

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung von *Netrin G1 (NTNG1)* als autosomales Kandidatengen für das Rett-Syndrom (RTT)

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war eine Patientin mit Rett-Syndrom (RTT), das bislang als monogene Erkrankung beschrieben wurde, die durch Mutationen im *MECP2* (Methyl CpG Bindeprotein 2) Gen verursacht wird. *MECP2* ist auf dem X-Chromosom im Abschnitt Xq28 lokalisiert. Die hier untersuchte Patientin ist Trägerin einer balancierten reziproken Translokation zwischen Chromosom 1 und Chromosom 7. Da dem gleichen Phänotyp im vorliegenden Fall somit ein unterschiedlicher, genetischer Hintergrund zu Grunde liegt, besteht die Möglichkeit, daß ein weiteres autosomales Kandidatengen für RTT existiert, das entweder auf Chromosom 1 oder Chromosom 7 lokalisiert ist.

3.1.1 Patientin mit reziproker balancierter Translokation 46,XX,t(1;7)(p13.3;q31.3) und Rett Syndrom (RTT)

Die Patientin wurde im Rahmen der Dissertation von Dr. med. Isabella Borg (Universität von Malta, MSD 06 Msida, Malta) untersucht. Sie ist die erste Tochter von gesunden, nicht blutsverwandten Eltern. Nach einer normalen Schwangerschaft und einer termingerechten, vaginalen Entbindung wurden zunächst keine Auffälligkeiten oder Dysmorphien festgestellt. Ihr Geburtsgewicht und der Kopfumfang lagen im Bereich der 90. Perzentile. Bis zum 5. Monat verlief ihre Entwicklung normal, danach zeigte sie zum ersten Mal ungewöhnliche Augenbewegungen. Mit 7 Monaten wurde sie auf Grund von anhaltenden afebrilen Krämpfen in ein Krankenhaus eingewiesen. Zu diesem Zeitpunkt zeigten sowohl Computertomographie- (CT) als auch Magnetresonanztomographie- (MRT) Untersuchungen keinen auffälligen Befund. Darüber hinaus wurde eine Chromosomenanalyse vorgenommen, bei der festgestellt wurde, daß die Patientin Trägerin einer balancierten Translokation zwischen den Chromosomen 1 und 7 mit dem Karyotyp 46,XX,t(1;7)(p22;q32) ist (Abb.3). In einer nachfolgenden

Untersuchung im Alter von 8,5 Monaten zeigte die Patientin ein gestörtes Kontaktverhalten und hatte Schwierigkeiten, den Augenkontakt aufrecht zu halten. Ihre Muskulatur war schwach ausgebildet, sie konnte weder ihren Kopf fixieren noch eigenständig sitzen. Die Biotinidase-Aktivitätsuntersuchung und die über visuelle Reizungen erzeugten Aktionspotentiale waren normal. Das Enzym Biotinidase ist für die Bereitstellung von Biotin aus Biocytin und proteingebundenem Biotin von Bedeutung. Ein Mangel an Biotinidase führt daher u. a. zu Biotinmangel, der auch geistige Behinderung verursachen kann. Im Rahmen weiterer Untersuchungen wurde ein Elektroenzephalogramm (EEG) durchgeführt, das eine abnormale Aktivität während des Schlafens zeigte. Weitere cytogenetische Analysen haben ein Angelman- oder Prader-Willi-Syndrom ausgeschlossen.

Im Alter von 2,5 Jahren wurden die CT- und MRT-Untersuchungen wiederholt und zeigten als einzige Anomalie einen leichten Rückgang bei der Myelinisierung der Axone. Im Alter von 3,5 Jahren wurden die epileptischen Anfälle mit Clobazam und Lamotrigine erfolgreich therapiert.

Mit 4 Jahren verweigerte die Patientin die Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme, und es mußte eine Magen-Sonde gelegt werden. Darüber hinaus war sie inkontinent, lief breitbeinig, unsicher und mit stets angewinkelten Ellenbogen. Die auffälligen, stereotypen Handbewegungen (Aneinanderreiben, Waschbewegungen, Klatschen, Händelutschen), die sie seit ihrem 2. Lebensjahr zeigte, waren auch in diesem Alter noch vorhanden. Ihre Sprachfähigkeiten beschränkten sich auf „Mum“ und „Dad“. Die Wachstumsentwicklung, in Bezug auf Größe und Gewicht, lag unterhalb der 3. Perzentile. Ihr Kopfumfang war im Bereich der 25. Perzentile. Sie zeigte keine weiteren Dysmorphiezeichen, und auch die körperlichen Untersuchungen ergaben Normalbefunde.

Auf Grund der geschilderten Anamnese der Patientin wurde entsprechend der diagnostischen Kriterien (Hagberg et al., 2002) die Diagnose Rett-Syndrom gestellt.

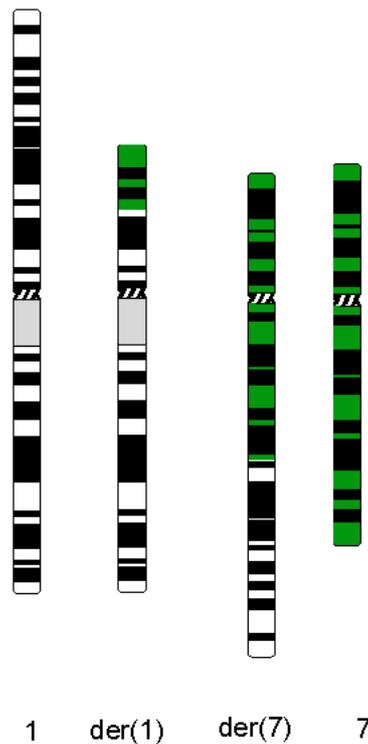


Abb. 3: **Ideogramm** der normalen Chromosomen 1 (weiß) und 7 (grün) und der derivativen Translokationschromosomen der(1) und der(7) der Patientin mit dem Karyotyp 46,XX,t(1;7)(p13.3;q31.3)

3.1.2 Physikalische Kartierung der Bruchpunkte auf den Chromosomen 1 und 7

3.1.2.1 Chromosom 7

Für die Kartierung der chromosomalen Bruchpunkte wurden Chromosomen der Patientin mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) analysiert. Die Metaphase Chromosomen aus lymphoblastoiden Zellen der Patientin wurden mit fluoreszenzmarkierten, genomischen YAC, PAC und BAC Klonen hybridisiert.

Der PAC Klon RP5-865F17 (Accession Nr. AC006010) zeigt Signale auf dem normalen Chromosom 7 und dem derivativen Chromosom 7 und kartiert somit proximal zum Bruchpunkt. Der PAC Klon RP5-902E20 (Accession Nr. AC006148) zeigt Signale auf dem normalen Chromosom 7 und dem derivativen Chromosom 1 und kartiert deshalb distal zum Bruchpunkt (diese FISH Analysen wurden im Rahmen der Dissertation von Dr. med. Isabella Borg durchgeführt). Beide Klone grenzen die Bruchpunkt-Region auf annähernd 236 Kb ein (Abb.4).

A

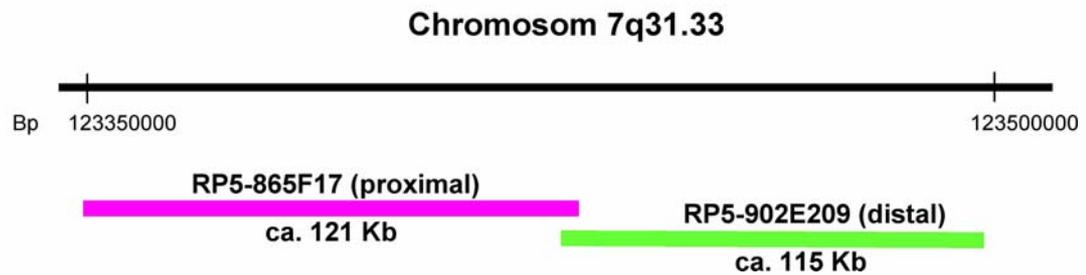


Abb.4: **Schematische Darstellung der Bruchpunktregion von Chromosom 7:** Lokalisierung des proximalen PAC Klons RP5-865F17 (AC006010) und des distalen PAC Klons RP5-902E20 (AC006148) auf Chromosom 7

Die *in silico* Analyse dieser Region mittels *Human Genome Browser* (Version Mai 2004) zeigt, daß in dieser Region keine bekannten Gene lokalisiert sind (Abb.5).

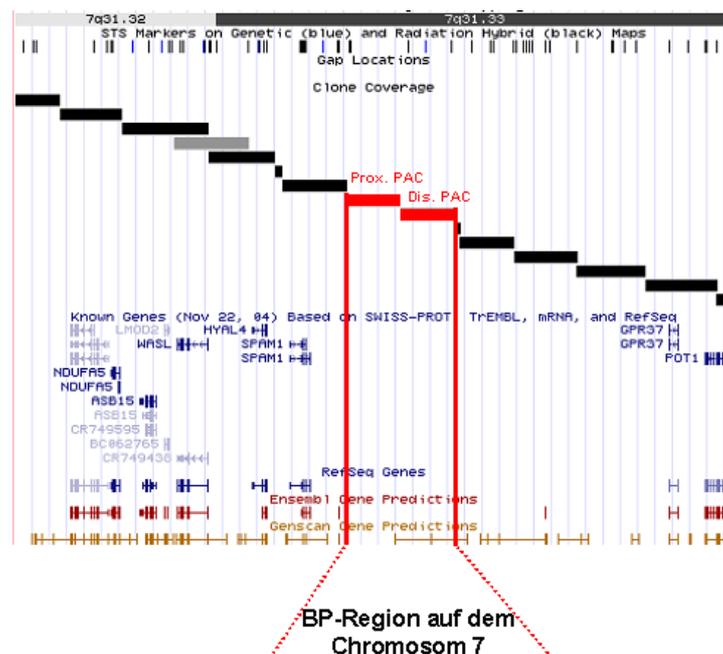
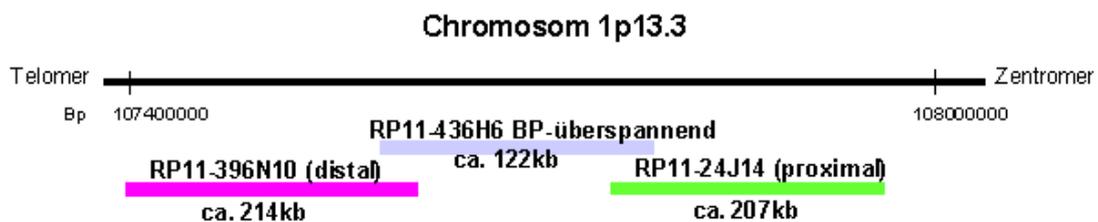


Abb.5: **Ausschnitt aus der Bruchpunkt-Region von Chromosom 7.** Der proximale PAC Klon und der distale PAC Klon sind rot hervorgehoben und die genomische Region auf dem Chromosom 7, die diese beiden PAC Klone überspannen, ist ebenfalls rot gekennzeichnet. Bekannte Gene sind in blau dargestellt.

3.1.2.2 Chromosom 1

Auf Chromosom 1 konnte neben dem proximalen BAC Klon RP11-24J14 (Accession Nr. AC016085) und dem distalen BAC Klon RP11-396N10 (Accession Nr. AL590427) der Bruchpunkt überspannende BAC Klon RP11-436H6 (Accession Nr. AL513187) identifiziert werden (Abb.6A). Er hybridisiert sowohl an das normale Chromosom 1 als auch an die derivativen Chromosomen 1 und 7 (Abb.6B). Diese FISH-Analyse wurde ebenfalls von Dr. med Isabella Borg im Rahmen ihrer Dissertation durchgeführt.

A



B

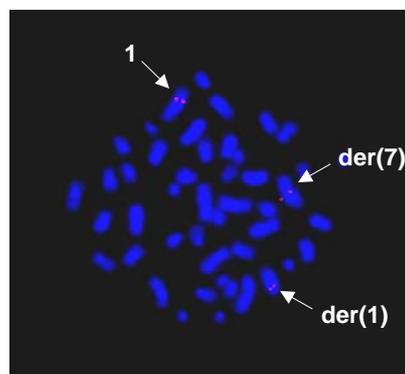


Abb.6: **A: Schematische Darstellung der Bruchpunktregion von Chromosom 1** Lokalisierung des proximalen BAC Klons RP11-24J14 (AC016085), des distalen BAC Klons RP11-396N10 (AL590427) und des Bruchpunkt-überspannenden BAC Klons RP11-436H6 (AL513187) auf Chromosom 1.

B: Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung des BAC Klons RP11-436H6 auf Metaphase-Chromosomen der Patientin. Der BAC Klon zeigt Signale auf dem normalen Chromosom 1, dem derivativen Chromosom 1 und dem derivativen Chromosom 7 und ist somit Bruchpunkt-überspannend. Die Signale sind als rote Punkte auf den Chromosomen sichtbar.

Bei der Karyotypisierung mittels Giemsa-Färbung wurde der Karyotyp zunächst als 46,XX,t(1;7)(p22;q32) festgelegt. An Hand der FISH Analysen mußte der Bruchpunkt jedoch neu definiert werden als: 46,XX,t(1;7)(p13.3;q31.3).

Da die Southern Blot Analysen zur weiteren Eingrenzung des Bruchpunktbereiches zunächst zu keinen Ergebnissen führten, wurden die FISH-Analysen für die Bruchpunktregion auf Chromosom 1 wiederholt. Die erneuten Analysen zeigten, daß der zuvor als proximal charakterisierte BAC Klon RP11-24J14 in 4 von 16 Metaphasen Bruchpunkt-überspannende Signale zeigte (Abb.7).

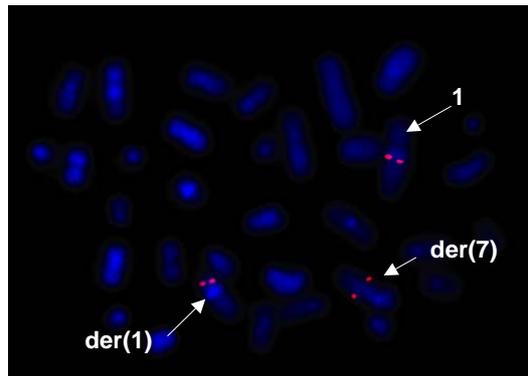


Abb.7: **Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung des BAC Klons RP11-24J14** auf Metaphase-Chromosomen der Patientin. Auch dieser BAC Klon zeigt Signale auf dem normalen Chromosom 1, dem derivativen Chromosom 1 und dem derivativen Chromosom 7 und ist somit ebenfalls Bruchpunkt-überspannend. Die Signale sind als rote Punkte auf den Chromosomen sichtbar.

Bei den übrigen Metaphasen dieser Hybridisierung waren 10 Signale proximal und 2 Signale distal. Demnach zeigen sowohl der BAC Klon RP11-436H6 als auch der BAC Klon RP11-24J14 Bruchpunkt-überspannende Signale. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß der Bruchpunkt höchstwahrscheinlich in der genomischen Sequenz lokalisiert ist, die in beiden BAC Klonen vorhanden ist. BAC Klone werden entsprechend ihrer 5' und 3' übereinstimmenden Endsequenzen einander zugeordnet. Primer die im proximalen Bereich des BAC Klons RP11-436H6 binden, binden auch im distalen Bereich des BAC Klons RP11-24J14. Dieser Bereich umfaßt ca. 30 Kb übereinstimmender Sequenz beider Klone (Abb.6A). Innerhalb dieses Bereiches muß demnach höchstwahrscheinlich der Bruchpunkt lokalisiert sein.

3.1.3 Eingrenzung des Bruchpunktbereiches auf Chromosom 1 durch Southern Blot Analyse

Mit einer weiteren Feinkartierung der Bruchpunktregion wurde festgestellt, ob spezifische Gene durch die Translokation unterbrochen werden. Auf dem Bruchpunkt überspannenden BAC Klon (RP11-436H6) von Chromosom 1 ist mit großer Wahrscheinlichkeit das *Netrin G1* Gen (*NTNG1*) unterbrochen, da dessen Exone sowohl auf dem distalen, dem Bruchpunkt-überspannenden, als auch auf dem proximalen BAC Klon vorhanden sind.

Deswegen konzentrierte sich die weitere molekulare Analyse der Bruchpunkte zunächst auf den Bruchpunktbereich von Chromosom 1, und die Auswahl der Proben für die Southern Blot-Hybridisierungen beschränkte sich auf die Bruchpunkt-überspannenden BAC Klone RP11-436H6 und RP11-24J14.

Bei der Darstellung der FISH Ergebnisse wurde bereits erwähnt, daß der BAC Klon RP11-24J14 in einigen Metaphasen Bruchpunkt-überspannende Signale auf den beiden derivativen Chromosomen 1 und 7 und auf dem normalen Chromosom 1 gezeigt hat. Dieser BAC Klon besteht aus acht ungeordneten Sequenzabschnitten, seine Sequenz ist jedoch identisch zu RP11-436H6 und RP11-270C12 (Accession Nr. AC114491). Deswegen ist es möglich, im folgenden für alle weiteren Experimente die Sequenz von RP11-270C12 als Referenzsequenz zu verwenden.

Die Proben für die Southern Blot-Analyse wurden in dem Bereich übereinstimmender Sequenz beider Bruchpunkt-überspannender BAC Klone amplifiziert. Für die Southern Blot Analyse, die erfolgreich die Bruchpunktregion auf Chromosom 1 eingrenzen konnte, wurde genomische DNA der Patientin und einer weiblichen Kontrollperson mit vier verschiedenen Restriktionsenzymen (*DraI*, *HincII*, *MboI* und *SspI*) verdaut. Die Hybridisierung dieses Blots wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde, hergestellt mit Primern, die die Region von Nukleotid 20482 bis Nukleotid 21049 auf der invertierten Sequenz des BAC Klons RP11-270C12 amplifiziert, durchgeführt. Mit dieser Sonde konnten für alle vier verwendeten Restriktionsenzyme aberrante Banden in der DNA der Patientin nachgewiesen werden (Abb.8A). Solche Banden waren in der DNA der Kontrollperson nicht nachweisbar. Die erwartete Größe der verdauten DNA

Fragmente betrug bei *Sspl* 3105 Bp, bei *Mbol* 587 Bp, bei *HincII* 9137 Bp und bei *Dral* 700 Bp. Alle diese Fragmente sind in der entsprechend verdauten DNA der Kontrolle vorhanden. Bei der adäquat behandelten DNA der Patientin hingegen findet man, neben den erwarteten Fragmenten resultierend vom normalen Chromosom 1, aberrante Fragmente, da durch die chromosomale Umstrukturierung die Sequenz der derivativen Chromosomen an den Bruchpunktregionen verändert sind, und dadurch neue Schnittstellen für die Restriktionsenzyme auftreten (Abb.8A). Die Tatsache, daß für alle vier Restriktionsenzyme aberrante DNA Fragmente bei der Patientin gefunden wurden, spricht dafür, daß eine weitere Eingrenzung des Bruchpunktes auf einen Bereich zwischen den Nukleotiden 20723 und 21206 auf dem BAC Klon RP11-270C12 mit einer Größe von 483 Bp gelungen ist (Abb.8B). Des Weiteren werden bei der DNA der Patientin, welche mit den Enzymen *Sspl*, *Mbol* und *Dral* verdaut wurde, drei aberrante Fragmente detektiert. Dies kommt dadurch zustande, daß die verwendete Probe sowohl an die Sequenz des normalen Chromosom 1 als auch an die Sequenz der beiden derivativen Chromosomen bindet. Diese drei Fragmente sind somit Bruchpunkt-überspannend und die Enzyme *Dral* und *Mbol* grenzen die Bruchpunktregion am stärksten ein. Der Bruchpunkt müßte zwischen der *Mbol* Schnittstelle an Position 20723 und der *Dral* Schnittstelle an Position 21206 liegen (Abb.8B). Beide Enzyme schneiden sowohl in der normalen Sequenz als auch in der Sequenz der derivativen Chromosomen kurze Fragmente. Deshalb bietet es sich an, eines dieser Enzyme für die sich anschließende Bruchpunktklonierung zu verwenden.

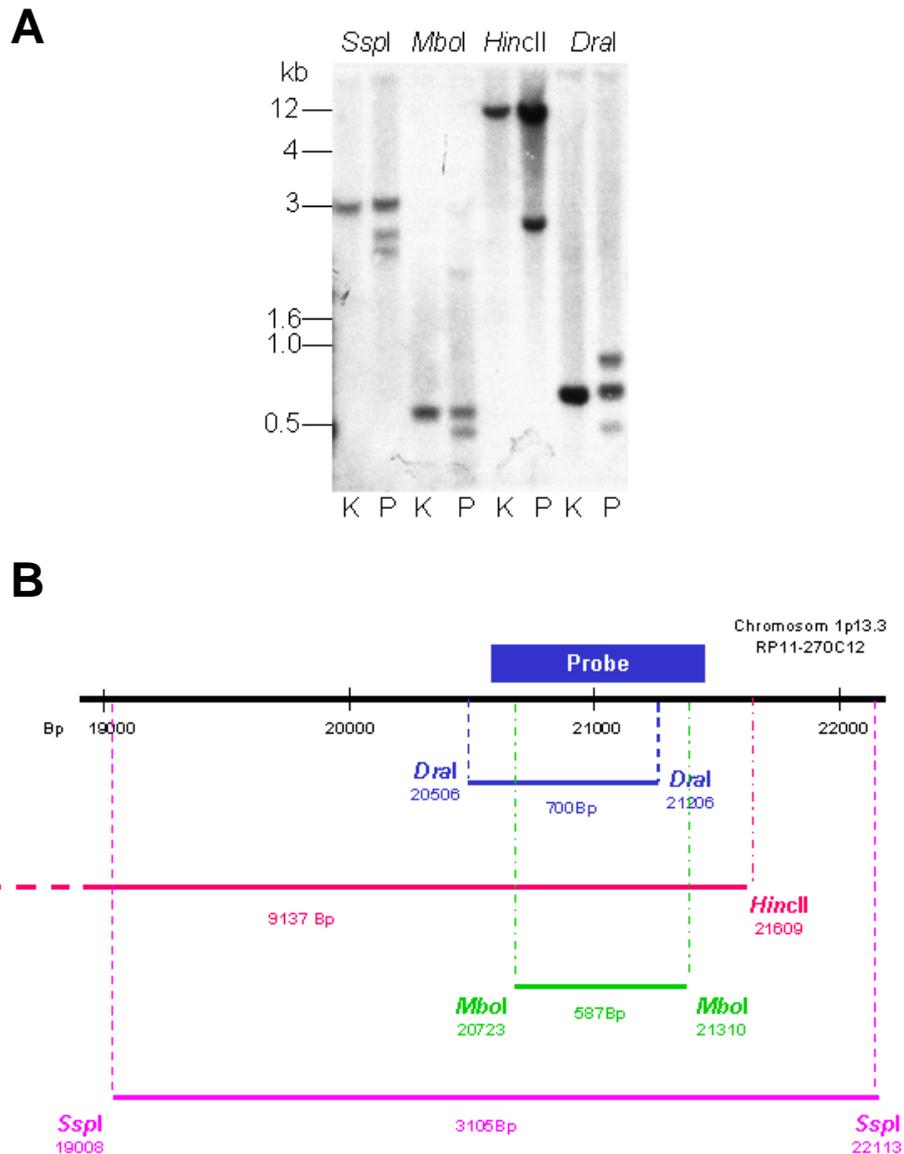


Abb.8: **Southern Blot Analyse der Bruchpunktregion auf Chromosom 1**

A Southern Blot Hybridisierung: DNA der Patientin (P) und DNA einer weiblichen Kontrollperson (K) wurde mit *SspI*, *MboI*, *HincII* und *DraI* verdaut, geblottet und anschließend mit einer radioaktiv markierten Probe hybridisiert. Neben den erwarteten Fragmenten in der DNA der Patientin und der Kontrollperson sind zusätzliche aberrante Fragmente in der DNA der Patientin vorhanden.

