Verteilung von EGFP in CHO-K1-Zellen bezüglich des ER..... | 57 |
| Abbildung 3.18: Subzelluläre Verteilung von rFMRP-Iso4-EGFP in CHO-K1-Zellen bezüglich des ER..... | 58 |
| Abbildung 3.19: Subzelluläre Verteilung von rFMRP-Iso7-EGFP in CHO-K1-Zellen bezüglich des ER..... | 59 |
| Abbildung 3.20: Subzelluläre Verteilung von rFMRP-Iso8-EGFP in CHO-K1-Zellen bezüglich des ER..... | 60 |
| Abbildung 3.21: Verteilung von EGFP in Hippokampusneuronen..... | 62 |
| Abbildung 3.22: Verteilung von rFMRP-Iso4-EGFP in Hippokampusneuronen..... | 63 |
| Abbildung 3.23: Verteilung von rFMRP-Iso7-EGFP in Hippokampusneuronen..... | 64 |
| Abbildung 3.24: Verteilung von rFMRP-Iso8-EGFP in Hippokampusneuronen..... | 65 |
| Abbildung 4.1: Das FMR1-Gen der Ratte..... | 68 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 2.1: Übersicht über verwendete Bakterienstämme, Zelllinien und Labortiere..... | 22 |
| Tabelle 2.2: Übersicht über die verwendeten Restriktionsendonukleasen..... | 22 |
| Tabelle 2.3: Übersicht über die verwendeten Grundvektoren..... | 23 |
| Tabelle 2.4: Übersicht über die konstruierten Vektoren..... | 23 |
| Tabelle 2.5: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide..... | 24 |
| Tabelle 2.6: Übersicht der verwendeten primären Antikörper..... | 25 |
| Tabelle 2.7: Übersicht der verwendeten sekundären Antikörper..... | 25 |
| Tabelle 2.8: Übersicht der PCR-Bedingungen..... | 26 |
| Tabelle 3.1: Übersicht über die Größe der einzelnen Exons des FMR1-Gens der Ratte (<i>Rattus norvegicus</i>)..... | 37 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| Abb. | Abbildung |
| AK | Antikörper |
| AS | Aminosäuren |
| as | <i>anti-sense</i> |
| BiP | <i>Binding Protein</i> |
| bp | Basenpaare |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| cDNA | <i>complementary DNA</i> |
| CHO-K1 | Zelllinie aus Ovarien chinesischer Hamster (engl.: <i>Chinese Hamster Ovary</i>) |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphate |
| DTT | Dithiotreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGFP | <i>enhanced green fluorescent protein</i> |
| ERFP | <i>enhanced red fluorescent protein</i> |
| EM | Elektronen Mikroskopie |
| engl. | englisch |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| FCS | fetales Kälberserum (engl.: <i>fetal calf serum</i>) |
| FMR1 | <i>fragile X mental retardation gene 1</i> |
| FMRP | <i>fragile X mental retardation protein</i> |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| Grp78 | 78 kDa <i>glucose-regulated protein</i> |
| h | Stunde |
| HEPES | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure |
| hnRNA | heterogene Kern-RNA (engl.: <i>heterogeneous nuclear RNA</i>) |
| HRP | Rettich-Peroxidase (engl.: <i>horseradish peroxidase</i>) |
| IQ | Intelligenzquotient |
| Iso | hier: Isoform |
| kb | Kilobasen |
| kDa | Kilodalton |
| KH-Domäne | heterogene nukleäre RNP K homologe Domäne |
| LB | „Lysogene Brühe“ (engl.: <i>lysogenic broth</i>) |
| M | Molar, Mol/Liter |
| mA | milli-Ampere |
| MAP2 | Mikrotubulus Assoziiertes Protein 2 |
| μ | Mikro (10^{-6}) |
| min | Minute(n) |
| mRFP | <i>monomeric red fluorescent protein</i> |
| mRNA | Boten-RNA (engl.: <i>messenger RNA</i>) |
| n | Nano (10^{-9}) |
| NES | nukleäres Exportsignal |
| NLS | nukleäres Lokalisationssignal |

| | |
|-------------------------|---|
| nt | Nukleotide |
| OD₆₀₀ | Optische Dichte bei 600nm |
| PAGE | Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl.: <i>phosphate-buffered saline</i>) |
| PC12-Zellen | Zelllinie aus dem Phäochromozytom der Ratte |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>) |
| PEG | Polyethylenglykol |
| PFA | Paraformaldehyd |
| r | <i>rat</i> (engl. für Ratte), aus der Spezies <i>Rattus norvegicus</i> |
| RGG-Box | Arginin-(R), Glycin-reiche (G) Domäne mit RGG-Tripeptiden |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNP | Ribonukleoprotein (RNP)-Komplexe |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>revolutions per minute</i>) |
| RT | Raumtemperatur |
| s | <i>sense</i> |
| SDS | Natriumdodecylsulfat (engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i>) |
| snRNP | Ribonucleoproteinkomplexe (engl.: <i>small nuclear Ribonucleoprotein particles</i>) |
| T | hier: Transkript |
| Tab. | Tabelle |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA-Puffer |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| u | Enzymeinheit (<i>unit</i>) |
| ü.N. | über Nacht |
| UTR | untranslatierte Region |
| V | Volt |
| vGLUT | vesikulärer Glutamattransporter |
| v/v | Volumen pro Volumen |
| w/v | Gewicht pro Volumen |

1 Einleitung

Das Fragile X-Syndrom, nach seinen Erstbeschreibern auch als Martin-Bell-Syndrom bekannt (Martin und Bell, 1943), gehört mit einer Inzidenz von 1:4000 bei Männern und 1:8000 bei Frauen (Crawford *et al.*, 1999; Turner *et al.*, 1996) zu den häufigsten erblichen Ursachen mentaler Retardierung. Der Name des Syndroms leitet sich von zytogenetischen Beobachtungen an kultivierten Patientenzellen ab. Unter bestimmten Kulturbedingungen, z.B. nach Folatentzug, kondensiert der lange Arm des X-Chromosoms während der Mitose nicht vollständig, so dass eine kurze Region „fragil“ zu sein scheint (Sutherland, 1977). Diese zytogenetisch darstellbare fragile Stelle liegt in der Bande Xq27.3 und wird heute als FRAXA-Lokus bezeichnet. Neuere Untersuchungen zeigen, dass das Auftreten der fragilen Region des X-Chromosoms durch direkte oder indirekte Hemmung der Thymidylatsynthetase induzierbar ist (Jacky und Sutherland, 1983).

Das Fragile X-Syndrom (FXS) manifestiert sich bei männlichen und weiblichen Patienten mit verschiedenen somatischen Merkmalen und Beeinträchtigungen der intellektuellen und kognitiven Fähigkeiten (z.B. de Vries *et al.*, 1995; Hagerman *et al.*, 1997; Hatton *et al.*, 2006; Roberts *et al.*, 2007; Sullivan *et al.*, 2007; Stewart *et al.*, 1994; Wisniewski *et al.*, 1991). Der klinische Phänotyp des FXS-Patienten zeichnet sich durch charakteristische Merkmale aus, die bei der Diagnosestellung hilfreich sein können, bei Erwachsenen aber deutlich ausgeprägter sind als bei Kindern. Zu den klinischen Merkmalen gehören typische faziale Dysmorphien wie ein längliches, schmales Gesicht mit vorspringendem Kinn und vorstehender Stirn und oft großen, manchmal auch abstehenden Ohren. Bei ca. 80% der betroffenen Männer findet sich eine pathologische Vergrößerung der Hoden (Makroorchidie), die bereits vor der Pubertät vorhanden sein kann (Lachiewicz und Dawson, 1994). Des Weiteren ist das Syndrom nicht selten mit einer Bindegewebisdysplasie verbunden, die sich in einer Hyperextensibilität der Gelenke äußern kann und vermutlich mit einem erhöhten Risiko für kardiale Veränderungen, wie einem

Mitralklappenprolaps, verbunden ist (Crabbe *et al.*, 1993; Sreeram *et al.*, 1989). Außerdem ist bei Patienten mit Fragilem X-Syndrom eine erhöhte Prävalenz von Strabismus, Myopie und Skoliose beschrieben worden (Steinbach, 2000). Eine kleine Gruppe betroffener Männer zeigt äußere Merkmale wie Minderwuchs, Fettleibigkeit, sowie kurze Hände und Füße, die an das Prader-Willi-Syndrom erinnern (de Vries *et al.*, 1993; Schrandner-Stumpel *et al.*, 1994). Vermutlich ist dieser Phänotyp auf eine hypothalamische Fehlregulation zurückzuführen (Schrandner-Stumpel *et al.*, 1994). Da bei Kindern die phänotypischen Merkmale, abgesehen von einem möglicherweise erhöhten Geburtsgewicht oder einer relativen Makrozephalie (Terracciano *et al.*, 2005; Turner *et al.*, 1980), meist noch nicht sehr ausgeprägt sind, können hier in den meisten Fällen nur die kognitiven und intellektuellen Defizite, sowie Verhaltensauffälligkeiten Hinweise auf das Vorliegen des Fragilen X-Syndroms geben. Die Bandbreite der intellektuellen Beeinträchtigungen ist erheblich und reicht von einer diskreten, allgemeinen Lernbehinderung mit normalem bis grenzwertigem IQ, bis zu einer schwergradigen geistigen Retardierung. Anhand von Längsschnittstudien mit Fragilen X-Patienten konnte beobachtet werden, dass die IQ-Werte sowohl bei den weiblichen als auch den männlichen Betroffenen, in signifikantem Ausmaß mit zunehmendem Alter stetig abnehmen (Fisch *et al.*, 2002; Wright-Talamante *et al.*, 1996). Die meisten betroffenen Kinder haben Sprech- und Sprachstörungen, verbunden mit einer Sprachentwicklungsverzögerung (Wisniewski *et al.*, 1991). Ihre Sprache wird als narrativ und zwanghaft beschrieben (Turner *et al.*, 1980). Das Lernvermögen ist bei dem Großteil der Betroffenen durch Aufmerksamkeitsdefizite und ausgeprägt hyperkinetisches Verhalten beeinträchtigt (Steinbach, 2000). Einige Betroffene haben zusätzlich emotionale Probleme, die sich in ängstlichem Verhalten und dem Vermeiden von Blick- und Körperkontakt äußern (Einfeld *et al.*, 1994). Des Weiteren sind bei einem relativ großen Anteil der Jungen und bei einigen Mädchen mit Fragilem X-Syndrom sämtliche Symptome des frühkindlichen Autismus vorhanden (Clifford *et al.*, 2006). Allerdings ist dieser gesamte Symptomkomplex bei jedem der Betroffenen verschieden stark ausgeprägt,

wodurch sich das Krankheitsbild in unterschiedlicher Weise präsentieren und die Diagnose erschwert werden kann. Eine besondere Situation stellen dabei die weiblichen Betroffenen, sowohl als Überträgerinnen als auch als Patientinnen dar. Im Vergleich zu den männlichen Patienten zeigen sie oft einen schwächer ausgeprägten Phänotyp und ein breiteres Spektrum an intellektuellen Beeinträchtigungen, wobei insbesondere die Intelligenzminderung im Durchschnitt weniger stark ausgeprägt ist als bei den männlichen Betroffenen (Riddle *et al.*, 1998). FXS-Frauen verfügen über zwei X-Chromosomen, von denen in der Regel nur eines die krankheitsverursachende Mutation trägt. Die zufällige Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen in weiblichen somatischen Zellen ist die Ursache für die zu beobachtende erhöhte phänotypische Variabilität (Abrams *et al.*, 1994; Kirchgessner *et al.*, 1995, Reiss *et al.*, 1995; Rousseau *et al.*, 1991). Somit wird das Protein weiblicher Mutationsträgerinnen weiterhin in allen somatischen Zellen gebildet, in denen das nicht-mutierte X-Chromosom aktiv ist. Von dort kann das Protein allerdings nicht in Zellen transportiert werden, die es selber nicht synthetisieren können.

Genetische Grundlage des Fragilen X-Syndroms sind Veränderungen in dem FMR1-Gen (*fragile X mental retardation gene 1*). Das 38 kb umfassende FMR1-Gen liegt auf dem langen Arm des X-Chromosoms in der Bande Xq27.3, umfasst 17 Exons und kodiert ein 4,4 kb großes Transkript (Eichler *et al.*, 1993; vgl. Abbildung 1.1).

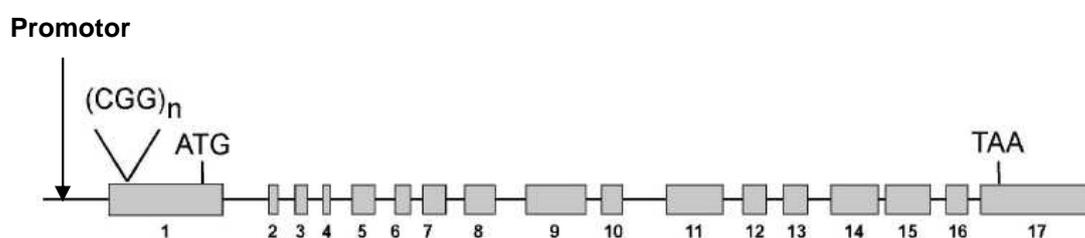


Abbildung 1.1: Das FMR1-Gen des Menschen

Die grauen Boxen stellen schematisch die 17 Exons des Gens dar. Dazwischen liegen die nicht-kodierenden Introns. Die Trinukleotide ATG und TAA kennzeichnen die Position des Start- und Stoppcodons. Im Exon 1, in dem Bereich der die 5'-untranslatierte Region kodiert, liegt eine Region, die aus zahlreichen, direkt aufeinander folgenden Kopien des Trinukleotids CGG zusammengesetzt ist ((CGG)_n).

Exon 1 und Exon 17 kodieren die 5'- bzw. 3'-untranslatierte Region (UTR) der FMR1-mRNA. In dem die 5'-UTR kodierenden Genabschnitt befindet sich eine repetitive Sequenz. Bei nicht vom FXS betroffenen Menschen besteht diese Region aus 6-52 Kopien des Trinukleotids CGG (Fu *et al.*, 1991; Kremer *et al.*, 1991). Die Anzahl dieser Trinukleotidblöcke kann sich von einer zur nächsten Generation vervielfältigen. Durch stabilisierende Faktoren wie z.B. intermittierende AAG-Triplets (Kunst und Warren, 1994), zeigen die Trinukleotide allerdings keine Tendenzen zur weiteren Expansion und sind daher ohne pathologischen Wert. Bei Individuen hingegen, wo z.B. weniger der intermittierenden AAGs, insbesondere am 3'-Ende der CGG-Triplets, vorhanden sind, ist die Stabilität der CGG-Abfolge herabgesetzt, so dass diese expandieren können (Crawford *et al.*, 2000). Bei einer Länge von 60 bis 200 Trinukleotid-Motiven handelt es sich um eine sogenannte Prämutation. Sowohl männliche als auch weibliche Träger dieser Genveränderung weisen keine kognitiven Beeinträchtigungen auf (Reiss *et al.*, 1993; Sobesky *et al.*, 1996). Jedoch hat ein Teil der weiblichen Prämutationsträgerinnen ovarielle Dysfunktionen mit vorzeitigem Beginn der Menopause (Schwartz *et al.*, 1994). Man spricht hier von dem sogenannten *Premature Ovarian Failure* (POF). Ungefähr 30% der männlichen Prämutationsträger erkranken im höheren Alter an einer neurodegenerativen Erkrankung, dem *Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome* (FXTAS) (Hagerman *et al.*, 2003). Während männliche Überträger Allele dieses Längenbereichs in der Regel ohne größere Veränderungen an ihre Nachkommen weitergeben, haben Nachkommen der weiblichen Überträgerinnen meist eine noch weiter expandierende repetitive Region (Fu *et al.*, 1991). Diese Situation mit 60 bis 200 Trinukleotiden wird als Prämutation bezeichnet, weil es sich hierbei um eine Vorstufe der krankheitsverursachenden Vollmutation handelt, bei der die Tripletzahl über 200 liegt. Je länger das mütterliche Prämutationsallel ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit der Vererbung einer Vollmutation (Fisch *et al.*, 1995). Aufgrund der im Verlauf von Generationen fast immer zunehmenden Länge einer Prämutation und Vollmutation, wird auch die Frequenz betroffener Nachkommen von Generation zu Generation größer. Dieses Phänomen, das man bei allen Syndromen mit mutativer Trinukleotid-Expansion beobachtet,

wird als *Antizipation* bezeichnet. Beim Fragilen X-Syndrom wurde es, solange die molekulare Ursache noch nicht bekannt war, als „Sherman-Paradox“ bezeichnet (Fu *et al.*, 1991). Bei einer Vollmutation gibt es über 200 und bis zu mehreren Tausend Wiederholungen des CGG-Triplets. Liegen CGG-Triplett-Regionen mit mehr als 200 Kopien vor, werden diese und benachbarte DNA-Sequenzen methyliert. Die Methylierung des Promotors führt zur vollständigen Unterdrückung der Transkription des FMR1-Gens, so dass das FMR-Protein nicht mehr synthetisiert wird (Bell *et al.*, 1991; Pieretti *et al.*, 1991; Sutcliffe *et al.*, 1992). Pränatale Studien zeigen, dass die Methylierung im Rahmen einer Vollmutation bereits in der Embryonalentwicklung stattfindet (Sutcliffe *et al.*, 1992). Bei mehr als 95% der FXS-Patienten ist die Vollmutation des Trinukleotid-Bereichs ursächlich für die Erkrankung verantwortlich. Nur bei einem geringen Anteil der Betroffenen bewirken Deletionen oder Punktmutationen in dem FMR1-Gen einen Ausfall des FMR-Proteins oder die Bildung eines mutierten Proteins, welches seine normale physiologische Funktion nicht mehr vollständig ausüben kann.

Für wissenschaftliche Studien zum FXS wird häufig ein Mausmodell herangezogen, eine sogenannte *FMR1-Knockout*-Mauslinie, bei der durch Ausschalten des FMR1-Gens, ähnlich dem Fragilen X-Syndrom, das *fragile X mental retardation protein* (FMRP) nicht mehr synthetisiert werden kann. Übereinstimmend mit dem Phänotyp von Patienten mit Fragilem X-Syndrom, besitzt der Großteil der *FMR1-Knockout*-Mäuse vergrößerte Hoden (Makroorchidie) (Kooy *et al.*, 1996). Mit Hilfe von Lern- und Verhaltenstests konnten bei den Mäusen auch den kognitiven und intellektuellen Defiziten entsprechende Beeinträchtigungen beobachtet werden (Fisch *et al.*, 1999; Kooy *et al.*, 1996). Morphologische Untersuchungen der kortikalen Neurone von *FMR1-Knockout*-Mäusen zeigten verlängerte, dünne dendritische Dornen mit unreifem Aussehen und erhöhter Dichte (Comery *et al.*, 1997; Grossman *et al.*, 2006; Irwin *et al.*, 2000). Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen aus Studien an neuronalem *post-mortem*-Gewebe von Patienten mit Fragilem X-Syndrom (Hinton *et al.*, 1991; Rudelli *et al.*, 1985; Wisniewski *et al.*, 1991). Basierend auf diesen Erkenntnissen entstand die Theorie, dass ein

Fehlen des FMR1-Proteins zur gestörten Reifung der Neurone, mit daraus resultierenden kognitiven Defiziten, führt (Comery *et al.*, 1997).

Das Genprodukt des FMR1-Gens ist das *fragile X mental retardation protein* (FMRP). Es besteht aus ca. 620 Aminosäureresten und besitzt ein Molekulargewicht von 70 bis 80 Kilodalton (kDa). Es existieren orthologe Proteine in Säugern, Hühnern und *Drosophila*, was auf eine hohe evolutionäre Konservierung des Proteins schließen lässt.

Das FMR-Protein verfügt über verschiedene funktionelle Domänen. Dies sind Proteinabschnitte, die sich aufgrund struktureller oder funktioneller Unterschiede von ihrer Umgebungssequenz abgrenzen lassen. Die N-terminalen 184 AS sind für die nukleäre Lokalisation des Proteins wichtig. In Übereinstimmung damit beinhaltet diese Region ein putatives nukleäres Lokalisationssignal (NLS) (Eberhart *et al.*, 1996), dessen funktionelle Bedeutung mittels Deletionsmutanten gezeigt wurde (Eberhart *et al.*, 1996). Außerdem konnte gezeigt werden, dass ein Protein mit fehlender von Exon 14 kodierter Region und FMRP-Varianten mit mutiertem C-Terminus, ausschließlich nukleär lokalisiert sind. Diese Beobachtungen lassen die Lokalisation eines nukleären Exportsignals (NES) im C-terminalen Bereich des Proteins vermuten (Fridell *et al.*, 1996; Sittler *et al.*, 1996). Darüber hinaus wurden in dem von Exon 14 kodierten Proteinabschnitt für ein NES charakteristische Aminosäuresequenzen beschrieben (Fridell *et al.*, 1996). Von Siomi *et al.* (1993) und Ashley *et al.* (1993) konnte gezeigt werden, dass FMRP im mittleren Proteinabschnitt zwei KH- (heterogene nukleäre RNP K homologe) Domänen besitzt. Im C-terminalen Proteinbereich liegt eine RGG-Box (Arginin-(R), Glycin-reiche (G) Domäne mit RGG-Tripeptiden) (Adinolfi *et al.*, 1999). Beide Domänen-Typen sind als RNA-bindende Motive bekannt (Ashley *et al.*, 1993; Kiledjian und Dreyfuss, 1992; Siomi *et al.*, 1993).

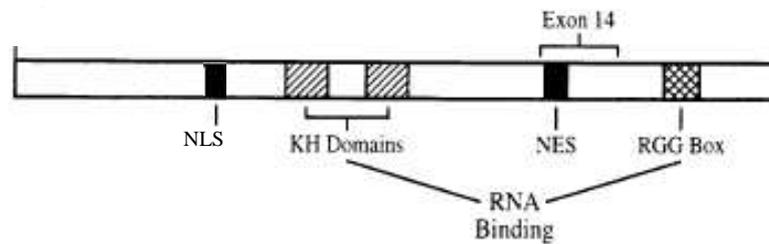


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Struktur von FMRP

Dargestellt sind die einzelnen funktionellen Domänen von FMRP: zwei KH-Domänen und eine RGG-Box, die als RNA-bindende Motive bekannt sind, sowie ein putatives NLS (nukleäres Lokalisationssignal) und ein, durch Exon 14 kodiertes, NES (nukleäres Exportsignal).

Nach Fridell *et al.*, 1996.

Dementsprechend konnte gezeigt werden, dass FMRP an RNA bindet. In *in-vitro* Untersuchungen mit homopolymerer RNA bindet FMRP präferentiell an polyG und polyU (Siomi *et al.*, 1993). Zudem bindet FMRP *in-vitro* an seine eigene mRNA und ca. 4% der Transkripte aus fetalem menschlichem Gehirn (Ashley *et al.*, 1993). Eine von de Boule *et al.* (1993) beschriebene Punktmutation in der zweiten KH-Domäne führt zu einem ausgeprägten, dem Fragilen X-Syndrom entsprechenden Phänotyp. Dies deutet auf die zentrale Bedeutung der RNA-Bindungsfähigkeit von FMRP hin. Bindungsstudien mit verkürzten FMR1-Proteinen, denen die RGG-Box fehlte, zeigten einen Verlust der RNA-Bindung (Siomi *et al.*, 1993). Daher scheint die RGG-Box für die Fähigkeit von FMRP an RNA zu binden von sehr großer Bedeutung oder sogar essentiell zu sein. Mit Hilfe von rekombinantem FMRP in RNA-Bindungsexperimenten wurde gezeigt, dass von der RGG-Box RNA-Regionen erkannt werden, die sich zu einer Quadruplex-Struktur, dem sogenannten G-Quartett falten (Schaeffer *et al.*, 2001; vgl. Abb. 1.3). In einem G-Quartett ordnen sich vier Guanin-Reste in einer Ebene zueinander an. Diese G-Quartett-Struktur wird durch Hoogsteen-Basenpaarung und Kalium-Ionen stabilisiert (Ramos *et al.*, 2003). Schaeffer *et al.* (2001) konnten zeigen, dass FMRP *in vitro* spezifisch und mit hoher Affinität seine eigene FMR1-mRNA bindet. Neben der eigenen FMR1-mRNA konnten aber auch mehrere hundert andere potentielle *in vivo* mRNA-Bindungspartner identifiziert werden. Allerdings verfügen nicht alle dieser mRNAs über eine G-Quartett-Struktur (Brown *et al.*, 2001; Darnell *et al.*, 2001).

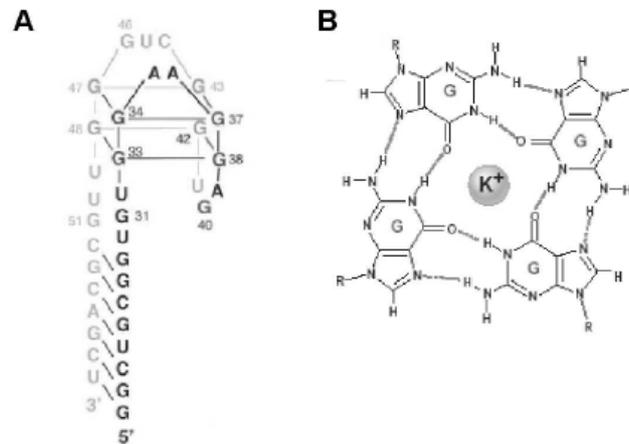


Abbildung 1.3: Struktur des RNA-G-Quartetts, welches von der RGG-Box von FMRP erkannt wird

Schematische Darstellung der dreidimensionalen Faltung der RNA in Vorderansicht (A) und Aufsicht der Basenstruktur (B) unter Stabilisation durch Kalium-Ionen. Nach Darnell *et al.*, 2001 und Schaeffer *et al.*, 2001.

