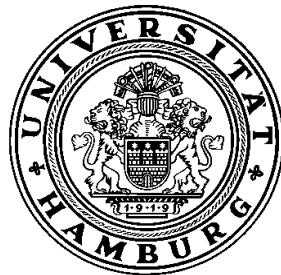


Das Fragile X Syndrom: Molekulare Veränderungen
der postsynaptischen Dichte in der Maus
(*Mus musculus* L.)

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
im Department Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften an der Universität Hamburg



vorgelegt von

Janin Schütt

Hamburg 2009

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Priv.-Doz. Dr. S. KINDLER
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. K. WIESE
Tag der Disputation: 09. Oktober 2009

Hamburg, den 18. September 2009



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. Ganzhorn'.

Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Fragile X Syndrom	1
1.2	Das Fragile X Mental Retardation Protein	3
1.3	Die Postsynaptische Dichte	7
1.4	Ziel der Arbeit.....	10
2	Material und Methoden.....	11
2.1	Material	11
2.1.1	Chemikalien	11
2.1.2	Bakterienstämme, Zell- und Tierlinien.....	11
2.1.3	DNA-Vektoren und Sonden.....	11
2.1.4	Oligonukleotide	12
2.1.5	Antikörper.....	13
2.2	Molekularbiologische Methoden.....	14
2.2.1	Quantifizierung von Nukleinsäuren	14
2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	14
2.2.3	Präparation von genomischer DNA.....	16
2.2.4	Präparation von Plasmid-DNA	16
2.2.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	16
2.2.6	Klonierung von DNA-Fragmenten und DNA-Sequenzierung.....	16
2.2.7	Isolierung von RNA aus Gehirnlysaten, Synaptosomen oder Immunpräzipitaten	17
2.2.8	Northern Blot	17
2.2.9	Quantitative Realtime-PCR	18
2.3	Zellbiologische Methoden.....	19
2.3.1	Kultivierung und Transfektion von <i>Mouse Embryonic Fibroblasts</i> (MEFs)	19
2.3.2	Kultivierung und Transfektion von Neuronen.....	19
2.3.3	Stimulierung und Ernte von Cortex-Neuronen	20
2.3.4	Immunzytochemische Analyse von Hippocampus-Neuronen	20
2.4	Biochemische Methoden	21
2.4.1	Quantifizierung von Proteinen, Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot	21
2.4.2	Reinigung von GST-Fusionsproteinen	22

2.4.3	Aufreinigung polyklonaler Antikörper aus Serum (anti-FMRP)	23
2.4.4	Immunpräzipitationen von Proteinen und assoziierten RNA-Molekülen.....	23
2.4.5	Messung der Luciferase-Aktivität.....	24
2.4.6	Isolierung von Synaptosomen und postsynaptischen Dichten	24
2.5	Statistische Auswertung der Daten und Stichprobengröße	24
3	Ergebnisse	26
3.1	Identifizierung von <i>Fmr1</i> ^{-/-} Tieren	26
3.1.1	Genotypisierung von <i>Fmr1</i> ^{-/-} Tieren	26
3.1.2	Herstellung und Testung eines FMRP-Antikörpers.....	27
3.2	Quantitative Analyse von Proteinen der postsynaptischen Dichte in Wildtyp und <i>Fmr1</i> ^{-/-} Mäusen	28
3.2.1	Veränderte Zusammensetzung der postsynaptischen Dichte in adulten <i>Fmr1</i> ^{-/-} Tieren	29
3.2.2	Entwicklungsabhängige Veränderungen in der postsynaptischen Dichte von <i>Fmr1</i> ^{-/-} Tieren	32
3.3	Quantitative Analyse von PSD Protein kodierenden mRNA-Molekülen in Wildtyp und <i>Fmr1</i> ^{-/-} Mäusen	35
3.3.1	Relative Quantifizierung von mRNA aus adulten WT und <i>Fmr1</i> ^{-/-} Mausgehirnlysaten mittels Northern Blot.....	35
3.3.2	Relative Quantifizierung von mRNA aus adulten WT und <i>Fmr1</i> ^{-/-} Mausgehirnlysaten mittels <i>Real-Time</i> PCR.....	36
3.3.3	Relative Quantifizierung von mRNA aus juvenilen WT und <i>Fmr1</i> ^{-/-} Mausgehirnlysaten mittels RT-qPCR	37
3.3.4	Relative Quantifizierung von mRNA aus Synaptosomen von WT und <i>Fmr1</i> ^{-/-} Mäusen mittels RT-qPCR.....	39
3.4	Identifizierung von FMRP Ziel-mRNA-Molekülen.....	41
3.5	FMRP-abhängige Translationsregulation von SAPAP3 und Shank1 mRNA-Molekülen	46
3.6	Einfluß von metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluRs) auf die Translation der Shank1 mRNA	51
4	Diskussion.....	53
5	Zusammenfassung.....	60
6	Literaturverzeichnis.....	62

Publikationen

Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

AMPA	Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-Propionsäure
AraC	Cytosin- β -D-Arabinofuranosid
Arc	aktivitätsreguliertes Cytoskelett-assoziiertes Protein
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
CaMKII	<i>Calcium/Calmodulin dependent protein kinase II</i>
°C	Grad Celcius
C	Cytosin-Nukleotid
Ct	<i>cycle threshold</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
DAG	Diacylglycerol
DHPG	S-(3,5)-Dihydroxyphenylglycin
DMEM/MEM	<i>Dulbecco 's modified eagle medium/ minimum essential medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosid 5'-triphosphate
DTE	<i>dendritic targeting element</i>
EX	Embryonaltag X
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F-Aktin	filamentöses Aktin
<i>Fmr1</i>	<i>Fragile X linked mental retardation type 1</i>
FMRP	<i>Fragile X Mental Retardation Protein</i>
FRAX	Fragiles X Syndrom
Fw	<i>forward</i>
FXR1P/ FXR2P	<i>Fragile X-related proteins 1 und 2</i>
G	Guanin-Nukleotid
GK	Guanylat-Kinase
GluR1-4	AMPA-Rezeptoruntereinheit 1-4
GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde
HBSS	<i>Hanks ' balanced salt solution</i>
hnRNP	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i>

HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
I	Isoleucin
ICC	Immuncytochemie
Ig	Immunglobulin
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPTG	Isopropylindolyl-thiogalactosid
IRSp53	<i>Insulin receptor substrate of 53 kDa</i>
kDa	Kilodalton
KH	hnRNP-K <i>Homology</i>
Ko	<i>knockout</i>
l	Liter
LB	Luria Bertoni
Ln	natürlicher Logarithmus
LTD	<i>long-term depression</i>
LTP	<i>long-term potentiation</i>
M	Molar, Mol/Liter
m	<i>mouse</i>
MAGUK	Membran assoziierte Guanylat-Kinasen
MAP2	<i>microtubule associated protein 2</i>
MEF	<i>mouse embryonic fibroblast</i>
mGluR	metabotroper Glutamat-Rezeptor
min	Minute
mRNA/ mRNP	<i>messenger ribonucleic acid/ messenger ribonucleoprotein</i>
N	Asparagin
NES	<i>Nuclear export signal</i>
NLS	<i>Nuclear localisation signal</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NR1/2A/B	NMDA-Rezeptoruntereinheit 1/2A/2B
nt	Nukleotide
OD600	Optische Dichte bei 600nm
PX	postnataler Tag X
PABP	Poly(A)-Bindeprotein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBS-T	<i>phosphate buffered saline</i> mit Tween

PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDZ	<i>PSD-95/Discs-large/ZO-1</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff-Protonen-Konzentration
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PSD	Postsynaptische Dichte
PSD-95	PSD Protein von 95 kDa
Rb	<i>rabbit</i>
Rev	<i>reverse</i>
RGG	Arginin Glycin Glycin <i>repeats</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
Rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	reverse Transkription
RT-qPCR	reverse Transkription quantitative Real-Time PCR
sec	Sekunde
SAP	<i>synapse-associated protein</i>
SAPAP	<i>synapse-associated protein 90/postsynaptic density-95-associated protein</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Shank	<i>SH3 domain and ankyrin repeat containing protein</i>
S6K1	Ribosomal Protein S6 Kinase
SOD	Superoxid Dismutase
T _m	Schmelztemperatur
u.a.	unter anderem
U	<i>unit</i>
UTR	untranslatierte Region
v.a.	vor allem
v/v	Volumen pro Volumen
WB	Western Blot
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
z.B./z.T.	zum Beispiel/zum Teil

1 Einleitung

1.1 Das Fragile X Syndrom

Das Fragile X Syndrom (FRAX) ist eine der häufigsten Ursachen für genetisch bedingte mentale Retardierung, das mit einer Frequenz von 1:4000 bei Männern und 1:6000 bei Frauen auftritt (Kooy et al., 1998; Turner et al., 1996). Die Intelligenzminderung ist, besonders bei Frauen in Folge der zufälligen X-Inaktivierung in den einzelnen Zellen, sehr variabel ausgeprägt (Keysor and Mazzocco, 2002; Riddle et al., 1998). Weitere phänotypische Krankheitsmerkmale sind Sprach- und Sprechstörungen besonders während der Entwicklung, Aufmerksamkeitsdefizite, Hyperaktivität, frühkindlicher Autismus und nicht obligate somatische Merkmale wie faziale Dysmorphien (Abbildung 1.1A), Bindegewebdysplasien sowie Makroorchidie bei Männern (de Vries et al., 1998). Auf zellulärer Ebene wurden bei Gehirnautopsien morphologisch veränderte dendritische Dornen (siehe auch 1.3) an pyramidalen Neuronen entdeckt (vgl. Abbildung 1.2, Hinton et al., 1991).

Zytogenetisch ist die Erkrankung mit einem aberrant kondensierten X-Chromosom assoziiert, welches einen fragil erscheinenden Bereich am distalen Ende des langen Chromosomarms aufweist (Abbildung 1.1B, Sutherland, 1977). Verkerk et al. (1991) identifizierten an der scheinbar brüchigen Stelle Xq27.3 das Gen *Fmr1* (*fragile X linked mental retardation type 1*). Das 38 kb große Gen besteht aus 17 Exons und kodiert für ein 4,4 kb großes Transkript (Eichler et al., 1993). In Exon 1, vor dem Startkodon, befindet sich eine variabel repetitive Sequenz aus bis zu 50 CGG-Trinukleotiden (Abbildung 1.1C). Bei 95% der Patienten mit FRAX ist dieser repetitive Bereich auf über 200 CGG-Triplets verlängert (Kremer et al., 1991). Diese Expansion geht mit einer Methylierung der Cytosinreste in den Triplets sowie der flankierenden DNA-Abschnitte einher. Da diese Methylierung ebenfalls den Promotor des Gens umfasst, können keine Transkriptionsfaktoren binden und das Gen wird nicht mehr transkribiert (Schwemmle et al., 1997; Sutcliffe et al., 1992). In den Patienten lassen sich aufgrund dieser *loss of function* (Funktionsverlust) Mutation die Transkripte des Gens *Fmr1* nicht nachweisen (Schwemmle et al., 1997). Zudem kommt es zu einer Histondeacetylierung und einem Chromatinumbau, was diesen Bereich im Metaphase-Chromosom folglich fragil erscheinen lässt (Coffee et al., 1999).

In Familien mit FRAX treten zwei Arten von mutierten Allelen auf. Zum einen das beschriebene mutierte Allel welches zum Krankheitsbild führt, zum anderen besitzen unauffällige männliche Individuen und weibliche Überträgerinnen meist eine Vorstufe des mutierten Allels, das prämutierte Allel, in der der repetitive Bereich aus 50 bis 200 CGG-Trinukleotiden besteht. Einem mutierten Allel geht immer ein prämutiertes Allel in der

vorherigen Generation voraus. Während eine normale Länge der repetitiven Sequenz von bis zu 50 Trinukleotid-Wiederholungen meist stabil vererbt wird, ist ein prämutiertes Allel häufig instabil. Die repetitive Region in einem prämutierten Allel expandiert von Generation zu Generation und die Anzahl betroffener Nachkommen wird dabei mit jeder Generation größer, dieses Phänomen wird als Antizipation bezeichnet (Fu et al., 1991; Sherman et al., 1985; Sherman et al., 1984; Snow et al., 1993).

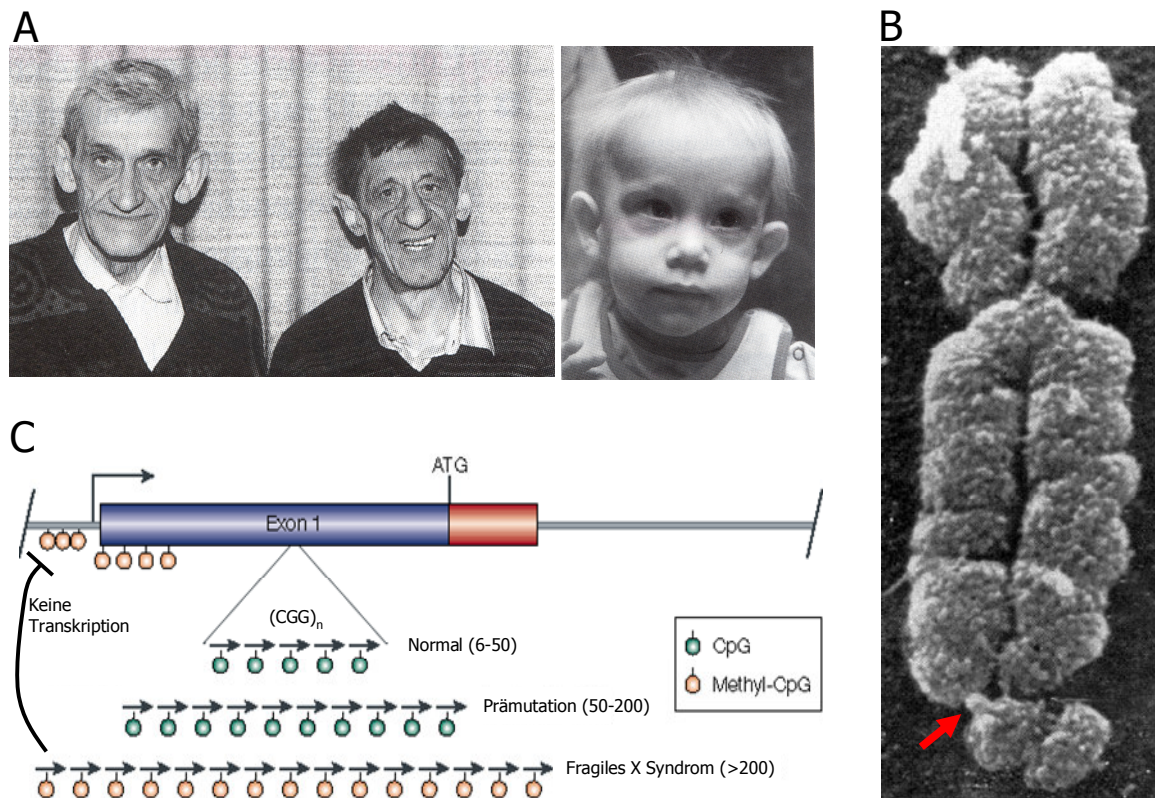


Abbildung 1.1: Das Fragile X Syndrom - Phänotyp und molekularbiologische Ursache

(A) Zwei ältere männliche Patienten und ein weibliches Kleinkind zeigen typische faciale Auffälligkeiten, die mit dem Fragilen X Syndrom einhergehen (Buselmaier and Tariverdian, 2007). (B) Metaphase X-Chromosom eines FRAX Patienten im Elektronenmikroskop. Der rote Pfeil deutet auf die fragil wirkende Stelle an Position Xq27.3 (modifiziert nach Harrison et al., 1983). (C) Molekulargenetische Ursache des Fragilen X Syndroms (modifiziert nach Robertson and Wolffe, 2000) ist die Verlängerung einer repetitiven Sequenz aus CGG-Trinukleotiden auf über 200 Triplets in Exon1 von *Fmr1*.

Das Konsortium um Ben Oostra und Patrick Willems stellte 1994 eine FMRP-defiziente Mauslinie als Modellsystem zur Untersuchung des FRAX vor. Der Funktionsverlust des Proteins beruhte dabei nicht wie beim Menschen auf einer Stilllegung der Genexpression. Für die Herstellung der FMRP-defizienten Maus wurde das Gen für die Neomycin Phosphotransferase mit rekombinanten Promotoren und einem Polyadenylierungssignal (Soriano et al., 1991) in gegenläufiger Orientierung in das Exon 5 von *Fmr1* inseriert. Dadurch wird eine veränderte RNA transkribiert, die in den Mäusen in ein aberrantes Protein translatiert wird (The Dutch-Belgian Fragile X Consortium, 1994).

Phänotypisch weisen FMRP-defiziente Mäuse, wie FRAX Patienten, Makroorchidie und Hyperaktivität auf. In verschiedenen Verhaltenstests zum Lernen und Gedächtnis schnitten FMRP-defiziente Mäuse schlechter ab als Wildtyp Artgenossen, was eine weitere Ähnlichkeit zum FRAX darstellt (Fisch et al., 1999; Mineur et al., 2002; The Dutch-Belgian Fragile X Consortium, 1994). Des Weiteren wurde in den Mäusen die gleiche erhöhte Dichte und die eher filopodien- statt pilzförmige Morphologie der dendritischen Dornen beobachtet (Abbildung 1.2, Comery et al., 1997; Galvez and Greenough, 2005; Irwin et al., 2000; McKinney et al., 2005). Aufgrund der phänotypischen Ähnlichkeiten ist das Mausmodell mittlerweile ein etabliertes und anerkanntes Modell um die Funktion des Proteins FMRP und die molekularbiologischen Aspekte der Krankheit aufzuklären.

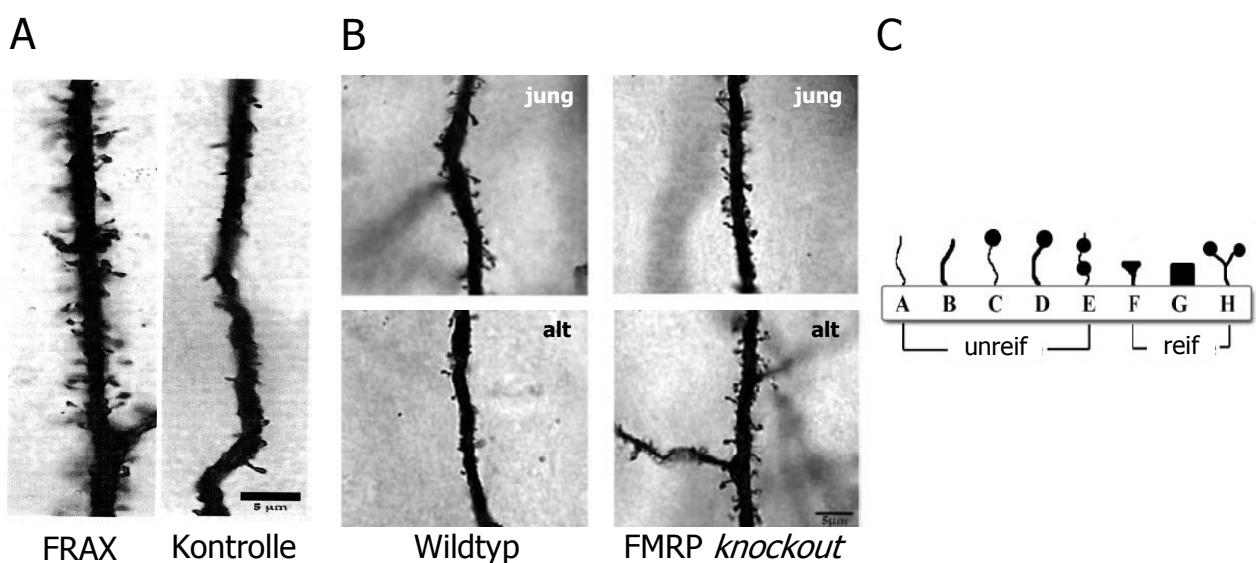


Abbildung 1.2: Veränderungen in Morphologie und Frequenz dendritischer Dornen von FRAX Patienten und FMRP-defizienten Mäusen

(A) Golgi-Färbung humaner Dendriten von Pyramidenzellen des Cortex eines FRAX Patienten und eines gesunden Individuums (Irwin et al., 2000). Die Dichte der dendritischen Dornen ist am Dendriten des FRAX Patienten gegenüber dem gesunden Menschen deutlich erhöht. Die Morphologie der Dornen erscheint eher filopodienförmig (vgl.C). (B) Golgi-Färbung muriner Dendriten von Wildtyp und FMRP-defizienten Tieren (modifiziert nach Galvez and Greenough, 2005). Wie beim Menschen ist auch im Tiermodell die Dichte dendritischer Dornen in den FMRP-defizienten Tieren gegenüber den Wildtyp Tieren erhöht. (C) Die Morphologie dendritischer Dornen wird je nach Aussehen als unreif oder reif klassifiziert (modifiziert nach Galvez and Greenough, 2005).

1.2 Das Fragile X Mental Retardation Protein

Das Gen *Fmr1* kodiert das *Fragile X Mental Retardation Protein* (FMRP). Während der murinen Embryonalentwicklung ist FMRP ubiquitär nachzuweisen (Hinds et al., 1993). Im erwachsenen Organismus wird das Protein sowohl beim Menschen als auch bei Mäusen hauptsächlich in Gehirn und Hoden (Devys et al., 1993; Hinds et al., 1993) sowie in proliferierenden Zellen gebildet (Khandjian et al., 1995). Im Gehirn ist FMRP am stärksten im Hippocampus, dem cerebralen Cortex und dem Cerebellum nachzuweisen (Abitbol et al., 1993; Hinds et al., 1993), wobei man das Protein hauptsächlich in Neuronen und kaum in

Gliazellen findet (Devys et al., 1993). Die FMRP-Konzentration im Gehirn ist prä- und neonatal am höchsten und nimmt bei Mäusen ab dem 10. Tag nach der Geburt kontinuierlich bis zu einem Basisniveau ab (Hinds et al., 1993; Khandjian et al., 1995; Lu et al., 2004; Singh et al., 2007). In Neuronen ist das Protein hauptsächlich zytoplasmatisch zu detektieren (Devys et al., 1993; Tamanini et al., 1997), konnte aber auch in Dendriten (Castren et al., 2001) und im Nukleus (Willemsen et al., 1996) nachgewiesen werden.

FMRP besteht aus 631 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 78 kDa. Es sind allerdings zahlreiche kleinere Isoformen bekannt (Verheij et al., 1995). Die Homologie der Aminosäureabfolge zwischen Mensch und Maus beträgt 97% (Deelen et al., 1994). Das Protein besitzt ein NLS (*Nuclear localisation signal*) für die Rekrutierung in den Kern und ein NES (*Nuclear export signal*) für den Export aus dem Kern (Eberhart et al., 1996). FMRP ist ein RNA-bindendes Protein (Ashley et al., 1993; Siomi et al., 1993b). Es besitzt zwei hnRNP K homologe Domänen (KH-Motive) und eine Arginin und Glycin reiche Region (RGG-Box), welche die Bindung von mRNA-Molekülen ermöglichen (Burd and Dreyfuss, 1994; Gibson et al., 1993; Kiledjian and Dreyfuss, 1992; Siomi et al., 1993a). FMRP blockiert die Translation gebundener mRNAs (Brown et al., 2001; Khandjian et al., 2004; Lagerbauer et al., 2001; Li et al., 2001). Das Protein ist allerdings auch in der Lage die Translation bestimmter mRNAs zu fördern (Bechara et al., 2009). FMRP bindet ca. 4% aller Transkripte im Gehirn (Brown et al., 2001). Unter anderem kann das Protein auch mit der eigenen mRNA assoziieren und darüber die Translation der *Fmr1* Transkripte beeinflussen (Schaeffer et al., 2001). Die von FMRP gebundenen RNA-Moleküle besitzen oft G-Quartett-Strukturen (Abbildung 1.3). In einigen Fällen z.B. bei der PSD-95 mRNA befinden sich in der Nähe dieser Struktur auch Uracil-reiche Regionen, die ebenso die Bindung fördern (Denman, 2003; Dolzhanskaya et al., 2003; Zalfa et al., 2007). Die Bindung einer RNA kann ebenso über einen so genannten Kissing-Komplex stattfinden (Darnell et al., 2005a). Und erst kürzlich wurde ein viertes Motiv identifiziert, welches die Bindung zwischen FMRP und der SOD (Superoxid Dismutase) mRNA vermittelt (Bechara et al., 2009).

Neben den gebundenen mRNAs ist FMRP mit den homologen Proteinen FXR1P und FXR2P sowie weiteren Proteinen wie z.B. Pura α und mStaufen assoziiert, die die Funktion von FMRP modulieren können (Bardoni et al., 1999; Denman, 2003; Ohashi et al., 2002; Schenck et al., 2001). Durch Assoziation mit Proteinen und mRNAs entstehen mRNP (*messenger ribonucleoprotein*)-Komplexe. Auch FMRP bildet in der Zelle mRNP-Komplexe die mit aktiv translatierenden Polyribosomen oder der ribosomalen 60S Untereinheit assoziiert sind (Brown et al., 2001; Corbin et al., 1997; Feng et al., 1997; Khandjian et al., 2004; Siomi et al., 1996; Stefani et al., 2004; Willemsen et al., 1996).

Die RNA-bindende Eigenschaft der KH-Motive ist für die Funktion des Proteins essentiell. In einzelnen Fällen wurde bei Patienten statt der Trinukleotidexpansion eine Punktmutation beschrieben, die zu einem Aminosäureaustausch von Isoleucin zu Asparagin an Position 304 (I304N) in der KH2-Domäne des Proteins führt (Abbildung 1.3) und die ebenfalls zum FRAX mit gleichem bzw. stärker ausgeprägtem Phänotyp führt (De Boule et al., 1993). Durch die Mutation wird die Sekundärstruktur des KH-Motivs verändert (Musco et al., 1996) woraufhin die Domäne eine verringerte RNA-Bindungskapazität aufweist (Verheij et al., 1995). Außerdem assoziiert das mutierte Protein nicht mehr mit Polyribosomen (Feng et al., 1997).

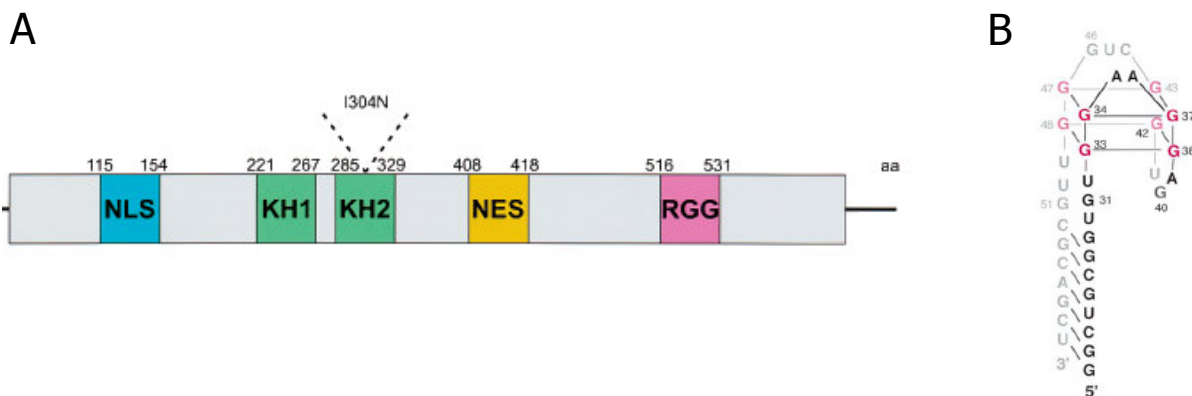


Abbildung 1.3: Aufbau von FMRP und der G-Quartett-Struktur von FMRP-assoziierten RNA-Molekülen

(A) Schematische Darstellung von FMRP mit den RNA-bindenden Motiven KH1, KH2 (hnRNP K Homolog 1 und 2) und RGG-Box (Arginin und Glycin reiche Region) sowie den für den Kerntransport benötigten Motiven NLS (Kernlokalisierungssignal) und NES (Kernexportsignal, modifiziert nach Oostra and Chiurazzi, 2001). Im KH2-Motiv kann sich der Aminosäureaustausch befinden, der auch zum Fragilen X Syndrom führt. Die Zahlen geben jeweils die Position des Motivs in der Aminosäuresequenz an.

(B) G-Quartett-Sekundärstruktur der sc1 RNA. Dieser Abschnitt kann die Bindung an FMRP vermitteln (Darnell et al., 2001).

Die meisten neuronalen mRNAs befinden sich nur im Soma. Einige sind jedoch auch in Dendriten vorhanden. Bis heute konnten einige dendritisch lokalisierte Transkripte postsynaptischer Proteine wie z.B. die Shank1, SAPAP3, GluR1 und PSD-95 mRNA identifiziert werden (Falley et al., 2009; Ju et al., 2004; Kindler et al., 2004; Steward and Schuman, 2003; Zalfa et al., 2007). Die dendritisch lokalisierten mRNAs können vor Ort an der Synapse nach Aktivierung entsprechender Rezeptoren (aktivitätsabhängig) translatiert werden und gewährleisten vermutlich eine schnelle individuelle Reaktion einzelner Synapsen auf spezifische Aktivität (Input-Spezifität). Diese lokale und individuell gesteuerte Proteinsynthese ist essentiell für synaptische Plastizität und langfristige Lernvorgänge (Sutton and Schuman, 2006). Synaptische Plastizität ist die von der Aktivität abhängige Änderung der Effizienz des synaptischen Signals. Diese Effizienzmodulation kommt sowohl durch Änderungen der Morphologie als auch der Physiologie der Synapse zustande und gilt als ein möglicher neurophysiologischer Mechanismus für Lernprozesse und

Gedächtnisfunktionen. Eine Form der synaptischen Plastizität, die mit FMRP in Verbindung gebracht werden kann, ist die *long-term depression* (LTD) die durch eine Aktivierung metabotroper Glutamatrezeptoren (mGluR) induziert wird (Ronesi and Huber, 2008) und eine lokale Proteinsynthese an Synapsen benötigt. Es konnte gezeigt werden, dass FMRP nach Aktivierung von mGluR an den Synapsen verstärkt synthetisiert (Weiler et al., 1997) und für die Rezeptor-abhängige Translation anderer Transkripte z.B. PSD-95 mRNA benötigt wird (Park et al., 2008; Todd et al., 2003). Im Hippocampus FMRP-defizienter Mäuse wurde eine erhöhte mGluR-abhängige LTD gemessen. Vermutlich ist FMRP normalerweise an der Signalkaskade nach mGluR-Aktivierung beteiligt. Da FMRP hauptsächlich inhibierend auf die lokale Translation wirkt, kommt es bei FMRP-defizienten Mäusen zu einer unkontrollierten Proteinsynthese, was die erhöhte LTD bedingt (mGluR Theorie des FRAX, Bear et al., 2004). Die Gabe von mGluR-Antagonisten kann die exzessive Translation auf ein normales Niveau korrigieren (Dolen et al., 2007), weshalb aktuelle klinische Studien mit STX107 und Fenobam (beides mGluR-Antagonisten) Hoffnung auf Linderung des Syndroms machen.

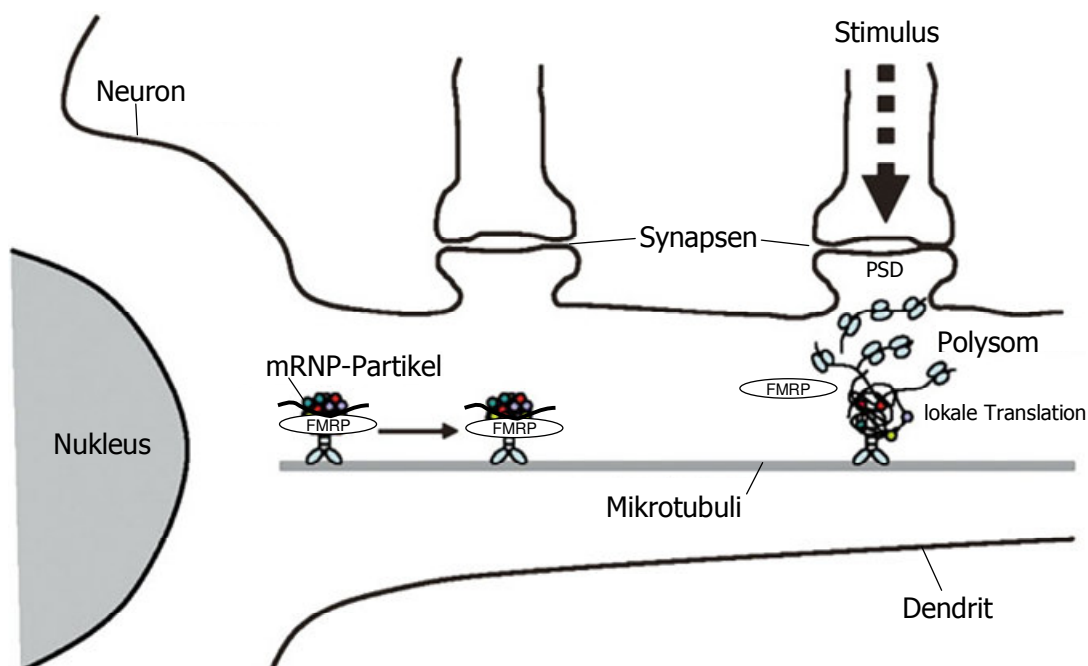


Abbildung 1.4: FMRP reguliert die lokale Translation an der Synapse

FMRP wird entlang der Mikrotubuli in mRNP-Partikeln in Dendriten transportiert und reguliert an Synapsen aktivitätsabhängig die lokale Translation dendritischer Transkripte (modifiziert nach Miki et al., 2005).

1.3 Die Postsynaptische Dichte

Neurone kommunizieren miteinander über hochspezialisierte Kontaktstellen, die Synapsen.

Im Säugerhirn ist die Mehrzahl der Synapsen exzitatorisch und nutzt den Neurotransmitter Glutamat als Botenstoff. Exzitatorische Synapsen bestehen aus einem Axonende, dem präsynaptischen Bouton und einer pilzförmigen Ausstülpung des Dendriten, dem postsynaptischen dendritischen Dornen (Abbildung 1.2). Dendritische Dornen können ihre Form verändern und somit die Signalleitungseffizienz einer Synapse modulieren. Derartige Veränderungen scheinen eine wesentliche Grundlage für Lern- und Gedächtnisprozesse darzustellen (Holtmaat et al., 2006; Trachtenberg et al., 2002).