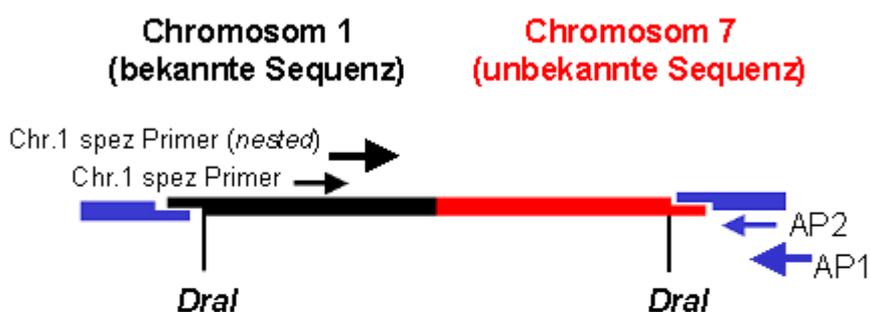
B Schematische Übersicht der genomischen Region 1p13.3 auf Chromosom 1 in der sich der Chromosomenbruchpunkt befindet. Sowohl die erwarteten Restriktionsstellen von *HincII* (dunkelrosa), *SspI* (flieder), *MboI* (grün) und *DraI* (blau) als auch die erwarteten Restriktionsfragmentgrößen sind abgebildet. Ebenso ist die verwendete Probe eingezeichnet, die der Sequenz von 20482 bis Nukleotid 21049 auf dem invertierten BAC Klon RP11-270C12 entspricht.

3.1.4 Klonierung der Bruchpunkte auf dem derivativen Chromosom 1 und dem derivativen Chromosom 7

An Hand der Feinkartierung des Bruchpunktes mittels Southern Blot Analyse ist zwar eine Unterbrechung der transkriptionellen Einheit des *NTNG1* Gens wahrscheinlich, da das Exon 7 dieses Gens proximal zum Bruchpunkt lokalisiert ist und dadurch von den restlichen Exonen des Gens abgetrennt wird. Aber um kleinere Deletionen oder Inversionen in dieser Bruchpunktregion auszuschließen, wurde eine Bruchpunktklonierung durchgeführt (Siebert et al., 1995).

An die Schnittstellen der mit *DraI* verdauten DNA der Patientin wird ein Adapter für glatte Restriktionsschnittstellen ligiert. Anschließend wird eine PCR mit einem sequenzspezifischen Primer, in diesem Falle spezifisch für Chromosom 1, und einem Adapterprimer (AP1) durchgeführt, dem sich eine *nested* PCR mit einem weiteren sequenzspezifischen Primer und einem Adapterprimer (AP2) anschließt (Abb.9A). Neben dem vorausgesagten PCR Produkt mit einer Größe von 568 Bp, das sowohl bei der *DraI* verdauten DNA der Kontrolle als auch bei der Patientin detektierbar ist, entsteht ein zusätzliches Fragment bei der DNA der Patientin mit einer Größe von ca. 400 Bp, das die Bruchpunktsequenz repräsentiert (Abb.9B).

A



B

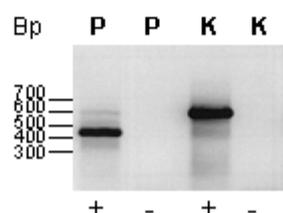


Abb.9: Klonierung des Bruchpunktes auf Chromosom 1

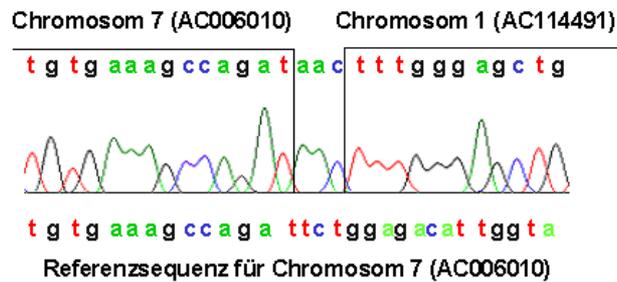
A: Schematische Darstellung der PCR zur Klonierung des Bruchpunktes. Die verwendeten sequenzspezifischen Primer und die Adapterprimer (AP) sind eingezeichnet.

B: Auftrennung der PCR-Produkte der Bruchpunktklonierungs-PCR mittels Gelelektrophorese. Bei der Kontrolle (K) ist nur das erwartete PCR Fragment nachweisbar. Bei der Patientin (P) ist neben dem erwarteten PCR Produkt, resultierend vom normalen Chromosom1, ein kleineres PCR-Produkt nachweisbar. Dieses PCR-Produkt sollte aus Hybridsequenz von Chromosom 1 und Chromosom 7 bestehen. +: PCR-Reaktion; -: Negativkontrolle der PCR-Reaktion ohne Taq-Polymerase.

Dieses aberrante Fragment wird auf Grund der geringeren Größe bevorzugt amplifiziert, was zu einer schwächeren Amplifikation des normalen Fragments führt. Die anschließende Sequenzierung dieses Fragments zeigt, daß man durch PCR mit dem sequenzspezifischen Primer und dem Adapterprimer ein Hybrid-PCR-Fragment erhält, das sowohl Sequenz von Chromosom 1 als auch Sequenz von Chromosom 7 enthält. Zusätzlich sind drei Basenpaaren in die neue Hybridsequenz eingebaut worden, welche keinem der beiden Chromosomen zugeordnet werden konnte (Abb.10A). In diesem Fall stammt das Zentromer des Hybridchromosoms von Chromosom 7. Demnach wird laut Definition dieses Hybridchromosom als derivatives Chromosom 7 bezeichnet.

A

Derivatives Chromosom 7



B

Derivatives Chromosom 1

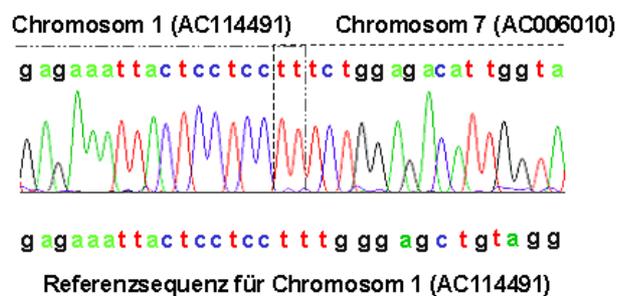


Abb.10: Chromatogramme der Bruchpunktsequenzen beider derivativer Chromosomen

A: Chromatogramm der Bruchpunktsequenz des derivativen Chromosoms 7 ermittelt durch Bruchpunktklonierung. Drei Nukleotide an der Bruchpunktstelle können keiner Sequenz von Chromosom 1 oder Chromosom 7 zugeordnet werden. Unterhalb des Chromatogramms des derivativen Chromosom 7 ist die Referenzsequenz für Chromosom 7 aufgeführt.

B: Chromatogramm der Bruchpunktsequenz des derivativen Chromosoms 1 ermittelt durch PCR mit Chromosom 1- und Chromosom 7-spezifischen Primern. An dieser Bruchpunktstelle sind sowohl bei Chromosom 1 als auch bei Chromosom 7 mehrere Thyminde. Dadurch läßt sich der Bruchpunkt nicht exakt auf ein Nukleotid festlegen. Unterhalb des Chromatogramms des derivativen Chromosom 1 ist die Referenzsequenz für Chromosom 1 aufgeführt.

Mit Hilfe der Sequenzinformation, die durch die Bruchpunktklonierung erhalten wurde, ist es möglich, die Bruchpunktregionen beider derivativer Chromosomen mittels PCR Analyse und chromosomenspezifischer Primer zu amplifizieren. Dies dient einerseits als Bestätigung für die Bruchpunktklonierung des derivativen

Chromosoms 7 und andererseits zur Bestimmung des Bruchpunktes auf dem derivativen Chromosom 1.

Die präzise Lokalisierung des Bruchpunktes auf dem derivativen Chromosom 1 ist wichtig, um Deletionen oder Insertionen auszuschließen, die womöglich einen Einfluß auf den Phänotyp haben könnten. Für die PCR wurden Primer verwendet, die spezifisch für die durch die Bruchpunktklonierung ermittelten Sequenzen auf Chromosom 1 und Chromosom 7 sind. Durch die Kombination des vorwärts beziehungsweise rückwärts orientierten Primers spezifisch für Chromosom 1 mit dem vorwärts beziehungsweise rückwärts orientierten Primers spezifisch für Chromosom 7, können nur PCR Produkte mit der Patienten DNA von den beiden derivativen Chromosomen amplifiziert werden (Abb.11).

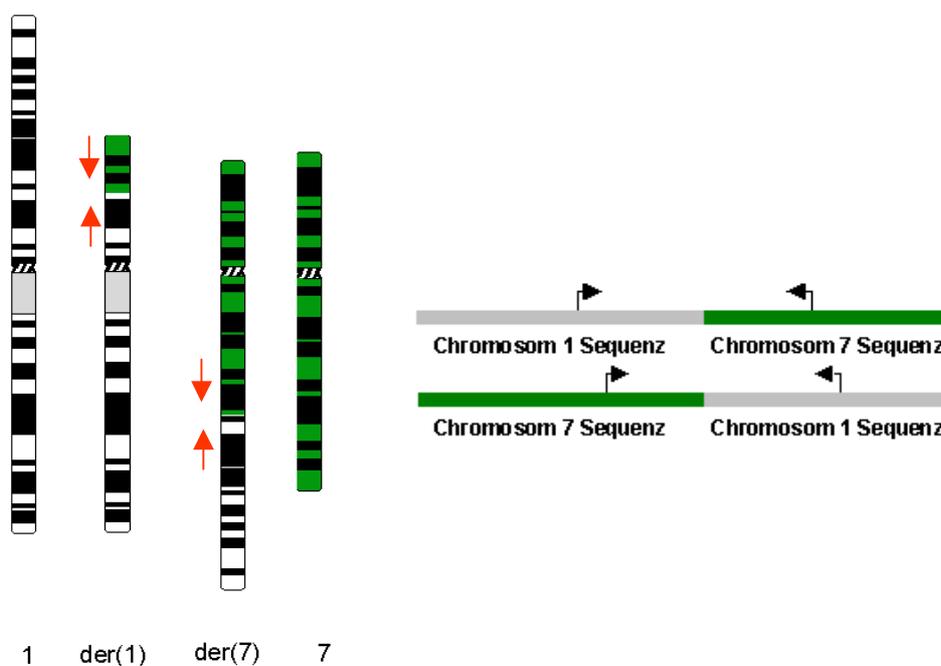


Abb.11: **Amplifikation der Bruchpunktsequenzen beider derivativer Chromosomen:** Die Lage der verwendeten Primer ist mit Pfeilen schematisch dargestellt. Eine Amplifikation dieser PCR Produkte ist nur auf der DNA der Translokationschromosomen der Patientin möglich.

Das Chromatogramm des klonierten Bruchpunktfragments amplifiziert von dem derivativen Chromosom 1 zeigt, daß keine Deletionen oder Insertionen stattgefunden haben. Wegen der übereinstimmenden Thymidine an den Bruchpunkten beider Chromosomen läßt sich der Bruchpunkt nicht auf ein bestimmtes Nukleotid festlegen (Abb.10B). Die Zuordnung der Sequenz des

Bruchpunktbereiches des derivativen Chromosom 7 zu der entsprechenden genomischen Sequenz zeigt, daß das *NTNG1* Gen zwischen den Exonen 6 und 7 unterbrochen ist.

Auf Chromosom 7 ist das das nächstgelegene, bekannte Gen das *Sperm Adhesion Molecule 1 (SPAM1)*, das ca. 160 Kb proximal vom Bruchpunkt liegt. Distal vom Bruchpunkt liegt das nächste bekannte Gen 614 Kb entfernt, der *G Protein-Coupled Receptor 37 (GPR37)*. Eine weitere vorhergesagte mRNA (NT_007933.842) ist 21 Kb distal vom Bruchpunkt lokalisiert (Abb.12). Diese mRNA wurde jedoch nur an Hand der genomischen Sequenz durch das Softwareprogramm *Gene Scan Prediction* vorhergesagt. Da es keine korrespondierenden EST Klone gibt, ist nichts über die Expression bzw. über das Expressionsmuster dieser vorhergesagten mRNA bekannt. Durch den Bruchpunkt unterbrochen ist ein gespleißtes EST (Accession Nr. BX643283) (Abb.12). Die vorhergesagten „Exone“ von BX643283 verteilen sich über eine genomische Region von ca. 357 Kb, demgegenüber steht eine Transkriptgröße von 573 Bp. Abgesehen davon war es unmöglich, durch *in silico* Analyse mit dem *ORF Finder Programm* (NCBI) einen längeren, zusammenhängenden, offenen Leserahmen zu ermitteln. Um die Expression von BX643283 zu überprüfen, wurden RT-PCR Experimente mit Intron-überspannenden Primern spezifisch für dieses EST, durchgeführt. Mit den hier verwendeten cDNAs, die aus fötaler Gehirn RNA, lymphoblastoiden Zelllinien und Fibroblasten gewonnen wurden, konnte kein Produkt erzeugt werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß dieses EST möglicherweise artifiziell sein könnte. Seine Existenz kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden.

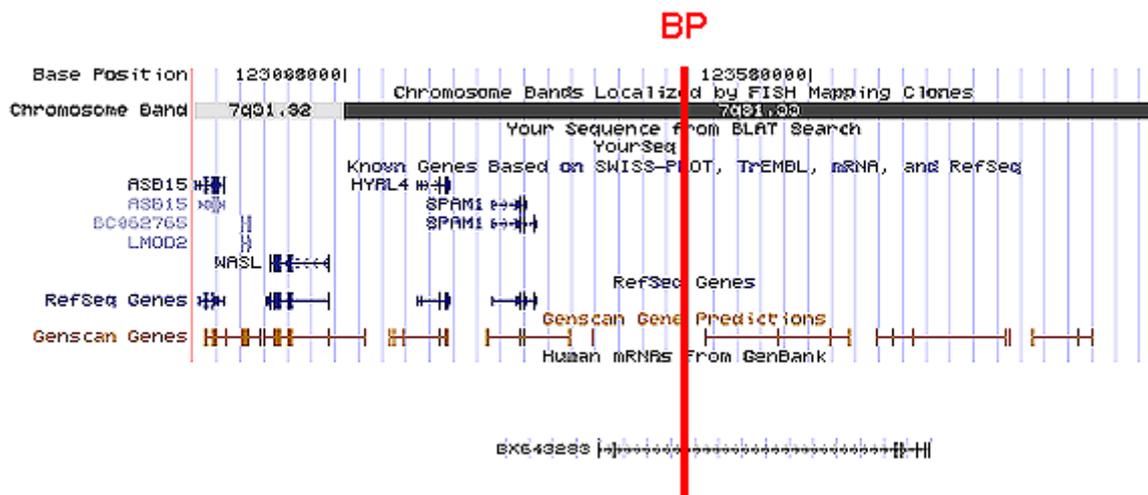


Abb.12: **Genomische Region des Bruchpunktbereiches auf Chromosom 7:** Der rote Balken repräsentiert den Bruchpunkt, der die genomische Einheit eines vorhergesagten gespleißten ESTs zerstört (BX643283)

3.1.5 *In silico* Analyse der Bruchpunktregion mit dem *Netrin G1* Gen (*NTNG1*)

Die den Bruchpunkt flankierenden BAC Klone (RP11-24J14 und RP11-396N10) und die den Bruchpunkt überspannenden BAC Klone (RP11-436H6 und RP11-270C12) enthalten die Exone des *Netrin G1* Gens (*NTNG1*) (Abb.13). Insgesamt überspannen die Exone von *NTNG1* eine genomische Region von annähernd 270 Kb in der chromosomalen Region p13.3 von Chromosom 1. Für *NTNG1* sind bislang zwei unterschiedliche Transkriptvarianten (Transkriptvariante 1: Accession Nr. AB023193 und Transkriptvariante 2: Accession Nr. BC030220) beschrieben worden. Die Exone 1, 2 und 3 liegen auf dem BAC Klon RP11-396N10. Auf dem BAC Klon RP11-436H6 sind die Exone 4, 5 und 6 lokalisiert, und auf dem BAC Klon RP11-270C12 liegt Exon 7. Beide Transkriptvarianten haben unterschiedliche 5' untranslatierte Exone. Eine alternative Spleißstelle in Exon 6 erzeugt außerdem unterschiedliche 3' Enden. Der Bruchpunkt auf Chromosom 1 liegt in Intron 6 und trunkiert die Transkriptvariante 2, indem er die genomische Region, die Exon 7 enthält, von der genomischen Region, die alle anderen Exone trägt, trennt (Abb.13).

Hinsichtlich der Transkriptvariante 1 liegt der Bruchpunkt stromabwärts vom letzten kodierenden Exon. In diesem Fall ist es möglich, daß der Bruchpunkt

regulatorische Elemente zerstört oder das Gen durch die Translokation in einen anderen genomischen Kontext bringt. Es wurde bereits gezeigt, daß die Zerstörung von 3' regulatorischen Elementen die Transkriptmenge negativ beeinflusst (Nakada et al., 2004 und Kurokawa et al., 2004).

Die *in silico* Translation der Transkriptvariante 1 führt zu einem vorhergesagten Protein bestehend aus 386 Aminosäuren (Accession Nr. BAA76820) und die Translation der Transkriptvariante 2 führt zu einem vorhergesagten Protein bestehend aus 438 Aminosäuren (Accession Nr. AAH30220). Auf Aminosäureebene sind beide Proteine nahezu identisch. Der einzige Unterschied ist das um 52 Aminosäuren längere, C-terminale Ende von AAH30220.

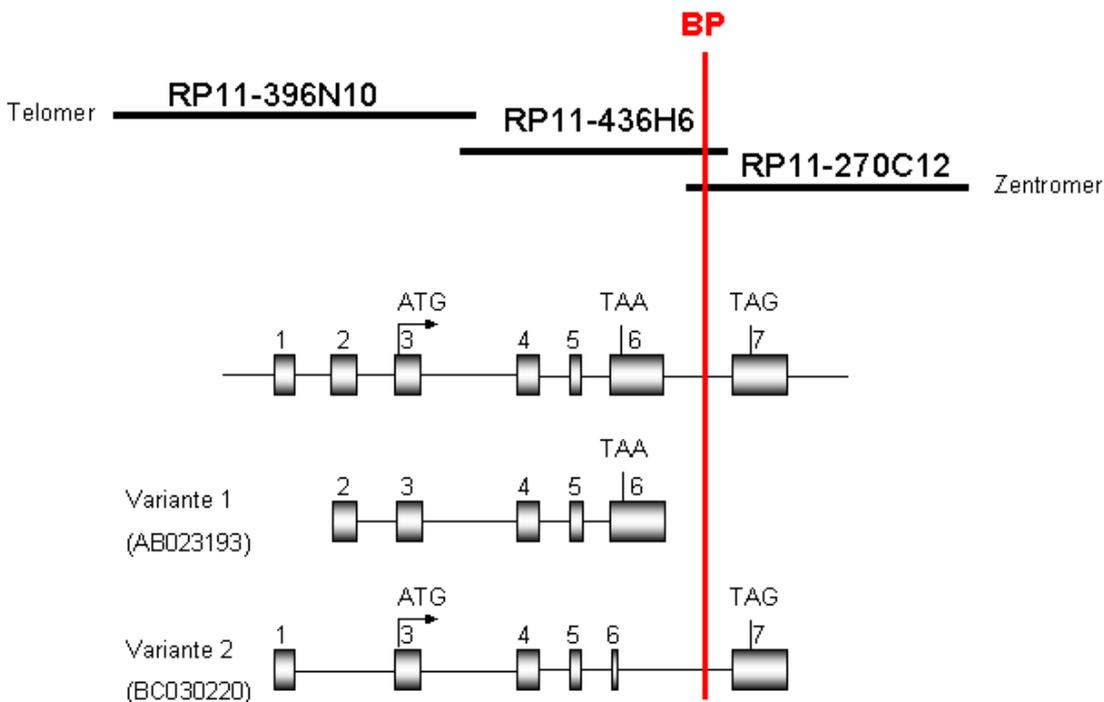


Abb.13: **Schematische Darstellung der *NTNG1* Transkriptvarianten:** In der oberen Zeile sind die BAC Klone eingezeichnet, die Sequenzen der *NTNG1* Exone enthalten. In der zweiten Zeile ist die Verteilung der Exone in der genomischen Sequenz mit entsprechenden Translations- und Stoppcodons dargestellt. In der dritten Zeile ist die Transkriptvariante 1 des *NTNG1* Gens dargestellt. Für diese Variante ist bislang kein Translationsstart festgelegt worden. Das Translationsstoppcodon ist in Exon 6 lokalisiert. Die unterste Zeile repräsentiert die Transkriptvariante 2 deren Translationsstartcodon in Exon 3 und deren Translationsstoppcodon in Exon 7 lokalisiert sind. Der rote Balken repräsentiert den Bruchpunkt, der zwischen Exon 6 und Exon 7 in der genomischen Sequenz lokalisiert ist.

3.1.6 Expressionsstudien der beiden Transkriptvarianten von *NTNG1*

Bei der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Translokation handelt es sich um eine autosomale Translokation zwischen dem Chromosom 1 und dem Chromosom 7. Im Gegensatz zu Translokationen bei männlichen Patienten, bei denen ein X-chromosomales Gen unterbrochen ist, liegt bei einer autosomalen Translokation kein kompletter Funktionsverlust des betroffenen Gens vor, da noch eine funktionsfähige Kopie des Gens auf dem jeweiligen homologen Chromosom vorhanden ist. Die hier untersuchte chromosomale Umstrukturierung führte zu einer Zerstörung der transkriptionellen Einheit der Transkriptvariante 2 von *NTNG1*, da der Bruchpunkt auf Chromosom 1 innerhalb der Sequenz von Intron 6 lokalisiert ist. Durch diese Trunkierung besteht die Möglichkeit, daß das Transkript instabil ist und degradiert wird. Dies würde zu einer Reduktion der Transkriptmenge der Transkriptvariante 2 führen. Mit Hilfe von semiquantitativer RT-PCR mit Primern, die in Exon 7 lokalisiert waren, konnte gezeigt werden, daß die Transkriptmenge der Transkriptvariante 2 etwa um die Hälfte reduziert wird (Abb.14 untere Zeile).

Bei der Untersuchung der Transkriptvariante 1 wurde kein Unterschied im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Bei dieser semiquantitativen RT-PCR wurden die Primer in Exon 2 und 3 platziert (Abb.14 mittlere Zeile). Demnach scheint keine regulatorische Sequenz von der Translokation betroffen zu sein, die die Expression dieser Transkriptvariante beeinflusst.

Darüber hinaus wurde eine semiquantitative RT-PCR mit Primern, die in Exon 4 und 5 lokalisiert waren, durchgeführt. Diese Exone sind bei beiden Transkriptvarianten vorhanden, so daß eine Unterscheidung zwischen den beiden Transkriptvarianten nicht möglich ist. Allerdings kann man auch hier eine signifikante Reduktion der gesamten Transkriptmenge erkennen (Abb.14 obere Zeile). Die Reduktion der Menge der *NTNG1* Transkripte der Patientin ist auf die Zerstörung der genomischen Einheit der Transkriptvariante 2 zurückzuführen.

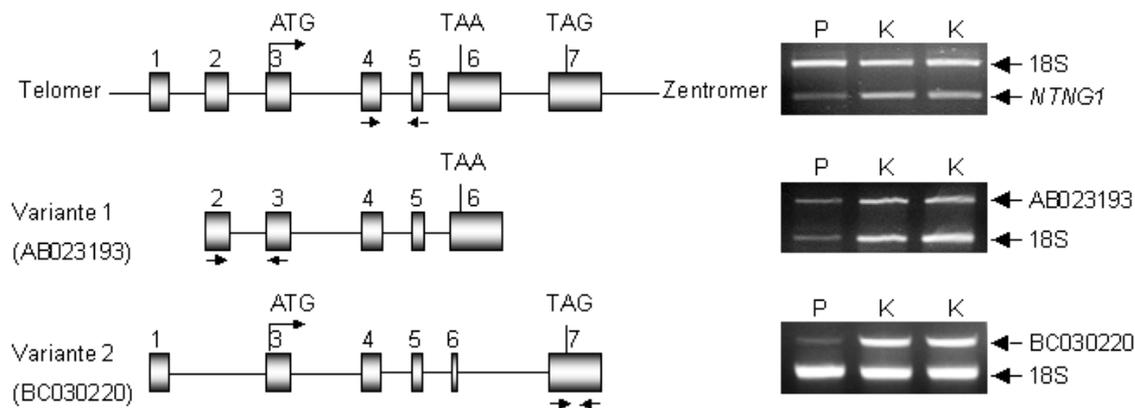


Abb.14: **Expressionsanalyse der beiden Transkriptvarianten von *NTNG1* mit RNA der Patientin und einer Kontrollperson:** P steht für Patientin, K steht für Kontrollperson. In der oberen Zeile ist das Ergebnis der semiquantitativen RT-PCR dargestellt, bei der beide Transkriptvarianten amplifiziert werden, da die Primer in Exon 4 und Exon 5 lokalisiert sind, und eine Unterscheidung der beiden Transkriptvarianten nicht erlauben. Die untere Bande ist die genspezifische Bande (*NTNG1*) und die obere Bande ist die Kontrolle, ein PCR Produkt des 18S Gens. In der zweiten Zeile sind die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR für die Transkriptvariante 1 dargestellt, bei der Primer verwendet wurden, die nur diese Transkriptvariante amplifizieren. Die unterste Zeile zeigt die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR mit einem Primerpaar spezifisch für die Transkriptvariante 2. Alle Banden sind mittels *Image Quant* Programm Version 5.2 quantifiziert worden.