Schon Ende der siebziger Jahre war bekannt, dass die proteinkodierenden Sequenzen in eukaryoten Organismen diskontinuierlich sind, d.h. von Bereichen nichtkodierender DNA unterbrochen werden. Diese nichtkodierenden DNA-Abschnitte nennt man *intervenierende Sequenzen* oder *Introns*, die kodierenden Genabschnitte bezeichnet man als *Exons*. Bei der Übersetzung der genetischen Information in ein funktionsfähiges Protein entsteht zunächst ein Zwischenprodukt, welches neben den funktionell relevanten Exons auch die nichtkodierenden Introns enthält und als *heterogene Kern-RNA* (hnRNA, *heterogeneous nuclear RNA*) oder *Prä-mRNA* bezeichnet wird. Damit die kodierenden Sequenzen eines solchen gestückelten Gens ein funktionsfähiges Stück genetischer Information bilden können, ist das sogenannte *Spleißen* wichtig. Hierbei werden die Introns herausgeschnitten, so dass die reife *mRNA* entsteht, die ins Zytoplasma transportiert wird, wo die endgültige Proteinbiosynthese, die Translation, stattfindet. Bewerkstelligt wird das Spleißen der Prä-mRNA durch sogenannte Spleißosomen. Diese Ribonucleoprotein(RNP)-Komplexe nutzen hierzu konservierte Erkennungsregionen an den Exon-Intron- (Spleißdonor) bzw. Intron-Exon- (Spleißakzeptor) Übergängen. In eukaryoten Organismen ist ein komplexer

Regulationsmechanismus der Genexpression beschrieben worden, bei dem das Spleißen der Transkripte eukaryoter Gene durch das Überspringen einzelner Exons (Exon-Skipping), das Einbehalten von Introns (Intron-Retention) oder das Benutzen unterschiedlicher Spleißdonoren oder -akzeptoren von einem einzelnen Gen unterschiedliche mRNA-Transkripte und damit auch unterschiedliche Proteine entstehen lässt. Dieser Prozess wird als *alternatives Spleißen* bezeichnet und kann gewebespezifisch oder entwicklungsstadienabhängig sein (Verkerk *et al.*, 1993). Im Rahmen dieser Arbeit werden entsprechende mRNAs die durch alternatives Spleißen aus einer gemeinsamen Vorläufer-RNA hervorgehen als *Spleißvarianten* bzw. *Transkripte* (T) bezeichnet. Sie kodieren jeweils unterschiedliche FMRP-Formen, die in der vorliegenden Arbeit als *Isoformen* (Iso) bezeichnet werden. Für FMRP sind bislang zwölf unterschiedliche humane und murine mRNA-Varianten charakterisiert worden, deren Entstehung auf alternatives Spleißen zurückzuführen ist (Ashley *et al.*, 1993; Eichler *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1996; Sittler *et al.*, 1996; Verkerk *et al.*, 1993). Während der embryonalen Entwicklung von Mensch und Säugern, wird das Gen in fast allen Geweben exprimiert. In adulten Geweben sind die mRNA und das Protein hauptsächlich im Gehirn und im Hoden nachweisbar, den beiden Organen die beim Fragilen X-Syndrom am stärksten betroffen sind. Sehr geringe Proteinmengen liegen in den Muskelgeweben und der Haut vor (Devys *et al.*, 1993; Hinds *et al.*, 1993; Khandjian *et al.*, 1995). Im Gehirn wird FMRP am stärksten in Neuronen des Hippokampus und im Zerebellum exprimiert (Devys *et al.*, 1993; Hinds *et al.*, 1993). In Neuronen befindet sich FMRP präferentiell im somatodendritischen Zytoplasma (Eberhart *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1997; Khandjian *et al.*, 2004; Mazroui *et al.*, 2003). Auch in anderen Zellen ist FMRP vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert (Castrén *et al.*, 2001; Devys *et al.*, 1993; Eberhart *et al.*, 1996; Fridell *et al.*, 1996; Sittler *et al.*, 1996; Verheij *et al.*, 1993). In geringer Konzentration ist es aber auch im Zellkern nachweisbar (Feng *et al.*, 1997). Im Zytoplasma kolokalisiert FMRP mit Ribosomen (Khandjian *et al.*, 1996). In Saccharosegradienten kosedimentiert FMRP mit der großen ribosomalen Untereinheit (Corbin *et al.*, 1997; Khandjian *et al.*, 1996). Weitere Untersuchungen zeigen, dass FMRP im Zytoplasma als Komponente

sogenannter Ribonukleoprotein(RNP)-Komplexe vorliegt, die an der Translationsregulation beteiligt sind (Khandjian *et al.*, 2004).

Für FMRP konnten aber nicht nur verschiedene RNA-Bindungspartner, sondern auch unterschiedliche mit dem FMR1-Protein interagierende Proteine charakterisiert werden. Hierbei handelt es sich bei den interessantesten Kandidaten um die beiden autosomalen homologen Proteine von FMRP, FXR1 (*fragile X relatives*) und FXR2. Sie zeigen funktionell und strukturell große Ähnlichkeiten zu FMRP und besitzen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Fähigkeit zur Bildung von Homo- und Heterooligomeren (Siomi *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1995). Im Gegensatz zu FMRP liegen FXR1 und FXR2 auch in peripheren Geweben, wie dem Muskelgewebe in hoher Konzentration vor (Bakker *et al.*, 2000; Dubé *et al.*, 2000; Tamanini *et al.*, 1997). Diese unterschiedliche Proteinverteilung könnte ein Hinweis auf eine mögliche FMRP-unabhängige Funktion von FXR1 und FXR2 sein.

Über die genaue zelluläre Funktion von FMRP ist bislang wenig bekannt. Basierend auf den zu FMRP bekannten Erkenntnissen wurde von Eberhart *et al.* (1996) folgendes Funktionsmodell publiziert: das im Zytoplasma synthetisierte Protein gelangt durch sein Kernlokalisierungssignal vermittelt in den Zellkern. Dort bildet es mit verschiedenen anderen Proteinen (z.B. FXR2) und über seine RNA-Bindedomäne mit spezifischen mRNAs, sogenannte messenger Ribonukleoprotein(mRNP)-Komplexe. Dabei entscheiden bestimmte RNA-Strukturen, wie z.B. die G-Quartett-Struktur, welche mRNAs gebunden werden. Über das Kernexportsignal von FMRP kann dann der Transport zurück ins Zytoplasma erfolgen, wo FMRP schließlich als Bestandteil des aktiven Translationsapparates auftritt. Nähere Untersuchungen zur Beteiligung von FMRP an der Translationsregulation zeigten, dass es hier vermutlich hauptsächlich inhibitorisch auf die mit ihm interagierenden mRNAs wirkt (Laggerbauer *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001). Darnell *et al.* (2001) konnten allerdings in Bezug auf bestimmte mRNA-Moleküle auch eine translationsaktivierende Wirkung von FMRP zeigen. Die starke Expression des FMR1-Proteins im Gehirn, das Hauptsymptom der mentalen Retardierung bei Patienten mit Fragilem X-Syndrom und die unreif aussehenden dendritischen

Dornen in der FMR1-*Knockout*-Maus und neuronalem *post-mortem*-Gewebe von Fragilen X-Patienten (Hinton *et al.*, 1991), deuten auf die Beteiligung von FMRP bei der Differenzierung und Funktion von Neuronen hin. Es wäre denkbar, dass FMRP an dem Transport verschiedener mRNPs entlang der Dendriten beteiligt ist und als ein regulatorischer Bestandteil des neuronalen Proteinsyntheseapparates wirksam ist. Möglicherweise beeinflusst FMRP hier besonders die Synthese von Proteinen, die bei dem Reifungsprozess der Synapsen von Bedeutung sind (Bagni *et al.*, 2005). In welcher Art und Weise das FMR1-Protein für die Entwicklung normaler intellektueller Fähigkeiten essentiell ist, ist allerdings noch unbekannt.

Arbeitshypothese und Fragestellung

Wie anfangs erwähnt, sind für FMRP in verschiedenen Spezies Orthologe beschrieben worden. Über orthologe Proteine der Ratte war bis zu diesem Zeitpunkt allerdings wenig bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit sollten FMRP-Isoformen der Ratte (*Rattus norvegicus*) näher charakterisiert werden. Die FMR1-hnRNA von anderen Spezies wird bekanntermaßen alternativ gespleißt. Aus diesem Grund sollte im ersten Teil der vorliegenden Arbeit nach alternativ gespleißten mRNA-Varianten der Ratte gesucht werden. Es wäre denkbar, dass von unterschiedlichen mRNA-Molekülen kodierte FMRP-Isoformen verschiedene Funktionen besitzen. Daher sollten im zweiten Teil der Arbeit die von möglichen charakterisierten Spleißvarianten kodierten Proteine in eukaryotischen Zellen exprimiert und ihr subzelluläres Verhalten studiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von Merck, Sigma oder Roth in höchstmöglicher Qualität und Reinheit bezogen.

2.1.2 Bakterienstämme, Zelllinien, Labortiere

Tabelle 2.1: Übersicht über verwendete Bakterienstämme, Zelllinien und Labortiere

| | Name | Hersteller |
|----------------|---|---|
| Bakterienstamm | Escherichia coli XL-1 Blue | Stratagene |
| Zelllinie | CHO-K1 (<i>Chinese Hamster Ovary</i>) | DSMZ, Braunschweig, ACC 110 |
| Labortiere | Rattus norvegicus (Wistar-Ratte) | Tierzucht des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) |

2.1.3 Restriktionsenzyme

Tabelle 2.2: Übersicht über die verwendeten Restriktionsendonukleasen

| Enzym | Erkennungssequenz | Konzentration | Hersteller |
|---------|--|---------------|---------------------|
| Apal | 5'...GGGCCIC...3' 3'...CICCGGG...5' | 10 U/μl | Fermentas |
| BamHI | 5'...GIGATCC...3' 3'...CCTAGIG...3' | 10 U/μl | Fermentas |
| BglII | 5'...AIGATCT...3' 3'...TCTAGIA...5' | 10 U/μl | Fermentas |
| EcoRI | 5'...GIAATTC...3' 3'...CTTAAIG...5' | 10 U/μl | Fermentas |
| HindIII | 5'...AIAGCTT...3' 3'...TTCGAIA...5' | 10 U/μl | Fermentas |
| KpnI | 5'...GGTACIC...3' 3'...CICATGG...5' | 10 U/μl | New England Biolabs |
| PstI | 5'...CTGCAIG...3' 3'...GIACGTC...5' | 10 U/μl | Fermentas |

2.1.4 Plasmid-DNA

2.1.4.1 Grundvektoren

Tabelle 2.3: Übersicht über die verwendeten Grundvektoren

| Plasmid | Hersteller | Verwendungszweck |
|--------------|----------------|---|
| pGEM®-T Easy | Promega | Klonierung von PCR-Produkten |
| pEGFP-N1 | Clontech | Expression von Fusionsproteinen aus FMRP-Isoformen und C-terminalem Grün-floureszierenden Protein EGFP (<i>enhanced green flourescent protein</i>) in eukaryotischen Zellen |
| pCMV-Tag2A | Stefan Kindler | Expression von mit dem Flag-Epitop markiertem α -Tubulin der Ratte |
| pmRFP-N1 | Stefan Kindler | Expression von Fusionsproteinen aus rat- α -Tubulin und C-terminalem Rot-floureszierendem Protein mRFP (<i>monomeric red flourescent protein</i>) in eukaryotischen Zellen |

2.1.4.2 Konstruierte Vektoren

Tabelle 2.4: Übersicht über die konstruierten Vektoren

| Plasmid | Bemerkungen |
|----------------------|--|
| prFMR1-T4-EGFP | pEGFP-N1-Vektor mit der kodierenden Region der FMR1-Spleißvariante T4 der Ratte mit vorgeschalteter Kozaksequenz |
| prFMR1-T7-EGFP | pEGFP-N1-Vektor mit der kodierenden Region der FMR1-Spleißvariante T7 der Ratte mit vorgeschalteter Kozaksequenz |
| prFMR1-T8-EGFP | pEGFP-N1-Vektor mit der kodierenden Region der FMR1-Spleißvariante T8 der Ratte mit vorgeschalteter Kozaksequenz |
| pCMV-Tag2A | pCMV-Tag2A mit der kodierenden Region von α -Tubulin der Ratte |
| pr α Tub-mRFP | pmRFP-N1 mit der kodierenden Region von α -Tubulin der Ratte |

2.1.5 Kits

Folgende Kits wurden in dieser Arbeit verwendet:

peqGOLD Gel Extraction Kit (Peqlab)

EndoFree® Plamid Maxi Kit (10) (Qiagen)

QIAquick® PCR Purification Kit (250) (Qiagen)

2.1.6 Oligonukleotide

Alle eingesetzten Oligonukleotide wurden, soweit nicht anders angegeben, von Invitrogen synthetisiert. Gelieferte Oligonukleotide wurden in sterilem H₂O aufgenommen, so dass die Endkonzentration 100 pmol/μl betrug.

Tabelle 2.5: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide

Fett gekennzeichnet sind die Restriktionsschnittstellen. Die Kozaksequenz ist gepunktet und das Startcodon ist durchgezogen unterstrichen.

| Name | Sequenz (5'→3'), Verwendungszweck | Schnittstelle |
|------------------|---|---------------|
| FMR1r-1s | AAGAATTC <u>GC</u> <u>CGCC</u> <u>ACCA</u> ATGGAGGAGCTGG Klonierung von T3, T5, T7, T8 in pGEM Klonierung von T1, T2, T4 in pEGFP-N1 | EcoRI |
| FMR1r-8as | TTGGGCCCTT GGTACTCCATTACGAGTGG Klonierung von T3, T5, T7, T8 in pGEM Klonierung von T1, T4 in pEGFP-N1 | Apal |
| FMR1r-9as | TTGGGCCCTG TACTCCATTACGAGTGGT Klonierung von T2 in pEGFP-N1 | Apal |
| FMR1r-3s | CTGTTAATCCCAACAAACCTGC Sequenzierung der rFMRP-cDNA | |
| FMR1r-7s | AGGATCGAAGCTGAAAATGAG Sequenzierung der rFMRP-cDNA | |
| FMR1r-9s | CACCAAGTTCCTACCTTCCAA Sequenzierung der rFMRP-cDNA | |
| FMR1r-10as | ATTTGTAATCTCTCCAAACGCAAC Sequenzierung der rFMRP-cDNA | |
| FMR1r-11s | GTACAGATAAGGAAAAAGGCTATG Sequenzierung der rFMRP-cDNA | |
| FMR1r-12as | TTGGATCCG TACTCCATTAC Sequenzierung der rFMRP-cDNA | BamHI |
| CMV1-s | TGTCGTAACAACCTCCGCCCC Sequenzierung der rFMRP-cDNA | |
| SVPA2 | ATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAG Sequenzierung der rFMRP-cDNA | |
| GFP-rev (Sigma®) | GTCGCCGTCCAGCTCGAC Sequenzierung der FMR1r-EGFP-Konstrukte am Übergang zwischen der FMRP- und EGFP-cDNA | |
| mRFP-seq-as | CGGAGCCCTCCATGCGC Sequenzierung rαTub-pmRFP | |
| rαTub-3s | AAAAAAGCTTAGCCGCCACCATGCGTGAGT Amplifikation der kodierenden Region der rαTub-cDNA und Klonierung in pmRFP-N1 bzw. pmRFP-C2 | |
| rαTub-4as | TTGGTACCGTATTCTCCTTCTTCTC Amplifikation der kodierenden Region der rαTub-cDNA und Klonierung in pCMV-Tag2A | |
| rαTub-5as | TTGGTACCTTGATTCTCCTTCTTCTT Amplifikation der kodierenden Region der rαTub-cDNA und Klonierung in pmRFP-N1 bzw. pmRFP-C2 | |

2.1.7 Antikörper

2.1.7.1 Primäre Antikörper

Tabelle 2.6: Übersicht der verwendeten primären Antikörper

| Name | Verdünnung | | Hersteller |
|-----------------------------------|------------------------|---------------------|------------|
| | <i>Immunzytochemie</i> | <i>Western Blot</i> | |
| Kaninchen-anti- α -tubulin | 1:500 | | Abcam |
| Maus-anti-GAPDH | 1:800 | | Ambion |
| Kaninchen-anti-vGLUT | 1:10.000 | | Chemicon |
| Maus-anti-MAP2 | 1:1000 | | Sigma |
| Kaninchen-anti- α -FLAG | 1:100 | | Sigma |
| Kaninchen-anti-mRFP | 1:4000 | | Clontech |
| Kaninchen-anti-Grp78 | 1:250 | | Stressgen |
| Kaninchen-anti-GFP | | 1:10.000 | Abcam |
| Kaninchen-anti-FMRP-Serum | | 1:5000 | Pineda |

2.1.7.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 2.7: Übersicht der verwendeten sekundären Antikörper

| Name | Verdünnung (Immunzytochemie) | Hersteller |
|---------------------------------|---------------------------------|------------------|
| | AlexaFlour® 488-anti-mouse-IgG | |
| AlexaFlour® 546-anti-rabbit-IgG | 1:500 | Molecular probes |
| AlexaFlour® 635-anti-mouse-IgG | 1:500 | Molecular probes |
| Marina Blue-anti-rabbit-IgG | 1:500 | Molecular probes |
| | Verdünnung (Western Blot) | |
| HRP-anti-mouse-IgG | 1:2500 | Amersham |
| HRP-anti-rabbit-IgG | 1:2000 | Dianova |

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation von DNA-Abschnitten wurde PfuI-Polymerase (Promega®) verwendet.

PCR-Standardansatz:

- 10-50 ng DNA-Matrize
- 1 µl 5'-*Primer* (10 pmol/µl)
- 1 µl 3'-*Primer* (10 pmol/µl)
- 5 µl 10 x PfuI-Buffer
- 1 µl dNTP-Mix (10mM)
- 1 µl PfuI-Polymerase

add ddH₂O auf Gesamtvolumen von 50 µl

Die Amplifikation erfolgte mit Hilfe des *GeneAmp PCR System 2400 Thermocycler* (Perkin Elmer) nach folgenden Programmen:

Tabelle 2.8: Übersicht der PCR-Bedingungen

| PCR-Programm | DNA-Amplifikation | | Sequenzier-PCR | |
|---------------------------------|--|-------------|----------------|----------|
| Initiale Denaturierung | 94°C, 2-5 min | 30-35x ↺ | 96°C, 1 min | 25x ↺ |
| Denaturierung | 94°C, 30 sec | | 96°C, 20 sec | |
| <i>Primer</i> -Hybridisierung | 4-6°C unter der <i>Primer</i> -Schmelztemperatur | | 50°C, 5 sec | |
| Kettenverlängerung (Elongation) | 72°C, 1 min/kb Länge des gewünschten Produkts | | 60°C, 4 min | |
| Endelongation | 72°C, 3-7 min | | | |
| | 4°C, ∞ | | 4°C, ∞ | |

Die PCR-Produkte wurden nach Abschluss der PCR-Reaktion mittels des QIAquick® PCR Purification Kit (250) (Qiagen) aufgereinigt und für Subklonierungen verwendet.

2.2.1.2 Quantifizierung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA erfolgte entweder durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm im Photometer (GeneQuant Spektralphotometer RNA/DNA Calculator, Amersham Biosciences) oder mittels Agarosegelelektrophorese (2.2.1.3).

2.2.1.3 DNA-Gelelektrophorese, Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Zur größenabhängigen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde die Elektrophorese mit horizontalen 1%igen Agarosegelen genutzt (Sambrook *et al.*, 1989). Die Agarose (Invitrogen Life Technologies) wurde in 1xTAE (Tris-Acetat-EDTA-Puffer, einfach konzentriert in wässriger Lösung; Sambrook *et al.*, 1989), der auch als Ladepuffer diente, gelöst, und 0,2 µg/ml Ethidiumbromid (Sigma) wurden zum Detektieren der DNA unter UV-Licht, zugegeben. Die DNA-Proben wurden mit 6x Ladepuffer (*6xLoading Dye Solution*, Fermentas (10 mM Tris-HCl (pH 7.6); 0,03% Bromphenol Blau; 0,03% Xylen Cyanol FF; 60% Glycerol; 60 mM EDTA)) versetzt, zusammen mit dem Größenstandard *Gene Ruler™ 100bp DNA ladder* (MBI Fermentas) auf das Gel aufgetragen und bei 70-130 V elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die DNA-Fragmente über das interkalierte Ethidiumbromid am UV-Tisch (UVT 2035, Herolab) sichtbar gemacht. Die gegebenenfalls für Klonierungen relevanten DNA-Fragmente wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des peqGOLD Gel Extraction Kit (Peqlab) entsprechend der Herstellerangaben isoliert.

2.2.1.4 Restriktion von DNA mit Endonukleasen

Plasmid-DNA und PCR-Produkte wurden mit Restriktionsenzymen (2.1.3) nach Herstellerangaben verdaut. Enzymreaktionen wurden mittels Hitzeinaktivierung (65°C, 15 min) oder durch Zugabe von Ladepuffer für die Agarosegelelektrophorese (2.2.1.3) beendet.

2.2.1.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Linearisierte Vektoren wurden mit dem drei- bis zehnfachen molaren Überschuss eines entsprechend geschnittenen DNA-Fragments und 1 U T4-DNA-Ligase (Invitrogen Life Technologies) nach Herstellerangaben mehrere Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. PCR-Produkte mit einem durch die PCR generierten Poly-A-Überhang wurden entsprechend der Herstellerangaben in den Vektor *pGEM®-T Easy* (Promega) kloniert.

2.2.1.6 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. lysogeny broth) über Nacht bei 37°C geschüttelt und dann zum Animpfen einer 500 ml Hauptkultur eingesetzt. Nach Erreichen einer OD_{600} von 0,3-0,6 wurde die Bakteriensuspension für 1-2 min in Eiswasser gekühlt, bei 4°C und 1000 x g 5 min zentrifugiert und das Pellet wurde in 50 ml eiskaltem TSB (LB, pH 6,1; 10% PEG 3350 (w/v); 5% DMSO (v/v); 0,01 M $MgSO_4$; 0,01 M $MgCl_2$) resuspendiert. Nach einer 10-15 minütigen Inkubation auf Eis wurde die Suspension aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

Für die Transformation wurden 100 µl Bakteriensuspension mit 20 µl KCM (0,5 M KCl; 0,15 M $CaCl_2$; 0,25 M $MgCl_2$), 10 µl Ligationsansatz und 70 µl Wasser versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein fünfminütiger „Hitzeschock“ bei 37°C. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) und anschließender Inkubation für 40-60 min im 37°C-Schüttler, wurden

die Bakterienzellen auf LB-Selektionsplatten (Sambrook *et al.*, 1989) ausplattiert und über Nacht im 37°C-Brutschrank inkubiert.

2.2.1.7 Bakterienkultur und Plasmidpräparation

Erfolgreich transformierte Bakterien konnten bei 37°C in Abhängigkeit von der vektorbedingten Resistenz auf Kanamycin- bzw. Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten oder in entsprechenden LB-Flüssigmedien vermehrt werden (Sambrook *et al.*, 1989). Aus Bakterienkolonien wurden DNA-Plasmide mittels alkalischer Lyse isoliert (Sambrook *et al.*, 1989). Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA für Transfektionen (2.2.2.1, 2.2.2.2) wurde das EndoFree® Plamid Maxi Kit (10) (Qiagen) nach Herstellerangaben eingesetzt.

2.2.1.8 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach dem Kettenabbruchverfahren (Sanger *et al.*, 1977) im Rahmen von Polymerase-Kettenreaktionen (2.2.1.1). Hierfür wurden fluoreszenz-markierte Didesoxynukleotide aus dem *ABI PRISM™ BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems) sowie die ebenfalls darin enthaltene AmpliTaq® DNA Polymerase eingesetzt und eine PCR nach dem in Tabelle 2.8 beschriebenen Programm durchgeführt. Die Analyse der fluoreszenzmarkierten Fragmente erfolgte durch den *ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer* (Applied Biosystems) im Sequenzierlabor des Instituts für Humangenetik (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf).

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Kultivierung und transiente Transfektion von CHO-K1 Zellen

Die von Ovarien des chinesischen Hamsters (*Cricetulus griseus*) abstammenden CHO-K1 Zellen wurden in *F-12 Ham-Medium* (Gibco,

Invitrogen) mit 10% hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserum (FCS, Sigma), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Grünthal) in Zellkulturschalen (Ø 10 cm, Sarstedt) bei 37°C in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre kultiviert. Zur normalen Kultivierung der Zelllinie wurden die Zellen alle 3-5 Tage passagiert. Hierbei wurden die Zellen einmal mit 1 x PBS-Puffer (13,7 mM NaCl; 0,27 mM KCl; 0,9 mM Na₂HPO₄; 0,23 mM KH₂PO₄; pH 7,4; Sambrook *et al.*, 1989) gewaschen und nach Zugabe von Trypsin (0,25% Trypsin (w/v), Invitrogen, in 1 x PBS-Puffer) 2-5 min bei 37°C inkubiert bis sich die Zellen von den Schalen ablösten. Die Zellsuspension wurde mit dem drei- bis fünffachen Volumen Kulturmedium versetzt, um das Trypsin zu inaktivieren und in den gewünschten Zellkonzentrationen zur weiteren Kultivierung auf neue Kulturschalen überführt. Transiente Transfektionen erfolgten mit Hilfe von *LipofectamineTM 2000 Reagent* (Invitrogen) nach Herstellerangaben einen Tag nach der Zellpassage.

2.2.2.2 Präparation, Kultivierung und transiente Transfektion primärer Hippokampusneurone

Hippokampusneurone wurden nach dem Protokoll von Blichenberg *et al.* (1999) aus dem Gehirn von 18-20 Tage alten Rattenembryonen präpariert und transfiziert. Die Neurone wurden nach der Präparation aus den Hippokampi der Rattenembryonen für 3 h bei 37°C auf Poly-L-Lysin (Sigma) beschichteten Deckgläsern in Plattiermedium (*Modified Eagle Medium* (MEM) (Gibco); 10% Pferdeserum (v/v), (Gibco, Invitrogen)) ausplattiert. Anschließend wurde das Plattiermedium durch „Neuromedium“ (Neurobasalmedium (Gibco); 1 x B27 Supplement (Gibco); 0,5 mM L-Glutamin (Gibco, Invitrogen); 25 µM Glutamat (Sigma)) ausgetauscht. Nach vier Tagen wurde die Hälfte des Mediums durch frisches Medium ersetzt, welches kein Glutamat, dafür aber 5 µM AraC (Cytosin-β-D-Arabinofuranosid (Sigma)), enthielt, um Gliazellen aus der Kultur zu entfernen. Im Folgenden wurden die Neurone zweimal die Woche mit frischem „Neuromedium“ versehen, wobei jeweils nur die Hälfte des Mediums ersetzt wurde.

Die transiente Transfektion erfolgte am siebten Tag nach der Präparation mit der CaPO₄-Methode (Blichenberg *et al.*, 1999; Sambrook *et al.*, 1989). Dabei wurden 10 µg Plasmid-DNA mit 10 µl 2,5 M CaCl₂ und H₂O in einem Endvolumen von 100 µl vermisch. Unter kontinuierlichem Schütteln wurden tropfenweise 100 µl 2 x BBS (50 mM BES; 280 mM NaCl; 1,5 mM Na₂HPO₄, pH 6,96) zugegeben. Nach einer zwanzigminütigen Inkubation bei RT wurden jeweils 100 µl des DNA-BBS-Ansatzes zu den auf einem Deckglas kultivierten Neuronen gegeben. Nach der Zugabe des Transfektionsansatzes wurden die Zellen für 2-4 Stunden bei 37°C in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurde das Präzipitat durch 3-5 maliges Waschen mit 1 x *Hanks Balanced Salt Solution* (HBSS, 10 mM HEPES, 2 mM NaOH (Gibco, Invitrogen)) von den Zellen entfernt. In frischem „Neuromedium“ wurden die Neurone für weitere 5-10 Tage inkubiert.

