

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Humangenetik

Direktor der Einrichtung: Prof. Dr. Andreas Gal

Das Fragile-X-Syndrom: Vergleichende Analyse der zellulären Proteininteraktionsmuster der physiologischen und einer pathogenen Form des Proteins FMRP

Dissertation

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

vorgelegt von:

Nickolas Mirko Petrenz
aus Ebsdorfergrund

Hamburg 2010

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 11.02.2011**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: PD Dr. S. Kindler

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. M. Glatzel

Prüfungsausschuss, dritte Gutachterin: PD Dr. E. Mohr

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Das Fragile-X-Syndrom	5
1.2	Das Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP)	8
1.3	Das mutierte Protein FMRP-I304N	11
1.4	Bekannte Interaktionspartner von FMRP	11
1.5	Arbeitshypothese und Fragestellung	12
2	Material und Methoden	14
2.1	Material	14
2.1.1	Chemikalien	14
2.1.2	Bakterienstämme und Zelllinien	14
2.1.3	Verwendete Vektoren	15
2.1.4	Antikörper	16
2.1.4.1	Primäre Antikörper	16
2.1.4.2	Sekundäre Antikörper	17
2.2	Methoden	18
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	18
2.2.1.1	Agarosegelelektrophorese	18
2.2.1.2	Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien	18
2.2.1.3	Präparation von Plasmid DNA	18
2.2.1.4	Quantifizierung von DNA	19
2.2.1.5	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	19
2.2.1.6	Coomassie-Färbung des SDS-Gels	19
2.2.1.7	Massenspektrometrie	20
2.2.1.8	Western blot und Immundetektion	20

2.2.2 Zellbiologische Methoden.....	21
2.2.2.1 Kultivierung und Transfektion humaner embryonaler Nieren-zellen .	21
2.2.2.2 Affinitätschromatographische Reinigung rekombinanter Proteine	21
2.2.2.3 Immunzytochemie an primären Hippocampusneuronen	23
2.2.2.4 Mikroskopische Arbeitstechniken.....	23
3 Ergebnisse	24
3.1 Präzipitation von EGFP-FMRP.....	24
3.2 Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung.....	27
3.3 Unterteilung der identifizierten Proteine	30
3.4 Verifizierung der massenspektrometrischen Ergebnisse.....	31
3.4.1 FMRP.....	32
3.4.2 DDX17.....	35
3.4.3 DDX5.....	37
3.4.4 PABPC1.....	39
3.4.5 MOV10	41
3.4.6 RBM14.....	43
3.4.7 KHSRP.....	45
3.4.8 XRCC6	47
3.4.9 TDRD3.....	48
4 Diskussion.....	51
5 Zusammenfassung	65
6 Abkürzungsverzeichnis	66
7 Bibliografie	68
8 Danksagung.....	79
9 Lebenslauf	80
10 Eidesstattliche Versicherung.....	82

1 Einleitung

1.1 Das Fragile-X-Syndrom

Das Fragile-X-Syndrom (FRAX) ist eine der häufigsten Ursachen genetisch bedingter mentaler Retardierung und wurde erstmals 1943 von Martin und Bell beschrieben (Martin und Bell, 1943). Eine entscheidende, zytogenetische Beobachtung führte 1969 zur heutigen Bezeichnung des Syndroms. Lubs entdeckte einen fragil wirkenden Abschnitt am langen Arm des X-Chromosoms (Lubs, 1969). Dieser auch als FRAXA-Lokus bezeichnete Abschnitt konnte mittlerweile in der Bande Xq27.3 lokalisiert werden (Harrison *et al.*, 1983). Southerland gelang schließlich die Aufklärung dieser Beobachtung. Er konnte zeigen, dass der betroffene Bereich unter spezifischen Kulturbedingungen (z.B. in Folat-freiem Medium) während der Mitose nicht vollständig kondensiert und daher fragil erscheint (Sutherland, 1977).

Die Angaben zur Prävalenz der Erkrankung sind schwankend. Sie reichen bei Männern von 1:4000 bis 1:4500, bei Frauen von 1:6000 bis 1:9000 (Kooy *et al.*, 1998; Warren und Sherman, 2001). Diese Zahlen basieren häufig auf Kohortenstudien, bei denen Kinder mit Lernstörungen untersucht wurden. Problematisch ist jedoch, dass viele Betroffene, und hierbei insbesondere weibliche Patienten, einen normalen oder nur leicht unter dem Durchschnitt liegenden Intelligenzquotienten (IQ) haben und somit in diesen Untersuchungen nicht immer erfasst werden (Hagerman, 2008). Zudem könnten unterschiedliche Erfassungskriterien der untersuchenden Studien die schwankenden Angaben verursachen. Einer aktuellen Publikation zufolge ist die Prävalenz mit 1:2500 betroffenen Individuen höher als bisher angenommen (s.o.). Auf eine geschlechts-spezifische Aufteilung wurde verzichtet, da aufgrund des oben wiedergegebenem Sachverhalts das geschlechtsspezifische Vorkommen weniger differiert als bisher angenommen (Hagerman, 2008).

Das FRAX gehört zur Gruppe der Trinukleotid-Expansionserkrankungen, zu der beispielsweise auch die Chorea Huntington zählt. Grundlage dieser Erkrankungen ist die Erweiterung eines repetitiven Bereichs in den betroffenen Genen. Die Expansion der Trinukleotidsequenzen könnte auf Ungenauigkeiten bei der DNA-Replikation oder ein ungleiches *Crossing-over* zurückzuführen sein (Warren, 1997; Wells, 1996).

Beim FRAX kommt es zu einer Veränderung im humanen *FMR1*-Gen (*fragile X mental retardation gene 1*). Das Gen besteht aus 17 Exons und kodiert ein ca. 4,4 Kilobasen großes Transkript (Eichler *et al.*, 1993). Im ersten Exon des *FMR1*-Gens befindet sich stromaufwärts der kodierenden Region eine repetitive CGG-Trinukleotidsequenz. Bei Gesunden ist die Anzahl dieser CGG-Triplets kleiner als 50 (siehe Abb.1.1). Individuen, die eine repetitive Region mit 50 bis 200 CGG-Wiederholungen besitzen, werden als sog. Prämutationsträger bezeichnet. Bei ihnen kommt es nicht zur Ausprägung des FRAX, allerdings steigt die Anzahl der betroffenen Individuen in den nachfolgenden Generationen signifikant an (Reiss *et al.*, 1993; Sherman *et al.*, 1984; Sobesky *et al.*, 1996). Ist die repetitive Sequenz größer als 200 Triplets kommt es zur Ausprägung des FRAX.

Die Folge der Trinukleotidexpansion ist eine Methylierung der Cytosinreste des betroffenen Bereichs und angrenzender DNA-Abschnitte. Hier, im 5'Ende des Gens, befindet sich auch der Promotor, der für die Transkription des *FMR1*-Gens verantwortlich ist. Die Methylierung der Promotorregion verhindert die Bindung von Transkriptionsfaktoren und hat die vollständige Inaktivierung des Gens zur Folge (Schwemmler *et al.*, 1997; Sutcliffe *et al.*, 1992). FMRP (*fragile x mental retardation protein*), das Produkt des *FMR1*-Gens, wird nicht mehr hergestellt und fehlt in den betroffenen Zellen.

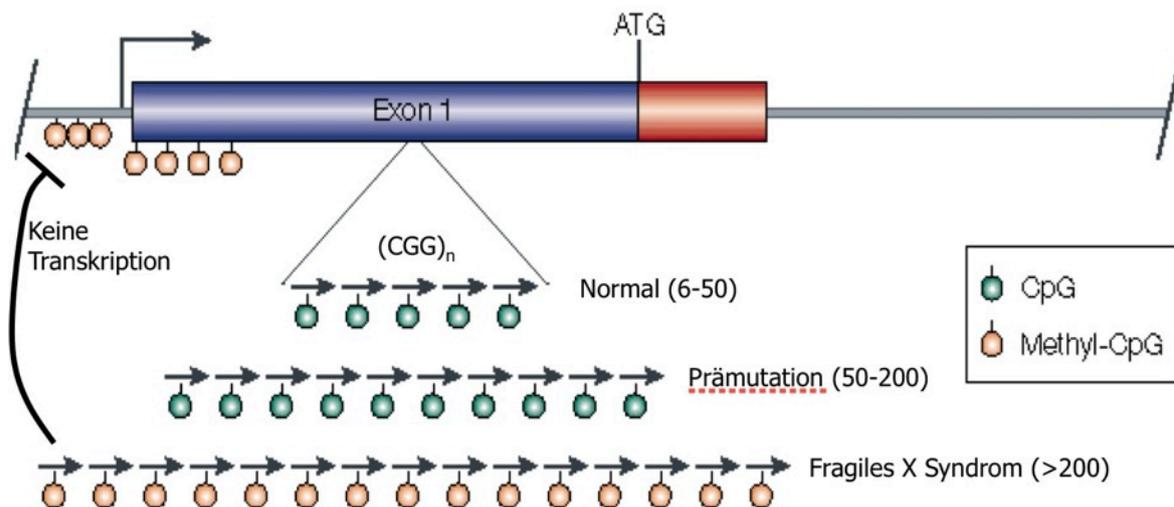


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung des ersten Exons (Box) des *FMR1*-Gens mit der Ursache des FRAX. Gesunde Menschen und Träger der Prämutation haben 6-50 bzw. 50-200 CGG-Wiederholungen (→), die Region ist nicht methyliert (●) und das Gen wird transkribiert (↗). Bei am FRAX erkrankten Patienten ist die Triplett-Region weiter expandiert (>200). Es kommt zur Methylierung (●) der Triplettsequenz und der angrenzenden Promotorregion, die die Transkription des *FMR1*-Gens verhindert (Die Darstellung ist frei modifiziert nach Schütt (2009) und Robertson und Wolffe (2000)).

Die Vererbung des FRAX ist ungewöhnlich für einen X-chromosomalen Erbgang und weicht von den Mendelschen Regeln ab. Es zeigt sich eine unvollständige Penetranz sowohl bei Männern als auch bei Frauen. Besonders interessant ist, dass Männer als Träger der Prämutation (Prämutationsträger), die Erkrankung auf ihre Enkel übertragen können, obwohl sie selber nicht betroffen sind (Sherman *et al.*, 1984). Diese Beobachtung wurde als das sog. Sherman-Paradox bekannt. Interessanterweise kommt es erst zur Expansion eines prämutierten Allels, nachdem eine weibliche Meiose durchlaufen wurde. Bei Nachkommen normal intelligenter Mütter und Töchtern prämutationstragender Männer kommt es zu einer unterschiedlichen Penetranz hinsichtlich der mentalen Retardierung. Die Unterschiede dieser Untersuchung hinsichtlich der Ausprägung einer mentalen Retardierung waren deutlich: 74% erkrankte Nachkommen bei den Töchtern prämutationstragender Männer, gegenüber 18% erkrankten Nachkommen bei den Müttern prämutationstragender Männer (Sherman *et al.*, 1984).

Die Folgen des Fehlens von FMRP sind vielfältig. Im Vordergrund der phänotypischen Ausprägung steht die mentale Retardierung. Die Bandbreite der Ausprägung reicht von einer leichten Lernbehinderung - mit annähernd normalem IQ - und leichter kognitiver Dysfunktion bis hin zu frühkindlichem Autismus. Typischerweise rangiert der IQ betroffener Individuen zwischen 20 und 70 und ist mit zunehmendem Alter rückläufig (Fisch *et al.*, 2002; Wright-Talamante *et al.*, 1996). Häufig sind es Sprach- und Sprechstörungen, die als erste Auffälligkeit einer gestörten Entwicklung bemerkt werden (Wisniewski *et al.*, 1991). Einige der Patienten leiden zudem an Verhaltensauffälligkeiten wie einer Hyperaktivität oder einem Aufmerksamkeitsdefizit (Cornish *et al.*, 2004).

Zu diesen kognitiven Störungen kommen morphologische Auffälligkeiten. Etwa 80% der betroffenen Männer leiden an einer Makroorchidie (Lachiewicz und Dawson, 1994). Besonders prägnant sind kraniale und faciale Dysmorphien. Dazu gehören eine Makrozephalie, eine längliche Gesichtsform, eine prominente Kinn- und Stirnpartie und große teilweise abstehende Ohren (siehe Abb. 1.2).



Abbildung 1.2
Phänotypische Auffälligkeiten des FRAX. Man beachte die faciale Besonderheiten. (Penagarikano *et al.*, 2007)

Weitere Merkmale sind Hochwuchs und eine allgemeine Bindegewebschwäche, die sich in der Überstreckbarkeit von Gelenken, aber auch in kardialen Pathologien, wie z.B. einem Mitralklappenprolaps, äußern können (Crabbe *et al.*, 1993; Sreeram *et al.*, 1989).

Die Symptome des FRAX sind durch eine ausgeprägte Variabilität gekennzeichnet, die besonders bei Frauen zur Geltung kommt. Bei Heterozygotie kommt es zu einer zufälligen Inaktivierung eines X-Chromosoms. Die Folge ist ein Zellmosaik, in dem erkrankte Zellen neben gesunden existieren. Je nachdem wie häufig und in welchen Zellen das betroffene X-Chromosomen aktiv ist, kommt es zu einem extrem variablen Phänotyp (Kirchgessner *et al.*, 1995; Reiss *et al.*, 1995). Hemizygoten Männer sind häufiger von dem Vollbild der Erkrankung betroffen als heterozygote Frauen.

1.2 Das *Fragile X Mental Retardation Protein* (FMRP)

FMRP wird in nahezu allen Geweben des Menschen exprimiert (Khandjian *et al.*, 1995; Devys *et al.*, 1993). Die höchsten Konzentrationen sind, analog zu den verbreitetsten Symptomen des FRAX (mentale Retardierung und Makroorchidie), in Hirn und Hoden nachweisbar. Im Hirn ließen sich dabei die höchsten Spiegel des Proteins in den Neuronen des Hippokampus und des Kleinhirns detektieren (Devys *et al.*, 1993; Hinds *et al.*, 1993). Zudem ist FMRP im neonatalen Hirn in deutlich höheren Konzentrationen nachweisbar als im adulten Hirn (Lu *et al.*, 2004), was eine Beteiligung des Proteins im Rahmen der Hirnentwicklung vermuten lässt.

In den vom FRAX betroffenen Zellen wird FMRP nicht exprimiert (siehe 1.1). Es sind diverse Isoformen von FMRP bekannt, die durch alternatives Spleißen entstehen (Verheij *et al.*, 1995). Das Protein besitzt ein Molekulargewicht von 70 bis 80 Kilodalton (kDa) und besteht aus etwa 630 Aminosäuren. In Neuronen befindet sich FMRP vornehmlich im Zytoplasma, hier lässt es sich vermehrt im Soma, den Dendriten und in postsynaptischen Bereichen nachweisen (Eberhart *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1997a; Antar *et al.*, 2004). In geringerer Konzentration ist das Protein allerdings auch im Nukleus zu detektieren (Feng *et al.*, 1997b; Verheij *et al.*, 1993). FMRP besitzt ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) und ein nukleäres Exportsignal (NES) für den Transport in und aus dem Zellkern (siehe Abb. 1.3, Eberhart *et al.*, 1996). Entsprechend fungiert FMRP als sog. *Shuttle-Protein*, das zwischen Zellkern und Zytoplasma verkehrt (Tamanini *et al.*, 1999).

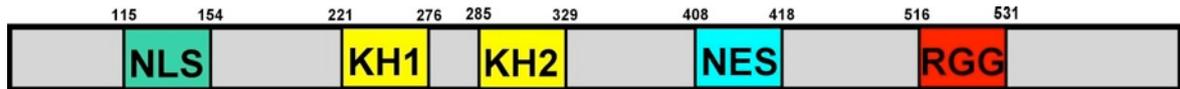
FMRP

Abbildung 1.3 Schematische Darstellung von FMRP und den RNA-bindenden Domänen KH1, KH2 und *RGG box*, sowie den Motiven NLS und NES. Die Zahlen geben jeweils die Position in der Aminosäuresequenz von FMRP an (Die Abbildung ist frei modifiziert nach Oostra und Chiurazzi (2001). Für weitere Erklärungen, siehe Text).

FMRP verfügt über zwei dem heterogenen nukleären Ribonukleoprotein K (KH) ähnliche Domänen und eine C-terminal gelegene Arginin/Glycin-reiche Sequenz: die *RGG box* (siehe Abb. 1.3; Ashley *et al.*, 1993; Siomi *et al.*, 1993). Sowohl die KH-Domänen als auch die *RGG box* sind RNA-bindende Motive (Kiledjian und Dreyfuss, 1992). Aktuellere Untersuchungen von FMRP sprechen zudem für ein weiteres N-terminales RNA-Bindungsmotiv, das eine Homologie zu der ebenfalls RNA-bindenden Tudordomäne aufweist (Ramos *et al.*, 2006). Dementsprechend zeigten *in vitro* Experimente, dass FMRP mit etwa 4% der Transkripte eines humanen fetalen Gehirnlisates assoziiert ist, darunter befindet sich auch seine eigene mRNA (Brown *et al.*, 2001; Schaeffer *et al.*, 2001).

Im Zytoplasma assoziiert FMRP als Bestandteil von mRNP (*messenger* Ribonukleoprotein) -Komplexen mit elongierenden Polyribosomen (Khandjian *et al.*, 1996; Siomi *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1997a). Weitere Untersuchungen konnten eine Beteiligung an der Regulation der Translation nachweisen (Laggerbauer *et al.*, 2001). So kann FMRP die lokale Translation spezifischer gebundener mRNAs an Synapsen hemmen (Steward und Worley, 2001; Zalfa *et al.*, 2003). Aktuellere Ergebnisse zeigen zudem eine stimulative Wirkung von FMRP auf die Translation bestimmter mRNA-Moleküle (Bechara *et al.*, 2009).

Betrachtet man die hier dargestellten Informationen zu FMRP, entsteht das Modell eines neuronal wichtigen Proteins, das mit Hilfe seines NLS in den Zellkern transportiert wird und hier mit unterschiedlichen Proteinen und spezifischen mRNA-Molekülen assoziiert, um mRNP-Komplexe zu formieren. Mittels seines NES gelangt das Protein aus dem Nukleus in das Zytoplasma, wo es mit Polyribosomen assoziiert. Je nach Zusammensetzung der mRNP-Komplexe könnte FMRP dabei unterschiedliche regulative Impulse vermitteln und die Translation bestimmter RNA-Moleküle modulieren (siehe auch Abb. 1.4). FMRP fungiert somit als *Shuttle*-Protein für den Transport spezifischer mRNA aus dem Nukleus in das Zytoplasma. Hier erfüllt es möglicherweise komplexe regulative Funktionen bei der Synthese von Proteinen.

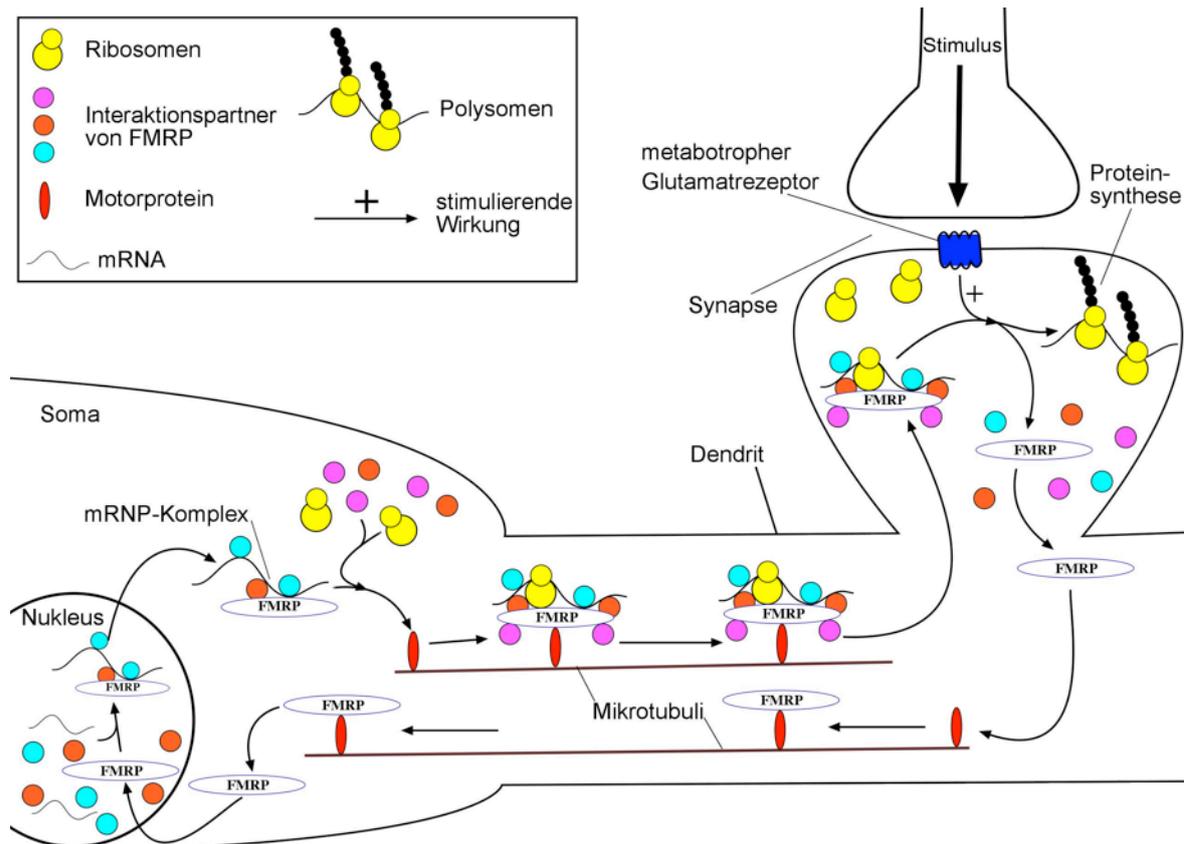


Abbildung 1.4 Schematische Darstellung der vermuteten zellulären Funktion von FMRP. Das Protein wird in den Nucleus importiert, dort assoziiert FMRP mit weiteren Proteinen und wird aus dem Kern exportiert. Als Bestandteil von mRNP-Komplexen gelangt es entlang der Mikrotubuli von Dendriten zu den Synapsen. Hier reguliert FMRP gemeinsam mit metabotropen Glutamatrezeptoren aktivitätsabhängig die Synthese spezifischer Proteine (Die Abbildung ist frei modifiziert nach Warren und Bassel (2008). Für weitere Erklärungen, siehe Text).

Ein möglicher Erklärungsansatz, in dem eine Verbindung zwischen der zellulären Funktion von FMRP und den pathologischen Konsequenzen des FRAX gezogen wird, ist die sog. mGLUR (*metabotropic glutamate receptor*) -Theorie (Bear *et al.*, 2004). Im Zentrum dieser Theorie stehen metabotrope Glutamatrezeptoren an den Synapsen von Neuronen. Die Aktivierung dieser Rezeptoren stimuliert die Translation bestimmter mRNAs, welche an diversen neuronalen Funktionen beteiligt sind. Diese stimulierende Funktion wird negativ von FMRP beeinflusst. Fehlt FMRP an der Synapse, könnte es zu einer gesteigerten Proteinsynthese kommen, die sich möglicherweise in einer veränderten Morphologie der Synapse widerspiegelt. Die neuronalen Symptome des FRAX wären somit durch eine verstärkte Antwort der Zelle auf eine reguläre mGLUR-Aktivität zu erklären (Bear *et al.*, 2004). Basierend auf dieser Theorie gibt es klinische Studien an FRAX-Patienten mit mGLUR-Antagonisten, die eine Linderung der Symptomatik in Aussicht stellen.

1.3 Das mutierte Protein FMRP-I304N

Die Entdeckung, dass eine isolierte Punktmutation im *FMR1*-Gen bei normaler Trinukleotidsequenz eine ausgeprägte FRAX-Symptomatik zur Folge hat, lieferte neue Ansatzpunkte hinsichtlich der Aufklärung zellulärer Funktionen von FMRP (De Boule *et al.*, 1993; Siomi *et al.*, 1994). Die Mutation führt also auf zellulärer Ebene zu ähnlichen Veränderungen wie der Wegfall von FMRP. Dies legt nahe, dass sich die Mutation an einer funktionell zentralen Stelle von FMRP befindet.

FMRP-I304N

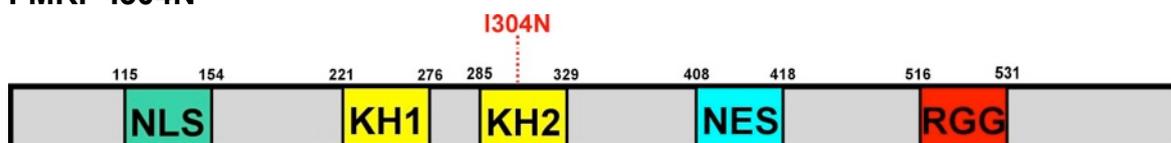


Abbildung 1.5 Schematische Darstellung von FMRP-I304N. In der RNA-bindenden KH2-Domäne befindet sich an der Position 304 die Punktmutation (I304N). Hier erfolgte ein Austausch der Aminosäure Isoleucin (Wildtypprotein) gegen Asparagin (mutiertes Protein; die Abbildung ist frei modifiziert nach Oostra und Chiurazzi (2001). Für weitere Erklärungen, siehe Text und Abb.1.4).

Durch die Punktmutation kommt es zu einem Aminosäuren-Austausch (Isoleucin zu Asparagin an der Position 304) in der zweiten KH-Domäne von FMRP (siehe Abb. 1.5; Darnell *et al.*, 2005), in dessen Folge es zu einer Veränderung der Sekundärstruktur des Proteins kommt (Siomi *et al.*, 1994; Musco *et al.*, 1996). Es resultiert eine eingeschränkte RNA-Bindungsfähigkeit von FMRP-I304N im Vergleich zu FMRP (Verheij *et al.*, 1995). Die Assoziation von FMRP-I304N mit aktiven Polyribosomen zu einem mRNP-Komplex ist eingeschränkt (Feng *et al.*, 1997a). Zudem ist die inhibitorische Wirkung von FMRP-I304N im Rahmen der Translation durch eine fehlende Fähigkeit zur Homodimerisierung vermindert (Laggerbauer *et al.*, 2001).

