

Dissertation der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

**Funktionelle Charakterisierung von FMRP,
dem Krankheitsgenprodukt des
Fragilen X-Syndroms**

vorgelegt von
Eva-Maria Keidel
aus
Oberhausen

München 2004

Angefertigt am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried
mit Genehmigung der Biologischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Eingereicht am: 28.09.2004

Tag des Promotionskolloquiums: 16.03.2005

Erstgutachter: Prof. Dr. Elisabeth Weiß

Zweitgutachter: Prof. Dr. Heinrich Leonhardt

Sondergutachter: Prof. Dr. Utz Fischer

Meiner Familie

Bildung ist wunderbar.
Doch sollte man sich von Zeit zu Zeit erinnern,
dass wirklich Wissenswertes nicht gelehrt werden kann.

Oscar Wilde

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	9
	SUMMARY.....	11
2	EINLEITUNG	13
2.1	Das Fragile X-Syndrom.....	13
2.1.1	Die genetischen Ursachen des Fragilen X-Syndroms.....	13
2.1.1.1	Trinukleotid-Expansionskrankheiten.....	13
2.1.1.2	Das Fragile X-Syndrom.....	14
2.1.1.3	Das <i>FMR1</i> -Gen	14
2.1.1.4	Analyse des Fragilen X-Syndroms anhand eines Mausmodells	15
2.1.2	Charakterisierung von FMRP, dem Genprodukt des Fragilen X-Syndroms	16
2.1.2.1	Eigenschaften von FMRP	16
2.1.2.2	Interaktoren von FMRP	18
2.1.2.3	Die Funktion von FMRP.....	19
2.2	Der PRMT5-Komplex	22
2.2.1	Die spinale Muskelatrophie (SMA).....	22
2.2.1.1	Molekulargenetische Ursachen der SMA	22
2.2.1.2	Die Funktion von SMN in der Biogenese von snRNP.....	23
2.2.2	Protein-Arginin-Methyltransferasen	26
2.2.3	Der PRMT5-Komplex	27
2.2.3.1	Die Protein-Arginin-Methyltransferase 5.....	27
2.2.3.2	Interaktoren von PRMT5.....	28
2.2.3.3	Die Funktion von PRMT5 in der Sm-Core-Biogenese	29
2.3	Ziel dieser Arbeit.....	30
3	MATERIAL.....	33
3.1	Chemikalien und Enzyme	33
3.2	Puffer und Kulturmedien.....	33
3.3	Antikörper	37
3.4	Plasmide.....	37
3.5	Organismen	39

4	METHODEN	40
4.1	Molekular- und zellbiologische Methoden.....	40
4.1.1	Klonierung von cDNA-Fragmenten.....	40
4.1.2	Kultivierung und Transfektion von Säugerzellen.....	40
4.2	Biochemische Methoden.....	41
4.2.1	Standardmethoden der Proteinbiochemie	41
4.2.2	Diskontinuierliche Gelelektrophorese von Proteinen.....	41
4.2.3	Rekombinante Expression von Proteinen.....	42
4.2.4	Radioaktive Markierung von Proteinen durch gekoppelte in-vitro-Transkription und - Translation	43
4.2.5	Herstellung von HeLa-Zellextrakten	43
4.2.6	Bindungsexperimente.....	44
4.2.7	Dichtegradienten-Ultrazentrifugation	45
4.2.8	Gelfiltration.....	45
4.2.9	Metabolische Markierung von Gewebekulturzellen mit [³² P]-ortho-Phosphat und Dünnschicht-chromatographische Auftrennung der Phosphoaminosäuren.....	46
4.2.10	In-vitro-Phosphorylierung von Proteinen.....	47
4.3	Immunologische Methoden	48
4.3.1	Standardmethoden der Immunologie	48
4.3.2	Herstellung monoklonaler Antikörper	48
4.3.3	Herstellung polyklonaler Antikörper	53
4.3.4	Westernblot	54
4.3.5	Immunpräzipitation	55
4.3.6	Immunfluoreszenz-Mikroskopie.....	55
4.4	Spezielle Experimente	56
4.4.1	Methylierungsassay	56
4.4.2	Radioaktive Markierung von RNA (in-vitro-Transkription).....	57
4.4.3	RNA-Bindung an rekombinantes FMRP.....	57
4.4.4	Inhibition der in-vitro-Translation einer mRNA.....	58
4.4.4.1	Run-off-Transkription der SMN-cDNA.....	58
4.4.4.2	Translations-Assay.....	59
4.4.5	Polysomengradient.....	59
4.4.6	Ionenaustauscherchromatographie	60
5	ERGEBNISSE	61
5.1	Analyse von FMRP, dem Krankheitsgenprodukt des Fragilen X-Syndroms	61
5.1.1	FMRP inhibiert die mRNA-Translation in vitro.....	62
5.1.2	Lokalisation der Translationsinhibitionsdomäne von FMRP	64

5.1.3	Die Fähigkeit zur Translationsinhibition korreliert mit der Homodimerisierung von FMRP	66
5.1.3.1	Der Punktmutante FMRP _{B304N} fehlt die Fähigkeit zur Homodimerisierung	66
5.1.3.2	Ein zentraler Bereich von FMRP ist für die Homodimerisierung des Proteins verantwortlich	67
5.1.3.3	Die Korrelation von Translationsinhibition und Homodimerisierung von FMRP	68
5.1.3.4	Die Bindungsstellen von FXR1 und FXR2 an FMRP überlappen sich	69
5.1.4	Herstellung eines monoklonalen anti-FMRP-Antikörpers	70
5.1.5	FMRP liegt in humanen Zellen modifiziert vor	73
5.1.5.1	FMRP kann <i>in vitro</i> methyliert werden	76
5.1.5.2	FMRP ist ein Phosphoprotein	78
5.1.5.3	FMRP kann <i>in vitro</i> phosphoryliert werden	79
5.1.5.4	Die RNA-Bindung von FMRP wird durch Phosphorylierung nicht beeinflusst	80
5.1.5.5	Schritte zur Identifizierung der Kinase	81
5.2	Der PRMT5-Komplex	86
5.2.1	Die drei Hauptkomponenten des Methyltransferase-Komplexes	86
5.2.1.1	Die Interaktionen von PRMT5, pICln und WD45	86
5.2.1.2	Der isolierte PRMT5-Komplex ist notwendig und hinreichend, um Sm-Proteine zu methylieren	88
5.2.2	pICln und WD45 sind Aktivatoren der Methyltransferase PRMT5	89
5.2.2.1	pICln stimuliert die Methyltransferase-Aktivität von isoliertem PRMT5-Komplex	90
5.2.2.2	Die Methyltransferase-Aktivität von rekombinantem PRMT5 lässt sich durch pICln und WD45 stimulieren	91
5.2.2.3	pICln ist ein wichtiger Cofaktor für die Aktivität von PRMT5	93
5.2.3	Die Heterodimerisierung von SmB und Smd3 ist keine Voraussetzung für deren Methylierung	98
5.2.4	SmB und Smd3 werden als Monomere von PRMT5 methyliert	99
5.2.5	SMN übernimmt die methylierten Sm-Proteine und ermöglicht so einen erneuten Methylierungszyklus	102
5.2.6	Die methylierten Sm-Proteine werden als Monomere auf den SMN-Komplex übertragen	104
6	DISKUSSION	107
6.1	Eigenschaften und Funktion von FMRP	107
6.1.1	Die Funktion von FMRP als Inhibitor der Translation	107
6.1.2	Eingrenzung funktioneller Domänen von FMRP	112
6.1.2.1	Die Homodimerisierung von FMRP als Voraussetzung für die Translationsinhibition	112
6.1.2.2	Die FXR-Interaktionsdomäne	115
6.1.3	RNA-Targets von FMRP	116

6.2	Untersuchungen zur Methyltransferase-Aktivität des PRMT5-Komplexes bei der U-snRNP-Biogenese.....	121
6.2.1	Untersuchungen zum Aufbau des PRMT5-Komplexes.....	122
6.2.2	pICln und WD45 sind notwendig für eine effektive Methylierung von Sm-Proteinen durch PRMT5.....	123
6.2.3	Zum Zeitpunkt ihrer Methylierung bilden die Sm-Proteine noch keine Heterodimere	126
6.2.4	Ausblick.....	128
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	130
8	ANHANG.....	141
8.1	Abkürzungen	141
8.2	Veröffentlichungen	143
8.3	Danksagung	144
8.4	Lebenslauf.....	145
8.5	Erklärung	146

1 Zusammenfassung

Das Fragile X-Syndrom ist die häufigste Form vererbter mentaler Retardation. In nahezu allen Fällen wird die Krankheit durch Expansion von CGG-Triplett-Wiederholungen im 5'UTR des *FMRI*-Gens hervorgerufen: Dies führt zur transkriptionellen Abschaltung des Gens und damit zum Fehlen des *fragile X mental retardation protein* (FMRP). Darüber hinaus sind wenige Patienten bekannt, die *FMRI* mit Mutationen im kodierenden Bereich exprimieren. Welche zellulären Prozesse durch FMRP-Defizienz oder -Fehlfunktion gestört werden, ist bislang unklar.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese verfolgt, dass FMRP ein Regulator der Translation ist. Dem lag die Beobachtung zugrunde, dass FMRP einerseits an mRNA-Moleküle binden kann und im Kontext makromolekularer Komplexe mit aktiv translatierenden Ribosomen assoziiert. Mit Hilfe von *in-vitro*-Translationsexperimenten in Reticulocytenslysaten konnte in der Tat gezeigt werden, dass rekombinant exprimiertes FMRP die Translation unterschiedlicher mRNAs inhibiert. Eine Variante von FMRP mit einer Aminosäureaustausch-Mutation, die in einem Patienten mit schwerem Krankheitsgrad gefunden worden war (I304N), ist hierzu kaum noch in der Lage. Anhand von Protein-Bindungsstudien wurde deutlich, dass dem mutierten Protein die Fähigkeit zur Bildung von Homooligomeren fehlt, während seine RNA-Bindungseigenschaften nicht beeinträchtigt sind. Dies zeigt, dass Protein-Oligomerisierung eine Voraussetzung für die Aktivität von FMRP bei der Translationsinhibition ist. Um jene Aminosäuresequenzen in FMRP zu identifizieren, welche für die Bildung von Homo- oder Heterooligomeren (mit den autosomalen Homologen FXR1 und FXR2) verantwortlich sind, wurden *in-vitro*-Bindungsexperimente mit rekombinant hergestellten Deletionsmutanten aller drei Proteine durchgeführt. Der verantwortliche Bereich konnte auf ein von Aminosäuren 112 bis 215 gebildetes Coiled-Coil-Motiv in FMRP eingegrenzt werden. Schließlich wurde untersucht, ob FMRP posttranslational modifiziert wird und die Aktivität des Proteins auf diese Weise reguliert sein könnte. Zunächst wurde festgestellt, dass rekombinantes FMRP *in vitro* von Säugerzell-Extrakt bzw. rekombinanter Casein-Kinase II phosphoryliert wird. Durch zweidimensionale Gelelektrophorese von FMRP-Immunpräzipitaten konnte die Phosphorylierung von FMRP auch *in vivo* gezeigt werden. Die modifizierten Aminosäuren wurden als Serinreste identifiziert. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass FMRP *in vitro* am C-Terminus methyliert werden kann. Die geschilderten Nachweismethoden können nun für die Identifizierung und Charakterisierung der modifizierenden Enzyme herangezogen werden.

Ein zweites Projekt befasste sich mit der Biogenese spleißosomaler U-snRNP. Dieser Prozess erfordert eine Reihe von Proteinen, eine essentielle Komponente ist dabei das Protein SMN, welches bei der neuromuskulären Krankheit Spinale Muskelatrophie (SMA) mutiert ist. SMA ist die zweithäufigste autosomal rezessive Erkrankung mit Todesfolge beim Menschen. Sie wird durch Mutationen im *SMN1*-Gen verursacht, wodurch es zu einem Mangel an funktionellem SMN-Protein in der Zelle kommt. Das Protein ist eine Komponente in makromolekularen Komplexen, welche die Zusammenlagerung spleißosomaler U-snRNP katalysieren. Eine allen U-snRNP gemeinsame Komponente ist die heptamere snRNP-Core-Domäne, bestehend aus den Proteinen SmB, D1, D2, D3, E, F, und G. Bevor sie von SMN gebunden und auf die U-snRNA transferiert werden können, ist eine symmetrische Dimethylierung von SmB, SmD1 und SmD3 erforderlich, welche vom PRMT5-Komplex katalysiert wird. Während die Funktion der Protein-Arginin-Methyltransferase PRMT5 als katalytisch aktiver Faktor durch *in-vitro*-Methylierungsassays bereits belegt werden konnte, war die Rolle der beiden cytoplasmatischen Assoziationspartner, pICln und WD45, noch unklar. Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand zunächst darin, den Aufbau des Komplexes zu untersuchen und die Funktion von pICln und WD45 zu analysieren.

Mit Hilfe von *in-vitro*-Bindungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass sowohl pICln, als auch WD45 an PRMT5 binden. PRMT5 ist als zentrale Komponente des Komplexes in der Lage zu oligomerisieren. In unterschiedlichen *in-vitro*-Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass pICln und WD45 Aktivatoren der Methyltransferase sind. So kann die Methylierungsaktivität von aus Zellextrakt isoliertem, als auch von rekombinant exprimiertem PRMT5 durch Zugabe der beiden Proteine stimuliert werden.

Sm-Proteine, welche aus U-snRNP isoliert werden, liegen in heterooligomeren Komplexen vor. Dabei wechselwirken die Sm-Proteine B und D3 (SmB/D3), D1 und D2 (SmD1/D2) und E, F und G (SmE/F/G) miteinander. Unklar war bisher jedoch, in welchem Schritt des Sm-Core-Assembly diese Assoziationen stattfinden. *In-vitro*-Methylierungsassays wiesen darauf hin, dass die Sm-Proteine zum Zeitpunkt ihrer Methylierung durch PRMT5 einzeln und nicht als Heterooligomere bestehen. Weiterhin zeigten Immunpräzipitationen, dass SmB und D3 effektiver auf den SMN-Komplex übertragen wurden, wenn sie nicht als Komplex vorlagen. Diese Daten lassen vermuten, dass sich die Sm-Proteine erst kurz vor dem Sm-Core-Assembly zu Heterooligomeren zusammenfinden.

Summary

Fragile X syndrome is the most frequent form of heritable mental retardation. In the majority of cases the disease is caused by transcriptional silencing of the *FMRI* gene in response to the expansion of CGG repeats in the 5'UTR of the gene, leading to a lack of fragile X mental retardation protein (FMRP). Only a few patients exhibit missense-mutations in the coding region of *FMRI* leading to an aberrant gene product. However, little is known about how FMRP deficiency or malfunction leads to the pathophysiology of Fragile X syndrome.

FMRP is an RNA binding protein that associates with translating polyribosomes as part of a large messenger ribonucleoprotein (mRNP). In the present study, it was investigated whether the protein can act as a regulator of translation. Using recombinant FMRP, it was shown that the protein suppresses translation of different mRNAs in rabbit reticulocyte lysate. Interestingly, FMRP containing an amino acid substitution at position 304 (FMRP_{I304N}), originally identified in a severely affected patient, renders the protein incapable of interfering with translation. *In vitro* binding experiments revealed that FMRP_{I304N}, in contrast to wildtype FMRP, was incapable of forming homo-oligomers. However, its affinity for mRNA was not altered. These results suggest that oligomerization is a prerequisite for the function of FMRP in translational inhibition. In order to identify the protein region responsible for homo- and hetero-oligomerization with the two autosomal homologues FXR1 and FXR2, an array of FMRP deletion mutants were tested for oligomerization properties. *In vitro* binding experiments showed that a putative coiled-coil domain (aminoacids 112 to 215) was required for mutual interaction of all three proteins.

Finally, it was examined whether FMRP is post-translationally modified and whether this may play a role in the function of this protein. It was initially demonstrated that both, mammalian cell extract and casein-kinase II, are capable of FMRP phosphorylation *in vitro*. Furthermore phospho-aminoacid analysis of immunoprecipitated human FMRP revealed phosphorylation of serine residues. Additionally, the protein can be methylated *in vitro* in the C-terminal part. The outlined experimental strategy may be utilized as a tool for the identification and characterization of FMRP-modifying enzymes. The obtained data identify FMRP as a negative regulator of translation and suggest that misregulation of translation of specific mRNAs lead to the disease phenotype.

Analysis of the biogenesis of spliceosomal U-snRNP was the second project of the Ph.D. thesis. This process involves the transient export of nuclear encoded U-snRNA to the cytoplasm, the assembly with a set of spliceosomal proteins (termed Sm-proteins B/B', D1, D2, D3, E, F, and G) and the nuclear import of the assembled particle to the nucleus. The assembly reaction of U-snRNP, although a spontaneous process *in vitro*, is facilitated *in vivo* by a large number of proteins, including SMN, the protein mutated in the neuromuscular disorder spinal muscular atrophy. These factors are organised in two functional units, termed PRMT5-complex and SMN-complex, that successively cooperate in the assembly reaction. In a first step, the PRMT5-complex sequesters newly synthesized Sm proteins and converts arginines in SmB, D1 and D3 to symmetrical dimethylarginines (sDMA). This enhances their transfer to the SMN-complex, which facilitates the assembly reaction with the U-snRNA. Whereas *in vitro* methylation experiments have identified PRMT5 as the catalytic component of the PRMT5 complex, the functions of the two known cofactors of this enzyme, pICln and WD45, were unknown.

Using a biochemical approach, an interaction map of the PRMT5 complex has been established. These studies revealed that oligomeric PRMT5 directly interacts with pICln and WD45 via distinct domains. Interestingly, *in vitro* methylation experiments further indicated that both cofactors strongly activate the catalytic activity of the methyltransferase. The transfer of modified Sm proteins to the SMN-complex was studied in a newly established assay system. Sm proteins form stable heterooligomeric complexes composed of SmB/D3, SmD1/D2 and SmE/F/G and it is believed that these complexes are intermediates in the assembly reaction. Quite unexpectedly, the studies presented in this thesis indicate that Sm proteins bind initially as monomers to the PRMT5-complex to allow for the efficient methylation and transfer to the SMN complex. The data suggest that hetero-oligomerization takes place in a late step of the assembly reaction, possibly at the SMN complex prior to U-snRNP assembly.

2 Einleitung

2.1 Das Fragile X-Syndrom

2.1.1 Die genetischen Ursachen des Fragilen X-Syndroms

2.1.1.1 Trinukleotid-Expansionskrankheiten

Trinukleotid-Expansionskrankheiten zeichnen sich durch eine Instabilität im Genom aus, die zu einer vielfachen Wiederholung eines Nukleotidtripletts in einem Gen führt. Die erste Trinukleotid-Expansionskrankheit wurde Anfang der neunziger Jahre durch die Klonierung von *FMRI* entdeckt, dem Krankheitsgen des Fragilen X-Syndroms (Verkerk *et al.*, 1991). Es enthält in seiner 5'-untranslatierten Region die bis zu 50fache Nukleotidwiederholung CGG, die in betroffenen Familien bei der Vererbung auf die nächste Generation auf über 200fach expandieren kann. Bis dahin waren derartige Instabilitäten im Genom als Krankheitsursache unbekannt, doch heutzutage weiß man von mindestens 14 Erbkrankheiten, welche durch Trinukleotidexpansionen verursacht werden.

Was sie alle verbindet ist, dass die der Krankheit zugrunde liegende Trinukleotidabfolge eher expandiert als kontrahiert und dass sowohl Gene in somatischen Zellen als auch in Keimzellen betroffen sind. Ein weiterer Punkt, der auf die Tripletexpansionskrankheiten zutrifft ist, dass die Vererbung der Krankheiten nicht den Mendelschen Regeln gehorcht. Nachfolgende Generationen in der Familie sind signifikant öfter von der Krankheit betroffen als ihre Vorfahren, ein Phänomen, welches man genetische Antizipation nennt (Sherman *et al.*, 1984).

Trinukleotid-Expansionskrankheiten werden in zwei Subklassen eingeteilt, die sich nach der Lage der Tripletwiederholung im Krankheitsgen unterscheiden:

Kodierende Tripletexpansionen, d.h. die Tripletwiederholung liegt in der kodierenden Sequenz eines Gens und wird auf diese Weise auch translatiert. Da es sich ausnahmslos um Glutamin-kodierende Triplets handelt, bezeichnet man die daraus resultierenden Krankheiten als Polyglutamin-Expansionskrankheiten (zusammengefasst in La-Spada and Taylor, 2003). Die zweite Gruppe ist die der nicht-kodierenden Trinukleotid-Expansionskrankheiten, zu denen auch das Fragile X-Syndrom zählt (zusammengefasst in Cummings and Zoghbi, 2000).

2.1.1.2 Das Fragile X-Syndrom

Das Fragile X-Syndrom ist mit einer Inzidenz von 1:4500 bei Männern und 1:9000 bei Frauen die häufigste genetisch bedingte Form mentaler Retardation (Warren and Sherman, 2001). Die Krankheit ist gekennzeichnet durch einen niedrigen Intelligenzquotienten, Lernschwierigkeiten, Makroorchidismus und Autismus, charakteristisch sind ein langes Gesicht, hervortretende Ohren, und überdehnbare Gelenke bei betroffenen Patienten (Turner *et al.*, 1980; Rudelli *et al.*, 1985). Der Krankheitsname stammt von cytogenetischen Beobachtungen in kultivierten Patientenzellen, wo nach Folatentzug ein langer Arm des kondensierten X-Chromosoms „fragil“, also brüchig erscheint (Sutherland, 1977). Diese Tatsache, zusammengenommen mit der maternalen Vererbung des Fragilen X-Syndroms, deutete schon früh an, dass die Krankheit durch eine Mutation auf dem X-Chromosom verursacht wird (Martin, 1943). Aus diesem Grund sind Frauen auch weniger oft und stark von der Krankheit betroffen als Männer und die Fehlfunktionen korrelieren hier mit der Häufigkeit der Inaktivierung des abnormalen X-Chromosoms in somatischen Zellen (Riddle *et al.*, 1998; Sobesky *et al.*, 1996).

2.1.1.3 Das *FMRI*-Gen

Bereits 1969 erkannten Lubs *et al.* den Zusammenhang zwischen mentaler Retardation und dem cytogenetischen Marker des brüchigen (fragilen) X-Chromosoms (Lubs, 1969). Die Mutation wurde 1983 dem Bereich Xq27.3 auf dem langen Arm des X-Chromosoms zugeordnet, bis 1991 wurde die Region durch genetische und physikalische Positionsanalysen (*Mapping*) genauer eingegrenzt (Harrison *et al.*, 1983). Schließlich klonierten Verkerk *et al.* das *FMRI*-Gen (*fragile X mental retardation gene 1*), dessen Genprodukt FMRP bei der Mehrzahl aller Fragilen X-Patienten fehlt (Verkerk *et al.*, 1991).

Das 38 Kilobasen umfassende *FMRI*-Gen kodiert für ein 4,4 Kilobasen großes Transkript, welches aus 17 Exons besteht (Eichler *et al.*, 1993; Ashley *et al.*, 1993a; vgl. Abbildung 2-1). *FMRI* besitzt zwei autosomale Homologe *FXR1* und *FXR2* (*fragile X related gene 1/2*), die im Vergleich mit *FMRI* zu ca. 60 % identisch sind. Es existieren Orthologe in Säugern, Hühnern und Fruchtfliegen, was auf eine hohe evolutionäre Konservierung schließen lässt.

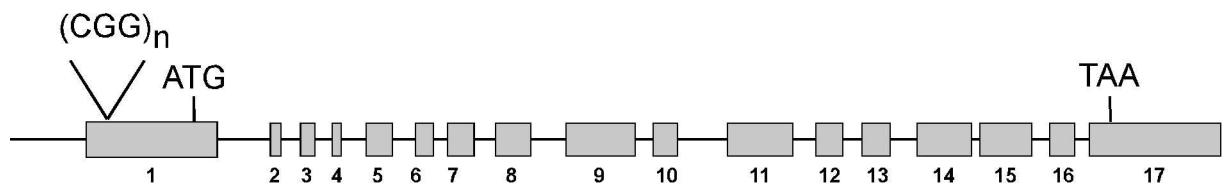


Abbildung 2-1 Das FMRI-Gen. Die Balken stellen schematisch die 17 Exons des Gens dar, die Nukleotide ATG und TAA bezeichnen das Start- und Stopcodon. In der 5'-untranslatierten Region befindet sich die Basenabfolge CGG, die bei der gesunden Bevölkerung bis zu 50 Wiederholungen aufweisen kann.

In der gesunden Bevölkerung kommen Polymorphismen mit 6-50 Trinukleotid-Wiederholungen vor. Werden die Sequenzen länger, kommt es zum Krankheitsphänotyp. Ab hier unterscheidet man Prämutationen mit 50 bis 200 und Vollmutationen mit bis zu mehreren tausend Wiederholungen. Die Prämutation tritt mit einer Inzidenz von 1:400 Frauen bzw. 1:1000 Männern auf und während die Frauen meist über normale intellektuelle Fähigkeiten verfügen (Franke *et al.*, 1998), kommt es bei männliche Patienten gehäuft zu kognitiven Schwierigkeiten (Steyaert *et al.*, 1996). Untersuchungen an Prämutationsträgern zeigten, dass sich die Expansion extrem instabil bei der Vererbung verhält und für die Nachkommen das Risiko für eine Vollmutation exponentiell ansteigt.

In 95 % aller Patienten ist die Expansion der Trinukleotid-Wiederholung auf eine Anzahl von über 200 bis zu mehreren Tausend die Ursache für das Fragile X-Syndrom. Als Folge hiervon wird der Promotorbereich des *FMRI*-Gens inklusive einer stromaufwärts gelegenen CpG-Insel methyliert und die *FMRI*-Expression daraufhin abgeschaltet (Sutcliffe *et al.*, 1992).

2.1.1.4 Analyse des Fragilen X-Syndroms anhand eines Mausmodells

Die *FMRI*-Knockout-Maus ist lebensfähig, was die frühere Hypothese widerlegte, es handele sich bei *FMRI* um ein essentielles Haushaltsgen. Übereinstimmend mit dem Phänotyp von Fragilen X-Patienten besitzen über 90 % der Knockout-Mäuse Makroorchidismus (Kooy *et al.*, 1996). Obwohl Intelligenztests nicht direkt auf Mäuse übertragbar sind, wurden doch unterschiedliche Lern- und Verhaltenstests durchgeführt, deren Ergebnisse auf Ähnlichkeiten mit dem Phänotyp des Fragilen X-Syndroms schließen lassen (Van-Dam *et al.*, 2000). So hatten *FMRI*-Knockout-Mäuse größere Schwierigkeiten als Wildtyp-Mäuse, eine unter Wasser versteckte Plattform wieder zu finden (*Morris water maze test*) (Fisch *et al.*, 1999). Eine detaillierte Untersuchung der kortikalen Neuronen offenbarte verlängerte und ausgedünnte Dendritenfortsätze, eine Beobachtung, die auch in *post-mortem*-Gewebe von Fragilen X-Patienten gemacht wurde. Dies führte zu der Theorie, dass ein Fehlen des Proteins

zu morphologisch unreifen Neuronen und damit zu kognitiven Defiziten bei Patienten führen könnte (Comery *et al.*, 1997).

2.1.2 Charakterisierung von FMRP, dem Genprodukt des Fragilen X-Syndroms

2.1.2.1 Eigenschaften von FMRP

Ogleich der Zusammenhang zwischen der Instabilität des X-Chromosoms und dem Krankheitsphänotyp der vererbten, mentalen Retardation schon früh erkannt worden war, so war es erst die Identifizierung von *FMR1*, die Analysen der zellulären Funktion des FMR-Proteins und damit der molekularen Ursachen der Erkrankung ermöglichte. Erste Experimente ergaben, dass das Protein in fast allen Geweben exprimiert wird (Khandjian *et al.*, 1995; Devys *et al.*, 1993), die höchsten Mengen jedoch im Gehirn und in den Hoden vorhanden sind. Interessanterweise kann man hier eine direkte Verbindung zum Phänotyp des Fragilen X-Syndroms erkennen, dessen Hauptausprägungsformen mentale Retardation und Makroorchidismus sind.

FMRP (*fragile X mental retardation protein*), das Genprodukt von *FMR1* besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 78 Kilodalton. Darüber hinaus sind 20 kürzere Isoformen bekannt, die durch alternatives Spleißen entstehen, mindestens vier von ihnen zeigen eine gewebespezifische Lokalisation (Verheij *et al.*, 1995).

FMRP lokalisiert im Gehirngewebe primär im Cytoplasma von Neuronen und dort speziell in Dendritenfortsätzen (Devys *et al.*, 1993). Mittels Immunfluoreszenzmikroskopie konnte man FMRP allerdings auch im Kern unterschiedlicher Zelltypen finden (Feng *et al.*, 1997b; Verheij *et al.*, 1993). Die Analyse verschiedener Spleißisoformen und Deletionsmutanten deuteten dann auf das Vorhandensein eines Kernexportsignals in Exon 14 (NES) und auch auf eine Kernlokalisationssequenz (NLS, Eberhart *et al.*, 1996; Sittler *et al.*, 1996). Während es sich bei der NLS um eine nicht-kanonische Sequenz zwischen Aminosäure 114 und 150 von FMRP handelt (Bardoni *et al.*, 1997), bestätigten gezielte Mutationsanalysen von Fridell *et al.* die Existenz eines kanonischen Kernexportsignals des HIV-1 Rev-Typs. Mit Hilfe von Austauschmutationen konnte gezeigt werden, dass die FMRP-NES nicht nur auf der Sequenzebene der Rev-NES gleicht, sondern auch in funktioneller Hinsicht deren Aufgabe des spezifischen RNA-Exports übernehmen kann (Fridell *et al.*, 1996; Fischer *et al.*, 1995)

Die Summe dieser Entdeckungen führte zu der Hypothese, dass es sich bei FMRP um ein zwischen Kern- und Cytoplasma pendelndes (*Shuttling*) Protein handelt, letztendlich konnte

dies durch die Untersuchungen von Tamanini *et al.* bestätigt werden. Durch den Einsatz des Antibiotikums Leptomycin B, einem spezifischen Inhibitor des Kernexports von Leucinreichen Exportsequenzen, konnte FMRP im Zellkern zurückgehalten und somit angereichert werden (Tamanini *et al.*, 1999a). Die gezielte Inhibition der Bindung der FMRP-NES an den Kernexport-Rezeptor Exportin-1 zeigte, dass der Export von FMRP, wie auch der des HIV-1 Rev-Proteins, Exportin-abhängig verläuft.



Abbildung 2-2 Drei RNA-Interaktionsdomänen sind innerhalb der Fragilen X-Proteinfamilie konserviert. Die drei Balken stellen schematisch die Primärstruktur der Proteine dar. Die schwarz unterlegten Bereiche zeigen die Lage der KH-Domänen im Protein, die grau unterlegten die der RGG-Box. FXR1 und FXR2 besitzen ein nukleoläres Lokalisationssignal (NoS), welches in FMRP nicht vorkommt.

Mittels Sequenzanalysen (Siomi *et al.*, 1993), (Ashley *et al.*, 1993b) konnten drei Domänen von FMRP identifiziert werden, welche Homologie zu RNA-bindenden Proteinen aufweisen. So findet man im N-terminalen Bereich (Aminosäuren 222-258 und 284-320) zwei KH-Domänen mit Homologie zu hnRNP K (heteronukleäres Ribonukleinprotein K) und weiter C-terminal (Aminosäuren 527-552) eine Arginin/Glycin-reiche Sequenz (RGG-Box), wie sie auch in hnRNP U vorkommt (vgl. Abbildung 2-2) (Kiledjian and Dreyfuss, 1992).

Tatsächlich konnten auch bei FMRP RNA-Bindungseigenschaften nachgewiesen werden. In Untersuchungen mit *in-vitro*-translatiertem FMRP und homopolymerer RNA zeigte das Protein in erster Linie eine Affinität für polyG und polyU (Siomi *et al.*, 1993). Zur gleichen Zeit belegte eine Studie von Ashley *et al.*, dass *in-vitro*-translatiertes FMRP mit 4% der in Gehirngewebelysate befindlichen mRNAs assoziiert, darunter auch seine eigene FMR1-mRNA (Ashley *et al.*, 1993b). Aber auch hier konnte die direkte Bindung von RNA durch FMRP nicht verifiziert werden. Erste Hinweise auf eine direkte RNA-Assoziation konnten durch Brown *et al.* gewonnen werden, die rekombinant exprimierte, murines FMRP mit der FMR1-mRNA quervernetzen konnten. Die Beobachtung, dass dabei die 3' untranslatierte Region für die Interaktion verantwortlich ist, legte nahe, dass es sich hierbei um eine spezifische RNA-Bindung handelt (Brown *et al.*, 1998).

Zellfraktionierungen mittels Dichtegradientenzentrifugation zeigten für FMRP eine RNA-vermittelte Assoziation mit translatierenden Polyribosomen (Khandjian *et al.*, 1996; Corbin *et al.*, 1997; Tamanini *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1997a; Eberhart *et al.*, 1996). Diese über 660

Kilodalton schweren mRNP-Komplexe (*messenger ribonucleoprotein particle*) bestehen aus unterschiedlichen RNAs, ribosomalen Proteinen und einer Reihe von bisher noch wenig identifizierten Proteinen.

Die pathologische Bedeutung der RNA-Assoziation von FMRP wird besonders bei der Betrachtung einer Punktmutation deutlich, welche vor wenigen Jahren bei einem Fragilen X-Patienten gefunden wurde (De Boulle *et al.*, 1993). Dieser Patient zeigt einen sehr gravierenden Phänotyp, der aber nicht auf die fehlende Expression von FMRP zurückzuführen ist, sondern auf eine Punktmutation in der zweiten KH-Domäne. Eine Basenmutation verursacht hier einen nichtkonservativen Austausch der Aminosäure Isoleucin gegen Asparagin an Position 304 (I304N).

Offensichtlich kommt es hier zu einer dominant negativen Ausprägung der Mutation, welche fatalere Auswirkungen auf die Funktion von FMRP und die Zellen hat, als das alleinige Fehlen des Proteins. Neuere Untersuchungen legten nahe, dass diese FMRP-Punktmutante noch RNA binden kann, die Assoziation mit aktiven Polyribosomen zu einem mRNP-Komplex jedoch eingeschränkt ist (Feng *et al.*, 1997a; Laggerbauer *et al.*, 2001).

2.1.2.2 Interaktoren von FMRP

Durch biochemische und genetische Studien konnte in den letzten Jahren eine Reihe von Interaktoren identifiziert werden. Bei den interessantesten Kandidaten handelt es sich um die beiden autosomalen Homologen von FMRP, FXR1 und FXR2. 1995 isolierten Zhang *et al.* mittels eines Hefe *Two-Hybrid*-Systems ein humanes Protein, das mit FMRP assoziiert ist (Zhang *et al.*, 1995). Es wurde als *fragile x related protein 1* (FXR1) bezeichnet. Die Sequenzierung ergab, dass es sich hierbei um ein autosomales Homolog von FMRP mit über 60 % Ähnlichkeit auf Proteinebene handelt. Nahezu gleichzeitig wurde von Siomi *et al.* mit Hilfe eines Datenbank-Sequenzvergleiches ein weiteres, ebenfalls autosomales Homolog gefunden und als Bindungspartner charakterisiert. In Fortführung obiger Nomenklatur wurde es als FXR2 bezeichnet. FMRP, FXR1 und FXR2 haben allesamt *in vitro* die Fähigkeit zur Bildung von Homo- und Heterooligomeren (Siomi *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1995).

Immunlokalisationsstudien zeigten eine Co-Lokalisation aller drei Proteine in Hirngewebe, aber eine unterschiedliche Verteilung in Muskel- und Hodenzellen (Bakker *et al.*, 2000; Dube *et al.*, 2000). Für einige FXR1- und FXR2-Spleißisoformen ist gewebespezifisch eine nukleoläre Lokalisation beschrieben worden, das daraufhin identifizierte nukleoläre Import-Signal (NoS) des HIV-Rev-Typs befindet sich im extremen C-Terminus beider Proteine (Tamanini *et al.*, 2000).

FXR1 und FXR2 besitzen dieselben funktionalen Domänen wie FMRP (Abbildung 2-2) und es wird vermutet, dass sie zum Teil redundante Funktionen haben.

2.1.2.3 Die Funktion von FMRP

Für das Verstehen und die medizinische Behandlung des Fragilen X-Syndroms ist die Kenntnis über die Funktion von FMRP unerlässlich. Erste Hinweise darauf ergaben sich aus der Identifizierung von RNA-Bindungsdomänen in der FMRP-Sequenz (Ashley *et al.*, 1993b; Siomi *et al.*, 1993).

Um die Funktion von FMRP zu eruieren, fokussierten sich einige Arbeitsgruppen auf die mit FMRP assoziierten RNAs, wobei der Schwerpunkt der Suche dabei auf eventuellen Gemeinsamkeiten innerhalb der Sequenz oder der Funktion lag. Aus früheren Untersuchungen war bekannt, dass FMRP unspezifisch an homopolymere Guanosin- und Uridinsequenzen bindet. Nur die eigene *FMR1*-mRNA galt bisher als spezifischer RNA-Bindungspartner (Brown *et al.*, 1998). Kürzlich charakterisierten Schaeffer *et al.* mit Hilfe von rekombinantem FMRP in RNA-Bindungsexperimenten den Bereich der *FMR1*-mRNA, welcher für eine Bindung ausreichend und notwendig ist: eine ca. 100 Nukleotide lange, purinreiche Region innerhalb der für die RGG-Box kodierenden Sequenz, die sich zu einer Quadruplex-Struktur, dem so genannten G-Quartett faltet (Schaeffer *et al.*, 2001; Williamson *et al.*, 1989).

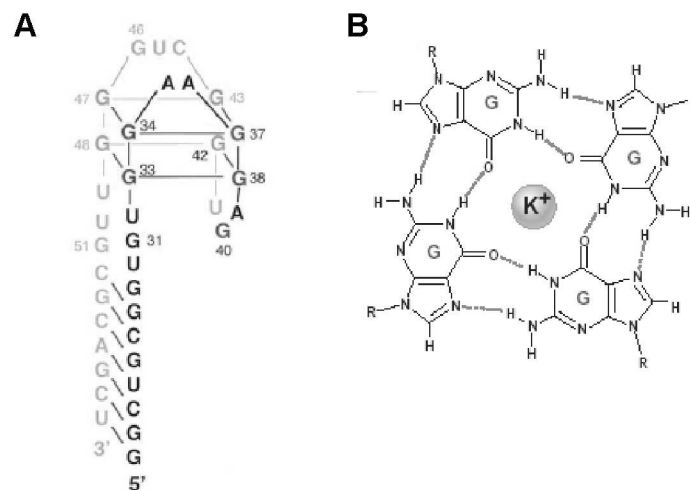


Abbildung 2-3 Die Struktur des RNA-G-Quartetts, welches die Bindung an FMRP vermitteln soll. Schematische Darstellung der dreidimensionalen Faltung der Sequenz in Vorderansicht (A) und Aufsicht der Basenstruktur (B) unter Stabilisation durch Kalium-Ionen. Nach Schaeffer *et al.*, 2001 und O'Donnell and Warren, 2002.

Nach Austausch dieser Region gegen ein G-Quartett einer nichtverwandten mRNA wird FMRP immer noch gebunden, was nach Schaeffer *et al.* belegt, dass FMRP eher an eine Struktur, als an eine spezifische Sequenz bindet (vgl. Abbildung 2-3).

Parallel zueinander publizierten Darnell *et al.* (2001) und Brown *et al.* (2001) zwei unterschiedliche Ansätze zur Identifikation von FMRP assoziierten mRNAs. Mittels einer *in-vivo*-selektiven Strategiemethode (SELEX) und einem systematischen *Microarray*-Ansatz identifizierten beide insgesamt mehr als 400 potentielle mRNA-Bindungspartner. Genauere Analysen legten jedoch nahe, dass nicht alle von ihnen über ein G-Quartett verfügen, was vermuten lässt, dass noch unbekannte Sekundärstrukturen oder Sequenzen in mRNAs an der Erkennung und Bindung durch FMRP beteiligt sind.

Eine der interessantesten identifizierten mRNAs ist diejenige, welche für das Protein MAP1B kodiert. MAP1B assoziiert mit dem Mikrotubuli-Cytoskelett und vermittelt so das Wachstum von Dendriten und Synapsen (Hummel *et al.*, 2000; Meixner *et al.*, 2000; Roos *et al.*, 2000). Parallel zu den oben beschriebenen Untersuchungen charakterisierten Zhang *et al.* das MAP1B-Homologe *futsch* als *in-vivo*-Target für dFXR (*drosophila fragile X related*) in *D. melanogaster* (Zhang *et al.*, 2001). Durch Immunpräzipitation konnte zum einen eine Assoziation zwischen dFXR und *futsch*-mRNA nachgewiesen werden, zusätzlich zeigten *dFXR*-Mutanten eine Hochregulierung der *futsch*-Expression. Diese Ergebnisse legen nahe, dass dFXR im Nervensystem als Translationsrepressor von *futsch* agiert. Der Phänotyp von *dFXR*-Mutanten äußert sich in einer gestörten Erregungsleitung in Neuronen.

Ein Kernlokalisations- und Kernexportsignal in FMRP und die Tatsache, dass das Protein mit translatierenden Polyribosomen als hnRNP vorliegt, lassen eine Funktion beim mRNA-Kernexport und der daran anschließenden Translation vermuten. Diese Theorie unterstützen auch die Ergebnisse von Feng *et al.* (Feng *et al.*, 1997a), welche Untersuchungen an FMRP mit der in einem Patienten identifizierten Punktmutation in der zweiten KH-Domäne durchführten (I304N, siehe auch Kapitel 2.1.2.1). Sie stellten fest, dass die Mutante FMRP_{I304N} nicht mehr mit translatierenden Polyribosomen komplexiert, sondern in abnormalen, kleineren heteronukleären Ribonukleinpartikeln zu finden ist. Diese Daten lassen den Rückschluss zu, dass bei diesem Patienten eine fehlende Polyribosomenassoziation von FMRP den ausgeprägten Krankheitsphänotyp verursachen könnte.

Fasst man die über FMRP gewonnenen Erkenntnisse zusammen, ergibt sich ein Modell über die putative Funktion des Proteins in Neuronen: mittels des Kernlokalisierungssignals gelangt FMRP in den Zellkern, wo es sich mit einigen Proteinen und über seine RNA-Bindedomänen

mit spezifischen mRNAs zu mRNP-Komplexen formiert. Dabei entscheiden die Proteinzusammensetzung und spezielle mRNA-Strukturen (wie das G-Quartett) welche mRNAs gebunden werden. Mit Hilfe der Kernexportsequenz in FMRP erfolgt der Transport ins Cytoplasma. Die Integration von FMRP in unterschiedliche mRNPs und die Assoziation mit Ribosomen implizieren, dass das Protein eine Funktion bei der Regulation der Translation gebundener mRNAs übernimmt.

2.2 Der PRMT5-Komplex

2.2.1 Die spinale Muskelatrophie (SMA)

Die spinale Muskelatrophie (SMA) ist eine tödlich verlaufende neuromuskuläre Erkrankung des Menschen. Sie tritt mit einer geschätzten Inzidenz von 1 in 6000 Neugeborenen auf und ist damit eine der häufigsten autosomal rezessiven Erbkrankheit mit Todesfolge (Pearn, 1978; Pearn, 1973; Roberts *et al.*, 1970). SMA ist gekennzeichnet durch fortschreitende Degeneration der α -Motoneuronen in den Vorderhörnern der grauen Substanz des Rückenmarks. Dadurch kommt es in den Patienten zu progressiver Muskelschwäche und Atrophie an den Gliedmaßen und am Rumpf, wobei die proximale Muskulatur dabei meist früher und stärker betroffen ist als die distale. Eine Therapie der SMA ist bisher nicht bekannt.

Man unterscheidet drei verschiedene Formen der SMA, je nach dem Zeitpunkt des ersten Auftretens von Symptomen und dem klinischen Verlauf der Erkrankung (Munsat and Davies, 1992). Patienten mit Typ-I-SMA (auch: Werdnig-Hoffmann-Krankheit) erkranken innerhalb der ersten sechs Lebensmonate. Aufgrund der stark ausgeprägten und schnell zunehmenden Muskelschwäche erlernen sie nie das Sitzen oder Gehen und sterben in der Regel innerhalb der ersten zwei bis drei Lebensjahre an Ateminsuffizienz. Bei Typ-II-SMA treten die ersten Symptome etwas später als bei Typ-I auf und auch die Verlaufsform der Krankheit ist milder. Die Lebenserwartung liegt bei etwa 10 Jahren. Bei Typ-III-SMA (auch: Kugelberg-Welander-Syndrom) zeigen sich die ersten Symptome erst nach dem 18. Lebensmonat. Im Vergleich zu Typ-I und Typ-II zeigt diese Form der SMA einen milderen, chronischen Verlauf, die Betroffenen erreichen das Erwachsenenalter.

2.2.1.1 Molekulargenetische Ursachen der SMA

1995 entdeckten Lefebvre *et al.* durch positionelles Klonieren das Gen *survival motor neuron* (*SMN*), das ursächlich für die Entstehung nahezu aller SMA-Formen verantwortlich ist (Lefebvre *et al.*, 1995).

Vom *SMN*-Gen gibt es beim Menschen jeweils eine telomere Kopie (*SMN1*) und eine centromere Kopie (*SMN2*) auf Chromosom 5, welche auf DNA-Ebene zu 99 % identisch sind. In etwa 96 % aller untersuchten SMA-Patienten ist das telomere *SMN1*-Gen homozygot

deletiert bzw. mutiert, sodass kein funktionsfähiges Protein von diesem Locus gebildet wird. *SMN2* ist hingegen nicht betroffen (vgl. Abbildung 2-4).

SMN2 unterscheidet sich von *SMN1* vor allem durch eine Nukleotidsubstitution innerhalb des offenen Leserasters (eine C→T-Transition in Exon 7). Der Basenaustausch verändert nicht die Aminosäurezusammensetzung des resultierenden Proteins, sondern liegt innerhalb eines sogenannten „Exonic Splicing Enhancer“ (ESE). Dieses Sequenzmotiv ist an der Regulation des prä-mRNA-Spleißens beteiligt, und für die Inklusion des Exons 7 von SMN zwingend notwendig. Der C-T-Austausch inaktiviert diesen ESE, so dass aus der *SMN2*-prä-mRNA überwiegend ein verkürztes Transkript entsteht, welchem Exon 7 fehlt. Die Translation der mRNA führt zu einem C-terminal verkürzten SMN-Protein, das instabil und nicht funktionell ist (Lefebvre *et al.*, 1997; Lorson and Androphy, 2000; Lorson *et al.*, 1999; Monani *et al.*, 1999). Die Krankheit wird daher durch eine Reduktion und nicht durch den völligen Verlust der SMN-Expression in den Zellen hervorgerufen (Gen-Dosis-Effekt). Zellen oder Organismen, welche kein SMN exprimieren, sind hingegen nicht lebensfähig. Weshalb bei SMA-Patienten nur Motoneuronen betroffen sind, ist gegenwärtig noch unklar.

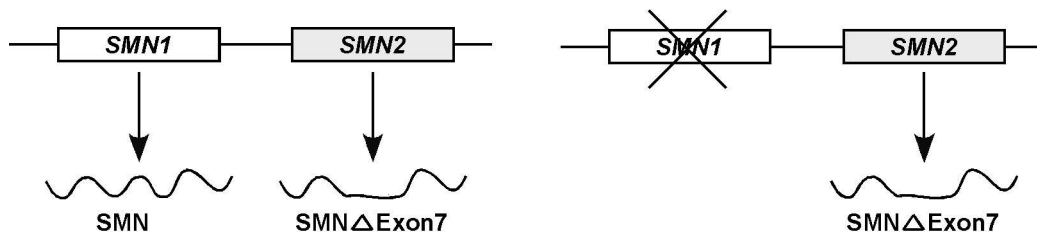


Abbildung 2-4 *SMN2* wird alternativ gespleißt. Die Abbildung zeigt schematisch die genetische Situation im gesunden Menschen (links) und im SMA-Patienten (rechts). Im Patienten sind beide Allele des *SMN1*-Gens durch Mutation so verändert, dass kein funktionsfähiges Protein entsteht. Dem von *SMN2* exprimierten Protein fehlt Exon 7, die Folge ist der SMA-Phänotyp.

In den α -Motoneuronen von SMA-Patienten, die nur noch *SMN2* exprimieren, steht daher vermutlich zu wenig funktionsfähiges SMN-Protein voller Länge zur Verfügung. Einer weithin akzeptierten Hypothese zur Folge wird die Krankheit offenbar durch die verminderte Expression und nicht den völligen Verlust von SMN hervorgerufen (Lefebvre *et al.*, 1997).

2.2.1.2 Die Funktion von SMN in der Biogenese von snRNP

Die Identifizierung von *SMN1* als Krankheitsgen der SMA ermöglichte die Analyse der zellulären Funktion des SMN-Proteins und damit der molekularen Ursachen der Krankheit. Erste Experimente zur Charakterisierung ergaben, dass das Gen in allen humanen Zellen

ubiquitär exprimiert wird (Lefebvre *et al.*, 1995). Dies, wie auch der Befund, dass das Gen essentiell für das Überleben der Zellen ist (Schrank *et al.*, 1997), legen nahe, dass es sich bei *SMN* um ein so genanntes Haushaltsgen handelt, also eine grundsätzliche Funktion im Stoffwechsel von Zellen erfüllt.

SMN1 kodiert für ein Protein mit 294 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 38 kDa (Lefebvre *et al.*, 1995), dessen einziges Charakteristikum eine sogenannte Tudor-Domäne ist. Dieses ca. 50 Aminosäuren umfassende Motiv ist evolutionär konserviert und kommt in einigen putativen RNA-bindenden Proteinen vor (Ponting, 1997).

Lokalisationsstudien in HeLa-Zellen ergaben, dass *SMN* sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern gefunden wird. Interessanterweise ist es dabei im Zellkern in distinkten Strukturen, sogenannten „gems“ (*gemini of coiled bodies*) konzentriert, welche in unmittelbarer Nachbarschaft von „cajal bodies“ gefunden wurden (Liu and Dreyfuss, 1996). Letztere weisen einen hohen Gehalt an snRNP (*small nuclear ribonucleoproteins*) auf und für sie wird eine Funktion bei der Reifung und als Speicherort der Spleißosom-Komponenten diskutiert (Matera and Frey, 1998).

