

**FMRP reguliert die Aktinzytoskelett-Reorganisation durch das
Armadillo-Protein p0071**

Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Herrn Alexander Nolze

geb. am 13. Juli 1982 in Querfurt

Gutachter:

Prof. Dr. Mechthild Hatzfeld

Prof. Dr. Elmar Wahle

Prof. Dr. Michael Kiebler

Tag der öffentlichen Verteidigung: 12.02.2014

Meinen Eltern,

*„Man sieht nie, was schon getan wurde, man sieht immer
nur, was noch zu tun bleibt.“*

Marie Curie

1. EINLEITUNG.....	1
1.1. DAS FRAGILE-X-SYNDROM.....	1
1.2. DAS FRAGILE X MENTAL RETARDATION PROTEIN (FMRP).....	3
1.2.1. RNA-bindende Eigenschaften von FMRP	4
1.2.2. Effekte von FMRP auf die mRNA-Stabilität	7
1.2.3. Effekte von FMRP auf den mRNA-Transport	9
1.2.4. Effekte von FMRP auf die mRNA-Translation.....	10
1.2.5. Posttranslationelle Regulation von FMRP	14
1.2.6. Funktionsmodell von FMRP	15
1.3. DAS AKTINZYTOSKELETT.....	17
1.3.1. Die Regulation des Aktinzytoskeletts durch die kleinen Rho-GTPasen	18
1.4. P0071, EIN MITGLIED DER <i>ARMADILLO</i> -PROTEINFAMILIE	20
1.4.1. Funktionen von p0071	20
1.4.2. Regulation von p0071.....	22
1.5. ZIELSTELLUNG.....	23
2. MATERIAL UND METHODEN.....	24
2.1. MATERIALIEN	24
2.1.1. Chemikalien und Enzyme.....	24
2.1.2. Bakterienstämme	24
2.1.3. Zelllinien	25
2.2. METHODEN	26
2.2.1. Molekularbiologische Methoden.....	26
2.2.1.1. Isolation von RNA aus eukaryontischen Zellen	26
2.2.1.2. Reverse Transkription	26
2.2.1.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
2.2.1.4. Ortsgerichtete Mutagenese.....	28
2.2.1.5. Quantitative <i>real-time</i> -PCR (q-PCR)	28
2.2.1.6. Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	32
2.2.1.7. Reinigung von Nukleinsäuren.....	32
2.2.1.8. Restriktionsverdau von Nukleinsäuren	32
2.2.1.9. Klonierung von Expressionsplasmiden	33
2.2.1.10. Ligation.....	34
2.2.1.11. Herstellung Transformations-kompetenter Bakterien	34
2.2.1.12. Transformation von Plasmid-DNA	35
2.2.1.13. Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	35
2.2.1.14. Sequenzierung.....	36
2.2.1.15. <i>in-vitro</i> -Transkription	36
2.2.1.16. 5'-Markierung von Oligonukleotiden mit [γ - ³² P]-ATP	37
2.2.1.17. Primer Extension zur G-Quadruplex-Detektion.....	37
2.2.1.18. Polyacrylamid-Harnstoff-Gelelektrophorese	38

2.2.2. Biochemische Methoden	39
2.2.2.1. Herstellung von Zelllysaten	39
2.2.2.2. Proteinkonzentrationsbestimmung	39
2.2.2.3. Fällung von Proteinen	40
2.2.2.4. SDS-PAGE	40
2.2.2.5. Western Blot	41
2.2.2.6. Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen	42
2.2.2.7. Expression und Reinigung von MS2BP-MBP	42
2.2.2.8. Expression von GST-Fusionsproteinen	43
2.2.2.9. GST-pulldown-Analyse	44
2.2.2.10. Streptavidin-pulldown	45
2.2.2.11. Co-Immunpräzipitation von RNA-Liganden	45
2.2.2.12. mi-TRAP	47
2.2.2.13. Dichtegradientenzentrifugation	49
2.2.2.14. Reporter-Gen-Analysen	49
2.2.2.15. Statistische Auswertungen	50
2.2.3. Immunhistochemische Methoden	50
2.2.3.1. Immunfluoreszenz	50
2.2.3.2. Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH)	51
2.2.3.3. F-Aktin/G-Aktin-Messung	52
2.2.4. Zellbiologische Methoden	52
2.2.4.1. Kultivierung humaner und muriner Zellen	52
2.2.4.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen	52
2.2.4.3. Transfektion humaner und muriner Zellen	53
2.2.4.3.1. Kalziumphosphat-Methode	53
2.2.4.3.2. Lipofektion	54
2.2.4.4. Lentivirale Transduktion muriner Zellen	54
2.2.4.5. mRNA-Abbau-Analyse	55
2.2.4.6. Durchflusszytometrie	55
3. ERGEBNISSE	56
3.1. DER EINFLUSS VON FMRP AUF DIE ORGANISATION DES AKTINZYTOSKELETTS	56
3.1.1. Der Einfluss der FMRP-Expression auf die Morphologie der Zellen	56
3.1.1.1. Der Verlust von FMRP hat einen starken Einfluss auf die Organisation des Aktinzytoskeletts	56
3.1.1.2. Die Menge an F-Aktin, die Anzahl der Fokalkontakte und die Zellgröße sind in <i>Fmr1</i> -Zellklonen reduziert	59
3.1.2. Die Re-Expression von FMRP in den <i>Fmr1</i> -Zellklonen führt zu einem <i>rescue</i> des <i>Fmr1</i> +-Phänotyps	62
3.2. DER EINFLUSS VON FMRP AUF P0071	65
3.2.1. Proteine des Rho-Signalwegs zeigen ein differenzielles Expressionsmuster	65
3.2.2. Die p0071-mRNA ist ein FMRP-Zieltranskript	67
3.2.3. FMRP reguliert die p0071-mRNA-Translation	72

3.2.3.1.	FMRP reprimiert die Translation einer chimären p0071-mRNA	72
3.2.3.2.	Die p0071-mRNA wird in <i>Fmr1</i> -Zellen verstärkt translatiert	74
3.2.3.3.	FMRP bindet die zentrale Region der p0071-3'UTR.....	76
3.2.3.4.	FMRP bindet G- und U-reiche Sequenzbereiche in der p0071-3'UTR.....	78
3.2.3.5.	Der Phosphorylierungsstatus von FMRP beeinflusst die Translationsrepression der p0071-mRNA.....	83
3.2.4.	FMRP moduliert die Aktin-Organisation durch die Kontrolle der p0071-Expression	85
3.2.5.	FMRP beeinflusst die Lokalisation der p0071-mRNA	88
3.3.	EINFLUSS VON FMRP AUF DIE KLEINEN RHO-GTPASEN	90
3.3.1.	Die FMRP-Expression beeinflusst die Rho-GTPase-Aktivität	90
3.3.2.	Die Expression von Rho-GTPase-Mutanten verändert die Phänotypen von <i>Fmr1</i> + und <i>Fmr1</i> -Zellen	94
3.4.	DIE EINFLÜSSE VON FMRP UND P0071 AUF DAS NEURITENWACHSTUM	97
3.4.1.	Die Neuroblastoma-Zelllinie Neuro-2a als Modellsystem.....	97
3.4.2.	Die p0071-mRNA lokalisiert in den Wachstumskegeln von Neuriten.....	97
3.4.3.	Die p0071-mRNA-Lokalisation ist von KIF3C abhängig.....	100
3.4.4.	p0071 lokalisiert im Soma und in den Wachstumskegeln von Neuro-2a-Zellen	102
3.4.5.	p0071 und FMRP modulieren das Neuritenwachstum in Neuro-2a-Zellen	103
4.	DISKUSSION	107
4.1.	EINFLUSS VON FMRP UND P0071 AUF DAS AKTINZYTOSKELETT	107
4.2.	EINFLUSS VON FMRP AUF DIE P0071-MRNA	113
4.2.1.	Bindung der p0071-mRNA durch FMRP.....	114
4.2.2.	Translationsrepression der p0071-mRNA durch FMRP	117
4.2.3.	Regulation der p0071-mRNA-Stabilität durch FMRP	120
4.3.	FUNKTIONSMODELL	122
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	125
6.	LITERATURVERZEICHNIS	127
7.	ANHANG	I
7.1.	ERGÄNZENDE ERGEBNISSE.....	I
7.2.	VERWENDETE GERÄTE	II
7.3.	VERWENDETE ANTIKÖRPER	II
7.4.	VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDE	IV
7.5.	VERWENDETE PLASMIDE UND siRNAs.....	VI
7.6.	VERWENDETE FISH-SONDEN.....	VIII
7.7.	VERWENDETE KIT-SYSTEME.....	IX
7.8.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IX
7.9.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XI

7.10. TABELLENVERZEICHNIS XIII

1. Einleitung

1.1. Das Fragile-X-Syndrom

Das Fragile-X-Syndrom (FXS), früher bekannt als Martin-Bell-Syndrom (MARTIN AND BELL, 1943), wurde erstmals 1943 beschrieben. Es ist die am häufigsten auftretende vererbte mentale Retardation und tritt meistens in Form einer Autismus-Spektrumstörung mit einer Frequenz von 1:4000 bei Männern und mit einer von 1:6000 bei Frauen auf (PENAGARIKANO *et al.*, 2007). FXS ist eine X-chromosomal gekoppelte Störung und ist für ihr ungewöhnliches Vererbungsmuster bekannt. Dabei steigt die Anfälligkeit, das mutierte Gen zu tragen, von Generation zu Generation (SHERMAN *et al.*, 1985). Durch die Entdeckung eines fragilen Bereiches am Ende des X-Chromosoms in verschiedenen betroffenen Patienten wurde der erste Beweis hinsichtlich des molekularen Ursprungs vom Fragilen-X-Syndrom erhalten (LUBS, 1969; SUTHERLAND, 1977). Erst 1991 konnte dieser Bereich im Genom lokalisiert werden (VERKERK *et al.*, 1991) und mit expandierten CGG-Trinukleotid-Wiederholungen in der 5'UTR (untranslatierten Region) des Gens *Fragile X mental retardation 1 (Fmr1)* in Zusammenhang gebracht werden.

Somit war FXS das erste Beispiel für eine sogenannte Trinukleotid-Wiederholung-Expansionsmutation. In normalen Populationen ist die CGG-Wiederholung polymorph und reicht von 5 bis 55 CGGs mit einer durchschnittlichen Länge von 30 CGG-Einheiten (FU *et al.*, 1991). In Patienten mit Fragilem-X-Syndrom ist die Anzahl der CGG-Wiederholungen auf mehr als 200 expandiert, was auch als Vollmutation bezeichnet wird. Dabei sind die CGGs hypermethyliert und die Methylierung breitet sich bis auf die benachbarte Promotorregion des *Fmr1*-Gens aus (VERKERK *et al.*, 1991; OBERLE *et al.*, 1991; SUTCLIFFE *et al.*, 1992). Als Konsequenz davon ist das Gen transkriptionell stillgelegt und das *Fmr1*-Genprodukt, das *Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP)*, wird nicht exprimiert.

Patienten mit FXS haben eine besondere physische Erscheinung mit großen Ohren, einem verlängerten Gesicht und einem stark gewölbten Gaumen. Andere Symptome sind zum Beispiel Skoliosen, flache Füße und Makroorchidismus bei Jungen (JACQUEMONT *et al.*, 2007). Außerdem sind ein weites Spektrum an kognitiven Beeinträchtigungen und Verhaltensstörungen charakteristisch für FXS-Patienten. Dazu gehören soziale Angst, sensorische Hypersensitivität, stereotypisches Verhalten und schwach entwickelte motorische Koordination (BELMONTE und BOURGERON 2006; HERNANDEZ *et al.*, 2009).

Zudem kommt es zu starken geistigen Entwicklungsverzögerungen und Epilepsie (BERRY-KRAVIS, 2002). Dabei ist allgemein anerkannt, dass ein Großteil der neurologischen Symptome des Fragilen-X-Syndroms durch eine Veränderung der synaptischen Plastizität¹ zu Stande kommen (MARTIN *et al.*, 2000). Diese ist essenziell für Prozesse wie die Konsolidierung und die Speicherung von Langzeiterinnerungen und umfasst unter anderem die Langzeitdepression (LTD). Diese beschreibt eine aktivitätsabhängige Verringerung der Effektivität der synaptischen Signalübertragung in Folge von Synapsenabbau (HAAS *et al.*, 2011). Die LTD wird durch die Aktivierung von Gruppe-I-metabotropen-Glutamaterezeptoren (mGluRs) ausgelöst und resultiert, nach lokaler Proteinsynthese synaptisch lokalisierter, dendritischer mRNAs, in der verringerten Oberflächenexpression von α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure-Rezeptoren (AMPA) (SONG UND HUGANIR, 2002).

Die mGluR-Theorie des FXS besagt, dass FMRP in einem Signalweg *downstream* der mGluRs aber *upstream* der lokalen Proteinsynthese agiert. Dabei reprimiert FMRP die Translation bestimmter mRNAs im Basalzustand, aber erlaubt die lokale Translation nach Aktivierung von mGluRs (HUBER *et al.*, 2000). Die erhöhte Proteinsynthese wiederum ist wichtig für die AMPAR-Internalisierung und die LTD (BEAR *et al.*, 2004). Hingegen kommt es beim Fragilen-X-Syndrom, wenn FMRP nicht exprimiert wird, zu einer unkontrollierten Proteinsynthese mit hyperaktivierter AMPAR-Internalisierung und einer verstärkten LTD, selbst bei fehlender mGluR-Stimulation. Somit ist die dauerhaft erhöhte mGluR-LTD zusammen mit der deregulierten Proteinsynthese Hauptgrund für die mentale Retardation im Fragilen-X-Syndrom (HOU *et al.* 2006, NOSYREVA und HUBER, 2006).

Trotz der schweren Verhaltensstörungen konnten in *post-mortem*-Studien an Gehirnen von Patienten mit Fragilem-X-Syndrom nur geringfügige Abnormalitäten gefunden werden (REISS *et al.*, 1995; HALLAHAN *et al.*, 2011). Dazu zählen Fehlentwicklungen der dendritischen Dornen². Sie erscheinen länger und dünner als normal, höchstwahrscheinlich durch eine Reifungsstörung und verzögerte Dornendynamik (IRWIN *et al.*, 2001; CRUZ-MARTÍN *et al.*, 2010).

Um die phänotypischen Veränderungen besser erforschen zu können, wurde ein *Fmr1-knockout*-Maus-Modell generiert (*Fmr1*-KO), in welchem ein Teil des *Fmr1*-Gens deletiert ist. Dadurch konnte ein FMRP-Expressionsverlust, ähnlich wie beim Fragilen-X-Syndrom, nachgeahmt werden (BAKKER *et al.*, 1994). Die *Fmr1*-KO-Maus und andere

¹ aktivitätsabhängige Veränderung der synaptischen Signalübertragung

² spezialisierte postsynaptischen Kompartimente, die einen Großteil der Signale exzitatorischer Synapsen vermitteln

Tiermodelle wurden eingehend charakterisiert. In Verbindung mit weiteren *in-vitro*-Studien lieferten diese wichtige Erkenntnisse zur potenziellen Rolle von FMRP in der Pathophysiologie des Fragilen-X-Syndroms.

1.2. Das Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP)

Wie bereits erwähnt, wird FMRP durch das *Fmr1*-Gen codiert. Es gibt mindestens 12 verschiedene Spleißvarianten mit einem Molekulargewicht zwischen 67 und 80 kDa. (DEVYS *et al.*, 1993). Deren Expression scheint nicht gewebespezifisch zu sein, da verschiedene Gewebe das gleiche Expressionsmuster zeigen (VERKERK *et al.*, 1993). Das alternative Spleißen betrifft die Exons 12, 14, 15 und 17 (siehe Abb. 1-1). Der am häufigsten exprimierten Isoform von FMRP fehlt das Exon 12, der Isoform mit der niedrigsten Expression fehlt das Exon 14 (SITTLER *et al.*, 1996).

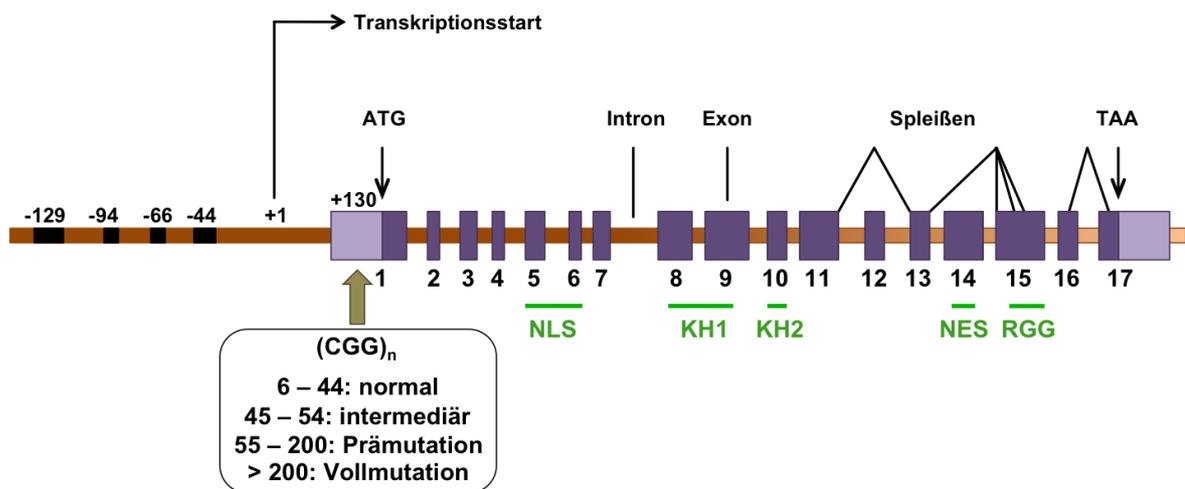


Abb. 1-1: Schematische Übersicht über das *Fragile X mental retardation 1*-Gen (*Fmr1*). Das *Fmr1*-Gen besteht aus 17 Exons, die alternativem Spleißen unterzogen werden. Die CGG-Wiederholungen befinden sich im untranslatierten Bereich des Exons 1. Mehr als 200 CGGs führen zur Promotor-Methylierung und zur transkriptionellen Stilllegung des Gens. Die Lokalisation der Domänen des normal exprimierten Proteins sind in grün angegeben (modifiziert nach PENAGARIKANO *et al.*, 2007).

FMRP lokalisiert vorwiegend im Zytoplasma, jedoch konnte die Isoform ohne Exon 14 im Nukleus nachgewiesen werden. Dies ist übereinstimmend mit der Identifikation eines nukleären Exportsignals (NES) im Exon 14. FMRP enthält zudem ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) in den Exons 5 und 6, was zeigt, dass sich FMRP zwischen Nukleus und Zytoplasma bewegen kann (FENG *et al.*, 1997b).

Darüber hinaus zeigt FMRP Sequenzmotive, die für RNA-bindende Proteine charakteristisch sind. Es besitzt zwei heterogene nukleäre Ribonukleoprotein-K-Homologie-Domänen (KH-Domänen) in den Exons 8, 9 und 10, eine Arginin-Glycin-Glycin-Box (RGG-Box) in Exon 15 (ASHLEY *et al.*, 1993) und eine RNA-Bindedomäne in der aminoterminalen Region (ADINOLFI *et al.*, 2003). *In vitro* bindet FMRP ungefähr 4% aller mRNAs im fötalen humanen Gehirn, seine eigene mRNA eingeschlossen (ASHLEY *et al.*, 1993).

FMRP kann in einer RNA-abhängigen Weise mit Polyribosomen assoziieren. Dies geschieht durch *messenger* Ribonukleoprotein-Partikel (mRNPs) mit einer Größe um 660 kDa. Sie enthalten unter anderem die zwei FMRP-Homologen *Fragile X Related Protein 1* (FXR1P) und FXR2P (ZHANG *et al.*, 1995). FXR1P und FXR2P zeigen eine 86%ige und 70%ige Sequenzhomologie zu FMRP und besitzen zudem die gleichen funktionellen Domänen. Sie lokalisieren hauptsächlich im Zytoplasma und bilden dort einen gemeinsamen Proteinkomplex mit Polysomen. Zusätzlich interagieren auch das *nuclear FMRP interacting protein* (NUFIP), das *cytoplasmic FMRP interacting protein* (CYFIP), das *82-kD FMRP interacting protein* (82-FIP), Nucleolin und der Y-Box Faktor 1/p50 (YB1/p50) mit FMRP (BARDONI *et al.*, 1999; 2003; CEMAN *et al.*, 1999; CEMAN *et al.*, 2000; SCHENCK *et al.*, 2001).

Die biologische Signifikanz der RNA-Bindeeigenschaften und der polyribosomalen Assoziation von FMRP-mRNPs kann in Zellen von FXS-Patienten, die eine *missense*-Mutation (I304N) in der KH2-Domäne besitzen, beobachtet werden (DE BOULLE *et al.*, 1993). Die Mutation verhindert die korrekte Faltung der KH2-Domäne wodurch das mutierte FMRP (I304N) nicht mehr mit aktiv translatierenden Polyribosomen assoziieren kann (SIOMI *et al.*, 1994; VERHEIJ *et al.*, 1995; FENG *et al.*, 1997a).

1.2.1. RNA-bindende Eigenschaften von FMRP

Essenzielle Informationen über die Funktion von FMRP lieferten zahlreiche Arbeiten, die sich auf die Identifizierung von FMRP-Zieltranskripten fokussierten. Diese Untersuchungen umfassten FMRP-Immunpräzipitationen gefolgt von *microarray*-Analysen co-präzipitierter mRNAs (BROWN *et al.*, 2001) und Hochdurchsatz-Sequenzierungen von durch vernetzte Immunpräzipitation isolierten RNAs (HITS-CLIP, (DARNELL *et al.*, 2011)). Außerdem zählten dazu photoaktivierte Ribonukleosid-verstärkte Vernetzung und Immunpräzipitation (PAR-CLIP, (ASCANO *et al.*, 2012)) sowie Hefe-3-Hybrid-Analysen (ZOU *et al.*, 2008). Die Experimente führten zur Identifizierung von

hundertens putativen mRNAs, die für Proteine mit entscheidenden Rollen in neuronaler Funktion, synaptischer Plastizität und Neuronenreifung codieren (Tab. 1, modifiziert nach SANTORO *et al.* 2012). Bis heute sind jedoch nur 14 dieser Zieltranskripte durch biochemische Untersuchungen validiert. Dabei gehören die α -CaMKII, Arc, Map1b, Sapap4 und die PSD-95-mRNAs zu den am besten charakterisierten FMRP-Zieltranskripten (BASSELL und WARREN, 2008).

Tab. 1: Validierte FMRP-Zieltranskripte^a.

mRNA	G-Quadruplex ähnliche Struktur ^b	Nachweis ^c	beschrieben durch
APP	+	Co-IP	WESTMARK und MALTER, 2007
Arc	–	Co-IP	PARK <i>et al.</i> , 2008
α -CaMKII	–	Co-IP	ZALFA <i>et al.</i> , 2003; HOU <i>et al.</i> , 2006; MUDDASHETTY <i>et al.</i> , 2007; KAO <i>et al.</i> , 2010
eEF1A	–	Co-IP, <i>in vitro</i>	HUANG <i>et al.</i> 2005
Fmr1	+	<i>in vitro</i>	WEILER <i>et al.</i> , 1997; SCHAEFFER <i>et al.</i> , 2001; ANTAR <i>et al.</i> , 2005
GABA ₁ δ	–	APRA, <i>in vitro</i>	MIYASHIRO <i>et al.</i> , 2003
GluR _{1/2}	–	Co-IP	MUDDASHETTY <i>et al.</i> , 2007
hASH1	– ^d	<i>in vitro</i>	FÄHLING <i>et al.</i> , 2009
Map1b	+	Co-IP, <i>in vitro</i> , biophysikalisch	BROWN <i>et al.</i> , 2001; DARNELL <i>et al.</i> , 2001; HOU <i>et al.</i> , 2006; MENON <i>et al.</i> , 2008
PSD-95	+	Co-IP, <i>in vitro</i>	TODD <i>et al.</i> , 2003; ZALFA <i>et al.</i> , 2007; MUDDASHETTY <i>et al.</i> , 2007
Rgs5	–	APRA, <i>in vitro</i>	MIYASHIRO <i>et al.</i> , 2003; DICTENBERG <i>et al.</i> , 2008
Sapap3/4	–	Co-IP	BROWN <i>et al.</i> 2001; DICTENBERG <i>et al.</i> 2008
Sema3F	+	Co-IP, biophysikalisch	DARNELL <i>et al.</i> , 2001; MENON und MIHAILESCU, 2007
Sod1	– ^e	<i>in vitro</i>	BECHARA <i>et al.</i> , 2009

^aMindestens 14 FMRP-Zieltranskripte wurden auf biochemischen Weg bestätigt. Einige enthalten G-Quadruplexe, andere enthalten verschiedene Sekundärstrukturen und U-reiche Sequenzen bzw. wurde deren Sekundärstruktur nicht untersucht. Plus (+) kennzeichnet einen direkten experimentellen Beweis, Minus (–) kennzeichnet das Fehlen eines direkten Beweises, unklare Ergebnisse oder Gegenbeweise.

^bEinige Zieltranskripte enthalten putative G-Quadruplexe oder G-reiche Regionen, welchen die als anerkannt geltende G-Quadruplex Konsensussequenz fehlt; sie werden als G-Quadruplex-ähnlich bezeichnet.

^cVerschiedene *in-vivo*-Methoden wurden zur Validierung der FMRP-mRNA-Interaktionen genutzt; Co-Immünpräzipitation (Co-IP), Antikörper-positionierte RNA-Amplifikation (APRA) und weitere. *In-vitro*-Methoden beinhalten Filterbindungsstudien, *gel-shift-assays*, Affinitätsaufreinigung und UV-Quervernetzung.

^dhASH1-mRNA enthält eine U-reiche Region, welche die FMRP-Bindung vermittelt.

^eSod1-mRNA enthält das erste Beispiel für die SoSLIP-Struktur, wodurch die Bindung an FMRP stattfindet.

Hinsichtlich der Bindung von FMRP an die Zieltranskripte unterscheidet man zwei verschiedene Mechanismen. Einerseits erkennt FMRP seine Zieltranskripte direkt. Dabei spielt die RGG-Box von FMRP eine entscheidende Rolle. Sie bindet sogenannte G-

Quadruplexe (DARNELL *et al.*, 2001). Dabei werden vier Guanine durch Wasserstoffbrückenbindungen in einer planaren Konformation stabilisiert (Abb. 1-2 A). Die meisten in den bereits genannten Studien identifizierten FMRP-Zieltranskripte enthalten potenzielle G-Quadruplex-Strukturen. So konnte eine G-Quadruplex-vermittelte Interaktion von FMRP mit den *Fmr1*-, *Map1b*- und *Sema3F*-mRNAs über biochemische Analysen bestätigt werden (SCHAEFFER *et al.*, 2001; MENON und MIHAILESCU, 2007; MENON *et al.*, 2008). FMRP co-präzipitiert auch mit einer G-reichen Region in der *Amyloid Precursor Protein*-mRNA (APP-mRNA), die in der Lage ist, eine dem G-Quadruplex ähnliche Struktur zu bilden (WESTMARK und MALTER, 2007). Im Gegensatz dazu konnte FMRP auch in Gegenwart von Lithium, welches die FMRP-G-Quadruplex-Interaktionen zerstört (CHEN *et al.*, 2003), an das putative G-Quadruplex in der 3'UTR der PSD-95-mRNA binden (DARNELL *et al.*, 2001).

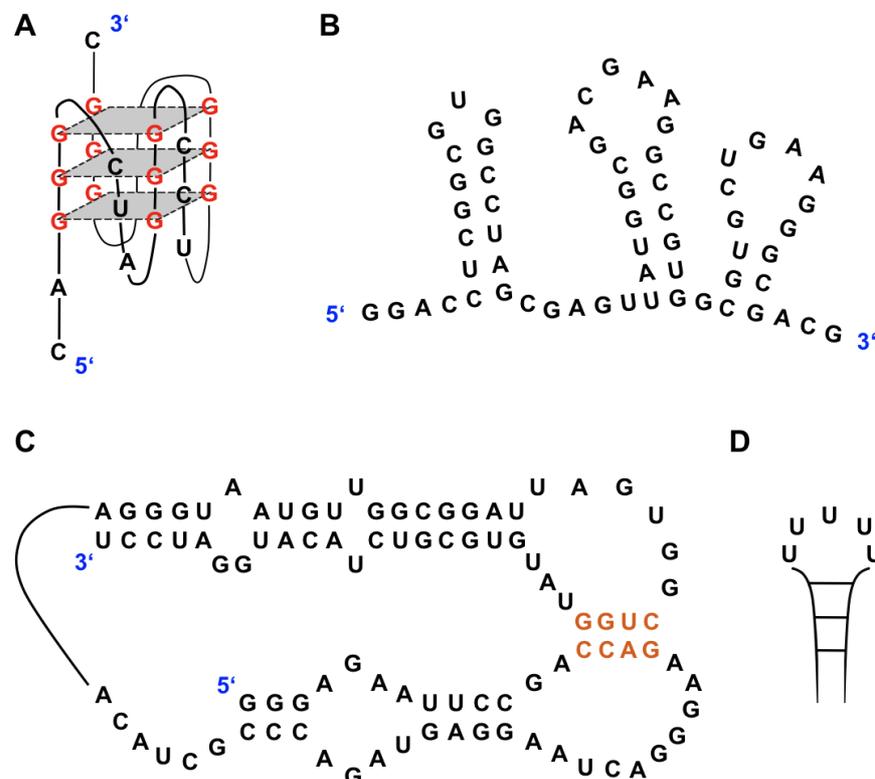


Abb. 1-2: Schematische Darstellung der von FMRP erkannten RNA-Strukturen. (A) paralleles G-Quadruplex, (B) SoSLIP (*Sod1* mRNA Stem Loops Interacting with FMRP), (C) „kissing complex“ und (D) das U-Pentamer modifiziert nach PENAGARIKANO *et al.*, 2007).

In der *Sod1*-mRNA erkennt FMRP direkt ein spezielles RNA-Strukturmotiv, das sogenannte SoSLIP (*Superoxide dismutase 1 (Sod1) mRNA Stem Loops Interacting with FMRP*), (Abb. 1-2 B). Dabei handelt es sich um eine dreifache stem-loop-Struktur, die durch kurze Sequenzen voneinander getrennt ist (BECHARA *et al.*, 2009). Eine andere

Gruppe von RNA-Liganden enthält U-reiche Sequenzen mit 5 bis 23 Basen langen sich wiederholenden U-Pentameren (Abb. 1-2 D, (CHEN *et al.*, 2003)). So assoziiert FMRP mit der U-reichen Region in der 5'UTR der hASH1-mRNA (FÄHLING *et al.*, 2009).

Außerdem ist bekannt, dass die KH2-Domäne von FMRP eine komplexe RNA-Tertiärstruktur, den sogenannten Schleifen-Schleifen-Pseudoknoten oder „*kissing complex*“ direkt bindet (DARNELL *et al.*, 2005) (Abb. 1-2 C). Der „*kissing complex*“ wurde durch eine Auswahl zufällig synthetisierter RNAs gebildet, aber noch nicht an endogenen mRNAs nachgewiesen. Möglicherweise bildet sich dieser Komplex *in vivo* nur, wenn zwei RNA-Moleküle interagieren und ist somit für die Assoziation des Zieltranskripts mit Adapter-RNAs oder miRNAs relevant (SANTORO *et al.*, 2012).

Auf der anderen Seite können aber auch indirekte, komplexere Interaktionen zwischen FMRP und seinen Zieltranskripten stattfinden. So konnten neuere Daten die Beteiligung FMRPs am miRNA-Signalweg nachweisen. miRNAs (microRNAs) sind kurze (21 Nukleotide), nicht-codierende regulatorische RNAs, welche die Genexpression partiell homologer mRNAs durch Translationsrepression modulieren. Sie werden aus längeren RNAs durch das RNase III-Enzym Dicer prozessiert und in einen RNA-induzierten Stilllegungskomplex (*RNA-induced silencing complex* (RISC)) eingebaut. Dieser vermittelt die Interaktion zwischen miRNAs und ihren Zieltranskripten. FMRP assoziiert dabei mit mehreren Komponenten, sowohl den miRNAs als auch mit Proteinen aus dem RISC (JIN *et al.*, 2004).

Zusammenfassend bindet FMRP also mRNAs, nicht-codierende RNAs und miRNAs (ZALFA *et al.*, 2003; GABUS *et al.*, 2004; JOHNSON *et al.*, 2006; ZALFA und BAGNI, 2005; EDBAUER *et al.*, 2010). Dabei regulieren FMRP-mRNPs die Stabilität, die Lokalisation oder die Translation der durch FMRP gebundenen mRNAs (BAGNI und GREENOUGH, 2005; DE RUBEIS und BAGNI, 2010).

1.2.2. Effekte von FMRP auf die mRNA-Stabilität

Die mRNA-Stabilität ist ein stark regulierter posttranskriptioneller Schritt, der eng mit der mRNA-Translation koordiniert ist. Normalerweise produzieren *housekeeping*-Gene unveränderlich stabile Transkripte, während der Umsatz anderer mRNAs einer strikten Regulation unterliegt, um die Genexpression bestimmten zellulären und entwicklungsspezifischen Stimuli anzupassen. Viele mRNAs besitzen eine schnelle Abbaurrate, was in einem niedrigen *steady-state*-Level des Proteins unter basalen Bedingungen resultiert. Nach einer Stimulation wird die Produktion der mRNAs rasch

durch Transkriptionsaktivierung induziert und eine mäßige Mengenerhöhung führt zu einer signifikanten Variation ihrer Expression (KHABAR, 2007).

Neuere Daten belegen, dass FMRP die mRNA-Halbwertszeit, entweder durch Stimulation oder Inhibierung des mRNA-Abbaus, regulieren kann (DE RUBEIS und BAGNI, 2010). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die mRNA-Menge beeinflusst ist, wenn die FMRP-Expression verloren gegangen ist. So fanden Brown *et al.* in einer Hochdurchsatzstudie zur Identifizierung neuer FMRP-Zieltranskripte eine Veränderung in der Expression von 144 mRNAs in Lymphoblastoid-Zellen von Patienten mit Fragilem-X-Syndrom (BROWN *et al.*, 2001). In einer anderen Studie identifizierten Miyashiro *et al.* im Gehirn einige der gleichen mRNAs wie Brown *et al.* und beschrieben deren Expressionsmuster (BROWN *et al.*, 2001; MIYASHIRO *et al.*, 2003). Dabei waren drei von 11 mRNAs (p40/LRP, DAG1 und GRK4) im Hippocampus von *Fmr1*-KO-Mäusen in ihrer Menge im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen reduziert.

Der FMRP-Verlust beeinflusst auch die Expression von mRNAs, welche den GABA_A-Rezeptor codieren. So ist die mRNA-Menge der δ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors in Neuronen von FMRP-defizienten Mäusen reduziert (MIYASHIRO *et al.*, 2003; GANTOIS *et al.*, 2006; DICTENBERG *et al.*, 2008). Dabei wirkt FMRP als neuronaler mRNA-stabilisierender Faktor. In diesem Kontext sind die mRNAs, welche 8 von 12 bekannten GABA-Untereinheiten codieren, im Cortex aber nicht im Cerebellum von *Fmr1*-KO-Mäusen signifikant in ihrer Expression reduziert ((IDRISSI *et al.*, 2005; D'HULST *et al.*, 2006).

Ein direkt in seiner Stabilität reguliertes FMRP-Zieltranskript ist die PSD-95-mRNA. (ZALFA *et al.*, 2007). Die PSD-95-mRNA codiert ein wichtiges Gerüstprotein der Signaltransduktionsmaschinerie an glutamatergen Synapsen (KIM und SHENG, 2004). Weil PSD-95 beides, die Struktur und die Funktion dendritischer Dornen beeinflusst, können Veränderungen in der PSD-95-Expression zu den kognitiven Beeinträchtigungen, die durch den FMRP-Verlust ausgelöst werden, beitragen (MIGAUD *et al.*, 1998; VICKERS *et al.*, 2006). Dabei schützt FMRP die PSD-95-mRNA im Hippocampus spezifisch vor Abbau. Dieser stabilisierende Effekt von FMRP kann durch neuronale Aktivität verstärkt werden, wie zum Beispiel durch die Stimulation von metabotropen Glutamatrezeptoren mit (S)-3,5-Dihydroxyphenylglycin (DHPG) (ZALFA *et al.*, 2007). Somit besitzt FMRP einen ortsspezifischen Effekt auf die PSD-95-mRNA-Stabilität (MUDDASHETTY *et al.*, 2007; TODD *et al.*, 2003). Der den PSD-95-mRNA-Umsatz regulierenden FMRP-Komplex wurde bis jetzt aber noch nicht identifiziert.

Außerdem reguliert FMRP die Stabilität der Nxf1-mRNA (ZHANG *et al.*, 2007). Diese Nxf1-mRNA codiert für die große Untereinheit des mRNP-Exportrezeptors, der am Transport reifer Transkripte aus dem Nukleus ins Zytoplasma beteiligt ist. NXF1 ist zusammen mit NXF2 (als FMRP-Bindungspartner identifiziert) die vorherrschende Komponente der Familie nukleärer Exportfaktoren (LAI *et al.*, 2006). Zhang *et al.* zeigten, dass der Umsatz der Nxf1-mRNA nach NXF2 Überexpression in der murinen Neuroblastoma-Zelllinie Neuro-2a erhöht und somit die Nxf1-mRNA-Mengen reduziert sind. Weil dieser Effekt aber durch FMRP-Verlust aufgehoben werden konnte, wird FMRP in diesem Falle ein degradationsstimulierender Effekt, der durch NXF2 induziert wird, zugeschrieben (ZHANG *et al.*, 2007).

FMRP übernimmt somit, vorwiegend im Gehirn, wichtige Funktionen in der Regulation des mRNA-Umsatzes (GABA₁δ-mRNA) und der mRNA-Stabilität (PSD-95- und Nxf1-mRNA).

1.2.3. Effekte von FMRP auf den mRNA-Transport

FMRP kann neben der mRNA-Stabilität auch die Lokalisation von mRNAs in subzellulären Domänen, wie zum Beispiel in Dendriten oder dendritischen Dornen, regulieren. Die RNA-Lokalisation ist in vielen Zelltypen für die Etablierung und Aufrechterhaltung der Polarität essenziell (ERDÉLYI *et al.*, 1995). FMRP lokalisiert entlang des dendritischen Schafts an der Basis der dendritischen Dornen (FENG *et al.*, 1997a; ANTAR *et al.*, 2004; FERRARI *et al.*, 2007), sowie in Wachstumskegeln und in reifen Axonen (ANTAR *et al.*, 2006; PRICE *et al.*, 2006; CENTONZE *et al.*, 2008). Das Protein konnte in dynamischen RNA-Partikeln, welche vom Soma zu den Dendriten und Axonen wandern, nachgewiesen werden (DE DIEGO OTERO *et al.*, 2002). Es wird angenommen, dass diese RNA-Partikel während des Transports translationell reprimierte mRNPs sind. Sie sind in ihrer Zusammensetzung sehr heterogen. *Processing-bodies* (*P-bodies*) und *stress-granules* enthalten die gestoppte Translationsinitiationsmaschinerie, zum Beispiel ribosomale Untereinheiten, mRNAs und Proteine. Dagegen beinhalten Partikel mit sehr hoher Dichte auch die translationell gestoppte Elongationsmaschinerie (Polyribosomen und ribosomale Aggregate) (ANDERSON und KEDERSHA, 2006; KIEBLER und BASSELL, 2006). FMRP-mRNPs konnten in allen drei Typen dieser RNA-Partikeln nachgewiesen werden (MAZROUI *et al.*, 2002; ASCHRAFI *et al.*, 2005; BARBEE *et al.*, 2006; MAGHSOODI *et al.*, 2008).

Der Transport dieser FMRP-mRNP-positiven Partikel ist mikrotubuliabhängig. In Säugern interagiert FMRP dazu mit den Motorproteinen Kinesin 5 (KIF5) und Kinesin 3C (KIF3C) (KANAI *et al.*, 2004; DAVIDOVIC *et al.*, 2007; DICTENBERG *et al.*, 2008). In *Drosophila* hingegen wurde FMRP zusammen mit Kinesin und Dynein gefunden (LING *et al.*, 2004). In einem durch Dichtenberg *et al.* vorgeschlagenen Modell, interagiert FMRP nach DHPG-Stimulation effizienter mit der Kinesin-leichten-Kette, der Hauptuntereinheit zur Cargo-Bindung von KIF5, und verstärkt somit die aktivitätsabhängige Lokalisation der gebundenen mRNAs. Deshalb ist die stimulus-induzierte Lokalisation einiger mRNAs wie Map1b, α -CaMKII und Sapap4 in hippocampalen Neuronen von *Fmr1*-KO-Mäusen beeinträchtigt (KRICHEVSKY und KOSIK, 2001; BRAMHAM und WELLS, 2007; DICTENBERG *et al.*, 2008).

So konnte eine erhöhte synaptische Verteilung von FMRP durch Aktivierung von mGluRs nachgewiesen werden. Dies ist einhergehend mit der Beobachtung, dass der dendritische Transport der *Fmr1*-mRNA nach DHPG-Stimulation verstärkt und FMRP in geringer Entfernung zu mGluRs neu synthetisiert wird (ANTAR *et al.*, 2004; FERRARI *et al.*, 2007; KAO *et al.*, 2010). Zudem wurde eine reduzierte Bewegungsgeschwindigkeit von dendritischen, *Fmr1*- und α -CaMKII-mRNA-enthaltenden Partikeln, 0 bis 40 min nach DHPG-Stimulation nachgewiesen, wahrscheinlich durch das „Andocken“ dieser mRNAs an die dendritischen Dornen.

Damit übereinstimmend ist, dass sich die Verteilung der α -CaMKII-mRNA nach DHPG-Behandlung in den umgebenden Dendriten erhöhte. Beide Effekte sind in FMRP-defizienten Neuronen aufgehoben (KAO *et al.*, 2010). FMRP trägt somit nicht nur zum mRNA-Transport entlang der Dendriten, sondern auch zum aktivitäts-induzierten „Andocken“ der mRNAs an die dendritischen Dornen bei.

1.2.4. Effekte von FMRP auf die mRNA-Translation

Die bereits erwähnte Anwesenheit von FMRP in *P-bodies*, *stress-granules* und hochdichten Partikeln impliziert, dass das Protein verschiedene Funktionen in der Translationsregulation ausüben kann (CEMAN *et al.*, 2003; ZALFA *et al.*, 2006). Wie FMRP die Translation seiner Zieltranskripte reguliert, ist bis jetzt nicht im Detail verstanden. Aber es gibt Hinweise, dass FMRP sowohl als translationeller Repressor als auch als Aktivator fungieren kann.

Die FMRP-vermittelte Translationsrepression seiner Zieltranskripte ist wichtig, um eine unnötige Expression der Proteine während des Transports in die Dendriten zu

unterbinden (KINDLER *et al.*, 2005; WELLS, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass FMRP sowohl die basale als auch die aktivitätsabhängige lokale Proteinsynthese beeinflusst (ZALFA *et al.*, 2003; LU *et al.*, 2004; HOU *et al.*, 2006; MUDDASHETTY *et al.*, 2007; NAPOLI *et al.*, 2008; PARK *et al.*, 2008; KAO *et al.*, 2010). Mehrere unabhängige Untersuchungen unterstützen die Hypothese, dass FMRP vorwiegend als Translationsrepressor fungiert. So zeigten Lagerbauer *et al.* schon 2001, dass die Zugabe von gereinigtem rekombinantem FMRP in Retikulozytenlysat bzw. die Injektion in *Xenopus*-Oozyten eine mengenabhängige Repression der mRNA-Translation induzierte. Dieser Effekt konnte durch die Deletion der FMRP-Bindestelle im Zieltranskript (Mbp-mRNA) aufgehoben werden (LI *et al.*, 2001; LAGGERBAUER *et al.*, 2001).

Die Eigenschaften von FMRP als translationeller Repressor wurden eingehend durch die biochemische Fraktionierung von Gehirnextrakten in aktiv translatierenden Ribosomen (Polysomen) und translationell stillgelegten Partikeln (mRNPs) untersucht. Dabei fanden Brown *et al.* 2001 unter 251 mRNAs, die ein differenzielles polysomales Verteilungsmuster in Patienten mit Fragilem-X-Syndrom zeigten, 136 mRNAs mit erhöhter und 115 mRNAs mit reduzierter Anreicherung in Polysomen (BROWN *et al.*, 2001).

Im Gehirn von *Fmr1*-KO-Mäusen sind verschiedene mRNAs, wie zum Beispiel α -CaMKII-, Arc- und Map1b-mRNAs, aufgrund verstärkter Translation vorwiegend in den Polysomen anzutreffen, weniger in mRNPs. Einhergehend damit sind die Mengen der durch diese mRNAs codierten Proteine in der Abwesenheit von FMRP signifikant erhöht (ZALFA *et al.*, 2003). Dabei ist die Expression von mehr als 100 Proteinen, in aus *Fmr1* KO Neuronen isolierten Synaptoneurosomen³ verändert. Dies könnte einer gestörten dendritischen mRNA-Lokalisation und Proteinsynthese zugeschrieben werden (LIAO *et al.*, 2008).

Überraschenderweise scheint FMRP auch die Translation einzelner Zieltranskripte aktivieren zu können. So verstärkt FMRP die translationsaktivierende Fähigkeit des SoSLIP-Motivs in der Sod1-mRNA (BECHARA *et al.*, 2009). Zudem konnte FMRP eine Rolle bei der erhöhten Translation der hASH1-mRNA durch einen unbekanntem Mechanismus zugewiesen werden (FÄHLING *et al.*, 2009).

Es ist sehr wahrscheinlich, dass FMRP die Translation in vielen Phasen reguliert. FMRP co-sedimentiert mit monomeren 80S-Ribosomen und in leichten mRNP-Komplexen mit BC1, CYFIP1 sowie mit Translationsinitiationsfaktoren (LAGGERBAUER *et*

³ gereinigte Synapse, die sowohl prä- als auch postsynaptische Strukturen enthält

al., 2001; GABUS *et al.*, 2004; JOHNSON *et al.*, 2006; ZALFA *et al.*, 2007; CENTONZE *et al.*, 2008; NAPOLI *et al.*, 2008; LACOUX *et al.*, 2012).

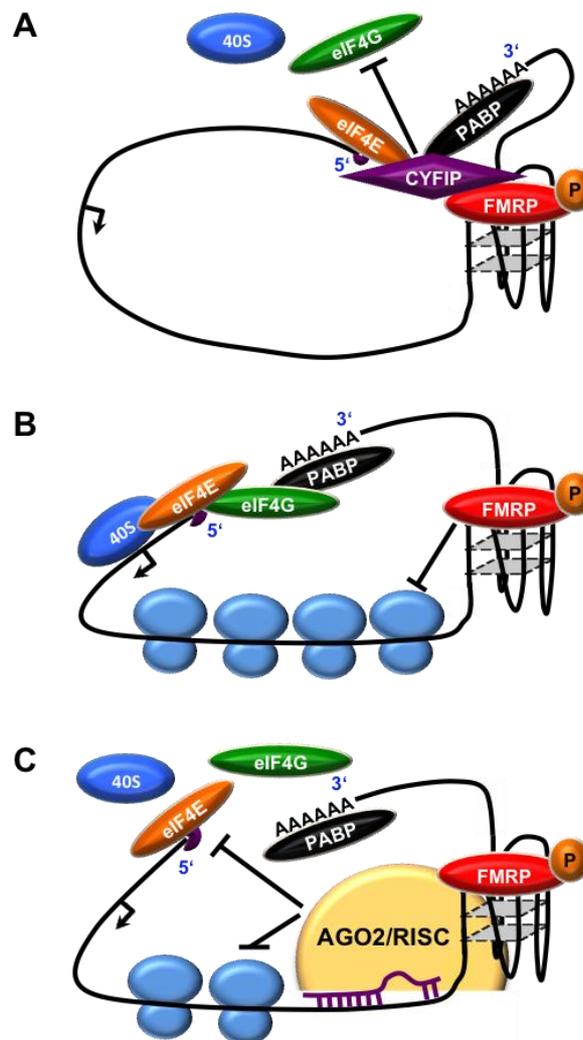


Abb. 1-3: Schematische Darstellung von drei Modellen zur FMRP-vermittelten Translationsrepression. (A) FMRP rekrutiert CYFIP1 um die Bildung des eIF4E-eIF4G-eIF4A-Komplexes zu verhindern und inhibiert damit die Translationsinitiation. (B) FMRP bewirkt ein Festsetzen der Ribosomen während der Elongationsphase der Translation. (C) FMRP rekrutiert den *RNA-induced silencing complex* (RISC) um die Translation zu reprimieren (modifiziert nach SANTORO *et al.*, 2012).

Ein Modell, wie FMRP die Translation regulieren könnte, beschäftigt sich mit der Inhibierung der Translationsinitiation (siehe Abb. 1-3 A). Bei der cap-abhängigen Translation, die in Neuronen wichtig ist, benötigt die Translationsinitiation den eIF4F-Komplex, bestehend aus eIF4E, eIF4G und eIF4A, um mit dem 5' m7GTP der mRNA zu assoziieren. 4E-Bindeproteine (4E-BPs) interferieren mit der eIF4E-eIF4G-Interaktion und regulieren dabei die Bildung des eIF4F-Komplexes (MARCOTRIGIANO *et al.*, 1999; COSTA-

MATTIOLI *et al.*, 2009). CYFIP1, ein bekannter Bindungspartner von FMRP (SCHENCK *et al.*, 2001; 2003), wurde als 4E-BP identifiziert (NAPOLI *et al.*, 2008). Interessanterweise war die Bildung des FMRP-CYFIP1-eIF4E-Komplexes in Anwesenheit von *cap*-Arc-mRNA, ein FMRP-Zieltranskript, verstärkt, jedoch nicht in Anwesenheit von *cap*-Luciferase-mRNA. Diese Daten stützen damit ein Modell, in welchem FMRP das CYFIP1 zu spezifischen mRNAs (Map1b-, α -CaMKII- und App-mRNAs) rekrutiert, mit eIF4E assoziiert und die Rekrutierung der Translationsinitiationsmaschinerie blockiert. In Übereinstimmung damit führt der *knockdown* von CYFIP1 zu signifikant erhöhten Proteinmengen von MAP1B, α -CaMKII und APP (NAPOLI *et al.*, 2008). Der genaue Mechanismus für diese Beobachtung ist noch weitestgehend unbekannt.

In einem weiteren Modell wurde FMRP die Funktion zugeschrieben, die Translation durch Inhibierung der Elongation zu reprimieren (KHANDJIAN *et al.*, 1996; TAMANINI *et al.*, 1996; FENG *et al.*, 1997a; CEMAN *et al.*, 2003; STEFANI *et al.*, 2004), da ein Großteil von FMRP mit Polysomen co-sedimentiert. Dies ist auch noch nach Puromycinbehandlung, wodurch aktiv translatierende Ribosomen zerstört werden, der Fall. Dies bedeutet, dass Polyribosomen möglicherweise fixierte Ribosomen repräsentieren (STEFANI *et al.*, 2004). Ribosomale *run-off-assays*⁴, bei denen die Zellen mit Natriumazid, einem unspezifischen Inhibitor der Translationsinitiation, welcher die Elongation nicht beeinflusst, behandelt wurden, zeigten, dass ein Anteil von FMRP mit fixierten Ribosomen assoziiert war (Abb. 1-3 B, (CEMAN *et al.*, 2003). Diese Daten werden durch eine erst kürzlich veröffentlichte Studie unterstützt, in welcher FMRP-Zieltranskripte nach UV-Quervernetzung identifiziert wurden (DARNELL *et al.*, 2011). Dabei bindet FMRP die codierende Sequenz von mRNA-Transkripten, die mit fixierten Ribosomen assoziiert sind.

Ein dritter postulierter Mechanismus der FMRP-vermittelten Deregulation der mRNA-Translation erfolgt in Kooperation mit miRNAs und dem RNA-Interferenz-Signalweg (RNAi) (Abb. 1-3 C). FMRP aus *Drosophila* interagiert direkt oder indirekt mit zwei Komponenten des RISC, Argonaut 2 (AGO2) und Dicer (ISHIZUKA *et al.*, 2002). In Säugerzellen ist FMRP in mRNPs inkorporiert, die AGO2, Dicer und miRNAs enthalten (JIN *et al.*, 2004). Aber auch in postsynaptischen Kompartimenten scheint FMRP mit AGO2 und Dicer zu interagieren (CAUDY *et al.*, 2002; PLANTE *et al.*, 2006; LUGLI *et al.*, 2008). *In vitro* unterstützt FMRP, aktivitäts-vermittelt durch die KH1-Domäne, das Zusammenfinden von miRNAs mit ihren Zieltranskripten. Zusätzlich zeigen embryonale

⁴ biochemische Methode zur Untersuchung der Translationskompetenz von Polysomen

Mausfibroblasten (MEFs) von *Fmr1*-KO-Mäusen eine verstärkte *RNAi* von Luciferase-Reportern im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (PLANTE *et al.*, 2006).

Zudem wurde FMRP assoziiert mit spezifischen miRNAs gefunden, was in einer Translationsrepression des korrespondierenden Zieltranskripts resultierte (EDBAUER *et al.*, 2010). Die Überexpression zwei dieser miRNAs, miR-125b und miR-132, in kultivierten hippocampalen Neuronen aus Ratten resultierte in defekten dendritischen Dornen. Der *knockdown* von FMRP in diesen Zellen revertierte beide Phänotypen (EDBAUER *et al.*, 2010). Gleichermäßen zeigt eine andere Studie, dass die 3'UTR der PSD-95-mRNA sowohl die miR-125a als auch FMRP bindet und beide für die Translationsrepression notwendig sind (Muddashetty *et al.*, 2011). Somit unterstützen diese Daten einen Mechanismus, bei dem FMRP die 3'UTRs seiner Zieltranskripte bindet und nachfolgend die Bindung eines komplementären miRNA-RISC vermittelt bzw. stabilisiert und somit die Translation blockiert.

Dabei schließen sich diese drei Modelle der FMRP-regulierten Translationsinhibition nicht notwendigerweise gegenseitig aus. Verschiedene Mechanismen können zu verschiedenen Zeiten an einem mRNA-Molekül wirken. Zum Beispiel könnte FMRP die Translationsinitiation seiner Zieltranskripte während des Transports zu den dendritischen Dornen inhibieren. Wenn die mRNA die Synapse erreicht, könnte FMRP dann die Translation durch Fixierung der Ribosomen oder die Rekrutierung eines miRNA-RISC inhibieren.

1.2.5. Posttranslationelle Regulation von FMRP

Neben der Regulation seiner Zieltranskripte kann FMRP auch selbst durch posttranslationelle Mechanismen reguliert werden. So wird FMRP in der RGG-Box methyliert, hauptsächlich an Arginin₅₄₄, wobei diese Methylierung die Protein-Protein- und Protein-RNA-Interaktionen zu regulieren scheint (DOLZHANSKAYA *et al.*, 2006). Zudem besitzt FMRP eine Region mit phosphorylierten Resten im C-Terminus. Dabei ist ein Serin-Rest, der von *Drosophila* bis zum Menschen (human: S500; murin: S499; *Drosophila*: S406) konserviert ist, zugleich auch die primäre Phosphorylierungsstelle von FMRP (CEMAN *et al.*, 2003). Dieses Serin begünstigt im phosphorylierten Zustand die Phosphorylierung der umgebenden Reste. Diese Phosphorylierung beeinflusst weder die Degradationsrate von FMRP noch die Spezies von RNAs mit der FMRP assoziiert, sondern die Assoziation mit Polyribosomen und die Fähigkeit zur Translationsrepression (CEMAN *et al.*, 2003; MUDDASHETTY *et al.*, 2011). *In vivo* kommt FMRP sowohl in der

phosphorylierten als auch in der unphosphorylierten Form vor, obwohl die phosphorylierte Variante die vorwiegende FMRP-Form in dendritischen Partikeln ist (NARAYANAN *et al.*, 2007). Es konnte gezeigt werden, dass die phosphorylierte Form von FMRP offenbar mit translationsinaktiven Polyribosomen assoziiert ist, während die unphosphorylierte Form von FMRP mit aktiv translatierenden Polyribosomen interagiert (CEMAN *et al.*, 2003).

Diese Resultate stehen in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Muddashetty *et al.*, die zeigen, dass die Überexpression einer die Phosphorylierung vortäuschenden Mutante (FMRP-S499D) aber nicht die von einer nicht-phosphorylierbaren FMRP-Mutante (FMRP-S499A) die Translation eines Konstrukts mit der PSD-95-3'UTR inhibieren kann (MUDDASHETTY *et al.*, 2011). Weiterhin konnten die Autoren durch Dichtegradientenzentrifugationen zeigen, dass FMRP-S499D das Konstrukt mit der 3'UTR der PSD-95-mRNA in mRNP-Fractionen verschob, was auf eine Inhibierung der Translationsinitiation durch FMRP-Phosphorylierung schließen lässt.

Interessanterweise interagiert Dicer mit unphosphorylierten aber nicht mit phosphoryliertem FMRP (CHEEVER und CEMAN, 2009). Dies lässt den Schluss zu, dass die Phosphorylierung von FMRP auch den *RNAi*-Signalweg durch eine Blockierung der Dicer-abhängigen Prozessierung von Vorläufer-miRNAs reprimieren könnte. Zusammengefasst inhibiert also phosphoryliertes FMRP die Translation seiner Zieltranskripte, während unphosphoryliertes FMRP eine Translation erlaubt.

1.2.6. Funktionsmodell von FMRP

Aus den bisher bekannten Daten zur Funktion von FMRP wurden verschiedene Funktionsmodelle entwickelt. Das am besten charakterisierte Modell ist im Folgenden beschrieben (siehe Abb. 1-4).

FMRP wird über sein nukleäres Lokalisationssignal in den Zellkern transportiert. Dort bindet es seine Zieltranskripte über verschiedene RNA-Bindemotive, wie die RGG-Box, die KH-Domänen oder den N-Terminus. Nach der Assoziation mit seinen spezifischen mRNAs wird der FMRP-mRNA-Komplex über FMRPs nukleäres Exportsignal zurück ins Zytoplasma transportiert. Dabei scheint der Wiedereintritt des Komplexes in den Nukleus durch die gebundene mRNA inhibiert zu sein.

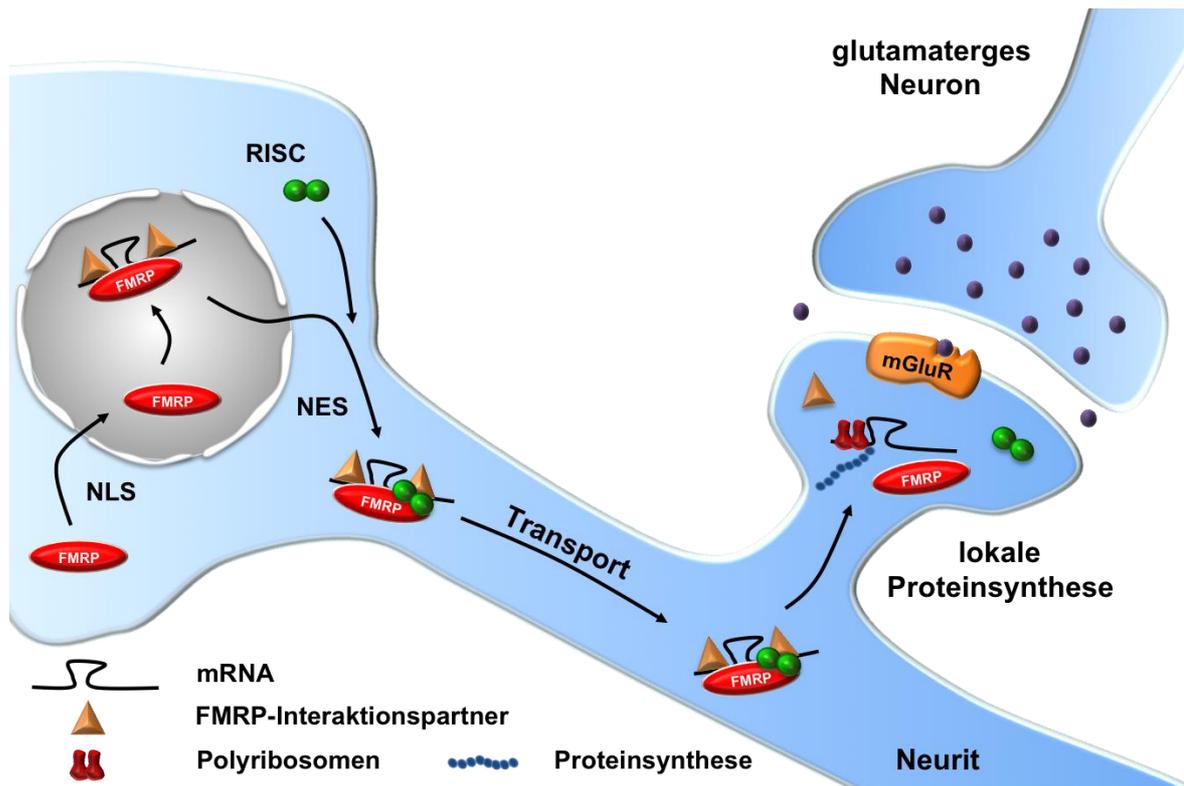


Abb. 1-4: Schematisches Funktionsmodell von FMRP in Neuronen. Nach dem Transport in den Zellkern über sein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) assoziiert FMRP mit seinen Zieltranskripten und Protein-Bindungspartnern. Der Komplex wird ins Zytoplasma transportiert, und nach Bindung des *RNA-induced silencing complex* (RISC) translationell reprimiert mittels Motorproteinen zum Zielort bewegt. Nach Stimulation von metabotropen Glutamaterezeptoren (mGluRs) dissoziieren FMRP und weitere Proteine von der mRNA und die lokale Proteinsynthese kann stattfinden (modifiziert nach WILLEMSSEN *et al.*, 2011).

Im Zytoplasma wird der FMRP-mRNA-Komplex für verschiedene andere Proteine zugänglich und assoziiert mit dem RISC. Dadurch wird die Translation der gebundenen mRNA inhibiert und gleichzeitig deren Stabilität erhöht. Mittels des Motorproteins KIF3C werden diese FMRP-mRNPs anschließend mikrotubuliabhängig in die Neuriten transportiert. Durch neuronale Stimulation, wie zum Beispiel durch Aktivierung metabotroper Glutamaterezeptoren, wird der Transport dieser mRNPs zum Zielort verstärkt. Zugleich sorgt die gesteigerte neuronale Aktivität für eine Dissoziation des RISC mit folgender Degradation der Proteine aufgrund gesteigerter Proteasomentätigkeit. Damit wird die Translationsrepression aufgehoben und die freigesetzte mRNA kann lokal translatiert werden.

FMRP übernimmt somit vielfältige Funktionen in der Regulation der mRNA-Stabilität, des mRNA-Transports und der mRNA-Translation. Dabei ist auffällig, dass die meisten Zieltranskripte von FMRP hauptsächlich bei der neuronalen Morphogenese eine entscheidende Rolle spielen. Da es bei diesem Prozess vorwiegend zu einem Umbau des

Aktinzytoskeletts kommt, soll im folgendem näher auf dessen Struktur, Funktion und Regulation eingegangen werden.