1.4 Bekannte Interaktionspartner von FMRP

Die ersten Proteine, die als Interaktionspartner von FMRP nachgewiesen werden konnten, sind die beiden autosomalen Homologe FXR1 (*fragile x related protein 1*) und FXR2 (*fragile x related protein 2*; Siomi *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1995). Sie zeigen funktionell viele Parallelen zu FMRP. So sind FXR1 und FXR2 beide in der Lage, RNA zu binden (Siomi *et al.*, 1995) und fungieren als *Shuttle*-Proteine zwischen Zytoplasma und Nukleus bzw. Nukleoloplasma (Tamanini *et al.*, 1999).

Die Interaktion der Proteine miteinander und eine Assoziation mit ribosomalen 60s Untereinheiten konnte nachgewiesen werden (Siomi *et al.*, 1996). Weitere Interaktionspartner von FMRP konnten von Schenck *et al.* (2001) identifiziert werden. Die Proteine CYFIP1 (*cytoplasmic FMR1 interacting protein 1*) und CYFIP2 (*cytoplasmic FMR1 interacting protein 2*) verfügen über eine zu großen Teilen identische Aminosäuresequenz (88%). Trotzdem unterscheiden sie sich in ihrem Interaktionsverhalten: CYFIP2 interagiert mit FMRP, FXR1 und FXR2, CYFIP1 dagegen ausschließlich mit FMRP (Schenck *et al.*, 2001). Für beide Proteine wurde eine zytoplasmatische Lokalisation beschrieben, außerdem konnte eine Colokalisation mit FMRP und Ribosomen beobachtet werden (Schenck *et al.*, 2001).

Die Assoziation der beschriebenen Interaktionspartner von FMRP mit Ribosomen lässt eine Funktion der Proteine bei der Translation vermuten. Somit verdichten sich auch die Hinweise auf eine regulative Funktion von FMRP im Rahmen der Translation.

1.5 Arbeitshypothese und Fragestellung

Für die Aufklärung der molekularen Wirkungsweise von FMRP wäre es interessant, weitere Proteine zu identifizieren, die mit FMRP interagieren. Die Identität dieser Interaktionspartner erlaubt möglicherweise Rückschlüsse auf die Funktion von FMRP innerhalb der Zelle. Die bisher identifizierten Proteine konnten mit der Translation - bzw. der Regulation der Translation - in Verbindung gebracht werden (siehe 1.4). Weitere Interaktionspartner von FMRP mit einem ähnlichen Funktionsspektrum würden die These einer regulativen Funktion von FMRP an der Translation festigen.

Im Rahmen des FRAX führt eine isolierte Punktmutation (FMRP-I304N) zu mannigfaltigen, zellulären Veränderungen und einem ausgeprägten FRAX-Phänotyp. Daher ist es besonders wissenswert zu überprüfen, ob Interaktionspartner von FMRP in ihrem Bindungsverhalten zu dem mutierten Protein beeinflusst sind. Ein Protein, das mit FMRP interagiert, nicht aber mit FMRP-I304N, könnte eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie des FRAX spielen und zudem an der Genese einer mentalen Retardierung beteiligt sein.

In dieser Arbeit soll deshalb, mit Hilfe einer Affinitätschromatographie aus humanem Zellmaterial, FMRP isoliert und die daran gebundenen Interaktionspartner identifiziert werden. In einem weiteren Schritt sollen diese putativen Interaktionspartner verifiziert, sowie erste Rückschlüsse auf den die Assoziation vermittelnden Bindungstyp geschlossen werden. Außerdem sollen vergleichende Versuche mit dem mutierten Protein FMRP-I304N mögliche Unterschiede im Interaktionsverhalten darstellen. Erkenntnisse über die subzelluläre Lokalisation der identifizierten Proteine sollen mit Hilfe von immunzytochemischen Aufnahmen kultivierter Rattenneurone des Hippokampus gewonnen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden soweit nicht anders vermerkt von Merck (Darmstadt, Deutschland), Sigma-Aldrich (St.Louis, USA), Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), Roche (Penzberg, Deutschland) oder Roth (Karlsruhe, Deutschland) in höchstmöglicher Qualität bezogen und verwandt.

2.1.2 Bakterienstämme und Zelllinien

Tabelle 2.1 Übersicht der verwendeten Bakterienstämme und Zelllinien

	Name	Hersteller
Bakterienstamm	<i>Escherichia coli</i> XL1- Blue	Stratagene
Zelllinie	Humane embryonale Nierenzellen-293 (HEK-293)	European Collection of Cell Cultures (ECACC)
Labortiere	<i>Rattus norvegicus</i> (Wistar-Ratte)	Zentrale Tierhaltung, UKE Hamburg

2.1.3 Verwendete Vektoren

Tabelle 2.2 Übersicht der verwendeten Grundvektoren

Vektor	Bemerkung	Hersteller
pEGFP-N1	pEGFP-N1 kodiert die GFPmut1-Variante von Wildtyp-GFP (Cormack <i>et al.</i> , 1996; siehe Herstellerangaben). <i>GenBank Accession: #U55762</i>	Clontech Laboratories, Inc USA
pEGFP-FMRP	Grundvektor pEGFP-N1 Innerhalb des Polylinkerbereiches wurden die Nukleotide 174-3882 der <i>FMR1</i> cDNA (NCBI Referenz Sequenz: NM_002024.4) inseriert, dieser Bereich umfasst den gesamte kodierende Region (Nukleotide 190-2085).	Arbeitsgemeinschaft (AG) Rob Willemsen Department of Clinical Genetics, Erasmus University, Rotterdam, Niederlande, (Schrier <i>et al.</i> , 2004)
pEGFP-FMRP-I304N	Grundvektor pEGFP-N1 Innerhalb des Polylinkerbereiches wurden die Nukleotide 47-3882 der <i>FMR1</i> cDNA (NCBI Referenz Sequenz: NM_002024.4) inseriert, dieser Bereich umfasst den gesamte kodierende Region (Nukleotide 190-2085). Im Vergleich zu pEGFP-FMRP ist ein längerer Abschnitt der <i>FMR1</i> cDNA inseriert (siehe auch 3.4.1, Abb. 3.5). Zudem erfolgte an Position 1099 ein Basenaustausch von Adenin zu Thymin, mit der Folge einer Tripletteränderung.	Arbeitsgemeinschaft (AG) Rob Willemsen Department of Clinical Genetics, Erasmus University, Rotterdam, Niederlande, (Schrier <i>et al.</i> , 2004)

2.1.4 Antikörper

2.1.4.1 Primäre Antikörper

Tabelle 2.3 Übersicht der verwendeten primären Antikörper

Antikörper: Name Spezies	Größe des Antigens	Hersteller	Verdünnung <i>Western blot</i>	Verdünnung Immunzyto- chemie
Anti-DDX-5 Kaninchen	69 kDa	Bethyl Laboratories Inc. Montgomery, USA	1:2500	1:250
Anti-DDX-17 Kaninchen	72 kDa	Bethyl Laboratories Inc. Montgomery, USA	1:5000	1:250
Anti-FMRP Kaninchen	78 kDa	Janin Schütt, UKE Hamburg	1:1000	1:100
Anti-FMRP Maus	78 kDa	Euromedex, Frankreich	-	1:200
Anti-KHSRP Kaninchen	75 kDa	AG Kindler UKE Hamburg	1:2000	1:200
Anti-MAP2 Kaninchen	199 kDa	Craig Garner Standford University	-	1:2000
Anti-MAP2 Maus	199 kDa	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, München	-	1:2000
Anti-MOV-10 Kaninchen	114 kDa	Proteintech Group, Chicago, USA	1:1000	1:50
Anti-PABP Kaninchen	73 kDa	Evita Mohr, UKE Hamburg	1: 500	1:100
Anti-RBM-14 Kaninchen	69 kDa	Abcam plc, Cambridge, UK	1:1000	1:100

Antikörper: Name Spezies	Größe des Antigens	Hersteller	Verdünnung <i>Western blot</i>	Verdünnung Immunzyto- chemie
Anti-RPS-6 Kaninchen	30 kDa	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA	1: 500	1:100
Anti-TDRD-3 Maus	83 kDa	Novus Biologicals, Ltd. Cambridge, UK	1:1000	1:25
Anti-XRCC-6 Maus	70 kDa	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	1:80	1:25

2.1.4.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 2.4 Übersicht der verwendeten sekundären Antikörper

Antikörper:	Hersteller	Verdünnung <i>Western blot</i>	Verdünnung Immunzyto- chemie
<i>Horse radish peroxidase</i> (HRP)-Anti-Kaninchen	Dianova, Hamburg	1:10000	-
HRP-Anti-Ziegen	Dianova, Hamburg	1:10000	-
HRP-Anti-Maus	Dianova, Hamburg	1:10000	-
ALEXA-488-Anti-Maus	Invitrogen, Karlsruhe	-	1:200
ALEXA-488-Anti-Kaninchen	Invitrogen, Karlsruhe	-	1:200
ALEXA-546-Anti-Maus	Invitrogen, Karlsruhe	-	1:200
ALEXA-546-Anti-Kaninchen	Invitrogen, Karlsruhe	-	1:200

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse von DNA-Fragmenten wurden einprozentige Agarosegele für eine horizontale nicht-denaturierende, Elektrophorese nach Sambrook *et al.* verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). Als Größenstandard wurde DNA *Ladder* 100 bp (Invitrogen) nach Herstellerangaben verwendet. Die Detektion von DNA-Fragmenten erfolgte unter UV-Licht.

2.2.1.2 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

Kompetente Bakterien (E-coli XL1- Blue, Stratagene) wurden nach Walhout *et al.* generiert (Walhout *et al.*, 2000) und bei -80°C eingefroren. Zur Transformation wurden 100 µl kompetente E-coli XL1- Blue Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 100 µl Transformationsansatz (20 µl 5x KCM (0,5 M KCl, 0,15 M CaCl₂, 0,25 M MgCl), 0,2 µl Plasmid-DNA) inkubiert. Das Gemisch wurde 20 Minuten auf Eis gekühlt und anschließend für 5 Minuten bei 37°C erwärmt. Es folgte die Zugabe von 1 ml *Lysogeny broth* (LB) -Medium (1% Tryptone, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, pH 7,4) sowie die Inkubation für 1 h auf einen Schüttelheizblock bei 37°C. Nun wurde der Ansatz für 30 Sekunden bei 16.000 x g zentrifugiert und das Pellet in 100 µl LB-Medium resuspendiert. Die Suspension wurde auf einer kanamycin-haltigen LB-Platte ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.2.1.3 Präparation von Plasmid DNA

Aus Bakterien wurde Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse isoliert (Sambrook *et al.*, 1989). Zur Bereitstellung größerer Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte die Aufreinigung mit Hilfe von Affinitätssäulen (Nucleobond Xtra Maxi Plus EF Kit, Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben.

2.2.1.4 Quantifizierung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen erfolgte im Spektrophotometer (BioPhotometer, Eppendorf AG) nach Herstellerangaben in geeigneten Verdünnungen. Vektor-DNA wurde zusätzlich mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (siehe 2.2.1.1.). Die Vektorbanden wurden mit denen eines Größenmarkers (DNA Ladder 100 bp, Invitrogen) verglichen, um Intensität und Qualität zu beurteilen.

2.2.1.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine wurden mit Hilfe einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in acht- bzw. zehnpromentlichen Gelen aufgetrennt (Sambrook *et al.*, 1989). Genutzt wurde hierfür das Tetra Cell System (BIO-RAD). Als Größenmarker wurde ein gefärbter Proteinstandard verwendet (PageRuler, prestained Protein Ladder Plus, Fermentas).

2.2.1.6 Coomassie-Färbung des SDS-Gels

Im Anschluss an die SDS-Page (siehe 2.2.1.5) wurde das SDS-Gel über Nacht in Coomassie-Färbelösung (0,1% Brilliant Blue R-250 Staining Solution, Serva, 40% Methanol, 10% Acetat) inkubiert und anschließend mit Coomassie-Entfärbelösung (40% MeOH, 10% Essigsäure) entfärbt. Um möglichst ausgeprägte Banden zu erreichen, erfolgte anschließend eine weitere Färbung mit kolloidaler Coomassie-Färbelösung (20% 5 x Roti Blue, Roth, 20% Methanol) über Nacht. Abschließend wurde das SDS-Gel in doppelt destillierten Wasser (ddH₂O) gewaschen.

2.2.1.7 Massenspektrometrie

Die wie in 2.2.2.7 gefärbten Proteine in dem SDS-Gel wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für klinische Chemie des UKE Hamburg von der AG Massenspektrometrische Proteomanalytik (PD Dr. Friedrich Buck und Sönke Harder) massenspektrometrisch analysiert.

Für die Ionisation von Molekülen wurde das Matrix-unterstützte Laser-Desorptions/Ionisations (MALDI) -Verfahren genutzt und nach der *Top-Down*-Strategie vorgegangen. Hierbei wurden die angefärbten Proteinbanden aus dem SDS-Gel herausgeschnitten und anschließend mit Trypsin verdaut (Brendel et al., 2004). Es folgt die massenspektrometrische Analyse der Peptidhydrolysate und eine Datenbankanalyse zur Identifizierung der zugrundeliegenden Proteine (AG Massenspektrometrische Proteomanalytik UKE Homepage, 2010)

2.2.1.8 Western blot und Immundetektion

Zur Immundetektion wurden die im SDS-Gel der Größe nach aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (PROTAN, Whatman) übertragen. Der Transfer wurde im *Semi-dry*-Verfahren (Trans-Blot SD Cell, BIO-RAD) durchgeführt und erfolgte nach Herstellerangaben in Transferpuffer (25 mM Tris-Base, 150 mM Glycin, 10% Methanol). Die Proteinübertragung auf die Membran konnte mit Ponceau S-Lösung (Sigma-Aldrich) nach Herstellerangaben verifiziert werden. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde die Membran nun für 1 h bei Raumtemperatur mit Blockierlösung (10% Magermilchpulver in TBS-T (TBS-T: 0,1 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,5 mM NaCl, 0,1% Tween20)) inkubiert. Die Reaktion mit dem primären Antikörper in entsprechender Konzentration (Tab. 2.3) in Blockierlösung erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach drei zehnmütigen Waschschrritten mit TBS-T folgte die Inkubation mit dem entsprechenden *Horse radish peroxidase* (HRP)-gekoppelten, sekundären Antikörper (Tab. 2.4) in TBS-T für 1 h bei Raumtemperatur. Im Anschluss an drei zehnmütige Waschschrritte in TBS-T wurden die nun antikörpermarkierten Proteine mit Hilfe des ECL-Systems (SuperSignal, West Pico -, West Femto Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific) und einem digitalen Belichtungsgerät (Molecular Imager, ChemiDOC XRS, BIO-RAD) nach Herstellerangaben detektiert.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Kultivierung und Transfektion humaner embryonaler Nierenzellen

Die Kultivierung der humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-293-Zellen) erfolgte in DMEN (Dulbecco's Modified Eagle Medium (High Glucose), Invitrogen/Gibco) mit 10% FBS (*fötales bovines* Serum „Gold“, Hitzeinaktiviert, PAA) in Zehn-Zentimeter-Kunststoff-Gewebekulturschalen bei 37°C. Ab einer Konfluenz von etwa 90% wurden die Zellen passagiert. Dazu wurden sie zunächst zwei mal mit PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,76 mM KH₂PO₄, pH 7,4) gewaschen und anschließend mit Hilfe von Trypsin (1%, Sigma-Aldrich) in PBS von der Gewebekulturschale abgelöst. Die Trypsinwirkung wurde mittels DMEN mit 10% FBS gestoppt, und die Zellen in der geeigneten Verdünnung (1:3 bis 1:8) mit frischem Nährmedium auf Gewebekulturschalen plattiert. Die Transfektion erfolgte ab einer Konfluenz von etwa 40% mit Hilfe von Turbofect (Fermentas) nach Herstellerangaben mit 10 µg DNA pro Schale. Für jedes Konstrukt wurden jeweils zwölf Kulturschalen mit HEK-293-Zellen transfiziert. Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen.

2.2.2.2 Affinitätschromatographische Reinigung rekombinanter Proteine

Mit Hilfe der *GFP-Trap*-Methode (siehe Abb. 3.1) ist es möglich, EGFP-markierte Proteine durch Immunpräzipitation und Zentrifugation zu isolieren. Dazu wird eine EGFP-bindende Agarosematrix in Form kleiner Kügelchen genutzt (*GFP-Trap_A*, Chromotek), die EGFP-markierte Proteine bindet. Die Proteine können nun durch Zentrifugation isoliert und anschließend durch Denaturierung von den Agarosematrix getrennt werden. Das präzipitierte Material wird anschließend auf ein SDS-Gel geladen und nach Größe aufgetrennt.

1. Proteinextraktion

Nach der Transfektion (siehe 2.2.2.1) mit den entsprechenden DNA-Konstrukten und einer Inkubationszeit von etwa 72 h wurden die HEK-293-Zellen auf Eis zunächst zwei mal mit PBS gewaschen.

Mit Hilfe von 1 ml RIPA-Puffer (10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% TX100, 1% Na-Deoxycholate, 5 mM EDTA) pro Gewebekulturschale und unter Zugabe von Proteaseinhibitor (1 mM PMSF und 1x Protease Inhibitor Complete, Roche) zur Proteaseinhibition wurden die Zellen 15 Minuten auf Eis permeabilisiert und von den Schalen abgelöst. Das Zelllysate wurde weitere 30 Minuten inkubiert und dabei alle 10 Minuten durchmischt. Mit Hilfe einer Pipette wurde im nächsten Schritt die DNA entfernt. Zur Reinigung wurde das Zelllysate bei 16.000 x g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand in einem 12 ml Röhrchen gesammelt. Als „Eingangskontrolle“ für den *Western blot* wurde an dieser Stelle 300 µl des Zelllysats entnommen, 75 µl Laemmlipuffer zugesetzt und das Gemisch für 5 Minuten bei 95°C erhitzt.

2. Affinitätschromatographie

Für 12 ml HEK-Zelllysate pro DNA-Konstrukt wurden 60 µl Agarosematrix (*GFP-Trap_A*, Chromotek) zunächst nach Herstellerangaben mit Waschpufferlösung (10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA und Proteaseinhibitor (1 mM PMSF und 1x Protease Inhibitor Complete, Roche)) gereinigt und daraufhin mit dem gesammelten Zelllysate für 2 h bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Im Anschluss wurde das Gemisch bei 2000 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Es folgten drei weitere Zentrifugationen bei 2000 x g und 4°C mit jeweils 10 ml Waschpufferlösung, um die Agarosematrix zu reinigen. Zur Elution wurde die Agarosematrix in 30 µl (für die massenspektrometrische Untersuchung) bzw. 300 µl (für die Untersuchungen mittels *Western blot*) Laemmlipuffer (Cleveland *et al.*, 1977) resuspendiert und für 10 Minuten bei 95°C gekocht, um die gebundenen Proteinkomplexe zu lösen. Das Eluat wurde bei -20°C eingefroren und später per SDS-PAGE aufgetrennt. Für die Untersuchungen mittels *Western blot* wurden jeweils 15 µl pro Spur des gewonnenen Präzipitats aufgetragen.

GFP-Trap mit RNA-Verdau

Als zusätzliche Variation zu dem beschriebenen Ablauf mit den Konstrukten für das EGFP-markierte FMRP, dem EGFP-markierten FMRP-I304N und der Kontrolle mit EGFP erfolgte eine weitere Affinitätschromatographie mit EGFP-markiertem FMRP. Während der Affinitätschromatographie wurde die RNA im Zelllysate durch RNase A (0,05 µg/µl, Qiagen) abgebaut, um über RNA gebundene Proteine von FMRP zu lösen.

2.2.2.3 Immunzytochemie an primären Hippocampusneuronen

Mit Hilfe der Immunzytochemie ist es möglich, die subzelluläre Verteilung von Proteinen in Zellen zu analysieren. Die nach Banker und Goslin (*Culturing Nerve Cells*, 1998) präparierten, kultivierten und wie beschrieben auf Deckgläschen fixierten primären Hippocampusneurone von Wistar-Ratten (Blichenberg *et al.*, 1999) wurden mir von der AG Kindler (Institut für Humangentik, UKE) zur Verfügung gestellt.

Die bei -80°C eingefrorene Zellen wurden zunächst in 1x PBS aufgetaut und anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Blockierlösung (10% Ziegenserum (Normal Goat Serum, Gibco) in 1x PBS) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Nun erfolgte die Reaktion mit den entsprechenden Primärantikörpern (siehe Tab. 2.3) in Blockierlösung über Nacht bei 4°C. Es schlossen sich drei Waschschriffe à 10 Minuten mit jeweils 1 ml 1x PBS an. Die Inkubation mit den entsprechenden fluoreszierenden Sekundärantikörpern (siehe Tab. 2.4) erfolgte bei Raumtemperatur innerhalb von 2 h in Blockierlösung. Nach weiteren drei zehninütigen Waschschriffen mit 1x PBS wurden die so behandelten Deckgläschen mit Hilfe von 10 µl eines kernfärbenden Reagens (Prolong Gold antifade reagent DAPI, Invitrogen) auf einem Objektträger eingebettet und bei 4°C über Nacht getrocknet.

2.2.2.4 Mikroskopische Arbeitstechniken

Zur Dokumentation und Betrachtung der immunzytochemisch behandelten Präparate (siehe 2.2.2.3) wurde das motorisierte Durch- und Auflicht-Fluoreszenz-Mikroskop IX81 (Olympus Optical CO. (Europa) GmbH) mit der Digital Kamera C4742-80-12AG (Hamatsu Pothonics Deutschland GmbH) genutzt. Es wurden die Programme Cell[^]R 3.3 (Olympus Soft Imaging Solution GmbH) für die Aufnahmen am Mikroskop und Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems Incorporated) zur Auswertung und Bearbeitung der Bilder verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Präzipitation von EGFP-FMRP

Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass es sich bei FMRP um ein RNA-bindendes Protein handelt (Siomi *et al.*, 1993 und 1994; Ashley *et al.*, 1993), das über mehrere Bindungsdomänen verfügt (siehe auch Abb.1.3). Wenig später wurde der Nachweis erbracht, dass FMRP mit anderen Proteinen interagiert. Identifiziert wurden die homologen Proteine FXR1 und FXR2 (Zhang *et al.*, 1995, Siomi *et al.*, 1995). Hinweise auf eine regulatorische Funktion von FMRP im Rahmen der Translation (Laggerbauer *et al.*, 2001), sowie die Assoziation zu mRNP-Komplexen (Feng *et al.*, 1997a) legten die Hypothese multipler Protein-Protein-Interaktionen von FMRP nahe. Grundlegendes Ziel dieser Arbeit ist daher die Identifikation weiterer Interaktionspartner von FMRP, mit deren Hilfe die molekulare Wirkungsweise von FMRP weiter aufgeschlüsselt werden könnte. Sowohl die Aufklärung der pathologischen Vorgänge im Rahmen des FRAX als auch der physiologischen Funktionen von FMRP in der Zelle könnten auf diese Weise vorangetrieben werden.

Zunächst sollten mögliche Interaktionspartner von FMRP identifiziert werden. Dafür wurde folgender Versuchsaufbau realisiert: HEK-293-Zellen wurden mit einem eukaryontischen Expressionsvektor (siehe 2.1.3) transfiziert, um EGFP-markiertes FMRP zu exprimieren. Das rekombinant hergestellte Fusionsprotein samt der daran gebundenen Interaktionspartner konnte nun affinitätschromatographisch mit Hilfe der sog. *GFP-Trap*-Methode gereinigt werden. Das EGFP-markierte Fusionsprotein wurde hierbei mittels einer EGFP-bindenden Agarosematrix isoliert (siehe Abb. 3.1 und Kapitel 2.2.2.2).

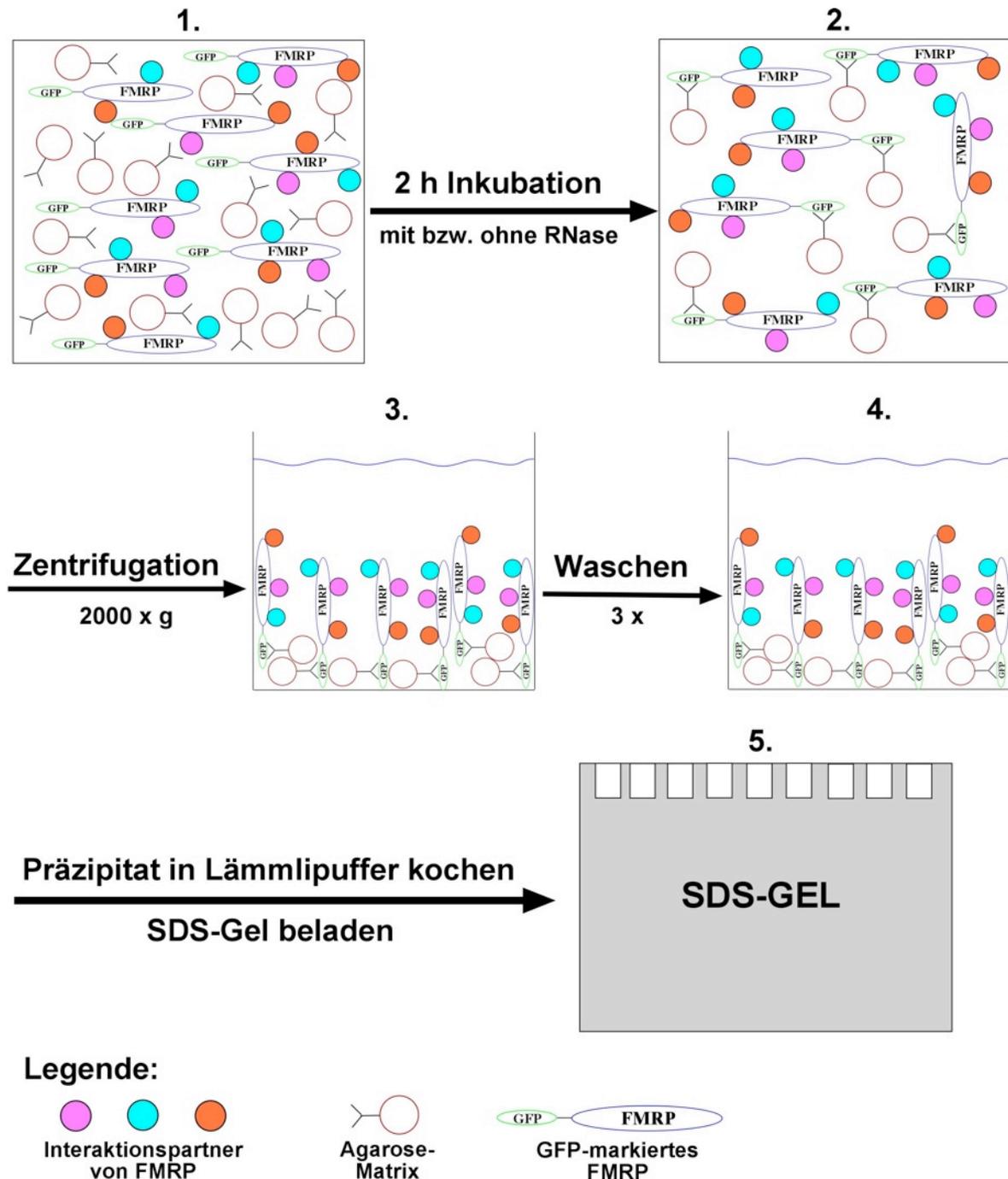


Abbildung 3.1 Schematische Darstellung der Affinitätschromatographie zur Reinigung des EGFP-markierten rekombinanten FMRP. 1. Inkubation der EGFP-bindenden Agarosematrix mit dem HEK-293-Zellysate, das u.a. das EGFP markierte FMRP und die daran gebundenen endogenen Interaktionspartner enthält. 2. Die Bindung der EGFP-affinen Kügelchen an das EGFP-markierte FMRP ist erfolgt. 3. Zentrifugation bei 2000 x g, der Überstand wird abgenommen. 4. Das Präzipitat wird in mehreren Waschzyklen durch Resuspension in Waschpuffer und anschließender Zentrifugation gereinigt. 5. Abschließend wird das Präzipitat in Laemmli-Probenpuffer gekocht, um die Proteinbindungen zu lösen und auf ein SDS-Gel aufgetragen (siehe auch 2.2.2.2).