Das Spleißosom ist ein makromolekularer Komplex, welcher sich aus Proteinen und einer prä-mRNA aufbaut und das prä-mRNA-Spleißen im Zellkern von Eukaryonten katalysiert (zusammengefasst in Kramer, 1996; Burge *et al.*, 1999).

Hauptbestandteile des Spleißosoms sind vier verschiedene RNA-Protein-Partikel, die snRNP (für: *small nuclear ribonucleoproteins*), welche nach ihrem RNA-Anteil als U1-, U2-, U5- und U4/U6-snRNP bezeichnet werden. Alle U-snRNAs (*small nuclear RNA*) haben eine ausgeprägte Sekundärstruktur und besitzen, mit Ausnahme der U6-snRNA; Singh and Reddy, 1989) eine so genannte „Sm-Site“, einen Uridyl-reichen Abschnitt, der als Bindungsstelle für die Sm-Proteine dient (Branlant *et al.*, 1982).

Neben den für jede der jeweiligen U-snRNAs spezifischen Proteinen (zusammengefasst in Jurica and Moore, 2003), existieren auch sieben Proteine, welche allen snRNP gemeinsam sind: die Sm-Proteine B/B', D1, D2, D3, E, F und G (B' ist eine Spleißvariante von B). Sie sind benannt nach ihrer Reaktivität mit Autoantikörpern des Sm-Serotyps von Patienten mit systemischem Lupus erythematoses.

Biochemische und strukturelle Untersuchungen offenbarten, dass die Sm-Proteine als heptamerer Ring an die Sm-Bindungsstelle der snRNAs gebunden sind (Kambach *et al.*, 1999b; Kastner *et al.*, 1990; Raker *et al.*, 1999; Stark *et al.*, 2001). Zusammen mit der snRNA bilden sie den sogenannten *Sm-Core* aus, ein strukturelles Grundgerüst, das allen spleißosomalen snRNP gemeinsam ist (vgl. Abbildung 2-5).

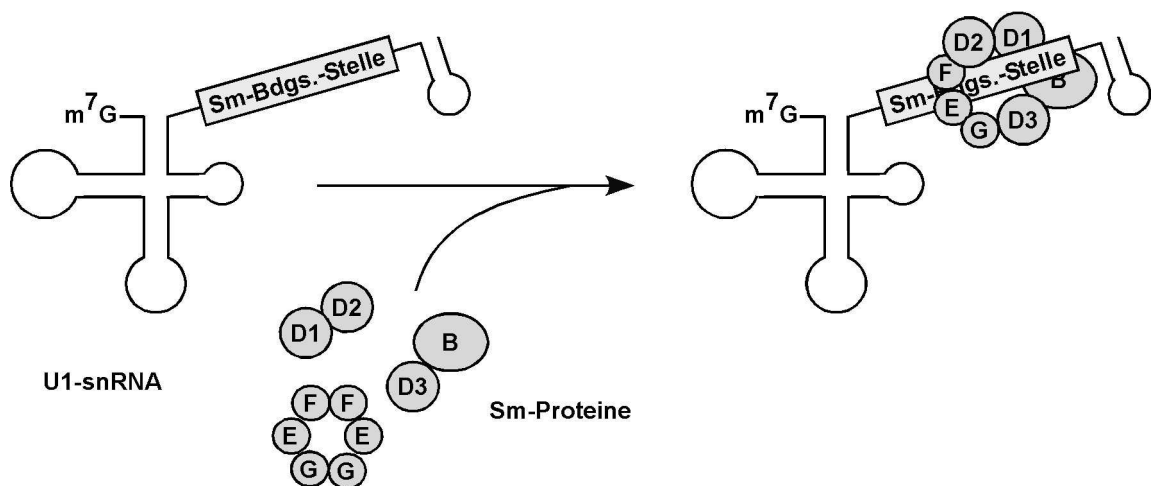


Abbildung 2-5 Die Ausbildung der Sm-Core-Struktur auf der U1-snRNA. Schematische Darstellung zeigt schematisch die Zusammenlagerung der Sm-Proteine zum heptameren Ring auf der hier als Beispiel gewählten U1-snRNA. Die zum Teil methylierten Sm-Proteine werden vom SMN-Komplex auf der RNA assembliert, wobei sie an die Sm-Bindungsstelle binden, die in allen U-snRNAs gefunden wird.

Von den spleißosomalen U-snRNAs bindet nur U6 keine Sm-Proteine. Stattdessen formen die strukturell eng verwandten LSM-Proteine 2-8 (*like Sm*) einen heptameren Ring am Uridinreichen 3'-Ende der U6-snRNA aus, welcher der Sm-Core-Domäne strukturell sehr ähnlich ist (Salgado-Garrido *et al.*, 1999; Toro *et al.*, 2001).

Obwohl sich die U-snRNP *in vitro* spontan zusammenlagern können (Raker *et al.*, 1996; Raker *et al.*, 1999), konnte nachgewiesen werden, dass das Sm-Core-Assembly *in vivo* ein ATP-abhängiger Prozess ist, welcher zusätzliche Faktoren, insbesondere SMN, erfordert. Untersuchungen in Oocyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* haben gezeigt, dass die Biogenese der spleißosomalen snRNP in mehreren Schritten im Zellkern und im Cytoplasma erfolgt (Mattaj, 1988). Alle spleißosomalen snRNAs außer U6 werden von der RNA-Polymerase-II transkribiert und verlassen als m^7G -gecappte Vorläufer vorübergehend den Zellkern. Im Cytoplasma assoziieren sie mit Sm-Proteinen und bilden so die Sm-Core-Struktur aus (Zeller *et al.*, 1983). Diese ist die Voraussetzung für die anschließende Prozessierung und Modifikation der snRNA, einschließlich der Umwandlung der m^7G -Capstruktur zum $m_3^{2,2,7}G$ -Cap (Cap-Hypermethylierung) (Yang *et al.*, 1992; Mattaj, 1986). Das zusammengelagerte Partikel wird anschließend durch spezifische Transportrezeptoren, welche sowohl das m_3G -Cap als auch die Sm-Core-Domäne erkennen, in den Zellkern transportiert (Fischer *et al.*, 1993; Huber *et al.*, 2002). Nach der cytoplasmatischen Reifung wird das snRNP in den Zellkern transportiert (Fischer *et al.*, 1993). Derzeit ist noch unklar, zu welchem Zeitpunkt der snRNP-Biogenese die Assoziation mit den spezifischen Proteinen erfolgt.

Untersuchungen in *Xenopus laevis* Oocyten und einem zellfreien experimentellen Assay-System haben bestätigt, dass SMN, im Komplex mit mindestens 18 weiteren spezifischen Proteinen, essentiell für diese Reaktion ist (Fischer *et al.*, 1997; Buhler *et al.*, 1999; Meister *et al.*, 2001a). So konnte gezeigt werden, dass in SMN-immunodepletierten Zellextrakten kein U-snRNP-Assembly mehr stattfindet, dieses jedoch nach Zugabe von aufgereinigtem SMN-Komplex jedoch wiederhergestellt werden kann (Meister and Fischer, 2002). Die Daten sprechen dafür, dass die Assoziation der Sm-Proteine mit dem SMN-Komplex der grundlegende Schritt im U-snRNP-Assembly ist.

2.2.2 Protein-Arginin-Methyltransferasen

Die Methylierung von Proteinen gehört, wie auch die Phosphorylierung, zu den posttranslationalen Modifikationen, die der Zelle noch nach der Translation gestatten, die Aktivität von Proteinen zeitlich oder räumlich koordinieren zu können. Obwohl Proteine auch an Lysinen und Histidinen methyliert werden, sind in erster Linie Arginine das Ziel dieser Modifikation. Drei Hauptformen der Protein-Arginin-Methylierung wurden bisher gefunden: Monomethylarginine (MMA), symmetrische Dimethylarginine (sDMA) und asymmetrische Dimethylarginine (aDMA) (vgl. Abbildung 2-6).

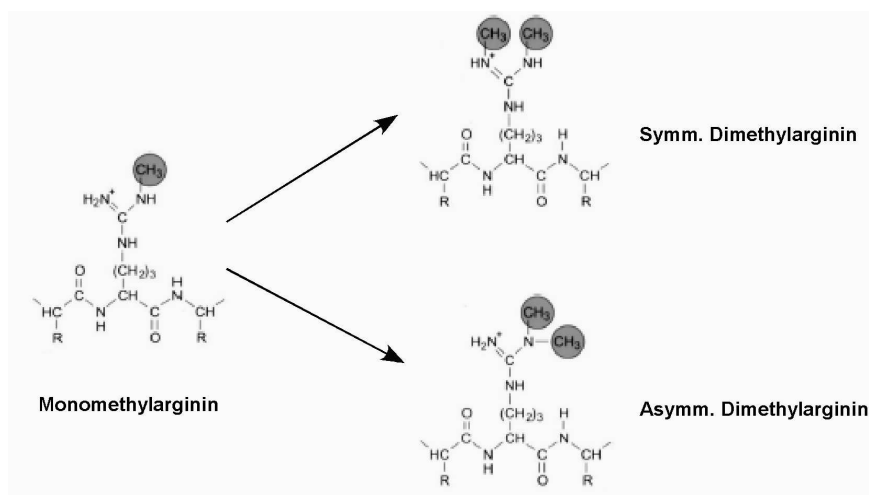


Abbildung 2-6 Die durch Protein-Arginin-Methyltransferasen katalysierten Modifikationen. Die Abbildung zeigt die symmetrische und asymmetrische Dimethylierung an Argininen und deren Vorstufe, die Monomethylierung (übernommen aus Aletta *et al.*, 1998).

Asymmetrische Dimethylierungen werden dabei von den Typ-I-Methyltransferasen PRMT1-4, sowie vermutlich auch PRMT6, katalysiert. PRMT5 dagegen ordnet man den Typ-II-Methyltransferasen zu, deren Proteinsubstrate eine symmetrische Dimethylierung erhalten.

Ein Vergleich der bisher bekannten Substrate für diese Form der posttranslationalen Modifikation ergab, dass die Mehrzahl von ihnen innerhalb einer Sequenz methyliert werden, welche als RNA-bindende Domäne beschrieben wurde (Kiledjian and Dreyfuss, 1992). Dennoch sieht es so aus, als würden hierdurch nicht die RNA-Bindeeigenschaften (Valentini *et al.*, 1999), sondern eher Protein-Protein-Interaktionen des Substrats moduliert werden. Im Gegensatz zu anderen posttranslationalen Modifikationen wie z.B. Phosphorylierungen oder Acetylierungen gibt es bisher keine Hinweise darauf, dass Methylierungen reversibel sind. Während nach und nach weitere Methyltransferasen und deren Substrate beschrieben werden (vgl. Boisvert *et al.*, 2003), liegen die genauen Funktionen der katalysierten Methylierungen größtenteils noch im Dunkeln.

2.2.3 Der PRMT5-Komplex

2.2.3.1 Die Protein-Arginin-Methyltransferase 5

Das Protein PRMT5 wurde ursprünglich von Pollack *et al.* mit Hilfe eines *Yeast-Two-Hybrid-Screens* nach Janus-Kinase-2-Interaktoren im Jak/Stat-Signaltransduktionsweg als *Janus kinase binding protein 1* (JBP1) identifiziert. Das ca. 72 Kilodalton große Protein ist hauptsächlich cytoplasmatisch lokalisiert und zeigt in Sequenzvergleichen deutliche Homologien zu anderen Protein-Arginin-Methyltransferasen (Pollack *et al.*, 1999). Interessanterweise handelt es sich bei PRMT5 um die erste Protein-Arginin-Methyltransferase von der man weiß, dass sie die Bildung symmetrischer Dimethylarginine (sDMA) katalysiert und damit zur Gruppe der Typ-II-Enzyme gehört (Branscombe *et al.*, 2001). Die Entdeckung von sDMAs in den spleißosomalen Proteinen SmB, D1 und D3 (Brahms *et al.*, 2000) ließ schnell vermuten, dass mit ihnen ein *in-vivo*-Substrat für PRMT5 gefunden worden war (Friesen *et al.*, 2001c; Meister *et al.*, 2001b).

Wie alle bis heute beschriebenen Arginin-Methyltransferasen verfügt PRMT5 über eine so genannte Methyltransferasedomäne, welche sich unter anderem aus einer S-Adenosylmethionin-bindenden Sequenz (Aminosäure 365-369, GAGR_G) und einer weniger konservierten, C-terminalen Region von bisher unbekannter Funktion zusammensetzt (Rho *et al.*, 2001). Abbildung 2-7 zeigt einen grafischen Homologievergleich der verschiedenen humanen Protein-Arginin-Methyltransferasen.

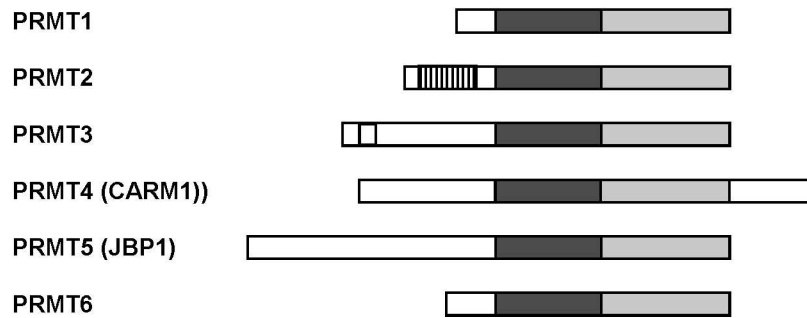


Abbildung 2-7 Die humanen Protein-Arginin-Methyltransferasen sind in ihrer Domänenstruktur hoch konserviert. Schematische Darstellung der sechs humanen Methyltransferasen als Protein-Primärstruktur. Die Homologie erstreckt sich vor allem über die Methyltransferasedomäne (schwarz) und eine weniger homologe, C-terminale Region (grau). Andere bekannte, nicht konservierte Domänen sind die SH3- (gestreift, in PRMT2) und die Zinkfingerdomäne von PRMT3. Abbildung übernommen aus (McBride and Silver, 2001).

Co-Immunpräzipitationen und *in-vitro*-Methylierungsassays ergaben, dass der 1999 von Pu *et al.* isolierte PRMT5-Komplex mit den assoziierten Bindungspartnern pICln und WD45/MEP50 die symmetrische Arginin-Methylierung der genannten Sm-Proteine katalysiert, welches als Voraussetzung für deren Bindung an SMN gilt (Meister *et al.*, 2001b), (Brahms *et al.*, 2001a). Diese Daten implizieren, dass der PRMT5-Komplex eine Funktion in der snRNP-Biogenese innehat, indem er die Sm-Core-Proteine SmB, D1 und D3 methyliert und anschließend an den Assembly-Faktor SMN übergibt.

2.2.3.2 Interaktoren von PRMT5

Im PRMT5-Komplex (*Methylosome*, Friesen *et al.*, 2001b) konnte bisher nur die Funktion der Protein-Arginin-Methyltransferase PRMT5 geklärt werden. Von zwei weiteren Komponenten des bei ca. 20 S sedimentierenden, cytoplasmatischen Komplexes, pICln und WD45/MEP50, weiß man weitaus weniger (Pu *et al.*, 1999).

Obwohl pICln ursprünglich als Ionenkanal-Komponente identifiziert wurde (Paulmichl *et al.*, 1992), legten eine fehlende Transmembrandomäne und die sowohl cytoplasmatische, als auch nukleäre Lokalisation eine andere Funktion des ca. 37 Kilodalton schweren Proteins nahe. PICln konnte man bisher noch keine Homologie zu bereits bekannten Proteinen nachweisen, sodass man auf eine bestimmte Funktion hätte schließen können. Die Bindung der Sm-Domäne der Sm-Proteine SmD1 und D3 und die Interaktion mit PRMT5 sprechen jedoch für eine Funktion bei der Methylierung von snRNP-Core-Proteinen (Friesen *et al.*, 2001a; Pu *et al.*, 1999).

Mittels Dichte-Gradientenzentrifugation konnten Friesen *et al.* neben dem 20S PRMT5-Komplex auch noch einen 6S Komplex isolieren. Dieser besteht aus pICln und den Sm-

Proteinen SmD1, D2, D3 und zeigt erwartungsgemäß keine Methylierungsaktivität. Seine genaue Funktion ist noch unklar (Friesen *et al.*, 2001b).

Dies gilt auch für WD45/MEP50, dem dritten Protein im PRMT5-Komplex. Wie pICln bindet es in *in-vitro*-Bindungsassays die beiden Sm-Proteine SmD1 und D3, außerdem auch noch SmB, D2 und E (Friesen *et al.*, 2002).

WD45 (bzw. MEP50 für *methylosome protein 50 kDa*) gehört zur Gruppe der WD-Wiederholungen enthaltenden Proteine, deren Gemeinsamkeit in der Ausbildung einer speziellen, sequenzbedingten β -Faltblattstruktur liegt. Es wird diskutiert, dass sie als Plattform für Protein-Protein-Wechselwirkungen fungiert (Wall *et al.*, 1995; Garcia-Higuera *et al.*, 1996; Sondek *et al.*, 1996). *In-vitro*-Bindungsassays von WD45 mit den Sm-Proteinen scheinen dies zu bestätigen.

Zusammengefasst implizieren die Daten weniger eine regulatorische Funktion von WD45 und pICln bei der Protein-Arginin-Methylierung, sie scheinen eher für die Präsentation der Substrate an das Enzym PRMT5 verantwortlich zu sein.

Das Zusammenspiel der PRMT5-Komplexkomponenten bei der Methylierung der Sm-Proteine ist einer der Punkte, welche in dieser Arbeit adressiert werden.

2.2.3.3 Die Funktion von PRMT5 in der Sm-Core-Biogenese

Betrachtet man die aktuellen Daten über PRMT5 und SMN, wird eine zeitliche Abfolge ihrer Funktionen erkennbar. Hierbei scheint es, dass die Methylierungsaktivität von PRMT5 die Voraussetzung für das Sm-Core-Assembly durch den SMN-Komplex schafft. Durch die drei Hauptkomponenten des PRMT5-Komplexes, PRMT5, pICln und WD45 werden unmethylierte Sm-Proteine gebunden (Friesen *et al.*, 2001b; Friesen *et al.*, 2002) und in ihrer RG-reichen Region symmetrisch dimethyliert. So modifiziert können sie von SMN gebunden (Buhler *et al.*, 1999; Brahms *et al.*, 2001a) und mit Hilfe des SMN-Komplexes als heptamerer Ring auf den snRNAs assembliert werden (Raker *et al.*, 1996; Kambach *et al.*, 1999a; Meister *et al.*, 2002). Abbildung 2-8 fasst ein Modell dieser Theorie zusammen.

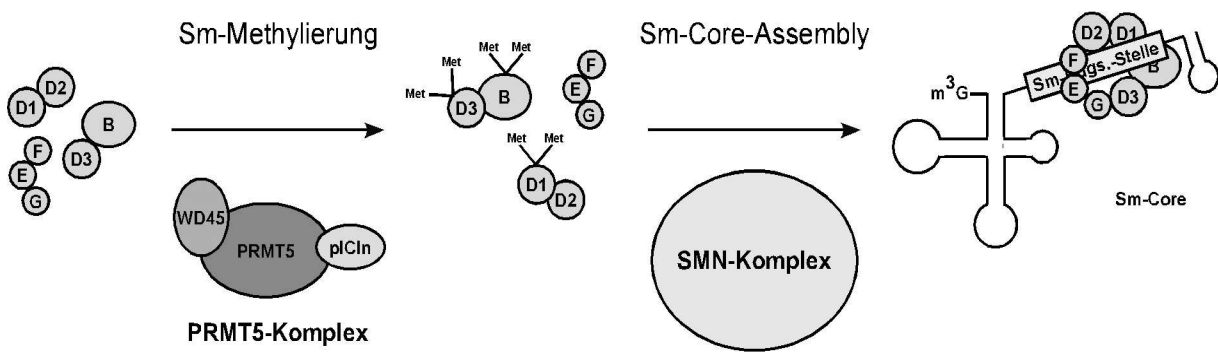


Abbildung 2-8 Ein Modell der sequentiellen Abfolge von Sm-Methylierung und Sm-Core-Assembly. Schematische Darstellung der an der Sm-Methylierung und dem Core-Assembly beteiligten Protein- und RNA-Komponenten. Die symm. Dimethylierung der drei Sm-Proteine SmB, SmD1 und SmD3 wird durch den PRMT5-Komplex (PRMT5, pICln und WD45) katalysiert, die Aufgabe der anschließenden Zusammenlagerung zum heptameren Ring auf der U-snRNA übernimmt der SMN-Komplex.

Bisher unklar ist der Mechanismus, der zur Übertragung der Sm-Proteine vom PRMT5- auf den SMN-Komplex führt. Da nur drei (SmB, D1 und D3) der sieben Sm-Proteine methyliert werden, stellt sich die Frage, in welchem Schritt die restlichen vier Proteine in den Sm-Core-Ring integriert werden. Biochemische Untersuchungen gaben Hinweise darauf, dass vor der Methylierung bereits Sm-Heterodimere/-oligomere bestehen, von denen dann jeweils ein Bindungspartner methyliert wird (Raker *et al.*, 1996; Kambach *et al.*, 1999b). So modifiziert können zwei oder drei Sm-Proteine gleichzeitig auf SMN übertragen werden, ohne dass jedes von ihnen methyliert ist. Mittels *in-vitro*-translatierter Sm-Proteine in U-snRNA-freien Systemen konnten Heteromere aus SmD1/D2, SmB/D3 und SmE/F/G rekonstruiert werden. Es wird diskutiert, dass diese auch bei höheren Salzkonzentrationen stabilen Komplexe Vorstufen auf dem Weg zum Sm-Core-Ring darstellen. Ihre deutlich größere Stabilität in der rekombinanten Co-Expression mit ihren jeweiligen putativen Bindungspartnern gegenüber der Expression als Einzelprotein spricht ebenfalls für ein Vorliegen als Heteromer (Ch. Kambach, persönliche Mitteilung).

Bisher fehlen allerdings entsprechende *in-vivo*-Beweise für bereits fertig zusammengebaute Sm-Core-Komponenten.

2.3 Ziel dieser Arbeit

Obwohl das *Fragile X Mental Retardation Protein* (FMRP) als Ribosomen-assoziiertes, RNA-bindendes Protein bekannt war, gab es zu Beginn dieser Arbeit keine Daten über dessen

zelluläre Funktion. Diese Arbeit verfolgte die Hypothese, dass FMRP aufgrund der genannten Eigenschaften ein Regulator der Translation sein könne, was mit einem zu etablierenden Testsystem untersucht werden sollte. Hierfür war beabsichtigt, FMRP funktionell in *E. coli* zu exprimieren, daraus zu reinigen und seine Aktivität anhand bekannter Eigenschaften (RNA-Bindung und Oligomerisierung) zu verifizieren. Für die Analyse von FMRP stand außerdem eine mutierte Version von FMRP (I304N) zur Verfügung, die bei einem Patienten mit Fragilem X-Syndrom zu einem äußerst schweren Krankheitsbild führt. Dies ermöglichte, die Funktion von FMRP mit Bezug zur Krankheit zu überprüfen. Wie sich im Zuge der Arbeiten zeigen sollte, konnte der postulierte Effekt von FMRP auf die Translation in der Tat bestätigt werden (Laggerbauer *et al.*, 2001), sodass sich als Folgeziel die Eingrenzung jener funktionellen Domänen in FMRP anschließen würde, welche für Translationsinhibition, RNA-Bindung sowie Homo- und Hetero-Oligomerisierung erforderlich sind. Der Frage, ob FMRP posttranslational modifiziert wird und so selbst in seiner Aktivität reguliert werden könne, sollte mit geeigneten Testsystemen *in vivo* und *in vitro* nachgegangen werden.

Ausgangspunkt des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit war die Beobachtung, dass einige Sm-Proteine Ziel einer symmetrischen Dimethylierung durch die Protein-Arginin-Methyltransferase PRMT5 sind. Diese Modifikation ist Voraussetzung für die Interaktion mit SMN und spielt damit eine wichtige Rolle bei der Ausbildung des Sm-Core. Die funktionelle Analyse von PRMT5 sollte dabei Einblicke in den Katalysemechanismus des Enzyms ermöglichen. Als Voraussetzung hierfür war beabsichtigt, zu Anfang die Bindungsverhältnisse der Hauptkomponenten des PRMT5-Komplexes, PRMT5, pICln und WD45, mittels *in-vitro*-translatierter Proteine und Immunpräzipitationen aus Zelllysaten genauer zu untersuchen. Daran anschließend sollte die jeweilige Aufgabe der drei Komplexkomponenten bei der Sm-Methylierung ergründet werden. Zu diesem Zweck sollten alle beteiligten Proteine rekombinant in *E. coli* exprimiert werden und daraufhin in unterschiedlich konzipierten *in-vitro*-Assays auf ihre Funktion in der Methylierungsreaktion hin überprüft werden.

3 Material

3.1 Chemikalien und Enzyme

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien in Analyse-Qualität von den Firmen *Biorad*, *Roche*, *Fluka*, *Gibco BRL*, *Merck*, *Roth* und *Sigma* bezogen. Radiochemikalien stammten von der Firma *Amersham-Pharmacia*, Enzyme von den Firmen *MBI*, *Promega* und *New England Biolabs*. Oligonukleotide wurden bei der Firma *Metabion* synthetisiert.

3.2 Puffer und Kulturmedien

RNA-Probenpuffer (denaturierend)	90 % (v/v) Formamid 0,025 % (w/v) Xylencyanol 0,025 % Bromphenolblau
5 %iges denat. RNA-Gel	0,5x TBE 5 % PAA (Rotiphorese Gel 40, Fa. Roth) 8 M Harnstoff 500 µl 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat (APS) 50 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) ad 100 ml H ₂ O
RNA-Probenpuffer (nativ)	15 % (v/v) Glyzerin 10 mg/ml Heparin 0,025 % (w/v) Xylencyanol 0,025 % (w/v) Bromphenolblau
6 %iges natives RNA-Gel (nativ)	30 ml 20 %iges Acrylamid (80:1) 5 ml 10x TBE 4,6 ml Glyzerin 500 µl APS 50 µl TEMED ad 100 ml H ₂ O

AES-Puffer (RNA-Isolierung)	300 mM Na ⁺ -Acetat (pH 5,2) 2 mM EDTA 0,1 % (w/v) SDS
PBS (phosphate buffered saline)	130 mM NaCl 77,4 ml 1M Na ₂ HPO ₄ 22,6 ml 1M NaH ₂ PO ₄ ad 1 L ddH ₂ O
4x Proteinprobenpuffer	100 mM Tris-HCl pH 6.8 2,5 mM EDTA 0,1 % Bromphenolblau 50 % Glycerin 100 mM DTE (Dithioerythrol)
1x Probenpuffer mit Urea	4,8 g Urea 5 % SDS 200 mM Tris-HCl pH 6,8 1 mM EDTA 10 % β-Mercaptoethanol
TBT-Puffer	175,2 g NaCl 14,5 g Tris-Base 60 g Tris-HCl 100 ml Tween-20 ad 2 L H ₂ O
IP-Puffer	150 mM NaCl 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) 5 mM MgCl ₂ 0,01 % Nonidet P-40
1x TBE-Puffer	89 mM Tris-HCl pH 8.3

	89 mM Borsäure
	2,5 mM EDTA
5 %ige Sammelgellösung	1,5 ml 30 % Acrylamid-Lösung (Vernetzungsgrad: 37,5:1)
	1,5 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6.8
	50 µl 20 % (w/v) SDS
	5 µl TEMED
	100 µl 10 % APS
	ad 10 ml H ₂ O
12 %ige Trenngellösung	4 ml 30 % Acrylamid-Lösung (Vernetzungsgrad: 37,5:1)
	2 ml 2M Tris-HCl pH 8,0
	50 µl 20 % SDS
	4 µl TEMED
	100 µl 10 % APS
	ad 10 ml H ₂ O
Elektrophorese-Laufpuffer	150 g Glycin
	30 g Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
	10 g SDS
	ad 1 L H ₂ O
Wasch-Puffer	300 mM NaCl
	50 mM Tris-HCl (pH 8,5)
	5 mM MgCl ₂
Roeder A-Puffer	10 mM KCl
	10 mM Hepes-KOH (pH 7,9)
	1,5 mM MgCl ₂
	0,5 mM DTT
	0,5 mM PMSF
Roeder C-Puffer	420 mM KCl
	10 mM Hepes-KOH (pH 7,9)

1,5 mM MgCl₂
0,5 mM DTT
0,2 mM EDTA
5 % (v/v) Glyzerin
0,5 mM PMSF

Roeder D-Puffer

100 mM KCl
20 mM Hepes-KOH (pH 7,9)
1,5 mM MgCl₂
0,5 mM DTT
20 % (v/v) Glyzerin
0,5 mM PMSF

10x Methylierungspuffer

500 mM Tris-HCl (pH 7,4)
20 mM EDTA
20 mM EGTA

Aufschlusspuffer

300 mM KCl
50 mM Tris-HCl (pH 7,4)
2 mM EDTA
0,5 mM DTT
0,1 % Nonidet P40

Medium zur Kultivierung von *E. coli* (2YT)

16 g/l Bacto-Trypton (Fa. Difco)
10 g/l Bacto-Yeast-Extrakt (Fa. Difco)
5 g/l NaCl
pH 7,4

Superbroth

3,5 % (w/v) Bactotrypton
2 % (w/v) Hefeextrakt
0,5 % (w/v) NaCl

3.3 Antikörper

Die folgende Tabelle gibt die verwendeten Antikörper und -seren wieder. Sekundäre Antikörper für Westernblot waren mit Peroxidase, solche für Immunfluoreszenzmikroskopie mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) oder Tetramethylrhodaminisothiocyanat (TRITC) konjugiert.

Tabelle 3-1 Übersicht über die verwendeten Antikörper

Name (Klon)	Antigen	Herkunft, Typ	Hersteller / Referenz	Zustand
primäre Antikörper:				
anti-FMRP(36.1)	FMRP	Maus, monoklonal	diese Arbeit	affinitätsgereinigter Hybridoma-Überstand
anti-PRMT5	PRMT5	Kaninchen, polyklonal	diese Arbeit	affinitätsgereinigtes Serum
anti-pICln	pICln	Kaninchen, polyklonal	Fa. Charles River	affinitätsgereinigtes Serum
anti-WD45	WD45	Kaninchen, polyklonal	diese Arbeit	affinitätsgereinigtes Serum
anti-SMN	SMN	Maus, monoklonal	D. Bühler	affinitätsgereinigter Hybridoma-Überstand
sekundäre Antikörper:				
anti-mouse IgG FITC conjugate	Maus-IgG	Ziege, polyklonal	Fa. Sigma	gereinigt, präadsorbiert
anti-mouse IgG TRITC conjugate	Maus-IgG	Ziege, polyklonal	Fa. Sigma	gereinigt, präadsorbiert
anti-mouse IgG peroxidase conjugate	Maus-IgG	Ziege, polyklonal	Fa. Sigma	gereinigt
anti-rabbit IgG FITC conjugate	Kaninchen-IgG	Ziege, polyklonal	Fa. Sigma	gereinigt, präadsorbiert
anti-rabbit IgG TRITC conjugate	Kaninchen-IgG	Ziege, polyklonal	Fa. Sigma	gereinigt, präadsorbiert
anti-rabbit IgG peroxidase conjugate	Kaninchen-IgG	Ziege, polyklonal	Fa. Sigma	gereinigt

3.4 Plasmide

Tabelle 3-2 fasst die in dieser Arbeit verwendeten Plasmid-Vektoren zusammen, Tabelle 3-3 listet die verwendeten cDNA-Konstrukte auf.

Die verwendeten *Tags* zur Proteinisolierung waren:

His: 6x Histidin

ZZ: immunogene Domäne von Protein A aus *Staphylococcus aureus*

GST: Glutathion-S-Transferase

Tabelle 3-2 Übersicht über die verwendeten Plasmid-Vektoren

Vektor	Hersteller / Referenz	Organismus	Eigenschaften
pET21a	Fa. Novagen	<i>E. coli</i>	prokaryontischer Expressionsvektor für Proteine mit N- und C-terminalem His-tag
pET21a-ZZ	(Buhler <i>et al.</i> , 1999)	<i>E. coli</i>	prokaryontischer Expressionsvektor für Proteine mit N-terminalem ZZ-tag und C-terminalem His-tag
pET28a	Fa. Novagen	<i>E. coli</i>	prokaryontischer Expressionsvektor für Proteine mit C-terminalem His-tag
pGEX-5X-1	Fa. Amersham-Pharmacia	<i>E. coli</i>	prokaryontischer Expressionsvektor für Proteine mit N-terminalem GST-tag
pGEX-6X-1	Fa. Amersham-Pharmacia	<i>E. coli</i>	prokaryontischer Expressionsvektor für Proteine mit N-terminalem GST-tag

Tabelle 3-3 Übersicht über die verwendeten cDNA-Konstrukte

Protein (cDNA)	Aminosäuren	Plasmid	Konstrukt
FMRP	1-632	pHA	pHA-FMRP
		pET21a-zz	pZZ-FMRP
		pET21a	p21-FMRP
	1-215	pET21a	p21-FMRP1-215
	1-277	pET21a	p21-FMRP1-277
	1-332	pET21a	p21-FMRP1-332
	1-430	pET21a	p21-FMRP1-430
	112-332	pET21a	p21-FMRP112-332
216-632	pET21a	p21-FMRP216-632	
430-632	pET21a	p21-FMRP430-632	
FMRP-I304N	1-430	pET21a-ZZ	pZZ-FMRP-I304N
		pET21a	p21-FMRP-I304N 1-430
	112-332	pET21a	p21-FMRP-I304N 112-332
	1-632	pET21a	p21-FMRP-I304N 1-632
FXR1	1-621	pET21a-ZZ	pZZ-FXR1
		pET21a	p21-FXR1
FXR2	1-673	pET21a-zz	pZZ-FXR2
		pET21a	p21-FXR2
PRMT5	1-638	pGEX-6X-1	pGEX-PRMT5
		pET21a	p21-PRMT5

Protein (cDNA)	Aminosäuren	Plasmid	Konstrukt
pICln	1-237	pGEX-6X-1	pGEX-pICln
	1-237	pET21a	p21-pICln
WD45	1-343	pGEX-6X-1	pGEX-WD45
	1-343	pET21a	p21-WD45
pICln-PRMT5-WD45	Jeweils volle Länge der cDNAs + dazwischenliegende IRES	pET28a	Tricistron
SmB	1-231	pGEX-6X-1	pGEX-SmB
	1-231	pET28a	p28-SmB
SmD3	1-126	pGEX-6X-1	pGEX-SmD3
	1-126	pET28a	p28-SmD3
Heterodimer SmB/SmD3	Jeweils volle Länge	Nur als Protein, zur Verfügung gestellt von Ch. Kambach	

3.5 Organismen

Bakterien:

Für Klonierungen und zur prokaryontischen Proteinexpression wurden die *Escherichia coli* Stämme DH5 α (Fa. Gibco BRL) und BL-21(DE3) (Fa. Stratagene) verwendet.

Genotypen:

DH5 α : F⁻, λ ⁻, hsdR17, deoR, endA1, supE44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, Δ (argF-lacZYA)169, Φ 80d(lacZ Δ M15)

BL21(DE3): F⁻, dcm, ompT, hsdS(rB⁻ mB⁻), gal, (DE3)

Zell-Linien:

Zur transienten Transfektion, Extrakterstellung, und für Lokalisationsstudien fanden die Zell-Linien HeLa S3 (humane Zervixkarzinom-Zellen) und 293 (humane, embryonale, Ad5-transformierte Nierenzellen) Verwendung. Erstere waren zur Extraktpräparation Suspensionszellen (Darnell *et al*, 1959), letztere adhärent wachsende Säugerzellen.

Tiere:

Die Herstellung von Antiseren erfolgte durch Immunisierung von Kaninchen bzw. Mäusen.

4 Methoden

4.1 Molekular- und zellbiologische Methoden

Alle nicht näher beschriebenen molekularbiologischen Standardmethoden (DNA/RNA-Gelelektrophorese, -Extraktion, -Präzipitation und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren etc., PCR) wurden nach (Sambrook *et al.*, 1989) bzw. nach den jeweiligen Herstellerangaben durchgeführt. Dort finden sich auch die Zusammensetzungen der nicht näher beschriebenen Puffer und Lösungen.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit dem „Mini-“ bzw. „Maxi-Plasmid-Purification-Kit“ der Firma Qiagen. Für die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der „Qiaquick-Kit“ der Firma Qiagen verwendet, PCR-Produkte wurden mit dem PCR-Purification-Kit aufgereinigt.

Transformationen von Plasmid-DNA in die *E. coli* Stämme DH5 α und BL21(DE3) erfolgte nach der Hitzetransformations-Methode, ebenfalls aus (Sambrook *et al.*, 1989).

4.1.1 Klonierung von cDNA-Fragmenten

Die in dieser Arbeit verwendeten cDNA-Konstrukte sind in Tabelle 3-3 zusammengefasst. Wenn nicht anders angegeben wurden alle in dieser Arbeit verwendeten cDNAs bei Umklonierung durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach den Protokollen von Innis *et al.* amplifiziert (Innis and Gelfand, 1990). Als Matrize (*template*) hierfür dienten die in Kapitel 3.4 genannten, bereits klonierte cDNAs. Als Primer wurden im Einzelnen nicht aufgeführte, spezifische Oligonukleotide verwendet, die am 5'- bzw. am 3'-Ende eine geeignete Restriktionsschnittstelle aufwiesen, mit deren Hilfe die betreffende cDNA in Plasmid-Vektoren inkloniert wurde. Für alle PCR-Reaktionen wurde das *Expand High Fidelity PCR System* der Fa. Roche verwendet.

4.1.2 Kultivierung und Transfektion von Säugerzellen

Säugerzellen werden bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit auf Kunststoff-Gewebekulturschalen bzw. in Gewebekulturflaschen kultiviert. Als Kulturmedium (Vollmedium) wird *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Fa. Gibco BRL) mit 10 % (v/v) fetalem Kälberserum (FCS, Fa. Gibco BRL), 2 mM L-Alanyl-L-glutamin (Gibco BRL)

und 0,1 mg/ml Penicillin/Streptomycin (Fa. Sigma) verwendet. Bei einer Konfluenz von etwa 70 % werden die Zellen passagiert. Dazu werden sie nach Entfernen des Mediums mit PBS (37°C) gewaschen, dann mit 1 % Trypsin in PBS von der Kulturschale abgelöst. Es wird frisches Vollmedium zugegeben und die Zellen in geeigneter Verdünnung (1:2 bis 1:10) auf neuen Kulturschalen ausgesät, so dass sie eine Konfluenz von ca. 15 % erreichen. Alle Zellkulturarbeiten erfolgen unter sterilen Bedingungen.

4.2 Biochemische Methoden

4.2.1 Standardmethoden der Proteinbiochemie

Alle proteinbiochemischen Standardmethoden wurden nach den Versuchsvorschriften in Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Dort finden sich auch die Zusammensetzungen der in dieser Arbeit nicht aufgeführten Puffer.

4.2.2 Diskontinuierliche Gelelektrophorese von Proteinen

Die Auftrennung von Proteinen erfolgt durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach Laemmli, 1970. Dafür wird zwischen zwei abgedichtete Glasplatten zunächst ein Trenngel, nach der Polymerisation darauf dann ein Sammelgel gegossen. Die genaue Vorgehensweise hierzu ist in (Sambrook *et al.*, 1989) beschrieben. Nach der Polymerisation wird das Gel in eine mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoreseapparatur eingespannt. Die Proteinproben (bis 20 µl) werden mit einem Drittel Volumen Protein-Probenpuffer versetzt und bei 96°C für 5 min denaturiert. Anschließend werden sie in die Probenaschen des Gels pipettiert und bei einer Stromstärke von 65 bis 70 mA aufgetrennt.

Zur Coomassie-Färbung der aufgetrennten Proteine wird das Gel nach der Elektrophorese für 30 min in Färbelösung (0,1 % [w/v] Coomassie Brilliant Blue R-250, 30 % [v/v] Methanol, 10 % [v/v] Essigsäure), danach mehrfach in Entfärbelösung (30 % [v/v] Methanol, 10 % [v/v] Essigsäure) geschwenkt. Zum immunologischen Nachweis werden die Proteine nach der Elektrophorese auf eine Nitrozellulose- oder PVDF-Membran transferiert (Westernblot-Verfahren, siehe 4.3.4 Westernblot). Zum Nachweis radioaktiv markierter Proteine wird das Gel zur Fixierung für 30 min in 30 % Essigsäure geschwenkt, das radioaktive Signal mit Hilfe von Amplify (Fa. Amersham Pharmacia) verstärkt, das Gel in einem Gelrockner getrocknet und autoradiografiert.

4.2.3 Rekombinante Expression von Proteinen

4.2.3.1 Expression in *Escherichia coli*

Für die Expression eines rekombinanten Proteins wird das entsprechende Plasmid-Konstrukt in *E. coli* BL21gold(DE3) transformiert und auf einer antibiotikumhaltigen Agarplatte ausgestrichen. Nach geeigneter Inkubation wird eine Einzelkolonie abgenommen und eine Übernachtskultur in 1 Liter Superbroth-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 23°C angelegt. Bei einer OD von 0,5-0,8 wird die Expression des Proteins durch Zugabe von 1 mM IPTG (pET-Konstrukte) induziert und die Kultur bei 16°C für 5-6 h weiterinkubiert. Danach werden die Bakterien durch Zentrifugation für 15 min mit 5000 g bei 4°C geerntet. Das Pellet wird einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und kann so bei -20°C eingefroren werden. Das Bakterienpellet wird nach kurzem Antauen in kaltem Aufschlusspuffer (bei His-Fusionsproteinen alle Schritte ohne EDTA/EGTA) resuspendiert und durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Nach Abzentrifugieren der Zellreste (25000 g, 30 min, 4°C) werden die Überstände in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert oder durch Affinitätsreinigung weiter aufgearbeitet.

Affinitätsreinigung von GST- und His-Fusionsproteinen:

Zur Affinitätsreinigung von GST-Fusionsproteinen werden die wie oben beschrieben hergestellten Bakterienlysate mit 1 ml, in Aufschlusspuffer gewaschener Glutathion-Sepharose (Fa. Amersham-Pharmacia) für 1 h bei 4°C inkubiert. Die Sepharose wird dreimal mit einem zehnfachen Volumen Aufschlusspuffer gewaschen, dann, nach Bedarf, die gebundenen GST-Fusionsproteine mit 10 mM Glutathion in Puffer eluiert. Die Proteine werden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Reinigung von His-Fusionsproteinen werden die Bakterienlysate mit 1 ml Ni-NTA-Agarose (Fa. Qiagen) für 1 h bei 4°C inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit Aufschlusspuffer werden die gebundenen Proteine mit 200 mM Imidazol in Puffer eluiert und in flüssigem Stickstoff weggefroren. Aliquots der Elutionsfraktionen werden durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert.

Für die Reinigung von ZZ-Fusionsproteinen werden die Bakterienlysate analog der Aufreinigung von His-Fusionsproteinen behandelt, da die Proteine sowohl His- als auch ZZ-Tag besitzen.

4.2.4 Radioaktive Markierung von Proteinen durch gekoppelte *in-vitro*-Transkription und -Translation

Zur gekoppelten *in-vitro*-Transkription und -Translation von cDNAs wird das „TNT-T7 coupled Transcription/Translation Assay“ (Fa. Promega) verwendet. Die hierfür eingesetzten cDNA-Konstrukte enthalten einen T7-Promotor und leiten sich von den Vektoren pET21a und pET28a ab. Zur radioaktiven Markierung der Proteine bei der Translation wird [³⁵S]-Methionin verwendet. Ein typischer Reaktionsansatz hat folgende Zusammensetzung:

1 µl	Plasmid-DNA (1 µg/µl)
1 µl	[³⁵ S]-Methionin (10 µCi/µl)
7,5 µl	T7-TNT Quick Reticulocytelysat (Fa. Promega)

Die Ansätze werden für 1,5 h bei 30 °C inkubiert, anschließend bei –20°C weggefroren. Ein Aliquot der Reaktion wird durch SDS-PAGE und anschließende Autoradiographie analysiert.

4.2.5 Herstellung von HeLa-Zellextrakten

Kern- und Cytoplasmaextrakte aus HeLa-Zellen werden in Anlehnung an ein Protokoll von Dignam *et al.* hergestellt (Dignam *et al.*, 1983). Alle Schritte erfolgen bei 4°C mit vorgekühlten Lösungen und Geräten.

Cytoplasmaextrakt:

Zunächst werden $5 \cdot 10^{10}$ HeLa-Zellen (Fa. Celltech) in PBS gewaschen und bei 1000 g pelletiert. Nach Resuspension im fünffachen Pelletvolumen Roeder-A-Puffer (10 mM KCl, 10 mM HEPES/KOH [pH 7,9], 1,5 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT, 0,5 mM PMSF) werden die Zellen für 10 min gequollen. Nach erneuter Zentrifugation und Resuspension des Zellpellets im zweifachen Volumen Roeder-A-Puffer erfolgt der Zellaufschluss durch 10 Pistillstöße in einem Glashomogenisator (*Douncer*). Alternativ werden die HeLa-Zellen in PBS aufgenommen und im *Douncer* lysiert, dieser PBS-Cytoplasmaextrakt wird vor allem für Methylierungen verwendet. Die Zellkerne werden vom Cytoplasma durch Zentrifugation für 10 min bei 1000 g getrennt. Das Kernpellet wird wie unten beschrieben weiterverarbeitet. Der cytoplasmatische Überstand wird durch Zugabe von 5 M NaCl auf eine Endkonzentration von 200 mM NaCl gebracht, zur Entfernung von Lipiden mit n-Heptan überschichtet und für 15 min bei 10000 g abzentrifugiert. Die wässrige Phase wird als Cytoplasmaextrakt abgenommen. Zur Verwendung für Immunpräzipitationen wird Igepal auf eine

Endkonzentration von 0,5 % zugegeben und der Extrakt, zum Ausschluss von Schwebstoffen, durch einen Microfilter (Porengröße 0,8 µm, Fa. Millipore) filtriert.

Kernextrakt:

Die pelletierten Kerne werden in 150 ml Roeder-C-Puffer (420 mM KCl, 10 mM HEPES/KOH [pH 7,9], 1,5 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT, 0,2 mM EDTA, 5 % [v/v] Glycerin, 0,5 mM PMSF) resuspendiert und durch 15 Pistillstöße im *Douncer* aufgeschlossen. Die Suspension wird für 30 min auf Eis gerührt, danach für 30 min bei 25000 g abzentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wird zum Schluss für 2,5 h gegen Roeder-D-Puffer (100 mM KCl, 20 mM HEPES/KOH [pH 7,9], 1,5 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT, 20 % [v/v] Glycerin, 0,5 mM PMSF) dialysiert. Die so hergestellten Kernextrakte werden für Dichtegradienten-Ultrazentrifugationen und für Immunpräzipitationen verwendet. Zur Verwendung für Immunpräzipitationen wird Igepal auf eine Endkonzentration von 0,5 % zugegeben und der Extrakt, zum Ausschluss von Schwebstoffen, durch einen Microfilter (Porengröße 0,8 µm, Fa. Millipore) filtriert.

Gesamtzellextrakte:

Gesamtzellextrakt von HeLa-Zellen wird durch Zelllyse mit IP-Puffer, wie in Kapitel 4.2.9 beschrieben, hergestellt.

4.2.6 Bindungsexperimente

Zur Analyse der Interaktion zwischen zwei Proteinen wird eines der beiden in *E. coli* als GST- oder ZZ-Fusionsprotein exprimiert und an einer geeigneten Matrix immobilisiert. Das andere wird als *in-vitro*-translatiertes oder ebenfalls rekombinant exprimiertes Protein zugegeben.

Bei ZZ-Fusionsproteinen werden 1-2 µg des rekombinanten Proteins mit 30 µl IgG-Sepharose (Fa. Amersham-Pharmacia) für 1 h bei 4°C in einem Überkopfschüttler inkubiert. Bei GST-Fusionsproteinen werden 1-2 µg des gereinigten Proteins mit 30 µl Glutathion-Sepharose (Fa. Amersham-Pharmacia) ebenfalls für 1 h bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit einem zehnfachen Volumen PBS mit 0,05 % Igepal werden 1-5 µl eines *in-vitro*-Translationsansatzes (siehe Kapitel 4.2.4) zugegeben und zur Proteinbindung für 1 h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Die Sepharose wird erneut viermal mit PBS/Igepal gewaschen, das Reaktionsgefäßes gewechselt und schließlich die gebundenen Proteine mit

SDS-PAGE-Probenpuffer eluiert. Die Analyse der Eluate erfolgt durch SDS-PAGE mit anschließender Autoradiographie.

4.2.7 Dichtegradienten-Ultrazentrifugation

Die Dichtegradienten-Ultrazentrifugation dient der analytischen und präparativen Fraktionierung von Zellextrakten. Mit einem Gradientenmischer (Fa. Biocomp) werden dazu lineare, 15- bis 45-prozentige (w/v) Saccharosegradienten in 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM MgCl₂ mit einem Volumen von 11 ml hergestellt. Die Gradienten werden mit je 500 µl des zu fraktionierenden Extrakts beladen und für 18 h mit 41000 rpm bei 4°C in einem „SW41-Ti“- Ausschwingrotor (Fa. Beckman) bei ausgeschalteter Rotorbremse zentrifugiert. Nach Beendigung des Laufes werden 500µl-Fractionen gesammelt, die Proteine mit TCA präzipitiert und in SDS-PAGE-Probenpuffer aufgenommen. Die Analyse erfolgt durch SDS-PAGE mit anschließendem Westernblot.

TCA-Präzipitation: Die Proteinlösung wird 3:1 mit einer eiskalten 100 %-igen TCA-Lösung [w/v] gemischt, für 30 min auf Eis inkubiert und daraufhin 30 min bei 13000 rpm und 20 °C in einer Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert. Das Präzipitat wird mit Aceton gewaschen, erneut abzentrifugiert und nach Verdunsten des restlichen Acetons in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

4.2.8 Gelfiltration

Die Gelfiltration erfolgte mit einer Biocad Sprint (Fa. PerSeptive Biosystems) mit für die jeweilige vorgepackte Gelfiltrationssäule (Fa. Amersham-Pharmacia) angegebenen Säulenlaufparametern. In dieser Arbeit wird eine Superose-6-Säule verwendet.

