UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG EPPENDORF

Institut für Humangenetik

kommissarischer Institusleiter: Prof. Dr. med. Kurt Ullrich

Der Einfluss von FMRP *(fragile x-mental retardation protein)* auf die Zusammensetzung dendritisch lokalisierter Ribonukleoprotein Partikel in der Maus (*Mus musculus*)

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Katharina Steffens

aus Pinneberg

Hamburg 2014

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 25.07.2014

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. Evita Mohr

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. Christian Hagel

1. EINLEITUNG **1**

1.1 Das Fragile X-Syndrom **1**

1.2 Das Gen *FMR1* **4**

1.3 Das *fragile-X-mental retardation protein* (FMRP) **6**

1.4 mRNA Transport in Neuronen und die Rolle von FMRP **7**

1.5 Ziel der Arbeit **13**

2. MATERIAL UND METHODEN **14**

2.1 Material **14**
2.1.1 Chemikalien 14
2.1.2 Bakterienstämme, Zelllinien und Tiere 14
2.1.3 DNA-Vektoren 14
2.1.4 Oligonukleotide 15
2.1.5 Antikörper 16

2.2 Molekularbiologische Methoden **17**
2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 17
2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten 17
2.2.3 Restriktionsverdau und Ligation von DNA-Fragmenten 18
2.2.4 Mini- und Midipräparation von Plasmid-DNA 18
2.2.5 DNA-Sequenzierung 18
2.2.6 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien 19
2.2.7 RNA Isolation aus Mausgehirnen 19
2.2.8 Reverse Transkriptase quantitative *real-time* Polymerase Ketten Reaktion (RT-qPCR) 20

2.3 Biochemische Methoden **21**
2.3.1 Expression, Aufreinigung und Kopplung von GST-Fusionsproteinen an Glutathion Sepharose 21
2.3.2 Aufreinigung von Proteinen und RNA aus Mausgehirnlysaten 22
2.3.3 Quantifizierung von Proteinen, Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 23
2.3.4 Proteinnachweis im Western Blot 23
2.3.5 Optimierung der Aufreinigung und Präzipitation von mRNP-Komplexen aus Mausgehirnlysaten 24

3. ERGEBNISSE **26**

3.1 Herstellung der Fusionsproteine **26**

3.2 Methodenoptimierung der Protein- und mRNA Präzipitation **27**

3.3 Quantitative Untersuchung der mRNP-Komplexe aus Gehirnen der Wildtyp- und FMRP-*Knockout* Maus **28**
3.3.1 Quantitative Analyse adulter Mausgehirnlysate auf Proteinebene mittels Western Blot 29
3.3.2 Quantitative Analyse verschiedener mRNAs aus KIF3c- und KIF5c mRNPs mittels *real time*-RT-PCR 36

4. DISKUSSION **43**

5. ZUSAMMENFASSUNG **53**

6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS **54**

7. LITERATURVERZEICHNIS **57**

8. ANHANG **66**

8.1 Zusammensetzung der Puffer und Medien **66**

8.2 Verwendetes Expressionskonstrukt **68**

9. DANKSAGUNG **70**

10. PUBLIKATION **71**

11. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG **72**

1. Einleitung

1.1 Das Fragile X-Syndrom

Die Häufigkeit von Erkrankungen mit mentaler Retardierung und Intelligenzminderung liegt in westlichen Ländern bei ca. 1-2% (Leonard *et al*. 2002). Jungen sind viermal häufiger betroffen als Mädchen. Die Ursachen hierfür sind vielseitig und häufig molekularbiologisch nicht eindeutig geklärt. Die sogenannten ASDs (*autism spectrum disorders*) bilden einen Formenkreis von Erkrankungen, bei denen die autistischen Züge der Patienten phänotypisch im Vordergrund der Erkrankung stehen. Häufig überschneiden sich die Symptome der Intelligenzminderung (IQ < 70) und der autistischen Merkmale. Unter autistischen Verhaltenszügen werden im Allgemeinen grob beschränkte und stereotype Interessen und Verhaltensmuster zusammengefasst (Mefford et al. 2012). Das Fragile-X Syndrom (FRAX) ist die häufigste bekannte hereditäre monogene Ursache für mentale Retardierung (Crawford *et al.* 2001) und Autismus (Wang *et al.* 2010). Im Gegensatz zu den meisten ASDs ist die Ursache des FRAX bekannt. Eine Mutation auf dem X-Chromosom (Xq27.3) führt zu einer Trinukleotidexpansion mit Hypermethylierung und Transkriptionsstopp des *FMR1*-Gens, was zum Fehlen des *fragile X mental retardation protein* = FMRP führt (Sutherland 1993). Die Inzidenz einer Vollmutation des Fragilen-X Syndroms liegt bei 1 : 5161 betroffener männlicher Neugeborenen (Coffee *et al.* 2009), während Metaanalysen im Mittel eine Inzidenz von 1 : 3717 – 1 : 8918 bei Männern aufweisen (Crawford 2001). Frauen können ebenfalls an einem FRAX erkranken.

Im Vordergrund steht das Leitsymptom der unterschiedlich stark ausgeprägten mentalen Retardierung in Form von Intelligenzminderung, Sprachstörungen und Aufmerksamdefiziten (Gothelf *et al.* 2008). Phänotypisch ist die Erkrankung durch nicht obligate Merkmale wie z.B. faziale Dysmorphien gekennzeichnet. Zur klassichen Physiognomie bei FRAX-Patienten und Patientinnen kann ein langes schmales Gesicht mit hoher Stirn und supraorbitalen Wülsten, eine Bindegewebsschwäche mit überstreckbaren Gelenken sowie große und wenig differenzierte Ohren oder ein prominenter Unterkiefer gehören (Abb. 1.1). Das erhöhte Risiko an kardialen Erkrankungen zu leiden ist vermutlich durch die Bindegewebsschwäche

bedingt. Am häufigsten weisen die Patienten einen Mitralklappenprolaps auf (Pyeritz *et al.* 1982) während ebenso eine erhöhte Prävalenz von Myopien, Strabismus und Skoliosen beschrieben ist. Betroffene Säuglinge zeigen meist nicht mehr als ein erhöhtes Geburtsgewicht oder eine relative Makrozephalie (Terracciano *et al.* 2005). Eventuell können eine Makroorchidie, pastöse, fleischige Hände und Füße mit tiefen Fußsohlenfurchen sowie eine feine, samtartige Haut bei Kindern zunächst die einzigen Hinweise auf das Vorliegen eines FRAX sein (de Vries *et al.* 1998). Erst später können hyperkinetische Verhaltensweisen mit autistischen Zügen, Konzentrationsschwächen oder Sprachentwicklungsstörungen richtungsweisend für die Erkrankung sein. Typischerweise zeigen männliche Betroffene dann eine postpubertäre Makroorchidie mit einer Fettleibigkeit, einer verminderten Körpergröße und kurzen Händen und Füßen, die an das Prader-Willi-Syndrom erinnern (de Vries *et al.* 1993). Bei Frauen ist die Prämutation des fragilen X Syndroms ein Risikofaktor für die Ausbildung einer prämaturen Ovarialinsuffizienz (POI, engl. *POF=premature ovarian failure*) (Hundscheid *et al.* 2000). Jedoch zeigen weibliche Nachkommen mit einer Prä- oder Vollmutation meist einen weniger stark ausgeprägten Phänotyp als männliche Nachkommen, weshalb Martin und Bell schon früh vermuteten, dass es sich bei dieser Erkrankung um eine Mutation auf dem X-Chromosom handeln könnte (Martin 1943).

Die Merkmalsausprägung variiert mit der vorhandenen Menge des *fragile X mental retardation protein* (FMRP). Die Intelligenzminderung als Leitsymptom ist bei Frauen in Folge der zufälligen X-Inaktivierung der somatischen Zellen äußerst variabel ausgeprägt, da eines der beiden X-Chromosomen in XX-Genotypen transkriptorisch ruhig gestellt wird (Keysor und Mazzocco 2002). Die Merkmalsausprägung ist durch den variablen Anteil an nicht mutierten X-Chromosomen sehr unterschiedlich.

Das Krankheitsbild wurde erstmals 1943 von J. Purdon Martin und Julia Bell in London klinisch beschrieben und ist seither auch als *Martin-Bell Syndrom* (Martin 1943) bekannt.

Der heutige Krankheitsname des Fragilen-X Syndroms wurde 1977 durch Sutherland determiniert. Er stammt aus den zytogenetischen Beobachtungen von kultivierten Patientenzellen, in denen nach Folatentzug oder durch den Folsäureantagonist Methotrexat der lange Arm des kondensierten X-Chromosoms „fragil“ erschien (Sutherland 1977). Diese makroskopisch sichtbaren Veränderungen im Karyogramm des metaphasischen X-

Chromosoms sind auf eine Histondeacetylierung mit Chromatinumbau zurück zu führen. Später konnte bewiesen werden, dass das Martin-Bell Syndrom (Martin 1943) und das Fragile-X Syndrom (Sutherland *et al.* 1977) die gleiche zytogenetische Ursache haben (Richards *et al.* 1981). Die Mutation konnte 1983 dem Bereich Xq27.3 zugeordnet und durch genetische und physikalische Positionsanalysen (*mapping*) genauer eingegrenzt werden (Harrison *et al.* 1983).

Das Gen *FMR1* (*fragile X linked mental retardation 1*), dessen Produkt FMRP (*fragile x mental retardation protein*) bei der Mehrzahl aller fragilen X-Patienten fehlt, wurde erstmals 1991 identifiziert (Verkerk *et al.* 1991).

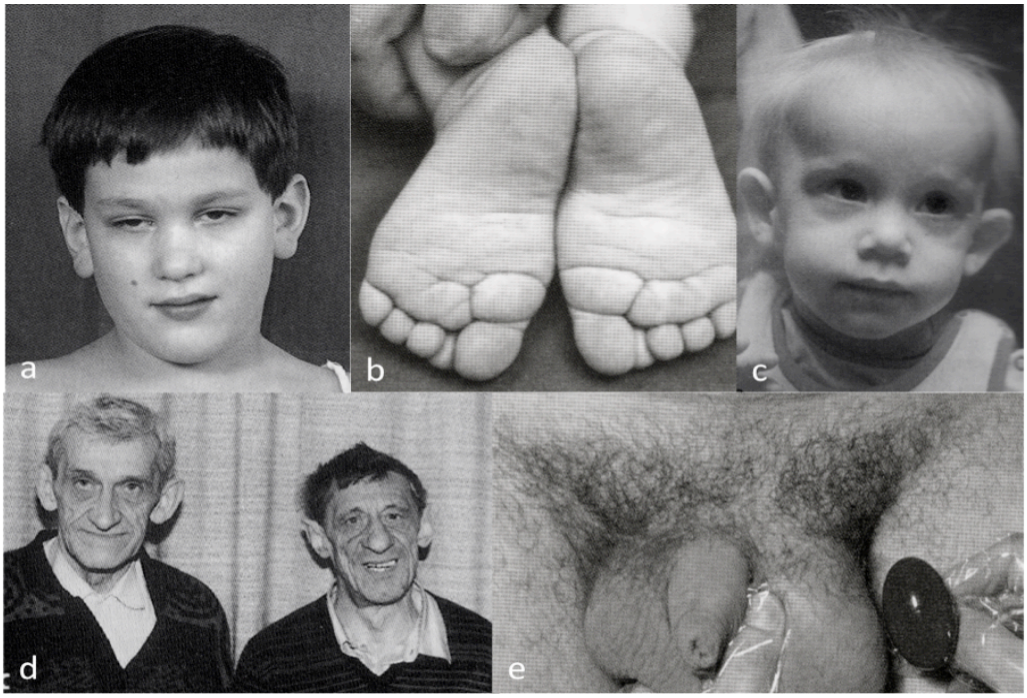


Abbildung 1.1: Phänotyp des Fragilen X-Syndroms: a) Neunjähriger Junge mit FRAX und den typischen fazialen Morphologien. b) ausgeprägte Furchungen der Füße. c) 2-jähriges Mädchen mit FRAX. d) zwei ältere Patienten. e) Makroorchidie: zum Vergleich wird ein normal großes Hodenmodell neben die Hoden eines Patienten mit FRAX gehalten. (Buselmaier und Tariverdian 2007).

1.2 Das Gen *FMR1*

Das Gen *FMR1* ist insgesamt 38 Kilobasen groß und besteht aus 17 Exons (Eichler *et al.* 1993). In nahezu allen Fällen wird das Fragile-X Syndrom durch Expansion von CGG-Tripletts in der 5'UTR des *FMR1*-Gens hervorgerufen (Kremer *et al.* 1991) und gehört daher zu den Trinukleotidexpansionskrankheiten (Sutherland 1993). Bei vorliegendem Phänotyp findet man in ca. 95% aller Patienten eine Vollmutation, die durch mehr als 200 CGG-Tripletts im Exon 1 definiert ist (Kremer *et al.* 1991). Die Methylierung der Cytosinreste des Promotorbereiches im *FMR1*-Gen führt zu einer transkriptionellen Abschaltung (*loss of function mutation*) des Gens und damit zum Fehlen des *fragile X mental retardation protein* (FMRP) (Sutcliffe *et al.* 1992). In gesunden Populationen findet man repetitive Polymorphismen mit 6-50 CGG-Triplettexpansionen am 5´-Ende des 1. Exons und am 3´-Ende des 1. Exons. Insgesamt wird die Prämutation mit 50-200 CGG-Triplettwiederholungen von einer Vollmutation mit 200 bis zu mehreren tausend Wiederholungen (Devys *et al.* 1992) unterschieden (Abb. 1.2). Die Prävalenz der Prä- und Vollmutation, also eines Genotyps mit mehr als 50 CGG-Trinukleotidwiederholungen, bei Frauen betrug in einer israelischen Studie von 14.000 Probandinnen im gebärfähigen Alter 1:69. Mehr als 54 CGG-Tripletts, also einer Vollmutation entsprechend, zeigte dann aber nur eine von 113 Probandinnen (Toledano-Alhadef *et al.* 2001). Metaanalytisch liegt die Inzidenz der Prämutation (50-200 Tripletts) bei Männern bei 1:1000 und bei Frauen bei 1:246 – 1:468 weltweit und zeigt eine geografische Divergenz (Crawford *et al*. 2001).

Sherman und Mitarbeiter beobachteten weiterhin, dass eine Trinukleotidexpansion in der Erbfolge nur in der weiblichen Keimbahn erfolgt und die Prämutation bzw. Vollmutation hier meist instabil vererbt wird (Sherman *et al.* 1984 und 1985). Das Risiko von Prämutationsträgerinnen (50 - 200 Tripletts) Nachkommen mit einer Vollmutation zu bekommen steigt exponentiell mit der Länge der vorhandenen Tripletts an, während eine Triplettlänge von bis zu 50 meist stabil vererbt wird (Fisch *et al*. 1995). Dieses Phänomen der instabilen Vererbung wird in der Humangenetik allgemein als Antizipation bezeichnet (Fu *et al*. 1991, Sherman *et al.* 1985). Sowohl männliche Vollmutations- als auch

Prämutationsträger sind im Allgemeinen fertil, denn Spermien von Vollmutationsträgern weisen immer nur eine Anzahl von 50-200 CGG-Tripletts (Prämutationsträger) auf (Reyniers *et al*. 1993). Ein betroffener Mann kann daher nur Töchter mit einer Prämutation bekommen, die dann häufig und je nach Ausmaß der X-Inaktivierung klinisch gesund sind. Dieses Phänomen ist seither auch als Sherman-Paradoxon bekannt (Sherman *et al.* 1985).

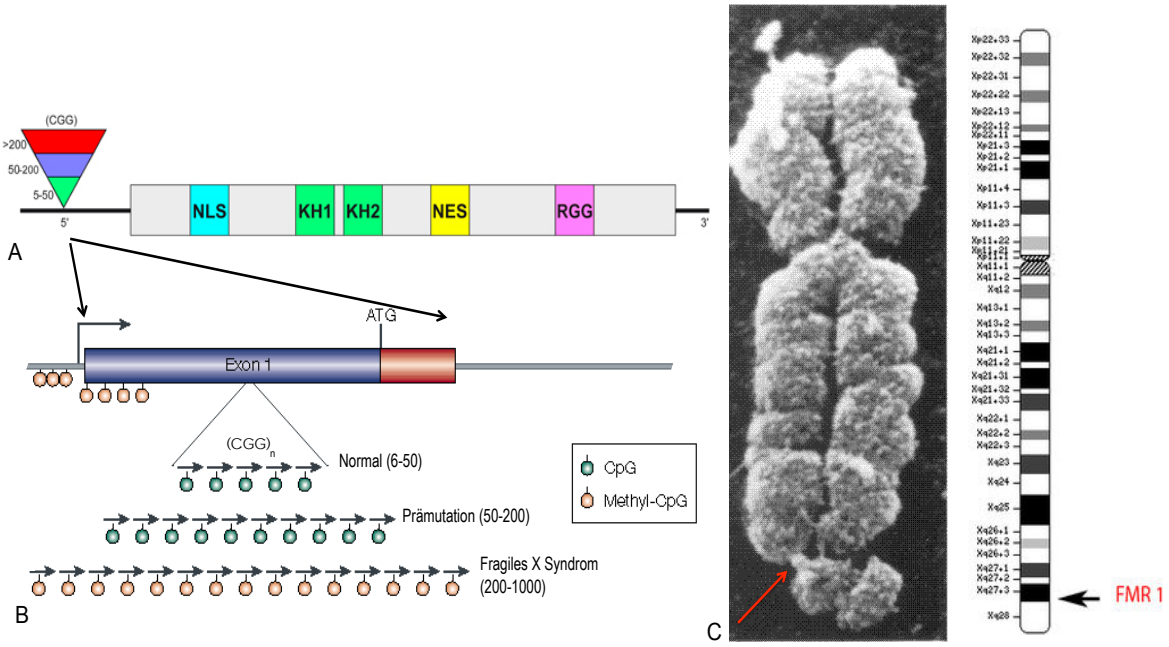


Abbildung 1.2: Molekulare Ursachen des Fragilen-X Syndroms: A) Schematische Darstellung des *FMR1*-Proteins und seiner kodierenden mRNA (modifiziert nach Oostra, Willemsen und Hoogeveen). Die für die RNA-Bindung relevanten Bereichen: die KH-Domänen und die RGG-Box sowie mit die für die Lokalisation verantwortlichen NLS-und NES Domänen sind eingezeichnet. B) Molekulargenetische Ursache des Fragilen-X Syndroms (modifiziert nach Robertson und Wolffe 2000) ist die Verlängerung einer repetitiven Sequenz aus CGG-Trinukleotiden auf über 200 Tripletts in Exon 1 von *FMR1*. C) Metaphase des X-Chromosoms eines FRAX Patienten im Elektronenmikroskop. Der rote Pfeil deutet auf die fragil wirkende Stelle an Position Xq27.3 (modifiziert nach Harrison *et al.* 1983). Daneben schematische Darstellung der *FMR1*-Position auf dem X-Chromosoms (NCBI Map Viewer, X-chromosome).

1.3 Das *fragile-X-mental retardation protein* (FMRP)

Das *FMR1*–Gen kodiert für das *fragile X-mental retardation protein*, auch FMRP genannt. Das RNA-bindende Protein besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 78 Kilodalton (kDa) und besteht aus 631 Aminosäuren. Autosomal kodierte homologe Proteine von FMRP sind FXR1 und FXR2 (*fragile X relatives*), die funktionell und strukturell große Ähnlichkeiten zu FMRP aufweisen. FMRP ist im zentralen Nervensystem am stärksten im Zytoplasma des cerebralen Cortex, des Hippocampus, und des Cerebellums nachzuweisen (Hinds *et al.* 1993). Als mRNA bindendes Protein kann es die Translation gebundener mRNAs sowie die Translation seiner eigenen mRNA hemmen (Laggerbauer *et al.* 2001) und fördern (Bechara *et al.* 2009). Insgesamt sind ungefähr 4 % der im Gehirn exprimierten mRNAs mit FMRP assoziiert (Ashley *et al.* 1993). Für die mRNA-Bindung enthält das Protein verschiedene funktionelle Domänen: Die N-terminalen 184 Aminosäuren enthalten das NLS *(nuclear localisation signal*) für die Rekrutierung in den Zellkern. Im C-terminalen Teil findet sich das NES (*nuclear export signal*) für den Export aus dem Zellkern heraus (Eberhart *et al.* 1996). Drei funktionelle Domänen von FMRP weisen Homologien zu anderen RNA-bindenden Proteinen auf (Siomi *et al.* 1993, Ashley *et al.* 1993): Im N-terminalen Bereich befinden sich zwei zum heteronukleären Ribonukleoprotein K (hnRNP-K) homologe Domänen (KH1 und KH2-Motive) und weiter C-terminal die sogenannte RGG-Box, die Wiederholungen der Sequenz Arginin/Glycin/Glycin enthält. Die RGG-Box bindet mit hoher Affinität an RNAs, die eine G-Quartett-Struktur enthalten (Darnell *et al.* 2001). Diese Bindung kann durch Methylierung der Arginine unterbunden werden und eine nicht vorhandene RGG-Box führt zum Verlust der RNA-Bindung von FMRP (Siomi *et al.* 1993). Die KH2-Domäne kann an synthetische RNAs binden, die einen sog. *kissing*-Komplex enthalten (Darnell *et al.* 2005). Diese Struktur konnte jedoch noch nicht in einer mit FMRP assoziierten mRNA *in vivo* nachgewiesen werden. Allerdings konnte der Aminosäureaustausch von Isoleucin zu Asparagin an Position 304 (I304N) in der KH2-Domäne eines Patienten mit ausgeprägtem Phänotyp des Fragilen-X Syndroms ohne CGG-Triplettexpansion die klinische Relevanz dieser RNA-Bindungsstelle und der Bedeutung für die Pathogenese des FRAX zeigen (De Boulle *et al.* 1993). Zuletzt wurde die Interaktion von FMRP mit der Superoxid Dismutase 1 mRNA (Sod1) über die SoSLIP (Sod1 Stem Loop Interacting with FMRP) nachgewiesen (Bechara *et*

al. 2009). Das Fehlen von FMRP führt zu einer verminderten Superoxid Dismutase Expression, was zu oxidativem Stress führt. Oxidativer Stress im Allgemeinen wird bereits mit Autismus, Schlafstörungen und Angstzuständen in Zusammenhang gebracht. Da diese Symptome ebenfalls beim FRAX auftreten, könnte die verminderte Superoxid Dismutase mit der erhöhten Menge an oxidativem Stress durch das Fehlen von FMRP ein weitere Faktor in der Pathogenese des FRAX darstellten (Bechara *et al.* 2009).

1.4 mRNA Transport in Neuronen und die Rolle von FMRP

Die zelluläre Funktion von FMRP liegt unter anderem in der Regulation von mRNAs. Das Vorliegen einer genau eingestellten Menge an mRNA und Proteinen ist maßgeblich für die neuronale Entwicklung und die aktivitätsabhängige Plastizität von Neuronen sowie deren synaptischer Verbindungen (Bear *et al*. 2004). FMRP wird zusammen mit anderen Bestandteilen der Translationsmaschinerie (Proteinen, mRNAs, Polyribosomen, ribosomale Untereinheiten) in unterschiedlich großen mRNPs (mRNPs=*messenger ribonuleoprotein particles*) vom Zellsoma in Richtung Dendriten transportiert (Antar *et al.* 2005). Dieser Transport der mRNPs erfolgt durch Mikrotubuli- (Kinesine/Dyneine) und Mikrofilament (Myosine)- assoziierte Motorproteine. Kinesine (KIFs) wurden in allen untersuchten Organismen vom Protozoen bis zum Säugetier gefunden. Die 15 Kinesinfamilien können grob in 3 Untergruppen eingeteilt werden: Die N-Kinesine, die M-Kinesine und die C-Kinesine: Sie enthalten ihre Motordomäne entweder am Aminoterminus, in der Mitte oder am Carboxyterminus. N-Kinesine transportieren ihre Last entlang von Mikrotubuli in Richtung Plus-Ende, C-Kinesine in Richtung Minus-Ende von Neuronen, während M-Kinesine Mikrotubuli depolymerisieren (Hirokawa *et al*. 2009).