2.2.2.3 Immunzytochemie

Für Immunfluoreszenzuntersuchungen wurden sowohl transfizierte CHO-K1 Zellen als auch transfizierte Neurone verwendet. Mit den CHO-K1 Zellen wurden zusätzlich Extraktionsversuche durchgeführt, bei denen die Zellen vor der Fixierung zunächst 1 x mit PBS, dann 1 x mit Extraktions-Puffer (100 mM Pipes; 1 mM MgSO₄; 2 mM EGTA; 1,8 M Glycerol; pH 7,4) gewaschen und anschließend mit 0,2% Triton-X-100 in Extraktions-Puffer für 10 min bei RT extrahiert wurden. Danach folgte ein zweimaliges Waschen der Zellen mit Extraktions-Puffer bevor die Zellen fixiert wurden. Hierfür erfolgte zunächst ein Waschschrift mit 1 x PBS ehe die Zellen für 15 min bei RT mit 4%igem Paraformaldehyd in PBS inkubiert wurden. Es folgte ein dreimaliges Waschen mit 1 x PBS und bei den Neuronen und nichtextrahierten CHO-K1 Zellen eine dreiminütige Permeabilisierung mit 0,1%igem Triton-X-100 in PBS bei RT. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurden unspezifische Bindungsstellen auf den Zellen für 1 h bei RT mit 10%igem Ziegenserum (Gibco) in PBS blockiert. Die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper (verdünnt in 10%igem Ziegenserum in PBS) erfolgte ü.N. bei 4°C oder 1-2 h bei RT. Die Deckgläser wurden anschließend dreimal mit PBS gewaschen und mit

entsprechenden Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörpern (verdünnt in 10%igem Ziegenerum in PBS) bei RT für 1 h inkubiert. Zuletzt wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen und auf Objektträgern mit Hilfe von *Permaflour* (Beckman Coulter) eingebettet. Die Verdünnungen der verwendeten Antikörper sind Tabelle 2.6 / 2.7 zu entnehmen.

2.2.2.4 Mikroskopie

Die Fluoreszenzsignale der transfizierten Zellen und Neurone wurden mit Hilfe des Zeiss Axiovert 135 Mikroskop in Kombination mit einer CCD C4742-95-12NRB Digital Kamera (Hamamatsu) und der *Openlab 2.2.5 Software* detektiert. Für qualitativ bessere Aufnahmen wurde das konfokale Mikroskop DM IRBE von Leica verwendet. Die Aufnahmen wurden mit dem Programm *Adobe® Photoshop 6.0* (Adobe System Incorporated) bearbeitet.

2.2.3 Proteinchemische Methoden

2.2.3.1 Gewinnung von Proteinextrakten aus Zellen

Für die Proteinextraktion wurden CHO-K1-Zellen in 1,8 cm- Ø-Kulturschalen ausgesät und die Expression der gewünschten Proteine durch die transiente Transfektion nach 2.2.2.1 induziert. Zur Gewinnung von Gesamtzellextrakten wurden die Zellen zunächst mit 1 x PBS gewaschen und anschließend in jeweils 100 µl RIPA-Puffer (1 mM Tris (pH 8,0); 5 M NaCl; 100% NPO₄; 10% NaDOC; 0,5 M EDTA (pH 8,0); 10% SDS) und 25-fachem Proteaseinhibitor pro Zellkulturschale lysiert und 15 min auf Eis inkubiert. Zum Homogenisieren wurde das Lysat daraufhin mehrfach auf- und abpipettiert und schließlich bei 13.000 rpm und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Das Pellet der Zentrifugation wurde verworfen und der Überstand bei -70°C gelagert.

2.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen wurden 10%ige SDS-Polyacrylamid-Gele (Sambrook *et al.*, 1989) eingesetzt und die SDS-PAGE nach der von Laemmli etablierten Methode durchgeführt (Laemmli, 1970). Die jeweiligen durch Proteinextraktion (2.2.3.1) gewonnenen Proteinproben wurden mit 25 µl 5 x Laemmli-Puffer (0,5 M DTT; 10% SDS; 0,4 M Tris-HCl (pH 6,8); 50% Glycerin) versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend bei 200 V in SDS-Ladepuffer (25 mM Tris-Base; 192 mM; 0,1% (v/v) SDS) elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenstandard diente ein vorgefärbter Protein-Molekulargewichtsmarker (*Full Range Rainbow Marker*, Amersham Biosciences).

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

Zur immunologischen Detektion von Proteinen wurden diese nach der Auftrennung mittels SDS-PAGE (2.2.3.2) elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran (PROTAN, Schleicher&Schuell) übertragen. Der Transfer erfolgte mit dem *semi dry* Verfahren nach Angaben der Hersteller von Membran und Blot-Apparatur (*Trans-Blot® SD Cell*, BioRad) in Semi-Dry Transferpuffer (25 mM Tris-Base; 10% Methanol (v/v); 150 mM Glycin) für ca. 45 min bei 150 mA. Nach einer erfolgreichen Proteinübertragung, die mittels Ponceaufärbung (*Ponceau S Solution*, Sigma) überprüft wurde, inkubierte man die Membran für 1 h bei RT mit Blockierlösung (10% Magermilchpulver oder 5% BSA in PBST (PBS + 0,3% Tween-20 (v/v))), um unspezifische Bindungen abzusättigen. Die anschließende Reaktion mit dem primären Antikörper, der in entsprechender Arbeitskonzentration in Blockierlösung verdünnt wurde (Tabelle 2.6), erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach drei zehnmütigen Waschschritten mit PBST folgte die Inkubation mit dem entsprechenden HRP (*horseradish peroxidase*)-gekoppeltem sekundären Antikörper in der entsprechenden Arbeitskonzentration (Tabelle 2.7) für 1 h bei RT. Es folgten drei weitere zehnmütige Waschschrritte mit PBST und im Anschluss die Detektion der antikörpermarkierten Proteine mit Hilfe des ECL-Systems (*Enhanced*

Chemiluminescence; Lumi-Light Western Blotting Substrate, Roche) nach Herstellerangaben auf Röntgenfilmen (Cronex 5 Medical X-Ray Film, Agfa).

3 Ergebnisse

In der Literatur sind verschiedene Isoformen des RNA-bindenden Proteins FMRP sowohl im humanen Gewebe als auch im Gewebe der Maus beschrieben worden (Verkerk *et al.*, 1993; Sittler *et al.*, 1995). In unserem Labor wird die cDNA der Ratte (*Rattus norvegicus*), von der zu diesem Zeitpunkt noch keine FMR1-mRNA-Varianten bekannt sind, für zahlreiche Versuche und Fragestellungen eingesetzt. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob im Gehirn der Ratte (*Rattus norvegicus*) unterschiedliche FMRP-Isoformen vorliegen. Anschließend sollten Untersuchungen zur differentiellen subzellulären Lokalisation verschiedener Isoformen durchgeführt werden, anhand derer eventuelle funktionelle Unterschiede aufgedeckt werden könnten.

3.1 Charakterisierung verschiedener FMRP-Isoformen der Ratte (*Rattus norvegicus*)

Zur Charakterisierung möglicher FMRP-Isoformen der Ratte wurde zunächst die bekannte FMR1-Maus-cDNA gegen das komplette Genom der Ratte abgeglichen, um mögliche Homologien auf DNA-Ebene zu detektieren. Insbesondere im vorderen und hinteren Genabschnitt zeigten sich identische Sequenzbereiche für beide Spezies. Diese Informationen wurden für das Design der rattenspezifischen Primer genutzt, so dass PCR-Analysen folgten, bei denen die cDNA aus adultem Rattengehirn als Matrize diente. Die hierfür eingesetzten Primer *FMR1-1sense* und *FMR1-8antisense* flankieren die kodierende Region der FMR1-cDNA der Maus. Somit sollte mit Hilfe dieser Primerkombination die kodierende Region der FMR1-cDNA der Ratte spezifisch amplifiziert werden. Im nächsten Schritt wurden die durch diese Amplifikation gewonnenen PCR-Produkte zunächst auf dem Agarosegel aufgetrennt. Dort stellten sich Fragmente in der gewünschten Größe von ca. 1,8 kb dar. Diese wurden mittels QIAquick® PCR Purification Kit (250) (Qiagen) aufgereinigt, in den pGEM-T Easy-Vektor kloniert (2.2.1.5) und in chemokompetente Bakterien transformiert (2.2.1.6). Aus mehreren

gewachsenen Kolonien wurde die Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse isoliert, mit dem Restriktionsenzym EcoRI verdaut und zur Analyse in einem Agarosegel aufgetrennt. Plasmide, die ein ca. 1,8 kb großes Insert enthielten wurden sequenziert (Abb. 3.1).

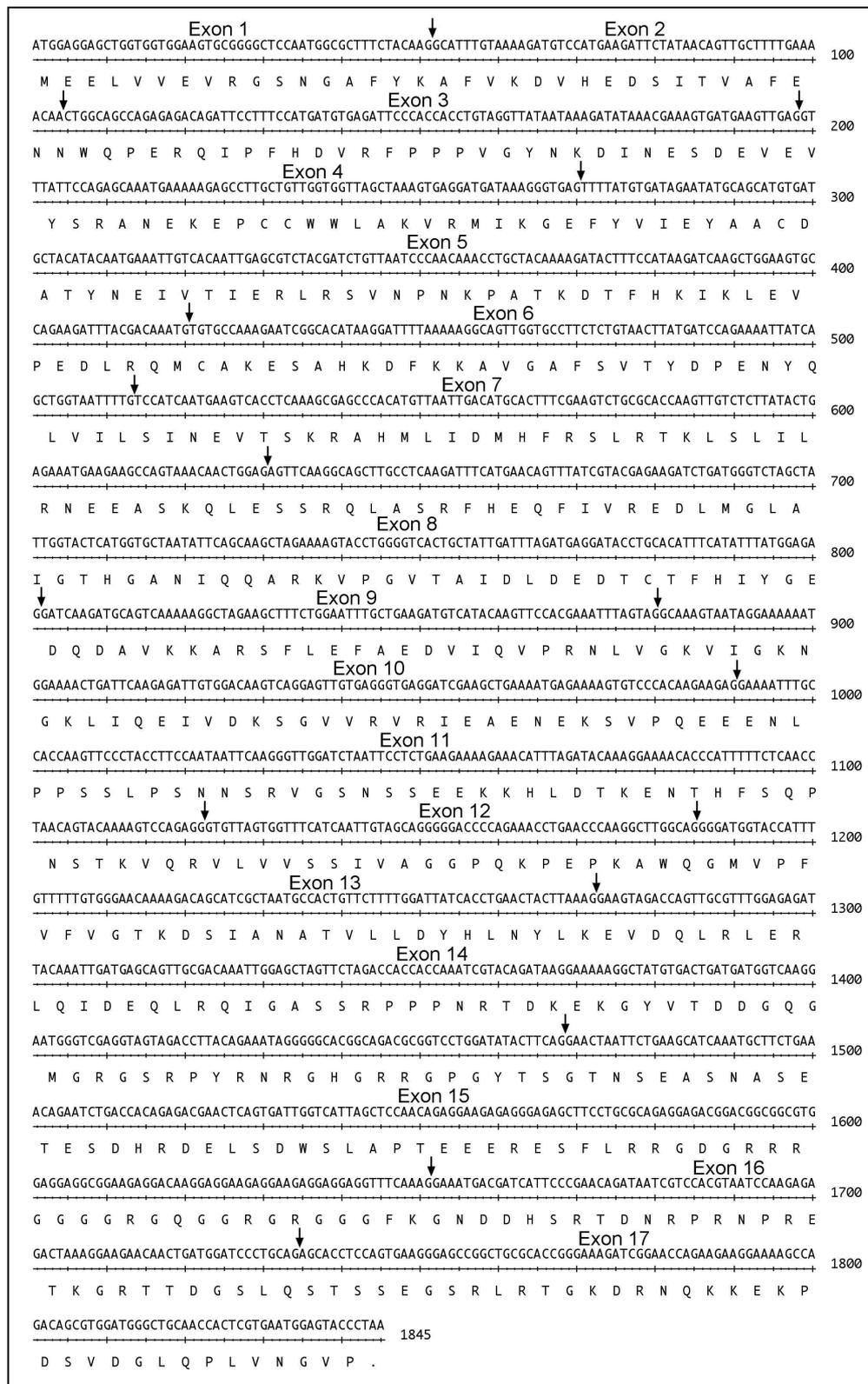


Abbildung 3.1: Kodierende Region der FMR1-cDNA und die davon abgeleitete FMRP-Sequenz der Ratte (*Rattus norvegicus*)
 Die schwarzen Pfeile markieren die einzelnen Exongrenzen.

| Exon | Größe in bp |
|------|-------------|
| 1 | > 51 |
| 2 | 53 |
| 3 | 94 |
| 4 | 72 |
| 5 | 150 |
| 6 | 93 |
| 7 | 117 |
| 8 | 171 |
| 9 | 79 |
| 10 | 110 |
| 11 | 132 |
| 12 | 63 |
| 13 | 87 |
| 14 | 196 |
| 15 | 183 |
| 16 | 83 |
| 17 | > 107 |

Tabelle 3.1: Übersicht über die Größe der einzelnen Exons des FMR1-Gens der Ratte (*Rattus norvegicus*)

Insgesamt wurden acht verschiedene, in Abbildung 3.2 schematisch dargestellte cDNA-Fragmente identifiziert. Die entsprechenden mRNAs gehen vermutlich durch alternatives Spleißen aus einer gemeinsamen Vorläufer-RNA hervor und werden in der vorliegenden Arbeit als *Spleißvarianten* bzw. *Transkripte* (T) bezeichnet. Sequenzabschnitte, die in der mRNA mit der längsten kodierenden Region vorhanden sind, in mindestens einem der anderen sieben Transkripte aber fehlen, werden nachfolgend als variable Regionen oder Abschnitte bezeichnet. Die acht verschiedenen cDNA-Fragmente kodieren jeweils unterschiedliche FMRP-Varianten, die im Rahmen dieser Arbeit als *Isoformen* (Iso) bezeichnet werden.

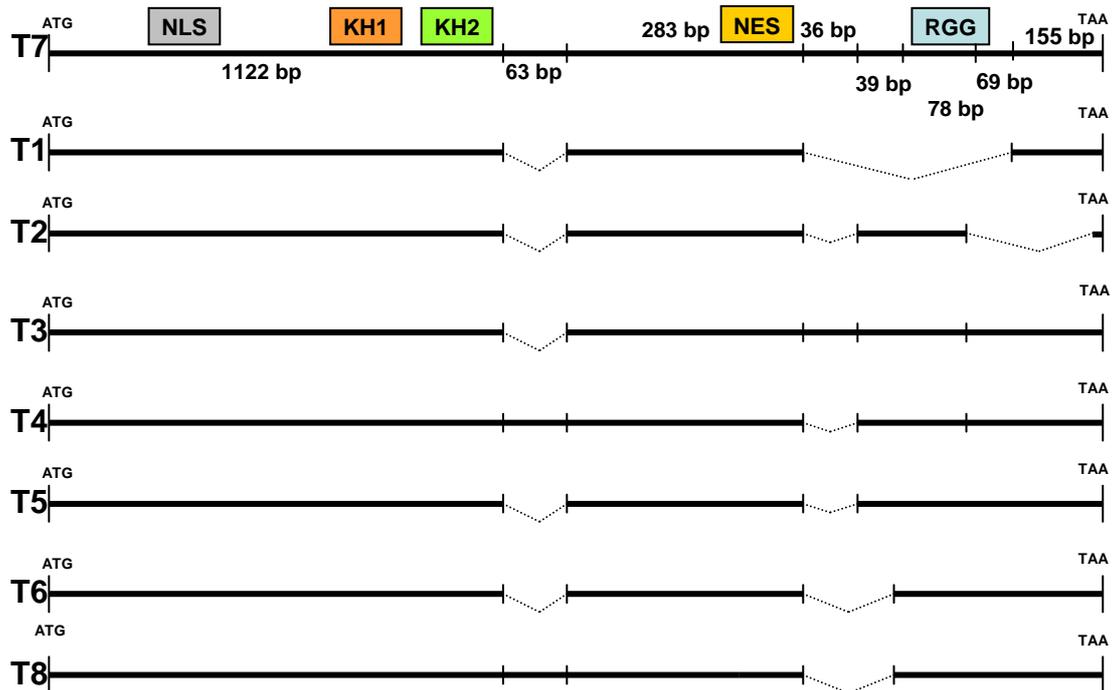


Abbildung 3.2: FMR1-cDNA-Varianten der Ratte

Schematische Darstellung der mittels PCR-Amplifikation von Ratten-cDNA und anschließender Sequenzierung identifizierten Spleißvarianten im kodierenden Bereich der rFMR1-mRNA. Die rFMR1-Spleißvarianten sind von **T1-T8** (T = Transkript) durchnummeriert. Hierbei entspricht T7 der längsten identifizierten cDNA-Sequenz. Fehlende Sequenzabschnitte sind gepunktet dargestellt und mittels der Nukleotidpositionen im vollständigen Transkript T7 beschrieben. Das Startcodon ist durch ATG, das Stoppcodon durch TAA gekennzeichnet.

Innerhalb der FMR1-cDNA-Sequenz sind Bereiche gekennzeichnet, die folgende Domänen kodieren: **NLS** (Nukleäres Lokalisationssignal) und **NES** (Nukleäres Exportsignal) sowie drei RNA-bindende Domänen: **KH1** und **KH2** (*hnRNP K homologe Domäne 1* bzw. *2*) und die **RGG-Box** (*Arginin-(R), Glycin-reiche (G) Domäne mit RGG-Tripeptid*).

Die gesamte Länge der kodierenden Region des längsten identifizierten Transkriptes umfasst 1842 bp und kodiert ein 614 AS umfassendes und 69 kDa großes Protein. Schaut man sich die schematische Darstellung der acht charakterisierten Transkripte an (Abb. 3.2), fällt auf, dass im vorderen Abschnitt des FMR1-Gens der Ratte vermutlich kein alternatives Spleißen stattfindet. Die vom 5'-Ende aus gesehen erste variable Region liegt 1123 bp vom Startcodon entfernt und umfasst 63 nt. Sie liegt stromabwärts der NLS-, KH1- und KH2-kodierenden Regionen. Somit besitzen alle von den acht Spleißvarianten kodierten FMRP-Isoformen die NLS-vermittelte Fähigkeit der Translokation in den Zellkern und die RNA-bindende Funktion der beiden KH-Domänen. Bei fünf der acht Spleißvarianten fehlt diese erste variable Region von 63 nt. Bei der Spleißvariante T3 fehlt gegenüber T7 lediglich diese 63 nt umfassende

Region. Bei den Transkripten T1, T2, T5 und T6 sind während des Spleißvorganges zusätzlich weitere Bereiche entfernt worden. Hierbei handelt es sich um Regionen, die hinter dem NES-kodierenden Bereich liegen und unterschiedlich lange Nukleotidsequenzen umfassen. Bei den Spleißvarianten T2, T4 und T5 ist der zusätzlich fehlende Abschnitt am kleinsten. Er umfasst nur 36 nt. Bei den Spleißvarianten T6 und T8 fehlen zusätzlich 39 unmittelbar stromabwärts daran anschließende Nukleotide. Die variable Region ist folglich insgesamt 75 nt lang. Bei dem Transkript T1 sind zusätzlich die an diese Region stromabwärts anschließenden 147 nt entfernt worden. Somit umfasst die variable Region hier insgesamt 222 nt, woraus der vollständige Verlust des für die RNA-bindende RGG-Box kodierenden Genabschnittes resultiert. Dem Transkript T2 fehlt eine 224 nt umfassende Region etwas stromaufwärts des Stoppcodons. Daher kodiert T2 eine C-terminal unvollständige RGG-Box.

Durch den Vergleich der neu identifizierten cDNA-Sequenzen mit der genomischen Sequenz der Ratte konnte die FMR1-Genstruktur der Ratte aufgeklärt werden (Abb. 3.1). Unterschiedliche Transkripte entstehen durch die differenzielle Nutzung einzelner Spleißdonoren und –akzeptoren an definierten Exon-Intron-Übergängen sowie mittels alternativer Spleißpunkte innerhalb einzelner Exons (Abb. 3.3). Die erste variable Region wird von Exon 12 kodiert. Dieser Sequenzbereich fehlt bei den Transkripten T1, T2, T3, T5 und T6. Die weiter stromabwärts gelegenen, auch in Kombination auftretenden, variablen Abschnitte werden durch die differenzielle Verwendung zwei alternativer Spleißakzeptoren und eines alternativen Spleißdonors innerhalb des Exons 15 aus der Vorläufer-RNA entfernt. Zur Herstellung der Transkripte T2, T4 und T5 wird der weiter stromaufwärts gelegene Akzeptor genutzt, während bei der Synthese der Transkripte T6 und T8 der stromabwärts davon gelegene Spleißakzeptor verwendet wird. Der alternative Spleißdonor in Exon 15 findet bei der Entstehung des Transkriptes T2 Verwendung. Des Weiteren gibt es einen alternativen Spleißakzeptor innerhalb des Exon 16, der bei der Entfernung der großen in T1 fehlenden variablen Region, genutzt wird.

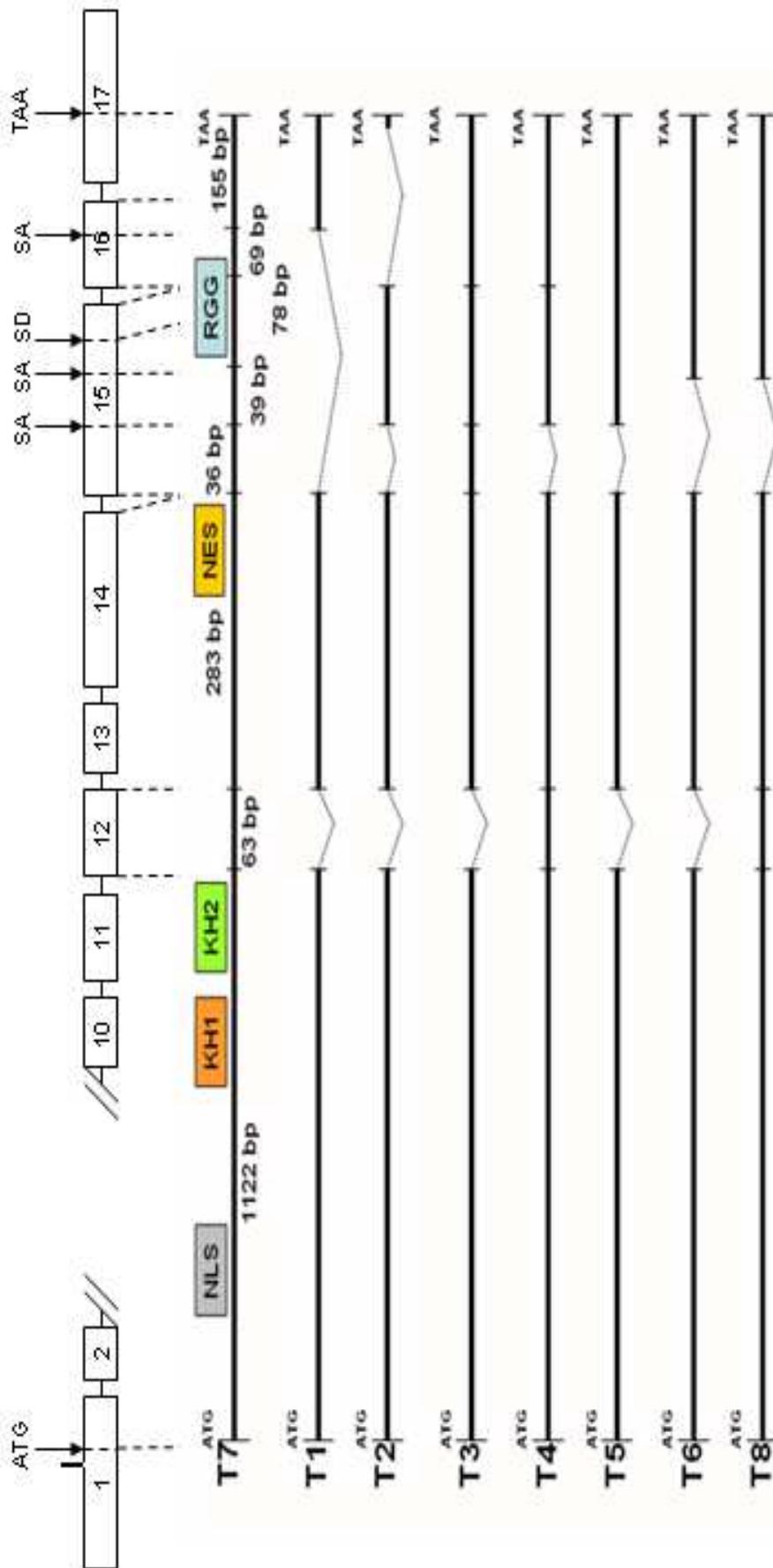


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der FMR1 Genstruktur im Genom der Ratte. Im oberen Teil des Bildes ist die Exon (weiße Boxen) -Intron (horizontale Striche) -Struktur sowie die Position wichtiger alternativer Splice-Akzeptoren (SA) sowie Donoren (SD) dargestellt. Exon 1 und Exon 17 kodieren das Start- (ATG) bzw. Stoppcodon (TAA) der Translation. Im unteren Bildteil sind die acht dieser Arbeit charakterisierende FMR1-mRNA-Splicevarianten dargestellt. Die horizontale Linie in jeder Variante repräsentiert die vorhandene Sequenzabschnitte, während die gepunktete Linie die dem entsprechenden Transkript zugehörigen Bereiche darstellt. Oberhalb der TT-mRNA sind die Regionen, welche die RNA-Bindedomäne (KH1, KH2 und RGG) bzw. das nukleäre Lokalisationsignal (NLS) und Exportsignal (NES) kodieren, eingezeichnet. Oberhalb und unterhalb von Transkript T1 ist die Größe der Exon 16 durch kleine vertikale Striche voneinander getrennte cDNA Abschnitte in Basepaaren angegeben.

Somit sind mittels PCR-Amplifikation der adulten Rattengehirn-cDNA acht FMR1-mRNA-Varianten charakterisiert worden, die acht unterschiedliche rFMRP-Isoformen kodieren. In keinem der acht Transkripte bewirkt das Fehlen einzelner variabler Regionen eine Verschiebung des Leserahmens (*frameshift*). Es wäre denkbar, dass die einzelnen variablen Regionen der Spleißvarianten individuelle Domänen mit separaten Funktionen kodieren. Daher war die auf den neu gewonnenen Erkenntnissen aufbauende Frage, ob die verschiedenen Isoformen in Zellen ein unterschiedliches Verhalten in Bezug auf ihre subzelluläre Verteilung zeigen. Um hierauf eine Antwort zu erhalten, wurden zunächst eukaryotische Expressionsvektoren konstruiert, die drei unterschiedliche FMRP-Isoformen als Fusionsproteine mit dem *enhanced green fluorescent protein* EGFP kodieren.

3.2 Herstellung eukaryotischer Expressionsvektoren

Zur Herstellung der eukaryotischen Expressionsvektoren wurden die kodierenden Regionen der beschriebenen acht FMR1-cDNA-Varianten über die Restriktionsschnittstellen EcoRI und ApaI aus den entsprechenden pGEM-T Easy-Vektoren heraus geschnitten und in den eukaryotischen Expressionsvektor pEGFP-N1 inseriert.

Die cDNA-Fragmente der Transkripte T4, T7 und T8 wurden erfolgreich subkloniert, während die restlichen fünf cDNAs nicht in den eukaryotischen Expressionsvektor eingebracht werden konnten.

Expressionsanalysen der Fusionsproteine in eukaryotischen Zellen begonnen werden sollte, galt es zu kontrollieren, ob in eukaryotischen Zellen die vollständigen Fusionsproteine synthetisiert werden.