1.3. Das Aktinzytoskelett

Aktin ist eine der Hauptkomponenten des zellulären Zytoskeletts und für den Aufbau und die Aufrechterhaltung der Zellform essenziell. Der Umbau des Aktinzytoskeletts unterstützt dabei Prozesse wie Zellbewegung, Zellteilung, zelluläre Morphogenese und intrazellulären Proteintransport. In sich entwickelnden Neuronen spielt Aktin sowohl bei der Neuritenbildung, -verzweigung und -verlängerung als auch bei der Synaptogenese eine Schlüsselrolle (TONI *et al.*, 2007). In reifen Neuronen ist Aktin das am häufigsten vorkommende zytoskelettale Protein, und ist besonders an Synapsen und an den dendritischen Dornen lokalisiert. (FIFKOVÁ und DELAY, 1982; MATUS, 2000; CAPANI *et al.*, 2001; YUSTE und BONHOEFFER, 2004).

Aktin existiert in zwei Zuständen, dem monomeren (G-Aktin) und dem filamentösen (F-Aktin). Die Dynamik des Aktinzytoskeletts wird dabei durch die homöostatische Balance zwischen den beiden Aktinzuständen durch intra- und extrazelluläre Stimuli reguliert (RIDLEY und HALL, 1992; RIDLEY *et al.*, 1992). Aktin ist eine ATPase und die Nukleotidhydrolyse reguliert die Transition zwischen G- und F-Aktin. In einem Gleichgewichtszustand und einer gegebenen G-Aktin-Konzentration wächst das Aktinfilament am „*barbed end*“ durch den spontanen Einbau von ATP-gebundenem G-Aktin und verkürzt sich am „*pointed end*“ durch die Dissoziation von vorwiegend ADP-gebundenem G-Aktin (POLLARD und BORISY, 2003). Nach der Disassemblierung von Aktin-Filamenten verbleiben die Aktin-Monomere relativ lang im ADP-gebundenen Zustand. Diese Eigenschaft ermöglicht der Zelle, eine hohe zytoplasmatische Konzentration an unpolymerisiertem Aktin aufrecht zu erhalten.

Ein Großteil des polymerisierten Aktins liegt in Form von Stressfasern in der Zelle vor. Dabei sind diese Stressfasern mit transmembranen Strukturen, den so genannten Fokalkontakten, verbunden. Fokalkontakte sind dynamische, multimere Proteinkomplexe, die für Anhaftung der Zellen an die extrazelluläre Matrix essenziell sind (ZAIDEL-BAR *et al.*, 2004).

In lebenden Zellen weist das Aktinzytoskelett eine Vielzahl verschiedener Strukturen auf, die für viele Aspekte der Zellphysiologie entscheidend sind. Für jeden dieser Prozesse besitzt das Aktinzytoskelett eine definierte molekulare Zusammensetzung und Struktur. Dies impliziert, dass die Eigenschaften des Netzwerks für einen spezifischen Aspekt der

Zellphysiologie verändert werden. Ein besonderes Augenmerk ist dabei auf die Aktinstrukturen, die essenziell für Migration (Lamellopodien und Filopodien), Adhäsion (Stressfasern) und Reizübertragung (dendritische Dornen) sind, zu richten.

1.3.1. Die Regulation des Aktinzytoskeletts durch die kleinen Rho-GTPasen

Obwohl die Mechanismen der Regulation des Aktinzytoskeletts nicht vollständig aufgeklärt sind, wird es generell als akzeptiert angesehen, dass Signale, die von Zelloberflächenrezeptoren durch Moleküle, wie zum Beispiel Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone ausgehen, die räumlich und zeitliche Reorganisation des Aktinzytoskeletts auslösen. Dabei sind die kleinen Rho-GTPasen der Rho-Familie die wichtigsten *downstream* gelegenen Signalmediatoren in diesem Prozess (HALL 1994; FOSTER *et al.*, 1996; RAFTOPOULOU und HALL, 2004).

Rho-GTPasen sind ubiquitär exprimiert und in Säugern wurden 20 Mitglieder dieser Proteinfamilie identifiziert (PONTING *et al.*, 1999). Bei der Kontrolle der Signaltransduktion fungieren sie als molekulare Schalter, indem sie zwischen einer GDP-gebundenen, inaktiven Form und einer GTP-gebundenen aktiven Form wechseln (Abb. 1-5). In ihrem GTP-gebundenen Zustand interagieren sie mit *downstream*-Effektoren und vermitteln somit intrazelluläre Antworten.

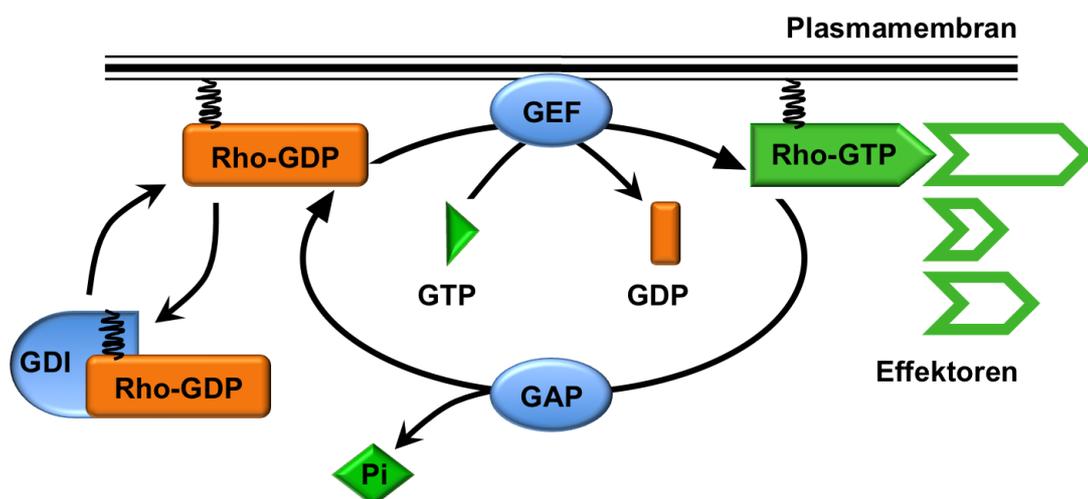


Abb. 1-5: Der Rho-GTPase Zyklus. Die Rho-GTPasen wechseln zwischen einer aktiven (GTP-gebundenen) und inaktiven (GDP-gebundenen) Konformation. In ihrem aktiven Zustand interagieren sie mit einem von mehr als 40 Effektoren. Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs), GAPs (GTPase-aktivierende Proteine) und Guanin-Nukleotid-Austauschinhibitoren (GDIs) regulieren den Aktivitätszustand der Rho-GTPasen. Die Prenylierung aller Rho-GTPasen am C-Terminus ist essenziell für deren Funktion (modifiziert nach (ETIENNE-MANNEVILLE und HALL, 2002).

Die wichtigste Funktion der Rho-GTPasen ist die Regulation der Aktindynamik. In diesem Prozess spielen RhoA, Rac1 und Cdc42, die am besten charakterisierten Mitglieder der Proteinfamilie, eine essenzielle Rolle (ETIENNE-MANNEVILLE und HALL, 2002). In Fibroblasten durchgeführte Studien mit dominant aktiven und dominant negativen Rho-GTPase-Varianten zeigten, dass RhoA vorwiegend die Assemblierung kontraktile Aktin-Myosin-Filamente (Stressfasern) reguliert, während Rac1 und Cdc42 die Aktinpolymerisation zur Bildung von peripheren Lamellopodien und Filopodien stimulierten (RIDLEY *et al.*, 1992; RIDLEY und HALL, 1992; NOBES und HALL, 1995). Des Weiteren konnten zahlreiche Studien einen Einfluss der Rho-GTPasen auf aktinabhängige Prozesse wie die Zytokinese (MABUCHI *et al.*, 1993; PROKOPENKO *et al.*, 2000), die Endo- und Exozytose (CARON und HALL 1998), die Axon-Wegfindung (LUO *et al.* 1997) und die entwicklungspezifische Morphogenese (LU und SETTLEMAN, 1999; SETTLEMAN, 1999) nachweisen.

In Fibroblasten fördern Cdc42 und Rac1 das Auswölben der Membran durch die Assemblierung von Aktinfilamenten an der Peripherie und RhoA initiiert das Zurückziehen der Membran durch kontraktile Aktin- und Myosinfilamente (LUO 2000). In Neuronen ist zum Beispiel aktives RhoA notwendig, um das Auswachsen von Dendriten (in *Drosophila*) zu limitieren (LEE *et al.*, 2000), wohingegen Rac1 für das durch den Nervenwachstumsfaktor (*nerve growth factor*, NGF) induzierte Axonwachstum notwendig ist (OZDINLER und ERZURUMLU, 2001). Gleichermäßen führt die Aktivierung von Rac1 zu einer vergrößerten Anzahl dendritischer Dornen, wobei die RhoA-Aktivierung den gegenteiligen Effekt hat (WONG *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2000).

Der Rho-GTPase-Zyklus wird durch drei Gruppen von Proteinen streng reguliert. Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) fördern den Austausch von GDP zu GTP um die Rho-GTPasen zu aktivieren (ZHENG, 2001; SCHMIDT und HALL, 2002). Rho-GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) stimulieren die intrinsische Rho-GTPase-Aktivität, wodurch das gebundene GTP zu GDP hydrolysiert und die Rho-GTPase inaktiviert wird (MOON und ZHENG, 2003). Guaninnukleotid-Dissoziationsinhibitoren (GDIs) verhindern eine Aktivierung der Rho-GTPasen, indem sie über eine hydrophobe Tasche die GDP-gebundene Form der Rho-GTPase binden und diese somit im Zytoplasma halten.

Durch eine Konformationsänderung während des Wechsels zwischen GTP- und GDP-gebundener Form wird eine Interaktion der Rho-GTPasen mit *downstream*-Effektoren möglich (BISHOP und HALL, 2000). Es sind bis heute mehr als 40 Effektoren von Rho-GTPasen nachgewiesen und untersucht worden. Neben diesen Effektoren wurden

auch sogenannte Gerüstproteine identifiziert, welche zur Signalspezifität der Rho-GTPase beitragen, indem sie das für die Rho-GTPase spezifische GEF und die *downstream* gelegenen Effektoren in räumliche Nähe bringen und deren Interaktion verstärken. Als eines dieser Gerüstproteine für die Rho-GTPase RhoA und das GEF ECT2 (*epithelial cell transforming gene 2*) konnte das Protein p0071 identifiziert werden (WOLF *et al.*, 2006).

1.4. p0071, ein Mitglied der Armadillo-Proteinfamilie

Das Protein p0071 gehört zur *Armadillo*-Protein-Superfamilie und wurde 1996 durch Hatzfeld und Nachtsheim identifiziert (HATZFELD und NACHTSHEIM, 1996). Dabei ist p120-Catenin (p120^{ctn}) der Prototyp dieser Subfamilie, welche außerdem δ -Catenin, ARVCF (*armadillo repeat protein deleted in velo cardio-facial syndrome*) und die Plakophiline 1 bis 3 umfasst. Gekennzeichnet ist die Proteinfamilie durch eine Sequenzwiederholung von ca. 42 Aminosäuren, dem sogenannten ARM-Motiv. Dieses besteht aus drei α -Helices, welche zuerst im *Drosophila* Segmentpolaritätsgen *Armadillo* charakterisiert wurden (PEIFER *et al.*, 1994). Tandem ARM-Wiederholungen falten sich zu einer rechtshändigen Superhelix und bilden somit eine Plattform für Protein-Protein-Wechselwirkungen (HUBER *et al.*, 1997). Es konnten Kristallstrukturen von verschiedenen *Armadillo*-Proteinen aufgeklärt werden, die zeigten, dass Proteine mit ARM-Wiederholungen zwar keine hohe Sequenzhomologie, aber eine vergleichbare Struktur aufweisen (HUBER *et al.*, 1997; CONTI *et al.*, 1998; LIU *et al.*, 2008; CHOI und WEIS, 2005; KIDD *et al.*, 2005; OTOMO *et al.*, 2005; ROSE *et al.*, 2005; STRIEGL *et al.*, 2010).

p0071 wird in eine N-terminale Kopf-, eine zentrale Arm- und eine C-terminale Schwanzdomäne untergliedert (HATZFELD und NACHTSHEIM, 1996). Am C-Terminus besitzt p0071 außerdem ein PDZ-Bindemotiv (DEGUCHI *et al.*, 2000).

1.4.1. Funktionen von p0071

Das Protein p0071 lokalisiert in Zell-Zell-Adhäsionskomplexen, den Desmosomen und *adherens junctions* und ist somit wie alle p120^{ctns} ein Zellkontakt-assoziiertes Protein (HATZFELD und NACHTSHEIM, 1996; SCHRÖDER *et al.*, 2000). Dabei stabilisiert p0071 E-Cadherin und erhöht die Halbwertszeit dieses Proteins maßgeblich (SETZER *et al.*, 2004; HATZFELD, 2005).

Die Kopf-Domäne von p0071 sorgt für eine Interaktion mit den desmosomalen Proteinen Desmocollin 3a, Desmoplakin und Plakoglobin. Über seine zentrale ARM-

Domäne interagiert p0071 mit in *adherens junctions* vorkommenden klassischen Cadherinen (HATZFELD *et al.*, 2003). Über die C-Terminale PDZ-Bindedomäne konnten Interaktionen mit Erbin und Papin nachgewiesen werden (JAULIN-BASTARD *et al.*, 2002; IZAWA *et al.*, 2002)

Neben der Membran-Assoziation konnte auch eine zytoplasmatische und nukleäre Lokalisation für p0071 nachgewiesen werden, was weitere, von der Zellkontaktassemblierung unabhängige Funktionen, sehr wahrscheinlich macht. So wiesen Ohno *et al.* im Jahr 2002 p0071 während der Zytokinese am kontraktilen Aktomyosinring nach, der für die Einschnürung der Zellmembran essenziell ist (OHNO *et al.*, 2002). Die Assemblierung und die Kontraktion dieser Struktur werden durch Rho-GTPasen kontrolliert. Bereits für drei Mitglieder der p120^{ctn}-verwandten Proteine, p120^{ctn}, δ -Catenin und p0071, konnten Funktionen bei der Regulation von Rho-GTPasen beschrieben werden (ABU-ELNEEL *et al.*, 2008).

Fibroblasten zeigten nach p120^{ctn}-Überexpression einen sogenannten Verzweigungs-Phänotyp, welcher durch Transfektion mit konstitutiv aktivem RhoA revertiert werden konnte (ANASTASIADIS *et al.*, 2000). Somit scheint p120^{ctn}, möglicherweise durch eine Interaktion mit dem GEF Vav2 und dem GAP p190RhoGAP, die RhoA-Aktivität herabzusetzen, wobei dadurch die Aktivität von Cdc42 und Rac1 erhöht wird (ANASTASIADIS, 2007). Für δ -Catenin konnte ein negativer Effekt auf die Aktivität von RhoA während der neuronalen Morphogenese nachgewiesen werden. Dabei reprimiert einerseits δ -Catenin und andererseits ein Komplex aus δ -Catenin und Cortactin den Rho-Signalweg, wodurch Neuritenwachstum und -verzweigung induziert werden (KEIL *et al.*, 2007). Somit schien es wahrscheinlich, dass p0071 ebenfalls eine Rolle bei der Regulation der Rho-GTPasen, möglicherweise während der Zytokinese, spielen könnte. Den Beweis für diese Hypothese konnten Wolf *et al.* erstmals erbringen (WOLF *et al.*, 2006). Sie wiesen nach, dass p0071 während der Zytokinese sowohl mit RhoA als auch mit dessen GEF ECT2 direkt interagiert und die Aktivität von RhoA reguliert. Jedoch konnte ebenso gezeigt werden, dass p0071 auch allein die Aktivität von RhoA regulieren kann. Während der Zytokinese wird p0071 verstärkt zum Zentralkörper⁵ transportiert und geht dort eine Interaktion mit ECT2 ein. Dieser Komplex sorgt dann für eine Stabilisierung der GTP-gebundenen, aktiven Form von RhoA und nimmt positiven Einfluss auf die Ausbildung des kontraktilen Ringes während der Zytokinese (WOLF *et al.*, 2006; KEIL *et al.*, 2007).

⁵ zytoplasmatischen Brücke, die zwei Tochterzellen verbindet

Auch bei der Regulation von dendritischen Dornen spielen p120^{ctn} und δ -Catenin/NPRAP eine entscheidende Rolle. In einer p120^{ctn}-KO-Maus konnte eine Verringerung in der Anzahl und Länge der dendritischen Dornen beobachtet werden (ELIA *et al.*, 2006). Zugleich war die RhoA-Aktivität reduziert während die Rac1-Aktivität erhöht war (KEIL *et al.*, 2013). δ -Catenin/NPRAP werden fast ausschließlich in neuronalen Zellen exprimiert und deren Überexpression induzierte die Ausbildung von Filopodien-ähnlichen Ausläufern in Neuronen durch Erhöhung der Aktivität von Cdc42 (ABU-ELNEEL *et al.*, 2008). Zudem regulieren δ -Catenin/NPRAP während der Entwicklung die Morphologie von dendritischen Dornen und Synapsen, wobei der *knockdown* eine Erhöhung der Dichte an dendritischen Dornen zur Folge hatte (ARIKKATH *et al.*, 2009). Mäuse mit einer Mutation im δ -Catenin/NPRAP-Gen zeigten eine schwerwiegende Beeinträchtigung der kognitiven Funktionen (ISRAELY *et al.*, 2004; MATTER *et al.*, 2009). In δ -Catenin-KO-Mäusen waren die globalen RhoA- und Rac1-Aktivitäten unbeeinflusst (ARIKKATH *et al.*, 2009), was eine lokale Regulation der Rho-GTPasen durch δ -Catenin nahelegt. Beim Menschen korreliert die Deletion von δ -Catenin mit mentaler Retardation im Cri-du-Chat-Syndrom⁶ (MEDINA *et al.*, 2000). Da sowohl die Expression von p0071 als auch die von δ -Catenin/NPRAP in Patienten, die an Schizophrenie leiden, verstärkt ist, scheint eine Rolle für p0071 bei der Regulation der synaptischen Plastizität sehr wahrscheinlich (MARTINS-DE-SOUZA *et al.*, 2009).

1.4.2. Regulation von p0071

Aufgrund der vielfältigen Funktionen von p0071 in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten ist eine präzise räumliche Lokalisation für dessen Funktion essenziell. So wird die intrazelluläre Sortierung von p0071 durch das Motorprotein KIF3b gesteuert. Dabei interagiert p0071 direkt mit KIF3b und transportiert es, im Kontext der Zytokinese, zur Membran (KEIL *et al.*, 2009). Andererseits kann p0071 auch durch posttranslationelle Modifikationen, wie z.B. Phosphorylierungen, reguliert werden. Dadurch könnten räumliche und zeitliche Interaktionen mit *upstream*- und *downstream*-Effektoren beeinflusst werden. So konnten putative Phosphorylierungsstellen in p0071 identifiziert werden, aber die dafür verantwortlichen Kinasen sind bis jetzt noch unbekannt (KEIL *et al.*, 2013)

Des Weiteren könnte p0071 auch auf Ebene der mRNA-Lokalisation und mRNA-Translation reguliert werden, da die ortsgenaue Proteinsynthese einen weiteren Weg darstellt, Proteine in der Zelle zu lokalisieren (XING und BASSELL, 2013).

⁶ dt.: Katzenschrei-Syndrom

1.5. Zielstellung

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass FMRP eine Vielzahl seiner Zieltranskripte auf Ebene der mRNA-Translation und mRNA-Stabilität reguliert und einen entscheidenden Einfluss auf die Morphogenese dendritischer Dornen im Gehirn hat. Da dendritische Dornen vorwiegend aus filamentösem Aktin aufgebaut sind könnte FMRP über eine Regulation seiner Zieltranskripte daher das Aktinzytoskelett modellieren. Jedoch wurden außer der mRNA der kleinen Rho-GTPase Rac1 bisher keine für die Aktinzytoskelett-Reorganisation relevanten mRNAs als FMRP-Zieltranskripte nachgewiesen. In mehreren Studien wurde die p0071-mRNA als putatives FMRP-Zieltranskript identifiziert. Für p0071 konnten bereits Einflüsse auf die Regulation des Aktinzytoskeletts bestätigt werden. So reguliert es beispielsweise die Aktivität der kleinen Rho-GTPase RhoA während der Zytokinese. Jedoch war bisher nichts über die *upstream* gelegenen Regulatoren von p0071 bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher ein möglicher Einfluss von FMRP auf die Expression und Regulation des *Armadillo*-Proteins p0071 sowie dessen Einfluss auf die Organisation des Aktinzytoskeletts und die neuronale Differenzierung untersucht werden. Anhand von mRNA- und Protein-Expressionsprofilen in *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Zellen sollte untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen der FMRP- und der p0071-Expression besteht. Darüber hinaus sollte analysiert werden, ob FMRP die p0071-mRNA tatsächlich bindet und über welche Sekundärstrukturen diese Assoziation erfolgt. Zudem wurden Untersuchungen durchgeführt, die klären sollten, ob diese Assoziation einen Einfluss auf die Translation, die Stabilität oder den Transport der p0071-mRNA hat.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten die Resultate aus den Fibroblastenzellklonen *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻ hinsichtlich des phänotypischen Einflusses von FMRP sowie von p0071 in neuronalen Zellen validiert werden. Denn der Phänotyp des Fragilen-X-Syndroms ist im neuronalen System besonders stark ausgeprägt.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien und Enzyme

Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Sigma-Aldrich (München, Deutschland) und Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) in der Qualitätsstufe *p.a.* bezogen. Zellkulturmedien und Zusätze wurden von der Firma PAA Laboratories GmbH (Cölbe, Deutschland) bezogen. Enzyme, dazugehörige Puffer sowie Protein- und DNA-Größenstandards wurden von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) und Bakterienstämme für Klonierungen und Protein-Expressionen von der Firma Stratagene (La Jolla, Kalifornien, USA) bezogen.

2.1.2. Bakterienstämme

Zur Vervielfältigung der Plasmide für Umklonierungen wurde der *Escherichia coli*-Stamm JM109 genutzt und für Protein-Expressionen wurde entweder der *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) oder der *E. coli*-Stamm Arctic Express (DE3) RIL verwendet (Tab. 2).

Tab. 2: Verwendete *E. coli*-Stämme

Bakterienstamm	Genotyp
JM109	e14 ⁻ (McrA ⁻) <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1</i> <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>supE44 relA1 Δ(lac-proAB)</i> [F' <i>traD36 proAB lacI^qZΔM15</i>]
BL21 (DE3)	F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal λ</i> (DE3)
Arctic Express (DE3) RIL	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal λ</i> (DE3) <i>endA</i> Hte [<i>cpn10 cpn60 Gent^r</i>] [<i>argU ileY leuW Str^r</i>]

Der *E. coli*-Stamm JM109 wurde im komplexen Nährmedium *lysogeny broth* (LB-Medium, s.u.) angezogen. Zur Selektion rekombinanter Klone wurde dem LB-Medium in Anhängigkeit des Vektors 50 µg/mL Kanamycin bzw. 100 µg/mL Ampicillin zugesetzt. Zur Herstellung von LB-Agar wurde dem LB-Medium 2% (w/v) Agar-Agar zugesetzt.

LB-Medium

- 1% (w/v) NaCl
- 1% (w/v) Trypton
- 5% (w/v) Hefeextrakt, pH 7,0

Für die Expression rekombinanter Proteine in den *E. coli*-Stämmen BL21 (DE3) und Arctic Express (DE3) RIL wurde 2x YT-Medium (s.u.) verwendet.

2x YT-Medium

1% NaCl (w/v)
1,6% Trypton (w/v)
1% Hefeextrakt (w/v), pH 7,0

2.1.3. Zelllinien

In dieser Arbeit wurden die in Tab. 3 aufgeführten eukaryontischen Zelllinien kultiviert und für experimentelle Untersuchungen verwendet.

Tab. 3: Verwendete eukaryontische Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
<i>Fmr1+</i> , <i>Fmr1</i> ⁻	murine embryonale Fibroblasten	CASTETS <i>et al.</i> , 2005
HEK293	humane embryonale Nierenzellen	GRAHAM <i>et al.</i> , 1977
HeLa SS6	humane epitheliale Zervixkarzinomzellen	GEY <i>et al.</i> , 1952
Neuro-2a	murine Neuroblastomazellen	KLEBE und RUDDLE, 1969

Die *Fmr1+*-Zellen wurden durch stabile Transfektion mit der an ein FLAG-Epitop gekoppelten *Fmr1*-Isoform 1 (im pTL10-Vektor) generiert. Hingegen wurden die *Fmr1*⁻-Zellen nur mit dem leeren pTL10-Vektor transfiziert. In beiden Fällen wurde das pIREShyg3-Plasmid co-transfiziert, um stabile Klone über ihre Hygromycin B-Resistenz zu selektieren. Das Fehlen der *Fmr1*-mRNA und von FMRP wurde durch RT-PCR und Western Blot-Analysen bestätigt (CASTETS *et al.*, 2005)

Die Neuro-2a-Zellen wurden durch Kultivierung in einem speziellen Mediums differenziert. Zum einen enthielt es das Antibiotikum Aphidicolin (3 µM). Dieses tetrazyklische Diterpen inhibiert die eukaryontische DNA-Replikation und blockiert den Zellzyklus in der frühen Synthese-Phase. Somit wurde gewährleistet, dass sich alle Zellen bei beginnender Differenzierung in der gleichen Stufe des Zellzyklus befanden (SAMAKÉ und SMITH, 1997).

Des Weiteren wurde dem Medium Retinsäure (20 µM) zugesetzt. Sie wirkt an einem nukleären Rezeptor als Signalmolekül bei der lokalen Differenzierung des Nervensystems (DURSTON *et al.*, 1989). Retinsäure moduliert dabei indirekt die Differenzierung von Neuronen durch die Modifikation der neuronalen Oberflächenrezeptoren für Wachstumsfaktoren (SCHEIBE und WAGNER, 1992). Zudem wirkt sich die Zugabe der

Retinsäure negativ auf den Phosphatidylinositol-Umsatz aus und stimuliert damit *in vitro* die Differenzierung der Neuro-2a-Zellen (PONZONI und LANCIOTTI, 1990).

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. Isolation von RNA aus eukaryontischen Zellen

Die Isolation von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen erfolgte durch Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion (CHOMCZYNSKI und SACCHI, 2006). Nachdem das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS (s.u.) gewaschen wurden, erfolgte die Lyse mit TRIzol (s.u.). Es wurde 1 mL TRIzol pro *well* einer 6-*well*-Platte verwendet. Die Suspension wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Reinigung bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden Zelltrümmer für 5 min bei 13000x g und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wurde durch die Zugabe von 200 μL Chloroform unter Rührschütteln extrahiert.

Zur Phasentrennung wurde für 5 min bei 13000x g und 4°C zentrifugiert. Die wässrige (obere) Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der RNA erfolgt durch die Zugabe von 500 μL Isopropanol für 15 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die RNA für 10 min bei 13000x g und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde mit 200 μL kaltem 80% (v/v) Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die RNA wurde in 30 μL RNase/DNase-freiem H_2O gelöst und bis zur reversen Transkription bei -80°C gelagert.

TRIzol

0,8 M Guanidiniumthiocyanat
0,4 M Ammoniumthiocyanat
0,1 M Natriumacetat, pH 5,0
5% (w/v) Glycerol
48% Roti-Aqua-Phenol für RNA-Isolierung

Phosphatpuffer (PBS), pH 7,3

137 mM NaCl
2,6 mM KCl
8,1 mM Na_2HPO_4
1,5 mM KH_2PO_4

2.2.1.2. Reverse Transkription

Zur Analyse der RNA mittels quantitativer RT-PCR (q-PCR, 2.2.1.5) wurden 2 μg Gesamt-RNA revers transkribiert. Die reverse Transkription erfolgte mit der

„SuperScript II M-MLV reversen Transkriptase“ (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA) nach folgendem Protokoll, beginnend mit Ansatz I (Tab. 4).

Tab. 4: Reaktionsansatz I für RT-PCR

Ansatz I
2 µg Gesamt-RNA
1 µL <i>random hexamers</i> oder <i>oligodT_s</i>
ad 11,5 µL RNase/DNase-freies ddH ₂ O

Nach anschließender Denaturierung der RNA für 5 min bei 65°C und Inkubation auf Eis für weitere 5 min erfolgte die Zugabe von 8,5 µL Ansatz II (Tab. 5), bestehend aus:

Tab. 5: Reaktionsansatz II für RT-PCR

Ansatz II
4 µL 5x RT-Puffer
2 µL dNTPs
2 µL DTT
0,5 µL SuperScript II M-MLV RT

Die vereinigten Reaktionsansätze wurden für 10 min bei 30°C und 80 min bei 42°C inkubiert. Die Inaktivierung der reversen Transkriptase erfolgte für 10 min bei 70°C. Die cDNA wurde, falls nicht unmittelbar verwendet, bis zur Analyse mittels q-PCR bei –20°C gelagert.

2.2.1.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der exponentiellen Amplifikation von Nukleinsäuren. Durch die Verwendung von artifiziellen Oligonukleotiden entstehen kurze doppelsträngige Bereiche mit freien 3'OH-Gruppen, die das zu amplifizierende Fragment flankieren. In einer *in-vitro*-Reaktion werden die Nukleinsäuren an diesen freien 3'OH-Gruppen durch thermostabile DNA-Polymerasen matrisenabhängig verlängert (Saiki *et al.*, 1988).

Jeder PCR-Ansatz enthält das *template*, die vier dNTPs, die beiden Oligonukleotide und eine thermostabile DNA-Polymerase. Ein zyklisch ablaufendes Programm zur *template*-Denaturierung (95°C, 30 s), Oligonukleotid-Anlagerung (50°C bis 65°C, 30 s) und DNA-Synthese (68°C oder 72°C, 60 s je 1 kb Fragmentlänge) führt zur exponentiellen Vermehrung der entsprechenden DNA-Fragmente.

In dieser Arbeit kam für die Klonierung verschiedener Genprodukte aus cDNA der ‚High Fidelity-PCR-Enzym-Mix‘ von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) zum Einsatz. Der Ansatz wurde durch kurzes Zentrifugieren gemischt und die PCR im Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) mit entsprechendem Programm durchgeführt.

2.2.1.4. Ortsgerichtete Mutagenese

Mit Hilfe einer ortsgerichteten Mutagenese ist es möglich, die Sequenz, der über eine PCR amplifizierten DNA, zu verändern (HUTCHISON *et al.*, 1978). Dabei kommen Oligonukleotide zum Einsatz, die nicht zu 100% identisch mit der *template*-Sequenz sind. In der vorliegenden Arbeit wurden cDNA-Sequenzen, die bereits in Vektoren kloniert waren, durch die ortsgerichtete Mutagenese verändert.

Die dafür verwendeten Oligonukleotide (Tab. 18) wurden so konstruiert, dass in der entsprechenden PCR zirkuläre, doppelsträngige DNA-Moleküle mit je zwei Einzelstrangbrüchen und der gewünschten Mutation entstehen. Diese DNA-Moleküle sind im Gegensatz zu den aus dem *E. coli*-Stamm JM109 isolierten (2.2.1.13) *template*-Plasmiden nicht methyliert.

Die nach der PCR durchgeführte Behandlung mit der Restriktionsendonuklease DpnI führte deshalb nur zur Degradation der *template*-Plasmide. Die neu entstandenen DNA-Moleküle wurden anschließend transformiert (2.2.1.12) und durch Sequenzierung analysiert (2.2.1.14). Auf diese Weise wurde das Plasmid zur Expression der nicht-phosphorylierbaren Variante von FMRP (FMRP-S499A-pEGFP-C1, Tab. 21) erzeugt.

2.2.1.5. Quantitative *real-time*-PCR (q-PCR)

Veränderungen des RNA-Gehaltes von Zellen bzw. Verschiebungen im Mengenverhältnis einzelner Transkripte können mit zwei Methoden quantifiziert werden – dem Northern Blot und der q-PCR. Die Vorteile der q-PCR liegen vor allem in der höheren Sensitivität, die es erlaubt, auch geringe Unterschiede zu detektieren, und der wesentlich geringeren Menge an benötigter RNA. Darüber hinaus verzichtet die q-PCR auf die Verwendung von Radioaktivität bei den eingesetzten Sonden und ermöglicht zudem einen höheren Messdurchsatz.

Es gibt im Wesentlichen zwei Technologien, die die Quantifizierung einer PCR erlauben, zum einen ist das die SYBR Green I-Technologie, zum anderen finden

sogenannte TaqMan-Sonden Anwendung. Beiden Technologien liegt eine herkömmliche PCR zu Grunde, deren Verlauf jedoch anhand einer fluoreszenzbasierten Messung dokumentiert werden kann. Die gemessene Fluoreszenz ist proportional zur entstandenen Menge an PCR-Produkt. Unter Berücksichtigung der Reaktionszyklen können daraus Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge der untersuchten Transkripte gezogen werden.

In dieser Arbeit wurde die SYBR Green I-Technologie angewendet. Diese Methode basiert auf dem Einsatz des Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I, welcher durch das Interkalieren in die doppelsträngige DNA fluoresziert. Bei dieser Form der q-PCR wird lediglich ein spezifisches Oligonukleotid-Paar zur Detektion eines Transkripts benötigt. Unter Berücksichtigung bestimmter Parameter beim Oligonukleotid-Design und den Reaktionsbedingungen kann mit dieser Methode eine hohe Spezifität erzielt werden. Beim Oligonukleotid-Design ist besonders auf die Schmelztemperatur und auf mögliche Sekundärstrukturen, welche zu Oligonukleotid-Dimerisierungen führen könnten, zu achten.

Außerdem ist es von Vorteil, wenn die Amplikons eine Exon/Exon-Grenze beinhalten, um die Amplifikation von genomischen DNA-Verunreinigungen zu verhindern. Im Anschluss an die PCR findet eine Schmelzkurvenanalyse statt, bei der durch eine langsame kontinuierliche Temperaturerhöhung das doppelsträngige PCR-Produkt in seine beiden Einzelstränge getrennt wird. Dadurch wird das gebundene SYBR Green I freigesetzt und fluoresziert nicht mehr. Die Anzahl der dadurch erhaltenen *peaks* korreliert mit der Anzahl der entstandenen PCR-Produkte. Da doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt besitzt als unspezifisch entstandene Oligonukleotid-Dimere, ist eine Unterscheidung dieser möglich. Die Höhe des *peaks* der Schmelzkurve gibt zusätzlich Auskunft über die Menge des gebildeten Fragments.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde jede q-PCR als Dreifachbestimmung durchgeführt und es kamen die in Tab. 6 aufgeführten Lösungen zum Einsatz.

Tab. 6: Standardbedingungen für SYBR Green I-q-PCR

MasterMix I	MasterMix II
7,5 µL 2xMasterMix	10 µL MasterMix I
0,3 µL SYBR Green I	0,03 µL <i>sense</i> Oligonukleotid (100 µM)
0,15 µL Fluorescein (Referenzfarbstoff)	0,03 µL <i>antisense</i> Oligonukleotid (100 µM)
2,05 µL RNase/DNase-freies ddH ₂ O	

Zunächst wurde der MasterMix I im Überschuss für alle durchzuführenden Reaktionen hergestellt. Der MasterMix II wurde anschließend für jedes einzelne Oligonukleotid-Paar separat hergestellt, indem die entsprechende Menge MasterMix I mit dem jeweiligen Oligonukleotid versetzt wurde. Pro Reaktion wurden zuerst 10 μL MasterMix II in ein *well* einer 96-*well*-Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurden 5 μL der zuvor 1:5 verdünnten cDNA zugegeben. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer optischen Folie versiegelt und mit dem iQ5-Cycler unter Verwendung des folgenden PCR-Programms vermessen: initiale Denaturierung für 3 min bei 95°C, 45 Zyklen bestehend aus Denaturierung (30 s bei 95°C), Anlagerung (30 s bei 60°C) und Elongation (30 s bei 72°C), Schmelzkurve (55°C bis 95°C).

Im Anschluss an eine Schmelzkurven-Analyse wurden die Messwerte unter Verwendung der $2^{\Delta\Delta\text{ct}}$ - Methode ausgewertet (LIVAK und SCHMITTGEN, 2001), wobei standardmäßig Cyclophilin A und RPLP0 als Kontrolle zur Normalisierung dienten. Bei dieser relativen Quantifizierung werden die ct-Werte⁷ der zu quantifizierenden Transkripte zweier Populationen (z.B. Wildtyp und *knockout*) direkt unter Normalisierung auf ein Kontrolle miteinander verglichen. Eine vorherige Quantifizierung der Absolutmengen mittels Standardkurven ist dadurch nicht mehr notwendig. Hierbei wird eine 100%ige PCR-Effizienz vorausgesetzt. Zur Auswertung die unten aufgeführte Formel verwendet.

$$R = 2^{((\text{ctA}-\text{ctB})_X - (\text{ctA}-\text{ctB})_Y)}$$

R	= mRNA Verhältnis
ctA	= ct-Wert Ziel-mRNA
ctB	= ct-Wert Kontroll-mRNA
X	= Population
Y	= Kontrollpopulation

Neben der SYBR Green I-Technologie kam in dieser Arbeit auch das TaqMan-System zur Anwendung, bei dem neben den PCR-Oligonukleotiden, eine zusätzliche Sonde eingesetzt wird. Diese enthält sowohl ein Fluorophor als auch einen *quencher*, der das Fluoreszieren der Sonde verhindert. Diese Sonde ist komplementär zu einem Teil des entstehenden PCR-Produkts. Im Verlauf der PCR wird durch die Exonuklease-Aktivität der Polymerase die erste Base der Sonde, an welche der Fluorophor gekoppelt ist, entfernt. Die freigesetzte Fluoreszenzmenge ist zu der entstandenen Produktmenge proportional. Vorteil der TaqMan-Technologie ist die äußerst hohe Spezifität, jedoch sind bei weitem nicht für alle Gene TaqMan-Sonden kommerziell erhältlich. Darüber hinaus ist diese Methode besonders kostenintensiv.

⁷ engl.: *threshold cycle*; Zykluszahl, bei der die entstandene Produktmenge einen definierten Schwellenwert erreicht

Zur Detektion von miRNAs wurden in dieser Arbeit kommerzielle ‚TaqMan MicroRNA Assays‘ (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA) genutzt. Aufgrund ihrer geringen Länge von nur 21 Nukleotiden musste vor der Durchführung der q-PCR eine spezielle RT-PCR durchgeführt werden. Dabei erfolgte für bis zu vier miRNAs gleichzeitig eine spezifische Multiplex-RT-Reaktion. Es kamen dazu spezielle *stem-loop*-Oligonukleotide zum Einsatz, die 3 bis 4 überhängende Basen am 5′-Ende besitzen, welche spezifisch mit dem 3′-Ende der miRNA hybridisieren können. Der Reaktionsansatz setzte sich aus den in Tab. 7 aufgeführten Bestandteilen zusammen.

Tab. 7: Reaktionsansatz für die miRNA RT-PCR

Ansatz
4 µL 5x RT-Puffer
0,2 µL dNTPs
0,3 µL RNaseOUT
0,5 µL SuperScript II M-MLV RT
7 µL RNase/DNase-freies ddH ₂ O mit 1 µg RNA
8 µL RT-Oligonukleotid (2 µL pro miRNA)

Der Reaktionsansatz wurde vorsichtig gemischt und anschließend im Thermocycler für 5 min bei 4°C, 30 min bei 16°C, weiteren 30 min bei 42°C und 10 min bei 70°C inkubiert. Die cDNA wurde nachfolgend direkt für die TaqMan-q-PCR verwendet. Der Reaktionsansatz bestand aus den in Tab. 8 aufgeführten Reagenzien.

Tab. 8: MasterMix für TaqMan-q-PCR

Ansatz
7,5 µL 2x TaqMan Universal MasterMix
0,15 µL Fluorescein
0,75 µL miRNA-spezifische TaqMan-Sonde
1,6 µL RNase/DNase-freies ddH ₂ O

Zuerst wurde der MasterMix für alle Reaktionen im leichten Überschuss hergestellt und 10 µL davon pro *well* einer 96-*well*-Mikrotiterplatte vorgelegt. Anschließend wurde 5 µL der zuvor 1:3,25 verdünnten cDNA zugegeben. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer optischen Folie versiegelt und mit dem iQ5-Cycler unter Verwendung des folgenden PCR-Programms vermessen: initiale Denaturierung für 10 min bei 95°C, 50 Zyklen bestehend

aus Denaturierung (15 s bei 95°C) sowie gleichzeitigen Anlagerung und Elongation (60 s bei 60°C).

Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der $2^{\Delta\Delta ct}$ -Methode (LIVAK und SCHMITTGEN, 2001), wobei zur Normalisierung die Anreicherung der kleinen nicht-codierenden RNA U6 verwendet wurde (KISS, 2002).

2.2.1.6. Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Zur Analyse von Nukleinsäuren wurde die Agarose-Gelelektrophorese genutzt. Nukleinsäuren sind aufgrund ihrer Phosphatgruppen negativ geladen, wodurch sie im elektrischen Feld wandern. Das Gel fungiert dabei als Molekularsieb. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Nukleinsäuren im Gel wird zum einen durch ihre Konformation und zum anderen durch ihre Größe bestimmt. Die Auftrennung erfolgte je nach Molekulargewicht der Nukleinsäuren in einem 1 bis 2%igen Agarose-Gel dem 0,3 µg/mL Ethidiumbromid zugesetzt wurde. Dieser Fluoreszenzfarbstoff interkaliert in die Nukleinsäuren wobei sich die Intensität seiner Fluoreszenz-Emission vervielfacht und eine Visualisierung im UV-Licht ermöglicht wird (WARING, 1965).

DNA-Proben wurden vor der Beladung des Geles mit 6x DNA-Ladepuffer (s.u.) versetzt. Die Gel-Elektrophorese erfolgte in horizontalen Elektrophorese-Kammern in TBE-Puffer (s.u.) bei 100 V für 30-60 min.

TBE-Puffer	6x DNA-Ladepuffer
445 mM Tris	0,25% (w/v) Bromphenolblau
445 mM Borsäure	40% (v/v) Glycerol
10 mM EDTA	100 mM EDTA
	0,1% (v/v) SDS

2.2.1.7. Reinigung von Nukleinsäuren

Die Reinigung von DNA-Fragmenten aus dem Agarose-Gel sowie die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgten mit dem ‚NucleoSpin Gel and PCR Clean-up System‘ (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers.

2.2.1.8. Restriktionsverdau von Nukleinsäuren

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die DNA sequenzspezifisch hydrolysieren können. Nach ihren Eigenschaften werden die Restriktionsendonukleasen in

drei Typen unterteilt, wobei in der Molekularbiologie hauptsächlich Restriktionsendonukleasen vom Typ II zum Einsatz kommen (ROBERTS *et al.*, 2003). Diese binden DNA sequenzspezifisch und hydrolysieren diese direkt an der meist palindromischen Erkennungssequenz von vier, sechs oder acht Basenpaaren. Die Hydrolyse der Phosphodiesterbindung kann entweder symmetrisch oder asymmetrisch erfolgen, wodurch im ersten Fall doppelsträngige Enden (*blunt ends*) und im zweiten Fall einzelsträngige Enden (*sticky ends*) entstehen. Restriktionsendonukleasen wurden in der vorliegenden Arbeit für die Klonierung von DNA-Fragmenten und die Identifizierung von Plasmiden verwendet.

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten (2.2.1.9) wurde das entsprechende PCR-Produkt oder der Ursprungsvektor mit den gleichen Restriktionsendonukleasen behandelt wie der Zielvektor bzw. mit Restriktionsendonukleasen, die identische Überhänge erzeugen.

Tab. 9: Reaktionsansätze für Restriktionsverdau

	analytischer Verdau	präparativer Verdau
Plasmid-DNA (1 µg/µL)	10 µL	2 µL
10x Puffer (Herstellerangaben)	5 µL	1 µL
Restriktionsendonuklease (10 U/µL)	3 µL	0,3 µL
RNase/DNase-freies ddH ₂ O	ad 50 µL	ad 10 µL

Der Reaktionsansatz (Tab. 9) wurde für 3 h bei 37°C oder über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die DNA elektrophoretisch (2.2.1.6) aufgetrennt und im Falle des präparativen Verdau mit dem ‚NucleoSpin Gel and PCR Clean-up System‘ (2.2.1.7) gereinigt.

2.2.1.9. Klonierung von Expressionsplasmiden

Alle Klonierungen wurden wie folgt durchgeführt: das zu klonierende DNA-Fragment wurde mittels ‚High Fidelity PCR-Enzym-Mix‘ (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) und mit spezifischen Oligonukleotiden, welche die entsprechenden Restriktionsschnittstellen enthielten, nach Angaben des Herstellers amplifiziert (Tab. 18). Als *template* für die *de-novo*-Amplifikationen diente cDNA, die durch reverse Transkription von RNA aus HeLa- oder *Fmr1*+Zellen hergestellt wurde (2.2.1.2).

Das DNA-Fragment wurde im Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.1.6), die Bande der entsprechenden Größe ausgeschnitten und gereinigt (2.2.1.7). Anschließend

konnte das Fragment, nach erfolgtem präparativen Restriktionsverdau (2.2.1.8), durch Ligation (2.2.1.10) in verschiedene Plasmide unter Verwendung entsprechender Restriktionsschnittstellen subkloniert werden. Die erfolgreiche Klonierung der Expressionsplasmide wurde durch einen analytischen Restriktionsverdau (2.2.1.8) und durch Sequenzierung (2.2.1.14) verifiziert.

2.2.1.10. Ligation

Bei der Ligation wird durch das Enzym Ligase eine Phosphodiesterbindung zwischen dem 3'OH-Ende eines DNA-Fragments und dem 5'-Phosphat-Ende eines anderen DNA-Fragments geknüpft. Diese Eigenschaft wurde genutzt, um DNA-Fragmente, die durch Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen entstanden sind, kovalent zu verknüpfen.

In diesem Falle wurde zur Ligation das Enzym T4 Ligase verwendet. Da für eine erfolgreiche Ligationsreaktion das Mengenverhältnis zwischen DNA-Fragment und Zielvektor zwischen 3:1 bis 5:1 liegen sollte, wurde vor der Ligation eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (2.2.1.6), um die Mengenverhältnisse besser abschätzen zu können.

Tab. 10: Ansatz für die Ligation

Ansatz	
DNA-Fragment	x μ L
Zielvektor	y μ L
5x Ligase-Puffer	2 μ L
T4 Ligase (1 U/ μ L)	1 μ L
RNase/DNase-freies ddH ₂ O	ad 10 μ L

Nach der Inkubation des Ligationsansatzes (Tab. 10) für 2 h bei RT wurde dieser in chemokompetente *E. coli* JM109, BL21 (DE3) oder Arctic Express (DE3) RIL transformiert (Tab. 2), auf LB-Platten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.11. Herstellung Transformations-kompetenter Bakterien

Zur Herstellung chemokompetenter *E. coli* wurden 5 mL LB-Medium mit je einer Kolonie angeimpft und über Nacht aerob bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 2 mL dieser Vorkultur zum Animpfen einer 200 mL Hauptkultur verwendet, welche bis zu

einer OD_{600} von 0,6 bei 37°C im Schüttelkolben inkubiert wurde. Die Bakterien wurden auf Eis abgekühlt und durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 3000x g und 4°C pelletiert. Das entstandene Pellet wurde in 1/20 Volumen TSB-Puffer (s.u.) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Um die kompetenten Bakterien anschließend bei -80°C zu lagern, wurden diese mit 10% Glycerol versetzt und zu je 100 µL aliquotiert.

TSB-Puffer

1x LB-Medium (Stammlösung 2x LB-Medium, pH 6,1)
10% (v/v) PEG 4000
5% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO)
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄

2.2.1.12. Transformation von Plasmid-DNA

Zur Transformation von Plasmid-DNA wurde ein 100 µL Aliquot chemokompetenter *E. coli* auf Eis aufgetaut. Entweder 50 ng Plasmid-DNA oder 10 µL Ligationsansatz wurden mit 2,5 µL 5x KCM-Lösung versetzt. Anschließend wurde der Ansatz zusammen mit den Bakterien für 20 min auf Eis und danach für 10 min bei RT inkubiert. Nach einstündigem Schütteln bei 37°C in 1 mL LB-Medium wurden die transformierten Bakterien auf LB-Platten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

5x KCM

500 mM KCl
150 mM CaCl₂
250 mM MgCl₂

2.2.1.13. Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Analyse der auf Selektions-Agar-Platten gewachsenen Kolonien wurde von diesen eine Übernachtskultur in 3 mL LB-Medium (mit entsprechendem Selektionsantibiotikum) angeimpft. 1,5 mL der Übernachtskultur wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und 1 min bei 13000x g und RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µL eiskaltem GET-Puffer (s.u.) resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert.

Zur Lyse der Bakterien wurde anschließend 200 µL 0,2 M NaOH mit 1% (v/v) SDS zugesetzt und das Lysat für 5 min bei RT inkubiert. Durch die Zugabe von 150 µL 3 M Natriumacetat wurden darauffolgend alle gelösten Proteine und die genomische DNA präzipitiert. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 13000x g und RT wurde der

Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 800 µL Isopropanol für 15 min bei RT gefällt. Die Plasmid-DNA wurde durch eine 15-minütige Zentrifugation (13000x g, RT) pelletiert, anschließend mit 500 µL 70% (v/v) Ethanol gewaschen und bei 60°C getrocknet. Die DNA wurde in 50 µL ddH₂O (+ 0,5 ng RNaseA) unter Schütteln bei 37°C im Heizblock gelöst.

Sollte die DNA zur Transfektion humaner bzw. muriner Zelllinien genutzt werden, wurde die DNA mit Hilfe des ‚NucleoBond Xtra EF Midi Purification System‘ (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) gereinigt.

Die Analyse der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen (2.2.1.8) und durch Sequenzierung (2.2.1.14). Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die OD₂₆₀ bestimmt. Bei einer OD von 1 entspricht die DNA-Konzentration 50 µg/mL (Schichtdicke der Quarzküvette: 10 mm). Die isolierte Plasmid-DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

GET-Puffer

50 mM Glucose
10 mM EDTA
25 mM Tris-HCl, pH 8,0

2.2.1.14. Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt.

2.2.1.15. *in-vitro*-Transkription

Das DNA-*template* für die *in-vitro*-Transkription der p0071-3'UTRs wurde durch Linearisierung eines p0071-3'UTR enthaltenden pcDNA3.1-Vektors mit PspOMI (New England Biolabs, Frankfurt am Main) generiert. Nach der Reinigung des *templates* mit dem ‚Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System‘ (Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA) wurde die RNA durch die T7 RNA Polymerase (Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA) nach Angaben des Herstellers transkribiert. Zur Biotin-Markierung wurde der *in-vitro*-Transkriptionsreaktion 0,5 mM rATP, rCTP, rGTP und 12,5 mM rUTP sowie 20 mM Biotin-4-UTP (Jena Bioscience, Jena, Deutschland) zugefügt. Die synthetisierte RNA wurde mittels TRIzol (2.2.1.1) gereinigt.

Die *in-vitro*-Transkription der mit 4xMS2-*loops* markierten p0071-3'UTRs bzw. der 4xMS2-*loops* (als Negativkontrolle) für die Co-Präzipitation von miRNAs erfolgte mittels

des ‚RiboMAX Large Scale RNA Production System‘ (Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA) nach Angaben des Herstellers. Die synthetisierte RNA wurde mit Hilfe des ‚MEGAclear Kit‘ (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

2.2.1.16. 5'-Markierung von Oligonukleotiden mit [γ - 32 P]-ATP

Die radioaktive Markierung von Nucleinsäuren kann am 5'- oder 3'-Ende erfolgen (BOSELEY *et al.*, 1980). Für eine 5'-Markierung muss das 5'OH-Ende der Nucleinsäure unphosphoryliert vorliegen. Die Markierung wurde mit der T4 Polynucleotidkinase (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) und [γ - 32 P]-ATP (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) durchgeführt. Der allgemeine Reaktionsansatz ist in nachstehender Tabelle aufgeführt.

Tab. 11: Reaktionsansatz zur radioaktiven Markierung von Oligonukleotiden

Ansatz
200 pmol DNA-Oligonukleotid (5'OH)
1 μ L 10x Kinasepuffer
2 μ L [γ - 32 P]-ATP
1 μ L T4 Polynucleotidkinase 10 U/ μ L
ad 10 μ L RNase/DNase-freies ddH ₂ O

Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert und die markierten Oligonukleotide anschließend durch die Zugabe von 1/10 Volumen 3 M NaOH und 2,5 Volumen Ethanol gefällt. Nach dem Lösen des Pellets in RNase/DNase-freiem ddH₂O wurde die Radioaktivität des Oligonukleotids im Szintillationszähler gemessen.

2.2.1.17. Primer Extension zur G-Quadruplex-Detektion

Die Primer Extension-Methode wurde genutzt, um die kationenabhängige Termination der reversen Transkription in der 3'UTR der p0071-mRNA zu untersuchen. Dazu wurden endmarkierte Oligonukleotide (2.2.1.16) genutzt, welche durch die AMV Reverse Transkriptase (Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA) bis zu einer putativen G-Quadruplex-Struktur verlängert werden. Dabei sind G-Quadruplexe in Anwesenheit von Kalium sehr stabil und blockieren damit den Fortschritt der Reversen Transkriptase am 3'-Ende der RNA, was in verkürzten Transkriptionsprodukten resultiert.

Umgekehrt werden G-Quadruplexe in Anwesenheit von Natrium destabilisiert und die reverse Transkription kann bis zum Ende der RNA fortgeführt werden. Dafür wurden nachstehende Reaktionsansätze verwendet (Tab. 12).

Tab. 12: Reaktionsansätze zur Oligonukleotid-Anlagerung

	Natrium	Kalium
RNA (pmol)	3 pmol	3 pmol
Oligo* (160.000 cpm/ μ L)	1 μ L	1 μ L
6HB Natrium	1 μ L	-
6HB Kalium	-	1 μ L
RNase/DNase-freies ddH ₂ O	ad 6 μ L	ad 6 μ L

Nach einminütiger Inkubation bei 90°C wurde die Reaktion 5 min bei RT verwahrt und anschließend jeweils 9 μ L der folgenden Extensionsansätze zugefügt (siehe Tab. 13).

Tab. 13: Ansätze für die Extensionsreaktion

	Extension Natrium	Extension Kalium
5x RTB Natrium	5 μ L	-
5x RTB Kalium	-	5 μ L
dNTPs (2,5 mM)	5 μ L	5 μ L
RT AMV 10 U/ μ L	0,6 μ L	0,6 μ L
RNase/DNase-freies ddH ₂ O	9,9 μ L	9,9 μ L

Die Reaktion wurde 60 min bei 42°C inkubiert und auf einem 8%igen Polyacrylamid-Harnstoff-Gel (2.2.1.18) analysiert.

6HB Natrium/Kalium

300 mM HEPES, pH 7,0
600 mM KCl/NaCl
1 mM EDTA

5x RTB Natrium/Kalium

250 mM Tris-HCl, pH 8,5
30 mM MgCl₂
200 mM KCl/NaCl

2.2.1.18. Polyacrylamid-Harnstoff-Gelelektrophorese

Denaturierende Polyacrylamid-Harnstoff-Gele eignen sich zur elektrophoretischen Auftrennung und Reinigung von einzelsträngiger DNA und RNA. Durch die Anwesenheit des denaturierenden Harnstoffs wird die Basenpaarung der Nukleinsäuren verhindert, wodurch diese unabhängig von ihrer Basenzusammensetzung und Sequenz durch das Gel migrieren.

Die aufzutrennende DNA bzw. RNA wurde mit 2x FA-SB (s.u.) versetzt und 10 min bei 65°C inkubiert. In der Zwischenzeit erfolgte ein 10-minütiges „Vorlaufen“ des Polyacrylamid-Harnstoff-Gels in 1x TBE-Puffer. Der anschließende Gel-Lauf erfolgte bei 15 mA für 10 bis 30 min. Unmarkierte Nukleinsäuren wurden mittels GelGreen (Biotium, Hayward, Kalifornien, USA) gefärbt. Die Detektion radioaktiv markierter Nukleinsäuren erfolgte hingegen über die Exposition des Gels mit einem sensitiven Röntgenfilm ÜN bei -20°C.

Gelzusammensetzung

13,25 mL 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid
14,5 mL ddH₂O
21 g Harnstoff
10 mL 5x TBE
200 µL 10% APS
25 µL TEMED

2x FA-SB

18 mM EDTA
0,25% (v/v) SDS
2,5% (v/v) Bromphenolblau
93,65% (v/v) Formamid

2.2.2. Biochemische Methoden

2.2.2.1. Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden die Zellen einmal mit eiskaltem PBS gewaschen, und mit entsprechender Menge Lysepuffer (s.u.) versetzt und mit Hilfe eines Zellschabers von der Schale gekratzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und per Handwärme wieder aufgetaut. Gegebenenfalls wurde die Suspension 15-mal mit einer 0,8 mm Kanüle (Sterican, B. Braun AG, Melsungen, Deutschland) und danach 15-mal mit einer 0,45 mm Kanüle (Sterican, B. Braun AG, Melsungen, Deutschland) homogenisiert.

SDS-Lysepuffer

25 mM Tris-HCl, pH 7,4
1% (v/v) SDS

5x MLB-Lysepuffer

125 mM HEPES, pH 7,5
750 mM NaCl
5% (v/v) NP-40
5 mM EDTA
10% (v/v) Glycerol

2.2.2.2. Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in einem Zelllysate wurde das ‚Coomassie Plus Protein Assay Reagent‘ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) verwendet.

Das Lysat wurde in ddH₂O 1:150 verdünnt und mit einem Volumen ‚Coomassie Plus Protein Assay Reagent‘ versetzt, geschüttelt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm bestimmt. Die Konzentration wurde unter Verwendung einer BSA-Kalibrierungsreihe errechnet.

2.2.2.3. Fällung von Proteinen

Diese Methode dient dazu, gelöste Proteine aus einer wässrigen Lösung zu konzentrieren. Proteinfällungen wurden mit Trichloressigsäure (TCA) durchgeführt. Dazu wurde der Proteinlösung 1/10 Volumen Natriumdeoxycholat sowie 1/5 Volumen eiskalte 10%ige TCA zugefügt. Nach kräftigem Mischen erfolgte die Inkubation bei 4°C für 10 min und anschließend ein Zentrifugationsschritt bei 13000x g für 10 min bei 4°C. Der Überstand wurde entfernt und zweimal mit 500 µL eiskaltem Aceton gewaschen. Das gewonnene Proteinpellett wurde für 5 min bei 95°C getrocknet und anschließend in 2x SDS-Probenpuffer resuspendiert.

2.2.2.4. SDS-PAGE

In der vorliegenden Arbeit wurde die SDS-PAGE (Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) zur Auftrennung von Proteinen verwendet (LAEMMLI, 1970). Dabei kamen 7,5 - 15%ige Polyacrylamid-Gele (s.u.) zum Einsatz. Die Funktion des SDS beruht darauf, dass die Sekundär- und Quartärstruktur von Proteinen zerstört wird und durch Mizellenbildung die Ladung der Proteine abgeschirmt wird. Aufgrund des anionischen SDS werden die Proteine im elektrischen Feld deshalb nur ihrer Größe nach aufgetrennt.

Es wurden 50 bis 75 µg Protein in 24 µL SDS-Lysepuffer mit 8 µL 4x SDS-Probenpuffer (s.u.) versetzt und anschließend für 5 min bei 95°C denaturiert. Neben 20 µL Proteinprobe wurden 5 µL Proteinmarker (‚Unstained Protein Molecular Weight Marker‘ bzw. ‚Prestained Protein Marker‘) auf das Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in Abhängigkeit vom eingesetzten Gel bei 90 V für 120 bis 180 min.

4x SDS-Probenpuffer

0,25 mM Tris-HCl, pH 6,8
8% (v/v) SDS
10% (v/v) β-Mercaptoethanol
30% (v/v) Glycerol
0,2% (v/v) Bromphenolblau

Elektrophoresepuffer

25 mM Tris-HCl, pH 8,8
132 mM Glycin
0,1% (v/v) SDS

Sammelgelpuffer

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

Sammelgel-Zusammensetzung

2,6 mL 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid
7,5 mL 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
200 µL 10% SDS
400 µL 10% APS
20 µL TEMED
12 mL ddH₂O

Trenngelpuffer

1,5 M Tris-HCl, pH 8,8

Trenngel-Zusammensetzung (10%ig)

10 mL 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid
7,5 mL 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
300 µL 10% SDS
200 µL 10% APS
20 µL TEMED
12 mL ddH₂O

2.2.2.5. Western Blot

Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine per *semi-dry*-Verfahren auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert (RENART *et al.*, 1979). Der Aufbau der Blotapparatur ist im Folgenden beschrieben.

Anode (+)

3x Whatmanpapier in Blotpuffer I
3x Whatmanpapier in Blotpuffer II
1x Nitrocellulose in Blotpuffer II
1x SDS-Polyacrylamid-Gel
3x Whatmanpapier in Blotpuffer III

Kathode (-)

Der Transfer erfolgte bei 1 mA/cm² für 60 bis 180 min (in Abhängigkeit von der Größe des Proteins). Zur Kontrolle des Transfers wurde die Nitrocellulose mit 1x Ponceau-S-Lösung (s.u.) gefärbt, die Markerbanden gekennzeichnet und anschließend in ddH₂O gewaschen. Nach dem Entfärben der Membran durch mehrmaliges Waschen mit TBST (s.u.) erfolgte die Blockierung von unspezifischen Antikörperbindestellen für 60 min mit 5% (w/v) Milch/TBST bzw. mit 5% (w/v) BSA/TBST (nach Angaben des Antikörper-Herstellers).

Die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper (Tab. 16) erfolgte über Nacht bei 4°C in 5% Milch/TBST bzw. in 5% BSA/TBST (nach Angaben des Herstellers). Nach dreimaligem Waschen mit TBST wurde die Membran mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper (Tab. 17) für 2 h in 5% Milch/TBST bei RT inkubiert und anschließend wieder dreimal in TBST gewaschen, um ungebundenen sekundären Antikörper zu entfernen. Die Peroxidaseaktivität des gebundenen sekundären Antikörpers wurde durch die Zugabe eines Substrates (Roti-Lumin oder CL-Lösung, s.u.) mit

anschließendem Auflegen eines Röntgenfilms (FujiFilm X-ray Film RX, Fuji, Minato, Japan) detektiert.

Blotpuffer I	Blotpuffer II	Blotpuffer III
0,3 M Tris-HCl, pH 10,4 20% (v/v) Methanol	25 mM Tris-HCl, pH 10,4 20% (v/v) Methanol	25 mM Tris-HCl, pH 9,4 20% (v/v) Methanol 40 mM ϵ -Aminocapronsäure
10x TBST	10x Ponceau-S-Lösung	CL-Lösung
100 mM Tris-HCl, pH 7,6 1 mM NaCl 1% (v/v) Tween-20	2% (w/v) Ponceau-S 30% (v/v) Sulfosalicylsäure 30% (v/v) Trichloressigsäure	25 mM Luminol 0,4 mM Cumarinsäure 100 mM Tris-HCl, pH 8,5 0,02% (v/v) H ₂ O ₂ 100 mM Tris-HCl, pH 8,5

2.2.2.6. Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Um alle Proteine in einem SDS-Polyacrylamid-Gel sichtbar zu machen, wurde Coomassie-Brillant Blau R250 genutzt. Der Triphenylmethanfarbstoff bildet starke nicht-kovalente Komplexe mit Proteinen. Die Bildung des Protein-Farbstoffkomplexes stabilisiert die negativ geladene, anionische Form des Farbstoffs und ruft eine charakteristische blaue Farbe hervor.

Für die Färbung wurde das Gel in Coomassie-Lösung (s.u.) aufgekocht und anschließend mehrfach in Entfärber-Lösung (s.u.) gekocht, um ungebundenen Farbstoff zu entfernen.