Am Ende der dendritischen Dornen, direkt unterhalb des synaptischen Spaltes, befindet sich die postsynaptische Dichte (PSD, Palay and Palade, 1955), ein 30-40 µm dickes Protein-Netzwerk (Ziff, 1997), aus membranständigen Rezeptoren, Kanälen, Zytoskelett-Proteinen, Zelladhäsionsproteine, Gerüstproteinen, G-Proteinen und deren Modulatoren sowie Signalkaskadenproteine inklusive Kinasen und Phosphatasen (Boeckers, 2006; Kim and Sheng, 2004). Die PSD verbindet den synaptischen Spalt mit dem Aktinzytoskelett, welches die Morphologie dendritischer Dornen bestimmt. Die Aktivierung einer Synapse kann zudem einen Umbau der PSD sowie eine damit verbundene Modulation der Signalleitung zur Folge haben (Ehlers, 2003; Steward and Schuman, 2003).

Rezeptoren durchspannen die postsynaptische Membran am äußersten Ende der PSD (Abbildung 1.5). Direkt am synaptischen Spalt befinden sich Glutamatrezeptoren des NMDA- und AMPA-Typen, während die mGluR einen perisynaptischen Ring bilden (Baude et al., 1993; Nusser et al., 1994). NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptoren (NMDAR) sind nichtselektive Kationenkanäle, die als Heterotetramere aus zwei NR1- und zwei NR2-Untereinheiten aufgebaut sind. Ihre Aktivierung erfolgt spannungs- und Liganden-abhängig. Nach ihrer Aktivierung lassen die Rezeptoren Natrium- und kleine Mengen Calcium-Ionen in die Zelle und Kalium-Ionen hinaus. Eine wiederholte Stimulierung induziert die Rekrutierung weiterer AMPA (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure)-Rezeptoren in die Membran, was schließlich zur *Long-term potentiation* (LTP) führt, während eine schwache, lange Aktivierung von NMDA-Rezeptoren zu weniger AMPA-Rezeptoren und folglich *Long-term depression* (LTD) führt. Diese beiden Mechanismen stärken oder schwächen die Synapse und tragen somit zur synaptischen Plastizität bei. AMPA-Rezeptoren (AMPA) gehören wie die NMDAR zu den ionotropen Rezeptoren. Über 80% der tetrameren Rezeptoren setzen sich aus zwei GluR1- und zwei GluR2-Untereinheiten zusammen. Außerdem kommen die Untereinheiten GluR3 und GluR4 vor. Die Permeabilität für bestimmte Ionen wird von der Zusammensetzung des Rezeptors bestimmt. Kanäle mit GluR2-

Untereinheiten sind für Calcium-Ionen nicht durchlässig. Alle Rezeptoren sind jedoch für Natrium- und Kalium-Ionen permeabel. Bisher sind acht metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluR 1-8) bekannt. Sie werden je nach nachfolgendem Signalweg in drei Gruppen eingeteilt. Die Rezeptoren mGluR1 und mGluR5 gehören zur ersten Gruppe (G_q gekoppelte Rezeptoren) und aktivieren die Phospholipase C. Durch die folgende Anreicherung von Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) werden die Proteinkinase C und der Calcium/Calmodulin-abhängige-Proteinkinase Signalweg aktiviert. Nachfolgend können die Proteinphosphatase 2A (PP2A) und die Ribosomal Protein S6 Kinase (S6K1) beeinflusst werden. Diese beiden Enzyme wurden als dephosphorylierende bzw. phosphorylierende Enzyme von FMRP identifiziert (Narayanan et al., 2007; Narayanan et al., 2008). Die mGluR interagieren mit Homer-Dimeren, welche die Verbindung zu Proteinen der Shank-Familie herstellen (Tu et al., 1999).

Neben den membranständigen Rezeptoren gibt es eine Reihe von Gerüstproteinen in der PSD, die die Kanäle in der Membran verankern und die Verbindung zum Zellinnern herstellen. PSD-95 ist das häufigste Gerüstprotein der PSD, das am besten untersuchte PSD-Protein und gehört zur SAP/ MAGUK (Membran-assoziierte Guanylat-Kinasen)-Proteinfamilie. Über seine aminoterminal PDZ (*PSD-95/Discs-large/ZO-1*)-Domäne interagiert es mit den NMDA-Rezeptoruntereinheiten NR2A und NR2B. Die carboxyterminale GK (Guanylat-Kinase)-Domäne vermittelt die Bindung mit den SAPAPs. Über das Protein Stargazin ist PSD-95 auch mit den AMPA-Rezeptoren verbunden (Chetkovich et al., 2002; Husi and Grant, 2001; Welch et al., 2004). SAP97 interagiert mit der AMPA-Rezeptoruntereinheit GluR1 und hilft, den Rezeptor in der Membran zu verankern (Valtschanoff et al., 2000). SAP102 interagiert mit der NMDA-Rezeptoruntereinheit NR2B (Muller et al., 1996). Chapsyn, auch PSD93 genannt, interagiert sowohl mit dem NMDA-Rezeptor als auch mit PSD-95 (Kim et al., 1996). Die Familie der SAP-assoziierten Proteine (SAPAPs) besitzt vier Mitglieder, SAPAP1-4. Die SAPAPs interagieren mit den MAGUKs und mit Proteinen der Shank-Familie (Takeuchi et al., 1997; Yao et al., 2003) und stellen damit eine Verbindung zwischen diesen beiden Proteinfamilien her. Die Familie der Shank-Proteine besteht aus Shank1, Shank2 und Shank3. Die Proteine können untereinander multimere Plattformen bilden, die durch Zink-Ionen stabilisiert werden und wichtig für die Formgebung des dendritischen Dornen sind (Gundelfinger et al., 2006). Shank-Proteine interagieren mit SAPAPs (Naisbitt et al., 1999) und mit IRSp53 (Soltau et al., 2004). IRSp53 (*Insulin receptor substrate of 53 kDa*) ist ein Aktinzytosklett beeinflussendes Protein. In dem es eine Rolle bei der F-Aktin Bündelung spielt, kann es Einfluss auf die Morphologie des dendritischen Dornen nehmen. Bei Neuronen in Zellkultur fördert eine Überexpression von IRSp53 die Entstehung filopodienförmiger dendritischer Dornen (Berhörster, Dissertation 2006). Außerdem verbindet das Protein die

Shank-Multimere mit PSD-95 (Soltau et al., 2004). Bei IRSp53-defizienten Mäusen sind synaptische Transmission und das Gedächtnis beeinträchtigt (Kim et al., 2009; Sawallisch et al., 2009).

Die hier vorgestellten Gerüstproteine interagieren miteinander und bilden ein dynamisches Netzwerk, welches in Abhängigkeit seiner Komposition Einfluss auf die Struktur, Stabilität, Dynamik und Funktion der Synapse hat (Ehlers, 2002; Romorini et al., 2004; Roussignol et al., 2005).

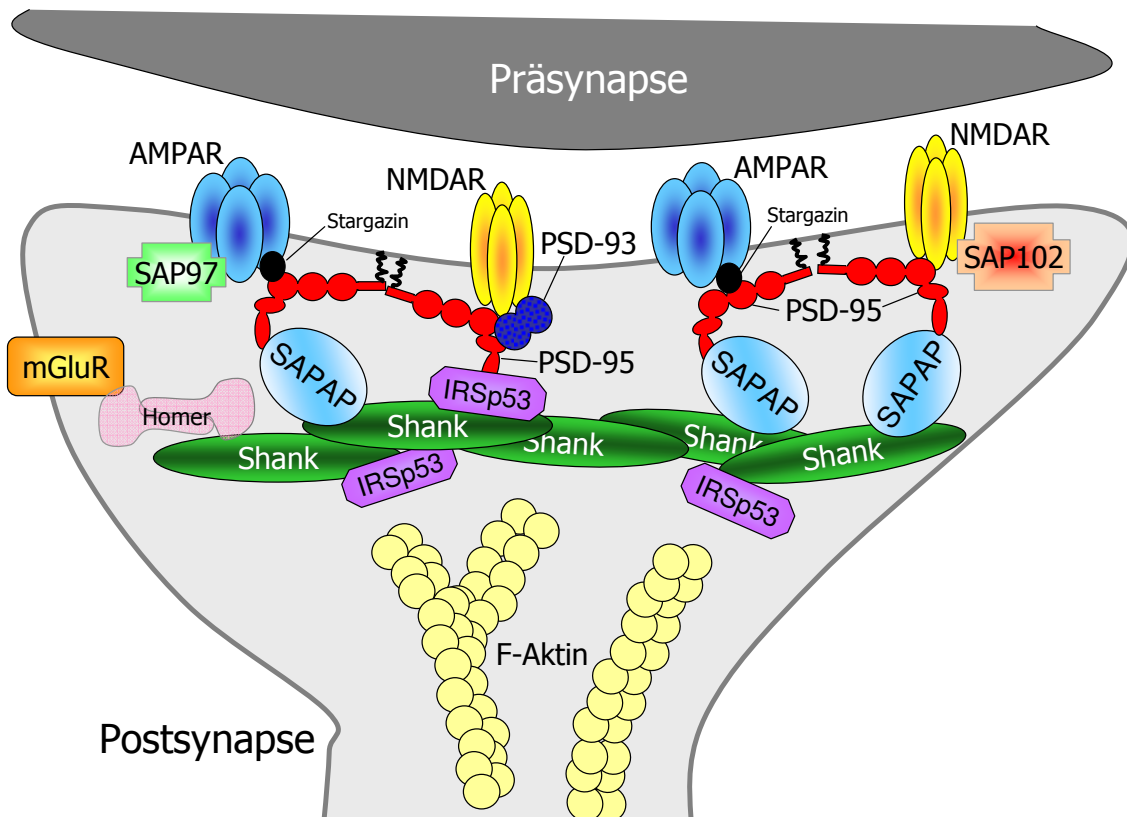


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung wichtiger Gerüst- und Rezeptorproteine der postsynaptischen Dichte exzitatorischer Synapsen

Die Rezeptoren NMDAR, AMPAR und mGluR durchspannen die Membran der Postsynapse. Sie werden durch Stargazin, Homer und Proteine der SAP-Familie verankert. Die SAPAPs interagieren mit PSD-95 und IRSp53 und stellt somit die Verbindung zwischen Rezeptoren und Shank-Netzwerk her (modifiziert nach Sheng and Hoogenraad, 2007). Für weitere Details siehe Text.

1.4 Ziel der Arbeit

Um die molekularen Veränderungen die zum FRAX beitragen besser verstehen zu können, war es ein wesentliches Ziel dieser Arbeit, Proteine der postsynaptischen Dichte im Mausmodell zu identifizieren, die durch den Verlust von FMRP in ihrer Konzentration verändert sind. FMRP scheint eine wichtige Rolle bei der Translationsregulation von mRNAs an der Synapse zu haben, so könnte die bei FRAX Patienten und FMRP-defizienten Mäusen gleichermaßen beobachtete aberrante Struktur dendritischer Dornen auf eine veränderte molekulare Zusammensetzung der PSD zurückzuführen sein. Weiter war es interessant zu untersuchen, ob solche Veränderungen abhängig von Gehirnregion und Alter auftreten und ob sie mit Änderungen der entsprechenden mRNA-Konzentration korrelieren.

Die Identifizierung weiterer Ziel-mRNAs sowie eine Charakterisierung der molekularen Grundlagen einer aktivitätsabhängigen Translationsregulation durch FMRP waren weitere zu untersuchende Aspekte, um den Einfluss des Proteins auf bestimmte Proteine der postsynaptischen Dichte zu charakterisieren, die möglicherweise zum Krankheitsbild des FRAX beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

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

2.1.2 Bakterienstämme, Zell- und Tierlinien

Für diese Arbeiten wurden *Escherichia coli* Bakterien des Stammes TOP10F' (Invitrogen) BL21-*CodonPlus* (Stratagene, La Jolla, USA) genutzt. Des Weiteren standen immortalisierte Mausembryo Fibroblasten (MEFs) von B6.129P2-*Fmr1^{tm1Cgr}/J* Tieren (*Fmr1^{-/-}* MEFs) und Fibroblasten aus *Fmr1^{-/-}* MEFs, in denen mittels stabiler Transfektion *Fmr1* (Isoform 1) fusioniert an ein FLAG-Epitop ins Genom inseriert wurde (WT MEFs), zur Verfügung (Castets et al., 2005). Es wurden zwei Mauslinien (*Mus musculus* L.) des Stammes C57bl/6J (Wildtyp/ WT Linie) und B6.129P2-*Fmr1^{tm1Cgr}/J* (*Fmr1^{-/-}*; Jackson Laboratories, Bar Harbor, USA) genutzt. Die Rattenneurone stammten aus *Rattus Norvegicus* (Stamm: Wistar, Versuchstierhaltung UKE, Hamburg).

2.1.3 DNA-Vektoren und Sonden

Tabelle 2.1: Ausgangsvektoren und in dieser Arbeit hergestellte Vektoren und Sonden

Bezeichnung	Verwendung und Eigenschaften	Quelle
Ausgangsvektoren		
pGEX-6P-1	Prokaryotische Expression Glutathion-S-Transferase Ampicillin	Amersham Pharmacia
pFiRe	Eukaryotische Expression Aus pBicFire (Jan Christiansen) generiert, Photinus und Renilla jeweils mit CMV-Promotor Ampicillin	Stefan Kindler und Claudia Schob
Für diese Arbeit generierte Vektoren		
pGEX-FMRP 1B	Nukleotide 1-1338 der kodierenden Region von <i>Fmr1</i> aus <i>Rattus norvegicus</i>	pGEX-6P-1 Fmr1 NM_052804
pFiRe-Shank1 3'UTR (1-588)	Photinus-Luciferase cDNA + Shank1 3'UTR (Nukleotide 1-588) aus <i>Rattus norvegicus</i>	pFiRe Shank1 NM_031751
pFiRe-Shank1 3'UTR (1-200)	Photinus-Luciferase cDNA + Shank1 3'UTR (Nukleotide 1-200) aus <i>Rattus norvegicus</i>	pFiRe Shank1 NM_031751
pFiRe-Shank1 3'UTR (200-400)	Photinus-Luciferase cDNA + Shank1 3'UTR (Nukleotide 200-400) aus <i>Rattus norvegicus</i>	pFiRe Shank1 NM_031751

pFiRe-Shank1 3'UTR (400-600)	Photinus-Luciferase cDNA + Shank1 3'UTR (Nukleotide 400-600) aus <i>Rattus norvegicus</i>	pFiRe Shank1 NM_031751
pFiRe-SAPAP3 3'UTR (=pFiRe-S3 3'UTR)	Photinus-Luciferase cDNA + komplette 3'UTR von SAPAP3 aus <i>Rattus norvegicus</i>	pFiRe SAPAP3 NM_173138
pFiRe-SAPAP3 5'UTR (=pFiRe-S3 5'UTR)	Photinus-Luciferase cDNA + komplette 5'UTR von SAPAP3 aus <i>Rattus norvegicus</i>	pFiRe SAPAP3 NM_173138
Sonden für Northern Blot Analysen		
Aktin	Kodierende Region (1136 Nukleotide), BamHI und XhoI geschnitten	pEGFP-Aktin von Clontech
PSD-95	Nukleotide 1-150 der kodierenden Region der alpha-Isoform (NM_007864)	aus Cortex cDNA (<i>Mus musculus</i>)
GluR1	797 Nukleotide (NM_008165) Primer 1.0 und 1.1	aus Cortex cDNA (<i>Mus musculus</i>)
NR1	720 Nukleotide (NM_008169) Primer 2.0 und 2.1 Exon1/2 bis Exon 6/7	aus Cortex cDNA (<i>Mus musculus</i>)

2.1.4 Oligonukleotide

Die benötigten Oligonukleotide für PCR (*Polymerase Chain Reaction*), RT-qPCR (reverse Transkriptase quantitative Real-Time PCR) und Sequenzierungen wurden bei der Firma Operon (Köln, Deutschland) bestellt, in tridestilliertem (für RT-qPCR Oligonukleotide zusätzlich RNase freiem) Wasser gelöst und auf 10 pmol/μl verdünnt. QuantiTect Primer Assays wurden von der Firma Qiagen bezogen und das Lyophilisat nach Herstellerangaben gelöst und verwendet.

Tabelle 2.2: Verwendete Oligonukleotide (*Mus musculus* spezifisch)

Name	Sequenz 5' > 3'	Referenz	Größe Produkt
PSD95-fw PSD95-rev	GGCACCGACTACCCACAG AACACCATTGACCGACAGGA	J. Schütt	260 bp
SAP97-fw SAP97-rev	AGTGACGAAGTCGGAGTGATT GTCAGGGATCTCCCCTTTATCT	J. Schütt	119 bp
SAPAP1-fw SAPAP1-rev	CGTAAGTGAAGTCTCCATCAAC CTCGCTCACCTGACTTATGG	J. Schütt	129 bp
SAPAP2-Fw SAPAP2-rev	GACAGACAGACTGCGGATCG GCAGACATCCTTGGGCTTTC	J. Schütt	149 bp
SAPAP3-fw SAPAP3-rev	ACTATTTGCAGGTGCCGCAAG GGGCTACCATCTGAGTCTCC	J. Schütt	141 bp
Shank1-fw Shank1-rev	AGCCTGCAGCAGTGCCAGCA ATGCGAGGCCGCCAGGCCCA	J. Schütt	134 bp
NR1-fw NR1-rev NR1-rev	AGCCAGGTCTACGCTATCC ACATCAGCACCTCTTGAA TAGGGTGGTACGGTGCGAAG	J. Schütt	720 bp 178 bp
NR2B-fw NR2B-rev	AGAGGTGGTTGACTTCTCTGTGCC TGAAGTATTCAAAGACAAAGACAGC	J. Schütt	181 bp
GluR1-fw GluR1-rev	ACCACTACATCCTCGCCAAC TCACTTGTCTCCACTGCTG	J. Schütt	144 bp
GluR1-fw GluR1-rev	TTGACTTACCGATTCTCTTCCC TCTGGATGTCGATCCCTTGGCC	J. Schütt	797 bp

IRSp53	QuantiTect Primer Assay Qiagen QT01061431	Qiagen	110 bp
BC1-fw BC1-rev	GTTGGGGATTTAGCTCAGTGG AGGTTGTGTGTGCCAGTTACC	Johnson et al.	152 bp
HPRT-fw HPRT-rev	GTTCTTTGCTGACCTGCTGGA TCCCCGTTGACTGATCATT	Kurth et al.	119 bp
GAPDH-fw GAPDH-rev	TGGCAAAGTGGAGATTGTTGCC AAGATGGTGATGGGCTTCCCG	QPPD	155 bp
Tubulin-fw Tubulin-rev	AAGGAGGATGCTGCCAATAA GCTGTGGAAAACCAAGAAGC	J. Schütt	135 bp
CamKII-fw CamKII-rev	ACCTGCACCCGATTCACAG TGGCAGCATACTCCTGACCA	Wang et Spandidos et al.	112 bp
FMR1s FMR2as Neo1as	GATCCATTCCCTTAATCCCAGCAC GGGATTAACAGATCGTAGACGCTC GCTTTACGGTATCGCCGCTCCC	S. Kindler	274 bp 590 bp

2.1.5 Antikörper

Tabelle 2.3: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Primär- und Sekundär-Antikörper

m = Maus, rb = rabbit (Kaninchen), WB = Western Blot, ICC = Immunzytochemie

Antikörper	Größe des detektierten Antigens im Western-Blot	Quelle	Verdünnung für WB
Primär-Antikörper:			
anti-FMRP, m monoklonal, clone 1C3-1a	75 kDa	Euromedex, Mundolsheim, Frankreich	Nach Herstellerangaben (n.H.)
anti-FMRP, rb polyklonal, H-120	75 kDa	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	n.H.
anti-β-Tubulin III, rb polyklonal	55 kDa	Sigma Aldrich, Munich, Deutschland	n.H.
anti-RGS4, rb polyklonal	34 kDa	abcam, Cambridge, UK	n.H.
anti-NR1, m monoklonal, MAB363	120 kDa	CHEMICON Europe, Hofheim, Deutschland	n.H.
anti-NR2A, rb polyklonal, AB1555P	163 kDa	CHEMICON	n.H.
anti-NR2B, rb polyklonal, AB1557P	166 kDa	CHEMICON	n.H.
anti-GluR1, rb polyklonal, AB1504	106 kDa	CHEMICON	n.H.
anti-GluR2/3, rb polyklonal, AB1506	105 kDa	CHEMICON	n.H.
anti-GluR4, rb polyklonal	106 kDa	Dianova, Hamburg, Deutschland	n.H.
anti-SAPAP1, affinitätsaufgereinigt rb polyklonal, #5280	90 kDa 150 kDa	Stefan Kindler	1:33
anti-SAPAP2, affinitätsaufgereinigt rb polyklonal, #5281	140 kDa 170 kDa	Stefan Kindler	1:83
anti-SAPAP3, affinitätsaufgereinigt rb polyklonal, #5269	Doppelbande 150 kDa	Stefan Kindler	1:1000
anti-SAP97, rb polyklonal	97 kDa 140 kDa	Valtschanoff et al. 2000	1:250
anti-SAP102, rb polyklonal	102 kDa	Müller et al. 1996	1:500

anti-SAP90/PSD-95, rb polyklonal	95 kDa	Kistner et al. 1993	1:1000
anti-Chapsyn-110, rb polyklonal	116 kDa	Kim et al. 1996	1:1000
anti-Shank1, rb polyklonal	240 kDa	Zitzer et al. 1999	1:2000
anti-Shank3, rb polyklonal	180 kDa	Redecker et al. 2006	1:3000
anti-IRSp53, rb polyklonal	53 kDa 58 kDa	Soltau et al. 2004	1:2000
anti-PABP, rb polyklonal	70 kDa	Brendel et al. 2004	1:2000
Immunglobulin G (IgG)	50 kDa 25 kDa	Sigma-Aldrich	
Sekundär-Antikörper:			
HRP-Anti-Maus-IgG		GE Healthcare	1:500 WB
HRP-Anti-Kaninchen-IgG		GE Healthcare	1:500 WB
Cy3-Anti-Kaninchen-IgG		Dianova	1:500 ICC

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäureelösungen erfolgte im Spektrophotometer (GeneQuant, Amersham Biosciences) in geeigneten Verdünnungen. Die Qualität von DNA und RNA wurde mittels Gelelektrophorese überprüft (2.2.5; 2.2.7).

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Alle Standard DNA-Amplifikationen und Genotypisierungen wurden mit der *Taq*-DNA-Polymerase (Qiagen) und dem dazugehörigen Reaktionspuffer im *GeneAmp PCR System 2400 oder 9600 Thermocycler* (PerkinElmer, Waltham, USA) durchgeführt. Die Volumina der Ansätze und die Reaktionsbedingungen variierten je nach Zweck der Vervielfältigung.

Tabelle 2.4: Ansatz und Bedingungen einer Standard-PCR

T_m = Schmelztemperatur der *Primer*

PCR-Ansatz		Schritt	Temperatur in °C	Zeit
DNA	Nach Bedarf	Initiale Denaturierung	94°C	5 min
10x Puffer	5 µl	Denaturierung	94°C	30 sec
Desoxynukleosid-triphosphate (dNTPs) je 10 mM	1 µl	<i>Primer</i> -Anlagerung	mind. 4°C unter T_m	30 sec
Primer 1 (10 mM)	1 µl	Verlängerung	72°C	pro 17 bp 1 sec
Primer 2 (10 mM)	1 µl	Terminale Verlängerung	72°C	7 min
Dimethylsulfoxid (DMSO)	1 µl	Lagerung	4°C	∞
<i>Taq</i> -Polymerase	0,5 µl	30-35 Zyklen		
H ₂ O	ad 50 µl			

Tabelle 2.5: Ansatz und Bedingungen einer Genotypisierungs-PCR

WT-PCR		FMRP ko-PCR		Schritt	Temperatur in °C	Zeit
genomische DNA	5 µl	genomische DNA	5 µl	Initiale Denaturierung	94°C	5 min
10x Puffer	3 µl	10x Puffer	3 µl	Denaturierung	94°C	30 sec
dNTPs je 10 mM	1 µl	dNTPs	1 µl	<i>Primer</i> -Anlagerung	60°C	30 sec
FMR1s 10 mM	1 µl	FMR1s	1 µl	Verlängerung	72°C	1 min
FMR2as 10 mM	1 µl	Neo1as	1 µl	Terminale Verlängerung	72°C	7 min
DMSO	1 µl	DMSO	1 µl	Lagerung	4°C	∞
<i>Taq</i> - Polymerase	0,5 µl	<i>Taq</i> - Polymerase	0,5 µl	35 Zyklen		
H ₂ O	ad 30 µl	H ₂ O	ad 30 µl			

Tabelle 2.6: Bedingungen für Sequenzierungs-PCR (Ansatz siehe 2.2.6)

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	96°C	5 min
Denaturierung	96°C	30 s
<i>Primer</i> -Anlagerung	55°C	15 s
Verlängerung	60°C	4 min
Terminale Verlängerung	72°C	4 min
Lagerung	4°C	∞

25 Zyklen

Tabelle 2.7: Ansatz und Bedingungen für RT-qPCR

PCR-Ansatz		Schritt	Temperatur	Zeit
RNA	1-100 ng	Reverse Transkription	50°C	30 min
SYBR Green MasterMix Qiagen	10µl	Initiale Denaturierung	95°C	15 min
RT-Mix	0,2µl	Denaturierung	95°C	15 sec
Fw-Primer 10 mM	1µl	<i>Primer</i> -Anlagerung	56°C-58°C	30 sec
Rev-Primer 10 mM	1µl	Verlängerung	72°C	30 sec
H ₂ O	ad 20µl	Schmelzkurvenbestimmung	72°C-95°C	5 sec pro °C

40 Zyklen

2.2.3 Präparation von genomischer DNA

Genomische DNA aus Schwanzbiopsien wurde mit dem *DNA Blood and Tissue Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Die Elution der DNA vom Säulenmaterial wurde statt mit 200 µl mit 100 µl AE-Buffer durchgeführt.

2.2.4 Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte mittels alkalischer Lyse (Sambrook et al., 1989). Im größeren Maßstab wurden Plasmide mittels Säulen endotoxinfrei gereinigt (*Endofree Plasmid MaxiKit*, Qiagen, Hilden, Deutschland oder *Nucleobond Xtra Maxi EF*, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland).

2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Analysen von DNA-Fragmenten oder PCR-Produkten wurden je nach Größe 1-2%ige Agarosegele für eine horizontale nicht-denaturierende Elektrophorese nach Sambrook et al. (1989) verwendet. Als Größenmarker wurde der GeneRuler™ 100 bp (Fermentas) verwendet. Die Dokumentation erfolgte unter UV-Licht. Einzelne DNA-Fragmente wurden mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgetrennt und mittels *PeqGOLD Gel Extraction Kit* (peqlab, Erlangen, Deutschland) aufgereinigt.

2.2.6 Klonierung von DNA-Fragmenten und DNA-Sequenzierung

Restriktion und Ligation von DNA

Plasmide oder PCR-Produkte wurden mit Endonuklease nach Herstellerangaben restringiert. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung des Enzyms, Zugabe von Ladepuffer für die Elektrophorese oder mittels Reinigung der DNA über eine Säule (*JETquick PCR Product Purification Spin Kit*, Genomed, Löhne, Deutschland) gestoppt.

Die Ligation eines DNA-Fragmentes mit einem linearisierten Vektor wurde mit T4 DNA Ligase (Invitrogen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurde das Fragment in einem drei- bis zehnfachen molaren Überschuss gegenüber dem Plasmid eingesetzt. Die Ligation wurde eine Stunde bei Raumtemperatur oder bei 16°C über Nacht inkubiert.

Herstellung und Transformation von kompetenten Bakterien

Kompetenten Bakterien (Stamm TOP10F', Invitrogen) wurden nach dem Protokoll von Walhout et al. (2000) generiert und transformiert.

DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der Didesoxy-Methode (Sanger et al., 1977). Mittels alkalischer Lyse isolierte Plasmide wurden vor Sequenzierung mittels *JETquick PCR*

Product Purification Spin Kit (Genomed) gereinigt. Plasmide aus Säulen-Präparationen wurden direkt verwendet. PCR-Produkte wurden nach Auftrennung im Agarosegel aus diesem aufgereinigt. Für einen Sequenzierungsansatz wurden 0,4-1 µg DNA mit 2 µl *Big Dye Mix* (*Abi Prism Big Dye Terminator Kit*, Applied Biosystems) und 1µl Primer vermischt. Der Ansatz wurde dann mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10µl aufgefüllt. Nach der Sequenzierungsreaktion (2.2.2) wurde der Ansatz mit Wasser auf 20µl aufgefüllt, mit 2µl 3M Natrium-Acetat und 55µl 100% Ethanol vermischt und bei 13.000rpm 30 Minuten zentrifugiert. Die pelletierte DNA wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und bis zur Sequenzierung bei -20°C gelagert.

2.2.7 Isolierung von RNA aus Gehirnlysaten, Synaptosomen oder Immunpräzipitaten

RNA wurde aus Gewebefractionen oder Immunpräzipitaten mit Hilfe von *TRIzol* (Invitrogen) oder dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Außer bei der RNA-Isolierung aus den Immunpräzipitaten wurde die Qualität der isolierten RNA nach jeder Isolierung qualitativ im Agarosegel (RNase-frei) überprüft. Nur undegradierete RNA (Abbildung 2.1) wurde weiterverwendet.

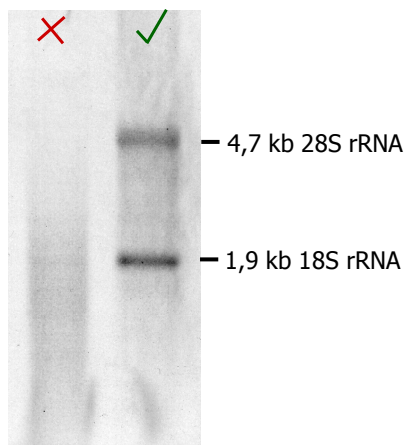


Abbildung 2.1: Elektrophoretische Auftrennung isolierter RNA im Agarosegel.

Nach RNA Isolierung wurden 1,5 µg RNA im Agarosegel aufgetrennt. Bei degradierter RNA (linke Spur) ist ein schwarzer Schleier zu erkennen. Bei intakter RNA kann man die beiden großen ribosomalen RNAs bei 1,9 und 4,7 kb erkennen (rechte Spur).

2.2.8 Northern Blot

Die Auftrennung von RNA und der Transfer im Northern Blot Verfahren wurden entsprechend der Formaldehyd-Methode nach Sambrook et al. (1989) und dem Qiagen[®] RNA/DNA Handbuch (Qiagen) durchgeführt. Die für die Detektion spezifischer Transkripte generierten DNA-Fragmente (2.1.4) wurden nach Herstellerangaben mit [³²P]-dCTP (Perkin Elmer) radioaktiv markiert (*Rediprime DNA Labeling System*; GE Healthcare, München, Deutschland) und aufgereinigt (MicroSpin[™] G-50; GE Healthcare). Die Membran (Hybond-XL, Amersham

Pharmacia) wurde mit ULTRAhyb™ (Ambion /Applied Biosystems, Austin, USA) bei 42°C prähybridisiert und hybridisiert. Die radioaktiven Signale wurden mit Röntgenfilmen (Kodak, Stuttgart, Deutschland) oder einem *BAS-1800II Phosphoimager* (Fuji Film) detektiert.

2.2.9 Quantitative Realtime-PCR

Für die relative Quantifizierung von mRNA-Konzentrationen in verschiedenen Geweben wurden jeweils WT und FMRP ko RNA als Duplikat-Ansätze in gleichen Mengen (zwischen 10-40 ng) bzw. für die Immunpräzipitation (IP) in gleichen Volumina in eine Reverse Transkription Quantitative Real-Time PCR (RT-qPCR) mit dem QuantiTect™ SYBR® Green RT-PCT Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben (siehe Tabelle 2.7) eingesetzt. Durchgeführt wurden die RT-qPCRs mit dem Rotor-Gene 3000 (Corbett).

Für jede der entstandenen Produktkurven wurde, separat für jeden Primerpaar, der Ct-Wert mittels Rotor-Gene 6 Software ermittelt (= *Cycle Threshold*; Zyklus des jeweiligen PCR-Ansatzes an dem sich die Fluoreszenzkurve im exponentiellen Bereich mit dem über die Hintergrundfluoreszenz gesetzte Schwellenwert schneidet). Die Ct-Werte wurden mittels REST2005 (Pfaffl et al., 2002) ausgewertet. Diese Software berechnet eine relative Konzentration zwischen *Fmr1*^{-/-} und WT für ein Transkript. Die Normalisierung erfolgt mit einem Haushaltsgen, dessen Transkription nicht verändert ist. In dieser Arbeit wurde zur Normalisierung die mRNA von HPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase) verwendet. Bei der angegebenen relativen Konzentration bedeutet der Wert 1, dass keine Mengenunterschiede des Transkriptes zwischen WT und *Fmr1*^{-/-} Gehirn bestehen. Eine relative Konzentration >1 bedeutet, dass die untersuchte mRNA im *Fmr1*^{-/-} Gehirn im Vergleich zum WT Gehirn angereichert war. Eine Konzentration <1 zeigte entsprechend eine geringere Menge an mRNA im *Fmr1*^{-/-} Gehirn.

Die für die Auswertung der relativen Expressionen mit REST2005 benötigten Effizienzen der einzelnen *Primer* wurden mittels RNA aus WT Cortexlysate ermittelt. Dazu wurden verschiedene RNA-Mengen (1 ng, 10 ng, 100 ng) in Triplikaten mit den einzelnen *Primern* mittels RT-qPCRs analysiert. Anhand der Ct-Werte der entstandenen Fluoreszenzkurven kann das Programm Rotor-Gene 6 die Effizienzen der *Primer* berechnen.

Für die Auswertung der Immunpräzipitate und Synaptosomen-Fraktionen wurden ebenfalls die Ct-Werte der Proben separat für den jeweiligen Primer ermittelt. Die Differenz der Ct-Werte zweier zu vergleichender Proben z.B. Präzipitation von FMRP aus WT und *Fmr1*^{-/-} Gehirnlisat oder Synaptosomen zu Homogenat wurde durch 0,333 dividiert um den relativen Ausgangsmengenunterschied zu ermitteln.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung und Transfektion von *Mouse Embryonic Fibroblasts* (MEFs)

Die Mausfibroblasten wurden in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Cambrex) mit 10% FBS (fötales bovines Serum; HyClone, Logan, USA), 150 µg/ml Hygromycin (PAA, Pasching, Österreich), 1 mM L-Glut (GlutaMAX™, Invitrogen) und Penicillin-Streptomycin (100 U/ml und 100 µg/ml; Gibco/Invitrogen) in 6-Loch-Schalen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen mit 1x PBS (phosphat buffered saline, Sambrook et al., 1989) gewaschen und mittels 1x Trypsin-Lösung (Sigma-Aldrich) in Versene Puffer (137 mM NaCl; 8,8 mM Na₂HPO₄; 2,7 mM KCl; 0,7 mM KH₂PO₄; 1mM EDTA; pH 7,4) von der Kulturschale abgelöst. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von DMEM gestoppt und die Zellen wurden verdünnt auf neue Schalen aufgeteilt.