3.3 Synthese rekombinanter FMRP-Isoformen in eukaryotischen Zellen

Um zu testen, ob die vollständigen Fusionsproteine synthetisiert werden, wurden CHO-K1-Zellen jeweils mit einem der drei Konstrukte prFMR1-T4/-T7/-T8-EGFP transient transfiziert und 24 Stunden später lysiert. Anschließend wurden die Zellextrakte in einer Western Blot Analyse sowohl mit einem polyklonalen Antikörper eines Kaninchens gegen die EGFP-Domäne, als auch mit polyklonalem anti-FMRP-Serum analysiert. Als Negativkontrolle diente ein Zellextrakt nichttransfizierter CHO-K1-Zellen.

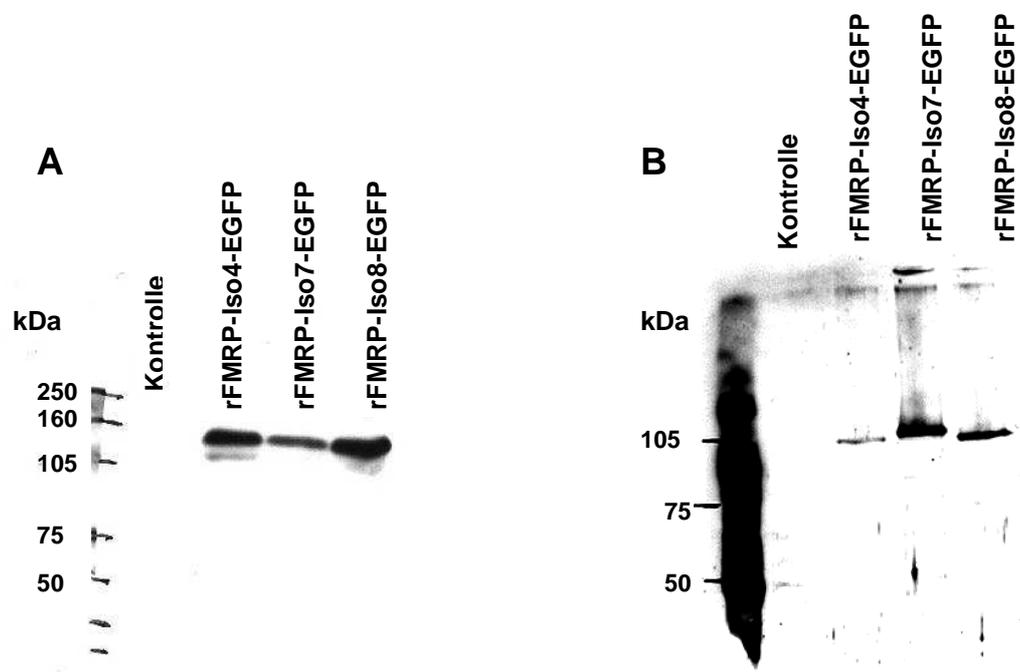


Abbildung 3.5: Expression von rFMRP-EGFP Fusionsproteinen in CHO-K1-Zellen

Die Synthese der vollständigen Fusionsproteine wurde mittels Western Blot Analyse mit einem polyklonalen Antikörper gegen die EGFP-Domäne (1:10.000) (A) und einem polyklonalen FMRP-Antikörper (1:5000) (B) analysiert. Die Proteine in der erwünschten Größe werden exprimiert. Als Kontrolle diente ein Zellextrakt nicht-transfizierter CHO-K1-Zellen.

Es zeigte sich in den Western Blot Analysen, dass alle drei Fusionsproteine in der erwarteten Größe von ca. 100 kDa synthetisiert werden. Die kalkulierten Molekulargewichte der Isoformen Iso4, Iso7 und Iso8 sind 98 kDa, 99 kDa und 96,2 kDa. Gegenüber dem Protein-Größenmarker laufen die Fusionsproteine langsamer als der kalkulierten Größe entsprechend erwartet. Dieses Verhalten wurde aber bereits bei zahlreichen Western Blot Analysen mit dem isolierten FMR1-Protein beobachtet (Siomi *et al.*, 1993). In dem Extrakt nicht-transfizierter Zellen zeigten sich keine Banden, womit eine Kreuzreaktivität der Antikörper ausgeschlossen werden kann.

3.4 Untersuchung der subzellulären Lokalisation verschiedener rFMRP-Isoformen in CHO-K1-Zellen

Für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation der Fusionsproteine in eukaryotischen Zellen wurden transfizierte CHO-K1-Zellen am zweiten Tag nach der Transfektion fixiert. Daraufhin folgte eine immunzytochemische Färbung der Zellen mit einem polyklonalen Antikörper gegen α -Tubulin (im roten Kanal dargestellt) zum Nachweis der Mikrotubuli. Rekombinante Proteine werden mittels ihrer Autofluoreszenz detektiert. Als Vergleich dienten Zellen, die mit einem EGFP-Vektor (pEGFP-N3) transfiziert wurden.

Zur Beschreibung der subzellulären Proteinverteilung wird in der vorliegenden Arbeit prinzipiell zwischen zwei Verteilungsmustern unterschieden. Wenn sich die Fusionsproteine zu vielen, kleinen über die Zelle verteilten Strukturen zusammenlagern, wird das entsprechende Verteilungsmuster als „granulär“ bezeichnet. Große die rekombinanten Proteine enthaltende Zellbestandteile werden hingegen als „Aggregate“ bezeichnet.

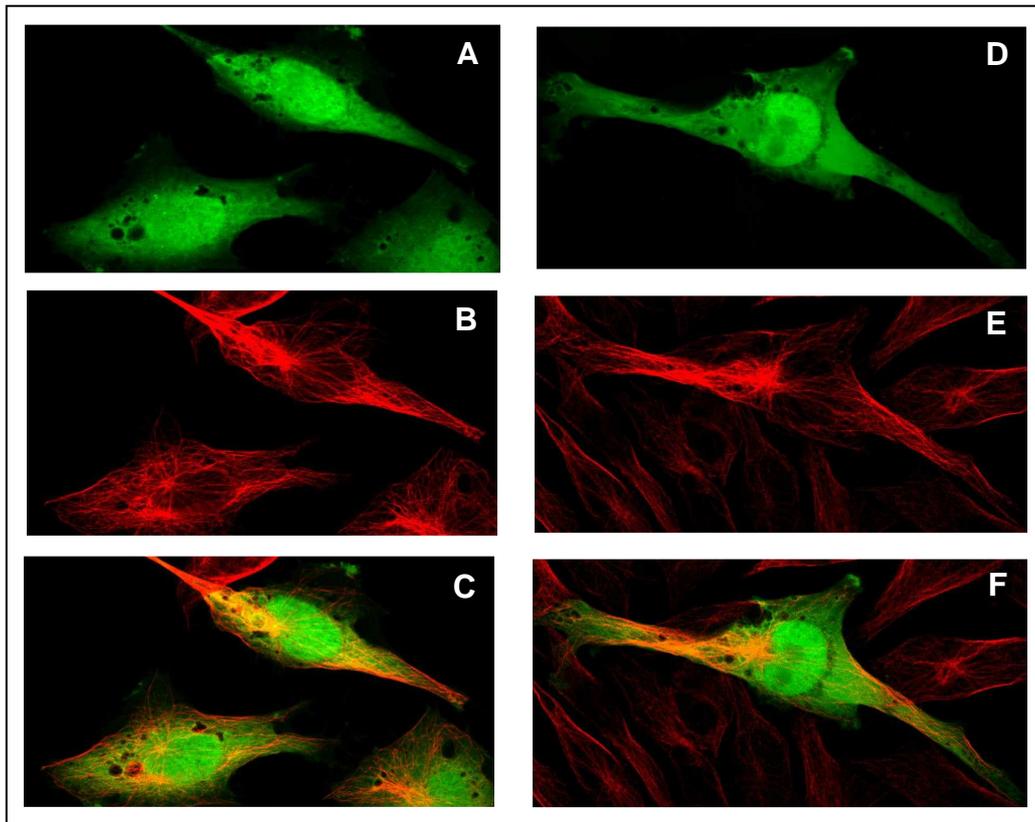


Abbildung 3.6: Subzelluläre Verteilung von EGFP in CHO-K1-Zellen

A+D: Autofluoreszenz von EGFP **B+E:** Detektion des endogenen α -Tubulins mittels Immunfluoreszenz **C+F:** Überlagerung beider Kanäle

In den pEGFP-N3 transfizierten CHO-K1-Zellen zeigt EGFP eine recht gleichmäßige Verteilung im Zytoplasma und Nukleus (Abb. 3.6 A und D). Hierbei ist eine Akkumulation im Zellkern zu beobachten. Im roten Kanal sind die filigranen Filamente des Mikrotubulus-Zytoskelettes erkennbar (Abb. 3.6 B und E). In der Überlagerung der beiden Kanäle (Abb. 3.6 C und F) kommt es zu einer partiellen Gelbfärbung die auf eine teilweise Kollokalisation, aber nicht zwangsläufige Assoziation von EGFP und α -Tubulin im Zytoplasma hindeutet. Die drei FMRP-Isoformen zeigen in den CHO-K1-Zellen eine unterschiedliche subzelluläre Verteilung.

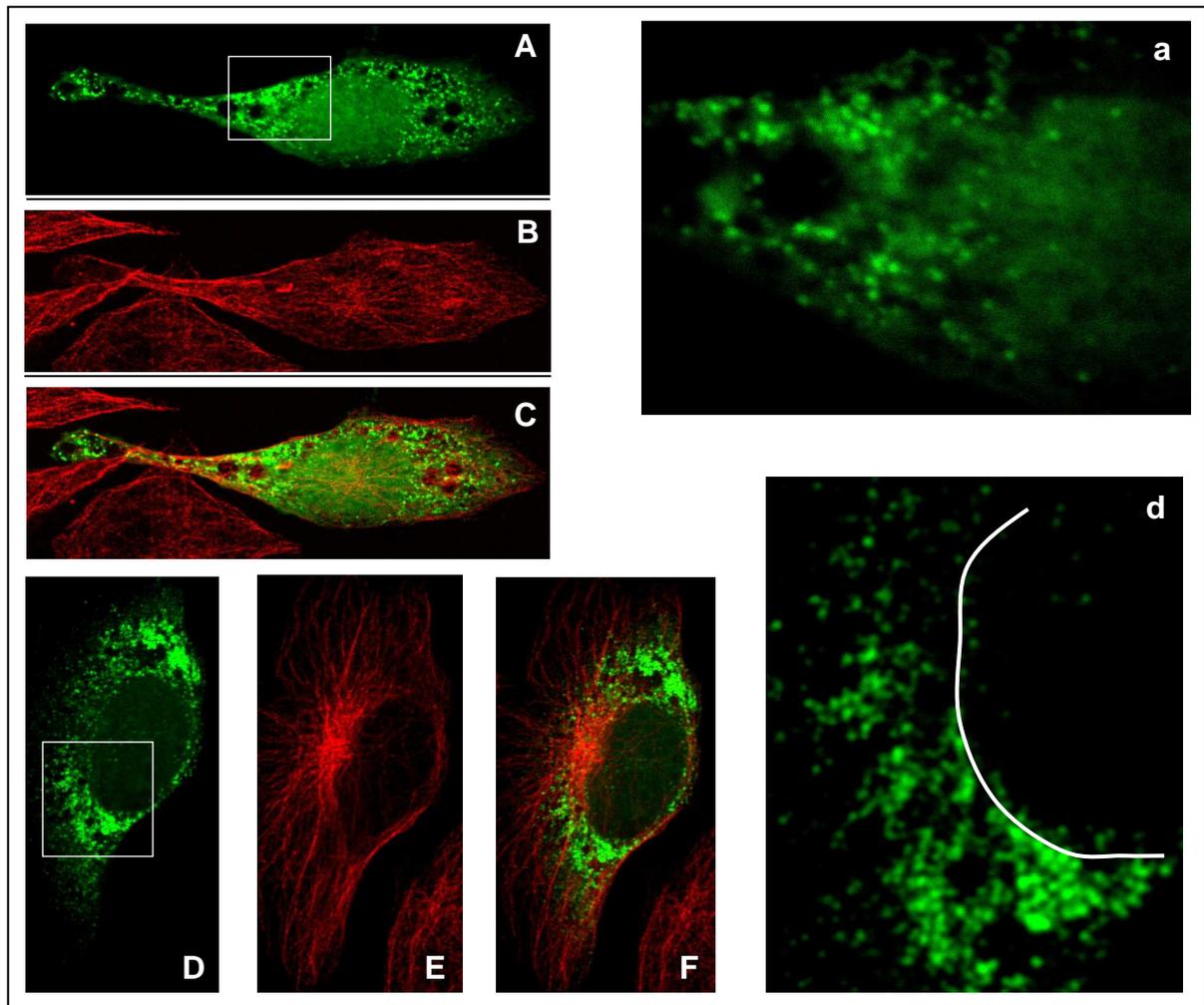


Abbildung 3.7: Subzelluläre Verteilung von rFMRP-Iso4-EGFP in CHO-K1-Zellen

A+D: Autofluoreszenz von rFMRP-Iso4-EGFP **B+E:** Dargestellt ist die α -Tubulin-Immundefärbung
C+F: Überlagerung beider Kanäle **a+d:** Jeweils vergrößerte Ausschnitte aus Bild A bzw. D. Die weiße Linie in Bild d zeigt die Grenze zwischen Zellkern und Zytoplasma. Deutlich wird die Anreicherung des Fusionsproteins im perinukleären Zytoplasma.

Das Fusionsprotein rFMRP-Iso4-EGFP ist vornehmlich im Zytoplasma lokalisiert und akkumuliert dort in Form kleiner Granulae, die über das gesamte Zytoplasma verteilt sind (Abb. 3.7). Die Granulae-Dichte ist perinukleär am höchsten und nimmt zur Peripherie der Zelle hin ab, wie besonders bei der in Abbildung 3.7 D-F dargestellten Zelle gut zu sehen. Eine Kolokalisation mit dem in dem roten Kanal immunzytochemisch dargestellten α -Tubulin, ist nicht zu beobachten.

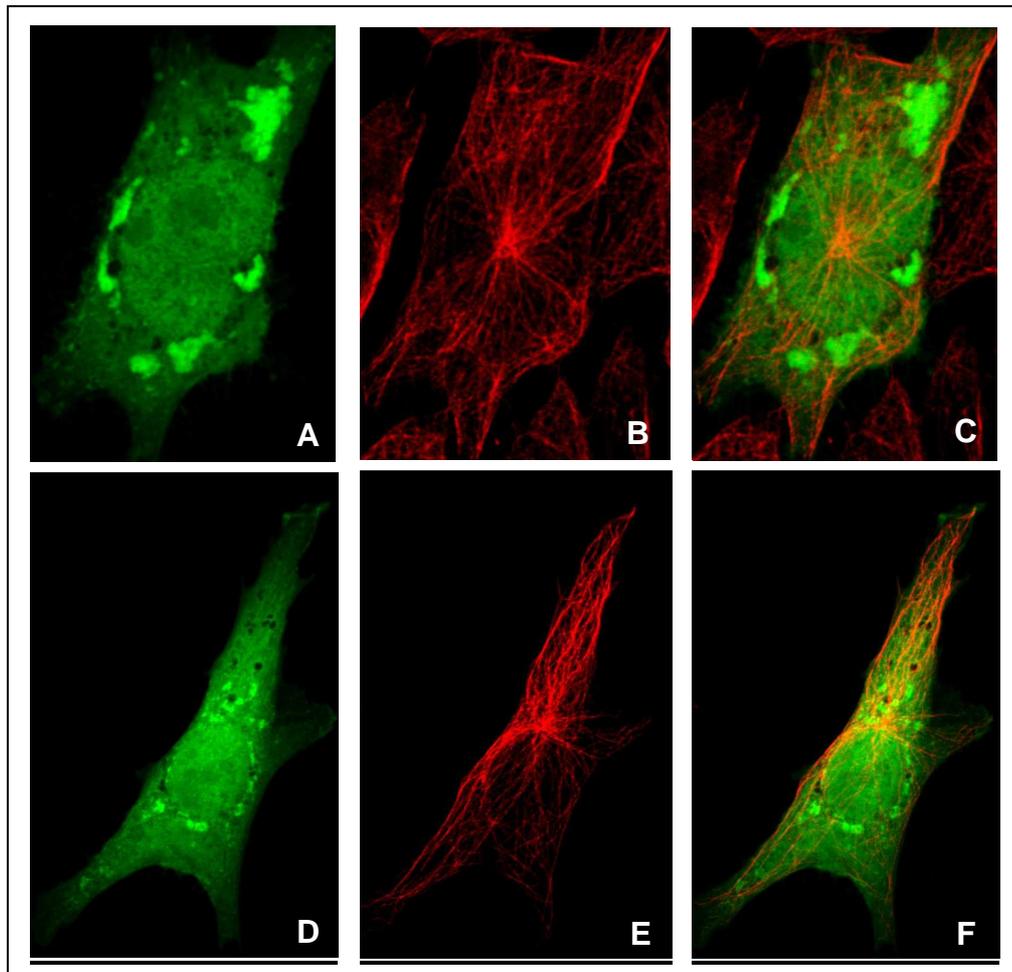


Abbildung 3.8: Subzelluläre Verteilung von rFMRP-Iso7-EGFP in CHO-K1-Zellen
A+D: Autofluoreszenz von rFMRP-Iso7-EGFP **B+E:** Dargestellt ist die α -Tubulin-Immunsfärbung
C+F: Überlagerung beider Kanäle

Das Fusionsprotein rFMRP-Iso7-EGFP stellt die größte bekannte rFMRP-Isoform dar. Dieses Protein zeigt wie rFMRP-Iso4-EGFP eine vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation, neigt aber deutlich mehr zur Bildung größerer Aggregate mit perinukleärer Anreicherung (Abb. 3.8 A und D). Unter den transfizierten Zellen überwog neben der feingranulären Proteinverteilung das Bild der wie in Abbildung 3.8 erkennbaren perinukleären Proteinaggregate, die folglich für das Fusionsprotein des Transkriptes T7 unter den Bedingungen der hier durchgeführten Transfektion und Fixierung nach zwei Tagen, charakteristisch zu sein scheinen.

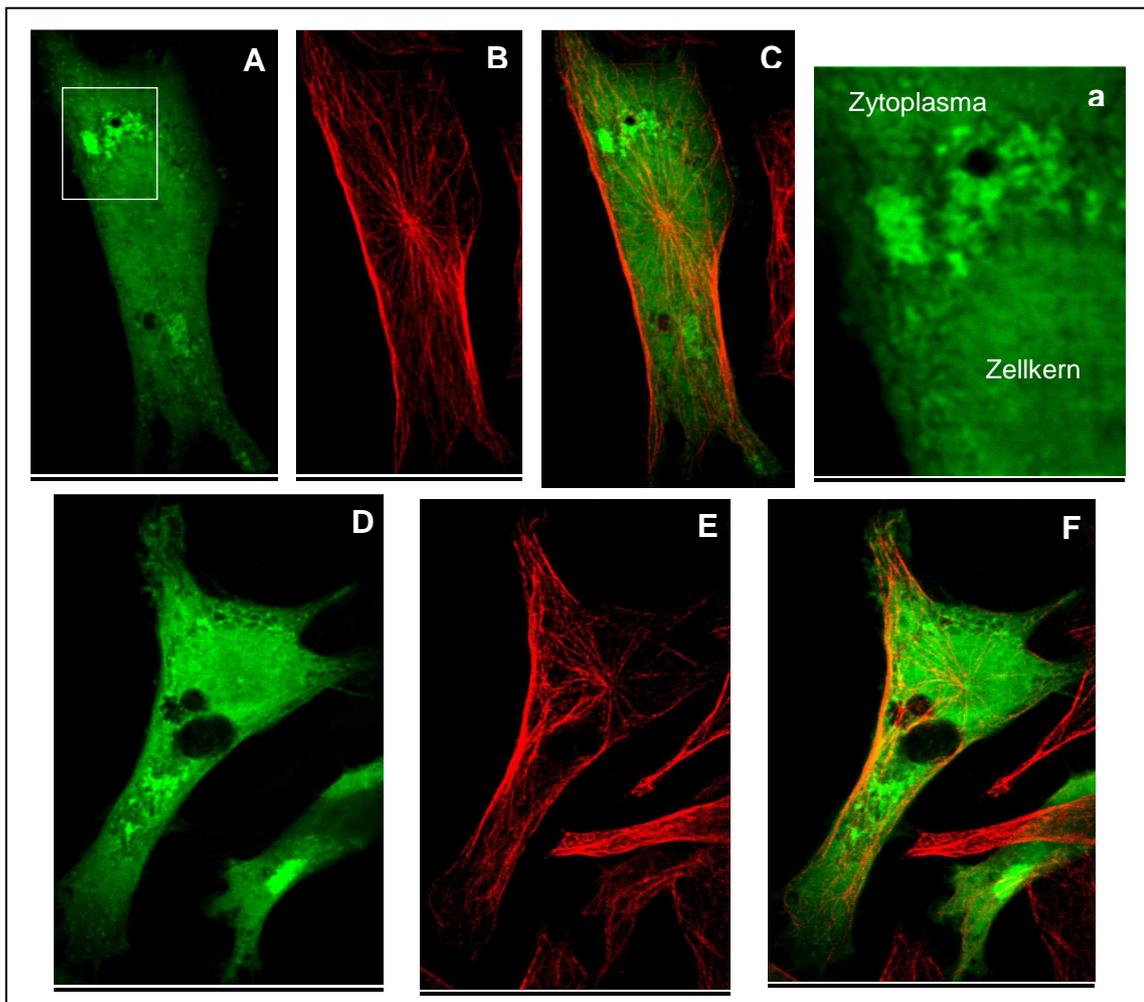


Abbildung 3.9: Subzelluläre Verteilung von rFMRP-Iso8-EGFP in CHO-K1-Zellen

A+D: Autofluoreszenz von rFMRP-Iso8-EGFP **B+E:** Dargestellt ist die α -Tubulin-Immurfärbung
C+F: Überlagerung beider Kanäle **a** Gezeigt ist ein vergrößerter Ausschnitt aus Bild A, in dem die perinukleären Aggregate des Fusionsproteins deutlich erkennbar sind.

Die Isoform rFMRP-Iso8-EGFP ist in allen Zellen hauptsächlich im Zytoplasma nachweisbar. In verschiedenen Zellen sind unterschiedliche subzelluläre Verteilungsmuster erkennbar. Neben der Bildung perinukleärer Aggregate (Abb. 3.9 A), wie sie bereits für die Isoform Iso7 beschrieben wurden (Abb. 3.8 A und D), finden sich auch transfizierte Zellen mit granulärem Proteinverteilungsmuster, ähnlich wie sie bei der Isoform Iso4 zu beobachten sind (Abb. 3.7 A und D), wobei das Muster der perinukleären Proteinaggregate überwiegt.

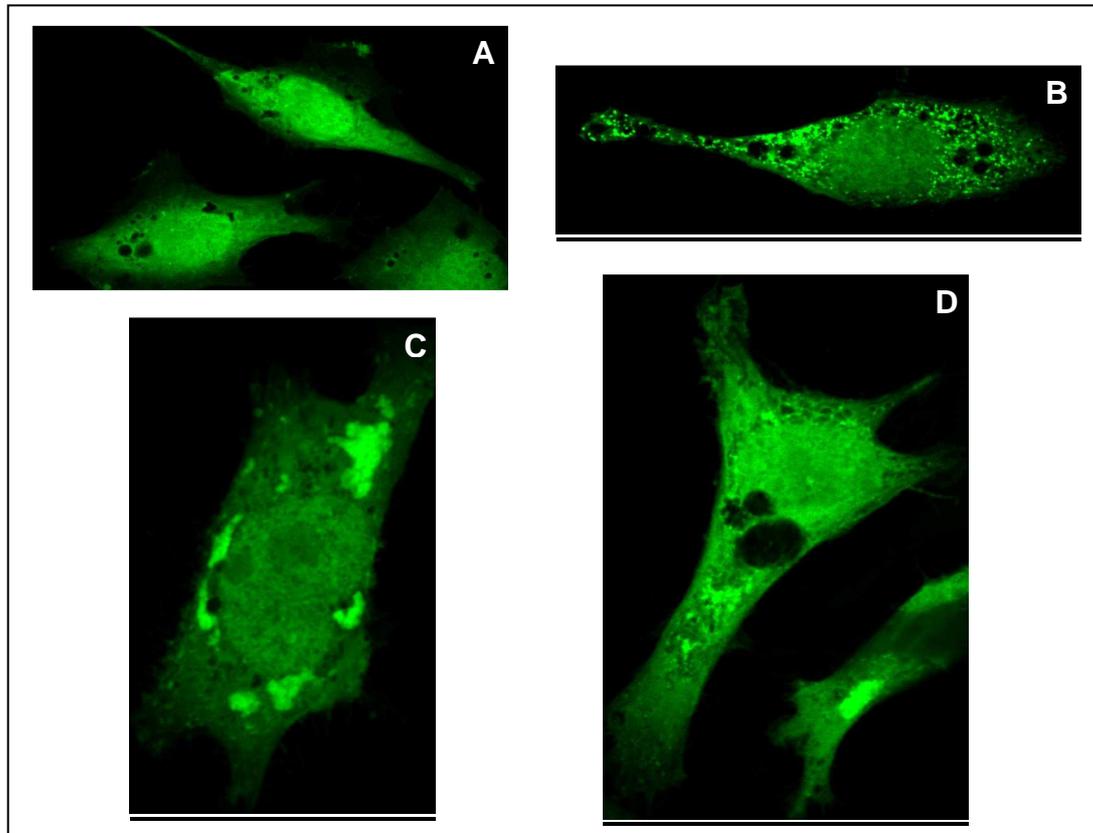


Abbildung 3.10: Vergleich der subzellulären Verteilung von EGFP und den drei verschiedenen rFMRP-Isoformen in transfizierten CHO-K1-Zellen

Während sich EGFP gleichmäßig im Zytoplasma und Zellkern verteilt (A), ist Iso4 granulär vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert (B). Demgegenüber neigt Iso7 zur Bildung perinukleärer Aggregate (C). Iso8 zeigt subzellulär sowohl die perinukleären Aggregate als auch perinukleäre Granulae (D).

In Abbildung 3.10 sind die subzellulären Verteilungsmuster der rekombinanten Proteine zusammenfassend dargestellt. Hierbei wird deutlich, dass alle drei Fusionsproteine eine vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation mit unterschiedlich stark ausgeprägter Aggregatbildung aufweisen.

3.4.1 Assoziation der rFMRP-Isoformen mit dem Zytoskelett

Um zu untersuchen ob die rFMRP-Isoformen mit dem Zytoskelett assoziieren, wurden die transfizierten CHO-K1-Zellen zwei Tage nach der Transfektion zunächst für 10 min mit 0,2% igem Triton-X-100 permeabilisiert. Anschließend

folgte die gewohnte Fixierung der Zellen mit 4%igem PFA. Bei der zehnmütigen Extraktion der transfizierten Zellen werden die löslichen Zellbestandteile herausgelöst, so dass in den fixierten Zellen präferentiell die Zytoskelett-assoziierten Komponenten verbleiben. Die rekombinanten Proteine werden nur dann in den Zellen verbleiben, wenn sie mit nicht extrahierten Zellbestandteilen, wie dem Zytoskelett, assoziiert sind.

Auch bei diesen Versuchen dienten EGFP- exprimierende Zellen als Vergleich.