Coomassie-Lösung

0,25% (w/v) Coomassie-Brillant Blau R250
9,2% (v/v) Essigsäure
45% (v/v) Methanol

Entfärber-Lösung

7,5% (v/v) Essigsäure
5% (v/v) Methanol

2.2.2.7. Expression und Reinigung von MS2BP-MBP

Die Expression des MS2BP-MBP-Fusionsproteins erfolgte im *E. coli*-Stamm BL21 (DE3), der zuvor mit dem MS2BP-MBP-pMAL5-Plasmid transformiert wurde (2.2.1.12). Eine 5 mL Vorkultur wurde bei 37°C über Nacht inkubiert, anschließend zu 1 L LB-Medium (+ 100 μ g/mL Ampicillin, 0,2% (v/v) Glucose) hinzugefügt und für 3 bis 4 Stunden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Proteinexpression erfolgte für 2 h bei 37°C durch Zugabe von IPTG (0,3 mM Endkonzentration). Die Bakterien wurden durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 5000x g und 4°C geerntet und das Pellet in

25 mL CB1 (+ 1:250 Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich, München, Deutschland), 1:1000 DTT) resuspendiert.

Die Lyse erfolgte durch die Zugabe einer Spatelspitze Lysozym mit nachfolgender Ultraschallbehandlung. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 20000x g und 4°C wurde der Rohextrakt mit CB1 (s.u.) auf ein finales Volumen von 40 mL eingestellt. Gleichzeitig wurden Amylose-Kügelchen (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) (2 mL Suspension pro Liter Bakterien) zweimal mit CB1 in einer PD10-Säule gewaschen. Anschließend wurde das Rohextrakt zusammen mit den Amylose-Kügelchen für 1 h bei 4°C rotierend inkubiert und die Amylose-Kügelchen nachfolgend dreimal mit CB1 auf einer PD10-Säule gewaschen. Zur Elution wurden die Amylose-Kügelchen mit 10 mL Maltose (10 mM) in CB1 (+ 1:1000 DTT) für 5 min rotierend bei 4°C inkubiert und in 1 mL-Fractionen aliquotiert. Die MS2BP-MBP-haltigen Fractionen wurden vereinigt und über FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) mit einer DEAE-Säule (5 mL Säulenvolumen) gereinigt und durch einen linearen NaCl-Gradienten (CB2, s.u.) eluiert. Das Protein wurde über Nacht in 1 L Bindepuffer (s.u.) dialysiert und nach einer Proteinkonzentrationsbestimmung (2.2.2.2) aliquotiert und bei -80°C gelagert.

CB1	CB2	Bindepuffer
20 mM Tris-HCl, pH 7,4	20 mM Tris-HCl, pH 7,4	20 mM Tris-HCl, pH 7,4
200 mM NaCl	1 M NaCl	150 mM NaCl
1 mM EDTA	1 mM EDTA	1,5 mM MgCl ₂
		8,7% (w/v) Glycerol

2.2.2.8. Expression von GST-Fusionsproteinen

Die Expression von GST-Fusionsproteinen erfolgte in den *E. coli*-Stämmen BL21 (DE3) oder Arctic Express (DE3) RIL. Diese wurden dazu mit Plasmiden transformiert (2.2.1.12), die für die entsprechenden GST-(Glutathion-S-Transferase)-Fusionsproteine codieren. Im Falle von GST und GST-ROCK wurde ein Klon *E. coli* BL21 (DE3) zum Animpfen einer Vorkultur in 25 mL 2x YT-Medium (+ 100 µg/mL Ampicillin) verwendet, die bis zu einer OD₆₀₀ ≥ 1,2 bei 37°C unter Schütteln inkubiert wurde. Von dieser Vorkultur wurde die Hauptkultur in 250 mL 2x YT-Medium (100 µg/mL Ampicillin) angeimpft und dabei deren OD₆₀₀ auf 0,4 eingestellt. Die Expression erfolgte für 3 h bei 30°C durch Zugabe von IPTG (0,2 mM). Für die Expression von GST-PAK3 wurde ein Klon *E. coli* Arctic Express (DE3) RIL in 25 mL 2x YT-Medium bis zu einer OD₆₀₀ ≥ 1,2 unter Schütteln bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde die Hauptkultur in 250 mL 2x YT-Medium (+ 100 µg/mL Ampicillin) angeimpft und deren OD₆₀₀ auf 0,4 eingestellt.

Die Expression erfolgte durch Zugabe von IPTG (0,2 mM) bei 13°C über Nacht. Danach wurden die Bakterien durch Zentrifugation für 10 min bei 4000x g und 4°C geerntet. Die Bakterien konnten im Anschluss bei -80°C gelagert werden.

Um zu analysieren, ob das gewünschte Protein exprimiert wurde und ob dieses löslich war, wurden die Bakterien in PBS durch Ultraschall aufgeschlossen und unlösliche Proteine und Zelltrümmer durch Zentrifugation für 30 min bei 14000x g und 4°C abgetrennt. Das entstandene Pellet wurde in 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen, 5 min bei 95°C inkubiert und 5 min bei 14000x g zentrifugiert. Die Analyse der löslichen und unlöslichen Fraktion erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung (2.2.2.4 und 2.2.2.6).

2.2.2.9. GST-pulldown-Analyse

Die GST-pulldown-Analyse wurde in dieser Arbeit genutzt, um den Aktivitätsstatus der Rho-GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 in Zelllysaten zu untersuchen. Es handelt sich um eine *in-vitro*-Methode mit der die physikalische Interaktion zwischen mehreren Proteinen untersucht werden kann. Beim GST-pulldown wird ein bakteriell exprimiertes GST-Fusionsprotein in einer Enzym-Substrat-Reaktion an Glutathion-Sepharose (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) gekoppelt. Diese Protein-Sepharose kann mit Zelllysaten, *E. coli*-Zellextrakten bzw. gereinigten Proteinen inkubiert werden. Die Bindung von Proteinen wird anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert (2.2.2.4 und 2.2.2.5).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Pellets von Bakterien, die GST, GST-ROCK und GST-PAK3 exprimierten, in Bakterien-Lysepuffer (+ 1 mM DTT, 1 mM Pefabloc SC, 10 µg/mL Aprotinin, 10 µg/mL Leupeptin, s.u.) resuspendiert und die Bakterien anachfolgend mittels Ultraschall aufgeschlossen. Zur Abtrennung von Bakterientrümmern und unlöslichen Proteinen wurden die Lysate für 30 min bei 14000x g und 4°C zentrifugiert. Zum Immobilisieren der GST-Fusionsproteine wurden die Überstände für 2 h bei 4°C mit in Bakterien-Lysepuffer äquilibrierter Glutathion-Sepharose inkubiert.

Bakterien-Lysepuffer

50 mM Tris-HCl, pH 7,5
150 mM NaCl
1 mM EDTA
10% (w/v) Glycerol

2.2.2.10. Streptavidin-pulldown

Der Streptavidin-pulldown ist eine *in-vitro*-Methode zur Identifizierung von RNA-Protein-Interaktionen. Dabei wird eine *in vitro* transkribierte, biotinylierte RNA an Streptavidin-beschichtete Sepharose gebunden. Nach Inkubation mit Zelllysaten und mehrmaligem Waschen kann das an die RNA gebundene Protein eluiert werden.

In dieser Arbeit wurde die *in vitro* transkribierte, biotinylierte p0071-3'UTR (2.2.1.15) in Bindepuffer (s.u.) an Streptavidin-Sepharose (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA) immobilisiert und anschließend für 30 min bei RT mit HEK293-Zelllysate (Lyse-Puffer I, siehe 2.2.2.11) inkubiert. Nach der Elution mit 1x SDS-Probenpuffer wurde das Eluat mittels SDS-PAGE (2.2.2.4) und Western Blot (2.2.2.5) auf die erfolgreiche Bindung von FMRP hin analysiert.

Bindepuffer

5 mM Tris-HCl, pH 7,5
0,5 mM EDTA
1 M NaCl

2.2.2.11. Co-Immunpräzipitation von RNA-Liganden

Um die spezifische Assoziation von FMRP mit verschiedenen mRNAs zu untersuchen, wurde endogenes FMRP mit einem spezifischen polyklonalen Antikörper präzipitiert. Die aus dem Präzipitat isolierte RNA wurde anschließend mittels semiquantitativer und q-PCR (2.2.1.5) analysiert. Das Experiment wurde in HEK293- sowie *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Zellen wie folgt durchgeführt.

Zur Herstellung eines zyttoplasmatischen Zellextrakts wurde das TAP-Lyse-Puffersystem verwendet, welches eine fraktionierte Extraktion von Zytoplasmen und Zellkernen ermöglicht. Hierfür wurden die zuvor geernteten Zellen einmal mit 5 mL Lyse-Puffer I (s.u.) gewaschen und bei 1500x g für 5 min zentrifugiert. Der Lyse-Puffer II (s.u.) wurde mit 50 U/mL RNaseOUT (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA), 100 µM RVC (Ribonukleotid-Vanadyl-Komplexe, Merck, Darmstadt, Deutschland) und 1:250 Protease-Inhibitoren (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA) versetzt, bevor das Zellpellet in 1,5 mL Lyse-Puffer II resuspendiert wurde. Zur Lyse wurde die Suspension 10 min auf Eis inkubiert und anschließend 15 bis 20-mal mittels Dounce-Homogenisator homogenisiert. Um die Zellkerne beim Pelletieren nicht zu zerstören, wurde für 5 min bei nur 5000x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß

überführt und das Pellet ein zweites Mal mit 0,5 mL Lyse-Puffer II wie zuvor extrahiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt von 5 min bei 5000x g und 4°C wurden die beiden Überstände vereinigt. Ein DNaseI-Verdau wurde mit 10 U/mL DNaseI (RNase-frei) für 15 min auf Eis durchgeführt. Zelltrümmer wurden anschließend für 10 min bei 13000x g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 0,2% (v/v) Hefe-tRNA versetzt. Von dem fertigen Zellextrakt wurden 2 Proben entnommen: einmal 100 µL als RNA-*input*, einmal 100 µL als Protein-*input*. Die Proben verblieben bis zur Aufarbeitung auf Eis.

In der Zwischenzeit wurden die in einem FMRP-Immunsereum erhaltenen Antikörper an ein 1:1-Gemisch aus ProteinA- und ProteinG-Sepharose-Kügelchen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) gekoppelt. Hierfür wurde der Lyse-Puffer II auf 150 mM KCl unter Verwendung des Lyse-Puffers III (s.u.) eingestellt. 50 µL Sepharose-Gemisch wurden mit Lyse-Puffer II (150 mM KCl) eingewaschen. 25 µL Sepharose-Gemisch wurden zur Immobilisierung des Antikörpers mit 2 µg FMRP-Antikörper (Abcam, Cambridge, UK; in Lyse-Puffer II (150 mM KCl)) für 1 h bei 4°C rotierend inkubiert. Weitere 25 µL Sepharose-Gemisch wurden als Kontrolle mit Lyse-Puffer II allein ebenfalls für 1 h bei 4°C unter Rotation inkubiert. Das Sepharose-Gemisch wurde abzentrifugiert und mit Lyse-Puffer II (150 mM KCl) gewaschen. 2 mL Zellextrakt wurden mit 1 mL Lyse-Puffer III auf 150 mM KCl eingestellt. Das FMRP- bzw. das Kontroll-Sepharose-Gemisch wurde zur Immunpräzipitation jeweils mit 1,5 mL Zellextrakt (150 mM KCl) für 60 min bei 4°C rotierend inkubiert.

Im Anschluss wurde das Sepharose-Gemisch dreimal mit Lyse-Puffer II (150 mM KCl) gewaschen, bevor eine Protein/RNA-Elution wie folgt durchgeführt wurde: die Sepharose wurde in 200 µL DEPC-H₂O mit 0,2% (v/v) SDS und 2% (v/v) β-Mercaptoethanol aufgenommen und für 5 min bei 70°C zur Protein-Elution inkubiert. Nach dem Pelletieren des Sepharose-Gemisches durch Zentrifugation für 30 s bei 13000x g wurde jeweils eine Probe von 20 µL entnommen. Die Proben wurden zusammen mit der *input*-Probe auf eine SDS-PAGE aufgetragen und ein Western Blot gegen FMRP durchgeführt, um die spezifische Immunpräzipitation von FMRP zu überprüfen.

Die verbliebene Sepharose wurde schüttelnd einem Proteinase-K-Verdau für 15 min bei 55°C unterzogen. Die beiden RNA-*input*-Fraktionen wurden nach Zugabe von 80 µL Lyse-Puffer II (150 mM KCl) ebenfalls einem Proteinase-K-Verdau unterzogen. Anschließend wurden alle Proben mit jeweils 160 µL DEPC-H₂O und 80 µL Ammoniumacetat (7,5 M) versetzt. Die Sepharose wurde für 30 s bei 13000x g

abzentrifugiert. 400 μL des Überstandes wurden in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 400 μL Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol unter Rührschütteln extrahiert. Zur Phasentrennung wurde für 5 min bei 13000x g und 4°C zentrifugiert. 380 μL der oberen Phase wurden in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wurde durch Zugabe von 1 mL 99% (v/v) Ethanol und 2 μL Glycogen für 1 h bei -20°C gefällt. Anschließend wurde für 15 min bei 13000x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 80% (v/v) Ethanol gewaschen und in 20 μL RNase/DNase-freiem H₂O resuspendiert.

Lyse-Puffer I	Lyse-Puffer II	Lyse-Puffer III
10 mM HEPES, pH 7,4	10 mM HEPES, pH 7,4	10 mM HEPES, pH 7,4
10 mM KCl	3 mM MgCl ₂	3 mM MgCl ₂
5 mM MgCl ₂	10 mM KCl	0,5 M KCl
	5% (w/v) Glycerol	5% (w/v) Glycerol
	0,5% (w/v) NP-40	0,5% (w/v) NP-40

2.2.2.12. mi-TRAP

Der mi-TRAP ist eine *in-vitro*-Methode zur Identifizierung von regulatorischen miRNAs einer spezifischen mRNA. miRNA-mRNA-Interaktionen sind durch unvollständige Basenpaarung gekennzeichnet. Die Schwierigkeit bei der Identifizierung von *miRNA targeting sites* (MTSS) für eine spezielle mRNA besteht in der Verwendung von *in-silico*-Vorhersagen, welche sich auf *seed*-Sequenzen und interspezifische Homologien konzentrieren (LEWIS *et al.*, 2003; KREK *et al.*, 2005; BETEL *et al.*, 2008). Mit Hilfe des mi-TRAPs können spezifisch an eine immobilisierte mRNA gebundene miRNAs (und auch RNA-bindende Proteine) isoliert und mittels TaqMan-q-PCR analysiert werden.

Es wurden 110 μL Amylose-Kügelchen (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) dreimal mit Lyse- und Bindepuffer (LBP, s.u.) gewaschen und anschließend mit 400 pmol aufgereinigtem MS2BP-MBP (2.2.2.7) für 1 h bei RT inkubiert. Nach dem vollständigem Entfernen des LBP wurden zum Blocken von unspezifischen Bindestellen 950 μL LBP, versetzt mit 50 μL BSA (10 mg/mL) und 4 μL Hefe-tRNA (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), zugefügt und erneut bei RT für 30 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit LBP wurden die Amylose-Kügelchen in 2 gleiche Ansätze aufgeteilt und der LBP vollständig entfernt. Es wurde anschließend mit 1 mL LBP (+ 11 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Heparin) aufgefüllt und die Amylose-Kügelchen mit 20 pmol *in vitro* transkribierter, mit 4xMS2-loops markierter, p0071-3'UTR bzw. mit 20 pmol *in vitro* transkribiertem 4xMS2-loops (2.2.1.15) für 1 h rotierend bei RT inkubiert.

Währenddessen wurde eine konfluente 15 cm-Schale HEK293-Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber in 5 mL PBS abgekratzt und für 5 min bei 2000x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1,5 mL LBP (+ 1:250 Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) aufgenommen, 15 min auf Eis inkubiert und bei 4°C für 10 min bei 13000x g zentrifugiert. Vom Überstand wurden 60 µL als Protein-*input* aliquotiert und mit 20 µL 4x SDS-Probenpuffer inkubiert. 200 µL des Überstandes dienten als RNA-*input* und wurden mit 160 µL RNase-freiem H₂O versetzt.

Die Amylose-Kügelchen wurden anschließend einmal mit LBP (+ 11 µg/mL Heparin) gewaschen und mit 500 µL Zelllysat sowie 500 µL LBP (+ 11 µg/mL Heparin, 30 U RNaseOUT, 1 mM DTT) für 30 min bei RT rotierend inkubiert. Darauffolgend wurden die Amylose-Kügelchen fünf Mal mit 900 µL LBP (+ 11 µg/mL Heparin) gewaschen und nachdem der LBP vollständig entfernt wurde, der immobilisierte Komplex zweimal für 15 min mit 150 µL Maltose (15 mM) von den Amylose-Kügelchen eluiert. Die RNA-*input* Fraktion wurde mit 3 µL Proteinase-K einem 15-minütigen Verdau bei 55°C unterzogen.

Zur Isolation präzipitierter miRNAs und zur Kontrolle der Bindung der Beute-RNA wurden das Eluat und der *input* mit 80 µL Ammoniumacetat, 80 µL RNase-freiem H₂O sowie 400 µL Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol versetzt, gemischt und bei 4°C und 14000x g für 15 min zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 1 mL 99% (v/v) Ethanol und 2 µL Glycogen für 1 h bei -20°C gefällt. Anschließend wurde für 15 min bei 13000x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 80% (v/v) Ethanol gewaschen, kurz getrocknet und der *input* in 30 µL, das Eluat in 12 µL RNase/DNase-freien H₂O aufgenommen. Eine Hälfte der eluierten RNA wurde mit 6 µL 2xFAB versetzt, 10 min bei 65°C inkubiert und auf einem Polyacrylamid-Harnstoff-Gel (2.2.1.18) analysiert. Die andere Hälfte des Eluats sowie die *input*-Fraktion wurden mittels TaqMan-q-PCR (2.2.1.5) analysiert.

Zur Isolation co-präzipitierter RNA-bindender Proteine wurde eine Proteinfällung (2.2.2.3) von bis zu vier vereinigten Eluaten durchgeführt.

Lyse- und Bindepuffer (LBP)

20 mM Tris-HCl, pH 7,5
150 mM KCl
1,5 mM MgCl₂
8,7% (v/v) Glycerol
0,05% (v/v) NP-40

2.2.2.13. Dichtegradientenzentrifugation

Die Dichtegradientenzentrifugation ist eine physikalische Trennmethode. Durch Ultrazentrifugation können Makromoleküle aufgrund ihrer unterschiedlichen Sedimentationseigenschaften im Dichtegradienten getrennt werden. In dieser Arbeit wurden Dichtegradientenzentrifugationen genutzt, um polysomale und prä-polysomale RNAs aus *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Zelllysaten voneinander zu trennen. Je Gradient wurde eine zu 90% konfluente 15 cm-Schale *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Zellen, die zuvor 15 min mit Cycloheximid (100 µg/mL) behandelt wurde, trypsiniert und anschließend mit PBS gewaschen. Die Zelllyse erfolgte durch Zugabe von Gradientenpuffer (s.u.). Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 2 mg Protein auf einen linearen 10 bis 45%igen (w/v) Sucrosegradienten geladen.

Die Zentrifugation erfolgte für 2 h bei 40000x g in einem SW40Ti Beckmann Rotor. Die Gradienten wurden mit Hilfe eines Sammelsystems (ISCO) in 800 µL Aliquots fraktioniert, die RNA durch TRIzol isoliert (2.2.1.1) und diese mittels q-PCR vermessen (2.2.1.5).

Gradientenpuffer

150 mM Kaliumacetat
20 mM HEPES, pH 7,4
5 mM MgCl₂
10% bzw. 45% (w/v) Sucrose
1% (v/v) NP-40

2.2.2.14. Reporter-Gen-Analysen

Zur Bestimmung der Translationsaktivität *in vivo* wurde das Luciferase-Reporter-Gen-System verwendet. Reportersysteme werden genutzt, um die Genexpression zu analysieren. Dabei werden normalerweise duale Reporter verwendet, um die experimentelle Genauigkeit zu erhöhen, wobei sich „dualer Reporter“ auf die simultane Expression und Messung von zwei individuellen Reporter-Enzymen in einem System bezieht. Typischerweise korreliert der „experimentelle Reporter“ direkt mit dem Effekt der spezifischen experimentellen Bedingungen während die Aktivität des co-transfizierten „Kontrollreporters“ als interne Kontrolle fungiert.

Vierundzwanzig Stunden nach dem Einsäen von 12×10^4 *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Zellen in 6-well-Platten wurden diese mit jeweils 250 ng p0071-3'UTR Luciferase-Reporter-Plasmiden und pRL-CMV co-transfiziert (Verhältnis 1:1). Gegebenenfalls wurde

zusätzlich ein FMRP-EGFP- oder FMRP-(S499A)-EGFP-Expressionsplasmid transfiziert. Nach 16 h wurden die Luciferase-Aktivitäten über das ‚Dual Glo Luciferase Assay System‘ (Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA) bestimmt. Dabei wurden die *firefly*-Luciferase-Aktivitäten auf die *Renilla reniformis*-Luciferase-Aktivitäten abgeglichen.

2.2.2.15. Statistische Auswertungen

In dieser Arbeit wurden, sofern nicht anders vermerkt, Quantifizierungen anhand von mindestens drei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Die Standardabweichungen wurden als Fehlerbalken in den Diagrammen dargestellt.

Der zweiseitige heteroskedastische Student's t-Test wurde zur Bestimmung der Signifikanz zwischen zwei Populationen genutzt (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$; *** $p \leq 0,0005$).

2.2.3. Immunhistochemische Methoden

2.2.3.1. Immunfluoreszenz

Zur Analyse von Proteinlokalisationen in Zellen wurden Immunfluoreszenz-Studien durchgeführt. Zellen wurden auf Deckgläschen eingesät und ggf. transfiziert und zu entsprechenden Zeitpunkten nach dreimal Waschen mit PBS in 3,7% (v/v) Formaldehyd/PBS für 10 min bei 4°C fixiert. Nach einmaligem Waschen in PBS wurden die Zellen in 0,5% (v/v) Triton X-100/PBS für 15 min bei RT permeabilisiert. Einem PBS-Waschschritt folgte die Inkubation in 1% (w/v) Milch/PBS für 30 min bei RT, um unspezifische Antikörper-Bindestellen zu blockieren. Darauffolgend wurden die Zellen mit dem gewünschten Primärantikörper in 1% (w/v) Milch/PBS über Nacht bei 4°C inkubiert und nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte erneut für 10 min eine Blockierung unspezifischer Antikörper-Bindestellen mit 1% (w/v) Milch/PBS bei RT.

Es folgte eine Inkubation der Zellen mit einem spezie-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Sekundärantikörper in 1% (w/v) Milch/PBS bei RT für 1 h. In diesem Schritt erfolgte außerdem die Markierung der DNA mit DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol) und ggf. die Färbung des Aktinzytoskeletts mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugiertem Phalloidin. Nach dreimaligem Waschen mit PBS und dem Waschen mit ddH₂O wurden die Zellen in 96% (v/v) Ethanol entwässert, getrocknet und in Mowiol (s.u.) eingedeckelt.

Die Bildaufnahme erfolgte unter standardisierten Bedingungen an einem Nikon E600 Mikroskop mit einem 60x Objektiv (Apochromat TIRF, Nikon, Tokio, Japan) über eine CDD Kamera (CCD-1300QLN, VDS Vosskühler, Stadtroda, Deutschland) unter Verwendung der Software NIS Elements AR 3.10 (Nikon, Tokio, Japan). Die Bearbeitung sowie die Auswertung der Bilder erfolgte mit der Software ImageJ Version 1.42 (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

Mowiol

5% (w/v) Mowiol
30% (v/v) Glycerol
0,25% (w/v) DABCO

2.2.3.2. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung ist eine Methode, die es erlaubt, auf subzellulärer Ebene spezifische mRNAs zu detektieren, zu lokalisieren und zu quantifizieren. Es werden multiple Oligonukleotide mit verschiedenen Sequenzen verwendet, die fluoreszenzmarkiert sind, additiv entlang des gleichen Zieltranskripts binden und ein detektierbares Signal erzeugen. In dieser Arbeit wurde ein Gemisch aus 48 verschiedenen Quasar 570-markierten Sonden (Stellaris FISH Probes, Biosearch Technologies, Novato, Kalifornien, USA) verwendet, die spezifisch die codierende Sequenz der murinen p0071-mRNA erkennen (NM_175464).

Die auf Deckgläschen eingesäten Zellen wurden nach einmaligem Waschen mit PBS in 3,7% (v/v) Formaldehyd/PBS für 10 min bei RT fixiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Nach einstündiger Permeabilisierung in 70% (v/v) Ethanol bei 4°C wurden die Zellen für 5 min bei RT mit Waschpuffer (s.u.) behandelt und mit den in Hybridisierungspuffer (s.u.) verdünnten Sonden über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach 30-minütigem Waschen in Waschpuffer wurde die DNA für 30 min bei 37°C mittels DAPI gefärbt und das Aktinzytoskelett mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugiertem Phalloidin markiert. Auf einen erneuten Waschschrift folgte die Entwässerung der Zellen mit 96% (v/v) Ethanol. Nach dem Trocknen wurden die Deckgläschen in ProLong Gold Antifade (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA) eingebettet.

Washpuffer

10% Formamid
10% 2x SSC

Hybridisierungspuffer

10% Formamid
10% 2x SSC
100 mg/mL Dextransulfat

2.2.3.3. F-Aktin/G-Aktin-Messung

5×10^3 *Fmr1*^{+/+}- und *Fmr1*^{-/-}-Zellen wurden in 96-well-Platten eingesät und nach 24 h mit 3,7% (v/v) Formaldehyd/PBS fixiert und zur Markierung von F-Aktin mit AlexaFluor 594-konjugiertem Phalloidin (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA) für 10 min bei RT inkubiert. Im Falle der G-Aktin-Markierung erfolgte die Inkubation für 10 min bei RT mit AlexaFluor 594-konjugierter DNaseI (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA). Die Markierung der DNA erfolgte mit DAPI.

Die Messung der F-Aktin/G-Aktin-Verhältnisse erfolgte mittels Fluoreszenzspektrometrie mit dem Plattenlesegerät Infinite M1000 PRO (Tecan Group, Männedorf, Österreich), wobei die DAPI-Fluoreszenz zum Abgleich verwendet wurde.

2.2.4. Zellbiologische Methoden

2.2.4.1. Kultivierung humaner und muriner Zellen

Embryonale Fibroblasten von *Fmr1*-KO-Mäusen wurden in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) unter Zusatz von 10% (v/v) FCS (*fetal calf serum*) und 75 mM Hygromycin B kultiviert. HEK293-Zellen wurden in DMEM mit 10% (v/v) FCS und 1% (v/v) Natriumpyruvat kultiviert, wohingegen Neuro-2a-Zellen in DMEM mit 5% (v/v) FCS und 1% (v/v) nichtessenziellen Aminosäuren gehalten wurden. Zur Differenzierung der Neuro-2a-Zellen wurde die Menge an FCS auf 2% (v/v) reduziert und dem Medium 20 μ M Retinsäure und 3 μ M Aphidicolin zugesetzt. Alle Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Alle 2 bis 3 Tage wurden die Zellen passagiert. Dazu wurden diese nach einmaligem Waschen mit PBSE in 1 mL 0,5% (v/v) Trypsin/PBSE von der Schale abgelöst und in 5 mL des entsprechenden Kultivierungsmediums aufgenommen. Nach 3-minütiger Zentrifugation bei 1000x g wurde das Zellpellet in 5 mL Medium resuspendiert, die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt und die gewünschte Menge an Zellen eingesät.

2.2.4.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen wie unter 2.2.4.1 beschrieben, abgelöst und nach dem Zentrifugieren in 1 mL FCS mit 10% (v/v) DMSO resuspendiert und in Einfriereröhrchen überführt. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen wurden die Zellen im Wasserbad erwärmt und umgehend in 5 mL vorgewärmtem Kultivierungsmedium resuspendiert. Nach 3-minütiger Zentrifugation bei 1000x g wurde das Pellet in frischem Medium resuspendiert und die Zellen ausgesät.

2.2.4.3. Transfektion humaner und muriner Zellen

Als Transfektion bezeichnet man das nicht-virale Einbringen von Fremd-DNA in eukaryontische Zellen. In der vorliegenden Dissertation wurden eukaryontische Zellen mit Hilfe von Kalziumphosphat oder Liposomen transfiziert.

2.2.4.3.1. Kalziumphosphat-Methode

Die DNA wird bei dieser Methode mit Kalziumchlorid und einer phosphathaltigen Pufferlösung gemischt. Dabei kommt es zur Ausbildung winziger DNA-Kalziumphosphatkristalle, die sich auf der Zellmembran niederschlagen und dann durch Endozytose aufgenommen werden. Im Überschuss vorhandene Kalzium-Ionen erhöhen die Durchlässigkeit der Zellmembran, so dass die Aufnahmefähigkeit der Zellen für Fremd-DNA steigt. Eine Behandlung mit glycerolhaltigem Puffer erhöht die Transfektionseffizienz, wobei der zugrunde liegende Mechanismus nicht bekannt ist.

Neuro-2a-Zellen bzw. HEK293-Zellen wurden am Tag vor der Transfektion ausgesät und mit 70%iger Konfluenz transfiziert. Dazu wurde das Kultivierungsmedium 30 min vor der Transfektion gegen FCS-freies Medium ausgetauscht. Anschließend wurde der in Tab. 14 beschriebene Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben.

Tab. 14: Ansatz für die Kalziumphosphat-Transfektion in 10 cm-Schale

Reagenz	Menge
Plasmid-DNA	60 µg
Kalziumchlorid (2 M)	93 µL
2x DNA-Präzipitationspuffer	750 µL
RNase/DNase-freies ddH ₂ O	ad 1500 µL

Dazu wurde die DNA in der entsprechenden Menge RNase/DNase-freiem ddH₂O zusammen mit Kalziumchlorid gemischt und tröpfchenweise unter Schütteln der 2x DNA-Präzipitationspuffer (s.u.) zugegeben. Nach 20 minütiger Inkubation des Ansatzes wurde dieser tropfend auf den Zellen verteilt und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 6 h wurde das Kultivierungsmedium abgesaugt, die Zellen mit serumfreien Medium

gewaschen und mit 3,5 mL Glycerol-Schockpuffer (s.u.) bei RT für 2 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit serumfreiem Medium wurden die Zellen mit normalem Kultivierungsmedium versetzt und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2x DNA-Präzipitationspuffer

50 mM HEPES, pH 7,05
1,5 mM Na₂HPO₄
10 mM KCl
280 mM NaCl
12 mM Glucose

Glycerol-Schockpuffer

50% (v/v) 2x DNA-Präzipitationspuffer
28% (v/v) DNase-/RNase-freies ddH₂O
12% (v/v) Glycerol

2.2.4.3.2. Lipofektion

Bei der Transfektion mit kationischen Lipiden, der Lipofektion, bilden die Lipide im wässrigen Milieu Mizellen oder Liposomen. Dabei bestehen die Mizellen aus einem Lipid-*monolayer* und haben einen Durchmesser von 1 bis 10 nm. Hingegen sind Liposomen deutlich größer (30 µm) und bilden *bilayer*. Beide Strukturen formen einen Komplex mit der DNA, der dann von der Zelle endozytotisch ins Zytoplasma aufgenommen werden kann. In dieser Arbeit wurde das Lipofektionsreagenz ‚Lipofectamin 2000‘ (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA) für die Transfektion von DNA und siRNAs verwendet. Die Handhabung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.2.4.4. Lentivirale Transduktion muriner Zellen

Das virus-abhängige Einbringen von DNA wird als Transduktion bezeichnet. Rekombinante lentivirale Vektoren sind effektive Werkzeuge, um Fremd-DNA in jede Art von Zellen einzubringen (COFFIN *et al.*, 1997). Dabei sind Lentiviren die vielseitigsten Retroviren, da sie in der Lage sind, fast alle eukaryontischen Zellen zu infizieren, d.h. zu transduzieren und eine stabile Expression des eingeschleusten Plasmids aufrecht zu erhalten.

In der vorliegenden Dissertation wurde das ‚Lenti-X Lentiviral Expression System‘ (Clontech, Mountain View, Kalifornien, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Für die Virusproduktion wurden HEK293-Zellen mittels Kalziumphosphat-Methode (2.2.4.3.1) mit pMD2.G (Addgene, no. 12259), psPAX2 (Addgene, no. 12260) und den viralen Expressionsplasmiden co-transfiziert. Nach 48 h wurden die Viren über den ‚Lenti-X Concentrator‘ (Clontech, Mountain View, Kalifornien, USA) nach Angaben des Hersteller gereinigt.

Zur Infektion von *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Zellen wurden diese mit einer Dichte von 12×10^3 Zellen/12-well eingesät und für 48 h mit verschiedenen Konzentrationen der entsprechenden Lentiviren inkubiert. Zur Selektion transduzierter Zellen wurden 100 bis 200 µg/mL Puromycin eingesetzt.

2.2.4.5. mRNA-Abbau-Analyse

Die mRNA-Abbau-Analyse basiert auf dem transkriptionshemmenden Effekt des Antibiotikums Actinomycin D. Dieses inhibiert die Polymerase II vermittelte Transkription und verhindert somit die Bildung von mRNA (RILL und HECKER, 1996). Somit kann die in der Zelle vorhandene mRNA-Menge, ohne dass neue mRNA synthetisiert wird, hinsichtlich ihrer Stabilität über einen definierten Zeitraum untersucht werden.

Dazu wurden in eine 6-well-Platte $2,2 \times 10^5$ *Fmr1*⁻- und *Fmr1*⁻-Zellen eingesät und die Zellen nach 16 h mit Actinomycin D (Endkonzentration 2,5 µM) behandelt. 15, 30, 60 und 120 min nach Zugabe von Actinomycin D wurde die RNA isoliert (2.2.1.1). Eine Probe von nicht behandelten Zellen diente als Null-Wert. Anschließend wurde mit der isolierten RNA eine RT-PCR (2.2.1.2) und danach eine q-PCR (2.2.1.5) durchgeführt.

2.2.4.6. Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Dabei werden von jeder Zelle gleichzeitig Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht detektiert.

Dabei ist das Vorwärtsstreulicht (FSC, *foreward scatter*) ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und hängt vom Volumen der Zelle ab. Hingegen ist das Seitwärtsstreulicht (SSC, *sideward scatter*) ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, die von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns und der Menge an Vesikeln in einer Zelle beeinflusst wird. Die durchflusszytometrischen Messungen erfolgten mit dem MACSQuant Analyser. Die Auswertung der Messungen erfolgte mit der MACSQuantify Software (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland).

3. Ergebnisse

3.1. Der Einfluss von FMRP auf die Organisation des Aktinzytoskeletts

Der Transport und die regulierte Translation von mRNAs in Dendriten sind für die neuronale Funktion, und dabei besonders für die Modulation der synaptischen Plastizität, wichtig. Diese ist für die Gedächtnisleistung und das Lernen essenziell (LIU-YESUCEVITZ *et al.*, 2011). Eine veränderte *spine*-Morphologie (lange und dünne dendritische Dornen) konnte sowohl in *post-mortem*-Gehirnen von Patienten mit Fragilem-X-Syndrom, als auch in *Fmr1*-KO-Mäusen beobachtet werden (COMERY *et al.*, 1997; IRWIN *et al.*, 2001). Außerdem ist bekannt, dass FMRP die Aktinzytoskelett-Organisation über eine negative Regulation der Rac1-Synthese moduliert (BONGMBA *et al.*, 2011)

Um die phänotypischen Veränderungen in neuronalen Zellen beim Fragilen-X-Syndrom besser zu verstehen und um in einem einfacher handzuhabenden Modellsystem zu arbeiten, wurden in dieser Dissertation vorwiegend Klone einer immortalisierten embryonalen Fibroblasten-Zelllinie verwendet, welche von einer *Fmr1*-KO-Maus abstammen (3T-6A STEK, CASTETS *et al.*, 2005). Diese Zellklone exprimieren FMRP (*Fmr1*⁺) oder nicht (*Fmr1*⁻). Aufgrund der fehlenden FMRP-Expression in der *Fmr1*⁻-Zelllinie und der stabilen FMRP-Expression in der *Fmr1*⁺-Zelllinie eigneten sich diese Zellen als aussagekräftiges Modellsystem zur vergleichenden Untersuchung des Phänotyps beim Fragilen-X-Syndrom.

3.1.1. Der Einfluss der FMRP-Expression auf die Morphologie der Zellen

3.1.1.1. Der Verlust von FMRP hat einen starken Einfluss auf die Organisation des Aktinzytoskeletts

Von den *Fmr1*⁺- und den *Fmr1*⁻-Zelllinien waren jeweils zwei Klone verfügbar, die sowohl biochemisch als auch phänotypisch charakterisiert wurden. Durch Western Blot-Analysen wurde der FMRP-Expressionsstatus in den Zellklonen überprüft. Dazu wurden Zelllysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt und per Western Blot analysiert (Abb. 3-1).

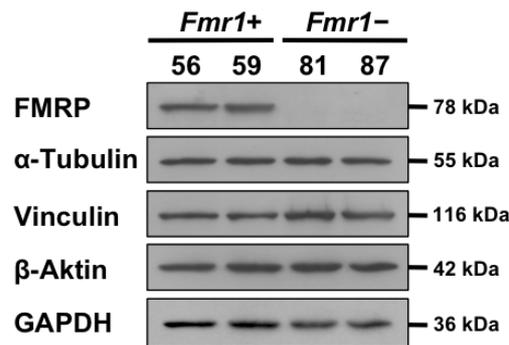


Abb. 3-1: *Fmr1*⁻-Zellen exprimieren kein FMRP. Western Blot-Analyse zur Validierung des FMRP-Expressionsstatus. *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Zellklone wurden in SDS-Lysepuffer lysiert und anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot auf die Expression von FMRP, α -Tubulin, Vinculin, β -Aktin und GAPDH analysiert.

Wie in Abb. 3-1 zu sehen, unterscheidet sich der Expressionslevel von FMRP in den *Fmr1*⁺-Zellklonen (#56 und #59) kaum, jedoch ist deutlich zu erkennen, dass in den *Fmr1*⁻-Zellklonen (#81 und #87) kein FMRP zu detektieren war. Dabei dienten die Proteine Vinculin, β -Aktin und GAPDH als Ladekontrolle während der SDS-PAGE und der Western Blot-Analyse (Abb. 3-1).

Anschließend wurde mittels Immunfluoreszenz-Studien die Aktinzytoskelett-Organisation der Zellklone untersucht (Abb. 3-2 A, B). Dabei wurde das Aktinzytoskelett mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugiertem Phalloidin gefärbt, welches spezifisch filamentöses Aktin bindet (F-Aktin) (BARDEN *et al.*, 1987). Der Zellkern wurde mit DAPI sichtbar gemacht (Abb. 3-2 A, B).

Wie in Abb. 3-2 ersichtlich, konnte eine deutliche Korrelation zwischen der FMRP-Expression und der Aktinzytoskelett-Struktur nachgewiesen werden. In beiden *Fmr1*⁺-Zellklonen zeigte das Aktinzytoskelett eine klare Struktur mit einer großen Anzahl an parallelen Stressfasern, welche sich durch die kompletten Zellen zogen (Abb. 3-2 A). Außerdem zeigten diese Zellen eine eher längliche Zellform. Der Verlust von FMRP in den *Fmr1*⁻-Zellklonen führte zu einer Strukturveränderung des Aktinzytoskeletts. Die Anzahl der Stressfasern war deutlich reduziert und ihre Lokalisation eher ungeordnet (Abb. 3-2 B). Hinzu kam, dass die Zellform nach FMRP-Verlust deutlich runder war, als in den Zellklonen, die FMRP exprimierten.

Um die starke Veränderung der Aktinzytoskelett-Organisation zu verifizieren, wurden außerdem in allen Zellklonen mittels Vinculinfärbung die Fokalkontakte sichtbar gemacht. Eine Veränderung der Stressfasern sollte mit einer Veränderung der Fokalkontakte korrelieren. Vinculin, als Bestandteil des Adhäsionskomplexes, diente als Fokalkontaktmarker (Abb. 3-2 A, B).

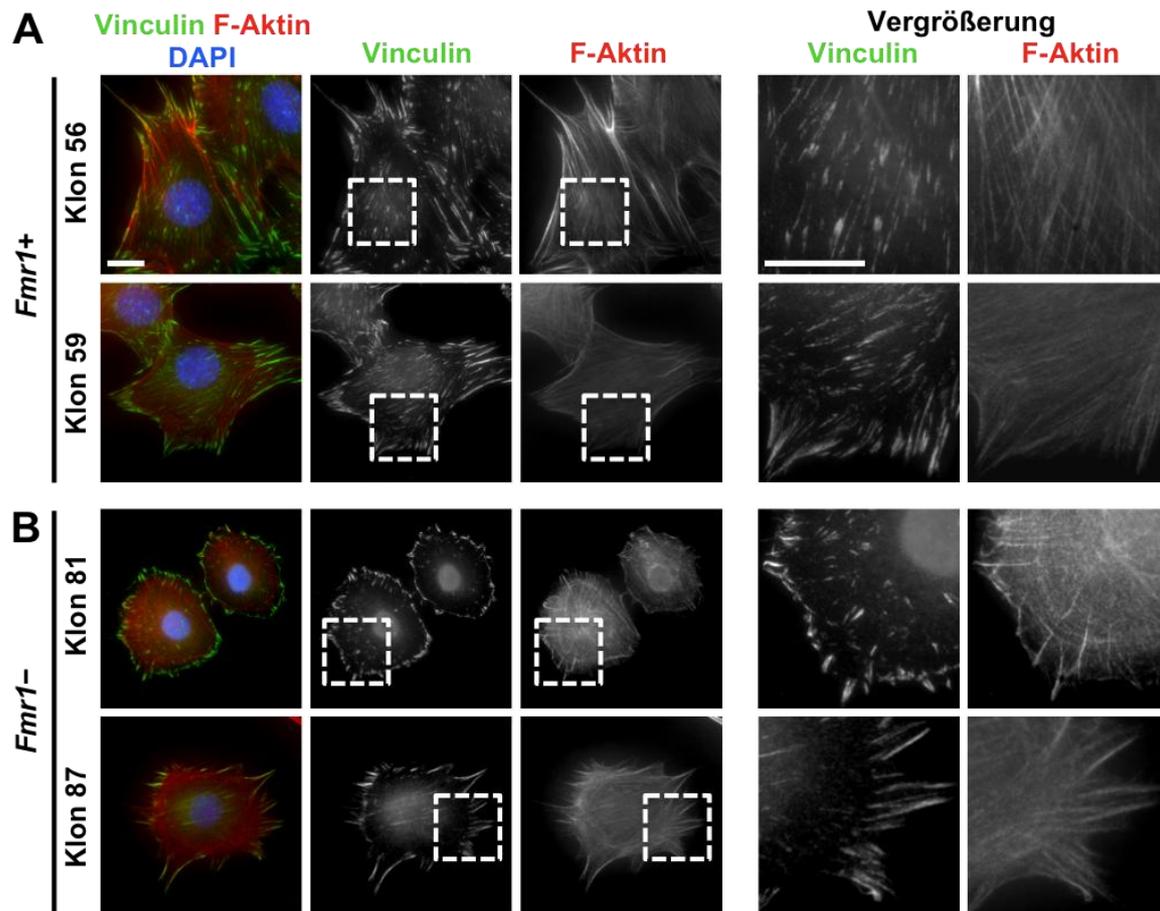


Abb. 3-2: Der Verlust von FMRP verändert die Morphologie und die Aktinzytoskelett-Organisation von *Fmr1*-Zellen drastisch. (A, B) Immunfluoreszenz-Studien zur Analyse der Aktinzytoskelett-Organisation in *Fmr1*+ und *Fmr1*-Zellklonen. *Fmr1*+ (A) und *Fmr1*-Zellklone (B) wurden 24 h nach dem Einsäen mit Formaldehyd fixiert und mit einem spezifischen Antikörper gegen Vinculin (grün) inkubiert. Zudem wurde filamentöses Aktin mit Phalloidin-AlexaFluor 594 (rot) und die DNA mit DAPI (blau) markiert. Die Zellen wurden mit Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Die Balken entsprechen 20 µm.

In den beiden *Fmr1*+ Zellklonen konnte eine hohe Anzahl von Fokalkontakten, sowohl peripher als auch zentral, in der Zelle detektiert werden (Abb. 3-2 A). Hingegen waren die Lokalisation und die Häufigkeit der Adhäsionskontakte in den *Fmr1*-Zellklonen drastisch verändert. Dabei fiel auf, dass die Fokalkontakte vorwiegend peripher angeordnet waren und zudem ihre Anzahl im Zellkörper im Vergleich zu den *Fmr1*+ Zellklonen reduziert war (Abb. 3-2 B). Diese Beobachtungen korrelieren direkt mit dem „Stressfaser-Phänotyp“ aus Abb. 3-2 A, B.

Die verwendeten Fibroblasten wuchsen auf einer extrazellulärer Matrix mit definierter Zusammensetzung. Ein wichtiger Bestandteil davon ist das Glykoprotein Fibronectin. Die meisten adhären Zellen heften sich über den $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin-Rezeptor an die polymerisierte Fibronectinmatrix. Dieses Anheften der Zellen resultiert in

Zellausbreitung, verbunden mit der Reorganisation des Zytoskeletts und im *clustering* der Integrinrezeptoren in definierten Regionen, den Fokalkontakten (CHRISTOPHER *et al.*, 1997).

Um ausschließen zu können, dass die bis hierher dokumentierten phänotypischen Unterschiede zwischen *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Zellklonen auf der Zusammensetzung der Wachstumsmatrix beruhen, denn die in Abb. 3-2 beschriebenen Beobachtungen wurden auf unbeschichteten Deckgläschen gemacht, wurden die Phänotyp-Analysen auf Fibronectin-beschichteten Oberflächen wiederholt (nicht gezeigt). Dabei zeigte sich, dass die Fibronectin-Beschichtung keinen Einfluss auf die Morphologie der Zellklone hatte.

3.1.1.2. Die Menge an F-Aktin, die Anzahl der Fokalkontakte und die Zellgröße sind in *Fmr1*⁻-Zellklonen reduziert

Aufgrund der beobachteten Unterschiede in der Organisation des Aktinzytoskeletts und der detektierten Veränderungen der Fokalkontakte, wurden deren Anzahl in *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Zellklonen vergleichend analysiert (Abb. 3-3). Dazu wurden von den bereits in Abb. 3-2 gezeigten Immunfluoreszenz-Aufnahmen (Abb. 3-3 A1) je 20 *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Zellen ausgewählt und die Vinculin-Signale (Abb. 3-3 A2) mit Hilfe der Software ImageJ in ein Schwarz-Weiß-Bild (Abb. 3-3 A3) umgewandelt. Anschließend wurde die Anzahl der Fokalkontakte einer definierten Größe (50 bis 1000 Quadratpixel) quantifiziert (Abb. 3-3 A4, B).

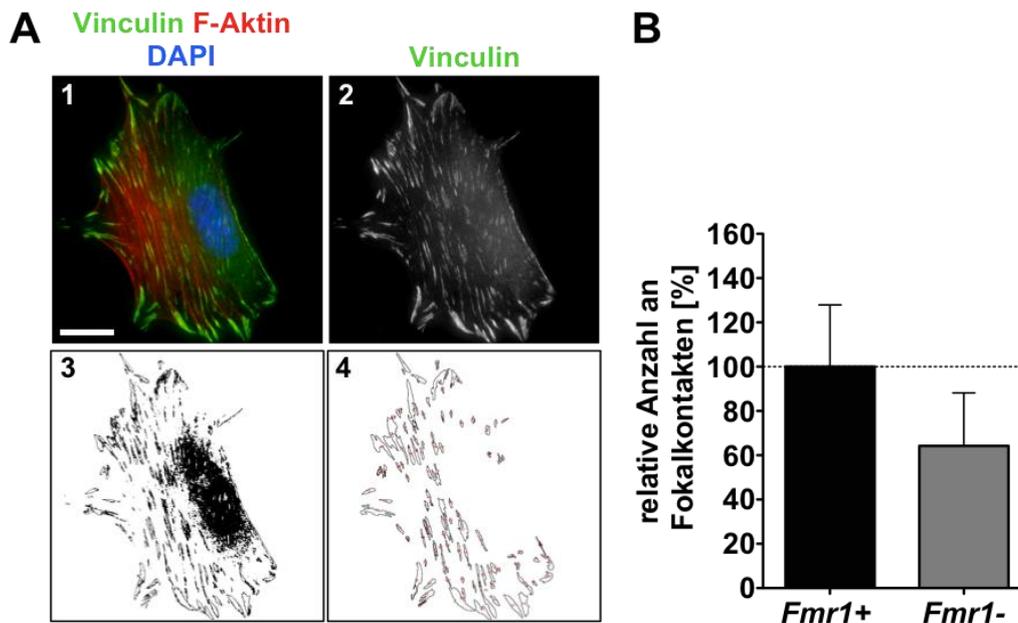


Abb. 3-3: Die Anzahl der Fokalkontakte ist in *Fmr1*⁻-Zellen deutlich reduziert.

(A, B) Bildanalyse zur Quantifizierung von Fokalkontakten. (A) Die Zellen wurden 24 h vor Formaldehyd-Fixierung auf Deckgläschen ausgesät und mit einem spezifischen Vinculin-Antikörper (grün) inkubiert. Die DNA (blau) wurde mittels DAPI und F-Aktin (rot) mit Phalloidin-AlexaFluor 594 markiert. Nach der Immunfluoreszenz-Mikroskopie, hier exemplarisch für *Fmr1*⁺-Zellen gezeigt (A 1), wurde mit Hilfe der Software ImageJ ein Schwarz-Weiß-Bild (A 2) des Vinculin-Signals (A 2) generiert und anschließend die Anzahl der Fokalkontakte (50 bis 1000 Quadratpixel) durch die Software markiert (A 4). Der Balken entspricht 20 μ m. (B) Quantifizierung der Fokalkontakte in *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Zellen. Es wurden Fokalkontakte von jeweils 20 *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Zellen ausgemessen. n = 1

Die Anzahl der Fokalkontakte war in beiden *Fmr1*⁻-Zellklonen im Vergleich zu den *Fmr1*⁺-Zellklonen um 40% reduziert. Damit war nicht nur die Lokalisation der Adhäsionskontakte, vorwiegend peripher in den *Fmr1*⁻-Zellklonen (siehe Abb. 3-2 B), verändert, sondern auch deren Anzahl. Da auch die Anzahl an Stressfasern in den *Fmr1*⁻-Zellklonen verringert war, könnte man schlussfolgern, dass FMRP einen positiven Einfluss auf die Aktinpolymerisation im zugrunde liegenden Modellsystem hat.

Um dies näher zu charakterisieren, wurde das F-Aktin/G-Aktin-Verhältnis der *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Zellklone bestimmt. Dabei ist die Menge an F-Aktin (filamentöses Aktin) ein Maß für polymerisiertes, also in Aktinfasern (Stressfasern) vorliegendes, Aktin. Hingegen kennzeichnet G-Aktin (globuläres Aktin) die Menge an nicht polymerisiertem Aktin. Das Verhältnis zwischen F-Aktin/G-Aktin ist somit ein Parameter, der den Polymerisierungsgrad des Aktins widerspiegelt. Ein hoher F-Aktin/G-Aktin-Wert ist ein Maß für eine höhere Anzahl an Stressfasern. Für dieses Experiment wurden in *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Zellklonen nach Fixierung F-Aktin mittels Phalloidin-AlexaFluor 594 und G-Aktin

mit DNaseI-AlexaFluor 594 angefärbt. Die gemessenen Fluoreszenz-Intensitäten wurden auf die DAPI-Fluoreszenz abgeglichen (Abb. 3-4 A).

Wie aus Abb. 3-4 ersichtlich, war das F-Aktin/G-Aktin-Verhältnis in den *Fmr1*⁻-Zellklonen im Vergleich zu beiden *Fmr1*⁺-Zellklonen um etwa 25% reduziert. Dies korreliert mit der reduzierten Anzahl von Stressfasern in diesen Zellen (vgl. Abb. 3-2). Somit sind die Resultate ein weiteres Indiz dafür, dass FMRP die Aktin-Polymerisierung positiv beeinflusst.

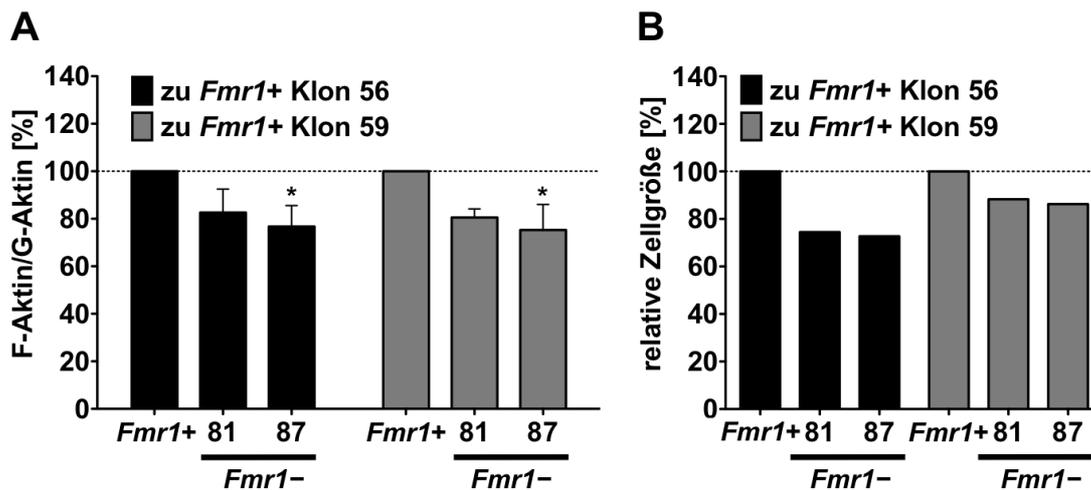


Abb. 3-4: In *Fmr1*⁻-Zellen ist das F-Aktin/G-Aktin-Verhältnis sowie die Zellgröße im Vergleich zu *Fmr1*⁺-Zellen reduziert. F-Aktin/G-Aktin-Analysen (A) und durchflusszytometrische Messung der Zellgröße (B) in *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Zellen. (A) *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Zellen wurden in 96-well-Platten eingesät und nach 24 h mit Formaldehyd fixiert. Filamentöses Aktin (F-Aktin) wurde mit AlexaFluor 594-konjugiertem Phalloidin, globuläres Aktin (G-Aktin) mit AlexaFluor 594-konjugierter DNaseI und die DNA mit DAPI markiert. Anschließend wurden die Fluoreszenz-Intensitäten gemessen und auf die DAPI-Fluoreszenz abgeglichen. Für jedes Experiment wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. n = 3 ; * , p ≤ 0,05 (B) *Fmr1*⁺ und *Fmr1*⁻-Zellklone wurden trypsiniert und auf ihre Größe hin untersucht. (A) Die Auswertung erfolgte mit dem MACS Quant Analyser mit der Software MACSQuantify. Es wurden in einer Einfachmessung von jeder Population 40000 Zellen untersucht. (B) Die Zellgrößen der *Fmr1*⁻-Zellklone #81 und #87 wurden auf die Zellgröße der *Fmr1*⁺-Zellklone #56 und #59 bezogen.

Die verringerte Anzahl an Stressfasern in den *Fmr1*⁻-Zellklonen sowie das reduzierte F-Aktin/G-Aktin-Verhältnis ließen die Vermutung aufkommen, dass FMRP möglicherweise auch die Zellgröße beeinflusst. Die reduzierte Anzahl von Stressfasern könnte mit einer verringerten flächenmäßigen Ausbreitung der Zellen korrelieren.

Aus diesem Grund wurde die Zellgröße (in Zusammenarbeit mit Claudia Reinke, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier, Institut für Molekulare Medizin, Sektion Molekulare Zellbiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) vergleichend zwischen den *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Zellklonen mittels Durchflusszytometrie bestimmt

(Abb. 3-4 B). Bei dieser Methode passieren die in Suspension vorliegenden Zellen einen fokussierten Laserstrahl und streuen einen Teil des eingestrahnten Lichts. Die Menge des gestreuten Lichts korreliert mit der Größe der Zelle und ihrer Granularität (CRISSMAN *et al.*, 1975).

Den Ergebnissen zufolge sind die *Fmr1*⁻-Zellklone (#81 und #87) kleiner als die *Fmr1*⁺-Zellklone (#56 und #59) (Abb. 3-4 B). Beide *Fmr1*⁻-Zellklone unterscheiden sich in ihrer Größe kaum. Der Größenunterschied fällt aber bei Normalisierung auf den *Fmr1*⁺-Zellklon #59 geringer aus als bei der Normalisierung auf den *Fmr1*⁺-Zellklon #56. Dies ist durch die reduzierte Zellgröße des *Fmr1*⁺-Zellklons #59 im Vergleich zum *Fmr1*⁺-Zellklon #56 zu erklären (Abb. 3-4 B).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die hier verwendeten *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Zellklone ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung der beim Fragilen-X-Syndrom auftretenden, von FMRP abhängigen Veränderungen des Aktinzytoskeletts sind. Die nachgewiesenen morphologischen Unterschiede korrelieren mit der FMRP-Expression und lassen den Schluss zu, dass FMRP einen Einfluss auf die Reorganisation des Aktinzytoskeletts besitzt. Jedoch ist bisher nicht bekannt, worüber diese Regulation erfolgt.

3.1.2. Die Re-Expression von FMRP in den *Fmr1*⁻-Zellklonen führt zu einem *rescue* des *Fmr1*⁺-Phänotyps

Da in den bereits untersuchten *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Zellklonen ein Zusammenhang zwischen der FMRP-Expression und dem Phänotyp nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 3-2 A, B) sollte im Folgenden überprüft werden, ob der beobachtete Phänotyp in *Fmr1*⁻-Zellen (Abb. 3-2 B) spezifisch ist und nicht nur auf klonaler Variabilität basiert bzw. ein Nebeneffekt der Immortalisierung ist. Dazu wurden beide *Fmr1*⁻-Zellklone lentiviral mit FMRP-EGFP transduziert, wobei die Kontroll-Transduktion mit EGFP durchgeführt wurde (durch Dr. Marcell Lederer, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier, Institut für Molekulare Medizin, Sektion Molekulare Zellbiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg). Nach Puromycin-Selektion erfolgte die Analyse des Phänotyps per Immunfluoreszenz-Studien.

Die lentiviral transduzierten *Fmr1*⁻-Zellklone wurden nach 24 h zum einen mit Antikörper gegen EGFP, als Marker für die erfolgreiche Transduktion, zum anderen mit einem Antikörper gegen Vinculin, als Fokalkontaktmarker, gefärbt. Außerdem wurde das Aktinzytoskelett mittels Phalloidin-AlexaFluor 594 sichtbar gemacht (Abb. 3-5 A, B). Die

FMRP-Expression der *Fmr1*⁻-Zellklone wurde mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot überprüft (Abb. 3-5 C).

In den *Fmr1*⁻-Zellklonen konnte eindeutig die Expression von FMRP-EGFP und EGFP (als Kontrolle) nachgewiesen werden (Abb. 3-5 C). Zudem ist anzumerken, dass das Expressionslevel beider eingebrachter Konstrukte auch mit dem Level der FMRP-Expression in den *Fmr1*⁺-Zellklonen #56 und #59 vergleichbar war (siehe Abb. 3-1).

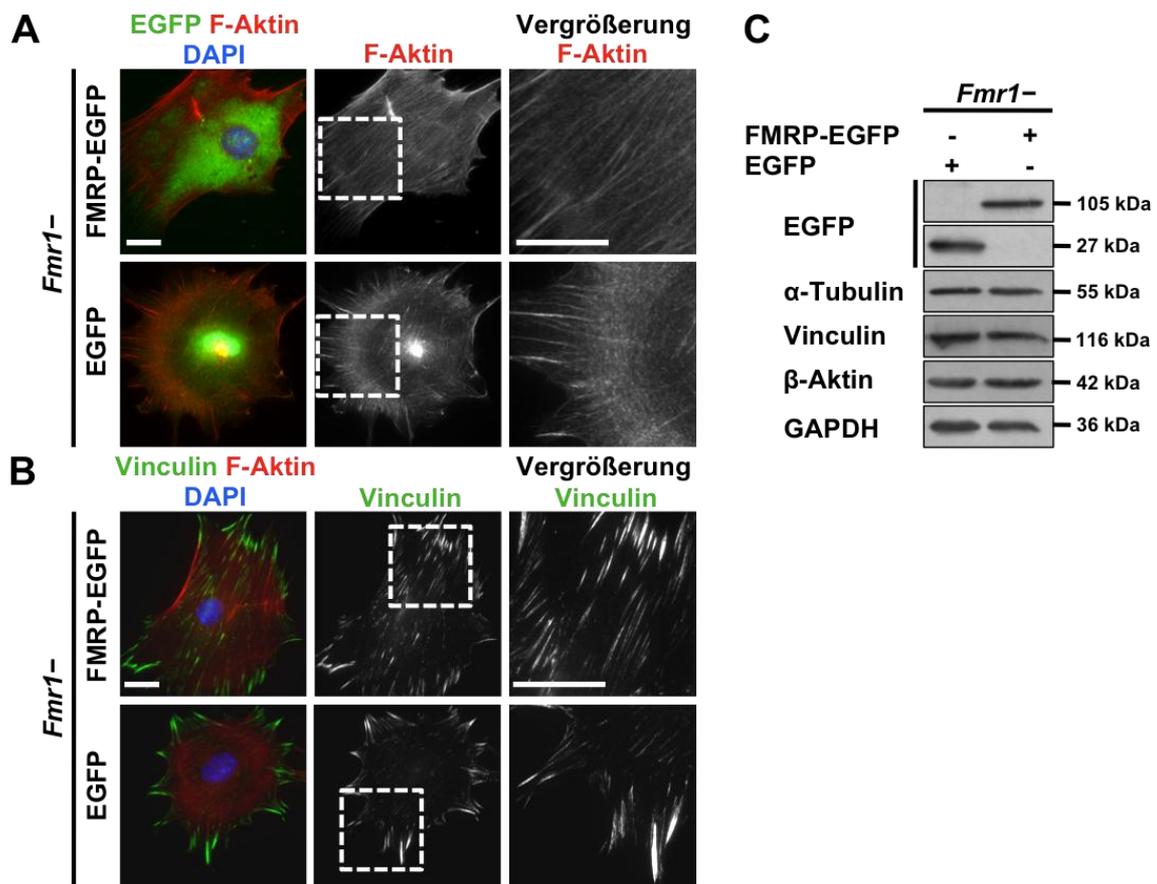


Abb. 3-5: Die Re-Expression von FMRP revertiert in den *Fmr1*⁻-Zellen den Phänotyp. (A, B, C) Immunfluoreszenz-Analysen und Western Blots von mit FMRP-EGFP oder EGFP lentiviral transduzierten *Fmr1*⁻-Zellen. (A, B) Die Puromycin-selektierten Zellen wurden 24 h nach dem Aussäen mit Formaldehyd fixiert. Nach Permeabilisierung wurden die Zellen entweder mit spezifischen Antikörpern gegen (A) EGFP (grün) oder (B) Vinculin (grün) inkubiert. Zusätzlich wurde die DNA (blau) mit DAPI und das Aktinzytoskelett (rot) mit Phalloidin-AlexaFluor 594 angefärbt. Die Balken entsprechen 20 µm. (C) Zelllysate von *Fmr1*⁻-Zellen wurden nach Transduktion und Puromycin-Selektion mittels SDS-PAGE und Western Blot auf die Expression des EGFP-Fusionsproteins, EGFP sowie auf Abgleichsproteine hin untersucht.