Die Transfektion von ca. 80% konfluenten Mausfibroblasten wurde mit *Lipofectamine 2000* (Invitrogen) nach Herstellerangaben mit 4 µg DNA je Loch einer 6-Loch-Schale durchgeführt.

2.3.2 Kultivierung und Transfektion von Neuronen

Hippocampus- und Cortex-Neurone wurden an Embryonaltag 18 aus den Nachkommen tragender Mäusen bzw. Ratten präpariert. Zunächst wurden die Hippocampi aus den kortikalen Hemisphären isoliert. Diese wurden dann in 1x HBSS (*Hanks Balanced Salt Solution*, Gibco/Invitrogen) mit 100 U bzw. µg/ml Penicillin-Streptomycin gesammelt. Die Gehirnhäute wurden von den präparierten Cortex-Hälften entfernt. Alle weiteren Angaben gelten für 12 Gehirne.

Hippocampus: Die Hippocampi wurden in HBSS mit 2,5 mg Trypsin/ml für 15 Minuten bei 37°C leicht schwenkend inkubiert. Danach wurde dreimal je fünf Minuten mit insgesamt 50ml Ausplattier-Medium [MEM mit 10% Pferdeserum (PAA) und 0,6% Glucose (w/v)] gewaschen, wobei die Hippokampi jeweils abgesaugt und in ein neues Gefäß überführt wurden. Danach erfolgte die Titration in 3 ml Ausplattier-Medium mit einer normalen und anschließend einer verengten, feuerpolierten Gaspasteurpipette durch 12maliges Auf- und Abpipettieren. Nach dem Auffüllen auf 12 ml Ausplattiermedium wurde die Zellzahl der Neurone bestimmt (Neubauer-Zählkammer) und auf eine Dichte von 150.000 – 300.000 Zellen pro ml eingestellt und in 12-Loch-Schalen (1 ml pro Loch) ausplattiert. Dafür wurden Deckgläschen mit einem Durchmesser von 18 mm (Assistent, 2x in 100% Ethanol gewaschen, einmal in tridestillierten Wasser und vier Stunden bei 180°C gebacken) verwendet. Diese Deckgläschen wurden vor dem Ausplattieren mit Poly-L-Lysin [1 mg/ml in

Borat-Puffer (50 mM Borsäure, 20 mM Natriumtetraborat, pH 8,5)] beschichtet und dreimal mit tridestilliertem Wasser gewaschen.

Cortex: Die Cortex-Hälften wurden grob zerkleinert und 30 Minuten mit 2,5 mg Trypsin/ml in HBSS bei 37°C inkubiert. Danach wurde dreimal fünf Minuten mit je 50ml Ausplattiermedium gewaschen, das Gewebe dann in 12 ml Medium mit der 10 ml-Pipette grob zerkleinert und anschließend in 4 ml-*Aliquots*, wie oben beschrieben, titriert. Die Lösung wurde durch eine Nylongaze gefiltert (*Cellstrainer*, 40 µm Porendurchmesser, Falcon) und die Zellzahl wurde bestimmt. Zwischen 1-2 x 10⁶ Neurone pro 2 ml wurden auf ein Loch einer mit Poly-L-Lysin beschichteten 6-Loch-Platte gegeben.

Nach ca. drei Stunden wurde das Ausplattiermedium gegen Neurobasal-Medium [Gibo/Invitrogen + 1x B-27 *Supplement* (Gibco/ Invitrogen); 0,5 mM L-Glutamin (GlutaMAX, Invitrogen); 100µg/ml Primocin (Invivogen, San Diego, USA) und 25 µM Glutamat] ausgetauscht. Der erste Mediumwechsel erfolgte drei bis fünf Tage nach der Präparation. Dabei wurde die Hälfte des Neurobasal-Mediums ausgetauscht. Dieses enthielt B-27, L-Glutamin, Primocin und 0,6-6 µM AraC (Sigma-Aldrich), welches Wachstum und Zellteilung von Fibroblasten hemmt. Ein weiterer Mediumwechsel mit Neurobasal ohne AraC erfolgte am siebten Tag zusammen mit der Transfektion.

Transfektion: Die Transfektion der Neurone erfolgte am siebten Tag oder für Stimulationsversuche am 14. Tag nach Präparation mittels Calciumphosphat-Präzipitation. Zur Transfektion von zwei Löchern (6-Loch-Platte) wurden 8 µg Plasmid-DNA in 90µl Wasser gelöst und dann 10 µl 2,5 M CaCl₂ zugegeben. Anschließend wurden 100 µl 2x BBS mit pH 6,96 (Sambrook et al., 1989) unter ständigem Mischen (Vortex) langsam zugegeben. Nach 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde je 100 µl der Präzipitat-Suspension auf die Zellen getropft und das Neurobasal-Medium wurde nach drei Stunden und drei Waschsritten mit 1x HBSS gewechselt.

2.3.3 Stimulierung und Ernte von Cortex-Neuronen

Die Cortex-Neurone wurden einen Tag nach Transfektion (Tag 15 in Kultur) mit 0,1 mM des metabotropen Glutamatrezeptor Agonisten S-(3,5)-Dihydroxyphenylglycin (DHPG gelöst in Wasser; Sigma-Aldrich) für zehn Minuten stimuliert und anschließend für die Luciferase-Messungen geerntet (2.4.5).

2.3.4 Immunzytochemische Analyse von Hippocampus-Neuronen

Zum Nachweis von Proteinen in auf Deckgläschen (Assistent) kultivierten Hippocampus-Neuronen wurde das Medium abgesaut und die Zellen wurden mit 1x PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte für 20 Minuten in 4% Paraformaldehyd in PBS bei Raumtemperatur. Nach

erneutem Waschen mit 1x PBS, wurden die Zellen für drei Minuten mit 0,3% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Nach gründlichem Waschen in 1x PBS wurden die Zellen mit 10% Ziegenserum in PBS (Blockierlösung) für ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur blockiert. Der erste Antikörper wurde in geeigneter Konzentration in Blockierlösung verdünnt und die Zellen über Nacht bei 4°C oder mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur darin inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in 1x PBS wurde der Sekundär-Antikörper in geeigneter Konzentration in Blockierlösung verdünnt und die Zellen wurden darin inkubiert (eine Stunde bei Raumtemperatur). Die Neurone wurden erneut dreimal mit 1x PBS gewaschen und mit *PermaFluor* (Beckman Coulter, Marseilles, Frankreich) auf Objektträgern fixiert.

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Quantifizierung von Proteinen, Natriumdodecylsulfat-

Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot

Die Konzentrationsbestimmungen von Proteinlysaten wurden nach Bradford (1976) durchgeführt. Die zu messenden Proteinlösungen wurden mit Wasser verdünnt und parallel zu einer Leerkontrolle (nur Wasser) und einer definierten BSA-Standardreihe (*bovine serum albumin*) in einer 96-Loch-Platte mit je 180 µl Bradford-Reagenz (Sigma-Aldrich) vermischt. Nach zwei bis drei Minuten Inkubation wurde der Farbumschlag der Chemikalie im ELISA-Reader (Titertek Multiscan Plus, Flow Laboratories) bei einer Extinktion von 620 nm gemessen. Die Konzentration wurde mittels Regressionsgleichung der BSA-Standardreihe in Excel bestimmt. Die gewünschte Menge Proteinlysate wurde für die Elektrophorese mit Laemmli-Puffer (Cleveland et al., 1977) für fünf Minuten bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung von Proteinen wurde mittels SDS-PAGE in 10%igen Gelen im *Mini-PROTEAN III* oder *Tetra Cell System* (Biorad) nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Als Größenmarker wurden gefärbte Proteingrößenstandards aufgetragen (*Full Range Rainbow Marker*, Amersham Bioscience oder *PageRuler™ prestained Protein Ladder Plus*, Fermentas). Zur Immundetektion von Proteinen wurden diese nach der Auftrennung im Proteingel auf eine Nitrocellulosemembran (*PROTAN*, Schleicher & Schuell) übertragen. Der Transfer erfolgte im *semi-dry* Verfahren nach Angaben der Hersteller von Membran und Blot-Apparatur (*Trans-Blot® SD Cell*, BioRad) in Transferpuffer [25 mM Tris-Base (w/v); 10% Methanol (v/v); 150 mM Glycin; pH 8,3]. Die Proteinübertragung wurde durch Färbung der Membran mit Ponceau S (Sigma-Aldrich) überprüft. Danach wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blockierlösung [10% Magermilchpulver oder 5% BSA in PBS-T; PBS-T: PBS + 0,3% Tween-20 (v/v)] inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu

blockieren. Die Reaktion mit dem primären Antikörper in entsprechender Konzentration (Tabelle 2.3) erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach drei zehnmütigen Waschschrinen mit PBS-T folgte die Inkubation mit dem passenden *Horse radish peroxidase* (HRP)-gekoppelten sekundären Antikörper in entsprechender Konzentration (Tabelle 2.3) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Im Anschluss an drei zehnmütige Waschschrine in PBS-T wurden die 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) detektiert. Die densitometrische Auswertung der Signale erfolgte mit dem Programm *ImageJ*. Dazu wurden die einzelnen Signale vermessen und die Bandenintensität und -größe vom Programm in eine Kurve umgerechnet. Die Flächen unterhalb der Kurven der zu vergleichenden Signale z.B. von WT und ko wurden berechnet. Tubulin diente als Ladekontrolle sowie Normalisierungsfaktor und wurde entsprechend immer mitgemessen. Anschließend wurden die einzelnen Werte zu den dazugehörigen Tubulinwerten normalisiert (Proteinwert / Tubulinwert = normalisierter Wert).

2.4.2 Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Für die Expression eines Fusionsproteins wurde eine 10 ml Übernachtvorkultur in 400 ml Luria Bertoni (LB)-Medium (Sambrook et al., 1989) überimpft und bei 37°C bis zu einer $OD_{600} = 0,6-1,0$ inkubiert. Nachdem 100 µl als Negativkontrolle abgenommen wurden, wurde die Fusionsprotein-Expression mit 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Nach zwei Stunden Inkubation bei 37° wurden erneut 100 µl abgenommen und die restliche Bakterien-Suspension wurde zentrifugiert (GSA Sorvall, 5000 rpm, 4 °C, 15 Minuten). Das Bakterien-Pellet wurde zweimal in 20 ml STE-Puffer (150 mM NaCl; 10 mM Tris pH 8; 5 mM EDTA) resuspendiert, dann mit je 200 µl PMSF und Lysozym (10mg/ml) versetzt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Die lysierten Bakterien wurden entweder über Nacht bei -20°C eingefroren oder fünfmal mit fünf Sekunden Ultraschall-Pulsen behandelt. Da das Fusionsprotein GST-FMRP in *Inclusion Bodies* aggregierte, wurden anschließend 100µl 1M DTT und 3,15 ml N-Lauroylsarcosin (10% in STE) hinzugegeben und der Ansatz 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 8,4 ml Triton X 100 (10% in PBS), 15 Minuten auf Eis, Zugabe des gleichen Volumen eiskaltes STE-Puffer pH 6,8 und weiteren zehn Minuten auf Eis, wurde der Ansatz 25 Minuten bei 20.000 x g und 4°C zentrifugiert. Vom Überstand wurden 100 µl als Kontrolle für die erfolgreiche Aufreinigung abgenommen und der Rest mit 1-2 ml gewaschener Glutathion-Sepharose (GE Healthcare; 2x mit STE-Puffer gewaschen und bei 500 x g für fünf Minuten pelletiert) über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Am nächsten Tag wurde das an die Sepharose gekoppelte Fusionsprotein nach drei bis vier Waschschrinen (mit 10 ml eiskaltem STE-Puffer, pelletiert bei 500g für fünf Minuten) dreimal

mit je 500 µl Elutionspuffer von der Sepharose gelöst. Die Protein-Konzentration der Eluate wurde anschließend im Proteingel bestimmt. Dazu wurden definierte Mengen BSA (1 µg, 2 µg, 5 µg und 10 µg) in Lämmli-Puffer parallel zu Aliquots der Eluate denaturiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend mit Coomassie brilliant blue (Sambrook et al., 1989) gefärbt und nach der Entfärbung wurde die Menge des Fusionsproteins geschätzt.

2.4.3 Aufreinigung polyklonaler Antikörper aus Serum (anti-FMRP)

Für die Affinitätsaufreinigung des polyklonalen FMRP-Antikörpers aus den Kaninchen-Seren wurden ca. 500 µg des GST-FMRP-Fusionsproteins in einem Proteingel mit nur einer großen Tasche aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran wurde die Fusionsprotein-Bande mittels Ponceau S Färbung (Sigma-Aldrich) sichtbar gemacht und ausgeschnitten. Während des Blockens in 3%BSA in 1x PBS für eine Stunde wurden 500 µl des Serums bei 56°C für 30 Minuten hitzeinaktiviert und 1:10 in Blocking-Puffer verdünnt. Nach der Inkubation über Nacht bei 4°C wurde der Membranstreifen zweimal für zehn Minuten mit 0,15 M NaCl und dreimal mit 1x PBS für fünf Minuten gewaschen. Im Anschluß wurde der Antikörper mit 5 ml Elutionspuffer [0,2 M Glycin (pH 2,8); 1 mM EGTA] für zehn Minuten bei Raumtemperatur vom Fusionsprotein abgetrennt. Das Eluat wurde sofort mit 1ml 2 M Tris-HCl (pH 8,0) neutralisiert und über Nacht bei 4°C mittels Dialyse in PBS umgepuffert.

2.4.4 Immunpräzipitationen von Proteinen und assoziierten RNA-Molekülen

Für die Aufreinigung von Proteinen und assoziierten RNA-Molekülen (RNA-Ko-Immunpräzipitation, IP) wurden jeweils sechs WT und FMRP ko Mausgehirne präpariert und nach Zalfa et al. (2003) in RNA-IP-Puffer mit Protease- und RNase-Inhibitoren homogenisiert und weiterverarbeitet. Das klare Lysat wurde für 30 Minuten bei 4°C mit Protein A Agarose (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA) inkubiert und diese anschließend bei 500 x g für fünf Minuten pelletiert und entfernt. Das so vorgereinigte Ausgangslysate wurde je Genotyp in drei Reaktionsgefäße zu gleichen Volumina aufgeteilt. Die einzelnen Gefäße wurden mit je 30µg Immunglobulin G (IgG), anti-PABP oder anti-FMRP über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden pro Ansatz 100 µl geblockte Protein A Agarose (Zalfa et al., 2003) für 40 Minuten hinzugegeben und nach dem Pelletieren der Agarose (500g für fünf Minuten) wurde das Präzipitat sechsmal mit RNA-IP-Puffer gewaschen. Die Agarose wurde in 200µl Wasser resuspendiert und 10% der Suspension wurde für eine Western Blot Analyse abgenommen. Der Rest wurde mit 10 µl Proteinase K (18mg/ml, Roche) bei 37°C für 15

Minuten inkubiert. Aus dem Überstand wurde danach mittels RNeasy Mini Kit die RNA nach Herstellerangaben isoliert.

2.4.5 Messung der Luciferase-Aktivität

Alle für die Luciferase-Messungen benötigten Puffer und Reagenzien stammten aus dem *Dual Luciferase Assay System* (Promega) und wurden nach Herstellerangaben verwendet.

Die mit entsprechenden Luciferase-Plasmiden (2.1.3) transfizierten Zellen wurden nach 24 Stunden geerntet. Die Enzym-Aktivitäten von *Photinus*- und *Renilla*-Luciferase wurden mittels Luminometer (MicroLumat LB96P; Berthold, Bad Wildbad, Deutschland) in den Zelllysaten bestimmt. Die Aktivität der *Photinus*-Luciferase wurde mit dem der *Renilla*-Luciferase normalisiert. Für die graphische Darstellung wurde der normalisierte Wildtyp Wert jeder Messung 100% gesetzt und der FMRP ko Wert entsprechend ausgerechnet, für die statistische Auswertung wurden die normalisierten Originalwerte verwendet.

2.4.6 Isolierung von Synaptosomen und postsynaptischen Dichten

Die Isolierung postsynaptischer Dichten aus Mausgehirnen bzw. aus verschiedenen Gehirnregionen wurde nach Carlin et al. (1980) durchgeführt. Verwendet wurden dafür sieben bis zehn Maugehirne. Für die Bestimmung der RNA-Konzentration in Synaptosomen wurde das Protokoll unter RNase-freien Bedingungen bis zur Zentrifugation des Materials im Sucrosegradienten durchgeführt. Die Proteinbande mit den angereicherten Synaptosomen wurde isoliert und aus ihr die Gesamt-RNA mittels RNeasy Mini Kit (Qiagen) aufgereinigt.

2.5 Statistische Auswertung der Daten und Stichprobengröße

Die statistische Auswertung der generierten Daten erfolgte im Programm Excel (Microsoft) mit dem zwei-seitigen t-Test und einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ wenn die Daten aus unabhängigen Messungen oder Experimenten generiert wurden. Für die Protein- und RNA-Quantifizierungen wurde die Aufarbeitung der Daten mit dem Programm SPSS (SPSS Inc.) vorgenommen. Da aus einzelnen Präparationen jeweils mehrere Messergebnisse generiert wurden, erfolgte die statistische Auswertung über die Analyse im linearen gemischten Modell, das die Struktur der Versuche (nach Präparation und Experiment) berücksichtigt. Das Signifikanzniveau betrug dabei auch $\alpha = 0,05$.

Für die Quantifizierung der Proteinkonzentrationen in PSD-Präparationen wurden mindestens drei unabhängige PSD-Isolierungen durchgeführt. Je Präparation wurden mindestens zwei Western Blots pro unverändertem Protein bzw. mindestens drei pro verändertem Protein analysiert. Die statistische Analyse wurde mit dem linear gemischten Modell (SPSS) durchgeführt. Für die relative Quantifizierung der RNA aus Wildtyp und FMRP-defizienten

Mausgehirnen wurden mindestens zwei unabhängige Präparationen genutzt. Mit jeder Präparation wurden mindestens zwei Quantifizierungen pro Transkript durchgeführt. Die einzelnen Proben wurden in der RT-qPCR in Duplikaten quantifiziert. Die statistische Analyse wurde mit dem linear gemischten Modell (SPSS) durchgeführt.

Für die Identifizierung von mRNA Molekülen, die von FMRP gebunden werden, wurden je untersuchte mRNA mindestens drei unabhängige Präzipitationen durchgeführt. Aus jeder Präzipitation wurden pro Transkript mindestens zwei Analysen in Duplikaten mittels RT-qPCR durchgeführt. Die statistische Auswertung mittels t-Test (gepaart) wurde für jede mRNA an den Ct-Werten von wtF-IP und koF-IP vorgenommen. Die statistische Analyse der beiden subjektiv eingeteilten Klassen erfolgt mit dem Linear Gemischten Modell (SPSS). Die Luciferase-Messungen wurden mit dem t-Test analysiert. Die jeweilige Anzahl der durchgeführten Messungen pro Experiment sind dem Ergebnisteil zu entnehmen.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung von *Fmr1*^{-/-} Tieren

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine *Fmr1*^{-/-} Mauslinie als FRAX Modell verwendet. Diese stammte aus den Jackson Laboratories (Bar Harbour, USA) und besitzt genetisch einen C57bl/6J Hintergrund.

3.1.1 Genotypisierung von *Fmr1*^{-/-} Tieren

Zur Analyse neuer Nachkommen wurde genomische DNA aus Schwanzbiopsien isoliert und für eine Genotypisierung mittels PCR eingesetzt. Für jedes Individuum wurden zwei Reaktionen zur Detektion des WT und *Fmr1*^{-/-} Allels durchgeführt. Bei homo- oder hemizygoten WT Tieren entsteht mit den *Primern* FMR1s und FMR2as ein 274 bp großes Amplifikat, während das *Primerpaar* FMR1s und neo1as zu keinem PCR-Produkt führt. Bei homo-/hemizygoten FMRP-defizienten Tieren entsteht mit den *Primern* FMR1s und neo1as ein Produkt von 590 bp und aufgrund der inserierten Neomycin Phosphotransferase-Kassette in einigen Reaktionen ein 1000 bp großes Produkt in Ansätzen mit den *Primern* FMR1s und FMR2as (Abbildung 3.1). Bei Heterozygotie entsteht mit den *Primern* FMR1s und FMR2as ein 274 bp großes Amplifikat und mit FMR1s und neo1as ein Produkt von 590 bp.

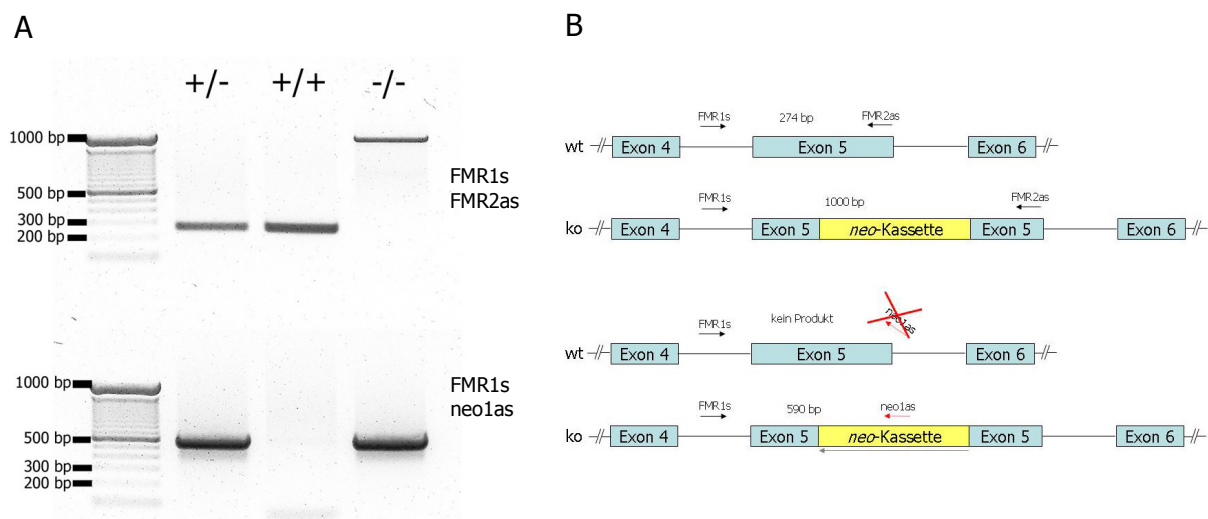


Abbildung 3.1: Genotypisierung von WT und *Fmr1*^{-/-} Mäusen

(A) Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte verschiedener Genotypisierungs-PCR. Das obere Gel zeigt Ansätze mit den *Primern* FMR1s und FMR2as. Das untere Gel zeigt die Ansätze mit den *Primern* FMR1s und neo1as. Bei Heterozygotie (+/-) entstanden in beiden PCR-Ansätzen Amplifikate von 274 bp (oben) und 590 bp (unten, linke Spur). Bei homozygoten WT Tieren (+/+) entstand nur bei der PCR mit FMR1s und FMR2as eine Bande von 274 bp (oben, mittlere Spur). Bei FMRP-defizienten Tieren (-/-) wurde in der Amplifikation mit FMR1s und neo1as ein 590 bp großes Produkt generiert (unten). In manchen Fällen konnte parallel in der PCR mit FMR1s und FMR2as ein 1000 bp großes Produkt amplifiziert werden (oben, rechte Spur) (B) Schematische Darstellung der Exons 4-6 von *Fmr1* Allelen auf dem X-Chromosom. Die Anlagerungsregion der in dieser Arbeit verwendeten *Primer* (schwarze/ rote Pfeile) sowie die Größe der zu erwartenden PCR-Produkte sind angegeben. Boxbereiche repräsentieren exonische, Striche intronische Genomabschnitte. Die Neomycinresistenz-Kassette

(*neo*-Kassette) beinhaltet das Neomycin Phosphotransferase Gen sowie Promotorfragmente und ein Polyadenylierungssignal und ist im Vergleich zu *Fmr1* in gegenläufiger Orientierung inseriert (grauer Pfeil).

3.1.2 Herstellung und Testung eines FMRP-Antikörpers

Um einen Antikörper gegen FMRP zu generieren, wurden die ersten 1338 Nukleotide der kodierenden Region des *Fmr1* Gens aus *Rattus norvegicus* an das 3' Ende des Glutathion-S-Transferase (GST) Gens in den pGEX-Vektor kloniert. Dieses Konstrukt wurde mittels IPTG in Bakterien zur Expression gebracht, so dass die Zellen das Fusionsprotein GST-FMRP synthetisierten. Das GST-FMRP-Fusionsprotein wurde nach einem Sarkosylaufschluss aus den Bakterien aufgereinigt, mittels GST-Sepharose isoliert und als Antigen Kaninchen zur Synthese von Antikörpern injiziert (Pineda, Berlin, Deutschland). Nach 235 Tagen zeigte das Serum FMRP-T1 im Vergleich zu einem vor der Immunisierung entnommenen Serum Prä-T1 im Western Blot eine starke Reaktion mit dem GST-FMRP-Fusionsprotein und mit FMRP in Gehirnllysaten, so dass das Tier ausgeblutet werden konnte. Das Serum FMRP-T1 wurde bei -80°C gelagert. Ein Teil des Serums wurde über das Antigen (GST-FMRP-Fusionsprotein) mittels Western Blot affinitätsaufgereinigt (aFMRP-T1), um unspezifische Immunreaktionen zu vermindern. Im Western Blot mit Mausgehirnllysaten konnte nach Inkubation mit aFMRP-T1 nur im WT eine 75 kDa große Bande detektiert werden, die im Lysat aus FMRP-defizienten Tieren fehlte (Abbildung 3.2A). Der generierte und aufgereinigte Antikörper aFMRP-T1 reagierte demnach spezifisch mit FMRP und zeigte keine unspezifische Kreuzreaktion in Material aus FMRP-defizienten Tieren. Der Antikörper aFMRP-T1 wurde für immunzytochemische Untersuchungen an hippocampalen Neuronen eingesetzt. Die endogene Färbung in Neuronen aus Ratten zeigte eine Lokalisation von FMRP im Soma und in Dendriten (Abbildung 3.2B). Diese Beobachtung stimmt mit den bisher publizierten Daten zur subzellulären Lokalisation des Proteins überein (Castren et al., 2001). Bei Immunzytofärbungen von Neuronen aus WT und *Fmr1*^{-/-} Mausembryonen zeigte sich eine leicht unspezifische Färbung in den FMRP-defizienten Zellen (Abbildung 3.2C). Die WT Mausneurone wiesen jedoch bei gleichen Aufnahmebedingungen (Belichtungszeit der Kamera) wesentlich stärkere Signale auf.

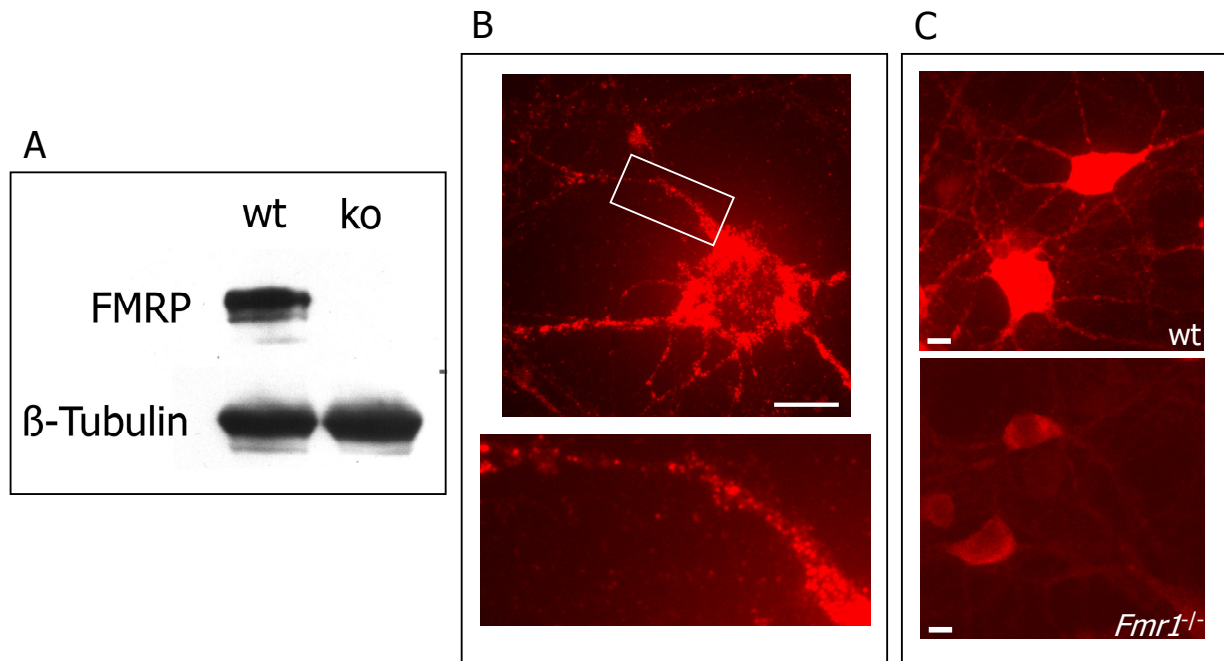


Abbildung 3.2: Nachweis von FMRP in Mausgehirnlysaten und kultivierten Neuronen mittels Western Blot und Immunzytochemie

(A) Elektrophoretische Auftrennung von je 50 µg Gehirnlisat aus WT und *Fmr1^{-/-}* Mäusen. Im anschließenden Western Blot wurde β-Tubulin (50 kDa) mittels Antikörper detektiert. Die gleich starken Signale belegen, dass identische Proteinmengen in beiden Spuren aufgetrennt wurden. Der Antikörper aFMRP-T1 zeigte nur im WT Lysat (wt, linke Spur) ein Signal aus mehreren Banden bei ca. 75 kDa. Im *Fmr1^{-/-}* Lysat (ko, rechte Spur) wurde kein Protein detektiert. Die Detektion der an die Proteine gebundenen primären Antikörper erfolgte mittels Chemilumineszenzreaktion an einem HRP (*horseradish peroxidase*)-gekoppelten spezies-spezifischen sekundären Antikörper. (B) In primären Rattenneuronen (7. Tag in Kultur) konnte FMRP immunzytochemisch mit aFMRP-T1 und einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper (Cy3-Anti-Kaninchen-IgG) nachgewiesen werden. Die rote Fluoreszenz ist sowohl im Soma als auch punktförmig im Dendriten zu detektieren (unteres Bild Vergrößerung des Dendriten). Weißer Balken = 10 µm (C) In *Fmr1^{-/-}* Mausneuronen (7. Tag in Kultur) konnte im Vergleich zu WT Neuronen bei identischer Belichtungszeit ein deutlich schwächeres Signal bei der Immunzytochemie mit aFMRP-T1 (siehe auch B) detektiert werden. Weiße Balken = 10 µm

3.2 Quantitative Analyse von Proteinen der postsynaptischen Dichte in Wildtyp und *Fmr1^{-/-}* Mäusen

Aufgrund der morphologischen Veränderungen der dendritischen Dornen in FMRP-defizienten Mäusen stellte sich die Frage, ob Proteine der in den Dornen lokalisierten postsynaptischen Dichte (PSD) gegenüber den WT Tieren in ihrer Konzentration verändert waren. Um dies zu untersuchen, wurden die Proteine der PSD nach einem biochemischen Protokoll (Carlin et al., 1980) aus Gehirnlisaten isoliert. Nach verschiedenen Zentrifugationsschritten wurden über einen Sucrosegradienten Synaptosomen angereichert. Diese enthalten sowohl post- als auch präsynaptische Bestandteile. Aus den Synaptosomen konnte nach einer Detergenzbehandlung die PSD-Fraktion isoliert werden. An verschiedenen Schritten der biochemischen Fraktionierung wurden Proben genommen, davon gleiche Proteinmengen in einem Gel aufgetrennt und das postsynaptische Protein NR1 sowie das präsynaptische

Protein Synaptophysin mit jeweils anti-NR1 und anti-Synaptophysin Antikörper detektiert (Abbildung 3.3). Synaptophysin liess sich bis zur Synaptosomen-Fraktion in steigender Konzentration detektieren (B). In der PSD-Fraktion war kein Signal vorhanden. Die Rezeptoruntereinheit NR1 war in allen Fraktionen zu detektieren, wobei das stärkste Signal in der PSD-Fraktion zu beobachten war (A). Die Anreicherung des postsynaptischen Proteins bewies, dass die PSD-Fraktion erfolgreich isoliert wurde. Das Fehlen präsynaptischer Proteine bestätigte die Reinheit dieser Fraktion.

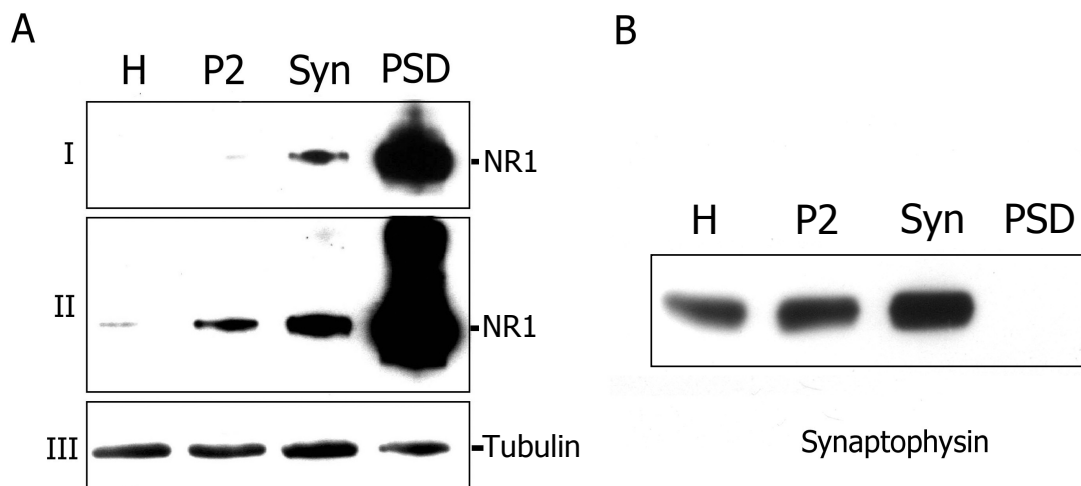


Abbildung 3.3: Biochemische Fraktionierung von Gehirnlisaten

(A) Während der Isolierung der PSD-Fraktion aus WT und *Fmr1*^{-/-} Gehirnlisaten wurden an verschiedenen Punkten Proben entnommen und im Proteingel aufgetrennt. Mittels Immundetektion im nachfolgenden Western Blot wurde NR1, ein Protein der PSD, nachgewiesen. Zu sehen ist die schrittweise Anreicherung des Proteins in Homogenat (H), über das Pellet der zweiten Zentrifugation (P2) und die Synaptosomenfraktion (Syn) bis hin zur PSD-Fraktion (PSD). Box I und II zeigen unterschiedliche Belichtungszeiten (1 min und 5 min) der Röntgenfilme zur NR1-Detektion. In Box III weist die Detektion von β -Tubulin identische Proteinmengen in jeder Spur nach. (B) Im Gegensatz zu postsynaptischen Proteinen ließ sich der präsynaptische Marker Synaptophysin mittels anti-Synaptophysin Antikörper in der Immundetektion nur bis zur Synaptosomenfraktion nachweisen und fehlte in der PSD-Isolierung. Weitere Details zur Detektion siehe Abbildung 3.2A.