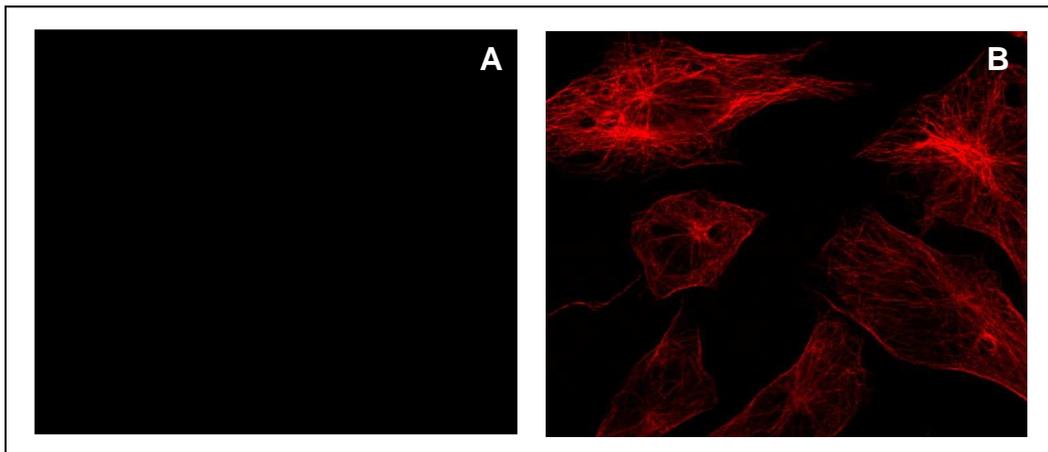


Abbildung 3.11: Subzelluläre Verteilung von EGFP in extrahierten CHO-K1-Zellen

A: Im grünen Kanal ist kein EGFP zu detektieren. Es liegt ungebunden in der Zelle vor und wird durch die Extraktionsbehandlung vollständig aus der Zelle eliminiert. **B:** Erkennbar ist die α -Tubulin-Färbung.

Bei EGFP handelt es sich um ein bekanntermaßen nicht mit dem Zytoskelett-assoziiertes Protein, welches daher nach der Extraktionsbehandlung in den Zellen nicht mehr nachweisbar sein müsste. Dieses Bild zeigte sich, wie in Abbildung 3.11 zu sehen ist, tatsächlich. So ist in den extrahierten Zellen nach wie vor in dem roten Kanal α -Tubulin immunzytochemisch nachweisbar. Hingegen ist EGFP, über seine Autofluoreszenz im grünen Kanal detektierbar, nach der Zellextraktion nicht mehr nachzuweisen, wobei eine Analyse der entsprechenden lebenden Zellen vor der Extraktion gezeigt hatte, dass zahlreiche Zellen EGFP exprimieren.

Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz der extrahierten Zellen wurde ein nicht extrahierbares Fusionsprotein aus murinem α -Tubulin und dem mRFP (*monomeric red fluorescent protein*) koexprimiert. Dadurch konnte die erfolgreiche Transfektion gezeigt werden, jedoch stellte sich dieses

Fusionsprotein subzellulär in Form unspezifischer, klumpiger Signale dar. Daher habe ich mich gegen eine Darstellung dieser Bilder entschieden.

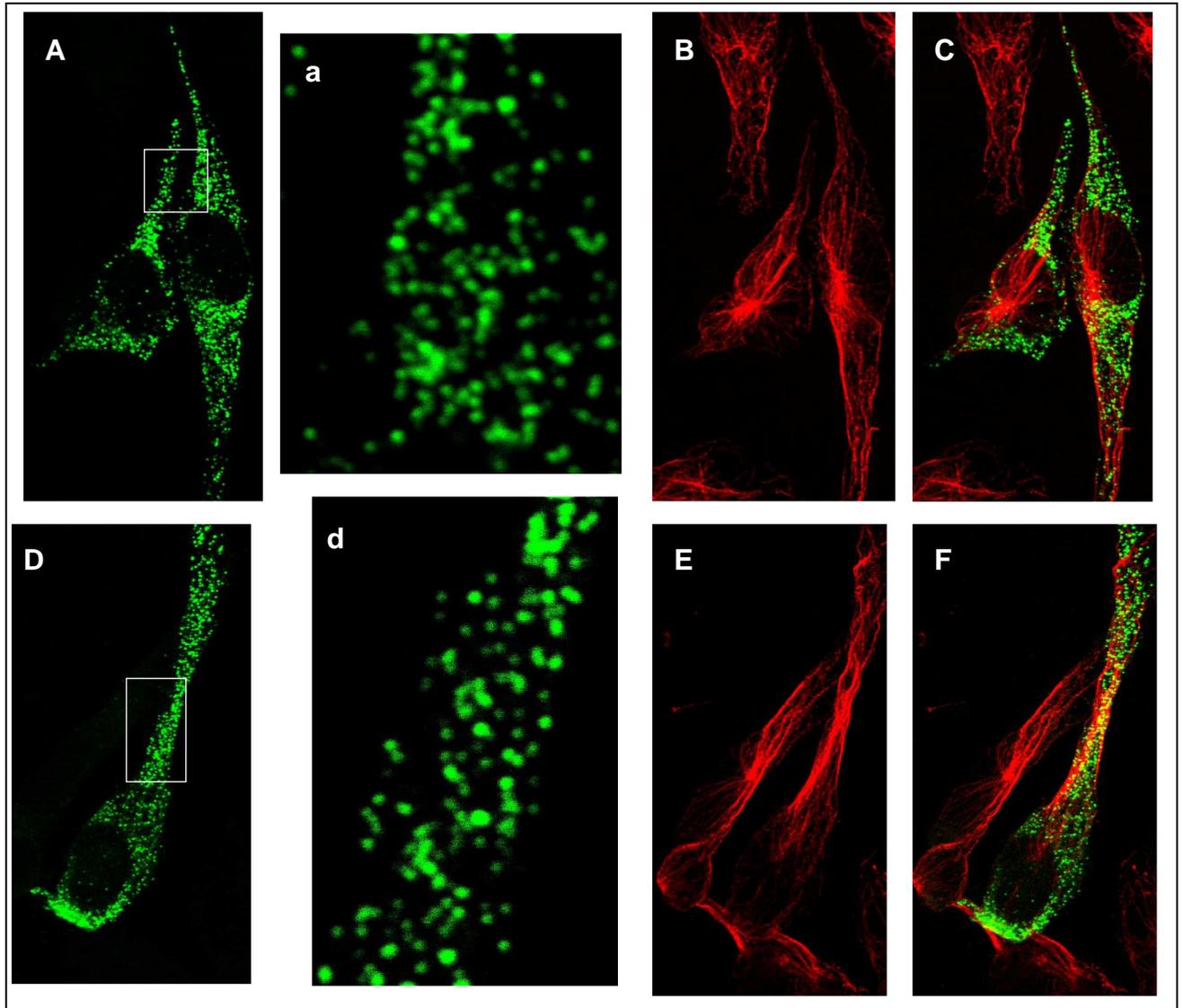


Abbildung 3.12: Subzelluläre Verteilung von rFMRP-Iso4-EGFP in extrahierten CHO-K1-Zellen

A+D: Autofluoreszenz des granulären rFMRP-Iso4-EGFP **a+d:** Vergrößerte Ausschnitte aus dem gekennzeichneten Bereich der Bilder A bzw. D **B+E:** Im roten Kanal die α -Tubulin-Immunfärbung **C+F:** Überlagerung des roten und grünen Kanals

Im Vergleich zum löslichen Protein EGFP ließ sich EGFP mit den drei FMRP-Isoformen fusioniert, auch nach Triton-Behandlung in den Zellen reichhaltig nachweisen. Somit scheinen die drei rFMRP-Isoformen im Zytoplasma mit unlöslichen Zellbestandteilen, wie dem Zytoskelett, assoziiert zu sein.

Auch bei den extrahierten Zellen zeigen die einzelnen Isoformen die bereits beschriebenen Charakteristika in ihrer subzellulären Verteilung.

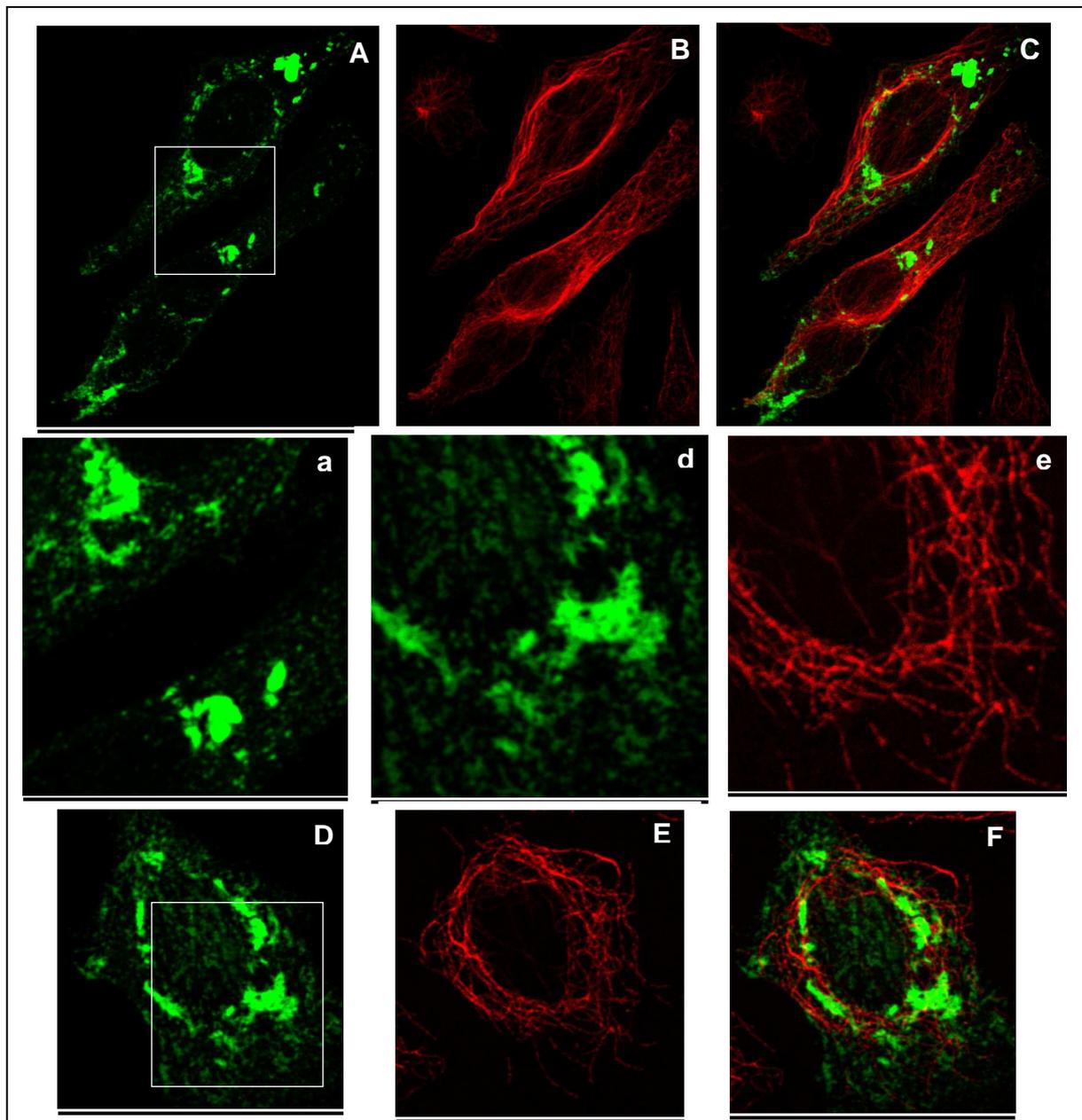


Abbildung 3.13: Subzelluläre Verteilung von rFMRP-Iso7-EGFP in extrahierten CHO-K1-Zellen

A+D: Autofluoreszenz von rFMRP-Iso7-EGFP mit perinukleären Aggregaten **a+d:** Vergrößerte Ausschnitte der gekennzeichneten Bereiche der Bilder A bzw. D **B+E:** Immunzytochemischer Nachweis von α -Tubulin **C+F:** Überlagerung des roten und grünen Kanals

So verteilt sich rFMRP-Iso4-EGFP auch nach der Extraktionsbehandlung in Form zahlreicher kleiner Granulae mit Aussparung des Zellkerns gleichmäßig über das gesamte Zytoplasma (Abb. 3.12).

Bei der Isoform Iso7 ließ sich auch in extrahierten Zellen die starke Aggregatbildung des Fusionsproteins mit perinukleärer Anreicherung und kompletter Aussparung des Zellkerns (Abb. 3.13) beobachten. Im roten Kanal ist das immunzytochemisch detektierte α -Tubulin zu sehen, welches durch die Extraktion der löslichen Komponenten nach der Triton-Behandlung, noch filigraner erscheint.

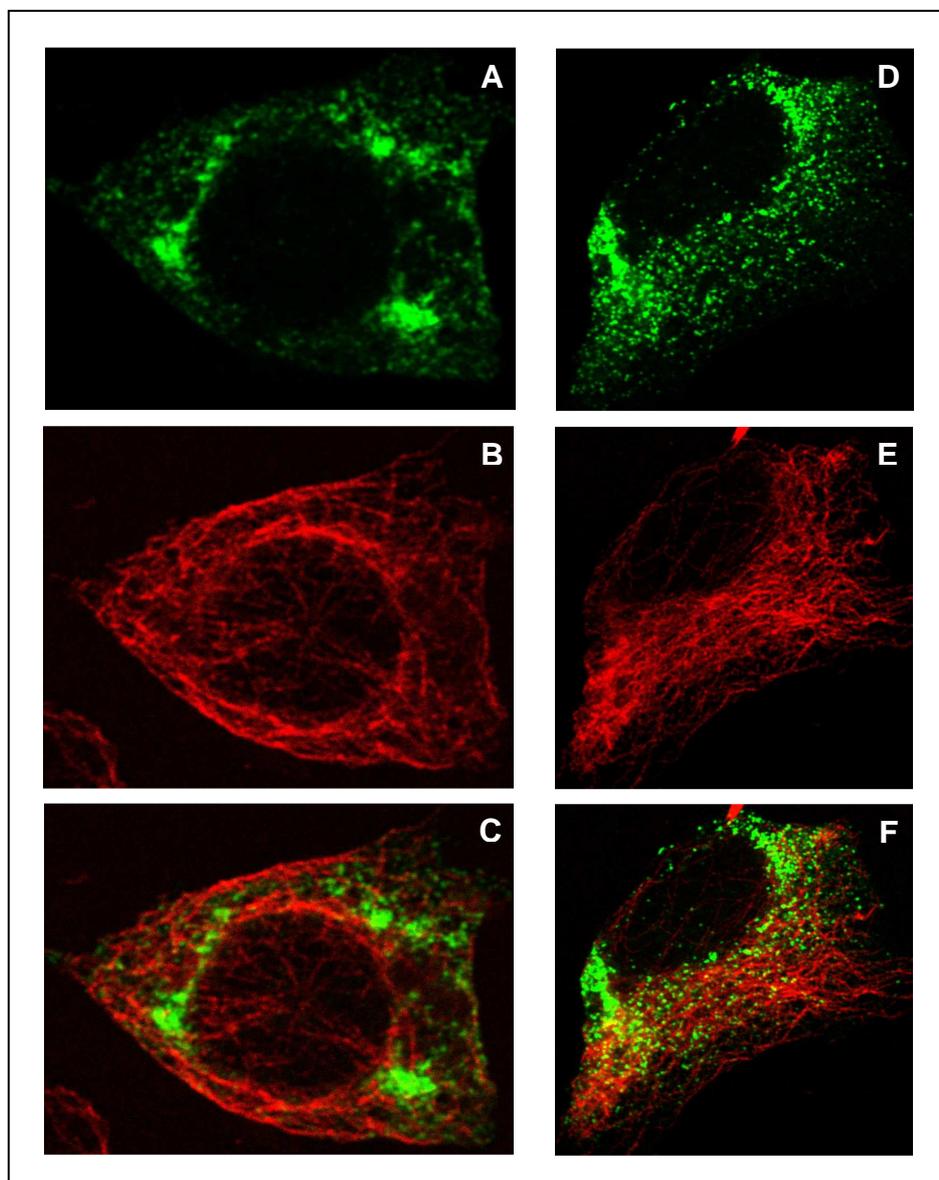


Abbildung 3.14: Subzelluläre Verteilung von rFMRP-Iso8-EGFP in extrahierten CHO-K1-Zellen

A+D: Autofluoreszenz von rFMRP-Iso8-EGFP **B+E:** Erkennbar ist die α -Tubulin-Immunfärbung
C+F: Überlagerung des roten und grünen Kanals

Auch die extrahierten, das Fusionsprotein rFMRP-Iso8-EGFP exprimierenden, Zellen bestätigen das subzelluläre Verteilungsmuster, welches diese Isoform bereits zuvor in den nichtextrahierten Zellen zeigte. Und sowohl die größeren Aggregate (Abb. 3.14 A) als auch die kleineren Granulae (Abb. 3.14 D) sind an das Zytoskelett gebunden.

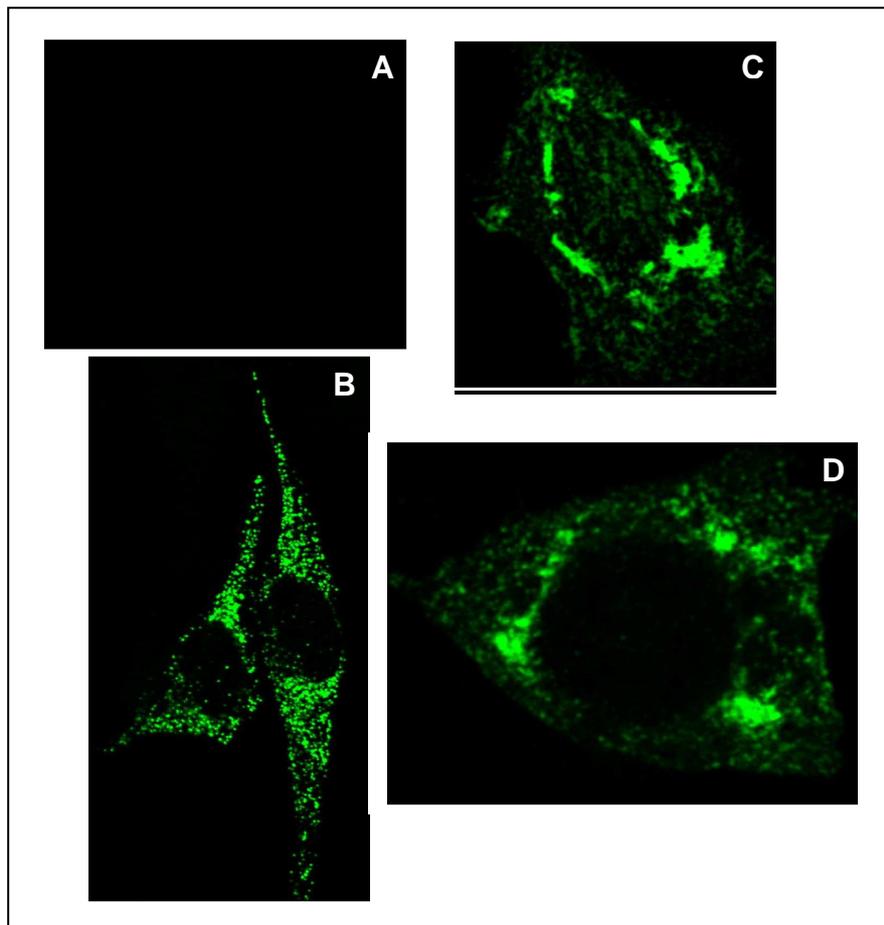


Abbildung 3.15: Vergleich der subzellulären Verteilung von EGFP und den drei rFMRP-Isoformen in extrahierten CHO-K1-Zellen

A: Nach der Extraktion der pEGFP-N3-transfizierten Zellen ist kein EGFP mehr zu detektieren
B: Auch nach Extraktion zeigt rFMRP-Iso4-EGFP eine zyttoplasmatische granuläre Verteilung
C: Perinukleäre Clusterung von rFMRP-Iso7-EGFP auch in extrahierten Zellen **D:** Die perinukleären Aggregate und Granulae zeigt rFMRP-Iso8-EGFP auch nach Extraktion

In der Abbildung 3.15 sind die vier charakteristischen Verteilungsmuster der extrahierten Zellen für EGFP und den drei rFMRP-Isoformen zusammengefasst. Anhand dieser Übersicht lässt sich sowohl der Unterschied zwischen dem ungebundenen Protein EGFP und den Zytoskelett-assoziierten Fusionsproteinen rFMRP-Iso4-/Iso7- und Iso8-EGFP als auch den einzelnen

Fusionsproteinen untereinander deutlich aufzeigen. Eine zusammenfassende Übersicht dieser Beobachtungen ist in Abbildung 3.16 dargestellt.

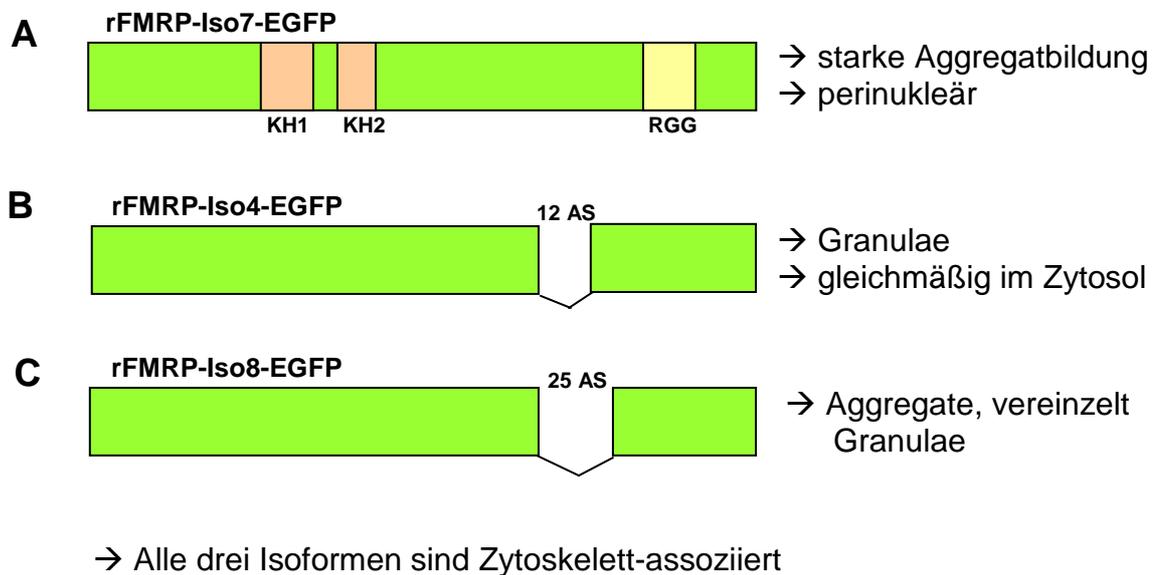


Abbildung 3.16: Zusammenfassende Übersicht der beobachteten subzellulären Lokalisationsmuster der drei rFMRP-Fusionsproteine in CHO-K1-Zellen

Zusammenfassend lässt sich bezüglich der beobachteten subzellulären Lokalisation der drei rFMRP-Isoformen festhalten, dass es sowohl Unterschiede als auch Gemeinsamkeiten gibt. Die beobachteten Unterschiede beziehen sich auf die zytoplasmatische Verteilung der exprimierten Fusionsproteine. Dort lässt sich wie im Falle der Isoform Iso4 eine granuläre Verteilung oder wie bei der Isoform Iso7 und in Teilen auch bei Iso8 eine starke Aggregatbildung beobachten. Den drei Isoformen gemein ist hingegen die vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation. Durch die Triton-Extraktion der transfizierten Zellen konnte für alle drei Isoformen eine Zytoskelettassoziation gezeigt werden. Eine weitere Gemeinsamkeit ist die mehr oder weniger stark ausgeprägte perinukleäre Anreicherung der exprimierten Fusionsproteine. Diese könnte auf eine Assoziation der Fusionsproteine mit dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) hindeuten, welches in höherer Konzentration in Kernnähe vorliegt. Um diese Hypothese zu verifizieren,

wurden im folgenden Versuchsteil Untersuchungen zur Kolokalisation zwischen den rFMRP-Isoformen und dem ER durchgeführt.

3.4.2 Untersuchung der Assoziation der rFMRP-Isoformen mit dem ER in CHO-K1-Zellen

Für die Anfärbung des ER zum Nachweis einer möglichen Kolokalisation mit den exprimierten rFMRP-Isoformen, wurde der polyklonale Grp78-Antikörper eingesetzt. Hierbei handelt sich um einen Antikörper gegen das 78 kDa große, Glukose-regulierte Protein, auch als BiP (*Binding Protein*) bezeichnet. Es gehört zur Gruppe der Hitzeschockproteine und ist das häufigste Chaperon im Lumen des ER, wo es die posttranslationale Modifikation neu synthetisierter Proteine unterstützt und kontrolliert.

In diesem Versuchsteil erfolgte die Fixierung der transfizierten CHO-K1-Zellen bereits am ersten Tag nach der Transfektion. Als Vergleich dienten wiederum mit EGFP-transfizierte Zellen in denen sich ein homogenes Verteilungsmuster von EGFP im Zytoplasma mit nukleärer Anreicherung zeigt (Abb. 3.17 A und D). Das ER ist perinukleär konzentriert (Abb. 3.17 B und E). Dies entspricht dem physiologisch stark angereicherten ER in diesem Zellareal. Eine Gelbfärbung und folglich eine Kolokalisation von EGFP und dem ER lässt sich nicht beobachten.