Wie in Abb. 3-5 A zu erkennen, revertierte die Expression von FMRP-EGFP in den *Fmr1*⁻-Zellklonen den *Fmr1*⁻-Phänotyp und dieser ähnelte dem *Fmr1*⁺-Phänotyp (siehe Abb. 3-2). Dies zeigte sich zum einen in der Erhöhung der Stressfaserdichte und zum anderen in einer langgestreckten Zellmorphologie (Abb. 3-5 A). Des Weiteren konnten

ubiquitär verteilte Fokalkontakte detektiert werden (Abb. 3-5 B). Hingegen hatte die Transduktion von EGFP alleine keinen Einfluss auf den *Fmr1*-Phänotyp. Die Fokalkontakte waren immer noch peripher angeordnet und die Stressfasern eher diffus über die gesamte Zelle verteilt (Abb. 3-5 A, B).

Um die Spezifität des Phänotyps zu verifizieren, wurden außerdem das F-Aktin/G-Aktin-Verhältnis, die Anzahl der Fokalkontakte und die Zellgröße (in Zusammenarbeit mit Claudia Reinke, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier, Institut für Molekulare Medizin, Sektion Molekulare Zellbiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) quantifiziert (Abb. 3-6).

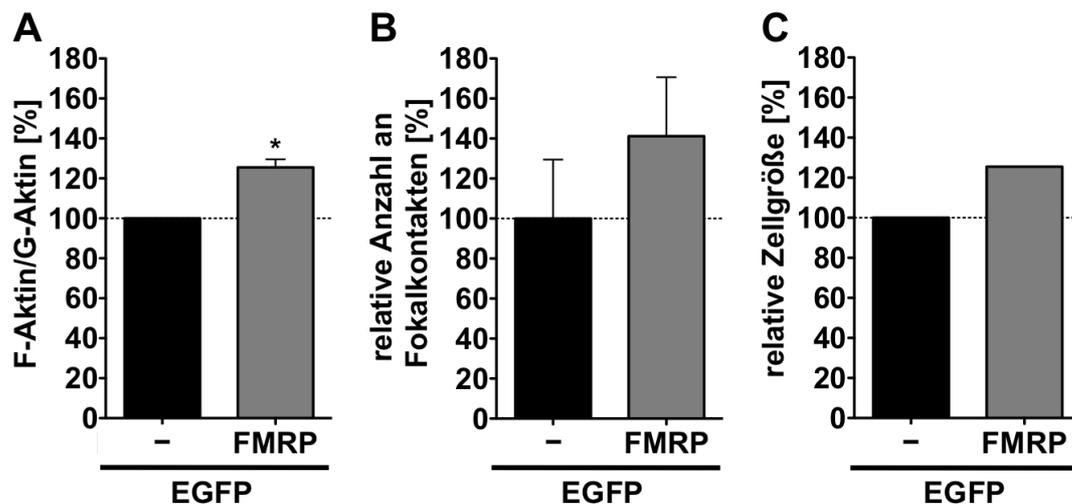


Abb. 3-6: Die FMRP-Expression in *Fmr1*-Zellen erhöht das F-Aktin/G-Aktin-Verhältnis, die relative Anzahl an Fokalkontakten sowie die relative Zellgröße.

(A, B, C) Quantifizierung des F-Aktin/G-Aktin-Verhältnisses, der Anzahl an Fokalkontakten und der Zellgröße in mit FMRP-EGFP oder EGFP lentiviral transduzierten und Puromycin-selektierten *Fmr1*-Zellen. (A) Zur Bestimmung des F-Aktin/G-Aktin-Verhältnisses wurden die Zellen 24 h nach dem Aussäen in 96-well-Platten mit Formaldehyd fixiert, F-Aktin mit Phalloidin-AlexaFluor 594, G-Aktin mit DNaseI-AlexaFluor 594 und die DNA mit DAPI markiert. Anschließend wurden die Fluoreszenz-Intensitäten in einem Mikroplattenlesegerät gemessen und auf die DAPI-Fluoreszenz abgeglichen. Es wurde jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt. $n = 3$; *, $p \leq 0.05$ (B) Für die Quantifizierung der Fokalkontakte wurden die Zellen 24 h vor Formaldehyd-Fixierung auf unbeschichteten Deckgläschen ausgesät und mit einem spezifischen Vinculin-Antikörper inkubiert. Die DNA wurde mittels DAPI und F-Aktin mit Phalloidin-AlexaFluor 594 markiert. Nach der Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurde mit Hilfe der Software ImageJ die Anzahl der Fokalkontakte (50 bis 1000 Quadratpixel) quantifiziert. Es wurden Fokalkontakte von jeweils 20 Zellen ausgemessen. $n = 3$ (C) Zur Zellgrößenbestimmung wurden die Zellen trypsinisiert, in PBS aufgenommen und mit Hilfe des MACS Quant Analyser auf ihre Größe hin untersucht. Die Auswertung erfolgte mit der Software MACSQuantify. Es wurden jeweils 40000 Zellen ausgemessen. $n = 1$

In Abb. 3-6 ist zu erkennen, dass nach FMRP-EGFP-Überexpression in den *Fmr1*-Zellklonen alle Parameter im Vergleich zur EGFP-Überexpression revertiert werden

konnten (Abb. 3-6 A, B, C). Das F-Aktin/G-Aktin-Verhältnis war um 25% (Abb. 3-6 A) und die Anzahl der Fokalkontakte in den *Fmr1*⁻-Zellklonen um 40% erhöht (Abb. 3-6 B). Zudem konnten mittels durchfluss-zytometrischer Messungen größere Zellen nach FMRP-EGFP-Überexpression detektiert werden (Abb. 3-6 C).

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass der in den Abb. 3-2 dokumentierte Phänotyp der *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Zellklone spezifisch ist und nicht auf der Immortalisierung der embryonalen Fibroblasten beziehungsweise auf klonaler Variabilität durch zufällige Integration des FMRP-Expressionsplamids im Genom beruht (CASTETS *et al.*, 2005).

Aufgrund der hier beschriebenen Beobachtungen, stellte sich die Frage, wodurch die starken Unterschiede in der Aktinzytoskelett-Organisation zwischen den *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Zellklonen hervorgerufen werden.

3.2. Der Einfluss von FMRP auf p0071

Zu den wichtigsten Regulatoren des Aktinzytoskeletts gehören die kleinen Rho-GTPasen. Diese Proteine wechseln zwischen einer aktiven GTP-gebundenen Form und einer inaktiven GDP-gebundenen Form. Ihre Aktivität wird durch Effektoren reguliert. So ist zum Beispiel das Protein ECT2 (*epithelial cell transforming sequence 2 oncogene*) ein GEF für alle drei genannten kleinen Rho-GTPasen.

Zusätzlich existieren „Gerüstproteine“, welche die kleine Rho-GTPase mit ihrem spezifischen GEF in räumliche Nähe bringen, um die Aktivierung zu erleichtern. Als ein solches „Gerüstprotein“ für RhoA und das GEF ECT2 konnte das *Armadillo*-Protein p0071 identifiziert werden (WOLF *et al.*, 2006).

3.2.1. Proteine des Rho-Signalwegs zeigen ein differenzielles Expressionsmuster

Aufgrund der morphologischen Unterschiede im Aktinzytoskelett in Abhängigkeit von der FMRP-Expression und der bereits beschriebenen Rolle von RhoA, p0071 und ECT2 im Rho-Signalweg (WOLF *et al.*, 2006) und deren Einfluss auf die Aktinzytoskelett-Organisation wurden die *steady-state*-Protein- und mRNA-Mengen dieser Mitglieder des Rho-Signalweges in *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Zellen per Western Blot und q-PCR untersucht (Abb. 3-7 A, B, C).

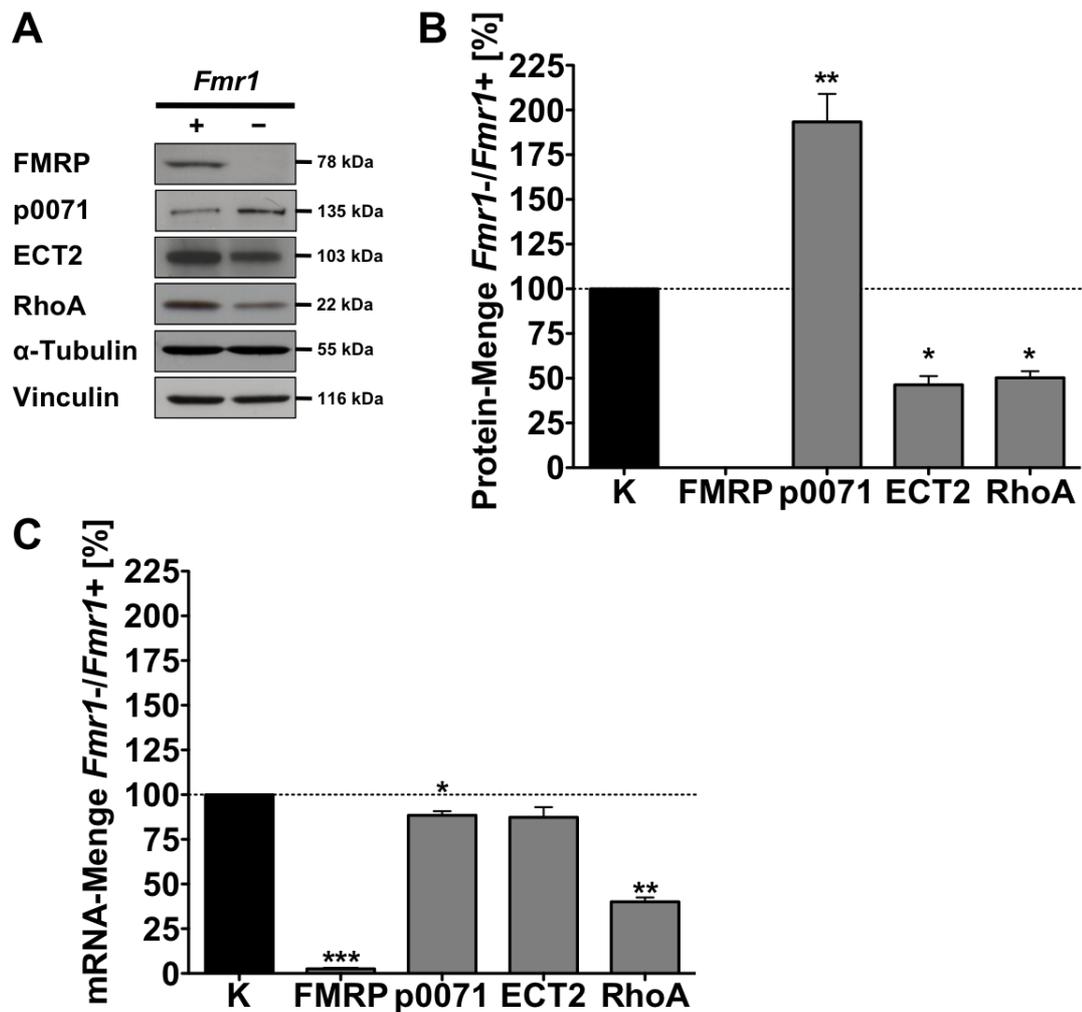


Abb. 3-7: Die *steady-state*-Protein- und mRNA-Mengen von Mitgliedern des Rho-Signalwegs in *Fmr1*^{+/+}- und *Fmr1*^{-/-}-Zellen differieren stark. (A, B, C) Western Blot- und q-PCR-Analysen zur Quantifizierung von Protein- und mRNA-Mengen in *Fmr1*^{+/+}- und *Fmr1*^{-/-}-Zellen. (A) Die Zellen wurden mit SDS-Lysepuffer lysiert, die Proteinkonzentration bestimmt und 75 μ g Protein mittels SDS-PAGE und Western Blot auf die Expressionslevel von FMRP, p0071, ECT2, RhoA und die Abgleichsproteine Vinculin und α -Tubulin hin untersucht und (B) quantifiziert. n = 3 (C) Die RNA aus *Fmr1*^{+/+}- und *Fmr1*^{-/-}-Zellen wurde mit TRIzol isoliert und anschließend q-PCR Messungen mit spezifischen Oligonukleotiden gegen Cyclophilin A (Kontrolle, K), FMRP, p0071, ECT2 und RhoA durchgeführt. Die mRNA-Mengen wurden auf die RPLP0-mRNA normalisiert. n = 3 ; *, p \leq 0,0005 ; **, p \leq 0,005 ; *, p \leq 0,05**

Wie aus Abb. 3-7 A ersichtlich, ergab die Quantifizierung des Western Blots, dass in den *Fmr1*^{-/-}-Zellen eine 2-fach erhöhte Menge an p0071 exprimiert wird. Die RhoA-Proteinmenge war in den *Fmr1*^{-/-}-Zellen im Vergleich zu den *Fmr1*^{+/+}-Zellen um 50% reduziert. Auch für das ECT2-Protein konnte eine starke Reduktion von etwa 50% im Western Blot nachgewiesen werden. FMRP konnte in den *Fmr1*^{-/-}-Zellen nicht detektiert werden (Abb. 3-7 A, B).

Weiterhin wurden die *steady-state*-mRNA-Mengen für FMRP, p0071, ECT2 und RhoA in *Fmr1*⁺ und *Fmr1*⁻-Zellen bestimmt (Abb. 3-7 C). In den *Fmr1*⁻-Zellklonen konnte keine FMRP-mRNA nachgewiesen werden. Die mRNA-Mengen für p0071 und ECT2 waren zwischen *Fmr1*⁺ und *Fmr1*⁻-Zellen nur geringfügig verändert (Abb. 3-7 C). Hingegen konnte für die RhoA-mRNA-Menge eine deutliche Reduktion im Vergleich zu den *Fmr1*⁺-Zellen detektiert werden (Abb. 3-7 C).

Zusammen mit der unveränderten p0071-mRNA-Menge könnte man aus diesen Befunden auf eine translationelle Regulation der p0071-mRNA durch FMRP schließen. Da hingegen die RhoA-mRNA-Menge reduziert war, könnte das ein Indiz für eine Stabilitätskontrolle der RhoA-mRNA durch FMRP sein. Für ECT2 könnte man eine durch FMRP vermittelte Translationsstimulation vermuten, da die Proteinmenge in den *Fmr1*⁻-Zellen reduziert, die mRNA-Menge jedoch weitgehend unverändert war.

3.2.2. Die p0071-mRNA ist ein FMRP-Zieltranskript

Eine posttranskriptionelle Regulation wird oftmals durch eine direkte Interaktion eines RNA-bindenden Proteins mit seinen Ziel-mRNAs vermittelt (GLISOVIC *et al.*, 2008). Für die mRNAs des Proteins p0071 und des nächsten Verwandten δ -catenin/NPRAP konnte gezeigt werden, dass diese putative FMRP-Zieltranskripte sind (BROWN *et al.*, 2001; DARNELL *et al.*, 2011; ASCANO *et al.*, 2012). Da bereits bekannt ist, dass p0071 das Aktinzytoskelett durch eine Regulation der kleinen Rho-GTPasen moduliert (WOLF *et al.*, 2006), wurde untersucht, ob FMRP die Organisation des Aktinzytoskeletts durch eine Regulation von p0071 auf der posttranskriptionellen Ebene moduliert. Um zwischen einem direkten oder indirekten Effekt von FMRP auf p0071 unterscheiden zu können, wurde analysiert, ob FMRP mit der p0071-mRNA assoziiert (BROWN *et al.*, 2001; DARNELL *et al.*, 2011).

Dazu wurde FMRP mit einem polyklonalen, an ProteinA-Sepharose immobilisierten FMRP-Antikörper aus *Fmr1*⁺-Zelllysat präzipitiert und *Fmr1*⁻-Zelllysat wurde als Negativkontrolle verwendet. Die Eluate wurden anschließend einerseits mittels Western Blot auf präzipitiertes FMRP und andererseits, nach Isolation der RNA, mit semiquantitativer PCR und q-PCR auf co-präzipitierte mRNAs untersucht (Abb. 3-8 A, B).

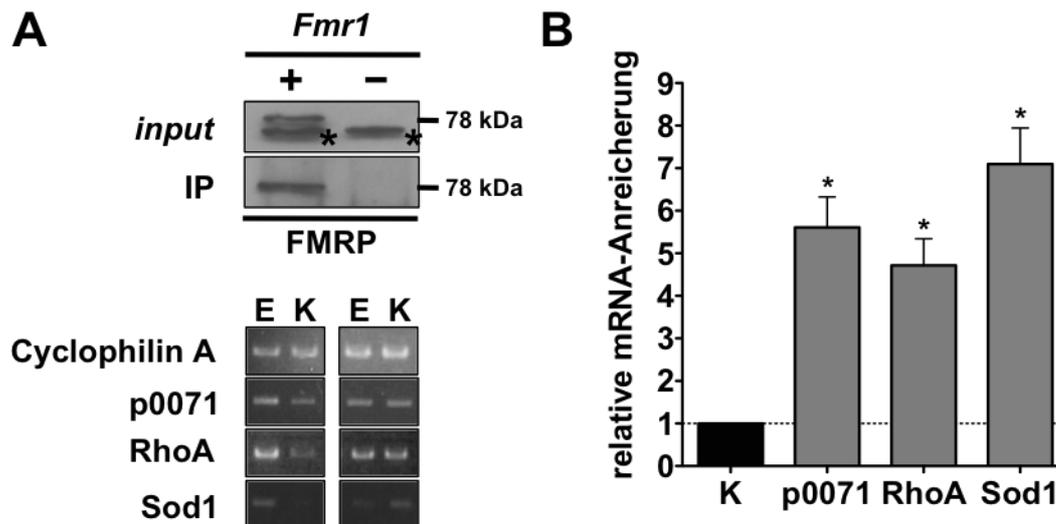


Abb. 3-8: Die p0071-mRNA co-präzipitiert mit FMRP in *Fmr1*+/-Zellen. (A, B) Co-Immünpräzipitation von mRNAs zusammen mit FMRP in *Fmr1*+/- und *Fmr1*-/- Zellysate. FMRP wurde mit einem spezifischen Antikörper aus *Fmr1*+/-Zellen präzipitiert und die co-präzipitierte RNA mittels semiquantitativer PCR und q-PCR untersucht. (A) Western Blot-Analyse der FMRP-Präzipitation aus *Fmr1*+/-Zellen (aber nicht aus *Fmr1*-/-Zellen). Die Sterne kennzeichnen eine unspezifische Nebenreaktion in der *input*-Fraktion (oberer Teil). Die Anreicherung co-präzipitierter mRNAs wurde mittels spezifischer Oligonukleotide für Cyclophilin A, p0071, RhoA und Sod1 in einer semiquantitativen PCR mit nachfolgendem Agarose-Gel analysiert. E = Eluat mit Antikörper; K = Eluat ohne Antikörper (unterer Teil). (B) q-PCR-Analyse der mit FMRP co-präzipitierter mRNAs mit spezifischen Oligonukleotiden für Cyclophilin A (Kontrolle, K), p0071, RhoA und Sod1. Die Anreicherung wurde mit der $2^{\Delta\Delta Ct}$ -Methode berechnet und auf die RPLP0-mRNA normalisiert. n = 3 ; *, p ≤ 0,05

Die Analyse der semiquantitativen PCR-Produkte mittels Agarose-Gel zeigte eine Anreicherung der p0071-, RhoA- und Sod1-mRNA im Präzipitat aus *Fmr1*+/-Zellen, aber nicht aus *Fmr1*-/-Zellen, obwohl auch hier eine schwache unspezifische Anreicherung (schwache Banden im Agarose-Gel) beobachtet werden konnte (Abb. 3-8 A). Eine quantitative Untersuchung der co-präzipitierter RNAs durch q-PCR bestätigte eine signifikante Anreicherung der p0071-mRNA und RhoA-mRNA sowie des bereits publizierten FMRP-Zieltranskripts, der Sod1-mRNA ((BECHARA *et al.*, 2009), Abb. 3-8 B) im Eluat. Für die Cyclophilin A-mRNA, welche als Negativkontrolle diente, konnte keine Anreicherung nachgewiesen werden.

Diese Befunde konnten auch für endogenes FMRP, präzipitiert aus HEK293-Zellysate, bestätigt werden (Abb. 3-9 A, B). Dazu wurde erneut eine FMRP-Immünpräzipitation durchgeführt (Abb. 3-9 A) und das Eluat (IP FMRP) nach Isolation co-präzipitierter mRNAs mit q-PCR auf das Vorhandensein der p0071- und RhoA-mRNA

untersucht (Abb. 3-9 B). In diesem Ansatz diente Protein A-Sepharose ohne Antikörper als Negativkontrolle (IP Kontrolle).

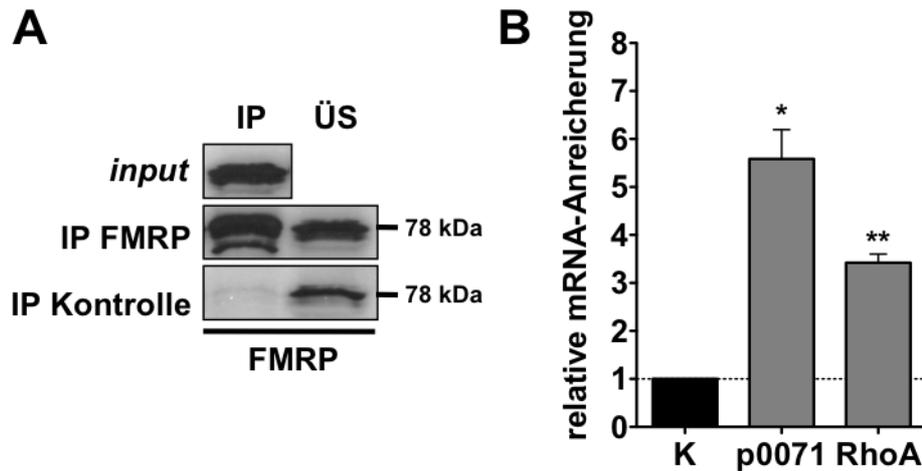


Abb. 3-9: Die p0071- und RhoA-mRNA co-präzipitieren mit FMRP in HEK293-Zellen. (A, B) Co-Immünpräzipitation von mRNAs zusammen mit FMRP in HEK293-Zelllysate. FMRP wurde mit einem spezifischen Antikörper aus HEK293-Zelllysate präzipitiert und die co-präzipitierte RNA mittels q-PCR untersucht. (A) Western Blot-Analyse der FMRP-Immünpräzipitation aus HEK293-Zelllysate. IP = Immünpräzipitation, ÜS = Überstand (B) q-PCR-Analyse der mit FMRP co-präzipitierten mRNAs mit spezifischen Oligonukleotiden für Cyclophilin A (Kontrolle, K), p0071- und RhoA-mRNAs. Die Anreicherung der mRNA wurde mit der $2^{\Delta\Delta ct}$ -Methode berechnet und auf die RPLP0-mRNA normalisiert. n = 3 ; **, p ≤ 0,005 ; *, p ≤ 0,05

Wie aus Abb. 3-9 B ersichtlich, konnte eine signifikante Anreicherung der p0071- und RhoA-mRNA nach FMRP-Immünpräzipitation aus HEK293-Zelllysate in Relation zur Kontrolle beobachtet werden (Abb. 3-9 A, B). Für dieses Experiment diente ebenfalls die Cyclophilin A-mRNA als Negativkontrolle.

Da eine Funktion von FMRP in der mRNA-Stabilitätskontrolle nachgewiesen werden konnte (ZALFA *et al.*, 2007), wurde zudem die p0071- und RhoA-mRNA-Stabilität in *Fmr1*^{+/+}- und *Fmr1*^{-/-}-Zellen untersucht. Dazu wurde eine mRNA-Abbau-Analyse durchgeführt. Diese basiert auf der Inhibierung der Polymerase II-gesteuerten Transkription durch das Antibiotikum Actinomycin D (RILL und HECKER, 1996), wodurch keine neue mRNA synthetisiert und somit die bereits vorhandene mRNA kann untersucht werden kann. Dazu wurden *Fmr1*^{+/+}- und *Fmr1*^{-/-}-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten mit 2,5 µM Actinomycin D behandelt, die RNA der Zellen mit TRIzol isoliert (2.2.1.1) und diese mittels q-PCR untersucht (Abb. 3-10 A, B, C, D).

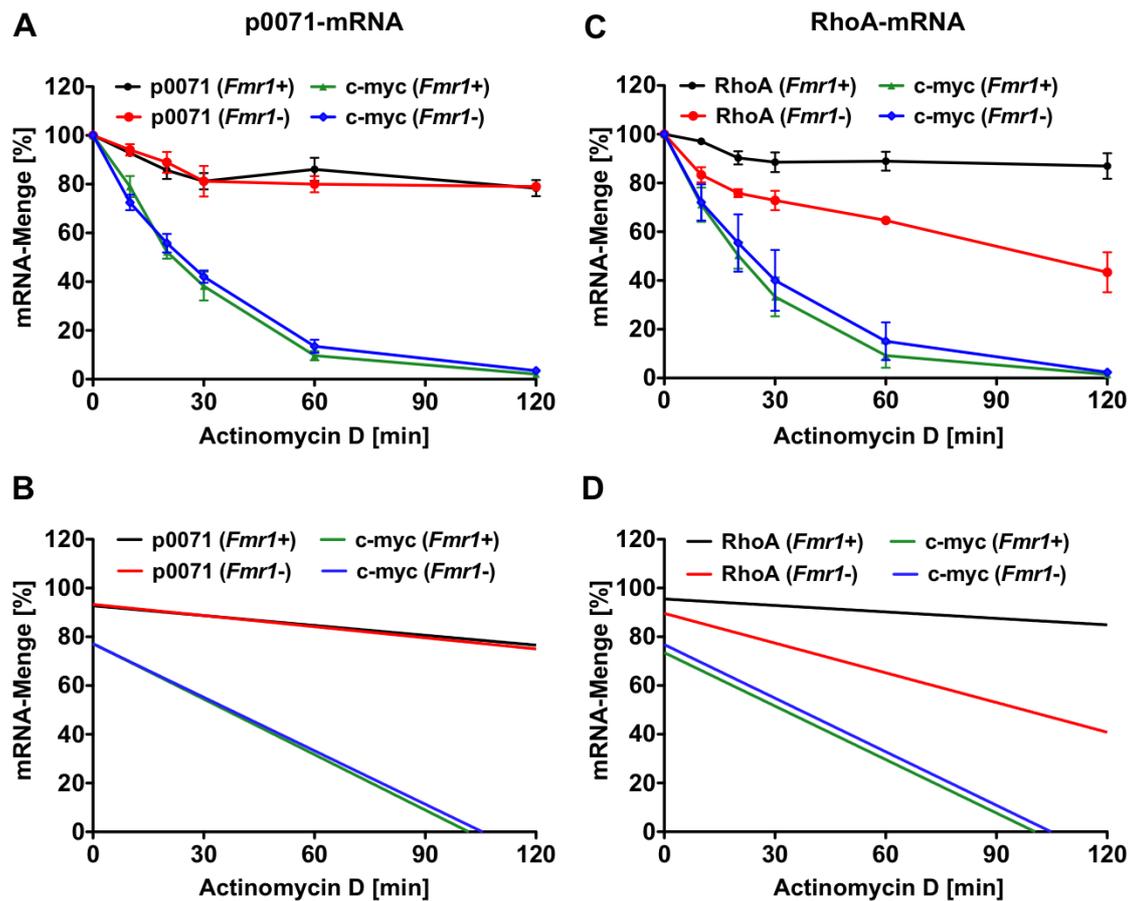


Abb. 3-10: FMRP beeinflusst die p0071-mRNA-Stabilität nicht, aber stabilisiert die RhoA-mRNA. (A - D) mRNA-Abbau-Analyse zur Überprüfung der mRNA-Stabilität in *Fmr1*⁻ und *Fmr1*⁺-Zellen. Dazu wurden die Zellen 24 h nach dem Aussäen zu verschiedenen Zeitpunkten mit 2,5 μ M Actinomycin D behandelt um die Polymerase II-vermittelte Transkription zu inhibieren. Die RNA wurde anschließend isoliert und mittels q-PCR analysiert. (A, C) Quantifizierung der p0071- (schwarze und rote Linie, links), RhoA- (schwarze und rote Linie, rechts) und c-myc-mRNA-Menge (blaue und grüne Linie, links und rechts) mit spezifischen Oligonukleotiden in *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Zellen. Die mRNA-Menge wurde mit der $2^{\Delta\Delta Ct}$ -Methode berechnet und auf die RPLP0-mRNA normalisiert. n = 3 (B, D) Lineare Regression zur Validierung der Abbaugeschwindigkeiten der mRNA.

In der mRNA-Quantifizierung in Abb. 3-10 ist zu erkennen, dass die p0071-mRNA sowohl in *Fmr1*⁺- als auch in *Fmr1*⁻-Zellen über einen Zeitraum von 120 min gleichermaßen stabil ist und nicht abgebaut wird (Abb. 3-10 A, schwarze und rote Linie). Dies zeigt, auch anhand der gleichen Abbaugeschwindigkeiten (Abb. 3-10 B, schwarze und rote Linie), dass FMRP die p0071-mRNA-Stabilität nicht beeinflusst. Für dieses Experiment wurde zudem die Menge der c-myc-mRNA quantifiziert, die als Positivkontrolle für den mRNA-Abbau diente. Denn es ist bekannt, dass die c-myc-mRNA nur eine Halbwertszeit von 30 min besitzt (DANI *et al.*, 1984). In *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Zellen wurde die c-myc-mRNA mit gleicher Effizienz abgebaut (Abb. 3-10 A, B, grüne

und blaue Linie). Für die RhoA-mRNA konnte mit der mRNA-Abbau-Analyse eine Stabilitätskontrolle durch FMRP nachgewiesen werden (Abb. 3-10 C, D). In *Fmr1*⁻-Zellen (Abb. 3-10 C, D, rote Linie) wurde die RhoA-mRNA deutlich stärker abgebaut, als in den *Fmr1*⁺-Zellen (Abb. 3-10 C, D, schwarze Linie). Nach 30 min Actinomycin D-Behandlung waren nur noch 80% der Ausgangsmenge an RhoA-mRNA vorhanden. Besonders deutlich wird dies durch den Vergleich der Abbaugeschwindigkeiten der RhoA-mRNA (Abb. 3-10 D, schwarze und rote Linie). Diese Daten zeigen, dass FMRP die RhoA-mRNA stabilisiert, da diese in *Fmr1*⁻-Zellen mit einer höheren Geschwindigkeit abgebaut wird, aber FMRP keinen Einfluss auf die Stabilität der p0071-mRNA besitzt.

Für einige FMRP-Zieltranskripte konnte die jeweilige 3'UTR als FMRP-Bindestelle identifiziert werden, so zum Beispiel für die PSD-95-mRNA (ZALFA *et al.*, 2007). Untersuchungen von Darnell *et al.* hatten gezeigt, dass FMRP mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit an die 3'UTR der p0071-mRNA bindet (DARNELL *et al.*, 2011).

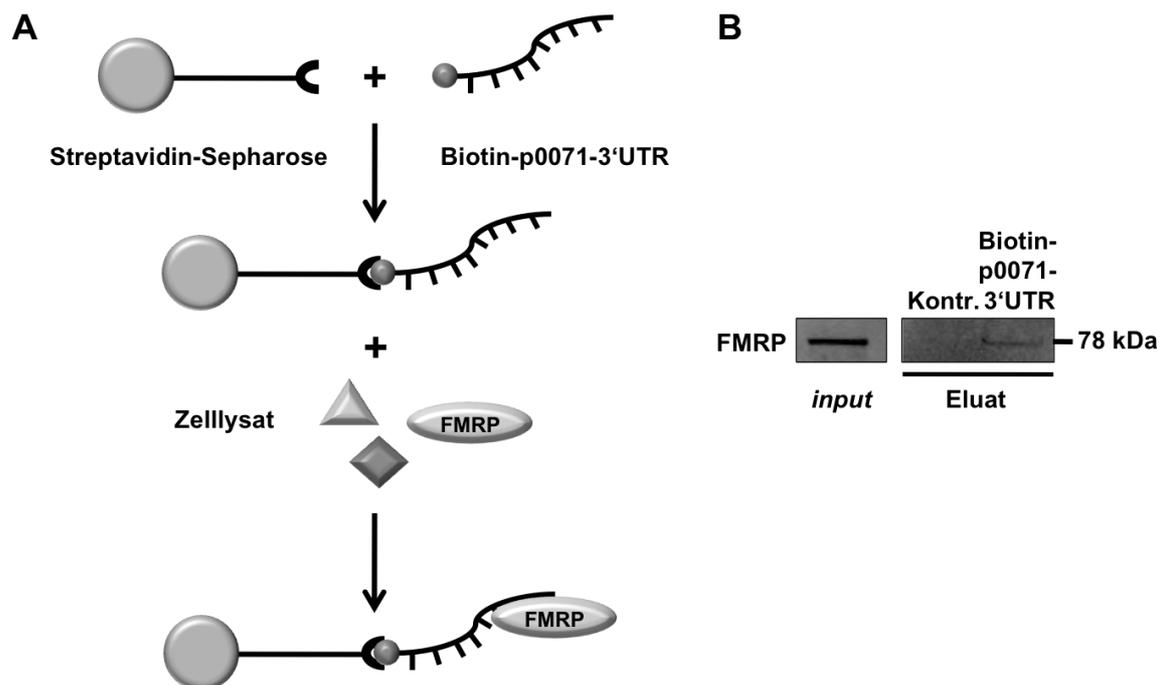


Abb. 3-11: FMRP kann durch die p0071-3'UTR aus HEK293-Zelllysate präzipitiert werden. (A, B) Streptavidin-pulldown zur Analyse der Bindung von FMRP an die p0071-3'UTR. (A) Schematische Darstellung des Streptavidin-pulldown-Experiments. Magnetische Streptavidin-Sepharose wurde mit *in vitro* transkribierter, biotin-markierter p0071-3'UTR inkubiert und diese daran immobilisiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit FMRP enthaltendem HEK293-Zelllysate. (B) Western Blot-Analyse des Streptavidin-pulldown-Experiments. Streptavidin-Sepharose ohne immobilisierte p0071-3'UTR diente als Kontrolle.

In einem mit den bereits gezeigten Co-Immunpräzipitationen vergleichbaren experimentellen Ansatz (in Zusammenarbeit mit Marcel Köhn, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier, Institut für Molekulare Medizin, Sektion Molekulare Zellbiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) wurde die p0071-3'UTR *in vitro* transkribiert, mit biotinyliertem UTP markiert und anschließend an magnetischer Streptavidin-Sepharose immobilisiert. Die Streptavidin-Sepharose wurde daraufhin mit FMRP enthaltendem HEK293-Zelllysat inkubiert (Abb. 3-11 A). FMRP konnte in dem Ansatz, welcher die immobilisierte 3'UTR der p0071-mRNA enthielt, spezifisch im Eluat nachgewiesen werden. Hingegen war FMRP in der Kontrolle (Streptavidin-Sepharose ohne biotinylierte p0071-3'UTR) nicht nachzuweisen (Abb. 3-11 B).

Diese Daten bestätigen die Interaktion zwischen der p0071-mRNA und FMRP und beschränken die FMRP-Bindestelle auf die p0071-3'UTR. Zusammenfassend zeigen die Resultate, dass FMRP direkt mit der p0071-mRNA interagiert.

Durch die Interaktion von FMRP mit seinen Zieltranskripten kann das Protein die mRNA auf eine Vielzahl von Wegen regulieren. Obwohl in einigen Studien über eine durch FMRP-vermittelte Regulation von mRNAs auf transkriptioneller Ebene berichtet wird (ZHONG *et al.*, 1999; MIYASHIRO *et al.*, 2003), erfolgt vorwiegend eine Regulation auf posttranskriptioneller Ebene. Aufgrund der Tatsache, dass FMRP sowohl mit der p0071-Proteinsynthese interferierte (siehe Abb. 3-7 B) als auch mit der p0071-mRNA interagiert (siehe Abb. 3-8 bis Abb. 3-11), konnte eine FMRP-vermittelte Regulation der p0071-mRNA-Translation als wahrscheinlich erachtet werden.

3.2.3. FMRP reguliert die p0071-mRNA-Translation

Bereits für die α -CaMKII-, Arc-, Map1b- und Sod1-mRNA konnte eine durch FMRP-vermittelte Translationsregulation nachgewiesen werden (ZALFA *et al.*, 2003; PARK *et al.*, 2008; BROWN *et al.*, 2001; BECHARA *et al.*, 2009).

3.2.3.1. FMRP reprimiert die Translation einer chimären p0071-mRNA

Es wurde berichtet, dass verschiedene RNA-bindende Proteine, auch FMRP, die mRNA-Translation vom 3'-Ende her regulieren, auch wenn neuere Daten belegen, dass FMRP zudem codierende Sequenzen binden kann (DARNELL *et al.*, 2011; ASCANO *et al.*, 2012). Um einen möglichen Effekt von FMRP auf die p0071-mRNA näher zu untersuchen, wurde

analysiert, wie FMRP die Translation eines Luciferase-Reporter-Transkripts moduliert, welches die 3'UTR der p0071-mRNA (human, NM_003628) enthält.

Somit konnte eine mögliche Regulation der Translation über die p0071-3'UTR indirekt über die Luciferase-Aktivität, welche proportional zur Menge an exprimierter Luciferase ist, gemessen werden. Dazu wurden *Fmr1*⁺-Zellen und *Fmr1*⁻-Zellen mit dem p0071-3'UTR-Luciferase-Reporter-Plasmid und einem *Renilla reniformis*-Luciferase-Expressionsvektor co-transfiziert und 24 h später die Luciferase-Aktivität per Luminometer bestimmt (Abb. 3-12).

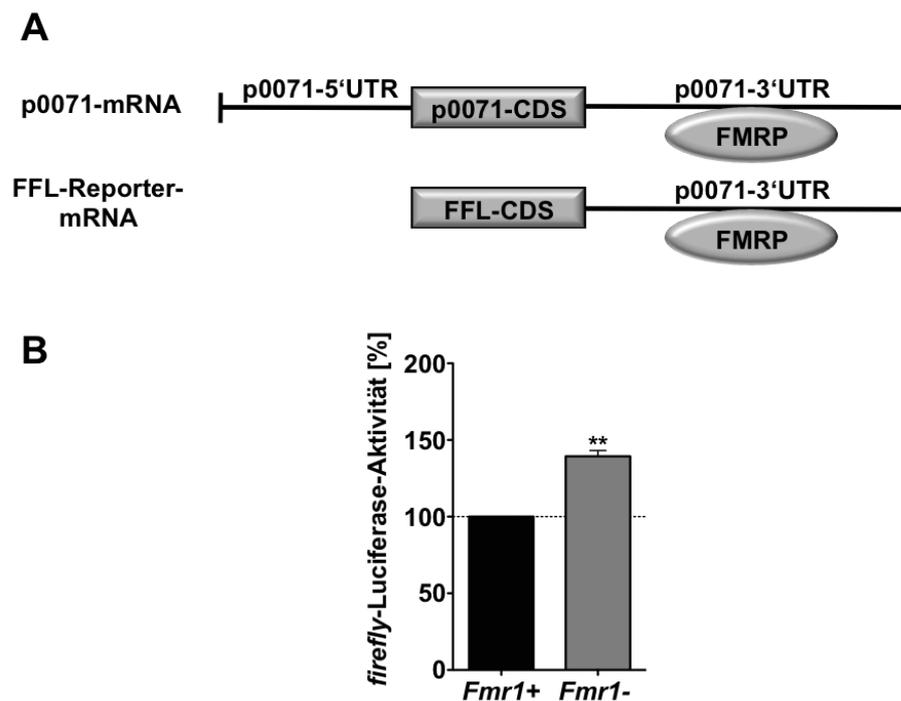


Abb. 3-12: FMRP reprimiert die p0071-Expression in *Fmr1*⁺-Zellen. (A, B) Luciferase-Reporter-Analyse zur Bestimmung eines möglichen translationellen Effektes von FMRP auf die p0071-mRNA. (A) Schematische Darstellung der verwendeten chimären *firefly*-Reporter-mRNA. Die Reporter-mRNA enthält die codierende Sequenz der *firefly*-Luciferase gefolgt von der Vollängen-p0071-3'UTR, an welche FMRP bindet. (B) *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Zellen wurden mit einem p0071-3'UTR-Luciferase-Reporter-Transkript und einem *Renilla reniformis*-Luciferase-Expressionsvektor co-transfiziert und 24 h später die Luciferase-Aktivität per Luminometer bestimmt. Die *firefly*-Luciferase-Aktivität wurde auf die *Renilla reniformis*-Luciferase-Aktivität normalisiert. n = 3 ; **, p ≤ 0,005

In den Messungen (Abb. 3-12 B) zeigte sich, dass die Luciferase-Aktivität nach Transfektion mit der p0071-3'UTR in den *Fmr1*⁻-Zellen um 50% höher war, als in den *Fmr1*⁺-Zellen (Abb. 3-12 B). Dies impliziert, dass die Protein-Expression der *firefly*-Luciferase durch FMRP negativ durch die p0071-3'UTR beeinflusst wurde. Das Fehlen von FMRP in den *Fmr1*⁻-Zellen hob den Translationsblock der chimären p0071-mRNA

auf. Da diese Untersuchungen nur einen indirekten Hinweis auf die Regulation der p0071-mRNA auf translationeller Ebene gaben, wurde nachfolgend ein direkterer Ansatz gewählt.

3.2.3.2. Die p0071-mRNA wird in *Fmr1*⁻-Zellen verstärkt translatiert

Für das sehr gut charakterisierte FMRP-Zieltranskript Sod1-mRNA konnte bereits eine positive Translationsregulation nachgewiesen werden. Bechara *et al.* zeigten mittels Dichtegradientenzentrifugation, dass die Anreicherung der Sod1-mRNA in Polysomen von *Fmr1*⁻-Zellen im Vergleich zu *Fmr1*⁺-Zellen deutlich reduziert war (BECHARA *et al.*, 2009). Der gleiche experimentelle Ansatz wurde gewählt, um die translationelle Regulation der p0071-mRNA durch FMRP zu untersuchen. Falls FMRP die Translation der p0071-mRNA reprimiert, sollte die p0071-mRNA verstärkt in den Polysomen von *Fmr1*⁻-Zellen angereichert sein.

Aus diesem Grund wurde die Verteilung der p0071-mRNA in translationsaktiven oder -inaktiven Ribosomen in *Fmr1*⁺-Zellen und *Fmr1*⁻-Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugationen (in Zusammenarbeit mit Dr. Christiane Harnisch, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Elmar Wahle, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Abteilung Allgemeine Biochemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) verglichen. Zelllysate von *Fmr1*⁺-Zellen und *Fmr1*⁻-Zellen wurden dafür in einem linearen 10 bis 45%igen Sucrosegradienten für 3 h bei 40000x g zentrifugiert. Aufgrund der unterschiedlichen Sedimentationsgeschwindigkeiten der Partikel im Dichtegradienten konnten die Lysate so in eine prä-polysomale (umfasst freie RNPs und translationsinaktive Ribosomen) und eine polysomale Fraktion (umfasst translationsaktive Ribosomen) aufgetrennt werden. Anschließend wurden diese fraktioniert, die RNA mittels TRIzol extrahiert und danach durch q-PCR die RNA-Verteilungen im Gradienten bestimmt (Abb. 3-13 A - C).

Dabei zeigte sich, dass die p0071-mRNA in den *Fmr1*⁺-Zellen vorwiegend in den prä-Polysomen und deutlich geringer in den Polysomen angereichert war (Abb. 3-13 A, schwarze Linie). In den *Fmr1*⁻-Zellen hingegen war die p0071-mRNA umgekehrt verteilt. Der größte Anteil war in den Polysomen nachweisbar und ein weitaus kleinerer Anteil in den prä-Polysomen (Abb. 3-13 A, gestrichelte Linie). Die Quantifizierung von drei unabhängigen Experimenten ergab eine signifikante Verschiebung der p0071-mRNA in die polysomalen Fraktionen der *Fmr1*⁻-Zellen (Abb. 3-13 D).

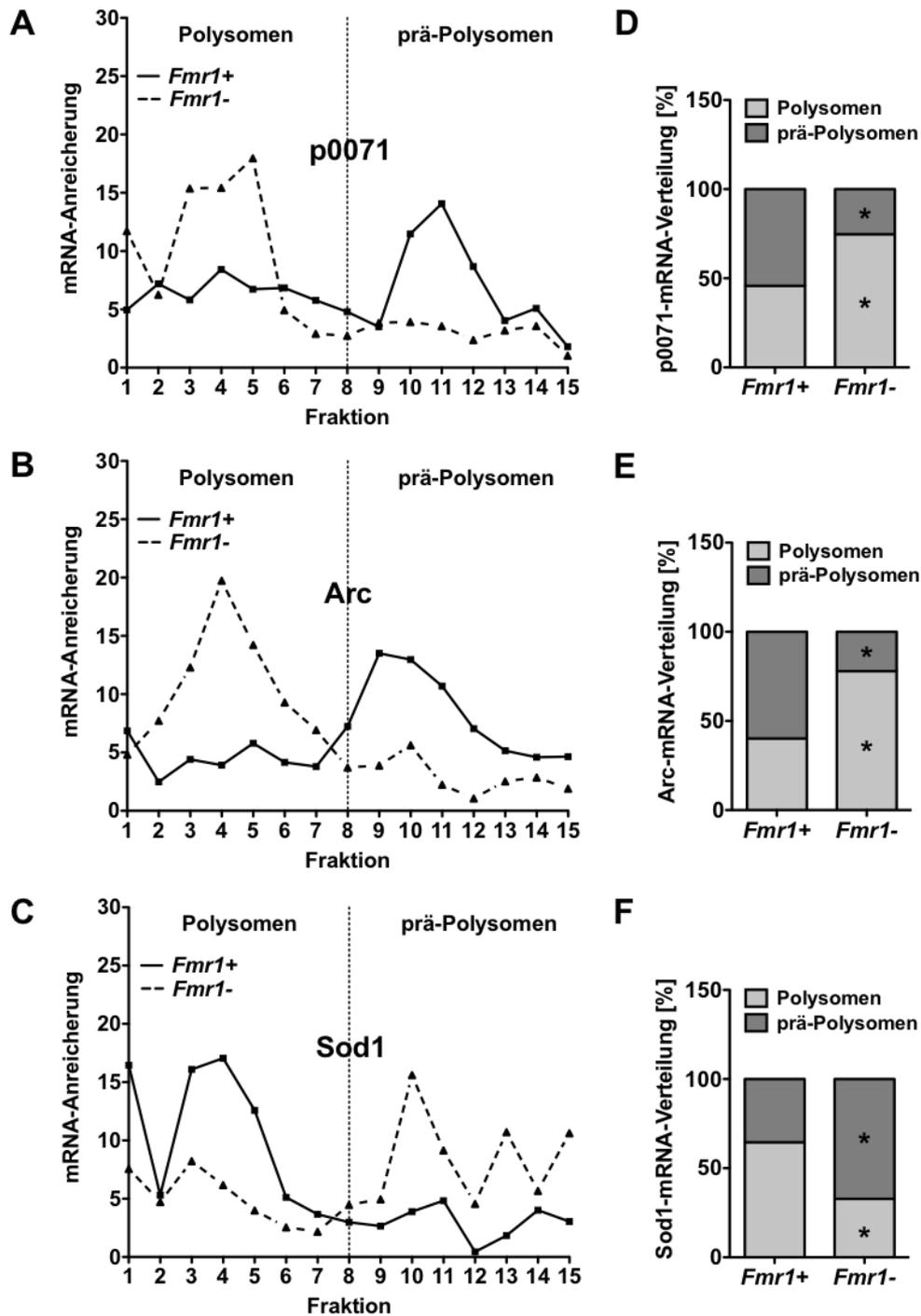


Abb. 3-13: Die p0071-mRNA ist in *Fmr1*⁻-Zellen stärker in die polysomalen Fraktionen verschoben. (A - F) mRNA-Verteilung nach Dichtegradientenzentrifugation von *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Zelllysaten. (A - C) *Fmr1*⁺-Zellen und *Fmr1*⁻-Zellen wurden 15 min vor der Zellernte mit 100 μ M Cycloheximid behandelt und die Zelllysate anschließend für drei Stunden in einem 10 bis 45%igen Sucrosegradienten bei 40000x g zentrifugiert. Aus den fraktionierten Gradienten wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit spezifischen Oligonukleotiden wurde die Verteilung für p0071-, Arc- und Sod1-mRNAs mittels q-PCR untersucht. Der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt. (D - F) Prozentuale Verteilung der untersuchten mRNAs in polysomalen und prä-polysomalen Fraktionen. n = 3 ; *, p \leq 0,05

Diese Ergebnisse erhärten die Hypothese, dass FMRP die Translation der p0071-mRNA negativ reguliert.

Nach den Dichtegradientenzentrifugationen wurden auch die mRNA-Verteilungen zweier bekannter FMRP-Zieltranskripte charakterisiert, von denen eines (Arc-mRNA, Abb. 3-13 B, (PARK *et al.*, 2008)) durch FMRP translationell reprimiert, das andere dagegen (Sod1-mRNA, Abb. 3-13 C, (BECHARA *et al.*, 2009)) translationell stimuliert wird.

Die Arc-mRNA zeigte im Dichtegradienten das gleiche Verteilungsmuster wie die p0071-mRNA jedoch mit verstärkter Anreicherung in den polysomalen Fraktionen in den *Fmr1*-Zellen (Abb. 3-13 B, gestrichelte Linie). Diese Verteilung konnte signifikant durch Quantifizierung der drei unabhängigen Experimente bestätigt werden (Abb. 3-13 E). Die Sod1-mRNA hingegen war weitaus stärker in den prä-polysomalen Fraktionen der *Fmr1*-Zellen vorzufinden und nur geringfügig in den Polysomen angereichert (Abb. 3-13 C, gestrichelte Linie), was auch an den signifikanten Verteilungsmustern deutlich zu sehen ist (Abb. 3-13 F). Mit diesen Versuchen konnte die p0071-mRNA als durch FMRP translationell negativ reguliertes Zieltranskript identifiziert und validiert werden.

3.2.3.3. FMRP bindet die zentrale Region der p0071-3'UTR

Aufgrund der translationellen Regulation der p0071-mRNA durch FMRP sollte im Folgenden die Bindestelle von FMRP an die p0071-3'UTR näher charakterisiert werden. FMRP besitzt diverse RNA-bindende Domänen, welche die Assoziation mit spezifischen Zieltranskripten vermitteln. Diese Domänen erkennen wiederum verschiedene RNA-Motive (SANTORO *et al.*, 2012). Die C-terminale RRG-Box von FMRP erkennt G-Quadruplexe *in vitro* und verschiedene, von FMRP gebundene mRNAs, besitzen putative G-Quadruplex-Strukturen (DARNELL *et al.*, 2001). Dementsprechend konnte für zahlreiche Zieltranskripte, wie z.B. *Fmr1*-, *MAP1b*- und *Sema3F*-mRNAs, eine G-Quadruplex-vermittelte Interaktion mit FMRP bestätigt werden (SCHAEFFER *et al.*, 2001; MENON und MIHAILESCU, 2007; MENON *et al.*, 2008). Des Weiteren wurden multiple U-reiche Pentamere sowohl in der codierenden Sequenz als auch in den 3'UTRs von FMRP-Zieltranskripten gefunden (CHEN *et al.*, 2003).

Um zu untersuchen, welche Sequenzabschnitte der p0071-3'UTR durch FMRP gebunden werden, wurden Luciferase-Reporter-Analysen durchgeführt. Dafür wurden drei überlappende, ca. 270 Nukleotide umfassende, Fragmente der p0071-3'UTR in einen *firefly*-Luciferase-Expressionsvektor kloniert (Abb. 3-14 A). Anschließend wurden

Fmr1⁺-Zellen und *Fmr1*⁻-Zellen mit den verschiedenen p0071-3'UTR-Luciferase-Reportern und mit einem *Renilla reniformis*-Luciferase-Expressionsvektor co-transfiziert und die Luciferase-Aktivität bestimmt (Abb. 3-14 B).

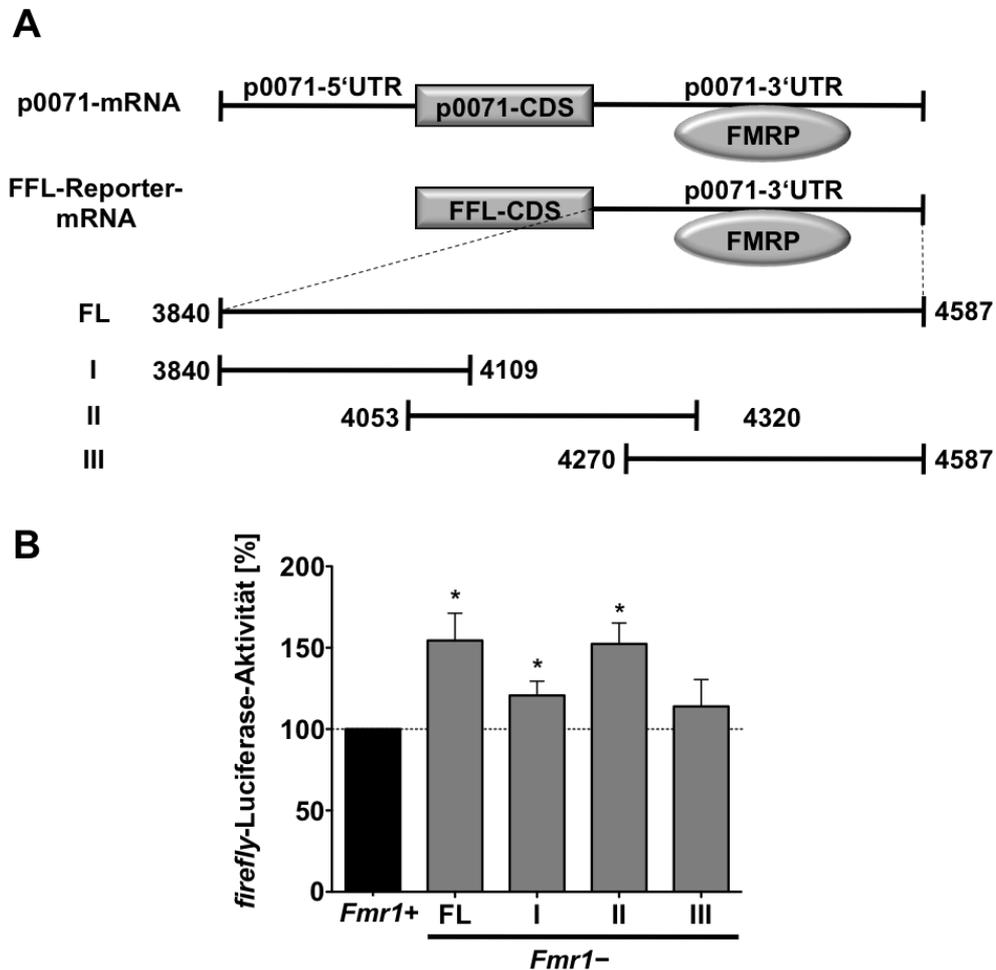


Abb. 3-14: FMRP reguliert die Translation der p0071-mRNA über eine Bindung an den zentralen Bereich der p0071-3'UTR. (A, B) Luciferase-Reporter-Analysen zur Identifizierung der FMRP-Bindestelle in der p0071-3'UTR. (A) Schematische Übersicht der verwendeten chimären *firefly* Reporter-mRNAs mit der Vollängen-p0071-3'UTR (FL) sowie drei überlappenden, ca. 270 Nukleotide langen Fragmenten (I–III). (B) *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Zellen wurden mit den p0071-3'UTR-Luciferase-Reporter-Transkripten und einem *Renilla reniformis*-Luciferase-Expressionsvektor co-transfiziert und 24 h später die Luciferase-Aktivität per Luminometer bestimmt. Die *firefly*-Luciferase-Aktivität der *Fmr1*⁻-Zellen wurde auf die *firefly*-Luciferase-Aktivität der *Fmr1*⁺-Zellen bezogen und auf *Renilla reniformis*-Luciferase-Aktivität normalisiert. n = 3 ; *, p ≤ 0,05

Nach Transfektion mit dem Fragment II der p0071-3'UTR (Nukleotide 4053 bis 4320) konnte die gleiche normalisierte *firefly*-Luciferase-Aktivität gemessen werden wie nach Transfektion mit der Vollängen-p0071-3'UTR (Nukleotide 3840 bis 4587) in Abb. 3-12 B und Abb. 3-14 B. Die Transfektion von *Fmr1*⁻-Zellen mit den Fragmenten I und III hatte

hingegen keinen Einfluss auf die *firefly*-Luciferase-Aktivität im Vergleich zu den transfizierten *Fmr1*⁺-Zellen (Abb. 3-14 A, B).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die durch FMRP vermittelte Translationsrepression der p0071-mRNA durch Fragment II der p0071-3'UTR determiniert wird und damit auch eine oder mehrere Bindestellen für FMRP in diesem Sequenzabschnitt der p0071-mRNA liegen.

3.2.3.4. FMRP bindet G- und U-reiche Sequenzbereiche in der p0071-3'UTR

Die oben genannten Ergebnisse mit Fragment II (Nukleotide 4053 bis 4320) ließen die Vermutung aufkommen, dass dieser Bereich der p0071-3'UTR eine oder mehrere FMRP-Zielsequenzen enthält.

Aus diesem Grund wurde die Nukleotidsequenz von Fragment II der p0071-3'UTR näher untersucht. Es konnte ein G-reicher Sequenzabschnitt in den ersten 100 Nukleotiden des Fragments II identifiziert werden und zudem eine U-reiche Nukleotidsequenz am Ende von Fragment II (Abb. 3-15).

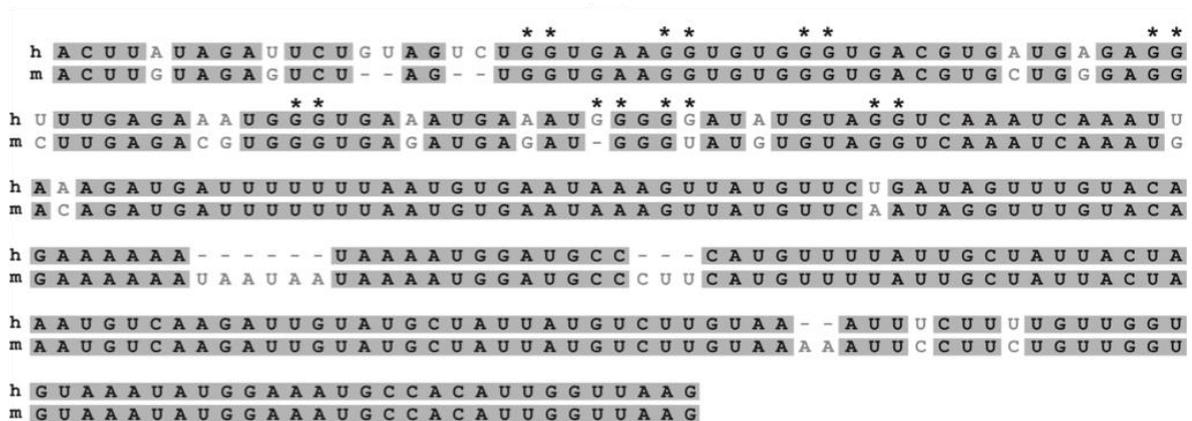


Abb. 3-15: Der zentrale Bereich der p0071-3'UTR weist sowohl G- als auch U-reiche Sequenzabschnitte auf. Schematischer Sequenzvergleich zwischen den zentralen Bereichen der humanen ((h), Nukleotide 4053 bis 4320) und der murinen (m) p0071-3'UTR. Grau unterlegte Bereiche markieren identische Nukleotide zwischen humaner und muriner p0071-3'UTR. Sterne markieren Guanin-Nukleotide, die nach Vorhersage putative G-Quadruplexe bilden können. Es wurde das *in-silico*-Vorhersageprogramm QGRS-Mapper⁸ genutzt (KIKIN *et al.*, 2006).

Jedoch bedeutet das Vorhandensein von G-reichen Sequenzabschnitten nicht automatisch, dass diese Bereiche G-Quadruplexe bilden können. Obwohl das Potenzial zur G-

⁸ <http://bioinformatics.ramapo.edu/QGRS/index.php>, 15.11.2012

Quadruplex-Bildung im der p0071-3'UTR in einer großangelegten Studie nur als moderat definiert wurde (EDDY und MAIZELS, 2006), konnten mit dem QGRS-Mapper⁸, einem Programm zur *in-silico*-Vorhersage von G-Quadruplexen (KIKIN *et al.*, 2006), drei putative G-Quadruplexe in der p0071-3'UTR identifiziert werden. Dabei lagen zwei der drei putativen G-Quadruplexe im Fragment II der p0071-3'UTR (Abb. 3-15, schwarze Sterne und Abb. 3-16 A).

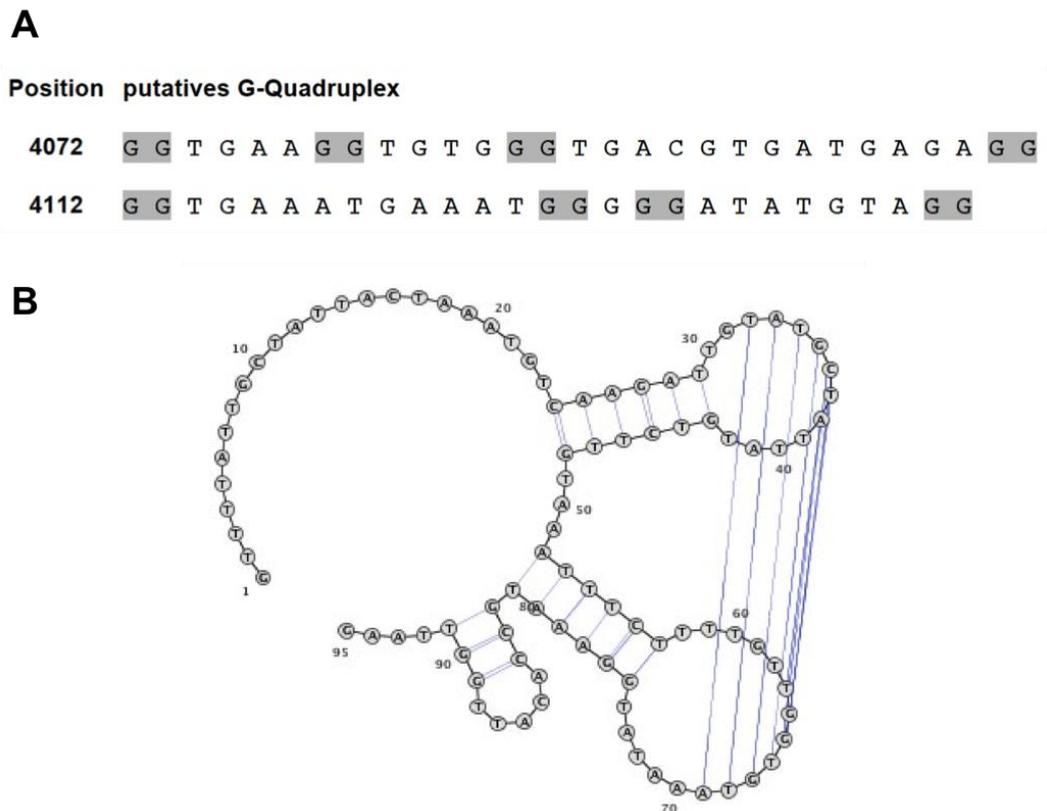


Abb. 3-16: Der zentrale Bereich der p0071-3'UTR kann von FMRP erkannte Struktur motive bilden, G-Quadruplexe und den „kissing complex“. (A, B) Schematische Darstellung von FMRP erkannten Strukturmotiven in der p0071-3'UTR. (A) Sequenzbereich in der p0071-3'UTR mit dem Potenzial zur Bildung von zwei G-Quadruplexen. Guanin-Nukleotide des jeweils vorhergesagten G-Quadruplexes sind grau hinterlegt. (B) Struktur des U-reichen Sequenzabschnitts in der p0071-3'UTR durch Verwendung des *in silico*-Vorhersageprogramms CyloFold⁹ (BINDEWALD *et al.*, 2010) mit zwei *stem-loop*-Strukturen, welche die Fähigkeit zur Bildung des „kissing complex“ aufweisen.