Analytische Gelfiltrationen werden zur Analyse der Zusammensetzung eines Proteinkomplexes und zur Abschätzung der Größe von Proteinen in Lösung herangezogen, präparative Gelfiltrationen werden zur Reinigung von Proteinkomplexen oder rekombinanten Proteinen verwendet. HeLa-Extrakt wird auf eine mit Laufpuffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,5, 1 mM PMSF, 1 mM DTT) voräquilibrierte Säule aufgetragen und in einer isokratischen Elution über 1,5 Säulenvolumina größenfraktioniert. Der Säulendurchlauf wird in 1 ml Fraktionen aufgefangen und nach SDS-PAGE durch Coomassie-Färbung oder im Westernblot analysiert.

Um den jeweiligen Fraktionen ein Molekulargewicht zuzuordnen zu können, wird dieselbe Säule einmalig mit dem *High Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kit* (Fa. Amersham-Pharmacia) beladen und die Elution anhand der Absorptionskurven ausgewertet.

4.2.9 Metabolische Markierung von Gewebekulturzellen mit [³²P]-*ortho*-Phosphat und Dünnschicht-chromatographische Auftrennung der Phosphoaminosäuren

Für die metabolische Markierung wird jeweils eine 250 ml Flasche adhärenter HeLa-Gewebekulturzellen bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert. Diese werden zweimal mit warmem TBS und einmal mit Phospholabel-Medium gewaschen und anschließend mit 0,5 mCi [³²P]-*ortho*-Phosphat pro Milliliter Phospholabel-Medium für 4 h weiterkultiviert. Die Gewebekulturzellen werden dreimal mit PBS gewaschen, mit 1 ml IP-Puffer (mit 150 µM Na-*ortho*-Vanadat und 100 µM Kalium-Fluorid, Phosphataseinhibitoren) versetzt und mit einem Zellschaber von der Kulturunterlage gelöst. Die Zellsuspension wird auf Eis mit einer G23-Kanüle homogenisiert und 10 min bei 13000 g zentrifugiert. Der Überstand wird mit 5 µg FMRP-Antikörper an 50 µl Protein-G Sepharose 1,5 h auf einem Überkoprotator bei 4°C inkubiert. Die Sepharose wird viermal mit PBS/0,05 % Igepal mit Phosphataseinhibitoren gewaschen und, nach einem Wechsel des Eppendorf-Röhrchens, in 25 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und gebloftet. Nach Amidoschwarzfärbung wird die PVDF-Membran ein bis zwei Tage mit einem Verstärkerschirm gegen einen sensitiven Film (MS, Fa. Kodak) exponiert. Die resultierenden Radioaktivsignale werden mit der Amidoschwarz gefärbten Membran zur Deckung gebracht und die radioaktiv markierten Proteine aus der PVDF-Membran ausgeschnitten. Dabei werden jeweils nur zwei Drittel einer Bande ausgeschnitten, um nach erneuter Exposition der Membran zu überprüfen, ob das ausgeschnittene Membranstück mit dem radioaktiven Signal übereinstimmt. Zudem wird mit der verbliebenen Membran eine Antikörper-Detektion durchgeführt, um die ausgeschnittene Bande dem gewünschten spezifischen Protein zuzuordnen.

Das ausgeschnittene Membranstück wird für 30 Sekunden in Methanol inkubiert, zweimal in ddH₂O gewaschen und mit 25 µl 6 N HCl versetzt. Die Hydrolyse des Proteins erfolgt für 50 min bei 110°C im Wärmeschrank. Die Reaktion wird mit 25 µl ddH₂O abgestoppt und abzentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in einer Membran Vakuumpumpe MD8C (Fa. Vakuubrand) getrocknet. Das getrocknete Hydrolysat wird in 3,5 µl DC-Puffer I resuspendiert, mit 1 µl Phosphoaminosäurestandard (Phospho-

Serin, -Threonin und -Tyrosin, jeweils 0,3 µg/ml, Fa. Sigma) versetzt und in 0,25 µl Fraktionen auf eine Dünnschichtchromatographie-Celluloseplatte in einem Punkt aufgetragen. Die Auftrennung der Phosphoaminosäuren erfolgt elektrophoretisch in zwei Dimensionen mit einer HTLE-7000 Apparatur (Fa. CBS Scientific) nach den Angaben des Herstellers. Die erste Dimension wird bei pH 1,9 in DC-Puffer I bei 1,5 kV, für 35 min durchgeführt. Die Platte wird anschließend mit einem Fön 20 min lang getrocknet und eine zweite Elektrophorese, um 90° gedreht, mit DC-Puffer II bei pH 3,5 für 30 min und 1,3 kV durchgeführt. Die Platte wird bei 60°C getrocknet und der Phosphoaminosäurestandard mit 0,5 % Ninhydrin-Lösung in Aceton bei 80°C visualisiert. Der Nachweis der radioaktiven Phosphoaminosäuren erfolgt durch eine einwöchige Exposition der DC-Platte mit einem Verstärkerschirm gegen einen sensitiven MS-Röntgenfilm.

DC-Puffer I

50 ml (88 %) Ameisensäure
156 ml Eisessig
ad 2000 ml ddH₂O

DC-Puffer II

100 ml Eisessig
10 ml Pyridin
0,5 mM EDTA
ad 2000 ml ddH₂O
mit Pyridin auf pH 3,5 einstellen

4.2.10 *In-vitro*-Phosphorylierung von Proteinen

In-vitro-Phosphorylierungsexperimente werden benutzt, um ein Protein als Substrat für Kinasen zu identifizieren und um phosphorylierbare Aminosäurereste in Proteinen zu lokalisieren. Bei der Phosphorylierung von FMRP als Substratproteinen soll die Phosphorylierungsstelle durch FMRP-Deletionsmutanten eingegrenzt werden. Serin/Threonin-Phosphorylierungen werden in Kinasierungspuffer I durchgeführt. Dazu werden pro Ansatz je zwei Mischungen hergestellt, die zur Kinasierung vereinigt werden:

MixA: 1 µl Substratprotein (1-2 µg/µl)
1 µl ATP (25 µM Endkonzentration)
ad 10 µl ddH₂O

MixB: 1 µl Casein-Kinase II oder HeLa-Zellextrakt

1 μl Kinasierungspuffer I (10x)
0,5-1 μl [γ - ^{32}P] ATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)
ad 10 μl ddH₂O

Als Substratproteine werden dabei FMRP und davon je eine N- und C-terminales Deletionsmutante verwendet. Als Phosphorüberträger diente zum einen Casein-Kinase II, zum anderen HeLa-Zellextrakt.

Die Kinasereaktion wird 30 min bei 30°C durchgeführt und durch Zugabe von 20 μl 4x-SDS-Probenpuffer abgestoppt. Die phosphorylierten Proteine werden über SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels Autoradiographie analysiert.

Die Reaktionen werden immobilisiert durchgeführt, wobei das Substrat an über seinen Histidin-Tag an Nickel-Chelat-Sepharose gebunden, oder mittels spezifischem Antikörper an Protein-G-Sepharose aus Zellextrakt immunpräzipitiert und anschließend gewaschen wird. Die an der Sepharosematrix immobilisierte Komponente wird dazu mit 25 μl des erforderlichen Kinasepuffers versetzt. Zur Quantifizierung der in ein Protein inkorporierten Radioaktivität wird das Gel nach SDS-PAGE und Coomassie-Färbung getrocknet und zum Nachweis der radioaktiven Phosphoaminosäuren erfolgt eine Exposition gegen einen sensitiven MS-Röntgenfilm (Fa. Kodak).

4.3 Immunologische Methoden

4.3.1 Standardmethoden der Immunologie

Sämtliche nicht näher beschriebenen immunologischen Standardmethoden wurden wie in (Harlow and Lane, 1988) beschrieben durchgeführt. Dort finden sich auch die Zusammensetzungen der hier nicht im Einzelnen aufgeführten Puffer und Lösungen. Die Grundlagen und Details der Herstellung von Antisera sind ebenfalls in Harlow und Lane (1988) beschrieben.

4.3.2 Herstellung monoklonaler Antikörper

1975 publizierten Kohler und Milstein eine neue Methode zur Herstellung monoklonaler Antikörper in Mäusen, mit der man Hybridzellen erhält, die sich unbegrenzt vermehren. Gleichzeitig sezernieren diese Zellen spezifische Antikörper gegen das Antigen, mit dem die Maus zuvor immunisiert wurde (Kohler and Milstein, 1975). Die Milzzelle einer solchen

Maus liefert die Fähigkeit zur Antikörperproduktion, während die Myelomzelle die unbegrenzte Wachstumsfähigkeit und die kontinuierliche Antikörpersekretion beisteuert. Die Selektion auf Hybridzellen findet über das Wachstumsmedium statt. Dieses enthält Aminopterin als Inhibitor der *de novo* Biosynthesewege zur Nukleotidherstellung. Die Zellen müssen also einen Stoffwechselnebenweg benutzen, um ihre Nukleinsäuren zu bilden. Die für die Fusion verwendeten Myelomzellen wurden zuvor mit 8-Azaguanin behandelt, um eine Mutation in diesem Synthesenebenweg zu erzeugen (speziell: Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT): katalysiert die Synthese einer gemeinsamen Vorstufe von AMP und GMP aus Hypoxanthin). Die fusionierten Zellen werden dann in einem Medium kultiviert, das Hypoxanthin und Thymin als Vorstufen für die Synthesewege und Aminopterin enthält (HAT-Medium). Nicht fusionierte Krebszellen sterben ab, da sie kein Hypoxanthin verwenden können. Milzzellen sterben ab, da sie *in vitro* nicht proliferieren können. So wachsen ausschließlich Hybridzellen heran, da sie fähig sind, ihre Nukleotide über einen Nebenweg zu synthetisieren und den neoplastischen Charakter von Myelomelternzellen besitzen.

4.3.2.1 Puffer, Zelllinien und Versuchstiere

Normalmedium (NM):

- 500 ml RPMI 1640 mit 25 mM HEPES
- 55 ml Fötale Kälberserum (FCS)
- 5,5 ml 200 mM L-Glutamin
- 5,5 ml Kanamycin
- 5,5 ml 10^{-3} M Mercaptoethanol

HAT-Medium:

- 571,5 ml Normalmedium
- 5,5 ml HT-Stocklösung
- 5,5 ml Aminopterin-Stocklösung (4×10^{-5} M, Fa. Serva)

HT-Medium:

- 571,5 ml Normalmedium
- 5,5 ml HT-Stocklösung (100x)
- (1,36 mg/ml Hypoxanthin, 0,73 mg/ml Thymin)

Sowohl bei den immunisierten, als auch bei den Mäusen zur Makrophagengewinnung handelt es sich um BALB/c. Zur Fusion werden Myelomzellen PAIB₃Ag81 verwendet.

4.3.2.2 Immunisierung der Versuchstiere

Als Versuchstiere dienen 7-10 Wochen alte Mäuse (BALB/c, weiblich). Es werden vier Immunisierungen in den Bauchraum (*intraperitoneal*) durchgeführt, wobei Antigen (Volllänge-FMRP) und Adjuvans in gleichen Volumina ausgiebig gemischt werden. Die Zellfusion findet drei Tage nach der dritten Immunisierung statt. Tabelle 4-1 zeigt das Immunisierungsschema.

Tabelle 4-1 Immunisierungsschema für monoklonale Antikörper

Immunisierung	Tag	Antigen (μg)	Freund´s Adjuvans
I	1	100	komplett
II	14	100	inkomplett
III	35	100	inkomplett
IV	56	100	inkomplett

4.3.2.3 Myelomaanzucht

Die Anzucht der Myelomazellen (PAIB₃Ag81) erfolgt acht Tage vor der Fusion. Hierzu werden die Zellen aufgetaut und in Gewebekulturflaschen ausgesät und bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchte kultiviert. Nach jeweils zwei Tagen und vor einer vollständigen Konfluenz werden die Zellen in eine nächst größere Flasche passagiert.

4.3.2.4 Gewinnung der Makrophagen

Die Gewinnung von Makrophagen vor der eigentlichen Fusion hat zwei Gründe. Zum einen sezernieren diese Wachstumsfaktoren, die für die Hybridomazellen notwendig sind, andererseits verhindern sie eine mögliche Kontamination durch Mycoplasmen.

Eine zwei Monate alte Maus (BALB/c, männlich) wird durch Genickbruch getötet und das Bauchfell abgezogen. Zur Gewinnung der Makrophagen-Feederzellen wird gekühltes Normalmedium (NM) in die Bauchhöhle injiziert. Nach kurzem Spülen wird das Medium mit den Feederzellen durch eine Spritze aus der Bauchhöhle entfernt, zentrifugiert (1000 rpm, 5 min, 4°C), das Pellet zweimal mit 15 ml Medium gewaschen und in 100 ml NM, 5 % BriClone aufgenommen. Je 0,5 ml wird in die Löcher von 24-Well Costarplatten (Fa. Costar) vorgelegt.

Anschließend werden die Zellen bis zur Fusion unter Standardbedingungen kultiviert.

4.3.2.5 Zellfusion von Milzzellen der immunisierten Versuchstiere mit Myelomazellen

Die Maus wird drei Tage nach der letzten Immunisierung durch Genickbruch getötet. Nach Öffnen der Bauchdecke wird die Milz, wenn möglich ohne Bindegewebe, steril entnommen und in RPMI-Medium (ohne HEPES) aufgenommen. Das Gewebe wird mit einer Pinzette zerkleinert und mit Hilfe einer Spritze zur Homogenisierung durch sterile Watte gedrückt. Die homogenisierten Milzzellen werden zentrifugiert (200 x g, 5 min, RT), in RPMI(OH) gewaschen, wiederum abzentrifugiert und in 10 ml RPMI(OH) aufgenommen.

Anschließend werden sie zu 5×10^7 abzentrifugierten Myelomazellen gegeben, die Suspension gemischt und erneut abzentrifugiert. Für die Fusion wird 0,5 ml auf 37°C vorgewärmtes PEG 4000 (Polyethylenglycol, Fa. Roche) zu dem Zellpellet gegeben und unter leichtem Schütteln genau eine Minute im 37°C-Wasserbad inkubiert. Anschließend werden die Zellen eine Minute bei Raumtemperatur stehen gelassen, dann erfolgt über fünf Minuten hinweg bei 37°C die Zugabe von 10 ml RPMI(OH). Um die entstandenen Zellkontakte zu stabilisieren müssen die Zellen 10-15 Minuten auf Eis stehen bleiben. Die Zellen werden erneut zentrifugiert und in 125 ml Normalmedium mit 5 % BriClone aufgenommen. Nach einer Inkubation von 24 Stunden ohne Selektionsmedium im Brutschrank kann eine Vereinzelnung (Klonieren) der Hybridomazellen erfolgen.

4.3.2.6 Die Vereinzelnung der Hybridomazellen in einzelne Klone

Die Costarplatten werden auf angewachsene Zellklone hin kontrolliert, von diesen Mischklonen werden mit Hilfe von Verdünnungsreihen Einzelklone in 96-Well Mikrotiterplatten angelegt. Diese werden mit Makrophagen in Normalmedium, 5 % BriClone, versorgt und unter Standardbedingungen zehn Tage ohne Mediumwechsel kultiviert. Anschließend können die Mediumüberstände auf den richtigen sezernierten Antikörper hin getestet werden, positive Klone werden schrittweise in jeweils größere Zellkulturgefäße überführt, bis die Zellzahl groß genug ist, dass die Klone zur Aufbewahrung eingefroren werden können.

4.3.2.7 Suche nach Zelllinien, die Antikörper der gewünschten Spezifität sezernieren (*Screening*)

4.3.2.7.1 ELISA (Enzyme-linked immunosorbant assay)

Der ELISA ermöglicht ein quantitatives Screening nach einem bestimmten Antikörper mit einem Antigen bekannter Spezifität. Der Versuch wird in einer Mikrotiterplatte durchgeführt. Im indirekten ELISA wird hierzu das Antigen über elektrostatische Wechselwirkung an der

Kunststoffoberfläche der Mikrotiterplatte immobilisiert. Nichtbesetzte Bindungsplätze werden durch eine 1 %ige BSA-Lösung in PBS abgesättigt, um unspezifische Bindung der Antikörper an die Mikrotiterplatte zu verhindern. Anschließend werden die Mediumüberstände der Einzelklone für zwei Stunden in je ein *Well* der Platte gegeben, nichtgebundene Antikörper können mit TBT gewaschen werden. Die Detektion des Antigen-Antikörper-Komplexes erfolgt für zwei Stunden mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper (Goat-Anti-Mouse Horseradish Peroxidase gekoppelt, Fa. Sigma), 1:1000 in TBT verdünnt, danach wird erneut mit TBT gewaschen. Durch Zugabe von Peroxidase-Substrat kann nun eine Detektion der positiven Klone erfolgen.

Beschichtung der Testplatten

Vollers Puffer (Beschichtung):	1,59 g/L	Na ₂ CO ₃
	0,2 g/L	NaN ₃
	2,93 g/L	NaHCO ₃
	pH 9,2	
Peroxydase-Substrat:	0,02 M Na ₂ HPO ₄ pH 6,8	
	1 mg/ml 5-Aminosalicylsäure	
	0,01 % H ₂ O ₂ (vor Gebrauch)	

Der ELISA wurde in durchsichtigen Greiner Dynatec Mikrotiterplatten (Greiner Labortechnik) durchgeführt. Die Antigen-Verdünnung betrug 10 µg/ml in Vollmers-Puffer, 100 µl pro Kavität.

4.3.2.7.2 Westernblot

Die im ELISA positiv getesteten Hybridoma-Überstände müssen auf ihre Westernblot-Qualität hin untersucht werden. Dafür werden sowohl 1,5 µg rekombinantes Protein mit dem zuvor immunisiert wurde, als auch 2×10^7 homogenisierte HeLa-Zellen auf jeweils ein SDS-Polyacrylamidgel geladen, per Elektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran geblottet (siehe auch 4.3.4 Westernblot). Die Membranen werden anschließend in ca. 0,5 cm breite, parallele Streifen geschnitten, auf die jeweils der Mediumüberstand eines Hybridomaklons gegeben wird. Mit Hilfe eines Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper (Goat-Anti-Mouse Horseradish Peroxidase gekoppelt, Fa. Sigma) kann nun getestet werden, ob der im Medium enthaltene monoklonale Antikörper sein rekombinantes bzw. in HeLa-Extrakt enthaltenes Antigen erkennt.

4.3.2.8 Gewinnung der monoklonalen Antikörper

Um die Antikörper zu gewinnen werden die Zellen aus den Hybridomakulturen durch Zentrifugation (5000 rpm; 10 min, 4 °C) entfernt. Der in den Überstand sezernierte Antikörper kann nun durch Affinitätsreinigung extrahiert und konzentriert werden (vgl. Harlow *et al.*, 1988).

4.3.2.9 Bestimmung der Immunglobulin-Subklasse der monoklonalen Antikörper

Die Subklasse der gewonnenen Antikörper wurde mit dem „Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents-Kit“ (Fa. Sigma) bestimmt. Der Kit wurde nach Herstellerangaben eingesetzt.

4.3.3 Herstellung polyklonaler Antikörper

Spezifische, polyklonale Antikörper werden durch Immunisierung von Kaninchen mit dem jeweiligen Antigen gewonnen. Dazu wird das Antigen wie in Kapitel 4.2.3 beschrieben in *E. coli* exprimiert und affinitätsgereinigt. Für die Erstimmunisierung werden 500 µg des gereinigten Proteins in einem 1:1-Verhältnis mit komplettem Freundschens Adjuvans (Fa. Sigma) gemischt, durch mehrmaliges Aufziehen in einer Kanüle homogenisiert und subkutan in ein Kaninchen injiziert. Im Abstand von je 21-28 Tagen erfolgen 3 weitere (*Booster*-) Injektionen mit einer 1:1-Suspension aus dem Antigen und inkomplettem Freundschens Adjuvans (Fa. Sigma). Durch Punktion der Ohrarterie wird dem Kaninchen Testblut entnommen und das Serum im Westernblot auf seine Spezifität getestet. Gegebenenfalls erfolgen weitere *Booster*-Injektionen. Bei ausreichender Spezifität wird das Tier narkotisiert und durch Herzpunktion getötet. Das aufgefangene Blut wird zur Gerinnung für 2 h bei 37°C inkubiert, über Nacht bei 4°C gelagert und dann für 30 min bei 5000 g abzentrifugiert.

Zur Affinitätsreinigung des Antiserums werden 2-3 mg des Antigens als rekombinant exprimiertes, gereinigtes Protein, gemäß der Herstellerangaben kovalent an NHS-aktivierte Sepharose (Fa. Amersham-Pharmacia) gekoppelt. Zur Bindung spezifischer Antikörper wird das Serum in einer Chromatographie-Säule mehrfach über diese Affinitätsmatrix geladen. Nach mehrmaligem Waschen der Säule mit PBS werden die gebundenen Antikörper durch pH-Schock mit 0,1 M Glycin pH 2,3 eluiert und die Eluate durch Zugabe von 10 % (v/v) 2 M Tris-HCl (pH 8,8) sofort neutralisiert. Die gereinigten Antiseren werden im Westernblot auf ihre Spezifität getestet. Alle Antikörper werden bei -20°C gelagert.

4.3.4 Westernblot

Auf Nitrozellulose:

Für den immunologischen Nachweis von Proteinen, die durch SDS-PAGE aufgetrennt wurden, wird das Westernblot-Verfahren verwendet. Dazu werden die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt, dann in einer *Semi-dry*-Blotapparatur bei einer Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Gelfläche für 2 h auf eine Nitrozellulose-Membran (Fa. Amersham) übertragen. Als Transferpuffer dient 20 % (v/v) Methanol in Laufpuffer für SDS-PAGE (siehe Kapitel 3.2). Nach dem Proteintransfer werden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran durch Schwenken in 5 % Magermilchpulver in TBT-Puffer (s. u.) blockiert. Anschließend wird die Membran für 1 h mit dem primären Antikörper in TBT inkubiert. Die hierfür geeignete Verdünnung wird in Vorversuchen empirisch ermittelt. Nach fünfmaligem Waschen für 10 min mit TBT wird die Membran für 1 h mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper, 1:1000 in TBT verdünnt, inkubiert, danach erneut fünfmal gewaschen. Die Peroxidase-Aktivität gebundener Sekundärantikörper wird durch Chemilumineszenz unter Verwendung von „Enhanced Chemical Luminescens“-Reagenz (ECL, Fa. Amersham-Pharmacia) nach den Herstellerangaben nachgewiesen.

Auf PVDF (Polyvinylidenfluorid):

Die Vorteile von PVDF liegen im schnelleren Proteintransfer für große Proteine und der sensitiven Anfärbbarkeit mit dem Farbstoff Amidoschwarz.

Transferpuffer (Towbin): 25 mM Tris pH 7,5
 192 mM Glycin
 20 % Methanol

Amidoschwarz-Färbelösung: 0,2 % (w/v) Amidoschwarz 10B
 10 % (v/v) Methanol
 2 % (v/v) Essigsäure

Die über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden über Elektrotransfer („Semi-dry“) auf eine PVDF-Membran transferiert. Zum Benetzen wird die PVDF-Membran einige Sekunden in Methanol getränkt und anschließend in Transferpuffer inkubiert. Der Transfer erfolgt anschließend für 90 min bei $1,5 \text{ mA pro cm}^2$ Trenngelfläche. Zur Sichtbarmachung der transferierten Proteine wird die Membran einige Minuten in Amidoschwarz-Färbelösung inkubiert und anschließend in 90 % Methanol (v/v), 2 % (v/v) Essigsäure entfärbt. Des Weiteren wird wie oben verfahren.

4.3.5 Immunpräzipitation

Immunpräzipitationen dienen der spezifischen, selektiven Isolierung eines Antigens und seiner Komplexpartner aus Zellextrakten. Alle Arbeiten finden bei 4 °C statt.

Zur Präzipitation des Protein-Komplexes werden 50 µg affinitätsgereinigte Antikörper durch Inkubation für 1 h an Protein-G-Sepharose (Fa. Amersham-Pharmacia) immobilisiert. Nach Waschen mit PBS/0,01 % Igepal werden die Antikörper für 1,5 h mit 15 ml HeLa-Cytoplasma-/Kernextrakt (siehe Kapitel 4.2.5) inkubiert. Anschließend wird fünfmal mit PBS/0,01 % Igepal gewaschen und das Reaktionsgefäß gewechselt. Die gebundenen Proteine werden mit 2 ml 0,1 M Glycin (pH 2,3) eluiert, TCA-präzipitiert und in Urea-Probenpuffer aufgenommen. Sie werden durch SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert. Durch Westernblot wird parallel dazu die FMR-Präzipitation aus dem Extrakt nachgewiesen.

Als Spezifitätskontrolle der Immunpräzipitationen werden in allen Fällen parallel zum eigentlichen Ansatz auf gleiche Weise behandelte Kontrollpräzipitationen mit unspezifischen Antikörpern oder -seren durchgeführt.

4.3.6 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen kann durch indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie analysiert werden. Dazu werden HeLa--Zellen auf sterilen Deckgläschen in 24-well-Platten unter Standardbedingungen (siehe Kapitel 4.1.2) kultiviert. Bei etwa 50 % Konfluenz werden die Zellen mit PBS (37°C) gewaschen. In den meisten Fällen wird sowohl eine Methanol-, als auch eine Paraformaldehyd-Fixierung durchgeführt und die Ergebnisse miteinander verglichen.

Methanol-Fixierung: Die Zellen werden in -20°C Methanol für zwei Minuten permeabilisiert und fixiert. Danach werden die Zellen dreimal je fünf Minuten mit PBS (RT) gewaschen.

Paraformaldehyd-Fixierung: Die Zellen werden in 3,7 % Formaldehyd in PBS (frisch angesetzt) für 5 min bei RT fixiert, dann mit 0,2 % Triton X-100 in PBS für 10 min permeabilisiert. Danach werden die Zellen dreimal mit PBS (RT) gewaschen und zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen für 30 min in 3 % (w/v) Rinder-Serumalbumin (BSA) in PBS inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/NP40-Puffer (1 % [v/v]) werden die Zellen für 1 h mit dem primären Antikörper, verdünnt in PBS/0,3 % BSA, inkubiert. Anschließend werden die Zellen fünfmal mit PBS/NP40-Puffer gewaschen, dann

mit dem Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Sekundärantikörper in PBS/0,3 % BSA für 1 h im Dunkeln inkubiert. Die geeignete Verdünnung wird für jeden Antikörper in Vorversuchen empirisch ermittelt. Nach Bindung der Sekundärantikörper wird erneut fünfmal mit PBS/NP40-Puffer, dann zweimal mit H₂O gewaschen. Dann werden die Deckgläschen mit den Zellen auf einem Objektträger in einem Tropfen MobiGlow-Einbettmedium (Fa. Mobitec) eingebettet und bis zum Mikroskopieren bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Die Präparate werden unter einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop („Axioplan 2“, Fa. Zeiss) oder einem Laser-Scanning-Mikroskop („LSM410“, Fa. Zeiss) mit einem 40×/1,3 Neofluar- oder 100×/1,3 Neofluar-Ölimmersionsobjektiv betrachtet. FITC-Fluoreszenzen werden bei 488 nm angeregt, die Emission mit einem 510-525nm-Bandpassfilter gefiltert, TRITC-Fluoreszenzen werden bei 543 nm angeregt und mit einem 570 nm-Langpassfilter betrachtet. Die Fluoreszenzen werden über eine gekoppelte CCD-Kamera dokumentiert.

4.4 Spezielle Experimente

4.4.1 Methylierungsassay

Ein rekombinant exprimiertes Protein oder ein Zellextrakt können auf ihre Methylierungsaktivität getestet werden. Als Methylgruppen-Akzeptoren werden Histone oder, wie in der vorliegenden Arbeit, der Sm-Heterodimer (SmB/D3) oder einzelne Sm-Proteine verwendet.

Für die Methylierungsreaktion wird folgender Ansatz pipettiert:

2 µl	10x Methylierungspuffer (500 mM Tris-HCl pH 7,5 , 10 mM EDTA, 10 mM EGTA)
10 µg	rekomb. Protein oder Zellextrakt
1 µl	rekomb. Sm-Protein (500 ng/µl)
2 µl	[³ H]-S-Adenosylmethionin 1 µCi/µl

ad 20 µl H₂O

Um den Einfluss verschiedener rekombinant exprimierter Proteine auf eine Methylierungsreaktion zu untersuchen, gibt man diese in einer Gesamtkonzentration von ca. 50-200 ng zu o.g. Ansatz zu.

Die Reaktion wird bei 37°C für eine Stunde inkubiert und anschließend mit Proteinprobenpuffer versetzt. Zur Analyse wird der Ansatz mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

Die autoradiographischen Signale werden mit dem „Image Master 1D Elite“ von Amersham Pharmacia Biotech (APB) aufgenommen und mit dem Programm „Image Master 1D Elite“ ausgewertet.

4.4.2 Radioaktive Markierung von RNA (*in-vitro*-Transkription)

Zunächst wird pHA-SMN durch *PvuII*-Restriktionsverdau linearisiert. Die *PvuII*-Schnittstelle liegt dabei jenseits des 3'-Endes der SMN-cDNA im Konstrukt. Die DNA wird durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und mit dem „Qiagen gel extraction kit“ nach den Angaben des Herstellers aus dem Gel eluiert.

Für die *in-vitro*-Transkription wird folgender Ansatz zusammenpipettiert:

2 µl	pHA-SMN (1 µg/µl, linearisiertes Plasmid)
5 µl	5×-Reaktionspuffer für RNA-Polymerase
3 µl	NTP-Mix (je 5 mM ATP, CTP, GTP)
1 µl	5 mM UTP
2,5 µl	m ⁷ GpppG (25 mM)
2,5 µl	DTT (0,1 M)
5 µl	RNase-freies H ₂ O
2 µl	α-[³² P]-UTP (3000 Ci/mmol)
2 µl	RNA-Polymerase (10 u/µl)

Die Reaktion wird für 2 h bei 37°C inkubiert. Zur Reinigung der *in-vitro*-transkribierten RNA wird der gesamte Reaktionsansatz mit 1 Volumen RNA-Probenpuffer (s. o.) gemischt und durch denaturierende Gelelektrophorese in einem 5 %-Polyacrylamidgel (s. o.) aufgetrennt. Die durch Autoradiographie sichtbar gemachte Bande wird aus dem Gel ausgeschnitten, mit 400 µl AES-Puffer (300 mM NaAc [pH 5,2], 2 mM EDTA, 0,1 % [w/v] SDS) versetzt und über Nacht bei 4 °C in einem Überkopf-Schüttler inkubiert. Anschließend wird die extrahierte RNA Ethanol-präzipitiert, in 10 µl RNase-freiem H₂O gelöst und ihre spezifische Radioaktivität durch Messung der Cherenkov-Strahlung im Szintillationsmessgerät ermittelt.

4.4.3 RNA-Bindung an rekombinantes FMRP

Zur Analyse ihrer RNA-Bindungsfähigkeit werden FMRP, FMRP-I304N und verschiedene FMRP-Deletionsmutanten mit ZZ-tag rekombinant in *E. coli* exprimiert und für eine Stunde bei 4°C an IgG-Sepharose gebunden. Nach ausreichendem Waschen mit PBS wird das

Protein mit radioaktiv markierter SMN-mRNA (s.o.) für eine Stunde bei 4°C auf einem Überkopffrotor inkubiert. Ein typischer Ansatz besteht aus:

1 µl	SMN-mRNA (ca. 15000 Ci/µl)
5 µl	rekombinantes Protein (1 µg/µl)
	in 400 µl
	1x PBS
	50 mM NaCl
	50 mM NH ₄ SO ₄
	0,02 % NP40

Anschließend werden die Ansätze viermal mit o.g. Puffer gewaschen. Die gebundene RNA wird mit Phenol-extrahiert, mit Natrium-Acetat gefällt und gewaschen (vgl. Sambrook *et al.*, 1989). Zur Analyse werden die Ansätze in RNA-Probenpuffer aufgenommen und auf ein Polyacrylamid-Gel mit Harnstoff aufgeladen. Mittels Autoradiographie können die Ansätze dann ausgewertet werden.

4.4.4 Inhibition der *in-vitro*-Translation einer mRNA

Zur Analyse der Funktion von FMRP werden Translationsinhibitions-Studien nach (Laggerbauer *et al.*, 2001) durchgeführt. Als Substrat der Reaktion dient, wenn nicht anders angegeben, SMN-mRNA, die durch *Run-off*-Transkription *in vitro* hergestellt wird.

4.4.4.1 *Run-off*-Transkription der SMN-cDNA

Zunächst wird pHA-SMN durch *PvuII*-Restriktionsverdau linearisiert. Die *PvuII*-Schnittstelle liegt dabei jenseits des 3'-Endes der SMN-cDNA im Konstrukt. Die DNA wird durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und aus dem Gel eluiert. Danach werden zusammengegeben:

5 µl	pHA-SMN (1 µg/µl, <i>PvuII</i> -linearisierte DNA)
5 µl	DTT (0,1 M)
5 µl	RNasin (Fa. Promega)
10 µl	m ⁷ GpppG (25 mM, Fa. Amersham-Pharmacia)
10 µl	NTP-Mix (je 5 mM ATP,CTP,GTP und UTP)
10 µl	5x-Reaktionspuffer für T7-RNA-Polymerase
2 µl	RNase-freies H ₂ O
3 µl	T7-RNA-Polymerase (10 u/µl)

Der Ansatz wird zur Transkription für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die neusynthetisierte SMN-mRNA durch Phenolextraktion und Ethanol-Präzipitation aufgereinigt und in RNase-freiem H₂O aufgenommen. Zur Kontrolle der Synthese wird ein Aliquot der Reaktion durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und durch Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht.

4.4.4.2 Translations-Assay

Für die Translationsexperimente werden affinitätsgereinigtes His-FMRP, His-FMR-I304N und verschiedene Deletionskonstrukte von FMRP verwendet. Alle Proteine werden gegen PBS-250 (PBS mit insgesamt 250 mM NaCl) dialysiert und nach Bradford-Vermessung auf vergleichbare molare Mengen eingestellt; wenn nicht anders angegeben, betrug die eingesetzte Menge von Vollängen-FMRP 100 ng. Vor der *in-vitro*-Translation werden die Proteine zur Komplexbildung in den angegebenen Mengen für 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend werden je 15 µg SMN-mRNA (s.o.) und PBS-250 zu einem Gesamtvolumen von 2 µl pro Ansatz zugegeben und für weitere 30 min auf Eis inkubiert.

Für die *in-vitro*-Translation wird das „Rabbit reticulocyte lysate system“ der Fa. Amersham-Pharmacia verwendet. Pro 2-µl-Ansatz der präinkubierten Proteine mit SMN-mRNA werden je 10,5 µl Translations-Mix zugegeben:

0,25 µl	MgAc (25 mM)
0,5 µl	KAc (2,5 M)
0,5 µl	RNase-Inhibitor (Fa. MBI)
0,5 µl	[³⁵ S]-Methionin (10 µCi/µl)
1 µl	Aminosäure-Mixtur ohne Methionin
2,75 µl	RNase-freies H ₂ O
5 µl	Reticulocytenlysat

Die Ansätze werden für 1 h bei 30°C inkubiert, die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

4.4.5 Polysomengradient

5x10⁷ adhärenente HeLa-Zellen werden bei 80 % Konfluenz mit 10 mg/ml Cycloheximid für zehn Minuten behandelt, um die Ribosomen auf der mRNA anzuhalten. Anschließend werden die Zellen geerntet und 10 min mit Polysomen-Puffer lysiert (10 mM HEPES pH 7,2, 150

mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 0,5 % NP-40, 150 mg/ml Cycloheximid and 100 U/ml RNasin (Fa. Promega)). Kerne und Mitochondrien werden 10 min bei 4°C und 5000 g pelletiert, der Überstand auf 250 mM KCl eingestellt und auf einen 10-40-%igen Saccharosegradienten geladen (20 mM HEPES, pH 7,2, 250 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 150 mg/ml Cycloheximid). Die Zentrifugation fand in einem SW41Ti (Fa. Beckman) bei 4°C, 32000 rpm, 135 min statt und anschließend wurden 21 Fraktionen abgenommen und mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert (Nach Rogers and Munro, 1987).

4.4.6 Ionenaustauscherchromatographie

Sie dient der Proteinkomplexaufreinigung, indem man sich die Nettoladung eines Komplexes zunutze macht. Frisch zubereiteter HeLa-Extrakt (in PBS) wird im *Batch*-Verfahren mit je 30 µl Ionenaustauschermatrix (SP- oder Q-Sepharose, Fa. APB) für eine Stunde bei 4°C unter langsamem Rotieren inkubiert. Anschließend wird die Matrix mit PBS mehrfach gewaschen und die gebundenen Proteine in mehreren Fraktionen mit Hilfe eines NaCl-Gradienten eluiert. Zur Identifikation der Fraktion, die das gewünschte Protein enthält, werden Fraktions-Aliquots per SDS-PAGE aufgetrennt und durch einen Westernblot ausgewertet.

5 Ergebnisse

5.1 Analyse von FMRP, dem Krankheitsgenprodukt des Fragilen X-Syndroms

Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass es sich bei FMRP um ein RNA-bindendes Protein handelt, welches, zusammen mit seinen Homologen FXR1 und FXR2 und anderen Proteinen, mit aktiv translatierenden Polyribosomen assoziiert ist. Zusammengefasst deuteten die Daten darauf hin, dass FMRP eine Funktion bei der Regulation der Translation spezifischer mRNAs innehat.

Um diese Hypothese überprüfen zu können, musste zu Beginn dieser Arbeit funktionsfähiges Protein exprimiert werden. Hierfür standen die Volllänge-cDNA von *FMR* und der krankheitsverursachenden Punktmutante *FMR*_{1304N} in Vektoren mit His-, und ZZ-tag zur Verfügung, die für die rekombinante Expression des Proteins in *E. coli* herangezogen wurden. Nach der Expression wurden die Proteine aufgereinigt und für unterschiedliche Untersuchungen herangezogen. Die Homogenität der im nachfolgenden Experiment eingesetzten Proteine wurde durch Coomassiefärbung kontrolliert (Abbildung 5-1).

Sowohl FMRP als auch FMRP_{1304N} wurden exprimiert und über das jeweilige His-tag in vergleichbarer Menge aufgereinigt. Beide Proteine wurden dialysiert und so für die nachfolgenden Experimente verwendet.

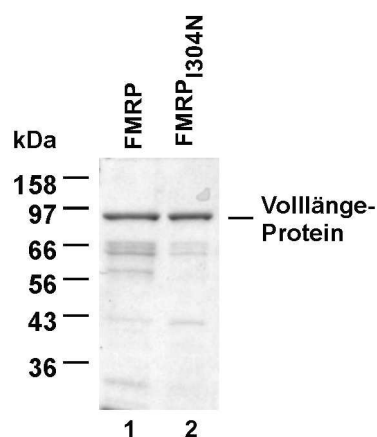


Abbildung 5-1 Rekombinante Expression von FMRP und FMRP_{1304N} mit His-tag. FMRP (Spur 1) und FMRP_{1304N} (Spur 2) wurden mit His-tag rekombinant in *E. coli* exprimiert und über Ni-NTA-Sepharose aufgereinigt. 300 ng des jeweiligen Proteins wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Coomassiefärbung sichtbar gemacht. FMRP und FMRP_{1304N} voller Länge haben eine Größe von ca. 85 kDa, dies entspricht den beiden obersten Banden.

5.1.1 FMRP inhibiert die mRNA-Translation *in vitro*

Vor Siomi *et al.* war gezeigt worden, dass es sich bei FMRP um ein RNA-bindendes Protein handelt (Siomi *et al.*, 1993). Erste Versuche belegten, dass vor allem pyrimidinreiche Sequenzen von FMRP gebunden werden. Eine *in vitro* von Brown *et al.* (Brown *et al.*, 1998) durchgeführte Studie zeigte daraufhin, dass es sich bei einer der assoziierten RNAs um die eigene *FMR1*-mRNA handelt. Die Daten konnten jedoch nicht zweifelsfrei klären, ob diese auch *in vivo* ein Bindungspartner von FMRP ist. Tatsächlich machten Bindungsexperimente deutlich (nicht gezeigt), dass FMRP mit einer Reihe von RNAs *in vitro* ohne Spezifität zu assoziieren vermag, darunter auch die im nachfolgenden Experiment verwandte SMN- und Luciferase-mRNA. Erstgenannte enthält dabei die kodierende Sequenz von *SMN*, dem Krankheitsgenprodukt der Spinalen Muskelatrophie (vgl. 2.2.1), die zweite besteht aus der kodierende Sequenz für das Reporterprotein Luciferase aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis*. Obwohl also FMRP *in vitro* unspezifisch an mRNAs bindet, sollte in einem ersten Experiment überprüft werden, ob das Protein einen Einfluss auf die Translation der gebundenen mRNAs hat.

Mit Hilfe eines *in-vitro*-Assay-Systems sollte nun die Funktion von rekombinantem FMRP auf die Translation verschiedener mRNAs getestet werden. Zu Anfang dieses Experiments wurden unterschiedliche *in-vitro*-transkribierte mRNAs (SMN-, *FMR1*- und Luciferase-mRNA) mit steigenden Mengen rekombinant exprimiertem FMRP oder FMRP_{I304N} (mit His-tag) vorinkubiert. Die höchste eingesetzte Proteinkonzentration betrug 75 nM. Anschließend wurde die mRNA-Translation durch Zugabe von Reticulocytenlysate gestartet. Nach einer einstündigen Inkubationszeit wurden die verschiedenen Ansätze elektrophoretisch aufgetrennt und durch Autoradiographie analysiert. Durch den Einbau von [³⁵S]-markiertem Methionin konnte die Synthese der Proteine autoradiographisch verfolgt werden.

Abbildung 5-2 macht einen interessanten Effekt deutlich. FMRP ist in diesem *in-vitro*-System in der Lage, die Translation der untersuchten mRNAs zu verhindern (vergl. Abbildung 5-2, Spur 4, 9 und 12 mit 1, 8 und 11). Steigende FMRP-Mengen im Ansatz bringen die Translation zum Erliegen, was deutlich macht, dass es sich hierbei um einen konzentrationsabhängigen Effekt handelt (hier am Beispiel der SMN-mRNA gezeigt, Spuren 2 bis 4). Für eine komplette Inhibition der Translation waren Mengen von 75 nM FMRP ausreichend, was der zehnfachen molaren Menge der verwendeten mRNAs entspricht.

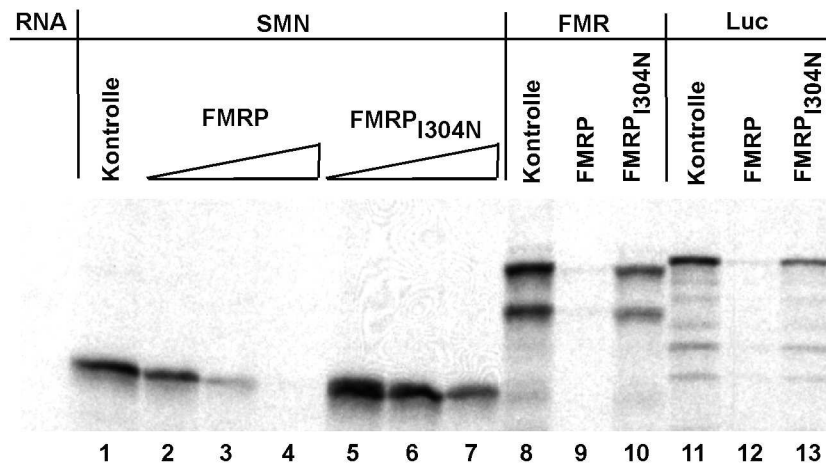


Abbildung 5-2 FMRP inhibiert, im Gegensatz zu FMRP_{I304N}, die Translation von unterschiedlichen mRNAs.
 A Autoradiographie eines *in-vitro*-Translationsinhibitionsexperiments. 18 nM (Spuren 2 und 5), 37 nM (Spuren 3 und 6) und 75 nM (Spuren 4, 7, 9, 10, 12 und 13) rekombinantes FMRP oder FMRP_{I304N} wurden mit der jeweiligen mRNA auf Eis vorinkubiert. Die getesteten mRNAs waren SMN- (Spuren 1-7), FMR1- (Spuren 8-10), und Luciferase-mRNA (Spuren 11-13). Die Kontrollen (Spuren 1, 8 und 11) enthielten statt Protein nur Puffer. Anschließend erfolgte der Translationsassay in Reticulocytenlysate. Die Ansätze wurden dann per SDS-PAGE aufgetrennt und die Translation durch den Einbau von radioaktiv markiertem Methionin autoradiographisch verfolgt. Die oberste Bande entspricht jeweils dem Vollängen-Protein.

Für die Translationsinhibition durch FMRP scheint die Sequenz der mRNA auf den ersten Blick nicht wichtig zu sein, da die in diesem Assay verwendeten mRNAs im Sequenzvergleich keine Übereinstimmungen zeigen (nicht gezeigt). Auch findet sich nur in der FMR1-mRNA das Purin-Quartett-Motiv (G-Quartett), welches als das Sekundärstruktur-Motiv für eine FMRP-Interaktion diskutiert wird. FMRP kann daher in diesem *in-vitro*-Assay effizient die Translation von gebundenen mRNA-Molekülen unterdrücken, wobei jedoch keine Spezifität dieses Effekts auf eine der distinkten RNAs beobachtet werden konnte.

In Patienten mit Fragilem X-Syndrom wird in der Regel eine CGG-Trinucleotidexpansion im Promotorbereich des FMR-Gens gefunden, was zur Inaktivierung der Transkription und einem Mangel an FMRP in den Zellen führt. Es ist aber auch ein Patient mit einer schwerer Ausprägung der Krankheit bekannt, dessen *FMR1*-Transkription nicht gestört ist. Bei diesem Patienten wurde statt der Trinucleotidexpansion eine *Missense*-Mutation innerhalb der zweiten KH-Domäne von FMRP gefunden, welche einen Aminosäureaustausch von Isoleucin 304 nach Asparagin (FMRP_{I304N}) zur Folge hat (in Abbildung 5-7 mit Stern markiert). FMRP_{I304N} wurde nun rekombinant in *E. coli* exprimiert und, wie im vorausgegangenen Versuch, auf seinen Einfluss auf die Translation von mRNA *in vitro* getestet.

Interessanterweise führt die Zugabe von FMRP_{I304N} zu den mRNAs (Spuren 5-7, 10 und 13) nicht wie bei FMRP zu einer starken Translationsinhibition, obwohl im Assay gleiche molare

Proteinmengen eingesetzt wurden. Im Vergleich mit Kontrollansätzen (1, 8, 11), die statt der verwendeten Proteine nur Puffer enthalten, ist nur ein leichter Rückgang der Translation zu verzeichnen. FMRP kann also, im Gegensatz zu FMRP_{I304N}, im zellfreien System als Repressor der Translation agieren. Diese Experimente lassen eine essentielle Rolle der zweiten KH-Domäne, in der sich die Missense-Mutation befindet, bei der Kontrolle der Translation vermuten.

5.1.2 Lokalisation der Translationsinhibitionsdomäne von FMRP

Um den für die Translationsinhibition verantwortlichen Bereich in FMRP genauer einzugrenzen, wurden nun *in-vitro*-Translationsinhibitions-Studien mit FMRP-Deletionen durchgeführt (vgl. Abb. 5-3 A). Diese wurden zu Anfang so gewählt, dass die funktionellen Domänen des Proteins voneinander getrennt wurden. Die Proteine wurden dann rekombinant in *E. coli* exprimiert und deren Einfluss auf die Translation von SMN-mRNA im Reticulocytenlysat, analog wie oben, untersucht.

Bei der autoradiographischen Auswertung des Experiments stellte sich heraus, dass die FMRP-Deletion, welche nur die ersten 430 Aminosäuren des Proteins besitzt, ausreicht, um eine vollständige Translationsinhibition der mRNA zu gewährleisten. Die Inhibition entspricht in ihrer Intensität der von Wildtyp-FMRP (Abbildung 5-3 B, vgl. Spuren 1 und 11). Dieses Fragment (FMRP₁₋₄₃₀) umfasst den N-Terminus, beide KH-Domänen und noch einen dahinter liegenden Bereich von 102 Aminosäuren. Dagegen ist die FMRP-Deletionsmutante 1-430_{I304N} nicht in der Lage die Translation der SMN-mRNA zu inhibieren (Spur 10). Auch hier ist wieder zu beobachten, dass die krankheitsverursachende Missense-Mutation nicht in der Lage ist, die Inhibition der Translation zu gewährleisten.

Eine weiter verkürzte Deletionsmutante bestehend aus dem N-Terminus von FMRP und beiden KH-Domänen (1-332, Abbildung 5-3, Spur 13) kann hingegen die Translation der mRNA nicht unterbinden. Einige der FMRP-Deletionen, FMRP₄₃₀₋₆₃₂, FMRP₂₇₈₋₆₃₂, FMRP₂₁₆₋₆₃₂ und FMRP₁₋₂₇₇, scheinen einen leicht inhibierenden Einfluss auf die Translation auszuüben, auch wenn sie sie nicht vollständig verhindern (Spuren 3-5 und 9). Diese Fragmente enthalten (außer FMRP₁₋₂₇₇) als gemeinsames Merkmal alle die RGG-Box und weisen auch RNA-Bindungseigenschaften auf (nicht gezeigt).