3.1.7 *In silico* Analyse von *NTNG1* Proteinen

NTNG1 gehört zur Proteinfamilie der Netrine und nimmt innerhalb dieser Familie eine Sonderstellung ein. *NTNG1* ist ein phylogenetisch relativ junges Protein, da bisher nur Homologe in Vertebraten (*Mus musculus* und *Gallus gallus*) beschrieben worden sind. Andere Mitglieder der Netrin Familie sind auch in *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* beschrieben worden. Alle Netrine sind Proteine, welche Axone bei ihrem Wachstum leiten. Die klassischen Netrine sind lösliche Proteine. Für *Ntn1* (*Mus musculus*) wurde jedoch gezeigt, daß die meisten Proteinvarianten über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI) Anker an der Plasmamembran verankert sind. An der Plasmamembran verankerte Axonleitmoleküle agieren wahrscheinlich nur in ihrem begrenzten Umfeld, während lösliche Axonleitmoleküle eher für die Leitung über längere Strecken

zuständig sind (Nakashiba et al., 2002). Darüber hinaus hat Ntng1 keine Affinität für die Rezeptoren, an die die übrigen Netrine binden (Nakashiba et al., 2000).

Ob die humanen NTNG1 Proteinisoformen lösliche oder an der Plasmamembran verankerte Axonleitmoleküle sind, ist noch nicht bekannt. Deshalb wurden beide Proteinisoformen *in silico* auf das Vorhandensein eines GPI Ankers überprüft. Mit Hilfe des *Detection/Prediction of GPI Cleavage Site* Programms (DGPI) (Kronegg und Buloz, 1999) wurde vorhergesagt, daß die Transkriptvariante 1 höchstwahrscheinlich keinen GPI Anker besitzt, da die potentielle C-terminale Erkennungssequenz (ω -Stelle) nicht vorhanden ist (Udenfriend und Kodukula, 1995). Im Gegensatz dazu besitzt die Transkriptvariante 2 eine solche Erkennungssequenz, weshalb die Möglichkeit besteht, daß dieses Protein an der Plasmamembran verankert ist.

Die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR bestätigen die Vermutung, daß die unterbrochene Transkriptvariante 2 instabil ist und degradiert wird. Diese Degradierung führt wahrscheinlich dazu, daß nur die Hälfte der normalen Menge des höchstwahrscheinlich über einen GPI Anker an der Plasmamembran befestigten Proteins AAH30220 vorhanden ist. Aus diesem Grund besteht die Möglichkeit, daß die Axonleitfunktion von NTNG1 über kürzere Strecken gestört sein könnte.

3.2 Identifizierung und funktionelle Analyse von X-chromosomalen Genen, die eine Rolle bei geistiger Behinderung spielen

3.2.1 Auswahl einer Region auf dem X-Chromosom für eine Mutationsanalyse

Geistige Behinderung tritt bei Männern bedeutend häufiger auf als bei Frauen. Deshalb nahm man schon lange an, daß Gene, die eine Rolle bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems und des Gehirns spielen, auf dem X-Chromosom lokalisiert sind (Lehrke, 1972). Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind 20 Gene für nicht-syndromale geistige Behinderung beschrieben worden (s. a. Kapitel 1.6). Dies zeigt, daß nicht-syndromale geistige Behinderung eine Erkrankung mit heterogenen Ursachen ist und die Kopplungsergebnisse verschiedener Familien nicht zusammenfassend interpretiert werden können. Dadurch ist es schwierig, bestimmte Regionen auf dem X-Chromosom zu definieren, um die molekularen Grundlagen für diese Erkrankung zu identifizieren.

Ropers et al. haben eine *in silico* Kopplungsanalyse mit dem Ziel durchgeführt, Regionen auf dem X-Chromosom zu identifizieren, in denen Gene liegen, die für die Entwicklung von kognitiven Fähigkeiten von Bedeutung sind.

Dabei wurden die Kopplungsdaten der einzelnen Familien entsprechend ihrer Intervalle auf dem X-Chromosom angeordnet. Je nach Größe des Kopplungsintervalls fand eine unterschiedliche Gewichtung statt. Kurze Kopplungsintervalle hatten eine stärkere Gewichtung als lange Kopplungsintervalle (s. a. Kapitel 1.7). Diese vergleichende Kopplungsanalyse von 125 nicht miteinander verwandten Familien zeigte, daß die Kopplungsintervalle bei 30% der Familien im proximalen Teil des X-Chromosoms in der Region Xp11.2 überlappen (Ropers et al., 2003). In Abbildung 15 sind die Kopplungsintervalle der Familien mit einem Überlapp in der Region Xp11.2 dargestellt. In dieser Region waren bisher keine Gene für geistige Behinderung identifiziert worden. Deshalb war Xp11.2 eine ideale Region für eine Mutationsanalyse von ZNS- und Gehirn-

spezifischen Genen in den Indexpatienten der Familien, deren Kopplungsdaten mit dieser Region überlappten.

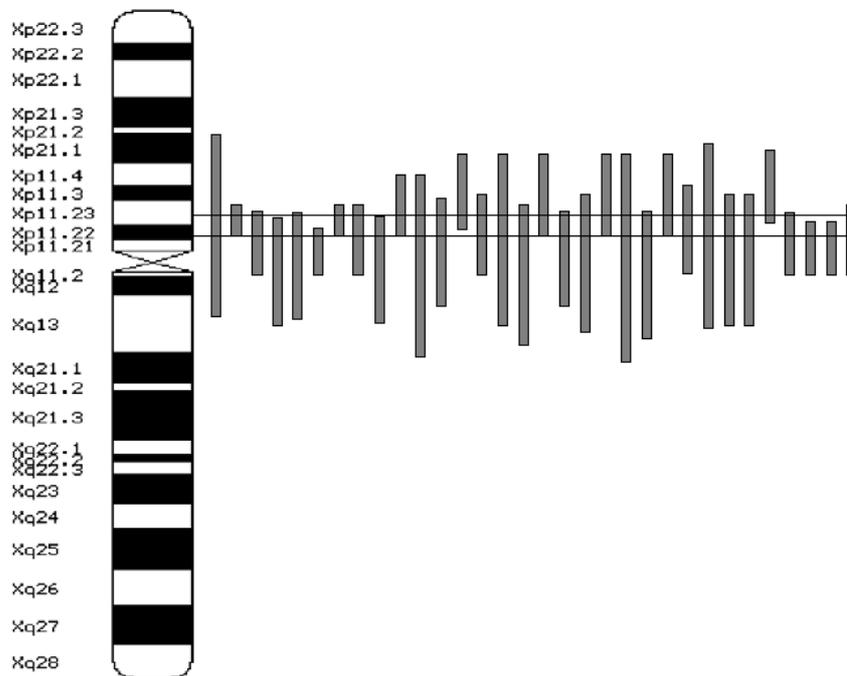


Abb.15: Schematische Darstellung der Kopplungsintervalle verschiedener NS-XLMR Familien, die alle die genomische Region Xp11.2 überspannen

3.2.2 Auswahl der Gene für die Mutationsanalyse

Innerhalb der genomischen Region von Xp11.2 wurde die Mutationsanalyse auf 46 Gene beschränkt, welche im zentralen Nervensystem beziehungsweise im Gehirn exprimiert werden. Bei der vorliegenden Arbeit wurden die folgenden Gene auf Mutationen in ihrer kodierenden Sequenz untersucht basierend auf der *Human Genome Browser* Version vom April 2003: *ABCB7* (Accession Nr. NM_004299), *ALAS2* (Accession Nr. NM_000032), *FTSJ1* (Accession Nr. AK024023), *I-4* (Accession Nr. NM_025210), *JM11* (Accession Nr. NM_033626), *PQBP1* (Accession Nr. AJ242829), *RBM3* (Accession Nr. NM_006743), *TFE3* (Accession Nr. NM_006521) und *TIMP1* (Accession Nr. NM_003254). Bei der Mutationsanalyse wurde jeweils die DNAs der Indexpatienten von den Familien, bei denen Xp11.2 im Kopplungsintervall enthalten war, auf Veränderungen in der

proteinkodierenden Sequenz der oben angegebenen Gene untersucht. Die Anzahl der untersuchten Indexpatienten ist für jedes Gen unterschiedlich, da entweder im Laufe der Analyse Mutationen in einem anderen Gen gefunden wurden oder keine DNA des Patienten mehr verfügbar war. Wieviel Patienten für die entsprechenden Gene analysiert wurden, kann der Tabelle 26 entnommen werden.

Im kodierenden Bereich der Gene *FTSJ1* und *PQBP1* konnten Mutationen nachgewiesen werden. Die entsprechenden Mutationen, ihre molekularbiologischen Untersuchungen und funktionellen Studien beider Gene werden in den folgenden Kapiteln dargestellt.

Tabelle 26: Anzahl der analysierten Indexpatienten der in Xp11.2 gekoppelten Familien

Gen	Anzahl der analysierten Indexpatienten	Analysierte Exone
ABCB7	17	16
ALAS2	25	10
FTSJ1	29	14
I-4*	25	1
JM11	36	8
PQBP1	36	7
RBM3	21	5
TFE3	30	10
TIMP1	23	5

* Dieses Gen ist aus der Datenbank entfernt worden und existiert nicht mehr.

3.2.3 Das *FTSJ Homolog 1 (FTSJ1)* Gen

3.2.3.1 Beschreibung der klinischen Merkmale der Indexpatienten und der weiteren betroffenen Familienmitglieder, bei denen Mutationen im *FTSJ1* Gen nachgewiesen worden sind

Insgesamt wurden drei unterschiedliche Mutationen im *FTSJ1* Gen in drei nicht miteinander verwandten Familien gefunden.

Die erste Familie wird als Familie MRX44 bezeichnet und der Stammbaum ist in Abbildung 16 dargestellt. Bei dieser Familie ist ein Kopplungsintervall zwischen Xp11.3-p11.21 festgelegt worden, in dem das krankheitsassoziierte Gen lokalisiert sein sollte (Hamel et al., 1999). Die betroffenen Familienmitglieder zeigen folgende phänotypische Merkmale:

Die Patienten II-3 und II-10 sind im Alter von 59 bzw. 63 Jahren verstorben und litten unter milder bis moderater geistiger Behinderung. Alle betroffenen männlichen Familienmitglieder der dritten Generation litten während ihrer Kindheit unter nicht progressiver geistiger Behinderung. Sie lebten alle, bis auf den Indexpatienten III-5, in Betreuungseinrichtungen. III-5 lebte in einer betreuten Wohngemeinschaft. Der Allgemeinzustand ihrer Gesundheit war gut. Alle weiblichen Familienmitglieder, sowohl die obligaten als auch die heterozygoten Überträgerinnen der Mutation, zeigten eine normale Intelligenz. Das zeigt, daß die Mutation rezessiv vererbt wird.

Der Indexpatient wurde im Alter von 30 Jahren untersucht. Sein Verhalten, das Aggressionsausbrüche und Neigung zu Selbstverstümmelung beinhaltete, wurde seit seiner Kindheit als schwierig beschrieben. Weitere phänotypisch auffällige Merkmale waren Synophris, schiefe Nase, hohe Nasenwurzel und ein großer Kopf (ohne Größenangabe). Sein Bruder III-2 starb im Alter von 51 Jahren an myeloider Leukämie, bevor die Familie untersucht wurde. Seine geistige Behinderung soll moderat gewesen sein, und sein Verhalten war schwer zu kontrollieren.

Der mütterliche Cousin des Indexpatienten III-6 wurde im Alter von 45 Jahren untersucht. Sein Verhalten war durch aggressive Ausbrüche charakterisiert. Er war Träger eines Hörgerätes, hatte eine milde Facialis-Parese und eine rechtsseitige Hemiatrophie.

Der andere mütterliche Cousin III-8 des Indexpatienten, untersucht mit 41 Jahren, zeigte keine Verhaltensauffälligkeiten. Abgesehen von präauriculären Anhängseln und beidseitigen Hohlfüßen waren keine körperlichen Auffälligkeiten vorhanden. Keiner der untersuchten Patienten war in der Lage zu lesen, zu schreiben oder leichte Rechenaufgaben zu lösen. Die intellektuellen Fähigkeiten und die Auffassungsgabe der Patienten waren moderat bis schwer beeinträchtigt (Hamel et al., 1999).

Stammbaum der Familie MRX44

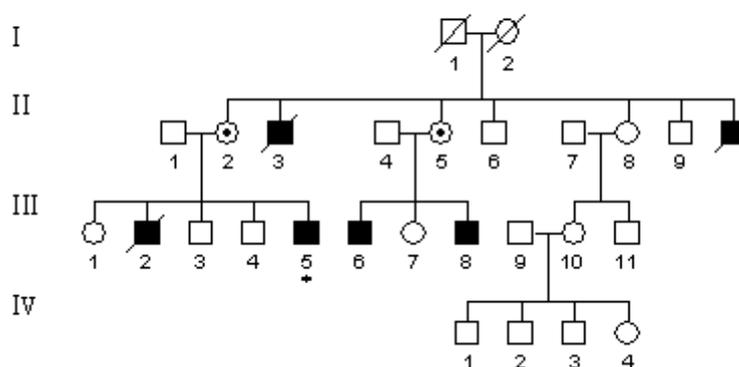


Abb.16: **Stammbaum der Familie MRX44:** Hemizygoten Träger der Mutation sind durch ausgefüllte Quadrate gekennzeichnet. Heterozygote Überträgerinnen der Mutation tragen einen Punkt innerhalb des Kreises. Durchgestrichene Kreise bzw. Quadrate bedeuten, daß die Person bereits verstorben ist. Der Indexpatient der Familie ist durch einen Stern gekennzeichnet.

Die zweite Familie wird als Familie P48 bezeichnet (Abb.17). Der Indexpatient dieser Familie wurde nach einer normalen Schwangerschaft ohne Komplikationen entbunden. Die Chromosomenanalyse zeigte einen normalen Befund, und das Fragile X Syndrom wurde durch molekulargenetische Untersuchung ausgeschlossen. Der Patient konnte mit 18 Monaten laufen und hat im Alter von 3-4 Jahren angefangen zu sprechen. Im Alter von 29 Jahren ist er in der Lage, einfache Sätze zu lesen, hat aber Schwierigkeiten den Sinn zu erfassen. Darüber hinaus zeigt er Verhaltensauffälligkeiten mit aggressiven Ausbrüchen, welche medikamentös behandelt werden mußten. Er ist 170 cm groß, wiegt 80 kg und sein Kopfumfang beträgt 61 cm (+3 SD). Die einzige phänotypische Auffälligkeit ist

sein flaches Mittelgesicht. Neurologische Untersuchungen (MRT und EEG) waren ohne pathologischen Befund.

Die Mutter des Indexpatienten ist eine heterozygote Trägerin der Mutation und besitzt normale intellektuelle Fähigkeiten. Für den ebenfalls erkrankten Onkel gibt es keine klinischen Daten, außer daß die Schwangerschaft und Geburt normal verlaufen sind und daß seine geistige Behinderung mild bis moderat ist. Die klinische Untersuchung der Familie wurde von Dr. med. Dellatolas (Académie de Saône-et-Loire, Frankreich) durchgeführt.

Stammbaum der Familie P48

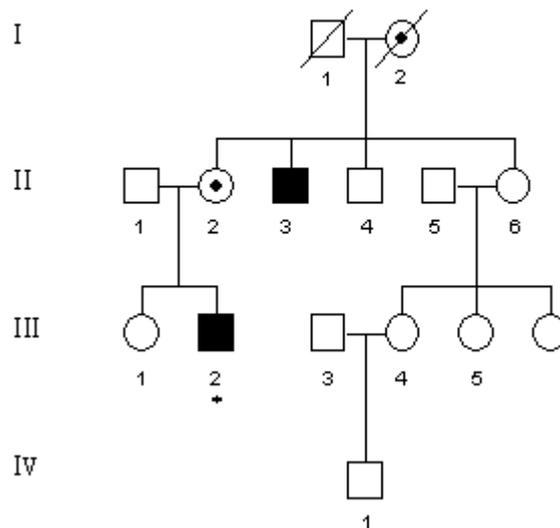


Abb.17: **Stammbaum der Familie P48:** Hemizygoter Träger der Mutation sind durch ausgefüllte Quadrate gekennzeichnet. Heterozygote Überträgerinnen der Mutation tragen einen Punkt innerhalb der Kreise. Durchgestrichene Kreise bzw. Quadrate bedeuten, daß die Person bereits verstorben ist. Der Indexpatient der Familie ist durch einen Stern gekennzeichnet.

Die dritte Familie wird als Familie A3 bezeichnet. In dieser Familie (Abb.18) sind die sechs betroffenen männlichen Mitglieder mild bis moderat geistig behindert. Alle besuchten eine Sonderschule, bis auf Patient III-4, der eine mildere Ausprägung der geistigen Behinderung zeigt und daher eine reguläre Grundschule besuchen konnte.

Der Patient II-3 zeigt Verhaltensstörungen mit aggressiven Ausbrüchen. Darüber hinaus leidet er an Angstzuständen und Depressionen. Sein Bruder, Patient II-12, wurde zusätzlich als schizophren diagnostiziert und mit antipsychotischen Medikamenten behandelt. Der Patient III-1 hat ebenfalls Verhaltensstörungen mit aggressiven Ausbrüchen und leidet außerdem an Angstzuständen und Depressionen. Diese Symptome wurden mit Paroxetine behandelt. Sein Cousin, Patient III-4, hat eine milde Ausprägung von geistiger Behinderung. Er konnte mit 11 Monaten laufen und wurde wegen einer Sprachverzögerung erst mit 2 Jahren auffällig. Nach dem Besuch der Grundschule partizipierte er an einem speziellen Programm, um in das Arbeitsleben integriert werden zu können. Er arbeitet und kann selbständig für sich sorgen. Sein Bruder, Patient III-5 (Indexpatient), zeigt Verhaltensstörungen mit Neigung zur Aggression, des Weiteren leidet er an Angstzuständen und Depressionen und wurde wie sein Cousin mit Paroxetine behandelt. Der Patient III-6, Bruder von Patient III-4 und III-5, hat die am stärksten ausgeprägte geistige Behinderung. Sein IQ liegt unter 55, und er war erst mit 10 Jahren in der Lage, in zusammenhängenden Sätzen zu sprechen. Auch er zeigt Verhaltensstörungen, die sich in Wut und Aggressionen äußern und mit Amitriptyline behandelt werden. Er besitzt keine Dismorphiezeichen, ist 167 cm groß, wiegt 57 kg, und sein Kopfumfang beträgt 55 cm. Die klinische Untersuchung wurde von Dr. med. Delatycki (Department of Paediatrics, Universität Melbourne, Victoria, Australien) durchgeführt.

Stammbaum der Familie A3

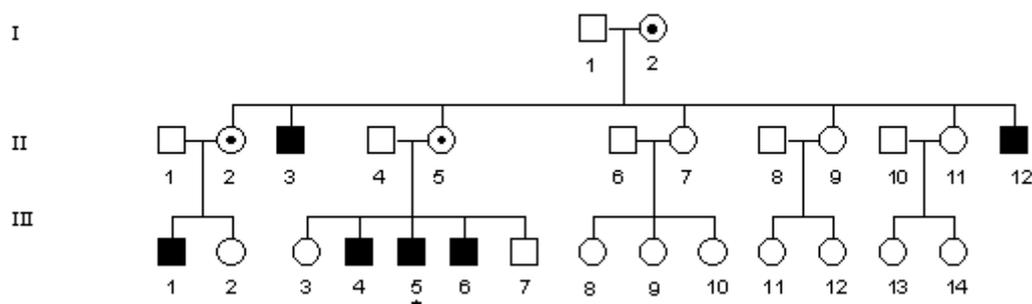


Abb.18: **Stammbaum der Familie A3:** Hemizygoter Träger der Mutation sind durch ausgefüllte Quadrate gekennzeichnet. Heterozygote Überträgerinnen der Mutation tragen einen Punkt innerhalb der Kreise. Der Indexpatient der Familie ist durch einen Stern gekennzeichnet.

3.2.3.2 Darstellung der verschiedenen Mutationstypen in *FTSJ1*

Die Mutationsanalyse beinhaltet eine DHPLC-Analyse (*Denaturing High Pressure Liquid Chromatography*) der DNA der Indexpatienten verschiedener Familien. Für diese Analyse wurde eine Amplifikation der einzelnen Exone von *FTSJ1* mit Primern in den flankierenden Intronsequenzen durchgeführt. Anschließend wurden die PCR-Produkte mittels DHPLC analysiert. Dabei wurden bei drei Indexpatienten aus unterschiedlichen Familien abweichende Elutionsprofile für drei verschiedene Exone von *FTSJ1* detektiert (Abb.19). Für jede Mutation wurden die jeweiligen PCR-Produkte von 400 männlichen Kontrollpersonen mittels DHPLC-Analyse untersucht, in deren Elutionsprofil keine Veränderungen festgestellt werden konnten. Die Mutationsanalyse und die möglichen funktionellen Folgen werden in den folgenden Kapiteln dargestellt.

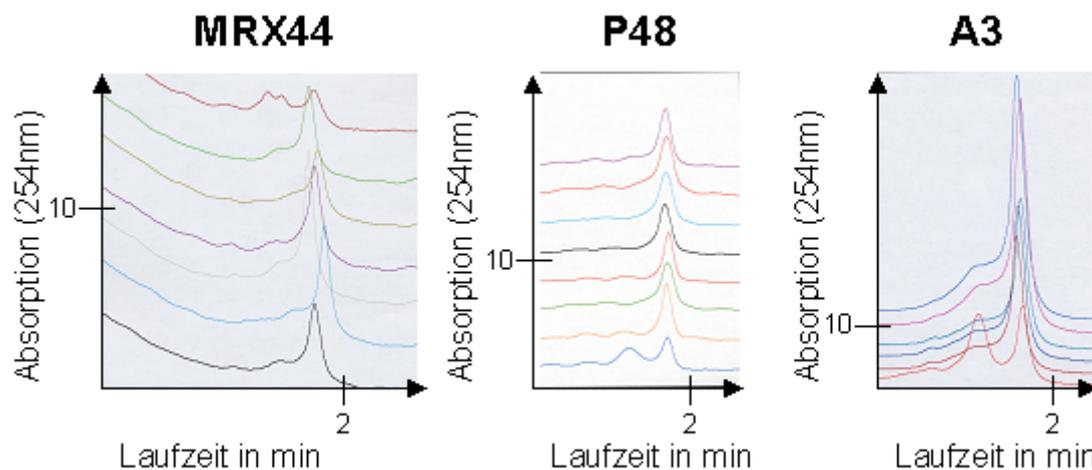


Abb.19: **Darstellung der DHPLC Analyse:** Auf allen Abbildungen ist die graphische Auswertung des Laufverhaltens, untersucht mittels DHPLC Analyse, verschiedener Hetero- und Homoduplexe dargestellt. Ein Nukleotidaustausch führt zur Bildung eines Heteroduplex, der im Gegensatz zu einem Homoduplex ein verändertes Laufverhalten zeigt. Die Absorption wird mittels UV-Licht gemessen. Im linken Graph repräsentiert die obere Linie

das Laufverhalten des *FTSJ1* Exon 9-PCR-Produktes amplifiziert mit der DNA des Indexpatienten von Familie MRX44, vereinigt mit einem *FTSJ1* Exon 9-PCR-Produkt eines anderen Indexpatienten. Infolge der Mutation ist das Laufverhalten des Heteroduplex verändert und eluiert früher von der Säule. Im mittleren Graph ist das Laufverhalten des *FTSJ1* Exon 4-PCR-Produktes amplifiziert mit der DNA des Indexpatienten von Familie P48, vereinigt mit einem *FTSJ1* Exon 4-PCR-Produkt eines anderen Indexpatienten (unterste Linie). Auch in diesem Fall führt eine Mutation zur Bildung eines Heteroduplex und zu einer früheren Elution von der Säule als die entsprechenden Homoduplices. Im rechten Graph ist das Laufverhalten des *FTSJ1* Exon 2-PCR-Produktes amplifiziert mit der DNA des Indexpatienten von Familie A3, vereinigt mit einem *FTSJ1* Exon 2-PCR-Produkt eines anderen Indexpatienten (unterste Linie). Wiederum führt eine Mutation zur Bildung eines Heteroduplex und zu einer früheren Elution von der Säule als die entsprechenden Homoduplices.