3.2.1 Veränderte Zusammensetzung der postsynaptischen Dichte in adulten *Fmr1*^{-/-} Tieren

Um die Konzentrationen der PSD-Proteine zu vergleichen, wurden die postsynaptischen Dichten (PSDs) aus Gehirnen adulter WT und *Fmr1*^{-/-} Mäuse isoliert und gleiche Proteinmengen im Gel aufgetrennt. Mit spezifischen Antikörpern wurden sowohl Gerüstproteine als auch Rezeptoruntereinheiten der PSD im Western Blot detektiert. Die Signale eines Proteins in WT und *Fmr1*^{-/-} PSD-Fraktion wurden miteinander verglichen. Repräsentative Ergebnisse der untersuchten PSD-Proteine sind in Abbildung 3.4 zusammengefasst. Die densitometrische Auswertung der Signale erfolgte mit dem Programm *ImageJ*. Dazu wurden die Signale eines Proteins in WT und *Fmr1*^{-/-} PSD-Fraktion vermessen und die Bandenintensität und -größe vom Programm in eine Kurve umgerechnet. Die

Flächen unterhalb der Kurven der beiden zu vergleichenden Signale (z.B. PSD-95 in WT und *Fmr1*^{-/-} PSD) wurden berechnet. Die einzelnen Werte wurden mit den dazugehörigen Tubulinwerten normalisiert (Proteinwert / Tubulinwert = normalisierter Wert). Für die statistische Auswertung wurden die normalisierten Messwerte logarithmiert und mittels SPSS über *mixed models* statistisch analysiert. Für die Zusammenfassung der Einzelwerte wurde für jedes Protein der Mittelwert der Quotienten aus normalisierten *Fmr1*^{-/-} zu WT Werten ($Q_{\text{PSD}^{\text{ko/wt}}}$) gebildet und im Balkendiagramm mit Standardabweichung dargestellt (Abbildung 3.5, auch für Details).

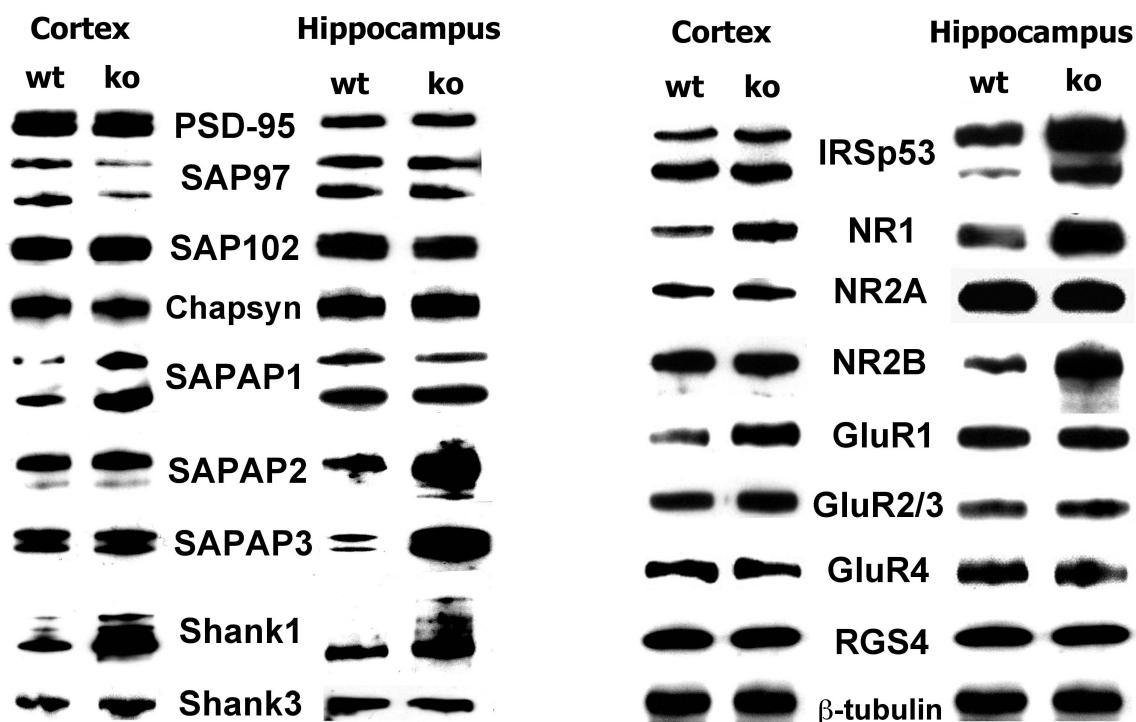


Abbildung 3.4: Vergleichende Immundetektion verschiedener Proteine aus PSD-Fraktionen von adulten WT und *Fmr1*^{-/-} Tieren im Western Blot

Für jedes untersuchte Protein ist ein repräsentatives Ergebnis der Detektion im Western Blot aus cortikaler und hippocampaler PSD-Fraktionen gezeigt. Die entsprechenden Größen der einzelnen Proteine sind in 2.1.5 aufgeführt. Die Detektion von β -Tubulin zeigte gleiche Proteinmengen in WT und *Fmr1*^{-/-} Spur an.

In den PSD-Fraktionen aus *Fmr1*^{-/-} Cortex konnten Konzentrationsänderungen bei Gerüstproteinen und Rezeptoruntereinheiten im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden (Abbildung 3.5). So sind in der Familie der SAP-Proteine sowohl SAP-97 ($Q_{\text{PSD}^{\text{ko/wt}}}$: $0,29 \pm 0,21$; $p=0,001$) als auch Chapsyn-110 ($0,78 \pm 0,15$; $p=0,031$) in der *Fmr1*^{-/-} PSD-Fraktion in geringerer Konzentration vorhanden. In der Familie der SAP-assoziierten Proteine (SAPAPs) lag SAPAP1 ($2,48 \pm 1,54$, $p=0,001$) in erhöhter Konzentration vor. Die Konzentrationen der beiden untersuchten Shank-Proteine Shank1 ($2,64 \pm 1,64$; $p<0,001$) und Shank3 ($1,36 \pm 0,33$; $p=0,04$) waren in der *Fmr1*^{-/-} PSD-Fraktion des Cortex signifikant erhöht. Bei den untersuchten Untereinheiten glutamaterger Rezeptoren waren in den

cortikalen *Fmr1*^{-/-} PSDs NR1 ($2,38 \pm 0,86$; $p=0,013$) und GluR1 ($2,21 \pm 1,04$; $p=0,001$) in erhöhter Konzentration zu finden. Im Unterschied dazu waren in den hippocampalen PSD-Fraktionen von *Fmr1*^{-/-} Mäusen die Konzentrationen der SAP-Proteine unverändert. Bei den SAPAPs kamen SAPAP2 ($2,28 \pm 0,9$; $p<0,001$) und SAPAP3 ($1,92 \pm 0,62$; $p<0,001$) in der *Fmr1*^{-/-} PSD in erhöhter Konzentration vor. Wie auch im Cortex war Shank1 in der Hippocampus-PSD verstärkt zu finden ($2,51 \pm 1,23$; $p<0,001$). Des Weiteren lagen IRSp53 ($2 \pm 0,88$; $p=0,005$) und die Rezeptoruntereinheiten NR1 ($1,98 \pm 0,77$; $p<0,001$) und NR2B ($1,79 \pm 0,68$; $p=0,016$) in den *Fmr1*^{-/-} PSD-Fraktionen in erhöhter Konzentration vor. Mit den vorangegangenen Analysen konnte gezeigt werden, dass in den adulten FMRP-defizienten Tieren die molekulare Zusammensetzung der PSD verändert ist und dass im Cortex und Hippocampus unterschiedliche Veränderungen auftreten. Dabei sind sowohl Rezeptoren als auch Gerüstproteine der PSD betroffen.

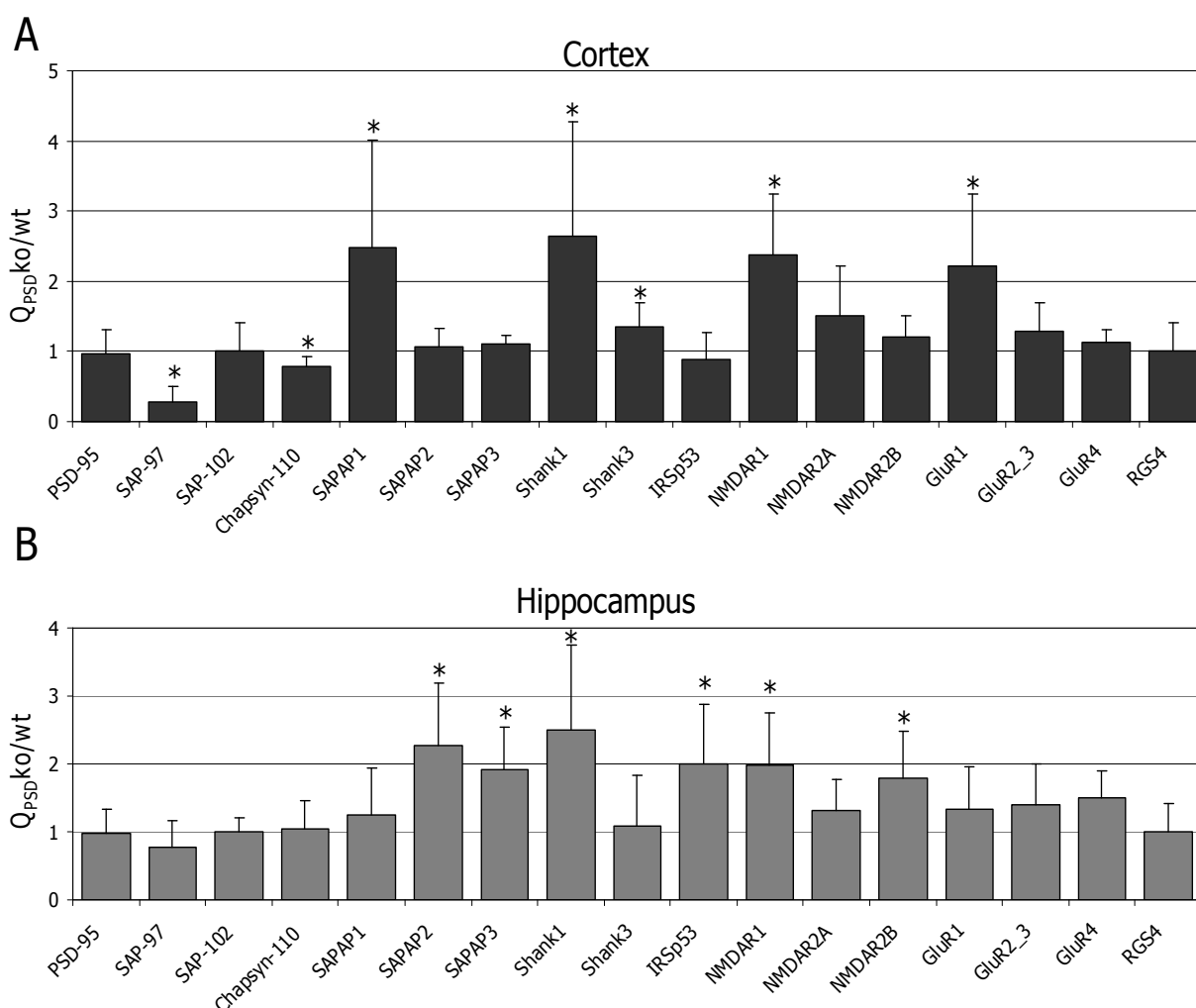


Abbildung 3.5: Relative Quantifizierung der Proteine aus PSD-Fraktionen von adulten *Fmr1*^{-/-} und WT Mausgehirnen

(A) Auswertung der relativen Quantifizierungen cortikaler PSD-Präparationen. Aus den normalisierten Signalen der *Fmr1*^{-/-} und WT Signale wurde für jedes Protein der $Q_{PSD} ko/wt$ gebildet. Ein Wert von 1 bedeutete, dass das entsprechende Protein in gleicher Konzentration in der PSD-Fraktion von *Fmr1*^{-/-} bzw. WT Mäusen vorliegt. Werte >1 zeigten eine erhöhte Konzentration des Proteins in der *Fmr1*^{-/-} PSD an, Werte <1 eine geringere Menge. (B)

Identische Auswertung wie in A an den hippocampalen PSD-Fraktionen. * Die mit einem Stern markierten Balken im Diagramm sind signifikant nach Auswertung in *mixed models* mit einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$.

3.2.2 Entwicklungsabhängige Veränderungen in der postsynaptischen Dichte von *Fmr1*^{-/-} Tieren

FMRP ist neonatal im Gehirn in größeren Mengen zu finden als im adulten Gehirn (Lu et al., 2004). Daher sollte überprüft werden, ob die in den adulten PSDs identifizierten Veränderungen bereits in juvenilen *Fmr1*^{-/-} Tieren vorhanden sind. Dazu wurden aus zwei Wochen alten WT und *Fmr1*^{-/-} Mäusen PSD-Fraktionen isoliert. Bei den adulten *Fmr1*^{-/-} Tieren war die Konzentration der Proteine SAP97, SAPAP1, Shank1, NR1 und GluR1 im Cortex stark verändert. Daher sollten diese Proteine auch in den juvenilen Tieren untersucht werden. Die Proteine PSD-95 und SAPAP3 wurden im Cortex juveniler Tiere ebenfalls untersucht. In der Hippocampus-PSD von adulten *Fmr1*^{-/-} Tieren kamen SAPAP2, SAPAP3, Shank1, IRSp53, NR1 und NR2B in größerer Menge als in den WT PSD-Fraktionen vor und wurden daher in den juvenilen Tieren analysiert.

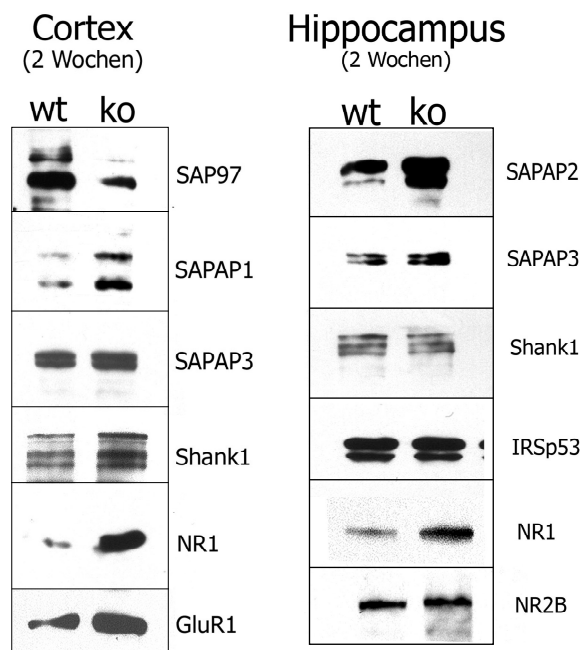


Abbildung 3.6: Western Blots verschiedener Proteine aus PSD-Präparationen von juvenilen WT und *Fmr1*^{-/-} Tieren

Für jedes untersuchte Protein ist ein exemplarisches Ergebnis der Detektion im Western Blot aus kortikaler und hippocampaler PSD-Fraktion gezeigt. Die entsprechenden Größen der einzelnen Proteine sind in 2.1.5 aufgeführt. Für weitere Details siehe Abbildung 3.2.

In Abbildung 3.6 sind exemplarisch die Immundetektionen von PSD-Proteinen aus juvenilen WT und *Fmr1*^{-/-} Tieren gezeigt. Der $Q_{\text{PSD}ko/wt}$ der untersuchten Proteine aus juvenilen Mäusen konnte errechnet und anschließend mit dem korrelierenden $Q_{\text{PSD}ko/wt}$ der adulten Mäuse verglichen werden (Abbildung 3.7).

Für SAP97 zeigte sich im Cortex der PSD-Fraktion aus jungen *Fmr1*^{-/-} Tieren eine deutliche, aber nicht signifikante Reduktion in der Konzentration ($0,5 \pm 0,5$; $p=0,228$). Ebenso konnte für SAPAP3 eine signifikante Reduktion ($0,7 \pm 0,23$; $p=0,03$) in den *Fmr1*^{-/-} PSD-Fraktionen festgestellt werden. Alle anderen untersuchten Proteine waren, bis auf PSD-95, in ihrer Konzentration signifikant erhöht (SAPAP1: $4,46 \pm 4$; $p=0,01$; Shank1: $2,12 \pm 1,47$; $p=0,012$; NR1: $2,71 \pm 1,85$; $p<0,001$; GluR1: $1,44 \pm 0,51$; $p=0,024$). Für das Protein PSD-95 konnte in den juvenilen PSD-Fraktionen des Cortex keine Veränderung festgestellt werden. In den hippocampalen PSD-Isolaten der jungen Tiere konnte für die Proteine SAPAP3 ($1,1 \pm 0,2$; $p=0,188$), Shank1 ($1,2 \pm 0,6$; $p=0,774$), IRSp53 ($0,99 \pm 0,41$; $p=0,964$) und NR2B ($1,15 \pm 0,57$; $p=0,607$) keine veränderte Konzentration zwischen WT und *Fmr1*^{-/-} detektiert werden. Einzig SAPAP2 ($1,8 \pm 0,38$; $p=0,028$) und NR1 ($1,7 \pm 0,74$; $p=0,008$) zeigten eine Konzentrationszunahme im *Fmr1*^{-/-} Tier. Die SAP97 Proteinkonzentration war im Cortex adulter *Fmr1*^{-/-} Tiere signifikant niedriger als in WT Tieren, diese deutliche Reduktion war bereits in der PSD aus jungen *Fmr1*^{-/-} Tieren zu erkennen, aber nicht signifikant. In den adulten Tieren konnte keine veränderte Proteinkonzentration von SAPAP3 identifiziert werden. In den juvenilen Tieren dagegen, war SAPAP3 in seiner Konzentration signifikant reduziert. Die weiteren im adulten Tier veränderten Proteine waren bereits im juvenilen Cortex signifikant verändert (SAPAP1, Shank1, NR1, GluR1). Für PSD-95 konnte weder in der adulten noch in der juvenilen *Fmr1*^{-/-} PSD-Fraktion eine Änderung in der Proteinkonzentration gegenüber den WT Tieren festgestellt werden. Bei den PSD-Isolaten aus dem Hippocampus junger Tiere zeigte sich interessanterweise nur eine geringe Übereinstimmung zwischen den Veränderungen in juveniler and adulter *Fmr1*^{-/-} PSD-Fraktion. Die Proteine SAPAP3, Shank1, IRSp53 und NR2B waren bei den zwei Wochen alten *Fmr1*^{-/-} Tieren in ihrer Konzentration noch nicht erhöht. Die Proteinkonzentrationen von SAPAP2 und NR1 zeigten eine der adulten PSD-Fraktion ähnliche Konzentrationszunahme im *Fmr1*^{-/-} Tier.

Zusammenfassend konnte in den vergleichenden Analysen gezeigt werden, dass vor allem im Cortex von FMRP-defizienten Tieren die veränderten Proteinkonzentrationen einzelner PSD-Proteine bereits in zwei Wochen alten Mäusen nachzuweisen sind. Im Unterschied zum Cortex waren im Hippocampus die meisten Proteine erst im Alter von zwei Monaten verändert.

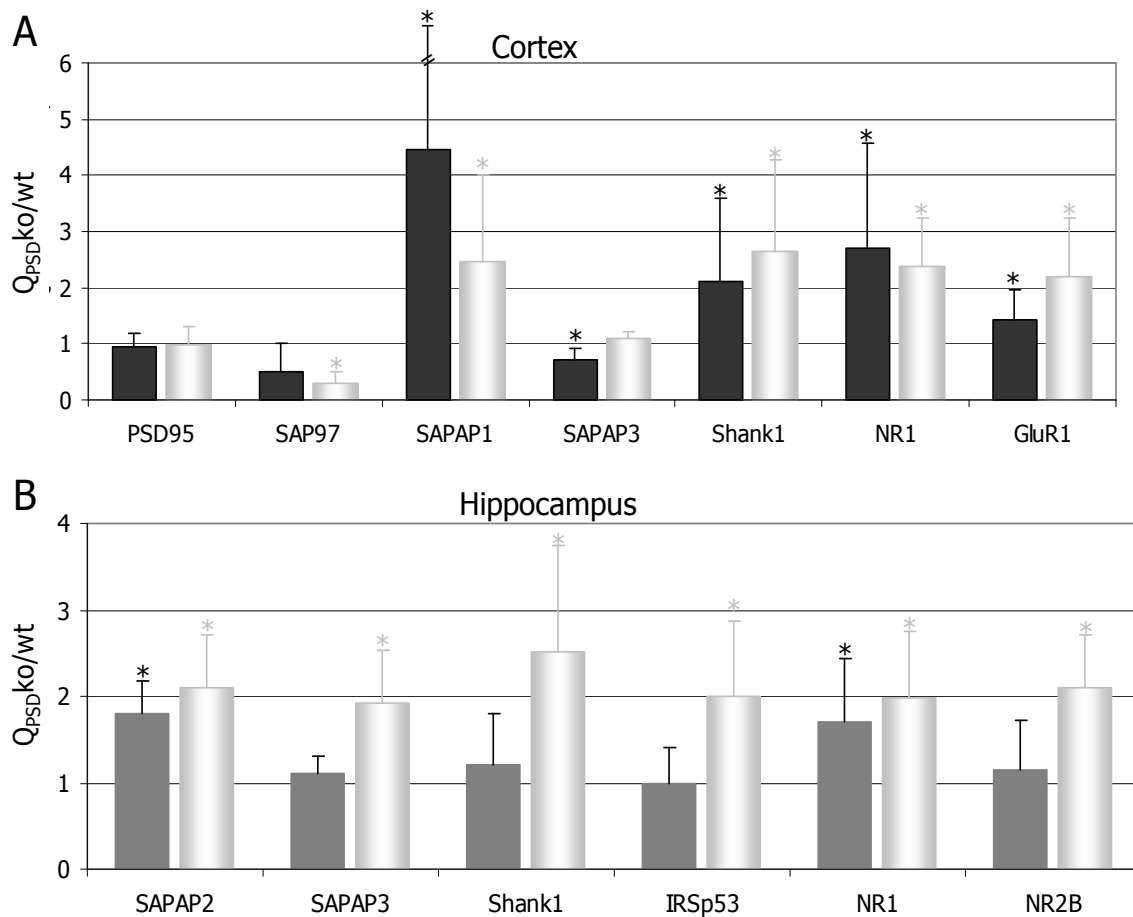


Abbildung 3.7: Relative Quantifizierung der untersuchten Proteine nach PSD-Isolierung aus juvenilen *Fmr1*^{-/-} und WT Mausgehirnen

(A) Auswertung der relativen Quantifizierung der kortikalen PSD-Präparationen aus juvenilen Tieren (schwarze Balken). Aus den normalisierten Signalen der *Fmr1*^{-/-} und WT Signale wurde für jedes Protein der $Q_{\text{PSD ko/wt}}$ errechnet. Veränderungen in der PSD aus Cortex von juvenilen *Fmr1*^{-/-} Tieren korrelierten meist mit den beobachteten Veränderungen in adulten Mäusen (hellgraue Balken). (B) Auswertung der relativen Quantifizierung der hippocampalen PSD-Präparationen aus jungen Tieren (dunkelgraue Balken, Auswertung wie in A). In der PSD aus Hippocampus-Gewebe von juvenilen *Fmr1*^{-/-} Tieren sind viele der im adulten Tier veränderten Proteine (hellgraue Balken) noch nicht verändert. * Die mit einem Stern markierten Balken im Diagramm sind signifikant nach Auswertung in *mixed models* mit einem Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$. Für weitere Details siehe Abbildung 3.5 und Text.

3.3 Quantitative Analyse von PSD Protein kodierenden mRNA-Molekülen in Wildtyp und *Fmr1*^{-/-} Mäusen

Im ersten Teil der Arbeit wurden zahlreiche in ihrer Konzentration veränderte Proteine der postsynaptischen Dichte in den *Fmr1*^{-/-} Mäusen identifiziert. Im Weiteren sollte überprüft werden, ob diese Veränderungen der Proteinkonzentration mit Konzentrationsveränderungen der entsprechenden mRNA-Moleküle korrelieren. Dazu wurde RNA aus Cortex und Hippocampus isoliert. Bei undegradierter RNA können zwei distinkte rRNA Banden von 4,7 und 1,9 kb in der Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Erst nach dieser Kontrolle wurde die isolierte RNA weiterverwendet.

3.3.1 Relative Quantifizierung von mRNA aus adulten WT und *Fmr1*^{-/-} Mausgehirnlysaten mittels Northern Blot

Um die Konzentrationen verschiedener mRNAs in WT und *Fmr1*^{-/-} Gehirnen miteinander zu vergleichen, wurden zunächst Northern Blot Experimente mit cortikaler RNA durchgeführt. Nachdem spezifische Sonden gegen PSD-95, GluR1 und NR1 mRNAs generiert wurden, konnten die entsprechenden Transkripte mittels Hybridisierung nachgewiesen werden. Für PSD-95 und GluR1 mRNAs wurde jeweils nur ein Experiment durchgeführt (Abbildung 3.8; linke Spalten). Zwischen WT und *Fmr1*^{-/-} konnte in beiden Fällen kein Unterschied in der mRNA Konzentration festgestellt werden. Die Hybridisierung mit der NR1-Sonde wurde in verschiedenen Versuchen (n=8) wiederholt und die radioaktiven Signale quantifiziert (Abbildung 3.8; rechte Spalten). Auch für diese mRNA konnte kein Unterschied detektiert werden.

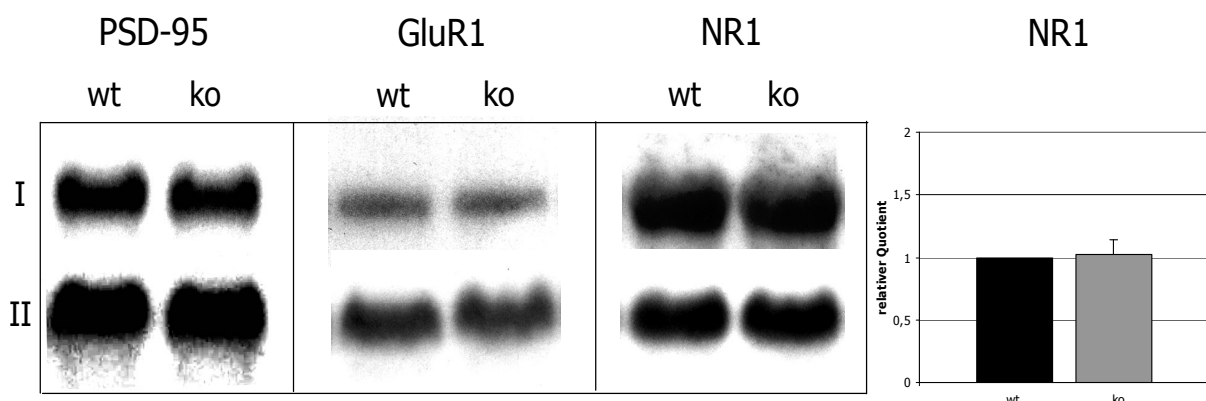


Abbildung 3.8: Quantifizierung von PSD-95, NR1 und GluR1 mRNA im WT und *Fmr1*^{-/-} Cortex mittels Northern Blot

Elektrophoretisch aufgetrennte Gesamt-RNA (40 µg) wurde im Northern Blot Verfahren auf eine Nitrocellulose Membran transferiert. Mittels Radionuklid-markierter sequenzspezifischer Sonden wurden die mRNAs von PSD-95 (3,3kb), GluR1 (5,7kb) und NR1 (4,2kb) detektiert (Reihe I). Die Aktin-mRNA diente als Ladekontrolle (II; 1,8 kb). Für die NR1 mRNA wurden mehrere Northern Blots (n=8) angefertigt und die Signalintensität wurde quantitativ ausgewertet (siehe Balkendiagramm rechts). Für keine der untersuchten mRNAs konnte ein signifikanter Unterschied zwischen WT (wt Spur) und *Fmr1*^{-/-} (ko Spur) Tier detektiert werden.

3.3.2 Relative Quantifizierung von mRNA aus adulten WT und *Fmr1*^{-/-} Mausgehirnlysaten mittels *Real-Time* PCR

Für weitere Analysen wurde eine sensitivere und exakter quantifizierbare Untersuchungsmethode, die reverse Transkription quantitative *Real-Time* PCR (RT-qPCR), eingesetzt. Dafür wurden gleiche Mengen von WT und *Fmr1*^{-/-} RNA (40ng) in eine RT-qPCR eingesetzt, bei der zunächst die RNA in cDNA umgeschrieben wurde und sich hieran direkt die Gen-spezifische PCR anschloss. Die in der Reaktion entstehenden Fluoreszenzkurven zeigen die Entstehung des Produktes während der PCR an. Für die Fluoreszenzkurven wurde, separat für jedes Oligonukleotidpaar, der Ct-Wert (*Cycle Threshold*) ermittelt. Der Ct-Wert ist der Zyklus des jeweiligen PCR-Ansatzes an dem sich die Fluoreszenzkurve im exponentiellen Bereich mit dem Schwellenwert, der über die unspezifische Fluoreszenz der ersten fünf bis zehn Zyklen gesetzt wird, schneidet. Die Ct-Werte wurden für das zu analysierende Transkript und das Transkript des Gens *HPRT* (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase, dient als Normalisierungsfaktor) mittels REST 2005 ausgewertet und als relative Konzentration *Fmr1*^{-/-} zu WT ($Q_{\text{RNAko/wt}}$) dargestellt. Dabei bedeutete ein $Q_{\text{RNAko/wt}}$ von 1, dass keine Konzentrationsunterschiede des Transkriptes zwischen WT und *Fmr1*^{-/-} Gehirn bestanden. Ein $Q_{\text{RNAko/wt}}$ von >1 bedeutete, dass die untersuchte mRNA im *Fmr1*^{-/-} Gehirn im Vergleich zum WT Gehirn angereichert war und ein $Q_{\text{RNAko/wt}}$ von <1 zeigte entsprechend eine geringere Konzentration der mRNA im *Fmr1*^{-/-} Gehirn.

Im ersten Schritt wurde, analog zu den Proteinquantifizierungen, die Gesamt-RNA aus Cortex und Hippocampus adulter (zwei Monate alter) WT und *Fmr1*^{-/-} Mäuse isoliert. Für Proteine, deren Konzentration in den *Fmr1*^{-/-} PSD-Fraktionen stark verändert war und für PSD-95, wurde die relative Konzentration der entsprechenden mRNAs zwischen *Fmr1*^{-/-} RNA und WT RNA ermittelt (Abbildung 3.5). In den Cortex-Präparationen waren die untersuchten mRNAs SAP97 ($Q_{\text{RNAko/wt}}$: $1,11 \pm 0,13$), SAPAP1 ($0,94 \pm 0,49$), SAPAP2 ($1,09 \pm 0,46$), SAPAP3 ($1,04 \pm 0,53$), Shank1 ($1,14 \pm 0,58$), IRSp53 ($0,96 \pm 0,28$) und NR2B ($1,19 \pm 0,36$) in den *Fmr1*^{-/-} Mäusen in ihrer Konzentration nicht verändert (Abbildung 3.5A). Die bereits im Northern Blot analysierten Transkripte von PSD-95 ($Q_{\text{RNAko/wt}}$: $1,2 \pm 0,46$), NR1 ($1,18 \pm 0,53$) und GluR1 ($0,9 \pm 0,18$) zeigten auch in der RT-qPCR keinen Unterschied in der Konzentration zwischen adulten WT und *Fmr1*^{-/-} Tieren. Ebenso waren die Konzentrationen der im Hippocampus untersuchten mRNAs PSD-95 ($Q_{\text{RNAko/wt}}$: $1,08 \pm 0,32$), SAP97 ($0,97 \pm 0,42$), SAPAP1 ($1,04 \pm 0,52$), IRSp53 ($1,05 \pm 0,46$), NR1 ($1,1 \pm 0,39$), NR2B ($0,96 \pm 0,21$) und GluR1 ($0,94 \pm 0,26$) im *Fmr1*^{-/-} Tier nicht verändert. Einzig die SAPAP2 mRNA ($1,69 \pm 0,46$; $p = 0,001$ *mixed models*) lag in erhöhter Konzentration vor (Abbildung 3.5B). Dieses korrelierte mit der bereits beobachteten erhöhten Proteinkonzentration von SAPAP2 in hippocampalen PSDs von adulten *Fmr1*^{-/-} Tieren. Die Transkripte von Shank1 ($0,75 \pm 0,25$) und SAPAP3 ($0,74 \pm 0,24$)

waren im Hippocampus FMRP-defizienter Tiere in leicht geringerer Konzentration gegenüber dem Wildtyp vorhanden, diese Änderungen waren jedoch nicht signifikant.