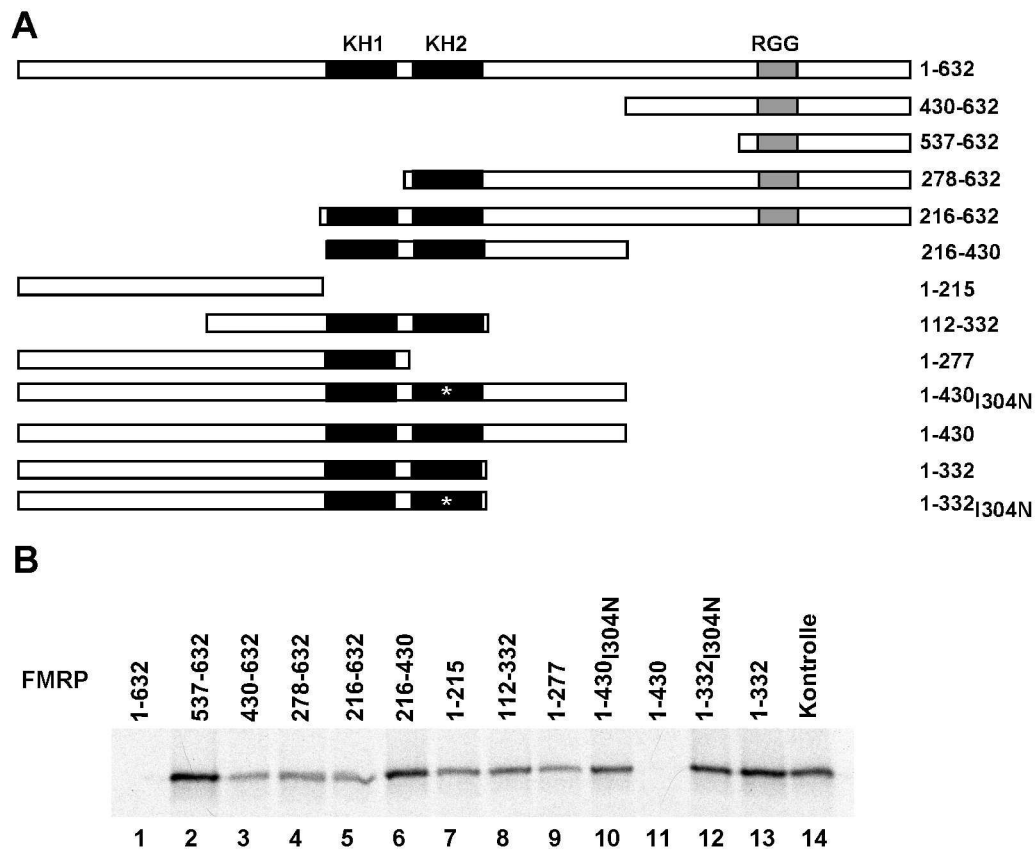


Abbildung 5-3 FMRP und FMRP₁₋₄₃₀ sind in der Lage, die RNA-Translation zu inhibieren. **A** Die Balken zeigen schematisch die Primärstruktur der in der Translationsinhibition getesteten FMRP-Deletionsmutanten. Die Lage der Punktmutation I304N ist mit einem „*“ angegeben. Ausgefüllte Balken geben die Positionen der KH-Domänen (schwarz) und der RGG-Box (grau) wieder. **B** Autoradiographie eines *in-vitro*-Translacionsexperiments. Dabei wurde FMRP₁₋₆₃₂ in einer Konzentration von 100 ng eingesetzt, die verkürzten Proteine in entsprechender molarer Menge. Die aufgeführten Proteine wurden mit SMN-mRNA und dem Reaktionsmix aus Reticulocytenlysate, Aminosäuren und [³⁵S]-Methionin zur *in-vitro*-Translation zusammengegeben und nach SDS-PAGE autoradiographisch analysiert. Spur 14 zeigt die Translation der mRNA ohne Zugabe rekombinanter Proteine.

FMRP₅₃₇₋₆₃₂, FMRP₂₁₆₋₄₃₀, FMRP₁₋₃₃₂ und die entsprechende Punktmutante zeigen keine Translationsinhibition, FMRP₁₋₂₁₅ und FMRP₁₁₂₋₃₃₂ haben dagegen einen leicht abgeschwächten Effekt.

Vergleicht man das Verhalten der FMRP-Deletionsmutanten in Abbildung 5-3 B, wird klar, dass der N-terminale Bereich inklusive beider KH-Domänen als primärer Mediator für die Inhibition der Translation in Frage kommt. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass noch andere Bereiche, wie zum Beispiel die RGG-Box, modulierend auf diese Funktion einwirken.

5.1.3 Die Fähigkeit zur Translationsinhibition korreliert mit der Homodimerisierung von FMRP

5.1.3.1 Der Punktmutante FMRP_{I304N} fehlt die Fähigkeit zur Homodimerisierung

Als nächstes sollte der Frage nachgegangen werden, warum FMRP_{I304N} nicht in der Lage ist, die Translation unterschiedlicher mRNAs zu inhibieren. Diese Mutation verursacht einen ausgeprägteren Krankheitsphänotyp, als das komplette Fehlen des Proteins. Auch wenn die Folgen der Mutation auf molekularer Ebene noch nicht genau verstanden sind, deutet dies darauf hin, dass nicht funktionsfähiges FMRP_{I304N} einen dominant negativen Effekt auf verschiedene Reaktionsabläufe, an denen FMRP beteiligt ist, ausübt. Vorausgegangene Untersuchungen in der Literatur machten deutlich, dass die Punktmutation in der zweiten KH-Domäne keine negativen Auswirkungen auf die RNA-Bindung des Proteins hat. Da aber KH-Domänen nicht nur RNA-Bindung, sondern auch Protein-Protein-Interaktionen vermitteln (Kim *et al.*, 2000), wurde nun durch *in-vitro*-Bindungsexperimente untersucht, ob der I304N-Aminosäure-Austausch Einfluss auf die Homo- und Heterodimerisierungsfähigkeit mit FXR1 und FXR2 ausübt.

Hierfür wurde rekombinantes FMRP_{I304N} über seinen ZZ-Fusionsanteil immobilisiert und mit je 2 µl *in-vitro*-translatiertem, radioaktiv-markiertem FMRP und FMRP_{I304N} inkubiert. Die Versuchsauswertung erfolgte durch gelelektrophoretische Auftrennung und daran anschließende Autoradiographie.

Die in Abbildung 5-4 gezeigten Ergebnisse machen deutlich, dass die Punktmutante FMRP_{I304N} zwar noch mit Wildtyp-FMRP interagieren kann, jedoch keine Dimerisierung zwischen Molekülen erfolgt, welche beide die Punktmutation tragen. Durch den Vergleich mit der eingesetzten Translat-Menge (Spur 1) kann die Aussage gemacht werden, dass die Punktmutante weniger als fünf Prozent der Wildtyp-FMRP-Menge bindet (Spur 2). Eine Homodimerisierung der Punktmutante ist dagegen nicht detektierbar (Spur 3), ebenso wie die Bindung von FMRP_{I304N}-Translat an immobilisiertes ZZ-tag in der Kontrolle (Spur 4).

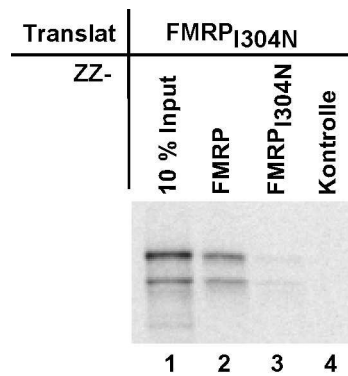


Abbildung 5-4 Die Punktmutante FMRP_{1304N} hat einen Dimerisierungsdefekt. Die Abbildung zeigt die Autoradiographie eines Bindungsassays. Rekombinantes ZZ-FMRP, ZZ-FMRP_{1304N} oder ZZ-tag als Kontrolle (Spuren 2-4) wurden immobilisiert und mit *in-vitro*-translatiertem, radioaktiv markiertem FMRP_{1304N} inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend gewaschen, dann elektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographisch analysiert. Spur 1 zeigt 10 % des eingesetzten Translats. Die obere Bande entspricht den Proteinen voller Länge, bei der unteren handelt es sich um ein unspezifisches Abbauprodukt.

Eine veränderte RNA-Bindung konnte für FMRP_{1304N} dagegen nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Abschließend lässt sich daher sagen, dass der Aminosäureaustausch in der zweiten KH-Domäne von FMRP zu einem Homodimerisierungs- bzw. Oligomerisierungsdefekt führt. Dieser Defekt korreliert mit der Beobachtung, dass die Punktmutante einen Funktionsverlust bei der Translationsinhibition zeigt.

5.1.3.2 Ein zentraler Bereich von FMRP ist für die Homodimerisierung des Proteins verantwortlich

Um die Homodimerisierungsdomäne von FMRP genauer einzugrenzen wurden nun Protein-Interaktionsstudien mit FMRP-Deletionsmutanten durchgeführt.

Hierzu wurden verschiedene Deletionsmutanten von FMRP kloniert und durch *in-vitro*-Translation radioaktiv markiert. Beim Entwurf der Deletionen wurde darauf geachtet, dass die drei im Protein vorkommenden, putativen RNA-Bindungsdomänen nicht zerstört werden. Die insgesamt zehn verschiedenen Proteinfragmente wurden schließlich auf ihre Bindung an immobilisiertes Volllängen-FMRP getestet.

Dabei war zu beobachten, dass sowohl der N-Terminus (1-215, Spur 22), als auch die beiden KH-Domänen mit dem C-Terminus zusammen (216-632 Spur 3) keine signifikante Bindung an ZZ-FMRP zeigen. Ausreichend für eine Bindung hingegen ist das Fragment 112-332 (Spur 23), was beide KH-Domänen und einen weiter N-terminal gelegenen Bereich des Proteins enthält. Somit ist festzuhalten, dass ein vergleichsweise großer Abschnitt in der Primärstruktur von FMRP, der auch die beiden KH-Domänen beinhaltet, für die Homodimerisierung notwendig ist (siehe Abbildung 5-5 und Abbildung 5-7).

In Abbildung 5-5 (Spuren 6 und 10) kann zusätzlich die Assoziation von FMRP_{I304N} mit den beiden autosomalen Homologen FXR1 und FXR2 beobachtet werden. Es zeigt sich, dass die Heterodimerisierung mit diesen beiden Proteine durch die Punktmutation nicht beeinträchtigt ist, im Gegensatz zur Homodimerisierung mit FMRP_{I304N} (vgl. Abbildung 5-4). Dies deutet darauf hin, dass es offensichtlich nicht zu einer totalen Fehlfaltung und damit einem Funktionsverlust des mutierten Proteins kommt.

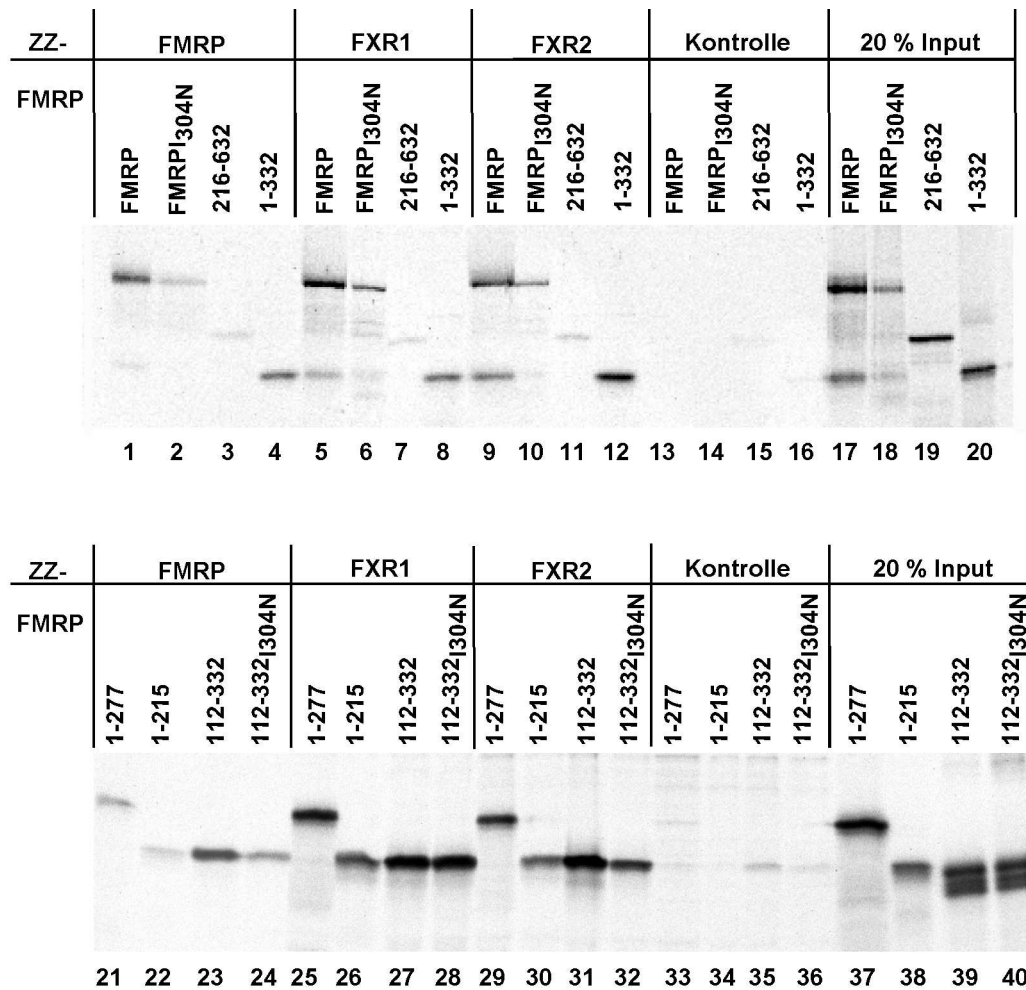


Abbildung 5-5 Unterschiedliche Domänen von FMRP vermitteln die Homodimerisierung und die Assoziation mit FXR1 und FXR2. Autoradiographie eines Bindungsexperiments mit *in-vitro*-translatierten Deletionsmutanten von FMRP. ZZ-FMRP (Spuren 1-4, 21-24), ZZ-FXR1 (Spuren 5-8, 25-28) oder ZZ-FXR2 (Spuren 9-12, 29-32) wurden immobilisiert und mit den angegebenen *in-vitro*-translatierten FMRP-Deletionsmutanten inkubiert. Als Kontrolle wurde das ZZ-Peptid immobilisiert und mit den Translaten inkubiert (Spuren 13-16, 33-36). Nach anschließendem Waschen wurden die Ansätze durch SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch analysiert. Spuren 17-20 und 37-40 zeigen 20 % des eingesetzten Translats.

5.1.3.3 Die Korrelation von Translationsinhibition und Homodimerisierung von FMRP

Die fehlende Homodimerisierung der punktmutierten FMRP-Fragmente (vgl. Abbildung 5-4) und die leicht abgeschwächte Translationsinhibition einiger Deletionsmutanten (Abbildung 5-3) geben Hinweise darauf, dass sowohl eine Dimerisierung von FMRP erfolgen muss, als

auch alle drei RNA-bindenden Domänen vorhanden sein müssen, um eine gänzliche Translationsinhibition der RNA zu erreichen. Abbildung 5-6 fasst die Ergebnisse der Dimerisierung und der Translationsinhibition zusammen.









	FMRP-Deletionsm.	Dimerisierung	TL-Inh.
	1-632	++	+
	1-632 _{I304N}	-	-
	216-632	-	-
	1-332	+	-
	1-277	-	-
	1-215	-	-
	1-430	+	+
	1-430 _{I304N}	-	-

Abbildung 5-6 Die Dimerisierung von FMRP ist die Voraussetzung für die Translationsinhibition. Die Balken zeigen schematisch die Primärstruktur der in Dimerisierung und Translationsinhibition getesteten FMRP-Deletionsmutanten. Die Lage der Punktmutation I304N ist mit einem „*“ angegeben. Ausgefüllte Balken geben die Positionen der KH-Domänen (schwarz) und der RGG-Box (grau) wieder. In einer Tabelle daneben sind die Ergebnisse der genannten Versuche zusammengefasst, wobei „++“ eine sehr gute Bindung, „+“ eine gute Bindung/Translationsinhibition und „-“ keine Bindung/Translationsinhibition bedeutet.

Die schematische Abbildung der Deletionsmutanten verdeutlicht, dass die Translationsinhibition einem vergleichsweise großen, zusammenhängenden Bereich in der Primärstruktur des Proteins zugeordnet werden kann. Dabei zeigt sich, dass von den Deletionsmutanten, welche alle drei RNA-Bindungsdomänen besitzen, nur Volllänge-FMRP in der Lage ist, die Inhibition der RNA-Translation zu gewährleisten, eine bis zur ersten KH-Domäne deletierte Mutante jedoch nicht (FMRP₂₁₆₋₆₃₂). Dagegen verdeutlicht der Vergleich der FMRP-Deletionen, dass in erster Linie FMRP welches auch zur Dimerisierung befähigt ist, eine Translationsinhibition ausübt (vgl. Abbildung 5-6, Punktmutationen von FMRP und FMRP₁₋₄₃₀). Eine Ausnahme bietet dagegen FMRP₁₋₃₃₂, welches trotz intakter Dimerisierung die Translation von RNA nicht beeinflusst.

5.1.3.4 Die Bindungsstellen von FXR1 und FXR2 an FMRP überlappen sich

Da eine nahe Verwandtschaft der Proteine der Fragilen X-Familie zueinander besteht, war es interessant zu erfahren, ob FXR1 und FXR2 ebenfalls an die Dimerisierungsdomäne von FMRP binden. In diesem Fall würden die beiden Homologen mit FMRP um diese Bindungsstelle konkurrieren. Zur Klärung dieser Frage wurden FXR1 und FXR2 mit *ZZ-tag* rekombinant exprimiert und an IgG-Sepharose immobilisiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von *in-vitro*-translatierten, radioaktiv markierten FMRP-Deletionsmutanten.

Die Abbildung 5-5 macht deutlich, dass FXR1 und FXR2 einen kleineren Bereich zur Heterodimerisierung mit FMRP benötigen, als FMRP zur Homodimerisierung. Die Bindungsstelle umfasst lediglich den N-terminalen Abschnitt vor den beiden KH-Domänen. Diese Aussage lässt sich aus der Beobachtung treffen, dass beide Proteine sowohl an Fragment FMRP 1-215 (Spuren 26, 30), als auch an FMRP 112-332 (Spuren 27, 31) gleichermaßen binden. Dagegen findet keine Assoziation mit der Deletionsmutante 216-632 statt.

Die C-terminalen zwei Drittel von FMRP (216-632 Spuren 3, 7 und 11) zeigen in diesem Assay keine Interaktion mit FMRP, FXR1 oder FXR2. Somit scheint es wahrscheinlich, dass die getesteten Protein-Protein-Interaktionen ausschließlich über den N-terminalen Bereich von FMRP vermittelt werden. Abbildung 5-7 fasst die Ergebnisse der Bindungsassays grafisch zusammen.

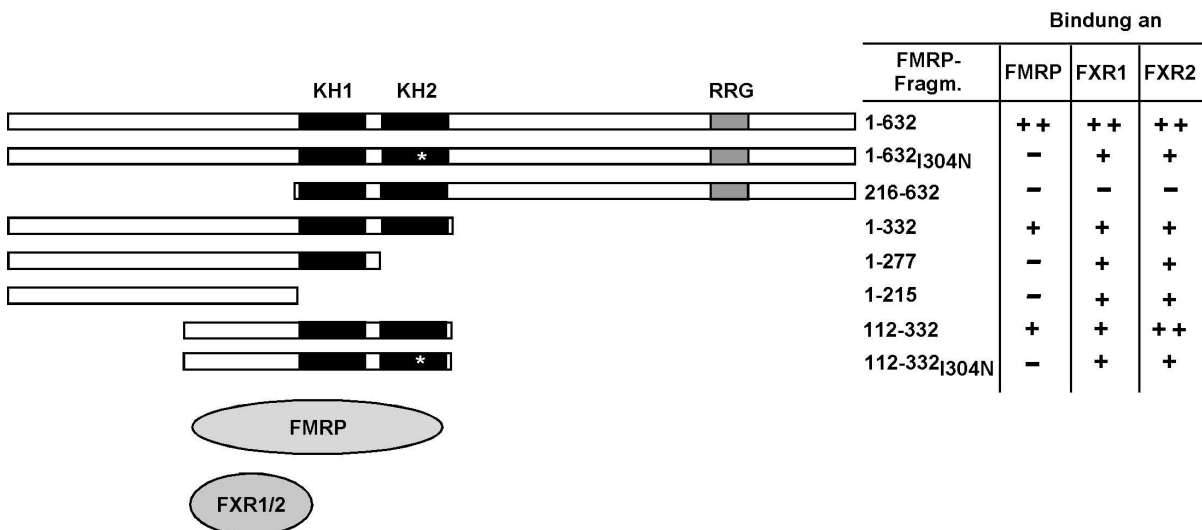


Abbildung 5-7 Schematische Zusammenfassung der Bindungsexperimente. Die Balken zeigen schematisch die Primärstruktur der getesteten FMRP-Deletionsmutanten mit der Position der beiden KH-Domänen (KH1, KH2) und der RGG-Box (RGG). * bezeichnet die Lage der Punktmutation I304N. Die Tabelle daneben und die stilisierten Proteine unterhalb der Balken fassen die Ergebnisse des Bindungsexperiments von Abbildung 5-5 zusammen.

5.1.4 Herstellung eines monoklonalen FMRP-Antikörpers

Der inhibierende Effekt von rekombinantem FMRP auf die Translation von mRNAs sollte nun auf der molekularen Ebene genauer verstanden werden. Aus diesem Grund sollte ein monoklonaler Antikörper hergestellt werden, der gegen FMRP gerichtet ist und die Aufreinigung des endogenen Proteins und seinen interagierenden Komponenten aus humanen Zellen ermöglicht. Mit ihm verband sich die Hoffnung auf ein „Werkzeug“ für die weitere biochemische Analyse von FMRP.

Für die Immunisierungen wurde Volllänge-FMRP rekombinant mit His-tag in *E. coli* exprimiert und in BALB/c Mäuse injiziert. Anschließend an mehrere *Booster*-Injektionen wurden antikörperproduzierende B-Zellen aus der Milz mit Myelomazellen fusioniert. Die so entstandenen Hybridomazellen wurden in Selektionsmedium kultiviert und zu Klonen vereinzelt. Mit Hilfe von ELISA-Tests und Westernblots konnten 13 spezifische FMRP-Antikörper-produzierende Zellklone (36.1, 333.1, 333.2, 333.3, 333.5, 333.6, 333.7, 333.8, 333.9, 333.10, 333.16, 333.27 und 333.28) isoliert werden, die allesamt rekombinant hergestelltes FMRP im Western-Blot bzw. im ELISA-Test erkennen (nicht gezeigt). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde der Klon 36.1 im Detail charakterisiert.

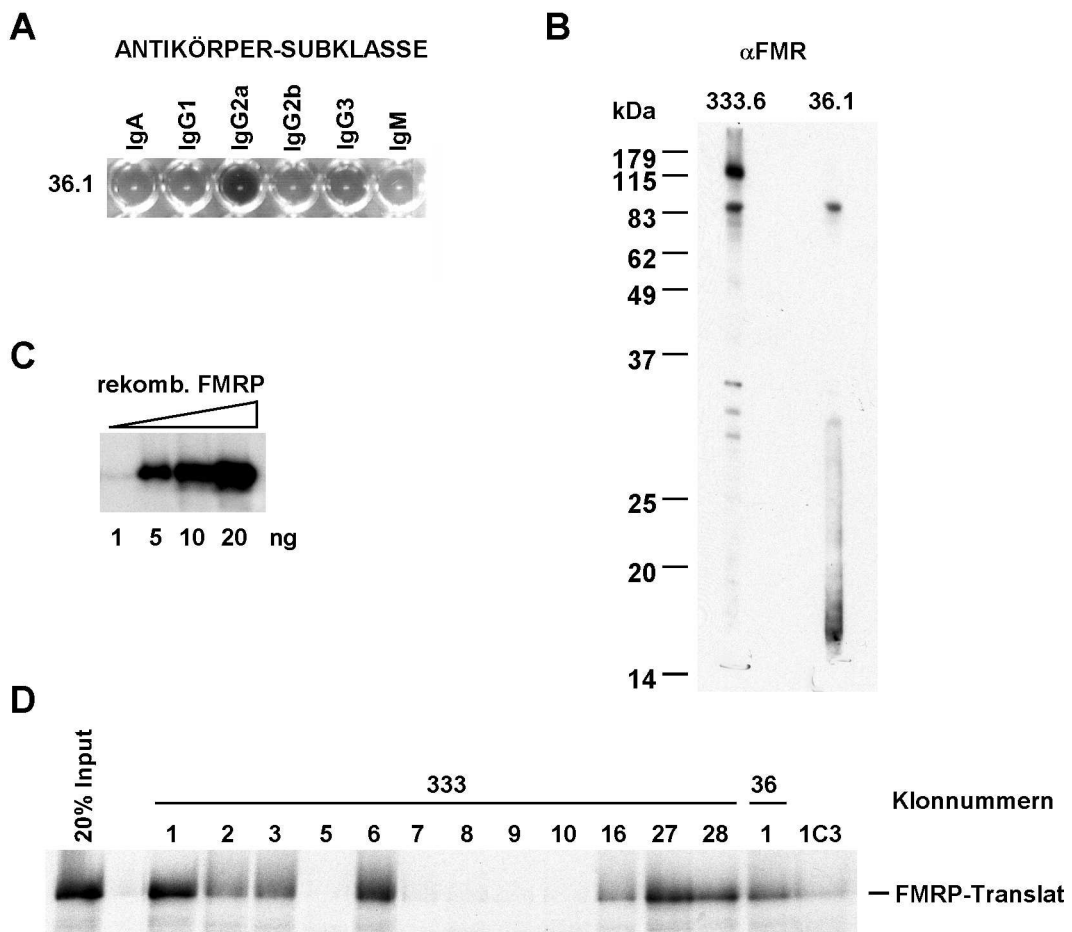


Abbildung 5-8 Charakterisierung von monoklonalen anti-FMRP-Antikörpern. **A** ELISA-Test zur Identifizierung der Antikörper-Subklasse. Die Farbreaktion findet in der Kavität statt, die Zweitantikörper gegen den Subtyp (Bezeichnung über der jeweiligen Kavität) des getesteten FMRP-Antikörpers enthält. **B** Westernblot mit 50 µg HeLa-Gesamtprotein pro Spur. **C** Westernblot mit unterschiedlichen Mengen (1-20 ng) rekombinantes FMRP. **D** Autoradiographie einer Immunpräzipitation von *in-vitro*-translatiertem FMRP durch unterschiedliche anti-FMRP-Klone. Die erste Spur zeigt 20 % des eingesetzten Translats, die übrigen Spuren sind oberhalb mit der jeweiligen Klonnummer beschriftet. 1C3 bezeichnet einen käuflich erworbenen FMRP-Antikörper.

Zu Anfang wurde mit Hilfe von FMRP-Deletionsmutanten das Epitop, welches der monoklonale Antikörper-Klon 36.1 im Westernblot erkennt, genau eingegrenzt. Es konnte zwischen Aminosäuren 357 und 376 lokalisiert werden, ein Bereich, der sich in FMRP etwa in der Mitte zwischen der zweiten KH-Domäne und der RGG-Box befindet.

Mit Hilfe eines ELISA-Assays erfolgte zu Anfang eine Bestimmung der Subklasse des anti-FMRP-Antikörpers. Es zeigt sich, dass der monoklonale anti-FMRP-Antikörper der Subklasse IgG2a angehört (siehe Abbildung 5-8, A) und damit hohe Affinität für Protein-A- wie auch für Protein-G hat.

Die Monospezifität eines Antikörpers für sein Antigen ist eine Grundvoraussetzung für viele biochemische Assays, daher lag nahe, den anti-FMRP-Antikörper Klon 36.1 auf seine Spezifität hin zu untersuchen. Hierzu wurde er zur Detektion von FMRP in HeLa-Zellextrakt im Westernblot eingesetzt. Zum Vergleich wurde auch mit den Antikörpern eines anderen Klons detektiert. Es zeigt sich, dass beide monoklonalen Antikörper-Klone (333.6 und 36.1) FMRP in Zellextrakt erkennen (Abbildung 5-8, B). In beiden Fällen ist auch hervorzuheben, dass FXR1 und FXR2, die ein geringfügig niedrigeres bzw. höheres Molekulargewicht als FMRP besitzen (ca. 81 kDa bzw. 89 kDa), nicht detektiert werden. Der Antikörper-Klon 36.1 ist monospezifisch für FMRP, im Gegensatz zu 333.6, der neben FMRP auch noch ein unbekanntes Protein mit einer Masse von 120 Kilodalton erkennt.

Ergänzend zur Spezifität wurde auch die Sensitivität des Antikörpers 36.1 untersucht. Abbildung 5-8, C zeigt, dass rekombinantes FMRP im Westernblot bis zu einer Menge von 5 ng erkannt wird.

Um die Fähigkeit der FMRP-Antikörper zur Immunpräzipitation von FMRP aus Zellextrakt zu prüfen, wurden die Mediumüberstände der dreizehn Hybridomaklone mit Protein-G-Sepharose inkubiert und so der von den Zellen ins Medium sezernierte Antikörper immobilisiert. Anschließend wurden sie mit *in-vitro*-translatiertem, [³⁵S]-markiertem FMRP inkubiert. Die Ansätze wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographisch untersucht (Abbildung 5-8 D). Dabei zeigte sich, dass die Klone 333.1, 333.2, 333.3, 333.6, 333.16, 333.27, 333.28 und 36.1 *in-vitro*-translatiertes FMRP präzipitieren können. Die anderen fünf Klone und der käuflich erworbene FMRP-Antikörper (Klon 1C3) sind dazu dagegen nicht in der Lage. Durch einige Antikörper können bis zu 20 % des eingesetzten FMRP-Translats immunpräzipitiert werden (Abbildung 5-8 D, Klone 333.1, 333.6 und 333.27).

Um zu überprüfen, ob der Antikörper Klon 36.1 natives FMRP in HeLa-Zellextrakt erkennen und daraus isolieren kann, wurden steigende Mengen Antikörper an Protein-G-Sepharose immobilisiert und anschließend mit Zellextrakt inkubiert. Nachfolgend wurden die Präzipitate durch SDS-PAGE aufgetrennt. Für eine Analyse der präzipitierten FMRP-Menge wurden auch steigende Mengen rekombinantes FMRP als Standard mit aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte durch Westernblot.

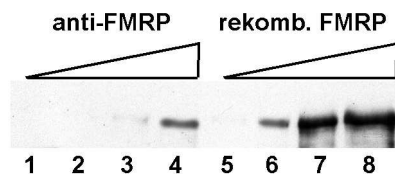


Abbildung 5-9 Der monoklonale FMRP-Antikörper kann FMRP nicht effizient aus Zellextrakt präzipitieren. Die Abbildung zeigt den Westernblot einer Immunpräzipitation von FMRP. Unterschiedliche Mengen des monoklonalen FMRP-Antikörpers Klon 36.1 (250 ng, 1, 5 oder 10 µg, Spuren 1-4) wurden immobilisiert und mit 2 ml HeLa-Zellextrakt (2×10^9 Zellen) inkubiert. Nach dem Waschen wurden die präzipitierten Proteine mit Protein-Probenpuffer eluiert und durch SDS-PAGE und Westernblot analysiert. Als Standard wurden definierte Mengen rekombinantes FMRP aufgetragen (0,5 ng, 1 ng, 5 ng oder 10 ng, Spuren 5-8).

Der Vergleich der präzipitierten FMRP-Menge mit dem Proteinstandard zeigt, dass ca. 10 µg Antikörper notwendig waren, um etwa 1 ng FMRP zu präzipitieren (Abbildung 5-9, vgl. Spuren 4 und 6). Geht man davon aus, dass in 1 ml HeLa-Extrakt (1×10^9 Zellen) 400 ng FMRP enthalten sind (nicht gezeigt), entspricht die präzipitierte Menge nur 0,25 % des im Versuchsansatz enthaltenen endogenen FMRPs. Darauf folgende Untersuchungen ergaben, dass nahezu kein FXR1 bzw. FXR2 in den Immunpräzipitationen enthalten waren (durch Westernblot nachgewiesen, nicht gezeigt), obwohl bekannt ist, dass beide Proteine in einem Komplex mit FMRP vorliegen (Zhang *et al.*, 1995; Siomi *et al.*, 1995). Ähnliche Experimente mit den anti-FMRP-Antikörpern 333.1 und 333.27 zeigten vergleichbare Resultate. Offenbar präzipitiert der Antikörper also freies Protein, wie dies auch die Immunpräzipitation von FMRP-Translat gezeigt hatte (vgl. Abbildung 5-8), komplexassoziiertes Protein aus HeLa-Zellextrakt wird hingegen nicht erkannt. Dies führt zu der Annahme, dass die monoklonalen anti-FMRP-Antikörper möglicherweise unter *in-vivo*-Bedingungen keinen Zugang zu ihrem Epitop im FMRP-Komplex haben und daher für Co-Immunpräzipitationen unter physiologischen Bedingungen ungeeignet sind.

5.1.5 FMRP liegt in humanen Zellen modifiziert vor

Im Folgenden stellte sich die Frage, über welche Mechanismen eine Kontrolle der Translation von mRNAs durch FMRP ausgeübt wird. Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf eine

Regulation der Aktivität durch posttranslationale Modifikationen gelegt, wie sie bereits von verwandten mRNP-assoziierten Proteinen bekannt waren (Shen *et al.*, 1998; Ostareck-Lederer *et al.*, 2002).

Erste Hinweise auf eine posttranslationale Modifikation von FMRP ergaben sich aus Experimenten mit frisch präparierten HeLa-Zellextrakten, bei deren gelelektrophoretischer Auftrennung FMRP mit zwei unterschiedlichen molekularen Massen detektiert werden konnte (nicht gezeigt). In weiteren Versuchen wurden HeLa-Cytoplasma- und -Kernextrakt gelfiltrationschromatografisch aufgetrennt und, nach SDS-PAGE, FMRP in den einzelnen Fraktionen durch Westernblot nachgewiesen (Abbildung 5-10). Vorwiegend im Kern kann mit dem Antikörper Klon 36.1 eine zweite Bande detektiert werden (FMRP*), ein ca. 15 Kilodalton höheres Molekulargewicht aufweist. Da der Antikörper monospezifisch für FMRP ist (vgl. Abbildung 5-8 B), wurde vermutet, dass es sich hierbei um eine posttranslationale Modifikation des Proteins handelt. Es konnte beobachtet werden, dass sich die Mengenverhältnisse zwischen FMRP und modifiziertem FMRP (hier mit einem Stern markiert) in den einzelnen Fraktionen proportional zueinander verändern.

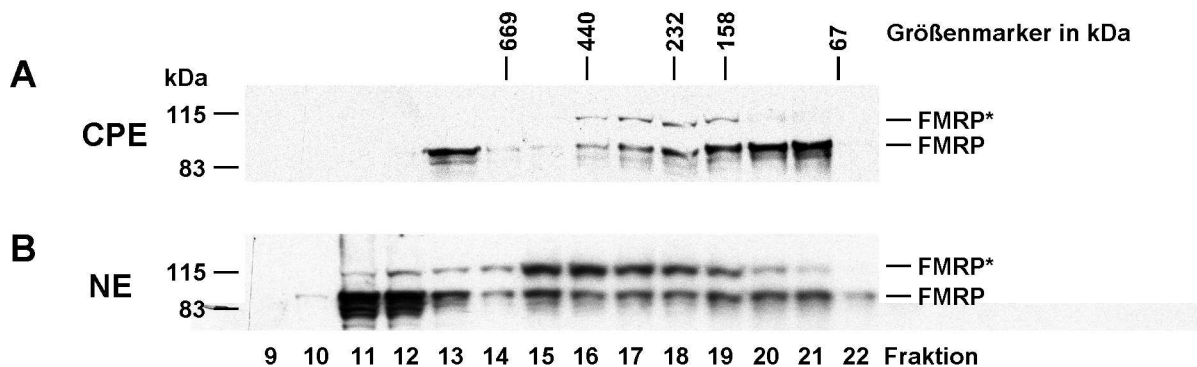


Abbildung 5-10 FMRP liegt in HeLa-Cytoplasma- und -Kernextrakt modifiziert vor. Westernblot von fraktioniertem HeLa-Cytoplasmaextrakt (A) und HeLa-Kernextrakt (B) nach einer Superose-6-Gelfiltrationschromatographie, die Detektion erfolgte mit anti-FMRP-Antikörper Klon 36.1. Dargestellt sind die Fraktionen (9-22), die dem Protein-Trennbereich der verwendeten Matrix entsprechen. Die Zahlen über den Fraktionen zeigen das Elutionsverhalten eines Molekulargewichtsmarkers (in Kilodalton) auf der verwendeten Säule.

Bei Betrachtung der gelfiltrationschromatografischen Auftrennung der Zellextrakte fällt auf, dass FMRP in den beiden zellulären Kompartimenten in verschiedenen Proteinkomplexen vorliegt, die sich anhand ihrer Masse und damit in ihrer Verteilung auf die eluierten Fraktionen unterscheiden.

Diese Beobachtung deckt sich mit bereits veröffentlichten Ergebnissen über FMRP als Teil von makromolekularen Komplexen, welche sowohl mRNAs, als auch Proteine in unterschiedlicher Zusammensetzung und Menge beinhalten (Ceman *et al.*, 1999; Feng *et al.*,

1997a; Tamanini *et al.*, 1996). Hierdurch erklärt sich möglicherweise auch das heterogene Laufverhalten von FMRP. Das Protein verteilt sich über viele Fraktionen bis in den hochmolekularen Bereich hinein (Abbildung 5-10, Fraktionen 11-21). Trotzdem fällt ein Unterschied zwischen Cytoplasma- und Kernextrakt ins Auge: Der größte cytoplasmatische FMRP-Komplex besitzt eine Masse von etwa 700 kDa (Fraktion 13). Im Kern jedoch setzt sich der Komplex anders zusammen, hier beträgt die Größe bis zu einem Megadalton (Fraktionen 11-13). Auffällig ist dabei auch, dass die größten Komplexe in beiden Kompartimenten vergleichsweise wenig des putativen modifizierten FMRP (FMRP*) enthalten, dagegen ist dieses vor allem in Komplexen mit einem Molekulargewicht zwischen 160 und 500 Kilodalton enthalten.

Aufgrund der verwendeten Gelfiltrationssäule werden in diesem Experiment nur Proteinkomplexe mit einer Masse unter einem Megadalton aufgetrennt. Größere mRNPs befinden sich dagegen im Durchbruch und können hier nicht analysiert werden.

Um einen Überblick über die Anzahl und Art der Modifikationen von FMRP zu erhalten, wurden HeLa-Total-, Cytoplasma- und Kernextrakt einer zweidimensionalen Gelelektrophorese unterzogen. Bei der hier angewandten Methode werden isoelektrische Fokussierung und denaturierende SDS-PAGE miteinander kombiniert. So können Proteine anhand ihrer Nettoladung und zusätzlich ihrer Größe aufgetrennt werden, wobei einzelne posttranslationale Modifikationen durch die Differenz einer einzigen Ladungsänderung unterschieden werden können.

Die gefällten Proteine wurden in der ersten Dimension in einem pH-Gradientengel (pH 3-11) ihrem isoelektrischen Punkt entsprechend fokussiert und anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion von FMRP erfolgte durch einen Westernblot.

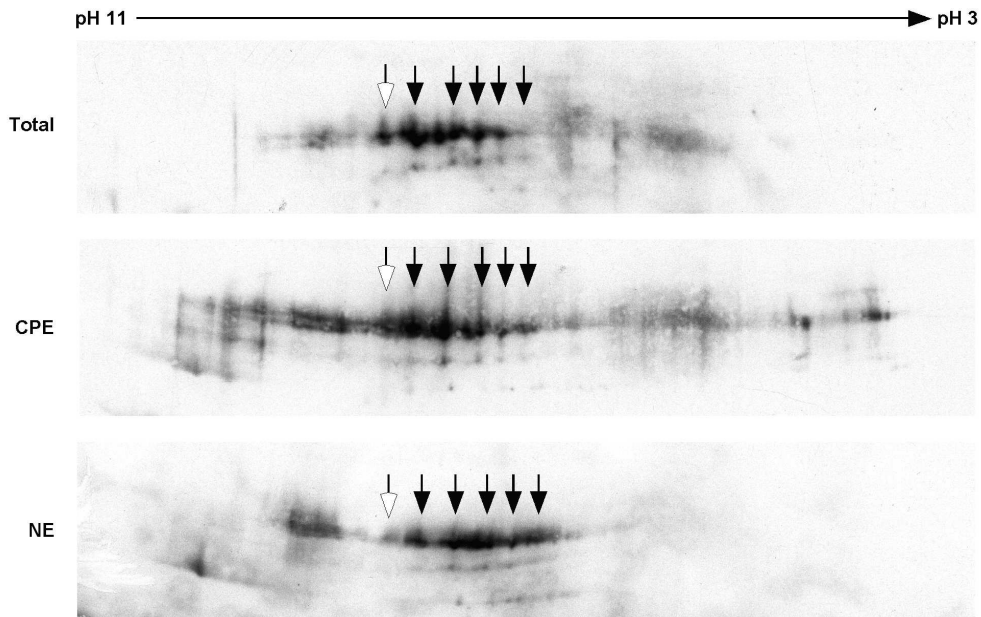


Abbildung 5-11 FMRP wird mehrfach posttranslational modifiziert. Westernblot einer 2-D-Gelelektrophorese von HeLa-Ganzzellextrakt (Total), -Cytoplasmaextrakt (CPE) und -Kernextrakt (NE), die Detektion von FMRP erfolgte mit den anti-FMRP-Antikörper Klon 36.1. Die gefällten Proteine wurden einer isoelektrischen Fokussierung im pH-Bereich von 11 bis 3 unterzogen, gefolgt von einer SDS-PAGE. Die den Extrakten gemeinsamen Detektionssignale werden von schwarzen Pfeilen angezeigt, Unterschiede in den FMRP-Modifikationen markieren die weißen Pfeile.

Es konnte gezeigt werden, dass FMRP in den unterschiedlichen Zellkompartimenten modifiziert vorkommt. Von den jeweils fünf bis sechs punktförmigen Detektionssignalen sind in Abbildung 5-11 diejenigen markiert, die in den drei unterschiedlichen Extrakten übereinstimmen (ausgefüllte Pfeile). Die offenen Pfeile deuten auf Unterschiede im Vergleich der Zellextrakte, die sich vor allem in Abweichungen bei den Proteinmengen bemerkbar machen, beispielsweise eine modifizierte Form von FMRP die im Cytoplasma vorkommt, jedoch nicht im Kernextrakt detektiert wird. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die cytoplasmatischen FMRP-Modifikationen in mindestens einem Fall von den nukleären unterscheiden.

5.1.5.1 FMRP kann *in vitro* methyliert werden

Im nächsten Schritt wurde nun der Frage nachgegangen, auf welche Art FMRP posttranslational modifiziert wird. Die Analyse von Proteinen mit RGG-Box ergab, dass diese oft Ziel intensiver asymmetrischer Dimethylierungen (aDMA) an den Argininresten dieser Domäne sind. Aus diesem Grund lag der Gedanke nahe, FMRP auf diese Modifikation hin zu untersuchen.

Auf der Grundlage der unterschiedlichen FMRP-Deletionsmutanten wurde nun in einem *in-vitro*-Assay untersucht, ob FMRP methyliert wird und in welcher Region des Proteins diese

Modifikation gegebenenfalls erfolgt. Da bis zu diesem Zeitpunkt noch keine FMRP-modifizierende Methyltransferase bekannt war, wurde in dem nachfolgend beschriebenen Experiment frisch präparierter HeLa-Cytoplasmaextrakt verwendet, in dem die Methyltransferase(n) vorhanden sein sollten. Dieser wurde mit rekombinantem FMRP bzw. unterschiedlichen FMRP-Deletionen inkubiert. Als Methylgruppendonor fungierte [³H]-markiertes S-Adenosylmethionin, der generelle Cofaktor für Arginin-Methyltransferasen. Anschließend wurde der Versuch gelelektrophoretisch und autoradiographisch ausgewertet. Anhand der Abbildung 5-12, Spur 1 wird deutlich, dass mindestens eine der im Cytoplasmaextrakt enthaltenen Methyltransferasen FMRP als Substrat erkennt und in der Lage ist, die radioaktiv markierte Methylgruppe auf das Protein zu übertragen. Durch einen Vergleich der Deletionsmutanten ist ersichtlich, dass sich die modifizierte Region im C-terminalen Teil von FMRP befindet, da neben Vollängen-FMRP nur FMRP₄₃₀₋₆₃₂ und FMRP₅₃₇₋₆₃₂ methyliert werden (Spuren 4 und 5).

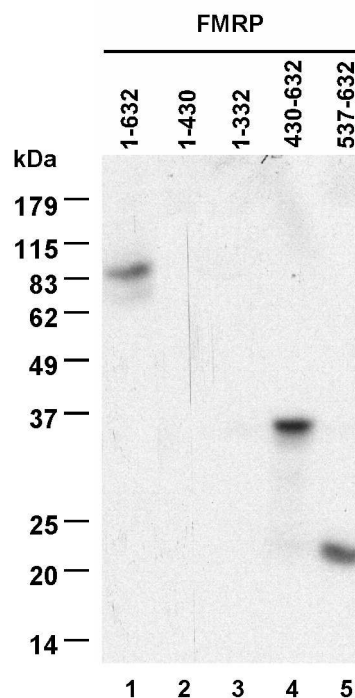


Abbildung 5-12 Der C-Terminus von FMRP wird in HeLa-Extrakt methyliert. Autoradiographie eines *in vitro* Methylierungsexperiments, bei dem gleiche molare Mengen verschiedener rekombinant exprimierter FMRP-Deletionsmutanten (Spuren 2-5) bzw. FMRP voller Länge (Spur 1) mit HeLa-Extrakt und radioaktiv markiertem S-Adenosylmethionin für eine Stunde bei 37°C inkubiert wurden. Anschließend wurden die Ansätze durch SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch analysiert. Die Zahlen geben die Größen eines Proteinmolekulargewichtsmarkers in Kilodalton an.

Vor allem die RGG-Box kommt als potentielle Akzeptor-Region in Frage, da RG-reiche Sequenzen vermehrt mit kovalenten Modifikationen in Form von Methylierungen in Verbindung gebracht werden. (vgl. Kapitel 2.2.2).

5.1.5.2 FMRP ist ein Phosphoprotein

Neben der Methylierung ist die Phosphorylierung eine häufige Art der posttranslationalen Modifikation bei RNA-bindenden Proteinen. Um zu untersuchen, ob FMRP *in vivo* phosphoryliert wird, wurden HeLa-Gewebekulturzellen im Wachstum mit [32 P]-*ortho*-Phosphat inkubiert. Die Zellen wurden anschließend lysiert und mit dem anti-FMRP-Antikörper Klon 36.1 inkubiert. Die so immunpräzipitierten Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Westernblot und parallele Autoradiographie der Blotmembran detektiert.

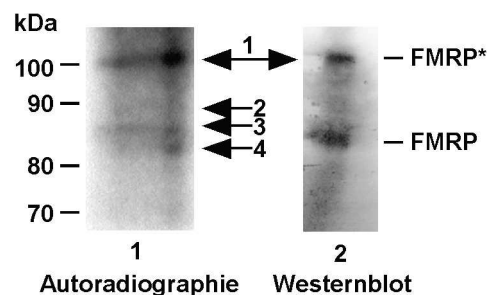


Abbildung 5-13 FMRP wird durch Phosphorylierung posttranslational modifiziert. Autoradiographie (1) und Westernblot (2) eines *in-vivo*-Phosphorylierungsexperiments, wobei FMRP in (2) mit dem anti-FMRP-Antikörper 1C3 nachgewiesen wurde. Pfeil 1 bezeichnet die übereinstimmende Bande vom phosphorylierten FMRP und FMRP* im Westernblot, die Pfeile 2-4 weisen auf phosphorylierte Proteine, bei denen es sich nicht um FMRP handelt.

Vergleicht man die Autoradiographie mit dem Westernblot (Abbildung 5-13), wird deutlich, dass nur die hochmolekulare FMRP-Bande (Pfeil 1) radioaktiv markiert ist. Drei deutlich schwächer markierte Proteinbanden decken sich nicht mit dem im Westernblot detektierten FMRP mit einer Größe von etwa 85 kDa. Damit ist ausgeschlossen, dass dieses phosphoryliert ist. Um nun die Art der Phosphorylierung zu untersuchen, wurde eine Phosphoaminosäure-Analyse durchgeführt. Hierzu wurde das [32 P]-markierte FMRP durch saure Hydrolyse in seine Aminosäuren gespalten und in einer 2D-Dünnschichtchromatographie untersucht (Abbildung 5-14).

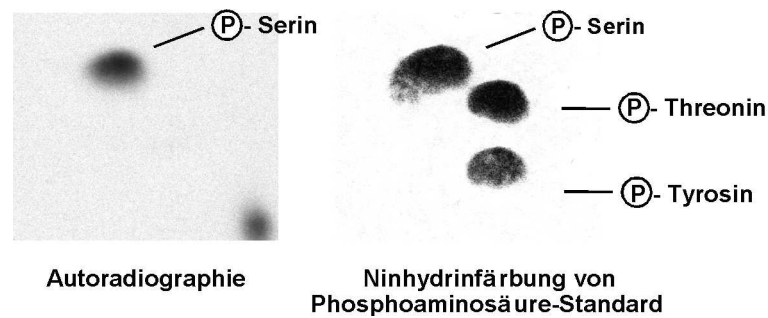


Abbildung 5-14 *FMRP* wird *in vivo* an Serin phosphoryliert. Autoradiographie einer dünn-schichtchromatographischen Auftrennung von sauer hydrolysiertem *FMRP*. Daneben ist die Ninhydrinfärbung eines Phosphoaminosäure-Standards (Phospho-Serin, -Threonin und -Tyrosin), ebenfalls nach einer dünn-schichtchromatographischen Auftrennung, abgebildet. Die Positionen der angefärbten Aminosäuren wurden dann mit dem Laufverhalten der Proteinprobe verglichen.

Der Vergleich der Autoradiographie mit dem angefärbten Aminosäurestandard (Phospho-Serin, -Threonin und -Tyrosin) belegt, dass die Proteinprobe phosphorylierte Aminosäuren enthielt, die bei der chromatographischen Auftrennung dem Laufverhalten von Phosphoserinen entsprechen. *FMRP* wird demnach *in vivo* an mindestens einem Serinrest phosphoryliert.

5.1.5.3 *FMRP* kann *in vitro* phosphoryliert werden

Nachdem klar war, dass *FMRP* an Serin-Resten modifiziert wird, galt es als nächstes zu untersuchen, in welcher Region des Proteins die Phosphorylierung erfolgt. Hierzu wurden rekombinant exprimiertes *FMRP*, *FMRP*-N-Terminus (1-332) und *FMRP* C-Terminus (216-632) einer *in-vitro*-Phosphorylierung unterzogen. Die hierfür gewählte Kinase war Casein-Kinase-II, da diese Kinase ein breites Spektrum bezüglich ihrer Zielproteine besitzt und sich in der Aminosäuresequenz von *FMRP* mehrere putative Erkennungssequenzen für CKII finden lassen.