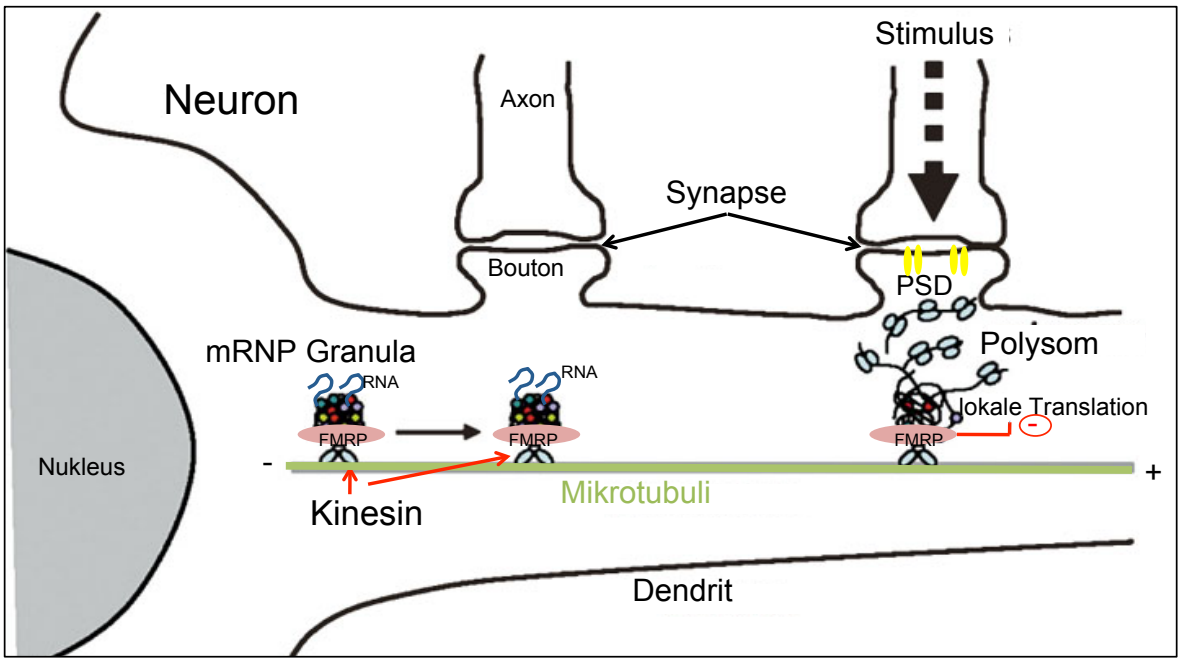


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des Transports von mRNPs an Mikrotubuli in Neuronen: Nukleusnah werden bereits generierte Proteine zusammen mit mRNA und weiteren Bestandteilen (siehe Text) von Kinesinen in *messenger* Ribonukleoprotein-Partikeln (mRNP) an Mikrotubuli entlang zu den Dendriten transportiert. Dort kann auf einen adäquaten Stimulus hin z.B. die Shank1 mRNA lokal an Polysomen translatiert werden. FMRP ist als RNA-bindendes Protein Teil der mRNP Komplexe und hemmt an den Dendriten die lokale Translation (modifiziert aus Miki *et al*. 2005).

Die Motorproteine der Kinesin-1 Familie (KIF5c, KIF5b, KIF5a) sind ATPasen von 380 kDa Größe und bestehen aus zwei schweren Ketten von jeweils etwa 120 kDa sowie zwei leichten Ketten mit je etwa 64 kDa. Jede schwere Kette besteht wiederum aus drei separaten Domänen (Bloom *et al*. 1988). Die C-terminale Schwanzdomäne, die mit den leichten Ketten verbunden ist, sorgt für die Erkennung der Lasten (*cargo*) (Skoufias *et al.* 1994). FMRP wird unter anderem durch das KIF5c Motorprotein transportiert, welches zur Kinesin-1 Familie (*conventional kinesin*) gehört (Hirokawa und Takemura 2005). KIF3c, ein Mitglied der Kinesin-2 Familie, konnte 2007 ebenso mit FMRP in KIF3c-mRNPs nachgewiesen werden (Davidovic *et al.* 2007).

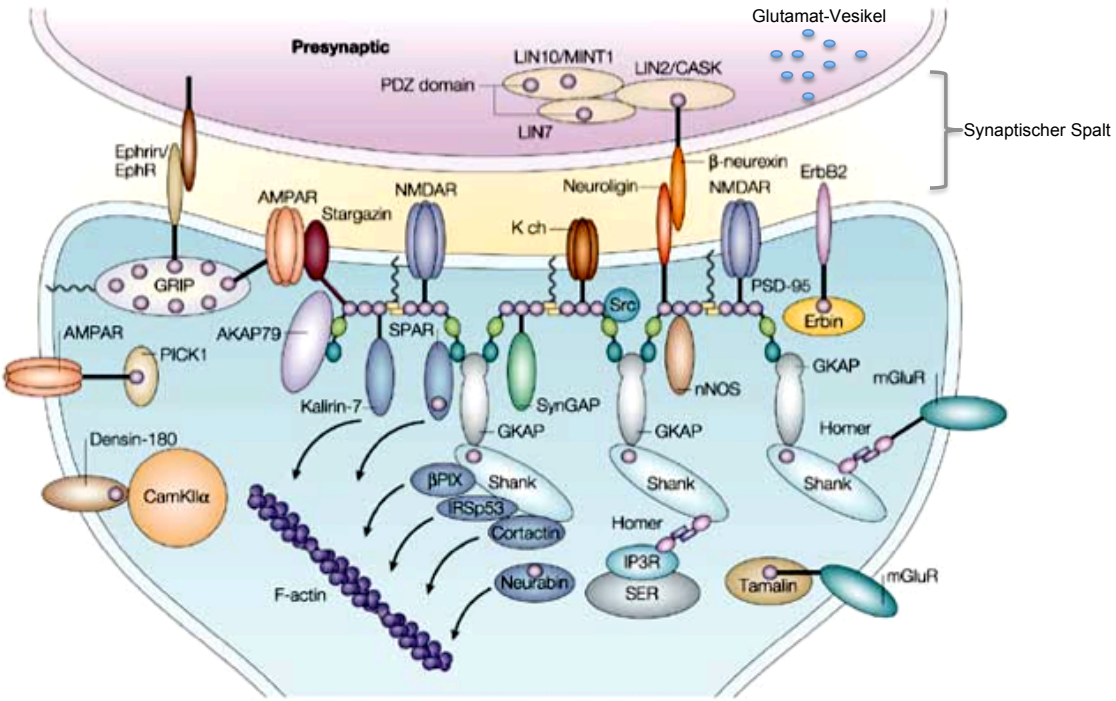


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung einer Synapse mit wichtigen Proteinen und Rezeptoren der postsynaptischen Dichte: Die Rezeptoren NMDA, AMPA und mGlu durchspannen die Membran der Postsynapse. Sie werden durch sogenannte Gerüstproteine verankert. Weitere Einzelheiten siehe Text (modifiziert aus Kim und Sheng 2004).

Die postsynaptische Dichte (PSD, Palay und Palade 1955) stellt ein komplexes Proteinnetzwerk aus membranständigen Rezeptoren, Kanälen, Zytoskelett-Proteinen, Zelladhäsionsproteinen und Gerüstproteinen dar und befindet sich an den dendritischen Dornen (*spines*) (Boeckers 2006). Einige mRNAs, die für wichtige Gerüstproteine der PSD kodieren (PSD-95, Shank1, Arg3.1/Arc, SAPAP3 und αCaMKII mRNAs), sind dendritisch lokalisiert (Boeckers 2006, Kindler *et al.* 2004, Zalfa *et al*. 2007). Eine lokale Proteinsynthese an Synapsen kann zu langanhaltenden, plastischen Veränderungen der Synapsen und damit zu Lern- und Gedächtnisprozessen beitragen (LTP=*long time potentation*) und ist beim FRAX gestört (Sutton und Schuman 2006). Morphologisch veränderte dendritische Dornen sind auch bei Patienten mit Trisomie 21, dem Rett-Syndrom oder anderen Erkrankungen mit mentaler Retardierung unbekannter Ätiologie erkennbar (Kaufmann *et al*. 2000). Im Hippokampus Fmrp-defizienter Mäuse kommt es durch das Fehlen von Fmrp zu einer unkontrollierten Proteinsynthese an den Synapsen. Dies führt zu morphologischen

Veränderungen mit eher filopodien- statt pilzförmigen dendritischen Dornen (Antar *et al*. 2006, Irwin *et al*. 2001) und einer Veränderung der synaptischen Rezeptorendichte von NMDA- und AMPA Rezeptoren (Snyder *et al*. 2001) (Abb. 1.5) sowie zu erhöhten Mengen des Gerüstproteins Shank1 in der PSD (Schuett *et al.* 2009).

Shank1 bildet gemeinsam mit Shank2 (ProSAP1) und Shank3 (ProSAP2) die ProSAP/Shank Familie. Diese sind als Proteine der postsynaptischen Dichte mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden und interagieren als *„master scaffolding molecules“* mit anderen Proteinen der PSD, wie z.B. der Sapap-Familie (Naisbitt *et al.* 1999), IRSp53 (Soltau *et al*. 2004) oder dem Calcium-unabhängigen Rezeptor für α−Latrotoxin (Kreienkamp *et al*. 2000, Tobaben *et al.* 2000). Die lokale Translation der Shank1 mRNA wird durch Fmrp negativ reguliert (Schuett *et al.* 2009). Eine *SHANK3*-Mutation (22q13.3) liegt bei dem durch mentale Retardierung charakterisierten Phelan-McDermid- Syndrom vor (PMS; Phelan *et al.* 2001). Da noch eine intakte Kopie des *SHANK3*-Gens vorhanden ist, wird eine Haploinsuffizienz als Krankheitsursache angesehen (Uchino *et al.* 2012). Eine exakt eingestellte Menge der Shank-Proteine im Gehirn erscheint daher wichtig für die Entwicklung von Sprache, Intelligenz und Kommunikation.

Das Prinzip der fehlenden Translationssupression von FMRP wurde durch die sog. mGluR-Theorie des Fragilen-X Syndroms von Bear und Huber untermauert. Die Theorie basiert auf folgenden drei Annahmen:

1. FMRP fungiert als lokaler Translationsrepressor an Synapsen,
2. die lokale Proteinsynthese an Synapsen wird durch Aktivierung der G-Proteingekoppelten Rezeptoren mGluR 1 oder 5 stimuliert,
3. die synaptische Proteinsynthese ist in Abwesenheit des mGluR5-Agonisten erhöht und kann durch die Abwesenheit nicht weiter gesteigert werden. (Bear *et al.* 2004).

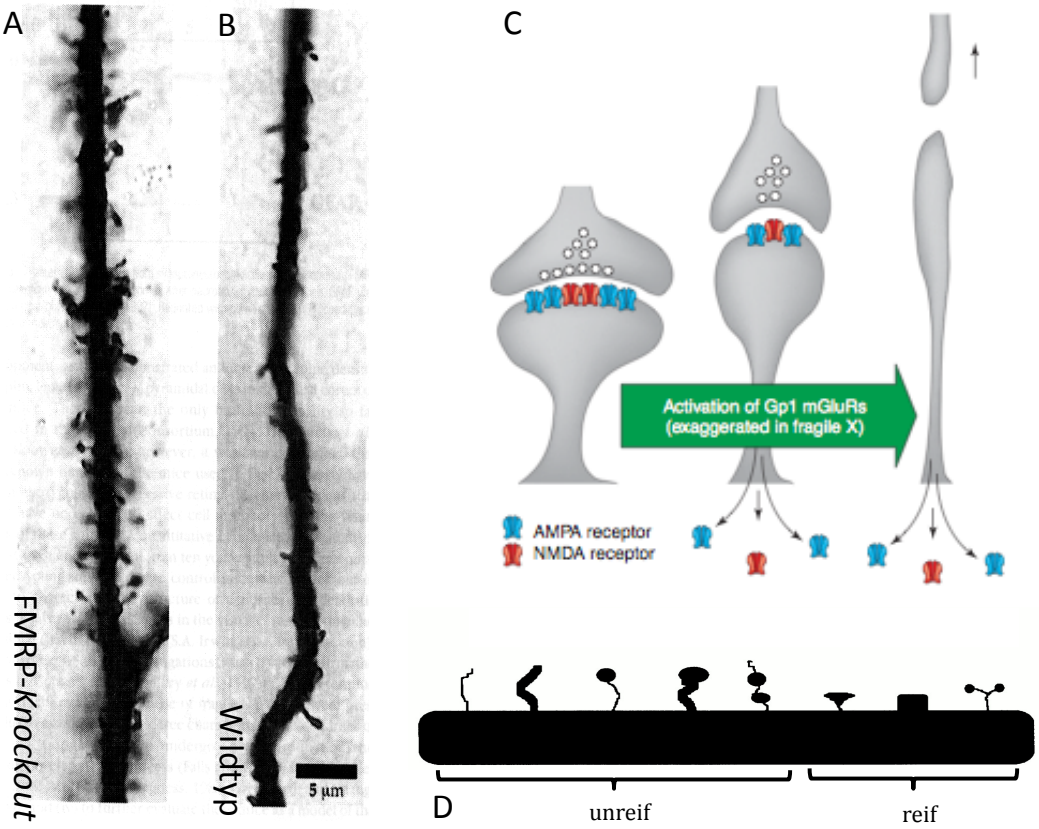


Abbildung 1.5: Atypische Synaptogenese beim Fragilen-X Syndrom: A) Darstellung eines Dendriten einer FMRP-*knockout* Maus. Die neuronalen *spines* sind in Morphologie und Anzahl verändert. B) Darstellung eines Dendriten einer Wildtyp Maus. Die *spines* sind in Morphologie und Anzahl normal. C) Schematische Darstellung von Synapsen im Wildtyp (links) und in der FMRP-*knockout* Maus (rechts). Gezeigt wird der Verlust von AMPA- und NMDA Rezeptoren sowie die Reduktion von Glutamatvesikeln in der Präsynapse. Die Aktivierung von mGluRs ist beim FRAX erhöht und die Translationssupression fehlt, so dass es zu ungerichteten Proteinbiosynthese mit morphologisch veränderten Synapsen kommt (modifiziert aus Bear et al. 2004) D) schematische Darstellung der Morphologie von Spines in Dendriten, die unreifer *spines* sind eher filopodien- statt pilzförmig (modifiziert aus Irwin et al. 2000)

Die mGluR-Theorie hat zu einem Paradigmenwechsel der medizinischen Sichtweise des Fragilen-X Syndroms geführt. Durch das Fehlen von FMRP ist die mGluR5- (metabotroper Glutamat Rezeptor 5) abhängige Langzeit Depression (LTD) gestört. Durch den Wegfall der Translationssupression von FMRP im Rahmen der Langzeit-Potenzierung (LTP) kommt es zu einer ungerichteten Proteinsynthese in der CA1 Region hippocampaler Neurone (Dolen und Bear 2008). Basierend auf der mGluR Theorie entstand die logische Schlussfolgerung mittels *down*-Regulation der Glutamatrezeptor-Signale viele phänotypische Merkmale des Fragilen-X Syndroms kurieren zu können (Bear 2005).

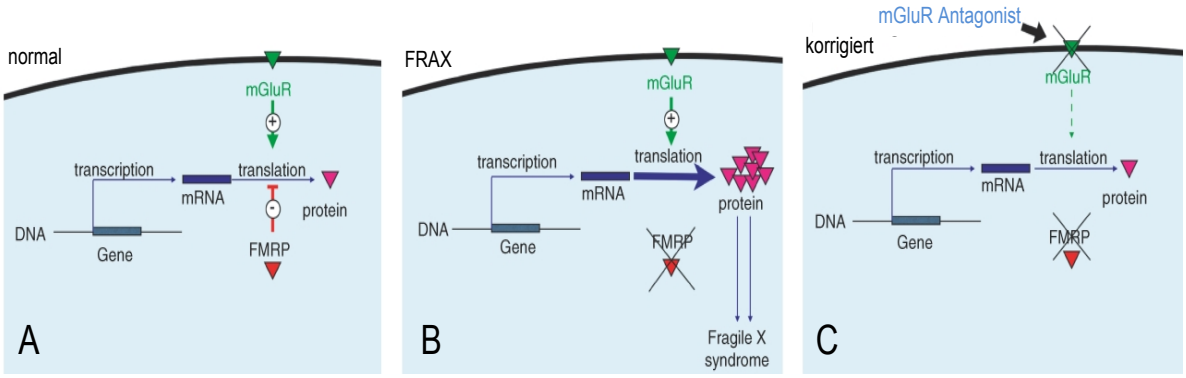


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der mGluR5 Therorie und der Behandlung des Fragilen-X Syndroms: A) Bei Gesunden wird nach Aktivierung des Glutamatrezeptors mGluR5 die Translation synaptischer Proteine initiiert. FMRP ist hier Gegenspieler und hemmt die Translation. B) Bei FRAX-Patienten fehlt die Hemmung durch FMRP und die Proteinsynthese erfolgt unkontrolliert, es kommt zur klinischen Ausprägung des Fragilen-X Syndroms. C) Durch mGlurR-Antagonisten könnte bei FRAX-Patienten die Stimulation der Translation reprimiert werden (modifiziert aus Dolen und Bear 2008).

Unterschiedliche Studien im Tiermodell und beim Menschen haben bestätigt, dass die Symptome durch eine Blockade des mGluR5-Rezeptors zum Teil behoben werden können (Dolen *et al.* 2007, Krueger *et al.* 2011). Oral verfügbare mGluR5-Antagonisten könnten bei frühzeitigem Therapiebeginn sogar die Ausbildung von Symptomen des FRAX abschwächen oder ganz verhindern (Wang *et al.* 2010).

Pharmakonzern	**Präparat**	**Wirkmechanismus**	**Studienphase**
Cortex pharmaceuticals	CX516 (Ampalex®)	AMPA Rezeptor Modulator	Phase II Studie
Novartis	AFQ056 (Mavoglurant®)	mGluR5 Antagonist	Phase III Studie
Roche	RO4917523 (RG7090)	mGluR5 Antagonist	Phase II Studie
Seaside therapeutics	STX107	mGluR5 selektiv negativ allosterischer Modulator (NAM)	Phase II Studie
	STX209 (Arbaclofen®)	GABAb Agonist	Phase III Studie

Tabelle 1.1: Übersicht aktueller Präparate, Studienphasen sowie der durchführenden Pharmaunternehmen zur Behandlung des fragilen X-Syndroms und anderen ASD (www.clinicaltrials.gov)

1.5 Ziel der Arbeit

Die Ergebnisse bisheriger Studien zeigen, dass die synaptische Proteinsynthese genau reguliert werden muss, um eine normale Funktion der Synapsen zu erreichen. Diese Regulation ist bei Patienten mit Fragilem-X Syndrom gestört, was zu einer veränderten Proteinausstattung in Synapsen von Neuronen führt. Über 800 mRNAs sind mit FMRP in mRNPs assoziiert (Darnell *et al.* 2011). Einige dieser mRNAs oder Proteine führen durch das Fehlen von FMRP zu einer gestörten Synaptogenese. Für die Pathogenese des Fragilen-X Syndroms ist es essentiell heraus zu finden, welche dieser Komponenten pathogen sind, um die bisherigen therapeutischen Ansätze zu optimieren.

Das Ziel dieser Arbeit war, den Einfluss von Fmrp auf die Zusammensetzung der mRNPs in Wildtyp- und *Fmr1*-/- Mäusen zu untersuchen. Die Analyse der mRNPs sollte sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene durchgeführt werden. Ein Fokus lag dabei auf der Analyse der Zusammensetzung der durch KIF5c- und der KIF3c- transportierten mRNPs. Hier stand die Fragestellung im Mittelpunkt, inwieweit und ob das Fehlen von Fmrp die Zusammensetzung dieser Partikel verändert und dies ein pathogener Faktor in der Ausprägung des FRAX sein könnte. Aufgrund der für die Synaptogenese wichtigen Funktion des *master scaffolding protein* Shank1 lag ein Schwerpunkt der Analysen auf der eventuell veränderten Konzentration der Shank1 mRNA. Weiterhin sollten mögliche Konzentrationsänderungen von Fmrp assoziierten Proteinen wie Staufen1, Purα, hnRNP-K, Ddx-1, Grip oder PABP in den KIF3c- und KIF5c mRNPs in Wildtyp- und *Fmr1-/-* Individuen untersucht werden, um auch ggf. hier einen pathogenen Faktor ausmachen zu können.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die Zusammensetzung aller Puffer und Medien ist im Anhang aufgeführt (8.1). Die Chemikalien wurden, falls nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) oder Roche (Penzberg. Deutschland) in reinst Qualität (p.A.) bezogen. Verwendete Enzyme stammten von NEB, Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland), Roche oder Promega (Mannheim, Deutschland).

2.1.2 Bakterienstämme, Zelllinien und Tiere

Für alle Klonierungen wurden *Escherichia coli* Bakterien vom Stamm TOP10F (Invitrogen) und zur Expression von rekombinanten Proteinen vom Stamm BL21-C*odonPlus* (Stratagene, La Jolla, USA) genutzt.

Es wurde die *Fmr1*-/- defiziente Mauslinie B6.129P2-Fmr1tm1Cgr/J (*fmr1*-/-; Jackson Laboratories, Bar Harbor, USA) (*Mus musculus L*.) sowie entsprechende Wildtyp-Mäuse des Stammes C57bl/6J (Wildtyp/WT Linie) genutzt.

2.1.3 DNA-Vektoren

Vektor	Beschreibung, Resistenz	Hersteller
pGEX-4T-2	Prokaryotische Expression, Glutathion-S-Transferase, Ampicillin	GE Healthcare Life Sciences

Tab. 2.1: Für Klonierung verwendeter DNA-Vektor.

Das Plasmid dient als Ausgangsvektor für die Klonierung. Das damit hergestellte Expressionskonstrukt ist im Anhang aufgeführt (Abschnitt 8.2).

2.1.4 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide für die PCR, RT-qPCR (reverse Transkriptase quantitative *real-time* PCR) und Sequenzierungen wurden bei Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Operon (Köln, Deutschland) bzw. Qiagen (Hilden, Deutschland) bestellt, mit tridestilliertem Wasser gelöst (für RT-qPCR Oligonukleotide mit RNase freiem Wasser) und auf 10 pmol/µl eingestellt. Alle QuantiTect Primer Assays (Qiagen) wurden nach Herstellerangaben gelöst und verwendet.