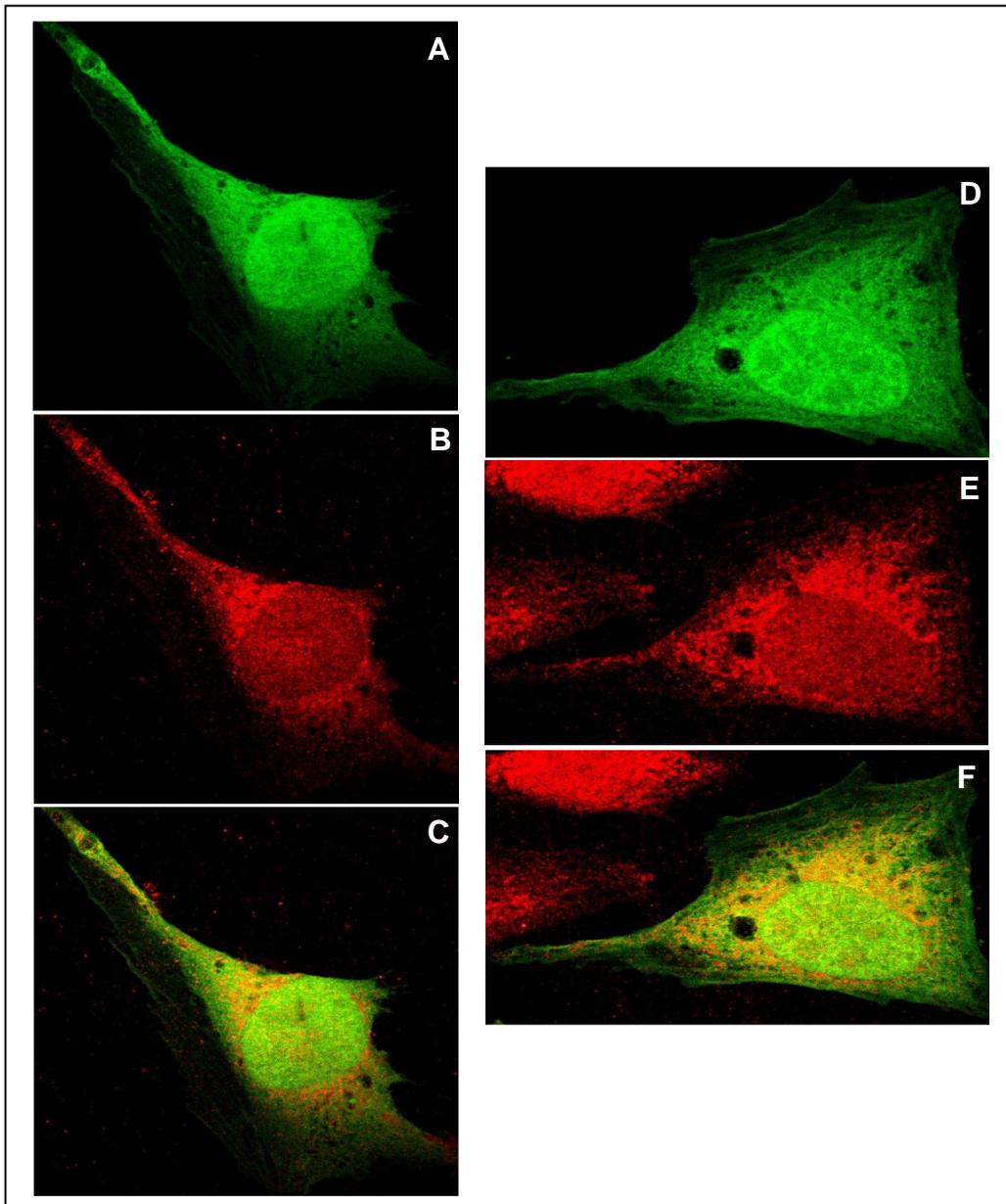


Abbildung 3.17: Subzelluläre Verteilung von EGFP in CHO-K1-Zellen bezüglich des ER
A+D: Autofluoreszenz von EGFP **B+E:** Erkennbar ist die ER-Immunfärbung mit dem Grp78-Antikörper **C+F:** Überlagerung der Signale aus dem roten und grünen Kanal.

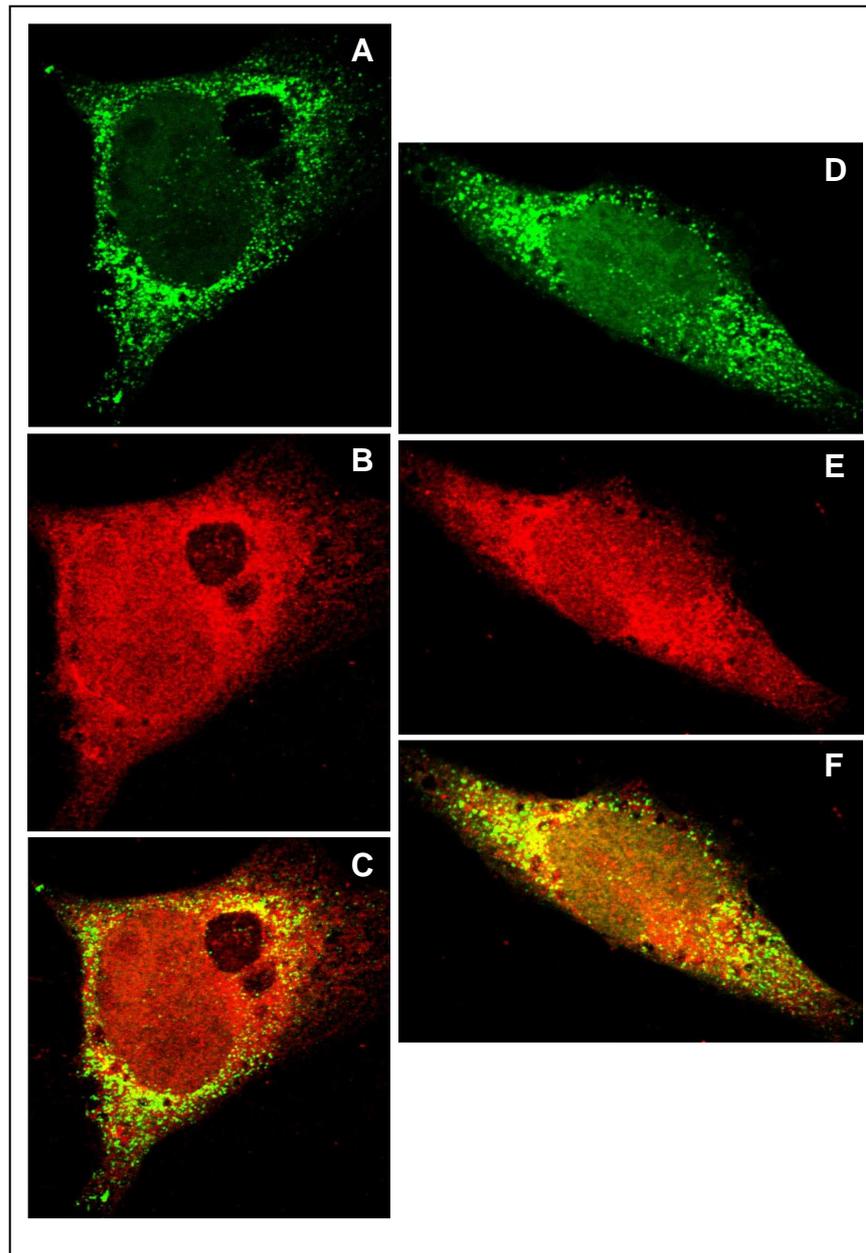


Abbildung 3.18: Subzelluläre Verteilung von rFMRP-Iso4-EGFP in CHO-K1-Zellen bezüglich des ER

A+D: Autofluoreszenz des granulären rFMRP-Iso4-EGFP **B+E:** Im roten Kanal die ER-Immunfärbung mit dem Grp78-Antikörper **C+F:** Überlagerung der Signale aus dem roten und grünen Kanal. Gelbfärbung veranschaulicht eine Kolokalisation von rFMRP-Iso4-EGFP mit dem

Die rFMRP-Isoform Iso4 zeigt auch in diesen Transfektionsversuchen das bereits vorher beobachtete granuläre subzelluläre Verteilungsmuster mit starker Dominanz im Zytoplasma und perinukleärer Anreicherung. In diesem Bereich lässt sich durch Überlagerung der Signale aus dem roten und grünen Kanal eine prägnante Gelbfärbung nachweisen (Abb. 3.18 C und F), die für eine Kolokalisation des Fusionsproteins rFMRP-Iso4-EGFP mit Strukturen des ER spricht.

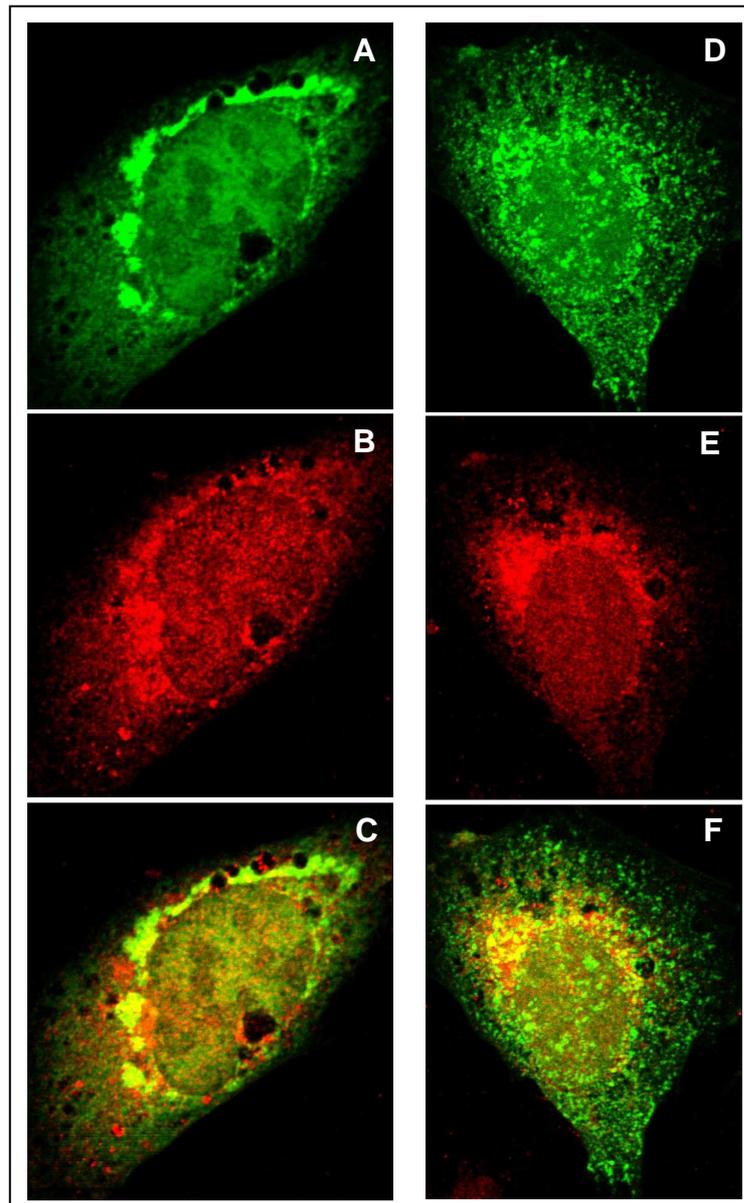


Abbildung 3.19: Subzelluläre Verteilung von rFMRP-Iso7-EGFP in CHO-K1-Zellen bezüglich des ER

A+D: Autofluoreszenz von rFMRP-Iso7-EGFP **B+E:** Erkennbar ist die ER-Immundefärbung mit dem Grp78-Antikörper **C+F:** Überlagerung der Signale aus dem roten und grünen Kanal. Gelbfärbung veranschaulicht eine Kolokalisation von rFMRP-Iso7-EGFP mit dem ER.

Bei dem Fusionsprotein rFMRP-Iso7-EGFP lässt sich auch in diesen Transfektionsversuchen die perinukleäre Aggregatbildung beobachten. Wurde sie in den Versuchen aus Abschnitt 3.4 und 3.4.1 allerdings fast in allen mit diesem Konstrukt transfizierten Zelle beobachtet, stellte sich das Bild in diesem Falle anders dar, denn in nur noch ungefähr der Hälfte der Zellen lag das Fusionsprotein in Aggregaten vor. In den übrigen Zellen verteilte sich das exprimierte Protein in Form kleiner Granulae über das gesamte Zytoplasma,

wie an der Zelle in Abbildung 3.19 D exemplarisch dargestellt. Entscheidender Grund für diese Beobachtung könnte der Zeitpunkt der Zellfixierung sein. Die Zellen aus Abschnitt 3.4 und 3.4.1, die bei diesem Fusionsprotein eine ausgeprägte Bildung von Proteinaggregaten zeigten, wurden erst zwei Tage nach Transfektion fixiert. Bei den Zellen aus diesem Versuchsteil hingegen erfolgte die Fixierung bereits einen Tag nach Transfektion. Möglicherweise bilden die Fusionsproteine zunächst kleinere Granulae, die sich später zu größeren Proteinaggregaten zusammenlagern. Des Weiteren lässt sich festhalten, dass es bei der Überlagerung des roten und grünen Kanals im perinukleären Bereich zu einer starken Gelbfärbung kommt, die eine Kolokalisation des Fusionsproteins rFMRP-Iso7-EGFP mit Strukturen des ER vermuten lässt.

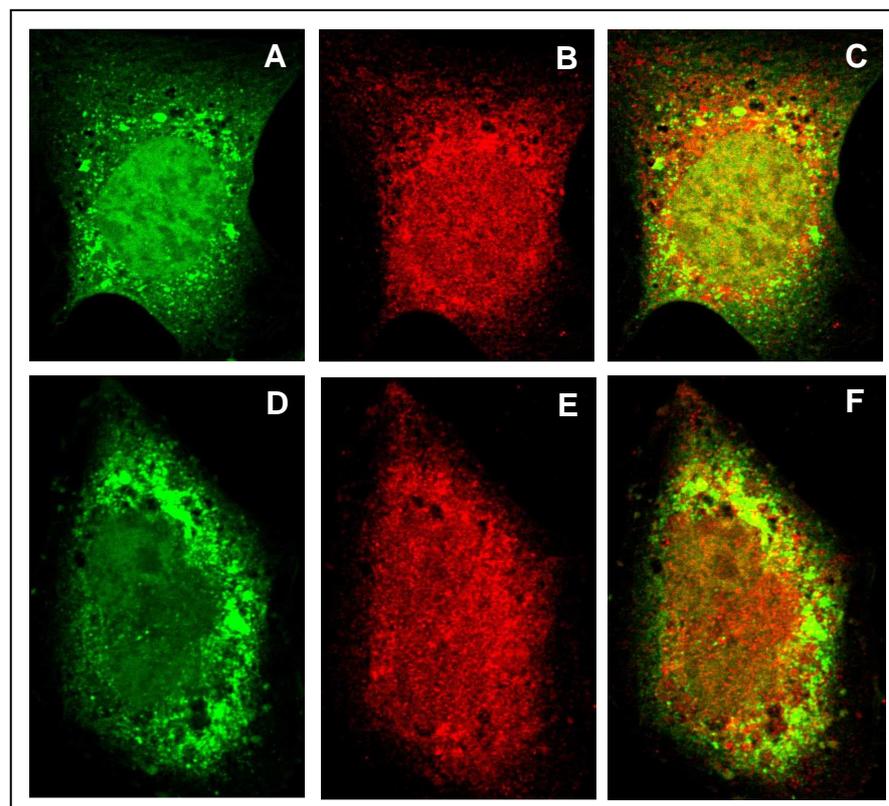


Abbildung 3.20: Subzelluläre Verteilung von rFMRP-Iso8-EGFP in CHO-K1-Zellen bezüglich des ER

A+D: Autofluoreszenz des Fusionsproteins rFMRP-Iso8-EGFP **B+E:** Erkennbar ist die ER-Immunfärbung mit dem Grp78-Antikörper **C+F:** Überlagerung der Signale aus dem roten und grünen Kanal. Gelbfärbung veranschaulicht eine Kolokalisation von rFMRP-Iso8-EGFP mit dem ER.

Das Verteilungsmuster des Fusionsproteins rFMRP-Iso8-EGFP ist in diesem Versuchsteil ähnlich inhomogen wie bei dieser Isoform bereits in vorherigen Versuchen beobachtet. Auch hier lassen sich sowohl Zellen mit zytoplasmatischen, perinukleär angereicherten Granulae als auch Zellen mit Proteinaggregaten finden, wobei das granuläre Verteilungsmuster überwiegt. Eine Gelbfärbung in Kernnähe bei der Überlagerung des roten und grünen Kanals spricht für eine Kolokalisation auch dieses Fusionsproteins mit Anteilen des ER. Folglich lässt sich für alle drei rFMRP-Isoformen sowohl eine Zytoskelettassoziation als auch eine perinukleäre Kolokalisation mit Strukturen des ER zeigen.

3.5 Untersuchung der subzellulären Lokalisation der rFMRP-Isoformen in Hippokampusneuronen der Ratte

Für das RNA-bindende Protein FMRP ist von verschiedenen Arbeitsgruppen im Vergleich zu den peripheren Geweben eine erhöhte Proteinexpression in Neuronen beschrieben worden (Antar *et al.*, 2005; Feng *et al.*, 1997; Khandjian *et al.*, 2004; Zalfa *et al.*, 2006). Daher stellte sich die Frage, wie sich die in dieser Arbeit neu identifizierten FMRP-Isoformen der Ratte in neuronalen Zellen verhalten und ob sie sich dort subzellulär unterschiedlich verteilen. Zur Beantwortung dieser Frage wurden die drei rFMRP-Isoformen in primären Hippokampusneuronen der Ratte exprimiert, die nach sieben Tagen transfiziert und nach weiteren sieben Tagen fixiert wurden. In den fixierten Zellen wurden das neuronenspezifische Mikrotubulus-assoziierte Protein 2 (MAP2) und der vesikuläre Glutamattransporter (vGLUT) immunzytochemisch detektiert. In Neuronen liegt MAP2 im Soma und den Dendriten vor. Demgegenüber diente das Anfärben von vGLUT, einem vesikulären Glutamattransporter in dem präsynaptischen Button, der Markierung synaptischer Zellkontakte (roter Kanal).

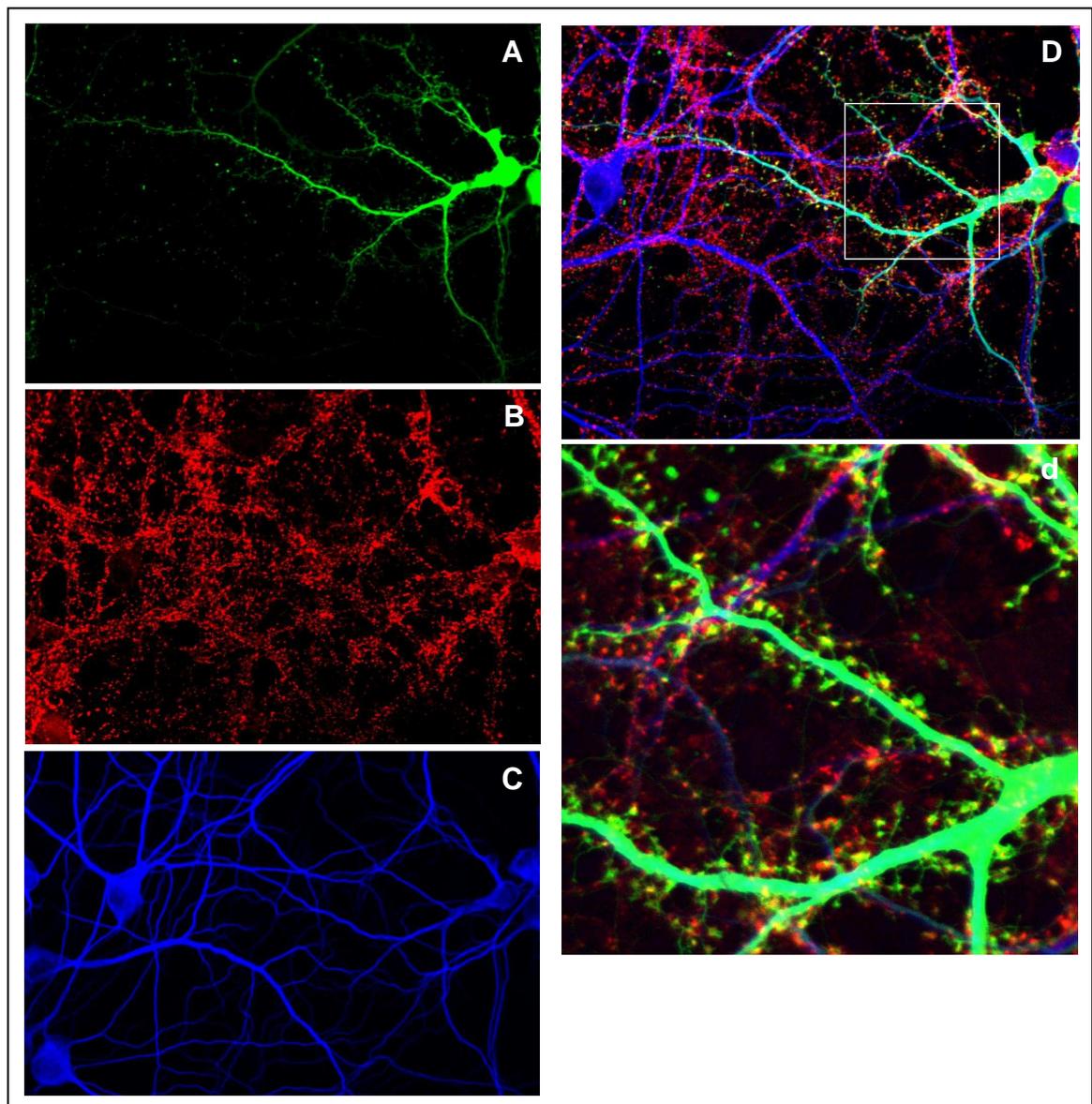


Abbildung 3.21: Verteilung von EGFP in Hippokampusneuronen

Vierzehn Tage alte Primärkulturen von Ratten-Hippokampusneuronen, am 7. Tag nach der Transfektion fixiert. **A:** Autofluoreszenz von EGFP **B:** Nachweis von vesikulären Glutamattransportern (vGLUT) im präsynaptischen Bereich mittels polyklonalem Antikörper. **C:** Nachweis des neuronenspezifischen Mikrotubulus-assoziierten Protein 2 (MAP2) als „Marker“ für somatodendritische Regionen. **D:** Überlagerung der drei Kanäle. **d:** Vergrößerter Ausschnitt aus Bild D. In türkis gefärbten Regionen kolokalisiert EGFP mit MAP2, eine Gelbfärbung zeigt eine Kolokalisation von EGFP mit vGLUT an.

Das in Neuronen exprimierte EGFP ist im Kern konzentriert, aber auch gleichmäßig in den Dendriten verteilt (Abb. 3.21). Eine Kolokalisation von EGFP mit MAP2 wird durch die Türkisfärbung in Abbildung 3.21 D und d deutlich. Die in Abbildung 3.21 d zu beobachtende Gelbfärbung spricht für eine

Kolokalisation von EGFP mit vGLUT in synaptischen Bereichen. Das Neuron stellt sich durch die gut ausgebildeten Dendriten als deutlich differenziert dar.

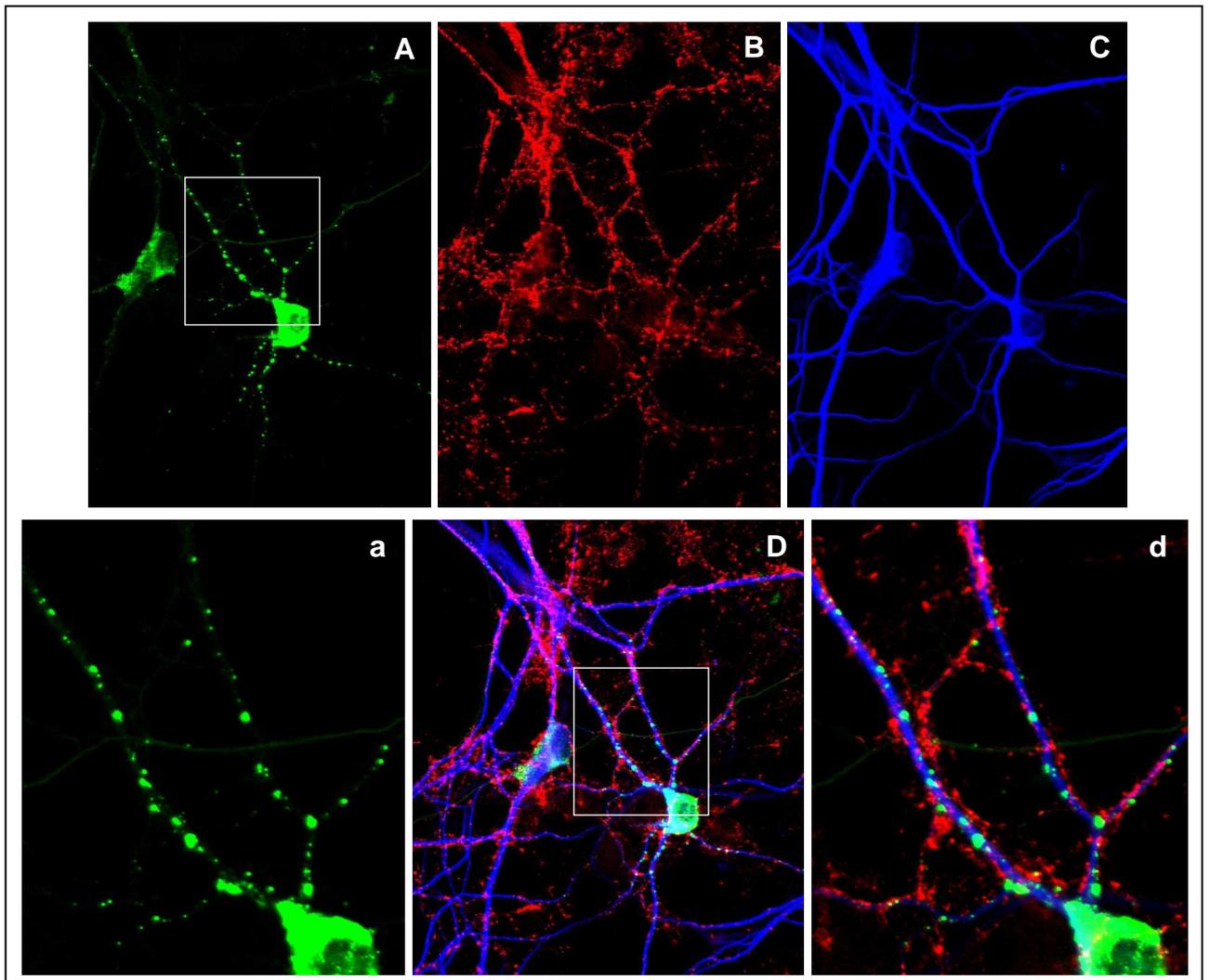


Abbildung 3.22: Verteilung von rFMRP-Iso4-EGFP in Hippokampusneuronen

Vierzehn Tage alte Primärkulturen von Ratten-Hippokampusneuronen, am 7. Tag nach der Transfektion fixiert. **A:** Autofluoreszenz des Fusionsproteins rFMRP-Iso4-EGFP **B:** Mittels polyklonalem Antikörper Nachweis von vesikulären Glutamattransportern (vGLUT) im präsynaptischen Bereich. **C:** Nachweis des neuronenspezifischen Mikrotubulus-assoziierten Protein 2 (MAP2) als Markerprotein für somatodendritische Lokalisation. **D:** Überlagerung der drei Kanäle. **a+d:** Vergrößerter Ausschnitt aus Bild A bzw. D. Die Türkisfärbung zeigt eine Kolokalisation von rFMRP-Iso4-EGFP mit MAP2.

Die rFMRP-Iso4-EGFP synthetisierenden Neurone zeigen eine starke Anreicherung des Fusionsproteins im somatischen Neuroplasma mit Aussparung des Zellkerns. Ein geringer Anteil des exprimierten Proteins liegt entlang der Dendriten in Form kleiner Granulae vor und weist dort, durch die

Türkisfärbung deutlich (Abb. 3.22 D und d), eine Kolokalisation mit dem somatodendritischen Markerprotein MAP2 auf. Das Protein liegt nicht in den distalen Anteilen der Dendriten vor, sondern ist auf die proximalen Bereiche beschränkt. Eine Gelbfärbung, und somit eine Kolokalisation mit synaptischen Strukturen, ist nicht nachweisbar.