Die rekombinante Kinase wurde mit γ -[^{32}P]-ATP und rekombinantem Volllänge-*FMRP* oder den jeweiligen *FMRP*-Deletionen 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze durch SDS-PAGE aufgetrennt und zur Überprüfung der erfolgten *FMRP*-Phosphorylierung autoradiographisch bzw. mittels Coomassiefärbung analysiert. Als Kontrolle dienten Ansätze, in denen HeLa-Zellextrakt statt Casein-Kinase-II zur Phosphorylierung von *FMRP* eingesetzt wurde.

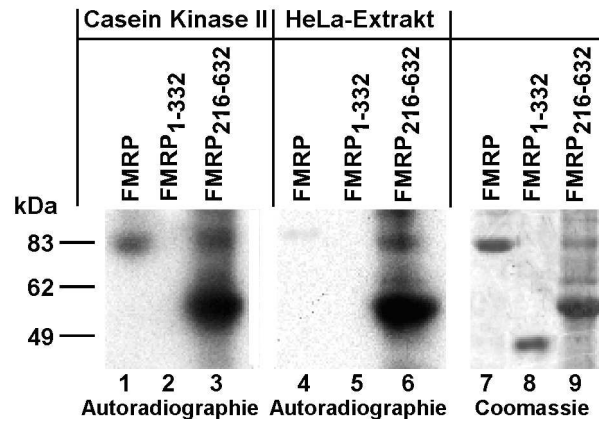


Abbildung 5-15 Der C-Terminus von FMRP kann *in vitro* phosphoryliert werden. Autoradiographie (Spuren 1-6) und Coomassiefärbung (Spuren 7-9) eines *in-vitro*-Phosphorylierungsexperiments. Die rekombinanten Proteine FMRP, FMRP₁₋₃₃₂ und FMRP₂₁₆₋₆₃₂ wurden mit 2 µg Casein-Kinase II (Spuren 1-3) und HeLa-Extrakt (Spuren 4-6) für eine halbe Stunde bei 30°C inkubiert. Eine Phosphorylierung wurde in der Autoradiographie anhand der übertragenen Phosphoserylgruppe von γ -[³²P]-ATP nachgewiesen. Ein Molekulargewichtsmarker gibt die Proteingrößen in Kilodalton an.

Die Autoradiographie zeigt, dass sich der C-Terminus von FMRP am effektivsten phosphorylieren lässt. Dies gilt sowohl für die Ansätze mit der rekombinanten Kinase, wie auch für die mit Zellextrakt (Abbildung 5-15, Spuren 3 und 6), auch wenn man berücksichtigt, dass ca. doppelt soviel des C-terminalen Fragments als Substrat eingesetzt wurde wie die anderen beiden Fragmente (vgl. Coomassiefärbung, Spuren 7-9).

Weiterhin ist in den Spuren 1 und 4 erkennbar, dass FMRP voller Länge sowohl von Casein-Kinase II, als auch im HeLa-Extrakt phosphoryliert wird. Dagegen wird der N-terminale Teil von FMRP (1-332) nicht *in vitro* phosphoryliert (vgl. Spuren 2 und 5). Die Phosphorylierungsstelle lässt sich somit auf den C-terminalen Bereich von FMRP eingrenzen.

5.1.5.4 Die RNA-Bindung von FMRP wird durch Phosphorylierung nicht beeinflusst

Es stellte sich nun die Frage, ob die posttranslationale Modifikation von FMRP eine Auswirkung auf dessen Funktion hat. Aufgrund der Position der Phosphorylierung im C-terminalen Abschnitt des Proteins, in dem sich auch die RGG-Box befindet, scheint es möglich, dass sich die Assoziation des Proteins zu mRNA verändert. Aus diesem Grund sollte das Protein im modifizierten Zustand auf seine RNA-Bindungsfähigkeit hin getestet werden. Dafür wurde rekombinant exprimiertes FMRP₂₁₆₋₆₃₂ in einem *in-vitro*-Phosphorylierungsassay durch Casein-Kinase II mit γ -[³²P]-ATP modifiziert, ein paralleler Ansatz ohne γ -[³²P]-ATP diente als Kontrolle. Anschließend wurden beide Ansätze mit poly-U-Sepharose inkubiert und anschließend nicht gebundenes Protein durch Waschen entfernt. Die Ansätze wurden nach einer SDS-PAGE sowohl autoradiographisch, als auch durch Coomassiefärbung untersucht.

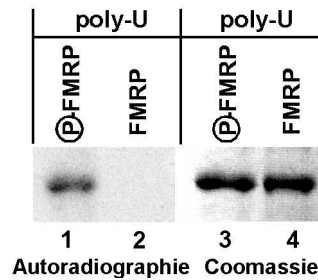


Abbildung 5-16 Die RNA-Bindefähigkeit von FMRP wird durch Phosphorylierung nicht beeinflusst. Die Abbildung zeigt die Autoradiographie (Spuren 1 und 2) eines RNA-Bindungsexperiments und die Coomassiefärbung der gebundenen Proteine (Spuren 3-4). 2 μg rekombinantes FMRP₂₁₆₋₆₃₂ wurden mit radioaktiv markiertem $\gamma\text{-ATP}$ *in vitro* phosphoryliert und, ebenso wie unphosphoryliertes FMRP, mit poly-U-Sepharose inkubiert. Die beiden Ansätze wurden autoradiographisch zum Nachweis der Phosphorylierung, als auch durch Coomassiefärbung auf die gebundenen Proteine hin untersucht.

Ein Vergleich der Coomassiefärbung (Spuren 3 und 4, Abbildung 5-16) macht deutlich, dass in beiden Ansätzen die gleiche Menge FMRP an die poly-U-Sepharose gebunden ist. Die Autoradiographie dient der Kontrolle, dass tatsächlich eine Phosphorylierung stattgefunden hat und phosphoryliertes FMRP an die Sepharose bindet (Spur 1). Offensichtlich wirkt sich eine Phosphorylierung in diesem Experiment weder negativ noch positiv auf die Bindung von FMRP an homopolymere RNA aus.

5.1.5.5 Schritte zur Identifizierung der Kinase

Obwohl die Funktion der Phosphorylierung von FMRP im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden konnte, ist es doch von großem Interesse, die Kinase zu identifizieren, welche diese Modifikation katalysiert.

Ein makromolekularer Komplex phosphoryliert FMRP

Um eine Vorstellung über die Masse der Kinase zu bekommen, wurde als erstes eine Massenaufreinigung von HeLa-Gesamtzellextrakt mittels Gelfiltrationschromatographie durch eine Superose-6-Säule durchgeführt. Anschließend wurden Aliquots aus den eluierten Fraktion entnommen und in einem Phosphorylierungsexperiment mit rekombinanten FMRP₂₁₆₋₆₃₂ und $\gamma\text{-}[^{32}\text{P}]\text{-markiertem ATP}$ inkubiert. Die Autoradiographie nach der elektrophoretischen Auftrennung der Ansätze identifiziert die Fraktionen, die eine Kinaseaktivität bezüglich FMRP enthalten.

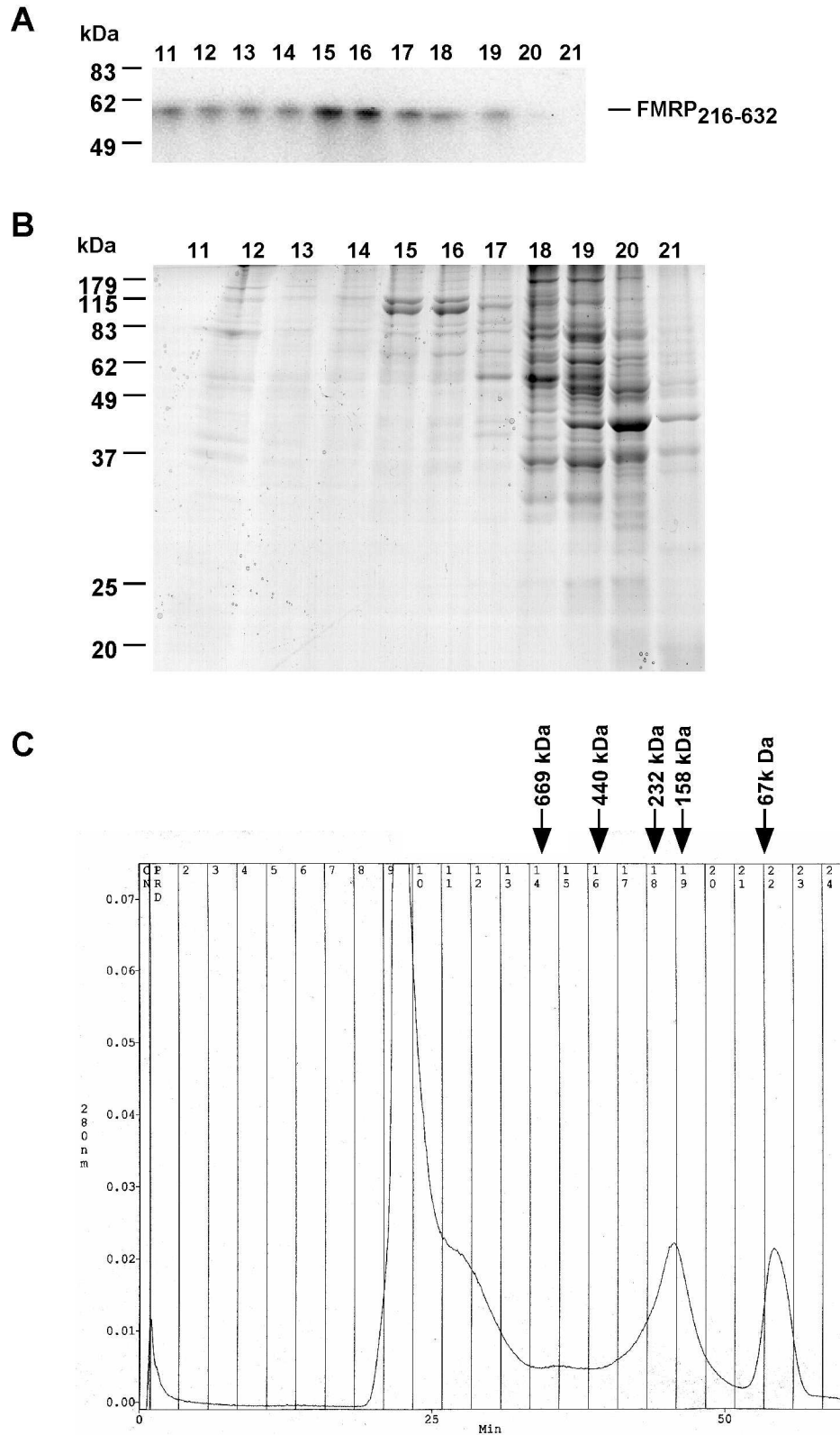


Abbildung 5-17 Ein makromolekularer Komplex phosphoryliert FMRP. **A:** Autoradiographie eines *in-vitro*-Phosphorylierungsexperiments. HeLa-Extrakt (5×10^8 Zellen) wurde mittels Gelfiltrationschromatographie durch eine Superose-6-Matrix größenfraktioniert und Aliquots der Fraktionen 11-21 wurden anschließend auf ihre Phosphorylierungsaktivität an rekombinatem FMRP₂₁₆₋₆₃₂ getestet. Die Ansätze wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Übertragung der radioaktiv markierten Phosphorylgruppe autoradiographisch nachgewiesen. **B:** Coomassiefärbung der Fraktionen 11-21 aus A. Ein Molekulargewichtsmarker gibt die Proteingrößen in Kilodalton an. **C:** Graphische Darstellung des Elutionsprofils der Gelfiltrationschromatographie aus A. Die Kurve zeigt die Absorption bei 280 nm der jeweiligen Fraktion an. Die X-Achse gibt die Laufzeit in Minuten an,

die Y-Achse die Absorptionseinheiten bei 280 nm. Über der Grafik zeigen die Molekulargewichte (in kDa) eines Größenmarkers an, in welchen Fraktionen Proteine mit der jeweiligen Masse eluiert werden.

Zur besseren Übersicht sind in Abbildung 5-17 A und B nur die Fraktionen gezeigt, die dem tatsächlichen Auftrennungsvermögen der verwendeten Superose 6-Säule entsprechen. In den davor eluierten Fraktionen (1-10) befindet sich der „Säulendurchbruch“, der sich aus einer Mischung von Aggregaten und Proteinkomplexen zusammensetzt, die aufgrund ihres hohen Molekulargewichts von der verwendeten Superose 6-Säule nicht aufgetrennt werden können.

Ein Vergleich mit dem Marker in Abbildung 5-17 C macht klar, dass die FMRP-phosphorylierende Kinase vor allem in hochmolekularen Komplexen in der Zelle vorliegt. Die beiden Fraktionen mit der höchsten Kinaseaktivität (Fraktionen 15 und 16) enthalten Komplexe mit einer Größe von mindestens 440 kDa. Zusätzlich kann eine Phosphorylierung noch bis zu Fraktionen detektiert werden, die Proteinkomplexe mit einer Größe von einem Megadalton beinhalten (Fraktion 11).

Fraktion 19 besitzt ebenfalls Phosphorylierungsaktivität bezüglich FMRP. Hier eluieren Proteinkomplexe (bzw. Proteine) mit einem Molekulargewicht von ca. 160 kDa. Dies lässt vermuten, dass der minimale, zur Phosphorylierung notwendige Kinasekomplex mindestens 160 kDa umfasst.

Phosphoryliertes FMRP comigriert in Gelfiltrationsfraktionen mit seiner Kinase

Wie auch FMRP, ist die FMRP-Kinase ebenfalls ein Bestandteil makromolekularer Komplexe. Da sich diese hochmolekularen Komplexe vermutlich aus wechselnden Bindungspartnern zusammensetzen, zeigt FMRP in den durchgeführten Gelfiltrationen, wie schon in Kapitel 5.1.5 beschrieben, ein heterogenes Laufverhalten. Ein ähnliches Bild ergibt sich, wenn man die Aktivität der Kinase in Abbildung 5-17 A verfolgt. Hier befindet sich die Kinase(aktivität) in den Fraktionen 11 bis 19, also sowohl in hochmolekularen, als auch kleineren Komplexen.

Die Hauptaktivität der Kinase liegt in den Fraktionen 15 und 16 (Abbildung 5-17 A). In den vergleichbaren Fraktionen der Abbildung 5-10 B befindet sich dort auch am meisten phosphoryliertes FMRP in Form der höher laufenden Proteinbande (Fraktionen 15, 16, FMRP*). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Kinase auch *in vivo* Bestandteil eines FMRP-Komplexes sein könnte.

Gelfiltrations- und Ionenaustauscherchromatographie als erste Schritte zur Kinase-Identifizierung

Um einen Überblick über die Verteilung der Proteine auf die einzelnen Fraktionen eines Gelfiltrationslaufs zu bekommen, wurde ein Teil der eluierten Fraktionen gefällt und nach einer elektrophoretischen Auftrennung mit Coomassie angefärbt (Abbildung 5-17 B). Abbildung 5-17 C zeigt darüber hinaus die Absorption bei 280 nm der einzelnen Fraktionen als Maß für den jeweiligen Proteingehalt.

Interessanterweise befindet sich die höchste Kinaseaktivität in den Fraktionen 15 und 16, wo vergleichsweise wenig Gesamtprotein zu finden ist (vgl. Abbildung 5-17 A zu Abbildung 5-17 C). Diese Tatsache macht eine eventuelle Aufreinigung der FMRP-phosphorylierenden Kinase einfacher. Basierend auf dieser ersten Vorreinigung des FMRP-/Kinase-Komplexes, welche sich die Größenunterschiede der Hela-Extraktbestandteile zunutze macht, können nun weitere Aufreinigungsschritte angeschlossen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun eine Ionenaustauscherchromatographie durchgeführt.

Um der Identifizierung der Kinase näher zu kommen, wurde die 15. Fraktion der Gelfiltrationschromatographie (Abbildung 5-17 B) unter neutralen pH-Bedingungen sowohl mit Kationenaustauscher- (SP-Sepharose), als auch mit Anionenaustauscher-Matrix (Q-Sepharose) inkubiert. Anschließend wurde von beiden Ansätzen die gewaschene Matrix und der Überstand in einem Phosphorylierungsassay mit FMRP₂₁₆₋₆₃₂ untersucht.

Es zeigt sich, dass unter neutralen pH-Bedingungen die FMRP-phosphorylierende Kinase an die Kationenaustauscher-Matrix bindet (Abbildung 5-18, Spur 1).

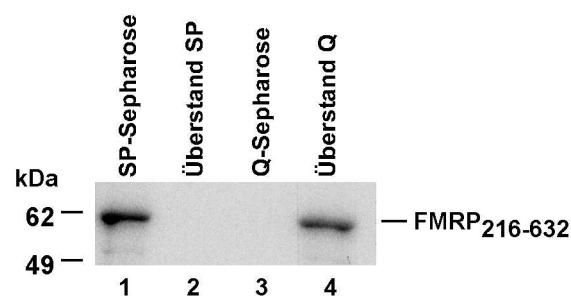


Abbildung 5-18 Die FMRP-phosphorylierende Kinase lässt sich über Ionenaustauscherchromatographie aufreinigen. Autoradiographie eines *in-vitro*-Phosphorylierungsexperiments. Die Gelfiltrationsfraktion mit der höchsten Kinaseaktivität bezüglich FMRP (vgl. Abbildung 5-17 A, Fraktion 15) wurde sowohl mit Kationen- (SP) als auch mit Anionenaustauscher-Matrix (Q) inkubiert. Anschließend wurde in einem Phosphorylierungsexperiment untersucht, ob die Kinase, welche FMRP₂₁₆₋₆₃₂ phosphoryliert, an die Ionenaustauscher (Spuren 1 und 3) gebunden ist oder in den Überständen (Spuren 2 und 4) vorliegt. Die Analyse der Ansätze erfolgte mittels SDS-PAGE und Autoradiographie.

Dagegen erfolgt keine Bindung an den Anionenaustauscher, die Phosphorylierung von FMRP geschieht hier nur durch den nicht gebundenen Proteinanteil der Chromatographie (Spuren 3

und 4). Zieht man nun einen Rückschluss auf die Nettoladung des Proteinkomplexes, in den die Kinase eingebunden ist, bedeutet das, dass dieser unter pH-neutralen Versuchsbedingungen positiv geladen ist und aus diesem Grund vom Kationenaustauscher gebunden wird.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hier etablierte Strategie eine Basis für die Isolierung und Charakterisierung der FMRP-Kinase ist.

5.2 Der PRMT5-Komplex

5.2.1 Die drei Hauptkomponenten des Methyltransferase-Komplexes

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit PRMT5, einem Faktor, der neben dem SMN-Komplex eine Rolle bei der Biogenese von U-snRNP eine Rolle spielt. PRMT5 ist Teil eines Komplexes (PRMT5-Komplex), der mit den Faktoren pICln und WD45 mindestens zwei weitere Proteine enthält. Bei PRMT5 handelt es sich um die erste bekannte (und möglicherweise einzige) Protein-Arginin-Methyltransferase, welche die Bildung symmetrischer Dimethylarginine katalysiert. Zu ihren *in-vivo*-Substraten gehören die spleißosomalen Proteine SmB/B', D1 und D3, die durch die Methylierung eine erhöhte Affinität für SMN erhalten. Die vier restlichen Sm-Proteine D2, E, F und G assoziieren ebenfalls mit dem PRMT5-Komplex, werden jedoch nicht modifiziert. Durch den direkten Kontakt des PRMT5-Komplexes mit dem SMN-Komplex werden alle Sm-Proteine dann auf den letztgenannten übertragen. Zum SMN/PRMT5-Komplex wird dann die aus dem Zellkern exportierte U-snRNA rekrutiert. Als nächstes wird ein vollständiger Satz der sieben Sm-Proteine in einem Schritt auf die U-snRNA transferiert, was in der Ausbildung der Sm-Core-Domäne resultiert.

Während die Funktion von PRMT5 als katalytisch aktiver Faktor in *in-vitro*-Methylierungsassays belegt werden konnte, war die Rolle seiner beiden anderen Komplexpartner noch unklar. Aus Bindungsexperimenten ging jedoch bereits hervor, dass sowohl pICln, als auch WD45 direkt an Sm-Proteine binden, pICln geht dabei eine stabile Wechselwirkung mit deren Sm-Motiv *in vitro* ein (Friesen *et al.*, 2002; Meister *et al.*, 2001b). Zunächst sollten die Interaktionen der PRMT5-Komplexkomponenten untereinander genauer untersucht werden. Aufbauend hierauf sollte durch geeignete enzymatische Assays das Zusammenspiel der Komponenten bei der Katalyse untersucht werden.

5.2.1.1 Die Interaktionen von PRMT5, pICln und WD45

Zu Beginn wurde ein *in-vitro*-Bindungsassay mit den drei Komplexkomponenten durchgeführt. Dazu wurden sie als GST-Fusionsproteine rekombinant in *E. coli* exprimiert und anschließend an Glutathion-Sepharose immobilisiert. Durch die Zugabe von radioaktiv-markiertem PRMT5, pICln und WD45 (hergestellt mittels *in-vitro*-Translation) konnte nun die gegenseitige Assoziation untersucht werden.

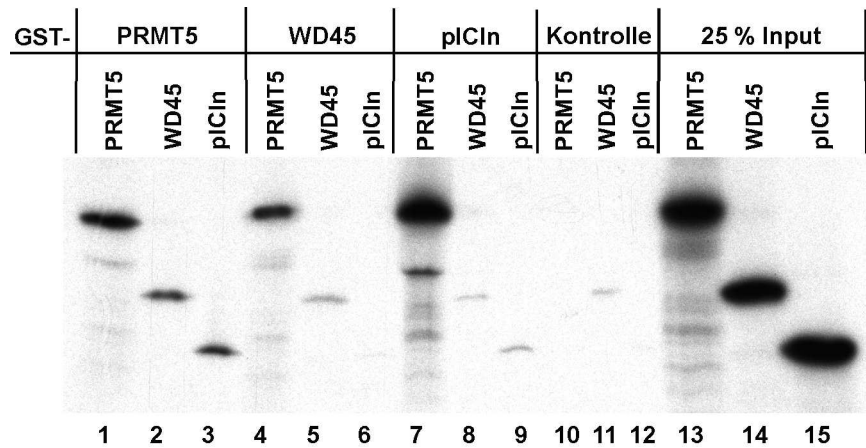


Abbildung 5-19 PRMT5 interagiert mit sich selbst und mit pICln und WD45. Autoradiographie eines *in-vitro*-Bindungsexperiments. GST-PRMT5 (Spuren 1-3), -WD45 (Spuren 4-6), -pICln (Spuren 7-9) und GST alleine (als Kontrolle, Spuren 10-12) wurden immobilisiert und mit je 2 μ l der radioaktiven Translate von PRMT5, WD45 und pICln inkubiert. Nach dem Waschen wurde mit Probenpuffer eluiert, die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und einer Autoradiographie unterzogen. Spuren 13-15 zeigen 25 % der eingesetzten Translate.

Es zeigte sich, dass sowohl pICln als auch WD45 an PRMT5 binden (Abbildung 5-19, Spuren 4 und 7). Dagegen scheint keine Interaktionen zwischen pICln und WD45 zu bestehen (Spuren 6 und 8). In der Autoradiographie wird außerdem deutlich, dass PRMT5 in der Lage ist, zu di- oder oligomerisieren (Abbildung 5-19, Spur 1).

Im Anschluss an die obigen Experimente sollte nun die Frage geklärt werden, ob die schon identifizierten Methyltransferase-Komplexkomponenten PRMT5, pICln und WD45 alleine ausreichen, um die Methylierung der Sm-Proteine zu gewährleisten, oder ob noch nicht charakterisierte Assoziationspartner die Katalyse beeinflussen. Somit sollte zu Anfang die genaue Zusammensetzung des PRMT5-Komplexes analysiert werden. Hierzu wurden polyklonale Antikörper gegen pICln und WD45 generiert, um mit ihnen mittels Co-Immunpräzipitationen eventuell noch unbekannte Komplexbestandteile aus Zellextrakt zu isolieren. 3 μ g der jeweiligen Antikörper wurden an Protein-G-Sepharose immobilisiert und mit Cytoplasmaextrakt aus 2×10^9 HeLa-Zellen inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze gewaschen, die Präzipitate mit Probenpuffer eluiert und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Um die Coomassiebanden den Proteinen eindeutig zuordnen zu können, wurde ein Westernblot angefertigt, mit dessen Hilfe man PRMT5, WD45 und pICln identifizieren kann (Abbildung 5-20 B).

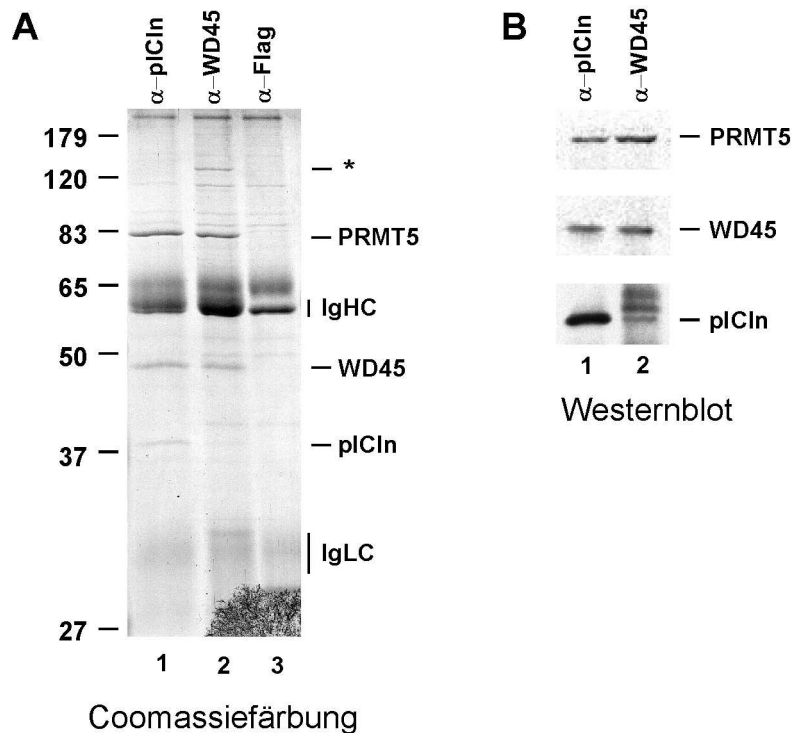


Abbildung 5-20 Der PRMT5-Komplex setzt sich aus drei Hauptkomponenten, PRMT5, pICln und WD45 zusammen, die im Komplex nicht stöchiometrisch repräsentiert sind. Immunpräzipitation aus HeLa-Cytoplasmaextrakt mit anti-pICln- (1), anti-WD45-Antikörpern (2) und einem Kontroll-Antikörper (α -Flag, 3). **A:** Die eluierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassiefärbung sichtbar gemacht. Ein Größenmarker gibt die Proteinmassen in Kilodalton an. IgHC: schwere Ketten der Immunglobuline, IgLC: leichte Ketten der Immunglobuline. * bezeichnet ein noch nicht identifiziertes Protein **B:** Ein Zehntel der in **A** gezeigten Menge wurde nach einer SDS-PAGE einem Westernblot unterzogen, mit spezifischen Antikörpern wurde auf PRMT5, WD45 und pICln detektiert.

Die Coomassiefärbung der Proteinelutionen belegte, dass beide Antikörper ihr jeweiliges Antigen präzipitieren und zusätzlich auch noch die beiden anderen, bereits bekannten Komplexpartner (Abbildung 5-20 A). Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Bindungsexperimenten aus Abbildung 5-19 wird deutlich, dass pICln und WD45 nicht direkt, sondern über PRMT5 als „Brückenglied“ interagieren.

5.2.1.2 Der isolierte PRMT5-Komplex ist notwendig und hinreichend, um Sm-Proteine zu methylieren

Es stellte sich die Frage, ob der durch Immunpräzipitation in dieser Arbeit isolierte PRMT5-Komplex, mit seinen drei Bestandteilen PRMT5, pICln und WD45, Methylierungsaktivität besitzt. Hierzu wurden die in Kapitel 5.2.1 über anti-pICln und anti-WD45 präzipitierten Komplexe mit dem rekombinant exprimierten Heterodimer SmB/D3 als Substrat und [3 H]-markiertem S-Adenosylmethionin für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Als Positivkontrolle diente ein Ansatz mit HeLa-Cytoplasmaextrakt an Stelle der Immunpräzipitate, als Negativkontrolle eine α -Flag-Immunpräzipitation. Die Ansätze wurden nach einer SDS-PAGE

autoradiographisch analysiert. In diesem Experiment und allen folgenden (wenn nicht anders angegeben) wurde der Heterodimer SmB/D3 als Methylierungssubstrat verwendet. Die Analyse erfolgte jeweils anhand des autoradiographischen Nachweises von [³H]-markiertem SmD3.

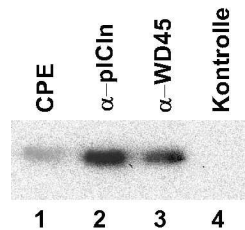


Abbildung 5-21 Der über Immunpräzipitation isolierte PRMT5-Komplex methyliert Sm-Proteine. Autoradiographie eines *in-vitro*-Methylierungsexperiments. Je 10 % der in Abbildung 5-20 gezeigten Immunpräzipitationen wurde mit dem Heterodimer SmB/D3 und [³H]-markiertem S-Adenosylmethionin inkubiert (Spuren 2-4). Eine Methylierung von SmD3 wurde, anschließend an eine SDS-PAGE, durch Autoradiographie analysiert. Als Positive-Kontrolle diente HeLa-Cytoplasmaextrakt (CPE). Als Negativ-Kontrolle diente eine α-Flag-Immunpräzipitation (Spur 4).

Beide isolierten Komplexe sind in der Lage SmD3 zu methylieren (Abbildung 5-21, Spuren 2 und 3). Ein stärker radioaktives Signal als bei der Methylierung durch Cytoplasmaextrakt deutet dabei auf eine Anreicherung der Methyltransferase in diesen Ansätzen hin (Abbildung 5-21, Spuren 2, 3 und 1), die Immunpräzipitation mit einem Kontroll-Antikörper weist erwartungsgemäß keine Methyltransferase-Aktivität auf (Spur 4). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein Komplex, bestehend aus PRMT5, pICln und WD45, alleine ausreicht, die Methylierung der Sm-Proteine zu gewährleisten.

5.2.2 pICln und WD45 sind Aktivatoren der Methyltransferase PRMT5

Zu Anfang dieser Arbeit war die Funktion von PRMT5, die symmetrische Dimethylierung der Sm-Proteine im Cytoplasma von Zellen, bereits bekannt, unklar hingegen war das Zusammenspiel mit den beiden Bindungspartnern pICln und WD45 bzw. deren Rolle im Komplex. Aufgrund der bisherigen Ergebnisse konnte man entweder einen direkten Einfluss auf die Methylierungsaktivität von PRMT5 vermuten, oder eine Funktion von pICln und WD45 als reine „Recruitmentfaktoren“, die eine Interaktion mit dem Substrat vermitteln. Diese Annahmen sollten in Methylierungsassays an Sm-Proteinen überprüft werden.

Zu Anfang wurde ein Ansatz gewählt, bei dem die Methylierungsaktivität von PRMT5 im Cytoplasma-Kontext untersucht wurde. Hierfür wurde Cytoplasmaextrakt mit steigenden Mengen der in *E. coli* rekombinant exprimierten Proteine pICln und WD45, SmB/D3 und

[³H]-markiertem S-Adenosylmethionin inkubiert. Die methylierten Sm-Proteine wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

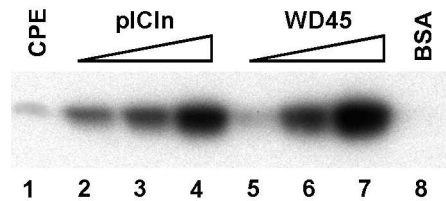


Abbildung 5-22 pICln und WD45 steigern die Methylierung von Sm-Proteinen in HeLa-Cytoplasmaextrakt. Autoradiographie eines *in-vitro*-Methylierungsassays. HeLa-Cytoplasmaextrakt (10^5 Zellen) wurde mit steigenden Mengen (100, 200 und 300 ng) pICln (Spuren 2-4) und WD45 (Spuren 5-7), dem Heterodimer SmB/D3 (500 ng) und [³H]-markiertem S-Adenosylmethionin für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Eine Methylierung von SmD3 wurde anschließend an eine SDS-PAGE durch Autoradiographie nachgewiesen. Als Positivkontrolle wurde die gleiche Menge HeLa-Cytoplasmaextrakt ohne pICln und WD45 zum Ansatz gegeben (Spur 1). Um einen unspezifischen Effekt von pICln und WD45 auszuschließen, enthielt ein Ansatz stattdessen 300 ng BSA (Spur 8).

Während der Cytoplasmaextrakt (Spur 1) eine geringe Methylierungsaktivität aufweist, kommt es in Gegenwart von pICln bzw. WD45 zu einer Methylierungsverstärkung um das Fünf- bis Zehnfache (Abbildung 5-22, Spur 3, 4 und 6, 7). Dagegen bewirkt die gleiche Menge BSA im Ansatz der Kontrolle eine unspezifische Hemmung der Enzymaktivität von PRMT5.

Erstaunlicherweise lässt sich durch die Zugabe von gleichen Mengen pICln oder WD45 eine vergleichbare Methylierungsverstärkung von SmB/D3 durch PRMT5 beobachten (vgl. Abbildung 5-22 Spur 3 und 6). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass beide Proteine PRMT5 unter diesen *in-vitro*-Bedingungen auf vergleichbare Art und Weise stimulieren.

5.2.2.1 pICln stimuliert die Methyltransferase-Aktivität von isoliertem PRMT5-Komplex

Bei dem oben beschriebenen Versuchsaufbau wurde der Einfluss von pICln und WD45 auf die Methylierungsaktivität von PRMT5 ausschließlich im cytoplasmatischen Kontext betrachtet. Um die Wirkung der Komplexkomponenten aufeinander gezielter zu untersuchen, wurden die über anti-pICln oder anti-WD45 immunpräzipitierten PRMT5-Komplexe (vgl. Kapitel 5.2.1) mit steigenden Mengen rekombinanten pICln, rekombinanten SmB/D3 und [³H]-markiertem S-Adenosylmethionin versetzt und in einem *in-vitro*-Methylierungsexperiment auf ihre Aktivität hin getestet. Die Ergebnisanalyse erfolgte autoradiographisch.

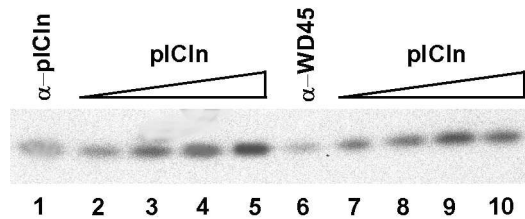


Abbildung 5-23 pICln steigert die Methylierungsaktivität des isolierten PRMT5-Komplexes. Autoradiographie eines *in-vitro*-Methylierungsassays. Je 20 % der in Abbildung 5-20 gezeigten Immunpräzipitationen (anti-pICln: Spuren 1-5, anti-WD45: Spuren 6-10) wurde mit dem Heterodimer SmB/D3 und [³H]-markiertem S-Adenosylmethionin inkubiert. Zusätzlich wurden steigende Mengen pICln (80, 100, 120 und 140 ng) zur Immunpräzipitation von anti-pICln (Spuren 2-5) und anti-WD45 (Spuren 7-10) zugesetzt. Eine Methylierung von SmD3 wurde anschließend an eine SDS-PAGE durch Autoradiographie nachgewiesen. Spuren 1 und 6 entsprechen den Immunpräzipitationen ohne zugesetztes pICln.

Wie schon im Cytoplasmaextrakt kann auch am isolierten PRMT5-Komplex die methylierungssteigernde Wirkung von pICln verfolgt werden. Bei Erhöhung der pICln-Konzentration im Ansatz wird SmD3 kontinuierlich stärker methyliert (Abbildung 5-23, Spuren 2-5), besonders deutlich ist dieser Effekt bei der höchsten eingesetzten pICln-Menge (Spur 5), wo die Signalstärke annähernd dem zehnfachen der Ausgangsmenge ohne Zusatz von rekombinantem Protein entspricht. pICln stimuliert somit die Methyltransferase-Aktivität von isoliertem PRMT5. Diese Aussage lässt sich sowohl für den über anti-pICln-, als auch den über anti-WD45-Antikörper isolierten Komplex treffen. Die beiden Komplexe unterscheiden sich vor allem darin, dass mit dem anti-pICln-Antikörper mehr pICln präzipitiert wurde als mit dem anti-WD45-Antikörper (Abbildung 5-20 A, vgl. Spuren 1 und 2). Der höhere Gesamtgehalt an pICln in diesen Ansätzen könnte eine insgesamt stärkere SmB/D3-Methylierung als durch den über WD45 präzipitierten Komplex erklären (Abbildung 5-23, vgl. Spuren 5 und 10).

5.2.2.2 Die Methyltransferase-Aktivität von rekombinantem PRMT5 lässt sich durch pICln und WD45 stimulieren

Bei den voraus gegangenen Methylierungsassays lag PRMT5 bereits an seine beiden Interaktionspartner im Komplex gebunden vor. Um nun einen direkten Einfluss von pICln und WD45 auf PRMT5 *in vitro* zu untersuchen, wurde aktives PRMT5 rekombinant in *E. coli* exprimiert und in den folgenden Methylierungsexperimenten eingesetzt. PRMT5 konnte nur als Co-Expression mit pICln rekombinant und aktiv hergestellt werden, daher ist nicht auszuschließen, dass die Aufreinigungen von PRMT5 sehr geringe Mengen pICln enthalten.

Es galt als erstes festzustellen, ob die Methylierungsaktivität von rekombinantem PRMT5 tatsächlich symmetrische Dimethylarginine in den Sm-Proteinen generiert. Unter Umständen könnte PRMT5 unter *in-vitro*-Bedingungen asymmetrische Dimethylierung generieren, diese

unspezifische Enzymreaktion sollte in einem Vorexperiment ausgeschlossen werden. Um dies zu klären, wurde die Beobachtung ausgenutzt, dass nur die symmetrische, nicht aber die asymmetrische Dimethylierung von Sm-Proteinen die Interaktion mit SMN erlaubt (Brahms *et al.*, 2001a; Friesen *et al.*, 2001a). Rekombinante Sm-Proteine sollten daher nur dann mit SMN interagieren können, wenn diese zuvor von PRMT5 symmetrisch dimethyliert wurden. Um die Art der Methylierung zu analysieren, wurden SmB/D3 in einem *in-vitro*-Assay durch PRMT5 methyliert und auf ihre Bindung an rekombinantes, immobilisiertes GST-SMN getestet. Als Positivkontrolle wurden durch Cytoplasmaextrakt symmetrisch dimethylierte Sm-Proteine verwendet. Anschließend wurde das immobilisierte GST-SMN auf gebundenes SmB/D3 hin überprüft, indem sowohl die Sepharose, als auch der Überstand jeder Reaktion autoradiographisch analysiert wurde.

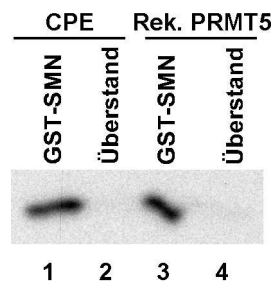


Abbildung 5-24 Rekombinant exprimiertes PRMT5 ist in der Lage, Sm-Proteine symmetrisch zu dimethylieren. Autoradiographie eines Bindungsassays. HeLa-Cytoplasmaextrakt (10^5 Zellen, Spuren 1 und 2) und rekombinant exprimiertes PRMT5 (Spuren 3 und 4) wurden mit SmB/D3 und [3 H]-markiertem S-Adenosylmethionin inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze für eine Stunde bei 4°C zu 2 µg rekombinantes, immobilisiertes GST-SMN in PBS gegeben. Nach anschließendem Waschen wurden die Sepharose (Spuren 1 und 3) und die Überstände (Spuren 2 und 4) elektrophoretisch aufgetrennt und eine Methylierung von SmD3 durch Autoradiographie untersucht.

Abbildung 5-24 verdeutlicht, dass in *E. coli* exprimiertes PRMT5 tatsächlich in der Lage ist, eine symmetrische Dimethylierung an Sm-Proteinen durchzuführen. SmD3 wird von SMN zu ca. 95 % gebunden, daher ist es wahrscheinlich, dass das Sm-Protein sowohl in Cytoplasmaextrakt (Spur 1), als auch von rekombinantem PRMT5 (Spur 3) nur symmetrisch, nicht asymmetrisch angeordnete Methylgruppen erhält. Die hier von PRMT5 katalysierte Reaktion entspricht der *in-vivo*-Funktion des Proteins.

In einem *in-vitro*-Methylierungsassay wurde nun der direkte Einfluss von pICln und WD45 auf die von rekombinantem PRMT5 katalysierte Methylierungsreaktion geprüft. Hierfür wurde PRMT5 mit steigenden Mengen rekombinantem pICln, WD45 oder beiden Proteinen gleichzeitig inkubiert. Analog der vorausgegangenen Experimente wurde nun die Aktivität von PRMT5 in den einzelnen Ansätzen miteinander verglichen.

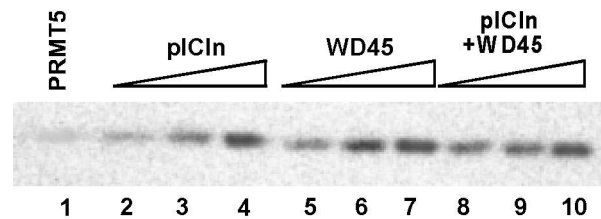


Abbildung 5-25 Die Methyltransferase-Aktivität von PRMT5 lässt sich durch pICln und WD45 stimulieren. Autoradiographie eines *in-vitro*-Methylierungsassays. 10 µg rekombinant exprimiertes PRMT5 wurde mit dem Heterodimer SmB/D3 und [³H]-markiertem S-Adenosylmethionin inkubiert. Zusätzlich wurden steigende Mengen (50, 100 und 150 ng) pICln (Spuren 2-4), WD45 (Spuren 5-7) und pICln + WD45 (Spuren 8-10) zugesetzt. Nach einer elektrophoretischen Auftrennung der Ansätze wurde eine Methylierung von SmD3 durch Autoradiographie analysiert. Spur 1 enthält nur rekombinantes PRMT5 ohne zugesetztes pICln oder WD45.

In diesem Experiment lässt sich zum ersten Mal eine direkte Stimulation der Methylierungsaktivität von PRMT5 durch pICln und WD45 nachweisen.

Obwohl vergleichsweise viel (10 µg) rekombinantes PRMT5 im Assay verwendet wurde, ist dieses gering aktiv (Spur 1). Setzt man hingegen steigende Mengen pICln hinzu, lässt sich hier, wie auch in vorhergehenden Experimenten, eine Aktivitätssteigerung von PRMT5 beobachten (Abbildung 5-25, Spuren 2-4). Einen vergleichbaren Einfluss übt auch WD45 auf PRMT5 in diesem *in-vitro*-Assay aus, was sich in einer verstärkten Methylierung von SmD3 äußert (Spuren 5-7). Ansätze, die sowohl pICln als auch WD45 enthalten, unterscheiden sich in der Stärke des Methylierungssignals nicht von den Spuren, in denen nur eines der beiden Proteine zugesetzt war (Spuren 8-10). Man hätte zumindest eine Veränderung der Methylierung erwarten können, wenn nicht sogar eine Addition der stimulierenden Wirkung von beiden Proteinen zusammen.

5.2.2.3 pICln ist ein wichtiger Cofaktor für die Aktivität von PRMT5

Als nächstes wurde der Frage nachgegangen, auf welche Weise pICln die Methyltransferase PRMT5 stimuliert. Aus früheren Beobachtungen wusste man, dass pICln sowohl die Sm-Domäne der Sm-Proteine, als auch PRMT5 bindet. Damit könnte pICln die Funktion einer Plattform übernehmen, auf der die Sm-Proteine der Methyltransferase zur Modifikation präsentiert werden. Das schließt nicht aus, dass die Bindung von pICln die Methyltransferase PRMT5 auch direkt in seiner Aktivität beeinflussen könnte.

Um die letzten beiden Punkte genauer zu analysieren, wurde in zeitabhängigen Methylierungsassays die Kinetik der PRMT5-Stimulation durch pICln untersucht. Hierfür wurden jeweils zehn *in-vitro*-Methylierungsansätze mit Cytoplasmaextrakt (wie in Kapitel

5.2.2.1) mit oder ohne Zugabe von rekombinantem pICln durchgeführt. Die Methylierungsreaktionen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch Zugabe von Protein-Probenpuffer abgestoppt, die Ansätze per Autoradiographie analysiert und mit der „Image-Master“-Software von APB ausgewertet.

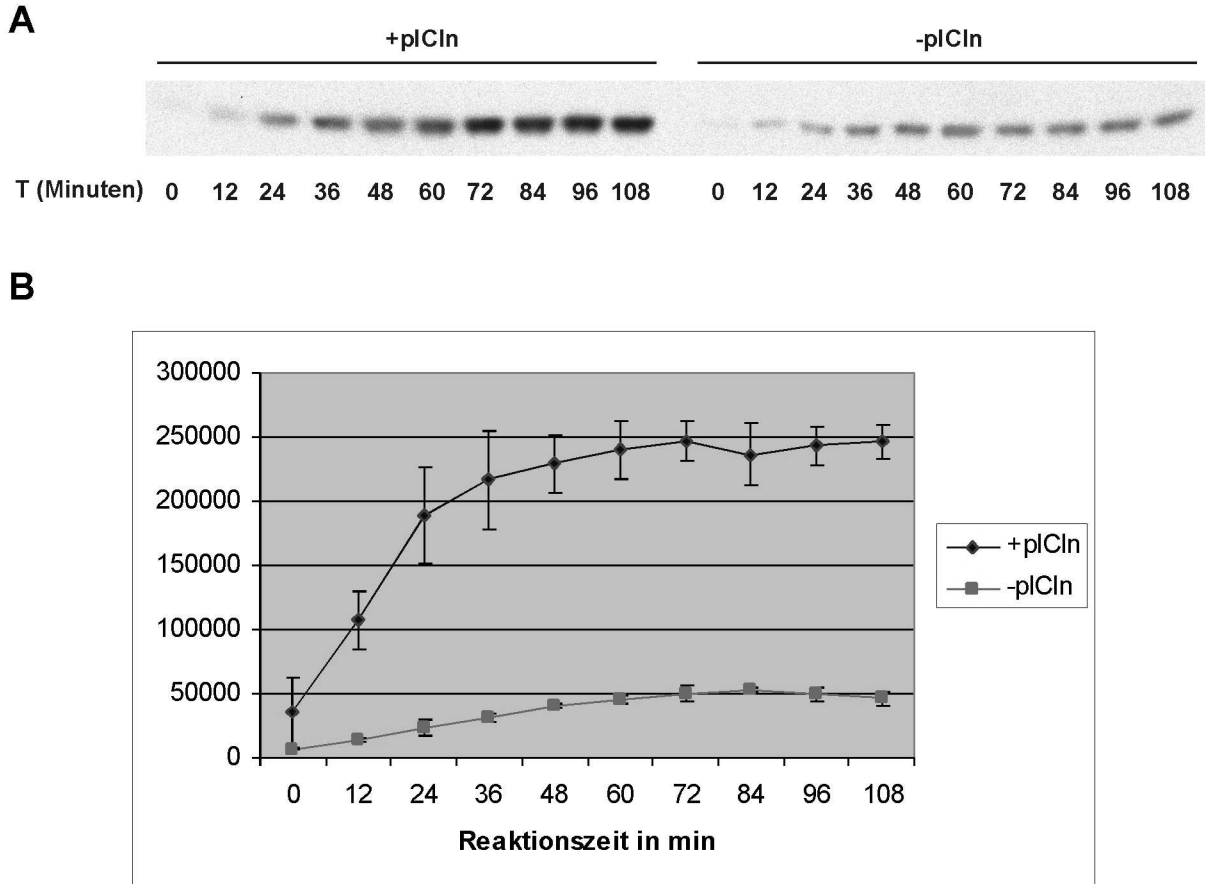


Abbildung 5-26 pICln stimuliert die Methylierungseffizienz von PRMT5. Autoradiographie eines *in-vitro*-Methylierungsassays. Jeweils zehn Versuchsansätze mit (100 ng) oder ohne pICln wurden mit HeLa-Cytoplasmaextrakt (10^5 Zellen), rekombinantem SmB/D3 (500 ng) und [3 H]-markiertem S-Adenosylmethionin inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (zwischen 0 und 108 Minuten) wurde die Reaktion dann durch Zugabe von Protein-Probenpuffer beendet. Nach einer elektrophoretischen Auftrennung der Ansätze erfolgte die autoradiographische Analyse der Methylierungsstärke von SmD3. **B:** Mit Hilfe des APB Image Master wurden die autoradiographischen Signale aus vier unabhängigen Versuchen wie in **A** vermessen und mit dem Programm „Image-Master 1D Elite“ ausgewertet. Die Werte der X-Achse bezeichnen die Reaktionszeit in Minuten, die der Y-Achse die relative Signalstärke des radioaktiven Methylierungssignals. Die Balken geben die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Werte aus den vier Versuchen an.

Beim Vergleich der Verlaufskurven der Methylierungsreaktionen mit und ohne Zugabe von pICln (Abbildung 5-26 B), wird deutlich, dass in beiden Fällen nach etwa 60 Minuten die Signalstärken nicht mehr zunehmen, d.h. die maximal mögliche Methylierung von SmD3 im Ansatz erreicht ist. Obwohl das Substrat noch in hohem Überschuss vorhanden ist, findet ab diesem Zeitpunkt offenbar keine weitere Katalyse mehr statt. Dabei ist die maximale Methylierung in den Ansätzen mit pICln etwa fünfmal so hoch wie in den Ansätzen ohne pICln. Insgesamt lässt sich sagen, dass in den Ansätzen die pICln enthalten entweder mehr

Methylgruppen auf ein einzelnes SmD3-Molekül übertragen oder mehr SmD3-Moleküle methyliert werden.