Name	**Sequenz 5 ´> 3**	**Referenz**	**Größe Produkt**
SAPAP3-fw	ACTATTTGCAGGTGCCGCAAG	Qiagen	141 bp
SAPAP3-rev	GGGCTACCATCTGAGTCTCC		
Shank1-fw	AGCCTGCAGCAGTGCCCAGCA	Qiagen	134 bp
Shank1-rev	ATGCGAGGCCGCCAGGCCCA		
GAPDH-fw	TGGCAAAGTGGAGATTGTTGCC	Qiagen	155 bp
GAPDH-rev	AAGATGGTGATGGGCTTCCCG		
18S RNA-fw+rev	siehe Herstellerangaben	Qiagen	149 bp
Arc	siehe Herstellerangaben	Qiagen	134 bp
JACOB-fw+rev	siehe Herstellerangaben	Qiagen	
HPRT-fw	GTTCTTTGCTGACCTGCTGGA		
HPRT-rev	TCCCCCGTTGACTGATCATT	Qiagen	119 bp

Tab. 2.2: verwendete RT-qPCR Primer

2.1.5 Antikörper

Primär-Antikörper	Quelle	Verdünnung im WB	Größe des detektierten Antigens im WB
rb-Anti-KIF5C	ABR	1:2000	110kDa
m-Anti-Tubulin	Abcam	1:10.000	55 kDa
rb-Anti-DDX-1	Novus Biologicals, Littleton	1:1.000	78kDa
rb-Anti-DDX-1	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	1:1.000	78kDa
gp-Anti-KIF3c	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	1:2000	
rb-anti-FMRP H-120	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg	1:1.000	75 kDa
rb-Anti-FMRP	J.Schütt, UKE Hamburg	1:50	75 kDa
m-anti-FMRP 1C3-1a	Euromedex,	1:500	75 kDa
m-anti-hnRNP-K	Acris Antibodies GmbH	1:1.000	65kDa
rb-anti-PABP	E. Mohr, UKE Hamburg	1:1.000	73kDa
anti-GRIP	Transducktion Laboratories	1:1000	130kDa
m-anti-Purα	Abnova	1:2.500	47 kDa
anti-S6		1:1.000	29kDa
rb-anti-Staufen1 (Serum)	S. Kindler, UKE Hamburg	1:1.000	65 kDa

Tab. 2.3: Übersicht der eingesetzten Primär-Antikörper.
m = *mouse* (Maus); rb = *rabbit* (Kaninchen); WB= *Western Blot*; gp = *guinea pig* (Meerschweinchen)

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur gezielten Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Polymerase-Kettenreaktion genutzt (PCR). Für einen Gesamtansatz von 50µl wurden 10-100ng Plasmid-DNA als Matrize, 10-50pmol Primer und je 100µmol Desoxyribonukleotide eingesetzt.

Weitere Komponenten wie die *AmpliTaq*-Polymerase (Perkin Elmer) oder die *Pfu-Turbo*-Polymerase (Stratagene) wurden nach Herstellerempfehlungen eingesetzt. Zunächst wurde die DNA 2 Minuten bei 94°C denaturiert; es folgten 35 Zyklen aus je 1 Minute bei 94°C, 30 Sekunden bei 55-65°C für die Primer-Anlagerung (5°C unter der von Sigma-Aldrich berechneten Temperatur) und 1 Minute pro 1.000 Nukleotide bei 72°C für die Elongation. Im Anschluss erfolgte ein abschließender Verlängerungsschritt bei 72°C für 10 Minuten. Dies ermöglichte nach Agarose-Gelelektrophorese und Aufreinigung der PCR-Produkte die Klonierung in den pCR4-TOPO-Vektor (Invitrogen, Durchführung nach Herstellerangaben). Zur weiteren Klonierung der Fragmente waren diese entweder schon durch die verwendeten Primer mit Restriktionsschnittstellen versehen oder es wurden Schnittstellen des pCR4-TOPO-Vektors genutzt.

2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten

Je nach Größe der Fragmente wurden 0,8-2%ige Gele für horizontale nicht-denaturierende Elektrophoresen hergestellt. Hierfür wurde Agarose in 1x TAE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlen mit 0,2µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die Plasmide, Restriktionsansätze oder PCRs wurden mit 5x DNA-Ladepuffer versetzt, in die Geltaschen aufgetragen und mit 1x TAE-Laufpuffer bei 100V elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenmarker wurden der λ- und GeneRulerTM 100 bp Standard von Fermentas verwendet. Die Dokumentation erfolgte unter UV-Licht, wobei gewünschte Fragmente ausgeschnitten und durch Bindung an Glasmilch aus der Agarose isoliert werden konnten (*Qiaex II* von Qiagen).

2.2.3 Restriktionsverdau und Ligation von DNA-Fragmenten

Die PCR-Produkte wurden mit Restriktionsendonukleasen nach Herstellerangaben gespalten. Verwendet wurden ausschließlich FastDigest-Enzyme in 10x *buffer green* (Fermentas/Thermo Fisher Scientific), der gleichzeitig als Ladepuffer für die Gelelektrophorese diente. In einem Ansatz von 50µL wurde 1 µg DNA mit jeweils 1,5 µL Enzym für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der Auftrennung und Aufreinigung aus dem Agarosegel (2.2.2) wurde die DNA für die Ligation eingesetzt. In einem 20 µL Ansatz wurde die Vektor- und Insert-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:4-6 zusammen mit der T4-Ligase in adäquatem Puffer (Fermentas/Thermo Fisher Scientific) für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4-16°C inkubiert.

2.2.4 Mini- und Midipräparation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde mittels alkalischer Lyse (Sambrook et al., 1989) aus Bakterienkulturen aufgereinigt. Zur Herstellung von bis zu 20µg DNA wurden die Puffer P1-3 und das entsprechende Protokoll der Firma Qiagen verwendet (= Minipräparation). Für die Aufreinigung von Plasmid-DNA in größerem Maßstab und von höherer Reinheit wurde der *NucleoBond-XtraMidi-Kit* genutzt (Macherey&Nagel; = Midi- bzw. Maxipräparation). Die DNA-Konzentration wurde mit einem Spektrophotometer durch Messung der Absorption bei 260nm bestimmt.

2.2.5 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurden nach der Didesoxy-Methode (Sanger et al. 1977) mit dem *Abi Prism Big Dye Terminator Kit* (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Mini-DNA wurde zunächst noch einmal gefällt und mit Ethanol gewaschen. Midi-DNA konnte direkt eingesetzt werden. Es wurden dann 0,4-1µg DNA, 1µl *PreMix Big Dye*, 1µl Primer (10pmol/µl) und 4µl 2,5 *Puffer Applied 900* auf 10µl mit tridestillierten Wasser aufgefüllt und die Sequenzierungsreaktion in einem Thermocycler durchgeführt (96°C 1min; 25x je 96°C für 20 s, 50°C für 5 s, 60°C für 4 min). Die Reaktion wurde auf 50µl aufgefüllt und nach Zusatz von 5µl 3M Natriumacetat sowie 130µl 100% Ethanol bei 4°C und 14.000rpm 30 Minuten

zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 250µl 70%-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und bis zur Auftrennung der Produkte bei -20°C gelagert.

2.2.6 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

500mL LB-Medium wurden mit 5ml einer Vorkultur des *E. coli* TOP10F-Stammes angeimpft und bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer OD von 0,3−0,6 angezogen. Anschließend wurden die Zellen für 15 Minuten auf Eis gekühlt und bei 4°C und 5000rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50ml eiskaltem TSB resuspendiert und weitere 10−15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden in vorgekühlte 1,5mL Reaktionsgefäße aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Zur Transformation der Ligationsansätze in die kompetenten Zellen wurden die Ansätze zunächst bei 65°C für 10 Minuten gelagert. Die Bakterien (BL-21 Stamm, Stratagene) wurden parallel nach Herstellerangaben auf Eis aufgetaut und pro Ansatz 100µl kompetente Zellen zu 2µl der 1:10 vorverdünnten X-10-Gold ß-mercaptoethanol-Lösung (Stratagene) und 1-50ng Plasmid-DNA gegeben. Als Kontrolle wurde mit 1µl der mitgelieferten pUC18 Kontroll-Plasmid DNA wie oben beschrieben verfahren. Nach dreißigminütiger Inkubation auf Eis und Hitzeschock wurden die Ansätze mit 0,9ml auf 42°C vorgeheiztem SOC-Medium versetzt und bei 37°C für 1 Stunde bei 225-250rpm geschüttelt. Zu dem Ansatz wurde dann 1 ml vorgewärmtes LB-Medium ohne Zusätze zugegeben und für weitere 2h bei 37°C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.7 RNA Isolation aus Mausgehirnen

Die cerebrale RNA der Gehirnlysate wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Eluiert wurde die RNA mit 30−40 µl nukleasefreiem Wasser.

2.2.8 Reverse Transkriptase quantitative *real-time* Polymerase Ketten Reaktion (RT-qPCR)

Für die relative Quantifizierung der mRNA wurde eine reverse Transkription mit anschließender quantitativer *real-time* PCR durchgeführt. Die isolierte RNA von Wildtyp- und *Fmr1-/-* - Gehirnlysaten wurden als Duplikat-Ansätze in gleichen Volumina in einer RT-qPCR mit dem *QuantiTectTM SYBR Green RT-PCT Kit*®(Qiagen) nach Herstellerangaben (Tabelle 2.4) eingesetzt. Durchgeführt wurden die RT-qPCRs mit dem Rotor-Gene 3000 *Cycler* (Corbett).

Ausgewertet wurden die Ergebnisse mit der RotorGene 6 Software. Während der PCR wird der Fluoreszenzanstieg des *SYBR Green* Anteiles, der bei jedem PCR-Zyklus in das neusynthetisierte DNA-Produkt eingebaut wird, gemessen. Für jede der entstandenen Produktkurven wurde der ct-Wert (= *Cycle Threshold*; Zyklus des jeweiligen PCR-Ansatzes, an dem sich die Fluoreszenzkurve im exponentiellen Bereich mit dem über die Hintergrundfluoreszenz gesetzte Schwellenwert schneidet) ermittelt. Die ct-Werte der KIF3c- und der KIF5c-mRNPs wurden jeweils zu den ct-Werten der Negativkontrolle (GST) ins Verhältnis gesetzt und der Δct-Wert ermittelt.

PCR-Ansatz		**Schritt**	**Temperatur**	**Zeit**
RNA	1-100ng	Reverse Transkription	50°C	30min
SYBR Green MasterMix Quiagen®	10µl	Initiale Denaturierung	95°C	15min
RT-Mix	0,2µl	Denaturierung *	95°C	15sec
Fw-Primer 10mM	1µl	*Primer*-Anlagerung *	56°C-58°C	30sec
Rev-Primer 10mM	1µl	Verlängerung *	72°C	30sec
H_2O	ad 20µl	Schmelzkurvenbestimmung	72°C-95°C	5sec pro °C

Tabelle 2.4: Ansatz und Bedingungen für RT *real-time*-qPCR * 40 Zyklen

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Expression, Aufreinigung und Kopplung von GST-Fusionsproteinen an Glutathion Sepharose

Die für die C-terminale Cargo-Bindedomäme von KIF5c (AS 826-920; NM_008449) kodierende cDNA-Sequenz sowie das entsprechende Fragment von KIF3c (AS 689-796; NM_008445) wurden in den Vektor pGEX4T2 (GE Biotech) kloniert. Die resultierenden Plasmide wurden in BL21-Zellen transformiert (Methode 2.2.6).

Für die Aufreinigung der Fusionsproteine wurde eine 10ml Vorkultur mit Luria Bertoni (LB)-Medium (LB-Medium +100µg/ml Ampicillin, 37°C, über Nacht) hergestellt. Am folgenden Tag wurde damit eine 200ml Kultur angeimpft (TB-Medium + TB-Salz + 100µg/ml Ampicillin). Diese wurde bis zu einer OD_{600} von 1,4 bei 37°C gezüchtet.

Nachdem 100µl (P1) als Negativkontrolle abgenommen wurden, erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von 1mM Isopropyl-ß-D-thiogalactopyranosid (IPTG) für 24 Stunden bei 16°C. Zur Überprüfung einer erfolgreichen Induktion wurden erneut 100µl (P2) abgenommen. Die Kultur wurde dann zentrifugiert (5.000rpm, GSA Sorvall A6.14, 15 min bei 4°C). Das Pellet wurde in 20ml kaltem STE (150mM NaCl; 10mM Tris pH 8; 5mM EDTA) unter Zusatz von Protease-Inhibitoren (10µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin, 100 µM PMSF, 100µg/ml Bacitracin) aufgenommen, nochmals zentrifugiert und wieder in 20ml STE (inkl. der oben genannten Protease-Inhibitoren) resuspendiert. Nach Zugabe von 200µl Lysozym (10mg/ml) wurde 20 Minuten auf Eis inkubiert. Die lysierten Bakterien wurden sodann 5 x 5sec. mit Ultraschall-Pulsen behandelt. Danach wurde die Lösung mit 2ml Triton X-100 (1% in PBS) versetzt, erneut 20 Minuten auf Eis inkubiert und zentrifugiert (16.000rpm, Corex Sorvall A8.24, 25min, 4°C). Hiernach erfolgte die dritte Probenentnahme von 100µl (P3) des zentrifugierten Probenüberstandes. Für die weitere Aufreinigung der GST-Fusionsproteine wurden die Lysate an Glutathion-Sepharose 2ml (vorher 2x mit STE waschen, 500g, 3 Minuten) gekoppelt und über Nacht bei 4°C auf dem Rotator inkubiert. 100µl des Überstandes wurden als vierte Probe (P4) konserviert. Die Sepharose konnte nach 3-5 Waschschritten (mit je 10ml STE, 500g, 5 min) bei 4°C bis zum Einsatz in

Präzipitationsexperimenten gelagert werden. Zur Bestimmung der Proteinkonzetration von KIF3c-GST-Sepharose, KIF5c-GST-Sepharose und GST-Sepharose mittels Bradford-Test wurde die Fusionsprotein-Glutathion-Sepharosen mit 0,5ml Elutionspuffer (P5, 100µl) zum Lösen der Proteine von der Glutation-Sepharose eluiert.
Die Aufreinigung der Proteine wurde in einer 12% SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung überprüft. Hierzu wurde das Gel zunächst 20 Minuten in Coomassie-Lösung gefärbt und dann mit Entfärber-Lösung gewaschen.

2.3.2 Aufreinigung von Proteinen und RNA aus Mausgehirnlysaten

Für die Aufreinigung der mRNP-Komplexe aus den Mausgehirnlysaten wurde der gesamte Arbeitsplatz sowie hitzeempfindliche Materialien mit einem RNA-inaktivierenden Reiniger (Qiagen) gesäubert. Alle verwendeten Gegenstände wurden doppelt autoklaviert und gesondert gelagert. Es wurden nur gestopfte RNase-freie Pipettierspitzen, RNase-freie Lösungen und 0,1% DEPC-Wasser (2x autoklaviert) verwendet. Für alle Fusionsproteine wurden getrennte RNase-freie Gefäße verwendet.
Für die Aufreinigung von Proteinen und assoziierten RNA-Molekülen (RNA-Ko-Immunpräzipitation, IP) wurden pro Fusionsprotein jeweils drei WT- und *Fmr1-/-* Mausgehirne unter sterilen Kautelen präpariert und pro Gehirn mit 4ml IMAC-Puffer unter Zusatz von Protease-, RNase-Inhibitoren und 1% Triton X-100 mit dem Glas-Potter homogenisiert und bei 1.000g 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, während das Pellet noch einmal mit 4-6ml resuspendiert und erneut bei 1.000g für 10 Minuten zentrifugiert wurde. Beide Überstände wurden vereinigt und für 10 Minuten bei 10.000g (S34 Sorvall A6.14, 4°C) zentrifugiert.
Dieser Überstand wurde, um unspezifischen Bindungen vorzubeugen, mit der zuvor gewaschenen Glutathion-Sepharose (100µl) für 30 Minuten vorgereinigt und erneut für 2 Minuten (500g, 4°C) zentrifugiert. 450µl des Überstandes wurden als *Input*-Probe der Sepharose entnommen. Die *Input*-Probe wurde auf 100µl für die Proteinanalysen und 350µl für die RNA-Analysen aufgeteilt und auf Eis kühl gestellt. Der Überstand der vorgereinigten Lysate wurde sodann auf die an KIF3c-, KIF5c- und GST-Fusionsprotein gekoppelte

Glutathion-Sepharose gegeben und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Sepharose je 6x gewaschen (1ml IMAC-Puffer, jeweils gefolgt von Zentrifugation, 500g, 2 Minuten, 4°C) und das Pellet mit 500µl 0,5 M NaCl-Lösung eluiert. Hiervon wurden dem Eluat je 160µl-Proben für die Proteinanalyse entnommen und mit 40µl 5x Laemmli-Puffer versetzt. Der *Input*-Proteinprobe wurden 20µl Lämmli-Puffer hinzu gefügt und alle Proben für die Proteinanalysen wurden bei -20°C für die darauf folgenden *Western-Blot* Analysen gelagert. Die restlichen 340µl und die *Input*-RNA Proben wurden mit Hilfe des RNeasy Mini Kits® (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt (2.2.7).

2.3.3 Quantifizierung von Proteinen, Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Konzentrationsbestimmungen für die einzusetzenden Verhältnisse der Fusionsproteine wurden nach Bradford (1976) durchgeführt. Als Vergleich diente eine BSA-Standardreihe von 0,5-8µg/20µl Wasser. Die Probe selbst wurde ebenfalls in 20µl Wasser verdünnt und wie der Standard mit 80µl Bradford-Reagenz (Sigma-Aldrich) versetzt. Nach 10 Minuten erfolgte die Extinktionsmessung bei 620nm im *ELISA-Reader* (Titertek Multiscan Plus, Flow Laboratories) und die Auswertung anhand der Standardkurve im Programm Excel (Microsoft 2007). Die SDS-PAGE dient zur Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts. Die Gele wurden im *Mini-Protean II oder III* – System (Biorad) gegossen, wobei die Trenngele 8-12% Polyacrylamid (Sambrook et al. 1989) enthielten. Die Proben wurden mit 5x Laemmli-Puffer versetzt, bei 95°C für 5 Minuten denaturiert und bei einer Spannung von 120-180 Volt im Gel aufgetrennt. Als Marker dienten der *Protein Ladder* (Fermentas) bzw. der *Precision Plus Protein Standard* (Biorad).

2.3.4 Proteinnachweis im Western Blot

Die in der SDS-Page aufgetrennten Proteine können zum Nachweis mit spezifischen Antikörpern im Western Blot auf Nitrocellulose-Membranen (Protan, Schleicher und Schuell) transferiert werden. Hierzu wurden Gele, Membranen und *Whatman*-Papiere (Schleicher

und Schuell) kurz im Transfer-Puffer äquilibriert und nach Herstellerangaben zusammengesetzt (*Mini-Trans-Blot* Apparatur, *Wet Blot*, Biorad). Der Transfer erfolgte dann bei 100 Volt im Transfer-Puffer für eine Stunde. Danach wurde die Membran in 5% Milchpulver (Töpfer) in TBS-T für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C geblockt, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Die Inkubation mit dem Primär-Antikörper erfolgte ebenfalls in dieser Blockierungs-Lösung für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C.

Danach wurde die Membran mindestens dreimal mit TBS-T gewaschen (je 5-15 min) und für eine Stunde mit dem HRP-gekoppelten (*Horse Radish Peroxidase)* Sekundär-Antikörper in TBS-T inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T konnte der Western Blot dann mit Hilfe des ECL-Reagenz (*Enhanced Chemiluminescence,* Amersham) nach Herstellerangaben entwickelt werden, wobei die Detektion durch Belichtung von Röntgenfilmen erfolgte (*Cronex5 Medical X-Ray*, Agfa).

Die densitometrische Auswertung der Signale erfolgte mit dem Programm ImageJ. Die Intensität der zu vergleichenden Signale von WT- und *Fmr1*-/- Fraktionen für KIF3c und KIF5c wurden dokumentiert. Die GST-Bande diente als Ladekontrolle sowie Normalisierungsfaktor und wurde entsprechend mit gemessen. Die gemessenen Proteinwerte für WT-Input, KO-Input, WT-KIF5c, KO-KIF5c sowie WT-KIF3c und KO-KIF3c (WT=Wildtyp, KO=*knockout*) wurden jeweils durch den Proteinwert von GST dividiert und somit normalisiert. Dann wurden die Werte auf den WT-Input und KO-Input bezogen dargestellt.

2.3.5 Optimierung der Aufreinigung und Präzipitation von mRNP-Komplexen aus Mausgehirnlysaten

Es wurden vier unterschiedliche Verfahren für die Homogenisierung der Mausgehirne im direkten Test verglichen (n=1). Verwendet wurden jeweils 4 Mausgehirne von männlichen Tieren der Linie C57bl/6J. Der Versuch wurde mit den aufgereinigten Fusionsproteinen für KIF5c und GST durchgeführt. Alle Gehirne wurden auf dieselbe Art unter sterilen und RNase-freien Kautelen entnommen, mit 4ml IMAC-Puffer/Gehirn ergänzt und auf vier unterschiedliche Arten homogenisiert:

1. manuelle Homogenisierung der Mausgehirne mit Hilfe des Glas-Potter-Homogenisators (Abbildung 2.1),
2. wie in 1. unter Zusatz von 1% Triton X-100,
3. mechanisch-maschinelle Homogenisierung durch einen motorgetriebenen Teflon/Glas-Potter,
4. mechanisch-maschinelle Homogenisierung durch einen Ultraturrax- (Abbildung 2.1).

Nun wurde mit allen Proben weiter wie in Methode 2.3.2 verfahren.

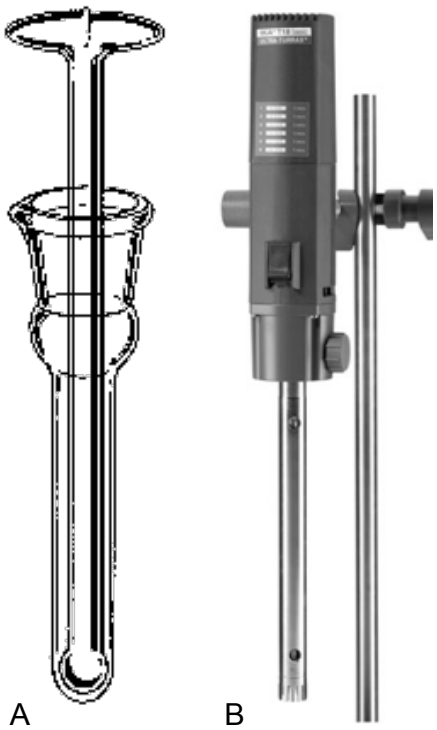


Abbildung 2.3.1: Gewebe-Homogenisatoren unterschiedlicher Arten, die für den Testvergleich verwendet wurden A) Herkömmlicher manuell betriebener Dounce Gewebe-Homogenisator aus Glas (Bellco®), entwickelt zur Homogenisierung der gesamten Zelle, ohne den Zellkern zu zerstören; B) der Ultra-Turrax zerkleinert Gewebe in einer Suspension durch ein rotierendes Messer (IKA®)

3. Ergebnisse

Kanai und Mitarbeiter publizierten eine Technik für die Aufreinigung von dendritisch lokalisierten mRNP-Komplexen (Kanai *et al.* 2004). Diese können mit der an GST fusionierten Cargobindedomäne von KIF5c präzipitiert werden. In dieser Arbeit ging es zunächst darum, die bestehende Präzipitationstechnik zu verbessern und analog zu dem KIF5c/GST-Fusionsprotein ein an Glutathion-Sepharose gebundenes KIF3c/GST-Fusionsprotein herzustellen (Davidovic *et al.* 2007) und beide Fusionsproteine für den Vergleich der durch KIF3c- oder KIF5c mRNPs in Wildtyp- und *knockout* Individuen einzusetzen.

3.1 Herstellung der Fusionsproteine

Die Aufreinigung von mRNP-Komplexen aus Gehirnlysaten erfolgte durch die Bindung der mRNP-Komplexe an die Glutathion-Sepharose gekoppelten KIF5c/GST- und KIF3c/GST-Fusionsproteine. Nicht fusioniertes an Glutathion-Sepharose gekoppeltes GST diente als Negativkontrolle. Für die Herstellung der Fusionsproteine wurden jeweils die kodierende Sequenzen für die C-terminale Cargo-Bindedomäne (AS 826-920 bei KIF5c, NM_008449 und AS 689-796 bei KIF3c, NM_008445) in den Vektor pGEX4T2 kloniert und dann in BL21-Zellen (E. coli Stamm) transformiert. Nach Kultivierung und Induktion der Expression wurden die Fusionsproteine durch Bindung an die Glutathion Sepharose aufgereinigt. Ebenso wurde mit dem reinem GST (ohne eine spezifische Cargo-Bindedomäne) verfahren. Das 12%ige SDS-Gel mit anschließender Coomassie Färbung zeigt die Banden der hergestellten Fusionsproteine (Abb. 3.1.a). Da die an Sepharose gekoppelten Mengen der Fusionsproteine stark variierten (mutmaßlich aufgrund unterschiedlich stark ausgeprägter Bindungsaffinität des Fusionsproteins an die Sepharose) wurde mithilfe des *Bradford-Assays* die einzusetzenden Verhältnisse ermittelt. Nach Elution wurden die Fusionsproteine erneut in dem neu ermittelten Verhältnis von 1:4,5 (KIF5c:KIF3c) an die Gluthationsepharose gebunden (Abb. 3.1.b). Versuche mit Gehirnlysaten adulter Wildtyp-Mäuse bestätigten, dass nun eine Präzipitation in gleicher Menge erreicht werden konnte. Die Negativkontrolle (Glutathion-Sepharose mit GST) zeigt keine Präzipitate (Abb. 3.1.c).