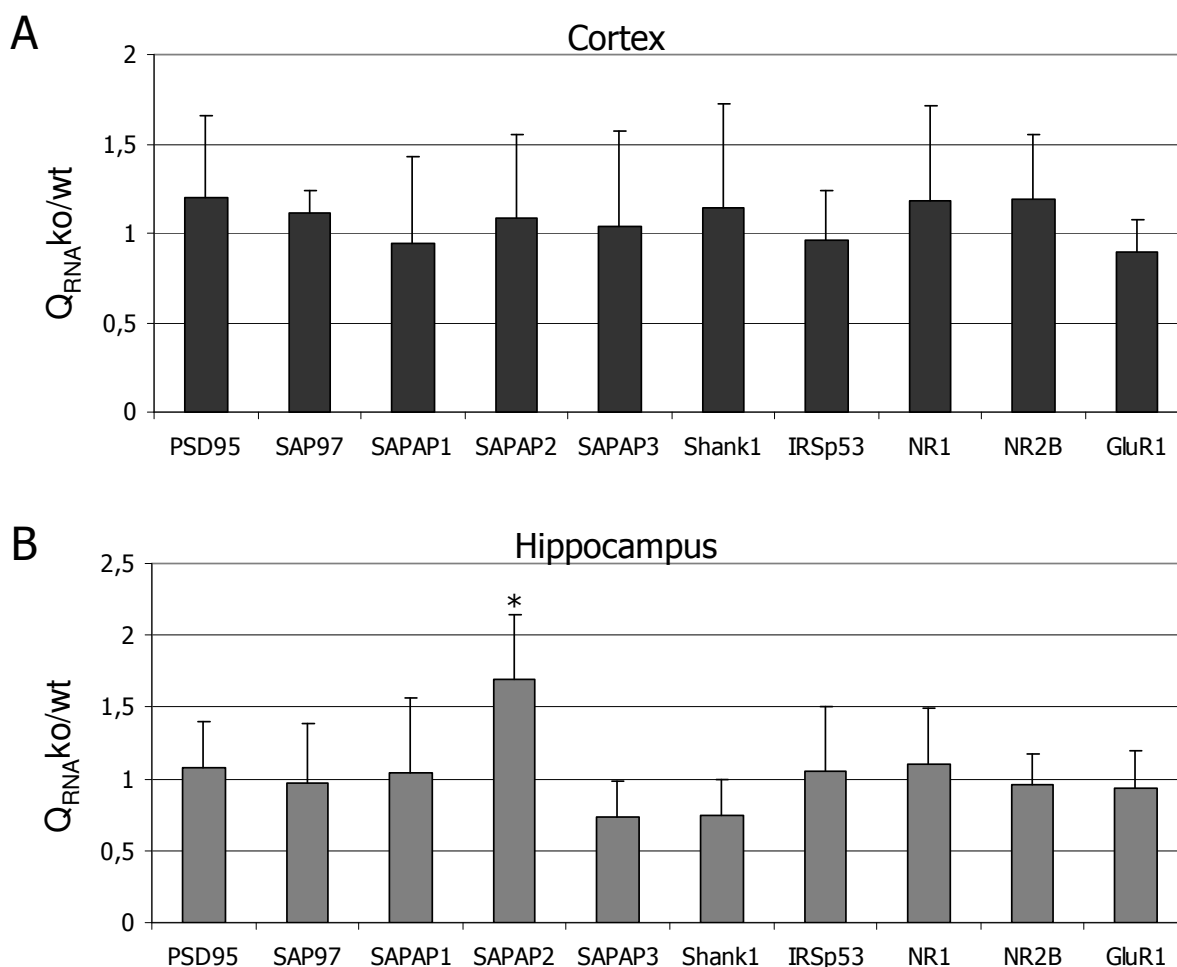


Abbildung 3.9: Relative Quantifizierung PSD-Protein kodierender mRNAs in Homogenat adulter *Fmr1*^{-/-} und WT Mäuse

(A) Gleiche Mengen RNA aus WT und *Fmr1*^{-/-} Cortexlysaten wurden in transkriptspezifischen RT-qPCRs analysiert. Mittels REST2005 wurden die ermittelten Ct-Werte unter Normalisierung relativ zum $Q_{RNA\ ko/wt}$ der HPRT mRNA in relative Konzentrationen zwischen WT und *Fmr1*^{-/-} umgerechnet. Der $Q_{RNA\ ko/wt}$ war für alle untersuchten mRNAs unverändert. (B) Im *Fmr1*^{-/-} Hippocampus Gewebe konnte signifikant mehr SAPAP2 mRNA nachgewiesen werden als im WT Hippocampus ($1,69 \pm 0,46$; $p=0,001$; *mixed models*). Die Konzentrationen der weiteren untersuchten mRNAs waren nicht verändert. Für weitere Details, siehe Text.

3.3.3 Relative Quantifizierung von mRNA aus juvenilen WT und *Fmr1*^{-/-} Mausgehirnlysaten mittels RT-qPCR

In weiteren Analysen sollten dieselben mRNAs auch in jungen (zwei Wochen alten) corticalen und hippocampalen RNA-Präparationen aus WT und *Fmr1*^{-/-} Mäusen quantifiziert werden.

Weder in den juvenilen Cortices [PSD-95 ($Q_{RNA\ ko/wt}$: $0,82 \pm 0,16$); SAP97 ($1,02 \pm 0,48$); SAPAP1 ($0,84 \pm 0,26$); SAPAP2 ($0,78 \pm 0,26$); SAPAP3 ($0,84 \pm 0,24$); Shank1 ($0,82 \pm 0,23$); IRSp53 ($0,98 \pm 0,14$); NR1 ($1,06 \pm 0,38$); NR2B ($0,95 \pm 0,2$); GluR1 ($0,81 \pm 0,19$)] noch in den Hippocampi [PSD-95 ($0,99 \pm 0,25$); SAP97 ($1,08 \pm 0,31$); SAPAP1 ($0,98 \pm 0,28$);

SAPAP2 ($1,04 \pm 0,07$); SAPAP3 ($1,1 \pm 0,28$); Shank1 ($1,08 \pm 0,25$); IRSp53 ($0,89 \pm 0,17$); NR1 ($1,2 \pm 0,42$); NR2B ($0,92 \pm 0,15$); GluR1 ($0,93 \pm 0,09$)] konnte ein Unterschied in den mRNA Konzentrationen zwischen *Fmr1*^{-/-} und WT Tieren festgestellt werden (Abbildung 3.10). Wie die anderen mRNAs war auch die SAPAP2 mRNA im *Fmr1*^{-/-} Hippocampus juveniler Tiere nicht verändert, während die Proteinkonzentration in den jungen *Fmr1*^{-/-} Tieren bereits erhöht war (vgl. Abbildung 3.7B).

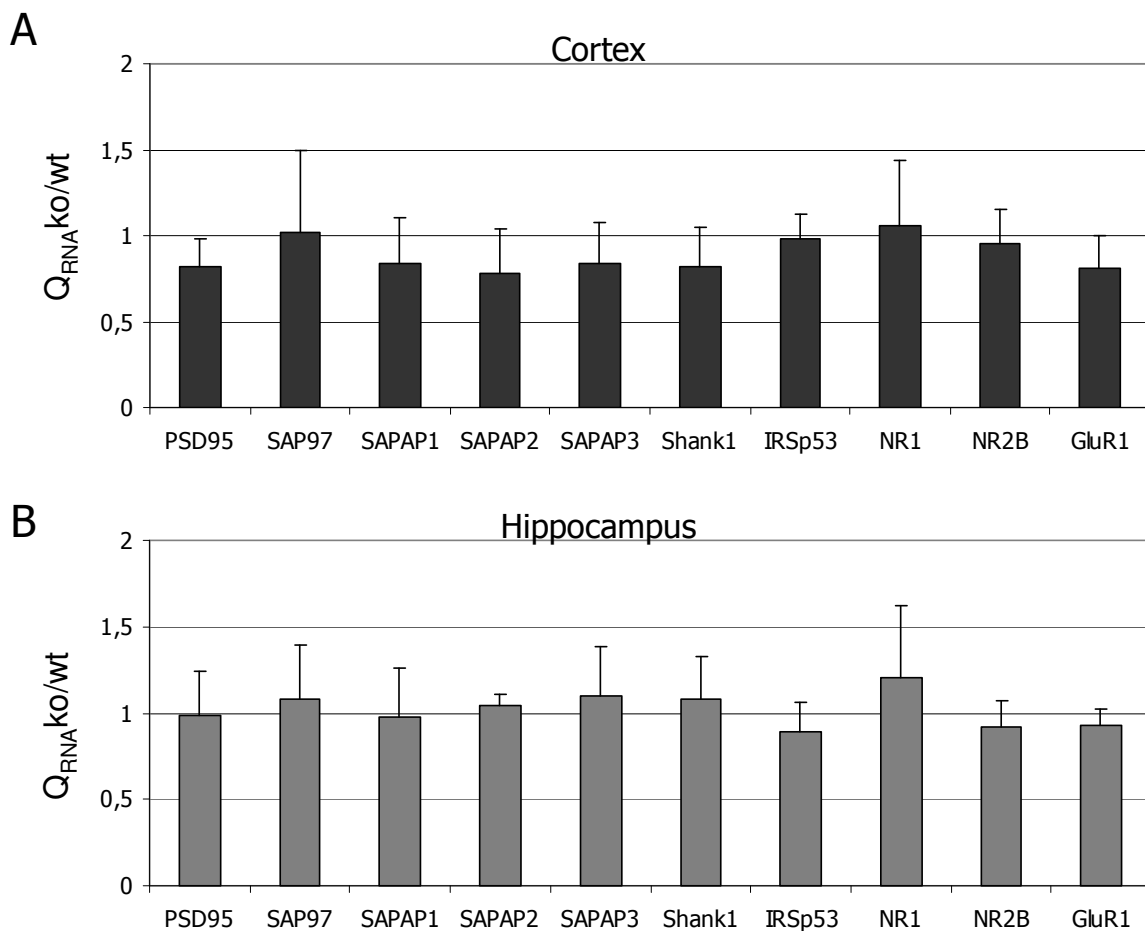


Abbildung 3.10: Relative Quantifizierung der mRNA in Homogenat juveniler *Fmr1*^{-/-} und WT Mäuse
 (A) Gleiche Mengen RNA aus WT und *Fmr1*^{-/-} Cortexlysaten junger Mäuse wurden in transkriptspezifischen RT-qPCRs analysiert. Mittels REST2005 wurden die ermittelten Ct-Werte in relative Expressionen zwischen *Fmr1*^{-/-} und WT umgerechnet. Es konnte für keines der untersuchten Transkripte ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen WT und *Fmr1*^{-/-} Cortex detektiert werden. (B) Die gleichen mRNAs wurden in hippocampalen Gewebe untersucht (wie in A). Keine der untersuchten mRNAs war in ihrer Konzentration verändert. Für weitere Details, siehe 3.3.2.

3.3.4 Relative Quantifizierung von mRNA aus Synaptosomen von WT und *Fmr1*^{-/-} Mäusen mittels RT-qPCR

FMRP ist sowohl im Soma als auch in den Dendriten lokalisiert (Castren et al., 2001). An Synapsen spielt FMRP bei der lokalen aktivitätsabhängigen Translation bestimmter assoziierter mRNAs eine Rolle (Park et al., 2008), daher könnte bereits der Transport oder die subzelluläre Stabilität dieser mRNAs in *Fmr1*^{-/-} Mäusen beeinflusst sein. Im Folgenden sollte daher untersucht werden, ob die Konzentration bestimmter mRNAs an Synapsen von *Fmr1*^{-/-} Mäusen verändert ist.

Aus dem Cortex und Hippocampus von WT und *Fmr1*^{-/-} Mäusen wurde RNA aus Synaptosomen isoliert. Dann wurden zunächst RNA-Proben aus Synaptosomen und aus Homogenat in RT-qPCR mit verschiedenen Oligonukleotiden analysiert (weitere Details siehe Abbildung 3.11). Die mRNAs von CamKII (Ca²⁺/Calmodulin abhängige Proteinkinase II), SAPAP3 und Shank1 kamen im Vergleich zum Homogenat in der synaptosomalen RNA-Präparation in erhöhter Konzentration vor (Abbildung 3.11). Auf der anderen Seite war die Konzentration der mRNAs von GAPDH, HPRT und alpha-Tubulin in der Synaptosomen-Fraktion gegenüber dem Homogenat niedriger. Die mRNAs, die für weitere Proteine der postsynaptischen Dichte kodieren (PSD-95, NR1, GluR1), waren in Synaptosomen und Homogenat ungefähr in gleicher Konzentration vorhanden. Die Transkripte von CamKII, SAPAP3 und Shank1 sind bekanntermaßen dendritisch (Kindler et al., 2004; Welch et al., 2004) und die GAPDH, HPRT und Tubulin mRNA-Moleküle eher im Soma lokalisiert. Es konnten demnach durch die Isolierung von RNA aus Synaptosomen präferentiell synaptische mRNA-Moleküle präpariert werden. Für die Transkripte von PSD-95 und GluR1 wurde ebenfalls eine dendritische Lokalisation beschrieben (Ju et al., 2004; Zalfa et al., 2007). Anhand der hier gezeigten Experimente lässt sich folgern, dass diese mRNAs zwar in Synaptosomen zu finden sind, ihre Konzentrationen jedoch im Vergleich zu den anderen synaptischen Transkripten deutlich geringer ist.

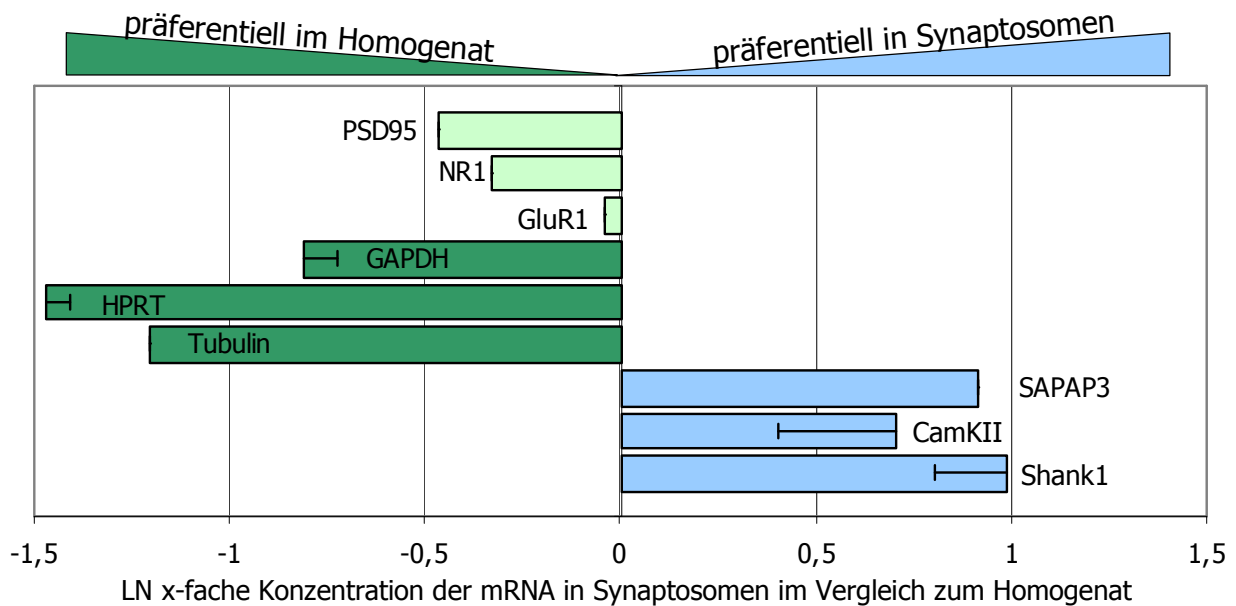


Abbildung 3.11: Anreicherung von dendritisch lokalisierten mRNAs in Synaptosomen

Die relativen Transkriptmengen verschiedener mRNAs wurden aus Gesamt-RNA eines Gehirnhomogenates und der Synaptosomen bestimmt. Gleiche Mengen RNA aus Homogenat bzw. Synaptosomen wurden parallel in RT-qPCRs mit sequenzspezifischen Oligonukleotiden analysiert. Aus dem Abstand der Ct-Werte von Homogenat und Synaptosomen einer mRNA (ΔCt) wurde der x-fache Konzentrationsunterschied berechnet ($\Delta Ct / 0,333$) und im Diagramm logarithmisch dargestellt. Die dendritisch lokalisierten Transkripte von SAPAP3, CamKII und Shank1 waren in den Synaptosomen deutlich stärker konzentriert als im Homogenat. Die im Soma lokalisierten Transkripte von GAPDH, HPRT und alpha-Tubulin waren dagegen im Homogenat stärker konzentriert als in den Synaptosomen. Die Transkripte von PSD-95, NR1 und GluR1 kamen in Homogenat und Synaptosomen in ungefähr gleicher Konzentration vor.

Die aus den Synaptosomen isolierte Gesamt-RNA von WT und *Fmr1*^{-/-} Mäusen wurde anschließend für die relative Quantifizierung der bereits in 3.3.2 und 3.3.3 untersuchten mRNAs verwendet. Die mRNAs PSD-95 ($Q_{RNA}^{ko/wt}$: $0,88 \pm 0,11$); SAP97 ($0,96 \pm 0,16$); SAPAP1 ($1,04 \pm 0,12$); SAPAP2 ($0,97 \pm 0,19$); SAPAP3 ($1,15 \pm 0,22$); Shank1 ($0,87 \pm 0,06$); IRSp53 ($1,05 \pm 0,15$); NR1 ($1,0 \pm 0,31$); NR2B ($0,93 \pm 0,28$); GluR1 ($0,94 \pm 0,19$) aus corticalen Synaptosomen waren in den *Fmr1*^{-/-} Tieren in ihrer Konzentration gegenüber dem WT nicht verändert (Abbildung 3.12). Die Konzentrationen der synaptosomalen mRNAs PSD-95 ($Q_{RNA}^{ko/wt}$: $1,22 \pm 0,06$); SAP97 ($1,04 \pm 0,14$); SAPAP1 ($1,03 \pm 0,28$); SAPAP2 ($1,07 \pm 0,18$); SAPAP3 ($0,95 \pm 0,18$); Shank1 ($1,16 \pm 0,18$); IRSp53 ($1,0 \pm 0,24$); NR1 ($1,01 \pm 0,3$); NR2B ($0,8 \pm 0,22$); GluR1 ($1,1 \pm 0,3$) aus dem Hippocampus waren in den FMRP-defizienten Tieren ebenfalls nicht verändert. Das Fehlen von FMRP wirkt sich folglich für die hier untersuchten mRNAs nicht auf die mRNA-Konzentration an der Synapse aus. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in Abwesenheit von FMRP weder der subzelluläre Transport noch die mRNA-Stabilität verändert sind. Die beobachteten Änderungen in den Proteinkonzentrationen beruhen demnach auf einer veränderten Translation der entsprechenden mRNAs.

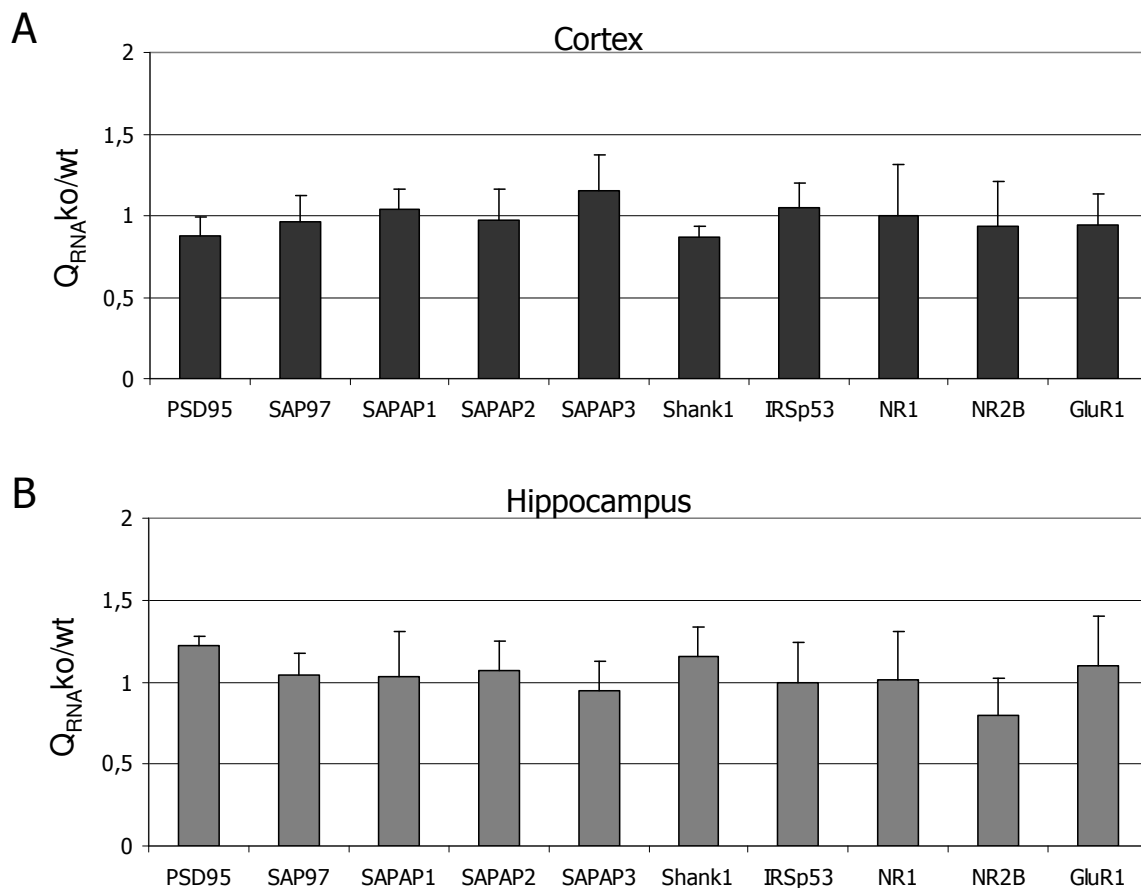


Abbildung 3.12: Relative Quantifizierung der synaptosomalen mRNA aus adulten *Fmr1*^{-/-} und WT Mäusen

(A) Gleiche Mengen RNA aus WT und *Fmr1*^{-/-} Synaptosomen des Cortex wurden in transkriptspezifischen RT-qPCRs analysiert. Mittels REST2005 wurde aus den ermittelten Ct-Werten der $Q_{\text{RNA ko/wt}}$ errechnet (weitere Details siehe 3.3.2 und Abbildung 3.9) Es konnte für keines der untersuchten Transkripte ein signifikanter Konzentrationsunterschied zwischen WT und *Fmr1*^{-/-} Synaptosomen detektiert werden (B) Auch die Quantifizierung von RNA in WT und *Fmr1*^{-/-} Synaptosomen aus adultem Hippocampusgewebe ergab keinen Unterschied zwischen den beiden Genotypen.

3.4 Identifizierung von FMRP Ziel-mRNA-Molekülen

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass bei Abwesenheit von FMRP wichtige Proteine der PSD in Abhängigkeit von Gehirnregion und Alter des Tieres in veränderter Konzentration vorliegen. Dies ist nicht auf eine veränderte Konzentration der entsprechenden mRNA in Neuronen oder an der Synapse zurückzuführen. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob mRNAs deren Translation in Abwesenheit von FMRP dereguliert ist *in vivo* im Mausgehirn mit FMRP assoziiert sind. Um dieser Fragestellung nachzugehen wurden verschiedene Immunpräzipitationen unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt. Als Positivkontrolle diente die Präzipitation des Poly(A)-Bindepoteins (PABP) aus WT und *Fmr1*^{-/-} Gehirnlysaten. Da PABP an alle polyadenylierten mRNAs sowie BC1 RNA bindet (Gorlach et al., 1994; Muddashetty et al., 2002; Munroe and Jacobson, 1990), sollte in entsprechenden Präzipitaten jede neuronale mRNA nachweisbar sein. Die Präzipitation mit unspezifischen Immunglobulin G (IgG) wurde als Negativkontrolle zur Identifikation

unspezifischer Präzipitationen verwendet. Zum Nachweis einer *in vivo* Interaktion zwischen FMRP und einer bestimmten mRNA wurde ein FMRP-Antikörper mit WT und *Fmr1*^{-/-} Gehirnllysaten inkubiert. Aus den *Fmr1*^{-/-} Lysaten ist keine Präzipitation von FMRP möglich und daher fungierte dieser Ansatz als weitere Negativkontrolle. Von den Präzipitaten wurden jeweils 10% im Proteingel aufgetrennt und zur qualitativen Überprüfung der Präzipitation mit den entsprechenden Antikörpern gegen FMRP bzw. PABP im Western Blot analysiert (Abbildung 3.13). Mittels FMRP-Antikörper liess sich FMRP (ca. 75 kDa) nur aus WT Lysaten (wtF-IP) und nicht aus *Fmr1*^{-/-} Gehirnen (koF-IP) präzipitieren. Außerdem wurde in der Präzipitation mit unspezifischen IgG aus WT Gehirnllysate kein FMRP isoliert (wtIgG-IP). PABP ließ sich aus WT und *Fmr1*^{-/-} Lysaten (wtP-I und koP-IP) gleichermaßen präzipitieren. Die hier eingesetzten Antikörper waren demnach für Immunpräzipitationen geeignet und konnten für die weiteren Experimente verwendet werden.

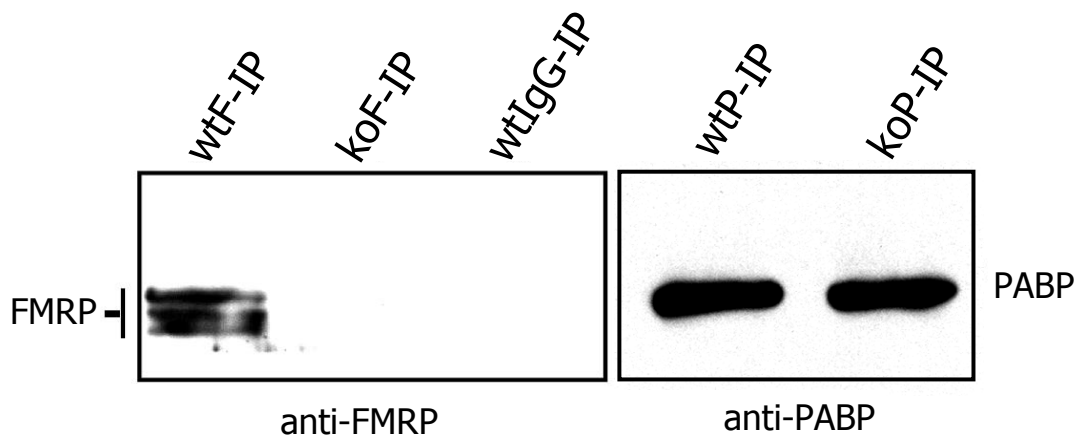


Abbildung 3.13: Immunpräzipitation von FMRP und PABP aus Gehirnllysaten

FMRP und PABP wurden mittels anti-FMRP und anti-PABP aus WT und *Fmr1*^{-/-} Gehirnllysaten präzipitiert. Im Western Blot (WB) wurden die Präzipitate mit primären Antikörpern gegen FMRP bzw. PABP analysiert (weitere Details siehe Abbildung 3.2A). Mittels FMRP-Antikörper liess sich FMRP (ca. 75 kDa) nur aus WT Lysaten (wtF-IP) und nicht aus *Fmr1*^{-/-} Gehirnen (koF-IP) präzipitieren. PABP ließ sich aus WT und *Fmr1*^{-/-} Lysaten (wtP-I und koP-IP) gleichermaßen präzipitieren. In einer Präzipitation mit unspezifischen IgG aus WT Gehirnllysate konnte kein FMRP isoliert werden (wtIgG-IP, WB mit anti-FMRP).

Aus den restlichen 90% des jeweiligen Präzipitats wurde die Gesamt-RNA isoliert und mittels RT-PCRs analysiert. Die Produkte wurden im Anschluss mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (Abbildung 3.14). Die untersuchten mRNAs PSD-95, BC1, Shank1 und NR2B konnten alle im PABP-Präzipitat aus WT Gehirnllysate detektiert werden (wtP-IP) und waren in der Präzipitation mit unspezifischem IgG nicht nachzuweisen. Die Präzipitation war demnach erfolgreich, aber nicht unspezifisch. Die PSD-95 mRNA lag im FMRP-Präzipitat des WT Lysates (wtF-IP) in größerer Menge als im *Fmr1*^{-/-} Lysate (koF-IP) vor. Die Shank1 mRNA konnte im Präzipitat aus WT Lysate (wtF-IP), aber nicht im Präzipitat aus *Fmr1*^{-/-} Lysate (koF-IP) detektiert werden. Die Produkte der NR2B mRNA spezifischen PCR konnten in den FMRP-

Präzipitaten aus WT und *Fmr1*^{-/-} Lysat (wtF-IP und koF-IP) quantitativ nicht voneinander unterschieden werden. Die BC1 RNA konnte nicht zusammen mit FMRP aus WT Lysaten präzipitiert werden (wtF-IP und koF-IP). Anhand der erfolgreichen Präzipitation von BC1 durch PABP (wtP-IP) konnte aber gezeigt werden, dass der Versuch und die Oligonukleotide funktionierten. Diese Ergebnisse zeigen, dass FMRP mit den Transkripten von Shank1 und PSD-95 assoziiert ist. Die Assoziation von PSD-95 mRNA mit FMRP bestätigt bereits publizierte Daten (Zalfa et al., 2007) und kann für folgende Versuche als Positivkontrolle verwendet werden. Außerdem konnte bestätigt werden, dass FMRP nicht mit BC1, einer RNA aus 152 Nukleotiden, die kein Protein kodiert (Anzai et al., 1986; Kobayashi et al., 1988), interagiert. Diese Beobachtung geht mit früheren Publikationen einher (Iacoangeli et al., 2008). Die analysierten Produkte der NR2B mRNA spezifischen PCR lassen keine eindeutige Aussage zu.

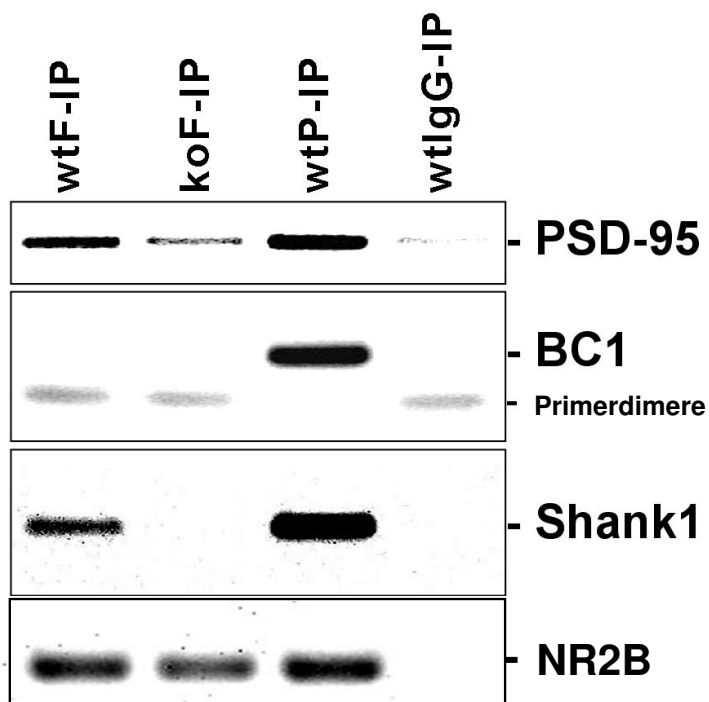


Abbildung 3.14: Die Shank1 mRNA bindet an FMRP

Elektrophoretische Analyse der Amplifikate aus reversen Transkriptionen mit anschließender transkriptspezifischer PCR von den verschiedenen Präzipitaten. Die PSD-95 mRNA lag im FMRP-Präzipitat des WT Lysates (wtF-IP) in größerer Menge als im ko Lysat (koF-IP) vor. Die BC1 RNA konnte mittels FMRP nicht präzipitiert werden (wtF-IP und koF-IP). Anhand der erfolgreichen Präzipitation mit PABP (wtP-IP) konnte gezeigt werden, dass der Versuch und die Primer funktionierten. Shank1 mRNA war in der FMRP-IP aus WT Lysat angereichert (wtF-IP). Im Präzipitat aus *Fmr1*^{-/-} Lysat konnte keine Shank1 mRNA nachgewiesen werden (koF-IP). Die NR2B mRNA konnte in den Ansätzen wtF-IP, koF-IP und wtP-IP gleichermaßen präzipitiert werden. Nach Inkubation von WT Lysat mit IgG (wtIgG-IP) konnte im pelletierten Material im Vergleich zu den FMRP- und PABP-Ansätzen eine geringere Menge bis gar keine mRNA nachgewiesen werden.

Die Betrachtung von verschiedenen Amplifikaten im Agarosegel zeigte nur ihre Konzentration am Ende einer PCR an. Zu diesem Zeitpunkt haben viele PCR-Produkte aber die gleiche Konzentration erreicht. Die möglicherweise bestehenden Unterschiede in der Ausgangsmenge können so nicht mehr festgestellt werden (vgl. Abbildung 3.15,

Fluoreszenzkurven Zyklus 40). Daher wurde für die weitere Identifizierung von FMRP-Zielmolekülen eine RT-qPCR durchgeführt. Anhand der in der RT-qPCR entstandenen Fluoreszenzkurven konnte beurteilt werden, ob die Präzipitationen qualitativ und quantitativ erfolgreich waren (Abbildung 3.15 am Beispiel NR2B mRNA). Bei der Amplifikation von NR2B aus PABP-Präzipitaten der WT und *Fmr1*^{-/-} Gehirne überlagerten sich die beiden Fluoreszenzkurven (wtP-IP und koP-IP) von NR2B exakt (Abbildung 3.15, linke überlagerte Kurven). Bei der Amplifikation von NR2B aus IgG-Präzipitaten erreichten die Fluoreszenzkurven (wtIgG-IP und koIgG-IP) deutlich später die exponentielle Vervielfältigungsphase als die wtP-IP und koP-IP, überlagerten sich jedoch ebenfalls exakt (Abbildung 3.15, rechte überlagerte Kurven). Die Fluoreszenzkurven der NR2B Amplifikation aus den WT und *Fmr1*^{-/-} FMRP-Präzipitaten (wtF-IP und koF-IP) zeigten im Gegensatz zu den beiden Kontrollen einen deutlichen Abstand zueinander (mittlere Kurven), wobei die wtF-IP Kurve vor der koF-IP Kurve die exponentielle Phase erreichte. Es konnten in diesem Experiment gleiche Mengen NR2B mRNA zusammen mit PABP aus WT und *Fmr1*^{-/-} Gehirnen präzipitiert werden. Für die Negativkontrolle, der IgG-Präzipitation, konnte im Vergleich zum PABP-Präzipitat nur eine geringe Menge NR2B mRNA unspezifisch pelletiert werden. Da die Kurven jedoch auch bei der Amplifikation von NR2B mRNA aus IgG-Präzipitat exakt übereinander lagen, ist diese unspezifische Präzipitation eine gleichmäßige Verunreinigung zwischen WT und *Fmr1*^{-/-} Präzipitat. Im FMRP-Präzipitat aus WT Gehirnlisat war im Unterschied zu den oben gezeigten Kontrollen mehr NR2B mRNA zu detektieren als im Präzipitat aus *Fmr1*^{-/-} Gehirnlisat. Obwohl zwischen wtF- und koF-IP im Gel kein Unterschied in der NR2B mRNA Menge zu detektieren war (Abbildung 3.14), konnte mittels RT-qPCR ein großer Unterschied in der Ausgangsmenge identifiziert werden. (Abbildung 3.15 und Abbildung 3.16). FMRP scheint demnach auch mit der NR2B mRNA zu interagieren.