Im Anschluss an diese Ergebnisse wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, der den unmittelbaren Einfluss von pICln auf die Methylierungsreaktion verdeutlichen sollte. Es wurden wie oben beschrieben zeitabhängige Methylierungsassays angesetzt und die Menge der übertragenen Methylgruppen anhand ihres radioaktiven Signals miteinander verglichen. Der Unterschied bestand jedoch darin, dass die Ansätze nicht von Anfang an pICln enthielten, sondern dieses erst nach einer zweistündigen Inkubationszeit zugegeben wurde. Zu dieser Zeit ist, von vorhergehenden Beobachtungen ausgehend, die Methylierung von SmD3 bereits stagniert (vgl. Abbildung 5-26, ab ca. der 60. Minute). Anschließend wurde die Methylierungsreaktion zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch Zugabe von Protein-Probenpuffer abgestoppt und die Ansätze autoradiographisch analysiert.

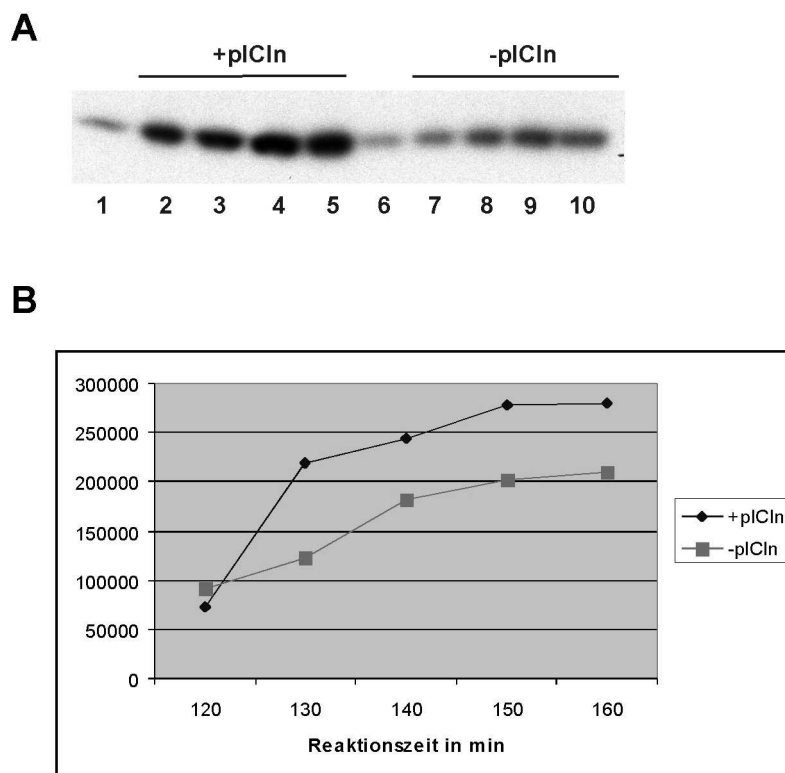


Abbildung 5-27 PICln ist ein Cofaktor der Methyltransferase PRMT5. Autoradiographie eines *in-vitro*-Methylierungsassays. Nach einer zweistündigen Inkubation von HeLa-Cytoplasmaextrakt (10^5 Zellen), dem Heterodimer SmB/D3 und [3 H]-markiertem S-Adenosylmethionin wurde der Methylierungsansatz aufgeteilt und eine Hälfte mit 100 ng rekombinantem pICln versetzt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden nun Aliquots entnommen und die Reaktion durch Zugabe von Protein-Probenpuffer beendet (bei Reaktionsstart und nach 130, 140, 150 und 160 Minuten). Nach einer elektrophoretischen Auftrennung der Ansätze erfolgte die autoradiographische Analyse der Methylierung von SmD3. Unter der Abbildung ist die jeweilige Inkubationszeit der Ansätze in Minuten angegeben. **B:** Mit Hilfe des APB Image Master wurden die autoradiographischen Signale aus **A** vermessen und mit dem Programm „Image-Master 1D“ ausgewertet. Die Werte der X-Achse bezeichnen die Reaktionszeit in Minuten, die der Y-Achse die relative Signalstärke des radioaktiven Methylierungssignals.

Im Gegensatz zu dem in Abbildung 5-26 dargestellten Versuch sollte die Methylierungsaktivität von PRMT5 unter den jetzt gewählten Bedingungen vor Zugabe von pICln schon stagniert sein. Erstaunlicherweise führt die pICln-Zugabe innerhalb von zehn Minuten zu einem steilen Anstieg der Methylierungsaktivität (Abbildung 5-27, +pICln), der nach etwa 150 Minuten seinen Höhepunkt erreicht und dann stagniert. Beim Vergleich mit den Kontrollansätzen ohne pICln wird deutlich, dass nach Zugabe von pICln auch hier nach zwei Stunden keine weitere Methylierung mehr statt findet, also PRMT5 trotz Substratüberschuss keine neuen Reaktionen katalysiert. pICln „reaktiviert“ also die Methylierungsaktivität von PRMT5, nachdem die Reaktion stagniert ist.

In den vorausgegangenen Experimenten wurde SmD3 als Methylierungssubstrat immer so eingesetzt, dass es nicht limitierend für die Enzymreaktion ist. In einem weiteren Versuch wurde nun rekombinantes SmD3 in steigenden Konzentrationen der Reaktion beigelegt, um zu untersuchen, welches die maximale Proteinmenge ist, die von PRMT5 methyliert werden kann. Dafür wurden zu dem Methylierungsansatz (mit bzw. ohne pICln) rekombinantes SmB/D3 in steigenden Mengen zugegeben. Anschließend wurden die Ansätze mittels SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch analysiert.

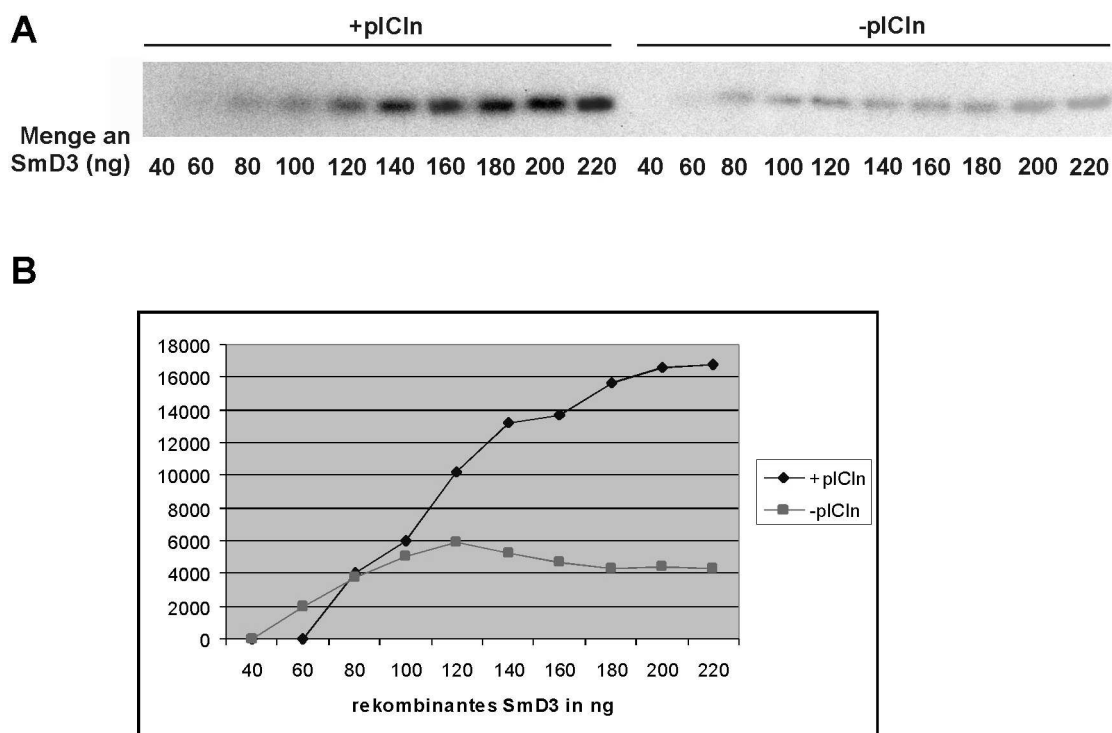


Abbildung 5-28 PRMT5 kann mit Hilfe von pICln etwa doppelt soviel Substrat umsetzen wie ohne pICln. Autoradiographie eines *in-vitro*-Methylierungsassays. Jeweils zehn Versuchsansätze mit bzw. ohne pICln wurden mit HeLa-Cytoplasmaextrakt und [³H]-markiertem S-Adenosylmethionin inkubiert und das Methylierungssubstrat SmB/D3 in ansteigenden Konzentrationen (40 bis 220 ng, unter den jeweiligen Ansätzen

angegeben) zugegeben. Die Reaktion verlief über eine Stunde bei 37°C. Anschließend an eine elektrophoretische Auftrennung der Ansätze erfolgte die autoradiographische Analyse der SmD3-Methylierung. **B:** Mit Hilfe des Image Master von APB wurden die autoradiographischen Signale aus **A** vermessen und mit dem Programm „Image Master 1D“ ausgewertet. Anschließend wurden sie in Form von zwei Kurven (Ansätze mit/ohne pICln) gegeneinander aufgetragen. Die Werte der X-Achse bezeichnen die zugefügte Menge an rekomb. SmB/D3 in ng, die der Y-Achse die relative Signalstärke des radioaktiven Methylierungssignals.

Abbildung 5-28 macht deutlich, welchen Effekt pICln auf die Methylierungsfähigkeit von PRMT5 ausübt. Die Stagnation der Kurve (Abbildung 5-28 B ohne pICln) bei 120 ng SmD3 besagt, dass trotz Zugabe weiteren Substrates PRMT5 nicht in der Lage ist, dieses auch zu methylieren. Bei Zugabe von pICln hingegen steigt das Methylierungssignal bis zu einer SmD3-Konzentration von 200 ng an, d.h. es ist PRMT5 viel länger möglich, seine Enzymfunktion effizient durchzuführen. Mit der Hilfe von pICln kann PRMT5 etwa doppelt soviel Substrat umsetzen, bevor die Reaktion auch hier stagniert. pICln ist also für eine effiziente Methylierungsaktivität von PRMT5 notwendig.

Die Tatsache, dass pICln phosphoryliert wird (Sanchez-Olea *et al.*, 1998) ließ die Vermutung aufkommen, dass diese Art der posttranslationalen Modifikation einen Einfluss auf die Methylierungsreaktion ausüben könnte. Um dies zu überprüfen wurde Cytoplasmaextrakt entweder mit 1 mM ATP oder γ S-ATP und pICln, SmB/D3 und [3 H]-markiertem S-Adenosylmethionin für eine Stunde inkubiert. Die Ansätze wurden mit Hilfe von SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

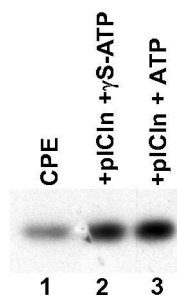


Abbildung 5-29 Die Methylierung von Sm-Proteinen lässt sich nicht durch ATP stimulieren. Autoradiographie eines *in-vitro*-Methylierungsassays. Cytoplasmaextrakt wurde entweder mit 1 mM ATP (Spur 3) oder 1 mM γ S-ATP (Spur 2) und pICln zu einem Methylierungsansatz zusammengefügt. Anschließend an eine elektrophoretische Auftrennung der Ansätze erfolgte die autoradiographische Analyse der Methylierung von SmD3. Spur 1 zeigt die SmD3-Methylierung durch Cytoplasmaextrakt ohne die Zugabe von ATP, γ S-ATP und pICln.

Es zeigt sich, dass die Zugabe von ATP keinen Effekt auf die Methylierungsreaktion ausübt (Abbildung 5-29 Spur 3). Im Vergleich mit einem Ansatz, der das nicht hydrolysierbare Analog γ S-ATP enthält (Spur 2), ist ebenfalls kein verändertes Methylierungssignal zu

erkennen. Die Phosphorylierung von pICln scheint unter diesen Versuchsbedingungen offenbar keinen Einfluss auf die Funktion des Proteins auszuüben.

5.2.3 Die Heterodimerisierung von SmB und SmD3 ist keine Voraussetzung für deren Methylierung

Das Sm-Core-Assembly ist in den letzten Jahren primär mit gereinigten Komponenten (d.h. U-snRNA und U-snRNP Proteinen) untersucht worden. Diese *in-vitro*-Studien zeigten, dass sich die Sm-Proteine in Abwesenheit von RNA zu den heteromeren Komplexen SmB/D3, SmD1/D2 und SmE/F/G zusammenlagern (Raker *et al.*, 1996; Raker *et al.*, 1999). Die Beobachtung, dass die Sm-Proteine *in vitro* heteromere Komplexe formen, führte zu der Theorie, dass sie unmittelbar nach ihrer Translation auch *in vivo* Heteromere bilden. Bisher ist jedoch völlig unklar, ob und wann diese beim assistieren SMN-abhängigen Assembly gebildet werden. Aus diesem Grund sollte in entsprechend konzipierten *in-vitro*-Assays überprüft werden, ob die Sm-Proteine für die Methylierung oder die anschließende Übertragung auf den SMN-Komplex als Heterodimer vorliegen müssen.

Da die Sm-Proteine B/D3 bisher nur als Heterodimer stabil exprimierbar waren, wurden die *in-vitro*-Methylierungsexperimente auch stets mit beiden Sm-Proteinen zusammen durchgeführt. Hierfür wurde HeLa-Cytoplasmaextrakt zusammen mit steigenden Mengen rekombinant exprimiertem pICln, dem Heterodimer SmB/D3 und radioaktiv markiertem S-Adenosylmethionin inkubiert. Die Ansätze wurden elektrophoretisch aufgetrennt und die Methylierung beider Sm-Proteine mittels Autoradiographie analysiert.

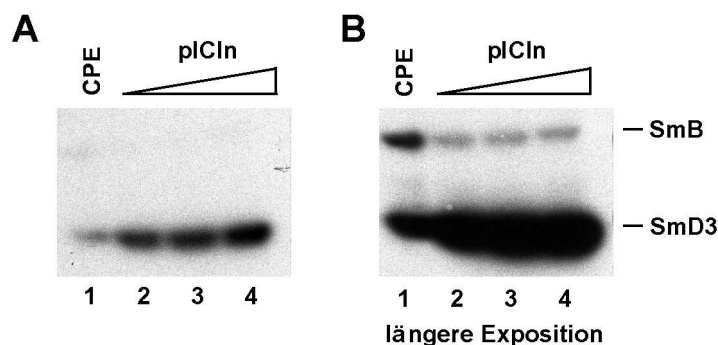


Abbildung 5-30 In vitro wird SmD3 in der Methylierung gegenüber SmB bevorzugt. **A:** Autoradiographie eines *in-vitro*-Methylierungsassays. HeLa-Cytoplasmaextrakt (10^5 Zellen) wurde mit steigenden Mengen (100, 200 und 300 ng) rekombinantem pICln (Spuren 2-4), SmB/D3 als Methylierungssubstrat und radioaktiv markiertem S-Adenosylmethionin inkubiert. Nach einer SDS-PAGE erfolgte die Autoradiographie der Ansätze. Spur 1 zeigt die Methylierungsaktivität des Extrakts ohne Zusatz von pICln. **B:** längere Exposition von A.

Wie auch in vorausgegangenen Untersuchungen schon beobachtet wurde, führt die pICln-Zugabe zu einer Methylierungssteigerung an SmD3 (Abbildung 5-30 A, Spuren 2-4), wohingegen SmB nur sehr ineffizient methyliert wird. In der längeren Exposition (B) wird deutlich, dass bei steigender pICln-Zugabe SmD3 als Methylgruppenakzeptor gegenüber SmB bevorzugt wird. Während im Cytoplasmaextrakt 1,5- bis 2-mal mehr SmD3 als SmB methyliert wird (Abbildung 5-30 B, Spur 1), steigt die Methylierung von SmD3 proportional zur zugegebenen Menge von pICln an (A, Spuren 2-4). Im Gegensatz dazu kann die Methylierung von SmB im Dimer durch pICln-Zugabe nicht gesteigert werden, sondern sie ist dagegen geringer (B, Spuren 2-4). Die Tatsache, dass *in vivo* SmB und SmD3 in ähnlichem Maße methyliert werden (Brahms *et al.*, 2000; Brahms *et al.*, 2001a), könnte dafür sprechen, dass die Proteine nicht als Heterodimer das Substrat des PRMT5-Komplexes sind, sondern einzeln von pICln gebunden und der Methyltransferase präsentiert werden.

5.2.4 SmB und SmD3 werden als Monomere von PRMT5 methyliert

Die unterschiedliche Effizienz bei der Methylierung des Heterodimers aus SmB und D3 implizierte, dass die Sm-Proteine zum Zeitpunkt ihrer Methylierung noch einzeln, und nicht als Heterodimer, vorliegen könnten. Trotz ihrer vergleichsweise geringen Größe waren die Sm-Proteine einzeln bisher in *E. coli* nicht stabil exprimierbar. Im Laufe dieser Arbeit gelang es jedoch, die Sm-Proteine einzeln bzw. durch Co-Expression mit pICln in löslicher Form zu erhalten, um sie so spezifisch in Methylierungsexperimenten untersuchen zu können.

Hierfür wurden SmB und SmD3 einzeln bzw. zusammen mit pICln rekombinant in *E. coli* exprimiert. Anschließend wurde ihre Methylierung in HeLa-Cytoplasmaextrakt wie oben untersucht. Sowohl SmB, als auch SmD3 werden methyliert, wenn sie einzeln und nicht als Heterodimer mit dem jeweiligen Bindungspartner vorliegen (Abbildung 5-31, Spuren 1 und 3). Fügt man den Ansätzen rekombinantes pICln hinzu, kommt es zu einer Steigerung in der Methylierungsaktivität (Spuren 2 und 4). Da die rekombinante Expression von SmD3 schwächer war als die von SmB, wurden hier nun weniger SmD3 im Assay eingesetzt. Dies führte dazu, dass das Methylierungssignal auch entsprechend schwach und in Spur 3 nur bei längerer Exposition erkennbar ist. Bei einer Co-Expression von SmB oder SmD3 zusammen mit pICln ist das Methylierungssignal beider Sm-Proteine vergleichbar stark (Abbildung 5-31, vgl. Spuren 5 und 6).

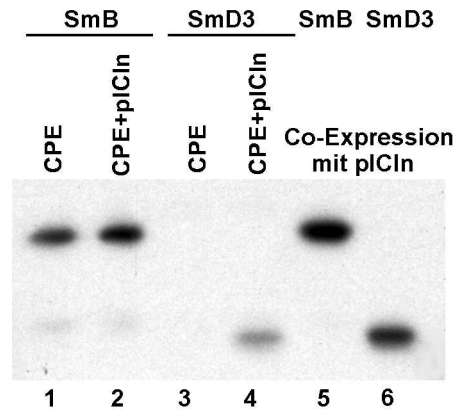


Abbildung 5-31 Die Sm-Proteine müssen nicht als Heterodimer vorliegen, um effizient methyliert zu werden. Autoradiographie eines *in-vitro*-Methylierungsexperiments. 200 ng SmB (Spuren 1 und 2) und 100 ng SmD3 (Spuren 3 und 4) wurden in *E. coli* einzeln (Spuren 1 bis 4) oder als Co-Expression mit pICln zusammen (Spuren 5 und 6) rekombinant exprimiert. Anschließend wurden sie in einem Methylierungsexperiment mit HeLa-Cytoplasmaextrakt und radioaktiv markiertem S-Adenosylmethionin für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Analyse der Ansätze erfolgte durch SDS-PAGE und Autoradiographie. Zu den Ansätzen 2 und 4 wurde zur Methylierungssteigerung pICln (100 ng) zugegeben.

Obige Experimente implizierten, dass SmB, welches nicht als Heterodimer vorliegt, in gleichem Maße wie SmD3 methyliert werden kann.

Um genauere Aussagen über die Bindung der Sm-Proteine an pICln zu erhalten, wurde ein *in-vitro*-Bindungsassay mit verschiedenen, an Glutathion-Sepharose immobilisierten pICln-Deletionsfragmenten durchgeführt. Die durch *in-vitro*-Translation radioaktiv markierten Sm-Proteine wurden nun einzeln auf ihre Bindung getestet. Die Ansätze wurden mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Abbildung 5-32 fasst die Ergebnisse zusammen.

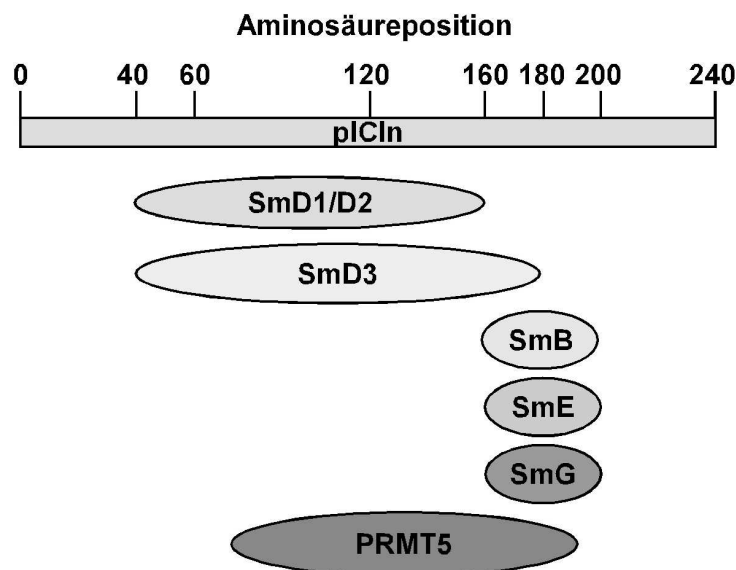


Abbildung 5-32 Die Sm-Proteine haben zum Teil überlappende Bindungsstellen an pICln. Schematische Darstellung eines *in-vitro*-Bindungsassays (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Klingenhäger,

Dissertation). Der Balken zeigt schematisch die Primärstruktur von pICln, die Zahlen geben einige wichtige Aminosäurepositionen wieder. Die darunter schematisch dargestellten Sm-Proteine und PRMT5 grenzen durch ihre Ausdehnung ihre jeweilige Bindungsstelle an pICln ein. SmF wurde in diesem Experiment nicht von pICln gebunden.

In der schematischen Darstellung der Bindungsexperimente wird deutlich, dass sich die Bindungsstellen von SmD1 und D2 an pICln vollständig überlappen (Abbildung 5-32, pICln Aminosäuren 40-160), die von SmB und D3 teilweise (pICln Aminosäuren 160-180). SmD3 assoziiert über einen weiten Bereich hinweg mit pICln (Aminosäuren 40-180), jeweils kürzere pICln-Deletionen resultieren in einem kompletten Verlust dieser Interaktion. SmB, E und G besitzen ebenfalls eine übereinstimmende Bindestelle an pICln (Aminosäuren 160-200). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass nicht zwei Proteine zur gleichen Zeit an denselben Bereich von pICln binden können. Vielmehr stützt dies die oben geäußerte Annahme einer sequenziellen Bindung einzelner Sm-Proteine an pICln.

Es stellte sich die Frage, ob pICln bei der Bindung von Sm-Proteinen und der Präsentation an PRMT5 eine Präferenz gegenüber bestimmten Sm-Proteinen hat. Dies sollte anhand von SmB und SmD3 überprüft werden. Dafür wurden entweder SmB oder SmD3 zusammen mit pICln in *E. coli* co-exprimiert und über den His-tag des Sm-Proteins aufgereinigt, um sicher zu stellen, dass pICln mit dem jeweiligen Sm-Protein gesättigt vorliegt. Zum co-exprimierten SmB-pICln wurden anschließend rekombinantes SmD3 und für das Methylierungsassay PRMT5 und S-Adenosylmethionin zugegeben. Entsprechend wurde zum co-exprimierten SmD3-pICln rekombinantes SmB gegeben und auch hier eine Methylierungsreaktion angesetzt.

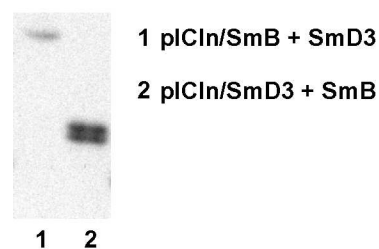


Abbildung 5-33 Die Sm-Proteine werden als Monomere von PRMT5 methyliert. Autoradiographie eines *in-vitro*-Methylierungsexperiments. SmB oder SmD3 wurden mit pICln co-exprimiert und zusammen aufgereinigt. Anschließend erfolgte ein Methylierungsassay, wobei SmD3 (Spur 1) oder SmB (Spur 2), PRMT5 und radioaktiv markiertes S-Adenosylmethionin zugegeben wurden. Die Ansätze wurden elektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographisch analysiert.

Mit den in Abbildung 5-33 abgebildeten Resultaten wird deutlich, dass nur jeweils eines der beiden Sm-Proteine durch PRMT5 methyliert wird, und zwar dasjenige, welches als Erstes an

pICln gebunden vorliegt. Inkubiert man pICln zusammen mit SmB und gibt dann erst SmD3 hinzu, wird nur SmB von PRMT5 methyliert (Spur 1). Umgekehrt wird nur SmD3 methyliert, wenn dieses mit pICln vorinkubiert wird (Spur 2). Nimmt man die letzten Ergebnisse zusammen, lässt sich demnach vermuten, dass die Sm-Proteine einzeln an pICln binden, so von PRMT5 methyliert werden und anschließend auf den SMN-Komplex übergehen. Erst dann ist pICln wieder bereit für eine neue Sm-Protein-Bindung und PRMT5 für weitere Methylierungen.

5.2.5 SMN übernimmt die methylierten Sm-Proteine und ermöglicht so einen erneuten Methylierungszyklus

Aufgrund der bisherigen Beobachtungen wurde die Hypothese aufgestellt, dass pICln durch die Bindung der Sm-Proteine diese der Methyltransferase präsentiert, die dann die symmetrische Dimethylierung katalysiert. Erst dann können die Sm-Proteine an den SMN-Komplex übergeben werden. Daher kann PRMT5 ohne pICln nur einen geringen Teil der vorhandenen Sm-Proteine methylieren, die Effizienz steigt stöchiometrisch mit der Menge an pICln im Ansatz. Hier stellte sich die Frage, warum die Methylierungsaktivität von PRMT5 nach einiger Zeit stagniert. Die Vermutung lag nahe, dass PRMT5 die von pICln präsentierten Sm-Proteine methyliert, diese aber anschließend von PRMT5 wieder entfernt werden müssen. Damit wäre das Enzym wieder frei, um eine neue Reaktion zu katalysieren. Sm-Proteine besitzen im methylierten Zustand eine höhere Affinität für SMN als für pICln (Friesen *et al.*, 2001b). Demnach könnte SMN die Aufgabe zufallen, die Sm-Proteine direkt nach der Methylierung durch PRMT5 zu übernehmen um einen erneuten Reaktionszyklus zu ermöglichen.

Um diese Theorie zu überprüfen wurden wiederum zeitabhängige Methylierungsassays durchgeführt und die einzelnen Ansätze, analog der vorausgegangenen Experimente, alle 20 Minuten abgestoppt und analysiert. Hierfür wurde Cytoplasmaextrakt mit SmB/D3 und [³H]-markiertem S-Adenosylmethionin für 80 Minuten inkubiert. Aufgrund der Befunde aus vorausgegangenen Experimenten ist die Methylierungsreaktion zu diesem Zeitpunkt bereits stagniert. Nun erhielten alle verbleibenden Ansätze rekombinantes pICln und nach weiteren 140 Minuten erfolgte die Zugabe von rekombinantem GST-SMN₁₋₁₆₀ (1-160, ein SMN-Fragment, welches die Tudor-Domäne trägt und mit Sm-Proteinen interagiert) zu einer Hälfte der Ansätze. Die restlichen Ansätze dienten der Kontrolle und erhielten stattdessen nur Puffer. Die Methylierung von SmD3 wurde wie oben autoradiographisch analysiert.

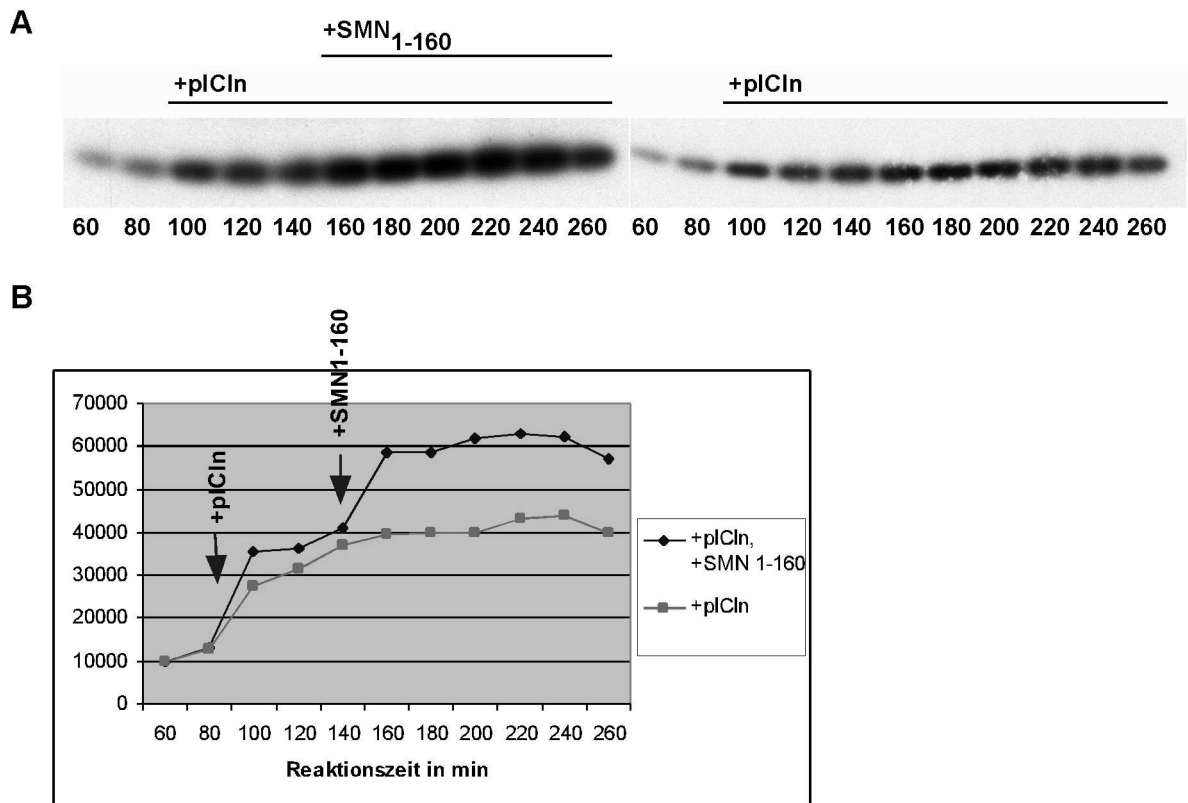


Abbildung 5-34 Die Zugabe von SMN zur Methylierungsreaktion reaktiviert PRMT5. Autoradiographie eines *in-vitro*-Methylierungsassays. Jeweils elf Methylierungsansätze mit HeLa-Cytoplasmaextrakt (10^5 Zellen), rekombinatem SmB/D3 und [3 H]-markiertem S-Adenosylmethionin wurden für eine Stunde inkubiert. Nach 60 und 80 Minuten wurde jeweils eine Reaktion abgestoppt. Anschließend erhielten alle verbleibenden Ansätze 100 ng rekombinantes pICln. Nach 100, 120 und 140 Minuten wurde erneut jeweils eine Reaktion abgestoppt. Zu den verbleibenden Ansätzen wurde nun 1 μ g GST-SMN₁₋₁₆₀ gegeben und die Reaktionen wiederum alle 20 Minuten durch Zugabe von Protein-Probenpuffer beendet. Anschließend erfolgten eine elektrophoretische Auftrennung und die radiographische Analyse der SmD3-Methylierung. **B:** Mit Hilfe des Image Master von APB wurden die autoradiographischen Signale aus **A** vermessen und mit dem Programm „Image Master 1D“ ausgewertet. Die Werte der X-Achse bezeichnet die Reaktionszeit in Minuten, die der Y-Achse die relative Stärke des radioaktiven Methylierungssignals.

Wie schon in früheren Versuchen ist eine Steigerung der Methylierungsaktivität von PRMT5 nach Zugabe von pICln zu beobachten (Abbildung 5-34 A, vgl. 100 Minuten mit 60/80 Minuten). Diese stagniert jedoch nach 100 bis 120 Minuten, die Kurve zeigt dort daher einen flachen Verlauf (Abbildung 5-34 B). Bei der Zugabe von SMN nach 140 Minuten jedoch steigt die Methylierungsaktivität und damit die Kurve wieder (Abbildung 5-34 B), ein Hinweis darauf, dass PRMT5 wieder Substrat umsetzen und Sm-Proteine methylieren kann. Dieses Ergebnis ist konsistent mit der Theorie, dass SMN die methylierten Sm-Proteine vom PRMT5-Komplex übernehmen muss, damit PRMT5 wieder frei für neue Katalyseschritte ist.

5.2.6 Die methylierten Sm-Proteine werden als Monomere auf den SMN-Komplex übertragen

In den bisherigen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass eine Heterooligomerbildung der Sm-Proteine vor der Methylierung durch PRMT5 unwahrscheinlich ist, da sonst eine gleichmäßige Modifikation der Komplexpartner verhindert wird. Dennoch ist es denkbar, dass im nächsten Schritt des Core-Assemblies, der Übertragung der Sm-Proteine auf den SMN-Komplex, eine Assoziation zu Heterooligomeren erfolgt. Im Folgenden sollte dieser nächste Schritt in der U-snRNP-Biogenese genauer untersucht werden. Hierzu wurden die Sm-Proteine B und D3 (mit His-tag) sowohl einzeln, als auch als Heterodimer durch Methylierung über PRMT5 radioaktiv markiert. Anschließend wurden die methylierten Sm-Proteine in HeLa-Cytoplasmaextrakt gegeben und eine Immunpräzipitation mit immobilisierten anti-SMN-Antikörpern durchgeführt. Die Präzipitate wurden eluiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und in einer Coomassiefärbung und autoradiographisch analysiert.

Es stellte sich heraus, dass sowohl SmB (Spur 2), als auch SmD3 (Spur 5) vollständig über den SMN-Komplex aus Cytoplasmaextrakt gebunden werden können. Dagegen bindet nur ca. zehn Prozent des methylierten SmB/D3-Heterodimers an den SMN-Komplex (Abbildung 5-35 A, Spur 8), kaum mehr als in der Kontroll-Immunpräzipitation (Spur 9). Abbildung 5-35 C zeigt die Coomassiefärbung der SMN-Immunpräzipitation aus A. Sie belegt, dass mindestens sieben der im cytoplasmatischen SMN-Komplex enthaltenen Komponenten eluiert wurden. Diese Daten sind ein deutlicher Hinweis darauf, dass die methylierten Sm-Proteine einzeln und nicht als Heterodimer auf den SMN-Komplex übertragen werden.

Aus vorausgegangenen Experimenten war bekannt, dass pICln an den SMN-Komplex bindet (nicht gezeigt). Um sicher zu gehen, dass die unterschiedliche Bindung der methylierten Sm-Proteine an den SMN-Komplex in Abbildung 5-35 nicht darauf zurückzuführen ist, dass die Proteine über unterschiedliche Mengen pICln an den Komplex assoziieren, wurden die pICln-Mengen in den einzelnen Spuren mit Hilfe eines Westernblots miteinander verglichen (Abbildung 5-35 B). Dabei zeigte sich, dass in allen drei präzipitierten SMN-Komplexen gleich viel pICln vorhanden ist (B, Spuren 2,4 und 6). Somit lassen sich die unterschiedlichen Mengen SmB und D3 am SMN-Komplex nicht durch verschiedene Mengen pICln in der Präzipitation erklären.

Zusammengefasst lassen diese Daten vermuten, dass die methylierten Sm-Proteine einzeln auf den SMN-Komplex übertragen werden. Sm-Heterooligomere bilden sich daher sehr wahrscheinlich erst am SMN-Komplex.

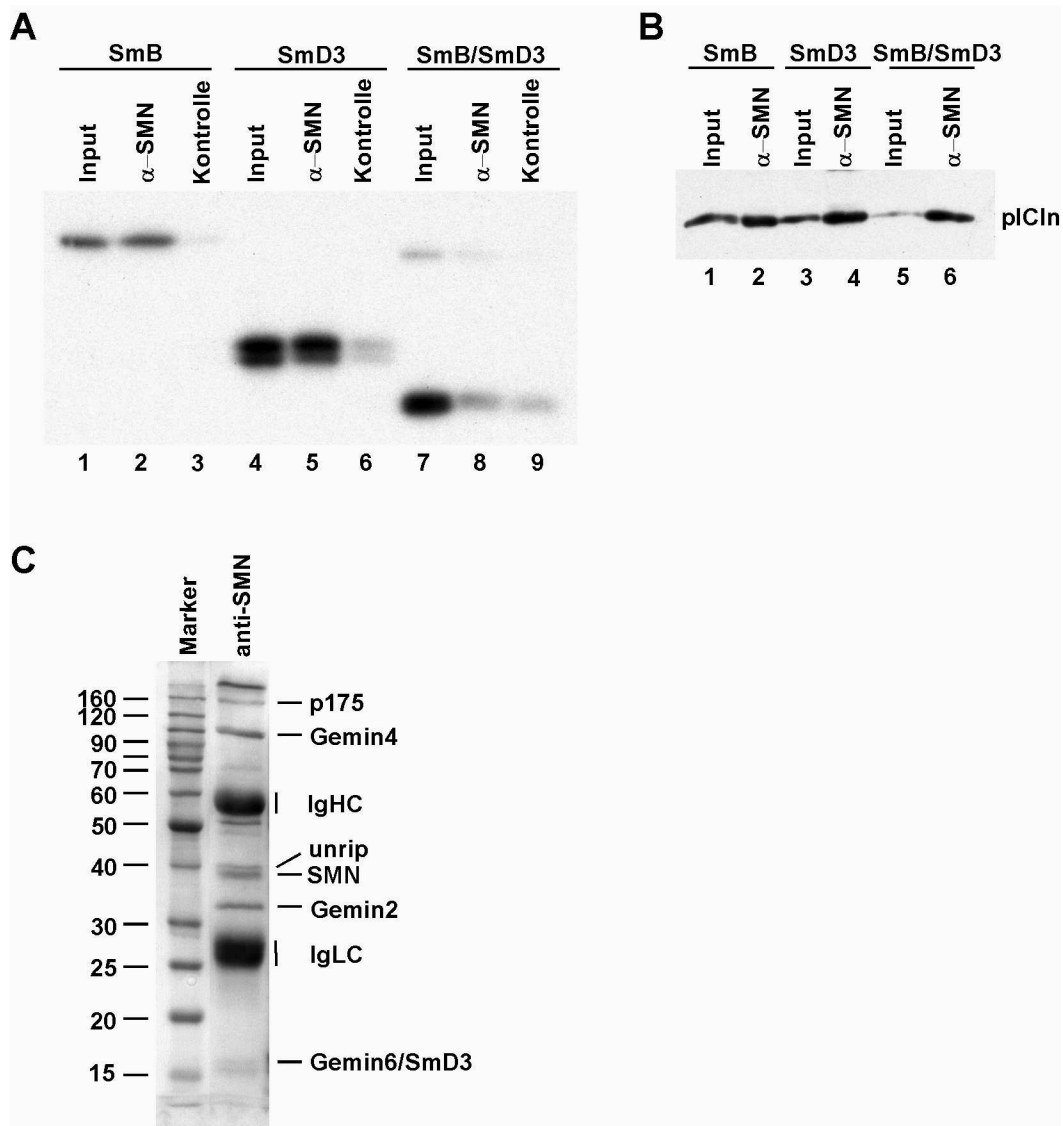


Abbildung 5-35 Die Übertragung der Sm-Proteine auf den SMN-Komplex erfolgt effizienter, wenn diese einzeln und nicht als Heterodimer vorliegen. **A:** Die rekombinanten Proteine SmB (Spuren 1-3), SmD3 (Spuren 4-6) oder der Heterodimer SmB/D3 wurden durch rekombinantes PRMT5 und [3 H]-SAM methyliert. Anschließend wurden sie mit HeLa-Cytoplasmaextrakt inkubiert und eine Immunpräzipitation mit SMN-Antikörpern (Klon 7B10) durchgeführt. Als Kontrollantikörper wurde anti-FMRP 36.1 verwendet (Spuren 3, 6 und 9). Mit Hilfe einer SDS-PAGE wurden die eluierten Proteine aufgetrennt und anschließend autoradiographisch analysiert. Spuren 1, 4 und 7 entsprechen der Menge Sm-Protein, die auch in der jeweiligen Immunpräzipitation eingesetzt wurde. **B:** Durch Westernblot wurde die in den Immunpräzipitaten enthaltene Menge an pICln nachgewiesen. **C:** Coomassiefärbung von 20 % der anti-SMN-Immunpräzipitation. IgHC = schwere Kette der Immunglobuline, IgLC = leichte Kette der Immunglobuline. Ein Molekulargewichtsmarker gibt die Proteingrößen in Kilodalton an.

6 Diskussion

6.1 **Eigenschaften und Funktion von FMRP**

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die biochemische Funktion von FMRP charakterisiert, dessen Fehlen das Fragile X-Syndrom verursacht. Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei FMRP um ein Ribosomen-assoziiertes, RNA-bindendes Protein handelt, wurde vermutet, dass FMRP ein Regulator der Translation sein könne. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde ein *in-vitro*-Testsystem etabliert, welches ermöglichte, den Einfluss von rekombinant in *E. coli* exprimiertem FMRP auf die Translation unterschiedlicher mRNAs zu untersuchen.

6.1.1 **Die Funktion von FMRP als Inhibitor der Translation**

Die Beobachtung, dass FMRP sowohl mit RNA, als auch mit aktiv translatierenden Ribosomen assoziiert ist (Tamanini *et al.*, 1996; Siomi *et al.*, 1996; Corbin *et al.*, 1997), ließ annehmen, dass das Protein eine Funktion bei der Regulation der Translation von mRNAs übernimmt. Erste Schritte zur Analyse dieser Hypothese ermöglichte die rekombinante Expression von FMRP und der Punktmutante FMRP_{I304N} in *E. coli*. Mit Hilfe dieser Proteine konnte in der vorliegenden Arbeit ein Translations-Assay-System etabliert werden, in welchem der Einfluss von FMRP auf die Translation *in vitro* untersucht werden konnte. Auf diese Weise wurde festgestellt, dass FMRP die Translation unterschiedlicher mRNAs in Reticulocytenslysat inhibiert und bei einem zehnfachen molaren Überschuss von rekombinantem Protein über mRNA eine vollständige Stilllegung der Translation eintritt. Interessanterweise war die Punktmutante FMRP_{I304N} nicht in der Lage, die Translation der getesteten mRNAs in vergleichbarer Stärke zu inhibieren. Erst bei der höchsten eingesetzten Proteinkonzentration konnte ein leichter inhibierender Effekt ausgemacht werden, wobei FMRP bei dieser Proteinkonzentration bereits eine vollständige Translationsinhibition verursacht. Der Vergleich zwischen wildtypischem und mutiertem Protein zeigt, dass es sich bei der Translationsinhibition durch FMRP um eine spezifische Funktion handelt. Da beide rekombinanten Proteine auf die gleiche Art und Weise hergestellt und gereinigt wurden, kann ein negativer Effekt auf die Translation, aufgrund einer eventuellen Verunreinigung, ausgeschlossen werden. Die im Assay eingesetzte niedrige Konzentration an rekombinantem Protein (ein zehnfach molarer Überschuss gegenüber der mRNA) spricht ebenfalls für einen spezifischen Einfluss von FMRP. In Untersuchungen, welche diese Experimente fortführen,

konnten Lagerbauer *et al.* zeigen, dass andere KH-Domänen-Proteine (hnRNP K, E1 und E2) die Translationsreaktion bei vergleichbaren Proteinkonzentrationen nicht beeinträchtigen (Lagerbauer *et al.*, 2001). Somit ist die inhibitorische Wirkung von FMRP nicht auf eine unspezifische RNA-Bindung zurückzuführen.

Unterschiedliche Studien haben sich mit der Kontrolle der Genexpression auf dem Level der Translation beschäftigt. In den meisten Fällen wird bereits die Initiation der Translation reguliert, der Geschwindigkeits-bestimmende Schritt der Reaktion. So werden einige Initiationsfaktoren phosphoryliert (eIF4E und eIF2 α), andere proteolytisch verdaut (eIF4G), um die Initiation zu beeinflussen. Weitere Möglichkeiten zur Kontrolle der Translation bieten Sequenzelemente der mRNA, die von spezifischen Proteinen erkannt und gebunden werden (zusammengefasst in Preiss and Hentze, 1999). Diese Sequenzen befinden sich überwiegend in den untranslatierten Regionen der mRNA und haben sehr unterschiedliche Funktionen. Beispielsweise kann die Bindung von bestimmten Proteinen zu einer mechanischen Verdrängung von Initiationsfaktoren, und somit zur Inhibition der Translation führen (Muckenthaler *et al.*, 1998). Umgekehrt können auch Proteine rekrutiert werden, welche die Translation Orts- oder Zeitpunkt-spezifisch stimulieren, ein Mechanismus, der häufig in verschiedenen Stadien der Organismenentwicklung auftritt (Macdonald and Smibert, 1996; Kim-Ha *et al.*, 1995; Stutz *et al.*, 1998).

Um einen möglichen Effekt von FMRP auf die Translationsinitiation nachzuweisen, analysierten Lagerbauer *et al.* das ribosomale „Assembly“ in Cycloheximid-behandeltem Reticulocytenlysat. Unter diesen Bedingungen findet das Ribosomenassembly auf der mRNA statt, eine Elongation wird jedoch verhindert. In Gegenwart von rekombinantem FMRP war die Menge an mRNA, welche mit Ribosomen beladen wurde, zu 50 % geringer als in Kontrollreaktionen. Interessanterweise hatte die Zugabe der Punktmutante FMRP_{I304N} keinen vergleichbaren Effekt auf die Initiation der Translation, das Assembly von 80S-Ribosomen auf der mRNA war nicht beeinträchtigt. Der Mechanismus der Inhibition wird also zum Teil dadurch hervorgerufen, dass FMRP die Bildung von Translations-Initiationskomplexen verhindert (Lagerbauer *et al.*, 2001). Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass FMRP auch spätere Phasen der Translation, wie Elongation oder Ribosomendissoziation, beeinflusst.

Aufgrund der Ergebnisse ist es vorstellbar, dass durch FMRP ein vermindertes Ribosomenassembly stattfindet und damit bestimmte mRNAs einer niedrigeren Translationsrate unterliegen als in Zellen ohne FMRP. Diese Vermutung konnte von Brown *et al.* zum Teil bestätigt werden. Nachdem eine Reihe von *in-vivo*-mRNA-„Targets“ durch

Immunpräzipitationen isoliert und identifiziert worden waren, wurde deren Polysomenassoziation untersucht. Dabei stellten Brown *et al.* fest, dass es in FMRP-defizienten Zellen sowohl zu einer erhöhten, als auch zu einer erniedrigten Polysomen-Beladung von FMRP-spezifischen mRNA kommt (Brown *et al.*, 2001). Während also FMRP *in vitro* einen eindeutig negativen Effekt auf die Initiation der Translation ausübt, erscheint der Einfluss des Proteins *in vivo* weitaus komplexer. Noch ist nicht eindeutig geklärt, inwieweit sich die unterschiedliche Proteinzusammensetzung der FMRP-enthaltenden mRNPs auf die Translation assoziierter mRNAs auswirkt, es scheint jedoch wahrscheinlich, dass nicht FMRP alleine, sondern eine Reihe von Proteinen an den Mechanismen beteiligt sind.

Da FMRP *in vitro* in der Lage ist, die Translation unterschiedlicher mRNAs ohne Sequenzspezifität zu inhibieren (Laggerbauer *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001; Schaeffer *et al.*, 2001), konzentrierten sich die neueren Untersuchungen auf die Inhibition von *in-vivo*-Targets. Erste Hinweise hierauf ergaben Experimente mit dFXR, dem FMRP-Homolog in *D. melanogaster*. Zhang *et al.* isolierten durch Immunpräzipitation von FMRP-mRNPs die *futsch*-mRNA, welche für das MAP1B-Homolog in *Drosophila* kodiert. Mittels Einzel- und Doppelmutanten konnte gezeigt werden, dass sich der Level von Futsch im Nervensystem der Fliegen umgekehrt proportional zur Expression von dFXR verhält (Zhang *et al.*, 2001). Futsch reguliert sowohl Dendritenentwicklung als auch Synapsenwachstum (Hummel *et al.*, 2000; Roos *et al.*, 2000) eine Überexpression durch fehlendes FMRP könnte eine mögliche Erklärung für die krankhaft veränderten Dendritenfortsätze in Fragilen X-Patienten darstellen. Als weiteres *in-vivo*-Target, welches von FMRP negativ reguliert wird, identifizierten Mazroui *et al.* die *FMRI*-mRNA. Im Hintergrund einer *FMRI*-Knockout Zelllinie konnten Co-Transfektionsassays zeigen, dass FMRP die Translation seiner mRNA inhibiert (Mazroui *et al.*, 2002). Obwohl die genaue Funktion hier noch unklar ist, lässt sich vermuten, dass es sich um einen negativen Rückkopplungsmechanismus handelt. Auf diese Art könnte verhindert werden, dass zu große Mengen FMRP gebildet werden, welche dann unspezifisch die Translation von mRNAs inhibieren.

Kürzlich wurde mit BC1 ein drittes mRNA-Target veröffentlicht, welches, im Gegensatz zu den beiden oben erwähnten, nicht für ein Protein kodiert (Zalfa *et al.*, 2003). BC1 lokalisiert primär in Dendriten und scheint dort die Translation zu reprimieren, indem es den 48S Prä-Initiationskomplex blockiert (Wang *et al.*, 2002). BC1 bindet direkt an FMRP und es wird vermutet, dass die RNA Basenpaarungen mit spezifischen mRNAs eingeht, um so als Brückenglied zwischen FMRP und Target-mRNAs zu dienen. Interessanterweise konnte eine

BC1 Antisense-RNA die Interaktion zwischen FMRP und MAP1B-mRNA unterbinden, eine Beobachtung die dafür spricht, dass die BC1-mRNA hier als Brückenglied zwischen FMRP und der MAP1B-mRNA fungiert. Die Autoren präsentieren ein Modell, wonach die Spezifität von FMRP für die Translationsinhibition bestimmter mRNAs durch Basenpaarung zwischen BC1 und der jeweiligen Target-mRNA vermittelt wird (Zalfa *et al.*, 2003). Fraglich bleibt hingegen, was der Vorteil eines solchen Brückenglieds gegenüber einer direkten Bindung darstellen soll.