Das wie illustriert gereinigte Fusionsprotein inklusive der möglichen Interaktionspartner, sowie eine entsprechende Menge des ursprünglichen Zelllysates (transfiziertes HEK-Zelllysate vor Inkubation mit der Agarosematrix fungiert als „Eingangskontrolle“, siehe auch Abb. 3.1) wurden anschließend auf ein SDS-Gel aufgetragen. Diese beiden Proben konnten per Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt, und das SDS-Gel mit einer Coomassie-Färbelösung gefärbt werden (siehe 2.2.1.6).

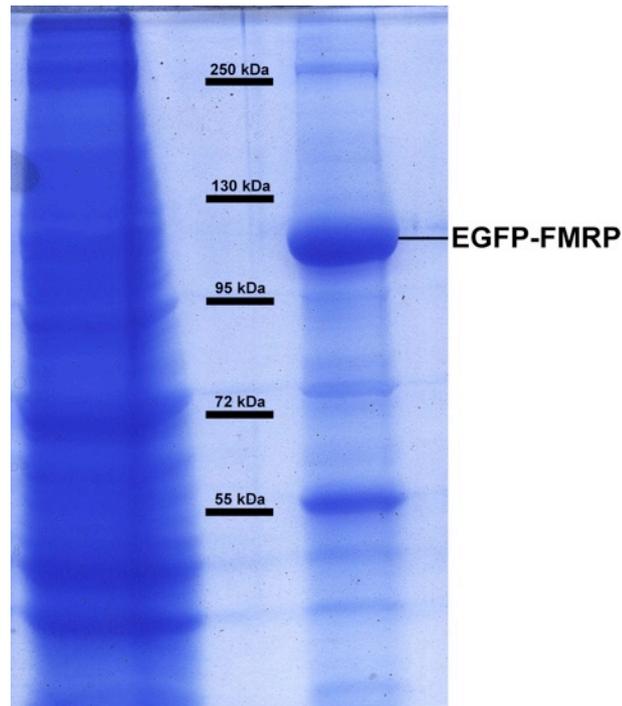


Abbildung 3.2 Coomassie gefärbtes SDS-Gel.

Linke Spur: In Laemmli-Probenpuffer gekochte Eingangskontrolle des transfizierten HEK-293-Wildtypproteinzelllysats vor der Inkubation mit der Agarosematrix (ein Vierhundertstel des Zelllysats von zwölf Gewebekulturschalen (30 μ l)). Rechte Spur: In Laemmli-Probenpuffer gekochtes gereinigtes Wildtyppräzipitat (gesamtes gereinigtes Präzipitat von zwölf Gewebekulturschalen (30 μ l); für weitere Informationen siehe 2.2.1.5 und 2.2.2.2)

Wie in Abb. 3.2 zu erkennen ist, unterscheidet sich die „Eingangskontrolle“ von dem letztendlich gewonnenen Präzipitat. In der „Eingangskontrolle“ lassen sich eine stärkere Färbung sowie zahlenmässig mehr und ausgeprägtere Banden, als in dem gereinigten Präzipitat erkennen. Ein großer Teil der in der „Eingangskontrolle“ noch vorhandenen Proteine ist nach Abschluss der Immunpräzipitation nicht mehr nachweisbar. Auf der rechten Seite sticht zudem eine ausgeprägte Bande bei etwa 120 kDa ins Auge. Hierbei handelt es sich um das rekombinante Fusionsprotein EGFP-FMRP.

Die Intensitätsunterschiede sowie die große Menge von EGFP-FMRP lassen sich als Hinweise auf eine funktionierende Immunpräzipitation deuten. Weitere Banden beherbergen die putativen Interaktionspartner von FMRP, die im nächsten Schritt unter Zuhilfenahme der Massenspektrometrie identifiziert werden sollen.

3.2 Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung

Die in dem gefärbten SDS-Gel enthaltenen Proteine wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für klinische Chemie des UKE Hamburg analysiert (AG Massenspektrometrische Proteomanalytik, besonderer Dank gilt PD Dr. Friedrich Buck und Sönke Harder). Die massenspektrometrische Untersuchung erfolgte nach der *Top-down*-Strategie (siehe 2.2.1.7). Aus dem unten abgebildeten SDS-Gel wurden 14 Banden ausgeschnitten (siehe Abb. 3.3), die darin enthaltenen Proteine wurden tryptisch verdaut und anschließend massenspektrometrisch untersucht.

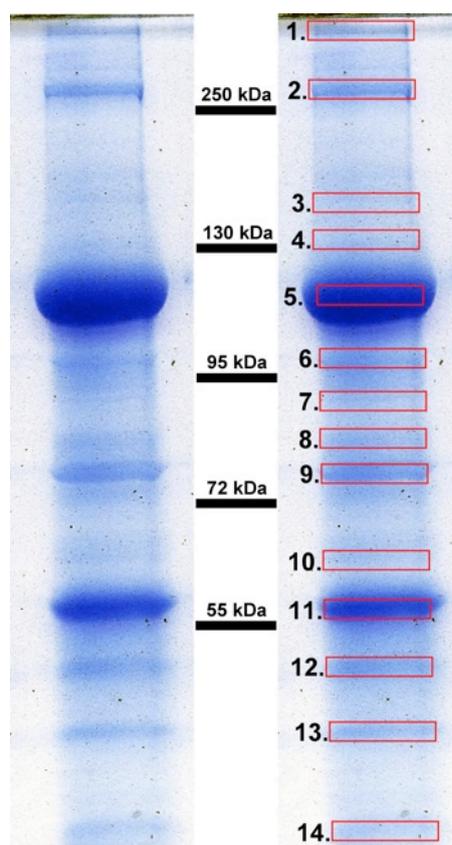


Abbildung 3.3 Lokalisation der ausgeschnittenen Banden des in Abb. 3.2 abgebildeten SDS-Gels. Rechts und links findet sich jeweils dieselbe Spur (EGFP-FMRP-Präzipitat). Auf der rechten Seite ist anhand der roten Kästen mit Nummerierung dargestellt an welchen Stellen des SDS-Gels Banden ausgeschnitten wurden.

Bei der Analyse der ausgeschnittenen Banden konnten insgesamt 50 unterschiedliche Proteine identifiziert werden. Eine vollständige, alphabetisch sortierte Auflistung aller identifizierten Proteine findet sich in der Tabelle 3.1.

Tabelle 3.1 Tabellarische Darstellung der mittels Massenspektrometrie identifizierten Proteine in alphabetischer Reihenfolge.

Protein	Zugangsnummer Bioinformatik- Harvester	Bande im SDS-GEL
ALDH18A1	IPI00008982	7
ATP5A1	IPI00440493	12
C14orf145	IPI00607659	1
CCT6A	IPI00027626	10
CCT6B	IPI00220656	10
CCT7	IPI00018465	10
CCT8	IPI00302925	10
CKB	IPI00022977	13
CLTC	IPI00024067	3
DAXX	IPI00170867	8
DDX17	IPI00023785	7 und 8
EEF1A1	IPI00396485	12
EFTUD2	IPI00003519	4
EIF4A1	IPI00025491	12
ENO1	IPI00465248	12
FMRP	IPI00215720	4 und 5
FRG2C	IPI00175122	6
HNRNPH1	IPI00013881	12
HNRNPM	IPI00171903	8
HSPA9	IPI00007765	9
HSP7C	IPI00003865	8

Protein	Zugangsnummer Bioinformatik- Harvester	Bande im SDS-GEL
HSP70	IPI00304925	8 und 9
HSP90AB1	IPI00414676	6
HSPD1	IPI00076042	10
ILF3	IPI00298788	6
Keratin z.B. KRT1	IPI00220327	2
KHSRP	IPI00855957	7
LBR	IPI00292135	10
Nono	IPI00304596	10
PA2G4	IPI00299000	13
PABPC1	IPI00008524	8
PCBP1	IPI00016610	14
PCBP2	IPI00216689	14
PKM2	IPI00220644	10
PRKDC	IPI00296337	1
PRMT1	IPI00215734	14
PRPF40B	IPI00789604	10
RBMI4	IPI00013174	8
RPL4	IPI00003918	12
RPN1	IPI00025874	9
RPS27A	IPI00798155	1, 3 und 10
SMARCB1	IPI00029695	14
S100A8	IPI00007047	5
TCP1	IPI00290566	10
TDRD3	IPI00006571	6
TOMM40	IPI00014053	14

Protein	Zugangsnummer Bioinformatik- Harvester	Bande im SDS-GEL
TUBA1A	IPI00180675	11
UBAP2L	IPI00514856	3
XRCC6	IPI00644712	9
ZNF518B	IPI00304621	3

Mit Hilfe der angegebenen Zugangsnummer lassen sich die Proteine über die Bioinformatik-Meta-Suchmaschine „Bioinformatik-Harvester“ eindeutig identifizieren. Die dritte Spalte der Tabelle benennt die Bande des SDS-Gels (siehe Abb. 3.3), in der das Protein nachgewiesen wurde.

3.3 Unterteilung der identifizierten Proteine

Mit Hilfe von Datenbankrecherchen wurden weitere Informationen zu den identifizierten Proteinen gesammelt. Dazu wurde die Bioinformatik-Meta-Suchmaschine *Bioinformatic Harvester IV* des Karlsruher Instituts für Technologie genutzt. Informationen über Lokalisation und Bindungsverhalten der Proteine stammen von *AceView*, *Entrez Gene* und *OMIM (NCBI)*.

Bei der Auswertung der massenspektrometrischen Daten fiel die große Gruppe von nukleinsäurebindenden Proteinen auf. Zu diesen zählen nach *AceView* und *Entrez Gene* (NCBI): DDX17, EIF4A1, ENO1, HNRNPH1, HNRNPM, ILF3, KHSRP, NONO, PA2G4, PABPC1, PCBP1, PCBP2, PRKDC, RBM14, RPL4, TDRD3, XRCC6 und ZNF518B. Zur weiteren Unterteilung wurde zwischen RNA- und DNA-bindenden Proteinen unterschieden. Die RNA-bindenden Proteine (DDX17, EIF4A1, HNRNPH1, HNRNPM, KHSRP, PA2G4, PABPC1, RPL4 und TDRD3) haben hierbei gegenüber den DNA-bindenden (ENO1, PRKDC, XRCC6 und ZNF518B) einen größeren Anteil. Weitere sechs Proteine der Gruppe sind in der Lage, sowohl DNA als auch RNA zu binden (ILF3, NONO, PA2G4, PCBP1, PCBP2 und RBM14). Bereits frühere Untersuchungen konnten zeigen, dass es sich bei FMRP um ein RNA-bindendes Protein handelt (Siomi *et al.*, 1993 und 1994; Ashley *et al.*, 1993). Da ein großer Teil der identifizierten Proteine ebenfalls diese Fähigkeit besaß, lag die Möglichkeit nahe, dass einige der als Interaktionspartner identifizierten Proteine mittels RNA an FMRP gebunden sind.

Daraufhin wurde der Versuchsaufbau für die fortführenden Experimente mittels *Western blot* modifiziert, und ein zusätzlicher RNA-Verdau des HEK-293-Zellysates während der Immunpräzipitation eingeführt. So sollten direkte *Protein-Protein*-Interaktionen von RNA-vermittelten Bindungen zu FMRP unterschieden werden.

Eine weitere Gruppe, die durch mehrere Proteine vertreten war, ist die der Hitze-Schock-Proteine (HSP). Hierzu gehören die Proteine: CCT6A, CCT6B, CCT7, CCT8, HSP7C, HSP70, HSP90AB1, HSPA9, HSPD1, TCP1. Zudem findet sich eine Reihe weiterer Proteine, die wahrscheinlich unabhängig von dem Fusionsprotein EGFP-FMRP im Rahmen der Affinitätsaufreinigung präzipitiert wurden. Zu diesen gehören Proteine, die am strukturellen Aufbau der Zelle beteiligt sind, z.B. α -Tubulin. Des Weiteren konnten einige mit dem Zellstoffwechsel assoziierte Proteine wie die Pyruvatkinase nachgewiesen werden.

Es folgte eine Auswahl vielversprechender Proteine, deren Interaktionsverhalten zu FMRP weiter untersucht werden sollte. Hierbei stand analog zu den für FMRP vermuteten Funktionen, eine Assoziation der zu untersuchenden Proteine mit Translation und Transkription im Vordergrund. Zusätzlich wurde nach Interaktionen der identifizierten Proteine untereinander gesucht.

3.4 Verifizierung der massenspektrometrischen Ergebnisse

Die in der Massenspektrometrie identifizierten putativen Interaktionspartner von FMRP wurden in einem nächsten Schritt mit Hilfe einer unabhängigen Methode verifiziert. Dazu wurden *Western blots* durchgeführt und die einzelnen Proteine per Immundetektion mit Hilfe des ECL-Systems auf Nitrozellulosemembranen nachgewiesen (siehe 2.2.1.8). Für eine erhöhtes Maß an Validität der Ergebnisse wurden alle Immunoblots mehrfach durchgeführt und nur bei Reproduzierbarkeit der Ergebnisse berücksichtigt. Zusätzliche Informationen über das Bindungsverhalten von FMRP mit seinen Interaktionspartnern sollte die Punktmutation I304N (siehe 1.3) geben. Es wurden also nicht nur die Ergebnisse der Massenspektrometrie überprüft, sondern außerdem verglichen, ob sich das Bindungsverhalten des Wildtypproteins in Bezug auf *Protein-Protein*-Interaktionen, von dem des mutierten Proteins FMRP-I304N unterscheidet. Dafür wurde die oben beschriebene Immunpräzipitation ebenfalls mit pEGFP-FMRP-I304N transfizierten HEK-293-Zellen durchgeführt (siehe 2.2.2.2).

Wie bereits in Kapitel 3.3 erwähnt, sollte eine weitere Variation des Versuchsablaufs Aufschluss über die Art und Weise bringen, wie FMRP mit Proteinen interagiert. Kommt es dabei zu *Protein-Protein*-Interaktionen, oder ist die Bindung RNA-abhängig?

Dafür wurde im Rahmen der Immunpräzipitation dem HEK-293-Zellysats vor der Inkubation mit der Agarosematrix des *GFP-Traps* die RNase zugefügt, um mögliche RNA vermittelte Bindungen zu lösen. Proteine, die indirekt mit Hilfe von RNA binden, wären nach einer Inkubation mit RNase nicht mehr nachweisbar (siehe 2.2.2.2). Demnach werden jeweils vier unterschiedliche Präzipitate miteinander verglichen: Immunpräzipitationsprodukte der Vektoren pEGFP-FMRP (mit und ohne RNA-Verdau bei der Immunpräzipitation), pEGFP-FMRP-I304N und pEGFP als Negativkontrolle. Als „Eingangskontrolle“ wurde eine Probe des Zellysats vor Inkubation mit der Agarosematrix entnommen, die ebenfalls mittels *Western blot* überprüft wurde.

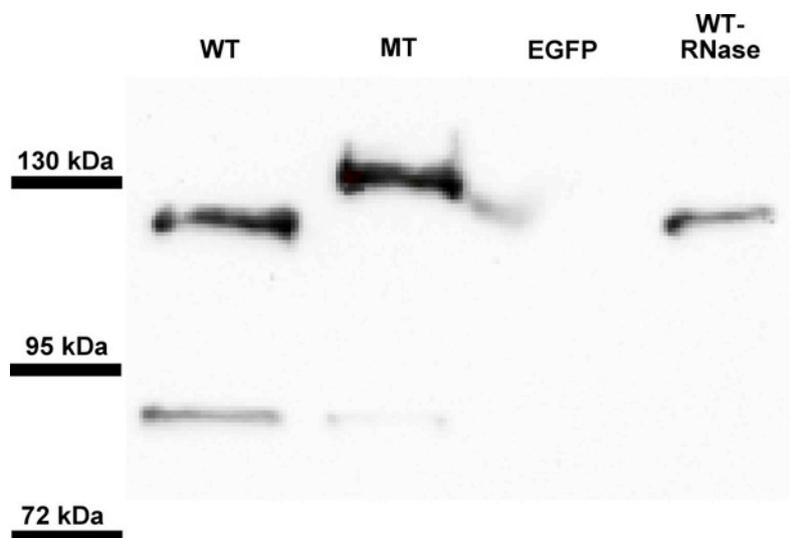
Aus Gründen der Übersichtlichkeit möchte ich im folgenden Abschnitt mit dem im *Western blot* untersuchten Protein, jeweils auch die Ergebnisse der immunzytochemischen Versuche vorstellen. Die Experimente an primären Hippokampusneuronen von Ratten versprachen weitere Informationen über die zelluläre Verteilung der identifizierten Proteine. Lokalisation - bzw. Colokalisation mit FMRP - der putativen Interaktionspartner sollte mit Hilfe unterschiedlicher Färbungen und Farbkanälen sichtbar gemacht werden. Hierzu wurden, die fixierten Neuronen mit Hilfe von Antikörpern immunzytochemisch angefärbt, um anschließend Aufnahmen unter einem Fluoreszenzmikroskop durchzuführen. Als Markerprotein für Qualität und Intensität der immunhistochemischen Färbung, erfolgte in einem ersten Versuch der Nachweis des neuronenspezifischen Mikrotubulus-assoziierten Protein 2 (MAP2) in Co-Färbung mit dem jeweiligen Protein. Der Nukleus wurde mit Hilfe eines kernfärbenden Fixierungsreagens blau angefärbt. In einem zweiten Experiment erfolgte eine Co-Färbung mit FMRP und dem zu untersuchenden Protein.

3.4.1 FMRP

An dieser Stelle wird ein *Western blot* präsentiert, auf dem das präzipitierte Fusionsprotein EGFP-FMRP mittels Antikörper nachgewiesen werden konnte. Anhand dieses Beispiels sollen exemplarisch die unterschiedlichen Spuren des *Western blots* besprochen werden, dessen Anordnung auch bei den folgenden Abbildungen zu finden ist. Hierbei werden jeweils vier Spuren betrachtet (Abb.3.4).

Die erste (WT) zeigt das Präzipitat des Wildtyp-Proteins FMRP. In der zweiten Spur (MT) ist das Präzipitat des mutierten Proteins FMRP-I304N aufgetragen. An dritter Stelle (EGFP) findet sich eine Negativkontrolle, bei der ausschließlich EGFP in den HEK-293-Zellen exprimiert und präzipitiert wurde, um mögliche unspezifische Interaktionen z.B. zwischen EGFP und dem jeweils untersuchten Protein auszuschließen. In der letzten Spur (WT-RNase) findet sich erneut das Wildtyp-Protein FMRP, allerdings wurde hier wie in 3.1 beschrieben, eine zusätzliche Inkubation mit RNase durchgeführt.

Abbildung 3.4 Nachweis von FMRP mittels *Western blot* und Immundetektion.



Es wurden jeweils 15 μ l des entsprechenden Zelllysates aufgetragen. Einzelne Spuren im *Western blot*: WT: Zelllysate mit dem Wildtyp-Protein FMRP, MT: Zelllysate mit dem mutierten Protein FMRP-I304N, EGFP: Zelllysate mit EGFP als Kontrolle, WT-RNase: Zelllysate mit dem Wildtyp-Protein FMRP und erfolgter RNase-Inkubation (für weitere Informationen siehe 2.2.1.5 und 2.2.1.8). Pro Spur wurden jeweils ein zwanzigstel (15 μ l) des entsprechenden Zelllysates aufgetragen (siehe 2.2.2.2).

Die Abbildung 3.4 zeigt in der WT-Spur endogenes FMRP (Signal bei ca. 80 kDa), das gebunden an das EGFP-markierte FMRP (bei ca. 130 kDa) präzipitiert wurde. Bei gleichen Mengen der aufgetragenen Präzipitate (Wildtypprotein FMRP und mutiertes Protein FMRP-I304N) ist der Anteil von gebunden-präzipitierten endogenem FMRP aus dem Präzipitat des mutierten Proteins deutlich geringer, bleibt aber nachweisbar (Abb. 3.4, MT). In der Kontrollspur, in der ausschließlich EGFP präzipitiert wurde, ist FMRP nicht detektierbar (EGFP). In dem RNase-exponierten Wildtyppräzipitat lässt sich das Fusionsprotein EGFP-FMRP detektieren, endogenes FMRP dagegen nicht (WT-RNase).



Abbildung 3.5 Schematische Darstellung der unterschiedlichen Größe der *Linker*-Sequenz bei den verwendeten rekombinanten Proteinen EGFP-FMRP und EGFP-FMRP-I304N.

Wie aus Abbildung 3.4 ersichtlich, sind die beiden EGFP-markierten Fusionsproteine FMRP und FMRP-I304N (WT und MT) nicht exakt gleich groß, obwohl sie sich eigentlich nur durch den Austausch einer einzelnen Aminosäure unterscheiden sollten. Diese Tatsache ist auf eine unterschiedlich große *Linker*-Sequenz zwischen EGFP und FMRP bzw. FMRP-I304N zurückzuführen (siehe Abb. 3.5 und 2.1.3).

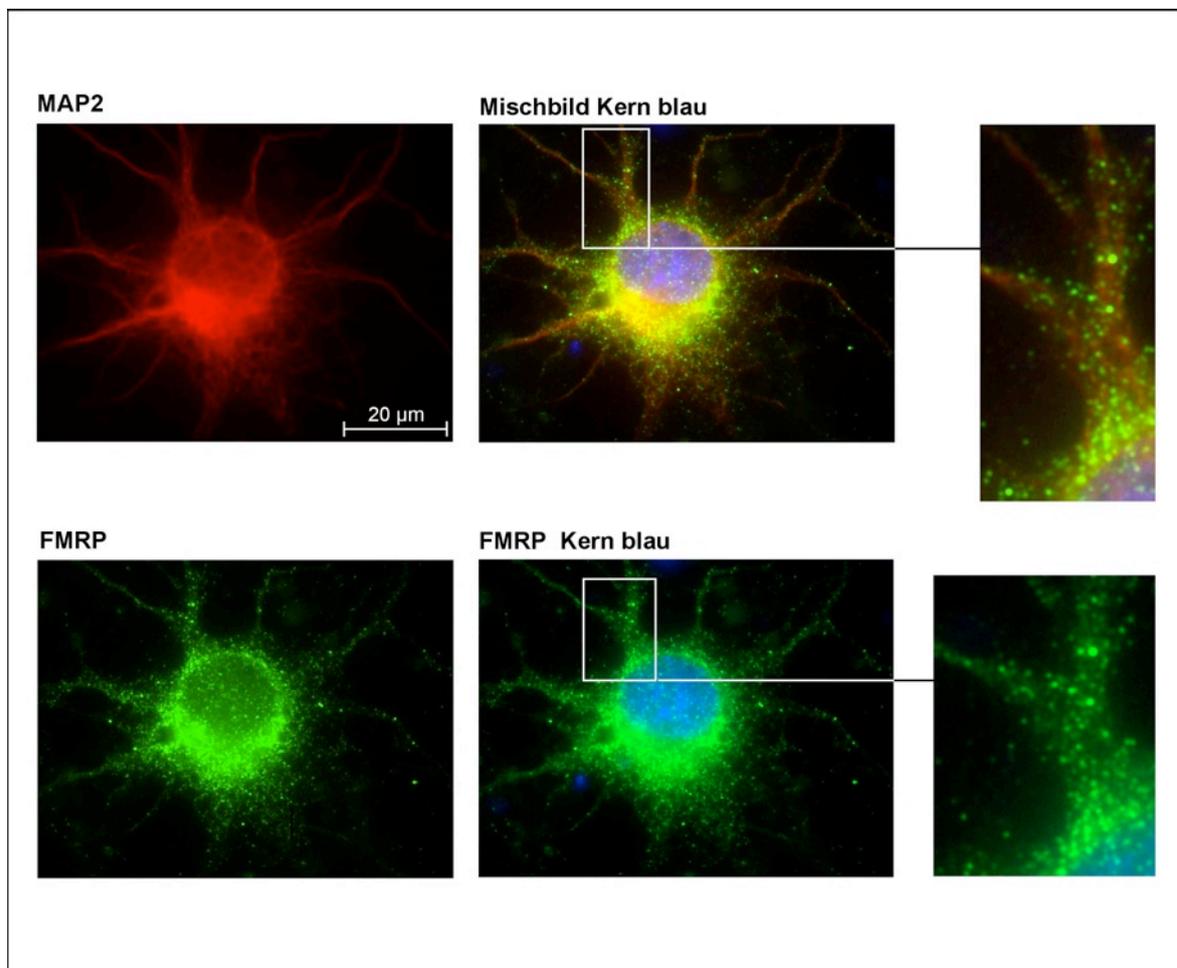


Abbildung 3.6 Subzelluläre Verteilung des endogenen FMRP mit Nachweis des neuronenspezifischen MAP2. Links: Vergrößerung von primären Rattenneuronen in Kultur für den immunzytochemischen Nachweis von MAP2 (rot) und FMRP (grün). Mitte: Überlagerung beider Farbkanäle zur Darstellung einer Colokalisation, der Nukleus ist blau angefärbt. Rechts: Ausschnittvergrößerungen (Antikörper und Verdünnung, siehe Tab. 2.3).