3.2.3.2.1 Mutationsanalyse von *FTSJ1* bei Familie MRX44

Auf Grund des auffälligen Ergebnisses der DHPLC Analyse wurde das Exon 9 des Indexpatienten der Familie MRX44 sequenziert. Die Auswertung der Sequenz ergab einen Basenaustausch des letzten Nukleotids am 3' Ende von Exon 9 von Guanin zu Adenin (655G→A) verglichen mit der Sequenz von Exon 9 einer Kontrollperson (Referenzsequenz: Accession Nr. BC023584) (Abb.20). Die Familie MRX44 (Abb.16) besteht aus 27 Mitgliedern, von denen sechs der männlichen Mitglieder von nicht-syndromaler geistiger Behinderung betroffen sind. Durch PCR-Analyse konnte bestätigt werden, daß auch die Patienten III-6 und III-8 Träger des bei Indexpatient III-5 vorhandenen Nukleotidaustausches sind. Ebenfalls durch PCR-Analyse konnte gezeigt werden, daß die Mütter (II-2 und II-5) deren Söhne geistig behindert sind heterozygote Trägerinnen der Mutation sind. Sowohl nicht betroffene männliche Personen (z.B. III-3 und III-9), als auch weibliche Personen, die keine Übertägerinnen sind (z.B. II-8), waren entsprechend negativ für diesen Nukleotidaustausch.

FTSJ1 Exon 9 Sequenz

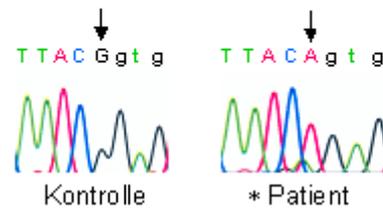


Abb.20: **Ausschnitt aus dem Chromatogramm der *FTSJ1* Exon-9-Sequenz des Indexpatienten von Familie MRX44 und einer Kontrolle:** Die Nukleotide, die zur Exonsequenz gehören, sind in Großbuchstaben dargestellt, diejenigen der Intronsequenz sind in Kleinbuchstaben dargestellt. Beide Chromatogramme zeigen die Nukleotide am Übergang von Exon 9 zu Intron 9. Im linken Chromatogramm, das die Sequenz von Exon 9 einer männlichen Kontrollperson repräsentiert, ist das 5' Nukleotid von Exon 9 ein Guanin. Im rechten Chromatogramm, das die Sequenz von Exon 9 des Indexpatienten von Familie MRX44 repräsentiert, ist anstelle des Guanins ein Adenin vorhanden.

3.2.3.2 Mutationsanalyse von *FTSJ1* bei Familie P48

Das PCR-Produkt von Exon 4 des Indexpatienten von Familie P48 zeigte ebenfalls ein verändertes Elutionsverhalten bei der DHPLC Analyse. Die Sequenzierung dieses Exons ergab, daß dieser, im Vergleich zur Exon 4 Sequenz einer Kontrollperson (Referenzsequenz: Accession Nr. BC023584), Träger einer Basensubstitution von Cytosin zu Thymin (196C→T) ist, (Abb.21). Der ebenfalls betroffene Onkel des Indexpatienten (II-3) ist Träger derselben Mutation, und die Mutter des Indexpatienten die heterozygote Überträgerin dieser Mutation. Die nicht betroffene, männliche Person (II-4) ist negativ für diesen Nukleotidaustausch.

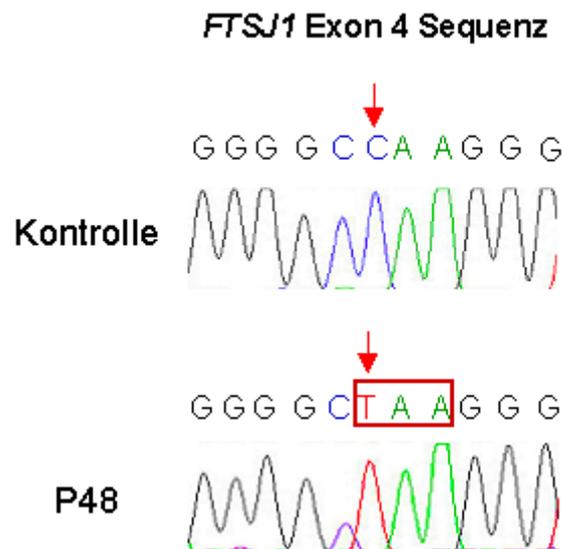


Abb.21: **Ausschnitt aus den Chromatogrammen der FTSJ1 Exon 4-Sequenz des Indexpatienten von Familie P48 und einer Kontrolle:** Beide Chromatogramme zeigen einen Ausschnitt aus der Sequenz von Exon 4. Im oberen Chromatogramm ist die Sequenz von Exon 4 einer männlichen Kontrollperson dargestellt. Im unteren Chromatogramm, das die Sequenz von Exon 4 des Indexpatienten von Familie P48 repräsentiert, ist anstelle des Cytosins ein Thymin vorhanden. Die rote Umrandung kennzeichnet, daß der Nukleotidaustausch zur Bildung eines Translationsstopkodons führt.

3.2.3.2.3 Mutationsanalyse von FTSJ1 bei Familie A3

Das Amplifikat von Exon 2 des Indexpatienten der Familie A3 zeigte ebenfalls ein auffälliges Elutionsprofil bei der DHPLC Analyse. Durch die anschließende Sequenzierung konnte demonstriert werden, daß ein Guanin am Übergang von Exon 2 zu Intron 2 deletiert ist (IVS2+1delG) (Referenzsequenz: Accession Nr. BC023584) (Abb.22). Im Normalfall endet Exon 2 am 3' Ende mit einem Guanin, und Intron 2 beginnt am 5' Ende mit einem Guanin. Das Ergebnis der Sequenzierung ermöglicht es nicht zu entscheiden, ob die Deletion im Exon oder im Intron stattgefunden hat. In der weiteren Darstellung der Ergebnisse wird diese Frage an Hand von RT-PCR Experimenten geklärt. Die Mutation konnte bei allen betroffenen männlichen Mitgliedern dieser Familie (II-3, II-12, III-1, III-4 und III-6) nachgewiesen werden. Ebenso konnte gezeigt werden, daß die Mütter (II-1 und II-5), deren Söhne geistig behindert sind, heterozygote Trägerinnen der Mutation sind. Die nicht betroffenen männlichen Personen dieser Familie (z.B. II-1 und II-4)

waren, ebenso wie die weiblichen Personen, die keine Übertägerinnen sind (z.B. II-7), negativ für die Mutation (die Untersuchung der Kosegregation der Mutation in *FTSJ1* bei Familie A3 wurde im Labor von Prof. Dr. J. Gecz durchgeführt (Women's and Children's Hospital, Adelaide Australien)).

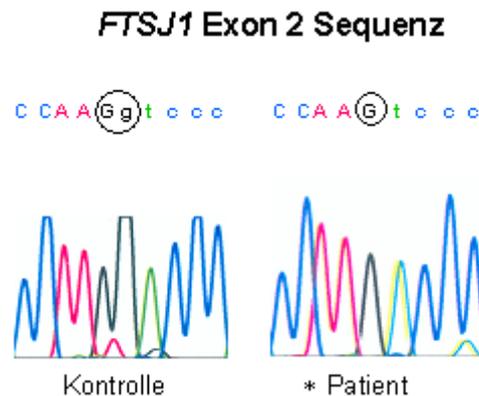


Abb.22: **Ausschnitt aus den Chromatogrammen der *FTSJ1* Exon 2-Sequenz des Indexpatienten von Familie A3 und einer Kontrolle:** Die Nukleotide der Exonsequenz sind in Großbuchstaben dargestellt, diejenigen der Intronsequenz in Kleinbuchstaben. Beide Chromatogramme zeigen die Nukleotide am Übergang von Exon 2 zu Intron 2. Im linken Chromatogramm, das die Sequenz einer männlichen Kontrollperson repräsentiert, sind am Exon- Intronübergang zwei Guaninmoleküle vorhanden. Im rechten Chromatogramm, das die Sequenz des Indexpatienten von Familie A3 repräsentiert, ist an diesem Übergang ein Guanin deletiert.

3.2.3.3 *In silico* Charakterisierung der *FTSJ1* Transkripte

Die Exone von *FTSJ1* (auch als *JM23* bezeichnet) überspannen eine genomische Region von 10,2 Kb in der chromosomalen Region Xp11.23 des kurzen Arms des X-Chromosoms. Die genomische Sequenz, inklusive *FTSJ1*, wird von der Sequenz mit der Accession Nr. AF196972, die aus mehreren BAC Klonen besteht, abgedeckt.

Zur Zeit sind für *FTSJ1* vierzehn unterschiedliche Transkriptvarianten in der *Human Genome Browser* Datenbank (Version Mai 2004) beschrieben (Tabelle 27). Diese mRNAs sind zusammengesetzt aus 258 ESTs, von denen 29 ausschließlich im Gehirn exprimiert werden. Die Sequenzen dieser 29 gehirnexprimierten ESTs sind in allen unten aufgeführten mRNAs vorhanden. Die

übrigen EST-Klone stammen aus den unterschiedlichsten Geweben, so daß man feststellen kann, daß *FTSJ1* ubiquitär exprimiert wird.

Tabelle 27: Transkriptvarianten von *FTSJ1*

Transkriptvariante	Accession Nummer	Größe
1	AK024023	1984 Bp
2	AJ005892	1867 Bp
3	CR595767	1854Bp
4	CR595180	1381Bp
5	CR616099	1320 Bp
6	CR600255	1803Bp
7	CR590233	1792Bp
8	CR613129	1801Bp
9	CR616867	1464Bp
10	CR606907	1896Bp
11	CR609653	1766Bp
12	BC021047	1798 Bp
13	BC023584	1814 Bp
14	AF063015	1678 Bp

In Abbildung 23 sind die verschiedenen Transkriptvarianten von *FTSJ1* schematisch dargestellt.

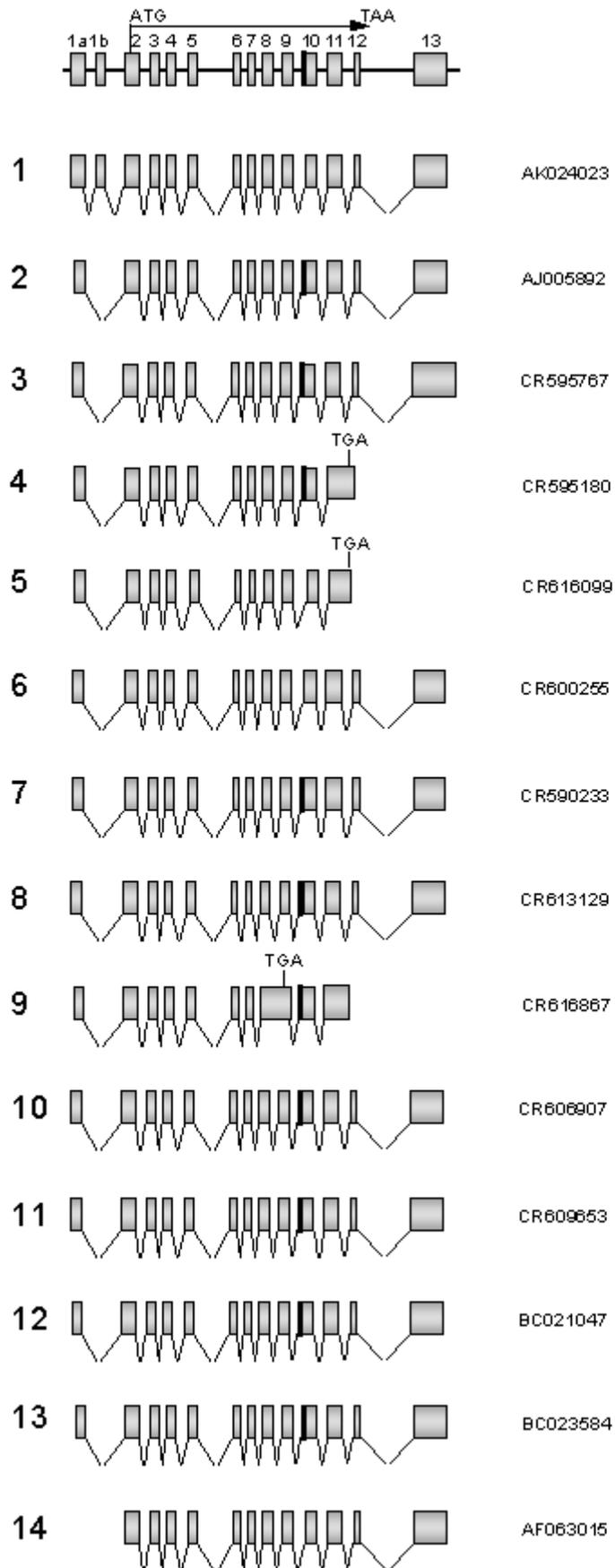


Abb. 23: **Schematische Darstellung der *FTSJ1* Transkriptvarianten** (nicht maßstabsgerecht):
 In der obersten Zeile ist die Verteilung der Exone von *FTSJ1* innerhalb der genomischen Sequenz schematisch dargestellt. Es sind sowohl das Startkodon für die Translation in Exon 2 (das für alle Spleißvarianten gleich ist), als auch das Stopkodon für die Translation (welches am häufigsten bei den verschiedenen Transkriptvarianten vertreten ist), eingezeichnet. In den folgenden Zeilen sind die verschiedenen Transkriptvarianten von *FTSJ1* mit ihren jeweils vorhergesagten Spleißmustern und entsprechenden Accession Nummern dargestellt. Der schwarze Balken, der bei einigen Transkriptvarianten am 5' Ende von Exon 10 zu finden ist, repräsentiert die 6 alternativ gespleißten Nukleotide. Drei Spleißvarianten haben ein anderes Stopkodon als die restlichen Transkriptvarianten. Diese alternativen Stopkodons sind in das Schema der entsprechenden Transkriptvarianten eingezeichnet.

Variante 1 (Accession Nr. AK024023) ist das längste Transkript mit den zwei untranslatierten Exonen 1a und 1b. In allen anderen Varianten ist Exon 1b nicht vorhanden. Des weiteren ist die Länge des 5' Endes von Exon 1a bei allen Varianten unterschiedlich. Eine weitere Stelle im Transkript, an der alternatives Spleißen stattfindet, ist am 5' Ende von Exon 10. Diese alternative Spleißstelle führt zu einer Verlängerung des Gesamttranskriptes um 6 zusätzliche Nukleotide. Als Konsequenz daraus verlängern sich die vorhergesagten Proteine um die zwei Aminosäuren Prolin und Aspartatsäure (an Position 220 und 221 bei den Accession Nr. CAA06749 und AAH23584). Bei allen Transkriptvarianten ist der Translationsstart in Exon 2 lokalisiert. Die *in silico* Translation der Transkriptvarianten 1 (Accession Nr. AK024023), 6 (Accession Nr. CR600255) und 14 (Accession Nr. AF063015) führt zu einem Protein von 327 Aminosäuren (Accession Nr. AAC33734), wo hingegen die *in silico* Translation der Transkriptvarianten 2 (Accession Nr. AJ005892), 3 (Accession Nr. CR595767), 7 (Accession Nr. CR590233), 8 (Accession Nr. CR613129) , 10 (Accession Nr. CR606907), 11 (Accession Nr. CR609653) und 13 (Accession Nr. BC023584) zu einem vorhergesagten Protein von 329 Aminosäuren (Accession Nr. AAH23584) führt. Die *in silico* Translation der Transkriptvariante 12 (Accession Nr. BC021047), mit dem *Translate* Programm (ExpASY) führte zu keinem längeren offenen Leserahmen. Innerhalb dieser Sequenz ist 22 Nukleotide stromaufwärts vom Translationsstartkodon ein zusätzliches Guanin, das bei keiner der anderen Sequenzen vorhanden ist. Außerdem ist ein zusätzliches Thymidin 9 Nukleotide

stromabwärts vom Translationsstartkodon vorhanden, das den offenen Leserahmen zerstört.

Neben diesen Proteinvarianten, die bis auf zwei zusätzliche Aminosäuren identisch sind, existieren noch drei Transkriptvarianten deren, *in silico* Translation zu Proteinvarianten mit alternativen C-terminalen Enden führt. Bei der Transkriptvariante 4 (Accession Nr. CR595180) wird eine alternative Spleißstelle in Intron 11 benutzt, die eine Verlängerung der Sequenz von Exon 11 um 125 Bp verursacht und zu einem Translationsstopkodon, beginnend an Position 1011 der Protein kodierenden Sequenz (Accession Nr. CR595180), führt. Das vorhergesagte Protein hat eine Gesamtlänge von 337 Aminosäuren, von denen die ersten 319 Aminosäuren mit der Sequenz der Proteinvariante AAH23584 übereinstimmen, die restlichen 19 Aminosäuren aber führen zu einem veränderten C-terminalen Ende dieser Proteinvariante. Entsprechendes gilt für die Transkriptvariante 5 (Accession Nr. CR616099). Auch bei dieser Transkriptvariante ist die Sequenz von Exon 11 verlängert, in diesem Fall jedoch um 101 Bp. Es wird dennoch das gleiche alternative Translationsstopkodon in Intron 11 genutzt wie bei der Transkriptvariante 4. Dadurch entspricht das C-terminale Ende dieser Proteinvariante dem C-terminalen Ende des vorhergesagten Proteins der Transkriptvariante 4. Ein Unterschied besteht jedoch beim Spleißen von Exon 10. Hier entsprechen die ersten 317 Aminosäuren der Sequenz der Proteinvariante CAA06749. Bei der Transkriptvariante 9 (Accession Nr. CR616867) wird das Intron 8 in die mRNA eingebaut. Dies führt zu einer Verschiebung des offenen Leserasters und zur Nutzung eines neuen Translationsstopkodons in Exon 9, beginnend an Position 699 der Proteinkodierenden Sequenz (Accession Nr. CR616867). Das vorhergesagte Protein hat eine Gesamtlänge von 233 Aminosäuren, wobei die ersten 190 Aminosäuren der Proteinvariante AAH23584 entsprechen, die restlichen 43 C-terminalen Aminosäuren jedoch verändert sind.

3.2.3.4 *In silico* Charakterisierung des FTSJ1 Proteins

FTSJ1 ist auf Grund der homologen Proteine verschiedener Spezies in die Familie der S-Adenosyl-L-Methionin-abhängigen Methyltransferasen eingeordnet worden. Homologe Proteine sind für *R. norvegicus* (LOC363450), *M. musculus* (NM_133991), *D. melanogaster* (CG5220), *A. gambiae* (GeneID: 1278793), *C. elegans* (3F295), *S. pombe* (SPAC4F10.03c), *S. cerevisiae* (NC_001134), *N. crassa* (NCU04040.1), *E. coli* (U00096), *M. grisea* (MG00559.4), *A. thaliana* (At5g01230) und *P. falciparum* (PFI0415c) beschrieben.

Alle homologen Proteine zeigen eine hohe Konservierung bezüglich der funktionellen Domäne. Diese S-Adenosyl-L-Methionin-abhängige Bindedomäne ist bei *E. coli* funktionell charakterisiert worden (Caldas et al., 2000). Da diese Domäne charakteristisch für alle Proteine dieser Gruppe ist, kann man annehmen, daß sie eine redundante Funktion aufweisen, allerdings verschiedene Zielmoleküle methylieren. Für *E. coli* wurde eine funktionelle Domäne aus alternierenden α -Helices und β -Faltblättern beschrieben, die durch ihre Konstitution eine Vertiefung bilden, welche als Bindungsstelle für den Kofaktor S-Adenosyl-L-Methionin dient (Caldas et al., 2000). Durch die starke Konservierung der funktionellen Domäne bei den verschiedenen Spezies, ist es wahrscheinlich, daß die funktionelle Domäne des humanen FTSJ1 ebenfalls aus alternierenden α -Helices und β -Faltblättern aufgebaut ist. An Hand von Sequenzhomologien auf Aminosäureebene kodieren wahrscheinlich Exon 2 bis Exon 9 für die Aminosäuren der funktionellen Domäne (Abb.24).

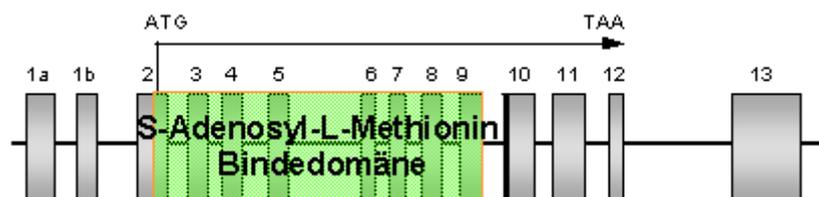


Abb.24: **Schematische Darstellung der FTSJ1 Exone:** Dargestellt ist die genomische Verteilung der Exone. In grün sind die Exone markiert, die für die vorhergesagte S-Adenosyl-L-Methionin Bindedomäne kodieren.

3.2.3.5 Expressionsstudien von *FTSJ1* in humanen Geweben

Durch Northern Blot Analyse sollte das Expressionsmuster von *FTSJ1* in adulten und fötalen humanen Geweben untersucht werden. Für die Hybridisierung des Northern Blots wurde eine cDNA Probe von *FTSJ1* verwendet, für deren Herstellung Primer in Exon 2 und Exon 10 gewählt wurden. Durch Verwendung dieser cDNA Probe konnten theoretisch alle beschriebenen Transkriptvarianten von *FTSJ1* detektiert werden (Abb.23). Auf allen Northern Blots konnte eine spezifische Bande von ungefähr 2,4 Kb detektiert werden (Abb.25). Eigentlich würde man auf Grund der unterschiedlichen Transkriptvarianten (s. Kapitel 3.2.3.3), spezifische Banden unterschiedlicher Größe erwarten. Die Auftrennung der RNAs auf den verwendeten Blots ist allerdings gering und abgesehen davon besteht die Möglichkeit, daß nicht alle Transkriptvarianten in den untersuchten Geweben exprimiert sind.

Die Hybridisierung des Northern Blots der RNA aus fötalen Geweben zeigte, das *FTSJ1* in der Lunge, in der Leber, in der Niere und im Gehirn exprimiert ist. Darüber hinaus scheint *FTSJ1* besonders stark im fötalen Gehirn exprimiert zu sein (Abb.25A). Bei der Hybridisierung des Northern Blots, auf dem RNAs aus unterschiedlichen Regionen des Gehirns vorhanden sind, zeigte sich, daß *FTSJ1* auch im adulten Gehirn in allen untersuchten Geweben exprimiert wird (Abb.25B). Eine geringfügig stärkere Expression konnte im Nukleus Caudate nachgewiesen werden. Der Nukleus Caudate ist Teil des extrapyramidalmotorischen Systems (EPS) und nimmt eine wichtige Funktion in der Steuerung der Willkürmotorik ein. Im Corpus Callosum hingegen wurde eine geringfügig schwächere Expression detektiert. Das Corpus Callosum ist eine quer verlaufende Faserverbindung zwischen den beiden Gehirnhemisphären. Es ist verantwortlich für die Informationsübertragung zwischen den beiden Gehirnhälften. Die Hybridisierung des Northern Blots, der RNA aus adultem Gewebe enthält, zeigte, daß *FTSJ1* in allen untersuchten Geweben exprimiert ist, mit einer leicht verstärkten Expression in der Plazenta und im Pankreas (Abb.25C). Alle Northern Blots wurden ebenfalls mit einer β -Aktin Sonde hybridisiert. Diese β -Aktin Hybridisierung dient dem Nachweis der RNA Menge in jeder Spur des Blottes und der Interpretation der Expressionsstärke durch Abgleich mit derselben.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß *FTSJ1* in allen untersuchten Geweben, sowohl im Fötalstadium als auch im adulten Stadium, exprimiert ist, mit einer möglicherweise verstärkten Expression im fötalem Gehirn.