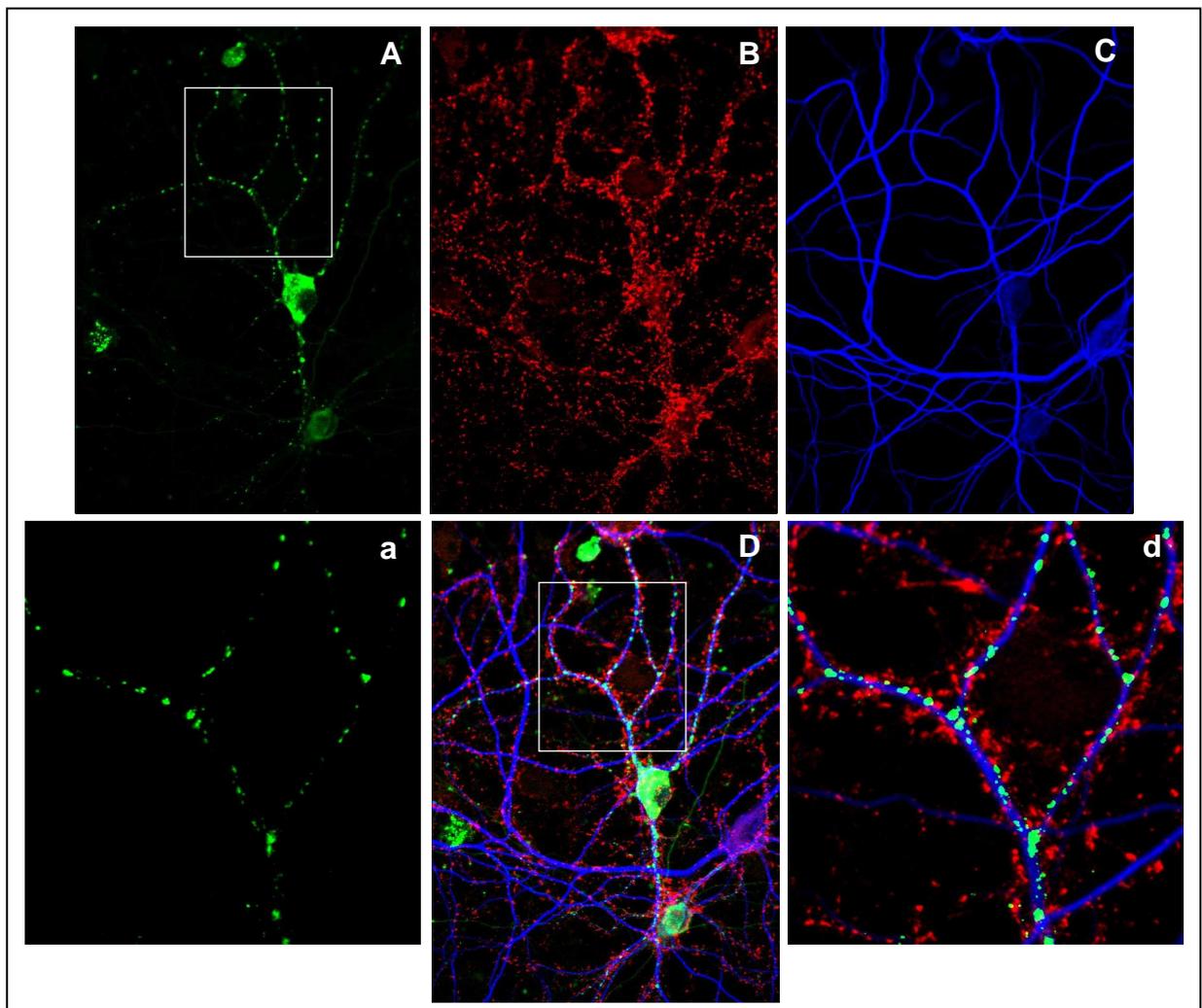


Abbildung 3.23: Verteilung von rFMRP-Iso7-EGFP in Hippokampusneuronen

Vierzehn Tage alte Primärkulturen von Ratten-Hippokampusneuronen, am 7. Tag nach der Transfektion fixiert. **A:** Autofluoreszenz von rFMRP-Iso7-EGFP **B:** Mittels polyklonalem Antikörper Nachweis von vesikulären Glutamattransportern (vGLUT) im präsynaptischen Bereich. **C:** Nachweis des neuronenspezifischen Mikrotubulus-assoziierten Protein 2 (MAP2) als Markerprotein für somatodendritische Lokalisation. **D:** Überlagerung der drei Kanäle. **a+d:** Vergrößerter Ausschnitt aus Bild A bzw. D. Die Türkisfärbung zeigt eine Kolokalisation von rFMRP-Iso7-EGFP mit MAP2.

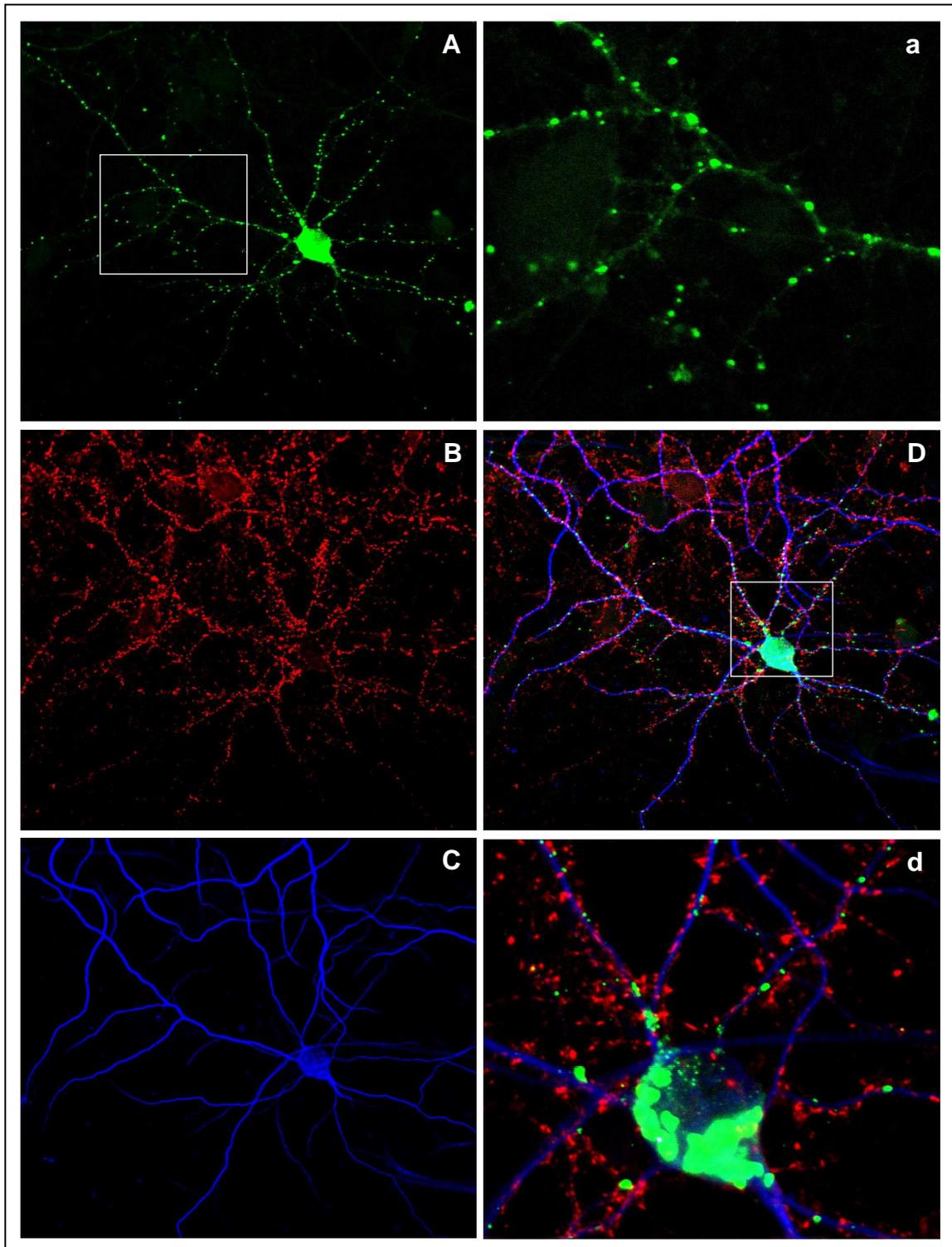


Abbildung 3.24: Verteilung von rFMRP-Iso8-EGFP in Hippokampusneuronen

Vierzehn Tage alte Primärkulturen von Ratten-Hippokampusneuronen, am 7. Tag nach der Transfektion fixiert. **A:** Autofluoreszenz von rFMRP-Iso8-EGFP **B:** Mittels polyklonalem Antikörper Nachweis von vesikulären Glutamattransportern (vGLUT) im präsynaptischen Bereich. **C:** Nachweis des neuronenspezifischen Mikrotubulus-assoziierten Protein 2 (MAP2) als Markerprotein für somatodendritische Lokalisation. **D:** Überlagerung der drei Kanäle. **a+d:** Vergrößerter Ausschnitt aus Bild A bzw. D. Die Türkisfärbung zeigt eine Kolokalisation von rFMRP-Iso8-EGFP mit MAP2.

Auch rFMRP-Iso7-EGFP ist in Neuronen in hoher Konzentration im Soma, außerhalb des Zellkerns, lokalisiert. Ein geringer Proteinanteil zeigt eine granuläre Verteilung bis in die distalen Dendriten (Abb. 3.23 A und a). Eine Kollokalisierung mit synaptischen Strukturen ist nicht zu beobachten.

Der überwiegende Teil des in Neuronen exprimierten Fusionsproteins rFMRP-Iso8-EGFP, liegt in Form großer Aggregate im somatischen Neuroplasma vor (Abb. 3.24 d). In den dendritischen Anteilen des Neurons zeigt das Protein eine granuläre Verteilung bis in die distalen Enden der gut ausgebildeten Dendriten des differenzierten Neurons (Abb. 3.24 A und a). Die fehlende Gelbfärbung in Abbildung 3.24 D und d spricht gegen eine Kollokalisierung des Fusionsproteins mit synaptischen Strukturen.

Folglich konnte für die drei rFMRP-Fusionsproteine in neuronalen Zellen eine gemeinsame somatische Lokalisation mit unterschiedlich stark ausgeprägter distaler Ausbreitung in die dendritischen Anteile, beobachtet werden. Über den Einsatz eines Antikörpers gegen den vesikulären Glutamattransporter (vGLUT) konnte für alle drei Isoformen eine Kollokalisierung mit synaptischen Strukturen ausgeschlossen werden.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals die gesamte kodierende FMR1-cDNA-Sequenz der Ratte näher beschrieben. Dabei konnte gezeigt werden, dass es mindestens acht verschiedene Spleißvarianten gibt, die durch alternatives Spleißen aus einer gemeinsamen Vorläufer-RNA hervorgehen. Die kodierende Region des längsten identifizierten Transkriptes umfasst 1842 bp und kodiert ein 69 kDa großes Protein.

Für die Maus und den Menschen sind bislang jeweils zwölf verschiedene, durch alternatives Spleißen entstandene FMR1-mRNA-Varianten charakterisiert worden (Ashley *et al.*, 1993; Eichler *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1996; Sittler *et al.*, 1996; Verkerk *et al.*, 1993), deren kodierende Regionen mehr als 90% homolog zueinander sind (Ashley *et al.*, 1993; Denman *et al.*, 2002; Verkerk *et al.*, 1993). Für das orthologe FMR1-Gen von *Drosophila melanogaster*, dFMR1, sind bisher nur zwei, auf alternatives Spleißen zurückzuführende, mRNA-Transkripte beschrieben worden (Schenck *et al.*, 2002).

Die ersten 1122 nt der kodierenden Region sind in allen acht, im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Spleißvarianten der Ratte, identisch. Interessanterweise sind für die entsprechende Region der humanen und murinen FMR1-cDNAs ebenfalls keine Sequenzvariationen beschrieben worden (Ashley *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1996; Verkerk *et al.*, 1993). Dies deutet darauf hin, dass die N-terminale Domäne von FMRP für die Funktion des Proteins unerlässlich ist. Von Eberhart *et al.* (1996) konnte mittels Expression Flag-Epitop markierter FMRP-Varianten in COS-7 Zellen gezeigt werden, dass die N-terminalen 184 AS für die nukleäre Rekrutierung von FMRP unentbehrlich sind. Diese Beobachtung lässt das Vorliegen eines nukleären Lokalisationssignals (NLS) in dem vorderen Proteinabschnitt von FMRP vermuten. Gestützt wird diese Vermutung durch eine für das NLS charakteristische Anreicherung von Arginin- und Lysin-Resten in der entsprechenden Region des Proteins (Eberhart *et al.*, 1996). Des Weiteren umfasst diese N-terminale Region zwei RNA-bindende KH-Domänen (Ashley *et*

Menschen und des Huhns vollständig identisch. Die von de Boulle *et al.* (1993) beschriebene *Missense*-Mutation in der zweiten KH-Domäne, führt zu einem Austausch von Isoleucin gegen Asparagin und dem daraus resultierenden Verlust der RNA-bindenden Fähigkeit dieser Domäne (Siomi *et al.*, 1994). Die Folge ist ein ausgeprägter, dem Fragilen X-Syndrom entsprechender, Phänotyp des betroffenen Patienten. Dieses Beispiel macht die große funktionelle Relevanz der RNA-bindenden KH-Domänen für das FMR-Protein deutlich und könnte erklären, warum die entsprechende Region in allen bekannten FMRP-Isoformen identisch ist.

Die erste variable Region der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten FMR1-cDNA-Fragmente der Ratte liegt stromabwärts der die KH-Domänen kodierenden Region und umfasst 63 nt. Diese Region fehlt bei fünf der insgesamt acht charakterisierten Transkripte. Auch in FMR1-Transkripten des Menschen und der Maus ist die entsprechende Region „variabel“ (Denman *et al.*, 2002; Sittler *et al.*, 1996; Verkerk *et al.*, 1993). Diese variable Region entspricht dem von Exon 12 kodierten Bereich, dessen Sequenz durch Exon-Skipping bei den Spleißvarianten T1, T2, T3, T5 und T6 fehlt. Auch für die humanen und murinen FMR1-mRNAs ist das Skipping des entsprechenden Exon 12 beschrieben worden (Sittler *et al.*, 1996). Das Exon 12 kodiert für einen Proteinabschnitt mit stark hydrophoben Eigenschaften (Ashley *et al.*, 1993). Entsprechende hydrophobe Domänen sind häufig für die Ausbildung einer spezifischen Tertiärstruktur von Proteinen von Bedeutung (Löffler/Petrides, 2003). Über mögliche Auswirkungen dieser hydrophoben Domäne auf die Fähigkeit der Proteinfaltung sind bislang allerdings keine Beobachtungen gemacht worden.

Des Weiteren ist für die humanen und murinen Transkripte der komplette Verlust des von Exon 14 kodierten Sequenzabschnitts beschrieben worden, welcher ein nukleäres Exportsignal (NES) kodiert (Eberhart *et al.*, 1996; Fridell *et al.*, 1996; Sittler *et al.*, 1996). Proteine, denen der durch Exon 14 kodierte Bereich fehlt, sind in Immunfluoreszenz-Untersuchungen in eukaryotischen Zellen ausschließlich nukleär lokalisiert (Sittler *et al.*, 1996). Alle im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Transkripte kodieren FMRP-Isoformen, die das von

Exon 14 kodierte NES besitzen. Folglich scheinen alle Isoformen sowohl im Kern als auch im Zytoplasma von Bedeutung zu sein. Die nächste stromabwärts gelegene variable Region der Ratten-FMR1-Transkripte umfasst entweder 36 nt (T2, T4, T5), oder ist durch unmittelbar stromabwärts daran anschließende fehlende 39 nt insgesamt 75 nt lang (T6 und T8). Diese variablen Regionen kommen durch die Verwendung zwei unterschiedlicher Spleißakzeptoren innerhalb des Exon 15 zustande (s. Abb. 3.3). Ashley *et al.* (1993) und Verkerk *et al.* (1993) konnten durch Untersuchungen verschiedener Gewebe von Maus und Mensch zeigen, dass auch in diesen beiden Spezies die entsprechenden Spleißvarianten auf die Verwendung unterschiedlicher Spleißakzeptoren in Exon 15 zurückzuführen sind.

Es konnten in der vorliegenden Arbeit aber auch zwei Transkripte identifiziert werden, die bisher in anderen Spezies nicht beschrieben worden sind. Eine dieser beiden mRNA-Varianten ist das Transkript T1, dem zusätzlich zu den für die Transkripte T6 und T7 beschriebenen 75 fehlenden Nukleotiden, weitere 147 nt, folglich insgesamt 222 nt, fehlen. Die genomische Ratten-Sequenz lässt vermuten, dass zur Entstehung dieses Transkriptes ein Spleißakzeptor innerhalb von Exon 16 verwendet wird. Somit fehlt dieser Spleißvariante die komplette Sequenz des 183 nt umfassenden Exon 15 und Anteile der stromabwärts gelegenen kodierenden Sequenz des Exon 16. Dieser 222 nt große, alternativ gespleißte Bereich der Spleißvariante T1, kodiert unter anderem die vollständige RGG-Box (Adinolfi *et al.*, 1999). Die weitere bisher noch nicht charakterisierte FMR1-mRNA-Variante, das Transkript T2, an dessen 3'-Ende 224 nt fehlen, entsteht unter Verwendung eines Spleißdonors in Exon 15. Dieses Transkript kodiert eine Isoform mit unvollständiger RGG-Box. Von Siomi *et al.* (1993) konnte mittels *in vitro* RNA Bindungstest gezeigt werden, dass der Verlust der RGG-Box trotz vorhandener KH-Domänen zu einer starken Verminderung der RNA-Bindungskapazität von FMRP führt. Infolge dessen könnte die von dem Transkript T1 kodierte Isoform, Iso1 genannt, gegenüber allen anderen bekannten Isoformen eine verminderte Affinität und veränderte Spezifität für RNA besitzen. Bislang ist unklar, ob die unvollständige RGG-Box in Iso2 noch RNA-Bindungskapazität besitzt. Ob der

weiter stromabwärts liegende Genabschnitt der Spleißvariante T2 funktionelle Domänen kodiert, ist bislang nicht bekannt. Dies könnte durch Expression rekombinanter Proteine in kultivierten Zellen und Immunocytochemie untersucht werden.

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass in verschiedenen Spezies unterschiedliche FMR1-mRNA-Transkripte durch alternatives Spleißen aus einer gemeinsamen Vorläufer-RNA hervorgehen. Bei *Drosophila melanogaster* sind bislang nur zwei FMR1-mRNA beschrieben worden, deren Expression in S2-Zellen (embryonale Zellen von *Drosophila*) mittels Western Blot über die Detektion eines 85 und 92 kDa schweren Proteins nachgewiesen werden konnte (Schenck *et al.*, 2002). Die bisher zwölf unterschiedlichen beschriebenen FMR1-mRNA-Varianten des Menschen und der Maus (Ashley *et al.*, 1993; Eichler *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1996; Sittler *et al.*, 1996; Verkerk *et al.*, 1993) sind in verschiedenen Geweben identifiziert worden. Für die PCR-Analysen zur Identifikation der murinen FMR1-mRNA-Moleküle diente die mRNA vom Gehirn einer adulten Maus als Matrize (Ashley *et al.*, 1993; Verkerk *et al.*, 1993). Die Charakterisierung der FMR1-Transkripte des Menschen erfolgte unter Verwendung menschlicher fetaler Gehirn-cDNA (Huang *et al.*, 1996; Verkerk *et al.*, 1993) bzw. cDNA des Hoden (Ashley *et al.*, 1993). Die in dieser Arbeit identifizierten mRNA-Transkripte stammen aus dem Gehirn einer adulten Ratte. Der Vergleich der charakterisierten mRNA-Varianten ergab trotz der Verwendung von cDNA aus z.T. unterschiedlichen Geweben bzw. verschiedenen Entwicklungsstadien, große Parallelitäten. Es scheinen folglich durch alternatives Spleißen einer Prä-mRNA in verschiedenen Geweben und zu verschiedenen Stadien der Entwicklung identische mRNA-Moleküle gebildet zu werden (Ashley *et al.*, 1993; Verkerk *et al.*, 1993). Das anteilige Vorkommen der einzelnen mRNA-Transkripte ließe sich z.B. mit quantitativer PCR genauer untersuchen.

Die Tatsache, dass einige der identifizierten Transkripte auch in anderen Säugerspezies vorliegen, deutet darauf hin, dass die einzelnen Isoformen unterschiedliche zelluläre Funktionen besitzen. Basierend auf diesem Gedankenmodell wurden in dieser Arbeit Untersuchungen zur subzellulären

Verteilung der einzelnen FMRP-Isoformen der Ratte durchgeführt. Hierfür wurden die Isoformen Iso4, Iso7 und Iso8 als Fusionsproteine mit EGFP in eukaryotischen Zellen exprimiert.

Alle drei exprimierten Fusionsproteine lagen in den eukaryotischen CHO-K1-Zellen im Zytoplasma vor. Dieser zytoplasmatische Proteinnachweis von sowohl rekombinantem als auch endogenem FMRP in eukaryotischen Zellen stimmt mit vorherigen Untersuchungen überein (Castrén *et al.*, 2001; Devys *et al.*, 1993; Eberhart *et al.*, 1996; Fridell *et al.*, 1996; Sittler *et al.*, 1996; Verheij *et al.*, 1993). Von Feng *et al.* (1997) konnte allerdings in Neuronen mittels Immunogold Elektronen Mikroskopie (EM) gezeigt werden, dass FMRP neben der zytoplasmatischen Lokalisation auch im Zellkern vorhanden ist. Diese Beobachtung und das Vorhandensein eines NLS bzw. NES lassen ein Pendeln von FMRP zwischen dem Zytoplasma und dem Zellkern vermuten (Eberhart *et al.*, 1996; Fridell *et al.*, 1996; Sittler *et al.*, 1996). Die geringe Konzentration von FMRP im Kern konnte in der vorliegenden Arbeit in vereinzelt Zellen beobachtet werden, fällt gegenüber der starken zytoplasmatischen Konzentration allerdings wenig ins Gewicht.

Die verschiedenen Fusionsproteine zeigten neben der gemeinsamen zytoplasmatischen Präferenz aber auch subzelluläre Unterschiede. So verteilte sich Iso4 in Form kleiner Granulae über das gesamte Zytoplasma. Die Isoformen Iso7 und Iso8 hingegen bildeten vergleichsweise große Komplexe. Die Tendenz von überexprimiertem FMR1-Protein, im Zytoplasma Komplexe zu bilden, wurde bereits von Corbin *et al.* (1997) und Devys *et al.* (1993) beschrieben. Sie führen dieses Verhalten auf eine mögliche Assoziation von FMRP mit Zellorganellen oder Transportvesikeln zurück. Eine interessante Beobachtung stammt aus dem Versuchsteil 3.4.2, in welchem die CHO-K1-Zellen bereits am ersten Tag nach der Transfektion fixiert wurden. Dadurch konnte die Expression nach einem Tag gegenüber der nach zwei Tagen aus den anderen Versuchen, verglichen werden. Bei Iso4 dominierte sowohl nach der eintägigen als auch nach zweitägiger Expression das granuläre Erscheinungsbild. Demgegenüber zeigten die Isoformen Iso7 und Iso8 nach eintägiger bzw. zweitägiger Expression ein differentielles Bild. Fand die

Fixierung der Zellen bereits am ersten Tag nach der Transfektion statt, bildeten beide Isoformen bei ca. 50 % der transfizierten Zellen perinukleäre Proteinaggregate. In den übrigen Zellen verteilten sich die exprimierten Fusionsproteine in Form kleiner Granulae. Wenn die Zellen hingegen zwei Tage nach der Transfektion analysiert wurden, waren Iso7 und Iso8 in dem Großteil der transfizierten Zellen perinukleär aggregiert. Die Entstehung dieser Proteinaggregate könnte Ausdruck einer deutlich erhöhten intrazellulären FMRP Konzentration sein, die durch das gleichzeitige Vorhandensein von rekombinantem und endogenem FMRP zustande kommt. Es wäre denkbar, dass erhöhte FMRP Spiegel die Physiologie der Zelle stören, und sich Zellen mittels der Aggregation überschüssiger Proteine vor toxischen Wirkungen schützen. Interessant ist allerdings, dass Iso4 in keiner der transfizierten Zellen die Bildung von Proteinaggregaten zeigte. Möglicherweise wird diese Isoform gegenüber den beiden anderen Isoformen trotz Überexpression entweder von der Zelle besser toleriert oder in kleineren Mengen translatiert.

In dieser Arbeit sollte zudem eine mögliche Assoziation der rFMRP-Fusionsproteine mit dem Zytoskelett mittels Extraktionsversuchen untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass alle drei hier untersuchten Isoformen auch nach der Extraktion im Zytoplasma der Zellen nachweisbar sind (Abb. 3.12 bis 3.15). Dieses Ergebnis zeigt, dass FMRP vermutlich mit dem Zytoskelett assoziiert ist. Bereits Antar *et al.* (2005a) und De Diego Otero *et al.* (2002) führten Untersuchungen zur Zytoskelettassoziation von FMRP durch. Hierfür verwendeten sie primäre Hippokampusneurone bzw. PC12-Zellen und konnten durch Zugabe der Mikrotubuli-depolymerisierenden Substanz Nocodazol zeigen, dass der Transport der FMRP-Granulae entlang der Dendriten Mikrotubulus-abhängig stattfindet. Folglich wäre denkbar, dass auch die im Rahmen dieser Arbeit gezeigte Zytoskelettassoziation auf einen Mikrotubulus-abhängigen Transport von FMRP innerhalb der Zelle hinweist.

Die beobachtete perinukleäre Anreicherung der exprimierten Proteine ließ eine Assoziation der FMRP-Isoformen mit dem, in Kernnähe konzentrierter vorliegenden, Endoplasmatischen Retikulum (ER) vermuten. Dieser Vermutung sollte mittels immunzytochemischer Untersuchungen nachgegangen werden.

Eingesetzt wurde hierfür ein Antikörper gegen das Grp78-Protein, auch als BiP (*Binding Protein*) bezeichnet, welches zur Gruppe der Hitzeschockproteine gehört und das häufigste Chaperon im Lumen des ER darstellt. Es ist an der posttranslationalen Modifikation neu synthetisierter Proteine beteiligt. Eine teilweise Kolokalisation der exprimierten Proteine mit dem ER-Markerprotein konnte für alle drei rFMRP-Isoformen beobachtet werden (Abb. 3.18 bis 3.20). Es ist bekannt, dass es sich bei FMRP um ein nukleozytoplasmatisches RNA-Bindeprotein handelt (Ashley *et al.*, 1993; Siomi *et al.*, 1993), welches als Bestandteil sogenannter Ribonukleoprotein (RNP)-Komplexe (Khandjian *et al.*, 2004) im Zytoplasma verschiedener Zellen regulatorisch an der Translation beteiligt ist. Die in dieser Arbeit beobachtete Kolokalisation mit Strukturen des ER könnte folglich ein Hinweis dafür sein, dass FMRP an der Translationsregulation sekretorischer Proteine beteiligt ist. Über die genaue Funktion von FMRP ist zu diesem Zeitpunkt wenig bekannt. *In vitro* Experimente zeigen, dass FMRP die Translation assoziierter mRNAs inhibiert (Laggerbauer *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001). Es bleibt jedoch offen, ob es sich bei der Inhibition der Translation um die einzige Funktion von FMRP handelt, oder ob dieses Protein in weitere zelluläre Prozesse involviert ist.