Die subzelluläre Verteilung von FMRP wurde mit Hilfe der Immunzytochemie an kultivierten Rattenneuronen des Hippokampus dargestellt. Hier lässt sich FMRP vor allem im Zytosol nachweisen, es liegt in feinen Granulae vor, deren Dichte perinukleär am höchsten ist (siehe Abb. 3.6). In Dendriten und im Nukleus ließ sich FMRP ebenfalls - wenn auch in geringerer Konzentration - detektieren. Damit gleicht die ermittelte Lokalisation von FMRP den Ergebnissen anderer AGs (Antar *et al.*, 2004; Feng *et al.*, 1997a).

3.4.2 DDX17

DDX17 - mit vollem Namen *DEAD box polypeptide 17* genannt - konnte im *Western blot* mittels Antikörper detektiert werden (siehe Abb. 3.7). Hier zeigte sich ein Signal aus mehreren Banden, das auf unterschiedliche Isoformen des Proteins und die Reaktivität des Antikörpers zurückzuführen ist (Herstellerangaben; *Reference Sequence*, NCBI). Die in der Mitte liegende Bande bildet die hier besprochene Isoform 1 ab. In Abbildung 3.7 B ist das Ausgangsmaterial vor Inkubation mit der Agarosematrix als „Eingangskontrolle“ aufgetragen. Hier lässt sich DDX17 in beiden Zelllysaten (WT, MT) nachweisen. Nach Abschluss der Affinitätschromatographie ist das Protein, mit Ausnahme der EGFP-Kontrolle, in allen dargestellten Präzipitaten detektierbar (siehe Abb. 3.7 A, WT, MT, EGFP und WT-RNase).

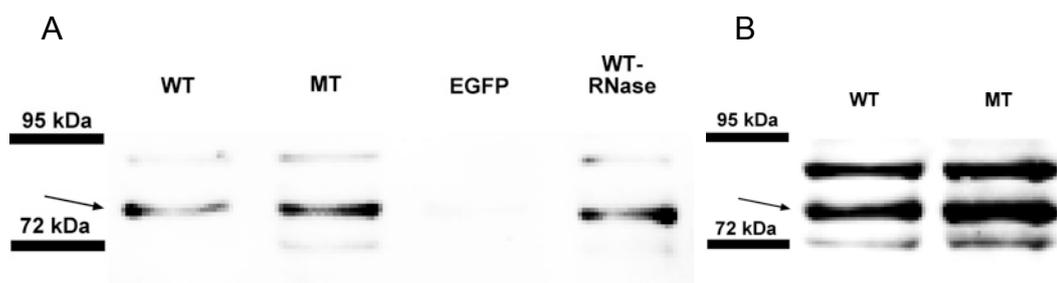


Abbildung 3.7 Nachweis von DDX17 (Pfeil) durch Immundetektion.

Einzelne Spuren im *Western blot*: A: WT: Zelllysat mit dem Wildtyp-Protein FMRP, MT: Zelllysat mit dem mutierten Protein FMRP-I304N, EGFP: Zelllysat mit EGFP als Kontrolle, WT-RNase: Zelllysat mit dem Wildtyp-Protein FMRP und erfolgter RNase-Inkubation. Pro Spur wurden jeweils ein Zwanzigstel (15 µl) des entsprechenden Zelllysates aufgetragen (siehe 2.2.2.2). B: Ausgangszelllysat vor Inkubation mit der Agarosematrix als „Eingangskontrolle“, Wildtyp-Protein FMRP (WT), mutiertes Protein FMRP-I304N (MT; für weitere Informationen siehe 2.2.1.5 und 2.2.1.8). Pro Spur wurden jeweils ein Achtundertstel (15 µl) des entsprechenden Zelllysates aufgetragen (siehe 2.2.2.2).

Damit bestätigten sich die massenspektrometrisch erhobenen Daten, DDX17 interagiert mit FMRP. Diese Verbindung zeigt sich auch nach einer Inkubation des Zelllysats mit RNase. Eine RNA-abhängige Interaktion mit FMRP ist somit sehr unwahrscheinlich. Die Assoziation von FMRP und DDX17 wird durch die Punktmutation nicht beeinflusst, da DDX17 auch im Präzipitat des mutierten Proteins FMRP-I304N detektierbar ist.

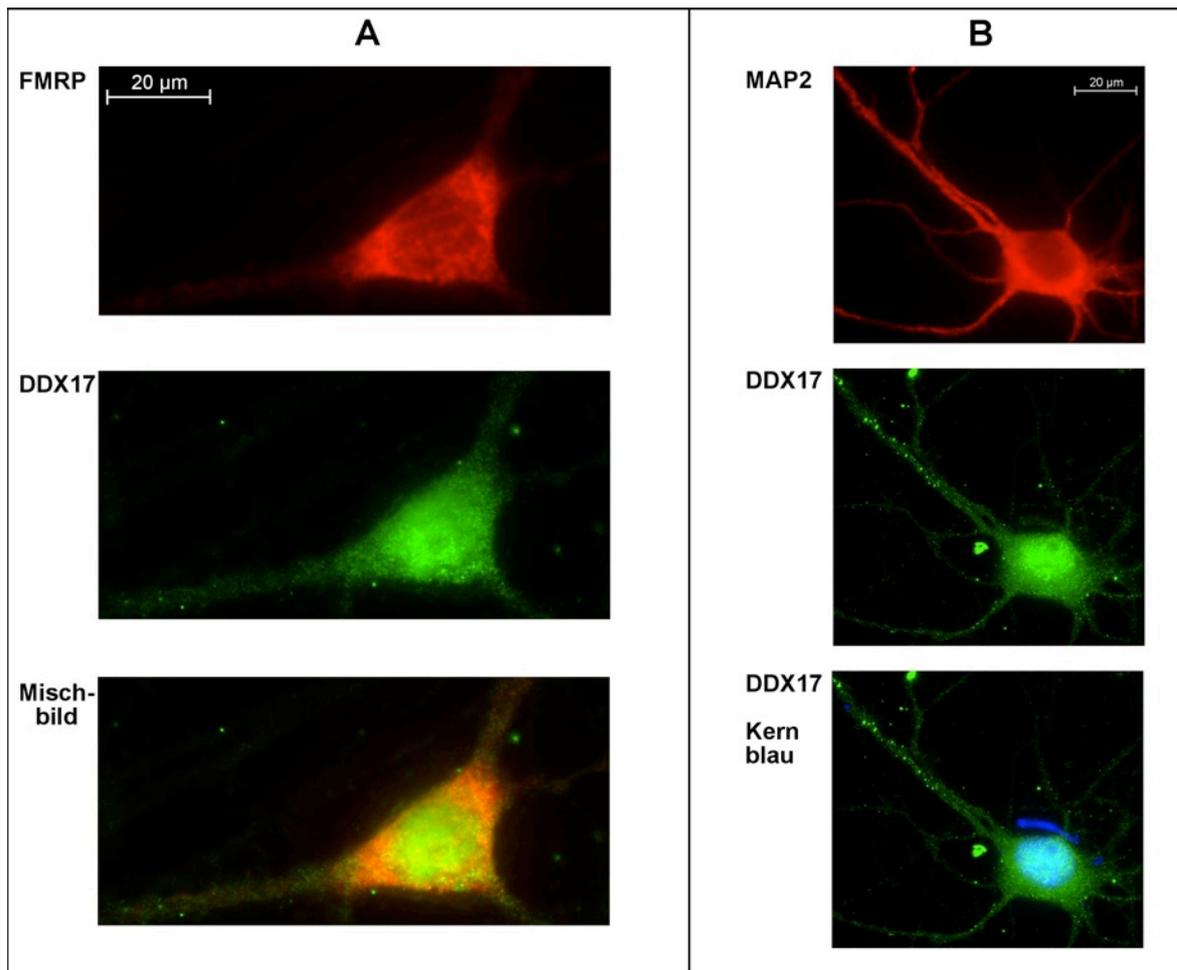


Abbildung 3.8 Nachweis und Lokalisation von DDX17, FMRP und MAP2 in kultivierten Ratten-Neuronen mittels Immunzytochemie. A: Vergrößerung von primären Rattenneuronen in Kultur für den Nachweis von FMRP (rot) und DDX17 (grün). Unten: Überlagerung der Farbkanäle zur Darstellung einer Colokalisation. B: MAP2 (rot) und DDX17 (grün). Unten: DDX17 (grün), Nucleus ist blau angefärbt (Antikörper und Verdünnung siehe Tab. 2.3).

In immunzytochemisch angefärbten Neuronen lässt sich DDX17 mit gleichmäßiger Intensität im Nucleus nachweisen, nicht aber in den Nucleoli. Das Zytosol ist ebenfalls gleichmäßig angefärbt, im Vergleich zum Nucleus allerdings weniger stark. In den Dendriten der Zelle zeigen sich in der Co-Färbung mit MAP2 (siehe Abb. 3.8 B) peripher bläschenförmige Akkumulationen von DDX17.

Bei Überlagerung der Farbkanäle von FMRP und DDX17 kommt es zu einer partiellen Gelbfärbung, vor allem im Nukleus und im kernnahen Zytosol, die eine Colokalisation, aber nicht zwangsläufige Assoziation der beiden Proteine zeigt.

3.4.3 DDX5

Als ein Protein, das den Großteil seiner Kernsequenz mit DDX17 gemein hat (Lamm *et al.*, 1996), wurde DDX5 (*DEAD box polypeptide 5*, IPI00017617) trotz fehlendem massenspektrometrischen Nachweis als putativer Interaktionspartner von FMRP interessant. Das Interaktionsmuster von DDX5 und FMRP wurde deshalb im *Western blot* ebenfalls eingehender untersucht.

Zunächst erfolgte der Nachweis des Proteins in den als „Eingangskontrollen“ entnommenen Zelllysaten (siehe Abb. 3.9 B, WT und MT). DDX5 konnte dabei in Form einer ca. 73 kDa großen Bande detektiert werden. Genauso verhielt es sich bei den anderen FMRP-haltigen Präzipitaten (siehe Abb. 3.9 A, WT, MT und WT-RNase). Einzig in der Spur, in der die EGFP-Kontrolle (EGFP) aufgetragen wurde, konnte keine Bande beobachtet werden.

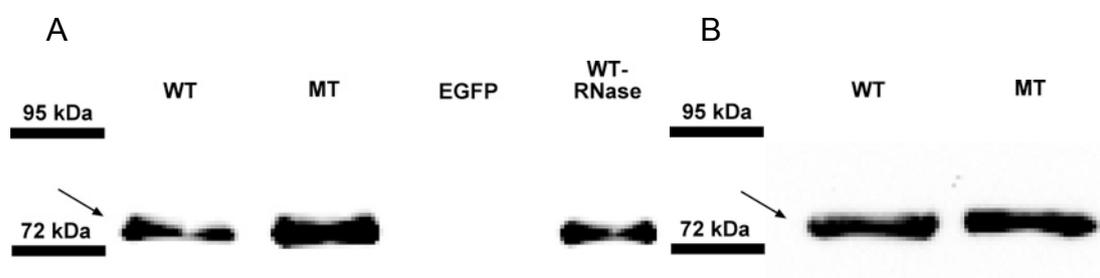


Abbildung 3.9 Nachweis von DDX5 (Pfeil) mittels *Western blot* und Immundetektion. Es kam ein im Kaninchen hergestellter Antikörper zum Einsatz (siehe Tab. 2.3). Für Erklärungen zu den einzelnen Spuren der *Western blots*, siehe Abbildung 3.7.

DDX5 zeigt somit ein identisches Bindungsmuster zu FMRP wie DDX17. Dabei ließ es sich sowohl als Interaktionspartner des Wildtypproteins als auch der mutierten Variante von FMRP nachweisen. Bei unverändertem Bindungsverhalten nach RNA-Verdau ist eine RNA-abhängige Interaktion von DDX5 und FMRP unwahrscheinlich. Eine *Protein-Protein*-Interaktion von DDX5 und FMRP ist möglich und sollte Bestandteil weiterer Untersuchungen sein.

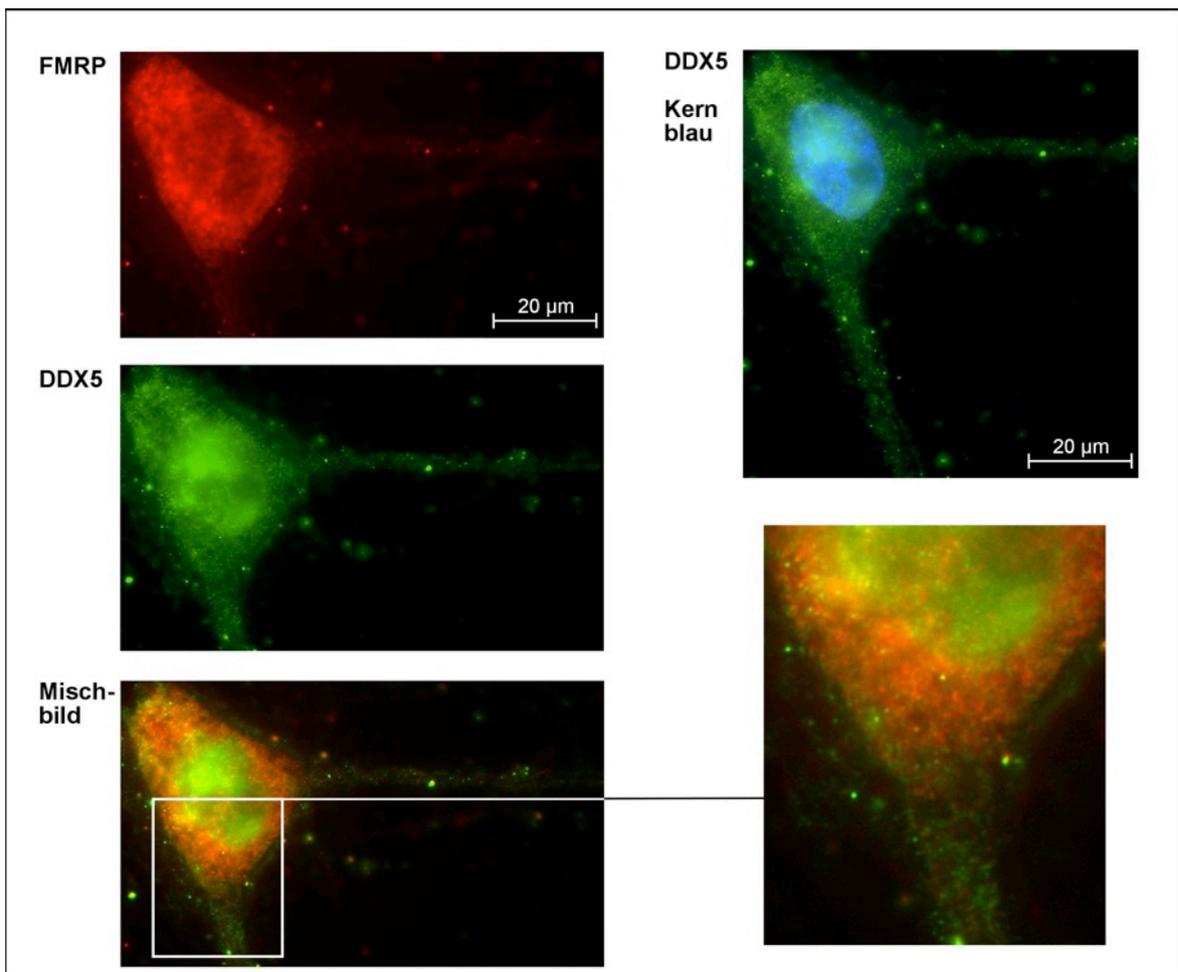


Abbildung 3.10 Subzelluläre Verteilung von DDX5 und FMRP in kultivierten primären Ratten-Neuronen. 60x Vergrößerung für den Nachweis von FMRP (rot) und DDX5 (grün). Links unten: Überlagerung der Farbkanäle zur Darstellung einer Colokalisation. Rechts oben: DDX5 (grün), der Kern ist blau angefärbt. Rechts unten: Ausschnittsvergrößerung (Antikörper und Verdünnung siehe Tab. 2.3).

Die Aufnahmen an kultivierten Rattenneuronen zeigen eine unterschiedliche Verteilung von DDX5 in Zytoplasma und Nukleus (siehe Abb. 3.10). Hierbei findet sich eine Akkumulation des Proteins im Zellkern, in den Nukleolii ist DDX5 nicht nachweisbar. Die Verteilung von DDX5 im Zytosol ist gleichmäßig, im Vergleich zum Nukleus ist das Protein allerdings in geringerer Konzentration detektierbar. Die Gelbfärbung, die sich im untersten Bild vor allem in den kernnahen Bereichen des Zytosols darstellt, zeigt eine Colokalisation mit FMRP.

3.4.4 PABPC1

Die Analyse der Zellhomogenate sollte eine mögliche Assoziation von PABPC1 (*poly(A) binding protein, cytoplasmic 1*) mit FMRP gegebenenfalls bestätigen.

Im *Western blot* zeigten sich in den als „Eingangskontrollen“ entnommenen Zelllysaten dabei Signale bei ca. 75 kDa (siehe Abb. 3.11 B, WT und MT). Ebenso ließ sich das Protein in den affinitätschromatographisch gereinigten Präzipitaten des Wildtypproteins (siehe Abb. 3.11 A, WT) und des mutierten Proteins (MT) nachweisen. Im Gegensatz dazu konnte PABPC1 im RNase-exponierten Wildtypproteinpräzipitat (WT-RNase) und in dem der EGFP-Kontrolle (EGFP) nicht detektiert werden.

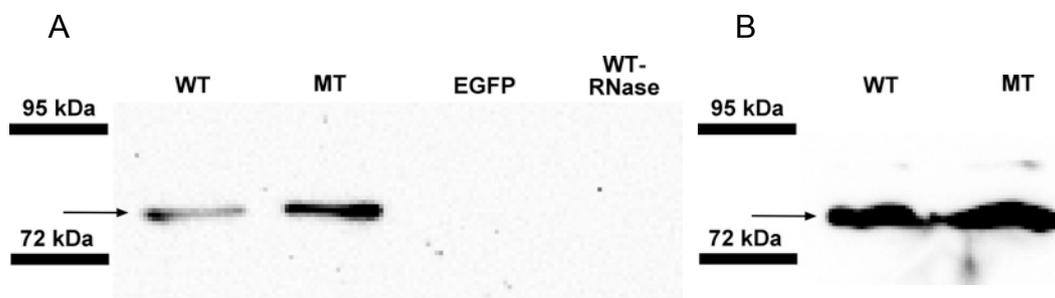


Abbildung 3.11 Nachweis von PABPC1 (Pfeil) mittels *Western blot* und Immundetektion. Zum Nachweis von PABPC1 kam ein im Kaninchen hergestellter Antikörper zum Einsatz. Für Erklärungen zu den einzelnen Spuren der *Western blots*, siehe Abbildung 3.7.

PABPC1 ließ sich demnach als Interaktionspartner von FMRP und FMRP-I304N nachweisen, eine Assoziation, die sich auf Basis dieser Ergebnisse als RNA-vermittelt bezeichnen lässt

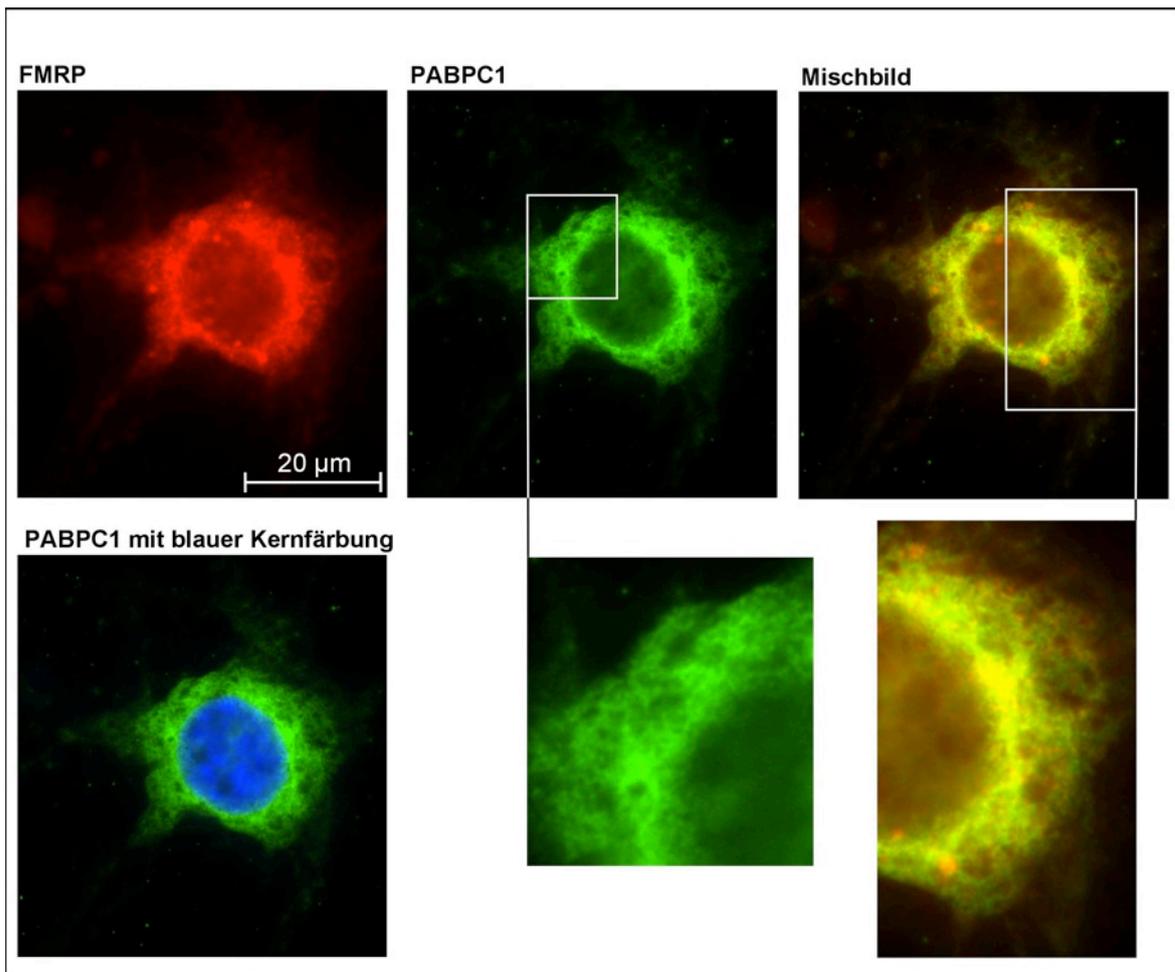


Abbildung 3.12 Immunzytochemischer Nachweis und Lokalisation von PABPC1 und FMRP in kultivierten Ratten-Neuronen. Obere Reihe: FMRP (rot) und PABPC1 (grün), ganz rechts sieht man ein überlagertes Bild zur Veranschaulichung der Colokalisation der beiden Proteine. Untere Reihe: Überlagerung der Farbkanäle von PABPC1 (grün) und dem blau gefärbten Kern, sowie Ausschnittvergrößerungen der oben beschriebenen Bilder (Antikörper und Verdünnung siehe Tab. 2.3).

Weitere Hinweise auf eine Assoziation der beiden Proteine lieferten die immunzytochemischen Aufnahmen an kultivierten Rattenneuronen (siehe Abb. 3.12). Es zeigte sich eine netzartige Anordnung von PABPC1 innerhalb des Zytosols, hier war das Protein in kernnahen Bereichen vermehrt nachweisbar. Im Vergleich dazu zeigte sich PABPC1 im Zellkern in deutlich verringerter Konzentration, die Nukleolii blieben gänzlich ausgespart. Bei Überlagerung der Farbkanäle von FMRP und PABPC1 ließ sich eine Colokalisation der beiden Proteine im gesamten Zytosol der Zelle darstellen.

3.4.5 MOV10

Ein weiteres Protein, das bezüglich seines Interaktionsmusters zu FMRP eingehender untersucht wurde, ist MOV10 (*Moloney leukemia virus 10, homolog (mouse)*, Harvester Zugangsnummer: IPI00444452). Das Protein konnte in der massenspektrometrischen Analyse des Wildtyppräzipitats nicht nachgewiesen werden. Jedoch war MOV10 bereits in vorausgegangenen Experimenten der AG Kindler als putativer Interaktionspartner von FMRP identifiziert worden.

In den als „Eingangskontrollen“ fungierenden Zelllysaten (siehe 2.2.2.2) konnte MOV10 in Form eines Signals bei etwa 115 kDa (siehe Abb. 3.13 B, WT und MT) nachgewiesen werden. Dementsprechend ließ sich das Protein sowohl im affinitätschromatographisch gereinigten Präzipitat des Wildtypproteins als auch in dem des mutierten Proteins nachweisen (siehe Abb. 3.13 A, WT und MT). In dem RNase-inkubierten Wildtypprotein-Präzipitat (WT-RNase) und in dem der EGFP-Kontrolle (EGFP) war MOV10 nicht detektierbar.

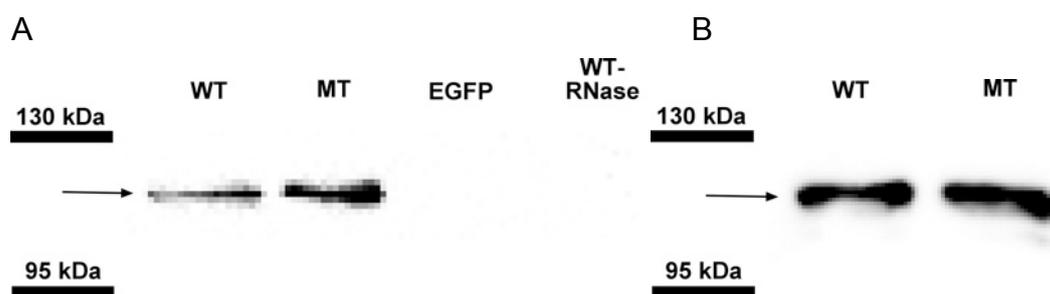


Abbildung 3.13 Detektion des Proteins MOV10 (Pfeil) mittels *Western blot* und Immundetektion. Es kam ein im Kaninchen hergestellter Antikörper zum Einsatz (siehe Tab. 2.3). Für Erklärungen zu den einzelnen Spuren der *Western blots*, siehe Abbildung 3.7.

MOV10 konnte somit mittels *Western blot* als Interaktionspartner von FMRP und FMRP-I304N bestätigt werden. Bei fehlendem Nachweis von MOV10 im RNase-exponierten Präzipitat lässt sich die Assoziation mit FMRP als RNA-vermittelte Interaktion bezeichnen. Eine *Protein-Protein*-Bindung der Interaktionspartner ist sehr unwahrscheinlich.