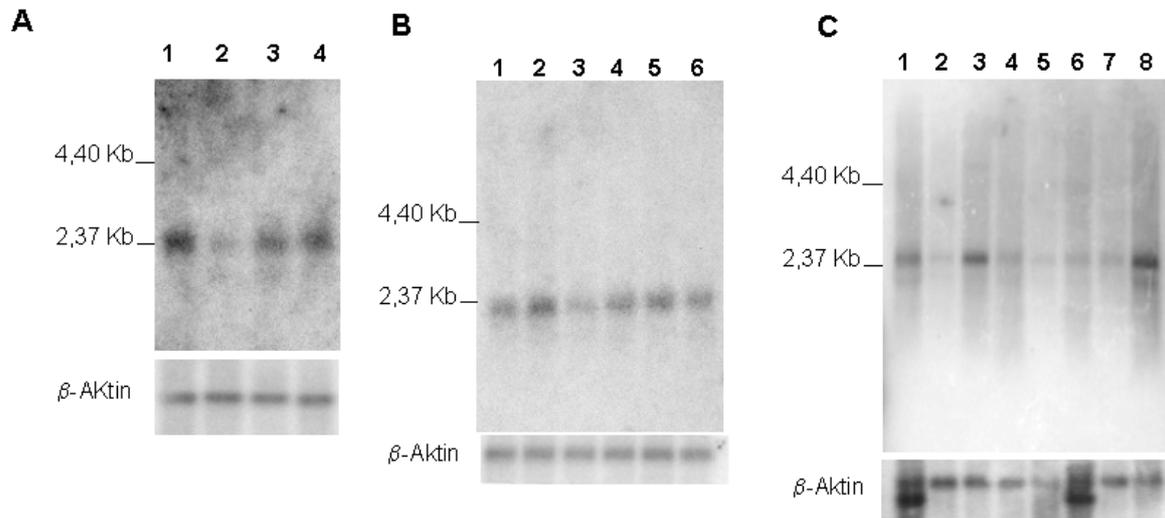


Abb.25: **Expressionsanalyse von *FTSJ1* in verschiedenen humanen Geweben:**

A: Northern Blot mit RNA aus fötalen Geweben. 1: Gehirn, 2: Lunge, 3: Leber, 4: RNA aus fötalem Niere. In allen Spuren ist eine spezifische Bande für *FTSJ1* erkennbar. Der gleiche Blot wurde auch mit einer β -Aktinprobe hybridisiert. Als Ladekontrolle wurde der Blot mit einer β -Aktinprobe hybridisiert.

B: Northern Blot mit RNA aus adulten Gehirngeweben. 1: Amygdala, 2: Nucleus Caudate, 3: Corpus callosum (Balken), 4: Hippocampus, 5: verschiedene Gehirngewebe, 6: Thalamus. Auch bei diesem Blot ist in allen Spuren eine spezifische Bande für *FTSJ1* detektierbar. Die Hybridisierung mit der β -Aktinprobe zeigt, daß vergleichbare Mengen von RNA aus den verschiedenen Geweben vorhanden sind.

C: Northern Blot mit RNA aus adulten Geweben. 1: Herz, 2: Gehirn, 3: Placenta, 4: Lunge, 5: Leber, 6: Skelettmuskel, 7: Nieren, 8: Pankreas. Auch bei diesem Blot ist in allen Spuren eine spezifische Bande für *FTSJ1* detektierbar, und die Hybridisierung mit der β -Aktinprobe zeigt, daß eine größere Menge an RNA in den Spuren 1 und 6 vorhanden ist

3.2.3.6 Funktionelle Analyse der Mutation 655G→A bei Familie MRX44

Die konservierten Bereiche an den Exon- und Intronübergängen sind von besonderer Bedeutung für einen korrekten Spleißvorgang. Besonders wichtig sind die beiden Nukleotide jeweils am 5' (GT) und 3' (AG) des Introns. Auch die 5' (C/AAG) und 3' (G/A) gelegenen äußersten Nukleotide der flankierenden Exone sind hochkonserviert und spielen eine wichtige Rolle bei der Erkennung durch das Spleißosom (Abb.26). Die in Familie MRX44 detektierte Mutation betrifft das letzte 5' gelegene Nukleotid von Exon 9 (s. Abb.20). Durch die Basensubstitution am 5' Ende von Exon 9 (655G→A) wird ein stark konserviertes Nukleotid verändert. Diese Substitution kann die Erkennung der Spleißstelle durch das Spleißosom verhindern und dadurch zu einem veränderten Spleißen führen.



Abb.26: Schematische Darstellung der konservierten Bereiche im Exon- und Intron- Bereich, die wichtig für einen korrekten Spleißvorgang sind (adaptiert aus Strachan und Read, 1996). Der Intronbereich ist in blau dargestellt. Variable Nukleotide sind mit N gekennzeichnet. Zwei Nukleotide übereinander bedeuten, daß das eine oder andere Nukleotid vorhanden sein kann.

Um den möglichen Effekt eines veränderten Spleißens der mutierten *FTSJ1*-RNA im Indexpatienten zu untersuchen, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Es wurden Intron-überspannende Primer in Exon 7 und Exon 10 ausgewählt. Für die cDNA Synthese wurde RNA aus lymphoblastoiden Zelllinien des Indexpatienten und einer männlichen Kontrolle isoliert. Die PCR auf der cDNA des Patienten und der cDNA der Kontrollperson zeigte, daß das von der Patienten-cDNA produzierte Amplifikat signifikant kürzer war im Vergleich mit dem von der cDNA der Kontrollperson produzierten Amplifikat. (Abb.27A). Exon 9 besteht aus 84 Nukleotiden, ein Herausspleißen dieses Exons würde den Größenunterschied zwischen beiden PCR-Produkten erklären. Um dieses zu überprüfen wurden die PCR-Produkte des Patienten und der Kontrolle sequenziert (Abb.27B). Wie man

dem Chromatogramm der Sequenz der cDNA des Patienten entnehmen kann, wird Exon 8 direkt mit Exon 10 verspleißt. Dies zeigt, daß die Mutation in unmittelbarer Nähe der Spleißdonorstelle des Exons dazu führt, daß die Spleißmaschinerie den Exon-Intron-Übergang nicht mehr erkennen kann. Exon 9 wird nicht mehr als solches erkannt und nicht in die mRNA von *FTSJ1* integriert.

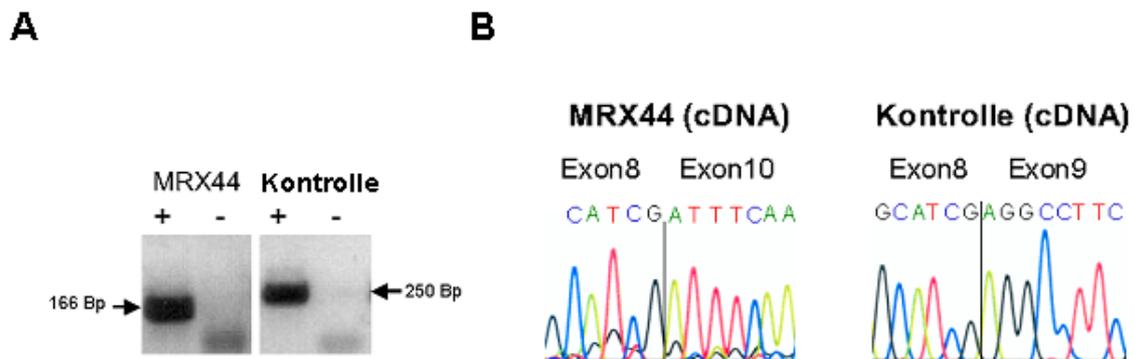


Abb.27: RT-PCR Analyse der Mutation 655G→A :

A: Gelelektrophoretische Auftrennung der RT-PCR Produkte amplifiziert auf cDNA des Indexpatienten der Familie MRX44 und einer Kontrollperson. Mit einem + gekennzeichnet ist die eigentliche RT-PCR, bei der zum Reaktionsansatz Reverse Transkriptase zugegeben wurde. Mit einem - gekennzeichnet ist die Negativkontrolle der RT-PCR, bei der zum Reaktionsansatz keine Reverse Transkriptase zugegeben wurde. Das RT-PCR Produkt amplifiziert auf der cDNA des Indexpatienten hat eine Größe von 166 Bp, das der Kontrollperson eine solche von 250 Bp.

B: Ausschnitt aus den Sequenzierungschromatogrammen der RT-PCR-Produkte des Indexpatienten und einer Kontrollperson. In der cDNA des Indexpatienten wird Exon 9 herausgespleißt und Exon 8 mit Exon 10 verknüpft. In der cDNA der Kontrollperson ist, wie erwartet, Exon 8 mit Exon 9 verknüpft.

Aus den bisherigen Ergebnissen ergab sich die Frage, ob das mutierte *FTSJ1* Transkript des Indexpatienten von Familie MRX44 (ohne Exon 9) stabil ist. Um dieses zu überprüfen, wurde eine Northern Blot Analyse mit polyA⁺ RNA aus lymphoblastoiden Zelllinien des Patienten und einer männlichen Kontrollperson durchgeführt. Die verwendete Probe für die Hybridisierung war dieselbe wie bei der Untersuchung der *FTSJ1* Expression in verschiedenen humanen Geweben (s. Kapitel 3.2.3.5; Abb.25). Das Ergebnis zeigt, daß das mutierte *FTSJ1* Transkript des Patienten in vergleichbarer Stärke wie das *FTSJ1* Transkript der Kontrolle

exprimiert wird (Abb.28). Das mutierte Transkript ist somit auch ohne Exon 9 stabil. Allerdings werden bei diesem Northern Blot zwei spezifische Banden detektiert. Wie man der Tabelle 5 entnehmen kann, gibt es vierzehn verschiedene Transkriptvarianten für *FTSJ1*. Die kürzeste Transkriptvariante (Accession Nr. CR616099) ist 1320 Bp lang, während die längste Transkriptvariante (Accession Nr. AK024023) 1984 Bp beinhaltet. Der Größenunterschied zwischen diesen beiden Transkriptvarianten wäre demnach theoretisch, basierend auf den publizierten Sequenzen, fast 800 Bp. Wahrscheinlich repräsentiert also die untere Bande die kürzeren Transkriptvarianten, während die obere Bande die längeren Transkriptvarianten repräsentiert.

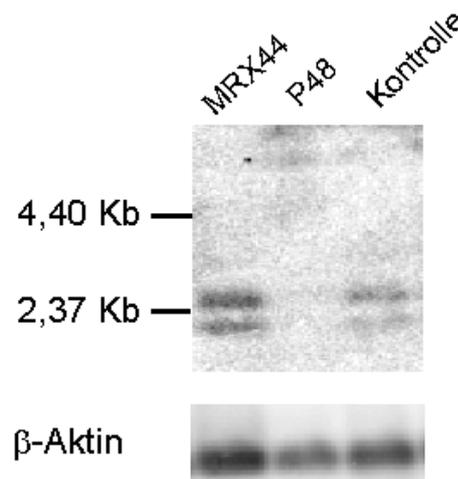


Abb.28: **Northern Blot Analyse von PolyA⁺ RNA der Indexpatienten von Familie MRX44 und P48:** PolyA⁺ RNA wurde aus lymphoblastoiden Zelllinien der Indexpatienten sowohl von Familie MRX44 und Familie P48 als auch von einer männlichen Kontrollperson isoliert und auf eine Nylonmembran transferiert. In der ersten Spur, in der die RNA des Indexpatienten von Familie MRX44 geblottet ist, sieht man zwei spezifische Banden für *FTSJ1*, die auch in der letzten Spur, in der die RNA einer männlichen Kontrollperson geblottet ist, nachweisbar sind. In der mittleren Spur ist RNA des Indexpatienten der Familie P48 geblottet. In dieser Spur sind keine spezifischen Banden für *FTSJ1* nachweisbar. Als Ladekontrolle wurde der Blot mit einer β -Aktinprobe hybridisiert und das Verhältnis der spezifischen *FTSJ1* Banden mit der entsprechenden β -Aktinbande quantifiziert (verwendetes Programm:ImageQuant von Amersham Bioscience)

Offensichtlich führt die Spleißstellenmutation in *FTSJ1* bei der Familie MRX44 zu einem Leseraster konformen Herausspleißen von Exon 9. Dies führt wiederum zu einer Deletion von 28 Aminosäuren im resultierenden mutierten *FTSJ1* Protein. Dadurch besteht die Möglichkeit, daß die Konformation des mutierten Proteins verändert ist. Darüber hinaus ist es auch möglich, daß die S-Adenosyl-L-Methionin-Bindedomäne, die höchstwahrscheinlich von Exon 2 bis Exon 9 kodiert wird (s. Kapitel 3.2.3.4), nicht mehr oder nur noch eingeschränkt funktionsfähig ist. Abgesehen von dieser Leseraster-konformen Deletion ist die Aminosäuresequenz des mutierten Proteins, verglichen mit der Aminosäuresequenz des *FTSJ1* Wildtyp Proteins, unverändert. Es besteht die Möglichkeit, daß die Konformationsänderung des mutierten Proteins eine veränderte zelluläre Lokalisation zur Folge hat. Um dies zu überprüfen, wurden Immunfluoreszenz-Experimente zur Bestimmung der bislang unbekanntenen zellulären Lokalisation des *FTSJ1* Proteins durchgeführt. Ausgangspunkt dafür sind die folgenden Überlegungen.

Bis heute sind nur die paralogen Proteine in *S. cerevisiae* und das homologe Protein in *E. coli* funktionell beschrieben worden. Es war daher unbekannt, in welchem Zellkompartiment das humane *FTSJ1* lokalisiert ist. In *E. coli* gibt es ein orthologes Protein, das *ftsJ* oder auch *rrmJ*. Dieses Protein ist als S-Adenosyl-L-Methionin-abhängige Methyltransferase beschrieben, welche die 23S rRNA der 50S Untereinheit des Ribosoms methyliert (Bugl et al., 2000). In *S. cerevisiae* gibt es drei paraloge Proteine, die als orthologe Proteine für das humane *FTSJ1* in Frage kommen. Eines davon ist *Mrm2p*, welches in die Methylierung der mitochondrialen 21S rRNA involviert ist (Pintard et al., 2002a). Das zweite ist *Spb1p*, das mittels Methylierungsaktivität an der Biogenese der 60S Untereinheit des Ribosoms beteiligt ist (Kressler et al., 1999). Das dritte Paralog ist *Trm7p*, welches die Methylierung der Antikodonschleife bestimmter tRNAs vermittelt (Pintard et al., 2002b).

Durch die Untersuchung der zellulären Lokalisation von *FTSJ1* kann man herausfinden, ob *FTSJ1* in einem bestimmten Zellkompartiment bevorzugt lokalisiert ist. Legt man die Funktionen der bereits publizierten paralogen Proteine von *S. cerevisiae* zugrunde, dann könnte das humane *FTSJ1*, wenn es in die Synthese der Ribosomen involviert ist, vollständig oder zumindestens überwiegend im Zellkern lokalisieren, da im Zellkern die Synthese der ribosomalen Untereinheiten stattfindet, welche anschließend im Zytoplasma zu

funktionsfähigen Ribosomen zusammengesetzt werden. Wäre FTSJ1 jedoch in die Methylierung der 21S rRNA involviert, die ein Bestandteil der mitochondrialen Ribosomen ist, dann wäre eine verstärkte mitochondriale Lokalisation des überexprimierten FTSJ1 Proteins zu erwarten. Wenn allerdings FTSJ1 in die Methylierung bestimmter tRNAs involviert wäre, dann würde man eine zytoplasmatische Lokalisation von FTSJ1 erwarten, da tRNA Modifikationen oftmals im Zytoplasma stattfinden (Abb.29).

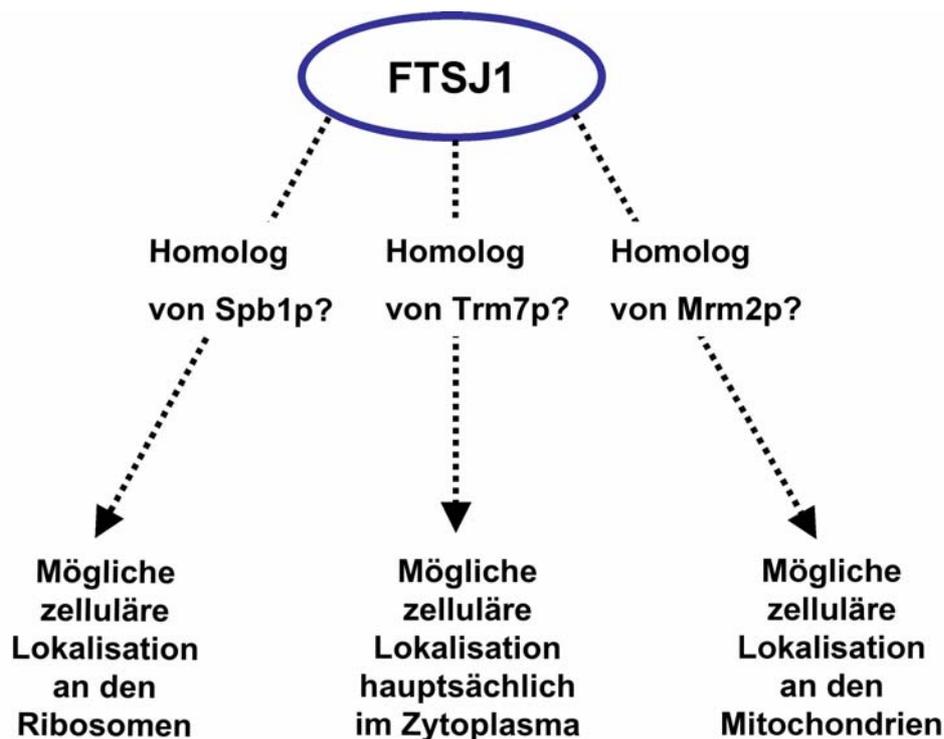


Abb.29: Schematische Darstellung der möglichen zellulären Lokalisation des humanen FTSJ1

Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden Immunfluoreszenz Experimente in HeLa Zellen und in einer Astrozytoma-Zelllinie (U373MG) durchgeführt. Dabei wurde die zelluläre Verteilung des überexprimierten, transient transfizierten humanen Wildtyp FTSJ1 untersucht. Das Wildtyp FTSJ1 Konstrukt wurde durch die Amplifikation der gesamten Protein-kodierenden Sequenz von *FTSJ1* auf der cDNA einer männlichen Kontrolle hergestellt und in einen Expressionsvektor kloniert. Mit diesen Konstrukten wurden HeLa-Zellen und U373MG-Zellen transformiert. HeLa-Zellen sind humane Zervixkarzinom-Zellen und U373MG sind

humane Glioblastomazellen. Die Experimente ergaben, daß das überexprimierte Wildtyp FTSJ1 gleichmäßig im Zytoplasma und im Zellkern verteilt ist (Abb.30B und 30D). Die beobachtete zelluläre Lokalisation läßt somit keine endgültigen Rückschlüsse auf mögliche Zielmoleküle des humanen FTSJ1 Proteins zu. Es scheint jedoch, als wäre Trm7p das funktionelle Homolog des humanen FTSJ1, da weder eine mitochondriale Lokalisation (Mrm2p) noch eine verstärkte Lokalisation im Zellkern (Spb1p) zu beobachten war. Um diese Vermutung zu bestätigen, müßte allerdings das Zielmolekül von FTSJ1 identifiziert werden.

Um eine möglicherweise veränderte Lokalisation des mutierten FTSJ1 Proteins zu untersuchen, wurde die gesamte Protein-kodierende Sequenz von *FTSJ1* auf der cDNA des Indexpatientenen von Familie MRX44 amplifiziert, in einen Expressionsvektor kloniert und in HeLa- und U373MG-Zellen transfiziert und transient überexprimiert. Das mutierte Protein (FTSJ1 Δ Exon 9) ist verstärkt im Zytoplasma lokalisiert, und das Signal im Zellkern ist wesentlich schwächer (Abb.30A und 30C). Offensichtlich führt die Konformationsänderung des mutierten Proteins, verursacht durch das Fehlen der 28 Aminosäuren, zu einer veränderten zellulären Lokalisation. Dadurch ist ein größerer Anteil des überexprimierten, mutierten FTSJ1 im Zytoplasma lokalisiert. Ob diese veränderte zelluläre Lokalisation des mutierten FTSJ1 Proteins einen Einfluß auf dessen Funktion ausübt, läßt sich zu diesem Zeitpunkt nicht klären.

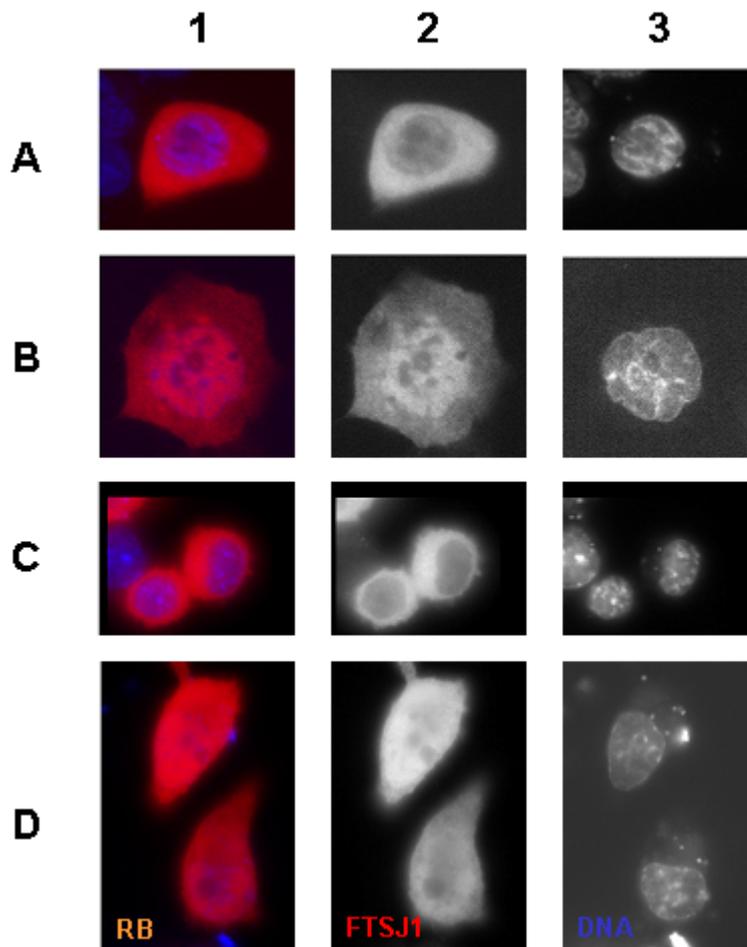


Abb.30: Immunfluoreszenz Experimente mit Wildtyp FTSJ1 und FTSJ1 Δ Exon 9:

Die überexprimierten FTSJ1 Proteine sind mit dem c-MYC Epitop N-terminal markiert und mit entsprechenden Antikörpern detektiert. Die Lokalisation der überexprimierten FTSJ1 Proteine kann somit mittels Fluoreszenzmikroskopie (in diesem Fall Emission von rotem Licht) nachgewiesen werden. In Spalte 1 sind sowohl die überexprimierten FTSJ1 Proteine (rot) als auch die DNA Färbung des Zellkerns mittels DAPI (blau) zu sehen. In Spalte 2 sind nur die überexprimierten FTSJ1 Proteine (grau) dargestellt und in Spalte 3 sieht man nur die DAPI Färbung der Zellkerne (grau).

A: Transiente Überexpression des FTSJ1 Δ Exon 9 Konstruktes in HeLa Zellen. Das mutierte Protein ist im Zellkern und verstärkt im Zytoplasma exprimiert.

B: Transiente Überexpression des FTSJ1 Wildtyp Konstruktes in HeLa Zellen. Das Wildtyp FTSJ1 Protein ist gleichmäßig im Zellkern und im Zytoplasma exprimiert.

C: Transiente Überexpression des FTSJ1 Δ Exon 9 Konstruktes in U373MG Zellen. Das mutierte Protein ist im Zellkern und verstärkt im Zytoplasma exprimiert.

D: Transiente Überexpression des FTSJ1 Wildtyp Konstruktes in U373MG Zellen. Das Wildtyp FTSJ1 Protein ist gleichmäßig im Zellkern und im Zytoplasma exprimiert.

3.2.3.7 Funktionelle Analyse der Mutation 196C→T in Familie P48

Bei der in Familie P48 gefundenen Nonsense-Mutation (196C→T) in Exon 4 handelt es sich um eine nichtsynonyme Substitution, da das CAA-Kodon spezifisch für Glutamin, durch ein Stopkodon (TAA) ersetzt wird. Höchstwahrscheinlich führt diese Mutation zu einer Instabilität des Transkriptes. Eine allgemein akzeptierte Regel besagt, daß vorzeitige Stopkodons, welche mehr als 50-55 Nukleotide stromaufwärts von der Spleißverbindung der letzten beiden Exone liegen, durch den sogenannten *nonsense mediated mRNA decay*-Mechanismus (NMD) degradiert werden (Hentze et al., 1999). Dies ist ein Schutzmechanismus der Zelle, um die Anhäufung von trunkierten und möglicherweise toxischen Proteinen zu vermeiden.