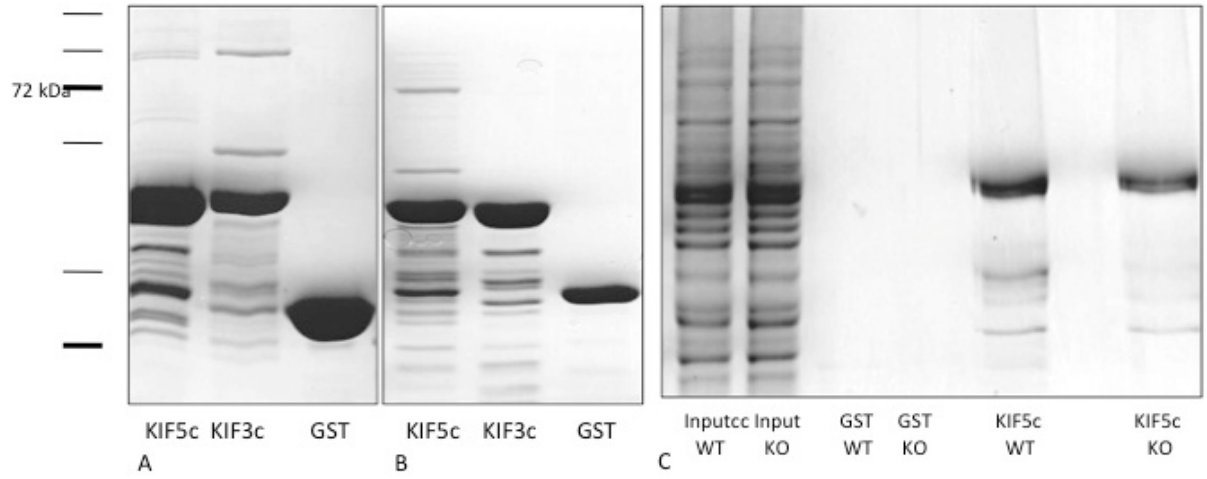


Abb. 3.1.1: SDS-Page der aufgereinigten Fusionsproteine KIF3c, KIF5c und GST A) eingesetzt in gleichen Mengen, B) eingesetzt im Verhältnis 4,5:1 sowie C) die Darstellung der Gesamtproteinpräzipitation nach Bindung an die Fusionsprotein (Abb. in schwarz-weiß dargestellt, Original Coomassie-blau gefärbt).

3.2 Methodenoptimierung der Protein- und mRNA Präzipitation

Ein Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob additive Verfahren zur Homogenisierung der Mausgehirne und Lösung der mRNP-Komplexe aus ihren Verbindungen geeigneter seien, als die vorbeschriebenen (Kanai *et al.* 2004, Davidovic *et al.* 2007).

Insgesamt wurden vier unterschiedliche Verfahren getestet: die manuelle Homogenisierung der Mausgehirne durch den Glas-Potter-Homogenisator (Davidovic *et al*. 2007), das Verfahren unter Zusatz von 1% Triton X-100, die mechanisch-maschinelle Homogenisierung durch einen motorgetriebenen Teflon/Glas-Potter und die mechanische Homogenisierung durch einen Ultra-Turrax. Hier zeigte sich, dass durch die Zugabe von 1% Triton X-100 in den RNase-freien IMAC-Puffer höhere Mengen an Proteinen im Vergleich zu den anderen drei Verfahren präzipitiert werden konnte. Exemplarisch wurden drei verschiedene bereits bekannte Komponenten der KIF5c mRNPs (Ddx-1, Fmrp und Pur-α sowie Tubulin) untersucht (Abbildung 3.2.1).

Triton X-100 (Alkylphenylpolyethylenglykol) ist ein nichtionisches Tensid und könnte in dem beschriebenen Versuch helfen, die Löslichkeit der bereits mechanisch zerkleinerten Gehirne zu verbessern. Denkbar wäre, dass so die an Glutathion-Sepharose gekoppelten GST/KIF-

Fusionsproteine im weiteren Versuchsablauf besser an die gelösten mRNP-Komplexe binden können. Für alle weiteren Versuche wurde somit die dieser Arbeit zugrunde liegende verbesserte Methode unter Zusatz von Triton X-100 verwendet.

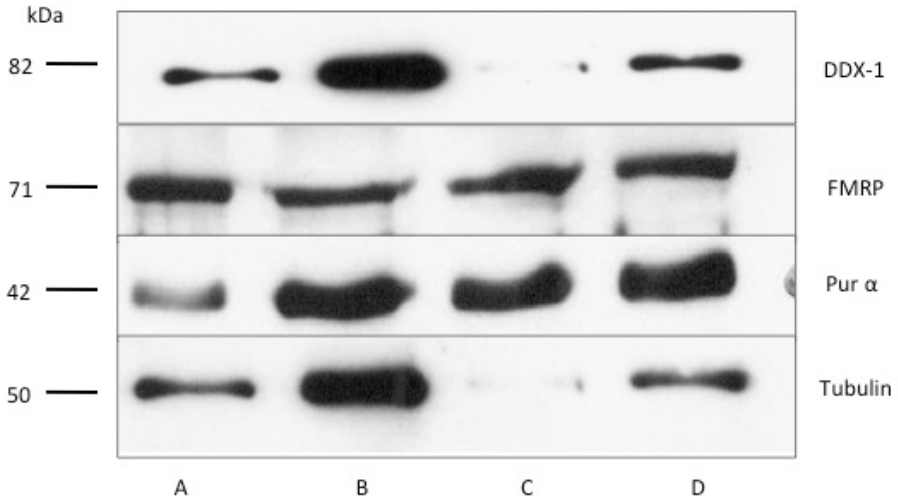


Abbildung 3.2.1: Western-Blot der KIF5C mRNPs zur Methodenoptimierung: Die Homogenisierung erfolgte A) mittels Glaspotter; B) mittels Glaspotter in Anwesenheit von 1% Triton X-100; C) mittels motorgetriebenen Teflon/Glas-Potter; D) mittels Ultra-Turrax-Homogenisator. Besonders deutlich ist der Intensitätsunterschied der Banden bei DDX-1 und Tubulin in der Spalte B zu erkennen.

3.3 Quantitative Untersuchung der mRNP-Komplexe aus Gehirnen der Wildtyp- und FMRP-*Knockout* Maus

Hauptfragestellung dieser Arbeit war jedoch, inwieweit das RNA-bindende Protein Fmrp in murinen *in vivo* Analysen die Protein- und mRNA-Zusammensetzung der mRNP-Komplexe im Cerebrum beeinflusst.

Für die Experimente wurde eine *Fmr1*-/- Mauslinie (*knockout*) mit genetischem C57bl/6J Hintergrund als FRAX Modell verwendet. Dementsprechend wurden Wildtyp-Tiere dieser Linie zum Vergleich eingesetzt. Die verwendeten Tiere stammen alle aus der Zucht der Tierhaltung des Universitätskrankenhauses Hamburg Eppendorf und wurden für die

Versuche freundlicherweise aus der Arbeitsgruppe PD Dr. rer. nat. S. Kindler (Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf) zur Verfügung gestellt.

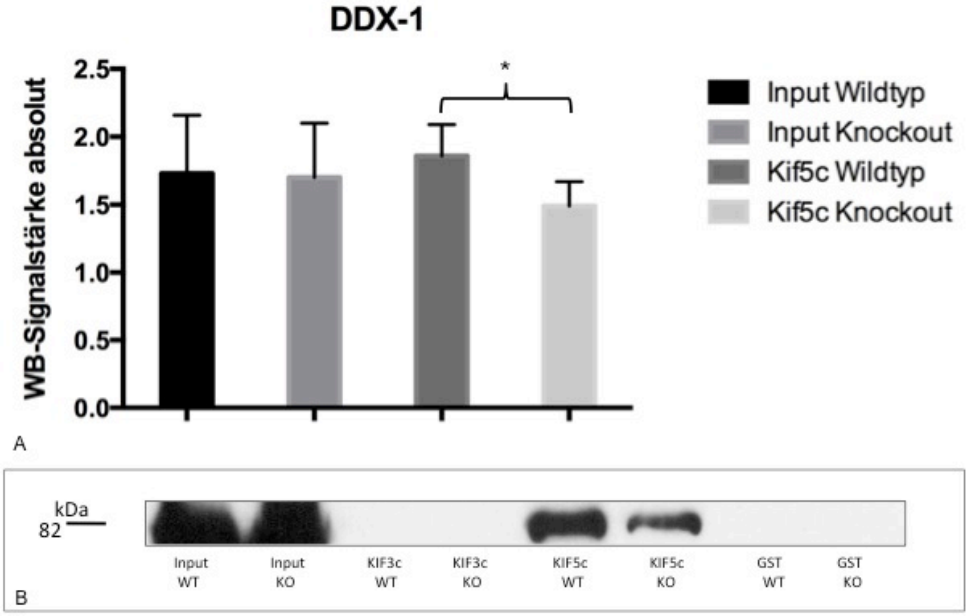
3.3.1 Quantitative Analyse adulter Mausgehirnlysate auf Proteinebene mittels Western Blot

Pro Versuchsreihe (n=3) wurden je 3 Gehirne pro Fusionsprotein und Wildtyp- bzw. *knockout*-Fraktion (insgesamt 18 Gehirne) adulter Wildtyp und *Fmr1y*/- bzw. *Fmr1-/-* Mäuse unter sterilen und RNase-freien Bedingungen entnommen. Aufgrund von eventuellen zyklischen Hormoneinflüssen wurden hauptsächlich männliche Individuen (*Fmr1y*/-) verwendet. Bei Verwendung von weiblichen Individuen, was meist durch die Verfügbarkeit der *knockout*-Tiere begründet war, wurden die Tiere nach Geschlecht und Alter gepaart verwendet. Die Isolation der mRNP-Komplexe erfolgte nach Methode 2.3.2. Die Versuche (n=3) wurden jedes Mal für alle drei Fusionsproteine (KIF3c, KIF5c und GST) der Wildtyp- und *Fmr1-*/- Fraktion parallel durchgeführt.
In der Veröffentlichung von Kanai und Mitarbeitern wurden 42 Proteine und mRNAs aus den etwa 1000s großen KIF5-mRNPs isoliert. 17 Proteine wurden genauer bezüglich ihrer Proteininteraktion, Transports und ihrer RNA-Interaktion untersucht. Hierunter fanden sich folgende Proteine: hnRNP-U, Purα und β, PSF, DDX1, DDX3, SYNCRIP, TLS,NonO, HSPC117, ALY, CGOI-99, Staufen, FMRP und EF-1α. Die Auswahl der in dieser Arbeit untersuchten Proteine wurde maßgeblich von den bisher bekannten Proteinen in den KIF5c-mRNP-Komplexen, möglichen Fmrp-Interaktoren (Kanai *et al.* 2004) oder bereits im Labor vorhandenen Primern für die *Western-Blot* Analysen beeinflusst.

Das humane Protein DDX1 = DBP-RB (*dead box protein retinoblastoma*) gehört zur Familie der DEAD box Proteine (Asp (D)-Glu(E)-Ala(A)-Asp(D)) und ist eine RNA-Helikase, die mit der RNA-Reifung und dem RNA-Transport in Verbindung gebracht wird (Bleoo *et al.* 2001, Kanai *et al.* 2004). Insgesamt sind mehr als 40 DEAD-box Proteine bekannt (Linder 2006). Der Vergleich zwischen der absoluten Proteinmenge in mRNA-Vesikeln unterschiedlicher

Transportmotorproteine im FRAX-Mausmodell wurde vor der Durchführung dieser Arbeit bislang noch nicht veröffentlicht.

Das herausragenste Ergebnis auf Proteinebene war, dass 25% mehr Ddx1 in KIF5c-mRNPs der Wildtyp-Fraktion als in KIF5c-mRNPs der *Fmr1* -/- Fraktion vorliegt (n=3; $1{,}86_{KIF5cWT}$ vs. $1{,}49_{KIF5cKO}$; p= 0,02675), wobei die Menge an Ddx1 im *Input* in WT- und *Fmr1-/-* Fraktion gleich ist. Im *Western-Blot* zeigt sich, dass in den KIF3c-mRNPs gar kein Ddx1 nachgewiesen werden konnte, weshalb für diese Fraktionen keine Messung möglich war (Abb. 3.3.1.c). Die Berechnungen für die Signifikanzniveaus wurden anhand der Originaldaten erstellt. Für die Darstellung im Balkendiagramm wurden die absoluten Werte (Abb. 3.3.1.c) in Relation zur *Input*-WT- und *Input*-KO Fraktion gesetzt (Abb. 3.3.1.a). Sowohl der *Western-Blot*, als auch die absoluten Daten zeigen den signifikanten Unterschied zwischen der KIF5c-WT und KIF5c-KO Fraktion, während sich die Menge an Ddx1 im Gesamthirnlysat (*Input*-WT und *Input*-KO) nicht unterscheiden (Abb. 3.3.1.a-c). Die Menge an Ddx1 in KIF5c-WT mRNPs übersteigt sogar die Menge des im *Input* vorhandenen Ddx1, was für einen spezifischen Transport von Ddx1 in KIF5c mRNPs sprechen könnte. Alle weiteren untersuchten Proteine zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den WT- und KO Fraktionen, was die o.g. Ergebnisse und die gesamte Methode zusätzlich validiert.



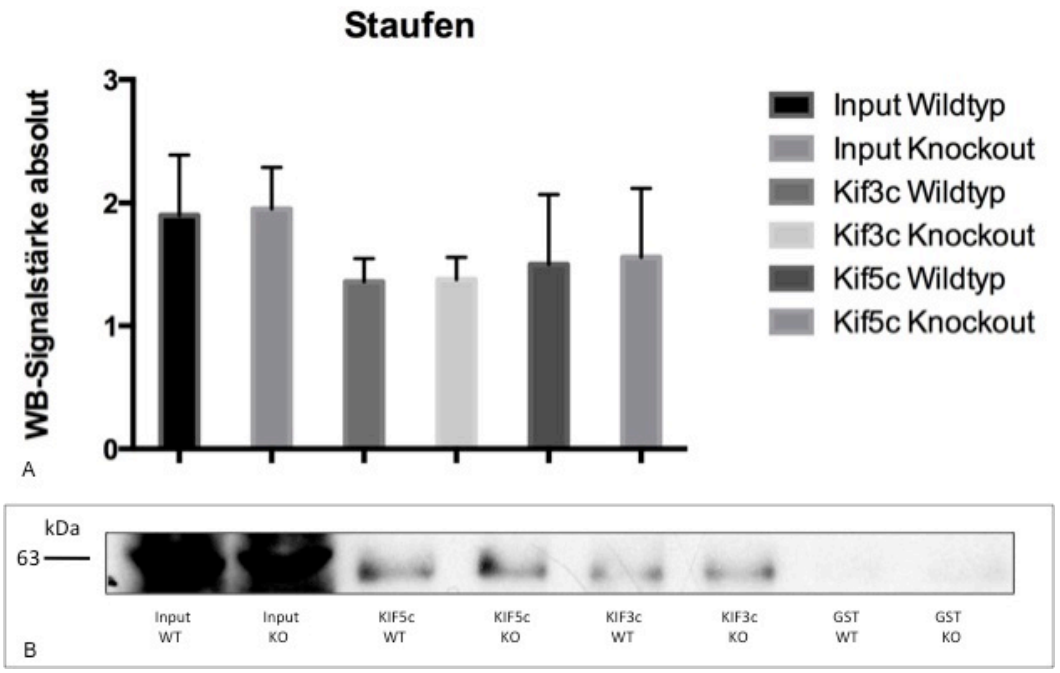
	Input WT	Input KO	KIF3c WT	KIF3c KO	KIF5c WT	KIF5c KO
DDX-1 A	1,39	1,34	n.m.	n.m.	1,92	1,45
DDX-1 B	1,59	1,64	n.m.	n.m.	2,05	1,69
DDX-1 C	2,21	2,14	n.m.	n.m.	1,6	1,34
Mittelwert	1,73	1,71	n.m.	n.m.	1,86	1,49
Standartabw.	0,44	0,35	n.m.	n.m.	0,32	0,25
p-Wert	**p= 0,59382**		n.m.		**p= 0,02675**	

C

Abbildung 3.3.1: Proteinanalyse von Ddx-1: A) Darstellung der densitometrischen Ergebnisse von Ddx-1 (n=3) im Balkendiagramm. Dargestellt sind zum Vergleich auch die Messungen der Gesamthirnlysate (*Input*); die Menge an Ddx1 Protein ist in KIF5c-Wildtyp-mRNPs im Vergleich zu KIF5c-*knockout*-mRNPs signifikant (p=0,02675) erhöht. B) Ddx1 im *Western-Blot*; auch hier erkennt man den Unterschied von Ddx1 Protein in KIF5c-WT mRNPs und KIF5c-KO mRNPs. C) die Tabelle zeigt die absolut in ImageJ gemessenen Werte, normalisiert durch die Negativkontrolle der GST-Sepharose n= 3 mit Mittelwert, Standardabweichung und Signifikanzniveau (ermittel nach dem *paired student´s t-test*, * = p < 0,05)

Staufen1 ist wie FMRP ein in KIF5c mRNPs lokalisiertes RNA-bindendes Protein. Es spielt eine wichtige Rolle im dendritischen Transport der CaMKIIα-mRNA (Kanai *et al.* 2004) und besitzt vier konservierte *double-stranded RNA binding domains* (dsRBDs) sowie eine Mikrotubuli-Bindedomäne (TBD) mit der es sich und weitere in den mRNPs enthaltene Bestandteile an die Kinesinmotorproteine binden kann. Bislang war lediglich bekannt, dass Staufen1 mit KIF5c-mRNPs assoziiert ist (Kanai *et al.* 2004). In diesen Versuchen konnte jedoch auch

dargestellt werden, dass Staufen1 sowohl mit KIF5c-mRNPs als auch mit KIF3c-mRNPs assoziiert ist (Abb. 3.3.2 a-c). Die Analysen der *Western-Blots* wurden Analog zu Ddx1 durchgeführt. Der gemessene Unterschied in den einzelnen Fraktionen war allerdings nicht signifikant.

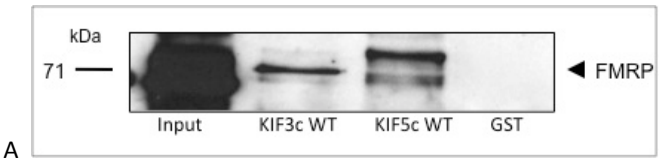


	Input WT	Input KO	KIF3c WT	KIF3c KO	KIF5c WT	KIF5c KO
Staufen1 A	1,34	1,57	1,36	1,37	1,05	1,17
Staufen1 B	2,1	2,05	1,56	1,56	2,15	2,21
Staufen1 C	2,26	2,23	1,17	1,2	1,31	1,3
Mittelwert	1,9	1,95	1,36	1,38	1,50	1,56
Standartabw.	0,49	0,34	0,27	0,22	0,47	0,51
p-Wert	**p= 0,63501**		**p= 0,29986**		**p= 0,43805**	

C

Abbildung 3.3.2: Ergebnisse der Proteinanalysen von Staufen1: A) Darstellung der densidometrischen Ergebnisse von Staufen1 (n=3) am Balkendiagramm; mutmaßlich wird mehr Staufen1 in KIF5c mRNPs als in KIF3c mRNPs transportiert, dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant. B) Darstellung von Staufen1 im *Western-Blot*: zu sehen sind die unterschiedlich starken Bandenintensitäten inkl. der Negativkontrolle GST. C) die Tabelle zeigt die absolut in ImageJ gemessenen Werte (durch GST normalisiert) n= 3 mit Mittelwert, Standardabweichung und Signifikanzniveau (ermittel nach dem *paired student´s t-test*) für Staufen1.

Fmrp selbst konnte sowohl in den WT-Gesamthirnlysaten (*Input*) als auch in der WT-KIF5c-mRNP Fraktion detektiert werden (Abb. 3.3.3). Wie erwartet wurde in den *Fmr1*-/- - und GST-Proben (Negativkontrolle) kein Fmrp nachgewiesen. Veröffentlicht ist, dass Fmrp neben der Assoziation mit KIF5c-mRNPs (Kanai *et al.* 2004) auch mit KIF3c-mRNPs assoziiert sei (Davidovic *et al.* 2007). Dies bot die Grundlage für Vergleiche genau dieser beiden Kinesin-Motorproteine. Es gelang zwar analog zu den Daten von Davidovic ein KIF3c-Fustionsprotein herzustellen und die Methode sogar zu verbessern, allerdings konnte in nur einem Versuch (n = 3) eine Assoziation zwischen Fmrp und dem hergestellten KIF3c-Fusionsproteinen nachgewiesen werden (Abb. 3.3.3).



A

B

Abbildung 3.3.3: A) *Western-Blot* von Fmrp: in einem Versuch (n=3) konnte Fmrp auch in WT-KIF3c mRNPs präzipitiert werden, hier allerdings auch nur eine der für FMRP typischen drei Banden im *Wester-Blot*.
B) *Western-Blot* von Fmrp für alle untersuchten Fraktionen: Detektion des Proteins in der WT-Input – und der WT-KIF5c Fraktion. Weder die KIF5c-*Fmr1*-/- (KO) noch die Fraktionen für KIF3c oder GST zeigen eine Präzipitation von Fmrp.

Für folgende weitere Proteine wurde die mögliche Assoziation mit KIF5c- und KIF3c mRNPs und der Einfluss des fehlenden Fmrp auf den Transport untersucht: PABP, hnRNP-K, Pur-α, S6-Protein und Grip.

Das zytoplasmatische Poly-A-Bindeprotein (PABP) ist in *Drosophila* mit FMRP assoziiert und mutmaßlich auch Bestandteil somatodendritisch lokalisierter mRNPs (Cziko *et al.* 2009). Es ist als direkter Interaktionspartner der für das Gerüstprotein der PSD kodierenden Shank1 3´UTR mRNA beschrieben (Iglauer, Dissertation 2005) und wie Fmrp ebenfalls mit translatierenden Polyribosomen assoziiert (Mohr und Richter 2004).
Die Versuche zeigen keine Assoziation von PABP und KIF3c-mRNPs, während erstmals der Nachweis von PABP gleichermaßen in KIF5c-WT – und KIF5c *Fmr1*-/- mRNPs gelang (Abb. 3.3.4). Die Menge an PABP zeigte in den jeweiligen Fraktionen keine signifikanten Unterschiede, daher wurde auf eine densitometrische Auswertung von PABP verzichtet.

Auch das poly-C-bindende Protein hnRNP-K (*heterogenous nuclear ribonucleoprotein K*) bindet RNA über seine hnRNP-K-*Homology*–Domänen (KH) und erfüllt vielfältige Aufgaben: hnRNP-K beeinflusst, ähnlich wie Fmrp, den Export, den Transport, die Stabilität und die Translation spezifischer mRNAs (Bomsztyk *et al.* 2004). Die meisten mRNAs werden trotz fehlendem Fmrp normal reguliert und translatiert. Da Kanai und Mitarbeiter bereits die Assoziation von KIF5c-mRNPs und hnRNP-U (*heterogenous nuclear ribonucleoprotein* U) publizierten, wurde nun das hnRNP-K analysiert.
Außer im Gesamthirnlysat (*Input*) konnte hnRNP-K jedoch weder in KIF3c- noch in KIF5c Wildtyp oder *Fmr1*-/- mRNPs nachgewien werden (Abb. 3.3.4).