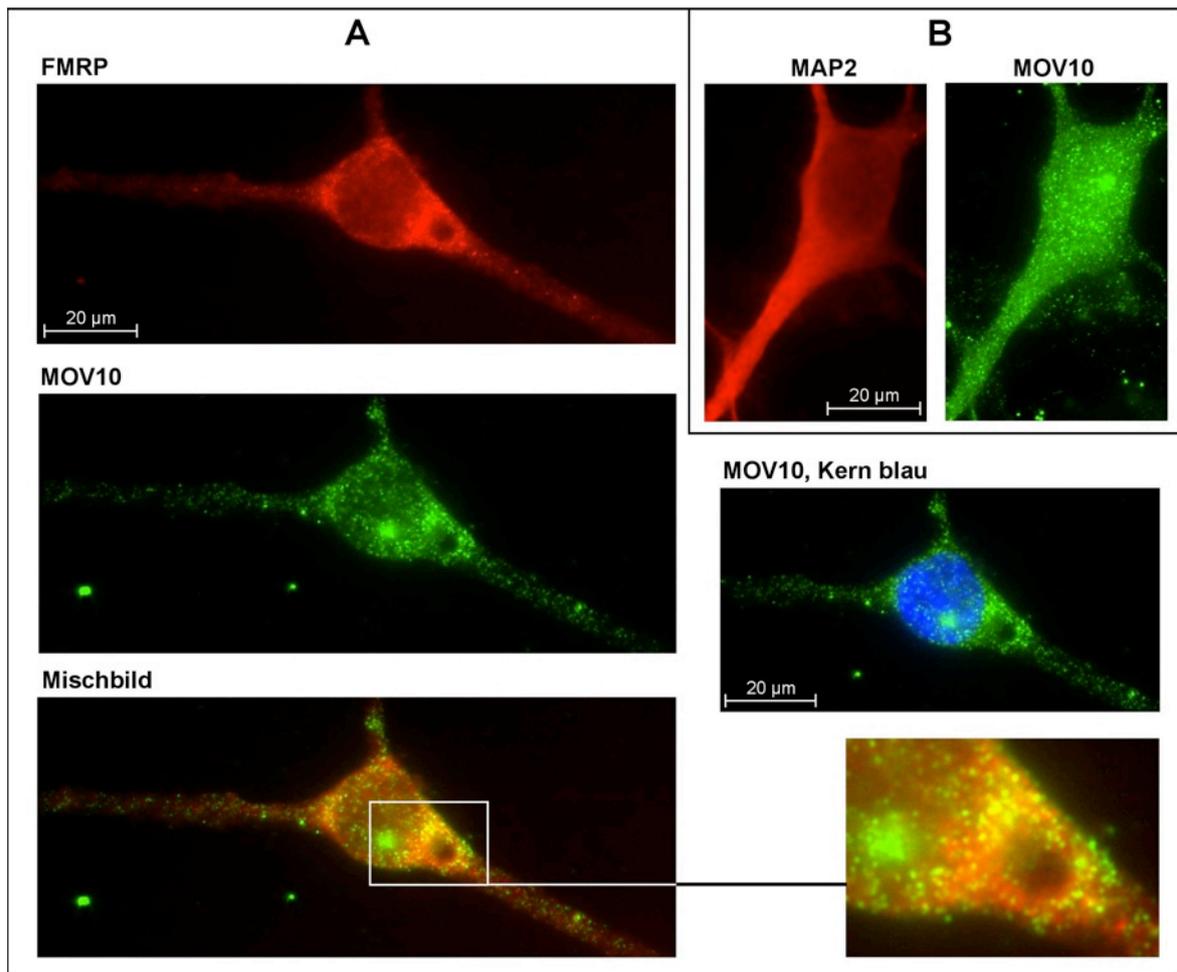


Abbildung 3.14 Lokalisation von MOV10, FMRP und MAP2 in kultivierten Rattenneuronen
 A: Vergrößerung für den immunzytochemischen Nachweis von FMRP (rot) und MOV10 (grün). Links unten: Überlagerung der Farbkanäle zur Darstellung einer Colokalisation. Rechts: Überlagerung der Farbkanäle von MOV10 (grün) und dem blau gefärbten Kern, sowie Ausschnittvergrößerungen der oben beschriebenen Bilder. B: Vergrößerung von primären Rattenneuronen, MAP2 (rot) und MOV10 (grün; Antikörper und Verdünnung siehe Tab. 2.3).

Immunzytochemische Aufnahmen an kultivierten Rattenneuronen (siehe Abb. 3.14) zeigten eine relativ gleichmäßige Verteilung des Proteins innerhalb der Zellen. Es findet sich eine Anreicherung in Form kleiner Granula, die über das gesamte Zytoplasma verteilt sind. Die Granula-Dichte ist perinukleär am höchsten und nimmt zur Peripherie der Zelle hin ab. Eine Colokalisation mit dem im roten Farbkanal dargestellten FMRP, ist vornehmlich kernnah zu beobachten und durch eine gelbliche Farbgebung verdeutlicht. Lediglich im Nukleus ist die Konzentration von MOV10 vergleichsweise geringer.

3.4.6 RBM14

In den als „Eingangskontrollen“ entnommenen Zelllysaten konnte das Protein RBM14 (*RNA binding motif protein 14*) in Form eines Signals bei ca. 73 kDa detektiert werden (siehe Abb. 3.15 B, WT und MT). Es folgte der Nachweis des Proteins in allen FMRP enthaltenden affinitätschromatographisch gereinigten Präzipitaten (siehe Abb. 3.15 A, WT, MT, WT-RNase). Im EGFP-Präzipitat (EGFP) war RBM14 dagegen nicht detektierbar.



Abbildung 3.15 Nachweis von RBM14 (Pfeil) mittels *Western blot* und Immundetektion. Es kam ein im Kaninchen hergestellter Antikörper zum Einsatz (siehe Tab. 2.3). Für Erklärungen zu den einzelnen Spuren der *Western blots*, siehe Abbildung 3.7.

RBM14 konnte somit als Interaktionspartner von FMRP und FMRP-I304N nachgewiesen werden. Die Assoziation der Proteine erfolgt, unter Berücksichtigung der dargestellten Ergebnisse, RNA-unabhängig.

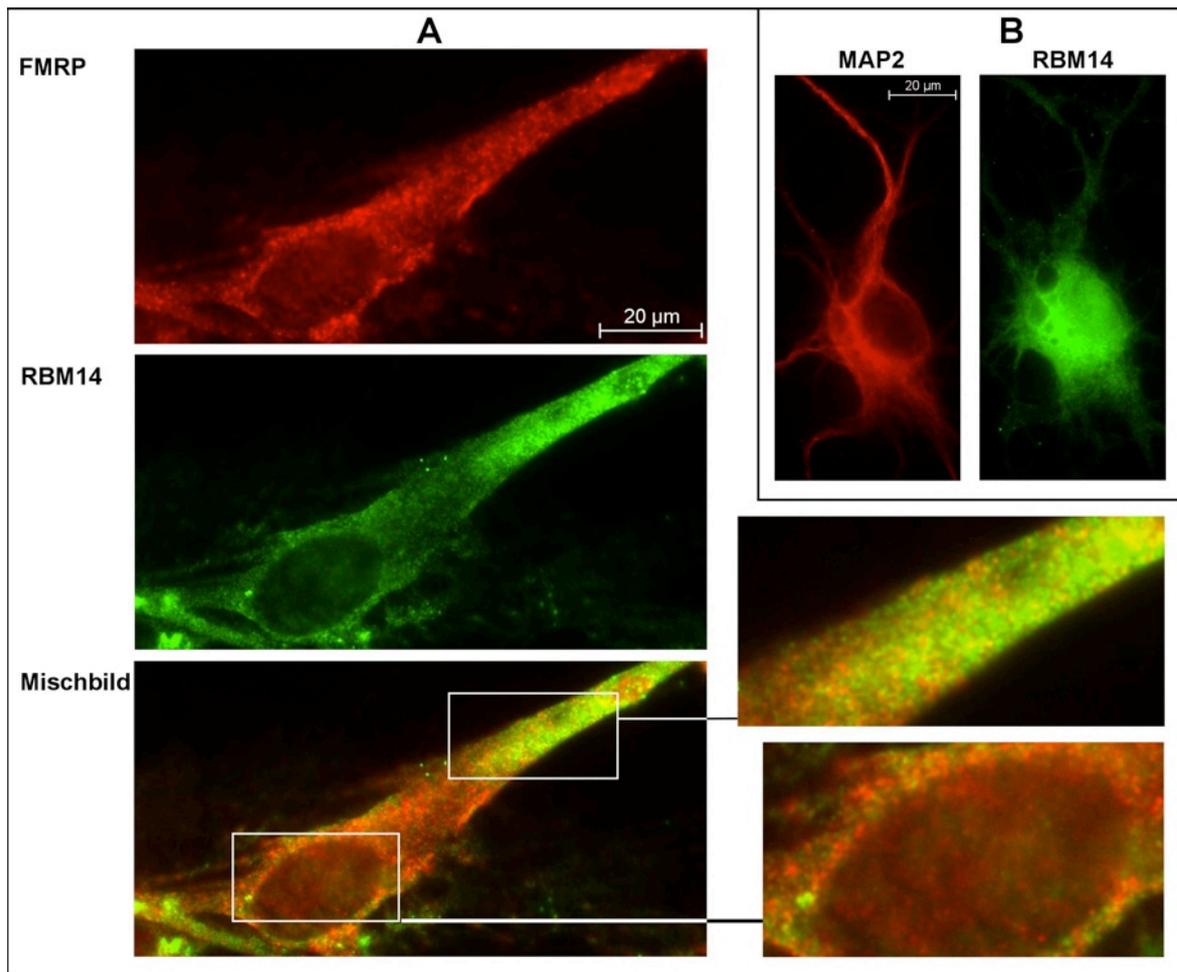


Abbildung 3.16 Nachweis und Lokalisation von RBM14, FMRP und MAP2 in kultivierten Ratten-Neuronen durch Immunzytochemie. A: Vergrößerung von primären Rattenneuronen in Kultur für den immunzytochemischen Nachweis von FMRP (rot) und RBM14 (grün). Das unterste Bild zeigt die Überlagerung der Farbkanäle zur Darstellung einer Colokalisation mit Ausschnittsvergrößerung. B: Vergrößerung primärer Rattenneurone in Kultur für den Nachweis von MAP2 (rot) und DDX17 (grün; Antikörper und Verdünnung siehe Tab. 2.3).

Immunzytochemische Aufnahmen an kultivierten Rattenneuronen des Hippokampus zeigten eine gleichmäßige Verteilung von RBM14 im Zytoplasma (siehe Abb. 3.16), die auch in der Peripherie der Zelle gut darstellbar ist. Im Vergleich dazu ist die Konzentration des Proteins im Nukleus geringer. Bei Überlagerung der Farbkanäle von FMRP und RBM14 zeigt sich eine Colokalisation der beiden Proteine in der Peripherie der Zelle (3.16 A, unten).

3.4.7 KHSRP

Bereits in vorausgegangenen Experimenten zum FRAX der AG Kindler war KHSRP (*KH-type splicing regulatory protein*) als Bindungspartner von FMRP identifiziert worden. Nachdem das Protein auch im Rahmen der Massenspektrometrie als putativer Interaktionspartner von FMRP nachgewiesen wurde, war eine weitere Untersuchung des Bindungsverhaltens von KHSRP die logische Konsequenz.

Das Protein hat ein berechnetes Molekulargewicht von 75 kDa, läuft im SDS-Gel allerdings auf Höhe von ca. 90 kDa. In den als „Eingangskontrollen“ genutzten Zelllysaten ließ sich KHSRP nachweisen (siehe Abb. 3.17 B, WT und MT). Im *Western blot* zeigten sich dabei zwei Banden bei ca. 90 kDa (siehe Pfeil), die auf die Existenz unterschiedlicher Isoformen von KHSRP zurückzuführen sind, die durch alternatives Spleißen entstehen (AceView, NCBI). Außerdem ließ sich in den „Eingangskontrollen“ eine weitere Bande bei ca. 80 kDa detektieren (siehe Abb. 3.17 B, WT und MT). Hierbei handelt es sich höchstwahrscheinlich um das Protein FUBP1 (*Far upstream element-binding protein 1*; Harvester Zugangsnummer: IPI00375441), das mit KHSRP nah verwandt ist.

KHSRP ließ sich in allen vier der untersuchten affinitätschromatographisch gereinigten Präzipitaten detektieren (siehe Abb. 3.17 A, WT, MT, EGFP und WT-RNase), auch im EGFP-Präzipitat, das als „Negativkontrolle“ fungierte (siehe 2.2.2.2). Hier war das Signal im Vergleich zu den anderen Präzipitaten deutlich schwächer ausgeprägt. Dieses Resultat war auch bei wiederholten, unabhängig durchgeführten Experimenten zu beobachten.

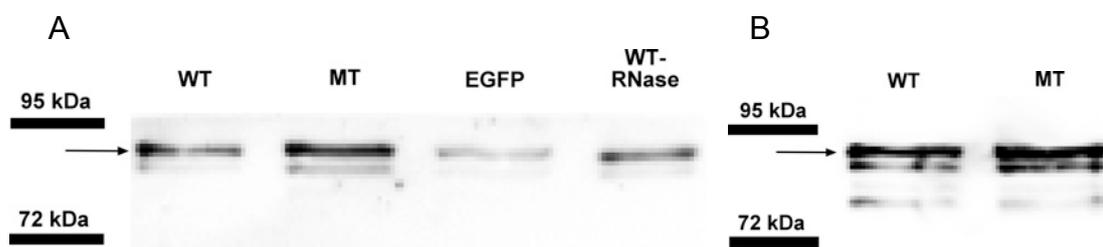


Abbildung 3.17 Nachweis von KHSRP (Pfeil) *Western blot* und Immundetektion.

Es kam ein im Kaninchen hergestellter Antikörper zum Einsatz (siehe Tab. 2.3). Für Erklärungen zu den einzelnen Spuren der *Western blots*, siehe Abbildung 3.7.

Bei Nachweis des Proteins in der EGFP-Kontrollspur könnten unterschiedliche Ursachen diesen Versuchsausgang begründen. So wäre es möglich, dass das Protein KHSRP an einen Bestandteil des *GFP-Traps* (z.B. die Agarosematrix) oder aber auch direkt an EGFP bindet.

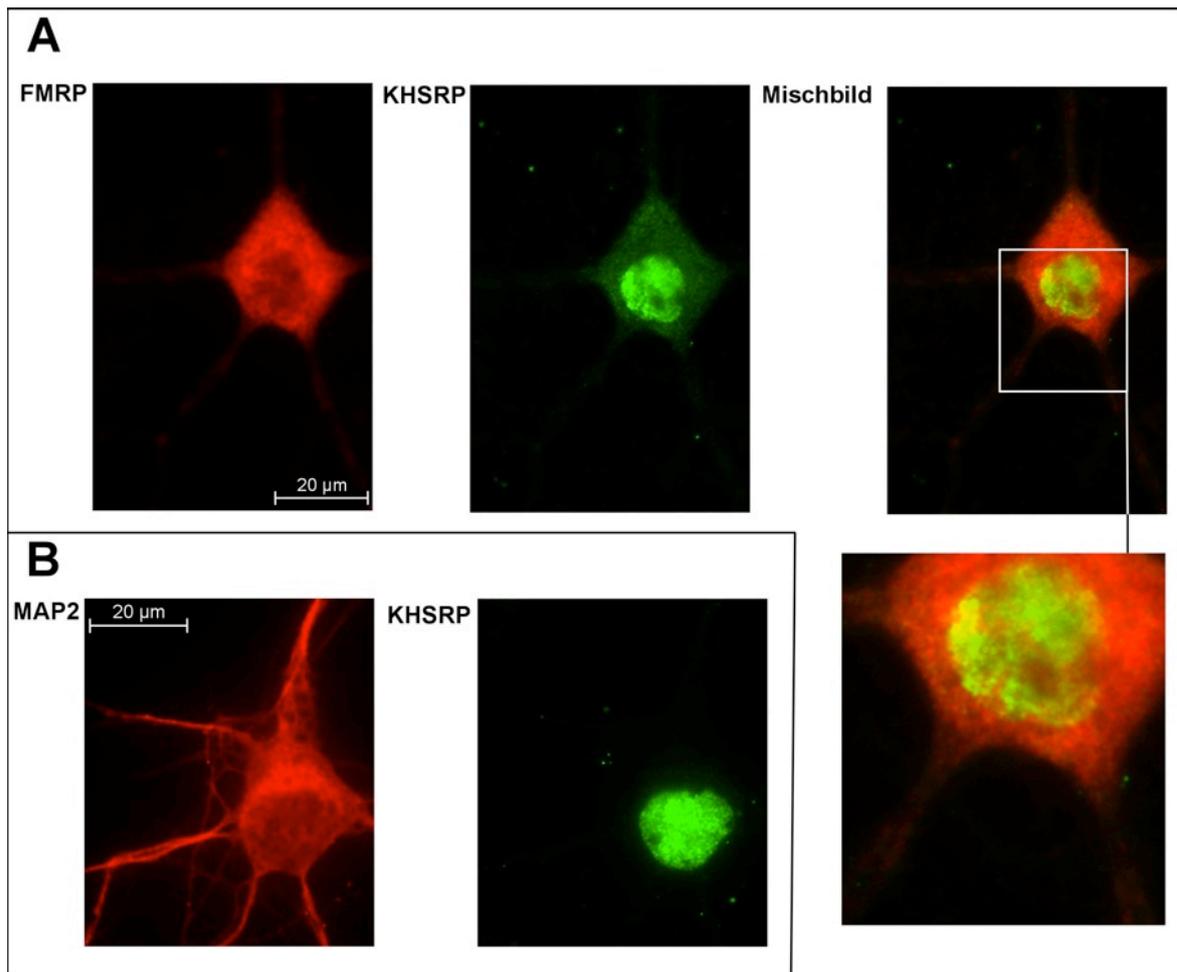


Abbildung 3.18 Subzelluläre Verteilung von KHSRP, FMRP und MAP2 in kultivierten Rattenneuronen. A: Vergrößerung primärer Rattenneuronen in Kultur für den immunzytochemischen Nachweis von FMRP (rot) und KHSRP (grün). Rechts: Überlagerung der Farbkanäle zur Darstellung einer Colokalisation. Unten rechts: Ausschnittsvergrößerung. B: Vergrößerung von primären Rattenneuronen in Kultur für den Nachweis von MAP2 (rot) und KHSRP (grün; Antikörper und Verdünnung siehe Tab. 2.3).

Zur Veranschaulichung der subzellulären Lokalisation von KHSRP erfolgte die immunzytochemische Färbung mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper (siehe Abb. 3.18). Es zeigte sich eine Akkumulation des Proteins im Nukleus, in den Nukleolii konnte KHSRP dagegen nicht nachgewiesen werden. Im Zytosol der Zelle war das Protein vergleichsweise schwächer, in Form feiner Granulae entlang der Dendriten, detektierbar. Eine sichtbare Colokalisation von FMRP und KHSRP ließ sich bei überwiegend abweichenden zellulärem Verteilungsmuster der Proteine nur sehr vereinzelt im Nukleus beobachten.

3.4.8 XRCC6

Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung der Präzipitate erfolgte die Detektion von XRCC6 (*X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6*) mittels Antikörper im *Western blot*. Hier erfolgte der Nachweis durch ein Signal in Form einer Bande bei ca. 72 kDa. Das Protein ließ sich sowohl in den als „Eingangskontrollen“ aufgetragenen Zelllysaten (siehe Abb. 3.19 B, WT und MT) als auch in den FMRP-haltigen, fertig gereinigten Präzipitaten detektieren (siehe Abb. 3.19 A, WT, MT und WT-RNase). Im WT-RNase-Präzipitat erfolgte der Nachweis in erkennbar stärkerer Ausprägung. Die EGFP-Kontrolle zeigte kein Signal.

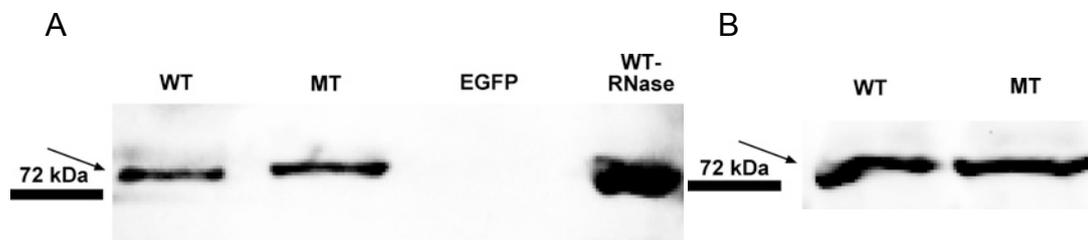


Abbildung 3.19 Detektion des Proteins XRCC6 (Pfeil) mittels *Western blot* und Immundetektion. Es kam ein in der Maus hergestellter Antikörper zum Einsatz (siehe Tab. 2.3). Für Erklärungen zu den einzelnen Spuren der *Western blots* siehe Abbildung 3.7.

XRCC6 interagiert demnach sowohl mit FMRP als auch mit dem mutierten Protein FMRP-I304N. Diese Interaktion ist nicht RNA-abhängig. XRCC6 bindet nicht an EGFP.

Die subzelluläre Verteilung von XRCC6 innerhalb der Zelle zeigt ein ähnliches Verteilungsmuster wie FMRP (siehe Abb. 3.20). Nach Abschluss der Färbung stellt sich eine relativ gleichmäßige Anordnung des Proteins im Zytoplasma dar. In der Peripherie der Zelle erfolgte dabei ein etwas schwächerer Nachweis. Der Zellkern ist - analog zu FMRP - deutlich geringer angefärbt, was auf ein niedrigeres Vorkommen des Proteins im Zellkern schließen lässt. Überlagert man die Farbkanäle von FMRP und XRCC6, zeigt sich eine nahezu gleichmäßig gelb angefärbte Zelle als Ausdruck einer Colokalisation der beiden Proteine.

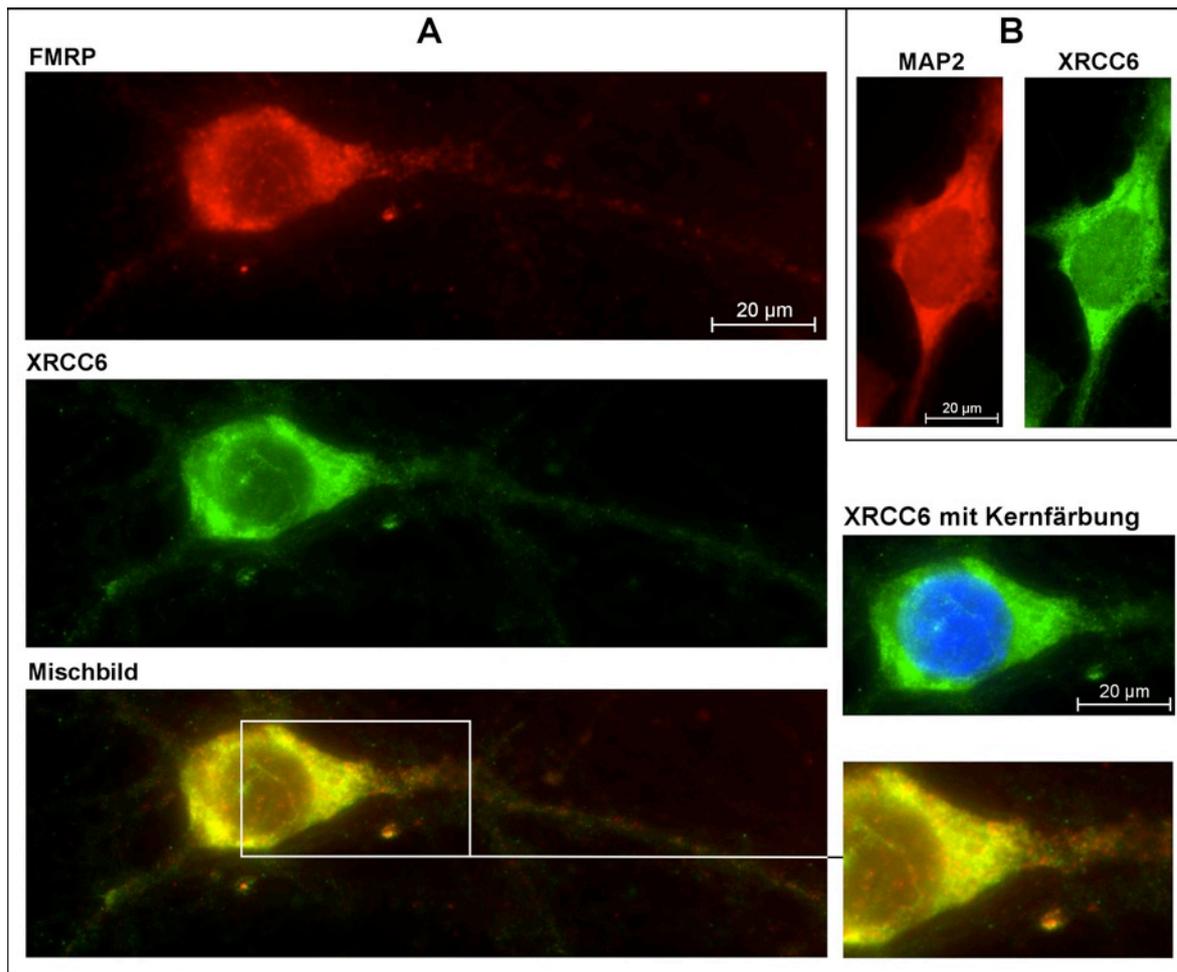


Abbildung 3.20 Subzelluläre Verteilung von XRCC6, FMRP und MAP2 in kultivierten Rattenneuronen. A: Vergrößerung primärer Rattenneurone für den immunzytochemischen Nachweis von FMRP (rot) und XRCC6 (grün). Unten: Überlagerung der Farbkanäle zur Darstellung einer Colokalisation. Unten rechts Ausschnittsvergrößerung. B: Vergrößerung primärer Rattenneurone in Kultur für den Nachweis von MAP2 (rot) und XRCC6 (grün; Antikörper und Verdünnung siehe Tab. 2.3)

3.4.9 TDRD3

Ein weiteres Protein, das im Rahmen dieser Arbeit als Interaktionspartner von FMRP verifiziert werden sollte, ist TDRD3, das *Tudor domain containing Protein 3*. Die Analysen der Zellhomogenate mit Hilfe des *Western blots* zeigten ca. 90 kDa große Banden, mittels derer sich TDRD3 nachweisen ließ. In den als „Eingangskontrollen“ verwendeten Zelllysaten konnte TDRD3 sowohl in dem des Wildtypproteins (siehe Abb. 3.21 B, WT) als auch in dem des mutierten Proteins FMRP-I304N (MT) detektiert werden. Demgegenüber zeigte sich ein verändertes Bild nach Abschluss der Affinitätschromatographie.