Von verschiedenen Arbeitsgruppen ist für FMRP eine vorwiegend neuronale Expression beschrieben worden (Antar *et al.*, 2005b; Devys *et al.*, 1993; Feng *et al.*, 1997; Khandjian *et al.*, 2004; Zalfa *et al.*, 2006). Daher lag es nahe, das Verhalten der drei unterschiedlichen Isoformen auch in neuronalen Zellen zu untersuchen. Hiefür wurden die Fusionsproteine in primären Hippokampusneuronen der Ratte exprimiert. Der überwiegende Teil der in den Neuronen exprimierten Fusionsproteine reichte sich im somatischen Neuroplasma, in Form ausgeprägter perinukleärer Proteinaggregate an. Ein demgegenüber geringerer Proteinanteil verteilte sich granulär bis in die peripheren Dendriten. Hierbei zeigten die Isoformen Iso7 und Iso8 gegenüber Iso4 eine ausgeprägtere distale Ausbreitung entlang der Dendriten (s. Abb. 3.22 bis 3.24). Diese in der vorliegenden Arbeit beobachtete granuläre Verteilung von FMRP entlang der Dendriten deckt sich mit den Erkenntnissen anderer Arbeitsgruppen (Antar *et al.*, 2005b; Castrén *et al.*, 2001; Devys *et al.*,

1993;). Des Weiteren wird in der Literatur eine Kolokalisation von FMRP mit synaptischen Strukturen beschrieben (Antar *et al.*, 2004; Castrén *et al.*, 2001). In dieser Arbeit wurde durch den Einsatz eines Antikörpers gegen einen vesikulären Glutamattransporter (vGLUT), eine Kolokalisation der Isoformen mit Strukturen im präsynaptischen Bereich untersucht. Eine Kolokalisation konnte hier nicht beobachtet werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass im Gehirn der Ratte mindestens acht verschiedene FMRP-Isoformen vorliegen. Dies spricht sehr dafür, dass FMRP als Bestandteil eines anspruchsvollen zellulären Systems verstanden werden kann und in komplexe physiologische Regulationsvorgänge involviert ist. Es wäre denkbar, dass die Isoformen über differentielle Interaktionsmuster verfügen. Dieser Vermutung könnte z.B. durch die Identifikation Isoform-spezifischer zellulärer Interaktionspartner nachgegangen werden. Des Weiteren wäre es interessant zu schauen, in welchem quantitativen Verhältnis die FMRP-Isoformen zueinander vorliegen und ob ihr Vorkommen in den einzelnen Geweben und Zelltypen variiert. Folglich stellt diese Arbeit eine wichtige Grundlage für weiterführende Untersuchungen dar, die sich mit den physiologischen Unterschieden und Funktionen der einzelnen FMRP-Isoformen der Ratte beschäftigen.

5 Zusammenfassung

Das Fragile X-Syndrom (FXS) gehört zu den häufigsten erblichen Ursachen mentaler Retardierung. In nahezu allen Fällen wird die Krankheit durch eine Expansion von CGG-Triplett-Wiederholungen in dem die 5'-untranslatierte Region (5'-UTR) kodierenden Abschnitt des *FMR1*-Gens hervorgerufen. Dies führt zur transkriptionellen Abschaltung des Gens und damit zum Fehlen des *fragile X mental retardation protein* (FMRP). Darüber hinaus sind einige wenige Patienten bekannt, bei denen ein durch Mutation verändertes FMRP die Krankheit hervorruft. Welche zellulären Prozesse durch die FMRP-Defizienz oder -Fehlfunktion gestört sind, ist bislang noch unklar.

In verschiedenen Spezies sind FMRP-Orthologe beschrieben worden. In der vorliegenden Arbeit sollten FMRP-Isoformen der Ratte (*Rattus norvegicus*) näher charakterisiert werden.

Mit Hilfe von PCR-Analysen konnten aus dem Gewebe des adulten Gehirns der Ratte (*Rattus norvegicus*) acht verschiedene mRNA-Transkripte identifiziert werden, die durch alternatives Spleißen aus einer gemeinsamen Vorläufer-RNA hervorgehen. Für drei der acht Isoformen wurde die subzelluläre Proteinverteilung in eukaryotischen Zellen und primären Hippokampusneuronen der Ratte untersucht. In den eukaryotischen CHO-K1-Zellen bilden die Isoformen kleine bzw. größere Aggregate und liegen präferentiell im Zytoplasma vor. Sie sind perinukleär konzentriert und scheinen mit dem ER assoziiert zu sein. Mittels Triton-Extraktion der transfizierten Zellen wurde die Zytoskelettassoziation der drei Isoformen nachgewiesen. In den Neuronen reichern sich die exprimierten Fusionsproteine im somatischen Neuroplasma, in Form ausgeprägter perinukleärer Proteinaggregate an. Ein demgegenüber geringerer Proteinanteil verteilt sich granulär bis in die peripheren Dendriten. Eine Kollokalisierung mit Strukturen im präsynaptischen Bereich konnte für keine der drei FMRP-Isoformen der Ratte beobachtet werden.

6 Literaturverzeichnis

Abrams MT, Reiss AL, Freund LS, Baumgardner TL, Chase GA, Denckla MB

Molecular-neurobehavioral associations in females with the fragile X full mutation

Am J Med Genet 1994; 51(4):317-327.

Adinolfi S, Bagni C, Musco G, Gibson T, Mazzarella L, Pastore A

Dissecting FMR1, the protein responsible for fragile X syndrome, in its structural and functional domains

RNA 1999; 5(9):1248-1258.

Antar LN, Afroz R, Dichtenberg JB, Carroll RC, Bassell GJ

Metabotropic glutamate receptor activation regulates fragile x mental retardation protein and FMR1 mRNA localization differentially in dendrites and at synapses

J Neurosci 2004; 24(11):2648-2655.

Antar LN, Dichtenberg JB, Plociniak M, Afroz R, Bassell GJ

Localization of FMRP-associated mRNA granules and requirement of microtubules for activity-dependent trafficking in hippocampal neurons

Genes Brain Behav 2005; 4(6):350-359.

Antar LN, Li C, Zhang H, Carroll RC, Bassell GJ

Local functions for FMRP in axon growth cone motility and activity-dependent regulation of filopodia and spine synapses

Mol Cell Neurosci 2006; 32(1-2):37-48

Ashley CT, Sutcliffe JS, Kunst CB, Leiner HA, Eichler EE, Nelson DL, Warren ST

Human and murine FMR-1: alternative splicing and translational initiation downstream of the CGG-repeat

Nat Genet 1993; 4(3):244-251

Ashley CT Jr, Wilkinson KD, Reines D, Warren ST

FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding

Science 1993; 262(5133):563-566

Bagni C, Greenough WT

From mRNP trafficking to spine dysmorphogenesis: the roots of fragile X syndrome

Nat Rev Neurosci 2005; 6(5):376-387

Bakker CE, de Diego Otero Y, Bontekoe C, Raghoje P, Luteijn T, Hoogeveen AT, Oostra BA, Willemsen R

Immunocytochemical and biochemical characterization of FMRP, FXR1P, and FXR2P in the mouse
Exp Cell Res 2000; 258(1):162-170

Bell MV, Hirst MC, Nakahori Y, MacKinnon RN, Roche A, Flint TJ, Jacobs PA, Tommerup N, Tranebjaerg L, Froster-Iskenius U, et al

Physical mapping across the fragile X: hypermethylation and clinical expression of the fragile X syndrome
Cell 1991; 64(4):861-866

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

Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome
Cell 2001; 107(4):477-487

Castren M, Haapasalo A, Oostra BA, Castren E

Subcellular localization of fragile X mental retardation protein with the I304N mutation in the RNA-binding domain in cultured hippocampal neurons
Cell Mol Neurobiol 2001; 21(1):29-38

Clifford S, Dissanayake C, Bui QM, Huggins R, Taylor AK, Loesch DZ

Autism Spectrum Phenotype in Males and Females with Fragile X Full Mutation and Premutation
J Autism Dev Disord 2006

Comery TA, Harris JB, Willems PJ, Oostra BA, Irwin SA, Weiler IJ, Greenough WT

Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits
Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94(10):5401-5404

Corbin F, Bouillon M, Fortin A, Morin S, Rousseau F, Khandjian EW

The fragile X mental retardation protein is associated with poly(A)⁺ mRNA in actively translating polyribosomes
Hum Mol Genet 1997; 6(9):1465-1472

Crabbe LS, Bensky AS, Hornstein L, Schwartz DC

Cardiovascular abnormalities in children with fragile X syndrome
Pediatrics 1993; 91(4):714-715

Crawford DC, Meadows KL, Newman JL, Taft LF, Pettay DL, Gold LB, Hersey SJ, Hinkle EF, Stanfield ML, Holmgren P, Yeargin-Allsopp M, Boyle C, Sherman SL

Prevalence and phenotype consequence of FRAXA and FRAXE alleles in a large, ethnically diverse, special education-needs population
Am J Hum Genet 1999; 64(2):495-507

Crawford DC, Wilson B, Sherman SL

Factors involved in the initial mutation of the fragile X CGG repeat as determined by sperm small pool PCR
Hum Mol Genet 2000; 9(19):2909-2918

Darnell JC, Jensen KB, Jin P, Brown V, Warren ST, Darnell RB

Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function
Cell 2001; 107(4):489-499

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

A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation
Nat Genet 1993; 3(1):31-35

De Diego Otero Y, Severijnen LA, van Cappellen G, Schrier M, Oostra B, Willemsen R

Transport of fragile X mental retardation protein via granules in neurites of PC12 cells
Mol Cell Biol 2002; 22(23):8332-8341

Denman RB, Sung YJ

Species-specific and isoform-specific RNA binding of human and mouse fragile X mental retardation proteins
Biochem Biophys Res Commun 2002; 292(4):1063-1069

de Vries BB, Fryns JP, Butler MG, Canziani F, Wesby-van Swaay E, van Hemel JO, Oostra BA, Halley DJ, Niermeijer MF

Clinical and molecular studies in fragile X patients with a Prader-Willi-like phenotype
J Med Genet 1993; 30(9):761-766

de Vries BB, Robinson H, Stolte-Dijkstra I, Tjon Pian Gi CV, Dijkstra PF, van Doorn J, Halley DJ, Oostra BA, Turner G, Niermeijer MF

General overgrowth in the fragile X syndrome: variability in the phenotypic expression of the FMR1 gene mutation
J Med Genet 1995; 32(10):764-769

Devys D, Lutz Y, Rouyer N, Bellocq JP, Mandel JL

The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation
Nat Genet 1993; 4(4):335-340

Dube M, Huot ME, Khandjian EW

Muscle specific fragile X related protein 1 isoforms are sequestered in the nucleus of undifferentiated myoblast
BMC Genet 2000; 1:4. Epub 2000 Dec 7

Eberhart DE, Malter HE, Feng Y, Warren ST

The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals
Hum Mol Genet 1996; 5(8):1083-1091

Eichler EE, Richards S, Gibbs RA, Nelson DL

Fine structure of the human FMR1 gene
Hum Mol Genet 1993; 2(8):1147-1153
Erratum in: Hum Mol Genet 1994; 3(4):684-685

Einfeld SL, Tonge BJ, Florio T

Behavioural and emotional disturbance in fragile X syndrome
Am J Med Genet 1994; 51(4):386-391

Feng Y, Absher D, Eberhart DE, Brown V, Malter HE, Warren ST

FMRP associates with polyribosomes as an mRNP, and the I304N mutation of severe fragile X syndrome abolishes this association
Mol Cell 1997; 1(1):109-118

Feng Y, Gutekunst CA, Eberhart DE, Yi H, Warren ST, Hersch SM

Fragile X mental retardation protein: nucleocytoplasmic shuttling and association with somatodendritic ribosomes
J Neurosci 1997; 17(5):1539-1547

Fisch GS, Hao HK, Bakker C, Oostra BA

Learning and memory in the FMR1 knockout mouse
Am J Med Genet 1999; 84(3):277-282

Fisch GS, Simensen RJ, Schroer RJ

Longitudinal changes in cognitive and adaptive behavior scores in children and adolescents with the fragile X mutation or autism
J Autism Dev Disord 2002; 32(2):107-114

Fisch GS, Snow K, Thibodeau SN, Chalifaux M, Holden JJ, Nelson DL, Howard-Peebles PN, Maddalena A

The fragile X premutation in carriers and its effect on mutation size in offspring
Am J Hum Genet 1995; 56(5):1147-1155

Fridell RA, Benson RE, Hua J, Bogerd HP, Cullen BR

A nuclear role for the Fragile X mental retardation protein
EMBO J 1996; 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
Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox
Cell 1991; 67(6):1047-1058
- Garcia-Mata R, Gao YS, Sztul E
Hassles with taking out the garbage: aggravating aggresomes
Traffic 2002; 3(6):388-396
- Grossman AW, Elisseou NM, McKinney BC, Greenough WT
Hippocampal pyramidal cells in adult Fmr1 knockout mice exhibit an immature-appearing profile of dendritic spines
Brain Res 2006; 1084(1):158-164
- Hagerman RJ
Fragile X syndrome. Molecular and clinical insights and treatment issues
West J Med 1997; 166(2):129-137
- Hagerman PJ, Greco CM, Hagerman RJ
A cerebellar tremor/ataxia syndrome among fragile X premutation carriers
Cytogenet Genome Res 2003; 100(1-4):206-212
- Hatton DD, Sideris J, Skinner M, Mankowski J, Bailey DB Jr, Roberts J, Mirrett P
Autistic behavior in children with fragile X syndrome: prevalence, stability, and the impact of FMRP
Am J Med Genet A 2006; 140(17):1804-1813
- Hinds HL, Ashley CT, Sutcliffe JS, Nelson DL, Warren ST, Housman DE, Schalling M
Tissue specific expression of FMR-1 provides evidence for a functional role in fragile X syndrome
Nat Genet 1993; 3(1):36-43
Erratum in: Nat Genet 1993; 5(3):312
- Hinton VJ, Brown WT, Wisniewski K, Rudelli RD
Analysis of neocortex in three males with the fragile X syndrome
Am J Med Genet 1991; 41(3):289-294
- Huang T, Li LY, Shen Y, Qin XB, Pang ZL, Wu GY
Alternative splicing of the FMR1 gene in human fetal brain neurons
Am J Med Genet 1996; 64(2):252-255
- Irwin SA, Galvez R, Greenough WT
Dendritic spine structural anomalies in fragile-X mental retardation syndrome
Cereb Cortex 2000; 10(10):1038-1044

Jacky PB, Sutherland GR

Thymidylate synthetase inhibitors and fragile site expression in lymphocytes
Am J Hum Genet 1983; 35(6):1276-1283

Johnson JM, Castle J, Garrett-Engele P, Kan Z, Loerch PM, Armour CD, Santos R, Schadt EE, Stoughton R, Shoemaker DD

Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays
Science 2003; 302(5653):2141-2144

Khandjian EW, Corbin F, Woerly S, Rousseau F

The fragile X mental retardation protein is associated with ribosomes
Nat Genet 1996; 12(1):91-93

Khandjian EW, Fortin A, Thibodeau A, Tremblay S, Cote F, Devys D, Mandel JL, Rousseau F

A heterogeneous set of FMR1 proteins is widely distributed in mouse tissues and is modulated in cell culture
Hum Mol Genet 1995; 4(5):783-789

Khandjian EW, Huot ME, Tremblay S, Davidovic L, Mazroui R, Bardoni B

Biochemical evidence for the association of fragile X mental retardation protein with brain polyribosomal ribonucleoparticles
Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101(36):13357-13362

Kiledjian M, Dreyfuss G

Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box
EMBO J 1992; 11(7):2655-2664

Kirchgessner CU, Warren ST, Willard HF

X inactivation of the FMR1 fragile X mental retardation gene
J Med Genet 1995; 32(12):925-929

Kooy RF, D'Hooge R, Reyniers E, Bakker CE, Nagels G, De Boulle K, Storm K, Clincke G, De Deyn PP, Oostra BA, Willems PJ

Transgenic mouse model for the fragile X syndrome
Am J Med Genet 1996; 64(2):241-245

Kremer EJ, Pritchard M, Lynch M, Yu S, Holman K, Baker E, Warren ST, Schlessinger D, Sutherland GR, Richards RI

Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)_n
Science 1991; 252(5013):1711-1714

Kunst CB, Warren ST

Cryptic and polar variation of the fragile X repeat could result in predisposing normal alleles
Cell 1994; 77(6):853-861

Lachiewicz AM, Dawson DV

Do young boys with fragile X syndrome have macroorchidism?
Pediatrics 1994; 93(6 Pt 1):992-995

Laggerbauer B, Ostareck D, Keidel EM, Ostareck-Lederer A, Fischer U

Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation
Hum Mol Genet 2001; 10(4):329-338

Li Z, Zhang Y, Ku L, Wilkinson KD, Warren ST, Feng Y

The fragile X mental retardation protein inhibits translation via interacting with mRNA
Nucleic Acids Res 2001; 29(11):2276-2283

Löffler G, Petrides PE

Biochemie und Pathobiochemie
Springer-Verlag, 7.Auflage, 2003

Mazroui R, Huot ME, Tremblay S, Boilard N, Labelle Y, Khandjian EW

Fragile X Mental Retardation protein determinants required for its association with polyribosomal mRNPs
Hum Mol Genet 2003; 12(23):3087-3096

Nakamura M, Masuda H, Horii J, Kuma K, Yokoyama N, Ohba T, Nishitani H, Miyata T, Tanaka M, Nishimoto T

When overexpressed, a novel centrosomal protein, RanBPM, causes ectopic microtubule nucleation similar to gamma-tubulin
J Cell Biol 1998; 143(4):1041-1052

Pieretti M, Zhang FP, Fu YH, Warren ST, Oostra BA, Caskey CT, Nelson DL

Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome
Cell 1991; 66(4):817-822

Ramos A, Hollingworth D, Pastore A

G-quartet-dependent recognition between the FMRP RGG box and RNA
RNA 2003; 9(10):1198-1207

Reiss AL, Freund L, Abrams MT, Boehm C, Kazazian H

Neurobehavioral effects of the fragile X premutation in adult women: a controlled study
Am J Hum Genet 1993; 52(5):884-894

- Reiss AL, Freund LS, Baumgardner TL, Abrams MT, Denckla MB
Contribution of the FMR1 gene mutation to human intellectual dysfunction
Nat Genet 1995; 11(3):331-334
- Riddle JE, Cheema A, Sobesky WE, Gardner SC, Taylor AK, Pennington BF, Hagerman RJ
Phenotypic involvement in females with the FMR1 gene mutation
Am J Ment Retard 1998; 102(6):590-601
- Roberts JE, Hennon EA, Price JR, Dear E, Anderson K, Vandergrift NA
Expressive language during conversational speech in boys with fragile X syndrome
Am J Ment Retard 2007; 112(1):1-17
- Roberts BL, Richardson WD, Smith AE
The effect of protein context on nuclear location signal function
Cell 1987; 50(3):465-475
- Rousseau F, Heitz D, Oberle I, Mandel JL
Selection in blood cells from female carriers of the fragile X syndrome: inverse correlation between age and proportion of active X chromosomes carrying the full mutation
J Med Genet 1991; 28(12):830-836
- Rudelli RD, Brown WT, Wisniewski K, Jenkins EC, Laure-Kamionowska M, Connell F, Wisniewski HM
Adult fragile X syndrome. Clinico-neuropathologic findings
Acta Neuropathol (Berl) 1985; 67(3-4):289-295
- Schaeffer C, Bardoni B, Mandel JL, Ehresmann B, Ehresmann C, Moine H
The fragile X mental retardation protein binds specifically to its mRNA via a purine quartet motif
EMBO J 2001; 20(17):4803-4813
- Schenck A, Van de Bor V, Bardoni B, Giangrande A
Novel features of dFMR1, the Drosophila orthologue of the fragile X mental retardation protein
Neurobiol Dis 2002; 11(1):53-63
- Schrander-Stumpel C, Gerver WJ, Meyer H, Engelen J, Mulder H, Fryns JP
Prader-Willi-like phenotype in fragile X syndrome
Clin Genet 1994; 45(4):175-180
- Schwartz CE, Dean J, Howard-Peebles PN, Bugge M, Mikkelsen M, Tommerup N, Hull C, Hagerman R, Holden JJ, Stevenson RE
Obstetrical and gynecological complications in fragile X carriers: a multicenter study
Am J Med Genet 1994; 51(4):400-402

Singer M, Berg P

Gene und Genome
Spektrum Akademischer Verlag, 1992

Siomi H, Choi M, Siomi MC, Nussbaum RL, Dreyfuss G

Essential role for KH domains in RNA binding: impaired RNA binding by a mutation in the KH domain of FMR1 that causes fragile X syndrome
Cell 1994; 77(1):33-39

Siomi H, Siomi MC, Nussbaum RL, Dreyfuss G

The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein
Cell 1993; 74(2):291-298

Siomi MC, Siomi H, Sauer WH, Srinivasan S, Nussbaum RL, Dreyfuss G

FXR1, an autosomal homolog of the fragile X mental retardation gene
EMBO J 1995; 14(11):2401-2408

Sittler A, Devys D, Weber C, Mandel JL

Alternative splicing of exon 14 determines nuclear or cytoplasmic localisation of fmr1 protein isoforms
Hum Mol Genet 1996; 5(1):95-102

Sobesky WE, Taylor AK, Pennington BF, Bennetto L, Porter D, Riddle J, Hagerman RJ

Molecular/clinical correlations in females with fragile X
Am J Med Genet 1996; 64(2):340-345

Sreeram N, Wren C, Bhate M, Robertson P, Hunter S

Cardiac abnormalities in the fragile X syndrome
Br Heart J 1989; 61(3):289-291

Steinbach P

Molekulargenetische Grundlagen des fra(X)-Syndroms – Diagnostik und therapeutische Hilfen; aus dem Handbuch der Molekularen Medizin, Band 6, Monogen bedingte Erbkrankheiten I; Ganten D, Ruckpaul K (Hrsg.)
Springer-Verlag 2000: 479-505

Stoll C

Problems in the diagnosis of fragile X syndrome in young children are still present
Am J Med Genet 2001; 100(2):110-115

Stryer L

Biochemie
Spektrum Akademischer Verlag 2003, 4. Auflage

Sullivan K, Hooper S, Hatton D

Behavioural equivalents of anxiety in children with fragile X syndrome:
parent and teacher report
J Intellect Disabil Res 2007; 51(Pt 1):54-65

Sutcliffe JS, Nelson DL, Zhang F, Pieretti M, Caskey CT, Saxe D, Warren ST

DNA methylation represses FMR-1 transcription in fragile X syndrome
Hum Mol Genet 1992; 1(6):397-400

Sutherland GR

Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence
on the type of tissue culture medium
Science 1977; 197(4300):265-266

Tamanini F, Meijer N, Verheij C, Willems PJ, Galjaard H, Oostra BA,
Hoogeveen AT

FMRP is associated to the ribosomes via RNA
Hum Mol Genet 1996; 5(6):809-813

Tamanini F, Willemsen R, van Unen L, Bontekoe C, Galjaard H, Oostra BA,
Hoogeveen AT

Differential expression of FMR1, FXR1 and FXR2 proteins in human brain
and testis
Hum Mol Genet 1997; 6(8):1315-1322

Terracciano A, Chiurazzi P, Neri G

Fragile X syndrome
Am J Med Genet C Semin Med Genet 2005; 137(1):32-37

Turner G, Daniel A, Frost M

X-linked mental retardation, macro-orchidism, and the Xq27 fragile site
J Pediatr 1980; 96(5):837-841

Turner G, Webb T, Wake S, Robinson H

Prevalence of fragile X syndrome
Am J Med Genet 1996; 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

Characterization and localization of the FMR-1 gene product associated
with fragile X syndrome
Nature 1993; 363(6431):722-724

Verkerk AJ, de Graaff E, De Boulle K, Eichler EE, Konecki DS, Reyniers E,
Manca A, Poustka A, Willems PJ, Nelson DL, et al

Alternative splicing in the fragile X gene FMR1
Hum Mol Genet 1993; 2(4):399-404
Erratum in: Hum Mol Genet 1993; 2(8):1348

Wisniewski KE, Segan SM, Miezieski CM, Sersen EA, Rudelli RD

The Fra(X) syndrome: neurological, electrophysiological, and neuropathological abnormalities

Am J Med Genet 1991; 38(2-3):476-480

Wright-Talamante C, Cheema A, Riddle JE, Luckey DW, Taylor AK, Hagerman RJ

A controlled study of longitudinal IQ changes in females and males with fragile X syndrome

Am J Med Genet 1996; 64(2):350-355

Zalfa F, Achsel T, Bagni C

mRNPs, polysomes or granules: FMRP in neuronal protein synthesis
Curr Opin Neurobiol 2006

Zhang Y, O'Connor JP, Siomi MC, Srinivasan S, Dutra A, Nussbaum RL, Dreyfuss G

The fragile X mental retardation syndrome protein interacts with novel homologs FXR1 and FXR2

EMBO J 1995; 14(21):5358-5366

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei allen Personen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. Stefan Kindler für die Überlassung des Themas, die fachliche Anleitung, die gute und engagierte Betreuung und die Möglichkeit unvergessliche Erfahrungen zu sammeln.

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

Allen Mitarbeitern und Doktoranden der Arbeitsgruppe Kindler und Kreienkamp, insbesondere Birgit Schwanke und Janin Schütt, für die stets hilfsbereite Einarbeitung in labortechnische Methoden, Vermittlung von Tipps und Tricks in der Durchführung der Laborarbeiten, sowie für die schöne gemeinsame Zeit innerhalb und außerhalb des Labors.

Meinem Freund Björn für die Unterstützung bei der Behebung technischer Probleme am Computer und seinem Rückhalt in allen Lebenslagen.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Nelly Schröder

Geburtsdatum,-ort: 31.12.1980, Hamburg

Ausbildung:

1987-2000 Rudolf-Steiner-Schule Hamburg-Wandsbek
(Gesamtschule)

06/2000 Abitur

08/2000-07/2001 Freiwilliges Soziales Jahr (FSJ) im AK Heidberg

03-09/2001 Ausbildung zur Rettungssanitäterin bei den Maltesern
Hamburg

10/2001 Beginn des Studiums der Medizin an der Universität
Hamburg

09/2003 Physikum

Famulaturen:

02-03/2004 Kinderarztpraxis in Hamburg-Poppenbüttel

07-09/2004 Innere Medizin im Kreiskrankenhaus Husum

01-03/2005 Pädiatrie im Government Hospital in Trivandrum, Indien

Praktisches Jahr:

02-06/2007 Chirurgie im AK Eilbek

06-10/2007 Innere im Katholischen Marienkrankenhaus Hamburg

10/2007-01/2008 Pädiatrie im AK Heidberg

Promotion:

seit 09/2005 Forschungsarbeiten zur Promotion im Institut für
Humangenetik des Universitätsklinikums Hamburg
Eppendorf unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. Stefan
Kindler

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.