Fmrp ist neben seinen homologen Proteinen FXR1 und FXR2 mit RNA-bindenden Proteinen wie z.B. Pur-α und Staufen1 assoziiert, die wiederum die Funktion von Fmrp modulieren können (Bardoni *et al.* 1999, Ohashi *et al.* 2002). Die Familie der *purine-rich binding proteins* (Pur-α, Pur-ß) kontrollieren unter anderem die Translation, DNA-Replikation und den RNA-Transport und werden neben Fmrp und Staufen1 in mRNP Komplexen transportiert (Gallia *et al.* 2000). Pur-α konnte sowohl in den KIF5c Wildtyp- als auch in den KIF5c *Fmr1*-/- mRNPs nachgewiesen werden. Es ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und *Fmr1*-/- Proben nachweisen. In den KIF3c mRNPs konnte Pur-α weder im WT noch im KO nachgewiesen werden (Abb. 3.3.4). Schlussfolgernd scheint Pur-α nicht mit KIF3c-mRNPs assoziiert zu sein.

Bekannt ist, dass das in seiner RGG-Domäne mutierte Fmrp (I304N) im Vergleich zu dem intakten Fmrp nicht mehr mit aktiv translatierenden Polyribosomen und ribosomalen Untereinheiten assoziiert ist (Khandjian *et al.* 2004, Siomi *et al.* 1993). Das S6-Protein bildet einen Bestandteil der mRNA-Bindungsstelle innerhalb der ribosomalen 40S-Untereinheit (Wool *et al.* 1996). Die Phosphorylierung des S6-Proteins scheint die Bindungsaffinität der Ribosomen für bestimmte mRNAs zu erhöhen und die Translationsinitiiation zu erleichtern (Narayanan *et al.* 2008). Bisher ist eine Assoziation des S6-Proteins mit KIF3c- oder KIF5c mRNPs nicht veröffentlicht. Ob also in den mRNPs bereits ribosomale Untereinheiten für die spätere Translation von vorhanden mRNAs mit transportiert werden ist unklar und deshalb wurde das S6-Protein mit in die Analysen einbezogen. Die Ergebnisse zeigen, dass das S6-Protein weder mit den KIF3c- noch mit den KIF5c mRNPs in Wildtyp- oder *Fmr1*-/- Fraktion assoziiert ist (Abb. 3.3.4).

Grip (GluR-*interacting protein*)/ABP, AMPA-*binding protein*) ist ein weiteres Gerüstprotein der postsynaptischen Dichte (Abb. 1.4) und bindet mit seiner fünften PDZ-Domäne (insgesamt 7 PDZ-Domänen) an den C-Terminus der GluR2- und GluR3-Untereinheit von tetrameren AMPA-Rezeptoren (Kim und Sheng 2004). Grip ist Teil der glutamatabhängigen Signalkaskade in der postsynaptischen Dichte. Analysen autistischer Patienten zeigen spezifische Mutationen in den PDZ-Domänen von Grip, die zu einer veränderten Interaktion mit den GluR2- und GluR3-Untereinheiten führten (Meijas et al. 2011). Allerdings zeigt sich Grip weder mit KIF3c – noch mit KIF5c-mRNPs assoziiert (Abb. 3.3.4). Auf weitere densitometrische Auswertungen wurde daher auch hier verzichtet.

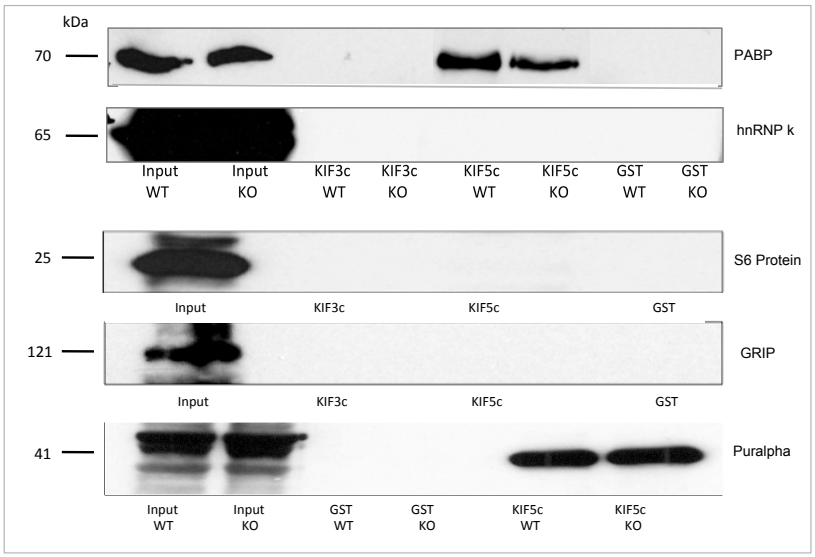
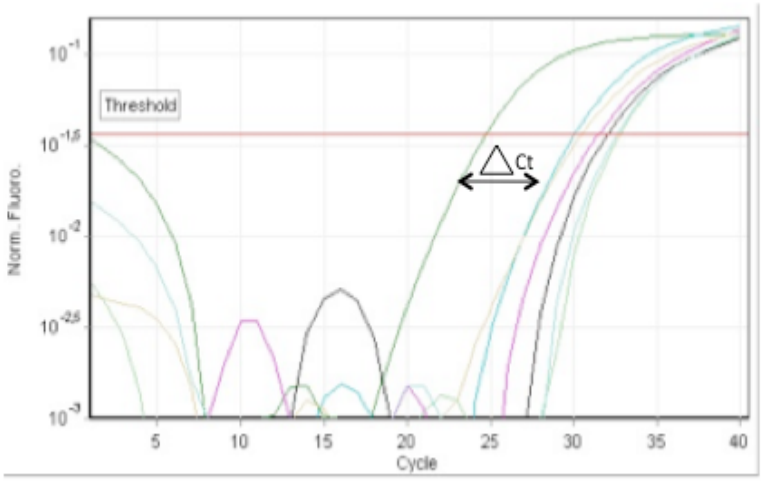


Abbildung 3.3.4: Western-Blots für PABP, hnRNP-K, S6 Protein, Grip und Pur-α: bisher war der Nachweis von Purα in KIF5c-mRNPs bekannt (Kanai *et al.* 2004), dies konnte bestätigt werden, in KIF3c mRNPs konnte Purα nicht nachgewiesen werden. Die Proteine hnRNPk, S6 und GRIP konnten in den Western-Blots nicht nachgewiesen werden und scheinen weder mit den KIF5c – noch mit den KIF3c-mRNPs assoziiert zu sein. Für PABP gelang der Nachweis in den KIF5c Wildtyp- und *knockout* mRNPs.

3.3.2 Quantitative Analyse verschiedener mRNAs aus KIF3c- und KIF5c mRNPs mittels *real time*-RT-PCR

Die nach Methode 2.3.2 isolierte RNA wurde einer sensitiven und exakt quantifizierbaren Untersuchungsmethode, der reversen Transkription mit folgender quantitativer *real-time* PCR (RT-qPCR), unterzogen. Von jeder Probe wurden parallel zwei Messungen durchgeführt. Die Fluoreszenzkurven (Abb. 3.3.5) zeigen die Entstehung des Produktes während der PCR an und für jedes Oligonukleotidpaar wurde der ct-Wert (*cycle threshold*) ermittelt. Der ct-Wert ist der Zyklus des jeweiligen PCR-Ansatzes, an dem sich die Fluoreszenzkurve im exponentiellen Bereich mit dem Schwellenwert, der über die unspezifische Fluoreszenz der ersten fünf bis zehn Zyklen gesetzt wird, schneidet.

Die ct-Werte der zu untersuchenden mRNAs aus den aufgereinigten KIF5c- und KIF3c-Fusionsproteinpräzipitaten wurden in Relation zu den ct-Werten von GST (Negativkontrolle) innerhalb eines Zyklus gesetzt. Als Positivkontrolle diente eine Probe des Gesamthirnlysats (*Input*). Die Differenz zwischen ct-GST und ct-KIF3c bzw. KIF5c ergab den Δct-Wert.



No.	Colour	Name	Type	Ct
9		Shank Input	NTC	24,66
10		Shank Kif3c	Unknown	31,47
11		Shank Kif3c	Unknown	31,99
12		Shank Kif5c	Unknown	30,06
13		Shank Kif5c	Unknown	30,45
14		Shank GST	Negative Control	32,68
15		Shank GST	Negative Control	32,55
16		Shank Wasser	Unknown	

Abbildung 3.3.5: Ergebnisdiagramm einer RT-qPCR für Shank1 mRNA: Die aus den Gehirnlysaten isolierten mRNAs wurden jeweils analysiert. Dabei wurde mit genspezifischen Oligonukleotiden eine bestimmte mRNA (hier das Shank1 Transkript) in den Ansätzen detektiert. Anhand des Abstandes der ct-Werte (Δct) zwischen den Kurven (Pfeil) kann der relative mRNA-Unterschied im Ausgangsmaterial errechnet werden.

Bekannt ist eine Assoziation der Shank1 mRNA mit KIF5c mRNPs (Darnell *et al.* 2011, Schütt *et al.* 2009). Nun sollte der Einfluss von Fmrp sowie zusätzlich eine eventuelle Assoziation der Shank1 mRNA mit KIF3c mRNPs untersucht werden.

In den WT-Proben lag der Δct-Wert der shank1-mRNA im Mittel für KIF5c bei 3,93 und für KIF3c bei 1,22; p=0,013 und in der *Fmr1*-/- Population für KIF5c bei 3,17 und für KIF3c bei 1,92; p=0,049. Somit scheint die Shank1-mRNA signifikant stärker mit KIF5c mRNPs als mit KIF3c mRNPs assoziiert zu sein. Der *Knockout* von Fmrp hat keinen Einfluss auf die jeweiligen Assoziationen (Abb. 3.3.6 A); (veröffentlicht in Falley et al., 2009). Ebenso konnte erstmals nachgewiesen werden, dass die Shank1 mRNA ebenfalls mit KIF3c mRNPs assoziiert zu sein scheint.

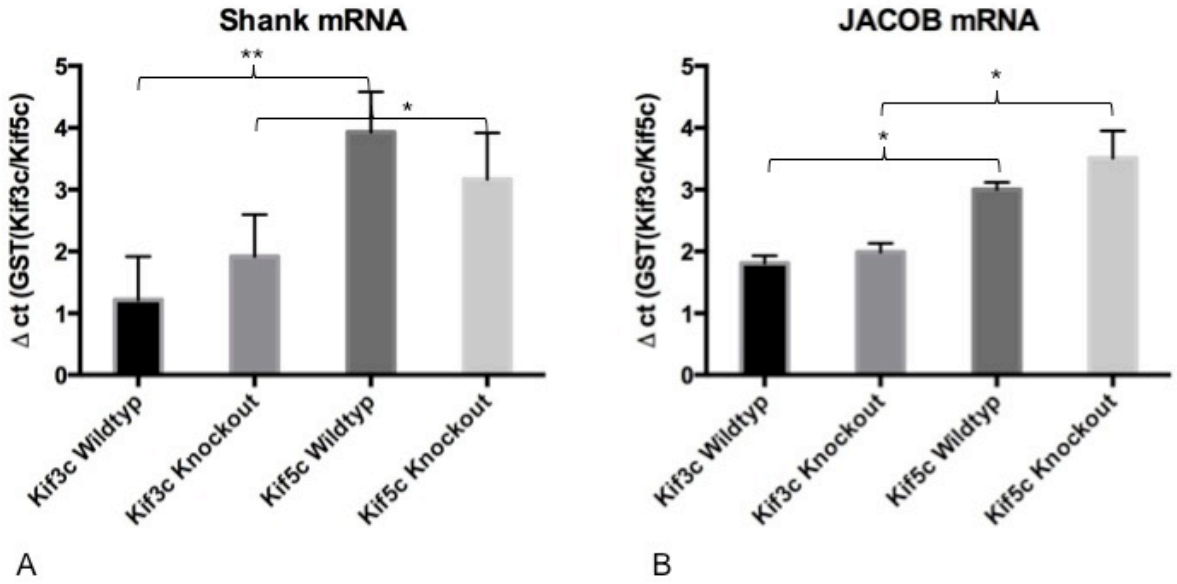
Die für das Protein JACOB kodierende mRNA wurde ebenfalls untersucht. JACOB ist vor allem in Zellkernen von Neuronen des limbischen Systems und des Cortex vorhanden. Es ist wie Shank1 ein Bestandteil der postsynaptischen Dichte und seine mRNA ebenfalls dendritisch lokalisiert (Kindler *et al.* 2009).

Die mRNA Analysen für JACOB zeigen eine im Vergleich spezifische Anreicherung in den KIF5c mRNPs, sowohl in den Wildtyp- als auch in den *Fmr1*-/- Fraktionen. ($\Delta CT_{WT\text{-}KIF3c}$ 1,81,

$\Delta CT_{WT\text{-}KIF5c}$ 3,1; p=0,000011; $\Delta CT_{Fmr1\text{-}/\text{-}KIF3c}$ 1,99, $\Delta CT_{Fmr1\text{-}/\text{-}KIF5c}$: 3,51; p=0,012, Abb. 3.3.6 B). Auch hier findet sich, wie bei den Shank1 mRNA Analysen, eine im Vergleich zur Negativkontrolle erhöhte Menge an JACOB mRNA in den KIF3c Fraktionen. Die Ergebnisse zeigen auch, dass das Fehlen von Fmrp anscheinend keinen Einfluss auf die Verteilung der JACOB mRNA zwischen den KIF3c- oder KIF5c mRNPs in in WT und KO hat. Insgesamt wird so die Hypothese untermauert, dass der Transport der JACOB- und Shank1-mRNAs spezifisch in KIF5c mRNPs erfolgt und dass das Fehlen von Fmrp keinen Einfluss auf den Transport zu haben scheint. Des weiteren konnte erstmals eine Assoziation von Shank1- und JACOB mRNA mit KIF3c mRNPs gezeigt werden.

Für andere dendritisch lokalisierte mRNAs wie z.B. die CamKIIα- und Arc/Arg3.1-mRNA wurde bereits eine Assoziation mit KIF5c mRNPs gezeigt (Hirokawa 2009). Arc/Arg3.1 ist ein Zytoskelett-assoziiertes Protein, dessen mRNA durch aktivitätsabhängige synaptische Stimulation *in vivo* nicht nur verstärkt transkribiert, sondern auch verstärkt dendritisch translatiert wird (Link *et al.* 1995). Untersuchungen zeigen, dass Fmrp die Translation der Arc/Arg3.1-mRNA reguliert (Park *et al.* 2008) und dass das Arc/Arg3.1 Protein im präfrontalen Cortex *Fmr1*-defizienter Mäuse vermindert ist (Krueger *et al.* 2011).

Die RNA-Analysen dieser Arbeit zeigen eine signifikante Umverteilung der Arc/Arg3.1 mRNA in der Wildtyp und *Fmr1*-/- Population ($\Delta ct_{WT\text{-}KIF3c}$ 1,4 vs. $\Delta ct_{Fmr1\text{-}/\text{-}KIF3c}$ 3,06; p=0,019; $\Delta ct_{WT\text{-}KIF5c}$ 3,4 vs. $\Delta ct_{FMR1\text{-}/\text{-}KIF5c}$ 2,14; p= 0,012; Abb. 3.3.7). Zusammenfassend ist in der *Fmr1*-/- Fraktion mehr Arc/Arg3.1 mRNA mit KIF3c mRNPs assoziiert während in der Wildtyp-Fraktion mehr Arc/Arg3.1 mRNA mit KIF5c mRNPs assoziiert zu sein scheint.

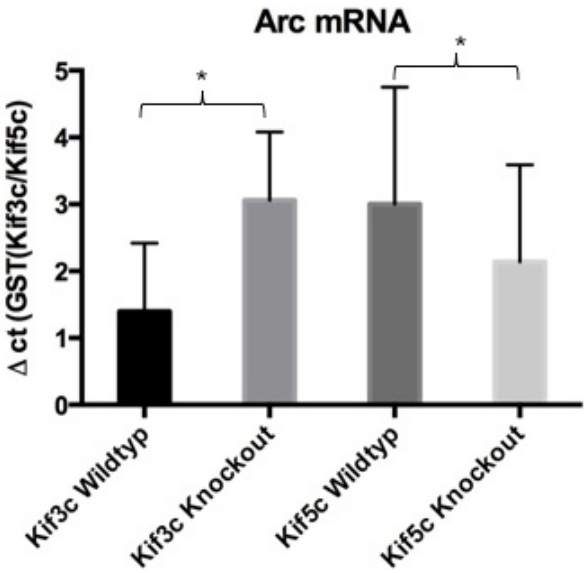


mRNA	KIF3c WT	KIF3c KO	KIF5c WT	KIF5c KO
Shank1 A	1,9	1,16	3,79	4,02
Shank1 B	1,25	2,45	4,64	2,59
Shank1 C	0,495	2,15	3,37	2,9
Mittelwert	1,22	1,92	3,93	3,17
Standartabw.	0,7	0,68	0,65	0,75
p-Wert	**0,219**		**1,188**	
p-Wert	**0,013**	-	**0,013**	-
p-Wert	-	**0,049**	-	**0,049**
mRNA	**KIF3c WT**	**KIF3c KO**	**KIF5c WT**	**KIF5c KO**
JACOB A	1,69	2,14	2,955	3,44
JACOB B	1,805	1,975	3,135	3,98
JACOB C	1,935	1,855	3,22	3,105
Mittelwert	1,81	1,99	3,1	3,51
Standartabw.	0,12	0,14	0,14	0,44
p-Wert	0,180		0,142	
p-Wert	**0,00011**	-	**0,00011**	-
p-Wert	-	**0,012**		**0,012**

C

Abbildung 3.3.6: Balkendiagramme der Shank1 – und Jacob mRNA und Darstellung der absolut gemessenen Δct-Werte in Tabellenform für alle 3 Versuchsreihen, hier A, B, C (n=3)

A) Darstellung der Ergebnisse der mRNA Analysen am Balkendiagramm für die Shank1 mRNA. B) Darstellung der Ergebnisse der mRNA Analysen am Balkendiagramm für die JACOB mRNA; (* = p < 0,05), WT=Wildtyp, KO=*knockout*). C) Tabelle: Dargestellt sind die absolut gemessenen Δct-Werte der RT real-time PCR für die shank1 – und die JACOB mRNA für alle standartisiert durchgeführten Versuchsreien (n=3), mit Mittelwerten, Standardabweichungen und Signifikanzniveaus, grau unterlegt sind die signifikanten Unterschiede (ermittel nach dem *paired student´s t-test,* p< 0,05).



mRNA	KIF3c WT	KIF3c KO	KIF5c WT	KIF5c KO
Arc/arg.3.1 A	0,805	3,12	4,31	2,71
Arc/arg.3.1 B	2,57	4,05	4,51	3,235
Arc/arg.3.1 C	0,815	2,012	1,38	0,47
Mittelwert	1,4	3,06	3,4	2,14
Standartabw.	1,02	1,02	1,75	1,45
p-Wert	**0,019**		**0,012**	
p-Wert	**0,071**	-	**0,071**	-
p-Wert	-	**0,054**	-	**0,054**

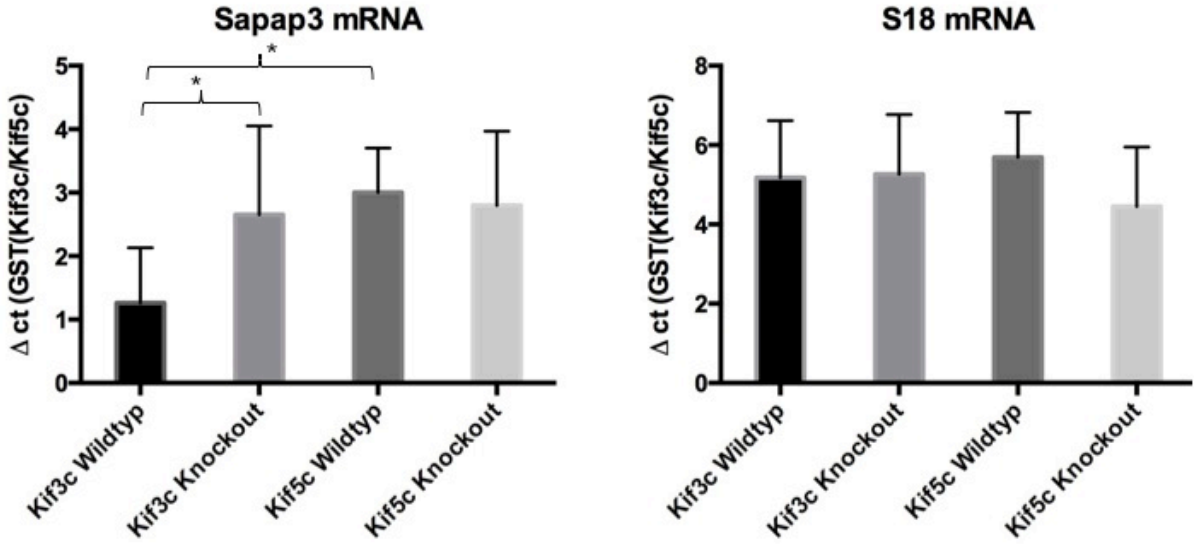
Abbildung 3.3.7: Balkendiagramme der Arc/Arg3.1 mRNA und Darstellung der absolut gemessenen Δct-Werte in Tabellenform für alle 3 Versuchsreihen, hier A, B, C (n=3): Das Balkendiagramm veranschaulicht die Umverteilung der Arc/Arg3.1 mRNA in den einzelnen Fraktionen, in der Wildtyp-KIF5c Fraktion scheint signifikant mehr Arc/Arg3.1 mRNA vorhanden zu sein, als in der *Fmr1*-/-Fraktion von KIF5c, für die KIF3c-Fraktionen scheint es genau umgekehrt zu sein: in der WT-KIF3c Fraktion findet sich weniger Arc/Arg3.1 mRNA als in der *Fmr1*-/- Fraktion, (* = p< 0,05, *student´s t-test*, WT=Wildtyp, KO=*knockout*).).

Tabelle: Dargestellt sind die absolut gemessenen Δct-Werte der RT real-time PCR für die Arc/Arg3.1-mRNA für alle standatisiert durchgeführten Versuchsreien (n=3), mit Mittelwerten, Standardabweichungen und Signifikanzniveaus, grau unterlegt sind die signifikanten Unterschiede (ermittel nach dem *student´s t-test,* p < 0,05).

Ähnlich wie bei der Arc/Arg3.1 mRNA zeigen die Untersuchungen der SAPAP3 mRNA in den Wildtyp- und *Fmr1*-/- Fraktionen eine Verschiebung innerhalb der mRNPs von KIF3c- und KIF5c-Motorproteinen. Die SAPAP3 mRNA ist in der Wildtyp Fraktion spezifisch mit dem KIF5c Motorproteinen assoziiert ($\Delta ct_{WT\text{-}KIF3c}$ 1,26 vs. $\Delta ct_{WT\text{-}KIF5c}$ 3,4; p=0,015). Diese Spezifität wird in der *Fmr1*-/- Fraktion aufgehoben, so dass der Anteil der mit KIF3c Motorproteinen assoziierten SAPAP3 mRNA zunimmt ($\Delta ct_{Fmr1\text{-}/\text{-}KIF3c}$ 2,65 vs. $\Delta CT_{Fmr1\text{-}/\text{-}KIF5c}$ 2,8; p=0,256; Abb. 3.3.8 A).