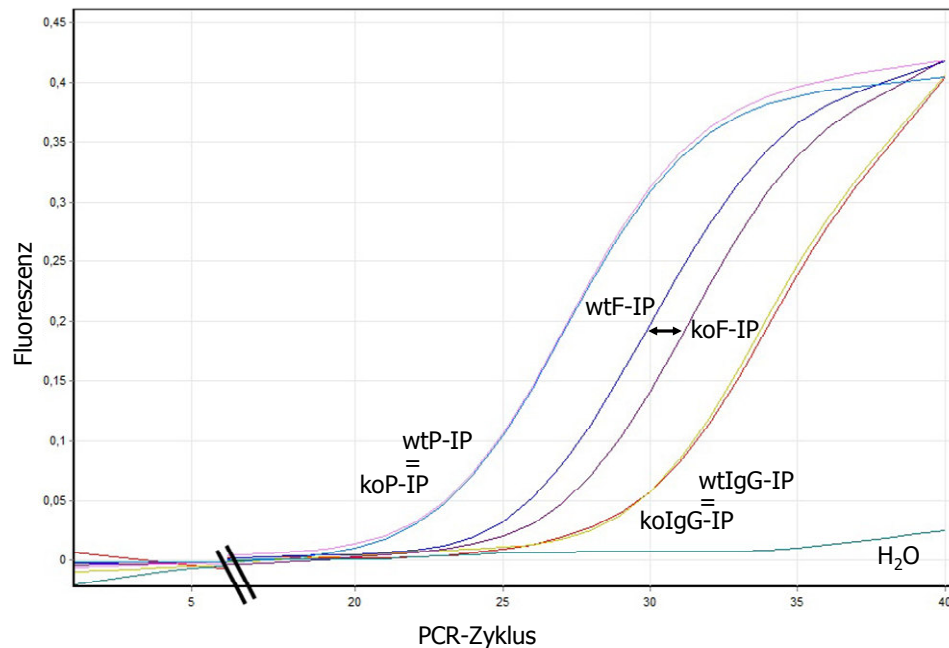


Abbildung 3.15: Fluoreszenzkurven von RT-qPCRs mit NR2B-Primern nach verschiedenen Präzipitationen

Die aus den verschiedenen Immunpräzipitationen isolierten RNAs wurden jeweils mit gleichem Volumen in RT-qPCR eingesetzt. Dabei wurde mit genspezifischen Oligonukleotiden eine bestimmte mRNA (hier das NR2B Transkript) in den Ansätzen detektiert. Anhand der Fluoreszenzkurven konnte gezeigt werden, dass in den Präzipitaten von PABP (Positivkontrolle, rosa und hellblau) viel NR2B mRNA präzipitiert wurde. Es gab jedoch keinen Mengenunterschied zwischen WT und *Fmr1*^{-/-} Lysat (wtP-IP=koP-IP). Mit dem IgG (Negativkontrolle, gelb und rot) konnte nur sehr wenig mRNA unspezifisch präzipitiert werden. Auch hier gab es keinen Mengenunterschied zwischen WT und *Fmr1*^{-/-} Lysat. Einzig bei der FMRP-Immunpräzipitation gab es einen deutlichen Unterschied zwischen den Fluoreszenzkurven von WT und ko Lysat (dunkelblau und lila). Anhand des Abstandes der Ct-Werte (ΔCt) zwischen den Kurven (Pfeil) kann der relative mRNA-Unterschied im Ausgangsmaterial ($\Delta Ct / 0,333$) errechnet werden.

Mit dieser Methode wurden weitere Transkripte hinsichtlich ihrer Präzipitation mit FMRP aus WT Lysaten im Vergleich zu *Fmr1*^{-/-} Lysaten untersucht und die Mengenunterschiede in den Präzipitaten relativ zueinander quantifiziert (Abbildung 3.16, $X_{RNA^{wt/ko}}$). Mit jeder neuen Präparation wurden für jede mRNA die Kurven der Positiv- und Negativkontrollen überprüft (PABP- und IgG-IP) und in weiteren Läufen die FMRP-Immunpräzipitationen analysiert. Die Bindung zwischen FMRP und den mRNAs von PSD-95 und Shank1 konnte bereits mittels Endproduktbestimmung bewiesen werden. Die RT-qPCR Analysen bestätigten dieses Ergebnis, beide Transkripte waren in der wtF-IP stärker konzentriert als in der koF-IP ($X_{RNA^{wt/ko}}$ PSD-95: $7,5 \pm 2,6$; $p < 0,001$; Shank1: $5,5 \pm 2,2$; $p < 0,001$). Alle drei untersuchten mRNAs der SAPAP-Familie (SAPAP1-3) waren in der wtF-IP ebenfalls stärker konzentriert ($X_{RNA^{wt/ko}}$ SAPAP1: $6,3 \pm 3,8$; $p < 0,001$; SAPAP2: $5,5 \pm 2,1$; $p < 0,001$; SAPAP3: $8,8 \pm 2,6$; $p < 0,001$). Außerdem konnte für die NMDAR-Untereinheiten NR1 und NR2 ($X_{RNA^{wt/ko}}$ NR1: $3,9 \pm 2,4$; $p = 0,002$; NR2B: $5 \pm 1,3$; $p = 0,003$) eine erhöhte Konzentration in der wtF-IP detektiert werden. Die mRNA des Gerüstproteins IRSp53 und die BC1 RNA waren in ihrer Konzentration zwischen wtF-IP und koF-IP nicht verändert ($X_{RNA^{wt/ko}}$ IRSp53: $1,1 \pm 0,8$; $p = 0,38$; BC1: $1,2 \pm 1$; $p = 0,93$). Die mRNAs von GluR1 und SAP97 waren in der wtF-IP

stärker konzentriert als in der koF-IP ($X_{\text{RNA wt/ko}}$ GluR1: $1,8 \pm 1,2$; $p=0,02$; SAP97: $1,8 \pm 0,9$; $p<0,001$). Diese Ergebnisse beweisen eine Interaktion zwischen FMRP und den Transkripten der SAPAP-Familie (SAPAP1-3) sowie den mRNAs von NR1 und NR2B. Transkripte des Gerüstproteins IRSp53 und die BC1 RNA werden nicht von FMRP gebunden. Die mRNAs von GluR1 und SAP97 waren zwar in der wtF-IP stärker konzentriert als in der koF-IP, da die Anreicherung dieser beiden mRNAs im Gegensatz zu den anderen mRNAs (4-9 fach) aber nicht sehr stark war, handelt es sich bei GluR1 und SAP97 mRNAs möglicherweise um schwach assoziierte oder indirekt gebundenen Interaktionspartner von FMRP.

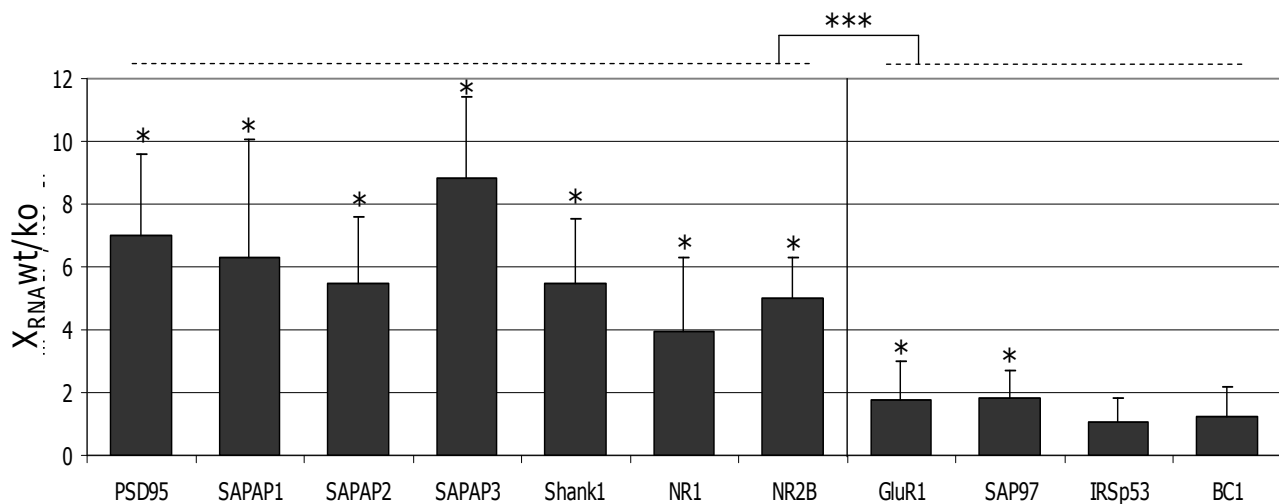


Abbildung 3.16: Identifikation neuer mRNA-Zielmoleküle von FMRP mittels Immunpräzipitation

Für die in der Abbildung dargestellten mRNAs wurden RT-qPCRs mit den jeweils spezifischen *Primer*paaren durchgeführt. Der Abstand der Ct-Werte aus wtF-IP und koF-IP wurde ermittelt und daraus der x-fache Unterschied in der WT Präzipitation gegenüber der *Fmr1*^{-/-} Präzipitation errechnet ($\Delta\text{Ct}/0,333 = X_{\text{RNA wt/ko}}$). Aus allen Läufen wurde der Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. *Die Signifikanz der einzelnen mRNAs beruht auf gepaarten t-Tests der Ct-Werte von wtF-IP und koF-IP. Für Details siehe Text. ***Die Signifikanz zwischen den subjektiv eingeteilten Klassen wurde mittels *mixed models* errechnet ($p<0,001$).

Anhand der identifizierten Mengenunterschiede zwischen WT und *Fmr1*^{-/-} Präzipitation mit FMRP-Antikörper lassen sich zwei Klassen bilden: die von FMRP gebundenen mRNAs (Abbildung 3.16, links vom Strich) und die mRNAs die nicht oder nur schwach von FMRP gebunden werden (Abbildung 3.16, rechts vom Strich). Diese beiden Klassen unterscheiden sich signifikant voneinander (*mixed models*, $p<0,001$).

3.5 FMRP-abhängige Translationsregulation von SAPAP3 und Shank1 mRNA-Molekülen

Im vorangegangenen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass FMRP die mRNAs von Shank1 und SAPAP3, zwei wichtigen Gerüstproteinen der postsynaptischen Dichte, *in vivo* bindet. Da die Konzentration dieser beiden Proteine in der PSD von *Fmr1*^{-/-} Tieren stark erhöht war, sollte untersucht werden, ob FMRP die Translation dieser mRNAs regulieren kann. Dazu

wurden sechs verschiedene eukaryotische Expressionsvektoren konstruiert, die alle jeweils zwei separate Gene enthalten die für die *Photinus* (PhoLuc) bzw. *Renilla* Luciferase (RenLuc) kodieren. Die RenLuc kodierenden Gene sind in allen Plasmiden identisch und die jeweilige gemessene Enzymaktivität wurde zur Normalisierung von unterschiedlichen Transfektionsraten verwendet. Die PhoLuc mRNAs, die von den sechs verschiedenen Vektoren kodiert werden, unterscheiden sich in ihrer 3' UTR Sequenz (untranslatierte Region, siehe Abbildung 3.17). Während Transkripte des pFiRe Vektors eine kurze rekombinante 3'UTR enthalten, besitzen von pFiRe:Shank1 (1-588) kodierte mRNAs die ersten 588 Nukleotide der Shank1 3'UTR inklusive eines *dendritic targeting elements* (DTE, Kindler et al., 2004). Die PhoLuc Transkripte der Vektoren pFiRe:Shank1 (1-200), pFiRe:Shank1 (200-400) und pFiRe:Shank1 (400-588) enthalten jeweils die proximalen Nukleotide 1-200, 200-400 und 400-588 der Shank1 3'UTR. Die von pFiRe:SAPAP3 kodierte PhoLuc mRNA besaß die komplette 3'UTR der SAPAP3 mRNA.

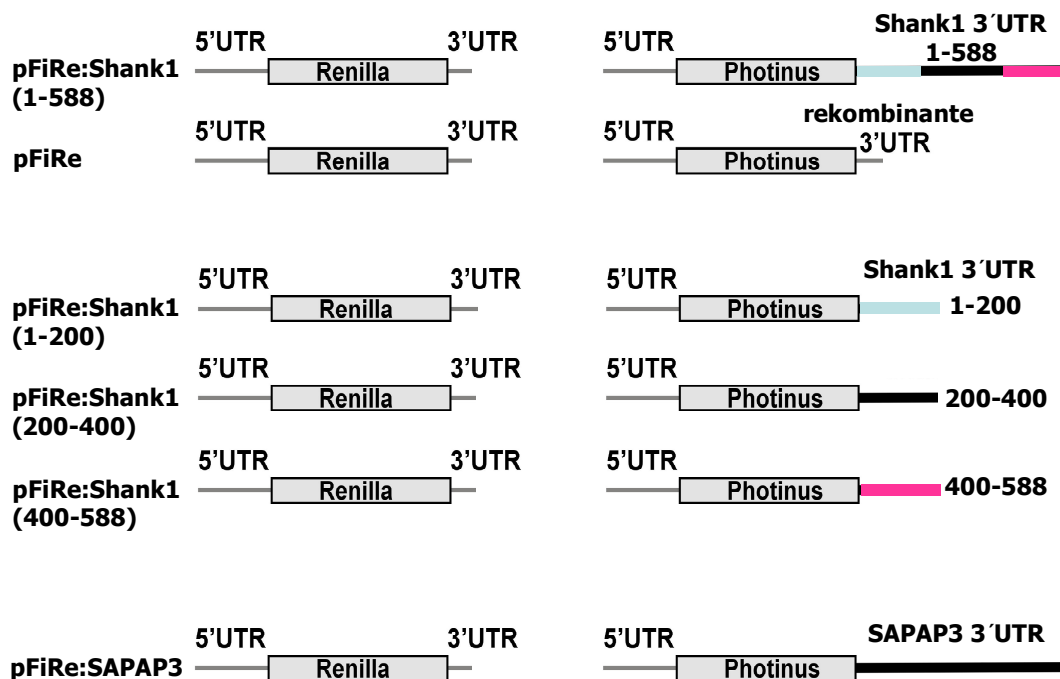


Abbildung 3.17: Aufbau der durch die Luciferase-Konstrukte kodierten mRNA-Moleküle zur Analyse der Translationsregulation durch FMRP

Alle sechs konstruierten eukaryotischen Expressionsvektoren enthalten zwei separate Gene, die für die *Photinus* (PhoLuc) oder *Renilla* Luciferase (RenLuc) kodieren. Die RenLuc mRNA war in allen Plasmiden identisch. Die PhoLuc mRNAs die von den sechs Vektoren kodiert werden, unterscheiden sich in ihrer 3' UTR Sequenz. Die Boxen repräsentieren die Region der mRNA die für die jeweilige Luciferase kodiert. Striche zeigen untranslatierte Regionen der mRNAs an. Für weitere Details, siehe Text.

Für die Analyse der Luciferase-Aktivität in WT und *Fmr1*^{-/-} Zellen wurden Mausfibroblasten (MEF = *mouse embryonic fibroblasts*) oder kultivierte Cortexneurone der Maus mit den verschiedenen Luciferase-Konstrukten transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen lysiert und geerntet. Die Enzym-Aktivitäten von PhoLuc und RenLuc wurden mittels Luminometer in den Zelllysaten bestimmt, und die Aktivität der PhoLuc wurde mit der Aktivität der RenLuc

normalisiert (nPhoLuc). Für die graphische Darstellung wurde der nPhoLuc WT Wert jeder Messung auf 100% gesetzt und der *Fmr1*^{-/-} Wert entsprechend berechnet (nPhoLucP). Die statistische Auswertung erfolgte mit dem gepaarten t-Test an den normalisierten Originalwerten (nPhoLuc).

WT und *Fmr1*^{-/-} MEF sowie sieben Tage alte Cortex cortikale Mausneurone wurden mit den eukaryotischen Expressionsvektoren pFiRe und pFiRe:SAPAP3 transfiziert, nach 24 Stunden geerntet und die PhoLuc und RenLuc Aktivitäten im Luminometer gemessen. In WT und *Fmr1*^{-/-} MEF die mit pFiRe transfiziert wurden, konnte kein Unterschied in der nPhoLuc Aktivität beobachtet werden (siehe Abbildung 3.19). In pFiRe:SAPAP3 transfizierten *Fmr1*^{-/-} MEF konnte signifikant mehr nPhoLuc Aktivität als in den WT MEFS gemessen werden (nPhoLucP *Fmr1*^{-/-}: 193% ± 112%, n=9, p=0,036; Abbildung 3.18). Mit pFiRe:SAPAP3 transfizierte Neurone hatten dagegen in WT und *Fmr1*^{-/-} Zellen die gleiche nPhoLuc Aktivität (nPhoLucP *Fmr1*^{-/-}: 122% ± 83%, n=13, p=0,97). Die Werte der Einzelmessungen streuten jedoch stark (rechtes Diagramm). In WT MEF inhibiert FMRP folglich die Translation der SAPAP3 mRNA über eine Interaktion mit der 3'UTR. Beim Fehlen von FMRP kommt es daher zu einer verstärkten Translation der SAPAP3 mRNA. Für Neurone lassen die Daten derzeit keine eindeutige Aussage über eine 3'UTR vermittelte Translationskontrolle der SAPAP3 mRNA durch FMRP zu.

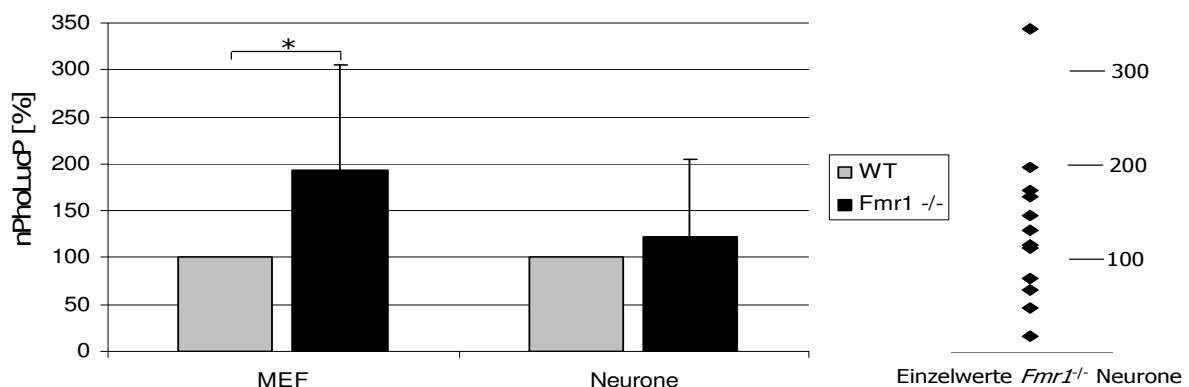


Abbildung 3.18: FMRP inhibiert in MEF die Translation der SAPAP3 mRNA über eine Interaktion mit der 3'UTR.

WT oder *Fmr1*^{-/-} MEF und Cortex Mausneurone wurden mit den verschiedenen Luciferase-Vektoren transfiziert. Die PhoLuc und RenLuc Aktivitäten wurden im Luminometer gemessen und nPhoLucP berechnet. Die PhoLuc mRNA mit SAPAP3 3'UTR besitzt in den *Fmr1*^{-/-} MEF signifikant mehr Aktivität als in den WT MEFS (193% ± 112%, n=9, p=0,036). In den Neuronen wurde in WT und *Fmr1*^{-/-} Zellen die gleiche PhoLuc Aktivität gemessen. Die Werte der Einzelmessungen streuten jedoch sehr stark (rechtes Diagramm). Weitere Details, siehe Text.

Die eukaryotischen Expressionsvektoren pFiRe und pFiRe:Shank1 wurden in WT und *Fmr1*^{-/-} MEF sowie sieben Tage alte cortikale Mausneurone eingebracht. Die Zellen wurden nach 24 Stunden geerntet und die PhoLuc und RenLuc Aktivitäten im Luminometer gemessen (weitere Details siehe oben). Die WT und *Fmr1*^{-/-} MEF die mit pFiRe transfiziert wurden

zeigten keinen Unterschied in der nPhoLuc Aktivität (nPhoLucP *Fmr1*^{-/-}: 88% ± 58%, n=7; Abbildung 3.19). In pFiRe:Shank1 transfizierten *Fmr1*^{-/-} MEF konnte eine leicht, jedoch nicht signifikant, stärkere nPhoLuc Aktivität als in den WT MEFS gemessen werden (nPhoLucP *Fmr1*^{-/-}: 125% ± 32%, n=11, p=0,098; Abbildung 3.19). In den Neuronen, die mit pFiRe:Shank1 transfiziert wurden, konnte dagegen in den *Fmr1*^{-/-} Zellen eine signifikant höhere nPhoLuc Aktivität (nPhoLucP *Fmr1*^{-/-}: 172% ± 76%, n=29, p<0,001) als in den WT Zellen gemessen werden. Die Aktivität der nPhoLuc in mit pFiRe transfizierten WT und *Fmr1*^{-/-} Neuronen unterschied sich nicht (nPhoLucP *Fmr1*^{-/-}: 101% ± 60%, p=0,29). In Neuronen inhibiert FMRP demnach die Translation der Shank1 mRNA über eine Interaktion mit der 3'UTR. Die Inhibition fehlt in den FMRP-defizienten Neuronen, so dass es dort zu einer verstärkten Translation der Shank1 mRNA kommt.

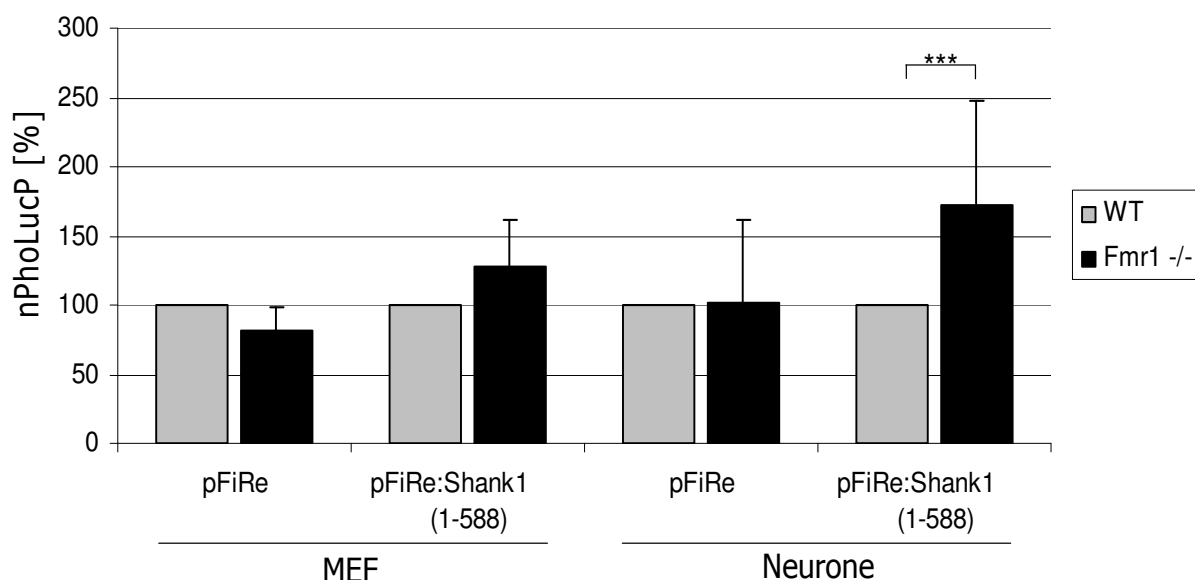


Abbildung 3.19: Die mRNA der PhoLuc mit Shank1 3'UTR (1-588) wird in *Fmr1*^{-/-} Neuronen verstärkt translatiert.

Cortex-Primärkulturen aus WT und *Fmr1*^{-/-} Embryonen (E18) sowie WT und *Fmr1*^{-/-} MEF wurden mit den Konstrukten pFiRe und pFiRe:Shank1 3'UTR (1-588) transfiziert und 24 Stunden später geerntet. Die Auswertung der im Luminometer gemessenen PhoLuc Aktivitäten erfolgte wie im Text beschrieben. Während mit pFiRe transfizierte Neurone und MEF sowie mit pFiRe:Shank1 transfizierte MEF die gleiche nPhoLuc Aktivität in WT und *Fmr1*^{-/-} Zellen zeigten, wurde die PhoLuc mRNA mit den ersten 588 Nukleotiden der Shank1 3'UTR beim Fehlen von FMRP in Neuronen verstärkt translatiert (nPhoLucP *Fmr1*^{-/-}: 172% ± 76%; n=29; gepaarter t-Test; p<0,001).

Es konnte hier gezeigt werden, dass die Regulation der Translation der Shank1 mRNA über FMRP und die 3'UTR des Transkriptes vermittelt wird. Um den Bereich der 3'UTR, der mit FMRP interagiert, näher einzugrenzen, wurden die Konstrukte pFiRe:Shank1 (1-200), pFiRe:Shank1 (200-400) und pFiRe:Shank1 (400-588) in Neurone eingebracht und die nPhoLuc Aktivitäten bestimmt (Abbildung 3.20; Details siehe oben). In mit pFiRe:Shank1 (1-200) transfizierten Neuronen konnte in den *Fmr1*^{-/-} Zellen eine etwas höhere, obwohl nicht signifikant veränderte, nPhoLuc Aktivität als in den WT Neuronen gemessen werden

(nPhoLucP *Fmr1*^{-/-}: 142% ± 69%; n=13; p=0,06). In Zellen die mit den beiden anderen Konstrukten pFiRe:Shank1 (200-400) und pFiRe:Shank1 (400-588) transfiziert wurden, konnte kein Aktivitätsunterschied der nPhoLuc zwischen WT und *Fmr1*^{-/-} Zellen beobachtet werden (nPhoLucP *Fmr1*^{-/-}: 200-400: 106% ± 64%, n=14, p=0,47 und 400-600: 122% ± 77%, n=9, p=0,35). Vermutlich sind die hier untersuchten Teilregionen für die FMRP vermittelte Translationsregulation nicht ausreichend. Es ist jedoch möglich, dass der vordere Bereich der 3'UTR (1-200) eine höhere Affinität als die anderen Regionen zu FMRP besitzt, da mit diesem Abschnitt die Luciferase-Aktivität am deutlichsten verändert war.

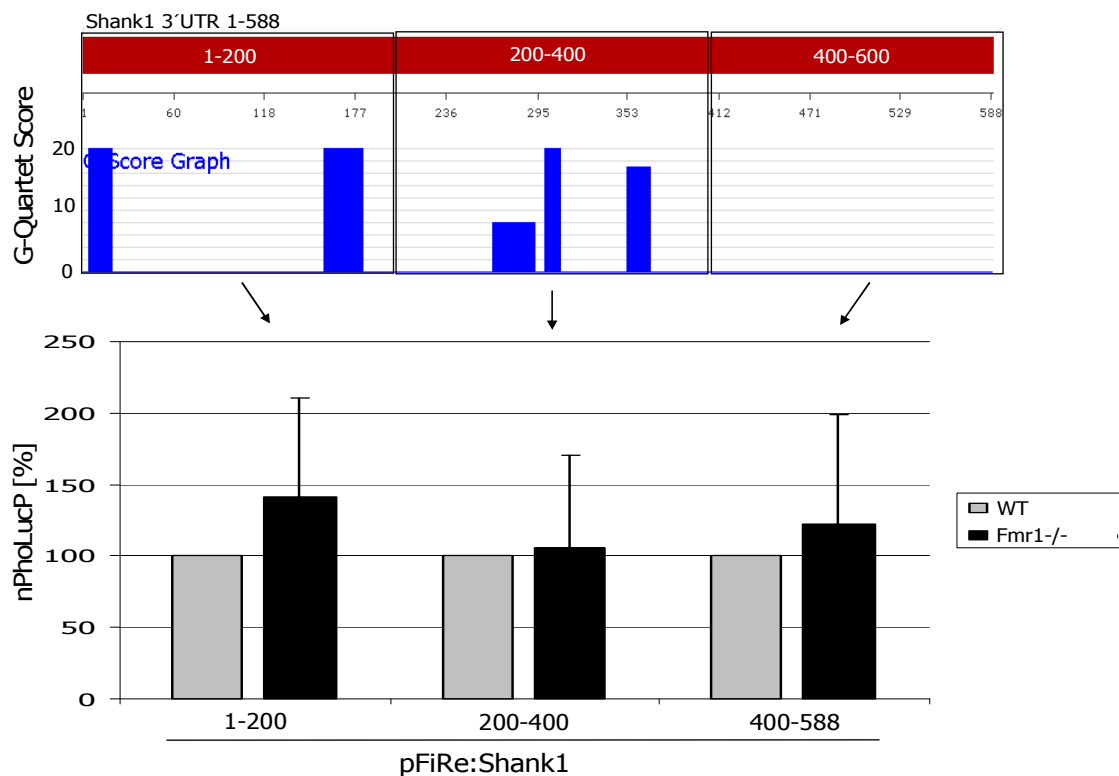


Abbildung 3.20: Die Translation der PhoLuc mRNA mit kurzen Fragmenten der Shank1 3'UTR ist in *Fmr1*^{-/-} Zellen nicht signifikant erhöht.

Cortex-Primärkulturen aus WT und *Fmr1*^{-/-} Embryonen (E18) wurden mit den Konstrukten pFiRe:Shank1 (1-200), pFiRe:Shank1 (200-400) und pFiRe:Shank1 (400-588) transfiziert und 24 Stunden später geerntet. Die Auswertung erfolgte im Text beschrieben. In mit pFiRe:Shank1 (1-200) transfizierten Neuronen konnte in *Fmr1*^{-/-} Zellen eine höhere, obwohl nicht signifikante, PhoLuc Aktivität als in WT Neuronen gemessen werden. In Zellen die mit den beiden anderen Konstrukten pFiRe:Shank1 (200-400) und pFiRe:Shank1 (400-588) transfiziert wurden, konnte kein Aktivitätsunterschied der PhoLuc zwischen WT und *Fmr1*^{-/-} Zellen beobachtet werden (Details siehe Text). Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Sequenzabfolge einer mRNA eine G-Quartet-Struktur bildet, lässt sich im G-Quartet-Score berechnen. Für die Shank1 3'UTR Sequenz wurden die Wahrscheinlichkeiten mit dem GQRS Mapper (Kikin et al., 2006) ermittelt. Die blauen Balken zeigen mögliche G-Quartet-Strukturen.

3.6 Einfluß von metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR) auf die Translation der Shank1 mRNA

Verschiedene Untersuchungen deuten darauf hin, dass FMRP in der Translationsregulation von Transkripten synaptischer Proteine wie z.B. PSD-95 eine Rolle spielt, die durch Aktivierung von metabotropen Glutamatrezeptoren moduliert wird (Todd et al., 2003). Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob die hier gezeigte FMRP-abhängige Translationsregulation der Shank1 mRNA (3.5) auch über eine Aktivierung der metabotropen Glutamatrezeptoren beeinflusst werden kann. Cortexneurone von WT und *Fmr1*^{-/-} Embryonen (Embryonaltag 18) wurden kultiviert und an Tag 14 in Kultur mit den Vektoren pFiRe bzw. pFiRe:Shank1 (1-588) transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit 0,1 mM DHPG, einem mGluR-Agonisten, für zehn Minuten stimuliert und anschließend geerntet. Die Luciferase-Aktivitäten wurden im Luminometer bestimmt. Die nPhoLuc wurden in den unstimulierten Kontrollen jeweils 100% gesetzt und die dazugehörigen Werte aus stimulierten Zellen entsprechend berechnet (nPhoLucP). Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem zweiseitigen t-Test an den normalisierten Originaldaten.

Die mit pFiRe transfizierten WT und *Fmr1*^{-/-} Neurone wiesen nach Stimulation mit DHPG, im Vergleich zu den unstimulierten Zellen, die gleiche nPhoLuc Aktivität auf (nPhoLucP + DHPG in WT: 71% ± 27%, n=7, p=0,08; in *Fmr1*^{-/-} : 90% ± 31%, n=9, p=0,38). In den WT Neuronen die mit pFiRe:Shank1 (1-588) transfiziert wurden, konnte nach DHPG-Stimulation eine erhöhte nPhoLuc Aktivität gemessen werden (WT mit pFiRe:Shank1; nPhoLucP + DHPG: 193% ± 91%, n=13, p=0,008). In den entsprechenden FMRP-defizienten Neuronen wurde nach Stimulation mit DHPG keine verstärkte PhoLuc Aktivität gemessen (*Fmr1*^{-/-} mit pFiRe:Shank1; nPhoLucP +DHPG: 119% ± 69%, n=10, p=0,6; Abbildung 3.21). Die PhoLuc mRNA mit rekombinanter 3'UTR wird demnach in der Translation durch Zugabe von DHPG weder in Wildtyp noch in *Fmr1*^{-/-} Cortexneuronen beeinflusst. In Wildtyp Neuronen wird die PhoLuc mRNA mit der Shank1 3'UTR (1-588) nach Aktivierung der metabotropen Glutamatrezeptoren durch DHPG verstärkt translatiert. Dieser Effekt ist in den FMRP-defizienten Neuronen nicht zu beobachten. Die Translation der PhoLuc mRNA wird demnach in WT Zellen durch FMRP über eine Interaktion mit der Shank1 3'UTR inhibiert. Diese Inhibierung wird durch Aktivierung von mGluR in WT Zellen aufgehoben, und die mRNA wird folglich verstärkt translatiert. Da FMRP in den *Fmr1*^{-/-} Zellen und somit auch die Blockierung der mRNA fehlt, kann es durch die Stimulierung nicht zu einer verstärkten Translation kommen.