Zum Nachweis des möglichen Abbaus der mutierten RNA des Patienten wurde PolyA⁺ RNA aus lymphoblastoiden Zelllinien von Patienten und einer männlichen gesunden Kontrolle extrahiert und für die Northern Blot Experimente eingesetzt. Die Ergebnisse zeigen zwei spezifische Banden für die RNA der Kontrollperson. Diese beiden Banden sind beim Patienten nicht nachweisbar (Abb.28). Dies bedeutet, daß sie auf Grund des vorzeitigen Stopkodons durch NMD abgebaut werden. Für den Patienten bedeutet das, daß höchstwahrscheinlich kein funktionelles FTSJ1 erzeugt wird und somit ein kompletter Funktionsverlust von FTSJ1 vorliegen muß.

3.2.3.8 Funktionelle Analyse der Mutation IVS2+1delG in Familie A3

Der Indexpatient der Familie A3 ist Träger einer Deletion von einem Nukleotid am Übergang von Exon 2 zu Intron 2. Ist das Nukleotid im Exon deletiert, dann würde dies entweder zu einer Verschiebung des Leserasters führen, was ein vorzeitiges Stopkodon zur Folge haben könnte, oder wie bei der Mutation in Familie MRX44 zu einem veränderten Spleißen der mRNA. Würde die Deletion im Intronbereich liegen, könnte dies zur Zerstörung der Spleißdonorstelle führen. Dies kann ebenfalls zu einem abnormen Spleißen der *FTSJ1* mRNA beim Patienten führen. Um die Mutation genauer lokalisieren zu können und ihren Effekt auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurden RT-PCR Experimente durchgeführt. Mit je einem spezifischen Primer für Exon 2 und Exon 5 von *FTSJ1* wurde auf cDNA des

Patienten und auf cDNA von gesunden, männlichen Kontrollen eine RT-PCR durchgeführt, und die PCR Produkte anschließend sequenziert. Die Chromatogramme der Sequenzen zeigen, daß im Falle des RT-PCR Produktes des Patienten 10 Nukleotide intronischer Sequenz in die mRNA inkorporiert werden (Abb.31). Des Weiteren kann man diesen Ergebnissen entnehmen, daß nicht das letzte Nukleotid im 3' Bereich von Exon 2 von der Deletion betroffen ist sondern das erste Nukleotid im 5' Bereich von Intron 2. Diese Deletion führt zur Zerstörung der Spleißdonorstelle und induziert darüber hinaus die Aktivierung einer kryptischen Spleißdonorstelle in Intron 2. Kryptische Spleißstellen sind den Spleißkonsensusstellen sehr ähnlich, werden aber normalerweise vom Spleißsystem nicht verwendet. Die Aufnahme von 10 intronischen Nukleotiden in das mutierte *FTSJ1* Transkript des Patienten führt zu einer Verschiebung des Leserasters bei der Translation und zu einer veränderten Aminosäuresequenz. Durch diese Verschiebung entsteht ein vorzeitiges Stopkodon in Exon 3 bei Nukleotid 147 der kodierenden Sequenz des mutierten *FTSJ1* Transkriptes (Accession Nr. AK024023).

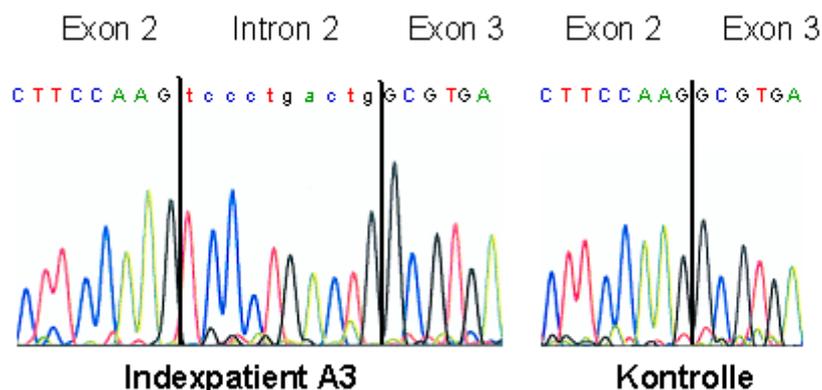


Abb.31: **RT-PCR Analyse der Mutation IVS2+1delG:** Ausschnitt aus den Sequenzierungs-chromatogrammen der RT-PCR Produkte des Indexpatienten und der Kontrollperson. Dargestellt ist der Übergang von Exon 2 zu Exon 3. In die cDNA des Indexpatienten sind 10 intronische Nukleotide inkorporiert. In der cDNA der Kontrollperson ist, wie erwartet, Exon 2 mit Exon 3 verknüpft.

Genau wie im Falle des Indexpatienten von Familie P48, stellt sich auch beim Indexpatienten von Familie A3 die Frage, ob die mutierten *FTSJ1* Transkripte

stabil sind oder ob die Leserasterverschiebung und das daraus resultierende vorzeitige Stopkodon in Exon 3, die Degradation des Transkriptes herbei führt. Die diesbezüglich durchgeführten Northern Blot Analysen mit PolyA⁺ RNA des Patienten und PolyA⁺ RNA von männlichen gesunden Kontrollen ergaben, daß auch in der Patienten-RNA die beiden representativen *FTSJ1* Banden nachweisbar sind. Allerdings war ihre Expressionsstärke merklich reduziert (Abb.32). Die Reduktion der Transkriptmenge kommt höchstwahrscheinlich durch NMD (s. Kapitel 3.2.3.9) zustande. Durch die Inkorporation von intronischer Sequenz, die durch die Zerstörung der Spleißdonorstelle in Intron 2 verursacht wird und eine kryptische Spleißstelle aktiviert, kommt es konsequenterweise zur Verwendung eines vorzeitigen Stopkodons in Exon 3. Durch dieses vorzeitige Stopkodon wird das mutierte *FTSJ1* Transkript als trunkiertes Transkript erkannt und über den NMD Mechanismus degradiert. Deshalb kann man zusammenfassend sagen, daß auch bei dieser Mutation ein Funktionsverlust von *FTSJ1* vorliegt.

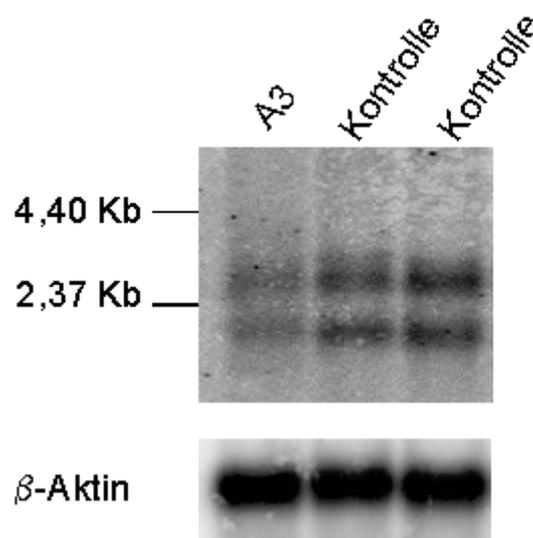


Abb.32: **Northern Blot Analyse von PolyA⁺ RNA der Indexpatienten von Familie A3:** PolyA⁺ RNA wurde aus lymphoblastoiden Zelllinien des Indexpatienten von Familie A3 und von zwei männlichen Kontrollperson isoliert und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Membran wurde mit einer radioaktiv markierten Probe, spezifisch für die Sequenz der *FTSJ1* mRNA von Exon 2 bis Exon 10, hybridisiert. In der ersten Spur, mit RNA des Indexpatienten von Familie A3, sieht man zwei spezifische Banden für *FTSJ1*, die auch in den letzten beiden Spuren, in der die RNA einer männlichen Kontrollperson vorhanden ist,

nachweisbar sind. Die Hybridisierung mit einer β -Aktinprobe zeigt, daß in allen Spuren RNA vorhanden ist und daß bei dem Indexpatienten der Familie A3 die Transkriptmenge reduziert ist.

3.2.3.9 Komplementationsstudien in *S. cerevisiae* zur Identifizierung des Zielmoleküls des humanen FTSJ1

Wie schon bei der Immunfluoreszenz von FTSJ1 beschrieben, sind drei zu FTSJ1 paraloge Proteine in *S. cerevisiae* bekannt (Kapitel 3.2.3.6).

Die Immunfluoreszenz-Ergebnisse hatten gezeigt, daß das humane Wildtyp FTSJ1 Protein gleichmäßig im Zytoplasma und im Zellkern verteilt ist (s. Kapitel 3.2.3.6). Somit konnten diese Ergebnisse keinen eindeutigen Hinweis auf eine mögliche Funktion von FTSJ1 geben. Deswegen sollte mit Hilfe von Komplementationsstudien das von FTSJ1 methylierte Zielmolekül identifiziert werden.

Es konnte bereits für verschiedene humane Gene gezeigt werden, daß der Deletionsphänotyp des entsprechenden *S. cerevisiae* Stammes durch Transformation mit dem humanen Ortholog komplementiert werden kann (Davey and Beach, 1995; Longo et al., 1997; Udell et al., 1998; Loewith et al., 2000). Da das humane FTSJ1 einen hohen Grad an Homologie in der S-Adenosyl-L-Methionin Bindungsdomäne zu den paralogen Proteinen Spb1p, Mrm2p und Trm7p in *S. cerevisia* aufweist, wurden sogenannte *Rescue* Experimente durchgeführt. Im Rahmen dieser Experimente wurde versucht, den Phänotyp von *mrm2* Δ , *spb1* Δ und *trm7* Δ Stämmen durch Transformation mit dem humanen FTSJ1 zu komplementieren. Ziel dieser Komplementationsversuche war es, in den entsprechenden Deletionsstämmen, das bislang unbekannte Zielmolekül von FTSJ1 zu ermitteln.

Dazu wurde die kodierende cDNA des Wildtyp *FTSJ1* und die Patienten cDNA, bei der Exon 9 fehlt (*FTSJ1* Δ Exon9), in die Expressionsvektoren pYES2 und pAE kloniert (s. Tabelle 28, 29 und 30).

Die Transkription der in den Vektor pYES2 klonierten Fragmente kann durch Zugabe von Galaktose zum Medium induziert werden. Bei pAE war ein konstitutiver Promotor dem klonierten Fragment vorgeschaltet, so daß die

Transkription kontinuierlich, ohne Induktion stattfinden konnte. Die Deletionsstämme waren neben weiteren Selektionsmarkern defizient für Uracil und Leucin. Da der Expressionsvektor pYES2 das Uracil Gen (URA3) und pAE das Leucin Gen (Leu2) trägt, ist es möglich, eine erfolgreiche Transformation durch Wachstum auf entsprechenden Selektionsmedien nachzuweisen.

3.2.3.9.1 Komplementationsstudien mit dem *mrm2Δ* Stamm

Der haploide MRM2 Deletionsstamm zeichnete sich durch ein verlangsamtes Wachstum gegenüber einem Wildtypstamm gleichen genetischen Hintergrunds aus. Darüber hinaus verliert der MRM2 Deletionsstamm mitochondriale DNA, die zu einer Instabilität der Mitochondrien führt. Die Wachstumsverzögerung kann durch Anzucht auf glyzerinhaltigem Medium und erhöhter Inkubationstemperatur verstärkt werden (Pintard et al., 2002).

Der *mrm2Δ* Stamm wurde mit pYES2 transformiert, in den entweder die humane cDNA des Wildtyp *FTSJ1* oder die cDNA des Indexpatienten von Familie MRX44 (*FTSJ1ΔExon9*) kloniert war. Als Negativkontrolle diente der mit leeren Vektor transformierte *mrm2Δ* Stamm. Als Positivkontrolle wurde ein Wildtypstamm (Y00000) mit demselben genetischen Hintergrund wie der Deletionsstamm verwendet, der ebenfalls mit dem leeren Vektor transformiert wurde (s. Tabelle 28).

Tabelle 28: Konstrukte für *mrm2Δ-Rescue-Experimente*

Transformierter Hefestamm	Vektor	Insert	Selektionsmarker	Wachstumseffekt
<i>mrm2Δ</i> (Y04503)	pYES2	Wildtyp <i>FTSJ1</i>	URA3	Schlechtes Wachstum
<i>mrm2Δ</i> (Y04503)	pYES2	<i>FTSJ1ΔExon9</i>	URA3	Schlechtes Wachstum
<i>mrm2Δ</i> (Y04503)	pYES2	leer	URA3	Schlechtes Wachstum
Wildtyp Hefestamm (Y00000)	pYES2	leer	URA3	Normales Wachstum

Alle Transformanten wurden auf Medien ohne Uracil selektiert. Nur Hefezellen, die den Vektor pYES2 mit oder ohne Insert aufgenommen haben, können auf Uracil-defizientem Medium wachsen. Deletierte Hefezellen, die mit dem leeren Vektor transformiert wurden, zeigten auf allen Selektionsplatten ein erheblich schlechteres Wachstumsverhalten als der mit leerem pYES2 transformierte Wildtypstamm (Abb.33; Zeilen 3 und 4). Wie man deutlich erkennen kann, wächst der mit dem leerem Vektor transformierte *mrm2Δ* Stamm auf dem Selektionsmedium mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle am schlechtesten (Abb.33A; Zeile 3). Der mit dem Wildtyp *FTSJ1* Konstrukt transformierte MRM2 Deletionsstamm wächst geringfügig besser als der mit *FTSJ1ΔExon9* transformierte. Dieser Wachstumsunterschied ist jedoch nicht signifikant (Abb.33A; Zeile 1 und 2). Nach Induktion des Promotors von pYES2 durch Zugabe von Galaktose als alleiniger Kohlenstoffquelle fand keine wesentliche Verbesserung des Wachstumsverhaltens statt (Abb.33B). Die Transformation mit dem humanen *FTSJ1* führte demnach nicht zu einem verbesserten Wachstum des *mrm2Δ* Stammes (Abb.33B; Zeile 1 und 2). Es sind zwar im Vergleich zur Negativkontrolle bei den mit Wildtyp *FTSJ1* und *FTSJ1ΔExon9* transformierten Deletionsstämmen mehr Kolonien gewachsen, allerdings war dieser Effekt erst nach einer Woche Inkubationszeit sichtbar (Abb.33B).

Durch Zusatz von Glycerin als einziger Kohlenstoffquelle kann der Effekt der Wachstumsverzögerung des Deletionsstammes verstärkt werden (Escribano und Mazon, 2000). Glycerin wird durch die Glukoneogenese zu Glukose umgewandelt. Diese Umwandlung verbraucht Energie, und der Prozeß findet teilweise an den Mitochondrien statt. Bei dem *mrm2Δ* Stamm kann die Methylierung der 21S rRNA nicht korrekt durchgeführt werden, so daß es zu einer Beeinträchtigung des mitochondrialen Translationsapparates kommt (Myers et al., 1985; Fearon und Mason, 1992). Dieses wiederum führt dazu, daß die MRM2 Deletionsmutante bei der ATP Synthese durch die Atmungskette beeinträchtigt ist. Dieser Effekt wird durch die Zugabe von Glycerin verstärkt, da die Zelle zur Verstoffwechslung von Glycerin mehr Energie aufwenden muß, als bei Glukose. Das bedeutet, daß sowohl die Glukoneogenese als auch die Energiegewinnung durch die Atmungskette beeinträchtigt sind. Wenn nur Glycerin dem Medium zugesetzt

wurde, konnte lediglich der Wildtypstamm wachsen. Alle anderen Transformanten zeigten auch nach einer Woche keine Kolonien (Abb.33C).

Gibt man jedoch zusätzlich neben Glycerin als Kohlenstoffquelle Galaktose zum Medium, dann kann man bei den mit pYES2 Wildtyp *FTSJ1* und pYES2 *FTSJ1*ΔExon9 transformierten Deletionsstämmen nach einer Woche Inkubationszeit eine leichte Verbesserung des Wachstumsverhaltens beobachten (Abb.33D). Dieses Experiment zeigt, daß anscheinend eine äußerst geringfügige funktionelle Komplementation zwischen dem Mrm2p der Hefe und dem humanen *FTSJ1* besteht. *FTSJ1* ist nicht in der Lage, die Methylierungsfunktion von Mrm2p in *S. cerevisiae* zu übernehmen. Aus diesem Grunde bleibt das Wachstumsdefizit des *mrm2*Δ Stammes bestehen.

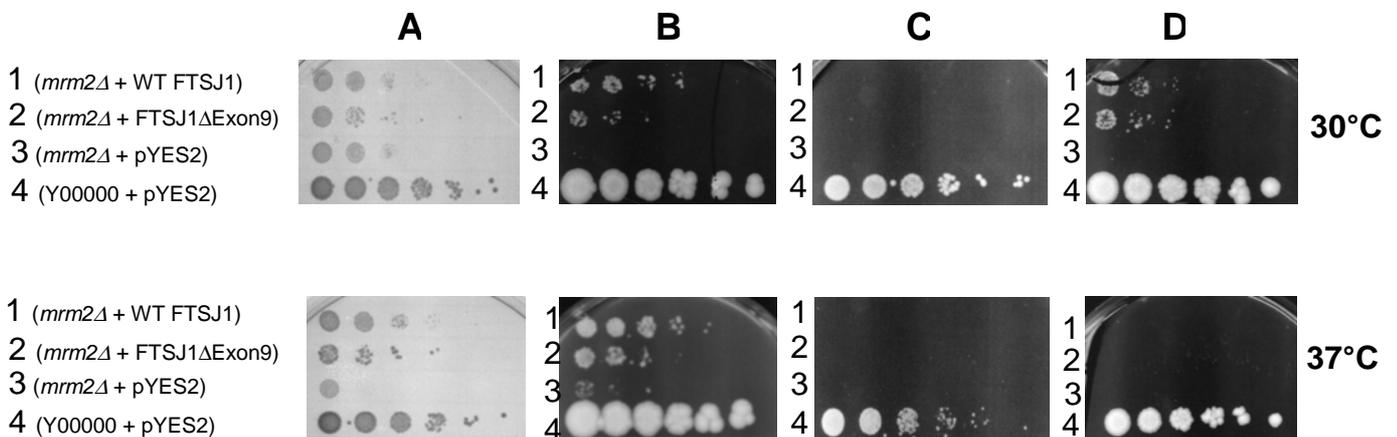


Abb.33: ***mrm2*Δ-Rescue-Experimente**: Der *mrm2*Δ Stamm wurde mit verschiedenen pYES2 Konstrukten transformiert. **1:** *mrm2*Δ + WT *FTSJ1* **2:** *mrm2*Δ + *FTSJ1*ΔExon9 **3:** *mrm2*Δ + pYES2 **4:** Y00000 (Hefewildtypstamm) + pYES2. Die Transformanten wurden auf eine OD von 0,3 (bei 560 nm) eingestellt. Diese Ausgangsverdünnung ist in jeder Reihe ganz links ausplattiert. Danach folgten Ausplattierungen jeweils 1:5,4 verdünnt. Nach dem Ausplattieren der Hefesuspensionen wurden die Platten bei 30°C bzw. 37°C für 7 Tage inkubiert.

A: Die Transformanten wurden auf Uracil-defizienten und Glukose-haltigen Festnährstoffböden ausplattiert. Bei 30°C wachsen alle transformierten *mrm2*Δ Stämme gleich schlecht. Der Wildtypstamm wächst wie erwartet normal. Der Effekt wird bei einer Inkubationstemperatur von 37°C verstärkt, allerdings wächst der mit leerem Vektor transformiert *mrm2*Δ Stamm am schlechtesten. Die *mrm2*Δ Stämme transformiert mit den *FTSJ1* Konstrukten wachsen etwas besser als der Deletionsstamm, jedoch erreichen sie kein mit dem Wildtypstamm vergleichbares Wachstumsverhalten.

B: Die Transformanten wurden auf Uracil-defizienten und Galaktose-haltigen Festnährstoffböden ausplattiert. Durch die Zugabe von Galaktose wird der pYES2 Promotor induziert. Die mit den FTSJ1 Konstrukten transformierten *mrm2Δ* Stämme wachsen etwas besser, während der *mrm2Δ* Stamm sein Wachstum fast vollständig eingestellt hat. Der Wildtypstamm wächst unverändert gut.

C: Die Transformanten wurden auf Uracil-defizienten und Glycerin-haltigen Festnährstoffböden ausplattiert. Keiner der transformierten *mrm2Δ* Stämme kann auf diesem Medium wachsen. Nur der Wildtypstamm zeigt normales Wachstum.

D: Die Transformanten wurden auf Uracil-defizienten, Glycerin- und Galaktose-haltigen Festnährstoffböden ausplattiert. Die mit den FTSJ1 Konstrukten transformierten *mrm2Δ* Stämme können durch die Zugabe von Galaktose auf den Glycerin-haltigen Nährstoffböden wachsen. Sie zeigen aber kein dem Wildtypstamm entsprechendes Wachstumsverhalten.

3.2.3.9.2 Komplementationstudien mit dem *spb1Δ/spb1* Stamm

Da die SPB1 Deletion im haploiden Stamm letal war, wurden die Komplementationstudien mit einem diploiden Hefestamm durchgeführt, bei dem nur ein SPB1-Allel deletiert war. Der *spb1Δ/spb1* Stamm sollte schon auf Glukosemedium ein deutlich gehemmtes Wachstum zeigen, diese Wachstumsverzögerung war allerdings nicht signifikant. Der *spb1Δ/spb1* Deletionsstamm wurde mit verschiedenen Konstrukten transformiert (s. Tabelle 29), und die Selektion fand auf Uracil-defizientem Medium mit Galaktose als Kohlenstoffquelle statt.

Tabelle 29: Konstrukte für SPB1-Rescue-Experimente

Transformierter Hefestamm	Vektor	Insert	Selektionsmarker	Wachstumseffekt
<i>spb1Δ/spb1</i> (Y04503)	pYES2	Wildtyp <i>FTSJ1</i>	URA3	Normales Wachstum
<i>spb1Δ/spb1</i> (Y04503)	pYES2	leer	URA3	Normales Wachstum
Wildtyp Hefestamm (Y00000)	pYES2	leer	URA3	Normales Wachstum
<i>spb1Δ/spb1</i> (Y04503)	pAE	Wildtyp <i>FTSJ1</i>	LEU2	Normales Wachstum

Transformierter Hefestamm	Vektor	Insert	Selektionsmarker	Wachstumseffekt
<i>spb1Δ/spb1</i> (Y04503)	pAE	leer	LEU2	Normales Wachstum
Wildtyp Hefestamm (Y00000)	pAE	leer	LEU2	Normales Wachstum

Es konnte kein Wachstumsunterschied zwischen den untersuchten Transformanten festgestellt werden (Abb.34A). Theoretisch kann die Wachstumsverzögerung durch eine Erniedrigung der Temperatur verstärkt werden. Die Transformanten wuchsen zwar insgesamt schlechter, zeigten aber keinen Unterschied im Wachstumsverhalten (Abb.34B). Um auszuschließen, daß dieses Phänomen auf den verwendeten Vektor zurückzuführen ist, wurden exakt dieselben Klonierungen in den Vektor pAE vorgenommen. Dieser Vektor trägt einen konstitutiven Promotor und muß nicht induziert werden. Als Selektionsmarker diente in diesem Falle Leucin, und die Transformanten wurden auf Leucin defizientem Medium selektiert. Auch in diesem Falle konnte kein Unterschied zwischen den mit dem *FTSJ1* Wildtyp Konstrukt transformierten *spb1Δ/spb1* Stämmen und dem Hefewildtypstamm nachgewiesen werden. Darüber hinaus war es nicht möglich zu überprüfen, ob der Stamm für das eine Allel von SPB1 tatsächlich deletiert war, da durch PCR Experimente auch das intakte Allel amplifiziert werden würde. Mittels semiquantitativer RT-PCR Analyse wäre eine Quantifizierung der Transkripte zwar möglich gewesen, diese wurde jedoch auf Grund der positiven Ergebnisse für bei der Komplementation des *trm7Δ* Stammes nicht durchgeführt (s. Kapitel 3.2.3.9.3). Darüber hinaus deuten die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Experimente (s. Kapitel 3.2.3.6; Abb.29 und Abb.30) darauf hin, daß *FTSJ1* wahrscheinlich nicht das orthologe Protein von Spb1p.