In den Western Blot Analysen konnten auf Proteinebene keine Bestandteile der ribosomalen 40s Untereinheit nachgewiesen werden (S6-Protein). Daraufhin untersuchte ich die aufgereinigten Proben auf ribosomale Bestandteile: die 18s rRNA. Ribosomale RNA ist wie die translatierende RNA eine *non-coding* RNA. Sie trägt keine genetischen Informationen, die in Proteine umgeschrieben werden, sondern ist als RNA-Molekül in der Zelle aktiv. Die Analysen zeigen, dass die 18s rRNA sowohl mit mRNPs der Wildtyp- als auch der *Fmr1*-/- Fraktion von KIF3c- und KIF5c-Motorproteinen assoziiert ist. Es gibt keinen signifikanten Unterschied für eine jeweilige Fraktion ($\Delta ct_{WT\text{-}KIF3c}$ 5,18 vs. $\Delta ct_{WT\text{-}KIF5c}$ 5,69, p=0,198; $\Delta ct_{KIF3c\ Fmr1\text{-}/\text{-}}$ 5,26 vs. $\Delta ct_{KIF5c\ Fmr1\text{-}/\text{-}}$ 4,45, p=0,71, Abb. 3.3.8 B). Das Fehlen von Fmrp scheint somit keinen signifikanten Einfluss auf die Verteilung der rRNA innerhalb der mRNPs zu haben.

Viele der dargestellten Ergebnisse zeigen, dass FMRP sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene einen signifikanten Einfluss auf die Zusammensetzung der mRNPs hat. Über eine pathologische Bedeutung kann jedoch zum jetztigen Zeitpunkt noch keine klinisch relevante Aussage getroffen werden.
Desweiteren konnte erstmals für verschiedene Protein als auch mRNAs eine Assoziation mit KIF3c oder KIF5c gezeigt werden.



A B

mRNA	KIF3c WT	KIF3c KO	KIF5c WT	KIF5c KO
SAPAP3 A	2	1,32	2,6	1,84
SAPAP3 B	1,47	4,095	3,92	4,105
SAPAP3 C	0,3	2,54	3,69	2,455
Mittelwert	1,26	2,65	3,4	2,8
Standartabw.	0,87	1,4	0,7	1,17
p-Wert	**0,156**		**0,143**	
p-Wert	0,015	-	**0,015**	-
p-Wert	-	**0,256**	**-**	**0,256**
18s A	6,29	5,25	6,965	5,11
18s B	5,705	6,78	5,32	5,5
18s C	3,55	3,77	4,805	2,73
Mittelwert	5,18	5,26	5,69	4,45
Standartabw.	1,44	1,51	1,13	1,5
p-Wert	**0,473**		**0,111**	

Abbildung 3.3.8: Balkendiagramme der Sapap3 sowie der 18s mRNA und Darstellung der absolut gemessenen Δct-Werte in Tabellenform für alle 3 Versuchsreihen, hier A, B, C (n=3): A) Die Sapap3 mRNA ist wie auch Shank1 und Jacob spezifisch in KIF5c mRNPs nachweisbar, die Menge an Sapap3 mRNA ändert sich in der *Fmr1*-/- Fraktion nicht, allerdings erhöht sich die mRNA Menge in den KO-KIF3c mRNPs, insgesamt findet sich somit eine erhöhte absolute Menge an Sapap3 mRNA beim *Knockout* (nur bezogen auf die Menge in KIF3c- und KIF5c mRNPs). B) Die rRNA der 18s ribosomalen Untereinheit ist sowohl in mRNPs von KIF3c als auch in KIF5c in der Wildtyp und *Fmr1*-/- Fraktion enthalten, das Fehlen von Fmrp hat keinen Einfluss auf die Menge der rRNA zwischen den beiden untersuchten mRNP-Fraktionen. (* = p<0,05, *student´s t-test*; WT=Wildtyp, KO=*knockout*)

Tabelle: Dargestellt sind die absolut gemessenen Δct-Werte der RT real-time PCR für die Sapap3-mRNA und die 18s rRNA für alle standatisiert durchgeführten Versuchsreien (n=3), mit Mittelwerten, Standardabweichungen und Signifikanzniveaus, grau unterlegt sind die signifikanten Unterschiede (ermittel nach dem *student´s t-test,* p < 0,05).

4. Diskussion

Durch den Vergleich von Bestandteilen der Ribonukleoproteinpartikeln (mRNPs), die am Transport wichtiger neuronaler Bestandteile im zentralen Nervensystem beteiligt sind, konnte der Einfluss von Fmrp auf die Zusammensetzung der mRNPs *in vivo* genauer untersuchen werden. Das Ziel solcher Experimente ist es die Pathogenese des FRAX auf molekularbiologischer Ebene besser zu verstehen, um langfristig relevante Therapien für diese häufige Erkrankung zu entwickeln. Durch die morphologische Analyse von *Fmr1*-/-, *FMR1*-/- Neuronen in murinem- und menschlichem Gewebe ist bekannt, dass diese eine veränderte Struktur aufweisen (Abb. 1.6) (Irwin *et al.* 2001, Snyder *et al.* 2001). Der zielgerichtete und spezifische Transport von Zellbestandteilen, mRNAs und Proteinen in Neuronen kann die Zusammensetzung der postsynaptischen Dichte (PSD) langfristig verändern (Schumann 1999). Dieser Transport erfolgt sowohl anterograd als auch retrograd an Mikrotubuli mithilfe von Kinesin- und Dynein-Motorproteinen. Proteine, mRNAs, Polysomen und Ribosomen werden in mRNPs (*messenger ribonucleoprotein particle*) entlang der Mikrotubuli zu ihrem Bestimmungsort transportiert (Goldstein und Yang 2000). Ein Modell zur Untersuchung von Kinesin-Motorproteinen wurde bereits 2004 etabliert (Kanai *et al.* 2004). Erstmals wurde der Bindungspartner eines konventionellen Kinesins (KIF5c), ein ca. 1000s großer Zusammenschluss von unterschiedlichen Bestandteilen, genauer analysiert. Insgesamt wurden 42 Proteine und mRNAs detektiert (darunter Fmrp, Staufen1, Purα/β, eIF2α oder EF-1α, ribosomale Proteine, RNA-Helicasen; mRNAs kodierend für CaMKIIα, Arc/Arg3.1). CaMKIIα- und Arc/Arg3.1-mRNAs sind bekannte dendritisch lokalisierte mRNAs, deren Translation durch die Aktivität von Synapsen reguliert werden kann (Link *et al*. 1995, Rook *et al.* 2000). Für einige dieser Proteine oder mRNAs wie z.B. für Fmrp, die CaMKIIα- oder Arc/Arg3.1 mRNA ist die Funktion, Interaktion oder Assoziation bereits genauer analysiert worden. Für die Vielzahl der anderen in den mRNPs transportierten Bestandteile, die in die Regulation der synaptischen Plastizität oder den dendritischen Transport involviert sind, sind jedoch noch viele Tatsachen ungeklärt.

Mithilfe des an Glutathion-Sepharose gekoppelten Fusionsproteins, welches die *cargo*-Bindedomäne von KIF5c trägt, konnte die an KIF5c gebundene Last analog zu den

Untersuchungen von Kanai und Mitarbeitern isoliert und analysiert werden (Kanai *et al.* 2004). 2007 wurden ähnliche Analysen mit einem weiteren Kinesin, dem KIF3c, durchgeführt. Hier wurde postuliert, dass Fmrp ebenfalls mit dem KIF3c-Motorprotein assoziiert sei (Davidovic *et al.* 2007).

Die Ziele, die oben genannte Methode mit einem KIF5c Fusionsprotein im Wildtyp-Mausgehirn zu wiederholen und auf *Fmr1*-/- Mausgehirne zu übertragen, ein KIF3c Fusionprotein herzustellen, um die Analysen für KIF3c mRNPs in Wildtyp- und *Fmr1*-/- Geweben auszuweiten und die bereits etablierte Methode zur Aufreinigung der mRNP Komplexe aus den Gehirnlysaten zu verbessern, konnten allesamt erreicht werden. Das Maß für die Methodenverbesserung wurde auf die quantitative Menge der präzipitierbaren Protein fest gelegt. Dieser Versuchsteil war rein experimentell und bestand aus drei verschiedenen Protokollveränderungen, die sich jeweils der Hypothese anlehnten die Gewebe besser zu solubilisieren, um so eine verbesserte Bindung der Fusionsproteine an die mRNPs zu ermöglichen. In einem umfassend angelegtem Parallelversuch konnte dargelegt werden, dass die Methode durch Zugabe von 1% Triton X-100 verbessert wird (n=1; Methode 2.3.4, Abb. 3.2). Als Tensid, welches die äußere Zellmembran zusätzlich zu der mechanischen Bearbeitung der Gewebe mittels Glas-Homogenisator solubilisiert, unterstützt Triton X-100 mutmaßlich den Vorgang der Bindung von mRNPs aus dem Zellinneren an die Fusionsproteine. Basierend auf dieser Hypothese wäre es interessant, weitere Detergenzien zur Verbesserung der Methodik zu untersuchen. Der Versuch wurde nur 1x durchgeführt, da die Verwendung von insgesamt 16 Mausgehirnen pro Methodenoptimierungsversuch in Anbetracht der bereits etablierten Methodik unangemessen schien und das Angebot der Wildtyp Tiere begrenzt war.

Das KIF3c Fusionsprotein konnte in Analogie zu der Veröffentlichung von Davidovic erfolgreich hergestellt werden (Davidovic *et al.* 2007), wobei der Nachweis von Fmrp in KIF3c mRNPs nur in einem von 3 Versuchen gelang (Abb. 3.3.3). Auch durch den Einsatz verschiedener Fmrp-Antikörper änderte sich dieser Sachverhalt nicht. Die Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen meinen Experimenten und denen von Davidovic konnten ich nicht heraus finden. Für die Versuchsreihen meiner Experimente konnten andere Proteine im Vergleich zu KIF3c gleichermaßen präzipitiert werden, was gegen einen

Fehler bei der Methodik sprechen würde. In Zusammenschau könnten die Ergebnisse jedoch auf eine inkonsistente Assoziation von Fmrp mit KIF3c hinweisen und untermalt die deutliche und konsequente Assoziation von Fmrp mit KIF5c.

Das Protein Ddx1 wurde bereits in KIF5c mRNPs nachgewiesen (Kanai *et al*. 2004). Ein Vergleich der Ddx1 Menge in Wildtyp und *Fmr1*-/- Fraktionen wurde bisher nicht durchgeführt. Umso relevanter könnten die Ergebnisse sein, dass im Mittel 25% mehr Ddx1 in WT KIF5c mRNPs als in *Fmr1*-/- KIF5c mRNPs zu finden ist. Dieser signifikante Unterschied ist durch die Verwendung von gepaarten Probenpaaren mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht durch veränderte Expressionslevel bedingt.

Insgesamt sind mehr als 40 DEAD-box Proteine bekannt (Linder 2006). Es sind ATP-abhängige RNA Helikasen, die durch die Veränderung der RNA Struktur Einfluss auf die Translationsinitiation, das Spleißen und die Zusammensetzung von Ribosomen und Spleißosomen haben (Godbout *et al.* 1998). Weiterhin sind DEAD-Box Proteine in der Zusammenstellung von mRNPs in Eukaryoten involviert (Ma *et al.* 2013). *Northern*-Blot Analysen zeigen eine starke Expression der DDX1 mRNA in Geweben neuroektodermalen Ursprungs (Retina, Gehirn und Rückenmark) und *DDX1* ist zudem in humanen Zelllinien von Retinoblastomen mit dem Protoonkogen *MYCN* (V-myc, *myelocytomatosis viral related oncogene*) (Godbout *et al.* 1998), als auch in Zelllinien muriner Hodentumoren, den Seminomen und Nicht-Seminomen (Tanaka *et al.* 2009) überexprimiert. DDX3 und DDX1 scheinen außerdem ein Kofaktor für den Rev-gerichteten Export der gespleißten und ungespleißten mRNAs des HI-Virus zu sein (Krishnan und Zeichner 2004). Nach Eintritt des viralen HIV Kapsids in die Wirtszelle und Einbau der proviralen DNA in das Wirtsgenom wird die Transkription durch virale (Tat), als auch durch zelluläre (NF*k*B) Faktoren reguliert. Das Spleißen der viralen mRNA-Produkte und deren Export aus dem Zellkern wird durch das virale Protein Rev gemeinsam mit Helikasen wie DDX1 oder DDX3 gesteuert. Alle bereits genannten Faktoren zeigen, dass DDX1/Ddx1 auf unterschiedlicher Ebene in die Translationsmaschinerie eingreift. Durch *Knockdown*-Analysen von DDX1 und Staufen2 in Hippocampi von Ratten konnte ebenfalls die Bedeutung der Proteine für die Zusammensetzung der mRNPs gezeigt werden. So wird durch einen lentiviralen *Kockdown*

von Ddx1 Staufen2 signifikant um 50% vermindert exprimiert, während die Staufen2-mRNA und die Menge an Fmrp unverändert ist. Der *Knockdown* von Staufen2 reduziert jedoch die Menge von Fmrp signifikant um 50%. Ddx1 ist dagegen signifikant erhöht und das Level der Ddx1 mRNA etwa verdoppelt (Bamann 2013).

Das Fragile-X Syndrom (FRAX) ist die häufigste bekannte hereditäre monogene Ursache für mentale Retardierung (Crawford *et al.* 2001) und Autismus (Wang *et al.* 2010). Die häufigste chromosomale Aberration, die ebenfalls unter anderem zu einer mentalen Retardierung führt, ist Trisomie 21. In einer Proteinanalyse von vier RNA-Helikasen (DDX1, DDX3, DDX72 und RuvB-*like* DNA Helikase) in humanen fetalen Gehirnlysaten von Aborten mit Trisomie 21 (19,8 +/- 2 Schwangerschaftswoche) und fetalen Gehirnlysaten von Aborten unklarer Genese waren die humanen Proteine DDX1 und DDX72 in der Trisomie 21-Kohorte signifikant erniedrigt (Kircher *et al.* 2002). Könnte eine veränderte DDX1 Proteinlokalisation beim FRAX also auch bedeutend für die Pathogenese sein?

Die Analysen dieser Arbeit zeigen auf muriner neuronaler Subebene eine um 25% verminderte Menge an Ddx1 in den KIF5c mRNPs der *Fmr*1-/- Fraktion, während sich die Menge an Ddx1 in den Gesamtgehirnlysaten (Abb. 3.3.1) in der Wildtyp- und *Fmr*1-/- Fraktion nicht unterscheidet. Die hier erhobenen Daten deuten, wie die oben genannte Publikation (Kircher *et al.* 2002), darauf hin, dass DDX1/Ddx1 eine Rolle in der Pathogenese des Fragilen-X Syndroms, Trisomie 21 oder weiteren Erkrankungen aus dem Formenkreis der autistischen Erkrankungen (ASDs) spielen könnte. Ddx1 könnte direkt oder indirekt mit Fmrp interagieren. Fmrp könnte unter anderem für die Rekrutierung von Ddx1 in die KIF5c mRNPs verantwortlich sein, was die verminderte Menge an Ddx1 in den *Fmr1*-/- Fraktionen erklären würde. Mutmaßlich sind aber auch weitere Faktoren für die Rekrutierung verantwortlich, ansonsten dürfte Ddx1 durch den *Knockout* von Fmrp in den KIF5c mRNPs gar nicht mehr nachweisbar sein. Eine direkte Interaktion von Ddx1 und Fmrp konnte bislang noch nicht gezeigt werden. Zudem sollte untersucht werden, welche konkrete Rolle Ddx1 in den KIF5c mRNPs spielt, welche weiteren direkten Interaktionspartner es hat und welchen Einfluss es auf die Translation der assoziierten mRNAs hat.

Das Protein Staufen1 ist bei Säugern in Dendriten lokalisiert und wird in KIF5 mRNPs transportiert (Kanai *et al.* 2004). In Säugern exisitieren zwei homologe Protein: Staufen1 und Staufen2, wobei Fmrp neben seinen homologen Proteinen FXR1 und FXR2 auch mit Staufen1 assoziiert ist. Staufen1 bzw. Staufen2 widerum scheint in der Lage zu sein die Funktion von Fmrp zu modulieren (Ohashi *et al.* 2002) und die Menge an Fmrp zu reduzieren (Baman 2013). Mit Hilfe seiner Tubulin-Bindedomäne sowie seiner vier dsRBDs (*double-stranded RNA binding domains*) bindet es ebenfalls mRNA (Wickham *et al.* 1999). Diese Bindung erfolgt sequenzunabhängig an doppelsträngige RNA (Macchi *et al.* 2003, Monshausen *et al.* 2001). Andere Untersuchungen zeigen, dass es durch Verhinderung dieser mRNA Bindung zu einer Störung des Transports anderer dendritisch lokalisierter mRNAs, der Shank1- und CaMKIIα-mRNAs, kommt (Falley *et al.* 2009; Kanai *et al.* 2004).
Die Analysen dieser Arbeit konnten die Anwesenheit von Staufen1 in KIF5c mRNPs bestätigen (Kanai *et al.* 2004). Zusätzlich wurde Staufen1 erstmals in KIF3c mRNPs nachgewiesen (Abb. 3.3.2), wobei der Verlust von Fmrp keinen Einfluss auf die Art des Staufen1-Transports (KIF3c-mRNPs oder KIF5c-mRNPs) hat. Bisher liegen keine Informationen über einen direkten Zusammenhang von Staufen1 und dem Vorliegen einer mentalen Retardierung vor. Für den *Knockdown* von Ddx1 konnte jedoch eine um 50% verminderte Staufen2 Proteinmenge detektiert werden (Bamann 2013), wobei es für Ddx1 Hinweise auf Zusammenhänge mit Erkrankungen mentaler Retardierung gibt (Kircher *et al.* 2002). Auch wenn Staufen1 als Fmrp-Interaktionspartner und mRNA bindendes Protein einen hohen Stellenwert im Ablauf der neuronalen Transportmechanismen zu haben scheint, können wir momentan basierend auf den vorliegenden Daten keinen direkten Einfluss auf die Pathogenese des Fragilen-X Syndroms vermuten.

Das Protein Pur-α wurde als CGG-*premutations Repeat-binding Protein* (RBP) identifiziert und beeinflusst allgemein die Apoptose von Neuronen (Jin *et al.* 2007, Qurashi *et al.* 2011). Das *Fragile X-associated Tremor/Ataxia Syndrome* (FXTAS) findet sich häufig bei männlichen Prämutationsträgern mit 50-200 CGG-Repeats innerhalb des *FMR1*-Gens. FXTAS gehört zur Gruppe der neurodegenerativen Krankheiten, die sich um das 50. Lebensjahr manifestieren. Phänotypisch zeigt sich ein progressiver Intentionstremor mit Ataxie und eventuell

zusätzlicher Demenz (Grigsby *et al.* 2006). Die Familie der *purine-rich binding proteins* (Pur-α, Pur-ß) kontrollieren unter anderem die Translation, DNA-Replikation und den RNA-Transport und werden neben Fmrp und Staufen1 in mRNP Komplexen transportiert (Gallia *et al.* 2000, Kanai *et al.* 2004). Mutmaßlich ist eine Akkumulation Pur-α mRNA in der Zelle für die Pathogenese des FXTAS ursächlich (Qurashi *et al.* 2011), denn die Überexpression von Pur-α kann in *Drosophila melanogaster* den FXTAS-Phänotypen aufheben (Jin *et al.* 2007).
Eine direkte Interaktion zwischen den oben genannten Proteinen konnte bislang noch nicht gezeigt werden. Vermutlich sind diese Proteine jedoch über ihre RNA-bindenden Domänen über mRNAs indirekt miteinander assoziiert (Ohashi *et al.* 2002).
Auch das translationsregulierende cytoplasmatische Poly-A-Bindeprotein (PABP) ist zusammen mit anderen Translationsinitiationsfaktoren (eIF4G, eIF4E, eIF4A) und Polyribosomen in Dendriten lokalisiert und wird in *stress-granules* oder mRNPs transportiert (Anderson und Kedersha 2006). Es reguliert die Translationsinitiation, den RNA Transport und die RNA Stabilität (Mohr und Richter 2004). PABP ist mit der Shank1 mRNA über die 3´-UTR assoziiert (Iglauer 2005), was einen Transport in KIF5c mRNPs nahe legte, dieser jedoch bisher noch nicht veröffentlich wurde. In den Analysen dieser Arbeit waren PABP und Pur-α in KIF5c mRNPs sowohl in der Wildtyp als auch in der *Fmr1*-/- Fraktion in gleichermaßen nachweisbar. Das Fehlen von Fmrp hatte keinen Einfluss auf die jeweiligen Menge von PABP oder Purα in den mRNPs. Es erscheint somit, als würden beide Proteine nicht durch Fmrp in die mRNPs rekrutiert werden. Zudem konnten beide Proteine nicht in den mRNPs von KIF3c (WT und *Fmr1*-/-) nachgewiesen werden (Abb. 3.3.4).

Wie bereits dargestellt hat FMRP zwei KH-Domänen (Ashley *et al.* 1993), die unter anderem für die RNA-Bindungsfähigkeit von Fmrp verantwortliche sind. Erstmals wurde das Motiv der KH-Domäne an dem Protein hnRNP-K (human heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K) beschrieben (Siomi *et al.* 1993). Dieses Motiv besteht aus ca. 70 Aminosäuren und kommt in hnRNP-K selbst drei Mal vor. Weisen Proteine in ihrer KH-Domäne eine Mutation auf, so verlieren diese ihre Funktion (z.B. Mutation in der KH2-Domäne von FMRP führt zum Verlust der RNA-Bindungsfähigkeit von FMRP, de Boulle *et al.* 1993). HnRNP-K spielt zudem eine Rolle in der Pathogenese paraneoplastischer Erkrankungen als Koaktivator von p53

(Moumen *et al.* 2005). Neben den bereits in KIF5c mRNPs nachgewiesenen hnRN-Proteinen (hnRNP-U, hnRNP-A/B, hnRNP-A0, hnRNP-A1, hnRNP-D) (Kanai *et al.* 2004) wurde nun das Schwesterprotein hnRNP-K in die Analysen mit einbezogen. Leider konnte hnRNP-K weder in den KIF5c- noch in den KIF3c mRNPs nachgewiesen werden (n=3). Somit kann zwar keine Aussage über einen möglichen Einfluss dieses Proteins gemacht werden, wobei der negative Nachweis von hnRNP-K als Maß für die hohe Spezifität der mRNP-Aufreinigung genommen werden könnten, denn hnRNP-K wurde in grossen Mengen im Gesamtgehirnlysat, aber eben nicht in mRNPs detektiert. Um den Einfluss von weiteren hnRN-Proteinen auszuschliessen, sollte die Analyse erneut mit einem der bereits nachgewiesenen hnRNPs durchgeführt werden.

Die Endeckung von Polysomen in Dendriten (Steward and Levy 1982) war der erste Anstoß für die Theorie der stimulusabhängigen lokalen Translation von mRNA in Dendriten als zellulärer Mechanismus zur Plastizität von Synapsen. Fmrp ist im zentralen Nervensystem in den mRNPs sowohl mit Ribosomen (Aschrafi *et al.* 2005) als auch mit Polysomen assoziiert (Khandijan *et al.* 2004). Im Hippocampus Fmrp-defizienter Ratten zeigen sich insgesamt weniger mRNPs als in den Wildtyp-Analysen (Aschrafi *et al.* 2005). Zur weiteren Analyse wurden deshalb ribosomale Proteine sowie ribosomale RNA in die Untersuchungen mit einbezogen. Das ribosomale Protein S6 ist Bestandteil der mRNA-Bindungsstelle innerhalb der ribosomalen 40S-Untereinheit in eukaryonten Ribosomen (Wool *et al.* 1996). S6 erleichtert durch die eigene Phosphorylierung und die erhöhte Bindungsaffinität der mRNAs an die Ribosomen die Translationsinitiation (Narayanan *et al.* 2008). Das Einbeziehen der S6-Proteinuntereinheit in die Analysen war ein rein experimenteller Ansatz, der auf dem vorhandenem Primer im Labor beruhte. So konnte es auch weder in KIF3c- noch in KIF5c-mRNPs nachgewiesen werden. Auf RNA-Ebene gelang allerdings der Nachweis der ribosomalen 18s RNA sowohl in mRNPs von KIF3c als auch von KIF5c in der Wildtyp und *Fmr1*-/- Fraktion. Dies erweitert die bisherigen Erkenntnisse (Aschrafi *et al.* 2005), dass mutmaßlich nicht nur die ribosomalen Proteine, sondern auch die ribosomale RNA in den mRNPs mit transportiert werden. Das Fehlen von Fmrp hat jedoch keinen Einfluss auf die Menge der mittransportierten rRNA in den mRNPs.