Der U-reiche Sequenzabschnitt im p0071-3'UTR lag *downstream* der G-reichen Nukleotidsequenz, wobei 44% der Nukleotide Uridine waren (siehe Abb. 3-15). Mit Hilfe des *in-silico*-Programms CyloFold⁹, zur Vorhersage von RNA-Sekundärstrukturen (BINDEWALD *et al.*, 2010), wurde dieser Sequenzabschnitt auf die Möglichkeit zur Bildung eines „kissing complexes“ hin untersucht. Dabei handelt es sich um einen Schleifen-

⁹ <http://cylofold.abcc.ncifcrf.gov>

Schleifen-Pseudoknoten. Tatsächlich ist dieser Sequenzbereich im Fragment II in der Lage, eine doppelte *stem-loop*-Struktur ähnlich des sogenannten „*kissing complexes*“ zu bilden (Abb. 3-15, Abb. 3-16 B, siehe Abb. 1-2 C).

Um nun zu überprüfen, ob diese Motive für die FMRP-vermittelte Translationsrepression der p0071-mRNA verantwortlich sind, wurde Fragment II in nochmals kleinere, ca. 100 Nukleotide lange Fragmente zerlegt und in den *firefly*-Luciferase-Expressionsvektor kloniert (Abb. 3-17 A).

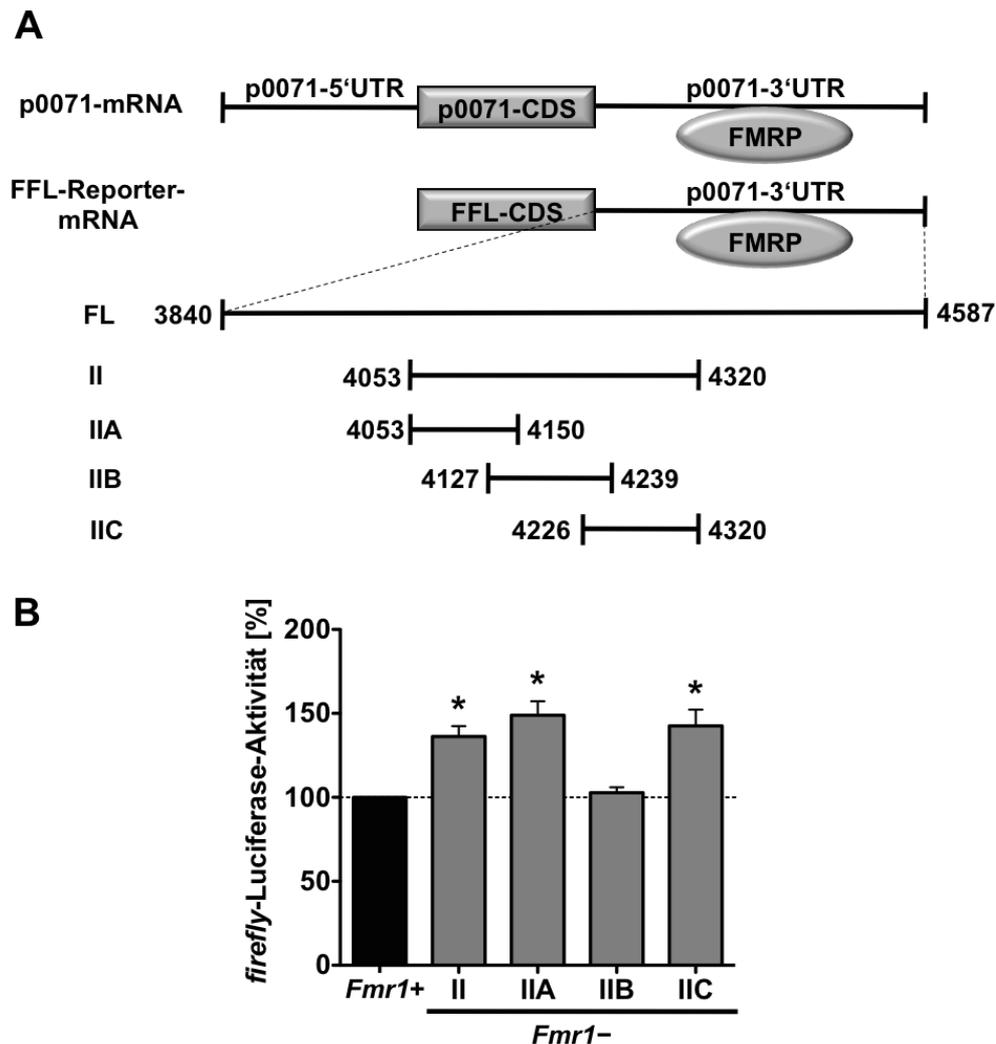


Abb. 3-17: FMRP bindet mit hoher Wahrscheinlichkeit über zwei verschiedene RNA-Struktur motive an den zentralen Bereich der p0071-3'UTR. (A, B) Luciferase-Reporter-Analysen zur Identifizierung der FMRP-Bindestelle im zentralen Bereich der p0071-3'UTR. (A) Schematische Übersicht der verwendeten chimären *firefly*-Reporter-mRNAs. (B) *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Zellen wurden mit den p0071-3'UTR-Luciferase-Reportern und einem *Renilla reniformis* Luciferase-Expressionsvektor co-transfiziert und nach 24 h wurde die Luciferaseaktivität per Luminometer bestimmt. Die *firefly* Luciferase-Aktivität der *Fmr1*⁻-Zellen wurde auf die *firefly*-Luciferase-Aktivität der *Fmr1*⁺-Zellen bezogen und auf *Renilla reniformis* Luciferase-Aktivität normalisiert. n = 3 ; *, p ≤ 0,05.

Fmr1⁺-Zellen und *Fmr1*⁻-Zellen wurden mit den verschiedenen p0071-3'UTR-Luciferase-Reportern (Abb. 3-17 A) und einem *Renilla Reniformis*-Luciferase-Expressionsvektor co-transfiziert und die Luciferase-Aktivität bestimmt (Abb. 3-17 B).

Wie aus Abb. 3-17 B ersichtlich, resultierte die Transfektionen der Reporter-Konstrukte mit Fragment IIA und IIC in einer erhöhten Luciferase-Aktivität in *Fmr1*⁻-Zellen im Vergleich zu *Fmr1*⁺-Zellen. Hingegen blieb die Aktivität des Reporter-Konstruktes, welches das Fragment IIB der p0071-3'UTR beinhaltete, weitgehend von der FMRP-Expression unbeeinflusst (Abb. 3-17 B).

Um die in den Luciferase-Reporter-Analysen erhaltenen Daten zu validieren, wurden Co-Immünpräzitationen mit exogenen p0071-3'UTR-Fragmenten und endogenem FMRP in HEK293-Zelllysaten durchgeführt. Dazu wurden HEK293-Zellen mit ausgewählten p0071-3'UTR-Luciferase-Reportern (Abb. 3-17 A) transfiziert. Nach 48 h wurde eine FMRP-Immünpräzitation durchgeführt (Abb. 3-18 A) und das Eluat mittels q-PCR auf die mRNA co-präzitiertes p0071-3'UTR-Luciferase-Reporter untersucht (Abb. 3-18 B).

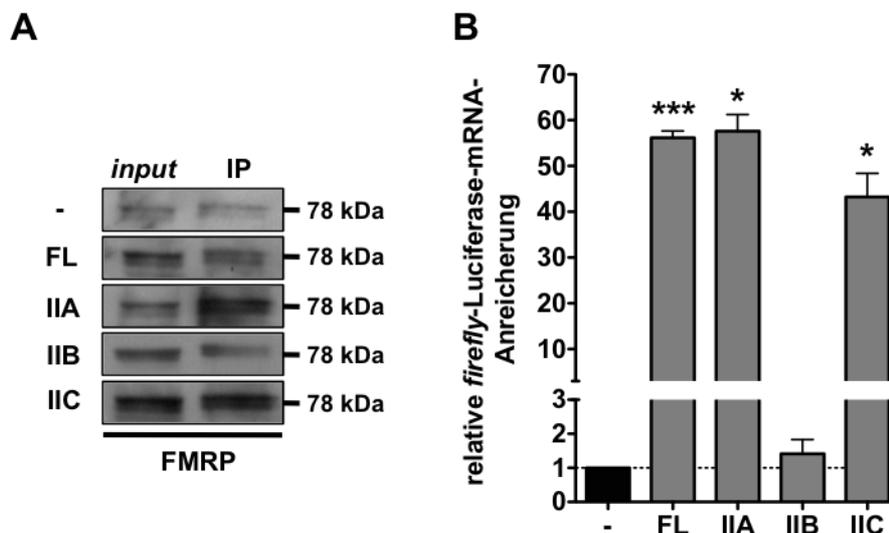


Abb. 3-18: FMRP bindet an zwei kurze Sequenzabschnitte in der p0071-3'UTR.

(A, B) Co-Immünpräzitation von p0071-3'UTR-Luciferase-Reportern zusammen mit FMRP in HEK293-Zelllysaten. FMRP wurde mit einem spezifischen Antikörper aus HEK293-Zelllysaten präzipitiert und die co-präzipitierte RNA mittels q-PCR untersucht. (A) Western Blot-Analyse der FMRP-Immünpräzitationen aus HEK293-Zelllysaten. IP = Immünpräzitation (B) q-PCR-Analyse der mit FMRP co-präzipitierten Luciferase-Reporter-mRNAs mit spezifischen Oligonukleotiden für die *firefly*-Luciferase, nachdem die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben wurde. Untransfizierte HEK293-Zellen dienen als Kontrolle (-). Die Anreicherung der mRNA wurde mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode berechnet und auf das RPLP0-mRNA normalisiert. n = 3 ; ***, p < 0,0005 ; * , p < 0,05

Nach erfolgreicher FMRP-Immunpräzipitation (Abb. 3-18 A) konnte für die Fragmente IIA und IIC der p0071-3'UTR eine signifikante Anreicherung der mRNA durch q-PCR im Eluat nachgewiesen werden (Abb. 3-18 B). Für Fragment IIB, welches zuvor in der Luciferase-Reporter-Analyse eine unveränderte Luciferase-Aktivität zeigte, konnte keine Anreicherung detektiert werden. Die Volllängen-p0071-3'UTR zeigte eine ähnliche Anreicherung wie die Fragmente IIA und IIC.

Aus den Daten der Luciferase-Reporter-Analysen (Abb. 3-17 B) und Co-Immunpräzipitationen (Abb. 3-18) kann man schlussfolgern, dass FMRP die Translationsrepression der p0071-mRNA über mindestens zwei regulatorische *cis*-Elemente in der p0071-3'UTR steuert (Fragmente IIA und IIC). Weiterhin weist die p0071-3'UTR innerhalb der Säugetiere besonders eine hohe Sequenzhomologie in den G-reichen und U-reichen *cis*-Determinanten auf (Abb. 3-15). Dies legt die Vermutung nahe, dass der hier beschriebene Regulationsprozess der Translationsrepression der p0071-mRNA bei Säugetieren stark konserviert ist.

Um zu überprüfen, ob die G-reiche Sequenz G-Quadruplex-Strukturen bildet, wurde die Kationen-abhängige Termination der reversen Transkription untersucht (Abb. 3-19).

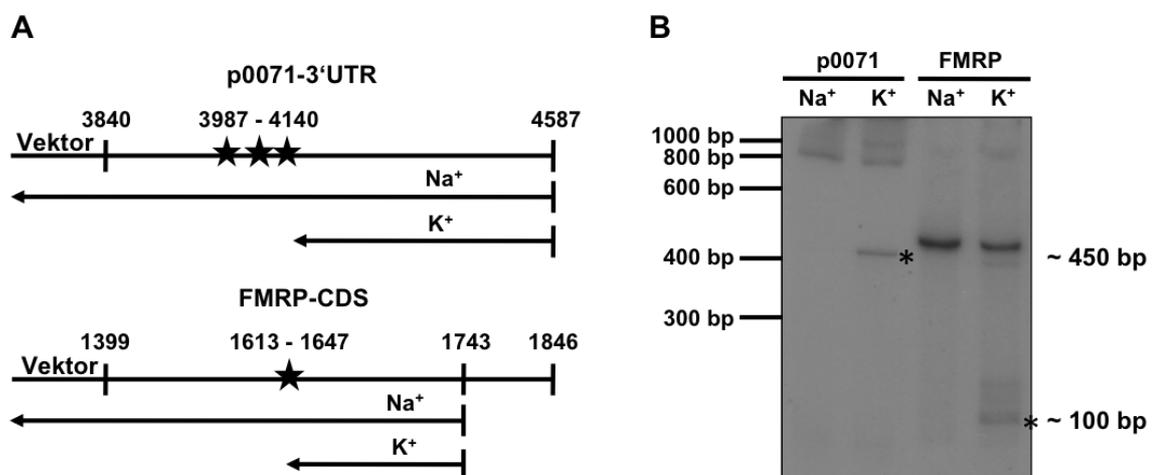


Abb. 3-19: Die p0071-3'UTR besitzt G-Quadruplexe in den G-reichen Sequenzabschnitten. (A, B) Primer Extensions-Analysen zur Detektion von G-Quadruplexen in der p0071-3'UTR. (A) Schematische Darstellung der p0071-3'UTR und der FMRP-CDS mit der Position der putativen G-Quadruplexe (p0071, Sterne) und dem bekannten G-Quadruplex-Motiv (FMRP, Sterne) sowie den zu erwartenden Produkten nach reverser Transkription in Anwesenheit von Na⁺ oder K⁺. (B) Autoradiographie des *Primer Extension Assays*. Mittels radioaktiv markierter Oligonukleotide wurden verschiedene Bereiche der p0071-3'UTR und der FMRP-CDS in Anwesenheit von Na⁺ oder K⁺ revers transkribiert und die Produkte mittels Polyacrylamid-Harnstoff-Gel und Autoradiographie analysiert. Die Sterne markieren unvollständige Produkte infolge von Pausen der reversen Transkriptase an G-Quadruplex-Strukturen in Anwesenheit von K⁺.

Dabei macht man sich zu Nutze, dass Kaliumionen G-Quadruplex-Strukturen stabilisieren und Natriumionen diese destabilisieren. Daher kommt es in Anwesenheit von Kaliumionen zu einem Abbruch der reversen Transkription falls tatsächlich G-Quadruplexe in der p0071-3'UTR vorhanden sind. Dazu wurden (in Zusammenarbeit mit Dr. René Keil, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Mechthild Hatzfeld, Institut für Molekulare Medizin, Sektion Pathobiochemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) Primer Extensionen in Anwesenheit von K^+ oder Na^+ mit *in vitro* transkribierter p0071-3'UTR durchgeführt.

Nach reverser Transkription der p0071-3'UTR (Abb. 3-19 A) fiel beim Vergleich von K^+ oder Na^+ behandelten Proben auf, dass sich unterschiedlich große Produkte gebildet hatten (Abb. 3-19 B). In Anwesenheit von K^+ entstand ein deutlich kürzeres Produkt (ca. 450 bp) als in Anwesenheit von Na^+ (ca. 800 bp). FMRP, mit einer bekannten G-Quadruplex-Struktur in der codierenden Sequenz, diente als Positivkontrolle. Diese Ergebnisse erlauben den Schluss, dass im Fragment II der p0071-3'UTR, entsprechend zur Vorhersage (Abb. 3-16 A), G-Quadruplexe vorhanden sind und somit die Interaktion zwischen FMRP und der p0071-mRNA in dem G-reichen Sequenzabschnitt über diese Sekundärstrukturen erfolgt.

3.2.3.5. Der Phosphorylierungsstatus von FMRP beeinflusst die Translationsrepression der p0071-mRNA

In vivo existiert FMRP in einer phosphorylierten und in einer unphosphorylierten Variante (NARAYANAN *et al.*, 2007). FMRP enthält einen Serinrest, der von *Drosophila melanogaster* bis zum *Homo sapiens* (human Serin₅₀₀, murin Serin₄₉₉, *Drosophila* Serin₄₀₆) konserviert ist und der zudem die primäre Phosphorylierungsstelle in FMRP darstellt (CEMAN *et al.*, 2003). Dabei wird angenommen, dass der Phosphorylierungsstatus dieses Schlüssel-Serins die Funktionalität von FMRP bestimmt. Obwohl die Phosphorylierung von FMRP keinen Einfluss auf seine RNA-Bindeeigenschaften hat, steuert diese aber dessen Eigenschaft, die Translation von Zieltranskripten zu inhibieren (CEMAN *et al.*, 2003; NARAYANAN *et al.*, 2007). Studien zur Regulation der Arc-mRNA belegen, dass an Serin₅₀₀ phosphoryliertes FMRP die konstitutive Translation der Arc-mRNA reprimieren kann (NIERE *et al.*, 2012).

Aufgrund der bereits beobachteten Gemeinsamkeiten in der Regulation der Arc- und p0071-mRNA (siehe Abb. 3-13 A, B), sollte nun analysiert werden, ob die translationelle Repression der p0071-mRNA durch den FMRP-Phosphorylierungsstatus moduliert wird.

Dazu wurde durch ortsgerichtete Mutagenese (2.2.1.4) eine an Serin₄₉₉ nicht-phosphorylierbare FMRP-Mutante erzeugt (S499A). *Fmr1*⁻-Zellen wurden entweder mit der nicht-phosphorylierbaren FMRP-S499A-Mutante oder dem FMRP-Wildtyp transfiziert. Zusätzlich erfolgte die Co-Transfektion dieser Zellen mit den bereits beschriebenen p0071-3'UTR-Fragmenten I-III (siehe Abb. 3-14 A) im *firefly*-Luciferase-Expressionsvektor und dem *Renilla reniformis*-Luciferase-Expressionsvektor. 24 h nach der Transfektion wurden die Luciferase-Aktivitäten bestimmt (Abb. 3-20).

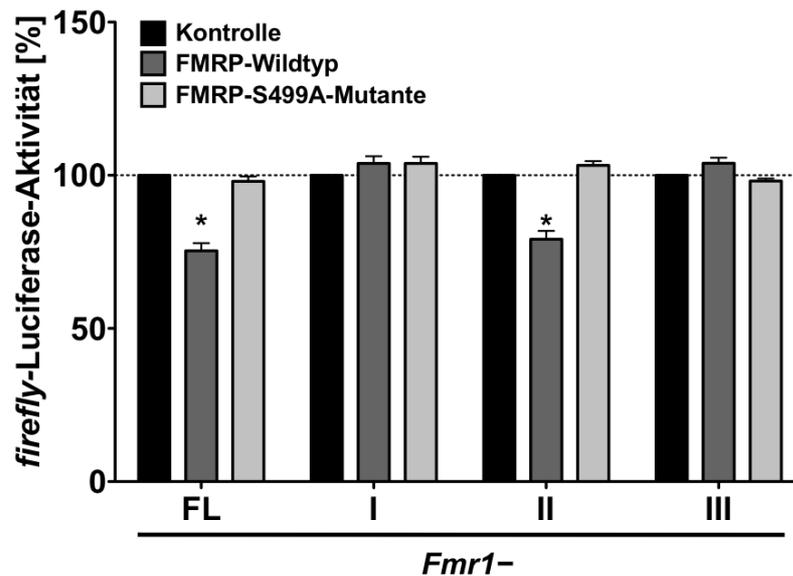


Abb. 3-20: Eine nicht-phosphorylierbare FMRP-Mutante kann die Translation der p0071-mRNA nicht reprimieren. *Fmr1*⁻-Zellen wurden entweder mit einer nicht-phosphorylierbaren FMRP-S499A-Mutante, dem FMRP-Wildtyp oder einem leeren Kontrollvektor und Luciferase-Reportern mit den p0071-3'UTR-Fragmenten I-III sowie dem Vollängen-p0071-3'UTR co-transfiziert. Zusätzlich wurde zudem ein *Renilla reniformis*-Luciferase-Expressionsvektor zum Abgleich transfiziert. 24 h Stunden nach Transfektion wurden die Luciferase-Aktivitäten bestimmt und auf die Kontrolltransfektion und die *Renilla reniformis*-Luciferase-Aktivitäten normalisiert. n = 3 ; *, p ≤ 0,05.

Die Transfektion der FMRP-S499A-Mutante in *Fmr1*⁻-Zellen konnte die Reporter-Aktivitäten für keines der p0071-3'UTR-Fragmente und auch nicht für das Vollängen-p0071-3'UTR reduzieren (Abb. 3-20, hellgraue Balken). Hingegen waren die Reporter-Aktivitäten nach Transfektion des FMRP-Wildtyps im Vergleich zur Kontrolle für das Vollängen-p0071-3'UTR sowie für das Fragment II deutlich verringert (Abb. 3-20, dunkelgraue Balken).

Aus diesen Daten kann man schließen, dass die FMRP-S499A-Mutante nicht in der Lage ist, die Translation über die 3'UTR der p0071-mRNA zu reprimieren. Dies impliziert

die Notwendigkeit der Phosphorylierung von FMRP an Serin₄₉₉ zur Translationsrepression der p0071-mRNA.

3.2.4. FMRP moduliert die Aktin-Organisation durch die Kontrolle der p0071-Expression

Schon für andere Zieltranskripte konnte eine FMRP-vermittelte Regulation von *downstream* gelegenen Signalwegen nachgewiesen werden (SANTORO *et al.*, 2012). So wurde durch Gross *et al.* gezeigt, dass FMRP die Aktivität der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) durch die Kontrolle der p110 β -mRNA-Translation reguliert (GROSS *et al.*, 2010). Bei p110 β handelt es sich um die katalytische Untereinheit der PI3K. Die Translation der p110 β -mRNA war in *Fmr1*-KO-Mäusen stark erhöht und führte zu einer Deregulation des PI3K-Signalwegs (GROSS *et al.*, 2010).

In der vorliegenden Arbeit konnte ich zeigen, dass FMRP die p0071-mRNA-Translation kontrolliert. Aus diesem Grund sollte nun analysiert werden, ob diese regulatorische Rolle für die FMRP-gesteuerte Modulation der Aktin-Organisation verantwortlich ist. Zu diesem Zweck wurde p0071 lentiviral in *Fmr1*⁺-Zellen überexprimiert (durch Dr. Marcell Lederer, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier, Institut für Molekulare Medizin, Sektion Molekulare Zellbiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) und nach Puromycin-Selektion die erfolgreiche Transduktion mittels Western Blot überprüft (Abb. 3-21 A).

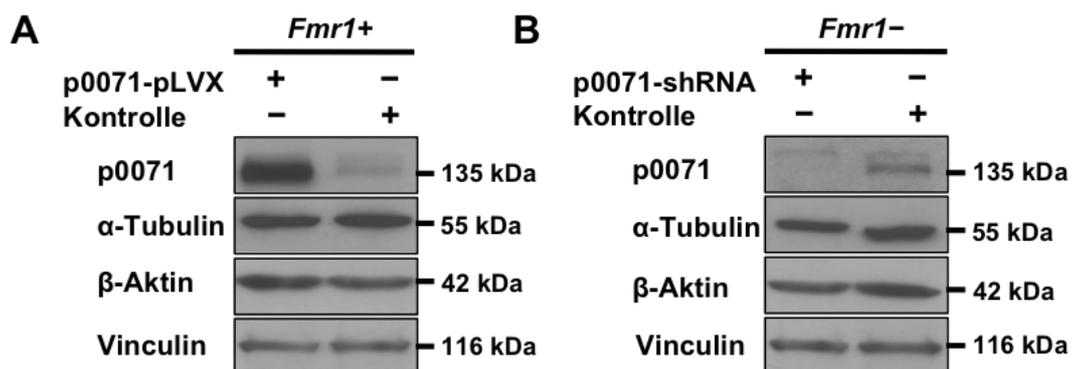


Abb. 3-21: Die lentivirale Überexpression und der *knockdown* von p0071 in *Fmr1*⁺- bzw. *Fmr1*⁻-Zellen war erfolgreich. (A, B) Western Blot-Analyse zur Überprüfung der lentiviralen Überexpression und des *knockdowns* von p0071 in *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Zellen. (A) *Fmr1*⁺-Zellen wurden mit p0071-pLVX-Lentiviren oder pLVX-Lentiviren (Kontrolle) und (B) *Fmr1*⁻-Zellen mit p0071-shRNA-Lentiviren bzw. Kontroll-shRNA-Lentiviren transduziert (siehe 2.2.4.4). Nach Puromycin-Selektion wurden die Zelllysate auf die Expression von p0071 sowie auf Abgleichsproteine hin mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht.

Anschließend wurde eine Phänotyp-Analyse mittels Immunfluoreszenz durchgeführt. Sowohl die Zellmorphologie als auch die Organisation des Aktinzytoskeletts nach p0071-Überexpression in FMRP re-exprimierenden Zellen waren konträr zu dem in *Fmr1*-Zellen beobachteten Phänotyp (vgl. Abb. 3-22 A mit Abb. 3-2 B).

Die Überexpression von p0071 führte zu einer runden Zellmorphologie, einer perinukleären Akkumulation und reduzierten Größe der Fokalkontakte sowie zu einer starken Verringerung der Anzahl an Stressfasern im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3-22 A).

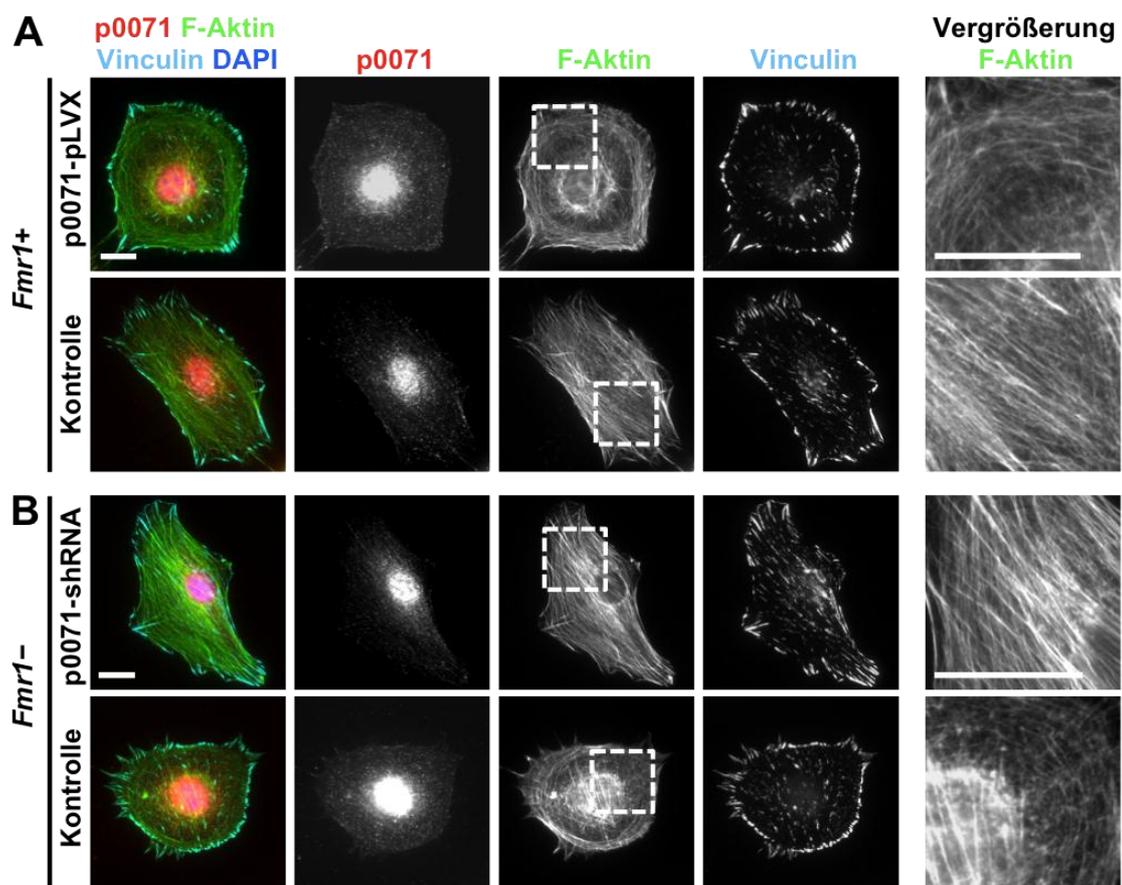


Abb. 3-22: Die Überexpression und der *knockdown* von p0071 führen zum *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Phänotyp. (A, B) Immunfluoreszenz-Studien von *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Zellen zur Analyse der Aktinzytoskelett-Organisation nach lentiviraler Transduktion mit den gekennzeichneten Konstrukten (siehe auch Abb. 3-21 A, B). (A) *Fmr1*⁺-Zellen wurden mit p0071-pLVX-Lentiviren oder pLVX-Lentiviren (Kontrolle) und (B) *Fmr1*⁻-Zellen mit p0071-shRNA-Lentiviren bzw. Kontroll-shRNA-Lentiviren transduziert. 24 h nach dem Einsäen wurden die Puromycin-selektierten Zellklone mit Formaldehyd fixiert und mit einem spezifischen Antikörper gegen p0071 (rot) und Vinculin (türkis) inkubiert. Zudem wurde filamentöses Aktin mit Phalloidin-Oregon Green 488 (grün) und die DNA mit DAPI (blau) markiert. Die Balken entsprechen 20 μ m.

Die Bestimmung des F-Aktin/G-Aktin-Verhältnisses nach p0071-Überexpression in *Fmr1*⁺-Zellen ergab eine Reduktion der Menge an F-Aktin um 25% im Vergleich zur

Kontrolle und bestätigte damit die phänotypischen Veränderungen (Abb. 3-23 A). Somit führt die p0071-Expression in *Fmr1*⁺-Zellen zum gleichen Phänotyp wie in *Fmr1*⁻-Zellen (vgl. Abb. 3-2 mit Abb. 3-22). p0071 ist daher möglicherweise eine Hauptkomponente bei der Regulation der Aktin-Organisation *downstream* von FMRP.

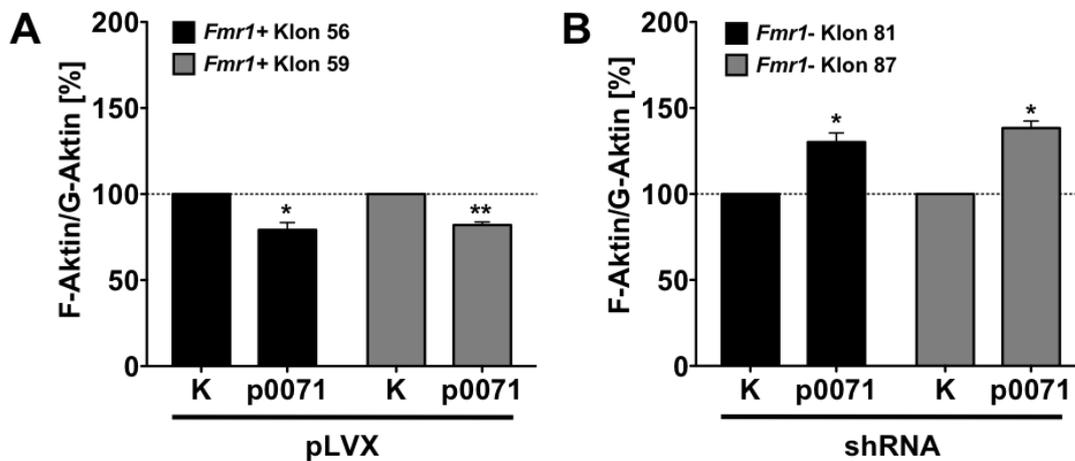


Abb. 3-23: p0071-Überexpression und *knockdown* führen zu einer Verringerung bzw. Erhöhung des F-Aktin/G-Aktin-Verhältnisses. (A, B) F-Aktin/G-Aktin-Analysen von lentiviral transduzierten (A) *Fmr1*⁺- und (B) *Fmr1*⁻-Zellklonen (siehe Abb. 3-21 und Abb. 3-22). Zur Bestimmung des F-Aktin/G-Aktin-Verhältnisses wurden die Zellen 24 h nach dem Aussäen in 96-*well*-Platten mit Formaldehyd fixiert, F-Aktin mit Phalloidin-AlexaFluor 594, G-Aktin mit AlexaFluor 594-konjugierter DNaseI und die DNA mit DAPI markiert. Anschließend wurden die Fluoreszenz-Intensitäten in einem Mikroplattenlesegerät gemessen und auf die DAPI-Fluoreszenz abgeglichen. Es wurde jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt. n = 3 ; **, p ≤ 0.005 ; *, p ≤ 0.05.

Zusätzlich stellte der shRNA-vermittelte lentivirale *knockdown* von p0071 (siehe Western Blot in Abb. 3-21 B) in *Fmr1*⁻-Zellen den *Fmr1*⁺-Phänotyp wieder her (Abb. 3-22 B). Der p0071-*knockdown* induzierte eine Verlängerung der Zellform mit einer erhöhten Menge an parallelen Stressfasern (Abb. 3-22 B). Zudem waren die Fokalkontakte vergrößert und auch das F-Aktin/G-Aktin-Verhältnis war um 25% im Vergleich zum Kontroll-*knockdown* erhöht (Abb. 3-23 B).

Diese Daten zeigen eindeutig, dass die Repression der p0071-mRNA-Translation durch FMRP die maßgebende Ursache für die beobachteten Veränderungen der Aktin-Organisation zwischen den *Fmr1*⁺-Zellen und den *Fmr1*⁻-Zellen ist.

Da der Expressionsstatus von p0071 direkt durch FMRP reguliert wird und gezeigt werden konnte, dass die nicht-phosphorylierbare FMRP-S499A-Mutante die Translation der p0071-mRNA nicht reprimieren kann (siehe Abb. 3-20), wurde im Folgenden analysiert, wie sich die Expression der FMRP-S499A-Mutante auf die Aktinzytoskelett-Organisation in *Fmr1*⁻-Zellen auswirkt. Dazu wurden *Fmr1*⁻-Zellen transient mit der

FMRP-S499A-Mutante transfiziert und nach 48 h die Organisation des Aktinzytoskeletts mittels Immunfluoreszenz untersucht (Abb. 3-24).

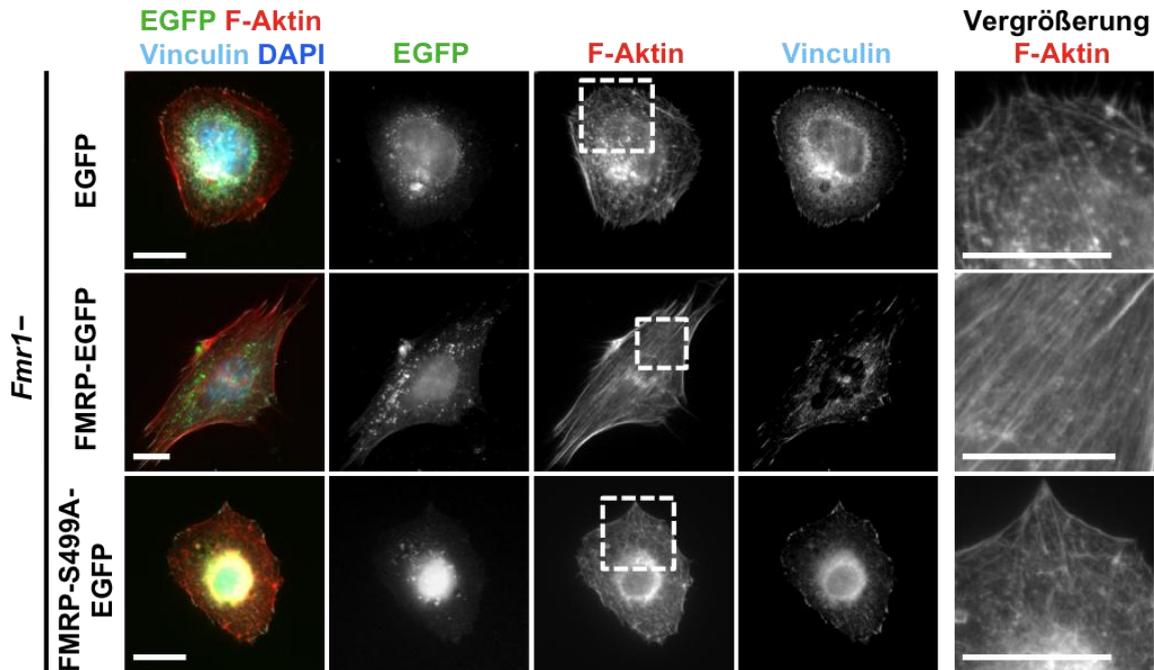


Abb. 3-24: Die FMRP-S499A-Mutante ist nicht in der Lage, den *Fmr1*--Phänotyp zu revertieren. Immunfluoreszenz-Analysen von *Fmr1*--Zellen nach Transfektion mit der FMRP-S499A-Mutante, FMRP-EGFP und EGFP (Kontrolle). *Fmr1*--Zellen wurden 24 h nach dem Einsäen mit den angezeigten Konstrukten transfiziert und nach 48 h mit Formaldehyd fixiert. Nach Permeabilisierung wurden die Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen EGFP (grün) und Vinculin (türkis) inkubiert. Zusätzlich wurde die DNA (blau) mit DAPI und das Aktinzytoskelett (rot) mit Phalloidin-AlexaFluor 594 angefärbt. Die Balken entsprechen 20 µm.

In Abb. 3-24 ist deutlich zu erkennen, dass die mit der FMRP-S499A-Mutante transfizierten *Fmr1*--Zellen (Abb. 3-24, untere Reihe) einen weitgehend unveränderten Phänotyp hinsichtlich der Aktinzytoskelett-Organisation im Vergleich zur Kontrolltransfektion (EGFP, obere Reihe) zeigen. Die Stressfasern sind ungeordnet und diffus in der Zelle verteilt. Diese Daten untermauern die bisherigen Ergebnisse und zeigen, dass FMRP die p0071-Expression negativ reguliert, dies jedoch nur im phosphorylierten Zustand durch eine Bindung der p0071-mRNA erfolgen kann.

3.2.5. FMRP beeinflusst die Lokalisation der p0071-mRNA

Nachdem die Translationskontrolle der p0071-mRNA durch FMRP charakterisiert wurde, sollte im Folgenden überprüft werden, ob FMRP auch noch andere Funktionen hinsichtlich der p0071-mRNA ausübt.

Es war bekannt, dass FMRP mit gebundenen Zieltranskripten innerhalb der Zelle in Form beweglicher, translationsreprimierter mRNP-Komplexe wandert (KIEBLER und BASSELL, 2006). Am Zielort wird die mRNA dann lokal translatiert (KRICHEVSKY UND KOSIK, 2001). In migrierenden Fibroblasten ist eine FMRP-abhängige p0071-mRNA-Lokalisation bereits beschrieben worden (MILI *et al.*, 2008).

Deshalb wurde untersucht, ob die p0071-mRNA durch FMRP in den embryonalen Fibroblasten gezielt lokalisiert wird. Dafür wurde in den Zellrasen eine Lücke eingeführt, um die Bildung von Filopodien zu induzieren. Nach 6 h wurden die *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Zellen fixiert und eine Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (2.2.3.2) mit p0071-mRNA-spezifischen, fluoreszenzmarkierten Sonden durchgeführt (Abb. 3-25).

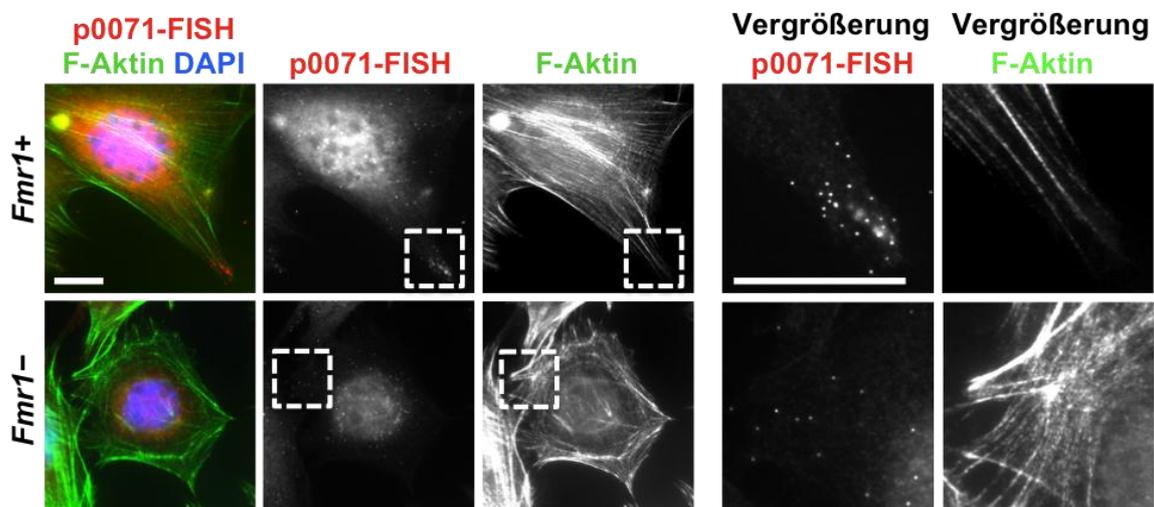


Abb. 3-25: FMRP vermittelt die Lokalisation der p0071-mRNA in die Filopodien von *Fmr1*⁺-Zellen. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung von p0071-mRNA in *Fmr1*⁺ und *Fmr1*⁻-Zellen. In den Zellrasen wurde 24 h nach dem Aussäen mit Hilfe einer Pipettenspitze eine Lücke eingeführt. Nach 6 h Stunden wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert, nach Angaben des Herstellers (Biosearch Technologies, Novato, Kalifornien, USA) weiter prozessiert und mit p0071-mRNA-spezifischen Quasar 570-markierten Sonden (rot) inkubiert. Filamentöses Aktin (grün) wurde mittels Phalloidin-Oregon Green 488 und der Zellkern (blau) mit DAPI markiert. Die Balken entsprechen 20 µm.

In *Fmr1*⁺-Zellen konnte die p0071-mRNA zytoplasmatisch und nukleär nachgewiesen werden (Abb. 3-25, obere Reihe). Äußerst prägnant war das Fluoreszenz-Signal für die p0071-mRNA an den Filopodien der *Fmr1*⁺-Zellen. Zudem konnte wieder der bereits beschriebene „Aktin-Phänotyp“ mit einer hohen Anzahl von parallelen Stressfasern nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3-2 A). Interessanterweise war diese prominente Lokalisation der p0071-mRNA in den *Fmr1*⁻-Zellen nicht mehr nachzuweisen (Abb. 3-25, untere Reihe). Vorwiegend lokalisierte die p0071-mRNA zytoplasmatisch mit nur vereinzelten Signalen in den Randbereichen der Zelle.

Diese Ergebnisse sind ein Hinweis darauf, dass FMRP nicht nur die p0071-mRNA translationell reguliert, sondern auch für deren Transport und Lokalisation verantwortlich ist. Die gemachten Beobachtungen stehen im Einklang mit den zuvor gezeigten Daten. In *Fmr1*⁺-Zellen wird die p0071-mRNA von FMRP gebunden und dadurch deren Translation reprimiert. Währenddessen erfolgt der Transport der p0071-mRNA zum Ort der lokalisierten Translation in die Filopodien (Abb. 3-25, obere Reihe). In *Fmr1*⁻-Zellen, in denen kein FMRP exprimiert wird, erfolgt bei gleicher *steady-state*-p0071-mRNA-Menge keine solche Regulation. Die mRNA kann nicht zum Ort der lokalen Translation transportiert werden und ist nicht in den Randbereichen beziehungsweise den Ausläufern der Zelle zu detektieren (Abb. 3-25, untere Reihe).

3.3. Einfluss von FMRP auf die kleinen Rho-GTPasen

Im vorhergehenden Abschnitt wurden Ergebnisse über die Regulation der p0071-mRNA durch FMRP und deren Einfluss auf das Aktinzytoskelett dargelegt. Daraus geht hervor, dass p0071 ein wichtiger *downstream* Effektor von FMRP ist.

Maßgeblich wird der Umbau des Aktinzytoskeletts durch die kleinen Rho-GTPasen gesteuert (HALL, 2012). In Maus-Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der Rho-GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 zur Reorganisation des Aktinzytoskeletts führt (HALL, 1998).

Die in dieser Dissertation gezeigten phänotypischen Differenzen im Aktinzytoskelett zwischen *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Zellen ließen die Vermutung aufkommen, dass der Aktivierungszustand der kleinen Rho-GTPasen in Abhängigkeit von der FMRP-Expression verändert ist. Da auch die p0071-Expression direkt von FMRP kontrolliert wird, könnte ein Zusammenhang zwischen dem Aktivierungszustand der kleinen Rho-GTPasen und der FMRP-kontrollierten p0071-Expression bestehen. Wolf *et al.* konnten zeigen, dass p0071 die Aktivität der kleinen Rho-GTPase RhoA während der Zytokinese stimuliert (WOLF *et al.*, 2006).

3.3.1. Die FMRP-Expression beeinflusst die Rho-GTPase-Aktivität

Um einen Eindruck davon zu bekommen, in welcher Weise der Aktivitätszustand der kleinen Rho-GTPasen von der FMRP-Expression abhängt, wurden Rho-GTPase-Aktivitätstests vergleichend mit *Fmr1*⁺-Zellen und *Fmr1*⁻-Zellen durchgeführt.

Dafür wurde die RhoA-Bindedomäne vom RhoA-Effektor ROCK (MAEKAWA, *et al.* 1999), sowie die Rac1/Cdc42-Bindedomäne des Rac1/Cdc42-Effektors PAK1/3 (SANDER *et al.*, 1998; BENARD *et al.*, 1999; BENARD und BOKOCH, 2002) bakteriell als GST-Fusionsprotein exprimiert und an Glutathion-Sepharose immobilisiert (ROCK-Sepharose und PAK-Sepharose). Da RhoA, Rac1 und Cdc42 nur im aktiven, GTP-gebundenen Zustand mit ihren Effektoren interagieren, wurde die ROCK-Sepharose eingesetzt, um aktives RhoA (Abb. 3-26 A) zu präzipitieren, wohingegen PAK-Sepharose dazu eingesetzt wurde, um aktives Rac1 und Cdc42 aus Zelllysaten zu isolieren (Abb. 3-26 B).

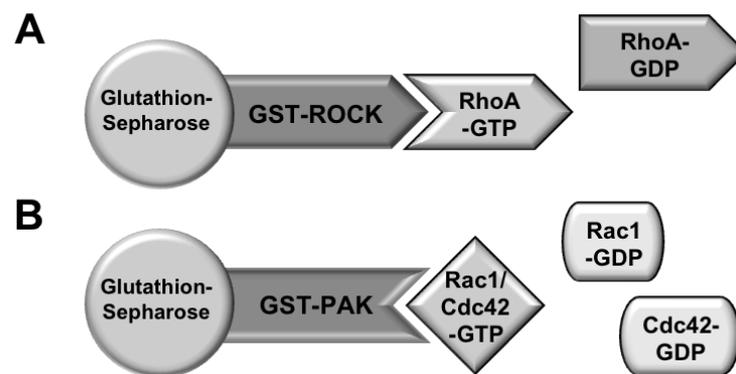


Abb. 3-26: Schematische Darstellung des Rho-GTPase-Aktivitätstests für die Präzipitation von aktivem RhoA, Rac1 und Cdc42 aus Zelllysaten. (A, B) Bakteriell exprimierte GST-Fusionsproteine mit der ROCK-RhoA-Bindedomäne (GST-ROCK) und mit der PAK-CRIB-Bindedomäne (GST-PAK) werden an Glutathion-Sepharose immobilisiert. (A) GST-ROCK präzipitiert ausschließlich aktives, GTP-gebundenes RhoA (RhoA-GTP), wohingegen (B) GST-PAK sowohl aktives Rac1 als auch aktives Cdc42 (Rac1/Cdc42-GTP) aus dem Zelllysate präzipitiert.

Um zunächst das Testsystem zu validieren, wurden Neuro-2a-Zellen mit Plasmiden transfiziert, die für EGFP-RhoA-DA (dominant aktiv) bzw. -DN (dominant negativ) und EGFP-Rac1-DA bzw. -DN codieren und die Lysate mit ROCK-Sepharose und PAK3-Sepharose inkubiert (Abb. 3-26 A, B und Abb. 3-27 A, B). Die Eluate wurden mittels SDS-PAGE und anschließend Western Blot auf die Anwesenheit von RhoA-EGFP und Rac1-EGFP untersucht (Abb. 3-27 A, B). Als dominant aktiv werden die Mutanten bezeichnet, die nicht in der Lage sind, GTP zu hydrolysieren und damit dauerhaft aktiviert sind. Im Gegensatz dazu können die dominant negativen Mutanten ihr spezifisches GEF binden und inhibieren *downstream*-Interaktionen mit Effektorproteinen. Somit titriert die dominant negative Rho-GTPase-Mutante jenes GEF aus, welches die entsprechende Rho-GTPase binden könnte (HEASMAN und RIDLEY, 2008).

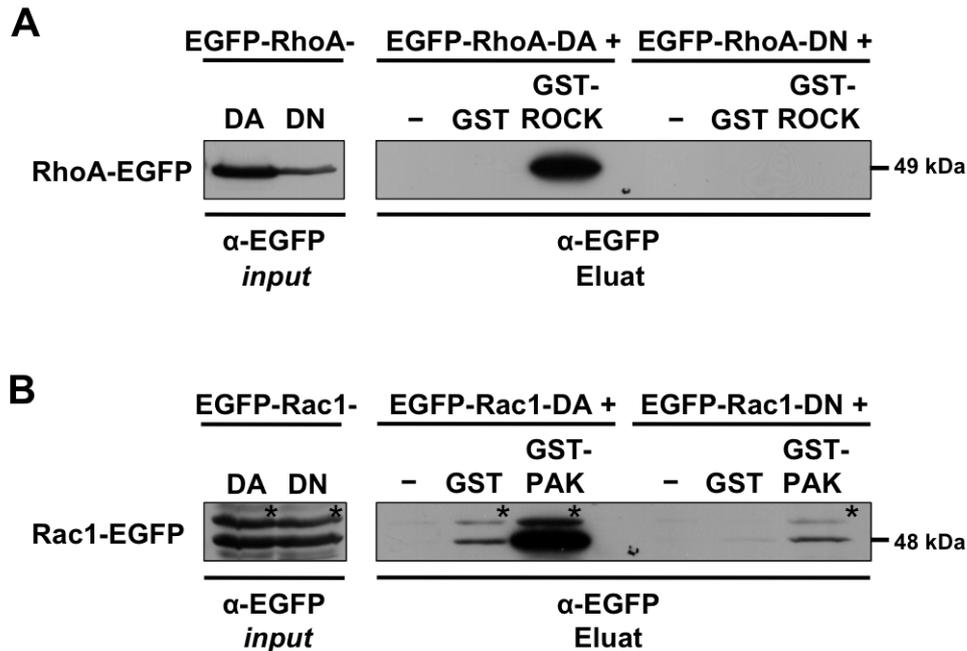


Abb. 3-27: Mit dem *in-vitro*-Testsystem werden ausschließlich dominant aktive Rho-GTPase-Mutanten präzipitiert. (A, B) Rho-GTPase-Aktivitätstests zur Validierung des *in-vitro*-Testsystems. Dazu wurden GST und GST-ROCK bzw. GST-PAK bakteriell exprimiert und an Glutathion-Sepharose immobilisiert. Diese wurde mit Zellysaten von Neuro-2a-Zellen, die zuvor mit EGFP-RhoA-DA/-DN bzw. EGFP-Rac1-DA/-DN sowie mit einem EGFP-Leervektor transfiziert wurden, für 1 h bei 4°C inkubiert. Nach intensivem Waschen wurden die Eluate mittels SDS-PAGE und Western Blot auf die Präzipitation von (A) dominant aktivem RhoA und (B) dominant aktivem Rac1 hin analysiert. Sterne kennzeichnen eine unspezifische Antikörper-Reaktion.

Mit den in Abb. 3-27 gezeigten Aktivitätstests konnte bestätigt werden, dass EGFP-RhoA-DA am besten von der ROCK-Sepharose präzipitiert wurde. Hingegen war EGFP-RhoA-DN nicht im Eluat nachzuweisen. Obwohl eine geringere Menge an EGFP-RhoA-DN (ca. 50% von EGFP-RhoA-DA) eingesetzt wurde (Abb. 3-27 A), kann aus den Daten geschlossen werden, dass inaktives RhoA (EGFP-RhoA-DN) nicht oder nur in geringem Maße an die ROCK-Sepharose bindet und dass aktives RhoA (EGFP-RhoA-DA) an die ROCK-Sepharose gebunden haben muss. Ein eindeutiges Ergebnis wurde auch für Rac1 nach Präzipitation mit der PAK-Sepharose erhalten, denn im Eluat konnte Rac1-EGFP prominent in den EGFP-Rac1-DA exprimierenden und nur sehr schwach in den EGFP-Rac1-DN exprimierenden Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3-27 B).

Diese Vorexperimente zeigten, dass sowohl die ROCK-Sepharose als auch die PAK-Sepharose spezifisch die aktiven, GTP-gebundenen Rho-GTPasen präzipitierten. Mit dem vorliegenden, funktionellen Testsystem konnte nun der Aktivitätszustand der kleinen Rho-GTPasen vergleichend in *Fmr1*⁺-Zellen und *Fmr1*⁻-Zellen bestimmt werden. Dazu

wurden Zelllysate von *Fmr1*⁺-Zellen und *Fmr1*⁻-Zellen mit ROCK- und PAK-Sepharose inkubiert und das Eluat mit Hilfe von SDS-PAGE und Western Blot auf das Vorhandensein von RhoA, Rac1 und Cdc42 hin untersucht (Abb. 3-28 A). Zudem wurden die Proteinmengen quantifiziert (Abb. 3-28 B).

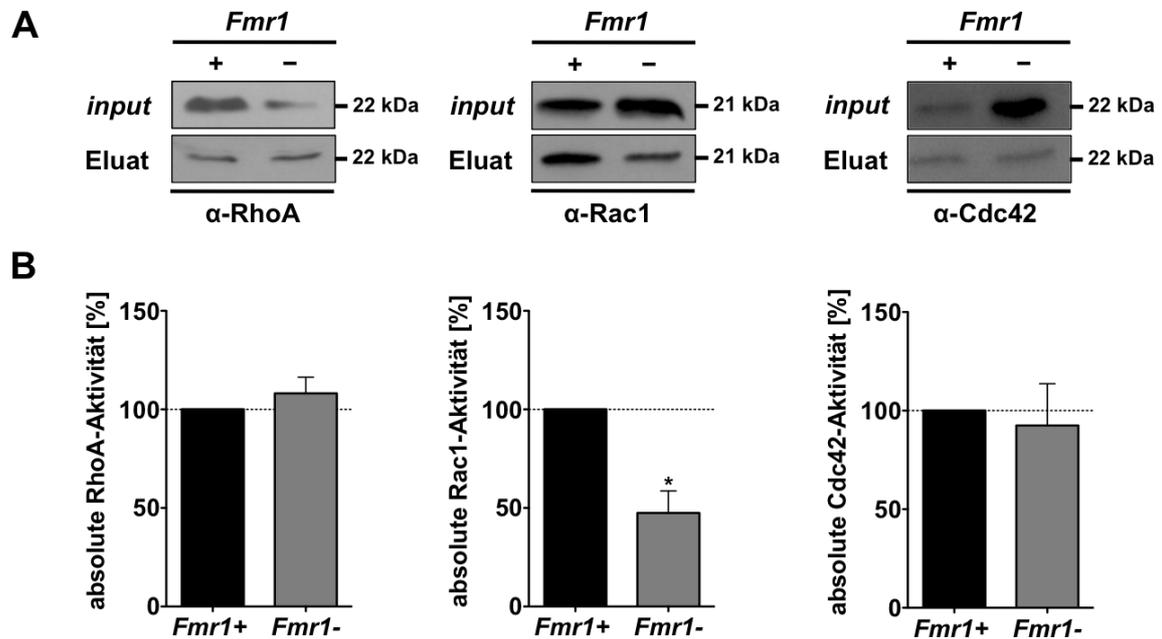


Abb. 3-28: Die Aktivität der kleinen Rho-GTPasen differiert zwischen *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Zellen stark. (A, B) Western Blot-Analyse von Rho-GTPase-Aktivitätstests für endogenes RhoA, Rac1 und Cdc42 in *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Zellen. Bakteriell exprimierte GST-Fusionsproteine (GST-ROCK und GST-PAK) wurden an Glutathion-Sepharose immobilisiert und diese mit *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Zelllysaten für 1 h bei 4°C inkubiert. Nach intensivem Waschen wurde ein Teil des *inputs* und das Eluat mittels (A) SDS-PAGE und Western Blot auf das Vorhandensein von RhoA, Rac1 und Cdc42 untersucht und (B) die Aktivität der Rho-GTPasen quantifiziert. n = 3 ; *, p ≤ 0.05.

Wie aus Abb. 3-28 ersichtlich, war nur die absolute (spezifische) Aktivität von Rac1 in *Fmr1*⁻-Zellen deutlich (um etwa 50%) reduziert (Abb. 3-28 A, B). Die Mengen an aktivem RhoA und Cdc42 hingegen waren in den *Fmr1*⁻-Zellen weitgehend unverändert (Abb. 3-28 B).

Da für die Regulation des Aktinzytoskeletts ein fein ausbalanciertes Aktivitätsgleichgewicht zwischen den kleinen Rho-GTPasen notwendig ist (HALL, 1998), deuten die dargestellten Ergebnisse darauf hin, dass die gemessenen (globalen) Aktivitäten eher im Gegensatz zu den phänotypischen Veränderungen in *Fmr1*⁻-Zellen stehen. In *Fmr1*⁻-Zellen konnte eine reduzierte Anzahl an Stressfasern und eine erhöhte Menge an Filopodien (vgl. Abb. 3-2 B) nachgewiesen werden, was durch reduzierte RhoA- und die im direkten Vergleich dazu höhere Cdc42- und Rac1-Aktivität erklärt werden könnte.

3.3.2. Die Expression von Rho-GTPase-Mutanten verändert die Phänotypen von *Fmr1*^{+/+}- und *Fmr1*^{-/-}-Zellen

Um zu überprüfen, wie der Aktivitätszustand der kleinen Rho-GTPasen den Phänotyp der *Fmr1*^{+/+}- und *Fmr1*^{-/-}-Zellen beeinflusst, wurden diese entweder mit EGFP-Wildtyp-RhoA bzw. -Rac1 oder dominant aktiven bzw. dominant negativen EGFP-RhoA- und Rac1-Mutanten transfiziert (Abb. 3-29 und Abb. 3-30).

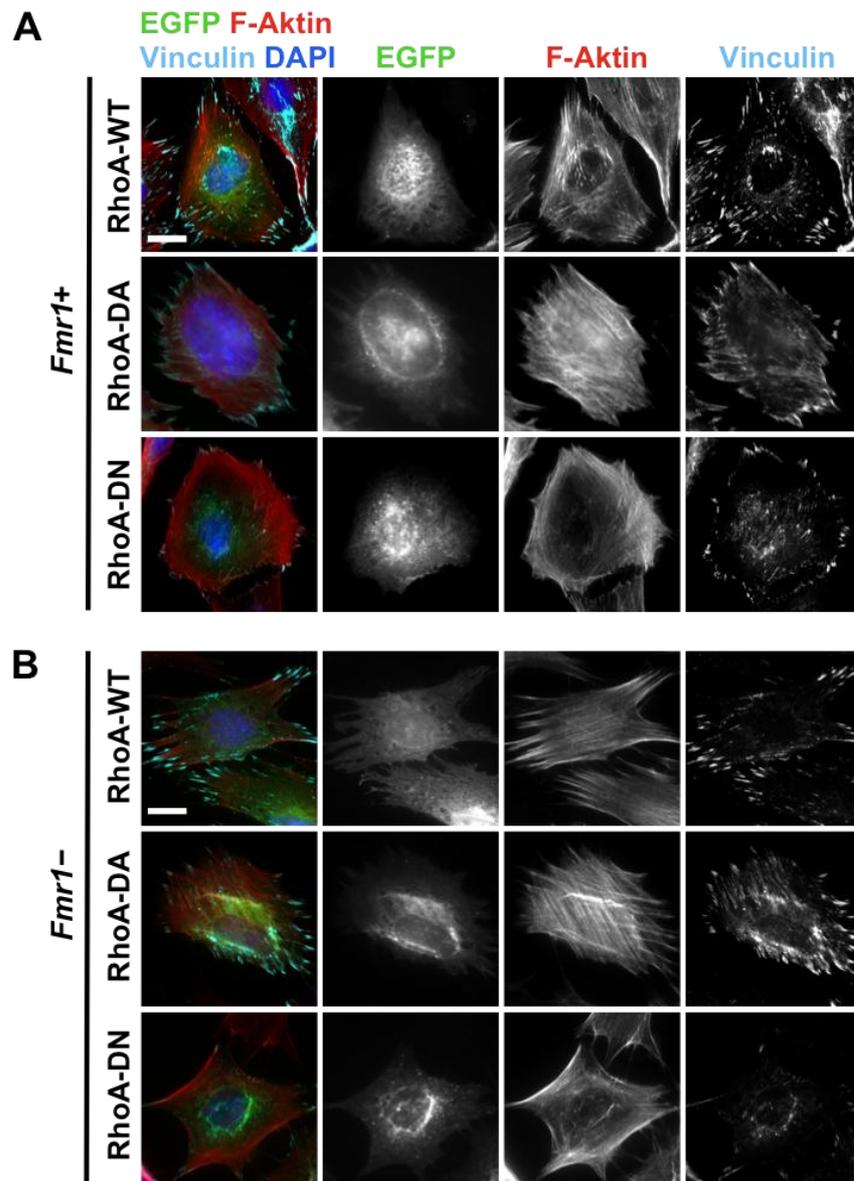


Abb. 3-29: Die Überexpression von RhoA-Mutanten hat starken Einfluss auf die Phänotypen von *Fmr1*^{+/+}- und *Fmr1*^{-/-}-Zellen. (A, B) Immunfluoreszenz-Analysen von transfizierten *Fmr1*^{+/+}- und *Fmr1*^{-/-}-Zellen. 24 h nach dem Einsäen wurden (A) *Fmr1*^{+/+}- und (B) *Fmr1*^{-/-}-Zellen mit EGFP-RhoA-WT/-DA/-DN transfiziert, nach 24 h fixiert und permeabilisiert. Die exprimierten Mutanten (grün) sowie Vinculin (türkis) wurden mit spezifischen Antikörpern angefärbt. F-Aktin (rot) sowie die DNA (blau) wurden mit Phalloidin-AlexaFluor 594 bzw. DAPI markiert. Die Balken entsprechen 20 µm.