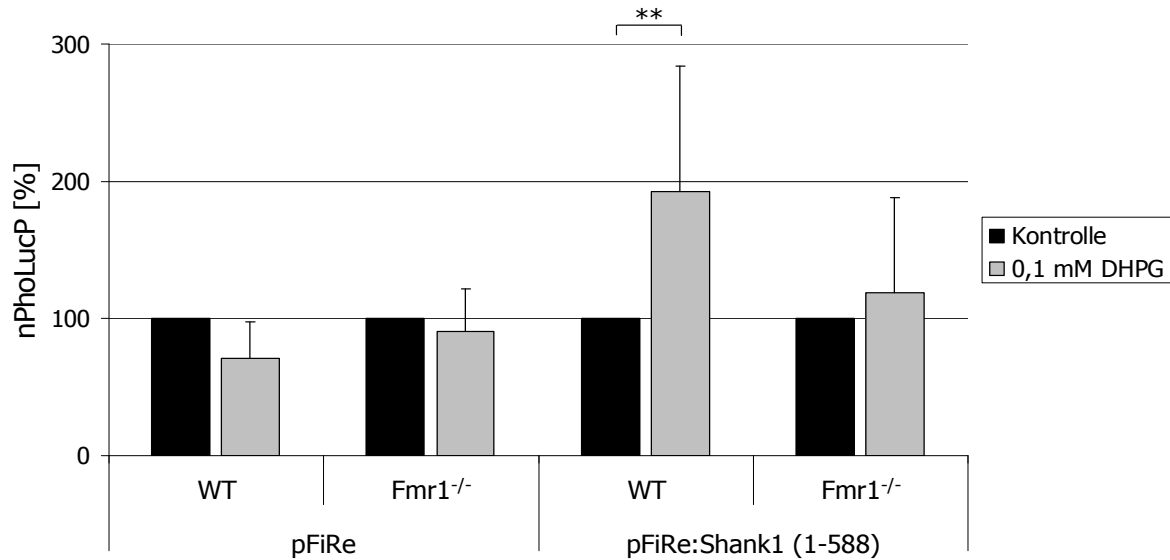


Abbildung 3.21: Die Translation der PhoLuc mRNA mit Shank1 3'UTR kann durch mGluR Stimulierung in WT Neuronen verstärkt werden.

Cortex-Primärkulturen aus WT und *Fmr1*^{-/-} Embryonen mit den Konstrukten pFiRe und pFiRe:Shank1 (1-588) transfiziert. Nach 24 Stunden wurden je Genotyp und Konstrukt eine Zellpopulation mit Wasser (Kontrolle, schwarze Balken) und eine mit 0,1mM DHPG (graue Balken) für zehn Minuten stimuliert und direkt im Anschluss geerntet. Während die mit pFiRe transfizierten WT und *Fmr1*^{-/-} Neurone nach Stimulation, im Vergleich zu den unstimulierten Zellen, die gleiche Aktivität zeigten, wurde in den WT Neuronen mit pFiRe:Shank1 (1-588) nach DHPG-Stimulation eine erhöhte PhoLuc Aktivität gemessen. In FMRP-defizienten Neuronen wurde nach Stimulation mit DHPG keine verstärkte PhoLuc Aktivität gemessen (Details siehe Text).

4 Diskussion

Der Verlust von FMRP führt in Menschen und in Mäusen zu einer veränderten Morphologie der dendritischen Dornen und einer gestörten Funktion der Synapsen (Bardoni et al., 2006; Bassell and Warren, 2008; Grossman et al., 2006; Jin and Warren, 2003). Die Morphologie und Funktion der Synapsen und dendritischen Dornen wird unter anderem über die Zusammensetzung der PSD reguliert. Es wird angenommen, dass FMRP die Translation von mRNAs postsynaptischer Proteine u.a. auch lokal in Dendriten reguliert (Bagni and Greenough, 2005; Darnell et al., 2005b; Garber et al., 2008; Oostra and Willemsen, 2009). Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob Proteine der postsynaptischen Dichte im Mausmodell durch den Verlust von FMRP in ihrer Konzentration verändert sind, diese Änderungen mit Konzentrationsänderungen der entsprechenden mRNA-Moleküle korrelieren und die Transkripte von PSD-Proteinen mit FMRP *in vivo* assoziiert sind. Zudem sollten die molekularen Grundlagen einer aktivitätsabhängigen Translationsregulation durch FMRP charakterisiert werden, um den Einfluss des Proteins auf bestimmte Proteine der PSD zu untersuchen, die möglicherweise zum Krankheitsbild des FRAX beitragen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Rezeptoruntereinheit NR1 sowohl in kortikalen als auch in hippocampalen PSD-Fraktionen FMRP-defizienter Tiere in erhöhter Konzentration vorkommt. Des Weiteren waren die Untereinheit NR2B im Hippocampus FMRP-defizienter Tiere vermehrt in der PSD zu detektieren. Es wurde nachgewiesen, dass die Transkripte der beiden NMDA-Rezeptoruntereinheiten NR1 und NR2B von FMRP *in vivo* gebunden werden. Da die mRNA Konzentrationen im Zytoplasma und an Synapsen unverändert waren, zeigen diese Befunde zusammengenommen, dass FMRP die Translation der NR1 und NR2B mRNAs vermutlich reprimiert, so dass die beobachtete erhöhte Proteinkonzentration in den PSD-Fraktionen FMRP-defizienter Tiere auf das Fehlen einer Translationsregulation durch FMRP zurückzuführen ist. In den PSD-Fraktionen adulter und juveniler FMRP-defizienter Tiere war die Konzentration der AMPAR-Untereinheit GluR1 im Vergleich zu WT Tieren signifikant erhöht, während die entsprechenden mRNA-Konzentrationen in Neuronen und an Synapsen unverändert waren. Dies liess vermuten, dass FMRP in WT Zellen die Translation der GluR1 mRNA reprimiert und es daher in Abwesenheit von FMRP zu einer verstärkten Synthese des Proteins kommt. Allerdings konnten die IP-Ergebnisse eine *in vivo* Assoziation der GluR1 mRNA mit FMRP nicht zweifelsfrei belegen. Diese geringe Affinität kann dadurch begründet sein, dass die Versuchsbedingungen sehr stringent gewählt wurden und das GluR1-Transkript in der Zelle nur mit Hilfe eines Ko-Faktors oder indirekt von FMRP gebunden werden kann. Eine Folge

könnte sein, dass FMRP die Translation der GluR1 mRNA gar nicht direkt reguliert. Die resultierende Änderung der Proteinkonzentration in den PSDs FMRP-defizienter Tiere könnte in diesem Fall eine indirekte Folge der FMRP Abwesenheit sein. Zusammengefasst könnten die hier gemessenen Konzentrationsänderungen einzelner Glutamatrezeptor-Untereinheiten eine veränderte Zusammensetzung von Glutamatrezeptoren in der Synapse bewirken. Die Zusammensetzung beeinflusst die Physiologie des Rezeptors und somit auch die Weiterleitung eingehender synaptischer Signale. Bei einer aberranten Rezeptorkomposition kann es daher zu kognitiven Beeinträchtigungen kommen (Groc et al., 2009; Lau and Zukin, 2007), die auch beim FRAX eine Rolle spielen könnten.

Im Unterschied zu den Rezeptoruntereinheiten war die postsynaptische Konzentration von SAP97 im Cortex von adulten FMRP-defizienten Tieren signifikant niedriger als in WT Tieren. Diese Tendenz war bereits in den zwei Wochen alten Tieren, wenn auch nicht signifikant, zu detektieren. Da die Transkriptkonzentrationen von SAP97 weder in der gesamten Zelle noch in den Synaptosomen verändert waren, lässt sich daraus folgern, dass FMRP in WT Zellen die Translation der SAP97 mRNA fördert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass FMRP die Translation nicht nur negativ beeinflussen, sondern auch als translationsaktivierender Faktor agieren kann (Bechara et al., 2009; Fahling et al., 2009). Aufgrund der hier gezeigten relativ schwachen *in vivo* Assoziation von SAP97 mRNA und FMRP könnte die Konzentrationsänderung auf Proteinebene allerdings auch aufgrund anderer Konzentrationsänderungen indirekt entstanden sein. Die Proteine SAP102 und PSD-95, welche mit SAP97 verwandt sind, waren sowohl in Cortex als auch in Hippocampus PSD-Präparationen von FMRP-defizienten und WT Tieren in gleicher Konzentration vorhanden. Zalfa et al. (2007) untersuchten die Konzentration von PSD-95 Transkripten und Proteinen im Hippocampus FMRP-defizienter Mäuse und wiesen eine niedrigere Konzentration von PSD-95 mRNA und Protein im Vergleich zu WT Tieren nach. Aufgrund dieser Ergebnisse, wurde eine stabilisierende Wirkung von FMRP auf die PSD-95 mRNA im Hippocampus postuliert. Auf der anderen Seite zeigten Muddashetty et al. (2007), dass in kultivierten Primärneuronen von FMRP-defizienten und WT Mäusen keine Veränderung in der PSD-95 mRNA Konzentration im Dendriten oder an der Synapse zu detektieren ist. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein, dass weder die PSD-95 mRNA in der gesamten Zelle oder selektiv an Synapsen, noch die Proteinkonzentration in der PSD FMRP-defizienter Tierer verändert ist. Zwar konnte hier und in anderen Publikationen gezeigt werden, dass die PSD-95 mRNA und FMRP miteinander assoziiert sind (Iacoangeli et al., 2008; Muddashetty et al., 2007; Todd et al., 2003; Zalfa et al., 2007), die zellulären Konsequenzen dieser Interaktion bleiben jedoch unklar. Und obwohl SAP102- und PSD-95-defiziente Mäuse verminderte Lernfähigkeit besitzen (Cuthbert et al., 2007; Migaud et al.,

1998) und der Funktionsverlust von SAP102 beim Menschen zu mentaler Retardierung führt (Tarpey et al., 2004), deuten die hier gezeigten Ergebnisse darauf hin, dass diese Proteine nicht zum Phänotyp des FRAX beitragen.

Die SAPAP2 Proteinkonzentration war in den hippocampalen PSD-Präparationen adulter FMRP-defizienter Tiere gegenüber den WT Tieren signifikant erhöht. Die entsprechende mRNA war in den adulten *Fmr1*^{-/-} Tieren ebenfalls in ihrer Konzentration erhöht. FMRP könnte demnach an der Regulation der SAPAP2 mRNA Stabilität beteiligt sein. Allerdings war die Proteinkonzentration in PSD-Fractionen aus juvenilen Hippocampi signifikant erhöht, obwohl die Konzentration der entsprechenden mRNA nicht verändert war. Zudem konnte hier gezeigt werden, dass die SAPAP2 mRNA und FMRP *in vivo* interagieren. Zusammenfassend deuten die Befunde daraufhin, dass FMRP vermutlich ebenfalls Einfluss auf die Translationsregulation der mRNA und nicht nur auf die Umsatzrate oder Stabilität des Transkriptes hat. Die Konzentration der SAPAP1 und SAPAP3 Transkripte waren weder in der gesamten Zelle noch an Synapsen in den FMRP-defizienten Tieren gegenüber WT Tieren verändert. Da die SAPAP3 mRNA dendritisch lokalisiert ist (Kindler et al., 2004), in den FMRP-defizienten Tieren aber keine Konzentrationsänderung in Synaptosomen zu detektieren war, lässt sich folgern, dass FMRP weder den subzellulären Transport noch die Stabilität des Transkriptes beeinflusst. Die Proteinmenge war dagegen in den PSDs im Cortex (SAPAP1) bzw. im Hippocampus (SAPAP3) von FMRP ko Tieren deutlich größer als in den Wildtyp Tieren. Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Transkripte von SAPAP1 und SAPAP3 *in vivo* mit FMRP interagieren, sind die Änderungen in der Proteinmenge von FMRP-defizienten Tieren vermutlich auf eine fehlende Translationsregulation in Abwesenheit von FMRP zurückzuführen. In Übereinstimmung mit der hier beschriebenen erhöhten SAPAP3 Konzentration in PSD-Fractionen von FMRP-defizienten Mäusen beobachteten Narayanan et al. (2008) sowohl bei einer funktionellen Inhibition von FMRP als auch in FMRP-defizienten hippocampalen Lysaten ebenfalls eine erhöhte Konzentration von SAPAP3 im Vergleich zu WT Lysaten. Zudem wurde in der Studie von Brown et al. (2001) die SAPAP3 mRNA als eine der elf bedeutendsten neuronalen mRNAs, die mit FMRP assoziiert sind, identifiziert. In dieser Arbeit konnte die 3' UTR der SAPAP3 mRNA als potentielle Bindungsregion von FMRP identifiziert werden. Die untersuchten Luciferase mRNAs mit SAPAP3 3'UTR wurden in FMRP-defizienten Mausfibroblasten signifikant stärker translatiert als in den Kontrollzellen. Die Translationsniveaus die in den Cortexneuronen aus WT und FMRP-defizienten Mäusen gemessen wurden, zeigten im Unterschied zu den MEF kein eindeutiges Ergebnis. Möglicherweise kann FMRP die Translation der SAPAP3 mRNA sowohl positiv als auch negativ, in Abhängigkeit vom Zustand bzw. der Aktivität der untersuchten Zellen, beeinflussen. Narayanan et al. (2007) konnten z.B. zeigen, dass nach Stimulation

metabotroper Glutamatrezeptoren mit DHPG in kultivierten Cortexneuronen weniger SAPAP3 gebildet wird. Außerdem war SAPAP3 in den hippocampalen PSD-Fraktionen adulter Tiere in erhöhter Konzentration zu finden, während die cortikalen PSD-Fraktionen juveniler Tiere eine verringerte Menge SAPAP3 aufwiesen. Zusammen mit den hier generierten Daten lässt sich folgern, dass FMRP die Translation aller Mitglieder der SAPAP-Familie reguliert und somit einen direkten Einfluss auf die Gerüstproteinzusammensetzung in der PSD hat. SAPAP3-defiziente Mäuse zeigen phänotypische Verhaltensweisen, die an Zwangsneurosen von Menschen erinnern (Welch et al., 2007). Diese Beobachtung veranschaulicht die Bedeutung der SAPAP-Gerüstproteine für die korrekte Funktion von Synapsen und unterstützt die Hypothese, dass veränderte Mengen dieser Proteinfamilie zur Fehlfunktion der Synapsen beim FRAX beitragen.

Wie auch die Proteine der SAPAP-Familie kann IRSp53 über PSD-95 Glutamatrezeptoren mit Shank-Proteinen verbinden. Die hier gezeigte Anreicherung von IRSp53 in den hippocampalen PSD-Fraktionen adulter FMRP-defizienter Mäuse gegenüber WT Mäusen könnte demnach eine ähnliche Rolle beim FRAX spielen wie die Konzentrationserhöhung der SAPAPs. Die Bedeutung von IRSp53 für die Funktion von Synapsen wird deutlich in IRSp53-defizienten Mäusen, die ein vermindertes Lern- und Erinnerungsvermögen aufweisen (Kim et al., 2009; Sawallisch et al., 2009). Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die mRNA von IRSp53 *in vivo* nicht von FMRP gebunden wird, ist es jedoch eher unwahrscheinlich, dass FMRP direkt die Translation der IRSp53 mRNA reguliert und die erhöhte Konzentration von IRSp53 in der hippocampalen PSD-Fraktion mit der fehlenden Translationsinhibition zusammenhängt. IRSp53 könnte möglicherweise infolge der verstärkten Synthese und folglich erhöhten Konzentration von Shank1, SAPAP2 und SAPAP3 in der PSD vermehrt in diese rekrutiert werden.

Die vorherrschende Hypothese zur Ursache der synaptischen Fehlfunktion und der mentalen Retardierung beim FRAX ist, dass durch das fehlende Protein FMRP eine verstärkte Proteinsynthese an den Synapsen stattfindet (Bassell and Warren, 2008; Bear et al., 2008; Pfeiffer and Huber, 2009). Diese Hypothese ist mit den hier dargestellten Ergebnissen konform, da bis auf SAP97 im adulten und SAPAP3 im juvenilen Cortex, alle weiteren untersuchten Proteine, wenn sie in ihrer Konzentration verändert waren, in den FMRP-defizienten PSD-Fraktionen in erhöhter Konzentration zu finden waren. Diese verstärkte Synthese in Abwesenheit von FMRP konnte in dieser Arbeit erstmals auch für Shank1 gezeigt werden. Shank1 ist ein weiteres sehr wichtiges Protein des PSD, dessen mRNA dendritisch lokalisiert ist (Falley et al., 2009). In der Analyse von Shank1 in PSD-Fraktionen konnte sowohl im Cortex als auch im Hippocampus FMRP-defizienter Mäuse in dieser Arbeit eine erhöhte Proteinkonzentration beobachtet werden. Die zytoplasmatische sowie die

synaptische Menge des Shank1 Transkriptes war in WT und *Fmr1*^{-/-} Gehirnlysaten, sowohl im Cortex als auch im Hippocampus gleich. Diese Ergebnisse gehen mit Experimenten in kultivierten Hippocampusneuronen von FMRP-defizienten und Wildtyp Mäusen einher, in denen kein Unterschied in der Shank1 mRNA Konzentration detektiert wurde (Zalfa et al., 2007). FMRP scheint demnach keinen Einfluss auf die Stabilität des Shank1 Transkriptes oder den Transport der mRNA in Dendriten zu haben. In dieser Arbeit konnte erstmals die *in vivo* Assoziation von Shank1 mRNA und FMRP nachgewiesen werden, so dass die erhöhte Proteinkonzentration in der PSD FMRP-defizienter Tiere direkt auf eine fehlende Translationsinhibition durch FMRP zurückgeführt werden kann. In FMRP-defizienten Neuronen wurde im Vergleich zu WT Neuronen eine erhöhte Translationsrate für eine Reporter mRNA mit Shank1 3'UTR gemessen. Das lässt den Schluß zu, dass die Translationsregulation der Shank1 mRNA durch FMRP über eine Interaktion mit der 3'UTR der mRNA vermittelt wird. Durch diese Interaktion zwischen Shank1 mRNA 3'UTR und FMRP wird in Neuronen aus WT Tieren demnach die Translation des Shank1 Transkriptes normalerweise blockiert. Da diese Blockierung der Translation in FMRP-defizienten Zellen fehlt, kommt es dort zu einer verstärkten Translation der Shank1 mRNA. Diese Beobachtung geht einher mit der höheren Shank1 Konzentration in der postsynaptischen Dichte FMRP-defizienter Tiere gegenüber WT Tieren (Abbildung 4.1). Während dieser Effekt in Neuronen eindeutig beobachtet werden konnte, gab es in der Analyse der Translation von Reporter mRNA mit Shank1 3'UTR in Mausfibroblasten keinen Unterschied zwischen WT und FMRP-defizienten Zellen. Dies könnte daran liegen, dass in den Fibroblasten wichtige Faktoren fehlen, die zur Translationsregulation neuronaler mRNAs benötigt werden, und die im Unterschied zu den Fibroblasten in den Neuronen endogen vorhanden sind.

Neben der gezeigten translationalen Fehlregulation im Grundzustand eines Neurons wurde für FMRP auch bereits eine Beteiligung an der Translationsregulation von mRNA-Molekülen nach synaptischer Aktivierung gezeigt, welche bei FMRP-Defizienz ebenfalls gestört ist (Bassell and Warren, 2008; Bear et al., 2008; Pfeiffer and Huber, 2009). Die Inhibierung der Translation einer mRNA durch FMRP kann durch die Aktivierung metabotroper Glutamatrezeptoren aufgehoben werden, so dass die entsprechende mRNA anschließend vermehrt translatiert wird. Diese aktivitätsabhängige mGluR-vermittelte Translation konnte in dieser Arbeit erstmals auch für das Shank1 Transkript gezeigt werden. Nach Stimulierung von mGluR mit dem Agonisten DHPG wurde eine Reporter mRNA mit den ersten 588 Nukleotiden der Shank1 3'UTR stärker translatiert als im Kontrollversuch. Diese durch Aktivität induzierte Translation konnte in Neuronen aus FMRP-defizienten Mäusen nicht gezeigt werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch das Fehlen von FMRP zum einen bereits eine exzessive Translation der sonst inhibierten Transkripte besteht und dass

zum anderen ohne FMRP keine Translationsinhibition vorhanden ist, die nach Aktivierung der mGluR aufgehoben werden kann und eine verstärkte Translation zur Folge hätte (Abbildung 4.1). Um den Interaktionsbereich der Shank1 3'UTR mit FMRP näher einzugrenzen, wurden kleinere Fragmente des untersuchten proximalen Endes des 3'UTR zur weiteren Analyse verwendet. Dabei konnte die Assoziationsregion nicht weiter eingegrenzt werden. Aufgrund der größeren Wahrscheinlichkeit für die Bildung von G-Quartett-Strukturen und dem, wenn auch nicht signifikanten, größten Einfluss auf die Translation einer Reporter mRNA, sind die ersten 200 Nukleotide der Shank1 3'UTR als Interaktionsbereich mit FMRP am wahrscheinlichsten. Allerdings könnte die Fragmentierung der ersten 588 Nukleotide der Shank1 mRNA 3'UTR in drei kleinere Teile auch dazu geführt haben, dass das dort lokalisierte *Dendritic Targeting Element* (DTE) zerstört wurde (Boeckers et al., 2004) und somit ein Transport der Reporter mRNA mit den verschiedenen proximalen Shank1 mRNA 3'UTR Fragmenten aus den Nukleotiden 1-200, 200-400 bzw. 400-588 an Synapsen ohne das vollständige DTE im Versuch nicht mehr möglich war. Da nicht auszuschließen ist, dass FMRP auch mit anderen Regionen der Shank1 mRNA interagiert z.B. in der kodierenden Region, die nicht mit dem Luciferase-Reportersystem analysiert wurde, wurde bereits begonnen einen neuen experimentellen Ansatz zu etablieren, um die Kontaktstelle zwischen RNA und Protein genauer zu kartieren und charakterisieren. Dabei wird wie in den Versuchen zur *in vivo* Interaktion zwischen FMRP und bestimmten mRNAs verfahren. Nach der Präzipitation wird jedoch das isolierte FMRP mit den gebundenen mRNA-Molekülen mit Ribonuklease behandelt. Man geht davon aus, dass alle ungeschützten Teile der RNA verdaut werden, während die direkt an FMRP bindenden Regionen vor dem Abbau geschützt sind. In anschließenden RT-qPCR können dann die geschützten RNA-Bereiche identifiziert werden. Dazu werden mehrere Oligonukleotidpaare eingesetzt, die kleine Amplifikate (200 bp) in der PCR bilden, mit denen alle Bereiche einer mRNA analysiert werden. Wenn diese Methode etabliert ist, ließe sich auch für alle anderen von FMRP gebundenen mRNAs die genaue Bindungsstelle, ohne Radioaktivität benutzen zu müssen, kartieren.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass FMRP die Transkriptmenge von Shank1 in Neuronen nicht beeinflusst, beim Fehlen von FMRP aber die Translation der Shank1 mRNA gestört ist, so dass im Grundzustand der Zelle zuviel Shank1 synthetisiert wird (Abbildung 4.1). Da Shank1 alleine einen starken Einfluss auf die Morphologie der dendritischen Dornen hat (Sala et al., 2001), könnten die hier gezeigten Störungen in der Translationsregulation von Shank1 Transkripten zur Krankheitsausprägung des Fragilen X Syndroms erheblich beitragen. Hohe Konzentrationen Shank1 können die verstärkte Bildung dendritischer Dornen induzieren (Roussignol et al., 2005).

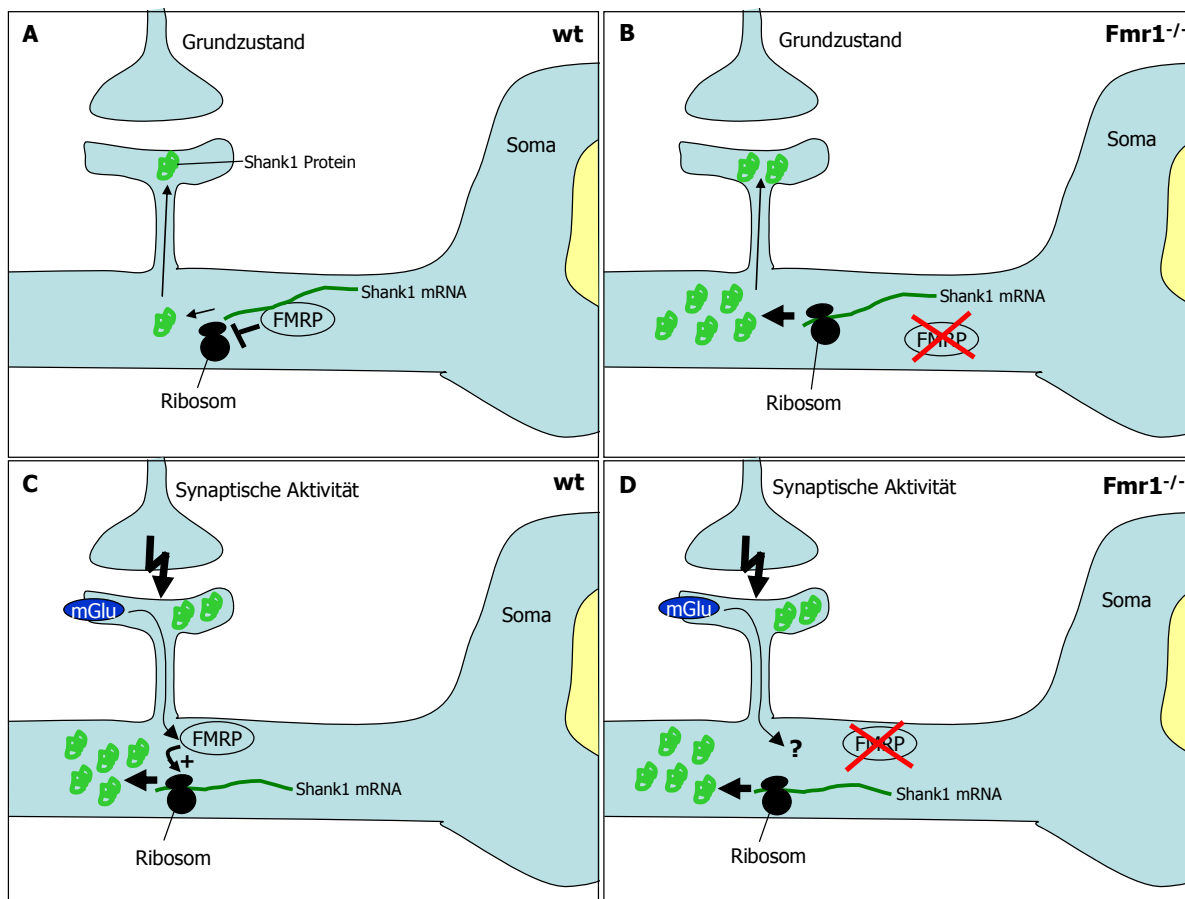


Abbildung 4.1: Translationsregulation der Shank1 mRNA durch FMRP in Dendriten

Dargestellt ist schematisch die Translationsregulation von dendritisch lokalisierter Shank1 mRNA durch FMRP in Dendriten. Bild A zeigt den Grundzustand in Neuronen von Wildtyp Tieren. FMRP inhibiert die Synthese von Shank1, so dass nur eine geringe Menge Protein vorhanden ist und in die PSD eingebaut werden kann. In Bild B wird in den Neuronen FMRP-defizienter Mäuse die Translation der Shank1 mRNA nicht inhibiert, da FMRP fehlt. Das Protein wird verstärkt synthetisiert und in die PSD eingebaut. Bild C und D stellen die Situation in den beiden Neuronen dar, wenn synaptische Aktivität metabotrope Glutamatrezeptoren beeinflusst. Während die Translation synaptischer Proteine in Wildtyp Neuronen gesteigert wird (C), kann die bereits im Grundzustand gesteigerte Syntheserate in FMRP-defizienten Neuronen (B) durch synaptische Aktivität nicht noch weiter verstärkt werden (D), da es keinen Inhibitor (FMRP) gibt, der daraufhin die Translation nicht mehr reprimiert.

Bei Patienten mit Fragilem X Syndrom könnten die erhöhten Mengen Shank1 möglicherweise auch dendritische Dornen stabilisieren, die ansonsten während der Reifung des Gehirns verloren gegangen wären. Es scheint für eine korrekte Funktion der Synapse essentiell zu sein, dass die Shank-Menge in der PSD exakt reguliert wird. Diese These wird durch die Tatsache unterstützt, dass der Verlust von nur einer Kopie des *Shank3* Gens beim Menschen im 22q13 Deletions-Syndrom (Phelan-McDerimid Syndrom) zur mentalen Retardierung führt (Bonaglia et al., 2001; Wilson et al., 2003). Proteine der Shank-Familie zählen zu den Hauptgerüstproteinen der postsynaptischen Dichte und regulieren die Größe und Gestalt von dendritischen Dornen aufgrund ihrer Fähigkeit mit vielen verschiedenen PSD-Bestandteilen direkt zu interagieren (Gundelfinger et al., 2006). Daher lässt sich vermuten, dass die erhöhte Shank-Menge in den Synapsen von FMRP-defizienten Individuen große Auswirkungen auf die mentalen Fähigkeiten von Patienten mit Fragilem X Syndrom hat.

5 Zusammenfassung

Das Fragile X Syndrom ist die zweithäufigste Ursache für genetisch bedingte mentale Retardierung beim Menschen. In Neuronen bewirkt das Fehlen des *Fragile X Mental Retardation Proteins* (FMRP) morphologische Veränderungen an dendritischen Dornen exzitatorischer Synapsen. Die Morphologie dendritischer Dornen beeinflusst die synaptische Plastizität und folglich Lern- und Gedächtnisprozesse im Gehirn. FMRP ist ein RNA-bindendes Protein, welches u.a. die Translation gebundener mRNA-Moleküle reguliert. Besonders bei der in Abhängigkeit von synaptischer Aktivität lokalen Translationsregulation in Dendriten scheint FMRP eine wichtige Rolle zu spielen. Eine zentrale Struktur in dendritischen Dornen ist die postsynaptische Dichte (PSD), deren Zusammensetzung die Morphologie und Funktion der dendritischen Dornen beeinflusst. In dieser Arbeit wurden Gerüstproteine und Rezeptoruntereinheiten identifiziert, deren Konzentration in der PSD FMRP-defizienter verändert ist. Derartige Veränderungen können zu einer veränderten Morphologie und folglich der mentalen Retardierung beitragen. In Abhängigkeit von der untersuchten Gehirnregion und dem Alter der Mäuse konnten verschiedene Proteine wie z.B. Mitglieder der Shank- und SAPAP-Familie identifiziert werden, deren Konzentration in Abwesenheit von FMRP verändert war. Diese Proteine sind Hauptbestandteile der PSD, die durch ihre Interaktion mit vielen weiteren Proteinen einen großen Einfluss auf die molekulare Zusammensetzung und Funktionalität der PSD haben. Die beobachteten Konzentrationsänderungen der Proteine korrelierten nicht mit veränderten Konzentrationen der entsprechenden Transkripte in den untersuchten Gehirnregionen, weder in der gesamten Zelle noch an Synapsen. Die in den FMRP-defizienten Tieren veränderte Proteinkonzentration scheint demnach auf eine fehlregulierte Translation und weniger auf eine veränderte Transkription, mRNA-Stabilität oder einen veränderten subzellulären Transport der Transkripte zurückzuführen zu sein. Für Shank1 und SAPAP Transkripte konnte zudem eine *in vivo* Assoziation mit FMRP nachgewiesen werden. Diese Befunde zeigen, dass FMRP die Translation dieser Transkripte und folglich auch die Konzentration von Shank1 und den SAPAPs in der PSD beeinflusst. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Translationsregulation der Shank1 mRNA über eine Interaktion der 3'UTR mit FMRP erfolgt. Zudem wird die durch FMRP inhibierte Translation der Shank1 mRNA durch synaptische Aktivität aktiviert. Dieser Mechanismus ist in Abwesenheit von FMRP gestört, so dass die aktivitätsabhängige Synthese von Shank1 in FMRP-defizienten Tieren fehlt. Die Konzentration von Shank1 kann nach synaptischer Aktivität nicht mehr reguliert werden, was vermutlich

negative Auswirkungen auf die synaptische Plastizität hat. Die in dieser Arbeit identifizierten Veränderungen FMRP-defizienter Mäuse beeinflussen die Zusammensetzung der postsynaptischen Dichte und könnten daher zum morphologischen Phänotyp und folglich zur mentalen Retardierung beim Fragilen X Syndrom beitragen.

6 Literaturverzeichnis

- Abitbol, M., Menini, C., Delezoide, A. L., Rhyner, T., Vekemans, M., and Mallet, J. (1993). Nucleus basalis magnocellularis and hippocampus are the major sites of FMR-1 expression in the human fetal brain. *Nat Genet* *4*, 147-153.
- Anzai, K., Kobayashi, S., Kitamura, N., Kanai, Y., Nakajima, H., Suehiro, Y., and Goto, S. (1986). Isolation and sequencing of a genomic clone for mouse brain specific small RNA. *J Neurochem* *47*, 673-677.
- Ashley, C. T., Jr., Wilkinson, K. D., Reines, D., and Warren, S. T. (1993). FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding. *Science* *262*, 563-566.
- Bagni, C., and Greenough, W. T. (2005). From mRNP trafficking to spine dysmorphogenesis: the roots of fragile X syndrome. *Nat Rev Neurosci* *6*, 376-387.
- Bardoni, B., Davidovic, L., Bensaid, M., and Khandjian, E. W. (2006). The fragile X syndrome: exploring its molecular basis and seeking a treatment. *Expert Rev Mol Med* *8*, 1-16.
- Bardoni, B., Schenck, A., and Mandel, J. L. (1999). A novel RNA-binding nuclear protein that interacts with the fragile X mental retardation (FMR1) protein. *Hum Mol Genet* *8*, 2557-2566.
- Bassell, G. J., and Warren, S. T. (2008). Fragile X syndrome: loss of local mRNA regulation alters synaptic development and function. *Neuron* *60*, 201-214.
- Baude, A., Nusser, Z., Roberts, J. D., Mulvihill, E., McIlhinney, R. A., and Somogyi, P. (1993). The metabotropic glutamate receptor (mGluR1 alpha) is concentrated at perisynaptic membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction. *Neuron* *11*, 771-787.
- Bear, M. F., Dolen, G., Osterweil, E., and Nagarajan, N. (2008). Fragile X: translation in action. *Neuropsychopharmacology* *33*, 84-87.
- Bear, M. F., Huber, K. M., and Warren, S. T. (2004). The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends Neurosci* *27*, 370-377.
- Bechara, E. G., Didiot, M. C., Melko, M., Davidovic, L., Bensaid, M., Martin, P., Castets, M., Pognonec, P., Khandjian, E. W., Moine, H., and Bardoni, B. (2009). A novel function for fragile X mental retardation protein in translational activation. *PLoS Biol* *7*, e16.
- Boeckers, T. M. (2006). The postsynaptic density. *Cell Tissue Res* *326*, 409-422.
- Boeckers, T. M., Segger-Junius, M., Iglauer, P., Bockmann, J., Gundelfinger, E. D., Kreutz, M. R., Richter, D., Kindler, S., and Kreienkamp, H. J. (2004). Differential expression and dendritic transcript localization of Shank family members: identification of a dendritic targeting element in the 3' untranslated region of Shank1 mRNA. *Mol Cell Neurosci* *26*, 182-190.
- Bonaglia, M. C., Giorda, R., Borgatti, R., Felisari, G., Gagliardi, C., Selicorni, A., and Zuffardi, O. (2001). Disruption of the ProSAP2 gene in a t(12;22)(q24.1;q13.3) is associated with the 22q13.3 deletion syndrome. *Am J Hum Genet* *69*, 261-268.