Bei den mRNA Analysen habe ich mich primär auf bereits bekannte dendritische mRNAs fokussiert. Bekannte Beispiele für aktivitätsregulierte, dendritisch lokalisierte mRNAs sind die CaMKIIα- oder Arc/Arg3.1-mRNA (Rook *et al.* 2000, Link *et al.* 1995), welche auch bereits in KIF5c mRNPs nachgewiesen werden konnten (Kanai *et al.* 2004). Spezifische Sequenzen innerhalb dieser mRNAs, sog. *dendritic targeting elements* (DTEs), sind für den Transport in die Dendriten und somit für deren Lokalisation verantwortlich (Kindler *et al.* 2005). Für die mRNA von Arg3.1/Arc sind bisher zwei unterschiedliche nicht überlappende DTEs in der 3'-untranslatierten Region bekannt (Kobayashi *et al.* 2005). Arc/Arg3.1 ist an strukturellen Umbauvorgängen bei langfristigen Veränderungen der Effizienz von Synapsen (*long term potentiation,* LTP; *long term depression*, LTD) beteiligt (Plath *et al.* 2006). Die Expression von Arc/Arg3.1 ist in Gesamthirnlysaten und Synaptosomen von *Fmr1*-/- Mäusen gering hochreguliert (Zalfa *et al.* 2003) und in bestimmten Formen der synaptischen Plastizität gestört (Korb und Finkbeiner 2011, Park *et al.* 2008). Auch die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das Fehlen von Fmrp Einfluss auf die jeweilige Assoziation der Arc/Arg3.1-mRNA mit bestimmten mRNPs hat (Abb. 3.3.7). Das Fehlen von Fmrp führt in meinen Analysen zu einer Verschiebung der Arc/Arg3.1 mRNA innerhalb der Motorproteine. Fmrp könnte somit für die Rekrutierung der Arc/Arg3.1 mRNA in KIF5c mRNPs wichtig sein. In Abwesenheit von Fmrp scheint die mRNA dann verstäkt in KIF3c mRNPs rekrutiert zu werden.

Shank1 repräsentiert eines der Gerüstproteine (*master scaffolding proteins*) der postsynaptischen Dichte (Kreienkamp 2008). Insgesamt ist eine exakte Menge aller Gerüstproteine für die neuronale Funktion essentiell und in Fmrp-defizienten Neuronen gestört (Bagni und Greenough 2005). Quantitative Analysen der postsynaptischen Dichte im Hippocampus zeigen eine stärkere Anreicherung von Shank/(ProSAP)-Proteinen in der postsynaptischen Dichte der *Fmr1*-/- Fraktion, während die Menge anderer Proteine nicht verändert ist (Schuett *et al.* 2009). Es gibt Hinweise darauf, dass Fmrp über die 3'-untranslatierte Region von Shank1 dessen Translation hemmt aber die absolute Menge an zytoplasmatischer oder dendritischer Shank1 mRNA nicht beeinflusst. Die Shank1 mRNA Menge ist in Wildtyp- und Fmrp-defizienten Mäusen identisch (Schuett *et al.* 2009). Die Aktivität von mGluR5 an der Synapse induziert normalerweise eine kurze

Dephosphorylierung von FMRP, so dass durch den Wegfall der Hemmung mehr Protein translatiert werden kann und an der Synapse zur Verfügung steht (Narayanan *et al.* 2008). Beim Fragilen-X Syndrom gibt es keine Translationshemmung durch FMRP, was zu einer erhöten Translation führ (Abb. 1.6). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen den Einfluss von Fmrp auf die Lokalisation der Shank1 mRNA. Sie zeigen, dass deutlich mehr Shank1 mRNA in den KIF5c mRNPs als in den KIF3c mRNPs vorhanden ist. Die Menge der mRNA ist durch das Fehlen von FMRP nicht verändert, was die Hypothese unterstützt, dass die veränderte Menge an Shank1 Protein posttranskriptionell bedingt sein muss (s.o.). Mutmaßlich handelt es sich zudem um einen spezifischen Transport der Shank1 mRNA durch KIF5c mRNPs.

JACOB ist ein synaptisches Protein, dessen kodierende mRNA sich fast ausschließlich in Dendriten des Cortex und des limbischen Systems des Cerebrums befindet (Kindler *et al.* 2009, Dieterich *et al*. 2008). Im Rahmen des *Importin-Pathways* wird JACOB durch synaptische Aktivierung von NMDA Rezeptoren zurück in neuronale Zellkerne transportiert. Es könnte dann über mRNPs zurück in die Dendriten gelangen, wo es anschließend die Transkription dendritisch lokalisierter mRNAs beeinflusst (Dieterich *et al.* 2008). Dieser schnelle Proteinabbau des instabilen JACOB erfolgt Ca^{2+}-abhängig durch die Protease Calpain. Es wird angenommen, dass dafür die exakt regulierte Menge an zytoplasmatischem JACOB essenziell ist. Der Transport der JACOB mRNA in KIF5c mRNPs konnte bereits gezeigt werden und wird wahrscheinlich ebenso durch ein *dendritic targetic element* (DTE) in der 3´-UTR determiniert (Kindler *et al.* 2009).

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die bisherigen Ergebnisse (Kindler *et al.* 2009) eines Transports der JACOB mRNA in KIF5c mRNPs. Es konnte gezeigt werden, dass zwar ebenfalls JACOB mRNA in KIF3c mRNPs enthalten ist, in KIF5c mRNPs aber wie bei Shank1 mehr JACOB mRNA transportiert wird. Die Menge an JACOB mRNA war in der *Fmr1*-/- Fraktion leicht erhöht, erreichte jedoch kein Signifikanzniveau. Ziel weiterer Untersuchungen sollte sein, inwiefern Fmrp einen Einfluss auf JACOB in seiner absoluten Menge in den Dendriten hat, ob die relativ gesteigerte mRNA Menge mit einer ebenfalls erhöhten Translationsrate zusammenhängt und ob eine Aktivierung der Glutamatrezeptoren auch für die lokale Proteinsynthese von JACOB in Dendriten zuständig ist.

Das Protein Sapap3 ist ebenso Teil der postsynaptischen Dichte. Das Fehlen des SAP90/PSD-95-Associated Proteins (Sapap3) führt im Mausmodell zu phänotypischen Verhaltensweisen, die an Zwangsneurosen von Menschen erinnern (Welch *et al.* 2007). Diese Beobachtung veranschaulicht die Bedeutung der Sapap-Gerüstproteine für die korrekte Funktion von Synapsen (Kelleher *et al.* 2008) und unterstützt die Hypothese, dass veränderte Mengen dieser Proteinfamilie zur Fehlfunktion der Synapsen beim Fragilen-X Syndrom beitragen (Krueger *et al.* 2011). Sapap3 ist wie Shank1 in der postsynaptischen Dichte im Hippocampus von *Fmr*1-/- Mäusen vermindert (Schütt *et al.* 2009). Ähnlich wie die Arc/Arg3.1 mRNA zeigen die Untersuchungen für die Sapap3 mRNA bei Wildtyp- und *Knockout*-Mäusen eine Verschiebung innerhalb der unterschiedlichen mRNPs (KIF3c und KIF5c). Warum der Verlust von Fmrp dazu führt, dass mRNAs von anderen Motorproteinen transportiert werden, ist nicht bekannt. Offensichtlich wird Fmrp dazu benötigt, dass bestimmte mRNAs (Arc/Arg3.1, Sapap3) und Proteine (Ddx1) in bestimmte mRNPs verlagert werden. So führt das Fehlen von Fmrp zu einem geringen Verlust von Ddx1, Arc/Arg3.1-mRNA und Sapap3-mRNA aus den KIF5c mRNPs, die dann aber in KIF3c mRNPs verlagert werden. Ursache hierfür könnte eine direkte Protein- oder mRNA-Interaktion von Fmrp sein. Speziell für Ddx1 wurde eine Proteininteraktion mit Fmrp jedoch noch nicht bewiesen. Für die mRNAs könnte es bedeuten, dass nicht nur die veränderte Translation, sondern auch ein veränderter oder fehlgeleiteter Transport Ursache für die Entwicklung des Fragilen-X Syndroms sein könnte.

5. Zusammenfassung

Das Fragile-X Syndrom (FRAX) ist die häufigste Ursache für monogenetisch bedingte mentale Retardierung beim Menschen. Ursache ist in nahezu allen Fällen eine transkriptionelle Abschaltung des Gens durch eine CGG-Trinukleotidexpansion. Dies führt zum Fehlen des *fragile X mental retardation protein* (FMRP). In Neuronen des zentralen Nervensystems beeinflusst das Fehlen von FMRP die synaptische Plastizität und folglich Lern- und Gedächtnisprozesse massiv. Mit Hilfe von Motorproteinen der Kinesinfamilie wie KIF5c oder KIF3c wird FMRP zusammen mit anderen Bestandteilen aus dem Soma des Neurons in mRNPs (messenger Ribonukleoproteinpartikeln) in die Dendriten transportiert, wo sie für die Umbauvorgänge der postsynaptischen Dichte (PSD) benötigt werden. Als Translationssupressor und mRNA bindendes Protein spielt FMRP in den Dendriten eine essenzielle Rolle. Das Fehlen von FMRP führt dagegen zu einer pathologischen Störung in der Entwicklung des zentralen Nervensystems und zur klinischen Ausprägung des Fragilen-X Syndroms.

In dieser Arbeit wurden die unterschiedlichen Zusammensetzungen o.g. mRNPs in Abhängigkeit von Fmrp auf mRNA und Proteinebene untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass mRNAs von Shank1 oder JACOB spezifisch mit KIF5c mRNPs assoziiert sind und dass das Fehlen von Fmrp teilweise bei anderen mRNAs (Arc/Arg3.1, Sapap3) zu einer Verlagerung des KIF5c assoziierten Transportes in die KIF3c mRNPs führt.

Das Protein Ddx1 wird bei der häufigsten chromosomal bedingten Erkrankung für mentale Retardierung, der Trisomie 21, vermindert im Gehirn exprimiert. Durch die *in vivo* Analysen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Ddx1 auch beim FRAX-Mausmodell in KIF5c mRNPs eine um 25% geringere Konzentration als in dem Wildtyp-Mausmodell aufweist. Zudem konnte für weitere Proteine wie Purα, Staufen1 und PABP eine zum Teil spezifische Assoziation mit KIF5c mRNPs nachgewiesen werden. Staufen1 konnte zudem in KIF3c mRNPs nachgewiesen werden. Alle derartigen Veränderungen könnten auf molekularbiologischer Ebene pathogene Ursachen in der Genese des Fragilen-X Syndroms sein.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abb./Tab.	Abbildung/Tabelle
AMPA	Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-Propionsäure
Arc	aktivitätsreguliertes Cytoskelett-assoziiertes Protein
bp	Basenpaare
BSA	*bovine serum albumin*
bzw.	beziehungsweise
CaMKII	Calcium/Calmodulin dependent protein kinase II
°C	Grad Celcius
C	Cytosin-Nukleotid
C-	Carboxy-/C-Terminus
ct	*cycle threshold*
cDNA	*complementary* DNA
DAG	Diacylglycerol
DDX1/Ddx1	*dead box protein retinoblastoma*
DHPG	S-(3,5)-Dihydroxyphenylglycin
DMEM/MEM	*Dulbecco´s modified eagle medium/minimum essential medium*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	*Desoxyribonucleic acid*
dNTP	Desoxyribonukleosid 5'-triphosphat
DTE	*dendritic targeting element*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fmr1	*Fragile X linked mental retardation type 1*
FMRP	*Fragile X Mental Retardation Protein*
FRAX	Fragiles X Syndrom
Fw	*forward*
FXR1P/ FXR2P	*Fragile X-related proteins 1 und 2*
G	Guanin-Nukleotid
GK	Guanylat-Kinase
GluR1-4	AMPA-Rezeptoruntereinheit 1-4
gp	*guinea pig*
GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde
hnRNP	*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*

HRP	*horseradish peroxidase*
I	Isoleucin
ICC	Immuncytochemie
Ig	Immunglobulin
IRSp53	Insulin receptor substrate of 53 kDa
JACOB	Caldendrin-bindendes Protein
kDa	Kilodalton
KH	hnRNP-K Homology
KHC	*Kinesin-heavy chain*
KIF	Kinesin-Familie
KLC	*Kinesin light chain*
KO	*knockout*
l	Liter
LB	Luria Bertoni
Ln	natürlicher Logarithmus
LTD	l*ong-term depression*
LTP	*long-term potentiation*
M	Molar
m	Mol/Liter
MAP2	*microtubule associated protein 2*
mGluR	metabotroper Glutamat-Rezeptor
min	Minute
mRNA/ mRNP	*messenger ribonucleic acid/ messenger ribonucleoprotein*
N	Asparagin
NES	*Nuclear export signal*
NLS	*Nuclear localisation signal*
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OD600	Optische Dichte bei 600nm
PABP	Poly(A)-Bindeprotein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	*phosphate buffered saline*
PBS-T	*phosphate buffered saline* mit Tween
PCR	*polymerase chain reaction*
PDZ	PSD-95/Discs-large/ZO-1
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff-Protonen-Konzentration

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSD	Postsynaptische Dichte
PSD-95	PSD Protein von 95 kDa
Rb	*rabbit*
Rev	*reverse*
RGG	Arginin Glycin Glycin repeats
RNA	*ribonucleic acid*
Rpm	*rounds per minute*
RT	reverse Transkription
RT-qPCR	reverse Transkription quantitative Real-Time PCR
sec	Sekunde
SAP	*synapse-associated protein*
SAPAP	*synapse-associated protein 90/postsynaptic density-95-associated protein*
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Shank	SH3 domain and ankyrin repeat containing protein
S6	Ribosomal Protein S6
SOD	Superoxid Dismutase
u.a.	unter anderem
U	*unit*
UTR	untranslatierte Region
v.a.	vor allem
v/v	Volumen pro Volumen
WB	*Western Blot*
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
z.B./z.T.	zum Beispiel/zum Teil

7. Literaturverzeichnis

Anderson, P. & Kedersha, N. (2006). RNA granules. *J Cell Biol, 172*(6), 803-808.

Antar, L. N., Dictenberg, J. B., Plociniak, M., Afroz, R., & Bassell, G. J. (2005). Localization of FMRP-associated mRNA granules and requirement of microtubules for activity-dependent trafficking in hippocampal neurons. *Genes Brain Behav, 4*(6), 350-359.

Antar, L. N., Li, C., Zhang, H., Carroll, R. C., & Bassell, G. J. (2006). Local functions for FMRP in axon growth cone motility and activity-dependent regulation of filopodia and spine synapses. *Mol Cell Neurosci, 32*(1-2), 37-48.

Aschrafi, A., Cunningham, B. A., Edelman, G. M., & Vanderklish, P. W. (2005). The fragile X mental retardation protein and group I metabotropic glutamate receptors regulate levels of mRNA granules in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A, 102*(6), 2180-2185.

Ashley, C. T., Jr., Wilkinson, K. D., Reines, D., & Warren, S. T. (1993). FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding. *Science, 262*(5133), 563-566.

Bagni, C., & Greenough, W. T. (2005). From mRNP trafficking to spine dysmorphogenesis: the roots of fragile X syndrome. *Nat Rev Neurosci, 6*(5), 376-387.

Bamann (2013). Funktionelle Analyse dendritischer mRNA-Binde- proteine und ihre Bedeutung für die postsynaptische Dichte exzitatorischer Synapse. Dissertation. Universität Hamburg.

Bardoni, B., Schenck, A., & Mandel, J. L. (1999). A novel RNA-binding nuclear protein that interacts with the fragile X mental retardation (FMR1) protein. *Hum Mol Genet, 8*(13), 2557-2566.

Bear, M. F., Huber, K. M., & Warren, S. T. (2004). The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends Neurosci, 27*(7), 370-377.

Bear, M. F. (2005). Therapeutic implications of the mGluR theory of fragile X mental retardation. *Genes Brain Behav, 4*(6), 393-398.

Bechara, E. G., Didiot, M. C., Melko, M., Davidovic, L., Bensaid, M., Martin, P., . . . Bardoni, B. (2009). A novel function for fragile X mental retardation protein in translational activation. *PLoS Biol, 7*(1), e16.

Bleoo, S., Sun, X., Hendzel, M. J., Rowe, J. M., Packer, M., & Godbout, R. (2001). Association of human DEAD box protein DDX1 with a cleavage stimulation factor involved in 3'-end processing of pre-MRNA. *Mol Biol Cell, 12*(10), 3046-3059.

Bloom, G. S., Wagner, M. C., Pfister, K. K., & Brady, S. T. (1988). Native structure and physical properties of bovine brain kinesin and identification of the ATP-binding subunit polypeptide. *Biochemistry, 27*(9), 3409-3416.

Boeckers, T. M. (2006). The postsynaptic density. *Cell Tissue Res, 326*(2), 409-422.

Bomsztyk, K., Van Seuningen, I., Suzuki, H., Denisenko, O., & Ostrowski, J. (1997). Diverse molecular interactions of the hnRNP K protein. *FEBS Lett, 403*(2), 113-115.

Buselmaier, W., and Tariverdian, G. (2007). Humangenetik, 4. Auflage edn (Heidelberg, Springer).

Coffee, B., Keith, K., Albizua, I., Malone, T., Mowrey, J., Sherman, S. L., & Warren, S. T. (2009). Incidence of fragile X syndrome by newborn screening for methylated FMR1 DNA. *Am J Hum Genet, 85*(4), 503-514.

Crawford, D. C., Acuna, J. M., & Sherman, S. L. (2001). FMR1 and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review. *Genet Med, 3*(5), 359-371.

Darnell, J. C., Jensen, K. B., Jin, P., Brown, V., Warren, S. T., & Darnell, R. B. (2001). Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. *Cell, 107*(4), 489-499.

Darnell, J. C., Fraser, C. E., Mostovetsky, O., Stefani, G., Jones, T. A., Eddy, S. R., & Darnell, R. B. (2005). Kissing complex RNAs mediate interaction between the Fragile-X mental retardation protein KH2 domain and brain polyribosomes. *Genes Dev, 19*(8), 903-918.

Darnell, J. C., Van Driesche, S. J., Zhang, C., Hung, K. Y., Mele, A., Fraser, C. E., . . . Darnell, R. B. (2011). FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. *Cell, 146*(2), 247-261.

Davidovic, L., Jaglin, X. H., Lepagnol-Bestel, A. M., Tremblay, S., Simonneau, M., Bardoni, B., & Khandjian, E. W. (2007). The fragile X mental retardation protein is a molecular adaptor between the neurospecific KIF3C kinesin and dendritic RNA granules. *Hum Mol Genet, 16*(24), 3047-3058.

De Boulle, K., Verkerk, A. J., Reyniers, E., Vits, L., Hendrickx, J., Van Roy, B., . . . Willems, P. J. (1993). A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nat Genet, 3*(1), 31-35.

de Vries, B. B., Mohkamsing, S., van den Ouweland, A. M., Halley, D. J., Niermeijer, M. F., Oostra, B. A., & Willemsen, R. (1998). Screening with the FMR1 protein test among mentally retarded males. *Hum Genet, 103*(4), 520-522.

Devys, D., Biancalana, V., Rousseau, F., Boue, J., Mandel. J.L., & Oberle, I. (1992). Analysis of full fragile X mutations in fetal tissues and monozygotic twins indicate that abnormal methylation an somatic heterogeneity are established early in development. *Am J Med Genet, 43* (1-2), 208-216.

Dieterich, D. C., Karpova, A., Mikhaylova, M., Zdobnova, I., Konig, I., Landwehr, M., . . . Kreutz, M. R. (2008). Caldendrin-Jacob: a protein liaison that couples NMDA receptor signalling to the nucleus. *PLoS Biol, 6*(2), e34.

Dolen, G., & Bear, M. F. (2008). Role for metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) in the pathogenesis of fragile X syndrome. *J Physiol, 586*(6), 1503-1508.

Dolen, G., Osterweil, E., Rao, B. S., Smith, G. B., Auerbach, B. D., Chattarji, S., & Bear, M. F. (2007). Correction of fragile X syndrome in mice. *Neuron, 56*(6), 955-962.

Eberhart, D. E., Malter, H. E., Feng, Y., & Warren, S. T. (1996). The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals. *Hum Mol Genet, 5*(8), 1083-1091.

Eichler, E. E., Richards, S., Gibbs, R. A., & Nelson, D. L. (1993). Fine structure of the human FMR1 gene. *Hum Mol Genet, 2*(8), 1147-1153.

Falley, K. (2007) Lokale Proteinbiosynthese von Shank1 in neuronalen Dendriten der Ratte, Rattus norvegicus (Berkenhout 1769). Dissertation, Universität Hamburg.

Falley, K., Schutt, J., Iglauer, P., Menke, K., Maas, C., Kneussel, M., . . . Kreienkamp, H. J. (2009). Shank1 mRNA: dendritic transport by kinesin and translational control by the 5'untranslated region. *Traffic, 10*(7), 844-857.

Fisch, G. S., Snow, K., Thibodeau, S. N., Chalifaux, M., Holden, J. J., Nelson, D. L., . . . Maddalena, A. (1995). The fragile X premutation in carriers and its effect on mutation size in offspring. *Am J Hum Genet, 56*(5), 1147-1155.

Fu, Y. H., Kuhl, D. P., Pizzuti, A., Pieretti, M., Sutcliffe, J. S., Richards, S., . . . et al. (1991). Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell, 67*(6), 1047-1058.

Gallia, G. L., Johnson, E. M., & Khalili, K. (2000). Puralpha: a multifunctional single-stranded DNA- and RNA-binding protein. *Nucleic Acids Res, 28*(17), 3197-3205.

Godbout, R., Packer, M., & Bie, W. (1998). Overexpression of a DEAD box protein (DDX1) in neuroblastoma and retinoblastoma cell lines. *J Biol Chem, 273*(33), 21161-21168.

Goldstein, L. S., & Yang, Z. (2000). Microtubule-based transport systems in neurons: the roles of kinesins and dyneins. *Annu Rev Neurosci, 23*, 39-71.

Gothelf, D., Furfaro, J. A., Hoeft, F., Eckert, M. A., Hall, S. S., O'Hara, R., . . . Reiss, A. L. (2008). Neuroanatomy of fragile X syndrome is associated with aberrant behavior and the fragile X mental retardation protein (FMRP). *Ann Neurol, 63*(1), 40-51.

Grigsby, J., Brega, A. G., Jacquemont, S., Loesch, D. Z., Leehey, M. A., Goodrich, G. K., . . . Hagerman, P. J. (2006). Impairment in the cognitive functioning of men with fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). *J Neurol Sci, 248*(1-2), 227-233.

Harrison, C. J., Jack, E. M., Allen, T. D., & Harris, R. (1983). The fragile X: a scanning electron microscope study. *J Med Genet, 20*(4), 280-285.