Wie in Abb. 3-29 zu sehen, konnten in den Immunfluoreszenzen nach Transfektion des RhoA-Wildtyps in *Fmr1*⁺-Zellen und *Fmr1*⁻-Zellen phänotypische Unterschiede beobachtet werden (Abb. 3-29 A, B). Die *Fmr1*⁻-Zellen zeigten nach RhoA-Wildtyp-Transfektion einen Phänotyp, der denen von FMRP-exprimierenden Zellen stark ähnelte, mit einer hohen Dichte an parallelen Stressfasern und einer langgestreckten Zellform sowie gleichmäßig verteilten Fokalkontakten (Abb. 3-29 B, obere Reihe). Dabei verstärkte die Expression der dominant aktiven RhoA-Mutante diesen Phänotyp noch weiter (Abb. 3-29 B, mittlere Reihe). Die Anzahl der Stressfasern stieg deutlich im Vergleich zu untransfizierten Zellen (Abb. 3-2 B) sowie der Wildtyp-Form von RhoA (Abb. 3-29 B, obere Reihe). Hingegen induzierte die Transfektion mit der dominant-negativen RhoA-Mutante eine Verstärkung des „normalen“ Phänotyps in den *Fmr1*⁻-Zellen. Die Zellen besaßen kaum noch Stressfasern und wenige Fokalkontakte (Abb. 3-29 B, untere Reihe).

Diese Beobachtungen erlauben den Schluss, dass die lokale RhoA-Aktivität in den *Fmr1*⁻-Zellen geringer ist als in den *Fmr1*⁺-Zellen und stehen damit in Kontrast zu den Resultaten des Rho-GTPase-Aktivitätstests für RhoA (vgl. Abb. 3-28 A, B, links). Besonders deutlich wird dies durch den Effekt der dominant negativen RhoA-Mutante in den *Fmr1*⁺-Zellen (Abb. 3-29 A, untere Reihe). Denn hier konnte der *Fmr1*⁻-Phänotyp induziert werden. Die Verringerung der RhoA-Aktivität durch die Transfektion der Mutante ist also mit dem *steady-state*-Zustand in den *Fmr1*⁻-Zellen gleichzusetzen. Der Einfluss von p0071 in diesen Experimenten ist jedoch nicht direkt nachzuweisen. Es wäre möglich, dass die erhöhte Stressfaserdichte nach Transfektion von RhoA-Wildtyp in den *Fmr1*⁻-Zellen durch eine verstärkte lokale Aktivierung des exogenen RhoA durch die erhöhte p0071-Proteinmenge (vgl. Abb. 3-7 B) induziert wurde. Die Effekte von p0071 auf die dominant aktive bzw. dominant negative RhoA-Mutante erscheinen eher marginal, da GTP-Hydrolyse bzw. GEF-Bindung unter diesen Bedingungen unabhängig von p0071 erfolgen.

Für die Expression von Rac1-Wildtyp sowie der dominant aktiven bzw. dominant negativen Mutante konnten ähnliche Unterschiede zwischen *Fmr1*⁺-Zellen und *Fmr1*⁻-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3-30 A, B). Nach der Transfektion von Rac1-Wildtyp in *Fmr1*⁺-Zellen wurde eine Reduktion der Stressfaseranzahl, eine Änderung der Zellform und eine verstärkte periphere Lokalisation der Fokalkontakte beobachtet (Abb. 3-30 A, obere Reihe). In *Fmr1*⁻-Zellen führte die Überexpression von Rac1-Wildtyp hingegen zur Bildung von Lamellopodien (Abb. 3-30 B, obere Reihe).

Eine noch drastischere Änderung des Phänotyps konnte nach Expression der dominant aktiven Rac1-Mutante gefunden werden. Sowohl in *Fmr1*⁺-Zellen als auch in *Fmr1*⁻-Zellen war ein breiter Lamellopodien-Saum zu beobachten (Abb. 3-30 A, B, jeweils mittlere Reihe).

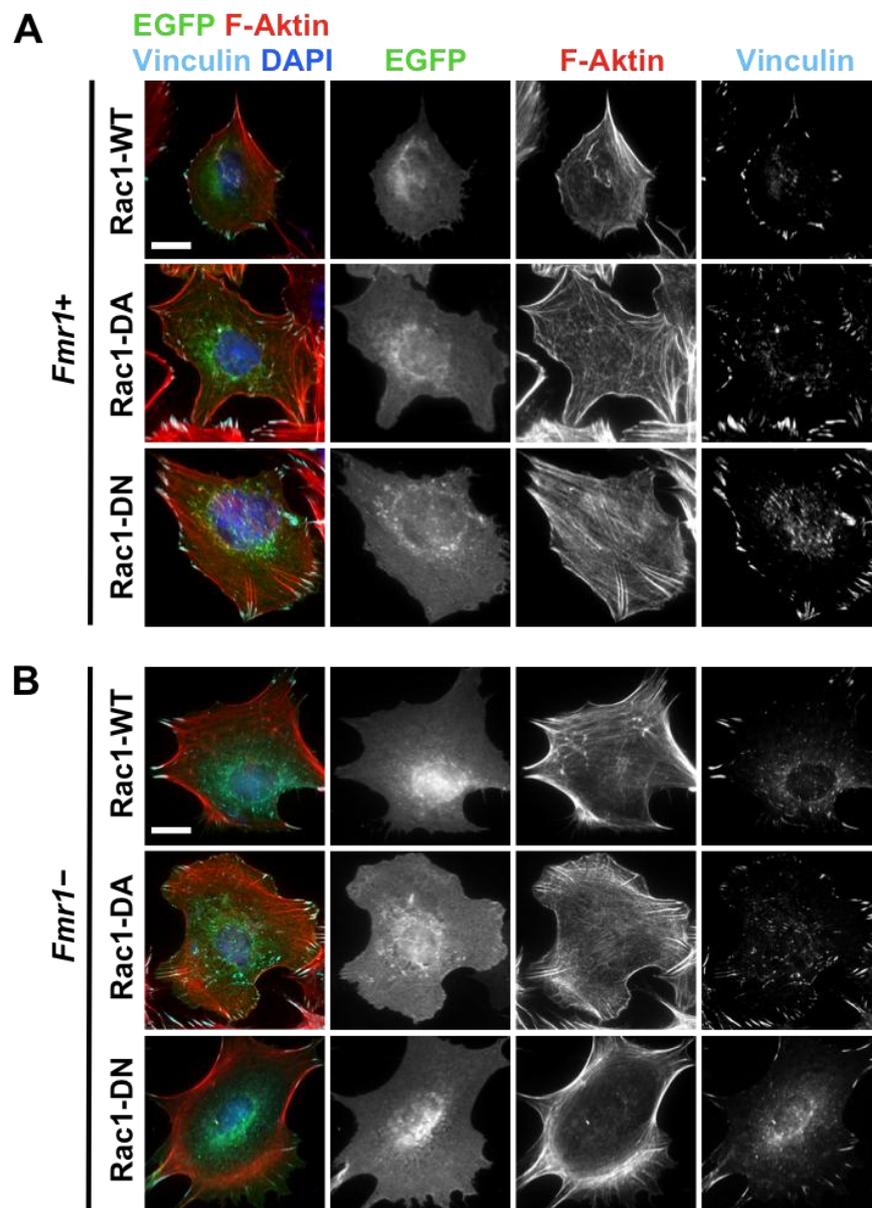


Abb. 3-30: Die Überexpression von Rac1-Mutanten hat starken Einfluss auf die Phänotypen von *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Zellen. (A, B) Immunfluoreszenz-Analysen von mit Rac1-Mutanten transfizierten *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Zellen. 24 h nach dem Einsäen wurden (A) *Fmr1*⁺-Zellen und (B) *Fmr1*⁻-Zellen mit EGFP-Rac1-WT/-DA/-DN transfiziert und 24 h danach mit Formaldehyd fixiert. Nach Permeabilisierung wurden die exprimierten Mutanten (grün) sowie Vinculin (türkis) mit spezifischen Antikörpern angefärbt. Filamentöses Aktin (rot) sowie die DNA (blau) wurden mit Phalloidin-AlexaFluor 594 bzw. DAPI markiert. Die Balken entsprechen 20 µm.

Wie aus Abb. 3-30 ersichtlich, hatte die Überexpression der dominant negativen Rac1-Mutante einen relativ schwachen Einfluss auf die Phänotypen beider Zelllinien (Abb.

3-30 A, B, untere Reihen). In *Fmr1*-Zellen war die Zellform dahingehend verändert, dass es eine höhere Anzahl von Filopodien gab (Abb. 3-30 B, untere Reihe).

Aus diesen Beobachtungen lässt sich auch indirekt auf die Aktivität der Rho-GTPase Rac1 schließen. Im Gegensatz zu den bereits gezeigten Rho-GTPase-Aktivitätstests (vgl. Abb. 3-28) scheint diese in *Fmr1*-Zellen erhöht zu sein.

Um den physiologischen Aspekt dieser Regulation näher zu charakterisieren, sollten die Untersuchungen auf das neuronale System ausgeweitet werden.

3.4. Die Einflüsse von FMRP und p0071 auf das Neuritenwachstum

Der Phänotyp des Fragilen-X-Syndroms ist in neuronalen Zellen sehr charakteristisch. Eine veränderte Morphologie der dendritischen Dornen konnte *post mortem* in Gehirnen von Patienten mit Fragilem-X-Syndrom sowie in *Fmr1*-KO-Mäusen beobachtet werden. Der Verlust von FMRP induziert eine verstärkte Bildung von langen dendritischen Dornen. (HINTON *et al.*, 1991; IRWIN *et al.*, 2001; COMERY *et al.*, 1997; NIMCHINSKY *et al.*, 2001). Kultivierte Neuronen von *Fmr1*-KO-Mäusen wiesen zudem eine erhöhte Anzahl an Synapsen auf. Einhergehend damit liegt die Beobachtung, dass der FMRP-Verlust die synaptische Plastizität beeinflusst (HUBER *et al.*, 2002).

3.4.1. Die Neuroblastoma-Zelllinie Neuro-2a als Modellsystem

Um die oben genannten Aspekte im neuronalen System zu untersuchen, wurden Neuro-2a-Zellen als Modellsystem verwendet. Dabei handelt es sich um Neuroblastoma-Zellen murinen Ursprungs. Diese immortalisierten Nervenzellen befinden sich in einem noch unreifen Stadium, da sie aus einem Tumor der embryonalen Neuralleiste stammen (KLEBE und RUDDLE, 1969), können aber durch Zugabe von Retinsäure zur Ausbildung von Neuriten stimuliert werden.

3.4.2. Die p0071-mRNA lokalisiert in den Wachstumskegeln von Neuriten

Um herauszufinden, ob p0071 eine Rolle bei der neuronalen Differenzierung spielt, wurde analysiert, wo die p0071-mRNA in neuronalen Zellen lokalisiert. Dafür wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt.

Zum einen kam das MS2BP-GFP-System zum Einsatz. Dabei handelt es sich um eine Methode, welche es erlaubt, die Lokalisation von RNA-Molekülen zu untersuchen. Das System basiert auf zwei Komponenten: einer Fusion aus dem MS2-Hüllprotein mit einem fluoreszierenden Protein sowie einer Reporter-mRNA, welche Multimere der RNA *stem-loops* enthält, die vom MS2-Hüllprotein erkannt werden. Das an die *stem-loops* gebundene MS2BP-GFP (MS2-Bindeprotein-GFP) dient somit als Signal, um die Lokalisation der RNA auf zellulärer Ebene mittels Fluoreszenz-Mikroskopie zu detektieren (BERTRAND *et al.*, 1998).

In diesem Fall wurde eine Reporter-mRNA, welche die codierende Sequenz der *firefly*-Luciferase sowie 6x MS2-*stem-loops* und das p0071-3'UTR enthielt, und eine Kontroll-Reporter-mRNA ohne p0071-3'UTR (Abb. 3-31 A) zusammen mit dem MS2BP-GFP in undifferenzierten Neuro-2a-Zellen co-exprimiert und diese für 48 h differenziert. Mittels Immunfluoreszenz wurde nachfolgend die Lokalisation der Reporter-mRNA analysiert (Abb. 3-31).

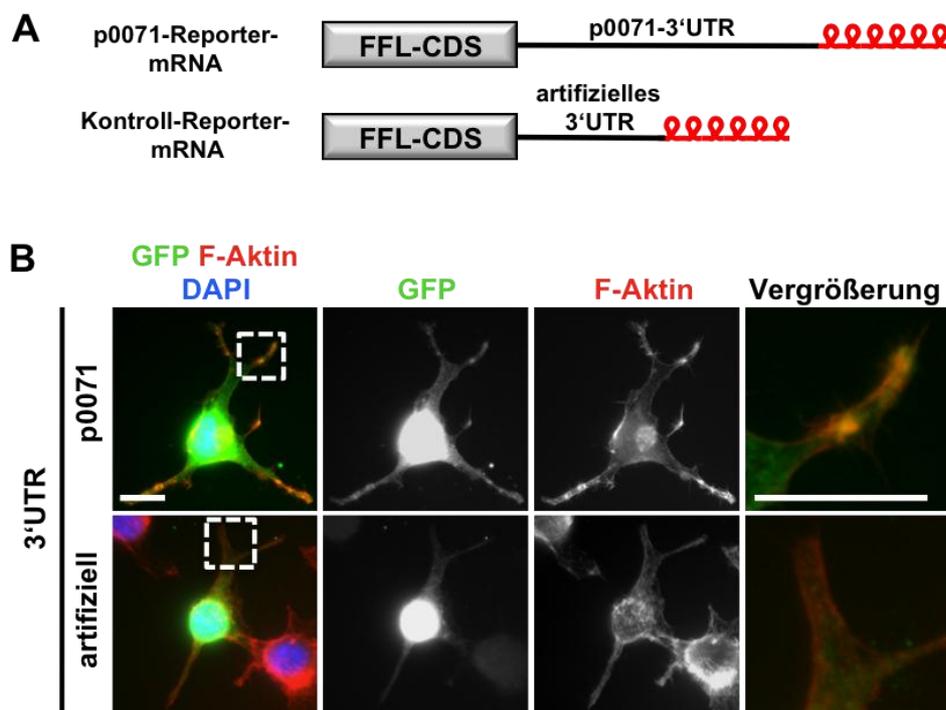


Abb. 3-31: Die p0071-mRNA lokalisiert in den Wachstumskegeln und an Verzweigungspunkten von Neuriten in Neuro-2a-Zellen. (A, B) Analyse zur p0071-mRNA-Lokalisation in differenzierten Neuro-2a-Zellen. (A) Schematische Darstellung der verwendeten Reporter-Konstrukte. Die p0071-Reporter-mRNA enthält die codierende Sequenz der *firefly*-Luciferase gefolgt vom p0071-3'UTR. Die Kontroll-Reporter-mRNA codiert nur für die *firefly*-Luciferase und enthält das artifizielle 3'UTR des pcDNA3.1-Vektors, bestehend aus der verbliebenen *multiple cloning site*. Beide Reporter besitzen sechs MS2-*stem-loops* (rot) zur Visualisierung mittels GFP-NLS-MS2BP und sind polyadenyliert. (B) Immunfluoreszenz-Studien

von Neuro-2a-Zellen zur Analyse der p0071-mRNA-Lokalisation. 24 h nach dem Einsäen wurden die Zellen mit den angegebenen Reporter-mRNAs sowie GFP-NLS-MS2BP co-transfiziert und anschließend für 48 h differenziert. Danach wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert und filamentöses Aktin (rot) mit Phalloidin-AlexaFluor 594 sowie die DNA (blau) mittels DAPI markiert. Die Balken entsprechen 20 μm .

Diese Daten liefern Hinweise, dass die p0071-mRNA in den Wachstumskegeln der Neuriten lokalisiert. Auffällig war das starke nukleäre Fluoreszenz-Signal für das MS2BP-GFP in beiden Versuchsansätzen. Dabei handelt es sich aber nicht um ein spezifisches Signal, welches durch die Bindung an MS2-*stem-loops* verursacht wird. Vielmehr wird die Lokalisation von MS2BP-GFP im Nukleus durch ein sich in der codierenden Sequenz befindliches nukleäres Lokalisationssignal (NLS) gefördert. Dies verhindert die starke Akkumulation des Proteins im Zytoplasma und ermöglicht somit die Detektion spezifischer RNA-Signale.

Um die Daten für das MS2BP-GFP-Signal zu validieren, wurde eine Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung der p0071-mRNA mit Fluorophor-markierten Oligonukleotiden durchgeführt (siehe 2.2.3.2 und Abb. 3-25). Die Neuro-2a-Zellen wurden 48 h nach Zugabe des Differenzierungsmediums fixiert und mit den FISH-Sonden inkubiert (Abb. 3-32).

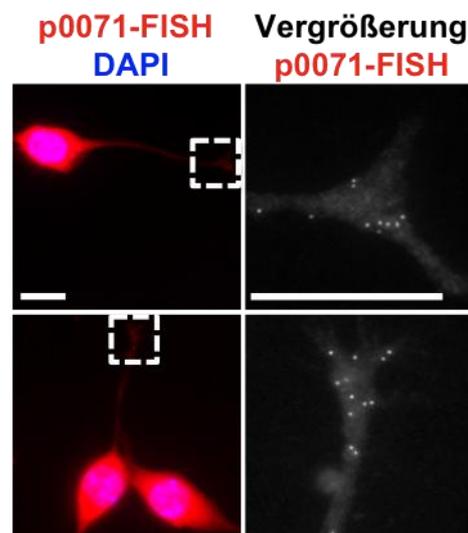


Abb. 3-32: Die p0071-mRNA lokalisiert in differenzierten Neuronen an den Wachstumskegeln und Verzweigungspunkten der Neuriten. Immunfluoreszenz-Studien nach Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung zur p0071-mRNA-Lokalisation in differenzierten Neuro-2a-Zellen. 24 h Stunden nach dem Aussäen wurden Neuro-2a-Zellen für 48 h differenziert. Nach Fixierung mit Formaldehyd wurden die Zellen nach Angaben des Herstellers (Biosearch Technologies, Novato, Kalifornien, USA) weiter prozessiert und mit p0071-mRNA-spezifischen, Quasar 570-markierten Sonden (rot) inkubiert. Der Zellkern (blau) wurde mit DAPI markiert. Die Balken entsprechen 20 μm .

Es ist auch in diesem Ansatz deutlich zu erkennen, dass die p0071-mRNA an den Wachstumskegeln der differenzierten neuronalen Zellen lokalisiert (Abb. 3-32, vgl. mit Abb. 3-31). Aber auch entlang der Neuriten und im Soma der Zellen konnten spezifische FISH-Signale für die p0071-mRNA detektiert werden. Dies bestätigt die Daten, welche mit dem MS2BP-GFP-System erhalten wurden.

3.4.3. Die p0071-mRNA-Lokalisation ist von KIF3C abhängig

Die spezifische Lokalisation der p0071-mRNA in den Wachstumskegeln der Neuriten ist ein Indiz dafür, dass p0071 auch in neuronalen Zellen zusammen mit FMRP die Organisation des Aktinzytoskeletts beeinflussen könnte. Es ist bereits beschrieben, dass FMRP in den Wachstumskegeln von Neuriten lokalisiert (BASSELL und WARREN, 2008; PFEIFFER und HUBER, 2009). In diesen Bereichen konnte auch die p0071-mRNA nachgewiesen werden (siehe 3.4.2). Dies impliziert, dass möglicherweise FMRP auch in neuronalen Zellen die p0071-mRNA bindet und gleichzeitig deren Lokalisation beeinflusst. Davidovic *et al.* konnten zeigen, dass FMRP, zusammen mit seinen gebundenen Zieltranskripten, in Neuriten entlang der Mikrotubuli mit Hilfe des Motorproteins KIF3C zu den Wachstumskegeln, also den Orten der gesteigerten Translation, transportiert wird (DAVIDOVIC *et al.*, 2007).

Aus diesem Grund war es naheliegend zu überprüfen, ob die p0071-mRNA auch KIF3C-abhängig zu den Wachstumskegeln der Neuriten transportiert wird. Dafür wurde die KIF3C-Expression in undifferenzierten Neuro-2a-Zellen mittels spezifischer siRNAs vermindert und die Zellen 24 h nach diesem *knockdown* für 48 h differenziert und eine Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung mit p0071-spezifischen Sonden durchgeführt (Abb. 3-33).

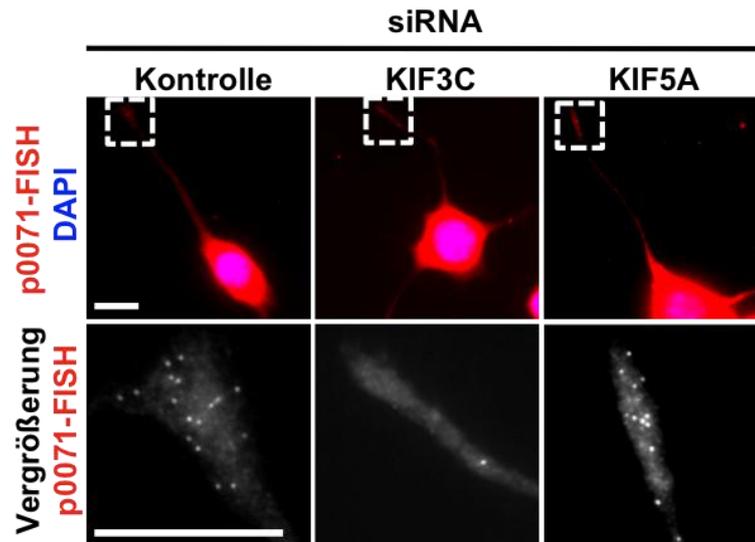


Abb. 3-33: Die p0071-mRNA lokalisiert in Abhängigkeit von KIF3C in den Wachstumskegeln von neuronalen Zellen. Immunfluoreszenz-Studien nach Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung zur p0071-mRNA-Lokalisation in differenzierten Neuro-2a-Zellen. 24 h nach dem Aussäen wurden Neuro-2a-Zellen mit den angegebenen siRNAs transfiziert und anschließend für 48 h differenziert. Nach Fixierung mit Formaldehyd wurden die Zellen nach Angaben des Herstellers (Biosearch Technologies, Novato, Kalifornien, USA) weiter prozessiert und mit p0071-mRNA-spezifischen, Quasar 570-markierten Sonden (rot) inkubiert. Der Zellkern (blau) wurde mit DAPI markiert. Die Balken entsprechen 20 µm.

Nach dem *knockdown* von KIF3C konnte kaum noch p0071-mRNA in den Wachstumskegeln bzw. in den Neuriten der differenzierten Neuro-2a-Zellen gefunden werden (Abb. 3-33, Mitte). Im Gegensatz dazu lokalisierte die p0071-mRNA in Kontroll-siRNA-behandelten Zellen normal in den zuvor beschriebenen Regionen (Abb. 3-33, links). Als weitere Kontrolle wurde die p0071-mRNA-Lokalisation nach KIF5A-*knockdown* analysiert. KIF5A interagiert zwar mit FMRP (KANAI *et al.*, 2004), ist jedoch nicht direkt am Transport von FMRP-haltigen Partikeln beteiligt. Nach KIF5A-*knockdown* war die p0071-mRNA noch ebenso stark wie nach Kontroll-*knockdown* in den Wachstumskegeln vorhanden (Abb. 3-33, rechts). Die prominenten Signale im Soma hingegen, waren in allen Fällen nachzuweisen und unabhängig von KIF3C- bzw. KIF5A-*knockdowns*. Diese Daten lassen es als sehr wahrscheinlich erachten, dass die p0071-mRNA über das Motorprotein KIF3C zu den Wachstumskegeln der Neuro-2a-Zellen transportiert wird.

3.4.4. p0071 lokalisiert im Soma und in den Wachstumskegeln von Neuro-2a-Zellen

Nachdem die p0071-mRNA in den Wachstumskegeln der Neuriten nachgewiesen werden konnte, war die Untersuchung der p0071-Protein-Lokalisation in diesen Bereichen der nächste logisch erscheinende Schritt. Die Wachstumskegel sind Orte gesteigerter Translation mit erhöhtem Protein-Umsatz. Somit schien es plausibel, dass in diesen Regionen die FMRP-vermittelte Translationsrepression der p0071-mRNA aufgehoben wird, eine verstärkte Menge an p0071 exprimiert wird und damit auch an diesen Stellen nachzuweisen ist. Dazu wurden in differenzierten Neuro-2a-Zellen Immunfluoreszenz-Studien mit einem p0071-spezifischen Antikörper durchgeführt (Abb. 3-34).

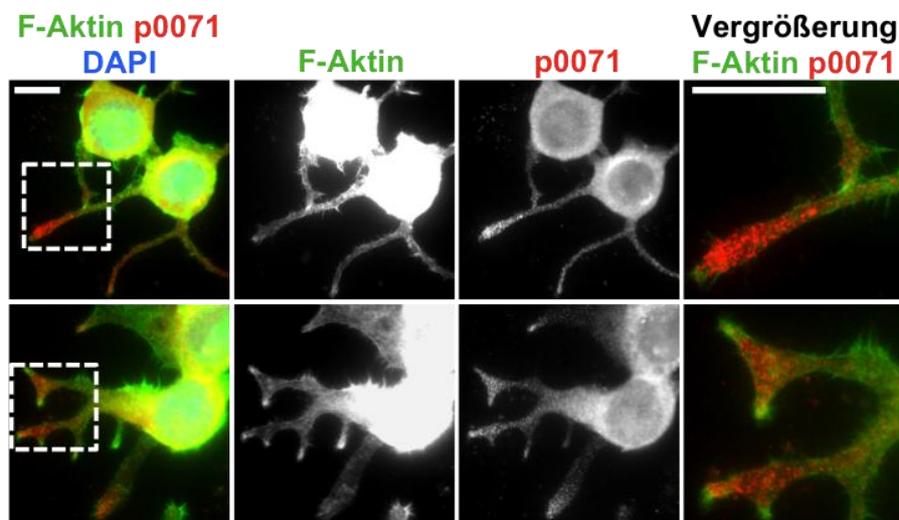


Abb. 3-34: Das p0071-Protein lokalisiert vorwiegend in Wachstumskegeln und in Bereichen hoher F-Aktin-Dichte der Neuriten in neuronalen Zellen.

Immunfluoreszenz-Studien zur p0071-Protein-Lokalisation in differenzierten Neuro-2a-Zellen. 24 h nach dem Aussäen wurden Neuro-2a-Zellen für 48 h differenziert. Nach Fixierung mit Formaldehyd wurden die Zellen mit einem spezifischen Antikörper gegen p0071 inkubiert. Filamentöses Aktin (grün) wurde mit Phalloidin-Oregon Green 488 und der Zellkern (blau) mit DAPI markiert. Die Balken entsprechen 20 µm.

Mittels Immunfluoreszenz konnte eindeutig gezeigt werden, dass p0071 verstärkt an den Wachstumskegeln und den Verzweigungsstellen der Neuriten lokalisiert. Des Weiteren ist auffällig, dass dies gleichzeitig Orte erhöhter Konzentration von filamentösem Aktin sind. Überraschender Weise konnte p0071 auch sehr prominent im Zellkörper der differenzierten neuronalen Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3-34).

Zusammen mit den vorhergehenden Daten lag die Vermutung nahe, dass FMRP die Differenzierung von neuronalen Zellen durch eine Regulation der p0071-Expression an den Wachstumskegeln steuert.

3.4.5. p0071 und FMRP modulieren das Neuritenwachstum in Neuro-2a-Zellen

FMRP kontrolliert die Aktin-Organisation und die Zellmorphologie in embryonalen Mausfibroblasten durch p0071. Zudem lokalisierte p0071 in den Wachstumskegeln des neuronalen Modellsystems. Aus diesem Grund konnte man spekulieren, dass FMRP und p0071 das Neuritenwachstum in antagonistischer Weise kontrollieren.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die morphologischen Effekte von FMRP-Überexpression und *knockdown* mit denen von p0071-Überexpression und *knockdown* verglichen (Abb. 3-35). Dazu wurden Neuro-2a-Zellen entweder mit FMRP- oder p0071-EGFP Expressionsplasmiden sowie mit FMRP- und p0071-siRNAs transfiziert, für 48 h differenziert und Immunfluoreszenz-Studien durchgeführt.

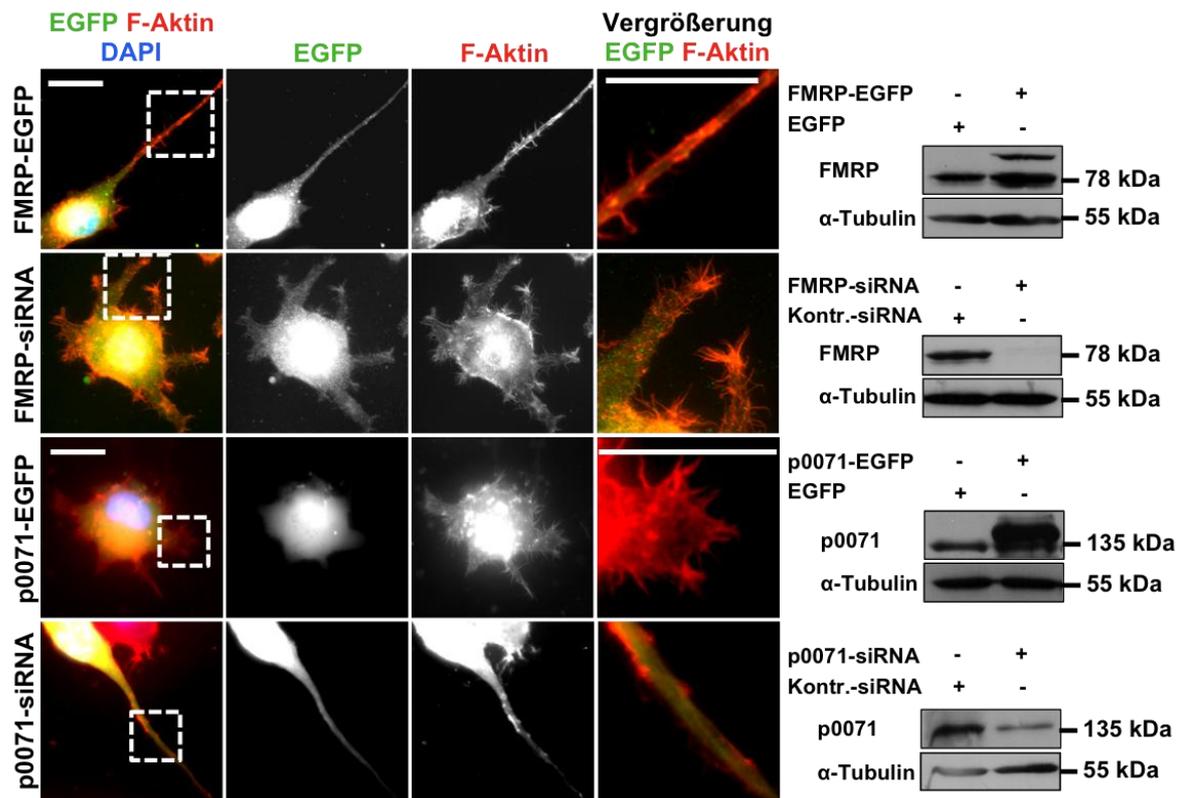


Abb. 3-35: p0071 und FMRP regulieren das Neuritenwachstum in Neuro-2a-Zellen in antagonistsicher Weise. Immunfluoreszenz-Studien und Western Blots zur Analyse des Einflusses der FMRP- und p0071-Expression auf den neuronalen Phänotyp. 24 h nach dem Aussäen wurden Neuro-2a-Zellen mit den angegebenen Konstrukten und siRNAs transfiziert und anschließend für 48 h differenziert. Nach Fixierung mit Formaldehyd und Permeabilisierung wurden die Zellen mit einem spezifischen Antikörper gegen EGFP (grün) inkubiert. Filamentöses Aktin (rot) wurde mit Phalloidin-AlexaFluor 594 und der Zellkern (blau) mit DAPI markiert. Die Balken entsprechen 20 μ m.

Wie in Abb. 3-35 zu sehen, verursachte die Überexpression von FMRP die Bildung von langen und unverzweigten Neuriten, wohingegen der umgekehrte Phänotyp beim *knockdown* von FMRP beobachtet wurde (Abb. 3-35, beide oberen Reihen). Im Gegensatz dazu war die Neuritenlänge bei p0071-Überexpression reduziert und die Neuriten stärker verzweigt. Darüber hinaus wurde erneut der gegensätzliche Phänotyp beim p0071-*knockdown* induziert (Abb. 3-35, beide unteren Reihen). Zusätzlich führten der FMRP-*knockdown* und die p0071-Überexpression zu einer stark veränderten Morphologie des Aktinzytoskeletts. Es traten kleine, nadelförmige F-Aktin-Strukturen an der Spitze der kurzen, Neuriten-ähnlichen Verlängerungen auf. Die Quantifizierung der induzierten Phänotypen hinsichtlich der Neuritenlänge und der Anzahl der Neuritenverzweigungen bestätigte diese Beobachtungen (Abb. 3-36).

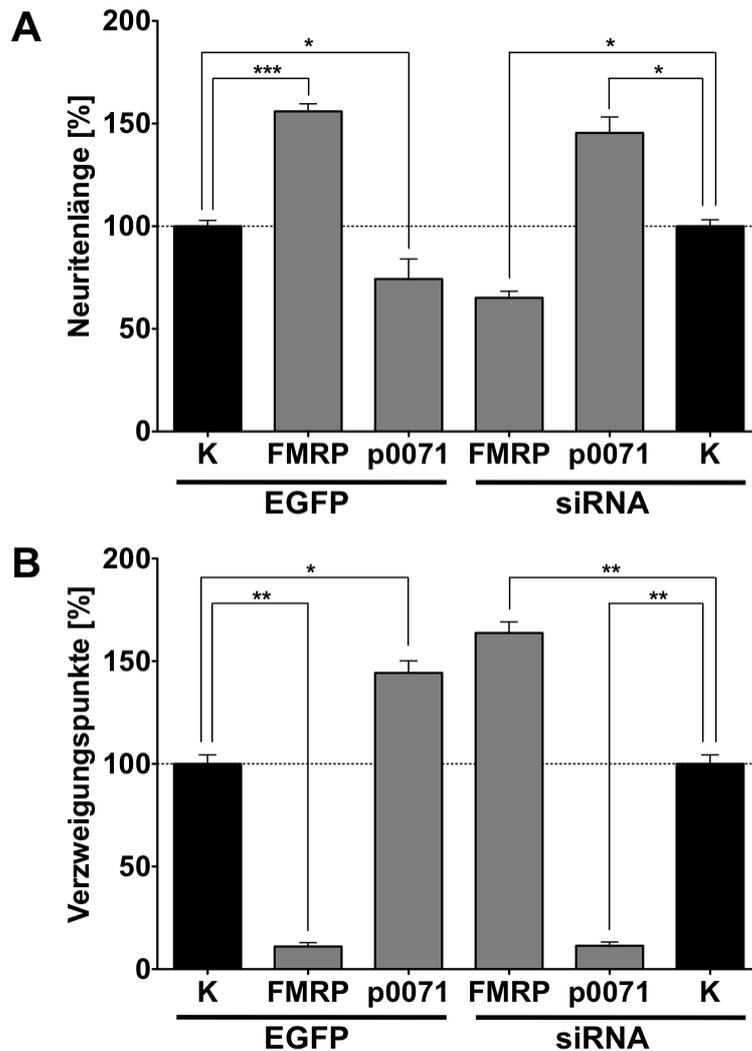


Abb. 3-36: FMRP und p0071 beeinflussen die Neuritenlänge und den Grad der Neuritenverzweigung in Neuro-2a-Zellen gegensätzlich. (A, B) Quantifizierung von Neuritenlänge und -verzweigung aus Immunfluoreszenzen in Neuro-2a-Zellen. Die Immunfluoreszenzen von je 100 transfizierten Zellen (siehe Abb. 3-35) wurden mittels der Software NIS Elements AR 3.10 hinsichtlich der (A) Neuritenlänge quantifiziert. Die Quantifizierung der (B) Verzweigungspunkte erfolgte manuell. $n = 3$; ***, $p \leq 0.005$; **, $p \leq 0.005$; *, $p \leq 0.05$.

Die Überexpression von FMRP und der p0071-*knockdown* resultierten im gleichen Phänotyp mit einer auf 150% erhöhten Neuritenlänge und einer um 90% reduzierten Neuritenverzweigung im Vergleich zu den Kontroll-Transfektionen (EGFP bzw. Kontroll-siRNA (Abb. 3-36 A, B). Im Gegensatz dazu führten sowohl der FMRP-*knockdown* als auch die p0071-Überexpression zum entgegengesetzten, zuvor beschriebenen Phänotyp. Die Neuritenlänge war um 30 bis 40% reduziert, wobei aber die Anzahl der Neuritenverzweigungen auf etwa 150% im Vergleich zu den Kontroll-Transfektionen (EGFP alleine und Kontroll-siRNA) anstieg (Abb. 3-36 A, B).

Diese Befunde erinnern stark an jene in den embryonalen Mausfibroblasten und unterstützen die Aussage, dass die FMRP-regulierte Expression von p0071 maßgeblich am Aktin-vermittelten Neuritenwachstum sowie an der Morphogenese der dendritischen Dornen beteiligt ist.

4. Diskussion

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass FMRP, das *Fragile X Mental Retardation Protein*, einen entscheidenden Einfluss auf die Regulation der Morphogenese der dendritischen Dornen im Gehirn hat (IRWIN *et al.*, 2001; CRUZ-MARTÍN *et al.*, 2010). Da dendritische Dornen vorwiegend aus filamentösem Aktin aufgebaut sind, scheint FMRP einen Einfluss auf die Reorganisation des Aktinzytoskeletts zu haben. FMRP ist ein RNA-bindendes Protein, welches Funktionen in der mRNA-Translation, der mRNA-Stabilität und dem mRNA-Transport ausübt (BASSELL und WARREN, 2008). Über eine Regulation seiner Zieltranskripte könnte FMRP daher das Aktinzytoskelett modellieren. Jedoch wurden außer der mRNA der kleinen Rho-GTPase Rac1 bisher keine für die Aktinzytoskelett-Reorganisation relevanten mRNAs als FMRP-Zieltranskripte nachgewiesen (CASTETS *et al.*, 2005). In verschiedenen Hochdurchsatzstudien wurde die p0071-mRNA als putatives FMRP-Zieltranskript identifiziert (BROWN *et al.*, 2001; DARNELL *et al.*, 2011; ASCANO *et al.*, 2012). Das Protein p0071 gehört zur Proteinfamilie der p120^{ctns}. Für drei Proteine dieser Familie, δ -Catenin, p120^{ctn} und p0071, konnten bereits Einflüsse auf die Regulation des Aktinzytoskeletts bestätigt werden (Wildenberg *et al.* 2006). So spielt p0071 beispielsweise eine entscheidende Rolle bei der Aktomyosin-vermittelten Abschnürung der Zellen während der Zytokinese und reguliert dabei die Aktivität der kleinen Rho-GTPase RhoA (Wolf *et al.* 2006).

Aus diesem Grund schien die p0071-mRNA, als ein durch FMRP reguliertes Zieltranskript, ein guter Kandidat für die Reorganisation des Aktinzytoskeletts mittels FMRP verantwortlich zu sein. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass p0071 ein wichtiger, von FMRP regulierter, *downstream*-Effektor im Rho-Signalweg ist. Die entsprechenden Ergebnisse werden in den folgenden Abschnitten diskutiert und es wird versucht anhand der Ergebnisse Funktionsmodelle zu erstellen, welche als Arbeitshypothese für die noch offenen Fragen dienen.

4.1. Einfluss von FMRP und p0071 auf das Aktinzytoskelett

In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass FMRP das Aktinzytoskelett durch p0071 reguliert. Ergebnisse aus embryonalen Mausfibroblasten konnten in Neuroblastoma-Zellen validiert werden.

In FMRP-defizienten Zellen (*Fmr1*⁻) des embryonalen Fibroblasten-Modellsystems war nicht nur die Zellmorphologie, sondern auch die Aktinzytoskelett-Organisation verändert. Dabei konnte eine deutlich reduzierte Zahl an Stressfasern sowie ein reduziertes F-Aktin/G-Aktin-Verhältnis nachgewiesen werden (Abb. 3-2 A, B und Abb. 3-4 A). Derselbe Phänotyp wurde durch die Überexpression von p0071 in *Fmr1*⁺-Zellen induziert (Abb. 3-22 A). Des Weiteren revertierte der *knockdown* von p0071 in *Fmr1*⁻-Zellen den FMRP-abhängigen Phänotyp in Hinsicht auf die Zellform, die Aktin-Organisation und das F-Aktin/G-Aktin-Verhältnis (Abb. 3-22 B und Abb. 3-23 A).

Erste Hinweise für eine Korrelation zwischen FMRP und dem Umbau des Aktinzytoskeletts wurden durch eine Verbindung zum Rac1-Signalweg gefunden. Dieser Signalweg spielt eine wichtige Rolle im Aktinzytoskelett-Umbau (HALL, 1998). Er kontrolliert die Reifung und Erhaltung der dendritischen Dornen (NAKAYAMA *et al.*, 2000).

So konnten Lee *et al.* eine Interaktion zwischen CYFIP1/2 (*cytoplasmic FMRP interacting protein 1/2*) und Rac1 sowie FMRP nachweisen. Außerdem konnte eine genetische Interaktion der drei orthologen Gene in *Drosophila* gezeigt werden. Des Weiteren wurde die Rac1-mRNA in Assoziation mit FMRP-mRNPs gefunden (LEE, 2003).

Eine weitere funktionelle Verbindung zwischen FMRP und dem Umbau des Aktinzytoskeletts durch die kleine Rho-GTPase Rac1 wurde durch Bongmba *et al.* sowie durch Castets *et al.* vorgeschlagen (CASTETS *et al.*, 2005; BONGMBA *et al.*, 2011). Castets *et al.* beschrieben, dass der durch Rac1 induzierte Aktinzytoskelett-Umbau in *Fmr1*⁻-Fibroblasten verstärkt ist, was einen Einfluss von FMRP auf Rac1 impliziert. Über 2D-Gelelektrophorese wurden die Proteome von *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Zellen hinsichtlich differenziell exprimierter Proteine untersucht. Dabei wurde unter anderem die β -Isoform der Protein Phosphatase 2A (PP2Ac) identifiziert (CASTETS *et al.*, 2005). Dieses Protein dephosphoryliert phospho-Cofilin, einen *downstream*-Effektor von Rac1 (AMBACH *et al.*, 2000). Dabei verstärkt phospho-Cofilin die Aktindepolymerisation und die Aktinfilament-Verzweigung am Ende des Rac1-Signalweges, was sich in einem verstärkten Umbau des Aktinzytoskeletts äußert (BAMBURG, 1999). Castets *et al.* wiesen veränderte Proteinmengen der PP2Ac zwischen *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Fibroblasten nach, wobei die Menge an PP2Ac in Zellen ohne FMRP doppelt so hoch war wie in *Fmr1*⁺-Zellen. Jedoch waren die *steady-state* mRNA-Mengen unbeeinflusst (CASTETS *et al.*, 2005).

Sie folgerten, dass FMRP den Rac1-Signalweg indirekt über die Translationsrepression der PP2Ac-mRNA reguliert. Denn eine verstärkte Expression von PP2Ac sorgt für eine

verringerte Menge an inaktivem phospho-Cofilin und damit zur verstärkten Aktindepolymerisation und Destabilisierung von Aktinfilamenten (CASTETS *et al.*, 2005).

Im beschriebenen Signalweg ist normalerweise aktives Rac1 für eine Inhibierung von Cofilin durch verstärkte Phosphorylierung verantwortlich. Deshalb scheint es eigentlich widersprüchlich, eine erhöhte Rac1-Aktivität in Abwesenheit von FMRP vorzufinden (BONGMBA *et al.*, 2011). Es wurde jedoch beobachtet, dass ein verringertes phospho-Cofilin Level und die Überexpression von Cofilin im gleichen Phänotyp resultieren, wie jener nach Expression von konstitutiv aktiven Rac1 (MEBERG und BAMBURG, 2000; LUO, 2002). Eine mengenmäßige lokale oder globale Erhöhung der Menge an unphosphoryliertem Cofilin führt also zu einem verstärkten Aktin-Umsatz. Auf der anderen Seite sorgt die Inaktivierung von Cofilin durch Rac1 zu einer stimulierten Aktinpolymerisation in *Fmr1*⁺-Zellen. Somit führt eine Balance zwischen den Effektoren zu einer präzisen Kontrolle der Aktinpolymerisation und -depolymerisation.

In dieser Arbeit konnten ähnliche funktionelle Hinweise für das *Armadillo*-Protein p0071 gefunden werden. Nach Vergleich der *steady-state* p0071-Proteinmengen zwischen *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Fibroblasten konnte eine doppelt so hohe p0071-Expression in *Fmr1*⁻-Zellen nachgewiesen werden, wobei die *steady-state* p0071-mRNA-Mengen weitgehend unverändert blieben (Abb. 3-7). Mittels Immunfluoreszenz-Studien konnte in *Fmr1*⁻-Fibroblasten ein stark verändertes Aktinzytoskelett beobachtet werden (Abb. 3-2 B). Anstelle einer hohen Anzahl paralleler Stressfasern wurde eine ungeordnete Struktur des Aktinzytoskeletts offensichtlich. Dabei war die Anzahl der Stressfasern deutlich reduziert. Diese Befunde sprechen für eine verstärkte Aktindepolymerisation in *Fmr1*⁻-Zellen im Vergleich zu *Fmr1*⁺-Zellen. Dies konnte statistisch signifikant durch die Ermittlung des F-Aktin/G-Aktin-Verhältnisses validiert werden. In FMRP-defizienten Zellen war das F-Aktin/G-Aktin-Verhältnis um 25% reduziert (Abb. 3-4 A).

Der Einfluss der erhöhten p0071-Expression könnte in diesem Zusammenhang eine entscheidende Rolle spielen. Es konnte durch Wolf *et al.* bereits gezeigt werden, dass p0071 durch eine direkte Interaktion mit der kleinen Rho-GTPase RhoA und dem GEF ECT2 die RhoA-Aktivität während der Zytokinese erhöht (WOLF *et al.*, 2006). In den hier gezeigten Ergebnissen war aber die globale RhoA-Aktivität nach FMRP-Verlust unverändert (Abb. 3-28). Diese korreliert nicht direkt mit dem nachgewiesenen Phänotyp hinsichtlich der reduzierten Anzahl an Stressfasern und dem verringerten F-Aktin/G-Aktin-Verhältnis. Damit scheint der durch p0071 vermittelte Regulationsmechanismus hier möglicherweise verändert zu sein. Das GEF ECT2 kann nicht nur RhoA, sondern auch

Cdc42 und Rac1 aktivieren (TATSUMOTO *et al.*, 1999). In der vorhandenen Literatur gibt es darüber jedoch gegensätzliche Analysen. So konnte für in Insektenzellen exprimiertes ECT2 keine *in-vitro*-GEF-Aktivität gegenüber RhoA, Rac1 und Cdc42 nachgewiesen werden (MIKI *et al.*, 1993), doch war aus Säugerzellen immunpräzipitiertes ECT2 in der Lage, RhoA, Rac1 und Cdc42 zu aktivieren (TATSUMOTO *et al.*, 1999). Somit scheinen spezifische Phosphorylierungsereignisse die GEF-Aktivität von ECT2 lokal zu regulieren (FIELDS und JUSTILIEN, 2010). ECT2, mit dem p0071 die RhoA-Aktivität während der Zytokinese beeinflusst, könnte somit auch in den *Fmr1*⁻-Zellen die Rac1- und Cdc42-Aktivität mittels p0071 stimulieren. Die Analyse der globalen Rho-GTPase-Aktivitäten für Rac1 und Cdc42 ergab jedoch eine Reduktion der Rac1-Aktivität und keine Veränderung für Cdc42 im Vergleich zu *Fmr1*⁺-Zellen (Abb. 3-28).

Die präzise Regulation der GTPase-Aktivitäten und auch die Interaktion mit den entsprechenden Effektoren sind für deren korrekte Funktion essenziell. Die Messung der Rho-GTPase-Aktivitäten zeigte, dass die Resultate der klassischen Rho-GTPase-Aktivitätstests, welche globale Effekte messen (siehe (Abb. 3-28), oft irreführend sind (PERTZ, 2010). Denn eine GTPase kann an verschiedenen Orten der Zelle gleichzeitig aktiviert sein, um spezielle Funktionen zu regulieren. Dabei könnten lokale Pools an GTPasen mit den entsprechenden *upstream* Regulatoren und *downstream* Effektoren existieren (KEIL *et al.*, 2013).

Die Ergebnisse meiner Dissertation erlauben den Schluss, dass hier eine sehr stark räumlich begrenzte Regulation der Rho-GTPasen stattfindet. Dabei könnte die erhöhte p0071-Proteinmenge in *Fmr1*⁻-Zellen zusammen mit ECT2 die Aktivitäten von Rac1 und Cdc42 lokal an den Zellgrenzen stimulieren, wodurch die beobachteten Effekte mit verstärkter Filopodienbildung in *Fmr1*⁻-Zellen erklärbar wären. Somit könnte p0071 *upstream* von Rac1 in Zusammenspiel mit der durch Castets *et al.* vorgeschlagenen *downstream* von Rac1 liegenden Erhöhung der PP2Ac-Proteinmenge (CASTETS *et al.*, 2005) den Rac1-Signalweg positiv stimulieren und so die beobachtete Reorganisation des Aktinzytoskeletts induzieren. Es ist jedoch auch möglich, dass p0071 auch direkt, ohne das GEF ECT2, die Rho-GTPasen in diesem Kontext verstärkt aktiviert (WOLF *et al.*, 2006; KEIL *et al.*, 2007).

Für diese Hypothese sprechen die im neuronalen Zellsystem gemachten Beobachtungen. Die Regulation der neuronalen Morphologie und synaptischen Modifikationen ist von der Reorganisation des Aktinzytoskeletts abhängig.

Sowohl die p0071-mRNA als auch das p0071-Protein wurden verstärkt in den Wachstumskegeln neuronaler Zellen nachgewiesen (Abb. 3-31, Abb. 3-32 und Abb. 3-34). Nach p0071-Überexpression war ein reduziertes Neuritenwachstum und eine verstärkte Verzweigung der Neuriten zu beobachten (Abb. 3-35 und Abb. 3-36). Dies zeigt, dass p0071 mit der Neuritenmorphogenese interferierte. So könnte p0071 lokal die RhoA-Aktivität senken und die Rac1- bzw. Cdc42-Aktivität stimulieren und damit die Verzweigung der Neuriten erhöhen. Andererseits förderte die Reduktion der p0071-Proteinmenge nach *knockdown* ein Auswachsen der Neuriten (Abb. 3-35 und Abb. 3-36). Überexpression und *knockdown* von FMRP hingegen führten zu gegensätzlichen Phänotypen. So scheint die p0071-Expression durch FMRP reguliert zu sein und damit auch die Aktivitätszustände der kleinen Rho-GTPasen.

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Britta Qualmann (Universitätsklinikum Jena, Institut für Biochemie I) konnten die Daten aus den Neuroblastoma-Zellen in primären hippocampalen Rattenneuronen validiert werden (nicht gezeigt). Damit liefert meine Dissertation weitere Hinweise, dass p0071, wie schon sein nächster Verwandter δ -Catenin/NPRAP, eine entscheidende Rolle bei der Neuritenmorphogenese spielt (ABU-ELNEEL *et al.*, 2008; ARIKKATH *et al.*, 2009). Die Expression von δ -Catenin/NPRAP als auch von p0071 ist in schizophrenen Patienten stark erhöht (MARTINS-DE-SOUZA *et al.*, 2009). Die in meiner Dissertation gezeigten Resultate sind ein Ansatz für eine mögliche Erklärung der Symptome des Fragilen-X-Syndroms. Die dendritischen Dornen sind in Patienten mit FXS nachweislich länger und dünner (IRWIN *et al.*, 2001; CRUZ-MARTÍN *et al.*, 2010). Dabei ist der Umbau des Aktinzytoskeletts, speziell in den Neuriten und an den dendritischen Dornen, beeinträchtigt.

Durch die verstärkte p0071-Expression, aufgrund der fehlenden Translationsrepression durch FMRP, könnte es zu einer Störung in den Aktivitätszuständen der kleinen Rho-GTPasen kommen. Chen *et al.* konnten zeigen, dass die Aktivität von Rac1 und dessen Effektor PAK (p-21 aktivierter Kinase) in *Fmr1*-KO-Mäusen vermindert ist (CHEN *et al.*, 2010). Sie stellten die Hypothese auf, dass die Aktivierung einer RhoA-zu-Cofilin-Kaskade Aktinpolymere bildet, die so lange in einem instabilen Zustand bleiben, bis sie durch das Einwirken einer anderen Folge von Ereignissen, den *upstream*-Rac-PAK-Signalweg eingeschlossen, stabilisiert werden (CHEN *et al.*, 2010). Dies würde dann zu einer Störung der Aktinfilamentstabilisierung in *Fmr1*-Zellen führen. In Übereinstimmung damit konnten Defizite in der Langzeitpotenzierung (*long term potentiation*, LTP) in *Fmr1*-KO-Mäusen durch eine dominant negative PAK-Mutante

revertiert werden (HAYASHI *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu zeigten Bongmba *et al.*, dass die Rac1-Aktivität in den Gehirnen von *Fmr1*-KO-Mäusen stark erhöht ist (BONGMBA *et al.*, 2011). Wie jedoch FMRP den Rho-Signalweg *upstream* der Rho-GTPasen und ihrer Effektoren reguliert, ist weitgehend unverstanden.

Eine Möglichkeit um die lokalen Aktivitäten der Rho-GTPasen zu untersuchen, würden Biosensoren bieten, die auf dem Prinzip des FRET (Förster-Resonanzenergietransfer) basieren. So existiert zum Beispiel ein Biosensor für RhoA. Dieser besteht aus der Rho-Bindedomäne (RBD) des Effektors Rhotekin, welche spezifisch RhoA-GTP bindet (REN *et al.*, 1999; PERTZ, 2010). Gefolgt wird diese von einem Cyan-fluoreszierenden Protein, einer flexiblen Verbindungsregion und einem gelb fluoreszierenden Protein. Nach Aktivierung, also GTP-Beladung, kommt es zur Interaktion zwischen RhoA-GTP und der RBD sowie zu einer Neuausrichtung der beiden Fluorophore. Dadurch wird das FRET-Signal verstärkt und eine lokale Aktivierung der GTPase messbar (PERTZ, 2010). Man könnte demnach Biosensoren in *Fmr1*-Zellen transfizieren, um den basalen und lokalen Aktivitätszustand der GTPasen zu ermitteln. Entsprechend der Phänotypveränderungen nach *p0071-knockdown* in diesen Zellen (Abb. 3-22 B, Abb. 3-23 B) könnte man dadurch einen Eindruck gewinnen, welchen Einfluss *p0071* auf die GTPase-Aktivitäten besitzt. Dieses Prinzip wäre auch in neuronalen Zellen anwendbar, um die möglicherweise *p0071*-abhängige Aktivierung der GTPasen in Abhängigkeit von der FMRP-Expression sowie den Einfluss auf die Reorganisation des Aktinzytoskeletts näher zu untersuchen.

Die Ergebnisse der Co-Immunpräzipitations-Experimente (Abb. 3-8 und Abb. 3-9), in denen die *p0071*-mRNA als FMRP-Zieltranskript identifiziert wurde, implizierten auch eine Bindung der RhoA-mRNA durch FMRP (Abb. 3-8 B und Abb. 3-9 B). Bis zum jetzigen Zeitpunkt gibt es keine direkten Beweise dafür, dass außer der Rac1-mRNA eine weitere Rho-GTPase ein direktes FMRP-Zieltranskript ist (CASTETS *et al.*, 2005). Die Bindung der RhoA-mRNA in *Fmr1*+Zellen war jedoch schwächer als die für die *p0071*-mRNA (Abb. 3-8 A, B). Eine durchgeführte mRNA-Abbau-Analyse ergab eine drastisch verringerte RhoA-mRNA-Stabilität in *Fmr1*-Zellen, was ein weiteres Indiz für die Bindung dieser mRNA an FMRP ist (Abb. 3-10 C, D). Zudem korreliert die verringerte RhoA-mRNA-Menge in *Fmr1*-Zellen direkt mit der verringerten Expression von RhoA in diesen Zellen. Beide Expressionsmuster waren in *Fmr1*-Zellen im Vergleich zu *Fmr1*+Zellen um 50% reduziert (Abb. 3-7). Die vorliegenden Daten lassen in diesem Falle den Schluss zu, dass die RhoA-mRNA durch FMRP auf Stabilitätsebene reguliert

wird. Solch ein Effekt konnte bereits durch Zalfa *et al.* für die PSD-95-mRNA gezeigt werden. Im Gehirn-Lysat von *Fmr1*-KO-Mäusen wurde eine reduzierte PSD-95-Proteinmenge bei zugleich verringerter mRNA-Menge und -Stabilität nachgewiesen (ZALFA *et al.*, 2007). Die von mir nachgewiesene Regulation der RhoA-mRNA-Stabilität durch FMRP könnte auch eine Erklärung für die möglicherweise verringerte lokale Aktivität von RhoA in den *Fmr1*-Zellen sein (Abb. 3-28) und gleichzeitig Ursache für die verringerte Anzahl an Stressfasern in den *Fmr1*-Zellen sein (Abb. 3-2 B).

In der Literatur gibt es bis jetzt nur wenige Hinweise für die putative Assoziation der RhoA-mRNA mit FMRP (CHEN *et al.*, 2003; ZALFA *et al.*, 2003; 2006). So berichteten Chen *et al.* bereits 2003, dass FMRP die RhoA-mRNA mit hoher Affinität über U-reiche Sequenzabschnitte in der 3'UTR bindet (CHEN *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu den hier vorliegenden Daten mit verringerter Halbwertszeit der RhoA-mRNA in *Fmr1*-Zellen (Abb. 3-10 C, D), berichten Zalfa *et al.* von einer unbeeinflussten RhoA-mRNA-Stabilität. Diese Diskrepanz könnte aufgrund des verwendeten Modellsystems zu Stande kommen. Zalfa *et al.* nutzten für ihre Analysen primäre kortikale und hippokampale Neuronen aus *Fmr1*-Wildtyp- und *Fmr1*-KO-Mäusen (ZALFA *et al.*, 2007). Dies impliziert möglicherweise eine differenzielle Funktion der FMRP-vermittelten Bindung der RhoA-mRNA in verschiedenen Geweben.

Um die Befunde meiner Dissertation zur Regulation der RhoA-mRNA-Stabilität zu validieren, bietet es sich an, die Stabilität einer Luciferase-Reporter-mRNA mit der RhoA-3'UTR in Abhängigkeit von der FMRP-Expression per mRNA-Abbau-Analyse zu untersuchen. Wenn FMRP die RhoA-mRNA tatsächlich über die 3'UTR stabilisiert, dann wäre eine verringerte Luciferase-Reporter-mRNA-Stabilität in *Fmr1*-Zellen zu erwarten.

4.2. Einfluss von FMRP auf die p0071-mRNA

Im Verlauf dieser Arbeit konnte die p0071-mRNA als neues FMRP-Zieltranskript identifiziert werden. Dabei kann FMRP seine Ziel-mRNAs auf vielfältige Weise regulieren, sofern diese direkt durch FMRP gebunden werden. Die Regulation reicht von der Translationskontrolle über die mRNA-Stabilität bis hin zur mRNA-Lokalisation (BASSELL und WARREN, 2008).

4.2.1. Bindung der p0071-mRNA durch FMRP

In Übereinstimmung mit RNA-Immunpräzipitationen (RIP), Hochdurchsatz-Sequenzierung von durch Quervernetzungs-Immunpräzipitation isolierter RNA (HITS-CLIP) und photoaktivierter Ribonukleosid-verstärkter Vernetzung und Immunpräzipitation (PAR-CLIP) (BROWN *et al.*, 2001; DARNELL *et al.*, 2011; ASCANO *et al.*, 2012), konnte in meiner Arbeit die Assoziation der p0071-mRNA mit FMRP nachgewiesen werden. Dies wurde durch mRNA-Co-Immunpräzipitationen sowie Streptavidin-*pull-down*-Experimente belegt (Abb. 3-8, Abb. 3-9 B und Abb. 3-11 B).

Die Bindung von FMRP an Zieltranskripte kann dabei unter anderem über G-Quadruplex-Strukturen, U-reiche-Sequenzabschnitte sowie über den „*kissing complex*“ erfolgen (DARNELL *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2003; DARNELL *et al.*, 2005). Mit Luciferase-reporterStudien konnte in dieser Dissertation eine FMRP-vermittelte Translationsrepression der p0071-mRNA durch zwei regulatorische *cis*-Determinanten in der p0071-3'UTR belegt werden (Abb. 3-17 B).

Das am weitesten *upstream* gelegene Element befindet sich zwischen den Nukleotiden 4053 und 4150 der 3'UTR der p0071-mRNA und enthält eine potenzielle G-Quadruplex-Struktur. Obwohl das Potenzial der G-Quadruplex-Bildung in der p0071-3'UTR nach einem Genom-weiten *in-silico*-Screening nur als moderat eingeschätzt wurde (EDDY und MAIZELS, 2006), konnten mit dem QGRS-Mapper⁸, einem *in-silico*-Algorithmus zur Vorhersage von G-Quadruplexen (KIKIN *et al.*, 2006), drei putative G-Quadruplexe in der p0071-3'UTR vorhergesagt werden. Zwei davon befinden sich in einem G-reichen Sequenzabschnitt von Fragment IIA (Abb. 3-15 und Abb. 3-16 A), welcher für die FMRP-vermittelte Translationsrepression der p0071-mRNA essenziell ist (Abb. 3-17 B).

Es konnten bereits für verschiedene mRNAs (PP2Ac, APP, FMRP und Sema3F) eine über G-Quadruplexe vermittelte Interaktion mit FMRP nachgewiesen werden (SCHAEFFER *et al.*, 2001; CASTETS *et al.*, 2005; WESTMARK und MALTER, 2007; EVANS *et al.*, 2012), welche durch die RGG-Box von FMRP vermittelt wird (DARNELL *et al.*, 2001). Die FMRP-vermittelte Bindung der eigenen mRNA war dabei stark Kationen-abhängig. In Anwesenheit von Natrium oder Lithium war die Bindung gestört, was auf die destabilisierende Wirkung der genannten Kationen auf die G-Quadruplex-Struktur zurückzuführen ist (SUNDQUIST und KLUG 1989).

So wurde beispielsweise durch Zalfa *et al.* (ZALFA *et al.*, 2007) auch in der 3'UTR der PSD-95-mRNA eine G-Quadruplex-Struktur als FMRP-Bindestelle vorgeschlagen, die

sich aber nicht bestätigte. Die Autoren bezogen sich dabei auf *in-silico*-Vorhersageprogramme, welche einen Sequenzabschnitt, der in der Lage war, eine G-Quadruplex-Struktur zu bilden, identifiziert hatten (TODD *et al.*, 2003). Eine genauere Untersuchung dieses Abschnitts ergab jedoch, dass diese G-reiche Region zwar essenziell für die Bindung an FMRP ist, diese jedoch nicht über die Formation einer G-Quadruplex-Struktur vermittelt wird (ZALFA *et al.*, 2007). Denn die Bindung von FMRP an das G-reiche Fragment der PSD-95-3'UTR erfolgte auch in der Anwesenheit von Lithium. Eine hohe Konzentrationen an Lithium (50 mM) hätte jedoch G-Quadruplexe destabilisiert (WILLIAMSON *et al.*, 1989; DARNELL *et al.*, 2001).

Auch für die p0071-mRNA wird die Bildung einer G-Quadruplex-Struktur angenommen. Jedoch konnte dies anfangs nicht definitiv bewiesen werden. Um die Anwesenheit von G-Quadruplexen zu bestätigen oder gegebenenfalls auszuschließen, wurden *Primer Extension Assays* durchgeführt. Mit der p0071-3'UTR konnten in dieser Dissertation Pausen während der reversen Transkription nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass es in der 3'UTR G-Quadruplexe gibt (Abb. 3-19). Dies sind eindeutige Belege dafür, dass die Bindung von FMRP an die p0071-mRNA über einen G-reichen Sequenzabschnitt in der 3'UTR, der G-Quadruplex-Strukturen bilden kann, erfolgt.