FMRP wird posttranslational modifiziert

FMRP muss in seiner Funktion als Translationsinhibitor streng reguliert werden, um sicher zu gehen, dass der Prozess zeitlich und räumlich kontrolliert abläuft. Dies kann über die variierende Proteinzusammensetzung der mRNP-Komplexe erfolgen, vorstellbar wäre aber auch ein direkter Einfluss auf das Protein in Form von posttranslationalen Modifikationen. Durch die Auftrennung von FMRP in einer zweidimensionalen Gelelektrophorese konnten Hinweise darauf gewonnen werden, dass FMRP in HeLa-Zellen mehrfache Modifikationen erhält und diese sich zum Teil in den einzelnen Zell-Kompartimenten unterscheiden. Genauere Analysen durch *in-vitro*-Experimente ergaben eine putative Methylierungs- und Phosphorylierungsstelle im C-Terminus von FMRP. Mit Hilfe von *in-vivo*-Phosphorylierungsassays konnte die Phosphorylierung an mindestens einem Serinrest von FMRP bestätigt werden.

Die Existenz einer RGG-Box in FMRP lässt vermuten, dass diese Arginin-Glycin-reiche Region, wie auch bei verwandten Proteinen, das Ziel von Methylierungen durch Protein-Arginin-Methyltransferasen des Typ-I ist (zusammengefasst in (Gary and Clarke, 1998)). Die Enzyme des Typ-I katalysieren dabei die Übertragung von ausschließlich asymmetrischen Dimethylargininen auf die Arginin-Glycin-reiche Region des Proteins. Obwohl primär RNA-bindende Proteine modifiziert werden, gibt es Hinweise darauf, dass dadurch nicht die RNA-Bindung, sondern vielmehr Protein-Protein-Wechselwirkungen des Substrats verändert werden (Valentini *et al.*, 1999; Schlessinger and Lemmon, 2003; Rutkowski and Kaufman, 2003).

Der Vergleich von bisher identifizierten Proteinsubstraten die mittels Methylierung modifiziert werden, legt nahe, dass eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine mit Funktionen in Protein-/RNA-Transport, Transkription und Signaltransduktion dieser Regulation unterworfen sind. Interessant für FMRP sind besonders drei beschriebene Protein-Eigenschaften, die durch Methylierung variiert werden können: 1) Kernexport und -transport (Npl3 und Hrp1 (Shen *et*

al., 1998). 2) Protein-Protein-Wechselwirkungen (Sm-Proteine SmD1, SmD3 und SmB mit SMN; Brahms *et al.*, 2001a; Friesen *et al.*, 2001a). 3) RNA-Bindungsaffinität (hnRNP-A1; Rajpurohit *et al.*, 1994).

FMRP ist ein zwischen dem Zellkern und dem Cytoplasma pendelndes Protein mit extensiven Protein- und RNA-Wechselwirkungen. Aus diesem Grund ist es vorstellbar, dass eine Methylierung eine oder mehrere der drei Eigenschaften beeinflussen könnte. Während dieser Arbeit veröffentlichten Denman *et al.* Ergebnisse zur Methylierung von FMRP, in denen die RNA-Assoziation *in vitro* näher betrachtet wurde (Denman *et al.*, 2002). Dabei wurde festgestellt, dass bei Hemmung der Methylierung in Reticulocytenslysat die Affinität des Proteins für fünf von sechs putativen mRNA-Targets abnimmt. Bei diesen Analysen konnte nicht ausgeschlossen werden, dass nicht auch Protein-Protein-Wechselwirkungen durch die Behandlung des Lysats beeinflusst wurden. Dennoch lässt sich mutmaßen, dass die RNA-Bindung von FMRP direkt oder indirekt durch Methylierung reguliert wird.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine weitere posttranslationale Modifikation in Form einer Serin-Phosphorylierung im C-Terminus von FMRP nachgewiesen werden. Phosphorylierungen wurden bei einer Reihe von FMRP-verwandten Proteinen beobachtet und dienen dort der Regulation von RNA-Bindung, Protein-Protein-Interaktionen, und dem Transport zwischen Zellkern und Cytoplasma (Municio *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1995; Jans, 1995). Während die beiden letztgenannten Aspekte noch nicht untersucht wurden, konnte in RNA-Bindungsexperimenten gezeigt werden, dass *in-vitro*-phosphoryliertes, rekombinantes FMRP keine veränderte RNA-Bindung aufweist. Parallel zu den hier gezeigten Ergebnissen identifizierten Siomi *et al.* eine hoch konservierte, C-terminale Phosphorylierungsstelle in dFXR, dem Ortholog von FMRP in *Drosophila melanogaster* (Siomi *et al.*, 2002). Durch Protein-Protein-Bindungsassays konnten Hinweise darauf gewonnen werden, dass eine Homodimerisierung durch die Phosphorylierung des Proteins unterstützt wird und diese als Voraussetzung für eine von den Autoren beobachtete, gesteigerte RNA-Assoziation dient. Als dFXR-modifizierende Kinase identifizierten sie in diesem Zusammenhang die Casein-Kinase-II. Die Tatsache, dass Siomi *et al.* im Gegensatz zu den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen einen Effekt auf die RNA-Bindung beobachteten, mag an einem veränderten Versuchsaufbau liegen. Während die Gruppe dFXR mit Hilfe der Kinase phosphorylierte, welche auch *in vivo* das Protein modifiziert, ist die Kinase für humanes FMRP noch nicht identifiziert worden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erste Schritte zur Aufreinigung dieser Kinase unternommen, die *in vivo* mit FMRP in einem 400-500 Kilodalton umfassenden Komplex assoziiert. Mit der

Hilfe von Gelfiltrations- und Ionenaustauscherchromatographie konnte das Enzym soweit aus Zellextrakt aufgereinigt werden, dass man nun in der Lage sein sollte, die betreffende Kinase über FMRP zu präzipitieren. Bis dahin kann nicht ausgeschlossen werden, dass die *in-vitro*-Phosphorylierung von FMRP durch die humane Casein-Kinase-II (vgl. Kapitel 5.1.5.4) nicht der *in-vivo*-Situation entspricht.

Ähnliche Beobachtungen wie Siomi *et al.* konnten auch von Ceman *et al.* gemacht werden, die bestätigten, dass das hoch konservierte Serin (Aminosäureposition 499) auch in humanem FMRP *in vivo* die primäre Phosphorylierungsstelle darstellt (Ceman *et al.*, 2003). Die genaue massenspektrometrische Analyse der umgebenden Sequenz deckte dann drei weitere Phosphorylierungspositionen auf. Der Vergleich mit der homologen Sequenz in *D. melanogaster* zeigte, dass zwei der vier Phosphorylierungsstellen zwischen dFXR und humanem FMRP nicht konserviert sind, die Proteine folglich auch nicht das gleiche Phosphorylierungsmuster aufweisen. Auch hier konnte kein Einfluss der Phosphorylierung auf die Bindung spezifischer RNAs durch das humane FMRP beobachtet werden. Letztere Ergebnisse machen wiederum deutlich, dass die Differenzen in der RNA-Bindung auf unterschiedliche Phosphorylierungen oder Phosphorylierungsfunktionen in den beiden Organismen zurückgeführt werden kann.

Durch Dichtegradienten-Zentrifugationen konnten Ceman *et al.* Hinweise darauf gewinnen, dass phosphoryliertes FMRP eine spezifische Assoziation mit ruhenden Polyribosomen eingeht. Nicht-phosphoryliertes Protein interagiert hingegen mit aktiv translatierenden Polyribosomen (Ceman *et al.*, 2003). Unter Berücksichtigung der hier gemachten Beobachtung, dass FMRP die Translation von mRNAs inhibieren kann, ist hier ein Modell vorstellbar, wonach die Regulation der Translation über Phosphorylierung und Dephosphorylierung von FMRP verläuft. Demnach ist denkbar, dass die Translation assoziierter mRNAs solange unterdrückt wird, wie phosphoryliertes FMRP im Komplex vorhanden ist. Auf ein Signal der Zelle hin könnte dann die Dephosphorylierung des Proteins zur „Freigabe“ der Ribosomen und somit der Translation gebundener mRNAs führen.

6.1.2 Eingrenzung funktioneller Domänen von FMRP

6.1.2.1 Die Homodimerisierung von FMRP als Voraussetzung für die Translationsinhibition

Mit Hilfe von *in-vitro*-translatierten Deletionsmutanten konnte die für die Homodimerisierung notwendige Domäne in FMRP genauer eingegrenzt werden. Dabei wurde festgestellt, dass ein

Bereich in der Primärstruktur des Proteins für die Interaktion verantwortlich ist, der sowohl beide KH-Domänen, als auch einen davon N-terminal befindlichen Bereich umfasst (Aminosäuren 112-332). Es handelt sich hierbei um eine Sequenz, welche sich zu einem Coiled-Coil-Motiv falten kann (Siomi *et al.*, 1996). Dieses Motiv setzt sich strukturell aus mindestens zwei ineinander gedrehten α -Helices zusammen, die größtenteils gleiche (Homooligomer) oder unterschiedliche Proteine miteinander verbinden (Heterodimer/oligomer). Die Funktion des Strukturmotivs liegt in erster Linie in der Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen, zusätzlich wirkt es dabei auch stabilisierend auf die dreidimensionale Struktur einiger Proteine (zusammengefasst in Lupas, 1996). Diesem Beispiel folgend könnte die Homodimerisierung von FMRP über das Coiled-Coil-Motiv vermittelt werden. Die Ergebnisse der Bindungsexperimente haben jedoch gezeigt, dass für eine stabile Bindung zusätzlich noch beide KH-Domänen erforderlich sind.

Interessanterweise konnte bei der Kartierung der Dimerisierungsdomäne von FMRP gezeigt werden, dass sich die Bindungseigenschaften der Punktmutante FMRP_{I304N} drastisch von denen des Wildtyps unterscheiden. Zwar kann die Punktmutante noch mit Wildtyp-FMRP wechselwirken, eine Homodimerisierung zwischen zwei FMRP_{I304N}-Molekülen ist jedoch schon bei physiologischen Salzkonzentrationen unmöglich. Hier ist es wichtig festzustellen, dass der männliche Patient mit der Missense-Mutation innerhalb der zweiten KH-Domäne (I304N) nur über ein (mutiertes) Allel von FMRP verfügt. Aufgrund des fehlenden Wildtyp-Allels ist eine Heterodimerbildung in den Zellen ausgeschlossen und vermutlich ist das defekte FMRP_{I304N} auch hier nicht zur Homodimerisierung befähigt. Dies lässt vermuten, dass die Dimerisierung eine wichtige Rolle bei der *in-vivo*-Funktion von FMRP und bei der Entstehung der Krankheitssymptome des Fragilen X-Syndroms spielt.

Die Assoziation von FMRP mit FXR1 und FXR2 ist dagegen nicht beeinträchtigt. Aus diesen Beobachtungen lässt sich die Wichtigkeit der zweiten KH-Domäne für eine Dimerisierung von FMRP erschließen. Frühe NMR-Analysen von FMRP-Fragmenten implizierten, dass nur die erste der beiden KH-Domänen (KH1) eine dreidimensionale Faltung aufweist und RNA-bindungsaktiv ist (Adinolfi *et al.*, 1999). Von der zweiten KH-Domäne hatte man dagegen angenommen, dass sie ungefaltet vorliegt. Neuere Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, dass dieser Bereich doch die typische KH-Domänenstruktur, eine $\beta\alpha\beta\beta\alpha$ -Faltung, einnimmt. Ein NMR-Vergleich von KH-Domänen unterschiedlicher Proteine lieferte Hinweise darauf, welche besondere Bedeutung der konservierten hydrophoben Aminosäure (Isoleucin 304) in der zweiten anti-Helix zukommt, die im punktmutierten FMRP gegen ein Asparagin ausgetauscht ist: Während die Mutation dieser Position in den isolierten KH-Domänen von

FMRP oder Nova-1 in einem entfalteten Protein resultieren (Musco *et al.*, 1997), (Lewis *et al.*, 2000), kommt es bei SF1 (*splicing factor1*) zu einem vollständigen Verlust der RNA-Bindung (Liu *et al.*, 2001). In allen bisher analysierten Komplexen erfolgte der direkte Kontakt zwischen KH-Domäne und Nukleinsäure über die konservierte Aminosäure an Position 304 (Lewis *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001; Braddock *et al.*, 2002a; Braddock *et al.*, 2002b).

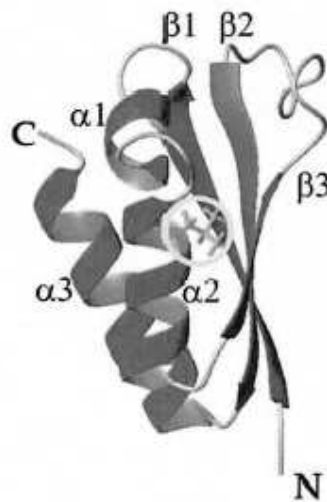


Abbildung 6-1 Schematische Darstellung der dreidimensionalen Faltung einer KH-Domäne (KH3 aus Nova-1). Rote Bänder repräsentieren anti-Helices, blaue Pfeile β -Stränge. Die hydrophobe Seitenkette der Position $\alpha 2$ ist grün hervorgehoben und entspricht der Position 304 in FMRP. Abbildung übernommen aus Ramos *et al.*, 2003b.

Am Beispiel der KH3-Domäne von Nova-1, einem Protein mit Funktion beim prä-mRNA-Spleißen, untersuchten kürzlich Ramos *et al.* den Einfluss der konservierten Aminosäure (L447 entspricht I304 in FMRP, vgl. Abbildung 6-1) auf die Struktur und die RNA-Assoziation (Ramos *et al.*, 2003b). Die Analyse des NMR-Spektrums legte nahe, dass in Abwesenheit der RNA eine Dimerisierung des Proteins erfolgt, die eine Konformationsänderung in der KH-Domäne zur Folge hat. Dies resultiert in einer Stabilisierung der Helixfaltung, wodurch eine stärkere RNA-Bindungsaffinität erreicht wird (Ramos *et al.*, 2003b). Eine Mutation an der oben erwähnten Position hingegen führte sowohl zu einem Verlust der spezifischen Bindung eines Adenins in Nukleinsäuren, als auch zu einer Destabilisierung der KH-Domäne. Zusammengenommen scheint es also wahrscheinlich, dass der in dieser Arbeit beobachtete vollständige Dimerisierungsdefekt von FMRP_{I304N} durch eine Entfaltung der KH-Domänenstruktur entsteht, die sich auch auf die weiter N-terminal (vgl. Abbildung 5-4) und ebenfalls an einer Assoziation beteiligten Bereiche des Proteins erstreckt. So erklärt sich auch die Beobachtung, dass noch eine Heterodimerisierung zwischen

FMRP_{I304N} und FMRP-Wildtyp zustande kommt, wo von vier beteiligten KH-Domänen nur eine einzige von der Mutation betroffen ist.

Durch den Vergleich verschiedener FMRP-Deletionsmutanten in Dimerisierungs-, RNA-Bindungs- und Translationsinhibitions-Experimenten konnten in dieser Arbeit Hinweise auf das unterschiedliche Verhalten von FMRP und FMRP_{I304N} gewonnen werden (vgl. Abbildung 5-6 und nicht gezeigte Daten). Dabei stellte sich heraus, dass insbesondere die Dimerisierung von FMRP über die Region der beiden KH-Domänen für die Funktion als Translationsinhibitor notwendig ist. Weiter kann man annehmen, dass die so regulierten mRNAs über die erste, oder beide KH-Domänen gebunden werden, da auch C-terminal deletiertes FMRP in der Lage ist, die Translation von mRNAs negativ zu beeinflussen. Diese Spekulationen lassen sich mit Ergebnissen von Mazroui *et al.* vereinbaren, die durch Transfektion von FMRP-Deletionsmutanten in FMRP-Knockout-Zellen nachweisen konnten, dass der N-Terminus mit beiden KH-Domänen für eine Rekrutierung des Proteins in polysomale mRNPs erforderlich, die RGG-Box jedoch entbehrlich ist (Mazroui *et al.*, 2003). Die Resultate reflektieren die *in-vivo*-Situation aus Untersuchungen mit Patientenzellen, wo die Punktmutante FMRP_{I304N} nicht mehr mit Polyribosomen assoziiert (Feng *et al.*, 1997a). Somit liegt die Vermutung nahe, dass FMRP auch *in vivo* die Rolle eines Translations-Inhibitor übernimmt, als Voraussetzung dafür aber über seine Domänen spezifisch mit mRNA und Polyribosomen wechselwirken muss.

6.1.2.2 Die FXR-Interaktionsdomäne

Die Kartierung der Bindungsstelle von FXR1 und FXR2 an FMRP mit Hilfe von Deletionsmutanten ergab, dass eine zusammenhängende Region in der Primärstruktur des Proteins für die Interaktion verantwortlich ist. Ausreichend ist ein Bereich von Aminosäure 112-215 in FMRP, der direkt N-terminal an die erste KH-Domäne anschließt. Es handelt sich hierbei vor allem um den zwischen den drei Proteinen hoch konservierten Bereich (75 % Ähnlichkeit), welcher die Coiled-Coil-Domäne enthält (Siomi *et al.*, 1996). Die Tatsache, dass sich mindestens zwei Coiled-Coil-Helices, und damit Proteinmoleküle, zusammenlagern können, lässt sich mit der Beobachtung von Zhang *et al.* vereinbaren, dass es *in vitro* zur Heterotrimer-Bildung aus den drei stark homologen Proteinen, FMRP, FXR1 und FXR2, kommt (Zhang *et al.*, 1995). Aus diesem Grund ist nicht auszuschließen, dass FXR1 und FXR2 über ihre Coiled-Coil-Motive an dieselbe Sequenz von FMRP binden und entweder nur eins der beiden Proteine oder beide gleichzeitig mit FMRP assoziieren.

Hinweise auf die zelluläre Situation konnten Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 1995) sowohl mit Hilfe eines *Two-Hybrid-Screens*, als auch durch Bindungsexperimente mit rekombinant exprimierten Proteinen gewinnen. Sie zeigten, dass FMRP, FXR1 und FXR2 *in vitro* sowohl mit sich selbst interagieren, als auch untereinander hetero-oligomerisieren. Die Autoren diskutieren ein Modell, wonach der Komplex aus diesen drei Proteinen in seiner Mengenzusammensetzung variabel ist und FMRP durch den wechselnden FXR-Gehalt im Komplex reguliert werden könnte. Fraglich ist, ob diese heteromeren Verbindungen auch *in vivo* existieren. Weitere Hinweise auf die *in-vivo*-Situation lieferten Ergebnisse von Tamanini *et al.*, die durch FMRP- und FXR1-Immunpräzipitationen aus Zellextrakt belegten, dass beide Proteine zu ca. 90 % als homomere Komplexe vorliegen (Tamanini *et al.*, 1999b). Der Vergleich mit weiteren Proteinen, welche eine Coiled-Coil-Struktur ausbilden legt nahe, dass die Ausbildung von Heterodimeren gegenüber Homodimeren unter bestimmten zellulären Bedingungen bevorzugt wird. So beeinflussen beispielsweise die wechselnden Heterodimerpartner des Coiled-Coil-Domänen-Transkriptionsfaktors c-Jun die Bindungsspezifität für unterschiedliche Genpromotoren (zusammengefasst in Shaulian and Karin, 2002). Für FMRP wird eine Funktion bei der Regulation der Translation verschiedener RNA-Targets diskutiert. Eine denkbare Möglichkeit wäre, ähnlich wie bei c-Jun, dass die Vermittlung einer Spezifität der RNA-Bindung durch verschiedene Heterodimer-Kombinationen erfolgt. Dabei könnte die Dimerisierung über das Coiled-Coil-Motiv auch hier der Stabilisierung einer räumlichen Anordnung beider Proteine dienen, die dann ebenfalls zur Spezifität bezüglich der RNA-Assoziation beiträgt.

6.1.3 RNA-,Targets“ von FMRP

Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass insgesamt ca. 4 % der neuronalen RNAs mit FMRP-mRNPs assoziiert vorliegen (Brown *et al.*, 2001). Es ist anzunehmen, dass *in vivo* die Substratspezifität von FMRP bezüglich seiner Targets streng reguliert wird. Prinzipiell sind hier, angesichts der bisherigen Informationen über das Protein, mehrere Mechanismen wahrscheinlich.

Zum einen könnte die Spezifität für die RNA-Bindung durch die Interaktion mit verschiedenen Proteinen in den meist mehr als 660 Kilodalton schweren mRNPs reguliert werden, in die FMRP *in vivo* integriert ist (Eberhart *et al.*, 1996; Corbin *et al.*, 1997; Feng *et al.*, 1997a). Die unterschiedlichen Angaben zur genauen Größe dieser mRNPs sprechen dafür, dass es sich um dynamische Komplexe handelt, die sich in ihrer Proteinzusammensetzung und -menge unterscheiden. Trotz der Identifikation einer Reihe von direkten und indirekten

Bindungspartnern in diesen Komplexen ist eine Regulation oder eine vermittelte Substratspezifität von FMRP bisher nicht eindeutig gezeigt worden (Ceman *et al.*, 1999; Ceman *et al.*, 2000; Schenck *et al.*, 2001).

Alternativ hierzu ist denkbar, dass die Assoziation mit mRNAs von spezifischen Sequenzelementen oder Faltungsmotiven in der jeweiligen mRNA abhängt. Vor kurzem konnten durch unterschiedliche Ansätze eine Reihe von putativen RNA-Interaktionspartnern von FMRP identifiziert werden, dabei fand vor allem das G-Quartett besondere Beachtung (Schaeffer *et al.*, 2001). Es besteht im Kern aus vier Guanin-Resten die durch Wasserstoffbrückenbindungen und Kalium-Ionen in einer planaren Konfiguration stabilisiert werden (Keniry). Mittels Deletionsmutanten charakterisierten Schaeffer *et al.* eine purinreiche Sequenz in der kodierenden Region der FMR1-mRNA (Nukleotide 1613-1648), welche *in vitro* diese Quadruplex-Struktur ausbilden kann und so von FMRP gebunden wird. Weitere Hinweise auf das G-Quartett als Erkennungselement ergaben Analysen von Brown *et al.* und Darnell *et al.*, die in etwa der Hälfte (8 von 14) der durch FMRP-Immünpräzipitation und Microarray isolierten RNA-Bindungspartner ein putatives G-Quartett entdeckten (Brown *et al.*, 2001; Darnell *et al.*, 2001). Interessanterweise bildet auch die MAP1B-mRNA, welche als *in-vivo*-Target von FMRP identifiziert wurde, ein solches G-Quartett aus (Zhang *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte weder in RNA-Bindungsexperimenten (nicht gezeigt), noch in den Translationsinhibitions-Assays eine Präferenz von FMRP für eine der drei verwendeten mRNAs (FMR1-, SMN- oder Luciferase-mRNA) beobachtet werden. Dies ist insofern erstaunlich, da nur die FMR1-mRNA eine purinreiche Region mit entsprechendem G-Quartett-Konsensus aufweist, eine Bindung bzw. Translationsinhibition der anderen beiden mRNAs scheint unter diesen Versuchsbedingungen somit G-Quartett-unabhängig zu verlaufen. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnten die Untersuchungen von Darnell *et al.* bieten, die mit Hilfe von FMRP-Deletionsmutanten deutlich machten, dass die Erkennung und Bindung eines G-Quartetts ausschließlich durch die RGG-Box von FMRP erfolgt (Darnell *et al.*, 2001). Ergänzend dazu zeigten kürzlich NMR-Studien einen *Induced-fit*-Mechanismus von rekombinant exprimierter FMRP-RGG-Box gegenüber einem G-Quartett (Ramos *et al.*, 2003a). Während also RNAs mit dieser Sequenz über die RGG-Box erkannt werden, ist gleichzeitig auch die Assoziation anderer RNAs über die ebenfalls RNA-bindenden KH-Domänen möglich, denen in FMRP noch keine Sequenzspezifität nachgewiesen wurde. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang die Deletionsmutante FMRP₁₋₄₃₀, die trotz Fehlen der RGG-Box die Translation von mRNA inhibiert. Aufgrund dieser Beobachtung ist davon auszugehen, dass die ersten 430

Aminosäuren für die untersuchte Funktion des Proteins ausreichend sind. Die in diesem Assay verwandte SMN-mRNA besitzt kein G-Quartett, von dem man annimmt, dass es spezifisch mit der RGG-Box in FMRP assoziiert (Darnell *et al.*, 2001). Eine Bindung findet hier also ausschließlich über eine oder beide KH-Domänen statt. Dieses Resultat lässt sich gut mit anderen Untersuchungen vereinbaren, in welchen kürzlich vermehrt Uridin-reiche Sequenzen als potentielle FMRP-Targets identifiziert wurden (Chen *et al.*, 2003; Dolzhanskaya *et al.*, 2003). Schon früh hatte sich in RNA-Bindungsexperimenten mit Homoribopolymeren gezeigt, dass die Punktmutation in der zweiten KH-Domäne (I304N) keinen Einfluss auf die Assoziation von FMRP mit poly(G) hat, die Bindung an poly(U) dagegen verhindert wird (Siomi *et al.*, 1994). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Uridin-reiche Sequenzen vermehrt durch die beiden KH-Domänen, Guanidin-reiche eher von der RGG-Box gebunden werden. Somit wird auch die *in-vitro*-Assoziation von FMRP mit der SMN-mRNA erklärbar, da sie in ihrer 3' untranslatierten Region (Nukleotide 1521-1577) ausgeprägte Abfolgen von Uridin aufweist und dieser Theorie zufolge von den KH-Domänen gebunden werden könnte.

Interessanterweise konnte kürzlich eine Verbindung zwischen FMRP und dem RNAi-Pathway festgestellt werden. RNA-Interferenz ist der in Eukaryonten konservierte Prozess der posttranskriptionellen Genabschaltung (Fire *et al.*, 1998; Cogoni and Macino, 2000; Vance and Vaucheret, 2001; Hutvagner and Zamore, 2002; Hannon, 2002). Induziert wird der Mechanismus durch doppelsträngige RNA, die in ihrer Sequenz komplementär zu der des abzuschaltenden Gens ist (Zamore *et al.*, 2000; Elbashir *et al.*, 2001). Zu Beginn findet eine Prozessierung der dsRNA zu 21-23 Nukleotid-Fragmenten statt, welche durch die RNase-Familie DICER katalysiert wird. Man unterscheidet hier 2 verschiedene Produkte: die siRNAs (*short interfering RNAs*) und die miRNAs (*micro RNAs*). Während erstere zusammen mit dem Protein-Komplex RISC die direkte Degradation homologer mRNAs einleiten, führt die Bindung von miRNAs an homologe mRNAs zur Inhibition der Translation (Olsen and Ambros, 1999; Zeng and Cullen, 2002).

In zwei unabhängigen Untersuchungen konnte ein mRNP-Komplex aus *D. melanogaster* isoliert werden, welcher neben dFXR essentielle Komponenten des RNAi-Pathways beinhaltet (Ishizuka *et al.*, 2002; Caudy *et al.*, 2002). Unter anderem copräzipitierten die RNase DICER, siRNAs, miRNAs und AGO2, eine essentielle Proteinkomponente des RISC-Komplexes (*RNA-induced silencing complex*). Einen weiteren wichtigen Hinweis für die Zugehörigkeit von dFXR zum RISC-Komplex gelang Caudy *et al.* durch dFXR-Immunpräzipitationen aus Zellen, welche mit doppelsträngiger RNA behandelt wurden. Dabei

zeigten die isolierten Komplexe signifikante RISC-Aktivität, die spezifisch gegen die eingesetzte Kontroll-mRNA gerichtet war. Dennoch scheint dFXR keine essentielle Komponente der RNAi-vermittelten Degradationsmaschinerie in *D. melanogaster* zu sein. Die Autoren favorisieren ein Modell, wonach dFXR als Teil des RISC-Komplexes von miRNAs zu seinen mRNA-Targets geleitet wird (Caudy *et al.*, 2002; Ishizuka *et al.*, 2002). Auf diese Weise würde die miRNA-Sequenz der mRNA-Bindung die nötige Spezifität vermitteln.

Obwohl dFXR in seiner Sequenz und Funktion in hohem Maße den humanen Homologen der Fragilen X-Familie gleicht (Wan *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2001), konnte bis jetzt für FMRP, FXR1 und FXR2 keine Verbindung zum RNAi-Pathway gefunden werden. Dennoch ist dieser Mechanismus der Target-Erkennung eine Möglichkeit, die bei der Translationsregulation durch humanes FMRP in Betracht gezogen werden kann.

Fasst man die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse und die aktuelle Literatur zusammen, lässt sich ein Modell aufstellen, welches eine Funktion von FMRP als Translationsrepressor unter bestimmten Konditionen beschreibt. Demnach dient die hohe Konzentration des Proteins in neuronalen mRNPs der Aufrechterhaltung einer Translationsinhibition, so lange bis diese aus dem Zellsoma heraus in die Dendriten und Synapsen transportiert worden sind (Feng *et al.*, 1997b; Zhang *et al.*, 2001). Auf ein bestimmtes zelluläres Signal hin könnte die Inhibition aufgehoben werden, sodass die Proteinexpression zeitlich und/oder räumlich kontrolliert ablaufen kann. Das Vorkommen von posttranslationalen Modifikationen wie Methylierung und Phosphorylierung von FMRP legt nahe, dass hierdurch Funktionen des Proteins reguliert werden könnten. Es gibt Hinweise, dass so ein direkter Einfluss auf die Protein-Interaktionen, die RNA-Bindung bzw. -Spezifität oder die Aktivität als Translationsinhibitor ausgeübt werden kann (Ceman *et al.*, 2003; Denman, 2002). Abbildung 6-2 fasst dieses Modell grafisch zusammen.

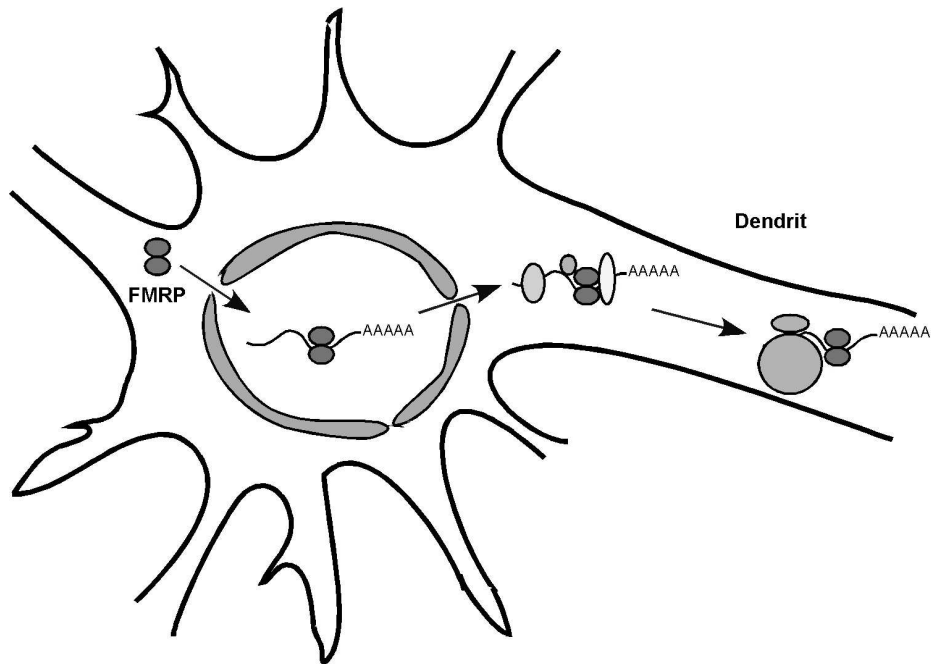


Abbildung 6-2 Ein Modell der Funktion und Regulation von FMRP in Neuronen. FMRP (rot) wird in den Zellkern transportiert. Dort erfolgt die Assoziation mit mRNAs und weiteren Proteinen zu einem mRNP, welches anschließend exportiert wird. Im Cytoplasma erfüllt FMRP die Funktion des Translationsrepressors, solange bis die mRNAs an ihrem Bestimmungsort angekommen sind. Auf ein bestimmtes zelluläres Signal hin könnte die Inhibition dann aufgehoben werden, sodass die Proteinexpression zeitlich und/oder räumlich kontrolliert ablaufen kann.

Nach diesem Modell könnte der Phänotyp von Fragilen X-Patienten durch eine zeitliche oder räumliche Fehlexpression bestimmter Gene hervorgerufen werden, deren Translation normalerweise durch FMRP reguliert wird. Darüber hinaus bleibt es jedoch offen, ob es sich bei der Inhibition der Translation um die einzige Funktion von FMRP handelt oder ob dieses Protein noch in weitere zelluläre Prozesse involviert ist.

6.2 Untersuchungen zur Methyltransferase-Aktivität des PRMT5-Komplexes bei der U-snRNP-Biogenese

Verschiedene Proteine, darunter auch die spleißosomalen Proteine SmB, D1 und D3, können in der Zelle durch Arginin-Methylierungen posttranslational modifiziert werden. Die hierfür verantwortlichen Methyltransferasen werden anhand der Form dieser Modifikation in zwei Gruppen unterteilt: Typ-I-Methyltransferasen katalysieren die Bildung asymmetrischer Dimethylierungen, Typ-II-Methyltransferasen die Bildung symmetrischer Dimethylierungen an Argininresten ihrer Substrate (vgl. Abbildung 2-6). Die hier näher untersuchte Methyltransferase PRMT5 ist dabei das einzige bisher bekannte Enzym der zweiten Gruppe. Inzwischen konnten in humanen Zellen über 100 symmetrisch dimethylierte Proteine identifiziert werden, denen eine Rolle bei der RNA-Prozessierung, aber auch bei der Transkription, Translation, Signaltransduktion und im Cytoskelett zugeschrieben wird (vgl. Boisvert *et al.*, 2003). Die genauen Funktionen der Modifikationen liegen dabei größtenteils noch im Dunkeln. Die große Anzahl an Proteinen lässt aber vermuten, dass es neben PRMT5 noch weitere Typ-II-Methyltransferasen beim Menschen gibt.

Zu Beginn der Arbeit war bereits bekannt, dass PRMT5 eine wichtige Rolle bei der Biogenese der U-snRNP im Cytoplasma spielt. Das Enzym katalysiert die symmetrisch Dimethylierung der spleißosomalen Proteine SmB, D1 und D3, die anschließend auf den SMN-Komplex übertragen werden. Hier erfolgt schließlich die Zusammenlagerung der Sm-Proteine und der snRNA zur so genannten Sm-Core-Domäne, der erste Schritt bei der Entstehung der U-snRNP (zusammengefasst in Meister *et al.*, 2002). Ziel dieser Arbeit war es nun einen genaueren Einblick in den Mechanismus der Sm-Protein-Methylierungen zu bekommen. Man wusste, dass PRMT5 im Cytoplasma Teil eines Komplexes ist, der auch die beiden Proteine pICln und WD45 enthält. Während die Funktion von PRMT5 als katalytisch aktiver Faktor durch *in-vitro*-Methylierungsassays bereits belegt werden konnte, war die Rolle der beiden anderen Komplexpartner noch unklar. Ein wesentliches Ziel der durchgeführten Untersuchungen bestand zunächst darin, den Aufbau des katalytisch aktiven PRMT5-Komplexes zu untersuchen und vor allem die Funktionen von pICln und WD45 bei der Methylierungsreaktion aufzudecken. Ebenso stellte sich die Frage, auf welche Weise die methylierten Sm-Proteine anschließend auf den SMN-Komplex übertragen werden. So war aus *in-vitro*-Studien bekannt, dass sich die Sm-Proteine zu verschiedenen heteromeren Komplexen zusammenlagern können und dass dies die Voraussetzung für das Assembly war

(Raker *et al.*, 1996). Allerdings war unklar, ob und zu welchem Zeitpunkt diese Komplexe auch *in vivo* entstehen.

6.2.1 Untersuchungen zum Aufbau des PRMT5-Komplexes

Zu Beginn der Untersuchungen sollten Bindungsexperimente klären, wie die bekannten Komponenten des PRMT5-Komplexes miteinander wechselwirken. Dabei zeigte sich, dass sowohl pICln als auch WD45 jeweils an PRMT5 binden, nicht aber untereinander. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass PRMT5 auch mit sich selbst interagiert. Diese Beobachtung wurde inzwischen durch Rho *et al.* bestätigt, die durch Sedimentationsanalysen zeigen konnten, dass auch endogenes PRMT5 aus 293-Zellextrakten in Form von distinkten Homooligomeren vorliegt (Rho *et al.*, 2001). Für die mit PRMT5 verwandten Typ-I-Methyltransferasen PRMT1 und PRMT3 wurden ebenfalls Oligomerisierungen beschrieben (Tang *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2000). Strukturanalysen von PRMT1 und PRMT3 lassen vermuten, dass die Oligomerisierung einen direkten Einfluss auf die Aktivität des Enzyms hat (Weiss *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000). Die an der Dimerisierung von PRMT3 beteiligten Aminosäuren wurden von Zhang *et al.* kristallographisch identifiziert, sie konzentrieren sich hauptsächlich auf zwei Bereiche im Protein (Aminosäuren 230-270 und 380-390). Daran anschließende Sequenzvergleiche offenbarten, dass einige dieser Positionen sowohl unter mehreren PRMTs, als auch unter verschiedenen Organismen konserviert sind (Zhang *et al.*, 2000). Vor dem Hintergrund der starken, auch strukturellen, Homologie der bisher bekannten PRMTs (zusammengefasst in McBride and Silver, 2001), könnten diese Aminosäuren auch für die Dimerisierung von PRMT5 relevant sein.

Durch Immunpräzipitationen mit WD45- und pICln-spezifischen Antikörpern aus HeLa-Zellextrakten wurde die *in-vivo*-Zusammensetzung des Methyltransferase-Komplexes aus den drei Komponenten PRMT5, pICln und WD45 bestätigt. Es konnte gezeigt werden, dass die so isolierten Komplexe auch funktionell aktiv sind, d.h. eine effektive Methylierung von Sm-Proteinen katalysieren können. Aus gelchromatographischen Untersuchungen weiß man, dass der PRMT5-Komplex im Cytoplasmaextrakt eine Größe von etwa 500 kDa aufweist (Meister *et al.*, 2001b). Zusammenfassend lässt sich demnach ein Modell über den Aufbau des Komplexes ableiten, bei dem die Methyltransferase als zentrale Komponente di- oder oligomerisiert vorliegt und dabei jeweils mit mehreren Molekülen pICln und WD45 assoziiert ist (vergl. Abbildung 6-3).

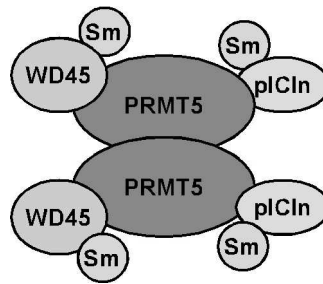


Abbildung 6-3 Modell des PRMT5-Komplexes. Die Abbildung stellt schematisch die Interaktionen der Proteine innerhalb des PRMT5-Komplexes dar. Zentraler Bestandteil ist ein PRMT5-Dimer (oder -Oligomer), an den wiederum pICln und WD45 direkt binden. Die Assoziation der Sm-Proteine verläuft sowohl über pICln, als auch über WD45.

Aus früheren Experimenten war bekannt, dass sowohl pICln, als auch WD45 direkt an Sm-Proteine binden, pICln geht dabei eine Wechselwirkung mit deren Sm-Motiv ein (Friesen *et al.*, 2002; Meister *et al.*, 2001b). Das ließ vermuten, dass beiden Proteine eine Funktion als „Recruitmentfaktoren“ haben könnten, die die Substrate SmB, D1 und D3 binden und an die katalytische Komponente des Komplexes, PRMT5, weiterleiten. Dabei könnten sie direkt oder indirekt die Aktivität des Enzyms beeinflussen.

6.2.2 pICln und WD45 sind notwendig für eine effektive Methylierung von Sm-Proteinen durch PRMT5

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigen, dass sowohl pICln als auch WD45 eine entscheidende Rolle bei der effizienten Methylierung der Sm-Proteine B, D1 und D3 durch PRMT5 spielen. So konnte durch Zugabe von rekombinantem pICln oder WD45 die Sm-Methylierung in Cytoplasmaextrakt deutlich gesteigert werden. Der gleiche, aktivierende Effekt beider Proteine wurde auch bei der Sm-Methylierung an isolierten PRMT5-Komplexen beobachtet. Da pICln und WD45 direkt mit PRMT5 interagieren, konnte man vermuten, dass es sich hier um einen unmittelbaren Einfluss beider Proteine auf die Methylierungsreaktion handelt. Analoge Experimente mit rekombinant exprimiertem PRMT5, pICln und WD45 bestätigten einen solchen direkten Effekt. Dabei konnte gezeigt werden, dass der aus rekombinanten Komponenten bestehende PRMT5-Komplex, wie der aus Zellextrakt isolierte Komplex, eine symmetrische Methylierung der Sm-Proteine katalysiert.

Es erstaunte zunächst, dass pICln und WD45 einen vergleichbaren Effekt auf die untersuchte Sm-Methylierung haben, obwohl keinerlei Verwandtschaft zwischen den beiden Proteinen besteht. Wie oben geschildert, war aber bekannt, dass beide direkt mit den gleichen Sm-

Proteinen interagieren können (Meister *et al.*, 2001b; Friesen *et al.*, 2002). WD45 und pICln zeigen in den in dieser Arbeit durchgeführten *in-vitro*-Untersuchungen eine funktionelle Homologie, welche sich allerdings nicht ohne weitere Ergebnisse auf die *in-vivo*-Situation übertragen lässt. Entsprechend dem in Abbildung 6-3 dargestellten Modell über den Aufbau des Komplexes bindet PRMT5 als zentraler Bestandteil gleichzeitig an pICln und WD45. Beide könnten so unabhängig voneinander gebundene Sm-Proteine zur Methylierung präsentieren. Diese Ergebnisse deuten an, dass so genannte „Recruitmentfaktoren“ für die Interaktion zwischen PRMT5 und seinen Substraten notwendig sind. Gegenwärtig ist es noch unklar, ob und inwieweit *in vivo* weitere Proteine, neben pICln und WD45, diese Funktion innehaben. Man könnte jedoch vermuten, dass noch andere Substrate über spezifische Recruitmentfaktoren an das Enzym herangebracht werden und es sich bei den Sm-Proteinen nicht um die einzigen Targets von PRMT5 im Cytoplasma handelt.

Um den Einfluss von pICln auf die Methylierungsreaktion genauer zu charakterisieren, wurden verschiedene Methylierungsexperimente konzipiert. Betrachtet man die Reaktionen im zeitlichen Verlauf, so zeigt sich, dass pICln die Katalyse nicht einfach beschleunigt sondern das Ausmaß der Methylierung im Experiment erhöht. So war die Gesamtmenge an SmD3, die in einem Ansatz methyliert werden kann, nach Zugabe von pICln deutlich höher als ohne das Protein. Dabei scheint es eine direkte, lineare Abhängigkeit zwischen der Menge an pICln im Ansatz und dem Ausmaß der SmD3-Methylierung zu geben.

Kinetische Untersuchungen zeigten einen interessanten Reaktionsverlauf: In Ansätzen ohne zugegebenes pICln kommt es nach einer gewissen Zeit zu einer Stagnation der Reaktion, d.h. obwohl das Enzym aktiv und Substrat im Überschuss vorhanden ist, findet keine weitere Methylierung mehr statt. Durch Zugabe von pICln kann die Reaktion wieder reaktiviert werden, weiteres Substrat wird umgesetzt bis die Reaktion erneut stagniert. Die Beobachtungen lassen vermuten, dass es im Verlauf der Reaktion zu einer Produkthemmung des PRMT5-Komplexes durch die schon methylierten Sm-Proteine kommt. Vermutlich bleibt das Sm-Protein nach seiner Methylierung an pICln gebunden und verhindert so, dass das Protein neues Substrat binden und in den nächsten Reaktionszyklus eintreten kann. Die Reaktion kommt zum Erliegen, kann aber nach Zugabe von weiterem pICln erneut ablaufen, bis auch dieses entsprechend blockiert ist. Ausgehend von diesem Modell stellte sich die Frage, wie in der Zelle die Freigabe des PRMT5-Komplexes nach einem Methylierungszyklus gewährleistet ist. Es war bekannt, dass die symmetrisch dimethylierten Sm-Proteine mit deutlich höherer Affinität von SMN als von pICln gebunden werden (Friesen *et al.*, 2001b). Diese Methylierung ist die Voraussetzung für ein effizientes U-snRNP-Assembly durch den

SMN-Komplex (Brahms *et al.*, 2001b; Friesen *et al.*, 2001a). In der Tat konnte hier gezeigt werden, dass eine bereits stagnierte Methylierungsreaktion nach Zugabe von rekombinantem SMN reaktiviert werden kann. Man kann daher annehmen, dass bei der Interaktion des PRMT5-Komplexes mit dem SMN-Komplex im Cytoplasma die methylierten Sm-Proteine direkt auf SMN übertragen werden und die Methyltransferase dadurch wieder „frei“ für einen neuen Reaktionszyklus wird (Abbildung 5-34). Ein solcher unidirektionaler Reaktionsverlauf könnte wichtig für die Regulation der Sm-Methylierung sein. Demnach könnten nur so lange Sm-Proteine effektiv methyliert werden, wie auch der SMN-Komplex als Akzeptor bereit steht, d.h. solange die Produkte der Methylierungsreaktion als Substrate für das anschließende Sm-Core-Assembly benötigt werden.

Die Untersuchungen in dieser Arbeit zeigen, dass pICln als Cofaktor notwendig für die Modifikation der Sm-Proteine durch PRMT5 ist und dadurch eine essentielle Funktion bei der Sm-Methylierung im Cytoplasma hat. Dabei bleibt offen, ob und wie die Aktivität von pICln selbst reguliert wird. Sanchez-Olea *et al.* konnten zeigen, dass pICln an mindestens zwei Serinresten phosphoryliert werden kann (Sanchez-Olea *et al.*, 1998). Daher wurde hier untersucht, ob diese posttranslationale Modifikation einen Einfluss auf die Aktivität von pICln bei der Sm-Methylierung hat. In Experimenten bei denen entweder ATP oder das nicht-hydrolysierbare Analog γ S-ATP zur Reaktion zugegeben war, wurden jedoch keine Unterschiede bei der Methylierung von SmD3 beobachtet. Die Daten lassen vermuten, dass die Phosphorylierung von pICln, zumindest unter den hier getesteten Bedingungen, nicht unmittelbar mit seiner Rolle bei der Sm-Methylierung im Zusammenhang steht.

Für WD45 wurde in ersten Experimenten eine vergleichbare Wirkung auf die Methylierungsreaktion wie für pICln beobachtet. Da auch WD45 mit Sm-Proteinen interagiert wurde auch hier eine Funktion als Adapterprotein zur Präsentation der Substrate an PRMT5 angenommen. Bislange ist unklar, inwieweit beide Proteine tatsächlich funktionell homolog sind. Es hat sich gezeigt, dass *in vitro* alle sieben Sm-Proteine von pICln, und alle außer SmF und SmG von WD45 gebunden werden (Meister *et al.*, 2001b; Friesen *et al.*, 2002).

Weiterführende Experimente werden zeigen, ob sie sich in ihrer Substratspezifität unterscheiden oder ob sie, z.B. über allosterische Effekte, auch einen direkten Einfluss auf die katalytische Aktivität von PRMT5 ausüben können.

6.2.3 Zum Zeitpunkt ihrer Methylierung bilden die Sm-Proteine noch keine Heterodimere

Die Beobachtung, dass Sm-Proteine *in vitro* heteromere Komplexe formen und als solche auch rekombinant stabil exprimiert werden können, führte zu der Theorie, dass sie noch vor dem Sm-Core-Assembly auch *in vivo* Heteromere bilden (Raker *et al.*, 1996). Erste experimentelle Hinweise bestätigen das. So legt die Beobachtung, dass durch Hochsalz-Behandlung spezifisch die Sm-Proteine B/B' und D3 vom SMN-Komplex gelöst werden können, den Schluss nahe, dass die beiden Proteine zu diesem Zeitpunkt als stabiler Komplex assoziiert vorliegen (Meister, 2002). Es stellte sich daher die Frage, ob man Hinweise darauf gewinnen kann, ob solche Komplexe bereits eine Rolle bei der Methylierung der Sm-Proteine oder bei der anschließenden Übertragung auf den SMN-Komplex spielen.