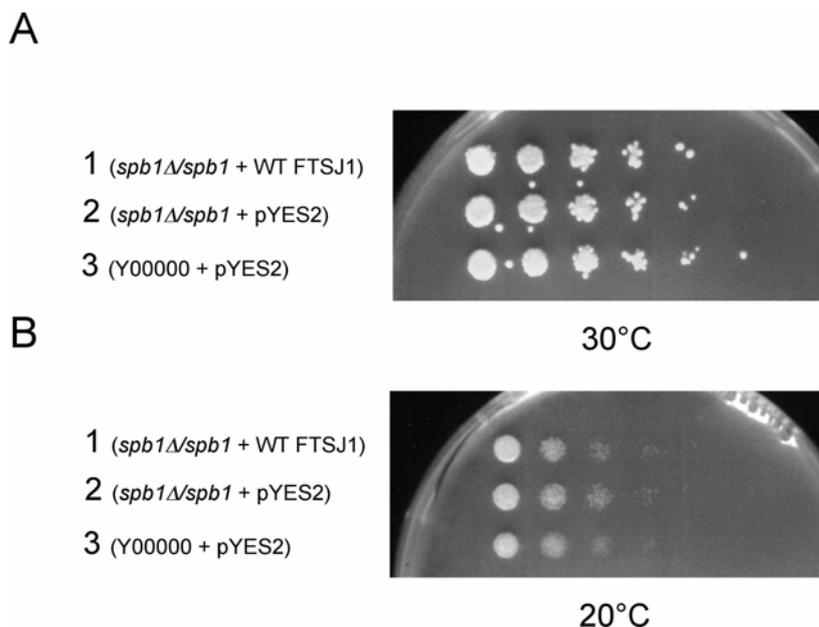


Abb.34: ***spb1Δ/spb1*-Rescue-Experimente**: Der *spb1Δ/spb1* Stamm wurde mit verschiedenen pYES2 Konstrukten transformiert. **1** *spb1Δ/spb1* + WT *FTSJ1* **2**: *spb1Δ/spb1* + pYES2 **3**: Y00000 (Hefewildtypstamm)+ pYES2. Die Hefesuspensionen wurden wie beim *mrm2Δ*-Rescue-Experiment verdünnt. Nach dem Ausplattieren der Hefesuspensionen wurden die Platten bei 20°C bzw. 30°C für drei Tage inkubiert.

A: Die Transformanten wurden auf Uracil-defizienten und Galaktose-haltigen Festnährstoffböden ausplattiert und bei 30°C inkubiert. Es ist kein unterschiedliches Wachstum zwischen dem *spb1Δ/spb1* Stamm, dem *spb1Δ/spb1* Stamm, transformiert mit Wildtyp *FTSJ1* und dem Hefewildtypstamm, erkennbar.

B: Die Transformanten wurden auf Uracil-defizienten und Galaktose-haltigen Festnährstoffböden ausplattiert und bei 20°C inkubiert. Das Wachstumsverhalten ist insgesamt schlechter bei der niedrigeren Temperatur aber für alle drei transformierten Hefestämme gleich.

3.2.3.9.3 Komplementationsstudien mit dem *trm7Δ* Stamm

Der haploide *trm7Δ* Stamm zeigte ebenfalls ein verlangsamtes Wachstum. Dennoch war auch in diesem Experiment die Wachstumsverzögerung schon auf Komplexmedium mit Glukose nicht sehr deutlich. Die Transformation mit dem Wildtyp *FTSJ1* und *FTSJ1ΔExon9* pYES2- und pAE-Konstrukten (Tabelle 30) brachte keine Verbesserung des Wachstumsverhaltens (Abb.35A). Deshalb wurde aus den *trm7Δ* Stamm RNA isoliert, DNase behandelt und mittels RT-PCR

nachgewiesen, daß kein TRM7 Transkript existiert, während im Wildtypstamm eindeutig ein TRM7 Transkript vorhanden ist (Abb.35B). Die Qualität der cDNA wurde durch RT-PCR Amplifikation der Transkripte des Aktin Gens von *S. cerevisiae* kontrolliert (Abb.35C).

Darüber hinaus wurde ebenfalls mittels RT-PCR überprüft, ob die beiden Transformanten, die die humane Wildtyp *FTSJ1* und die *FTSJ1*ΔExon9 cDNA in den Vektoren pYES2 und pAE transkribiert werden. Dafür wurden Primer verwendet, die schon bei den RT-PCR Experimenten für die Expressionsanalyse von *FTSJ1* bei Familie A3 eingesetzt wurden. Der vorwärts orientierte Primer bindet spezifisch in Exon 2, und der rückwärts orientierte Primer bindet spezifisch in Exon 5 des humanen *FTSJ1* Transkripts. Als Produkt der RT-PCR erhält man eine spezifische Bande von 238 Bp. Für die beiden Konstrukte mit dem humanen *FTSJ1* ist diese spezifische Bande nachweisbar. Bei dem Wildtypstamm der Hefe entsteht kein PCR-Produkt bei Verwendung der humanen *FTSJ1* Primer (Abb.35D).

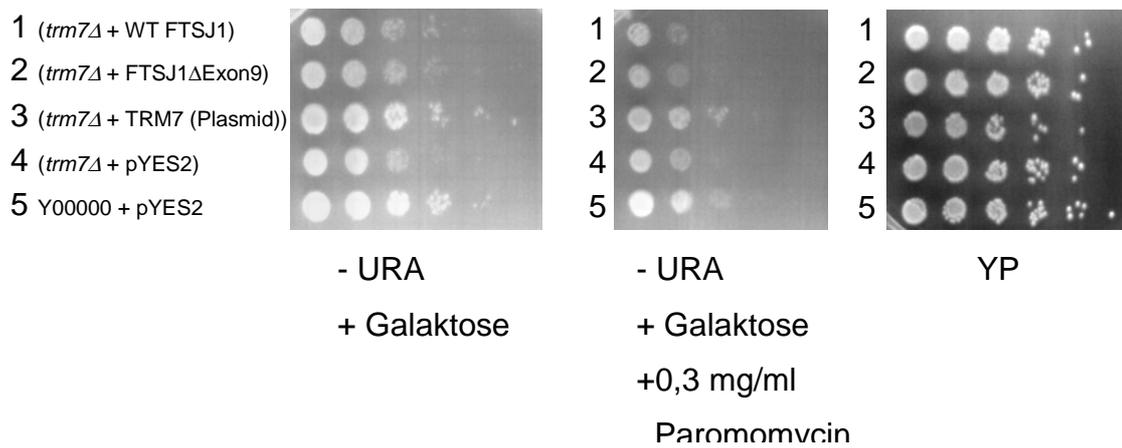
Diese Experimente zeigen, daß TRM7 in den Deletionsstämmen nicht exprimiert wird. Außerdem ist der Nachweis gelungen, daß die humanen *FTSJ1* Genkonstrukte in der Hefe transkribiert werden. TRM7 kodiert für eine S-Adenosyl-L-Methionin Methyltransferase, die zwei spezifische Basen in der Antikodonschleife der Phenylalanin, Tryptophan und Leucin spezifischen tRNAs methyliert. Diese Methylierungen sind für eine effiziente Translation wichtig. Unterbleiben diese Methylierungen, dann ist die Proteinsynthese eingeschränkt, was letztendlich im TRM7 Deletionsstamm zu einer Wachstumsverzögerung führt (Pintard et al., 2002).

Tabelle 30: Konstrukte für TRM7-Rescue-Experimente

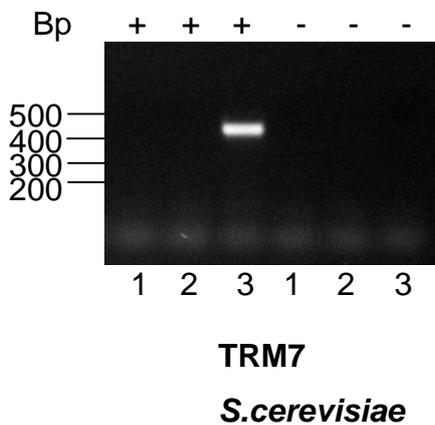
Transformierter Hefestamm	Vektor	Insert	Selektionsmarker	Wachstumseffekt
<i>trm7</i> Δ (Y03198)	pYES2	Wildtyp <i>FTSJ1</i>	URA3	Fast normales Wachstum
<i>trm7</i> Δ (Y03198)	pYES2	<i>FTSJ1</i> ΔExon9	URA3	Fast normales Wachstum
<i>trm7</i> Δ (Y03198)	pYES2	-	URA3	Etwas schlechteres Wachstum

Transformierter Hefestamm	Vektor	Insert	Selektionsmarker	Wachstumseffekt
Wildtyp Hefestamm (Y00000)	pYES2	-	URA3	Normales Wachstum
<i>trm7</i> Δ (Y03198)	pAE	Wildtyp FTSJ1	LEU2	Normales Wachstum
<i>trm7</i> Δ (Y03198)	pAE	-	LEU2	Schlechtes Wachstum
Wildtyp Hefestamm (Y00000)	pAE	-	LEU2	Normales Wachstum

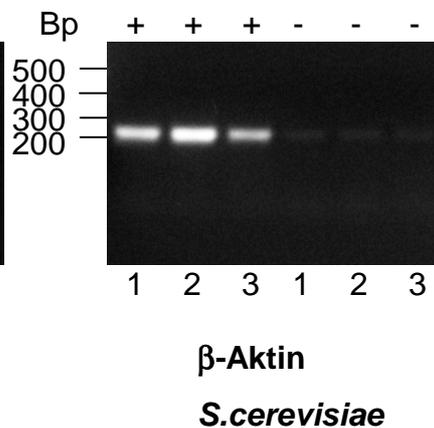
A



B



C



D

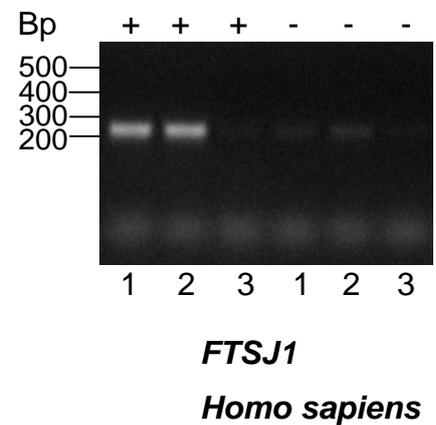


Abb.35: TRM7-Rescue-Experimente:

A: Der TRM7 Deletionsstamm wurde mit verschiedenen pYES2 Konstrukten transformiert.

1: TRM7^{-/-} + WT FTSJ1 **2:** TRM7^{-/-} + FTSJ1 Δ Exon9 **3:** TRM7^{-/-} + TRM7(Plasmid)

4: TRM7^{-/-} **5:** Y00000 (Hefewildtypstamm). Die Hefesuspensionen wurden wie bei den anderen Rescue-Experimenten verdünnt. Nach dem Ausplattieren der Hefesuspensionen wurden die Platten bei 30°C für drei Tage inkubiert. Die Selektionsplatten waren alle Uracil-defizient und enthielten als Kohlenstoffquelle Galaktose. Eine Selektionsplatte (mittlere Abbildung) enthielt zusätzlich Paromomycin (Translationsinhibitor). Außerdem wurden alle verdünnten Hefestämme ebenfalls auf Vollmedium (YPD) ausplattiert. Der TRM7^{-/-} Stamm transformiert mit TRM7 zeigt wie erwartet ein Wachstumsverhalten, das dem des Wildtypstammes (Y00000) vergleichbar ist. Alle anderen Transformanten zeigen ein ähnlich schlechtes Wachstumsverhalten. Das Wachstum auf den YPD-Platten ist bei allen Transformanten und dem Wildtypstamm gleich.

B: RT-PCR mit TRM7 spezifischen Primern. Aus dem TRM7^{-/-} + WT FTSJ1 Stamm (1), dem TRM7^{-/-} + FTSJ1 Δ Exon9 (2) und dem Hefewildtypstamm Y00000 (3) wurde RNA isoliert mit anschließender DNase Behandlung. Von dieser RNA wurden cDNAs synthetisiert. Die RT-PCR mit TRM7 spezifischen Primern führt nur im Hefewildtypstamm zu einem spezifischen Produkt.

C: RT-PCR mit spezifischen Primern für Aktin (*S. cerevisiae*). Für diese RT-PCR wurde die gleiche cDNA verwendet wie bei **B**. Für alle Proben konnte eine spezifische Aktinbande nachgewiesen werden.

Durch die Zugabe von Paromomycin zum Medium kann der Effekt der Wachstumshemmung verstärkt werden, da Paromomycin zur Wirkstoffgruppe der Aminoglykoside gehört, die eine vielfältige Störung der Proteinsynthese bewirken. Die Verwendung von Paromomycin führte allerdings bei den *Rescue* Experimenten zu keiner negativen Beeinflussung der Wachstums (Abb.35A).

Die Wiederholung dieser Experimente mit einem neu aus der Stammsammlung isolierten *trm7 Δ* Stamm, der freundlicherweise von Dr. Bruno Lapeyre zur Verfügung gestellt wurde, führten zu einem anderen Ergebnis. Das Wachstum des *trm7 Δ* Stammes war bereits auf Vollmedium (YPD) erheblich schlechter verglichen mit dem Hefewildtypstamm (Abb.36A). Dies war bei dem vorherigen *trm7 Δ* Stamm nicht der Fall. Die Transformation des neuen *trm7 Δ* Stammes mit dem humanen Wildtyp *FTSJ1*, kloniert in den pAE Vektor, führte zu einer erheblichen

Verbesserung des Wachstumsverhaltens (Abb.36). Der Deletionsstamm zeigte nach der Transformation ein dem Wildtypstamm vergleichbares Wachstumsverhalten. Die Transformation mit den pYES2-Konstrukten führte allerdings zu keiner Verbesserung des Wachstumsverhaltens des *trm7Δ* Stammes. Offensichtlich reicht die durch Galaktose induzierte Transkription des humanen *FTSJ1* nicht aus, um den Phänotyp des *trm7Δ* Stammes zu komplementieren. Bei den pAE-Konstrukten findet eine kontinuierliche Transkription des humanen *FTSJ1* durch einen konstitutiven Promotor statt. Dieser Vektor scheint für diese *Rescue*-Experimente geeigneter zu sein, und eine Wiederholung der Experimente führt zu einer Bestätigung der Komplementation des *trm7Δ* Stammes durch das humane *FTSJ1*.

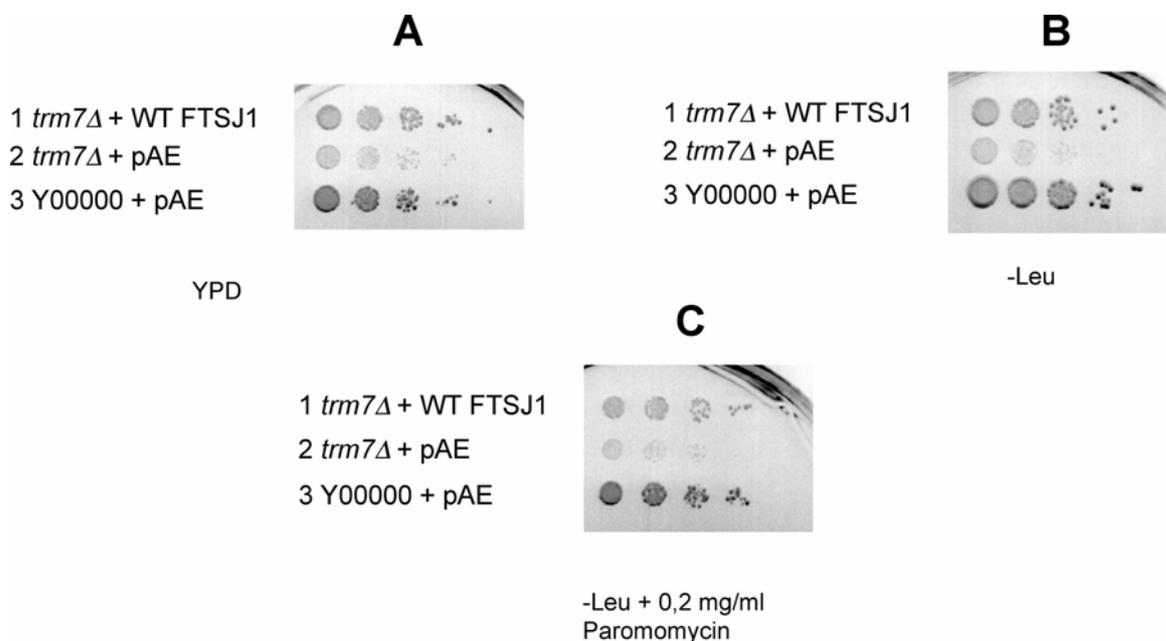


Abb.36: ***trm7Δ*-Rescue-Experimente mit neuem Deletionsstamm und pAE-Konstrukten:**

1: *trm7Δ* + WT FTSJ1, 2: *trm7Δ* + pAE 3: Y00000 (Hefewildtypstamm) + pAE.

Die Hefesuspensionen wurden wie bei den anderen *Rescue*-Experimenten verdünnt. Nach dem Ausplattieren der Hefesuspensionen wurden die Platten bei 30°C für drei Tage inkubiert. Die Selektionsplatten waren alle Leucin-defizient und enthielten als Kohlenstoffquelle Glukose. Eine Selektionsplatte (B) enthielt zusätzlich Paromomycin (Translationsinhibitor). Außerdem wurden alle verdünnten Hefestämme ebenfalls auf Vollmedium (YPD) ausplattiert (A). **A** Auf YPD-Medium ist das Wachstum des mit dem leerem pAE-Vektor transformierten Deletionsstammes wesentlich schlechter als das des Wildtypstammes. Der mit dem humanen FTSJ1 transformierte Deletionsstamm zeigt hingegen ein mit dem Hefewildtypstamm vergleichbares Wachstum. **B** Auf dem Leucin-

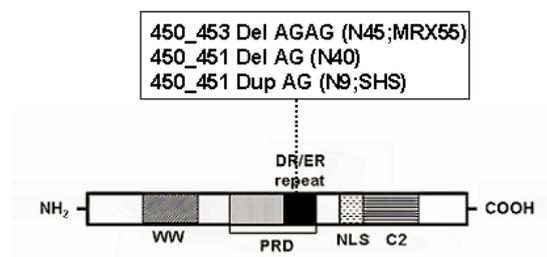
defizienten Medium ist das Wachstumsverhalten mit dem Wachstum auf YPD-Platten (A) vergleichbar. **C** Auf einem Medium ohne Leucin und mit 0,2 mg/ml Paromomycin wird dieser Effekt noch verstärkt.

3.2.4 Das Polyglutamin Bindeprotein 1 Gen (*PQBP1*)

3.2.4.1 Mutationen in *PQBP1* führen zu syndromaler und nicht-syndromaler geistiger Behinderung

Insgesamt wurden 3 unterschiedliche Mutationen im Exon 4 von *PQBP1* bei 5 verschiedenen Familien mittels DHPLC Analyse gefunden. Alle Mutationen betreffen einen Bereich in Exon 4, der für den sogenannte DR/ER Repeat kodiert. Bei den Mutationen handelt es sich um eine Duplikation von zwei Nukleotiden (450_451Dup. AG), die bei zwei Familien gefunden worden ist (Familie N9 und Familie SHS), eine Deletion von zwei Nukleotiden (450_451 Del. AG), die bei einer Familie gefunden worden ist (Familie N40), und um die Deletion von vier Nukleotiden (450_453 Del. AGAG), die bei zwei Familien gefunden worden ist (Familie N45 und Familie MRX55) (Abb.37A). Alle Mutationen führen zu einer Verschiebung des Leserasters, die je nach Mutationstyp zu unterschiedlichen vorzeitigen Stopkodons führen. Demzufolge kommt es zu verschiedenen vorhergesagbaren, trunkierten Proteinen mit unterschiedlich langen C-terminalen Enden (Abb.37B).

A



B

	621		
WT	acagagagagagagcgagacagggaaacgggatcgggaccgc...tga	265	AS
	R E R E R D R E R D R D R		
N9/SHS	acagagagagagagcgagacagggaaacgggatcgggaccgcg...taa	194	AS
	R E R E S E T G N G I G T A		
N45/MRX55	acagagagagcgagacagggaaacgggatcgggaccgcg...taa	192	AS
	R E S E T G N G I G T A		
N40	acagagagagagcgagacagggaaacgggatcgggaccgcgtga	164	AS
	R E A R Q G T G S G P R V		

Abb.37: Lokalisation der drei unterschiedlichen Mutationen in *PQBP1*

B: Schematische Darstellung des PQBP1 Proteins mit seinen funktionellen Domänen. Die in fünf verschiedenen Familien gefundenen, unterschiedlichen Mutationen sind alle im DR/ER *Repeat* lokalisiert.

A: Darstellung der nativen sowie der mutierten Nukleotidsequenz und der entsprechenden Aminosäuresequenzen. In der oberen Zeile ist die *PQBP1* Wildtypsequenz dargestellt. Darunter die verschiedenen Mutationstypen mit ihren abweichenden Aminosäuresequenzen und vorzeitigen Translationsterminationskodons.

Die Vorgehensweise bei dieser Mutationsanalyse war dieselbe wie für *FTSJ1* beschrieben. Nach der Detektion eines aberranten Elutionsprofils bei den Indexpatienten der unterschiedlichen Familien bei der DHPLC Analyse wurde deren Exon 4 sequenziert. Nach der Bestätigung der Mutationen durch die Sequenzierung wurde eine DHPLC-Analyse für Exon 4, amplifiziert mit der DNA von 400 männlichen Kontrollpersonen, durchgeführt. Alle Kontrollpersonen waren negativ für diese Mutation, so daß ein Polymorphismus ausgeschlossen werden kann. Daraufhin wurde die DNA der betroffenen männlichen Familienmitglieder und die der potentiellen und obligatorischen Trägerinnen auf das Vorhandensein einer Mutation in Exon 4 mittels Sequenzierung untersucht. Dadurch konnte eine Kosegregation der Mutation mit dem pathologischen Phänotyp gezeigt werden (Abb.38).

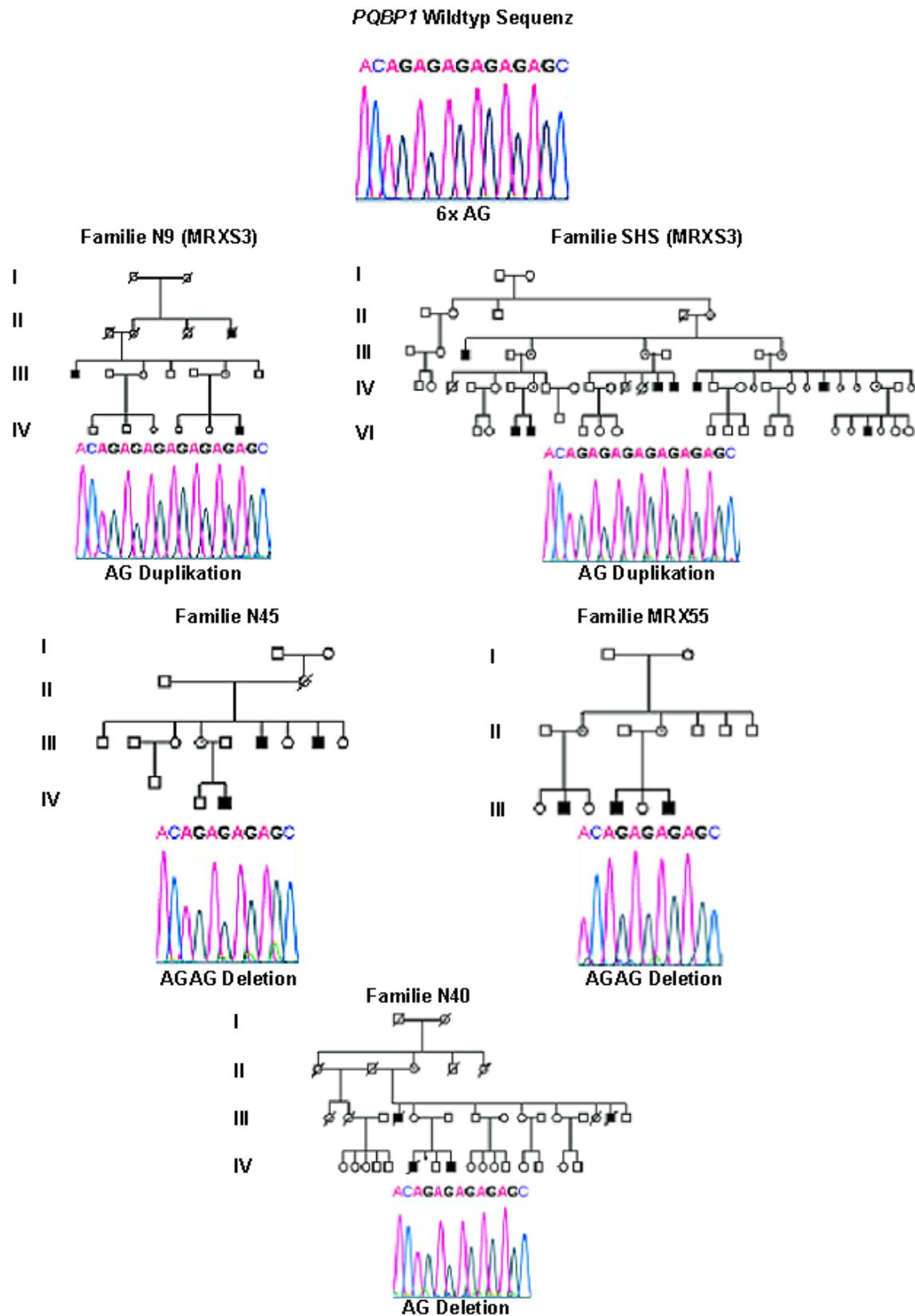


Abb.38: Darstellung der Stammbäume der Familien, bei denen Mutationen in *PQBP1* gefunden wurden und Ausschnitte aus den Chromatogrammen von Exon 4 der

Indexpatienten der jeweiligen Familie: Das oberste Chromatogramm repräsentiert einen Ausschnitt der *PQBP1* Wildtypsequenz von Exon 4 mit der Nukleotidabfolge, die für den DR/ER *Repeat* kodiert.