Das zweite *cis*-regulatorische Element in der 3'UTR der p0071-mRNA befindet sich näher am 3'-Ende und ist U-reich (~ 44%). Mit Hilfe des *in-silico*-Programms CyloFold⁹ (BINDEWALD *et al.*, 2010) zur Vorhersage von RNA-Sekundärstrukturen konnte ein „*kissing complex*“ in diesem Sequenzabschnitt der p0071-3'UTR vorhergesagt werden (Abb. 3-16 B).

Erst kürzlich berichteten Ascano *et al.* (ASCANO *et al.*, 2012) über die Entdeckung von zwei verschiedenen RNA-Erkennungsmotiven, dem ACUK- und WGGA-Motiv (K = G/U und W = A/U), in ungefähr 50% der FMRP-mRNA-Bindestellen. In der p0071-3'UTR findet sich in Fragment IIA ein ACUK-Element und ein WGGA-Motiv in Fragment IIC. Jedoch enthält Fragment IIB auch ein WGGA-Motiv, was bedeutet, dass dieses kurze Sequenzmotiv alleine nicht ausreichend ist, um die FMRP-abhängige Regulation von Zieltranskripten zu vermitteln. FMRP enthält neben der RGG-Box noch zwei KH-Domänen, welche für die RNA-Bindung des Proteins verantwortlich sind (DARNELL *et al.*, 2005). Es wird angenommen, dass die KH-Domänen die Assoziation mit der „*kissing complex*“-Struktur in den Zieltranskripten vermitteln. Durch die *missense*-Mutation (I304N) in der KH2-Domäne von FMRP wird die Bindung an die mRNA aufgehoben. Dies impliziert die Wichtigkeit dieser Domäne für die FMRP-Funktion

(DARNELL *et al.*, 2005). Des Weiteren scheinen die KH-Domänen für die Polyribosomen-Assoziation essenziell zu sein, während eine Deletion der RGG-Box keinen Einfluss auf die polysomale Assoziation zu haben scheint (MAZROUI *et al.*, 2003; DARNELL *et al.*, 2005).

Basierend auf diesen Erkenntnissen, wurde angenommen, dass FMRP mit beiden Sequenzmotiven (G-Quadruplex und „*kissing complex*“) entweder gleichzeitig mit zwei verschiedenen RNA-Molekülen oder mit ein und demselben Transkript interagieren kann. Während die Interaktion mit den KH-Domänen essenziell für die Translationskontrolle ist und diese Eigenschaft auch von den FMRP-verwandten Proteinen FXR1 und FXR2 geteilt wird, so könnte die G-Quadruplex-Struktur wichtig für die Vermittlung der Substratspezifität sein, da die Fähigkeit G-Quadruplexe zu erkennen und zu binden, für FMRP einzigartig ist (DARNELL *et al.*, 2009).

Somit scheint das mögliche Vorhandensein des „*kissing complex*“ zusammen mit der G-Quadruplex-Struktur in der p0071-mRNA ein Hinweis darauf zu sein, dass p0071 ein hochspezifisches FMRP-Zieltranskript ist, was durch die Identifizierung dieser mRNA durch RIP und CLIP untermauert wird (BROWN *et al.*, 2001; DARNELL *et al.*, 2011).

Da die Bildung einer G-Quadruplex-Struktur in der p0071-3'UTR nachgewiesen werden konnte (Abb. 3-19 B), wäre es wichtig, auch die Anwesenheit des „*kissing complex*“ zu validieren. Dazu könnten Streptavidin-*pulldown*-Experimente durchgeführt werden. Man könnte die Bindung eines in der KH2-Domäne deletierten FMRP (FMRP Δ KH2) mit der Bindung des FMRP-Wildtypproteins an die p0071-3'UTR vergleichen. Die FMRP KH2-Domäne ist für die Erkennung des „*kissing complex*“, also U-reicher Sequenzabschnitte, essenziell (SIOMI *et al.*, 1994; MAZROUI *et al.*, 2003). Falls das p0071-3'UTR eine „*kissing complex*“-Struktur besitzt, sollte FMRP Δ KH2 nicht an diese RNA binden. Zudem könnten die für die Bindung an FMRP verantwortlichen und in der 3'UTR der p0071-mRNA nachgewiesenen Sequenzabschnitte in Fragment IIA und IIC mutiert werden. Damit ließe sich untersuchen, welche Region der p0071-3'UTR für die Bindung an FMRP essenziell ist.

Außerdem wären Konkurrenzexperimente mit anderen FMRP-Zieltranskripten denkbar, um die Bindungsaffinität an die beiden identifizierten Bindungsstellen in Fragment IIA und Fragment IIC der p0071-3'UTR zu analysieren. Es konnte durch Schaeffer *et al.* gezeigt werden, dass FMRP eine sehr hohe Affinität zu seiner eigenen mRNA aufweist und dass diese besonders hoch für ein 427 Nukleotide langes Fragment, kurz N19, ist (SCHAEFFER *et al.*, 2001). So könnte zum Beispiel die Affinität der *in vitro*

transkribierten N19-mRNA zu GST-FMRP mit der Bindeaffinität von Fragment IIA und Fragment IIC zu GST-FMRP mittels *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) untersucht werden. Gleichzeitig könnten Konkurrenzexperimente durchgeführt werden, die einen Hinweis darauf geben würden, bei welcher Menge an N19-mRNA die Bindung an die p0071-3'UTR-Fragmente verloren geht. Diese Methode wurde bereits durch Bechara *et al.* genutzt, um die Bindung der Sod1-mRNA an FMRP zu untersuchen (BECHARA *et al.*, 2009).

4.2.2. Translationsrepression der p0071-mRNA durch FMRP

Durch die Bindung an FMRP können mRNAs sowohl auf Stabilitätsebene als auch auf Translationsebene reguliert werden (WESTMARK und MALTER, 2007; ZALFA *et al.*, 2007; BECHARA *et al.*, 2009). Zudem reguliert FMRP den mRNA-Transport, wobei es die Translation seiner Zieltranskripte gleichzeitig inhibiert (DICTENBERG *et al.*, 2008). Nach Stimulation von Gruppe I metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluRIs) wird diese Translationsrepression aufgehoben und die lokale Proteinsynthese kann an den dendritischen Dornen stattfinden.

In meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass die Translation der p0071-mRNA durch FMRP reprimiert wird (Abb. 3-12 B). Diese Funktion kann jedoch von der FMRP-S499A-Mutante nicht übernommen werden (Abb. 3-20). Die Phosphorylierung am Serin₄₉₉ (Serin₅₀₀ in *Homo sapiens*) scheint dabei wichtig für die Translationsrepression zu sein, da gezeigt werden konnte, dass eine Phosphorylierung vortäuschende Mutante von FMRP die dendritischen *steady-state*-Mengen von Arc supprimierte, wohingegen die nicht-phosphorylierbare Mutante (FMRP-S500A) dieses nicht konnte (NIERE *et al.*, 2012). In Übereinstimmung mit diesem Modell blockiert phosphoryliertes FMRP die *steady-state*-Translation der Arc-mRNA. Nach mGluRI-Stimulation wird die PP2Ac aktiviert und dephosphoryliert FMRP rasch, was die unmittelbare Synthese des Proteins Arc zur Folge hat (NIERE *et al.*, 2012). Dieses Modell steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen meiner Arbeit. Es impliziert ein Freisetzen der p0071-mRNA nach der FMRP-Dephosphorylierung, was dann zur lokalen Translation der p0071-mRNA führt. Somit könnte FMRP die Proteinsynthese der p0071-mRNA räumlich und zeitlich in Antwort auf die synaptische Stimulation regulieren. Die p0071-mRNA würde dabei während des Transports durch FMRP translationell reprimiert und in den Dendriten nach Stimulation freigesetzt werden. Unterstützend zu diesem Modell sind die Befunde, dass die p0071-mRNA an der Wanderungsfront von migrierenden Fibroblasten lokalisierte und besonders

hoch in Pseudopodien angereichert war (MILI *et al.*, 2008). Zudem konnte die p0071-mRNA in zellulären Ausläufern von Astrozyten nachgewiesen werden (THOMSEN und LADE NIELSEN, 2011). Die in meiner Arbeit durchgeführten p0071-mRNA-Lokalisationsexperimente konnten die mRNA auch in den Wachstumskegeln differenzierter Neuroblasten nachweisen (Abb. 3-31 B und Abb. 3-32). Diese Bereiche zeigten zudem eine Anreicherung an p0071-Protein (Abb. 3-34), was an dieser Stelle möglicherweise durch die lokale Translation der dort verstärkt lokalisierten p0071-mRNA akkumulierte.

Die Repression der p0071-mRNA-Translation durch FMRP konnte in dieser Dissertation eindeutig bewiesen werden, jedoch ist der zugrunde liegende Mechanismus nicht bekannt, weshalb darüber nur spekuliert werden kann. Wie bereits erwähnt (siehe 1.2.4) kann FMRP die Translation auf Ebene der Initiation (NAPOLI *et al.*, 2008) und Elongation (CEMAN *et al.*, 2003; STEFANI *et al.*, 2004) sowie durch die Rekrutierung des RISC (CAUDY *et al.*, 2002; ISHIZUKA *et al.*, 2002; PLANTE *et al.*, 2006) kontrollieren.

FMRP ist biochemisch und genetisch mit dem miRNA-Signalweg verbunden. Es interagiert mit Proteinen (AGO und Dicer) des RISC und mit miRNAs. Eine Hypothese ist, dass spezifische miRNAs, als Teil des regulatorischen FMRP-Translationskomplexes, die Repression oder Selektion von Ziel-mRNAs durch FMRP verstärken (JIN *et al.*, 2004a). Edbauer *et al.* konnten für miR-125b und miR-132 eine Assoziation mit FMRP nachweisen (EDBAUER *et al.*, 2010). Dabei regulierten die beiden miRNAs die Morphologie der dendritischen Dornen komplementär. Die Überexpression von miR-125b induzierte die Ausbildung langer dünner dendritischer Dornen, wohingegen die Überexpression von miR-132 die Breite dendritischen Ausläufer erhöhte (EDBAUER *et al.* 2010).

In einer anderen Studie von Muddashetty *et al.* konnte ein negativer Einfluss von miR-125a auf die Expression von PSD-95 nachgewiesen werden (MUDDASHETTY *et al.*, 2011). Die durch Zalfa *et al.* bereits beschriebene FMRP-vermittelte Translationsrepression der PSD-95-mRNA ging nach Mutation von zwei Nukleotiden in der miR-125a-Bindestelle in der PSD-95-3'UTR komplett verloren. Diese Daten belegen, dass die 3'UTR der PSD-95-mRNA ausreichend ist, um die durch FMRP hervorgerufene Regulation zu vermitteln, dass dafür jedoch eine Interaktion mit miR-125a notwendig ist (MUDDASHETTY *et al.*, 2011).

In meiner Dissertation wurden ebenfalls Untersuchungen vorgenommen, die klären sollten, ob die Expression von p0071 möglicherweise durch miRNAs reguliert wird. Dies

könnte in Zusammenspiel mit FMRP erfolgen und dabei eine Erklärung für die FMRP-vermittelte Translationsrepression der p0071-mRNA sein. In einem miRNA-*pull-down*-Experiment in HEK293-Zellen (mi-TRAP, 2.2.2.12) konnte die Bindung von zwei zuvor durch ein *in-silico*-Programm (miRWalk¹⁰, (DWEET *et al.*, 2011)) vorhergesagten miRNAs, miR-34a und miR-23a, an die p0071-3'UTR nachgewiesen werden (siehe Anhang, Abb. 7-1 B, C). Dabei zeigten die miRNAs eine sehr starke Anreicherung im Vergleich zum Kontroll-*pull-down* ohne p0071-3'UTR (siehe Anhang, Abb. 7-1 B). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die p0071-Expression durch miRNAs gemeinsam mit FMRP reguliert wird. FMRP konnte zusätzlich zu den beiden untersuchten miRNAs im präzipitierten Komplex nachgewiesen werden (siehe Anhang, Abb. 7-1 C).

Somit könnten beide miRNAs in einem Komplex mit FMRP (und AGO2) einen direkten Einfluss auf die p0071-Expression in *Fmr1*+ -Zellen ausüben, indem sie durch FMRP an die p0071-3'UTR rekrutiert werden, die mRNA binden und somit für eine AGO2-vermittelte Translationsrepression der p0071-mRNA sorgen. Nach FMRP-Verlust wäre dieser Regulationsmechanismus unterbrochen und eine verstärkte p0071-mRNA-Translation würde stattfinden.

Um dies näher zu untersuchen, müsste zuerst der direkte Einfluss der miRNAs auf die p0071-Expression analysiert werden. Mit p0071-3'UTR-Luciferase-Reporter-Analysen in *Fmr1*+ -Zellen und *Fmr1*- -Zellen nach miRNA Überexpression könnten Aussagen über den Regulationsmechanismus getroffen werden. Zum Beispiel, ob miR-34a und miR-23a tatsächlich die p0071-Proteinexpression durch eine Bindung an die p0071-3'UTR negativ beeinflussen. Zudem könnte, wie bereits durch Muddashetty *et al.* für miR-125a an der PSD-95-3'UTR gezeigt, die putative miR-34a und miR-23a Bindestelle in der p0071-3'UTR mutiert werden (MUDDASHETTY *et al.*, 2011). Falls die miRNAs tatsächlich mit der p0071-3'UTR assoziieren, sollte diese Bindung dann verloren gehen und kein Einfluss mehr auf die Luciferase-Reporter-Aktivitäten mit der p0071-3'UTR nachweisbar sein.

Über welchen Mechanismus die Translationsrepression der p0071-mRNA durch FMRP erfolgt, ist höchst spekulativ. Da die putativen FMRP-Bindestellen für die verschiedenen validierten FMRP-Zieltranskripte über 5'UTR, 3'UTR und codierende Sequenzen verteilt sind, könnten die verschiedenen mRNA-Untergruppen auf unterschiedlichem Wege, je nach Position ihrer FMRP-Bindestelle reguliert werden. Falls FMRP zum Beispiel in der 3'UTR eines Zieltranskripts bindet, dann könnte es seine regulatorische Funktion auf die Translation vorwiegend über miRNAs vermitteln. Wenn es

¹⁰ <http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/> (18.03.2011)

hingegen in der 5'UTR oder der codierenden Sequenz bindet, dann würde FMRP eher zu einer sterischen Blockade mit anschließender Ribosomen-Festsetzung führen.

4.2.3. Regulation der p0071-mRNA-Stabilität durch FMRP

Die Transkription ist eng verbunden mit der mRNA-Prozessierung im Nukleus. Jedoch fokussieren sich die am besten charakterisierten Modelle zur Regulation der RNA-Stabilität auf Verbindungen zwischen Transkription im Nukleus und die posttranskriptionelle Assemblierung von RNA-Bindeproteinkomplexen im Zytoplasma (HAREL-SHARVIT *et al.*, 2010).

Die Abbaurate von RNAs hängt von *cis*-aktiven Elementen in deren 3'UTR und von daran assoziierenden Faktoren ab. Ein gut charakterisiertes Element, das bei der mRNA-Stabilität eine Rolle spielt, ist eine 50 bis 150 Nukleotide lange, Adenosin- und Uridinreiche Sequenz, das sogenannte AU-reiche Element (ARE, *AU-rich element*). Es findet sich in der 3'UTR von mRNAs, die durch AU-reiche RNA-Bindeproteine (AUBPs) reguliert werden. Die Interaktion zwischen ARE und ARE-Bindeproteinen kann die Rekrutierung der mRNA-Abbaumaschinerie blockieren oder verstärken und somit zu einer schnellen Modifikation der Genexpression in Antwort auf veränderte Umwelt- und Entwicklungsbedingungen führen. Zu den RNA-Bindeproteinen, die mit diesen RNA-Elementen assoziieren, gehören unter anderem der AU-Bindfaktor 1 (AUF1, *AU-binding factor 1*) (ZHANG *et al.*, 1993), Tristetraprolin (TPP) (CARBALLO *et al.*, 1998) und ELAV/Hu (DALMAU *et al.*, 1990).

Auch für FMRP konnten Hinweise auf eine Beteiligung an der Regulation der mRNA-Stabilität gefunden werden (PSD-95-mRNA, siehe 1.2.2). Die FMRP-Bindestelle in der 3'UTR der PSD-95-mRNA liegt in der Nähe von drei U-reichen Sequenzmotiven, wobei zwei von ihnen AREs enthalten (Zalfa *et al.* 2007).

Auch in der 3'UTR der p0071-mRNA konnte ein ARE gefunden werden. Dieses befindet sich am Ende von Fragment I (Position 4033, nicht gezeigt) in der Nähe der G-reichen Sequenzabschnitte von Fragment II (Abb. 3-14). Im Gegensatz zur PSD-95-mRNA konnten in einer mRNA-Abbau-Analyse keine Unterschiede in der Halbwertszeit der p0071-mRNA zwischen *Fmr1*⁺ und *Fmr1*⁻-Zellen nach Transkriptionshemmung durch Actinomycin D nachgewiesen werden (Abb. 3-10 A, B). Deshalb kann ausgeschlossen werden, dass FMRP einen Effekt auf die p0071-mRNA-Stabilität besitzt und dass das ARE für einen FMRP-spezifischen Effekt verantwortlich ist. Somit scheint die p0071-mRNA kein Zieltranskript für ARE-Bindeproteine zu sein, da FMRP diese Bindestelle zwar in

Fmr1+ -Zellen durch die räumliche Nähe zum G-reichen Sequenzabschnitt von Fragment II abschirmt, aber nach FMRP-Verlust keine Veränderung in der mRNA-Stabilität auftritt. Aus diesem Grund scheint die Position bestimmter Sequenzen innerhalb der mRNA die FMRP-abhängige Regulation der mRNA-Stabilität zu bestimmen. So könnten zum Beispiel G-reiche Sequenzen in der Nähe von AREs eine stabile mRNA charakterisieren, wohingegen andere Sequenzen, zum Beispiel solche, die von einem FMRP-miRNA-Komplex erkannt werden, zu einer Destabilisierung der mRNA führen.

Dies lässt den Schluss zu, dass die Stabilität der p0071-mRNA über andere, FMRP-unabhängige, Faktoren reguliert werden muss. So sind zum Beispiel für die c-myc-mRNA stabilitätsregulierende Determinanten bekannt, welche in der codierenden Sequenz und in der 5'UTR liegen (WISDOM und LEE, 1991; JOHNSTON und CARROLL, 1992).

In diesem Zusammenhang kann auch Grund zur Annahme bestehen, dass die Bindung eines RNA-Bindeproteins die Bindung anderer RNA-Bindeproteine beeinflusst (RAINERI *et al.*, 2004). Dieser Einfluss könnte kompetitiv oder kooperativ sein. So stabilisieren Hu-Proteine ihre Zieltranskripte indem sie an AREs mit destabilisierenden Proteinen kompetitiv binden. Dagegen agieren HuR und AUF1 zum Beispiel als Kofaktoren für die p16INK4-mRNA und verstärken deren Abbau (CHANG *et al.*, 2010).

Ein ähnlicher Regulationsmechanismus könnte auch für die p0071-mRNA zutreffen. Dabei hatte FMRP allein keinen Einfluss auf die Stabilität der p0071-mRNA. Im Zusammenspiel mit anderen RNA-Bindeproteinen könnte FMRP jedoch als Feinregulator der p0071-mRNA-Stabilität fungieren. So ist bekannt, dass FMRP heterodimerisieren kann. Dabei interagiert FMRP mit FXR1, wobei dieses Protein AREs binden kann. So konnten Vasudevan und Steitz zeigen, dass FXR1 nur unter Serumentzug mit AREs interagiert und dabei die Stabilität der TNF α -mRNA zusammen mit AGO2 regulieren kann (VASUDEVAN und STEITZ, 2007). Entsprechend dieses Modells könnte auch bei der p0071-mRNA erst eine Stabilitätsregulation auftreten, wenn sich die physiologischen Bedingungen ändern, so zum Beispiel die Serumkonzentration oder die Menge an Wachstumsfaktoren. FMRP mit FXR1 könnten ein Heterodimer bilden und erst nach Serumentzug an die entsprechenden Zielsequenzen in der p0071-3'UTR binden. Dies könnte der Grund sein, warum in dieser Arbeit eine von FMRP unbeeinflusste p0071-mRNA-Stabilität nachgewiesen wurde. Ein Einfluss der Serumkonzentration wurde im Rahmen meiner Dissertation nicht untersucht.

Ein weiterer Aspekt hinsichtlich der Regulation der mRNA-Stabilität ist die Beteiligung von miRNAs an diesem Prozess. Die mRNA-Stabilität steht, wie bereits

erwähnt, unter der Kontrolle von *cis*-aktiven Elementen in der 3'UTR, welche Proteinfaktoren rekrutieren, die wiederum Deadenylierungsenzyme rekrutieren. Solche *cis*-aktiven Elemente sind zum Beispiel AREs, die c-fos-RNA-codierende Determinante und miRNA-Bindungsstellen (BAGGA *et al.*, 2005; BARREAU *et al.*, 2005; STANDART und JACKSON, 2007). Viele Beweise unterstützen die Idee, dass miRNAs ihre Zieltranskripte durch Deadenylierung und *decapping* sowie 5' - 3' exonukleolytischen Verdau destabilisieren. Im Zebrafisch vermittelt miR-430 die Deadenylierung von hunderten maternalen Transkripten in einer frühen Phase der Embryonalentwicklung (GIRALDEZ *et al.*, 2006). In embryonalen Mauskarzinomzellen konnten Wu *et al.* zeigen, dass die lin-28-mRNA, deren Menge während der Retinsäure induzierten neuronalen Differenzierung abnimmt, durch die Aktivität von miR-125, deren Menge während der Differenzierung zunimmt, deadenyliert wird (WU *et al.*, 2006). Auch in zellfreien Extrakten von Säugern und *Drosophila* konnte die miRNA-vermittelte Deadenylierung nachgewiesen werden (WAKIYAMA *et al.*, 2007; FABIAN *et al.*, 2009).

Obwohl die miRNA-vermittelte Deadenylierung und der folgende mRNA-Abbau ein weitverbreiteter Mechanismus sind (BAEK *et al.*, 2008), werden nicht alle von miRNAs gebundenen mRNAs destabilisiert. So wird unter anderem die Dicer-mRNA in Säugerzellen durch miRNA let-7 translationell reprimiert, aber ihre mRNA-Mengen bleiben weitgehend unbeeinflusst (SELBACH *et al.*, 2008). Entsprechend dieser Daten könnte man spekulieren, dass dieser Regulationsmechanismus auch für die p0071-mRNA Gültigkeit hat. So konnte in den *Fmr1*⁻-Zellen eine erhöhte p0071-Proteinmenge bei unveränderter p0071-mRNA-Menge im Vergleich zu *Fmr1*⁺-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3-7). Wie bereits erwähnt, könnte die Repression der p0071-mRNA-Translation durch eine Bindung von miRNAs (z. B. miR-23a und miR-34a, siehe Abb. 7-1 B) an die p0071-3'UTR vermittelt werden. Dieser Prozess wäre FMRP-abhängig. Durch Bindung von FMRP würden die miRNAs zum Zieltranskript rekrutiert werden und die Translation mit Hilfe des RISC reprimieren ohne die Stabilität der p0071-mRNA zu beeinflussen. Durch Verlust von FMRP in den *Fmr1*⁻-Zellen würde dann zwar die miRNA-Bindung und die Translationsrepression verloren gehen, aber die p0071-mRNA in ihrer Stabilität unverändert sein.

4.3. Funktionsmodell

Aus den in dieser Arbeit präsentierten Daten lässt sich folgendes Funktionsmodell für FMRP im Rho-Signalweg ableiten: FMRP inhibiert die Translation der p0071-mRNA und

stabilisiert die RhoA-mRNA durch eine direkte Interaktion mit diesen Transkripten. Damit kommt es zu einer lokalen Regulation der Proteinsynthese mit folgender Reorganisation des Aktinzytoskeletts durch Aktivierung der kleinen Rho-GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 mittels p0071 und ECT2 (Abb. 4-1 A).

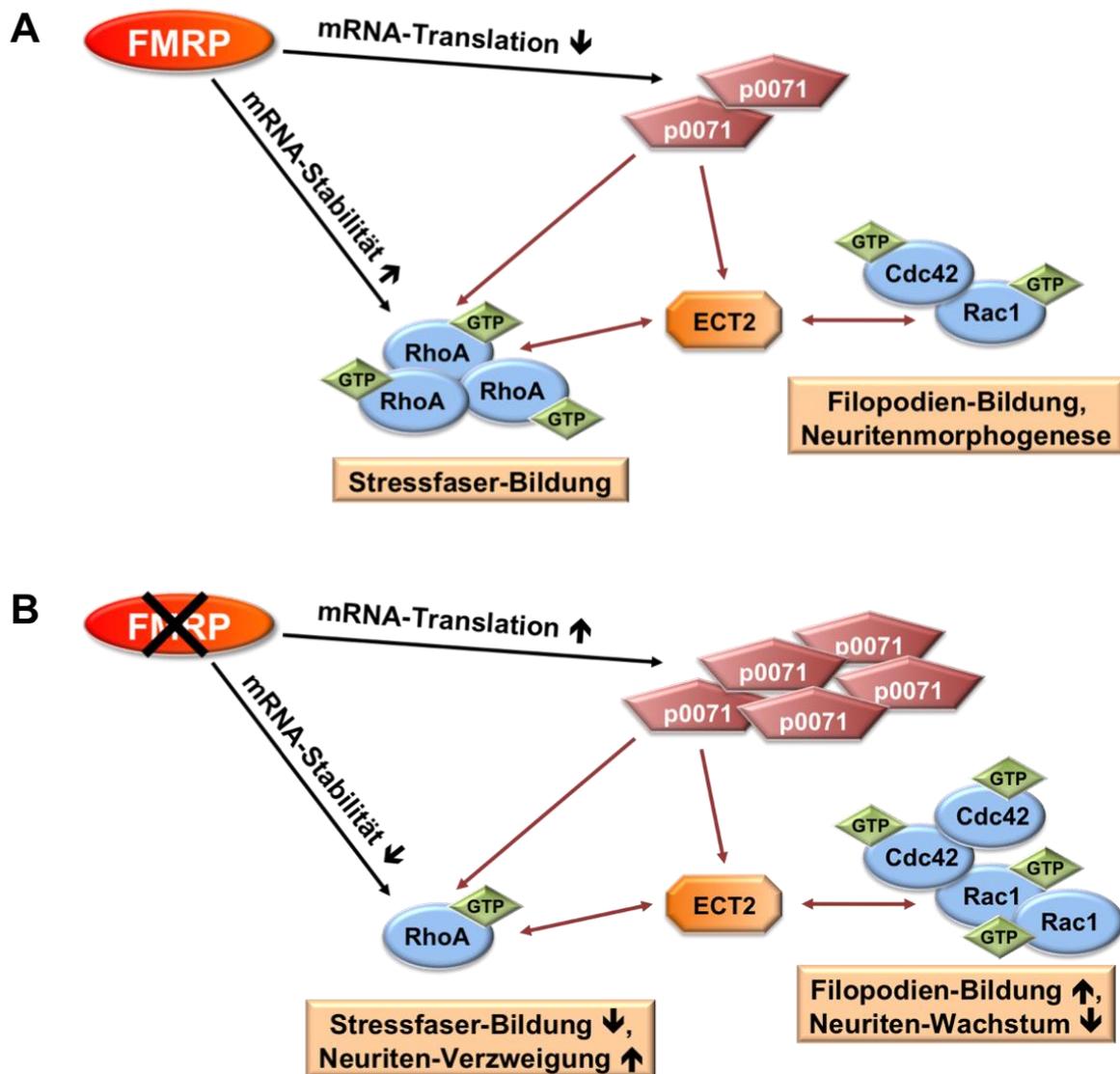


Abb. 4-1: Schematisches Modell zur Regulation der Aktinzytoskelett-Reorganisation mittels FMRP und p0071. FMRP fungiert als translationeller Repressor der p0071-mRNA und reguliert so die Aktivität der kleinen Rho-GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42. (A). Wenn FMRP nicht mehr exprimiert wird, sind diese mRNA-spezifischen Regulationsmechanismen außer Kraft gesetzt. Es kommt zu einer unkontrollierten Proteinsynthese und GTPase-Aktivierung (B), gefolgt von einer Deregulation des Aktinzytoskelett-Umbaus.

In FMRP-defizienten Zellen wird die Translation der p0071-mRNA gefördert, was eine Steigerung der p0071-Proteinmenge zur Folge hat. Im Gegensatz dazu kommt es zur Destabilisierung der RhoA-mRNA gefolgt von einer verringerten RhoA-Expression. Dadurch kann p0071, zusammen mit dem GEF ECT2, nur geringere Mengen an RhoA

lokal aktivieren, was wiederum in einer reduzierten Stressfaserbildung in *Fmr1*-Zellen und in einer verstärkten Neuritenverzweigung in neuronalen Zellen resultiert (Abb. 4-1 B). Andererseits kann die hohe p0071-Expression auch zu einer verstärkten lokalen Aktivierung von Rac1 und Cdc42 führen. Dies führt zur vermehrten Filopodienbildung in *Fmr1*-Zellen und verhindert im neuronalen System das Auswachsen der Neuriten (Abb. 4-1 B).

Somit identifiziert meine Dissertation die p0071-mRNA als neues und wichtiges FMRP-Zieltranskript und zeigt eindeutig, dass p0071 *downstream* von FMRP wirkt, um die Aktin-Organisation in der embryonalen Fibroblastenzelllinie zu regulieren. Zudem schlagen meine Daten einen funktionellen Zusammenhang zwischen Aktin-Desorganisation und veränderter neuronaler Morphologie im Fragilen-X-Syndrom vor.

5. Zusammenfassung

In verschiedenen Hochdurchsatz-Studien wurden mehr als 700 putative FMRP-assoziierte mRNAs identifiziert aber nur 14 von ihnen wurden bis heute experimentell validiert. Die mRNA des Proteins p0071 und seines nächsten Verwandten δ -Catenin/NPRAP befanden sich unter den putativen Zieltranskripten. p0071 gehört zur p120^{ctn}-Subfamilie *Armadillo*-verwandter Proteine und kontrolliert die RhoA-Aktivität während der Zytokinese. Es assoziiert dabei mit RhoA und dessen Aktivator ECT2. Obwohl die Rolle der p120^{ctn}-Proteinfamilie bei der Regulation der Organisation des Aktinzytoskeletts in verschiedenen Systemen charakterisiert worden war, war jedoch bis jetzt nichts über die *upstream* gelegenen Regulatoren dieser Proteine bekannt. Aus diesem Grund sollte in dieser Dissertation ein möglicher Zusammenhang zwischen FMRP und p0071 bei der Regulation des Aktinzytoskeletts untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass FMRP die Aktinzytoskelett-Organisation über das Protein p0071 reguliert. *Fmr1*⁻-Zellen wiesen nicht nur eine veränderte Zellmorphologie und Aktin-Organisation mit verringerter Anzahl an Stressfasern auf, sondern auch ein reduziertes F-Aktin/G-Aktin-Verhältnis. Derselbe Phänotyp konnte nach Überexpression von p0071 in *Fmr1*⁺-Zellen beobachtet werden. Darüber hinaus revertierte der *knockdown* von p0071 in *Fmr1*⁻-Zellen den FMRP-abhängigen Phänotyp in Hinblick auf Zellform, Aktin-Organisation und F-Aktin/G-Aktin-Verhältnis. Eine Wiederholung der Experimente aus der embryonalen Fibroblastenzelllinie im neuronalen System ergab, dass FMRP in differenzierten Neuroblastomazellen (Neuro-2a) das Auswachsen der Neuriten förderte, wohingegen p0071 hemmend auf die Neuritenmorphogenese wirkte. Die phänotypischen Veränderungen zwischen *Fmr1*⁺- und *Fmr1*⁻-Zellen resultieren dabei möglicherweise direkt aus unterschiedlichen lokalen Aktivitätszuständen der kleinen Rho-GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42, welche essenziell für die Aktinzytoskelett-Reorganisation sind. Jedoch bleibt der Einfluss von p0071 auf die kleinen Rho-GTPasen in diesem Zusammenhang spekulativ.

Aufgrund des antagonistischen Effekts von FMRP und p0071 auf die Organisation des Aktinzytoskeletts wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen der FMRP- und der p0071-Expression untersucht. Dabei konnte die p0071-mRNA als neues FMRP-Zieltranskript identifiziert werden und der Einfluss von FMRP auf die p0071-Expression wurde charakterisiert: FMRP reprimiert die Translation der p0071-mRNA durch eine

direkte Bindung an G-Quadruplexe und U-reiche Sequenzabschnitte im zentralen Bereich der p0071-3'UTR, wobei die p0071-mRNA-Stabilität weitgehend unbeeinflusst bleibt.

Des Weiteren konnte neben dem Einfluss von FMRP auf die Stabilität und Translation der p0071-mRNA auch ein Lokalisationseffekt nachgewiesen werden. Sowohl in embryonalen Fibroblasten, als auch in neuronalen Zellen war die Lokalisation der p0071-mRNA an den Zellgrenzen und Filopodien (*Fmr1*+ Zellen) bzw. in den Wachstumskegeln der Neuriten (Neuro-2a-Zellen) von FMRP abhängig, wobei zugleich das neurospezifische Motorprotein KIF3C eine Rolle zu spielen scheint.

Diese Daten belegen, dass die p0071-mRNA ein FMRP-Zieltranskript ist und schlagen eine funktionelle Verbindung zwischen der FMRP- und p0071-Expression sowie deren Beteiligung an der Regulation der Rho-GTPase-Aktivität und damit der Aktinzytoskelett-Reorganisation vor. Abschließend lässt sich sagen, dass diese Dissertation einen neuen Ansatz liefert zum Verständnis der Aktin-Desorganisation und der veränderten neuronalen Morphologie im Fragilen-X-Syndrom.

6. Literaturverzeichnis

- Abu-Elneel K, Ochiishi T, Medina M, Remedi M, Gastaldi L, Cáceres A, Kosik KS. 2008. A delta-catenin signaling pathway leading to dendritic protrusions. *J Biol Chem* **283**: 32781–32791.
- Adinolfi S, Ramos A, Martin SR, Dal Piaz F, Pucci P, Bardoni B, Mandel JL, Pastore A. 2003. The N-terminus of the fragile X mental retardation protein contains a novel domain involved in dimerization and RNA binding. *Biochemistry* **42**: 10437–10444.
- Ambach A, Saunus J, Konstandin M, Wesselborg S, Meuer SC, Samstag Y. 2000. The serine phosphatases PP1 and PP2A associate with and activate the actin-binding protein cofilin in human T lymphocytes. *Eur J Immunol* **30**: 3422–3431.
- Anastasiadis PZ. 2007. p120-ctn: A nexus for contextual signaling via Rho GTPases. *Biochim Biophys Acta* **1773**: 34–46.
- Anastasiadis PZ, Moon SY, Thoreson MA, Mariner DJ, Crawford HC, Zheng Y, Reynolds AB. 2000. Inhibition of RhoA by p120 catenin. *Nat Cell Biol* **2**: 637–644.
- Anderson P, Kedersha N. 2006. RNA granules. *The Journal of Cell Biology* **172**: 803–808.
- Antar LN, Afroz R, Dichtenberg JB, Carroll RC, Bassell GJ. 2004. Metabotropic glutamate receptor activation regulates fragile x mental retardation protein and FMR1 mRNA localization differentially in dendrites and at synapses. *J Neurosci* **24**: 2648–2655.
- Antar LN, Dichtenberg JB, Plociniak M, Afroz R, Bassell GJ. 2005. Localization of FMRP-associated mRNA granules and requirement of microtubules for activity-dependent trafficking in hippocampal neurons. *Genes Brain Behav* **4**: 350–359.
- Antar LN, Li C, Zhang H, Carroll RC, Bassell GJ. 2006. Local functions for FMRP in axon growth cone motility and activity-dependent regulation of filopodia and spine synapses. *Molecular and Cellular Neuroscience* **32**: 37–48.
- Arikkath J, Peng I-F, Ng YG, Israely I, Liu X, Ullian EM, Reichardt LF. 2009. Delta-catenin regulates spine and synapse morphogenesis and function in hippocampal neurons during development. *J Neurosci* **29**: 5435–5442.
- Ascano M, Mukherjee N, Bandaru P, Miller JB, Nusbaum JD, Corcoran DL, Langlois C, Munschauer M, Dewell S, Hafner M, *et al.* 2012. FMRP targets distinct mRNA sequence elements to regulate protein expression. *Nature*.
- Aschrafi A, Cunningham BA, Edelman GM, Vanderklish PW. 2005. The fragile X mental retardation protein and group I metabotropic glutamate receptors regulate levels of mRNA granules in brain. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 2180–2185.
- Ashley CT, Wilkinson KD, Reines D, Warren ST. 1993. FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding. *Science* **262**: 563–566.
- Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. 2008. The impact of microRNAs on protein output. *Nature* **455**: 64–71.
- Bagga S, Bracht J, Hunter S, Massirer K, Holtz J, Eachus R, Pasquinelli AE. 2005. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* **122**: 553–563.
- Bagni C, Greenough WT. 2005. From mRNP trafficking to spine dysmorphogenesis: the roots of fragile X syndrome. *Nat Rev Neurosci* **6**: 376–387.
- Bakker C, Willemsen R, Oostra BA, Verheij C. 1994. Fmr1 knockout mice: a model to study fragile X mental retardation. The Dutch-Belgian Fragile X Consortium. *Cell* **78**: 23–33.

- Bamburg JR. 1999. Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 185–230.
- Barbee SA, Estes PS, Cziko A-M, Hillebrand J, Luedeman RA, Coller JM, Johnson N, Howlett IC, Geng C, Ueda R, *et al.* 2006. Staufen- and FMRP-containing neuronal RNPs are structurally and functionally related to somatic P bodies. *Neuron* **52**: 997–1009.
- Barden JA, Miki M, Hambly BD, Remedios Dos CG. 1987. Localization of the phalloidin and nucleotide-binding sites on actin. *Eur J Biochem* **162**: 583–588.
- Bardoni B, Castets M, Huot M-E, Schenck A, Adinolfi S, Corbin F, Pastore A, Khandjian EW, Mandel J-L. 2003. 82-FIP, a novel FMRP (fragile X mental retardation protein) interacting protein, shows a cell cycle-dependent intracellular localization. *Hum Mol Genet* **12**: 1689–1698.
- Bardoni B, Schenck A, Mandel JL. 1999. A novel RNA-binding nuclear protein that interacts with the fragile X mental retardation (FMR1) protein. *Hum Mol Genet* **8**: 2557–2566.
- Barreau C, Paillard L, Osborne HB. 2005. AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res* **33**: 7138–7150.
- Bassell GJ, Warren ST. 2008. Fragile X syndrome: loss of local mRNA regulation alters synaptic development and function. *Neuron* **60**: 201–214.
- Bear MF, Huber KM, Warren ST. 2004. The mGluR theory of fragile X mental retardation. *Trends Neurosci* **27**: 370–377.
- Bechara EG, Didiot M-C, Melko M, Davidovic L, Bensaid M, Martin P, Castets M, Pognonec P, Khandjian EW, Moine H, *et al.* 2009. A novel function for fragile X mental retardation protein in translational activation. *PLoS Biol* **7**: e16.
- Belmonte MK, Bourgeron T. 2006. Fragile X syndrome and autism at the intersection of genetic and neural networks. *Nat Neurosci* **9**: 1221–1225.
- Benard V, Bohl BP, Bokoch GM. 1999. Characterization of rac and cdc42 activation in chemoattractant-stimulated human neutrophils using a novel assay for active GTPases. *J Biol Chem* **274**: 13198–13204.
- Benard V, Bokoch GM. 2002. Assay of Cdc42, Rac, and Rho GTPase activation by affinity methods. *Meth Enzymol* **345**: 349–359.
- Berry-Kravis E. 2002. Epilepsy in fragile X syndrome. *Dev Med Child Neurol* **44**: 724–728.
- Bertrand E, Chartrand P, Schaefer M, Shenoy SM, Singer RH, Long RM. 1998. Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast. *Molecular Cell* **2**: 437–445.
- Betel D, Wilson M, Gabow A, Marks DS, Sander C. 2008. The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res* **36**: D149–53.
- Bindewald E, Kluth T, Shapiro BA. 2010. CyloFold: secondary structure prediction including pseudoknots. *Nucleic Acids Res* **38**: W368–72.
- Bishop AL, Hall A. 2000. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* **348 Pt 2**: 241–255.
- Bongmba OYN, Martinez LA, Elhardt ME, Butler K, Tejada-Simon MV. 2011. Modulation of dendritic spines and synaptic function by Rac1: a possible link to Fragile X syndrome pathology. *Brain Res* **1399**: 79–95.
- Boseley PG, Moss T, Birnstiel ML. 1980. 5'-Labeling and poly(dA) tailing. *Meth Enzymol* **65**: 478–494.
- Bramham CR, Wells DG. 2007. Dendritic mRNA: transport, translation and function. *Nat Rev Neurosci* **8**: 776–789.

- Brown V, JIN P, Ceman S, Darnell JC, O'Donnell WT, Tenenbaum SA, Jin X, Feng Y, Wilkinson KD, Keene JD, *et al.* 2001. Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. *Cell* **107**: 477–487.
- Capani F, Martone ME, Deerinck TJ, Ellisman MH. 2001. Selective localization of high concentrations of F-actin in subpopulations of dendritic spines in rat central nervous system: a three-dimensional electron microscopic study. *J Comp Neurol* **435**: 156–170.
- Carballo E, Lai WS, Blackshear PJ. 1998. Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor- α production by tristetraprolin. *Science* **281**: 1001–1005.
- Caron E, Hall A. 1998. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* **282**: 1717–1721.
- Castets M, Schaeffer C, Bechara E, Schenck A, Khandjian EW, Luche S, Moine H, Rabilloud T, Mandel J-L, Bardoni B. 2005. FMRP interferes with the Rac1 pathway and controls actin cytoskeleton dynamics in murine fibroblasts. *Hum Mol Genet* **14**: 835–844.
- Caudy AA, Myers M, Hannon GJ, Hammond SM. 2002. Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev* **16**: 2491–2496.
- Ceman S, Brown V, Warren ST. 1999. Isolation of an FMRP-associated messenger ribonucleoprotein particle and identification of nucleolin and the fragile X-related proteins as components of the complex. *Mol Cell Biol* **19**: 7925–7932.
- Ceman S, Nelson R, Warren ST. 2000. Identification of mouse YB1/p50 as a component of the FMRP-associated mRNP particle. *Biochem Biophys Res Commun* **279**: 904–908.
- Ceman S, O'Donnell WT, Reed M, Patton S, Pohl J, Warren ST. 2003. Phosphorylation influences the translation state of FMRP-associated polyribosomes. *Hum Mol Genet* **12**: 3295–3305.
- Centonze D, Rossi S, Mercaldo V, Napoli I, Ciotti MT, De Chiara V, Musella A, Prosperetti C, Calabresi P, Bernardi G, *et al.* 2008. Abnormal striatal GABA transmission in the mouse model for the fragile X syndrome. *Biol Psychiatry* **63**: 963–973.
- Chang N, Yi J, Guo G, Liu X, Shang Y, Tong T, Cui Q, Zhan M, Gorospe M, Wang W. 2010. HuR uses AUF1 as a cofactor to promote p16INK4 mRNA decay. *Mol Cell Biol* **30**: 3875–3886.
- Cheever A, Ceman S. 2009. Translation regulation of mRNAs by the fragile X family of proteins through the microRNA pathway. *RNA Biol* **6**: 175–178.
- Chen L, Yun SW, Seto J, Liu W, Toth M. 2003. The fragile X mental retardation protein binds and regulates a novel class of mRNAs containing U rich target sequences. *Neuroscience* **120**: 1005–1017.
- Chen LY, Rex CS, Babayan AH, Kramár EA, Lynch G, Gall CM, Lauterborn JC. 2010. Physiological activation of synaptic Rac>PAK (p-21 activated kinase) signaling is defective in a mouse model of fragile X syndrome. *J Neurosci* **30**: 10977–10984.
- Choi H-J, Weis WI. 2005. Structure of the armadillo repeat domain of plakophilin 1. *J Mol Biol* **346**: 367–376.
- Chomczynski P, Sacchi N. 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* **1**: 581–585.
- Christopher RA, Kowalczyk AP, McKeown-Longo PJ. 1997. Localization of fibronectin matrix assembly sites on fibroblasts and endothelial cells. *Journal of Cell Science* **110 (Pt 5)**: 569–581.
- Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE. 1997. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY).
- Comery TA, Harris JB, Willems PJ, Oostra BA, Irwin SA, Weiler IJ, Greenough WT. 1997. Abnormal

- dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 5401–5404.
- Conti E, Uy M, Leighton L, Blobel G, Kuriyan J. 1998. Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell* **94**: 193–204.
- Costa-Mattioli M, Sossin WS, Klann E, Sonenberg N. 2009. Translational control of long-lasting synaptic plasticity and memory. *Neuron* **61**: 10–26.
- Crissman HA, Mullaney PF, Steinkamp JA. 1975. METHODS IN CELL BIOLOGY - David M. Prescott - Google Books. *Methods Cell Biol.*
- Cruz-Martín A, Crespo M, Portera-Cailliau C. 2010. Delayed stabilization of dendritic spines in fragile X mice. *J Neurosci* **30**: 7793–7803.
- D'Hulst C, De Geest N, Reeve SP, Van Dam D, De Deyn PP, Hassan BA, Kooy RF. 2006. Decreased expression of the GABAA receptor in fragile X syndrome. *Brain Res* **1121**: 238–245.
- Dalmau J, Furneaux HM, Gralla RJ, Kris MG, Posner JB. 1990. Detection of the anti-Hu antibody in the serum of patients with small cell lung cancer--a quantitative western blot analysis. *Ann Neurol* **27**: 544–552.
- Dani C, Blanchard JM, Piechaczyk M, Sabouty El S, Marty L, Jeanteur P. 1984. Extreme instability of myc mRNA in normal and transformed human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 7046–7050.
- Darnell JC, Fraser CE, Mostovetsky O, Darnell RB. 2009. Discrimination of common and unique RNA-binding activities among Fragile X mental retardation protein paralogs. *Hum Mol Genet* **18**: 3164–3177.
- Darnell JC, Fraser CE, Mostovetsky O, Stefani G, Jones TA, Eddy SR, Darnell RB. 2005. Kissing complex RNAs mediate interaction between the Fragile-X mental retardation protein KH2 domain and brain polyribosomes. *Genes Dev* **19**: 903–918.
- Darnell JC, Jensen KB, JIN P, Brown V, Warren ST, Darnell RB. 2001. Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. *Cell* **107**: 489–499.
- Darnell JC, Van Driesche SJ, Zhang C, Hung KYS, Mele A, Fraser CE, Stone EF, Chen C, Fak JJ, Chi SW, et al. 2011. FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. *Cell* **146**: 247–261.
- Davidovic L, Jaglin XH, Lepagnol-Bestel A-M, Tremblay S, Simonneau M, Bardoni B, Khandjian EW. 2007. The fragile X mental retardation protein is a molecular adaptor between the neurospecific KIF3C kinesin and dendritic RNA granules. *Hum Mol Genet* **16**: 3047–3058.
- De Boule K, Verkerk AJ, Reyniers E, Vits L, Hendrickx J, Van Roy B, Van den Bos F, de Graaff E, Oostra BA, Willems PJ. 1993. A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nat Genet* **3**: 31–35.
- De Diego Otero Y, Severijnen L-A, van Cappellen G, Schrier M, Oostra B, Willemsen R. 2002. Transport of fragile X mental retardation protein via granules in neurites of PC12 cells. *Mol Cell Biol* **22**: 8332–8341.
- De Rubeis S, Bagni C. 2010. Fragile X mental retardation protein control of neuronal mRNA metabolism: Insights into mRNA stability. *Mol Cell Neurosci* **43**: 43–50.
- Deguchi M, Iizuka T, Hata Y, Nishimura W, Hirao K, Yao I, Kawabe H, Takai Y. 2000. PAPIN. A novel multiple PSD-95/Dlg-A/ZO-1 protein interacting with neural plakophilin-related armadillo repeat protein/delta-catenin and p0071. *J Biol Chem* **275**: 29875–29880.
- Devys D, Lutz Y, Rouyer N, Bellocq JP, Mandel JL. 1993. The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. *Nat Genet* **4**: 335–340.
- Dicthenberg JB, Swanger SA, Antar LN, Singer RH, Bassell GJ. 2008. A direct role for FMRP in activity-

- dependent dendritic mRNA transport links filopodial-spine morphogenesis to fragile X syndrome. *Dev Cell* **14**: 926–939.
- Dolzanskaya N, Merz G, Aletta JM, Denman RB. 2006. Methylation regulates the intracellular protein-protein and protein-RNA interactions of FMRP. *Journal of Cell Science* **119**: 1933–1946.
- Durston AJ, Timmermans JP, Hage WJ, Hendriks HF, de Vries NJ, Heideveld M, Nieuwkoop PD. 1989. Retinoic acid causes an anteroposterior transformation in the developing central nervous system. *Nature* **340**: 140–144.
- Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N. 2011. miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by “walking” the genes of three genomes. *J Biomed Inform* **44**: 839–847.
- Edbauer D, Neilson JR, Foster KA, Wang C-F, Seeburg DP, Batterton MN, Tada T, Dolan BM, Sharp PA, Sheng M. 2010. Regulation of synaptic structure and function by FMRP-associated microRNAs miR-125b and miR-132. *Neuron* **65**: 373–384.
- Eddy J, Maizels N. 2006. Gene function correlates with potential for G4 DNA formation in the human genome. *Nucleic Acids Res* **34**: 3887–3896.
- Elia LP, Yamamoto M, Zang K, Reichardt LF. 2006. p120 catenin regulates dendritic spine and synapse development through Rho-family GTPases and cadherins. *Neuron* **51**: 43–56.
- Erdélyi M, Michon AM, Guichet A, Glotzer JB, Ephrussi A. 1995. Requirement for *Drosophila* cytoplasmic tropomyosin in oskar mRNA localization. *Nature* **377**: 524–527.
- Etienne-Manneville S, Hall A. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**: 629–635.
- Evans TL, Blice-Baum AC, Mihailescu M-R. 2012. Analysis of the Fragile X mental retardation protein isoforms 1, 2 and 3 interactions with the G-quadruplex forming semaphorin 3F mRNA. *Mol Biosyst* **8**: 642–649.
- Fabian MR, Mathonnet G, Sundermeier T, Mathys H, Zipprich JT, Svitkin YV, Rivas F, Jinek M, Wohlschlegel J, Doudna JA, *et al.* 2009. Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation. *Molecular Cell* **35**: 868–880.
- Fähling M, Mrowka R, Steege A, Kirschner KM, Benko E, Förstera B, Persson PB, Thiele BJ, Meier JC, Scholz H. 2009. Translational regulation of the human achaete-scute homologue-1 by fragile X mental retardation protein. *J Biol Chem* **284**: 4255–4266.
- Feng Y, Absher D, Eberhart DE, Brown V, Malter HE, Warren ST. 1997a. FMRP associates with polyribosomes as an mRNP, and the I304N mutation of severe fragile X syndrome abolishes this association. *Molecular Cell* **1**: 109–118.
- Feng Y, Gutekunst CA, Eberhart DE, Yi H, Warren ST, Hersch SM. 1997b. Fragile X mental retardation protein: nucleocytoplasmic shuttling and association with somatodendritic ribosomes. *J Neurosci* **17**: 1539–1547.
- Ferrari F, Mercaldo V, Piccoli G, Sala C, Cannata S, Achsel T, Bagni C. 2007. The fragile X mental retardation protein-RNP granules show an mGluR-dependent localization in the post-synaptic spines. *Molecular and Cellular Neuroscience* **34**: 343–354.
- Fields AP, Justilien V. 2010. The guanine nucleotide exchange factor (GEF) Ect2 is an oncogene in human cancer. *Adv Enzyme Regul* **50**: 190–200.
- Fifková E, Delay RJ. 1982. Cytoplasmic actin in neuronal processes as a possible mediator of synaptic plasticity. *J Cell Biol* **95**: 345–350.
- Foster R, Hu KQ, Lu Y, Nolan KM, Thissen J, Settleman J. 1996. Identification of a novel human Rho protein with unusual properties: GTPase deficiency and in vivo farnesylation. *Mol Cell Biol* **16**: 2689–2699.

- Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, Verkerk AJ, Holden JJ, Fenwick RG, Warren ST. 1991. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* **67**: 1047–1058.
- Gabus C, Mazroui R, Tremblay S, Khandjian EW, Darlix J-L. 2004. The fragile X mental retardation protein has nucleic acid chaperone properties. *Nucleic Acids Res* **32**: 2129–2137.
- Gantois I, Vandesompele J, Speleman F, Reyniers E, D'Hooge R, Severijnen L-A, Willemsen R, Tassone F, Kooy RF. 2006. Expression profiling suggests underexpression of the GABA(A) receptor subunit delta in the fragile X knockout mouse model. *Neurobiol Dis* **21**: 346–357.
- Gey GO, Coffman WD, Kubicek MT. 1952. Tissue culture studies of the proliferative... - Google Scholar. *Cancer Res*.
- Giraldez AJ, Mishima Y, Rihel J, Grocock RJ, Van Dongen S, Inoue K, Enright AJ, Schier AF. 2006. Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* **312**: 75–79.
- Glisovic T, Bachorik JL, Yong J, Dreyfuss G. 2008. RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Lett* **582**: 1977–1986.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**: 59–74.
- Gross C, Nakamoto M, Yao X, Chan C-B, Yim SY, Ye K, Warren ST, Bassell GJ. 2010. Excess phosphoinositide 3-kinase subunit synthesis and activity as a novel therapeutic target in fragile X syndrome. *J Neurosci* **30**: 10624–10638.
- Haas JS, Zavala B, Landisman CE. 2011. Activity-dependent long-term depression of electrical synapses. *Science* **334**: 389–393.
- Hall A. 1994. Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol* **10**: 31–54.
- Hall A. 2012. Rho family GTPases. *Biochem Soc Trans* **40**: 1378–1382.
- Hall A. 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**: 509–514.
- Hallahan BP, Craig MC, Toal F, Daly EM, Moore CJ, Ambikapathy A, Robertson D, Murphy KC, Murphy DGM. 2011. In vivo brain anatomy of adult males with Fragile X syndrome: an MRI study. *Neuroimage* **54**: 16–24.
- Harel-Sharvit L, Eldad N, Haimovich G, Barkai O, Duek L, Choder M. 2010. RNA polymerase II subunits link transcription and mRNA decay to translation. *Cell* **143**: 552–563.
- Hatzfeld M. 2005. The p120 family of cell adhesion molecules. *Eur J Cell Biol* **84**: 205–214.
- Hatzfeld M, Green KJ, Sauter H. 2003. Targeting of p0071 to desmosomes and adherens junctions is mediated by different protein domains. *Journal of Cell Science* **116**: 1219–1233.
- Hatzfeld M, Nachtsheim C. 1996. Cloning and characterization of a new armadillo family member, p0071, associated with the junctional plaque: evidence for a subfamily of closely related proteins. *Journal of Cell Science* **109** (Pt 11): 2767–2778.
- Hayashi ML, Rao BSS, Seo J-S, Choi H-S, Dolan BM, Choi S-Y, Chattarji S, Tonegawa S. 2007. Inhibition of p21-activated kinase rescues symptoms of fragile X syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 11489–11494.
- Heasman SJ, Ridley AJ. 2008. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 690–701.
- Hernandez RN, Feinberg RL, Vaurio R, Passanante NM, Thompson RE, Kaufmann WE. 2009. Autism

- spectrum disorder in fragile X syndrome: a longitudinal evaluation. *Am J Med Genet A* **149A**: 1125–1137.
- Hinton VJ, Brown WT, Wisniewski K, Rudelli RD. 1991. Analysis of neocortex in three males with the fragile X syndrome. *Am J Med Genet* **41**: 289–294.
- Hou L, Antion MD, Hu D, Spencer CM, Paylor R, Klann E. 2006. Dynamic translational and proteasomal regulation of fragile X mental retardation protein controls mGluR-dependent long-term depression. *Neuron* **51**: 441–454.
- Huang F, Chotiner JK, Steward O. 2005. The mRNA for elongation factor 1alpha is localized in dendrites and translated in response to treatments that induce long-term depression. *J Neurosci* **25**: 7199–7209.
- Huber AH, Nelson WJ, Weis WI. 1997. Three-dimensional structure of the armadillo repeat region of beta-catenin. *Cell* **90**: 871–882.
- Huber KM, Kayser MS, Bear MF. 2000. Role for rapid dendritic protein synthesis in hippocampal mGluR-dependent long-term depression. *Science* **288**: 1254–1257.
- Huber KM, Gallagher SM, Warren ST, Bear MF. 2002. Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 7746–7750.
- Hutchison CA, Phillips S, Edgell MH, Gillam S, Jahnke P, Smith M. 1978. Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. *J Biol Chem* **253**: 6551–6560.
- Hüttelmaier S, Zenklusen D, Lederer M, Dichtenberg J, Lorenz M, Meng X, Bassell GJ, Condeelis J, Singer RH. 2005. Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature* **438**: 512–515.
- Idrissi El A, Ding X-H, Scalia J, Trenkner E, Brown WT, Dobkin C. 2005. Decreased GABA(A) receptor expression in the seizure-prone fragile X mouse. *Neurosci Lett* **377**: 141–146.
- Israely I, Costa RM, Xie CW, Silva AJ, Kosik KS, Liu X. 2004. Deletion of the neuron-specific protein delta-catenin leads to severe cognitive and synaptic dysfunction. *Curr Biol* **14**: 1657–1663.
- Irwin SA, Patel B, Idupulapati M, Harris JB, Crisostomo RA, Larsen BP, Kooy F, Willems PJ, Cras P, Kozlowski PB, *et al.* 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**: 161–167.
- Ishizuka A, Siomi MC, Siomi H. 2002. A Drosophila fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins. *Genes Dev* **16**: 2497–2508.
- Izawa I, Nishizawa M, Tomono Y, Ohtakara K, Takahashi T, Inagaki M. 2002. ERBIN associates with p0071, an armadillo protein, at cell-cell junctions of epithelial cells. *Genes Cells* **7**: 475–485.
- Jacquemont S, Hagerman RJ, Hagerman PJ, Leehey MA. 2007. Fragile-X syndrome and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome: two faces of FMR1. *Lancet Neurol* **6**: 45–55.
- Jaulin-Bastard F, Arsanto J-P, Le Bivic A, Navarro C, Vély F, Saito H, Marchetto S, Hatzfeld M, Santoni M-J, Birnbaum D, *et al.* 2002. Interaction between Erbin and a Catenin-related protein in epithelial cells. *J Biol Chem* **277**: 2869–2875.
- Jin P, Alisch RS, Warren ST. 2004a. RNA and microRNAs in fragile X mental retardation. *Nat Cell Biol* **6**: 1048–1053.
- Jin P, Zarnescu DC, Ceman S, Nakamoto M, Mowrey J, Jongens TA, Nelson DL, Moses K, Warren ST. 2004. Biochemical and genetic interaction between the fragile X mental retardation protein and the microRNA pathway. *Nat Neurosci* **7**: 113–117.
- Johnson EM, Kinoshita Y, Weinreb DB, Wortman MJ, Simon R, Khalili K, Winckler B, Gordon J. 2006. Role of Pur alpha in targeting mRNA to sites of translation in hippocampal neuronal dendrites. *J*

- Neurosci Res* **83**: 929–943.
- Johnston JM, Carroll WL. 1992. c-myc hypermutation in Burkitt's lymphoma. *Leuk Lymphoma* **8**: 431–439.
- Kanai Y, Dohmae N, Hirokawa N. 2004. Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* **43**: 513–525.
- Kao D-I, Aldridge GM, Weiler IJ, Greenough WT. 2010. Altered mRNA transport, docking, and protein translation in neurons lacking fragile X mental retardation protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 15601–15606.
- Keil R, Wolf A, Hüttelmaier S, Hatzfeld M. 2007. Beyond regulation of cell adhesion: local control of RhoA at the cleavage furrow by the p0071 catenin. *Cell Cycle* **6**: 122–127.
- Keil R, Kiessling C, Hatzfeld M. 2009. Targeting of p0071 to the midbody depends on KIF3. *Journal of Cell Science* **122**: 1174–1183.
- Keil R, Schulz J, Hatzfeld M. 2013. p0071/PKP4, a multifunctional protein coordinating cell adhesion with cytoskeletal organization. *Biol Chem* **394**: 1005–1017.
- Khabar KSA. 2007. Rapid transit in the immune cells: the role of mRNA turnover regulation. *J Leukoc Biol* **81**: 1335–1344.
- Khandjian EW, Corbin F, Woerly S, Rousseau F. 1996. The fragile X mental retardation protein is associated with ribosomes. *Nat Genet* **12**: 91–93.
- Kidd AR, Miskowski JA, Siegfried KR, Sawa H, Kimble J. 2005. A beta-catenin identified by functional rather than sequence criteria and its role in Wnt/MAPK signaling. *Cell* **121**: 761–772.
- Kiebler MA, Bassell GJ. 2006. Neuronal RNA granules: movers and makers. *Neuron* **51**: 685–690.
- Kikin O, D'Antonio L, Bagga PS. 2006. QGRS Mapper: a web-based server for predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res* **34**: W676–82.
- Kim E, Sheng M. 2004. PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci* **5**: 771–781.
- Kindler S, Wang H, Richter D, Tiedge H. 2005. RNA transport and local control of translation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 223–245.
- Kiss T. 2002. Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell* **109**: 145–148.
- Klebe RJ, Ruddle FH. 1969. Neuroblastoma: cell culture analysis of a differentiating stem cell system. *J Cell Biol.*
- Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M, *et al.* 2005. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* **37**: 495–500.
- Krichevsky AM, Kosik KS. 2001. Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation-dependent translation. *Neuron* **32**: 683–696.
- Lacoux C, Di Marino D, Boyl PP, Zalfa F, Yan B, Ciotti MT, Falconi M, Urlaub H, Achsel T, Mougin A, *et al.* 2012. BC1-FMRP interaction is modulated by 2'-O-methylation: RNA-binding activity of the tudor domain and translational regulation at synapses. *Nucleic Acids Res* **40**: 4086–4096.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- Laggerbauer B, Ostareck D, Keidel EM, Ostareck-Lederer A, Fischer U. 2001. Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. *Hum Mol Genet* **10**: 329–338.