Im Präzipitat des Wildtypproteins FMRP (siehe Abb. 3.21 A, WT) ließ sich TDRD3 nachweisen, auch nach RNase-Inkubation blieb das Protein detektierbar (WT-RNase). Im Unterschied hierzu war das Protein im Präzipitat des mutierten Proteins FMRP-I304N (MT-Spur) und der EGFP-Kontrolle (EGFP-Spur) nicht nachweisbar.

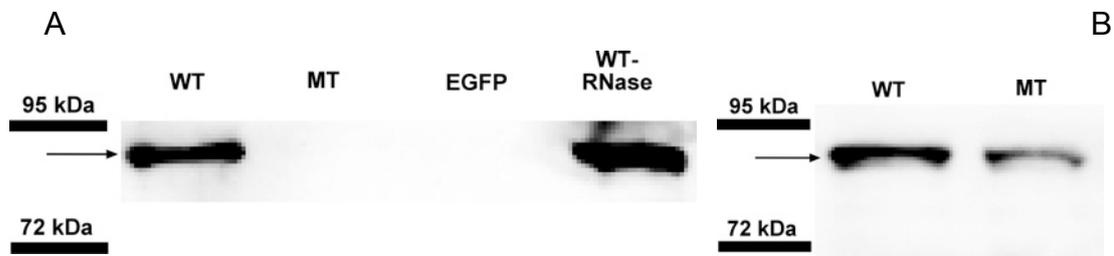


Abbildung 3.21 Detektion von TDRD3 (Pfeil) mittels *Western blot* und Immundetektion. Es kam ein in der Maus hergestellter Antikörper zum Einsatz (siehe Tab. 2.3). Für Erklärungen zu den einzelnen Spuren der *Western blots*, siehe Abbildung 3.7.

Mit Auswertung der Immunoblots konnte somit gezeigt werden, dass TDRD3 mit FMRP interagiert. Diese Verbindung ist nicht RNA-abhängig. Interessanterweise ist eine Interaktion von TDRD3 mit FMRP-I304N nicht zu belegen. Damit ist TDRD3 das einzige der hier eingehender untersuchten Proteine, bei dem ein Unterschied im Interaktionsmuster zwischen Wildtyp- und mutierten Protein zu detektieren war.

Im Rahmen der Immunzytochemie (siehe Abb. 3.22) zeigt sich eine gleichmäßige Verteilung des grün angefärbten TDRD3 innerhalb der Zelle. Am deutlichsten lässt sich das Protein im perinukleären Bereich nachweisen, allerdings kommt es auch in der Peripherie der Zelle zu Anreicherungen. Im Vergleich dazu ist TDRD3 im Nukleus in deutlich geringerer Intensität und nur vereinzelt detektierbar. Damit gleichen die Ergebnisse dieser Arbeit denen anderer Arbeitsgruppen (Lindner *et al.*, 2008; Goulet *et al.*, 2008). Das subzelluläre Verteilungsmuster von TDRD3 ist dem von FMRP also sehr ähnlich. Bei Überlagerung der Farbkanäle für FMRP und TDRD3 zeigten sich über die gesamte Zelle verteilt gelb angefärbte Areale, die sich besonders ausgeprägt in Kernnähe darstellten. Diese Gelbfärbung ist Zeichen einer Colokalisation der beiden Proteine.

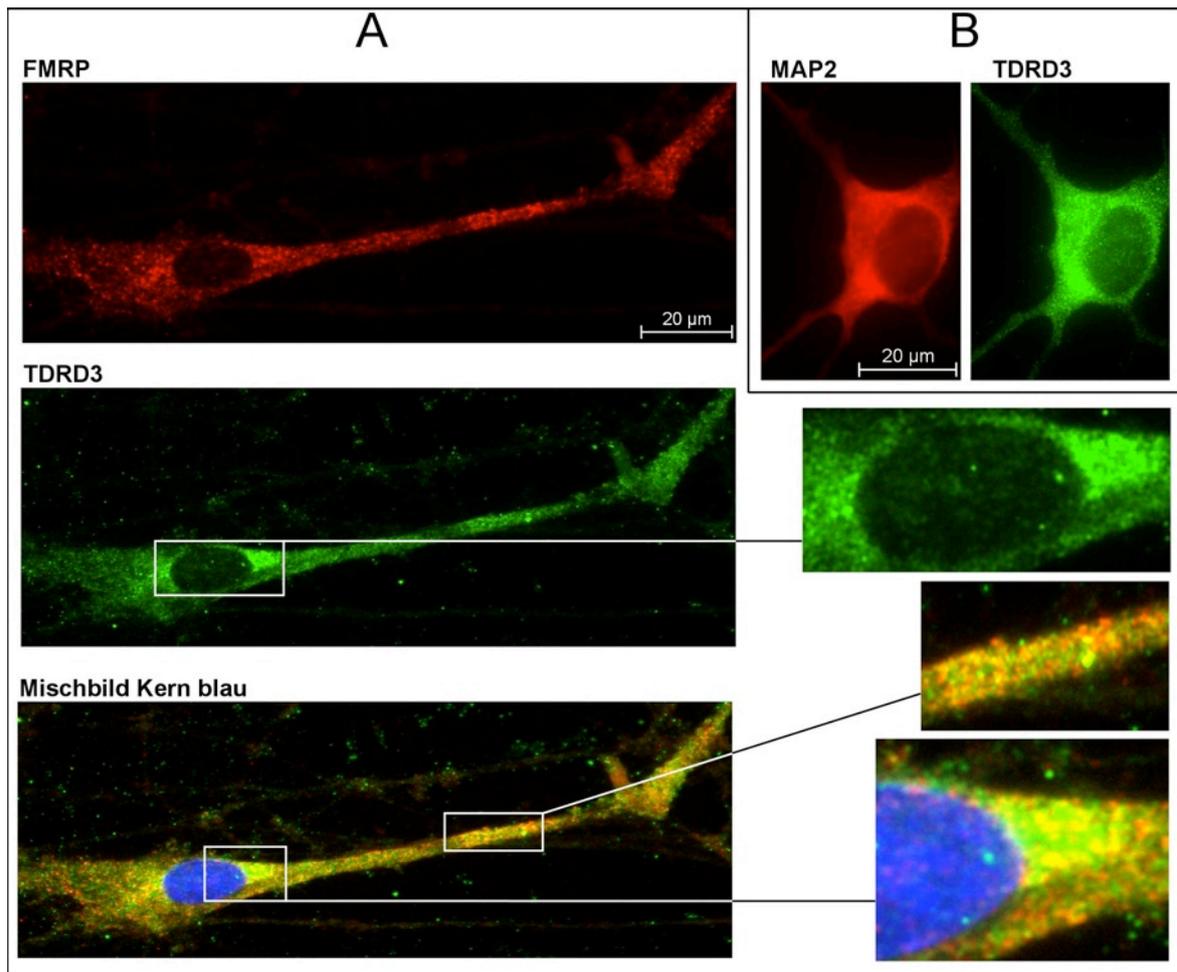


Abbildung 3.22 Subzelluläre Verteilung von TDRD3, FMRP und MAP2 in kultivierten Rattenneuronen. A: Vergrößerung primärer Rattenneuronen für den immunzytochemischen Nachweis von FMRP (rot) und TDRD3 (grün). Unten: Überlagerung der Farbkanäle zur Darstellung einer Colokalisation, der Nukleus ist in Blau angefärbt. Rechts: Ausschnittsvergrößerungen der jeweiligen Bilder. B: Vergrößerung primärer Rattenneurone für den Nachweis von MAP2 (rot) und TDRD3 (grün; Antikörper und Verdünnung siehe Tab. 2.3).

Die Zusammenschau der Ergebnisse zeichnet damit für TDRD3 ein interessantes Bild. Das Protein konnte als Interaktionspartner von FMRP bestätigt werden. Besonders bemerkenswert ist dabei, dass TDRD3 nicht mit dem mutierten Protein FMRP-I304N interagiert. Weitere Hinweise auf eine Assoziation von FMRP und TDRD3 lieferten die immunzytochemischen Aufnahmen an kultivierten Rattenneuronen. Beide Proteine zeigten ein sehr ähnliches Verteilungsmuster innerhalb der Zelle. Eine deutliche Colokalisation der beiden Proteine im Zytoplasma konnte dargestellt werden.

4 Diskussion

Eine Beteiligung von FMRP an der Regulation der Translation konnte dargestellt werden (Khandjian *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1997b). Weitere Untersuchungen zeigten eine inhibitorische Wirkung des Proteins (Laggerbauer *et al.*, 2001). Um diese Funktionsweise vermitteln zu können, muss FMRP als Homodimer vorliegen. Für die Dimerisierung ist ein Bereich des Proteins erforderlich, der die beiden KH-Domänen beinhaltet. Interessanterweise ist eine Homodimerisierung von FMRP-I304N nicht möglich, der inhibitorische Einfluss auf die Translation nimmt *in vitro* deutlich ab (Laggerbauer *et al.*, 2001). Da die von der Mutation betroffene KH-Domäne nicht nur zur Bindung von RNA befähigt, sondern auch Protein-Interaktionen vermittelt (Kim *et al.*, 2000), war es interessant zu erfahren, ob es außer des Homodimerisierungsdefektes von FMRP-I304N auch zu einem veränderten Bindungsverhalten anderer Proteine kommt.

Möglicherweise könnte ein verändertes Interaktionsverhalten von FMRP ursächlich für die verminderte regulatorische Translationswirkung sein. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde humanes, EGFP-markiertes FMRP in HEK-293-Zellen rekombinant exprimiert. Mit Hilfe einer Affinitätschromatographie wurde FMRP und die daran gebundenen Proteine gereinigt. Das Präzipitat wurde anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert, um mögliche endogene Interaktionspartner von FMRP zu identifizieren. In sich anschließenden Experimenten wurden einige dieser Proteine mittels *Western blot* als Interaktionspartner von FMRP verifiziert. Vergleichende Untersuchungen wurden mit dem mutierten Protein FMRP-I304N durchgeführt, um Unterschiede im Interaktionsverhalten zu FMRP darstellen zu können. Des Weiteren wurde ein enzymatischer RNA-Verdau des FMRP-Homogenats durchgeführt und ebenfalls per *Western blot* analysiert, um Aufschluss über die Art der Bindung zwischen FMRP und den untersuchten Proteinen zu erhalten. Zusätzliche Informationen über die subzelluläre Lokalisation der untersuchten Proteine lieferten immunzytochemische Experimente an primären Hippokampusneuronen der Ratte.

Ergebnisse der massenspektrometrischen Untersuchung

Bei der massenspektrometrischen Analyse des Wildtyppräzipitats wurden 50 Proteine als putative Interaktionspartner von FMRP identifiziert. Diese Proteine können in 3 Gruppen unterteilt werden.

Es fanden sich Chaperone, nukleinsäurebindende Proteine, sowie weitere Proteine, die vermutlich unabhängig vom Fusionsprotein im Rahmen der Affinitätsreinigung präzipitiert wurden. Zu den letztgenannten Proteinen gehören Strukturproteine der Zelle wie z.B. α -Tubulin und TOMM40 (mitochondrales Tunnel-Membranprotein), sowie Proteine, die in den zellulären Stoffwechsel eingebunden sind wie z.B. die Pyruvatkinase und ATP5A1 (mitochondrale ATP-Synthetase). Ergebnisse der Arbeitsgruppe Kindler deuten daraufhin, dass diese Proteine im Rahmen der Aufreinigung mittels *GFP-Trap* unabhängig von dem verwendeten Fusionsprotein fast immer präzipitiert werden.

Hitze-Schock-Proteine

Eine in diesem Experiment häufiger nachgewiesene Gruppe von Proteinen ist die der Chaperone. Folgende der massenspektrometrisch identifizierten Proteine können dieser Gruppe zugeordnet werden: CCT6A, CCT6B, CCT7, CCT8, HSP7C, HSPA9, HSP70, HSP90AB1 und TCP1. Chaperone sorgen u.a. für die korrekte Faltung von Proteinen bzw. korrigieren die Struktur fehlgefalteter Proteine. Das in diesem Experiment rekombinant exprimierte Fusionsprotein EGFP-FMRP kommt unter physiologischen Bedingungen nicht in der Zelle vor. Es besteht daher die Möglichkeit, dass die beiden Bestandteile des Proteins EGFP und FMRP dazu neigen, sich „fehlzufalten“. Eine vermehrte Assoziation von Chaperonen mit dem Fusionsprotein könnte eine Folge sein. Verfolgt man diese Hypothese weiter, wäre durch die Expression von EGFP-FMRP in großen Mengen auch die Anzahl der assoziierten Chaperone erhöht, diese würden dadurch anteilig auch häufiger copräzipitiert werden.

In der Literatur finden sich Hinweise, dass Chaperone bei der Expression rekombinanter Proteine häufig als Interaktionspartner identifiziert werden (Brendel *et al.*, 2004). Die Identifikation von HSP im Rahmen des Experiments war also zu erwarten, anteilig scheinen sie aus den dargestellten Gründen überrepräsentiert. Des Weiteren ist zu erwähnen, dass bei affinitätschromatographischen Reinigungen anderer Proteine nach der *GFP-Trap*-Methode der Arbeitsgruppe Kindler ebenfalls Chaperone detektiert wurden. Die nachgewiesenen HSP könnten also unter physiologischen Bedingungen weniger relevant sein als es die Anzahl der identifizierten Proteine suggeriert. Ein alternativer Versuch in Form einer Immunpräzipitation mit Hilfe von Antikörpern gegen endogenes FMRP von HEK-293-Zellen, könnte eine geringere Anzahl von HSP im Präzipitat zur Folge haben und damit diese Fragestellung beantworten.

DNA-bindende Proteine

Im Rahmen der massenspektrometrischen Analyse konnten einige DNA-bindende Proteine als putative Interaktionspartner von FMRP bestimmt werden. Zu diesen Proteinen gehören ENO1, PRKDC, XRCC6 und ZNF518B. Die Proteine PRKDC (*protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide*) und XRCC6 bilden dabei eine DNA-abhängige-Proteinkinase. PRKDC fungiert als katalytische Untereinheit (Wang *et al.*, 2004) und besitzt die Fähigkeit, andere Proteine (Ting *et al.*, 1998) zu binden. DNA-bindender Teil dieser Kinase ist XRCC6 (Jin *et al.*, 1997, Schild-Poulter *et al.*, 2001). Innerhalb der Zelle reguliert das Protein als Bestandteil eines Transkriptionsfaktorkomplexes die Transkription (Willis *et al.*, 2002).

In der vorliegenden Arbeit konnte XRCC6 mittels *Western blot* als spezifischer Interaktionspartner von FMRP und FMRP-I304N nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass FMRP und XRCC6 auf Basis von *Protein-Protein*-Interaktionen miteinander assoziiert sind, da diese Verbindung auch nach RNA-Verdau Bestand hatte. Ob es zwischen den Proteinen zu einer direkten Interaktion kommt, muss noch abschließend geklärt werden. Die in dieser Arbeit durchgeführten immunzytochemischen Aufnahmen an primären Rattenneuronen (siehe Abb. 3.20) zeigen eine relativ gleichmäßige Verteilung von XRCC6 im Zytoplasma, hier colokalisiert es mit FMRP. Im Zellkern zeigte sich dagegen eine verringerte Konzentration des Proteins verglichen mit dem Zytosol. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass XRCC6 neben den nukleären DNA-bindenden Funktionen (s.o.) auch eine zytosolische Bedeutung besitzt. So könnte XRCC6 ähnlich wie FMRP an RNA binden. Ob diese Bindung bereits im Nukleus zustande kommt und die Proteine möglicherweise gemeinsam aus diesem exportiert werden, müssen weitere Untersuchungen aufklären.

Erwähnenswert ist die Tatsache, dass die Proteinkinase mit diversen in diesem Experiment massenspektrometrisch identifizierten Proteinen interagiert. In der Abbildung 4.1 werden bekannte Interaktionen der betreffenden Proteine graphisch dargestellt. Die Interaktion von FMRP mit XRCC6 sowie die multiplen Verbindungen zu weiteren, im Rahmen dieses Experiments identifizierten Proteinen lassen XRCC6 als plausiblen Interaktionspartner von FMRP erscheinen. Die Funktionen von XRCC6, die seiner Interaktionspartner (z.B. PARP1 (*poly (ADP-ribose) polymerase 1*), Idogawa *et al.*, 2007) und der anderen identifizierten DNA-bindenden Proteine (z.B. ILF3 (*interleukin enhancer binding factor 3*)) deuten auf eine regulatorische Funktion im Rahmen des Metabolismus von RNA hin.

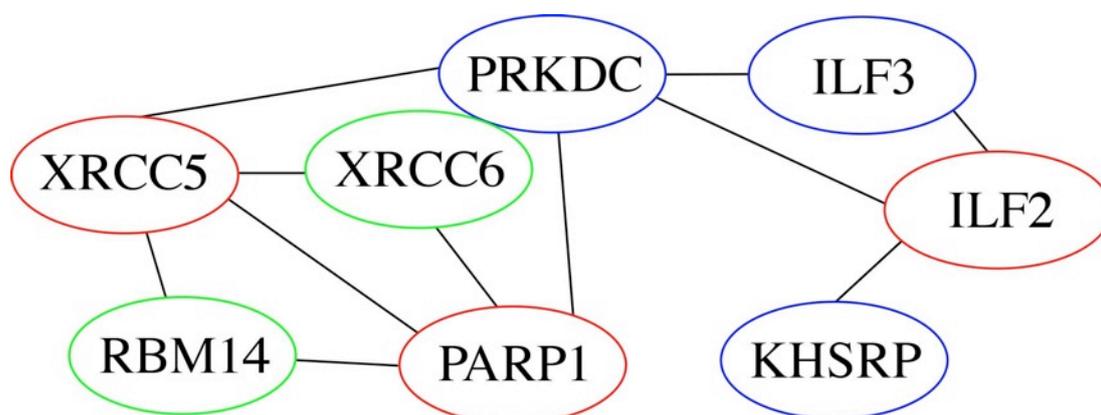


Abbildung 4.1 Schematische Darstellung der Interaktionen von PRKDC und XRCC6.

Die blau umrandeten Proteine wurden in der massenspektrometrischen Untersuchung als mögliche Interaktionspartner von FMRP identifiziert. XRCC6 und RBM14 sind grün dargestellt, da in dieser Arbeit eine Interaktion mit FMRP verifiziert werden konnte. Die rot umrandeten Proteine ILF2, PARP1 und XRCC5 wurden hingegen nicht nachgewiesen. Ein Strich symbolisiert eine bekannte Interaktion zwischen zwei Proteinen. Die dargestellten Interaktionen basieren auf publizierten Arbeiten aus den Datenbanken *AceView* und *Entrez Gene*, Quellen siehe Text und Abb. 4.4.

In welchem Zellkompartiment diese Proteine (im Besonderen XRCC6) mit FMRP assoziiert sind, könnten weiterreichende Charakterisierungen der einzelnen Proteine zeigen. Zielführend wäre dabei ein Experiment, in dem mittels Zellfraktionierung die Proteine vor der Affinitätschromatographischen Reinigung z.B. in eine nukleäre sowie eine zytosolische Fraktion unterteilt werden.

RNA-bindende Proteine

Sortiert man die massenspektrometrisch identifizierten Proteine nach ihren Gemeinsamkeiten, so sticht besonders die große Gruppe der RNA-bindenden Proteine hervor. Es zeigten sich Unterschiede der Proteine hinsichtlich ihres Interaktionsverhaltens zu FMRP. Hierbei scheinen einige der Proteine RNA-abhängig mit FMRP zu interagieren (PABPC1 und MOV10), während die restlichen der untersuchten Proteine (DDX5, DDX17, RBM14 und TDRD3) mittels Protein-Bindung mit FMRP in Verbindung stehen. Im folgendem Abschnitt werden die Proteine eingehender besprochen. Gemeinsamkeiten mit FMRP sollen beleuchtet werden.

DDX17 und DDX5

Beide Proteine gehören zu der Proteinfamilie der RNA-Helikasen (Hirling *et al.*, 1989) und sind *DEAD-box* Proteine, die durch ein Kernsegment von acht konservierten Motiven charakterisiert werden. Die Sequenz *Asp-Glu-Ala-Asp* (*D-E-A-D*) ist dabei die namengebende Komponente. RNA-Helikasen sind RNA-bindende Proteine (Lamm *et al.*, 1996) mit einer geringen Prozessivität. Sie sind an der Reorganisation von RNP beteiligt und sorgen für den Austausch RNA-assoziiierter Proteinkomponenten. In diesem Rahmen sind sie für zahlreiche zelluläre Prozesse wie Transkription, Stabilisierung von RNA, RNA-Transport und Translation von zentraler Bedeutung (Hirling *et al.*, 1989; Lamm *et al.*, 1996). Literaturrecherchen ergaben eine hochgradige strukturelle Homologie von DDX5 und DDX17 (Lamm *et al.*, 1996). Innerhalb der Zelle liegen sie zudem als Heterodimer vor (Ogilvie *et al.*, 2003). In Übereinstimmung hiermit, zeigten sich DDX5 und DDX17 in der vorliegenden Arbeit als Interaktionspartner von FMRP und FMRP-I304N mit identischem Bindungsverhalten.

Die detektierte Assoziation ist vermutlich eine Protein-vermittelte Bindung, da sie auch nach RNA-Verdau Bestand hat. Eine Interaktion von DDX5 und DDX17 mit dem Protein HNRNPH1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1) - massenspektrometrisch in vorliegender Arbeit als putativer Interaktionspartner von FMRP identifiziert - ist beschrieben (Jeronimo *et al.*, 2007). HNRNPH1 wiederum gehört zu der Familie der hnRNP (heterogene nukleäre Ribonukleoproteine), eine Gruppe von RNA-bindenden Proteinen, die mit prä-mRNA assoziiert sind (Honore *et al.*, 1995). Diese Proteinfamilie ist u.a. beteiligt am alternativen Spleißen, dem Transport von mRNA und der Translationsregulation (Han, Tang und Smith, 2010). Damit passt das Funktionsprofil der hnRNP sehr gut zu dem von FMRP und der *DEAD box* Proteine. Durch immunzytochemische Untersuchungen ließen sich DDX5 und DD17 sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus nachweisen (siehe Abb. 3.8 und 3.10). Im Nukleus scheint die Konzentration beider Proteine höher zu sein als im Zytoplasma. Im Kern und im perinukleären Bereich des Zytoplasmas kommt es zur Colokalisation beider Proteine mit FMRP. Zusammengefasst ergibt sich damit für beide Proteine das Bild plausibler Interaktionspartner von FMRP, die möglicherweise durch eine direkte *Protein-Protein*-Bindung mit FMRP assoziiert sind und auch funktionell - als RNA-bindende Proteine mit Beteiligung am RNA-Metabolismus - FMRP nahestehen.

RBM14

RBM14, auch bekannt unter dem Namen CoAA, besitzt zwei hoch konservierte RNA-Bindungsmotive (RNP1- und RNP2-Motiv), die häufig in Ribonukleoproteinen (RNP) zu finden sind und ist selbst Teil eines RNP-Komplexes (Iwasaki *et al.*, 2001). Als ein noch relativ unbekanntes Protein - vor allem was die Funktion betrifft - gibt es Hinweise, die auf eine Beteiligung von RBM14 an der Transkription schließen lassen. RBM14 nimmt als stimulierender Faktor Einfluss auf die Transkription und ist in der Lage, andere Proteine zu binden (Perani *et al.*, 2005; Iwasaki *et al.*, 2001 und 2005). Mit den bereits besprochenen DNA-bindenden Proteinen fügt sich RBM14 damit in die Gruppe von transkriptionsassoziierten Proteinen ein, die zusammen mit FMRP an der Transkription mitwirken.

Interessanterweise colokalisiert RBM14 mit NONO (*non-POU domain containing, octamer-binding protein*) in sog. *Paraspeckles* des Nukleoplasmas (Fox *et al.* 2002). NONO wurde in dieser Arbeit ebenfalls massenspektrometrisch als putativer Interaktionspartner von FMRP identifiziert (siehe Tab. 3.1). Die Ergebnisse der Immunoblots zeigen eine RNA-unabhängige Assoziation von FMRP und RBM14. Diese vermutlich auf Protein-Verbindungen basierende Interaktion wird auch durch die Punktmutation I304N nicht beeinträchtigt (siehe Abb. 3.16). RBM14 liegt in primären Rattenneuronen überwiegend im Zytosol vor. Im Kern ließ sich das Protein in geringerer Konzentration ebenfalls nachweisen. Eine Colokalisation mit FMRP konnte vereinzelt in der Peripherie der Zelle dargestellt werden. Die in dieser Arbeit detektierte zytosolische Lokalisation suggeriert somit präferentiell eine zytoplasmatische Funktion des Proteins. Diese könnte möglicherweise durch die Interaktion mit FMRP zu Stande kommen.

KHSRP

Die in diesem Experiment erhobenen Daten zu KHSRP und FMRP lassen kein eindeutiges Urteil hinsichtlich einer Interaktion der beiden Proteine zu. Eine im *Western blot* detektierte Protein-vermittelte Assoziation mit FMRP und FMRP-I304N kann nicht als eindeutiger Hinweis auf eine Interaktion gewertet werden, da auch in der EGFP-Kontrolle KHSRP detektiert wurde. Die Assoziation des Proteins mit EGFP ist allerdings deutlich schwächer als in den verglichenen Präzipitaten (FMRP, FMRP-I304N, FMRP-RNase, siehe Abb. 3.17 A). Dieses Ergebnis wurde mehrfach beobachtet. Die immunzytochemischen Experimente geben zudem keinen eindeutigen Hinweis auf eine Colokalisation der beiden Proteine und zeigen eher eine voneinander abweichende subzelluläre Verteilung.