Hinds, H. L., Ashley, C. T., Sutcliffe, J. S., Nelson, D. L., Warren, S. T., Housman, D. E., & Schalling, M. (1993). Tissue specific expression of FMR-1 provides evidence for a functional role in fragile X syndrome. *Nat Genet, 3*(1), 36-43.

Hirokawa, N., & Takemura, R. (2005). Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat Rev Neurosci, 6*(3), 201-214.

Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y., & Niwa, S. (2009). Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol, 10*(10), 682-696.

Hundscheid, R. D., Sistermans, E. A., Thomas, C. M., Braat, D. D., Straatman, H., Kiemeney, L. A., . . . Smits, A. P. (2000). Imprinting effect in premature ovarian failure confined to paternally inherited fragile X premutations. *Am J Hum Genet, 66*(2), 413-418.

Iglauer P. (2005) Transport und Translation der dendritisch lokalisierten Shank1 mRNA in Rattus norvegicus (Berkenhout, 1769). Dissertation, Universität Hamburg.

Irwin, S. A., Patel, B., Idupulapati, M., Harris, J. B., Crisostomo, R. A., Larsen, B. P., . . . Greenough, W. T. (2001). Abnormal dendritic spine characteristics in the temporal and visual cortices of patients with fragile-X syndrome: a quantitative examination. *Am J Med Genet, 98*(2), 161-167.

Jin, P., Duan, R., Qurashi, A., Qin, Y., Tian, D., Rosser, T. C., . . . Warren, S. T. (2007). Pur alpha binds to rCGG repeats and modulates repeat-mediated neurodegeneration in a Drosophila model of fragile X tremor/ataxia syndrome. *Neuron, 55*(4), 556-564.

Kanai, Y., Dohmae, N., & Hirokawa, N. (2004). Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron, 43*(4), 513-525.

Kaufmann, W. E., & Moser, H. W. (2000). Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cereb Cortex, 10*(10), 981-991.

Kelleher, R. J., 3rd, & Bear, M. F. (2008). The autistic neuron: troubled translation? *Cell, 135*(3), 401-406.

Keysor, C. S., & Mazzocco, M. M. (2002). A developmental approach to understanding Fragile X syndrome in females. *Microsc Res Tech, 57*(3), 179-186.

Khandjian, E. W., Huot, M. E., Tremblay, S., Davidovic, L., Mazroui, R., & Bardoni, B. (2004). Biochemical evidence for the association of fragile X mental retardation protein with brain polyribosomal ribonucleoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A, 101*(36), 13357-13362.

Kim, E., and Sheng, M. (2004). PDZ domain proteins of synapses. Nat Rev Neurosci 5, 771-781.

Kindler, S., Rehbein, M., Classen, B., Richter, D., & Bockers, T. M. (2004). Distinct spatiotemporal expression of SAPAP transcripts in the developing rat brain: a novel dendritically localized mRNA. *Brain Res Mol Brain Res, 126*(1), 14-21.

Kindler, S., Wang, H., Richter, D., & Tiedge, H. (2005). RNA transport and local control of translation. *Annu Rev Cell Dev Biol, 21*, 223-245.

Kindler, S., Dieterich, D. C., Schutt, J., Sahin, J., Karpova, A., Mikhaylova, M., . . . Kreutz, M. R. (2009). Dendritic mRNA targeting of Jacob and N-methyl-d- aspartate-induced nuclear translocation after calpain-mediated proteolysis. *J Biol Chem, 284*(37), 25431-25440.

Kircher, S. G., Kim, S. H., Fountoulakis, M., & Lubec, G. (2002). Reduced levels of DEAD-box proteins DBP-RB and p72 in fetal Down syndrome brains. *Neurochem Res, 27*(10), 1141-1146.

Korb, E., & Finkbeiner, S. (2011). Arc in synaptic plasticity: from gene to behavior. *Trends Neurosci, 34*(11), 591-598.

Kreienkamp, H. J., Zitzer, H., Gundelfinger, E. D., Richter, D., & Bockers, T. M. (2000). The calcium-independent receptor for alpha-latrotoxin from human and rodent brains interacts with members of the ProSAP/SSTRIP/Shank family of multidomain proteins. *J Biol Chem, 275*(42), 32387-32390.

Kremer, E. J., Pritchard, M., Lynch, M., Yu, S., Holman, K., Baker, E., . . . Richards, R. I. (1991). Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)n. *Science, 252*(5013), 1711-1714.

Krishnan, V., & Zeichner, S. L. (2004). Alterations in the expression of DEAD-box and other RNA binding proteins during HIV-1 replication. *Retrovirology, 1*, 42.

Krueger, D. D., Osterweil, E. K., Chen, S. P., Tye, L. D., & Bear, M. F. (2011). Cognitive dysfunction and prefrontal synaptic abnormalities in a mouse model of fragile X syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A, 108*(6), 2587-2592.

Laggerbauer, B., Ostareck, D., Keidel, E. M., Ostareck-Lederer, A., & Fischer, U. (2001). Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. *Hum Mol Genet, 10*(4), 329-338.

Leonard, H., & Wen, X. (2002). The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev, 8*(3), 117-134.

Linder, P. (2006). Dead-box proteins: a family affair--active and passive players in RNP-remodeling. *Nucleic Acids Res, 34*(15), 4168-4180.

Link, W., Konietzko, U., Kauselmann, G., Krug, M., Schwanke, B., Frey, U., & Kuhl, D. (1995). Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proc Natl Acad Sci USA, 92*(12), 5734-5738.

Ma, W. K., Cloutier, S. C., Tran, E. J. (2013) The DEAD-box Protein Dbp2 Functions with the RNA-Binding Protein Yra1 to Promote mRNP Assembly. *J. Mol. Biol,* 23; 425(20), 3824-38.

Martin, J. P., & Bell, J. (1943). A Pedigree of Mental Defect Showing Sex-Linkage. *J Neurol Psychiatry, 6*(3-4), 154-157.

Mefford, H. C., Batshaw, M. L., & Hoffman, E. P. (2012). Genomics, intellectual disability, and autism. *N Engl J Med, 366*(8), 733-743.

Meijas, R., Adamczyk, A. Angono, V., Niranjan, T., Thomas, G., Sharma, K., Skinner, C., Schwarzt, C.-E., Stevenson, R.-E., Fallin, M.-D., . . . Wang, T. (2011). Gain-of-function glutamate receptor interacting protein 1 variants alter GluA2 recycling and surface distribution in patients with autism. 108(12), 4920-4925

Miki, T., Takano, K., Yoneda, Y. (2005) The role of mammalian Staufen on mRNA traffic: a view from its nucleozytoplasmic shuttling function. *Cell Struct. Funct* 30(2):51 6.

Mohr, E., & Richter, D. (2004). Subcellular vasopressin mRNA trafficking and local translation in dendrites. *J Neuroendocrinol, 16*(4), 333-339.

Monshausen, M., Putz, U., Rehbein, M., Schweizer, M., DesGroseillers, L., Kuhl, D., . . . Kindler, S. (2001). Two rat brain staufen isoforms differentially bind RNA. *J Neurochem, 76*(1), 155-165.

Moumen A, Masterson P, O'Connor MJ, Jackson SP (2005). hnRNP K: an HDM2 target and transcriptional coactivator of p53 in response to DNA damage. *Cell, 123*(6), 1065-78.

Naisbitt, S., Kim, E., Tu, J. C., Xiao, B., Sala, C., Valtschanoff, J., . . . Sheng, M. (1999). Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron, 23*(3), 569-582.

Narayanan, U., Nalavadi, V., Nakamoto, M., Thomas, G., Ceman, S., Bassell, G. J., & Warren, S. T. (2008). S6K1 phosphorylates and regulates fragile X mental retardation protein (FMRP) with the neuronal protein synthesis- dependent mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling cascade. *J Biol Chem, 283*(27), 18478-18482.

Ohashi, S., Koike, K., Omori, A., Ichinose, S., Ohara, S., Kobayashi, S., . . . Anzai, K. (2002). Identification of mRNA/protein (mRNP) complexes containing Puralpha, mStaufen, fragile X protein, and myosin Va and their association with rough endoplasmic reticulum equipped with a kinesin motor. *J Biol Chem, 277*(40), 37804-37810.

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

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

Phelan, M. C., Rogers, R. C., Saul, R. A., Stapleton, G. A., Sweet, K., McDermid, H., . . . Kelly, D. P. (2001). 22q13 deletion syndrome. *Am J Med Genet, 101*(2), 91-99.

Plath, N., Ohana, O., Dammermann, B., Errington, M. L., Schmitz, D., Gross, C., . . . Kuhl, D. (2006). Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron, 52*(3), 437-444.

Pyeritz, R. E., Stamberg, J., Thomas, G. H., Bell, B. B., Zahka, K. G., & Bernhardt, B. A. (1982). The marker Xq28 syndrome ("Fragile-X Syndrome") in a retarded man with mitral valve prolapse. *Johns Hopkins Med J, 151*(5), 231-237.

Qurashi, A., Li, W., Zhou, J. Y., Peng, J., & Jin, P. (2011). Nuclear accumulation of stress response mRNAs contributes to the neurodegeneration caused by Fragile X premutation rCGG repeats. *PLoS Genet, 7*(6), e1002102. doi: 10.1371/journal.pgen.1002102

Reyniers, E., Vits, L., De Boulle, K., Van Roy, B., Van Velzen, D., de Graaff, E., . . . et al. (1993). The full mutation in the FMR-1 gene of male fragile X patients is absent in their sperm. *Nat Genet, 4*(2), 143-146.

Robertson, K. D., and Wolffe, A. P. (2000). DNA methylation in health and disease. Nat Rev Genet 1, 11-19.

Rook, M. S., Lu, M., & Kosik, K. S. (2000). CaMKII alpha 3' untranslated region- directed mRNA translocation in living neurons: visualization by GFP linkage. *J Neurosci, 20*(17), 6385-6393.

Schumann, E. M. (1999) mRNA trafficking and local protein synthesis at the synapse. *Neuron* 23, 645-648.

Schutt, J., Falley, K., Richter, D., Kreienkamp, H. J., & Kindler, S. (2009). Fragile X mental retardation protein regulates the levels of scaffold proteins and glutamate receptors in postsynaptic densities. *J Biol Chem, 284*(38), 25479-25487.

Sherman, S. L., Morton, N. E., Jacobs, P. A., & Turner, G. (1984). The marker (X) syndrome: a cytogenetic and genetic analysis. *Ann Hum Genet, 48*(Pt 1), 21-37.

Sherman, S. L., Jacobs, P. A., Morton, N. E., Froster-Iskenius, U., Howard- Peebles, P. N., Nielsen, K. B., . . . Watson, M. (1985). Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum Genet, 69*(4), 289-299.

Siomi, H., Siomi, M. C., Nussbaum, R. L., & Dreyfuss, G. (1993). The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. *Cell, 74*(2), 291-298.

Skoufias, D. A., Col, D. G., Wedaman, K. P., & Scholey, J. M. (1994). The carboxyl-terminal domain of kinesin heavy chain is important for membrane binding. *J Biol Chem, 269*(2), 1477-1485.

Snyder, E. M., Philpot, B. D., Huber, K. M., Dong, X., Fallon, J. R., & Bear, M. F. (2001). Internalization of ionotropic glutamate receptors in response to mGluR activation. *Nat Neurosci, 4*(11), 1079-1085.

Soltau, M., Berhorster, K., Kindler, S., Buck, F., Richter, D., & Kreienkamp, H. J. (2004). Insulin receptor substrate of 53 kDa links postsynaptic shank to PSD-95. *J Neurochem, 90*(3), 659-665.

Steward, O., & Levy, W. B. (1982). Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus. *J Neurosci, 2*(3), 284-291.

Sutcliffe, J. S., Nelson, D. L., Zhang, F., Pieretti, M., Caskey, C. T., Saxe, D., & Warren, S. T. (1992). DNA methylation represses FMR-1 transcription in fragile X syndrome. *Hum Mol Genet, 1*(6), 397-400.

Sutherland, G. R. (1977). Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. *Science, 197*(4300), 265-266.

Sutherland, G. R., Mulley, J. C., & Richards, R. I. (1993). Fragile X syndrome. The most common cause of familial intellectual handicap. *Med J Aust, 158*(7), 482-485.

Sutton, M. A., & Schuman, E. M. (2006). Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory. *Cell, 127*(1), 49-58.

Tanaka, K., Okamoto, S., Ishikawa, Y., Tamura, H., & Hara, T. (2009). DDX1 is required for testicular tumorigenesis, partially through the transcriptional activation of 12p stem cell genes. *Oncogene, 28*(21), 2142-2151.

Terracciano, A., Chiurazzi, P., & Neri, G. (2005). Fragile X syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet, 137C*(1), 32-37.

Tobaben, S., Sudhof, T. C., & Stahl, B. (2000). The G protein-coupled receptor CL1 interacts directly with proteins of the Shank family. *J Biol Chem, 275*(46), 36204-36210.

Toledano-Alhadef, H., Basel-Vanagaite, L., Magal, N., Davidov, B., Ehrlich, S., Drasinover, V., . . . Shohat, M. (2001). Fragile-X carrier screening and the prevalence of premutation and full-mutation carriers in Israel. *Am J Hum Genet, 69*(2), 351-360.

Uchino, S., & Waga, C. (2012). SHANK3 as an autism spectrum disorder- associated gene. *Brain Dev*. doi: 10.1016/j.braindev.2012.05.013

Verkerk, A. J., Pieretti, M., Sutcliffe, J. S., Fu, Y. H., Kuhl, D. P., Pizzuti, A., . . . et al. (1991). Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell, 65*(5), 905-914.

Wang, L. W., Berry-Kravis, E., & Hagerman, R. J. (2010). Fragile X: leading the way for targeted treatments in autism. *Neurotherapeutics, 7*(3), 264-274.

Welch, J. M., Lu, J., Rodriguiz, R. M., Trotta, N. C., Peca, J., Ding, J. D., . . . Feng, G. (2007). Cortico-striatal synaptic defects and OCD-like behaviours in Sapap3-mutant mice. *Nature, 448*(7156), 894-900.

Wickham, L., Duchaine, T., Luo, M., Nabi, I. R., & DesGroseillers, L. (1999). Mammalian staufen is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol, 19*(3), 2220-2230.

Wool, I. G. (1996). Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *Trends Biochem Sci, 21*(5), 164-165.

Zalfa, F., Eleuteri, B., Dickson, K. S., Mercaldo, V., De Rubeis, S., di Penta, A., . . . Bagni, C. (2007). A new function for the fragile X mental retardation protein in regulation of PSD-95 mRNA stability. *Nat Neurosci, 10*(5), 578-587.

Zalfa, F., Giorgi, M., Primerano, B., Moro, A., Di Penta, A., Reis, S., . . . Bagni, C. (2003). The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses. *Cell, 112*(3), 317-327

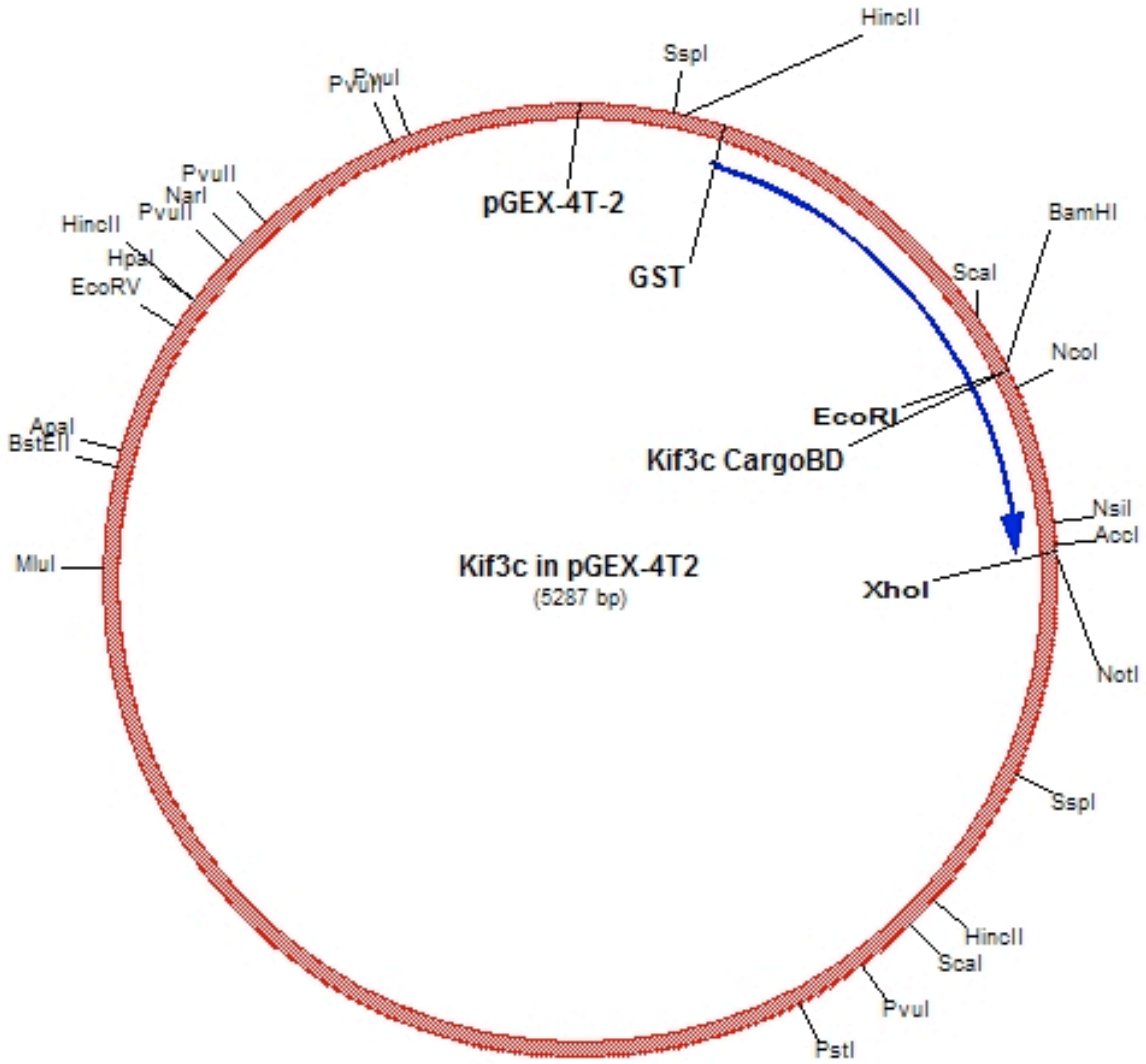
8. Anhang

8.1 Zusammensetzung der Puffer und Medien

2x BBS	50 mM BES 280 mM NaCl 1,5 mM Na2HPO4 pH 6,94 - 6,98 *Steril filtrieren*
Coomassie-Lösung:	40% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure 0,1% (w/v) Coomassie G-250
DEPC-Wasser:	100µl-1ml DEPC (DiethylenePyrocarbonate) in 1000ml tridestilliertes Wasser geben, kräftig schütteln, 24h bei 37°C inkubieren und 2-3x autoklavieren
5x DNA-Ladepuffer:	30% (v/v) Glycerin 40 mM Tris/HCl, pH 8.0 0,25% (w/v) Bromphenolblau
Elutionspuffer (Antikörper):	0,2 M Glycin 1 mM EGTA, pH 2.8
Elutionspuffer (GST):	50 mM Tris/HCl, pH 8.0 10 mM reduziertes Glutathion
Entfärbe-Lösung:	50% (v/v) Methanol 10% (v/v) Essigsäure
HEPES-Puffer:	119 mM NaCl 2,5 mM KCl 2 mM CaCl2 2 mMMgCl2 25 mM HEPES, pH 7.5 30 mM Glucose
5x KCM:	0,5 M KCl 0,15 M CaCl2 0,25 M MgCl2
5x Laemmli-Puffer:	50% (v/v) Glycerin 0,5 M DTT (Dithiothreitol) 7,5% (w/v) SDS 300 mM Tris/HCl, pH 6.8 Bromphenolblau
LB:	10 g/l Bacto-Pepton 10 g/l NaCl 10 g/l Hefe-Extrakt Für LB-Platten zusätzlich 15g/L Agar

10x PBS:	80 g/l NaCl 2 g/l KCl 14,4 g/l Na2HPO4 2,4 g/l KH2PO4 pH 7,3
RIPA-Puffer:	150 mM NaCl 50 mM Tris/HCl, pH 8.0 5 mM EDTA 0,5% (w/v) Natriumdeoxycholat 1% (v/v) NP-40 0,1% (w/v) SDS
SDS-Laufpuffer:	25 mM Tris/HCl 192 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
20x SSC:	3 M NaCl 0,3 M Tri-Natrium-Citrat x 2H2O pH 7.0
STE-Puffer:	50 mM NaCl 10 mM Tris/HCl, pH 8.0 1 mM EDTA
1x TAE-Puffer:	100 mM Tris/Acetat, pH 8.0 5 mM EDTA
10x TBE:	108 g/l Tris 55 g/l Borsäure 7,45 g/l EDTA
TBS-T:	150 mM NaCl 50 mM Tris/HCl, pH 7.9 0,2% (w/v) Tween-20
Transfer-Puffer:	92 mM Glycin 25 mM Tris/HCl 20% (v/v) Methanol 0,02% (w/v) ???SDS, oder?
Versene-Puffer:	1x PBS mit 0,5 mM EDTA

8.2 Verwendetes Expressionskonstrukt



SspI
HincII
GST
BamHI
NcoI
Kif3c CargoBD
AccI
NsiI
NotI

9. Danksagung

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

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp für die Überlassung des Themas, die fachliche Anleitung, die gute und engagierte Betreuung, seine Geduld und die Möglichkeit unvergessliche Erfahrungen zu sammeln.
Dem ehemaligen Institutsdirektor Herrn Prof. Dr. Andreas Gal danke ich für die Möglichkeit der Promotion in seinem Institut, der fachlichen Betreuung und der Begeisterung für das Fach Humangenetik auch im Rahmen des Wahltertials während meines Medizinstudiums.

Allen aktuellen und zum Teil ehemaligen Mitarbeitern und Doktoranden des Instituts für Humangenetik und der Arbeitsgruppe Kreienkamp und Kindler, insbesondere PD Dr. H.-J. Kreienkamp, Dr. rer. nat. Katrin Falley, Dr. rer. nat. Janin Ölschläger-Schütt und Hinne Hönck möchte ich für die stets hilfsbereite Einarbeitung einer laborunerfahrenen Medizindoktorandin in labortechnische Methoden, Vermittlung von Tipps und Tricks in der Durchführung der Laborarbeiten, sowie für die sehr schöne gemeinsame Zeit und gemeinsamen Pausen innerhalb und außerhalb des Labors danken!
Insgesamt waren die Monate in Vollzeit-Mitarbeit im Labor eine ganz tolle Zeit und Möglichkeit während meines Studiums einen so intensiven Einblick in die Grundlagenforschung zu bekommen, die ich nicht missen möchte.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner gesamten Familie!
Hier möchte ich besonders meinen Eltern für die jahrelange Motivation und Unterstützung jeglicher Art während meines Studiums danken.

Zu guter letzt möchte ich meinem Ehemann für die emotionale Unterstützung, die hilfreichen „fachfremden“ Meinungen, Ratschläge, Geduld, Motivation und all die Tipps danken, die man manchmal auf seinem beruflichen und persönlichen Weg braucht.

Eure Katharina.

10. Publikation

Teile dieser Arbeit wurden in der Fachzeitschrift *Traffic* veröffentlicht:

Shank1 mRNA: Dendritic Transport by Kinesin and Translational Control by the 5'Untranslated Region: Katrin Falley, Janin Schütt, Peter Iglauer, **Katharina Menke**, Christoph Maas, Matthias Kneussel, Stefan Kindler, Fred S. Wouters, Dietmar Richter and Hans-Jürgen Kreienkamp
Traffic. 2009 Jul;10(7):844-57. Epub 2009 Apr 11

11. 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.
Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Hamburg,

Katharina Steffens