- Lai D, Sakkas D, Huang Y. 2006. The fragile X mental retardation protein interacts with a distinct mRNA nuclear export factor NXF2. *RNA* **12**: 1446–1449.
- Lee A. 2003. Control of dendritic development by the *Drosophila* fragile X-related gene involves the small GTPase Rac1. *Development* **130**: 5543–5552.
- Lee T, Winter C, Marticke SS, Lee A, Luo L. 2000. Essential roles of *Drosophila* RhoA in the regulation of neuroblast proliferation and dendritic but not axonal morphogenesis. *Neuron* **25**: 307–316.
- Lewis BP, Shih I-H, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. 2003. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* **115**: 787–798.
- Li Z, Van Aelst L, Cline HT. 2000. Rho GTPases regulate distinct aspects of dendritic arbor growth in *Xenopus* central neurons in vivo. *Nat Neurosci* **3**: 217–225.
- Li Z, Zhang Y, Ku L, Wilkinson KD, Warren ST, Feng Y. 2001. The fragile X mental retardation protein inhibits translation via interacting with mRNA. *Nucleic Acids Res* **29**: 2276–2283.
- Liao L, Park SK, Xu T, Vanderklish P, Yates JR. 2008. Quantitative proteomic analysis of primary neurons reveals diverse changes in synaptic protein content in *fmr1* knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 15281–15286.
- Ling S-C, Fahrner PS, Greenough WT, Gelfand VI. 2004. Transport of *Drosophila* fragile X mental retardation protein-containing ribonucleoprotein granules by kinesin-1 and cytoplasmic dynein. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 17428–17433.
- Liu J, Phillips BT, Amaya MF, Kimble J, Xu W. 2008. The *C. elegans* SYS-1 protein is a bona fide beta-catenin. *Dev Cell* **14**: 751–761.
- Liu-Yesucevitz L, Bassell GJ, Gitler AD, Hart AC, Klann E, Richter JD, Warren ST, Wolozin B. 2011. Local RNA translation at the synapse and in disease. *J Neurosci* **31**: 16086–16093.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402–408.
- Lu R, Wang H, Liang Z, Ku L, O'Donnell WT, Li W, Warren ST, Feng Y. 2004. The fragile X protein controls microtubule-associated protein 1B translation and microtubule stability in brain neuron development. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 15201–15206.
- Lu Y, Settleman J. 1999. The role of rho family GTPases in development: lessons from *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol Res Commun* **1**: 87–94.
- Lubs HA. 1969. A marker X chromosome. *Am J Hum Genet* **21**: 231–244.
- Lugli G, Torvik VI, Larson J, Smalheiser NR. 2008. Expression of microRNAs and their precursors in synaptic fractions of adult mouse forebrain. *J Neurochem* **106**: 650–661.
- Luo L. 2000. Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nat Rev Neurosci* **1**: 173–180.
- Luo L. 2002. Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**: 601–635.
- Luo L, Jan LY, Jan YN. 1997. Rho family GTP-binding proteins in growth cone signalling. *Curr Opin Neurobiol* **7**: 81–86.
- Mabuchi I, Hamaguchi Y, Fujimoto H, Morii N, Mishima M, Narumiya S. 1993. A rho-like protein is involved in the organisation of the contractile ring in dividing sand dollar eggs. *Zygote* **1**: 325–331.
- Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A, Obinata T, Ohashi K, Mizuno K, Narumiya S. 1999. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* **285**: 895–898.

- Maghsoodi B, Poon MM, Nam CI, Aoto J, Ting P, Chen L. 2008. Retinoic acid regulates RARalpha-mediated control of translation in dendritic RNA granules during homeostatic synaptic plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 16015–16020.
- Marcotrigiano J, Gingras AC, Sonenberg N, Burley SK. 1999. Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G. *Molecular Cell* **3**: 707–716.
- Martin JP, Bell J. 1943. A PEDIGREE OF MENTAL DEFECT SHOWING SEX-LINKAGE. *J Neurol Psychiatry* **6**: 154–157.
- Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG. 2000. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci* **23**: 649–711.
- Martins-de-Souza D, Gattaz WF, Schmitt A, Rewerts C, Maccarrone G, Dias-Neto E, Turck CW. 2009. Prefrontal cortex shotgun proteome analysis reveals altered calcium homeostasis and immune system imbalance in schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **259**: 151–163.
- Matter C, Pribadi M, Liu X, Trachtenberg JT. 2009. Delta-catenin is required for the maintenance of neural structure and function in mature cortex in vivo. *Neuron* **64**: 320–327.
- Matus A. 2000. Actin-based plasticity in dendritic spines. *Science* **290**: 754–758.
- Mazroui R, Huot M-E, Tremblay S, Boilard N, Labelle Y, Khandjian EW. 2003. Fragile X Mental Retardation protein determinants required for its association with polyribosomal mRNPs. *Hum Mol Genet* **12**: 3087–3096.
- Mazroui R, Huot M-E, Tremblay S, Filion C, Labelle Y, Khandjian EW. 2002. Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression. *Hum Mol Genet* **11**: 3007–3017.
- Meberg PJ, Bamburg JR. 2000. Increase in neurite outgrowth mediated by overexpression of actin depolymerizing factor. *J Neurosci* **20**: 2459–2469.
- Medina M, Marinescu RC, Overhauser J, Kosik KS. 2000. Hemizyosity of delta-catenin (CTNND2) is associated with severe mental retardation in cri-du-chat syndrome. *Genomics* **63**: 157–164.
- Menon L, Mader SA, Mihailescu M-R. 2008. Fragile X mental retardation protein interactions with the microtubule associated protein 1B RNA. *RNA* **14**: 1644–1655.
- Menon L, Mihailescu M-R. 2007. Interactions of the G quartet forming semaphorin 3F RNA with the RGG box domain of the fragile X protein family. *Nucleic Acids Res* **35**: 5379–5392.
- Migaud M, Charlesworth P, Dempster M, Webster LC, Watabe AM, Makhinson M, He Y, Ramsay MF, Morris RG, Morrison JH, *et al.* 1998. Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature* **396**: 433–439.
- Miki T, Smith CL, Long JE, Eva A, Fleming TP. 1993. Oncogene *ect2* is related to regulators of small GTP-binding proteins. *Nature* **362**: 462–465.
- Mili S, Moissoglu K, Macara IG. 2008. Genome-wide screen reveals APC-associated RNAs enriched in cell protrusions. *Nature* **453**: 115–119.
- Miyashiro KY, Beckel-Mitchener A, Purk TP, Becker KG, Barret T, Liu L, Carbonetto S, Weiler IJ, Greenough WT, Eberwine J. 2003. RNA cargoes associating with FMRP reveal deficits in cellular functioning in *Fmr1* null mice. *Neuron* **37**: 417–431.
- Moon SY, Zheng Y. 2003. Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends in Cell Biology* **13**: 13–22.
- Muddashetty RS, Kelić S, Gross C, Xu M, Bassell GJ. 2007. Dysregulated metabotropic glutamate receptor-dependent translation of AMPA receptor and postsynaptic density-95 mRNAs at synapses in a mouse

- model of fragile X syndrome. *J Neurosci* **27**: 5338–5348.
- Muddashetty RS, Nalavadi VC, Gross C, Yao X, Xing L, Laur O, Warren ST, Bassell GJ. 2011. Reversible Inhibition of PSD-95 mRNA Translation by miR-125a, FMRP Phosphorylation, and mGluR Signaling. *Molecular Cell* **42**: 673–688.
- Nakayama AY, Harms MB, Luo L. 2000. Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* **20**: 5329–5338.
- Napoli I, Mercaldo V, Boyl PP, Eleuteri B, Zalfa F, De Rubeis S, Di Marino D, Mohr E, Massimi M, Falconi M, *et al.* 2008. The fragile X syndrome protein represses activity-dependent translation through CYFIP1, a new 4E-BP. *Cell* **134**: 1042–1054.
- Narayanan U, Nalavadi V, Nakamoto M, Pallas DC, Ceman S, Bassell GJ, Warren ST. 2007. FMRP Phosphorylation Reveals an Immediate-Early Signaling Pathway Triggered by Group I mGluR and Mediated by PP2A. *J Neurosci* **27**: 14349–14357.
- Niere F, Wilkerson JR, Huber KM. 2012. Evidence for a fragile X mental retardation protein-mediated translational switch in metabotropic glutamate receptor-triggered Arc translation and long-term depression. *J Neurosci* **32**: 5924–5936.
- Nimchinsky EA, Oberlander AM, Svoboda K. 2001. Abnormal development of dendritic spines in FMR1 knock-out mice. *J Neurosci* **21**: 5139–5146.
- Nobes CD, Hall A. 1995. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**: 53–62.
- Oberle I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, Boue J, Bertheas M, Mandel J. 1991. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* **252**: 1097–1102.
- Ohno H, Hirabayashi S, Iizuka T, Ohnishi H, Fujita T, Hata Y. 2002. Localization of p0071-interacting proteins, plakophilin-related armadillo-repeat protein-interacting protein (PAPIN) and ERBIN, in epithelial cells. *Oncogene* **21**: 7042–7049.
- Otomo T, Otomo C, Tomchick DR, Machius M, Rosen MK. 2005. Structural basis of Rho GTPase-mediated activation of the formin mDia1. *Molecular Cell* **18**: 273–281.
- Ozdinler PH, Erzurumlu RS. 2001. Regulation of neurotrophin-induced axonal responses via Rho GTPases. *J Comp Neurol* **438**: 377–387.
- Park S, Park JM, Kim S, Kim J-A, Shepherd JD, Smith-Hicks CL, Chowdhury S, Kaufmann W, Kuhl D, Ryazanov AG, *et al.* 2008. Elongation factor 2 and fragile X mental retardation protein control the dynamic translation of Arc/Arg3.1 essential for mGluR-LTD. *Neuron* **59**: 70–83.
- Peifer M, Berg S, Reynolds AB. 1994. A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell* **76**: 789–791.
- Penagarikano O, Mulle JG, Warren ST. 2007. The pathophysiology of fragile x syndrome. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **8**: 109–129.
- Pertz O. 2010. Spatio-temporal Rho GTPase signaling - where are we now? *Journal of Cell Science* **123**: 1841–1850.
- Pfeiffer BE, Huber KM. 2009. The state of synapses in fragile X syndrome. *Neuroscientist* **15**: 549–567.
- Plante I, Davidovic L, Ouellet DL, Gobeil L-A, Tremblay S, Khandjian EW, Provost P. 2006. Dicer-derived microRNAs are utilized by the fragile X mental retardation protein for assembly on target RNAs. *J Biomed Biotechnol* **2006**: 64347.
- Pollard TD, Borisy GG. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*

- 112:** 453–465.
- Ponting CP, Schultz J, Milpetz F, Bork P. 1999. SMART: identification and annotation of domains from signalling and extracellular protein sequences. *Nucleic Acids Res* **27**: 229–232.
- Ponzoni M, Lanciotti M. 1990. Retinoic acid rapidly decreases phosphatidylinositol turnover during neuroblastoma cell differentiation. *J Neurochem* **54**: 540–546.
- Price TJ, Flores CM, Cervero F, Hargreaves KM. 2006. The RNA binding and transport proteins stau1 and fragile X mental retardation protein are expressed by rat primary afferent neurons and localize to peripheral and central axons. *Neuroscience* **141**: 2107–2116.
- Prokopenko SN, Saint R, Bellen HJ. 2000. Untying the Gordian knot of cytokinesis. Role of small G proteins and their regulators. *J Cell Biol* **148**: 843–848.
- Raftopoulou M, Hall A. 2004. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* **265**: 23–32.
- Raineri I, Wegmueller D, Gross B, Certa U, Moroni C. 2004. Roles of AUF1 isoforms, HuR and BRF1 in ARE-dependent mRNA turnover studied by RNA interference. *Nucleic Acids Res* **32**: 1279–1288.
- Reiss AL, Abrams MT, Greenlaw R, Freund L, Denckla MB. 1995. Neurodevelopmental effects of the FMR-1 full mutation in humans. *Nat Med* **1**: 159–167.
- Renart J, Reiser J, Stark GR. 1979. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 3116–3120.
- Ren XD, Kiosses WB, Schwartz MA. 1999. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J* **18**: 578–585.
- Ridley AJ, Hall A. 1992. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**: 389–399.
- Rill RL, Hecker KH. 1996. Sequence-specific actinomycin D binding to single-stranded DNA inhibits HIV reverse transcriptase and other polymerases. *Biochemistry* **35**: 3525–3533.
- Roberts RJ, Belfort M, Bestor T, Bhagwat AS, Bickle TA, Bitinaite J, Blumenthal RM, Degtyarev SK, Dryden DTF, Dybvig K, *et al.* 2003. A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Res* **31**: 1805–1812.
- Rose R, Weyand M, Lammers M, Ishizaki T, Ahmadian MR, Wittinghofer A. 2005. Structural and mechanistic insights into the interaction between Rho and mammalian Dia. *Nature* **435**: 513–518.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487–491.
- Samaké S, Smith LC. 1997. Synchronization of cell division in eight-cell bovine embryos produced in vitro: effects of aphidicolin. *Theriogenology* **48**: 969–976.
- Sander EE, van Delft S, Klooster ten JP, Reid T, van der Kammen RA, Michiels F, Collard JG. 1998. Matrix-dependent Tiam1/Rac signaling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *J Cell Biol* **143**: 1385–1398.
- Santoro MR, Bray SM, Warren ST. 2012. Molecular mechanisms of fragile X syndrome: a twenty-year perspective. *Annu Rev Pathol* **7**: 219–245.
- Schaeffer C, Bardoni B, Mandel JL, Ehresmann B, Ehresmann C, Moine H. 2001. The fragile X mental retardation protein binds specifically to its mRNA via a purine quartet motif. *EMBO J* **20**: 4803–4813.
- Scheibe RJ, Wagner JA. 1992. Retinoic acid regulates both expression of the nerve growth factor receptor and sensitivity to nerve growth factor. *J Biol Chem* **267**: 17611–17616.

- Schenck A, Bardoni B, Langmann C, Harden N, Mandel J-L, Giangrande A. 2003. CYFIP/Sra-1 controls neuronal connectivity in *Drosophila* and links the Rac1 GTPase pathway to the fragile X protein. *Neuron* **38**: 887–898.
- Schenck A, Bardoni B, Moro A, BAGNI C, Mandel JL. 2001. A highly conserved protein family interacting with the fragile X mental retardation protein (FMRP) and displaying selective interactions with FMRP-related proteins FXR1P and FXR2P. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 8844–8849.
- Schmidt A, Hall A. 2002. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* **16**: 1587–1609.
- Schröder R, van der Ven PF, Warlo I, Schumann H, Fürst DO, Blümcke I, Schmidt MC, Hatzfeld M. 2000. p0071, a member of the armadillo multigene family, is a constituent of sarcomeric I-bands in human skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* **21**: 577–586.
- Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. 2008. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* **455**: 58–63.
- Settleman J. 1999. Rho GTPases in development. *Prog Mol Subcell Biol* **22**: 201–229.
- Setzer SV, Calkins CC, Garner J, Summers S, Green KJ, Kowalczyk AP. 2004. Comparative analysis of armadillo family proteins in the regulation of a431 epithelial cell junction assembly, adhesion and migration. *J Invest Dermatol* **123**: 426–433.
- Sherman SL, Jacobs PA, Morton NE, Froster-Iskenius U, Howard-Peebles PN, Nielsen KB, Partington MW, Sutherland GR, Turner G, Watson M. 1985. Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum Genet* **69**: 289–299.
- Siomi H, Choi M, Siomi MC, Nussbaum RL, Dreyfuss G. 1994. Essential role for KH domains in RNA binding: impaired RNA binding by a mutation in the KH domain of FMR1 that causes fragile X syndrome. *Cell* **77**: 33–39.
- Siomi MC, Higashijima K, Ishizuka A, Siomi H. 2002. Casein kinase II phosphorylates the fragile X mental retardation protein and modulates its biological properties. *Mol Cell Biol* **22**: 8438–8447.
- Sittler A, Devys D, Weber C, Mandel JL. 1996. Alternative splicing of exon 14 determines nuclear or cytoplasmic localisation of fmr1 protein isoforms. *Hum Mol Genet* **5**: 95–102.
- Song I, Huganir RL. 2002. Regulation of AMPA receptors during synaptic plasticity. *Trends Neurosci* **25**: 578–588.
- Standart N, Jackson RJ. 2007. MicroRNAs repress translation of m7Gppp-capped target mRNAs in vitro by inhibiting initiation and promoting deadenylation. *Genes Dev* **21**: 1975–1982.
- Stefani G, Fraser CE, Darnell JC, Darnell RB. 2004. Fragile X mental retardation protein is associated with translating polyribosomes in neuronal cells. *J Neurosci* **24**: 7272–7276.
- Steward O, Bakker CE, Willems PJ, Oostra BA. 1998. No evidence for disruption of normal patterns of mRNA localization in dendrites or dendritic transport of recently synthesized mRNA in FMR1 knockout mice, a model for human fragile-X mental retardation syndrome. *Neuroreport* **9**: 477–481.
- Stöhr N, Lederer M, Reinke C, Meyer S, Hatzfeld M, Singer RH, Hüttelmaier S. 2006. ZBP1 regulates mRNA stability during cellular stress. *The Journal of Cell Biology* **175**: 527–534.
- Stöhr N, Köhn M, Lederer M, Glass M, Reinke C, Singer RH, Hüttelmaier S. 2012. IGF2BP1 promotes cell migration by regulating MK5 and PTEN signaling. *Genes Dev* **26**: 176–189.
- Striegl H, Andrade-Navarro MA, Heinemann U. 2010. Armadillo motifs involved in vesicular transport. *PLoS ONE* **5**: e8991.
- Sundquist WI, Klug A. 1989. Telomeric DNA dimerizes by formation of guanine tetrads between hairpin

- loops. *Nature* **342**: 825–829.
- Sutcliffe JS, Nelson DL, Zhang F, Pieretti M, Caskey CT, Saxe D, Warren ST. 1992. DNA methylation represses FMR-1 transcription in fragile X syndrome. *Hum Mol Genet* **1**: 397–400.
- Sutherland GR. 1977. Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. *Science* **197**: 265–266.
- Tamanini F, Meijer N, Verheij C, Willems PJ, Galjaard H, Oostra BA, Hoogeveen AT. 1996. FMRP is associated to the ribosomes via RNA. *Hum Mol Genet* **5**: 809–813.
- Tatsumoto T, Xie X, Blumenthal R, Okamoto I, MIKI T. 1999. Human ECT2 is an exchange factor for Rho GTPases, phosphorylated in G2/M phases, and involved in cytokinesis. *J Cell Biol* **147**: 921–928.
- Thomsen R, Lade Nielsen A. 2011. A Boyden chamber-based method for characterization of astrocyte protrusion localized RNA and protein. *Glia* **59**: 1782–1792.
- Todd PK, Mack KJ, Malter JS. 2003. The fragile X mental retardation protein is required for type-I metabotropic glutamate receptor-dependent translation of PSD-95. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 14374–14378.
- Toni N, Teng EM, Bushong EA, Aimone JB, Zhao C, Consiglio A, van Praag H, Martone ME, Ellisman MH, Gage FH. 2007. Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nat Neurosci* **10**: 727–734.
- Vasudevan S, Steitz JA. 2007. AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell* **128**: 1105–1118.
- Verheij C, de Graaff E, Bakker CE, Willemsen R, Willems PJ, Meijer N, Galjaard H, Reuser AJ, Oostra BA, Hoogeveen AT. 1995. Characterization of FMR1 proteins isolated from different tissues. *Hum Mol Genet* **4**: 895–901.
- Verkerk AJ, de Graaff E, De Boulle K, Eichler EE, Konecki DS, Reyniers E, Manca A, Poustka A, Willems PJ, Nelson DL. 1993. Alternative splicing in the fragile X gene FMR1. *Hum Mol Genet* **2**: 1348.
- Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang FP. 1991. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* **65**: 905–914.
- Vickers CA, Stephens B, Bowen J, Arbuthnott GW, Grant SGN, Ingham CA. 2006. Neurone specific regulation of dendritic spines in vivo by post synaptic density 95 protein (PSD-95). *Brain Res* **1090**: 89–98.
- Wakiyama M, Takimoto K, Ohara O, Yokoyama S. 2007. Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes Dev* **21**: 1857–1862.
- Wang H, Dichtenberg JB, Ku L, Li W, Bassell GJ, Feng Y. 2008. Dynamic association of the fragile X mental retardation protein as a messenger ribonucleoprotein between microtubules and polyribosomes. *Mol Biol Cell* **19**: 105–114.
- Wang MJ. 1965. Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J Mol Biol* **13**: 269–282.
- Weiler IJ, Irwin SA, Klintsova AY, Spencer CM, Brazelton AD, Miyashiro K, Comery TA, Patel B, Eberwine J, Greenough WT. 1997. Fragile X mental retardation protein is translated near synapses in response to neurotransmitter activation. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 5395–5400.
- Wells DG. 2006. RNA-binding proteins: a lesson in repression. *J Neurosci* **26**: 7135–7138.
- Westmark CJ, Malter JS. 2007. FMRP mediates mGluR5-dependent translation of amyloid precursor protein. *PLoS Biol* **5**: e52.

- Wildenberg GA, Dohn MR, Carnahan RH, Davis MA, Lobdell NA, Settleman J, Reynolds AB. 2006. p120-catenin and p190RhoGAP regulate cell-cell adhesion by coordinating antagonism between Rac and Rho. *Cell* **127**: 1027–1039.
- Willemsen R, Levenga J, Oostra BA. 2011. CGG repeat in the FMR1 gene: size matters. *Clin Genet* **80**: 214–225.
- Williamson JR, Raghuraman MK, Cech TR. 1989. Monovalent cation-induced structure of telomeric DNA: the G-quartet model. *Cell* **59**: 871–880.
- Wisdom R, Lee W. 1991. The protein-coding region of c-myc mRNA contains a sequence that specifies rapid mRNA turnover and induction by protein synthesis inhibitors. *Genes Dev* **5**: 232–243.
- Wolf A, Keil R, Götzl O, Mun A, Schwarze K, Lederer M, Hüttelmaier S, Hatzfeld M. 2006. The armadillo protein p0071 regulates Rho signalling during cytokinesis. *Nat Cell Biol* **8**: 1432–1440.
- Wong WT, Faulkner-Jones BE, Sanes JR, Wong RO. 2000. Rapid dendritic remodeling in the developing retina: dependence on neurotransmission and reciprocal regulation by Rac and Rho. *J Neurosci* **20**: 5024–5036.
- Wu L, Fan J, Belasco JG. 2006. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 4034–4039.
- Xing L, Bassell GJ. 2013. mRNA localization: an orchestration of assembly, traffic and synthesis. *Traffic* **14**: 2–14.
- Yuste R, Bonhoeffer T. 2004. Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nat Rev Neurosci* **5**: 24–34.
- Zaidel-Bar R, Cohen M, Addadi L, Geiger B. 2004. Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochem Soc Trans* **32**: 416–420.
- Zalfa F, Achsel T, Bagni C. 2006. mRNPs, polysomes or granules: FMRP in neuronal protein synthesis. *Curr Opin Neurobiol* **16**: 265–269.
- Zalfa F, Bagni C. 2005. Another view of the role of FMRP in translational regulation. *Cell Mol Life Sci* **62**: 251–252.
- Zalfa F, Eleuteri B, Dickson KS, Mercaldo V, De Rubeis S, di Penta A, Tabolacci E, Chiurazzi P, Neri G, Grant SGN, *et al.* 2007. A new function for the fragile X mental retardation protein in regulation of PSD-95 mRNA stability. *Nat Neurosci* **10**: 578–587.
- Zalfa F, Giorgi M, Primerano B, Moro A, di Penta A, Reis S, Oostra B, Bagni C. 2003. The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses. *Cell* **112**: 317–327.
- Zhang M, Wang Q, Huang Y. 2007. Fragile X mental retardation protein FMRP and the RNA export factor NXF2 associate with and destabilize Nxf1 mRNA in neuronal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 10057–10062.
- Zhang W, Wagner BJ, Ehrenman K, Schaefer AW, DeMaria CT, Crater D, DeHaven K, Long L, Brewer G. 1993. Purification, characterization, and cDNA cloning of an AU-rich element RNA-binding protein, AUF1. *Mol Cell Biol* **13**: 7652–7665.
- Zhang Y, O'Connor JP, Siomi MC, Srinivasan S, Dutra A, Nussbaum RL, Dreyfuss G. 1995. The fragile X mental retardation syndrome protein interacts with novel homologs FXR1 and FXR2. *EMBO J* **14**: 5358–5366.
- Zheng Y. 2001. Dbl family guanine nucleotide exchange factors. *Trends Biochem Sci* **26**: 724–732.
- Zhong N, Ju W, Nelson D, Dobkin C, Brown WT. 1999. Reduced mRNA for G3BP in fragile X cells:

evidence of FMR1 gene regulation. *Am J Med Genet* **84**: 268–271.

Zhou Z, Reed R. 2003. Purification of functional RNA-protein complexes using MS2-MBP. *Curr Protoc Mol Biol* **Chapter 27**: Unit 27.3.

Zo, Liu J, Zhu N, Lin J, Liang Q, Brown WT, Shen Y, Zhong N. 2008. Identification of FMRP-associated mRNAs using yeast three-hybrid system. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* **147B**: 769–777.

7. Anhang

7.1. Ergänzende Ergebnisse

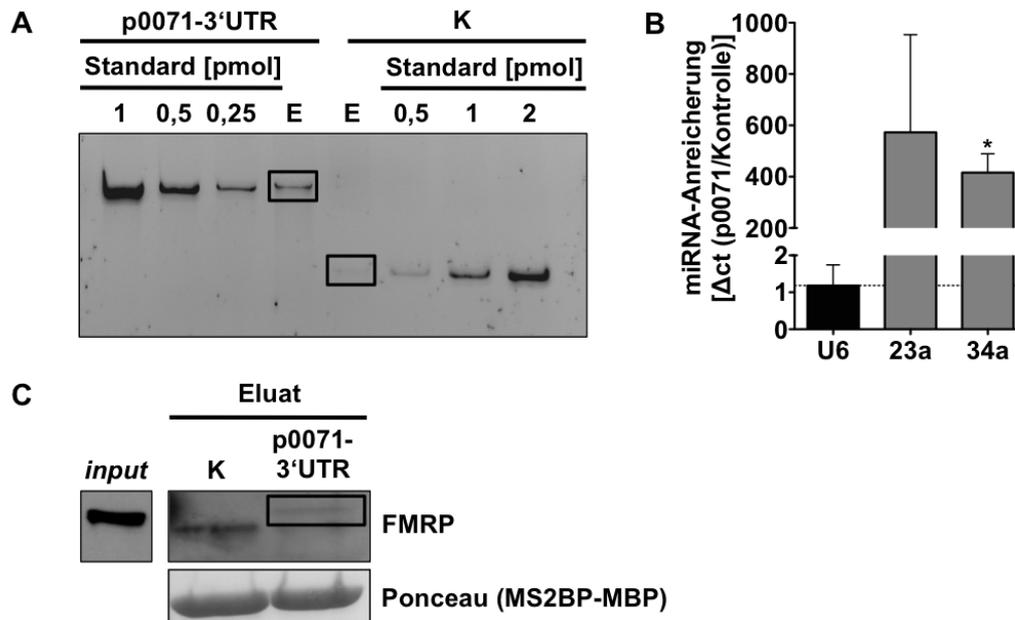


Abb. 7-1: Die miRNAs miR-23a und miR-34a binden zusammen mit FMRP an die p0071-3'UTR. (A - C) miRNA-pull-down mit der p0071-3'UTR. Die *in vitro* transkribierte p0071-3'UTR wurde mittels 4xMS2-loops über ein Fusionsprotein aus Mannose-Binde- und MS2-Bindeprotein an eine Amylosematrix immobilisiert und mit HEK293-Zelllysate inkubiert. Nach intensivem Waschen wurde der Protein-RNA-Komplex mittels Mannose von der Matrix eluiert. Aus 1/5 des Eluats wurde die RNA isoliert und teils mittels (A) Polyacrylamid-Harnstoff-Gel oder (B) TaqMan-q-PCR analysiert. Aus den restlichen 4/5 des Eluats wurden Proteine ausgefällt und mittels (C) SDS-PAGE und Western Blot auf die Co-Präzipitation von FMRP untersucht. (A) Polyacrylamid-Harnstoff-Gel zur Analyse der Eluate (E) von Kontroll-pull-down ((K), nur 4xMS2-loops) und p0071-3'UTR-pull-down. Definierte Mengen an Standards der jeweiligen RNA dienten zur Abschätzung der pull-down-Effizienz. (B) TaqMan-q-PCR zur Identifizierung co-präzipitierter miRNAs. Die Anreicherung wurde nach der $2^{\Delta\Delta ct}$ -Methode zwischen p0071-3'UTR-pull-down und Kontroll-pull-down berechnet. n = 3 ; *, p ≤ 0,05 (C) Western Blot-Analyse des Eluats sowie Ponceau-Färbung der Membran vor Inkubation mit spezifischem FMRP-Antikörper.

7.2. Verwendete Geräte

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden zur Durchführung der gezeigten Experimente die in Tab. 15 aufgelisteten Geräte verwendet.

Tab. 15: Verwendete Geräte

Gerät	Vertrieb
CO ₂ -Inkubator	Heraeus Instruments, Bad Grund, Deutschland
Durchflusszytometer MACS Quant Analyser	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
Kühlzentrifuge Sigma 2-16PK	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland
Kühlzentrifuge Sorvall RC-5B	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Mikroplattenlesegerät Infinite M1000 PRO	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
Mikroskopsystem Nikon Eclipse E600	Nikon, Tokio, Japan
PerfectBlue Semi-Dry Elektrobloetter	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Photometer Genequant 1300	GE Healthcare, München, Deutschland
iQ5-Cycler	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
SDS-PAGE-System Mini-Protean	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Sterilbank Hera Safe	Heraeus Instruments, Bad Grund, Deutschland
Thermocycler T3	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Thermomixer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus Instruments, Bad Grund, Deutschland

7.3. Verwendete Antikörper

Die in dieser Dissertation für Western Blot- (WB) und Immunfluoreszenz-Untersuchungen (IF) verwendeten Primär- und Sekundärantikörper werden in Tab. 16 und in Tab. 17 aufgeführt.

Tab. 16: Liste der verwendeten Primärantikörper

Antikörper	Spezies/Typ	Verdünnung	Vertrieb
anti-p0071	Meerschweinchen, polyklonal	WB 1:4000 IF 1: 3000	Peptide Specialty Laboratories, Heidelberg, Deutschland
anti-p0071	Maus, monoklonal	IF 1:200	Abnova, Taipeh, Taiwan
anti-FMRP	Kaninchen, polyklonal	WB 1:1000	Abcam, Cambridge, UK
anti-FMRP	Maus, monoklonal	WB 1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornien, USA

Antikörper	Spezies/Typ	Verdünnung	Vertrieb
anti-FMRP	Maus, monoklonal	WB 1:1500	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
anti-Vinculin	Maus, monoklonal	WB 1:1000 IF 1:1000	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
anti- α -Tubulin	Maus, monoklonal	WB 1:2000	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
anti- β -Aktin	Maus, monoklonal	WB 1:2000	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
anti-GAPDH	Maus, monoklonal	WB 1:4000	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
anti-GST	Maus, monoklonal	WB 1:4000	Becton, Dickinson and Company, Franklin lakes, New Jersey, USA
anti-RhoA	Maus, monoklonal	WB 1:500	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornien, USA
anti-RhoA	Maus, monoklonal	WB 1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
anti-Rac1	Maus, monoklonal	WB 1:1000	Becton, Dickinson and Company, Franklin lakes, New Jersey, USA
anti-Cdc42	Maus, monoklonal	WB 1:1000	Becton, Dickinson and Company, Franklin lakes, New Jersey, USA
anti-GFP	Kaninchen, polyklonal	WB 1:2000	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA

Tab. 17: Liste der verwendeten Sekundärantikörper

Antikörper	Spezies/Typ	Verdünnung	Vertrieb
anti-Maus HRP	Ziege, polyklonal	WB 1:10000	Dianova, Hamburg, Deutschland
anti-Kaninchen HRP	Esel, polyklonal	WB 1:10000	Dianova, Hamburg, Deutschland
anti-Meerschweinchen HRP	Esel, polyklonal	WB 1:10000	Dianova, Hamburg, Deutschland
anti-Meerschweinchen DyLight 488	Esel, polyklonal	IF 1:250	Dianova, Hamburg, Deutschland
anti-Meerschweinchen Cy3	Esel, polyklonal	IF 1:400	Dianova, Hamburg, Deutschland
anti-Maus DyLight 488	Esel, polyklonal	IF 1:250	Dianova, Hamburg, Deutschland
anti-Maus DyLight 649	Esel, polyklonal	IF 1:250	Dianova, Hamburg, Deutschland

7.4. Verwendete Oligonukleotide

Die folgenden Tabellen bieten eine Übersicht, der für Klonierungen (Tab. 18) und q-PCRs (Tab. 19) verwendeten Oligonukleotide. Vorwärts- (fw) und Rückwärts-Oligonukleotide (rev) sind entsprechend gekennzeichnet.

Tab. 18: Liste der zu Klonierungen verwendeten Oligonukleotide

Name	Sequenz 5' - 3'
p0071-shRNA#3 fw	GATCCAGGAGCTTCAGTTTCAACGTTCAAGAGACGTTGAAACTGA AGCTCCTTTTTTTACGCGTG
p0071-shRNA#3 rev	AATTCACGCGTAAAAAAGGAGCTTCAGTTTCAACGTCTCTTGAA CGTTGAAACTGAAGCTCCTG
FMRP fw	CTGAATTCGCCATGGAGGAGCTGGTGGTGGGAAG
FMRP rev	CACTCGAGTTAGGGTACTCCATTACCAGCGG
FMRP S499A fw	GAAGCATCAAATGCTGCTGAAACAGAATCTGACCACAGAGAC
FMRP S499A rev	GTCTCTGTGGTCAGATTCTGTTTCAGCAGCATTGATGCTTC
OligodT	TTTTTTTTTTTTTTTTTT
Rac1 fw	CTGAATTCGCCATGCAGGCCATCAAG
Rac1 rev	CAGTCGACTTACAACAGCAGGCATTT
RhoA fw	AAAGAATTCGCCATGGCTGCCATC
RhoA rev	TTTGTCGACGTTCTGTTCCGTGGG
p0071 3'UTR fw	AAGAATTCATCAAGATGCCCAACAG
p0071 3'UTR rev (+PolyA)	CACTCGAGCCAAGGATGAAATTTCCACATT
p0071 3'UTR rev (-PolyA)	CACTCGAGTTTCTTTTATGTGAATAGAAAA
p0071-3'UTR-(3840 – 4109)-Fragment-I fw	AAGAATTCATCAAGATGCCCAACAGAGG
p0071-3'UTR-(3840 – 4109)-Fragment-I rev	CACTCGAGTCTCAAACCTCTCATCACGTCACC
p0071-3'UTR-(4053 – 4320)-Fragment-II fw	AAGAATTCATTATAGATTCTGTAGTCTGGTGAAGG
p0071-3'UTR-(4053 – 4320)-Fragment-II rev	CACTCGAGCTTAACCAATGTGGCATTTCATATTT
p0071-3'UTR-(4270 – 4587)-Fragment-III fw	AAGAATTCCTTGAAATTTCTTTTGTGGTGTAAATATGGA
p0071-3'UTR-(4270 – 4587)-Fragment-III rev	CACTCGAGCCAAGGATGAAATTTCCACAT
p0071-3'UTR-(4053- 4150)-Fragment-II-A rev	CACTCGAGTTTGATTTGACCTACATATCCC
p0071-3'UTR-(4127- 4239)-Fragment-II-B fw	AAGAATTCGGGGGATATGTAGGTCAAATCAAATTTAAA
p0071-3'UTR-(4127- 4239)-Fragment-II-B rev	CACTCGAGAATAGCAATAAAACATGGGCAT

Name	Sequenz 5' - 3'
p0071-3'UTR-(4226-4320)-Fragment-II-C fw	AAGAATTTCGTTTTATTGCTATTACTAAATGTCAAGATTAG
FMRP-N19 fw	TTTTGAATTCGGAATGGGTCGAGGTAGTAGACC
FMRP-N19 rev	TTTTCTCGAGTTAGGGTACTCCATTCACCAGCGG

Tab. 19: Liste der für q-PCRs verwendeten Oligonukleotide

Name	Sequenz 5' - 3'
Cyclophilin A fw (Maus)	TCATGTGCCAGGGTGGTGACT
Cyclophilin A rev (Maus)	GGACCCAAAACGCTCCATGGCT
RPLP0 fw (Maus)	TTCCCACTTACTGAAAAGGTCAAGGC
RPLP0 rev (Maus)	GCGGTTTTGCTTTTTTCATCCTGCT
c-myc fw (Maus)	TCCTGTACCTCGTCCGATTC
c-myc rev (Maus)	GGTTTGCCTCTTCTCCACAG
FMRP fw (Maus)	TCCCTGCAGAGTGCCTCCAGT
FMRP rev (Maus)	TGCCCTGTGCCATCTTGCT
p0071 IsoformA fw (Maus)	CATCATTCAAGTCAGTTGG
p0071 IsoformA rev (Maus)	AACTCGGTCATCACAATAAG
RhoA fw (Maus)	GCCAAAATGAAGCAGGAGCCGGT
RhoA rev (Maus)	ACCGCATGAGGCTGCGTTCA
ECT2 fw (Maus)	TACCAGTTGGGGATGAAAGG
ECT2 rev (Maus)	GAGAAAGCAGAGACACCGATT
Arc fw (Maus)	GCTCCCCTCCCAGGGGTGAG
Arc rev (Maus)	CAGCAGCCTTGAGACCTGGTGT
Sod1 fw (Maus)	GGCGATGAAAGCGGTGTGCG
Sod1 rev (Maus)	CCGCTTGCCTTCTGCTCGAAGT
KIF3c fw (Maus)	TGCTTGCAGCCAAGTACAAG
KIF3c rev (Maus)	CTGTGCTTCAGTTCCAACA
KIF5a fw (Maus)	GGGACGACAGCGTCATTATT
KIF5a rev (Maus)	GGACGTCTTTGACGATCTGC
FFL fw	GAATCCATCTTGCTCCAACAC
FFL rev	TTCGTCCACAAACACAACCTC
RPLP0 fw (Mensch)	GGCGACCTGGAAGTCCAACCT
RPLP0 rev (Mensch)	CCATCAGCACCACAGCCTTC
Cyclophilin A fw (Mensch)	GTCAACCCACCGTGTCTCT
Cyclophilin A rev (Mensch)	CTGCTGTCTTTGGGACCTTGT

7.5. Verwendete Plasmide und siRNAs

Die in Tab. 20 aufgeführten Plasmide wurden von den angegebenen Firmen oder Personen bezogen. Hingegen wurden die in Tab. 21 zusammengestellten Plasmide selbst kloniert, entweder aus cDNA oder durch Umklonierung aus anderen, bereits vorhandenen Plasmiden. In Tab. 22 sind alle verwendeten siRNAs aufgeführt.

Tab. 20: Liste der verwendeten Plasmide

Plasmid	exprimiertes Protein	Herkunft
pEGFP-C2	EGFP	Becton, Dickinson and Company, Franklin lakes, New Jersey, USA
pGEX5.1	GST	GE Healthcare, München, Deutschland
pcDNA3.1-FFL	<i>firefly</i> -Luciferase	HÜTTELMAIER <i>et al.</i> , 2005
pRL-CMV	<i>Renilla reniformis</i> -Luciferase	Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA
pLVX-puro	-	Clontech, Mountain View, Kalifornien, USA
pLVX-puro-(new MCS)-EGFP	EGFP	STÖHR <i>et al.</i> , 2012
pLVX-puro-(new MCS)-EGFP-CMV TO	EGFP	STÖHR <i>et al.</i> , 2012
pLVX-shRNA1	-	Clontech, Mountain View, Kalifornien, USA
FMRP-wt-pEGFP-C1	FMRP-wt-EGFP	S. Hüttelmaier
p0071-wt-pEGFP-C1	p0071-wt-EGFP	WOLF <i>et al.</i> , 2006
pcDNA3.1-4xMS2-loops	-	S. Hüttelmaier
pcDNA3.1zeo-24xMS2-loops	-	STÖHR <i>et al.</i> , 2006
pcDNA3.1-Luc-6xMS2-loops	FFL	STÖHR <i>et al.</i> , 2006
pcDNA3.1-GFP-NLS-HA-MS2BP	GFP-MS2BP	STÖHR <i>et al.</i> , 2006
MS2BP-MBP-pMAL5	MS2BP-MBP	ZHOU and REED, 2003

Tab. 21: Liste der klonierten Plasmide

Plasmid	exprimiertes Protein	Herkunft des Fragments	Restriktions-schnittstellen
FMRP-S499A-pEGFP-C1	FMRP-S499A-EGFP	FMRP-wt-pEGFP-C1	SacI/EcoRI
RhoA-wt-pEGFP-C2	RhoA-wt-EGFP	cDNA	EcoRI/SalI
RhoA-DA-(Q63L)-pEGFP-C2	RhoA-DA-(Q63L)-EGFP	cDNA	EcoRI/SalI
RhoA-DN-(T19N)-pEGFP-C2	RhoA-DN-(T19N)-EGFP	cDNA	EcoRI/SalI

Plasmid	exprimiertes Protein	Herkunft des Fragments	Restriktions-schnittstellen
Rac1-wt-pEGFP-C2	Rac1-wt-EGFP	cDNA	EcoRI/SalI
Rac1-DA-pEGFP-C2	Rac1-DA-EGFP	cDNA	EcoRI/SalI
Rac1-DN-pEGFP-C2	Rac1-DN-EGFP	cDNA	EcoRI/SalI
p0071-3'UTR-(-PolyA)-TOPO	-	cDNA	EcoRI/XhoI
p0071-3'UTR-(+PolyA)-TOPO	-	cDNA	EcoRI/XhoI
p0071-3'UTR-(-PolyA)-4xMS2-Loops	-	p0071-3'UTR-(-PolyA)-TOPO	EcoRI/XhoI
p0071-3'UTR-(+PolyA)-FFL-pcDNA.3.1	FFL	p0071-3'UTR-(+PolyA)-TOPO	EcoRI/XhoI
p0071-shRNA#3-pLVX-shRNA1	-	Oligos	BamHI/EcoRI
pcDNA3.1zeo-p0071-3'UTR-(+PolyA)-24xMS2-Loops-	-	p0071-3'UTR-(+PolyA)-TOPO	EcoRI/XhoI
pLVX-puro-(new MCS)-FMRP-(wt)-EGFP-CMV TO	FMRP-(wt)-EGFP	cDNA	EcoRI/XhoI
p0071-3'UTR-(3840-4109)-Frag-I-FFL-pcDNA3.1	FFL	cDNA	EcoRI/XhoI
p0071-3'UTR-(4053-4320)-Frag-II-FFL-pcDNA3.1	FFL	cDNA	EcoRI/XhoI
p0071-3'UTR-(4270-4587)-Frag-III-FFL-pcDNA3.1	FFL	cDNA	EcoRI/XhoI
p0071-3'UTR-(4053-4150)-Fragment-II-A-FFL-pcDNA3.1	FFL	cDNA	EcoRI/XhoI
p0071-3'UTR-(4127-4239)-Fragment-II-B-FFL-pcDNA3.1	FFL	cDNA	EcoRI/XhoI
p0071-3'UTR-(4226-4320)-Fragment-II-C-FFL-pcDNA3.1	FFL	cDNA	EcoRI/XhoI
FMRP-N19-4xMS2-loops	-	FMRP-wt-pEGFP-C1	EcoRI/XhoI

Tab. 22: Liste der verwendeten siRNAs

siRNA	Sequenz 5' - 3'
p0071#5	CAUUCUGGAUGGAAGAACUCUdTdT
p0071#7	CCCUCGCUCUGAAUACGAUdTdT
FMRP	GUGAUGAAGUUGAGGUUUAdTdT
KIF3C	GCUCAAGUACCUCAUCAUUdTdT
KIF5A	GCAGAAGAUCUCCUUUCUUdTdT
Kontrolle	UGC GCUAGGCCUCGGUUGCdTdT

7.6. Verwendete FISH-Sonden

Die in Tab. 23 aufgeführten Sonden für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung sind spezifisch für Transkript Variante 2 der codierenden murinen p0071-Sequenz (NM_175464) und sind Quasar570-markiert.

Tab. 23: Liste der eingesetzten p0071-mRNA-FISH-Sonden

Sonde #	Sequenz 5' - 3'	Position
1	AAGCTAGAATAGTGGTGGCT	99
2	TTGAAACTGAAGCTCCTGCT	128
3	AATCTGCCTTTCCACTTCCA	164
4	ATCTTTCTAGCTGACTGGCA	186
5	TTTTCAGTTGAGCTGGTGCT	238
6	CATCTGTTGATCTCCAAGGA	264
7	TTTGCTCACACCAGGATTTG	287
8	GTTGGGATGAATAGTGTCAG	317
9	AGTCTGTTCTGGTGAGTAGA	374
10	ATCCCTCACTTTCATGGAGA	396
11	CCCCTGTCAGAGTAAGAAT	449
12	TTTGGCTGTTGTGGAAACTC	483
13	ATCCTGTGAATGGATGCTGT	525
14	CTCACCACATGGTTACTTGT	547
15	TTGTCCTTCAGCTCTTGAAG	569
16	ATTGGCTACTGATGGCTGAA	596
17	ACTGAACTAACTCTCCGCAT	622
18	AAGGAGACTGTGCTCTAGAT	645
19	TACCCAGAGAAGTTCTCAGT	705
20	TCACTGATGGAGAGCCAAAT	729
21	AACAGTCCTTTGCAGTGAAG	1052
22	GTCCAAATTGGTCCATGTCA	1074
23	GGTGGAACCATCCTTTCATA	1111
24	TATGCTGACTGGCATAGGAA	1161
25	TAGGAGTGATGTGCAAGTCA	1218
26	TAGTAGGTCCCTCCCTTCATA	1240
27	ATACAATGCTGTCTGTGACC	1307
28	TTCCAATACCTACTGAGCCT	1332
29	TTGGTATGTAAGGGTGCTTC	1376
30	CTGTGTTCAAGGCATAGTTA	1401
31	TATAGCTGCACTCTTGGACT	1461
32	TATTGATGGGGATCTTGTGG	1517
33	ATGTGAATGACTTCTGGCAG	1585

Sonde #	Sequenz 5' - 3'	Position
34	TTGTCAACCAAGCACAGATG	1657
35	GTACACCTCCATCTTCACTT	1679
36	TTCTGAACTTCCAACACCCT	1741
37	AAACACAAGGTTTCGAAGGG	1775
38	CACCAACGTTCTTCATTGCT	1821
39	TTCTTAACAGTCGCAGCAAG	1851
40	CCTTACTTCTGCATCAATGG	1874
41	AAAGAACCCCTGTAACAAGC	1896
42	CAGCATCACACGAAGATAGA	1920
43	CGTCTCGAATGATTGTCATC	1944
44	GTGTTGGTTAAGGTTGAGAG	1966
45	CCAACCAGAATGTGGAACTA	1991
46	GAACCAGTGAGGTCTGAAAT	2046
47	TTTGTTTTCGTGCTTCCTCC	2109
48	ATCACATACAACAGCGAGTC	2152

7.7. Verwendete Kit-Systeme

Tab. 24: Liste der verwendeten Kit-Systeme

Kit-System	Vertrieb
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up System	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoBond Xtra EF Midi Purification System	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA
RiboMAX Large Scale RNA Production System	Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA
MEGAclear Kit	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
Dual Glo Luciferase Assay System	Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA
Lenti-X Lentiviral Expression System	Clontech, Mountain View, Kalifornien, USA
Lenti-X Concentrator	Clontech, Mountain View, Kalifornien, USA
TaqMan MicroRNA Assays	Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA

7.8. Abkürzungsverzeichnis

A	<u>A</u> lanin
ADP	<u>A</u> denosindiphosphat
AMV	<u>A</u> vian <u>M</u> yeloblastosis <u>V</u> irus

APRA	<i>antibody-positioned RNA amplification</i>
APS	<u>A</u> mmoniumpersulfat
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat
BSA	<u>B</u> ovines <u>S</u> erum <u>a</u> lbumin
Cdc42	<i>Cell division cycle 42</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
Da	<u>D</u> alton
DABCO	1,4- <u>D</u> iazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	4',6- <u>D</u> iamidin-2-phenylindol
DEPC	<u>D</u> iethylpyrocarbonat
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	<u>D</u> esoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	<u>D</u> ithiothreitol
ECT2	<i>epithelial cell transforming sequence 2 oncogene</i>
EDTA	<u>E</u> thylendiamintetraazetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> , Fetales Kälberserum
FISH	<u>F</u> luoreszenz- <i>in-situ</i> - <u>H</u> ybridisierung
FMRP	<i>Fragile X Mental Retardation Protein</i>
FXRP	<i>Fragile X-Related Protein</i>
FXS	<u>F</u> ragiles- <u>X</u> - <u>S</u> yndrom
g	Erdbeschleunigung, Zentrifugalkraft
GAP	<u>G</u> TPase activating protein
GDI	<i>guanin nucleotide dissociation inhibitor</i>
GDP	<u>G</u> uanosindiphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GET	<u>G</u> lukose- <u>E</u> DTA- <u>T</u> ris-Puffer
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GST	<u>G</u> lutathion- <u>S</u> - <u>T</u> ranferase
GTP	<u>G</u> uanosintriphosphat
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HEPES	2-(4-(2- <u>H</u> ydroxyethyl)-1-piperazinyl)- <u>e</u> thansulfonsäure
I	<u>I</u> soleucin
IPTG	<u>I</u> sopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
KO	<i>knockout</i>
LB	lysogeny broth

MLB	<u>Mg</u> ²⁺ <u>L</u> ysis/ <u>W</u> ash <u>B</u> uffer
mRNA	<u>m</u> essenger <u>R</u> NA
mRNP	<u>m</u> essenger <u>r</u> ibonucleoprotein <u>p</u> article
N	Asparagin
OD	optische <u>D</u> ichte
PBS	<u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline
PBSE	<u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline <u>E</u> DTA
PDZ	<u>P</u> SD-95/ <u>D</u> lg/ <u>Z</u> O-1
PFA	<u>p</u> ara- <u>F</u> ormaldehyd
pH	<u>p</u> otentia <u>H</u> ydrogenii
PSD-95	<u>p</u> ost <u>s</u> ynaptic <u>d</u> ensity 95
Rac1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RhoA	<i>Ras homolog gene family, member A</i>
RNA	<u>r</u> ibonucleic <u>a</u> cid, Ribonukleinsäure
rpm	<u>r</u> ounds <u>p</u> er <u>m</u> inute
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
S	<u>S</u> erin
SDS	<u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate, Natriumlaurylsulfat
shRNA	<u>s</u> hort <u>h</u> airpin <u>R</u> NA
siRNA	<u>s</u> mall <u>i</u> nterfering <u>R</u> NA
TBE	<u>T</u> ris- <u>B</u> orat- <u>E</u> DTA-Puffer
TBS	<u>T</u> ris- <u>B</u> uffered <u>S</u> aline
TBST	<u>T</u> ris- <u>B</u> uffered <u>S</u> aline <u>T</u> ween-20
TEMED	<u>T</u> etramethylethylendi <u>a</u> min
Tris	<u>T</u> ris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<u>u</u> nits
ÜN	<u>ü</u> ber <u>N</u> acht
UTP	<u>U</u> ridintriphosphat
UTR	<u>u</u> ntranslatierte <u>R</u> egion
v/v	<u>v</u> olume <u>p</u> er <u>v</u> olume
w/v	<u>w</u> eight <u>p</u> er <u>v</u> olume
WT	<u>W</u> ildtyp
YT	<u>y</u> east <u>e</u> xtract and <u>t</u> ryptone

7.9. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Schematische Übersicht über das Fragile X mental retardation 1-Gen (<i>Fmr1</i>).....	3
Abb. 1-2: Schematische Darstellung der von FMRP erkannten RNA-Strukturen.....	6
Abb. 1-3: Schematische Darstellung von drei Modellen zur FMRP-vermittelten Translationsrepression.	12

Abb. 1-4: Schematisches Funktionsmodell von FMRP in Neuronen.	16
Abb. 1-5: Der Rho-GTPase Zyklus.	18
Abb. 3-1: <i>Fmr1</i> ⁻ -Zellen exprimieren kein FMRP.	57
Abb. 3-2: Der Verlust von FMRP verändert die Morphologie und die Aktinzytoskelett-Organisation von <i>Fmr1</i> ⁻ -Zellen drastisch.	58
Abb. 3-3: Die Anzahl der Fokalkontakte ist in <i>Fmr1</i> ⁻ -Zellen deutlich reduziert.	60
Abb. 3-4: In <i>Fmr1</i> ⁻ -Zellen ist das F-Aktin/G-Aktin-Verhältnis sowie die Zellgröße im Vergleich zu <i>Fmr1</i> ⁺ -Zellen reduziert.	61
Abb. 3-5: Die Re-Expression von FMRP revertiert in den <i>Fmr1</i> ⁻ -Zellen den Phänotyp.	63
Abb. 3-6: Die FMRP-Expression in <i>Fmr1</i> ⁻ -Zellen erhöht das F-Aktin/G-Aktin-Verhältnis, die relative Anzahl an Fokalkontakten sowie die relative Zellgröße.	64
Abb. 3-7: Die <i>steady-state</i> -Protein- und mRNA-Mengen von Mitgliedern des Rho-Signalwegs in <i>Fmr1</i> ⁺ - und <i>Fmr1</i> ⁻ -Zellen differieren stark.	66
Abb. 3-8: Die p0071-mRNA co-präzipitiert mit FMRP in <i>Fmr1</i> ⁺ -Zellen.	68
Abb. 3-9: Die p0071- und RhoA-mRNA co-präzipitieren mit FMRP in HEK293-Zellen.	69
Abb. 3-10: FMRP beeinflusst die p0071-mRNA-Stabilität nicht, aber stabilisiert die RhoA-mRNA.	70
Abb. 3-11: FMRP kann durch die p0071-3'UTR aus HEK293-Zelllysaten präzipitiert werden.	71
Abb. 3-12: FMRP reprimiert die p0071-Expression in <i>Fmr1</i> ⁺ -Zellen.	73
Abb. 3-13: Die p0071-mRNA ist in <i>Fmr1</i> ⁻ -Zellen stärker in die polysomalen Fraktionen verschoben.	75
Abb. 3-14: FMRP reguliert die Translation der p0071-mRNA über eine Bindung an den zentralen Bereich der p0071-3'UTR.	77
Abb. 3-15: Der zentrale Bereich der p0071-3'UTR weist sowohl G- als auch U-reiche Sequenzabschnitte auf.	78
Abb. 3-16: Der zentrale Bereich der p0071-3'UTR kann von FMRP erkannte Struktur motive bilden, G-Quadruplexe und den „kissing complex“.	79
Abb. 3-17: FMRP bindet mit hoher Wahrscheinlichkeit über zwei verschiedene RNA-Struktur motive an den zentralen Bereich der p0071-3'UTR.	80
Abb. 3-18: FMRP bindet an zwei kurze Sequenzabschnitte in der p0071-3'UTR.	81
Abb. 3-19: Die p0071-3'UTR besitzt G-Quadruplexe in den G-reichen Sequenzabschnitten.	82
Abb. 3-20: Eine nicht-phosphorylierbare FMRP-Mutante kann die Translation der p0071-mRNA nicht reprimieren.	84
Abb. 3-21: Die lentivirale Überexpression und der knockdown von p0071 in <i>Fmr1</i> ⁺ - bzw. <i>Fmr1</i> ⁻ -Zellen war erfolgreich.	85
Abb. 3-22: Die Überexpression und der knockdown von p0071 führen zum <i>Fmr1</i> ⁺ - und <i>Fmr1</i> ⁻ -Phänotyp.	86
Abb. 3-23: p0071-Überexpression und knockdown führen zu einer Verringerung bzw. Erhöhung des F-Aktin/G-Aktin-Verhältnisses.	87
Abb. 3-24: Die FMRP-S499A-Mutante ist nicht in der Lage, den <i>Fmr1</i> ⁻ -Phänotyp zu revertieren.	88
Abb. 3-25: FMRP vermittelt die Lokalisation der p0071-mRNA in die Filopodien von <i>Fmr1</i> ⁺ -Zellen.	89
Abb. 3-26: Schematische Darstellung des Rho-GTPase-Aktivitätstests für die Präzipitation von aktivem RhoA, Rac1 und Cdc42 aus Zelllysaten.	91

Abb. 3-27: Mit dem <i>in-vitro</i> -Testsystem werden ausschließlich dominant aktive Rho-GTPase-Mutanten präzipitiert.	92
Abb. 3-28: Die Aktivität der kleinen Rho-GTPasen differiert zwischen <i>Fmr1</i> ^{+/+} - und <i>Fmr1</i> ^{-/-} -Zellen stark...	93
Abb. 3-29: Die Überexpression von RhoA-Mutanten hat starken Einfluss auf die Phänotypen von <i>Fmr1</i> ^{+/+} - und <i>Fmr1</i> ^{-/-} -Zellen.	94
Abb. 3-30: Die Überexpression von Rac1-Mutanten hat starken Einfluss auf die Phänotypen von <i>Fmr1</i> ^{+/+} - und <i>Fmr1</i> ^{-/-} -Zellen.	96
Abb. 3-31: Die p0071-mRNA lokalisiert in den Wachstumskegeln und an Verzweigungspunkten von Neuriten in Neuro-2a-Zellen.	98
Abb. 3-32: Die p0071-mRNA lokalisiert in differenzierten Neuronen an den Wachstumskegeln und Verzweigungspunkten der Neuriten.	99
Abb. 3-33: Die p0071-mRNA lokalisiert in Abhängigkeit von KIF3C in den Wachstumskegeln von neuronalen Zellen.	101
Abb. 3-34: Das p0071-Protein lokalisiert vorwiegend in Wachstumskegeln und in Bereichen hoher F-Aktin-Dichte der Neuriten in neuronalen Zellen.	102
Abb. 3-35: p0071 und FMRP regulieren das Neuritenwachstum in Neuro-2a-Zellen in antagonistsicher Weise.	104
Abb. 3-36: FMRP und p0071 beeinflussen die Neuritenlänge und den Grad der Neuritenverzweigung in Neuro-2a-Zellen gegensätzlich.	105
Abb. 4-1: Schematisches Modell zur Regulation der Aktinzytoskelett-Reorganisation mittels FMRP und p0071.	123
Abb. 7-1: Die miRNAs miR-23a und miR-34a binden zusammen mit FMRP an die p0071-3'UTR.	I

7.10. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Validierte FMRP-Zieltranskripte ^a	5
Tab. 2: Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme.	24
Tab. 3: Verwendete eukaryontische Zelllinien.	25
Tab. 4: Reaktionsansatz I für RT-PCR.	27
Tab. 5: Reaktionsansatz II für RT-PCR.	27
Tab. 6: Standardbedingungen für SYBR Green I-q-PCR.	29
Tab. 7: Reaktionsansatz für die miRNA RT-PCR.	31
Tab. 8: MasterMix für TaqMan-q-PCR.	31
Tab. 9: Reaktionsansätze für Restriktionsverdau.	33
Tab. 10: Ansatz für die Ligation.	34
Tab. 11: Reaktionsansatz zur radioaktiven Markierung von Oligonukleotiden.	37
Tab. 12: Reaktionsansätze zur Oligonukleotid-Anlagerung.	38
Tab. 13: Ansätze für die Extensionsreaktion.	38
Tab. 14: Ansatz für die Kalziumphosphat-Transfektion in 10 cm-Schale.	53
Tab. 15: Verwendete Geräte.	II
Tab. 16: Liste der verwendeten Primärantikörper.	II

Tab. 17: Liste der verwendeten Sekundärantikörper	III
Tab. 18: Liste der zu Klonierungen verwendeten Oligonukleotide	IV
Tab. 19: Liste der für q-PCRs verwendeten Oligonukleotide.....	V
Tab. 20: Liste der verwendeten Plasmide	VI
Tab. 21: Liste der klonierten Plasmide	VI
Tab. 22: Liste der verwendeten siRNAs	VII
Tab. 23: Liste der eingesetzten p0071-mRNA-FISH-Sonden	VIII
Tab. 24: Liste der verwendeten Kit-Systeme.....	IX

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ich danke...

Frau Prof. Dr. Mechthild Hatzfeld für die Überlassung dieses spannenden Themas sowie die Gewährung des nötigen Freiraums bei der Bearbeitung und die gute Betreuung.

der gesamten Arbeitsgruppe Hatzfeld für die angenehme Arbeitsatmosphäre und jederzeit unkomplizierte Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. Elmar Wahle und Herrn Prof. Dr. Michael Kiebler für die Übernahme der Begutachtung dieser Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier für die hilfreichen Diskussionen zum Fortgang des Projekts und die Überlassung zahlreicher Plasmide.

der gesamten Arbeitsgruppe Hüttelmaier für die freundliche Aufnahme während meines dortigen „Forschungsaufenthalts“ und die Unterstützung bei der Durchführung von Experimenten.

Dr. Christiane Harnisch für die Hilfe bei der Dichtegradientenzentrifugation.

meiner Familie, vor allem meinen Eltern für ihren jahrelangen Rückhalt und ihre Unterstützung - ohne sie hätte ich nur halb so viel erreicht.

Curriculum Vitae

Persönliche Angaben

Alexander Nolze
geboren am 13.07.1982 in Querfurt
deutsche Staatsangehörigkeit
ledig

Werdegang

1989 – 1993	Grundschule Obhausen, Obhausen
1993 – 2002	Gymnasium Querfurt, Querfurt Abschluss: Abitur, 2002
2002 – 2003	Grundwehrdienst in Dillingen (Donau), Wildflecken (Rhön) und Halle (Saale)
2003 – 2008	Studium der Biochemie (Diplom), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale) Abschluss: Diplom, 2008
2007 – 2008	Diplomarbeit am Institut für Pathophysiologie, Sektion Pathobiochemie, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Mechthild Hatzfeld, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale)
2008 – 2012	Anfertigung der Dissertation am Institut für Molekulare Medizin, Sektion Pathobiochemie, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Mechthild Hatzfeld, Martin-Luther-Universität Halle- Wittenberg, Halle (Saale)

Publikationsliste

Alexander Nolze, Jacqueline Schneider, René Keil, Marcell Lederer, Stefan Hüttelmaier, Michael M. Kessels, Britta Qualmann and Mechthild Hatzfeld "FMRP regulates actin filament organization via the armadillo protein p0071". RNA. 2013 Nov;19(11):1483-96. doi: 10.1261/rna.037945.112. Epub 2013 Sep 23.

Vorträge

Alexander Nolze, „The function of p0071 in neuronal cells“, Retreat des GRK1591 „Posttranscriptional control of gene expression: mechanisms and role in pathogenesis“, 10.03.2011, Oppurg

Alexander Nolze, „The regulation of p0071 by FMRP“, Workshop des SFB610 „Protein-Zustände mit zellbiologischer und medizinischer Relevanz“, 18.11.2011, Oppurg

Alexander Nolze, „The regulation of p0071 by FMRP“, Retreat des GRK1591 „Posttranscriptional control of gene expression: mechanisms and role in pathogenesis“, 17.02.2012, Oppurg

Alexander Nolze, „FMRP regulates actin organization via the armadillo protein p0071“, Retreat des GRK1591 „Posttranscriptional control of gene expression: mechanisms and role in pathogenesis“, 04.12.2012, Halle (Saale)

Poster

Alexander Nolze, M. Hatzfeld, „Functions of FMRP in neuronal plasticity via the regulation of Rho-Signaling and p0071“, Forschungstag der Medizinischen Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 30.06.2011, Halle (Saale)

Alexander Nolze, S. Hüttelmaier, M. Hatzfeld, „FMRP regulates actin organization via the armadillo protein p0071“, 1st International Meeting des GRK1591 „Posttranscriptional

control of gene expression: mechanisms and role in pathogenesis“, 14. - 17.03.2012, Halle (Saale)

Alexander Nolze, M. Köhn, M. Lederer, S. Hüttelmaier, M. Hatzfeld, „FMRP regulates actin filament organization via the armadillo protein p0071“, Translational Control Meeting, 04. - 08.09.2012, Cold Spring Harbor, NY, USA

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne Hilfe nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Diese Dissertation wurde an keiner anderen Fakultät vorgelegt.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'A. Nolze', with a long horizontal flourish extending to the right.

Alexander Nolze