Demgegenüber finden sich in der Literatur Hinweise, die auf eine mögliche Assoziation der beiden Proteine schließen lassen. KHSRP ist als multifunktionales RNA-bindendes Protein an diversen zellulären Prozessen beteiligt. Zunächst stand dabei die Partizipation am alternativen prä-mRNA-Spleißen im Vordergrund (Min *et al.*, 1997). Aktuelle Untersuchungen enthüllen weitere wichtige Funktionen des Proteins: KHSRP interagiert mit RNA und ist an deren Abbau beteiligt (Gherzi *et al.*, 2004). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass KHSRP über die Bindung an bestimmte mikro-RNAs die Translation und Stabilität spezifischer mRNAs regulieren kann (Trabucchi *et al.*, 2009). Zudem verfügt KHSRP über vier zentrale KH-Domänen, durch die RNA-Bindungen ermöglicht werden (Min *et al.*, 1997). Eine Interaktion mit HNRNPH1 - in dieser Arbeit massenspektrometrisch als putativer Interaktionspartner FMRPs identifiziert und außerdem mit DDX5, DDX17 und HNRNPM (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M*) assoziiert (siehe Abb. 4.4) - ist beschrieben (Markovtsov *et al.*, 2000; Jeronimo *et al.*, 2007).

Gemeinsamkeiten von KHSRP mit FMRP finden sich also im Aufbau (z.B. KH-Domänen) und in der Funktion der beiden Proteine. So ist KHSRP - ähnlich wie FMRP - an der Regulation der Translation von RNA (Trabucchi *et al.*, 2009) und in Ratten an der Lokalisation von mRNA an der dendritischen Synapse beteiligt (Rehbein *et al.*, 2002). Sowohl KHSRP als auch FMRP interagieren mit HNRNPH1, eine fälschlich detektierte Assoziation von KHSRP und FMRP erscheint daher eher zweifelhaft. Möglicherweise handelt es sich um eine „transiente“ Interaktion der beiden Proteine, die sich mit dieser Versuchsanordnung nicht eindeutig nachweisen lässt. Eine weitere Untersuchung von KHSRP hinsichtlich des Interaktionsverhaltens zu FMRP wäre für eine umfassendere Beurteilung von Nöten.

PABPC1 und MOV10

Wie FMRP ist PABPC1 ein RNA-bindendes (Grange *et al.*, 1987, Deo *et al.*, 1999) *Shuttle*-Protein, das zwischen Zellkern und Zytoplasma verkehrt (Afonina *et al.*, 1998). Es ist dabei nicht nur an der Bildung von mRNP-Komplexen (Jonson *et al.*, 2007), sondern vermutlich auch am Transport dieser beteiligt. Roy *et al.* konnten eine stimulierende Wirkung von PABPC1 hinsichtlich der Translationsinitiation nachweisen (Roy *et al.*, 2002). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass PABPC1 die Effektivität der Translation auf unterschiedliche Art und Weise beeinflussen kann (Kahvejian *et al.*, 2005).

PABPC1 bindet an das 3'-Ende eukaryontischer mRNA-Moleküle (Grange *et al.*, 1987) und ist damit sowohl an der Stabilisierung von RNA (Roy *et al.* 2002) als auch an deren Abbau - durch Verkürzung des Poly-A-Schwanzes - beteiligt (Grosset *et al.*, 2000). Bekannte Interaktionspartner von PABPC1, die auch in den massenspektrometrischen Untersuchungen dieses Experiments als putative Interaktionspartner von FMRP identifiziert wurden (siehe Abb. 3.8), sind PCBP1, PCBP 2 (*poly(rC) binding protein 1 und 2*; Wang *et al.*, 1999) sowie EIF4A1 (*eukaryotic translation initiation factor 4A1*; Craig *et al.*, 1998).

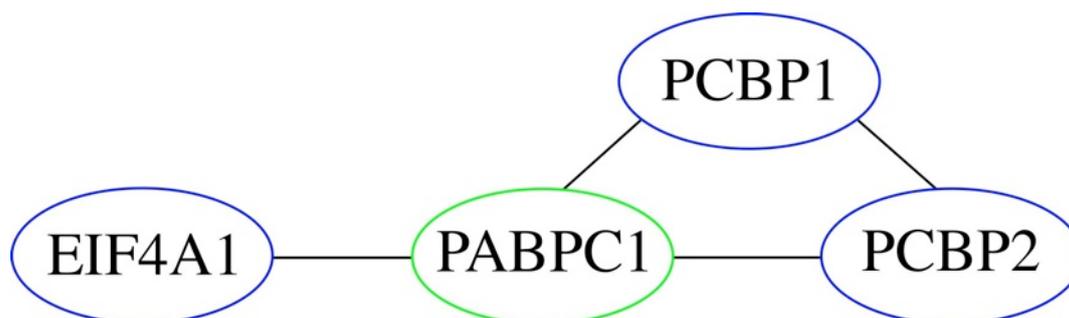


Abbildung 4.2 Schematische Darstellung der Interaktionspartner von PABPC1

Die blau umrandeten Proteine wurden in der massenspektrometrischen Untersuchung als putative Interaktionspartner von FMRP identifiziert. PABPC1 ist grün umrandet, da das Protein als Interaktionspartner von FMRP verifiziert werden konnte. Ein Strich symbolisiert eine bekannte Interaktion der beiden Proteine (Quellen siehe Text).

Durch die Analyse des Bindungsverhaltens im *Western blot* konnte eine RNA-abhängige Assoziation von PABPC1 zu FMRP nachgewiesen werden. Hierbei war kein Unterschied im Bindungsverhalten zu dem mutierten Protein FMRP-I304N detektierbar (siehe 3.4.4). Eine direkte Protein-Interaktion von FMRP mit PABPC1 kann auf Basis dieser Ergebnisse ausgeschlossen werden. Weitere Hinweise auf eine Assoziation der beiden Proteine konnten durch immunzytochemische Aufnahmen an primären Hippokampusneuronen der Ratte gewonnen werden. PABPC1 zeigt ein ähnliches Verteilungsmuster wie FMRP, mit ausgeprägterem Nachweis im Zytosol. Die Ergebnisse decken sich damit mit denen anderer Arbeitsgruppen. Grolach *et al.* hatten PABP zunächst ausschließlich im Zytoplasma nachweisen können (Grolach *et al.*, 1994), wenig später gelang jedoch der Nachweis in Zytosol und Nukleus (Afonina *et al.*, 1998). Zudem konnte in der vorliegenden Arbeit eine deutliche Colokalisation der beiden Proteine im gesamten Zytosol dargestellt werden, besonders ausgeprägt war diese im perinukleären Bereich. PABPC1 konnte somit als Interaktionspartner von FMRP bestätigt werden. Darüber hinaus sollte das Protein als enger Interaktionspartner von FMRP angesehen werden, da sich funktionell multiple Gemeinsamkeiten finden.

Als eine putative RNA-Helikase mit Fähigkeit zur Proteinbindung wurde MOV10 den *DExD box*-Proteinen zugeordnet (Meister *et al.*, 2005). Aktuell ist MOV10 als eine UPF1-ähnliche-Helikase klassifiziert worden (Fairman-Williams *et al.*, 2010). Zudem ist MOV10 das humane Ortholog des Proteins Armitage, das bei *Drosophila* an der Translationsregulation beteiligt ist (Chendrimada *et al.*, 2007). Als ein Markerprotein von sog. *processing bodies* (*p bodies*) mit Assoziation zu *RNA-induced silencing-complexes* (*RISC*) mehren sich außerdem die Hinweise auf eine Beteiligung des Proteins beim Abbau von RNA (Burdick *et al.*, 2010; Tomari *et al.*, 2004).

Die Analyse des Interaktionsverhaltens von MOV10 zu FMRP und FMRP-I304N mittels *Western blot* zeigte eine RNA-vermittelte Kommunikation der Proteine (siehe Abb. 3.13), die nach RNA-Verdau nicht mehr nachzuweisen war. Eine Assoziation auf Basis einer Protein-Bindung kann somit ausgeschlossen werden. Zudem konnte mittels Immunzytochemie gezeigt werden, dass MOV10 in Rattenneuronen sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma in feinen Granula vorliegt. Eine andere Arbeitsgruppe konnte das Protein vermehrt im Nukleus nachweisen (El Messaoudi-Aubert *et al.*, 2010). Damit passt MOV10 in die Reihe von RNA-bindenden Proteinen, die in dieser Arbeit im Vordergrund stehen. Eine mögliche Assoziation hinsichtlich der Translationsregulation könnte einen weiteren interessanten Aspekt des Proteins beinhalten und die detektierte Interaktion auch funktionell mit FMRP in Verbindung bringen.

FMRP-I304N interagiert nicht mit TDRD3

Die vergleichende Untersuchung von FMRP und FMRP-I304N zeigte tatsächlich in einem Fall ein differierendes Interaktionsverhalten. Das Protein TDRD3 ließ sich mittels *Western blot* als Interaktionspartner des Wildtypproteins nachweisen. Die Assoziation der beiden Proteine ist RNA-unabhängig. Zudem zeigte sich eine deutliche Colokalisation der beiden Proteine im Zytosol von kultivierten Rattenneuronen. Interessanterweise ließ sich im Gegensatz dazu keine Interaktion von TDRD3 mit FMRP-I304N detektieren. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass es durch die Punktmutation im FMRP-I304N zu einem Bindungsdefekt in der KH2-Domäne kommt, der die Interaktionsfähigkeit des Proteins einschränkt.

Bemerkenswerterweise wurden ähnliche Daten kürzlich von einer anderen AG publiziert. Lindner *et al.* konnten TDRD3 als Interaktionspartner von FMRP und den homologen Proteinen FXR1 und FXR2 mittels *in vitro* Experimenten unter Verwendung von immobilisiertem ZZ-markierten TDRD3 und (³⁵S)-markierten FMRP (bzw. FXR1 und FXR2) nachweisen (Lindner *et al.*, 2008).

Außerdem gelang es, die für die Interaktion mit TDRD3 verantwortliche Region von FMRP einzugrenzen (Aminosäuren 216-332). In diesem Bereich von FMRP liegt die von der Punktmutation betroffene KH-2-Domäne (siehe Abb. 4.1). Zudem scheint für die Bindung an TDRD3 eine weitere Region von FMRP essentiell zu sein, sie findet sich im Bereich der Aminosäuren 430 - 486. Die Autoren interpretierten die Ergebnisse dahingehend, dass die beiden Regionen im Rahmen der Tertiärstruktur räumlich zusammenfinden und dadurch die Bindung an TDRD3 ermöglichen (Lindner *et al.*, 2008). Auch hier wurden vergleichende Experimente mit FMRP-I304N durchgeführt, deren Resultat mit dem dieser Arbeit übereinstimmt: TDRD3 interagiert mit FMRP, nicht aber mit FMRP-I304N.

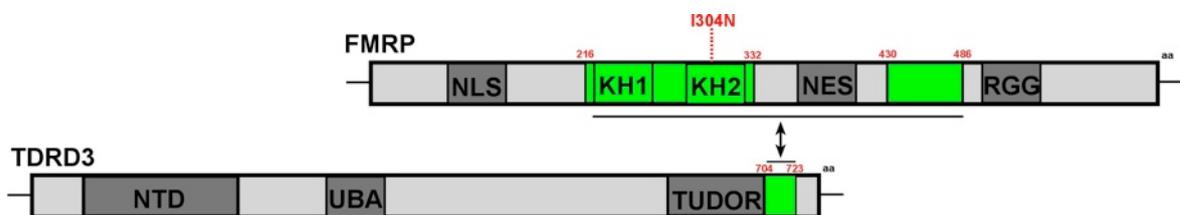


Abbildung 4.3 Schematische Darstellung einer direkten Interaktion von TDRD3 und FMRP. In Grün sind dabei für die Bindung der Proteine verantwortlichen Regionen markiert. Die angegebenen Zahlen bezeichnen die Position im jeweiligen Protein bezogen auf die Aminosäuren (Frei modifiziert nach Linder *et al.* (2008). Für nähere Informationen zu den Bindungsdomänen der Proteine, siehe Text).

Weitere Literaturrecherchen zu TDRD3 zeichnen das Bild eines bisher relativ unbekanntes Proteins, das unlängst von einer weiteren AG untersucht und charakterisiert wurde. TDRD3 verfügt demnach über mindestens drei Bindungsmotive (siehe auch Abb. 4.3): Die namensgebende ca. 60 Aminosäuren lange C-terminal gelegene Tudordomäne, eine zentrale Ubiquitin-bindende Domäne (UBA) sowie ein N-terminales OB (*oligosaccharide/nucleotide binding*)-Faltmotiv (NTD), das vermutlich ein Nukleinsäure-bindendes Motiv ist (Goulet *et al.*, 2008). Untersuchungen von Ramos *et al.* deuten darauf hin, dass FMRP im N-terminalen Bereich ebenfalls über eine Proteininteraktions-vermittelnde Tudordomäne verfügt (Ramos *et al.*, 2006). Andere Proteine, die dasselbe Tudor-Motiv tragen, sind häufig in den RNA-Metabolismus eingebunden (Ponting, 1997). Ein weiteres Protein, das in dieser Arbeit als putativer Interaktionspartner von FMRP identifiziert wurde, ist EEF1A1 (*eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1*).

Das Protein ist als Translationelongationsfaktor an der Assoziation spezifischer mRNA mit dem Zytoskelett beteiligt (Liu *et al.*, 2002). Goulet *et al.* identifizierten im Rahmen von *Pulldown*-Experimenten mit TDRD3 mehrere Proteine, die allesamt mit posttranskriptionellen regulatorischen Prozessen in Verbindung gebracht werden, u.a. jenes Protein EEF1A1 (Goulet *et al.*, 2008). Die Assoziation mit EEF1A1 kann damit als ein weiterer Anhaltspunkt für eine regulatorische Beteiligung von FMRP und TDRD3 am RNA-Stoffwechsel der Zelle dienen. Zudem konnte TDRD3 in Stresskörperchen (*Stress granules* (SG)) nachgewiesen werden (Goulet *et al.*, 2008). Dort colokalisiert es mit FMRP (Linder *et al.*, 2008). SG sind nach neueren Erkenntnissen ebenfalls an der Regulation des RNA-Metabolismus beteiligt (Anderson und Kedersha, 2009).

Die vielschichtige Symptomatik des FRAX, die auch durch die isolierte Punktmutation von FMRP-I304N verursacht werden kann, impliziert eine entscheidende Funktion von FMRP in der betroffenen KH2-Domäne. Betrachtet man die dargestellten Zusammenhänge hinsichtlich der Interaktion von FMRP und TDRD3, so erhärtet sich der Verdacht auf eine Interaktion zweier Proteine, die gemeinsam eine möglicherweise bedeutsame Funktion an der Regulation des RNA-Stoffwechsels haben. Sollte TDRD3 das einzige Protein sein, das nicht mit FMRP-I304N interagiert, wäre eine besondere Rolle in der Pathophysiologie des FRAX sehr gut möglich.

Interaktionen identifizierter Proteine untereinander

Wie bereits an anderer Stelle der Diskussion mehrfach angemerkt, konnten multiple Interaktionen der in diesem Experiment identifizierten putativen Interaktionspartner von FMRP untereinander aufgezeigt werden. Diese und weitere bisher noch nicht angemerkte Verbindungen der Proteine sind in Abbildung 4.4 graphisch dargestellt. Die Interaktionen basieren auf Daten von *ACE View* und *Entrez Gene (NCBI)* und beziehen sich auf publizierte Arbeiten bei *PubMed*. Die Vielzahl der dargestellten Interaktionen deutet daraufhin, dass im Rahmen der Immunpräzipitation auch ganze FMRP-haltige RNP-Komplexe copräzipitert wurden.

RNA-ABBAU

Eine interessante Gemeinsamkeit der besprochenen Proteine, die bei Studium der Literatur auffiel, ist eine Beteiligung am Abbau von RNA. So hat PABP Anteil an der Destabilisierung von RNA durch die Verkürzung des Poly-A-Schwanzes, damit ist es wie KHSRP am sog. *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) beteiligt (Grosset *et al.*, 2000; Gherzi *et al.*, 2004; Briata *et al.*, 2005). Das Protein MOV10 ist eng mit dem sog. *RISC-System (RNA-induced silencing complex)* verwoben und interagiert mit Proteinen der Argonaute-Gruppe (Burdick *et al.*, 2010; Weinmann, 2009). Eine diesen Ansatz erweiternde Hypothese beschreibt eine zentrale Rolle von RNA-Körperchen (u.a. SGs), die Einfluss auf die Translation von Proteinen nehmen, aber auch am Abbau von RNA beteiligt sind (Anderson und Kedersha, 2009). Eine Assoziation von FMRP mit RNA-Körperchen könnte in diesem Modell sowohl die stimulative als auch die inhibierende Wirkung von FMRP auf die Translation begründen.

Ausblick:

Eine Fortführung des Experiments sollte analog zu den bereits untersuchten Proteinen durchgeführt werden. Dabei müssten die in der massenspektrometrischen Analyse identifizierten, aber noch ausstehenden Interaktionspartner überprüft werden. Diese Untersuchungen könnten zeigen, ob es weitere Proteine mit besonderem Interaktionsmuster gibt, die mit FMRP, nicht aber mit FMRP-I304N interagieren. Sollte dies nicht der Fall sein, wäre das Protein TDRD3 und seine Funktion innerhalb der Zelle um so interessanter. Darüber hinaus ist eine eingehendere Untersuchung der verifizierten Interaktionspartner von Interesse. Mit Hilfe der erhobenen Daten lassen sich zwar Unterscheidungen zwischen Protein- und RNA-vermittelten Interaktionen machen, ob es allerdings zu direkten Interaktionen mit FMRP kommt, oder die identifizierten Proteine innerhalb eines Komplexes (z.B. innerhalb eines Stresskörperchens) indirekt assoziieren, kann durch diesen Versuchsaufbau nicht geklärt werden. Für die Beantwortung dieser Frage wären weitere *in vitro* Assays erforderlich. Um beispielsweise eine mögliche direkte Interaktion zwischen FMRP und DDX5 nachzuweisen, könnte ein *GST-Pulldown* (Gluthation-S-Transferase) durchgeführt werden. Zusätzlich wäre die Identifikation der für die Interaktion verantwortlichen Motive von großem Interesse. Die im Rahmen der Immunzytochemie gewonnenen Informationen über Lokalisation identifizierter Proteine könnten mit Hilfe von Zellfraktionierungsexperimenten verifiziert werden.

Fazit:

Abschließend lässt sich anmerken, dass der Nachweis von Proteinen, die auch in anderen Arbeitsgruppen als Interaktionspartner von FMRP identifiziert wurden (z.B. TDRD3, Lindner *et al.*, 2008), die Eignung des Versuchsaufbaus zur Suche nach assoziierten Proteinen bestätigt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können somit als Grundlage für weiterführende Untersuchungen dienen.

Die meisten der identifizierten Proteine wurden sowohl in Zellkern als auch im Zytoplasma nachgewiesen. Eine Reihe der Proteine sind an der Transkription oder der Translation beteiligt, andere an beidem. Die Assoziation zu Proteinen in unterschiedlichen Zellkompartimenten stützt damit die These von FMRP als *Shuttle*-Protein. Die hier dargestellten Ergebnisse sowie die Einordnung in die aktuelle Literatur bekräftigen die Rolle FMRPs als RNA-bindendes Protein mit komplexer Funktion in der Expressionsregulation von Proteinen. Dadurch mehren sich die Hinweise auf eine FMRP-vermittelte Verbindung zwischen Transkription, Translation und RNA-Degradation, möglicherweise übernimmt FMRP eine zentrale regulative Funktion im RNA-Metabolismus der Zelle.

Das mutierte Protein FMRP-I304N ist prinzipiell in der Lage, mit anderen Proteinen zu interagieren, allerdings verursacht die Punktmutation einen Bindungsdefekt in der KH2-Domäne, der die Interaktion mit bestimmten Proteinen wie z.B. TDRD3 verhindert. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit eine besondere Rolle von TDRD3 aufgezeigt werden. Eine eingehendere Charakterisierung des Proteins und seiner intrazellulären Funktionen könnten das FRAX und die verursachenden Pathomechanismen von einer bisher wenig untersuchten Seite beleuchten und damit weitere Hinweise auf die zellulären Funktionen von FMRP besonders in Verbindung mit der Translation bringen.

5 Zusammenfassung

Das Fragile-X-Syndrom (FRAX) ist eine der häufigsten Ursachen genetisch bedingter mentaler Retardierung. In nahezu allen Fällen kommt es dabei zur transkriptionellen Abschaltung des *fragile X mental retardation gene 1* (*FMR1*-Gen) und somit zum Fehlen des *fragile X mental retardation protein* (FMRP). Im Unterschied dazu konnte bei einem Betroffenen eine Punktmutation im *FMR1*-Gen beobachtet werden (FMRP-I304N). Es zeigte sich eine ausgeprägte FRAX-ähnliche Symptomatik, obwohl das mutierte Protein in den Zellen des betroffenen Patienten vorliegt. Wie genau das Fehlen von FMRP bzw. der Austausch einer einzelnen Aminosäure (FMRP-I304N) die vielschichtige Symptomatik des FRAX verursacht, konnte bis heute noch nicht vollständig aufgedeckt werden. Die Funktionen des betroffenen RNA-bindenden Proteins FMRP sind daher Bestandteil intensiver Forschung und könnten zudem Hinweise auf zelluläre Veränderungen geben, die eine mentale Retardierung verursachen.

In dieser Arbeit wurden daher Interaktionspartner von FMRP identifiziert, um damit weiteren Aufschluss über die molekularen Wirkmechanismen des Proteins zu gewinnen. Insgesamt konnten 50 putative Interaktionspartner von FMRP identifiziert werden. Die Funktionsspektren dieser mit FMRP assoziierten Proteine deuten auf eine zentrale Rolle von FMRP im RNA-Metabolismus der Zelle, insbesondere im Rahmen der Regulation von Translation und Transkription. Einige der identifizierten Proteine wurden als Interaktionspartner von FMRP näher untersucht. Zu diesen Proteinen gehören DDX5, DDX17, MOV10, PABPC1, RBM14, TDRD3 und XRCC6. Per *Western blot* wurde analysiert, ob es Unterschiede dieser Proteine hinsichtlich ihres Bindungsverhaltens zu FMRP und FMRP-I304N gibt. Es zeigte sich, dass FMRP sowohl über RNA-vermittelte als auch durch *Protein-Protein*-Interaktionen mit anderen Proteinen assoziiert ist. Besonders hervorzuheben ist dabei das Protein TDRD3. Dieses Protein interagiert auf Basis einer *Protein-Protein*-Interaktion mit FMRP, nicht aber mit dem mutierten Protein FMRP-I304N. Damit ist es das einzige bisher bekannte Protein, welches Unterschiede im Interaktionsverhalten mit FMRP bzw. FMRP-I304N aufweist. Diese Ergebnisse sprechen für einen Bindungsdefekt in der von der Mutation betroffenen KH2-Domäne des Proteins FMRP-I304N, der die Interaktionsfähigkeit des Proteins einschränkt. Der Ausfall der gemeinsamen Funktion von FMRP und TDRD3 könnte somit eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des FRAX einnehmen und die vielschichtige Symptomatik des FRAX mit verursachen.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DDX5	<i>DEAD box polypeptide 5</i>
DDX17	<i>DEAD box polypeptide 17</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECACC	<i>European Collection of Cell Cultures</i>
EEF1A1	<i>eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1</i>
EIF4A1	<i>eukaryotic translation initiation factor 4A1</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
FMR1	fragile X mental retardation gene 1
FMRP	<i>fragile X mental retardation protein</i>
FRAX	Fragile-X-Syndrom
FXR1	<i>fragile X mental retardation syndrome-related protein 1</i>
FXR2	<i>fragile X mental retardation syndrome-related protein 2</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
g	Erdschwerebeschleunigung
ggf.	gegebenenfalls
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde/n
HNRNPH1	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1</i>
HNRNPM	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M</i>
HRP	<i>Horse radish peroxidase</i>
HSP	Hitze-Schock-Protein
ILF3	<i>interleukin enhancer binding factor 3</i>
kDA	Kilodalton
KH	heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein K
KHSRP	<i>KH-type splicing regulatory protein</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
MAP2	Mikrotubulus assoziiertes Protein 2
mGLUR	<i>metabotropic glutamate receptor</i>
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
MOV10	<i>moloney leukemia virus 10, homolog (mouse)</i>

mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
mRNP	<i>messenger</i> Ribonukleoprotein
NES	nukleäres Exportsignal
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
NMD	<i>nonsense-mediated mRNA decay</i>
NONO	<i>non-POU domain containing, octamer-binding protein</i>
NTD	N-terminales-Faltmotiv
RBM14	<i>RNA binding motif protein 14</i>
RISC-Komplex	<i>RNA-induced silencing-Komplex</i>
RNase	Ribonuklease
PABPC1	<i>poly(A) binding protein, cytoplasmic 1</i>
PARP1	<i>poly (ADP-ribose) polymerase 1</i>
<i>p body</i>	<i>processing body</i>
PCBP 1	<i>poly(rC) binding protein 1</i>
PCBP 2	<i>poly(rC) binding protein 2</i>
PRKDC	<i>protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SG	Stresskörperchen (<i>stress granule</i>)
s.o.	siehe oben
sog.	so genannt
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
Tabl.	Tablette
TDRD3	<i>Tudor domain containing Protein 3</i>
u.a.	unter anderem
UBA	Ubiquitin-bindende Domäne
OB	<i>oligosaccharide/nucleotide binding</i>
UKE	Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
XRCC6	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6</i>

7 Bibliografie

- Afonina E, Stauber R, Pavlakis GN. (1998). The human poly(A)-binding protein 1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem* **273**,13015-21.
- Arbeitsgemeinschaft Massenspektrometrische Proteomanalytik (2010) Massenspektrometrische Proteomanalytik. [Online im Internet.] URL: http://www.uke.de/institute/klinische-chemie/index_56469.php?id=9_2_1&as_link=http%3A//www.uke.de/institute/klinische-chemie/index_56469.php&id_link=9_0_0&as_breadcrumb=%3Ca%20href%3D%22/index.php%22%3E%7C%20Home%3C/a%3E%20%3E%20%3Ca%20href%3D%22/zentren/index.php%22%3EZentren%3C/a%3E%20%3E%20%3Ca%20href%3D%22/zentren/diagnostik/index.php%22%3EZentrum%20f%FCr%20Diagnostik%3C/a%3E%20%3E%20%3Ca%20href%3D%22/institute/klinische-chemie/index.php%22%3EInstitut%20f%FCr%20Klinische%20Chemie%20/%20Zentrallaboratorien%3C/a%3E%20%3E%20%20%20Forschung [Stand: 27.10.2010, 13:00].
- Anderson P, Kedersha N. (2009). RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**,430-6.
- Antar LN, Afroz R, Dichtenberg JB, Carroll RC, Bassell GJ. (2004). Metabotropic glutamate receptor activation regulates fragile x mental retardation protein and FMR1 mRNA localization differentially in dendrites and at synapses. *J Neurosci* **24**,2648-55.
- Ashley CT, Jr., Wilkinson KD, Reines D, Warren ST. (1993). FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding. *Science* **262**,563-6.
- Bakker CE, de Diego Otero Y, Bontekoe C, Raghoe P, Luteijn T, Hoogeveen AT, Oostra BA, Willemsen R. (2000). Immunocytochemical and biochemical characterization of FMRP, FXR1P, and FXR2P in the mouse. *Exp Cell Res* **258**,162-70.
- Banker G, Goslin K. (2002). *Culturing Nerve Cells*, 2nd edition. Massachusetts Institute of Technology, London.
- Bassell GJ, Warren ST. (2008). Fragile X syndrome: loss of local mRNA regulation alters synaptic development and function. *Neuron* **60**,201-14.