Aus biochemischen Untersuchungen war bekannt, dass humanes SmB und SmD3 in der Zelle in vergleichbarem Ausmaß methyliert werden (Brahms *et al.*, 2001a), so erhält SmB eine sechsfache Arginin-Methylierungen, SmD3 eine fünffache. In Methylierungsexperimenten mit dem rekombinant exprimierten Heterodimer SmB-SmD3 zeigte sich jedoch, dass die Modifikation beider Proteine nicht gleichmäßig erfolgt, sondern SmD3 auf Kosten von SmB im Dimer bevorzugt wird. Bei der Suche nach den Ursachen für diese Ungleichverteilung der Modifikation gaben Bindungsexperimente mit pICln-Deletionsmutanten Hinweise auf eine Überlappung mehrerer Sm-Bindungsstellen im Protein. Die Analysen zeigten, dass SmD1, SmD2 und SmD3 mit der gleichen Region von pICln assoziierten, ebenso gab es übereinstimmende Bindungsstellen von SmB, SmE und SmG. Neuere Untersuchungen deuten dabei an, dass die Bindungsstellen von SmD3 und SmB teilweise überlappen (persönliche Mitteilung von M. Klingenhäger). Diese Ergebnisse legen nahe, dass immer nur ein Sm-Protein an pICln binden kann und würden damit die Beobachtungen erklären, dass die rekombinanten Sm-Proteine im Heterodimer ungleich methyliert werden: Die Expression als Dimer mag die rekombinanten Proteine SmB und SmD3 *in vitro* stabilisieren, beeinträchtigt jedoch deren Modifikation vermutlich insofern, dass voraussichtlich eine gerichtete Bindung an den PRMT5-Komplex erfolgt, was dann eine bevorzugte Methylierung von SmD3 zur Folge hat. Damit eine gleichmäßige Modifikation von SmB und SmD3 gewährleistet ist, scheint es daher wahrscheinlich, dass es in der Zelle nicht zu einer Heterodimerbildung der beiden Proteine vor der Interaktion mit dem PRMT5-Komplex kommt. Um die monomeren Proteine nach der Translation zu stabilisieren, könnte es dagegen eher zu einer frühen Bindung an pICln kommen, dass eine hohe Affinität für unmethylierte Sm-Proteine besitzt (Friesen *et al.*, 2001a). Erste Hinweise auf eine Richtigkeit dieser Vermutungen ergaben *in-*

in-vitro-Untersuchungen, in denen SmB oder SmD3, statt als Heterodimer, zusammen mit pICln rekombinant exprimiert und anschließend einer Methylierung durch PRMT5 unterzogen wurden. Hier zeigte sich in der Tat, dass beide Sm-Proteine in gleichem Maße methyliert werden, wenn sie dem PRMT5-Komplex einzeln als Substrat angeboten werden. In weiteren *in-vitro*-Methylierungsexperimenten konnte nachgewiesen werden, dass bei einer Vorinkubation von einem der beiden Sm-Proteine mit pICln auch dieses methyliert wurde und nicht vom korrespondierenden Heterodimer-Partner verdrängt werden konnte. Es kommt also zu keiner Bevorzugung was die Affinität der Bindung von SmB und SmD3 an pICln betrifft. Aus diesem Grund ist es wahrscheinlich, dass in der Zelle sowohl SmB, als auch SmD3 nach der Translation einzeln mit pICln assoziieren und so zur Methylierung an PRMT5 herangeführt werden.

In einem weiteren Experiment konnte nun im nächsten Schritt der Sm-Core-Biogenese überprüft werden, ob die methylierten Sm-Proteine als Heterodimere auf den SMN-Komplex übertragen werden. Dabei stellte sich heraus, dass sowohl methyliertes SmB, als auch SmD3 einzeln sehr effizient über SMN immunpräzipitiert werden können, der SmB/D3-Heterodimer dagegen nur in sehr geringem Ausmaß. Man kann daher vermuten, dass auch für diesen Schritt der Reaktionsfolge die Dimerisierung der beteiligten Sm-Proteine keine Voraussetzung ist. (Abbildung 6-4) fasst die erhaltenen Ergebnisse zu einem Modell der Methylierungsabfolge zusammen.

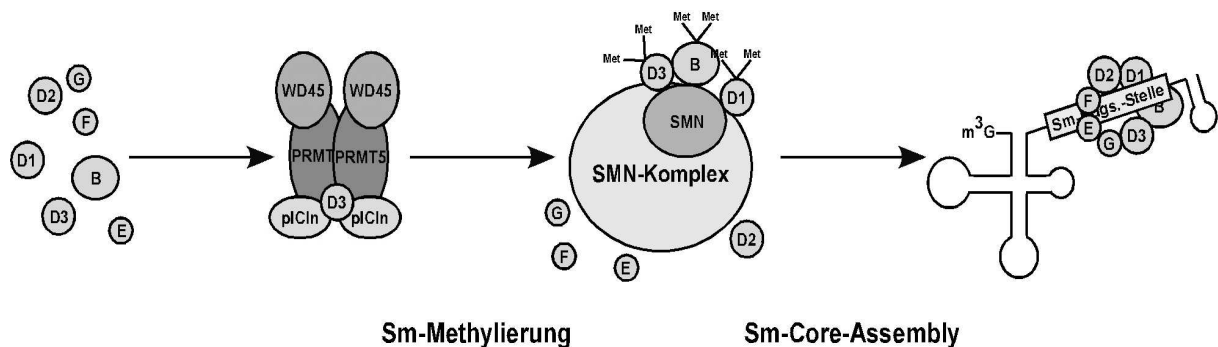


Abbildung 6-4 Modell der Sm-Methylierung durch den PRMT5-Komplex und die anschließende Übertragung auf den SMN-Komplex. Neu synthetisierte Sm-Proteine binden zunächst über eine direkte Interaktion mit pICln an den PRMT5-Komplex. Dort katalysiert PRMT5 die symmetrische Methylierung von Argininen in den Sm-Proteine SmB, D1 und D3. Im nächsten Schritt tritt der PRMT5-Komplex mit dem SMN-Komplex in direkten Kontakt wodurch der Transfer der Sm-Proteine auf den SMN-Komplex ermöglicht wird. SMN spielt dabei als direkter Interaktionspartner der Sm-Proteine SmB, D1 und D3 eine zentrale Rolle. Als nächstes wird ein vollständiger Satz der sieben Sm-Proteine SmB, D1, D2, D3, E, F, und G in einem Schritt auf die U-snRNA transferiert, was in der Ausbildung der Sm-Core-Domäne resultiert.

Somit stellt sich die Frage, ob und wann die von Raker *et al.* beobachteten Sm-Heterodimere in der Zelle auftreten und welche Funktion sie dabei erfüllen (Raker *et al.*, 1996). Die Daten dieser Arbeit deuten darauf hin, dass zu keinem Zeitpunkt vor oder nach der Methylierung der Sm-Proteine bis hin zur Übergabe an den SMN-Komplex solche Intermediate auftreten. Wahrscheinlicher ist dagegen die Bildung der Sm-Heteromere am SMN-Komplex, vor der anschließenden Beladung der U-snRNAs, dem eigentlichen Sm-Core-Assembly. Besonders die Tatsache, dass nur methylierte Sm-Proteine von SMN gebunden werden (Brahms *et al.*, 2001a; Friesen *et al.*, 2001a), spricht dafür, dass zu diesem Zeitpunkt die nicht methylierten Komponenten SmD2, E, F und G mit den methylierten SmB, D1 und D3 assoziieren, um auf definierte Weise in die Sm-Core-Struktur integriert zu werden. Die von Raker *et al.* beobachteten Heterodimere könnten somit Zwischenprodukte des am SMN-Komplex vorgeformten Sm-Rings sein, die sich stabil isolieren lassen. Die hohe Affinität der einzelnen Sm-Proteine zueinander könnte dabei die Isolierung solcher Komplexe begünstigen. Abschließend lässt sich hier festhalten, dass allen drei Grundbestandteile des cytoplasmatischen PRMT5-Komplexes, PRMT5, pICln und WD45, eine Funktion bei der Methylierung der als Monomer vorliegenden Sm-Proteine zukommt. Durch weitere *in-vivo*-Experimente müsste jedoch nun geklärt werden, zu welchem Zeitpunkt des weiteren Sm-Core-Assembly Heterooligomere in Erscheinung treten und auf welche Weise der finale Schritt, die Übertragung des Sm-Rings auf die U-snRNA, vor sich geht.

6.2.4 Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse erlauben einen Einblick in die Funktionsweise des PRMT5-Komplexes, wobei sich die hier durchgeführten Untersuchungen auf die cytoplasmatischen Methylierungs-Targets und Assoziationspartner beschränken. Unterschiedliche Analysen lassen vermuten, dass die Methyltransferase PRMT5 auch im Zellkern agiert. Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gelang es Boisvert *et al.* mehr als 100 symmetrisch dimethylierten Proteinen aus humanen Zellen zu präzipitieren, von denen eine Reihe im Zellkern lokalisiert und als potentielle Substrate von PRMT5 in Frage kommen könnten (zusammengefasst in Boisvert *et al.*, 2003). Die bisherigen Experimente haben gezeigt, dass PRMT5 für die Interaktion mit seinem Substrat Recruitment-Faktoren wie pICln oder WD45 benötigt. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Bindung der von Boisvert identifizierten Substrate über spezifische Adapterproteine vermittelt wird, die wie pICln die symmetrische Dimethylierung ermöglichen.

7 Literaturverzeichnis

- Adinolfi, S., Bagni, C., Musco, G., Gibson, T., Mazzarella, L. and Pastore, A. (1999) Dissecting FMR1, the protein responsible for fragile X syndrome, in its structural and functional domains. *Rna*, **5**, 1248-1258.
- Aletta, J.M., Cimato, T.R. and Ettinger, M.J. (1998) Protein methylation: a signal event in post-translational modification. *Trends Biochem Sci* **23**, 89-91.
- Ashley, C.T., Sutcliffe, J.S., Kunst, C.B., Leiner, H.A., Eichler, E.E., Nelson, D.L. and Warren, S.T. (1993a) Human and murine FMR-1: alternative splicing and translational initiation downstream of the CGG-repeat. *Nat Genet*, **4**, 244-251.
- Ashley, C.T., Wilkinson, K.D., Reines, D. and Warren, S.T. (1993b) FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding. *Science*, **262**, 563-566.
- Bakker, C.E., de Diego Otero, Y., Bontekoe, C., Raghoe, P., Luteijn, T., Hoogeveen, A.T., Oostra, B.A. and Willemsen, R. (2000) Immunocytochemical and biochemical characterization of FMRP, FXR1P, and FXR2P in the mouse. *Experimental Cell Research*, **258**, 162-170.
- Bardoni, B., Sittler, A., Shen, Y. and Mandel, J.L. (1997) Analysis of domains affecting intracellular localization of the FMRP protein. *Neurobiology of Disease*, **4**, 329-336.
- Boisvert, F.M., Cote, J., Boulanger, M.C. and Richard, S. (2003) A Proteomic Analysis of Arginine-methylated Protein Complexes. *Molecular and Cellular Proteomics*, **2**, 1319-1330.
- Braddock, D.T., Baber, J.L., Levens, D. and Clore, G.M. (2002a) Molecular basis of sequence-specific single-stranded DNA recognition by KH domains: solution structure of a complex between hnRNP K KH3 and single-stranded DNA. *Embo J*, **21**, 3476-3485.
- Braddock, D.T., Louis, J.M., Baber, J.L., Levens, D. and Clore, G.M. (2002b) Structure and dynamics of KH domains from FBP bound to single-stranded DNA. *Nature*, **415**, 1051-1056.
- Brahms, H., Meheus, L., de Brabandere, V., Fischer, U. and Luhrmann, R. (2001a) Symmetrical dimethylation of arginine residues in spliceosomal Sm protein B/B' and the Sm-like protein LSm4, and their interaction with the SMN protein. *Rna*, **7**, 1531-1542.
- Brahms, H., Meheus, L., de Brabandere, V., Fischer, U. and Luhrmann, R. (2001b) Symmetrical dimethylation of arginine residues in spliceosomal Sm protein B/B' and the Sm-like protein LSm4, and their interaction with the SMN protein. *Rna*, **7**, 1-12.
- Brahms, H., Raymackers, J., Union, A., de Keyser, F., Meheus, L. and Luhrmann, R. (2000) The C-terminal RG dipeptide repeats of the spliceosomal Sm Proteins D1 and D3 contain symmetrical dimethylarginines, which form a major B-cell epitope for anti-Sm autoantibodies. *J Biol Chem*, **275**, 17122-17129.
- Branlant, C., Krol, A., Ebel, J.P., Lazar, E., Haendler, B. and Jacob, M. (1982) U2 RNA shares a structural domain with U1, U4, and U5 RNAs. *Embo J*, **1**, 1259-1265.
- Branscombe, T.L., Frankel, A., Lee, J.H., Cook, J.R., Yang, Z., Pestka, S. and Clarke, S. (2001) PRMT5 (Janus kinase-binding protein 1) catalyzes the formation of symmetric dimethylarginine residues in proteins. *J Biol Chem*, **276**, 32971-32976.
- Brown, V., Jin, P., Ceman, S., Darnell, J.C., O'Donnell, W.T., Tenenbaum, S.A., Jin, X., Feng, Y., Wilkinson, K.D., Keene, J.D., Darnell, R.B. and Warren, S.T. (2001) Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. *Cell*, **107**, 477-487.

- Brown, V., Small, K., Lakkis, L., Feng, Y., Gunter, C., Wilkinson, K.D. and Warren, S.T. (1998) Purified recombinant Fmrp exhibits selective RNA binding as an intrinsic property of the fragile X mental retardation protein. *J Biol Chem*, **273**, 15521-15527.
- Buhler, D., Raker, V., Luhrmann, R. and Fischer, U. (1999) Essential role for the tudor domain of SMN in spliceosomal U snRNP assembly: implications for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, **8**, 2351-2357.
- Burge, C., Tuschl, T. and Sharp, P.A. (1999) Splicing of Precursors to mRNAs by the Spliceosomes. In Atkins, J.F. (ed.), *The RNA World*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 525-560.
- Caudy, A.A., Myers, M., Hannon, G.J. and Hammond, S.M. (2002) Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes & Development*, **16**, 2491-2496.
- Ceman, S., Brown, V. and Warren, S.T. (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. and Warren, S.T. (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, W.T., Reed, M., Patton, S., Pohl, J. and Warren, S.T. (2003) Phosphorylation influences the translation state of FMRP-associated polyribosomes. *Hum Mol Genet*, **12**, 3295-3305.
- Chen, L., Yun, S.W., Seto, J., Liu, W. and 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.
- Cogoni, C. and Macino, G. (2000) Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. *Current Opinion in Genetics & Development*, **10**, 638-643.
- Comery, T.A., Harris, J.B., Willems, P.J., Oostra, B.A., Irwin, S.A., Weiler, I.J. and Greenough, W.T. (1997) Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 5401-5404.
- Corbin, F., Bouillon, M., Fortin, A., Morin, S., Rousseau, F. and Khandjian, E.W. (1997) The fragile X mental retardation protein is associated with poly(A)+ mRNA in actively translating polyribosomes. *Hum Mol Genet*, **6**, 1465-1472.
- Cummings, C.J. and Zoghbi, H.Y. (2000) Fourteen and counting: unraveling trinucleotide repeat diseases. *Hum Mol Genet*, **9**, 909-916.
- Darnell, J.C., Jensen, K.B., Jin, P., Brown, V., Warren, S.T. and Darnell, R.B. (2001) Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. *Cell*, **107**, 489-499.
- Darnell J.E. Jr, Eagle H., Sawyer T.K. (1959) The effect of cell population density on the amino acid requirements for poliovirus synthesis in HeLa cells. *J Exp Med*, **1**;110:445-50.
- De Boulle, K., Verkerk, A.J., Reyniers, E., Vits, L., Hendrickx, J., Van Roy, B., Van den Bos, F., de Graaff, E., Oostra, B.A. and Willems, P.J. (1993) A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nat Genet*, **3**, 31-35.
- Denman, R.B. (2002) Methylation of the arginine-glycine-rich region in the fragile X mental retardation protein FMRP differentially affects RNA binding. *Cell Mol Biol Lett*, **7**, 877-883.
- Devys, D., Lutz, Y., Rouyer, N., Belloq, J.P. and Mandel, J.L. (1993) The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. *Nat Genet*, **4**, 335-340.

- Dignam, J.D., Lebovitz, R.M. and Roeder, R.G. (1983) Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res*, **11**, 1475-1489.
- Dolzhanskaya, N., Sung, Y.J., Conti, J., Currie, J.R. and Denman, R.B. (2003) The fragile X mental retardation protein interacts with U-rich RNAs in a yeast three-hybrid system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **305**, 434-441.
- Dube, M., Huot, M.E. and Khandjian, E.W. (2000) Muscle specific fragile X related protein 1 isoforms are sequestered in the nucleus of undifferentiated myoblast. *BMC Genet*, **1**, 4.
- Eberhart, D.E., Malter, H.E., Feng, Y. and Warren, S.T. (1996) The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals. *Hum Mol Genet*, **5**, 1083-1091.
- Eichler, E.E., Richards, S., Gibbs, R.A. and Nelson, D.L. (1993) Fine structure of the human FMR1 gene. *Hum Mol Genet*, **2**, 1147-1153.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes & Development*, **15**, 188-200.
- Feng, Y., Absher, D., Eberhart, D.E., Brown, V., Malter, H.E. and Warren, S.T. (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, C.A., Eberhart, D.E., Yi, H., Warren, S.T. and Hersch, S.M. (1997b) Fragile X mental retardation protein: nucleocytoplasmic shuttling and association with somatodendritic ribosomes. *J Neurosci*, **17**, 1539-1547.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-811.
- Fisch, G.S., Hao, H.K., Bakker, C. and Oostra, B.A. (1999) Learning and memory in the FMR1 knockout mouse. *American Journal of Medical Genetics*, **84**, 277-282.
- Fischer, U., Huber, J., Boelens, W.C., Mattaj, I.W. and Luhrmann, R. (1995) The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell*, **82**, 475-483.
- Fischer, U., Liu, Q. and Dreyfuss, G. (1997) The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. *Cell*, **90**, 1023-1029.
- Fischer, U., Sumpter, V., Sekine, M., Satoh, T. and Luhrmann, R. (1993) Nucleo-cytoplasmic transport of U snRNP: definition of a nuclear location signal in the Sm core domain that binds a transport receptor independently of the m3G cap. *Embo J*, **12**, 573-583.
- Franke, P., Leboyer, M., Gansicke, M., Weiffenbach, O., Biancalana, V., Cornillet-Lefebvre, P., Croquette, M.F., Froster, U., Schwab, S.G., Poustka, F., Hautzinger, M. and Maier, W. (1998) Genotype-phenotype relationship in female carriers of the premutation and full mutation of FMR-1. *Psychiatry Research*, **80**, 113-127.
- Fridell, R.A., Benson, R.E., Hua, J., Bogerd, H.P. and Cullen, B.R. (1996) A nuclear role for the Fragile X mental retardation protein. *Embo J*, **15**, 5408-5414.
- Friesen, W.J., Massenet, S., Paushkin, S., Wyce, A. and Dreyfuss, G. (2001a) SMN, the product of the spinal muscular atrophy gene, binds preferentially to dimethylarginine-containing protein targets. *Mol Cell*, **7**, 1111-1117.
- Friesen, W.J., Paushkin, S., Wyce, A., Massenet, S., Pesiridis, G.S., Van Duyne, G., Rappsilber, J., Mann, M. and Dreyfuss, G. (2001b) The methylosome, a 20S complex containing JBP1 and pICln, produces dimethylarginine-modified Sm proteins. *Mol Cell Biol*, **21**, 8289-8300.
- Friesen, W.J., Paushkin, S., Wyce, A., Massenet, S., Pesiridis, G.S., Van-Duyne, G., Rappsilber, J., Mann, M. and Dreyfuss, G. (2001c) The methylosome, a 20S complex

- containing JBP1 and pICln, produces dimethylarginine-modified Sm proteins. *Mol Cell Biol*, **21**, 8289-8300.
- Friesen, W.J., Wyce, A., Paushkin, S., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M. and Dreyfuss, G. (2002) A novel WD repeat protein component of the methylosome binds Sm proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**, 8243-8247.
- Garcia-Higuera, I., Fenoglio, J., Li, Y., Lewis, C., Panchenko, M.P., Reiner, O., Smith, T.F. and Neer, E.J. (1996) Folding of proteins with WD-repeats: comparison of six members of the WD-repeat superfamily to the G protein beta subunit. *Biochemistry*, **35**, 13985-13994.
- Gary, J.D. and Clarke, S. (1998) RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, **61**, 65-131.
- Hannon, G.J. (2002) RNA interference. *Nature*, **418**, 244-251.
- Harlow, E. and Lane, D.P. (1988) *Antibodies. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Harrison, C.J., Jack, E.M., Allen, T.D. and Harris, R. (1983) The fragile X: a scanning electron microscope study. *Journal of Medical Genetics*, **20**, 280-285.
- Huber, J., Dickmanns, A. and Luhrmann, R. (2002) The importin-beta binding domain of snurportin1 is responsible for the Ran- and energy-independent nuclear import of spliceosomal U snRNP in vitro. *J Cell Biol*, **156**, 467-479.
- Hummel, T., Krukkert, K., Roos, J., Davis, G. and Klambt, C. (2000) Drosophila Futsch/22C10 is a MAP1B-like protein required for dendritic and axonal development. *Neuron*, **26**, 357-370.
- Hutvagner, G. and Zamore, P.D. (2002) RNAi: nature abhors a double-strand. *Current Opinion in Genetics & Development*, **12**, 225-232.
- Imbert, G., Feng, Y., Nelson, D.L., Warren, S.T. and Mandel, J.L. (1998) FMR1 and mutations in fragile X syndrome: molecular biology, biochemistry and genetics. In Warren, S.T. (ed.), *Genetic Instabilities and Hereditary Neurological Disorders*. Academic Press, San Diego, USA, pp. 27-53.
- Innis, M.A. and Gelfand, D.H. (1990) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego.
- Ishizuka, A., Siomi, M.C. and Siomi, H. (2002) A Drosophila fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins. *Genes & Development*, **16**, 2497-2508.
- Jans, D.A. (1995) The regulation of protein transport to the nucleus by phosphorylation. *The Biochemical Journal*, **311** (Pt 3), 705-716.
- Jurica, M.S. and Moore, M.J. (2003) Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Molecular Cell*, **12**, 5-14.
- Kambach, C., Walke, S. and Nagai, K. (1999a) Structure and assembly of the spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein particles. *Curr Opin Struct Biol*, **9**, 222-230.
- Kambach, C., Walke, S., Young, R., Avis, J.M., de la Fortelle, E., Raker, V.A., Luhrmann, R., Li, J. and Nagai, K. (1999b) Crystal structures of two Sm protein complexes and their implications for the assembly of the spliceosomal snRNP. *Cell*, **96**, 375-387.
- Kastner, B., Bach, M. and Luhrmann, R. (1990) Electron microscopy of small nuclear ribonucleoprotein (snRNP) particles U2 and U5: evidence for a common structure-determining principle in the major U snRNP family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 1710-1714.
- Keniry, M.A. Quadruplex structures in nucleic acids. *Biopolymers*, **56**, 123-146.
- Khandjian, E.W., Corbin, F., Woerly, S. and Rousseau, F. (1996) The fragile X mental retardation protein is associated with ribosomes. *Nat Genet*, **12**, 91-93.
- Khandjian, E.W., Fortin, A., Thibodeau, A., Tremblay, S., Cote, F., Devys, D., Mandel, J.L. and Rousseau, F. (1995) A heterogeneous set of FMR1 proteins is widely distributed in mouse tissues and is modulated in cell culture. *Hum Mol Genet*, **4**, 783-789.

- Kiledjian, M. and Dreyfuss, G. (1992) Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *Embo J*, **11**, 2655-2664.
- Kim, J.H., Hahm, B., Kim, Y.K., Choi, M. and Jang, S.K. (2000) Protein-protein interaction among hnRNPs shuttling between nucleus and cytoplasm. *Journal of Molecular Biology*, **298**, 395-405.
- Kim-Ha, J., Kerr, K. and Macdonald, P.M. (1995) Translational regulation of oskar mRNA by bruno, an ovarian RNA-binding protein, is essential. *Cell*, **81**, 403-412.
- Kohler, G. and Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**, 495-497.
- Kooy, R.F., D-Hooge, R., Reyniers, E., Bakker, C.E., Nagels, G., De-Bouille, K., Storm, K., Clincke, G., De-Deyn, P.P., Oostra, B.A. and Willems, P.J. (1996) Transgenic mouse model for the fragile X syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, **64**, 241-245.
- Kramer, A. (1996) The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Annu Rev Biochem*, **65**, 367-409.
- La-Spada, A.R. and Taylor, J.P. (2003) Polyglutamines placed into context. *Neuron*, **38**, 681-684.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Laggerbauer, B., Ostareck, D., Keidel, E.M., Ostareck-Lederer, A. and Fischer, U. (2001) Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. *Hum Mol Genet*, **10**, 329-338.
- Lefebvre, S., Burglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Bulet, P., Viollet, L., Benichou, B., Cruaud, C., Millasseau, P., Zeviani, M. and et al. (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy- determining gene. *Cell*, **80**, 155-165.
- Lefebvre, S., Bulet, P., Liu, Q., Bertrand, S., Clermont, O., Munnich, A., Dreyfuss, G. and Melki, J. (1997) Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nat Genet*, **16**, 265-269.
- Lewis, H.A., Musunuru, K., Jensen, K.B., Edo, C., Chen, H., Darnell, R.B. and Burley, S.K. (2000) Sequence-specific RNA binding by a Nova KH domain: implications for paraneoplastic disease and the fragile X syndrome. *Cell*, **100**, 323-332.
- Li, Z., Zhang, Y., Ku, L., Wilkinson, K.D., Warren, S.T. and Feng, Y. (2001) The fragile X mental retardation protein inhibits translation via interacting with mRNA. *Nucleic Acids Res*, **29**, 2276-2283.
- Liu, Q. and Dreyfuss, G. (1996) A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *Embo J*, **15**, 3555-3565.
- Liu, Z., Luyten, I., Bottomley, M.J., Messias, A.C., Houngninou-Molango, S., Sprangers, R., Zanier, K., Kramer, A. and Sattler, M. (2001) Structural basis for recognition of the intron branch site RNA by splicing factor 1. *Science*, **294**, 1098-1102.
- Lorson, C.L. and Androphy, E.J. (2000) An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN. *Hum Mol Genet*, **9**, 259-265.
- Lorson, C.L., Hahnen, E., Androphy, E.J. and Wirth, B. (1999) A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 6307-6311.
- Lubs, H.A. (1969) A marker X chromosome. *American Journal of Human Genetics*, **21**, 231-244.
- Lupas, A. (1996) Coiled coils: new structures and new functions. *Trends in Biochemical Sciences*, **21**, 375-382.
- Macdonald, P.M. and Smibert, C.A. (1996) Translational regulation of maternal mRNAs. *Curr Opin Genet Dev*, **6**, 403-407.

- Martin, J.P., Bell, J. (1943) A pedigree of mental defect showing sex linkage. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, **6**, 154-156.
- Matera, A.G. and Frey, M.R. (1998) Coiled bodies and gems: Janus or gemini? *Am J Hum Genet*, **63**, 317-321.
- Mattaj, I.W. (1986) Cap trimethylation of U snRNA is cytoplasmic and dependent on U snRNP protein binding. *Cell*, **46**, 905-911.
- Mattaj, I.W. (1988) U snRNP assembly und transport. In Birnstiel, M. (ed.), *Structure and function of major and minor small nuclear ribonucleoprotein particles*. Springer Verlag, Berlin/NewYork, pp. 100-114.
- Mazroui, R., Huot, M.E., Tremblay, S., Boilard, N., Labelle, Y. and Khandjian, E.W. (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. and Khandjian, E.W. (2002) Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression. *Hum Mol Genet*, **11**, 3007-3017.
- McBride, A.E. and Silver, P.A. (2001) State of the arg: protein methylation at arginine comes of age. *Cell*, **106**, 5-8.
- Meister, G. (2002) Biogenese der spleißosomalen U snRNP: Charakterisierung eines faktorvermittelten Zusammenlagerungsprozesses von RNA-Protein-Komplexen. Munich. Dissertation
- Meister, G., Buhler, D., Pillai, R., Lottspeich, F. and Fischer, U. (2001a) A multiprotein complex mediates the ATP-dependent assembly of spliceosomal U snRNP. *Nature Cell Biology*, **3**, 945-949.
- Meister, G., Eggert, C., Buhler, D., Brahm, H., Kambach, C. and Fischer, U. (2001b) Methylation of Sm proteins by a complex containing PRMT5 and the putative U snRNP assembly factor pICln. *Curr Biol*, **11**, 1990-1994.
- Meister, G., Eggert, C. and Fischer, U. (2002) SMN-mediated assembly of RNPs: a complex story. *Trends Cell Biol*, **12**, 472-478.
- Meister, G. and Fischer, U. (2002) Assisted RNP assembly: SMN and PRMT5 complexes cooperate in the formation of spliceosomal UsnRNP. *Embo Journal*, **21**, 5853-5863.
- Meixner, A., Haverkamp, S., Wassle, H., Fuhrer, S., Thalhammer, J., Kropf, N., Bittner, R.E., Lassmann, H., Wiche, G. and Propst, F. (2000) MAP1B is required for axon guidance and is involved in the development of the central and peripheral nervous system. *The J Cell Biol*, **151**, 1169-1178.
- Monani, U.R., Lorson, C.L., Parsons, D.W., Prior, T.W., Androphy, E.J., Burghes, A.H. and McPherson, J.D. (1999) A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum Mol Genet*, **8**, 1177-1183.
- Muckenthaler, M., Gray, N.K. and Hentze, M.W. (1998) IRP-1 binding to ferritin mRNA prevents the recruitment of the small ribosomal subunit by the cap-binding complex eIF4F. *Molecular Cell*, **2**, 383-388.
- Municio, M.M., Lozano, J., Sanchez, P., Moscat, J. and Diaz-Meco, M.T. (1995) Identification of heterogeneous ribonucleoprotein A1 as a novel substrate for protein kinase C zeta. *J Biol Chem*, **270**, 15884-15891.
- Munsat, T.L. and Davies, K.E. (1992) International SMA consortium meeting. (1992, Bonn, Germany). *Neuromuscul Disord*, **2**, 423-428.
- Musco, G., Kharrat, A., Stier, G., Fraternali, F., Gibson, T.J., Nilges, M. and Pastore, A. (1997) The solution structure of the first KH domain of FMR1, the protein responsible for the fragile X syndrome. *Nat Struct Biol*, **4**, 712-716.
- O'Donnell, W.T. and Warren, S.T. (2002) A decade of molecular studies of fragile X syndrome. *Annu Rev Neurosci*, **25**, 315-338.

- Olsen, P.H. and Ambros, V. (1999) The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Developmental Biology*, **216**, 671-680.
- Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D.H., Cans, C., Neubauer, G., Bomsztyk, K., Superti-Furga, G. and Hentze, M.W. (2002) c-Src-mediated phosphorylation of hnRNP K drives translational activation of specifically silenced mRNAs. *Mol Cell Biol*, **22**, 4535-4543.
- Paulmichl, M., Li, Y., Wickman, K., Ackerman, M., Peralta, E. and Clapham, D. (1992) New mammalian chloride channel identified by expression cloning. *Nature*, **356**, 238-241.
- Pearn, J. (1978) Incidence, prevalence and gene frequency studies of chronic childhood spinal muscular atrophy. *J Med Genet*, **10**, 260-265.
- Pearn, J.H. (1973) The gene frequency of acute Werdnig-Hoffmann disease (SMA type 1). A total population survey in North-East England. *J Med Genet*, **10**, 260-265.
- Pollack, B.P., Kotenko, S.V., He, W., Izotova, L.S., Barnoski, B.L. and Pestka, S. (1999) The human homologue of the yeast proteins Skb1 and Hsl7p interacts with Jak kinases and contains protein methyltransferase activity. *J Biol Chem*, **274**, 31531-31542.
- Ponting, C.P. (1997) Tudor domains in proteins that interact with RNA. *Trends Biochem Sci*, **22**, 51-52.
- Preiss, T. and Hentze, M.W. (1999) From factors to mechanisms: translation and translational control in eukaryotes. *Current Opinion in Genetics & Development*, **9**, 515-521.
- Pu, W.T., Krapivinsky, G.B., Krapivinsky, L. and Clapham, D.E. (1999) pICln inhibits snRNP biogenesis by binding core spliceosomal proteins. *Mol Cell Biol*, **19**, 4113-4120.
- Rajpurohit, R., Paik, W.K. and Kim, S. (1994) Effect of enzymic methylation of heterogeneous ribonucleoprotein particle A1 on its nucleic-acid binding and controlled proteolysis. *The Biochemical Journal*, **304** (Pt 3), 903-909.
- Raker, V.A., Hartmuth, K., Kastner, B. and R, L. (1999) Spliceosomal U snRNP Core Assembly: Sm Proteins Assemble onto an Sm Site RNA Nonanucleotide in a Specific and Thermodynamically Stable Manner. *Mol Cell Biol*, **19**, 6554-6565.
- Raker, V.A., Plessel, G. and Luhrmann, R. (1996) The snRNP core assembly pathway: identification of stable core protein heteromeric complexes and an snRNP subcore particle in vitro. *Embo J*, **15**, 2256-2269.
- Ramos, A., Hollingworth, D. and Pastore, A. (2003a) G-quartet-dependent recognition between the FMRP RGG box and RNA. *Rna (New York, N.Y.)*, **9**, 1198-1207.
- Ramos, A., Hollingworth, D. and Pastore, A. (2003b) The role of a clinically important mutation in the fold and RNA-binding properties of KH motifs. *Rna (New York, N.Y.)*, **9**, 293-298.
- Rho, J., Choi, S., Seong, Y.R., Cho, W.K., Kim, S.H. and Im, D.S. (2001) Prmt5, which forms distinct homo-oligomers, is a member of the protein-arginine methyltransferase family. *J Biol Chem*, **276**, 11393-11401.
- Riddle, J.E., Cheema, A., Sobesky, W.E., Gardner, S.C., Taylor, A.K., Pennington, B.F. and Hagerman, R.J. (1998) Phenotypic involvement in females with the FMR1 gene mutation. *American Journal of Mental Retardation : Ajmr*, **102**, 590-601.
- Roberts, D.G., Chavez, J. and Court, S.D.M. (1970) The genetic component in child mortality. *Arch. Dis. Child*, **45**, 33-38.
- Rogers, J. and Munro, H. (1987) Translation of ferritin light and heavy subunit mRNAs is regulated by intracellular chelatable iron levels in rat hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **84**, 2277-2281.
- Roos, J., Hummel, T., Ng, N., Klambt, C. and Davis, G.W. (2000) *Drosophila* Futsch regulates synaptic microtubule organization and is necessary for synaptic growth. *Neuron*, **26**, 371-382.

- Rudelli, R.D., Brown, W.T., Wisniewski, K., Jenkins, E.C., Laure-Kamionowska, M., Connell, F. and Wisniewski, H.M. (1985) Adult fragile X syndrome. Clinico-neuropathologic findings. *Acta Neuropathol.*, **67**, 289-295.
- Rutkowski, D.T. and Kaufman, R.J. (2003) All roads lead to ATF4. *Dev Cell*, **4**, 442-444.
- Salgado-Garrido, J., Bragado-Nilsson, E., Kandels-Lewis, S. and Seraphin, B. (1999) Sm and Sm-like proteins assemble in two related complexes of deep evolutionary origin. *Embo J*, **18**, 3451-3462.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanchez-Olea, R., Emma, F., Coghlan, M. and Strange, K. (1998) Characterization of pICln phosphorylation state and a pICln-associated protein kinase. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1381**, 49-60.
- Schaeffer, C., Bardoni, B., Mandel, J.L., Ehresmann, B., Ehresmann, C. and Moine, H. (2001) The fragile X mental retardation protein binds specifically to its mRNA via a purine quartet motif. *Embo J*, **20**, 4803-4813.
- Schenck, A., Bardoni, B., Moro, A., Bagni, C. and Mandel, J.L. (2001) A highly conserved protein family interacting with the fragile X mental retardation protein (FMRP) and displaying selective interactions with FMRP-related proteins FXR1P and FXR2P. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 8844-8849.
- Schlessinger, J. and Lemmon, M.A. (2003) SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling. *Sci STKE*, **2003**, RE12.
- Schrank, B., Gotz, R., Gunnarsen, J.M., Ure, J.M., Toyka, K.V., Smith, A.G. and Sendtner, M. (1997) Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 9920-9925.
- Shaulian, E. and Karin, M. (2002) AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nature Cell Biology*, **4**, E131-136.
- Shen, E.C., Henry, M.F., Weiss, V.H., Valentini, S.R., Silver, P.A. and Lee, M.S. (1998) Arginine methylation facilitates the nuclear export of hnRNP proteins. *Genes & Development*, **12**, 679-691.
- Sherman, S.L., Morton, N.E., Jacobs, P.A. and Turner, G. (1984) The marker (X) syndrome: a cytogenetic and genetic analysis. *Annals of Human Genetics*, **48 (Pt 1)**, 21-37.
- Singh, R. and Reddy, R. (1989) Gamma-monomethyl phosphate: a cap structure in spliceosomal U6 small nuclear RNA. *Proc Nat Acad Sci USA*, **86**, 8280-8283.
- Siomi, H., Choi, M., Siomi, M.C., Nussbaum, R.L. and 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, H., Siomi, M.C., Nussbaum, R.L. and Dreyfuss, G. (1993) The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. *Cell*, **74**, 291-298.
- Siomi, M.C., Higashijima, K., Ishizuka, A. and Siomi, H. (2002) Casein kinase II phosphorylates the fragile X mental retardation protein and modulates its biological properties. *Mol Cell Biol*, **22**, 8438-8447.
- Siomi, M.C., Siomi, H., Sauer, W.H., Srinivasan, S., Nussbaum, R.L. and Dreyfuss, G. (1995) FXR1, an autosomal homolog of the fragile X mental retardation gene. *Embo J*, **14**, 2401-2408.
- Siomi, M.C., Zhang, Y., Siomi, H. and Dreyfuss, G. (1996) Specific sequences in the fragile X syndrome protein FMR1 and the FXR proteins mediate their binding to 60S ribosomal subunits and the interactions among them. *Mol Cell Biol*, **16**, 3825-3832.

- Sittler, A., Devys, D., Weber, C. and Mandel, J.L. (1996) Alternative splicing of exon 14 determines nuclear or cytoplasmic localisation of *fmr1* protein isoforms. *Hum Mol Genet*, **5**, 95-102.
- Sobesky, W.E., Taylor, A.K., Pennington, B.F., Bennetto, L., Porter, D., Riddle, J. and Hagerman, R.J. (1996) Molecular/clinical correlations in females with fragile X. *American Journal of Medical Genetics*, **64**, 340-345.
- Sondek, J., Bohm, A., Lambright, D.G., Hamm, H.E. and Sigler, P.B. (1996) Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1A resolution. *Nature*, **379**, 369-374.
- Stark, H., Dube, P., Luhrmann, R. and Kastner, B. (2001) Arrangement of RNA and proteins in the spliceosomal U1 small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nature*, **409**, 539-542.
- Steyaert, J., Borghgraef, M., Legius, E. and Fryns, J.P. (1996) Molecular-intelligence correlations in young fragile X males with a mild CGG repeat expansion in the FMR1 gene. *American Journal of Medical Genetics*, **64**, 274-277.
- Stutz, A., Conne, B., Huarte, J., Gubler, P., Volkel, V., Flandin, P. and Vassalli, J.D. (1998) Masking, unmasking, and regulated polyadenylation cooperate in the translational control of a dormant mRNA in mouse oocytes. *Genes & Development*, **12**, 2535-2548.
- Sutcliffe, J.S., Nelson, D.L., Zhang, F., Pieretti, M., Caskey, C.T., Saxe, D. and Warren, S.T. (1992) DNA methylation represses FMR-1 transcription in fragile X syndrome. *Hum Mol Genet*, **1**, 397-400.
- Sutherland, G.R. (1977) Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. *Science*, **197**, 265-266.
- Tamanini, F., Bontekoe, C., Bakker, C.E., van Unen, L., Anar, B., Willemsen, R., Yoshida, M., Galjaard, H., Oostra, B.A. and Hooegeveen, A.T. (1999a) Different targets for the fragile X-related proteins revealed by their distinct nuclear localizations. *Hum Mol Genet*, **8**, 863-869.
- Tamanini, F., Kirkpatrick, L.L., Schonkeren, J., van Unen, L., Bontekoe, C., Bakker, C., Nelson, D.L., Galjaard, H., Oostra, B.A. and Hooegeveen, A.T. (2000) The fragile X-related proteins FXR1P and FXR2P contain a functional nucleolar-targeting signal equivalent to the HIV-1 regulatory proteins. *Hum Mol Genet*, **9**, 1487-1493.
- Tamanini, F., Meijer, N., Verheij, C., Willems, P.J., Galjaard, H., Oostra, B.A. and Hooegeveen, A.T. (1996) FMRP is associated to the ribosomes via RNA. *Hum Mol Genet*, **5**, 809-813.
- Tamanini, F., Van Unen, L., Bakker, C., Sacchi, N., Galjaard, H., Oostra, B.A. and Hooegeveen, A.T. (1999b) Oligomerization properties of fragile-X mental-retardation protein (FMRP) and the fragile-X-related proteins FXR1P and FXR2P. *Biochem J*, **343 Pt 3**, 517-523.
- Tang, J., Gary, J.D., Clarke, S. and Herschman, H.R. (1998) PRMT 3, a type I protein arginine N-methyltransferase that differs from PRMT1 in its oligomerization, subcellular localization, substrate specificity, and regulation. *J Biol Chem*, **273**, 16935-16945.
- Toro, I., Thore, S., Mayer, C., Basquin, J., Seraphin, B. and Suck, D. (2001) RNA binding in an Sm core domain: X-ray structure and functional analysis of an archaeal Sm protein complex. *Embo J*, **20**, 2293-2303.
- Valentini, S.R., Weiss, V.H. and Silver, P.A. (1999) Arginine methylation and binding of Hrp1p to the efficiency element for mRNA 3'-end formation. *Rna (New York, N.Y.)*, **5**, 272-280.
- Van-Dam, D., D-Hooge, R., Hauben, E., Reyniers, E., Gantois, I., Bakker, C.E., Oostra, B.A., Kooy, R.F. and De-Deyn, P.P. (2000) Spatial learning, contextual fear conditioning and conditioned emotional response in *Fmr1* knockout mice. *Behavioural Brain Research*, **117**, 127-136.

- Vance, V. and Vaucheret, H. (2001) RNA silencing in plants--defense and counterdefense. *Science*, **292**, 2277-2280.
- Verheij, C., Bakker, C.E., de Graaff, E., Keulemans, J., Willemsen, R., Verkerk, A.J., Galjaard, H., Reuser, A.J., Hoogeveen, A.T. and Oostra, B.A. (1993) Characterization and localization of the FMR-1 gene product associated with fragile X syndrome. *Nature*, **363**, 722-724.
- Verheij, C., de-Graaff, E., Bakker, C.E., Willemsen, R., Willems, P.J., Meijer, N., Galjaard, H., Reuser, A.J., Oostra, B.A. and Hoogeveen, A.T. (1995) Characterization of FMR1 proteins isolated from different tissues. *Hum Mol Genet*, **4**, 895-901.
- Verkerk, A.J., Pieretti, M., Sutcliffe, J.S., Fu, Y.H., Kuhl, D.P., Pizzuti, A., Reiner, O., Richards, S., Victoria, M.F., Zhang, F.P. and et al. (1991) Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell*, **65**, 905-914.
- Wall, M.A., Coleman, D.E., Lee, E., Iniguez-Lluhi, J.A., Posner, B.A., Gilman, A.G. and Sprang, S.R. (1995) The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2. *Cell*, **83**, 1047-1058.
- Wan, L., Dockendorff, T.C., Jongens, T.A. and Dreyfuss, G. (2000) Characterization of dFMR1, a *Drosophila melanogaster* homolog of the fragile X mental retardation protein. *Mol Cell Biol*, **20**, 8536-8547.
- Wang, H., Iacoangeli, A., Popp, S., Muslimov, I.A., Imataka, H., Sonenberg, N., Lomakin, I.B. and Tiedge, H. (2002) Dendritic BC1 RNA: functional role in regulation of translation initiation. *The Journal of Neuroscience : the Official Journal of the Society For Neuroscience*, **22**, 10232-10241.
- Wang, L.L., Richard, S. and Shaw, A.S. (1995) P62 association with RNA is regulated by tyrosine phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, **270**, 2010-2013.
- Warren, S.T. and Sherman, S.L. (2001) The fragile X syndrome. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, **8**, 1257-1289.
- Weiss, V.H., McBride, A.E., Soriano, M.A., Filman, D.J., Silver, P.A. and Hogle, J.M. (2000) The structure and oligomerization of the yeast arginine methyltransferase, Hmt1. *Nature Structural Biology*, **7**, 1165-1171.
- Williamson, J.R., Raghuraman, M.K. and Cech, T.R. (1989) Monovalent cation-induced structure of telomeric DNA: the G-quartet model. *Cell*, **59**, 871-880.
- Yang, H., Moss, M.L., Lund, E. and Dahlberg, J.E. (1992) Nuclear processing of the 3'-terminal nucleotides of pre-U1 RNA in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol Cell Biol*, **12**, 1553-1560.
- Zalfa, F., Giorgi, M., Primerano, B., Moro, A., Di Penta, A., Reis, S., Oostra, B. and Bagni, C. (2003) The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses. *Cell*, **112**, 317-327.
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A. and Bartel, D.P. (2000) RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, **101**, 25-33.
- Zeller, R., Nyffenegger, T. and De Robertis, E.M. (1983) Nucleocytoplasmic distribution of snRNP and stockpiled snRNA-binding proteins during oogenesis and early development in *Xenopus laevis*. *Cell*, **32**, 425-434.
- Zeng, Y. and Cullen, B.R. (2002) RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm. *Rna*, **8**, 855-860.
- Zhang, X., Zhou, L. and Cheng, X. (2000) Crystal structure of the conserved core of protein arginine methyltransferase PRMT3. *Embo J*, **19**, 3509-3519.
- Zhang, Y., O'Connor, J.P., Siomi, M.C., Srinivasan, S., Dutra, A., Nussbaum, R.L. and Dreyfuss, G. (1995) The fragile X mental retardation syndrome protein interacts with novel homologs FXR1 and FXR2. *Embo J*, **14**, 5358-5366.

Zhang, Y.Q., Bailey, A.M., Matthies, H.J., Renden, R.B., Smith, M.A., Speese, S.D., Rubin, G.M. and Broadie, K. (2001) Drosophila fragile X-related gene regulates the MAP1B homolog Futsch to control synaptic structure and function. *Cell*, **107**, 591-603.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

AdOx	Adenosine-2', 3'-dialdehyde
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	bovines Serumalbumin
Ci	Curie (1 Ci = $3,7 \times 10^{10}$ Bq)
cpm	gezählte Zerfälle pro Minute (engl.: <i>counts per minute</i>)
DABCO	1,4-Diazabicyclo-[2.2.2]-octan
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTE	1,4-Dithioerythrit
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
EST	exprimierter Sequenzabschnitt (engl.: <i>expressed sequence tag</i>)
Fa.	Firma
FCS	fetales Kälberserum (engl.: <i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	bei Zentrifugationen: einfache Erdbeschleunigung ($9,81 \text{ ms}^{-2}$)
m^7GpppG	7-Methyl-guanylyl-(5'-5')-guanosintriphosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HAT	Histon-Acetyltransferase
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
hnRNP	heteronukleäres Ribonucleoproteinpartikel (heterogeneous nuclear ribonucleo-protein-particle)
IgG	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
KAc	Kaliumacetat
LiAc	Lithiumacetat
M	mol dm^{-3}

MALDI	Matrix-unterstützte Laserdesorption/Ionisation (engl.: <i>matrix assisted laser desorption/ionisation</i>)
MgAc	Magnesiumacetat
min	Minute(n)
MPI	Max-Planck-Institut
mRNA	Boten-RNA (engl.: <i>messenger RNA</i>)
NaAc	Natriumacetat
NCBI	National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nih.gov)
NMR	magnetische Kernresonanz (engl.: <i>nuclear magnetic resonance</i>)
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl.: <i>phosphate buffered saline</i>)
pCp	Cytidin-3'-5'-bisphosphat
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVA	Polyvinylalkohol
RACE	schnelle Amplifikation von cDNA-Enden (engl.: <i>rapid amplification of cDNA ends</i>)
RNP	Ribonucleoproteinpartikel
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SMA	spinale Muskelatrophie
snRNA	kleine nukleäre RNA (engl.: <i>small nuclear RNA</i>)
snRNP	kleines nukleäres RNP (engl.: <i>small nuclear RNP</i>)
snoRNP	kleines nukleoläres RNP (engl.: <i>small nucleolar RNP</i>)
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat
u	Enzymeinheit, <i>unit</i>
UTR	untranslatierte Region
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Chlor-4-Brom-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

8.2 Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

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(4):329-38.

8.3 Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei allen Personen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Utz Fischer für die Überlassung des Themas, fachliche Anleitung, sowie seine Diskussionsbereitschaft in allen Fragen.

Besonders verbunden bin ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „RNA-Metabolismus und neuronale Krankheiten“, sowie der Arbeitsgruppen Hengst und Melchior für die gute Zusammenarbeit und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Speziell gilt mein Dank noch:

Dr. Bernhard Lagerbauer, für die Hilfestellung in allem Fachlichen und allen anderen Lebenslagen, sowie die nette Arbeitsatmosphäre in unserem Labor L4.

Dr. Oliver Plöttner für die freundschaftliche Zusammenarbeit, die zahlreichen Korrekturen und seine unendliche Geduld mit mir.

(Fast Dr.) Anabel Herr, ohne deren Freundschaft und seelische Unterstützung, über die große Entfernung hinweg, ich nicht so weit gekommen wäre.

Marta Romano für die Freundschaft in der ersten, leider kurzen Zeit. Sie hat mir geholfen, neben dem MPI auch andere „Sehenswürdigkeiten“ von München kennen zu lernen.

Alicja Baskaya für die fachliche Hilfestellung und die aufmunternden Stunden in der Zellkultur.

Prof. Dr. Christian Lehner und Dr. Henning Jacobs danke ich für die erstklassige Ausbildung und der Freude an der Forschung.

Besonderer Dank gilt meinen Freunden, die mich unterstützt, mir beigestanden und mitgelitten haben. Für die vielen zahlreichen Mails und Gespräche, welche eine willkommene Abwechslung zum Laboralltag waren.

8.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Eva-Maria Keidel
Geburtstag: 10. August 1974
Geburtsort: Oberhausen
Anschrift: Theresienstr. 124
80333 München
Familienstand: ledig

Schulbesuche

1981 – 1985 Landwehr-Grundschule Oberhausen
1985 – 1994 Heinrich-Heine-Gymnasium Oberhausen
August 1994 Allgemeine Hochschulreife

Universitäre Ausbildung

Wintersemester 1994/95 –
Sommersemester 1999 Studium der Biologie an der Universität Bayreuth
Oktober 1996 Vordiplom
Oktober 1998 Diplom
November 1998 –
August 1999 Diplomarbeit bei Prof. Dr. Christian Lehner, Lehrstuhl für Genetik
Titel: Genetische Untersuchungen an den mitotischen Cyclinen A und B

Promotion

seit September 1999 Forschungsarbeiten zur Promotion in der Arbeitsgruppe „RNA-Metabolismus und neuronale Krankheiten“ am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. Utz Fischer

8.5 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt. Ferner erkläre ich, dass diese Arbeit an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht worden ist und noch keiner anderen Stelle zur Prüfung vorgelegen hat. Teile der Arbeit sind, wie auf Seite 143 angegeben ist, veröffentlicht worden.

München, im August 2004