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* *72*, 248-254.
- Brendel, C., Rehbein, M., Kreienkamp, H. J., Buck, F., Richter, D., and Kindler, S. (2004). Characterization of Staufin 1 ribonucleoprotein complexes. *Biochem J* *384*, 239-246.
- Brown, V., Jin, P., Ceman, S., Darnell, J. C., O'Donnell, W. T., Tenenbaum, S. A., Jin, X., Feng, Y., Wilkinson, K. D., Keene, J. D., *et al.* (2001). Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. *Cell* *107*, 477-487.
- Burd, C. G., and Dreyfuss, G. (1994). Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* *265*, 615-621.
- Buselmaier, W., and Tariverdian, G. (2007). *Humangenetik*, 4. Auflage edn (Heidelberg, Springer).
- Carlin, R. K., Grab, D. J., Cohen, R. S., and Siekevitz, P. (1980). Isolation and characterization of postsynaptic densities from various brain regions: enrichment of different types of postsynaptic densities. *J Cell Biol* *86*, 831-845.
- Castets, M., Schaeffer, C., Bechara, E., Schenck, A., Khandjian, E. W., Luche, S., Moine, H., Rabilloud, T., Mandel, J. L., and Bardoni, B. (2005). FMRP interferes with the Rac1 pathway and controls actin cytoskeleton dynamics in murine fibroblasts. *Hum Mol Genet* *14*, 835-844.
- Castren, M., Haapasalo, A., Oostra, B. A., and Castren, E. (2001). Subcellular localization of fragile X mental retardation protein with the I304N mutation in the RNA-binding domain in cultured hippocampal neurons. *Cell Mol Neurobiol* *21*, 29-38.
- Chetkovich, D. M., Chen, L., Stocker, T. J., Nicoll, R. A., and Brecht, D. S. (2002). Phosphorylation of the postsynaptic density-95 (PSD-95)/discs large/zona occludens-1 binding site of stargazin regulates binding to PSD-95 and synaptic targeting of AMPA receptors. *J Neurosci* *22*, 5791-5796.
- Cleveland, D. W., Fischer, S. G., Kirschner, M. W., and Laemmli, U. K. (1977). Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J Biol Chem* *252*, 1102-1106.
- Coffee, B., Zhang, F., Warren, S. T., and Reines, D. (1999). Acetylated histones are associated with FMR1 in normal but not fragile X-syndrome cells. *Nat Genet* *22*, 98-101.
- Comery, T. A., Harris, J. B., Willems, P. J., Oostra, B. A., Irwin, S. A., Weiler, I. J., and Greenough, W. T. (1997). Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 5401-5404.
- Corbin, F., Bouillon, M., Fortin, A., Morin, S., Rousseau, F., and Khandjian, E. W. (1997). The fragile X mental retardation protein is associated with poly(A)⁺ mRNA in actively translating polyribosomes. *Hum Mol Genet* *6*, 1465-1472.
- Cuthbert, P. C., Stanford, L. E., Coba, M. P., Ainge, J. A., Fink, A. E., Opazo, P., Delgado, J. Y., Komiyama, N. H., O'Dell, T. J., and Grant, S. G. (2007). Synapse-associated protein 102/dlgh3 couples the NMDA receptor to specific plasticity pathways and learning strategies. *J Neurosci* *27*, 2673-2682.

- Darnell, J. C., Fraser, C. E., Mostovetsky, O., Stefani, G., Jones, T. A., Eddy, S. R., and Darnell, R. B. (2005a). Kissing complex RNAs mediate interaction between the Fragile-X mental retardation protein KH2 domain and brain polyribosomes. *Genes Dev* *19*, 903-918.
- Darnell, J. C., Jensen, K. B., Jin, P., Brown, V., Warren, S. T., and Darnell, R. B. (2001). Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. *Cell* *107*, 489-499.
- Darnell, J. C., Mostovetsky, O., and Darnell, R. B. (2005b). FMRP RNA targets: identification and validation. *Genes Brain Behav* *4*, 341-349.
- De Boule, K., Verkerk, A. J., Reyniers, E., Vits, L., Hendrickx, J., Van Roy, B., Van den Bos, F., de Graaff, E., Oostra, B. A., and Willems, P. J. (1993). A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nat Genet* *3*, 31-35.
- de Vries, B. B., Halley, D. J., Oostra, B. A., and Niermeijer, M. F. (1998). The fragile X syndrome. *J Med Genet* *35*, 579-589.
- Deelen, W., Bakker, C., Halley, D. J., and Oostra, B. A. (1994). Conservation of CGG region in FMR1 gene in mammals. *Am J Med Genet* *51*, 513-516.
- Denman, R. B. (2003). Deja vu all over again: FMRP binds U-rich target mRNAs. *Biochem Biophys Res Commun* *310*, 1-7.
- Devys, D., Lutz, Y., Rouyer, N., Bellocq, J. P., and Mandel, J. L. (1993). The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. *Nat Genet* *4*, 335-340.
- Dolen, G., Osterweil, E., Rao, B. S., Smith, G. B., Auerbach, B. D., Chattarji, S., and Bear, M. F. (2007). Correction of fragile X syndrome in mice. *Neuron* *56*, 955-962.
- Dolzanskaya, N., Sung, Y. J., Conti, J., Currie, J. R., and Denman, R. B. (2003). The fragile X mental retardation protein interacts with U-rich RNAs in a yeast three-hybrid system. *Biochem Biophys Res Commun* *305*, 434-441.
- Eberhart, D. E., Malter, H. E., Feng, Y., and Warren, S. T. (1996). The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals. *Hum Mol Genet* *5*, 1083-1091.
- Ehlers, M. D. (2002). Molecular morphogens for dendritic spines. *Trends Neurosci* *25*, 64-67.
- Ehlers, M. D. (2003). Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. *Nat Neurosci* *6*, 231-242.
- Eichler, E. E., Richards, S., Gibbs, R. A., and Nelson, D. L. (1993). Fine structure of the human FMR1 gene. *Hum Mol Genet* *2*, 1147-1153.
- Fahling, M., Mrowka, R., Steege, A., Kirschner, K. M., Benko, E., Forstera, B., Persson, P. B., Thiele, B. J., Meier, J. C., and Scholz, H. (2009). Translational regulation of the human achaete-scute homologue-1 by fragile X mental retardation protein. *J Biol Chem* *284*, 4255-4266.
- Falley, K., Schutt, J., Iglauer, P., Menke, K., Maas, C., Kneussel, M., Kindler, S., Wouters, F. S., Richter, D., and Kreienkamp, H. J. (2009). Shank1 mRNA: dendritic transport by kinesin and translational control by the 5'untranslated region. *Traffic* *10*, 844-857.

- Feng, Y., Absher, D., Eberhart, D. E., Brown, V., Malter, H. E., and Warren, S. T. (1997). FMRP associates with polyribosomes as an mRNP, and the I304N mutation of severe fragile X syndrome abolishes this association. *Mol Cell* *1*, 109-118.
- Fisch, G. S., Hao, H. K., Bakker, C., and Oostra, B. A. (1999). Learning and memory in the FMR1 knockout mouse. *Am J Med Genet* *84*, 277-282.
- Fu, Y. H., Kuhl, D. P., Pizzuti, A., Pieretti, M., Sutcliffe, J. S., Richards, S., Verkerk, A. J., Holden, J. J., Fenwick, R. G., Jr., Warren, S. T., and et al. (1991). Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* *67*, 1047-1058.
- Galvez, R., and Greenough, W. T. (2005). Sequence of abnormal dendritic spine development in primary somatosensory cortex of a mouse model of the fragile X mental retardation syndrome. *Am J Med Genet A* *135*, 155-160.
- Garber, K. B., Visootsak, J., and Warren, S. T. (2008). Fragile X syndrome. *Eur J Hum Genet* *16*, 666-672.
- Gibson, T. J., Rice, P. M., Thompson, J. D., and Heringa, J. (1993). KH domains within the FMR1 sequence suggest that fragile X syndrome stems from a defect in RNA metabolism. *Trends Biochem Sci* *18*, 331-333.
- Gorlach, M., Burd, C. G., and Dreyfuss, G. (1994). The mRNA poly(A)-binding protein: localization, abundance, and RNA-binding specificity. *Exp Cell Res* *211*, 400-407.
- Groc, L., Bard, L., and Choquet, D. (2009). Surface trafficking of N-methyl-D-aspartate receptors: physiological and pathological perspectives. *Neuroscience* *158*, 4-18.
- Grossman, A. W., Elisseou, N. M., McKinney, B. C., and Greenough, W. T. (2006). Hippocampal pyramidal cells in adult *Fmr1* knockout mice exhibit an immature-appearing profile of dendritic spines. *Brain Res* *1084*, 158-164.
- Gundelfinger, E. D., Boeckers, T. M., Baron, M. K., and Bowie, J. U. (2006). A role for zinc in postsynaptic density asSAMBly and plasticity? *Trends Biochem Sci* *31*, 366-373.
- Harrison, C. J., Jack, E. M., Allen, T. D., and Harris, R. (1983). The fragile X: a scanning electron microscope study. *J Med Genet* *20*, 280-285.
- Hinds, H. L., Ashley, C. T., Sutcliffe, J. S., Nelson, D. L., Warren, S. T., Housman, D. E., and Schalling, M. (1993). Tissue specific expression of FMR-1 provides evidence for a functional role in fragile X syndrome. *Nat Genet* *3*, 36-43.
- Hinton, V. J., Brown, W. T., Wisniewski, K., and Rudelli, R. D. (1991). Analysis of neocortex in three males with the fragile X syndrome. *Am J Med Genet* *41*, 289-294.
- Holtmaat, A., Wilbrecht, L., Knott, G. W., Welker, E., and Svoboda, K. (2006). Experience-dependent and cell-type-specific spine growth in the neocortex. *Nature* *441*, 979-983.
- Husi, H., and Grant, S. G. (2001). Isolation of 2000-kDa complexes of N-methyl-D-aspartate receptor and postsynaptic density 95 from mouse brain. *J Neurochem* *77*, 281-291.
- Iacoangeli, A., Rozhdestvensky, T. S., Dolzhanskaya, N., Tournier, B., Schutt, J., Brosius, J., Denman, R. B., Khandjian, E. W., Kindler, S., and Tiedge, H. (2008). On BC1 RNA and the fragile X mental retardation protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 734-739.

- Irwin, S. A., Galvez, R., and Greenough, W. T. (2000). Dendritic spine structural anomalies in fragile-X mental retardation syndrome. *Cereb Cortex* *10*, 1038-1044.
- Jin, P., and Warren, S. T. (2003). New insights into fragile X syndrome: from molecules to neurobehaviors. *Trends Biochem Sci* *28*, 152-158.
- Ju, W., Morishita, W., Tsui, J., Gaietta, G., Deerinck, T. J., Adams, S. R., Garner, C. C., Tsien, R. Y., Ellisman, M. H., and Malenka, R. C. (2004). Activity-dependent regulation of dendritic synthesis and trafficking of AMPA receptors. *Nat Neurosci* *7*, 244-253.
- Keysor, C. S., and Mazzocco, M. M. (2002). A developmental approach to understanding Fragile X syndrome in females. *Microsc Res Tech* *57*, 179-186.
- Khandjian, E. W., Fortin, A., Thibodeau, A., Tremblay, S., Cote, F., Devys, D., Mandel, J. L., and Rousseau, F. (1995). A heterogeneous set of FMR1 proteins is widely distributed in mouse tissues and is modulated in cell culture. *Hum Mol Genet* *4*, 783-789.
- Khandjian, E. W., Huot, M. E., Tremblay, S., Davidovic, L., Mazroui, R., and Bardoni, B. (2004). Biochemical evidence for the association of fragile X mental retardation protein with brain polyribosomal ribonucleoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 13357-13362.
- Kikin, O., D'Antonio, L., and Bagga, P. S. (2006). QGRS Mapper: a web-based server for predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res* *34*, W676-682.
- Kiledjian, M., and Dreyfuss, G. (1992). Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *Embo J* *11*, 2655-2664.
- Kim, E., Cho, K. O., Rothschild, A., and Sheng, M. (1996). Heteromultimerization and NMDA receptor-clustering activity of Chapsyn-110, a member of the PSD-95 family of proteins. *Neuron* *17*, 103-113.
- Kim, E., and Sheng, M. (2004). PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci* *5*, 771-781.
- Kim, M. H., Choi, J., Yang, J., Chung, W., Kim, J. H., Paik, S. K., Kim, K., Han, S., Won, H., Bae, Y. S., *et al.* (2009). Enhanced NMDA receptor-mediated synaptic transmission, enhanced long-term potentiation, and impaired learning and memory in mice lacking IRSp53. *J Neurosci* *29*, 1586-1595.
- Kindler, S., Rehbein, M., Classen, B., Richter, D., and Bockers, T. M. (2004). Distinct spatiotemporal expression of SAPAP transcripts in the developing rat brain: a novel dendritically localized mRNA. *Brain Res Mol Brain Res* *126*, 14-21.
- Kistner, U., Wenzel, B. M., Veh, R. W., Cases-Langhoff, C., Garner, A. M., Appeltauer, U., Voss, B., Gundelfinger, E. D., and Garner, C. C. (1993). SAP90, a rat presynaptic protein related to the product of the Drosophila tumor suppressor gene dlg-A. *J Biol Chem* *268*, 4580-4583.
- Kobayashi, S., Anzai, K., and Goto, S. (1988). Nucleotide sequence of mouse genomic DNA coding for a brain specific small RNA. *Nucleic Acids Res* *16*, 360.
- Kooy, R. F., Oostra, B. A., and Willems, P. J. (1998). The fragile X syndrome and other fragile site disorders. *Results Probl Cell Differ* *21*, 1-46.

- Kremer, E. J., Pritchard, M., Lynch, M., Yu, S., Holman, K., Baker, E., Warren, S. T., Schlessinger, D., Sutherland, G. R., and Richards, R. I. (1991). Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)_n. *Science* *252*, 1711-1714.
- Laggerbauer, B., Ostareck, D., Keidel, E. M., Ostareck-Lederer, A., and Fischer, U. (2001). Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. *Hum Mol Genet* *10*, 329-338.
- Lau, C. G., and Zukin, R. S. (2007). NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* *8*, 413-426.
- Li, Z., Zhang, Y., Ku, L., Wilkinson, K. D., Warren, S. T., and Feng, Y. (2001). The fragile X mental retardation protein inhibits translation via interacting with mRNA. *Nucleic Acids Res* *29*, 2276-2283.
- Lu, R., Wang, H., Liang, Z., Ku, L., O'Donnell W, T., Li, W., Warren, S. T., and Feng, Y. (2004). The fragile X protein controls microtubule-associated protein 1B translation and microtubule stability in brain neuron development. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 15201-15206.
- McKinney, B. C., Grossman, A. W., Elisseou, N. M., and Greenough, W. T. (2005). Dendritic spine abnormalities in the occipital cortex of C57BL/6 Fmr1 knockout mice. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* *136B*, 98-102.
- Migaud, M., Charlesworth, P., Dempster, M., Webster, L. C., Watabe, A. M., Makhinson, M., He, Y., Ramsay, M. F., Morris, R. G., Morrison, J. H., *et al.* (1998). Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature* *396*, 433-439.
- Miki, T., Takano, K., and Yoneda, Y. (2005). The role of mammalian Staufen on mRNA traffic: a view from its nucleocytoplasmic shuttling function. *Cell Struct Funct* *30*, 51-56.
- Mineur, Y. S., Sluyter, F., de Wit, S., Oostra, B. A., and Crusio, W. E. (2002). Behavioral and neuroanatomical characterization of the Fmr1 knockout mouse. *Hippocampus* *12*, 39-46.
- Muddashetty, R., Khanam, T., Kondrashov, A., Bundman, M., Iacoangeli, A., Kremerskothen, J., Duning, K., Barnekow, A., Huttenhofer, A., Tiedge, H., and Brosius, J. (2002). Poly(A)-binding protein is associated with neuronal BC1 and BC200 ribonucleoprotein particles. *J Mol Biol* *321*, 433-445.
- Muddashetty, R. S., Kelic, S., Gross, C., Xu, M., and Bassell, G. J. (2007). Dysregulated metabotropic glutamate receptor-dependent translation of AMPA receptor and postsynaptic density-95 mRNAs at synapses in a mouse model of fragile X syndrome. *J Neurosci* *27*, 5338-5348.
- Muller, B. M., Kistner, U., Kindler, S., Chung, W. J., Kuhlendahl, S., Fenster, S. D., Lau, L. F., Veh, R. W., Haganir, R. L., Gundelfinger, E. D., and Garner, C. C. (1996). SAP102, a novel postsynaptic protein that interacts with NMDA receptor complexes in vivo. *Neuron* *17*, 255-265.
- Munroe, D., and Jacobson, A. (1990). mRNA poly(A) tail, a 3' enhancer of translational initiation. *Mol Cell Biol* *10*, 3441-3455.

Musco, G., Stier, G., Joseph, C., Castiglione Morelli, M. A., Nilges, M., Gibson, T. J., and Pastore, A. (1996). Three-dimensional structure and stability of the KH domain: molecular insights into the fragile X syndrome. *Cell* *85*, 237-245.

Naisbitt, S., Kim, E., Tu, J. C., Xiao, B., Sala, C., Valtschanoff, J., Weinberg, R. J., Worley, P. F., and Sheng, M. (1999). Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron* *23*, 569-582.

Narayanan, U., Nalavadi, V., Nakamoto, M., Pallas, D. C., Ceman, S., Bassell, G. J., and Warren, S. T. (2007). FMRP phosphorylation reveals an immediate-early signaling pathway triggered by group I mGluR and mediated by PP2A. *J Neurosci* *27*, 14349-14357.

Narayanan, U., Nalavadi, V., Nakamoto, M., Thomas, G., Ceman, S., Bassell, G. J., and Warren, S. T. (2008). S6K1 phosphorylates and regulates fragile X mental retardation protein (FMRP) with the neuronal protein synthesis-dependent mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling cascade. *J Biol Chem* *283*, 18478-18482.

Nusser, Z., Mulvihill, E., Streit, P., and Somogyi, P. (1994). Subsynaptic segregation of metabotropic and ionotropic glutamate receptors as revealed by immunogold localization. *Neuroscience* *61*, 421-427.

Ohashi, S., Koike, K., Omori, A., Ichinose, S., Ohara, S., Kobayashi, S., Sato, T. A., and Anzai, K. (2002). Identification of mRNA/protein (mRNP) complexes containing Puralpha, mStaufen, fragile X protein, and myosin Va and their association with rough endoplasmic reticulum equipped with a kinesin motor. *J Biol Chem* *277*, 37804-37810.

Oostra, B. A., and Chiurazzi, P. (2001). The fragile X gene and its function. *Clin Genet* *60*, 399-408.

Oostra, B. A., and Willemsen, R. (2009). FMR1: A gene with three faces. *Biochim Biophys Acta* *1790*, 467-477.

Palay, S. L., and Palade, G. E. (1955). The fine structure of neurons. *J Biophys Biochem Cytol* *1*, 69-88.

Park, S., Park, J. M., Kim, S., Kim, J. A., Shepherd, J. D., Smith-Hicks, C. L., Chowdhury, S., Kaufmann, W., Kuhl, D., Ryazanov, A. G., *et al.* (2008). Elongation factor 2 and fragile X mental retardation protein control the dynamic translation of Arc/Arg3.1 essential for mGluR-LTD. *Neuron* *59*, 70-83.

Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* *30*, e36.

Pfeiffer, B. E., and Huber, K. M. (2009). The State of Synapses in Fragile X Syndrome. *Neuroscientist*.

QPPD. Quantitative PCR Primer Database
<http://web.ncicrf.gov/rtp/gel/primerdb/default.asp>.

Redecker, P., Bockmann, J., and Bockers, T. M. (2006). Expression of postsynaptic density proteins of the ProSAP/Shank family in the thymus. *Histochem Cell Biol* *126*, 679-685.

- Riddle, J. E., Cheema, A., Sobesky, W. E., Gardner, S. C., Taylor, A. K., Pennington, B. F., and Hagerman, R. J. (1998). Phenotypic involvement in females with the FMR1 gene mutation. *Am J Ment Retard* *102*, 590-601.
- Robertson, K. D., and Wolffe, A. P. (2000). DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet* *1*, 11-19.
- Romorini, S., Piccoli, G., Jiang, M., Grossano, P., Tonna, N., Passafaro, M., Zhang, M., and Sala, C. (2004). A functional role of postsynaptic density-95-guanylate kinase-associated protein complex in regulating Shank assembly and stability to synapses. *J Neurosci* *24*, 9391-9404.
- Ronesi, J. A., and Huber, K. M. (2008). Metabotropic glutamate receptors and fragile x mental retardation protein: partners in translational regulation at the synapse. *Sci Signal* *1*, pe6.
- Roussignol, G., Ango, F., Romorini, S., Tu, J. C., Sala, C., Worley, P. F., Bockaert, J., and Fagni, L. (2005). Shank expression is sufficient to induce functional dendritic spine synapses in aspiny neurons. *J Neurosci* *25*, 3560-3570.
- Sala, C., Piech, V., Wilson, N. R., Passafaro, M., Liu, G., and Sheng, M. (2001). Regulation of dendritic spine morphology and synaptic function by Shank and Homer. *Neuron* *31*, 115-130.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual*, second edition edn, Cold Spring Harbor, NY Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *74*, 5463-5467.
- Sawallisch, C., Berhorster, K., Disanza, A., Mantoani, S., Kintscher, M., Stoenica, L., Dityatev, A., Sieber, S., Kindler, S., Morellini, F., *et al.* (2009). The insulin receptor substrate of 53 kDa (IRSp53) limits hippocampal synaptic plasticity. *J Biol Chem* *284*, 9225-9236.
- Schaeffer, C., Bardoni, B., Mandel, J. L., Ehresmann, B., Ehresmann, C., and Moine, H. (2001). The fragile X mental retardation protein binds specifically to its mRNA via a purine quartet motif. *Embo J* *20*, 4803-4813.
- Schenck, A., Bardoni, B., Moro, A., Bagni, C., and Mandel, J. L. (2001). A highly conserved protein family interacting with the fragile X mental retardation protein (FMRP) and displaying selective interactions with FMRP-related proteins FXR1P and FXR2P. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 8844-8849.
- Schwemmler, S., de Graaff, E., Deissler, H., Glaser, D., Wohrle, D., Kennerknecht, I., Just, W., Oostra, B. A., Doerfler, W., Vogel, W., and Steinbach, P. (1997). Characterization of FMR1 promoter elements by in vivo-footprinting analysis. *Am J Hum Genet* *60*, 1354-1362.
- Sheng, M., and Hoogenraad, C. C. (2007). The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu Rev Biochem* *76*, 823-847.
- Sherman, S. L., Jacobs, P. A., Morton, N. E., Froster-Iskenius, U., Howard-Peebles, P. N., Nielsen, K. B., Partington, M. W., Sutherland, G. R., Turner, G., and Watson, M. (1985). Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum Genet* *69*, 289-299.

- Sherman, S. L., Morton, N. E., Jacobs, P. A., and Turner, G. (1984). The marker (X) syndrome: a cytogenetic and genetic analysis. *Ann Hum Genet* *48*, 21-37.
- Singh, K., Gaur, P., and Prasad, S. (2007). Fragile x mental retardation (Fmr-1) gene expression is down regulated in brain of mice during aging. *Mol Biol Rep* *34*, 173-181.
- Siomi, H., Matunis, M. J., Michael, W. M., and Dreyfuss, G. (1993a). The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif. *Nucleic Acids Res* *21*, 1193-1198.
- Siomi, H., Siomi, M. C., Nussbaum, R. L., and Dreyfuss, G. (1993b). The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. *Cell* *74*, 291-298.
- Siomi, M. C., Zhang, Y., Siomi, H., and Dreyfuss, G. (1996). Specific sequences in the fragile X syndrome protein FMR1 and the FXR proteins mediate their binding to 60S ribosomal subunits and the interactions among them. *Mol Cell Biol* *16*, 3825-3832.
- Snow, K., Doud, L. K., Hagerman, R., Pergolizzi, R. G., Erster, S. H., and Thibodeau, S. N. (1993). Analysis of a CGG sequence at the FMR-1 locus in fragile X families and in the general population. *Am J Hum Genet* *53*, 1217-1228.
- Soltau, M., Berhorster, K., Kindler, S., Buck, F., Richter, D., and Kreienkamp, H. J. (2004). Insulin receptor substrate of 53 kDa links postsynaptic shank to PSD-95. *J Neurochem* *90*, 659-665.
- Soriano, P., Montgomery, C., Geske, R., and Bradley, A. (1991). Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell* *64*, 693-702.
- Spandidos, A., Wang, X., Wang, H., Dragnev, S., Thurber, T., and Seed, B. (2008). A comprehensive collection of experimentally validated primers for Polymerase Chain Reaction quantitation of murine transcript abundance. *BMC Genomics* *9*, 633.
- Stefani, G., Fraser, C. E., Darnell, J. C., and Darnell, R. B. (2004). Fragile X mental retardation protein is associated with translating polyribosomes in neuronal cells. *J Neurosci* *24*, 7272-7276.
- Steward, O., and Schuman, E. M. (2003). Compartmentalized synthesis and degradation of proteins in neurons. *Neuron* *40*, 347-359.
- Sutcliffe, J. S., Nelson, D. L., Zhang, F., Pieretti, M., Caskey, C. T., Saxe, D., and Warren, S. T. (1992). DNA methylation represses FMR-1 transcription in fragile X syndrome. *Hum Mol Genet* *1*, 397-400.
- Sutherland, G. R. (1977). Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. *Science* *197*, 265-266.
- Sutton, M. A., and Schuman, E. M. (2006). Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory. *Cell* *127*, 49-58.
- Takeuchi, M., Hata, Y., Hirao, K., Toyoda, A., Irie, M., and Takai, Y. (1997). SAPAPs. A family of PSD-95/SAP90-associated proteins localized at postsynaptic density. *J Biol Chem* *272*, 11943-11951.
- Tamanini, F., Willemsen, R., van Unen, L., Bontekoe, C., Galjaard, H., Oostra, B. A., and Hoogeveen, A. T. (1997). Differential expression of FMR1, FXR1 and FXR2 proteins in human brain and testis. *Hum Mol Genet* *6*, 1315-1322.

Tarpey, P., Parnau, J., Blow, M., Woffendin, H., Bignell, G., Cox, C., Cox, J., Davies, H., Edkins, S., Holden, S., *et al.* (2004). Mutations in the DLG3 gene cause nonsyndromic X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* *75*, 318-324.

The Dutch-Belgian Fragile X Consortium, x. (1994). Fmr1 knockout mice: a model to study fragile X mental retardation. The Dutch-Belgian Fragile X Consortium. *Cell* *78*, 23-33.

Todd, P. K., Mack, K. J., and Malter, J. S. (2003). The fragile X mental retardation protein is required for type-I metabotropic glutamate receptor-dependent translation of PSD-95. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 14374-14378.

Trachtenberg, J. T., Chen, B. E., Knott, G. W., Feng, G., Sanes, J. R., Welker, E., and Svoboda, K. (2002). Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature* *420*, 788-794.

Tu, J. C., Xiao, B., Naisbitt, S., Yuan, J. P., Petralia, R. S., Brakeman, P., Doan, A., Aakalu, V. K., Lanahan, A. A., Sheng, M., and Worley, P. F. (1999). Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins. *Neuron* *23*, 583-592.

Turner, G., Webb, T., Wake, S., and Robinson, H. (1996). Prevalence of fragile X syndrome. *Am J Med Genet* *64*, 196-197.

Valtschanoff, J. G., Burette, A., Davare, M. A., Leonard, A. S., Hell, J. W., and Weinberg, R. J. (2000). SAP97 concentrates at the postsynaptic density in cerebral cortex. *Eur J Neurosci* *12*, 3605-3614.

Verheij, C., de Graaff, E., Bakker, C. E., Willemsen, R., Willems, P. J., Meijer, N., Galjaard, H., Reuser, A. J., Oostra, B. A., and Hoogeveen, A. T. (1995). Characterization of FMR1 proteins isolated from different tissues. *Hum Mol Genet* *4*, 895-901.

Verkerk, A. J., Pieretti, M., Sutcliffe, J. S., Fu, Y. H., Kuhl, D. P., Pizzuti, A., Reiner, O., Richards, S., Victoria, M. F., Zhang, F. P., and *et al.* (1991). Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* *65*, 905-914.

Walhout, A. J., Temple, G. F., Brasch, M. A., Hartley, J. L., Lorson, M. A., van den Heuvel, S., and Vidal, M. (2000). GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes. *Methods Enzymol* *328*, 575-592.

Wang, X., and Seed, B. (2003). A PCR primer bank for quantitative gene expression analysis. *Nucleic Acids Res* *31*, e154.

Weiler, I. J., Irwin, S. A., Klintsova, A. Y., Spencer, C. M., Brazelton, A. D., Miyashiro, K., Comery, T. A., Patel, B., Eberwine, J., and Greenough, W. T. (1997). Fragile X mental retardation protein is translated near synapses in response to neurotransmitter activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 5395-5400.

Welch, J. M., Lu, J., Rodriguiz, R. M., Trotta, N. C., Peca, J., Ding, J. D., Feliciano, C., Chen, M., Adams, J. P., Luo, J., *et al.* (2007). Cortico-striatal synaptic defects and OCD-like behaviours in Sapap3-mutant mice. *Nature* *448*, 894-900.

Welch, J. M., Wang, D., and Feng, G. (2004). Differential mRNA expression and protein localization of the SAP90/PSD-95-associated proteins (SAPAPs) in the nervous system of the mouse. *J Comp Neurol* *472*, 24-39.

- Willemsen, R., Bontekoe, C., Tamanini, F., Galjaard, H., Hoogeveen, A., and Oostra, B. (1996). Association of FMRP with ribosomal precursor particles in the nucleolus. *Biochem Biophys Res Commun* *225*, 27-33.
- Wilson, H. L., Wong, A. C., Shaw, S. R., Tse, W. Y., Stapleton, G. A., Phelan, M. C., Hu, S., Marshall, J., and McDermid, H. E. (2003). Molecular characterisation of the 22q13 deletion syndrome supports the role of haploinsufficiency of SHANK3/PROSAP2 in the major neurological symptoms. *J Med Genet* *40*, 575-584.
- Yao, I., Iida, J., Nishimura, W., and Hata, Y. (2003). Synaptic localization of SAPAP1, a synaptic membrane-associated protein. *Genes Cells* *8*, 121-129.
- Zalfa, F., Eleuteri, B., Dickson, K. S., Mercaldo, V., De Rubeis, S., di Penta, A., Tabolacci, E., Chiurazzi, P., Neri, G., Grant, S. G., and Bagni, C. (2007). A new function for the fragile X mental retardation protein in regulation of PSD-95 mRNA stability. *Nat Neurosci* *10*, 578-587.
- Zalfa, F., Giorgi, M., Primerano, B., Moro, A., Di Penta, A., Reis, S., Oostra, B., and Bagni, C. (2003). The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses. *Cell* *112*, 317-327.
- Ziff, E. B. (1997). Enlightening the postsynaptic density. *Neuron* *19*, 1163-1174.
- Zitzer, H., Honck, H. H., Bachner, D., Richter, D., and Kreienkamp, H. J. (1999). Somatostatin receptor interacting protein defines a novel family of multidomain proteins present in human and rodent brain. *J Biol Chem* *274*, 32997-33001.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Schütt, J., Falley, K., Richter, D., Kreienkamp, H. J., Kindler, S. (2009).

Fragile X Mental Retardation Protein regulates the levels of scaffold proteins and glutamate receptors in postsynaptic densities. Akzeptiert bei JBC im Juli 2009

Iacoangeli, A., Rozhdestvensky, T. S., Dolzhanskaya, N., Tournier, B., **Schütt, J.**, Brosius, J., Denman, R. B., Khandjian, E. W., Kindler, S., and Tiedge, H. (2008).

On BC1 RNA and the fragile X mental retardation protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 734-739.

Iacoangeli, A., Rozhdestvensky, T. S., Dolzhanskaya, N., Tournier, B., **Schütt, J.**, Brosius, J., Denman, R. B., Khandjian, E. W., Kindler, S., and Tiedge, H. (2008).

Reply to Bagni: On BC1 RNA and the fragile X mental retardation protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, E29.

Poster auf Tagungen:

Mai 2007 27th Blankenese Conference

August 2007 2nd Westerburg Symposium

Oktober 2008 1st Baltic Sea Meeting of Neuronal Protein Turnover
(FOR 885)

März 2009 8th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society

Mai 2009 29th Blankenese Conference

Titel:

Janin Schütt, Katrin Falley, Dietmar Richter, Hans-Jürgen Kreienkamp and Stefan Kindler

„Fragile X Syndrome: Altered Composition of Postsynaptic Densities“

Vortrag:

November 2008 26. Treffen der Norddeutschen Humangenetiker, Rostock

Titel:

„Das Fragile X Syndrom – Einfluss von FMRP auf Synapsen“

Danksagung

Diese Promotionsarbeit wurde in der Zeit von November 2005 bis August 2009 im Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

Mein Dank gilt

Stefan Kindler – für Deine wissenschaftliche Betreuung und für die wissenschaftliche Freiheit die Du mir gelassen hast

Prof. Gal – dass ich vier Jahre Ihr Institut mein wissenschaftliches Zuhause nennen durfte

Prof. Richter – dass Sie mir mit Hilfe der Thyssen Stiftung die Doktorarbeit ermöglicht haben

Hans-Jürgen Kreienkamp – für die wissenschaftlichen Diskussionen (mit und ohne Kaffee)

Prof. Wiese – für die Übernahme des schriftlichen Gutachtens

Katrin Falley, Nelly Schröder, Matthias Vockel, Corinna Sawallisch, Biene Sieber, Claudia Schob, Birgit Schwanke, Birgit Herrman, Hinne Hönck, Christiane Schröder, Monika Rehbein, Steffi Dora, Cordula Steglich, Ingo Kurth und Evita Mohr,– für die stets freundschaftliche Zusammenarbeit mit Euch beim Publizieren, beim täglichen Laborwahnsinn, bei meinem Start in der AG Kindler 2005, bei allen kleinen und großen Sorgen, bei technischen und wissenschaftlichen Fragen, beim nervenaufreibenden Bestellchaos, beim Rotor-Gene 3000 und bei der gegenseitigen Hilfe mit Antikörpern und wissenschaftlichem Know-how.

Freunden und Familie – für die Versüßung meiner Freizeit mit allem was nicht mit Wissenschaft zu tun hat und dass ihr Euch mit mir über meine Erfolge freut

Stephan – für Deine Liebe und Unterstützung die Du mir schon so lange schenkst und die mich schon so manches Mal aufgefangen hat.