- Bear MF, Huber KM, Warren ST. (2004). The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends Neurosci* **27**,370-7.
- Bechara EG, Didiot MC, Melko M, Davidovic L, Bensaid M, Martin P, Castets M, Pognonec P, Khandjian EW, Moine H and others. (2009). A novel function for fragile X mental retardation protein in translational activation. *PLoS Biol* **7**,e16.
- Blichenberg A, Schwanke B, Rehbein M, Garner CC, Richter D, Kindler S. (1999). Identification of a cis-acting dendritic targeting element in MAP2 mRNAs. *J Neurosci* **19**,8818-29.
- Brendel C, Rehbein M, Kreienkamp HJ, Buck F, Richter D, Kindler S. (2004). Characterization of Staufen 1 ribonucleoprotein complexes. *Biochem J* **384**,239-46.
- Briata P, Forcales SV, Ponassi M, Corte G, Chen CY, Karin M, Puri PL, Gherzi R. (2005). p38-dependent phosphorylation of the mRNA decay-promoting factor KSRP controls the stability of select myogenic transcripts. *Mol Cell* **20**,891-903.
- Brown V, Jin P, Ceman S, Darnell JC, O'Donnell WT, Tenenbaum SA, Jin X, Feng Y, Wilkinson KD, Keene JD and others. (2001). Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. *Cell* **107**,477-87.
- Burdick R, Smith JL, Chaipan C, Friew Y, Chen J, Venkatachari NJ, Delviks-Frankenberry KA, Hu WS, Pathak VK. (2010). P Body-Associated Protein Mov10 Inhibits HIV-1 Replication at Multiple Stages. *J Virol*.
- Chendrimada TP, Finn KJ, Ji X, Baillat D, Gregory RI, Liebhaber SA, Pasquinelli AE, Shiekhattar R. (2007). MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature* **447**,823-8.
- Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**,33-8.
- Cornish K, Sudhalter V, Turk J. (2004). Attention and language in fragile X. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* **10**,11-6.
- Crabbe LS, Bensky AS, Hornstein L, Schwartz DC. (1993). Cardiovascular abnormalities in children with fragile X syndrome. *Pediatrics* **91**,714-5.

- Craig AW, Haghghat A, Yu AT, Sonenberg N. (1998). Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation. *Nature* **392**,520-3.
- Darnell JC, Fraser CE, Mostovetsky O, Stefani G, Jones TA, Eddy SR, Darnell RB. (2005). Kissing complex RNAs mediate interaction between the Fragile-X mental retardation protein KH2 domain and brain polyribosomes. *Genes Dev* **19**,903-18.
- De Boulle K, Verkerk AJ, Reyniers E, Vits L, Hendrickx J, Van Roy B, Van den Bos F, de Graaff E, Oostra BA, Willems PJ. (1993). A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nat Genet* **3**,31-5.
- Deo RC, Bonanno JB, Sonenberg N, Burley SK. (1999). Recognition of polyadenylate RNA by the poly(A)-binding protein. *Cell* **98**,835-45.
- Devys D, Lutz Y, Rouyer N, Bellocq JP, Mandel JL. (1993). The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. *Nat Genet* **4**,335-40.
- Dube M, Huot ME, Khandjian EW. (2000). Muscle specific fragile X related protein 1 isoforms are sequestered in the nucleus of undifferentiated myoblast. *BMC Genet* **1**,4.
- Eberhart DE, Malter HE, Feng Y, Warren ST. (1996). The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals. *Hum Mol Genet* **5**,1083-91.
- Eichler EE, Richards S, Gibbs RA, Nelson DL. (1993). Fine structure of the human FMR1 gene. *Hum Mol Genet* **2**,1147-53.
- El Messaoudi-Aubert S, Nicholls J, Maertens GN, Brookes S, Bernstein E, Peters G. (2010). Role for the MOV10 RNA helicase in polycomb-mediated repression of the INK4a tumor suppressor. *Nat Struct Mol Biol* **17**,862-8.
- Fairman-Williams ME, Guenther UP, Jankowsky E. (2010). SF1 and SF2 helicases: family matters. *Curr Opin Struct Biol* **20**,313-24.
- Feng Y, Absher D, Eberhart DE, Brown V, Malter HE, Warren ST. (1997a). FMRP associates with polyribosomes as an mRNP, and the I304N mutation of severe fragile X syndrome abolishes this association. *Mol Cell* **1**,109-18.
- Feng Y, Gutekunst CA, Eberhart DE, Yi H, Warren ST, Hersch SM. (1997b). Fragile X mental retardation protein: nucleocytoplasmic shuttling and association with somatodendritic ribosomes. *J Neurosci* **17**,1539-47.

- Fisch GS, Simensen RJ, Schroer RJ. (2002). Longitudinal changes in cognitive and adaptive behavior scores in children and adolescents with the fragile X mutation or autism. *J Autism Dev Disord* **32**,107-14.
- Fox AH, Lam YW, Leung AK, Lyon CE, Andersen J, Mann M, Lamond AI. (2002). Paraspeckles: a novel nuclear domain. *Curr Biol* **12**,13-25.
- Gherzi R, Lee KY, Briata P, Wegmuller D, Moroni C, Karin M, Chen CY. (2004). A KH domain RNA binding protein, KSRP, promotes ARE-directed mRNA turnover by recruiting the degradation machinery. *Mol Cell* **14**,571-83.
- Gorlach M, Burd CG, Dreyfuss G. (1994). The mRNA poly(A)-binding protein: localization, abundance, and RNA-binding specificity. *Exp Cell Res* **211**,400-7.
- Goulet I, Boisvenue S, Mokas S, Mazroui R, Cote J. (2008). TDRD3, a novel Tudor domain-containing protein, localizes to cytoplasmic stress granules. *Hum Mol Genet* **17**,3055-74.
- Grange T, de Sa CM, Oddos J, Pictet R. (1987). Human mRNA polyadenylate binding protein: evolutionary conservation of a nucleic acid binding motif. *Nucleic Acids Res* **15**,4771-87.
- Grosset C, Chen CY, Xu N, Sonenberg N, Jacquemin-Sablon H, Shyu AB. (2000). A mechanism for translationally coupled mRNA turnover: interaction between the poly(A) tail and a c-fos RNA coding determinant via a protein complex. *Cell* **103**,29-40.
- Hagerman PJ. (2008). The fragile X prevalence paradox. *J Med Genet* **45**,498-9.
- Han SP, Tang YH, Smith R. (2010). Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. *Biochem J* **430**,379-92.
- Harrison CJ, Jack EM, Allen TD, Harris R. (1983). The fragile X: a scanning electron microscope study. *J Med Genet* **20**,280-5.
- Hinds HL, Ashley CT, Sutcliffe JS, Nelson DL, Warren ST, Housman DE, Schalling M. (1993). Tissue specific expression of FMR-1 provides evidence for a functional role in fragile X syndrome. *Nat Genet* **3**,36-43.
- Hirling H, Scheffner M, Restle T, Stahl H. (1989). RNA helicase activity associated with the human p68 protein. *Nature* **339**,562-4.

- Honore B, Rasmussen HH, Vorum H, Dejgaard K, Liu X, Gromov P, Madsen P, Gesser B, Tommerup N, Celis JE. (1995). Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins H, H', and F are members of a ubiquitously expressed subfamily of related but distinct proteins encoded by genes mapping to different chromosomes. *J Biol Chem* **270**,28780-9.
- Idogawa M, Masutani M, Shitashige M, Honda K, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, Hirohashi S, Yamada T. (2007). Ku70 and poly(ADP-ribose) polymerase-1 competitively regulate beta-catenin and T-cell factor-4-mediated gene transactivation: possible linkage of DNA damage recognition and Wnt signaling. *Cancer Res* **67**,911-8.
- Idogawa M, Masutani M, Shitashige M, Honda K, Tokino T, Shinomura Y, Imai K, Hirohashi S, Yamada T. (2007). Ku70 and poly(ADP-ribose) polymerase-1 competitively regulate beta-catenin and T-cell factor-4-mediated gene transactivation: possible linkage of DNA damage recognition and Wnt signaling. *Cancer Res* **67**,911-8.
- Iwasaki T, Chin WW, Ko L. (2001). Identification and characterization of RRM-containing coactivator activator (CoAA) as TRBP-interacting protein, and its splice variant as a coactivator modulator (CoAM). *J Biol Chem* **276**,33375-83.
- Iwasaki T, Koibuchi N, Chin WW. (2005). Synovial sarcoma translocation (SYT) encodes a nuclear receptor coactivator. *Endocrinology* **146**,3892-9.
- Jeronimo C, Forget D, Bouchard A, Li Q, Chua G, Poitras C, Therien C, Bergeron D, Bourassa S, Greenblatt J and others. (2007). Systematic analysis of the protein interaction network for the human transcription machinery reveals the identity of the 7SK capping enzyme. *Mol Cell* **27**,262-74.
- Jin S, Kharbanda S, Mayer B, Kufe D, Weaver DT. (1997). Binding of Ku and c-Abl at the kinase homology region of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit. *J Biol Chem* **272**,24763-6.
- Jonson L, Vikesaa J, Krogh A, Nielsen LK, Hansen T, Borup R, Johnsen AH, Christiansen J, Nielsen FC. (2007). Molecular composition of IMP1 ribonucleoprotein granules. *Mol Cell Proteomics* **6**,798-811.
- Kahvejian A, Svitkin YV, Sukarieh R, M'Boutchou MN, Sonenberg N. (2005). Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes Dev* **19**,104-13.
- Khandjian EW, Corbin F, Woerly S, Rousseau F. (1996). The fragile X mental retardation protein is associated with ribosomes. *Nat Genet* **12**,91-3.

- Khandjian EW, Fortin A, Thibodeau A, Tremblay S, Cote F, Devys D, Mandel JL, 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**,783-9.
- Kiledjian M, Dreyfuss G. (1992). Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *EMBO J* **11**,2655-64.
- Kim JH, Hahm B, Kim YK, Choi M, Jang SK. (2000). Protein-protein interaction among hnRNPs shuttling between nucleus and cytoplasm. *J Mol Biol* **298**,395-405.
- Kirchgessner CU, Warren ST, Willard HF. (1995). X inactivation of the FMR1 fragile X mental retardation gene. *J Med Genet* **32**,925-9.
- Lachiewicz AM, Dawson DV. (1994). Do young boys with fragile X syndrome have macroorchidism? *Pediatrics* **93**,992-5.
- Laggerbauer B, Ostareck D, Keidel EM, Ostareck-Lederer A, Fischer U. (2001). Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. *Hum Mol Genet* **10**,329-38.
- Lamm GM, Nicol SM, Fuller-Pace FV, Lamond AI. (1996). p72: a human nuclear DEAD box protein highly related to p68. *Nucleic Acids Res* **24**,3739-47.
- Li B, Navarro S, Kasahara N, Comai L. (2004). Identification and biochemical characterization of a Werner's syndrome protein complex with Ku70/80 and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *J Biol Chem* **279**,13659-67.
- Linder B, Plottner O, Kroiss M, Hartmann E, Laggerbauer B, Meister G, Keidel E, Fischer U. (2008). Tdrd3 is a novel stress granule-associated protein interacting with the Fragile-X syndrome protein FMRP. *Hum Mol Genet* **17**,3236-46.
- Liu G, Grant WM, Persky D, Latham VM, Jr., Singer RH, Condeelis J. (2002). Interactions of elongation factor 1alpha with F-actin and beta-actin mRNA: implications for anchoring mRNA in cell protrusions. *Mol Biol Cell* **13**,579-92.
- Lu R, Wang H, Liang Z, Ku L, O'Donnell W T, Li W, Warren ST, 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**,15201-6.
- Lubs HA. (1969). A marker X chromosome. *Am J Hum Genet* **21**,231-44.

- Marko M, Leichter M, Patrinoiu-Georgoula M, Guialis A. (2010). hnRNP M interacts with PSF and p54(nrb) and co-localizes within defined nuclear structures. *Exp Cell Res* **316**,390-400.
- Markovtsov V, Nikolic JM, Goldman JA, Turck CW, Chou MY, Black DL. (2000). Cooperative assembly of an hnRNP complex induced by a tissue-specific homolog of polypyrimidine tract binding protein. *Mol Cell Biol* **20**,7463-79.
- Martin J, Bell J. (1943) A pedigree of mental defect showing sex linkage. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **6**,154-156.
- Meister G, Landthaler M, Peters L, Chen PY, Urlaub H, Luhrmann R, Tuschl T. (2005). Identification of novel argonaute-associated proteins. *Curr Biol* **15**,2149-55.
- Min H, Turck CW, Nikolic JM, Black DL. (1997). A new regulatory protein, KSRP, mediates exon inclusion through an intronic splicing enhancer. *Genes Dev* **11**,1023-36.
- Morrison C, Smith GC, Stingl L, Jackson SP, Wagner EF, Wang ZQ. (1997). Genetic interaction between PARP and DNA-PK in V(D)J recombination and tumorigenesis. *Nat Genet* **17**,479-82.
- Musco G, Stier G, Joseph C, Castiglione Morelli MA, Nilges M, Gibson TJ, Pastore A. (1996). Three-dimensional structure and stability of the KH domain: molecular insights into the fragile X syndrome. *Cell* **85**,237-45.
- Ogilvie VC, Wilson BJ, Nicol SM, Morrice NA, Saunders LR, Barber GN, Fuller-Pace FV. (2003). The highly related DEAD box RNA helicases p68 and p72 exist as heterodimers in cells. *Nucleic Acids Res* **31**,1470-80.
- Oostra BA, Chiurazzi P. (2001). The fragile X gene and its function. *Clin Genet* **60**,399-408.
- Perani M, Antonson P, Hamoudi R, Ingram CJ, Cooper CS, Garrett MD, Goodwin GH. (2005). The proto-oncoprotein SYT interacts with SYT-interacting protein/co-activator activator (SIP/CoAA), a human nuclear receptor co-activator with similarity to EWS and TLS/FUS family of proteins. *J Biol Chem* **280**,42863-76.
- Ponting CP. (1997). Tudor domains in proteins that interact with RNA. *Trends Biochem Sci* **22**,51-2.

- Ramos A, Hollingworth D, Adinolfi S, Castets M, Kelly G, Frenkiel TA, Bardoni B, Pastore A. (2006). The structure of the N-terminal domain of the fragile X mental retardation protein: a platform for protein-protein interaction. *Structure* **14**,21-31.
- Rehbein M, Wege K, Buck F, Schweizer M, Richter D, Kindler S. (2002). Molecular characterization of MARTA1, a protein interacting with the dendritic targeting element of MAP2 mRNAs. *J Neurochem* **82**,1039-46.
- Reiss AL, Freund L, Abrams MT, Boehm C, Kazazian H. (1993). Neurobehavioral effects of the fragile X premutation in adult women: a controlled study. *Am J Hum Genet* **52**,884-94.
- Reiss AL, Freund LS, Baumgardner TL, Abrams MT, Denckla MB. (1995). Contribution of the FMR1 gene mutation to human intellectual dysfunction. *Nat Genet* **11**,331-4.
- Robertson KD, Wolffe AP. (2000). DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet* **1**,11-9.
- Roy G, De Crescenzo G, Khaleghpour K, Kahvejian A, O'Connor-McCourt M, Sonenberg N. (2002). Paip1 interacts with poly(A) binding protein through two independent binding motifs. *Mol Cell Biol* **22**,3769-82.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition*. NY Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Schaeffer C, Bardoni B, Mandel JL, Ehresmann B, Ehresmann C, Moine H. (2001). The fragile X mental retardation protein binds specifically to its mRNA via a purine quartet motif. *EMBO J* **20**,4803-13.
- Schenck A, Bardoni B, Moro A, Bagni C, Mandel JL. (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**,8844-9.
- Schild-Poulter C, Pope L, Giffin W, Kochan JC, Ngsee JK, Traykova-Andonova M, Hache RJ. (2001). The binding of Ku antigen to homeodomain proteins promotes their phosphorylation by DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **276**,16848-56.

- Schrier M, Severijnen LA, Reis S, Rife M, van't Padje S, van Cappellen G, Oostra BA, Willemsen R. (2004). Transport kinetics of FMRP containing the I304N mutation of severe fragile X syndrome in neurites of living rat PC12 cells. *Exp Neurol* **189**,343-53.
- Schuett J. (2009) Das Fragile X Syndrom: Molekulare Veränderungen der postsynaptischen Dichte in der Maus (*Mus musculus* L.). Bio. Dissertation. Universität Hamburg.
- Schwemmle S, de Graaff E, Deissler H, Glaser D, Wohrle D, Kennerknecht I, Just W, Oostra BA, Doerfler W, Vogel W and others. (1997). Characterization of FMR1 promoter elements by in vivo-footprinting analysis. *Am J Hum Genet* **60**,1354-62.
- Sherman SL, Morton NE, Jacobs PA, Turner G. (1984). The marker (X) syndrome: a cytogenetic and genetic analysis. *Ann Hum Genet* **48**,21-37.
- Siomi H, Choi M, Siomi MC, Nussbaum RL, Dreyfuss G. (1994). Essential role for KH domains in RNA binding: impaired RNA binding by a mutation in the KH domain of FMR1 that causes fragile X syndrome. *Cell* **77**,33-9.
- Siomi H, Siomi MC, Nussbaum RL, Dreyfuss G. (1993). The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. *Cell* **74**,291-8.
- Siomi MC, Siomi H, Sauer WH, Srinivasan S, Nussbaum RL, Dreyfuss G. (1995). FXR1, an autosomal homolog of the fragile X mental retardation gene. *EMBO J* **14**,2401-8.
- Siomi MC, Zhang Y, Siomi H, 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**,3825-32.
- Sobesky WE, Taylor AK, Pennington BF, Bennetto L, Porter D, Riddle J, Hagerman RJ. (1996). Molecular/clinical correlations in females with fragile X. *Am J Med Genet* **64**,340-5.
- Sreeram N, Wren C, Bhate M, Robertson P, Hunter S. (1989). Cardiac abnormalities in the fragile X syndrome. *Br Heart J* **61**,289-91.
- Stelzl U, Worm U, Lalowski M, Haenig C, Brembeck FH, Goehler H, Stroedicke M, Zenkner M, Schoenherr A, Koeppen S and others. (2005). A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. *Cell* **122**,957-68.

- Steward O, Worley PF. (2001). A cellular mechanism for targeting newly synthesized mRNAs to synaptic sites on dendrites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**,7062-8.
- Sutcliffe JS, Nelson DL, Zhang F, Pieretti M, Caskey CT, Saxe D, Warren ST. (1992). DNA methylation represses FMR-1 transcription in fragile X syndrome. *Hum Mol Genet* **1**,397-400.
- Sutherland GR. (1977). Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. *Science* **197**,265-6.
- Tamanini F, Bontekoe C, Bakker CE, van Unen L, Anar B, Willemsen R, Yoshida M, Galjaard H, Oostra BA, Hoogeveen AT. (1999). Different targets for the fragile X-related proteins revealed by their distinct nuclear localizations. *Hum Mol Genet* **8**,863-9.
- Tang J, Kao PN, Herschman HR. (2000). Protein-arginine methyltransferase I, the predominant protein-arginine methyltransferase in cells, interacts with and is regulated by interleukin enhancer-binding factor 3. *J Biol Chem* **275**,19866-76.
- Ting NS, Kao PN, Chan DW, Lintott LG, Lees-Miller SP. (1998). DNA-dependent protein kinase interacts with antigen receptor response element binding proteins NF90 and NF45. *J Biol Chem* **273**,2136-45.
- Tomari Y, Du T, Haley B, Schwarz DS, Bennett R, Cook HA, Koppetsch BS, Theurkauf WE, Zamore PD. (2004). RISC assembly defects in the *Drosophila* RNAi mutant armitage. *Cell* **116**,831-41.
- Trabucchi M, Briata P, Garcia-Mayoral M, Haase AD, Filipowicz W, Ramos A, Gherzi R, Rosenfeld MG. (2009). The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of microRNAs. *Nature* **459**,1010-4.
- Verheij C, Bakker CE, de Graaff E, Keulemans J, Willemsen R, Verkerk AJ, Galjaard H, Reuser AJ, Hoogeveen AT, Oostra BA. (1993). Characterization and localization of the FMR-1 gene product associated with fragile X syndrome. *Nature* **363**,722-4.
- Verheij C, de Graaff E, Bakker CE, Willemsen R, Willems PJ, Meijer N, Galjaard H, Reuser AJ, Oostra BA, Hoogeveen AT. (1995). Characterization of FMR1 proteins isolated from different tissues. *Hum Mol Genet* **4**,895-901.

- Walhout AJ, Temple GF, Brasch MA, Hartley JL, Lorson MA, van den Heuvel S, Vidal M. (2000). GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes. *Methods Enzymol* **328**,575-92.
- Wang YG, Nnakwe C, Lane WS, Modesti M, Frank KM. (2004). Phosphorylation and regulation of DNA ligase IV stability by DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **279**,37282-90.
- Wang Z, Day N, Trifillis P, Kiledjian M. (1999). An mRNA stability complex functions with poly(A)-binding protein to stabilize mRNA in vitro. *Mol Cell Biol* **19**,4552-60.
- Warren ST. (1997). Polyalanine expansion in synpolydactyly might result from unequal crossing-over of HOXD13. *Science* **275**,408-9.
- Weinmann L. (2009) Functional characterisation of microRNA-containing Argonaute protein complexes. Bio. Dissertation. Universität Erlangen.
- Wells RD. (1996). Molecular basis of genetic instability of triplet repeats. *J Biol Chem* **271**,2875-8.
- Willis DM, Loewy AP, Charlton-Kachigian N, Shao JS, Ornitz DM, Towler DA. (2002). Regulation of osteocalcin gene expression by a novel Ku antigen transcription factor complex. *J Biol Chem* **277**,37280-91.
- Wisniewski KE, Segan SM, Miezczeski CM, Sersen EA, Rudelli RD. (1991). The Fra(X) syndrome: neurological, electrophysiological, and neuropathological abnormalities. *Am J Med Genet* **38**,476-80.
- Wright-Talamante C, Cheema A, Riddle JE, Luckey DW, Taylor AK, Hagerman RJ. (1996). A controlled study of longitudinal IQ changes in females and males with fragile X syndrome. *Am J Med Genet* **64**,350-5.
- Zalfa F, Giorgi M, Primerano B, Moro A, Di Penta A, Reis S, Oostra B, Bagni C. (2003). The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses. *Cell* **112**,317-27.
- Zhang Y, O'Connor JP, Siomi MC, Srinivasan S, Dutra A, Nussbaum RL, Dreyfuss G. (1995). The fragile X mental retardation syndrome protein interacts with novel homologs FXR1 and FXR2. *EMBO J* **14**,5358-66.

8 Danksagung

Ich bedanke mich vielmals bei allen die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Stefan Kindler für die umfassende Anleitung und Betreuung der Promotion. Ich danke dem Institutsdirektor Prof. Dr. Andreas Gal für die Möglichkeit der Dissertation am Institut für Humangenetik. Sönke Harder und PD Dr. Friedrich Buck danke ich für die Massenspektrometrische Untersuchung ohne die das Experiment nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke allen Beteiligten der Arbeitsgruppen Kindler und Kreienkamp, die mir häufig mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben, insbesondere Dr. Janin Schütt und Claudia Schob die mir bei meinen ersten Schritten im Labor geholfen haben.

Besonderer Dank gebührt meinen Eltern, die mir erst ermöglicht haben diese Arbeit zu Ende zu bringen, meiner Mutter im besonderem für grammatikalische Unterstützung, meinem Vater für Ansporn in schwierigen Situationen.

Meiner Freundin Juliane danke ich für Rückhalt in allen Lebenslagen, insbesondere dann wenn ich nicht mehr weiter wußte.

9 Lebenslauf

Nickolas Mirko Petrenz

Geburtstag/-ort: 05.05.1981 in Ebsdorfergrund bei Marburg

Schulbildung, Zivildienst und Hochschulstudium

08/1991 – 07/2000 Gymnasium Kaiser-Friedrich-Ufer, Hamburg
Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

08/2000 – 06/2001 Zivildienst bei der Diakoniestation
„Hilfe im Haus e.V.“, Hamburg
Individuelle Schwerstbehindertenbetreuung

10/2003 – 11/2009 Medizinstudium an der Universität Hamburg

01/2008 – 07/2010 Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf
Praktische Arbeit an einer experimentellen
Dissertation zum Thema Fragiles-X-Syndrom
am Institut für Humangenetik

Praktische Berufsausbildung

08/2006 – 09/2006 MVZ für Radiologie und Nuklearmedizin, Berlin
Famulatur, Radiologie und Nuklearmedizin

01/2007 – 02/2007 Krankenhaus Elim, Hamburg
Famulatur, Innere Medizin

04/2007 – 06/2007	Altonaer Kinderkrankenhaus, Hamburg Wahlfach nach neuer AO, Pädiatrie
08/2007 – 09/2007	Asklepios Klinik St. Georg, Hamburg Famulatur, Neurologie
08/2008 – 12/2008	Altonaer Kinderkrankenhaus, Hamburg Praktisches Jahr, Wahlfach-Tertial Pädiatrie
12/2008 – 02/2009	Asklepios Klinik Altona, Hamburg Praktisches Jahr, Chirurgie-Tertial Abteilungen für Allgemein- und Unfallchirurgie
02/2009 – 03/2009	Altonaer Kinderkrankenhaus, Hamburg Praktisches Jahr, Chirurgie-Tertial Abteilung für Kinderchirurgie
03/2009 – 07/2009	Asklepios Klinik Altona, Hamburg Praktisches Jahr, Innere-Tertial Abteilungen für Kardio- und Gastroenterologie

10 Eidesstattliche Versicherung

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

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

Unterschrift:

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'N. Petz', is written over a horizontal dotted line. The signature is cursive and somewhat stylized.