Die betroffenen männlichen Mitglieder der verschiedenen Familien zeigen eine gewisse Varianz hinsichtlich der pathologischen, phänotypischen Merkmale. Übereinstimmend ist bei allen betroffenen Familienmitgliedern die geistige Behinderung (rot hervorgehoben in Tabelle 31). In den Familien N9, MRX55 und N40 tritt bei den betroffenen, männlichen Mitgliedern Mikrozephalie auf (rosa hervorgehoben in Tabelle 31), die bei den betroffenen, männlichen Mitgliedern der Familie MRX55 nicht vorhanden ist. Die betroffenen Patienten der Familien N9, MRX55 und N40 haben zusätzlich eine geringe Körpergröße. Für die anderen pathologischen Merkmale ist phänotypische Variabilität zu beobachten (Tab.31). Die unterschiedlichen Mutationen führen in den unterschiedlichen Familien zu verschiedenen pathologischen Phänotypen. Allerdings zeigen die unterschiedlichen Familien mit den gleichen Mutationen auch abweichende, pathologische Phänotypen.

Tab.31: Phänotypische Merkmale der Familien mit Mutation in *PQBP1*

Familie	Phänotyp	Mutation	Referenz
N9	Geistige Behinderung, Mikrozephalie, Wachstumsverzögerung, gespaltenes Zäpfchen, einseitige Iris und Gewebedefekt der Aderhaut bei einem Patienten	AG Duplikation	Kleefstra et al., 2004
SHS (MRXS3)	Geistige Behinderung, Mikrozephalie, Brachyzeephalie, beidseitige spastische Lähmung, kleine Hoden und Analtresie	AG Duplikation	Sutherland et al., 1988
N45	Geistige Behinderung, Mikrozephalie, Analtresie und Situs Inversus	AGAG Deletion	Kleefstra et al., 2004
MRX55	Geistige Behinderung, Kleinwuchs bei einem Patienten	AGAG Deletion	Deqaqi et al., 1998
N40	Geistige Behinderung, Mikrozephalie, Kleinwuchs, spastische Lähmung, Herzfehler, gespaltener oder hoher Gaumen, andere Schädel- und Gesichtsauffälligkeiten.	AG Deletion	Hamel et al., 1994

3.2.4.2 *In silico* Analyse der humanen *PQBP1* Transkripte und der daraus resultierenden Proteine

PQBP1 ist auf dem X-chromosomalen Abschnitt Xp11.23 lokalisiert, und die Verteilung der Exone erstreckt sich über eine genomische Region von annähernd

9,5 Kb. Die genomische Sequenz, inklusive *PQBP1*, wird von dem BAC Klon RP11-416B14 (Accession Nr. AQ551147) abgedeckt.

PQBP1 kodiert für das Polyglutaminbindeprotein 1. Zur Zeit sind 11 verschiedene Transkriptvarianten in der *Human Genome Browser* Datenbank aufgeführt (Version Mai 2004) (Abb.39). Die überwiegende Anzahl der Transkriptvarianten (7 von 11) trägt das Translationsstartkodon in Exon 1 und das Translationsstopkodon in Exon 6 (Abb.39) Durch die Translation dieser Transkriptvarianten entsteht eine Hauptvariante des *PQBP1* Proteins bestehend aus 265 Aminosäuren mit charakteristischen Domänen.

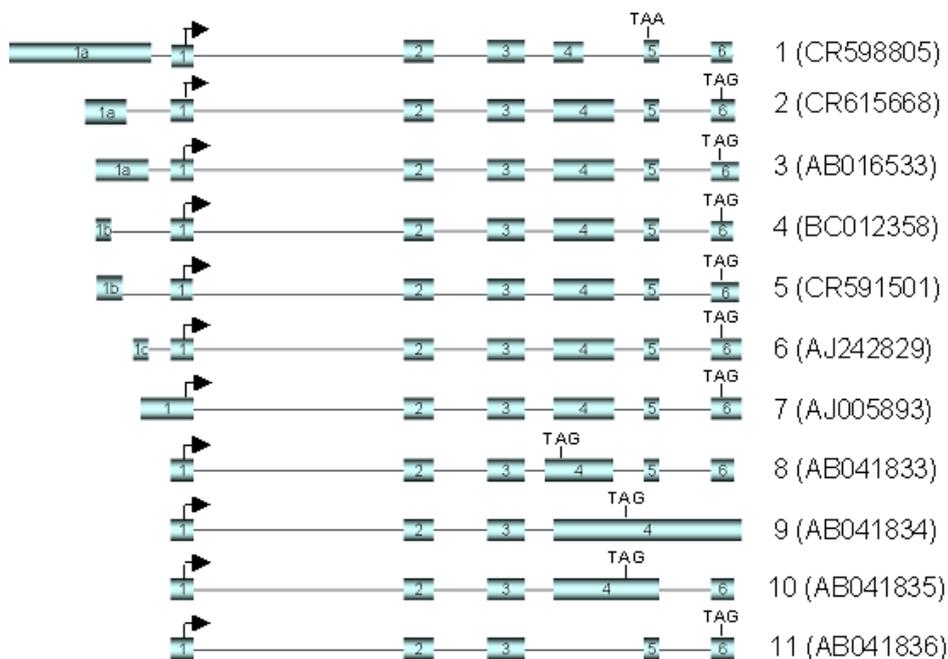


Abb.39: **Schematische Darstellung der Transkriptvarianten von *PQBP1*** (nicht maßstabgerecht). Die Translationsstartpunkte sind durch Pfeile dargestellt, die jeweiligen Translationsstopkodons sind ebenfalls für jede Variante eingezeichnet.

Diese Transkripte unterscheiden sich hauptsächlich durch ein alternativ gespleißtes 5' und 3' Ende. Die Transkriptvarianten 2 bis 7 kodieren alle für die gleiche Hauptvariante des vorhergesagten *PQBP1* Proteins und unterscheiden sich nur durch alternatives Spleißen im untranslatierten 5' und 3' Bereich ihrer Transkripte. Dadurch entsteht eine am häufigsten vertretene Proteinvariante, welche das längste *PQBP1* Protein mit allen bisher beschriebenen Domänen enthält. Beginnend vom N-terminalen Ende des Proteins handelt es sich um die

WW-Domäne, die PRD-Domäne, das DR/ER *Repeat*, ein vorhergesagtes Kerntransportsignal und eine C₂-Domäne spezifisch für PQBP1 (Abb.37A).

Die WW-Domäne besteht aus den Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Prolin, welche in konservierten Intervallen vorkommen. Diese Domäne dient als Bindungsstelle für Interaktionspartner mit einem Prolin-reichen PY-Motiv (Bork und Sudol, 1994; Sudol et al., 1995; Einbond und Sudol, 1996). Die darauffolgende PRD-Domäne (*Prolin Rich Domain*) besteht aus fünf sich wiederholenden Motiven von sieben Aminosäuren. Diese hauptsächlich sauren und basischen Aminosäuren sind spezifisch für PQBP1 und bisher bei noch keinem anderen Protein beschrieben. Das DR/ER Repeat liegt innerhalb der PRD-Domäne und bindet an polyglutaminreiche Abschnitte anderer Proteine, wie z. B. Huntingtin (Busch et al., 2003), Ataxin (Okazawa et al., 2002) und POU3F2 (Brn2) (Waragai et al., 1999). Die C₂-Domäne ist funktionell nicht verwandt mit anderen beschriebenen C₂-Domänen, bei denen nachgewiesen wurde, daß sie entweder Kalziumabhängig oder -unabhängig an Phospholipide binden (Rizo und Südhof, 1998). Vielmehr ist diese C₂-Domäne einzigartig bei PQBP1 und bindet an U5-15kD, das eine Komponente des Spleißosoms ist (Okazawa et al., 2001).

Weitere Unterschiede sind beim Spleißen von Exon 4 vorhanden (Abb. 39). Bei der Transkriptvariante 1 (Accession Nr. CR598805) ist das Exon 4 im 3' Ende um 133 Bp verkürzt. Dadurch wird ein Translationsstopkodon in Exon 5 an Position 449 (Referenzsequenz Accession Nr. AJ242829) benutzt. Die Translation dieser Transkriptvariante führt zu einem vorhergesagten Protein mit 149 Aminosäuren, dessen Sequenz unmittelbar nach dem DR/ER Repeat endet. Bei der Transkriptvariante 8 (Accession Nr. AB041833) ist das 5' Ende von Exon 4 um 14 Nukleotide verlängert, dies führt, im Vergleich zu den anderen Transkriptvarianten, zu einem veränderten Leseraster mit einem Translationsstopkodon in Exon 4 an Position 384 (Referenzsequenz Accession Nr. AJ242829) und einem, verglichen mit der am häufigsten vorkommenden PQBP1 Proteinvariante (Accession Nr. CAB44309), um 137 Aminosäuren verkürzten, vorhergesagtes Protein. Diese Änderung des C-terminalen Abschnittes des Proteins und dessen Verkürzung führen dazu, daß nur noch die Aminosäuresequenz der sogenannten WW-Domäne vorhanden ist. Alle anderen funktionellen Domänen sind bei dieser PQBP1 Proteinvariante nicht vorhanden.

Bei der Transkriptvariante 9 (Accession Nr. AB041834) werden das Intron 4 und das Intron 5 nicht herausgespleißt und somit in die reife mRNA integriert. Bei der Transkriptvariante 10 (Accession Nr. AB041835) wird das Intron 4 nicht herausgespleißt und dessen intronische Sequenz in die mRNA integriert. Sowohl bei Transkriptvariante 9 als auch bei Transkriptvariante 10 wird dasselbe Translationsstopkodon verwendet, das in Intron 4 an Position 672 (Referenzsequenz Accession Nr. AJ242829) lokalisiert ist. Beide Varianten resultieren dadurch in derselben vorhergesagten PQBP1 Proteinvariante, die sich ab Aminosäureposition 117 von der Hauptvariante des PQBP1 Proteins (Accession Nr. CAB44309) unterscheidet und insgesamt um 21 Aminosäurreste verkürzt ist. Dementsprechend sind bis auf die C₂-Domäne alle funktionellen Domänen enthalten. Bei der Transkriptvariante 11 (Accession Nr. AB041836) wird das komplette Exon 4 herausgespleißt. Dies führt zu keiner Verschiebung des Leserasters, aber alle Domänenbestandteile, die von Exon 4 kodiert werden, fehlen letztendlich im resultierenden Protein. Dabei handelt es sich um die PRD-Domäne, das DR/ER *Repeat* und das vorhergesagte Zellkernlokalisierungssignal. Die WW-Domäne und die C₂-Domäne bleiben in diesem Falle erhalten. Die übrigen Transkriptvarianten unterscheiden sich lediglich im nichttranslatierten 3' und 5' Bereich der Transkripte. Das hat keinen Einfluß auf den kodierenden Bereich der Transkripte und verursacht somit keine Veränderung bei der Translation.

3.2.4.3 Untersuchung des X-Inaktivierungstatus von *PQBP1*

Die Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen in weiblichen Zellen dient dem Ausgleich der Gen-Dosis im Vergleich zur männlichen Zelle, die nur über ein X-Chromosom verfügt (Lyon, 1961). Dabei wird im Blastozystenstadium nach dem Zufallsprinzip in allen somatischen Zellen eines der beiden X-Chromosomen inaktiviert. Die X-Inaktivierung wird durch das X-Inaktivierungszentrum (XIC) gesteuert. Das XIC ist eine multifunktionelle Genregion auf dem X-Chromosom, die zusammen mit anderen Genen sowohl die Initiierung als auch die Ausbreitung der Inaktivierung über das gesamte Chromosom steuert. *XIST* (*X-Chromosome Inactivation Specific Transcript*) ist ein Gen aus dieser Region, das nur im

inaktiven X-Chromosom aktiv ist und dessen RNA-Produkt an das inaktive X-Chromosom bindet. Reguliert wird die Aktivität von XIST über TSIX, daß das *Antisense*-Produkt zu XIST ist.

Neben *XIST* ist eine Reihe von Genen bekannt, die am inaktivierten X-Chromosom aktiv bleiben. Es handelt sich vor allem um solche Gene, die ein funktionelles Homolog auf dem Y-Chromosom besitzen. Dadurch wird eine äquivalente Gendosis in weiblichen und männlichen somatischen Zellen gewährleistet. Bei einem X-chromosomal-gekoppelten Erbgang besteht die Möglichkeit, daß die heterozygoten Trägerinnen der Mutation ebenfalls einen, wenn auch milderen, Phänotyp aufweisen, wenn das betreffende Gen der X-Inaktivierung entkommen kann. Dadurch würden beide Kopien und somit auch die mutierte Kopie des Gens exprimiert werden.

Um den X-Inaktivierungsstatus von *PQBP1* zu überprüfen, wurden Hamsterhybridzellen verwendet, die entweder ein aktives oder ein inaktives menschliches X-Chromosom tragen. Aus diesen Zelllinien wurde RNA isoliert und cDNA hergestellt. Diese cDNA wurde für RT-PCR Experimente verwendet, bei denen unterschiedliche, intronüberspannende Primer verwendet wurden. Das Gen für das Enzym Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (*HPRT*) z.B. unterliegt der X-Inaktivierung. Das X-chromosomal gekoppelte ribosomale Protein S4 (*RPS4X*) hingegen entkommt der X-Inaktivierung (Fisher et al., 1990). Mittels RT-PCR wurde die Expression dieser beiden Gene auf dem aktiven und auf dem inaktiven X-Chromosom überprüft, wobei dies mit der Expression von *PQBP1* verglichen wurde. Wie zu erwarten war, wird *PQBP1* auf dem inaktiven X-Chromosom nicht exprimiert. *PQBP1* unterliegt demnach der X-Inaktivierung (Abb.40).

Offensichtlich reicht die verbleibende Transkription des nicht mutierten *PQBP1* aus, um keinen pathologischen Phänotyp zu verursachen. Allerdings wurden alle X-Inaktivierungsstudien in Hamsterzellen beziehungsweise in lymphoblastoiden Zelllinien durchgeführt, so daß keine Aussage über den X-Inaktivierungsstatus von *PQBP1* im Gehirn getroffen werden kann.

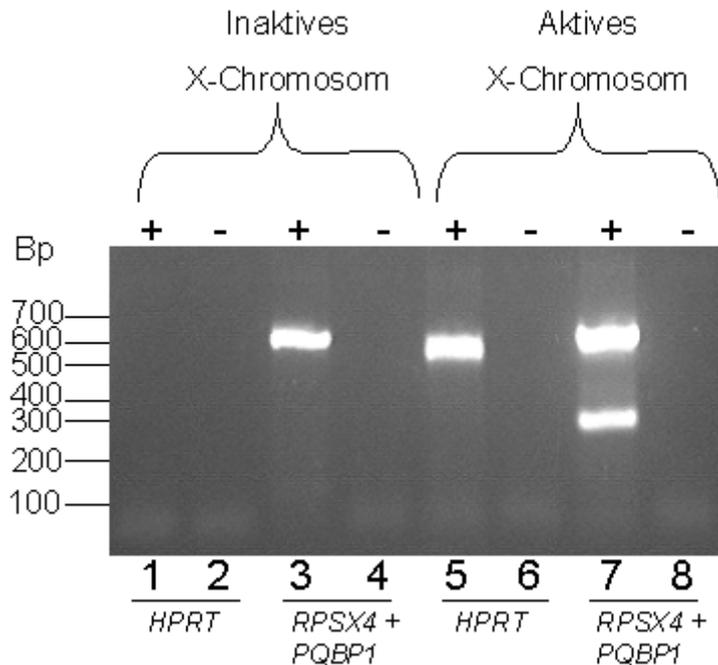


Abb.40: **PCR-Analyse zur Feststellung des X-Inaktivierungsstatus von *PQBP1***. In der ersten Spur ist kein PCR-Produkt sichtbar. Hier wurde ein Aliquot der PCR, die mit *HPRT* spezifischen Primern, mit der cDNA gewonnen aus der Hamsterzelle mit dem inaktiven X-Chromosom, durchgeführt wurde, aufgetragen. In der zweiten Spur ist die Negativkontrolle dieser RT-PCR aufgetragen, bei der zu der Synthesereaktion der cDNA keine reverse Transkriptase zugegeben wurde. In der dritten Spur ist nur ein PCR-Produkt sichtbar, das durch Amplifikation mit *RPS4X* spezifischen Primern, mit der cDNA gewonnen aus der Hamsterzelle mit dem inaktiven X-Chromosom, produziert wurde. Die ebenfalls in denselben Reaktionsmix zugegebenen *PQBP1* spezifischen Primern führten zu keinem Amplifikat. In der vierten Spur ist die Negativkontrolle dieser RT-PCR aufgetragen. Die selben RT-PCRs wurden mit cDNA gewonnen aus der Hamsterzelle mit dem aktiven X-Chromosom durchgeführt. In der fünften Spur ist ein spezifisches Produkt für *HPRT* zu sehen und in Spur sechs ist die Negativkontrolle dieser RT-PCR aufgetragen. In der siebten Spur sind spezifische Produkte für *RPS4X* und *PQBP1* nachweisbar. In Spur acht ist die Negativkontrolle dieser RT-PCR aufgetragen.

3.2.4.4 Expressionanalysen der mutierten *PQBP1* Transkripte

Bei Mutationen, die zu einer Leserasterverschiebung führen und letztendlich in einem vorzeitigen Stopkodon resultieren, stellt sich die Frage nach der Stabilität des Transkriptes und dem Abbau des trunkierten Transkriptes über NMD (vergleiche Kapitel 3.2.3.7). *PQBP1* ist auf dem X-Chromosom lokalisiert,

demnach würden instabile Transkripte bei männlichen Trägern der Mutation zu einem Funktionsverlust von *PQBP1* führen.

Um den Status der *PQBP1* Transkripte in den betroffenen Patienten zu analysieren, wurden PolyA⁺ Northern Blot-Analysen durchgeführt. Die RNA für diese Experimente stammte aus lymphoblastoiden Zelllinien der Patienten und von männlichen gesunden Kontrollpersonen. Die Hybridisierung des Blots fand mit einer für Exon 4 spezifischen Probe statt, mit welcher alle Transkriptvarianten mit Ausnahme von Transkriptvariante 11 (Accession Nr. AB041836) detektierbar sind. Dabei zeigte sich, daß das *PQBP1* Transkript, erkennbar als spezifische Bande bei ca. 1,15 Kb, in den Patienten signifikant geringer exprimiert wird als in den Kontrollen (Abb.41). Darüber hinaus scheint das *PQBP1* Transkript bei dem Indexpatienten der Familie N40 am stärksten reduziert zu sein (Abb.41).

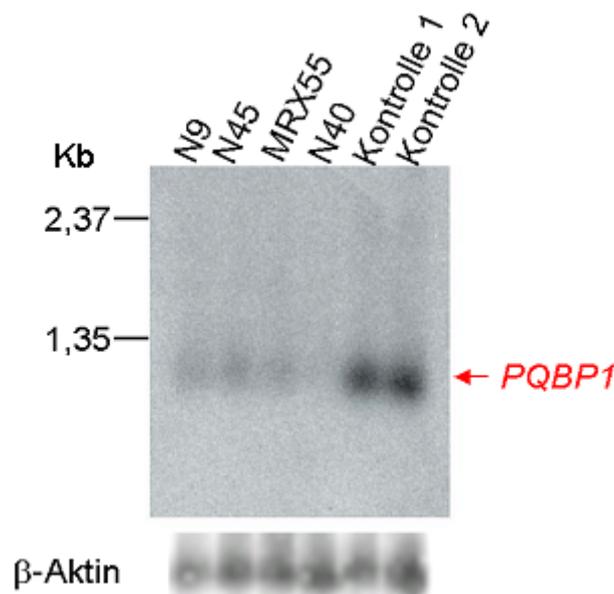


Abb.41: **Northern Blot-Analyse mit Exon 4 spezifischer Probe:** Ein PolyA⁺ Northern Blot mit RNA der Patienten mit Mutationen in *PQBP1* und zwei männlichen Kontrollpersonen wurde mit einer für Exon 4 spezifischen Probe hybridisiert. Bei der RNA der Kontrollen ist eine spezifische Bande bei ca. 1,15 Kb für *PQBP1* nachweisbar. Diese Bande ist bei den Patienten stark reduziert. Die Hybridisierung mit einer β -Aktin Probe gewährleistete, daß vergleichbare Mengen an PolyA⁺ RNA geblottet worden sind.

Es gibt jedoch zwei Transkriptvarianten, die Varianten 9 und 10 (siehe Abschnitt 3.2.4.2), die die intronischen Sequenzen von Intron 4 beziehungsweise von Intron 4 und 5 in die reife mRNA integrieren. Durch diese Tatsache könnte der

Mechanismus des NMD eventuell umgangen werden, da das Spleißosom bei der Transkriptvariante 9 kein Intron zwischen dem neuen, vorzeitigen Stopkodon bei der Patienten RNA und dem PolyA Signal detektiert. Dies könnte auch für die Transkriptvariante 10 gelten, obwohl das Intron 5 nicht in die reife mRNA integriert wird. Es hat sich gezeigt, daß auch solche Transkripte stabil sein können, bei denen nach dem Stopkodon-tragenden Exon noch ein Intron vor dem letzten Exon liegt.

Um festzustellen, ob die beiden *PQBP1* Transkripte dem Abbau durch *Nonsense mediated mRNA decay* entkommen, wurden ebenfalls PolyA⁺ Northern Blots durchgeführt. Diesmal wurde allerdings eine cDNA-Probe verwendet, welche spezifisch an die *PQBP1* RNA von Intron 4, Exon 5 und Intron 5 bindet. Diese Probe sollte nur diese beiden Transkriptvarianten detektieren. Da Exon 5 mit 63 Bp sehr kurz ist, ist es relativ unwahrscheinlich, daß auch noch die übrigen Transkripte detektiert werden können. Nach einer Woche Exposition des Röntgenfilms bei -80°C waren Transkripte von einer Größe von 1,15 Kb detektierbar (Abb.42). Dies entsprach derselben Größe wie für die Northern Blots hybridisiert mit der Exon 4 Probe (Abb.41). Der Vergleich der Patienten *PQBP1* Transkripte mit denen der Kontrollen zeigt, daß sie in ungefähr gleicher Intensität nachweisbar waren. Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, daß diese beiden Transkriptvarianten auch bei den Patienten nicht degradiert werden, da sie dem NMD-Mechanismus entkommen. Des Weiteren kann man demzufolge daraus schließen, daß kein kompletter Funktionsverlust aller *PQBP1* Proteinvarianten vorliegt. Allerdings führt die Translation dieser beiden Transkriptvarianten zu einem veränderten C-terminalen Ende dieser Proteinvarianten, verglichen mit der Hauptproteinvariante von *PQBP1* (Accession Nr. CAB44309). Diesen beiden Proteinvarianten fehlt die C₂-Domäne. Es macht darüber hinaus den Anschein, als wären diese beiden Transkriptvarianten in relativ geringen Mengen transkribiert, da beide Northern Blots unter exakt den gleichen Bedingungen durchgeführt wurden. Der Northern Blot, der nur die Transkriptvarianten 9 und 10 detektiert (Abb.41) mußte allerdings eine Woche mit einem Biomax Film exponiert werden, während der Northern Blot, der alle Transkriptvarianten, bis auf Transkriptvariante 11 detektiert, nur über Nacht mit einem Biomax Film exponiert wurde. Eine Erklärung hierfür wäre die Anzahl der gespleißten ESTs für die jeweiligen Transkriptvarianten. So existiert für die Transkriptvariante 9 nur ein gespleißtes

EST (Accession Nr. BX452075) und für die Transkriptvariante 10 existieren sechs gespleißte ESTs (Accession Nummern BQ574264, AI951021, BU687458, AI983503, BF739398 und AW843652) in der NCBI Datenbank (Version May 2004). Die zusätzlichen Banden auf dem Northern Blot kommen dadurch zustande, daß ein Teil der radioaktiv markierten *FTSJ1*-Probe auch die verbliebene ribosomale RNA detektiert.

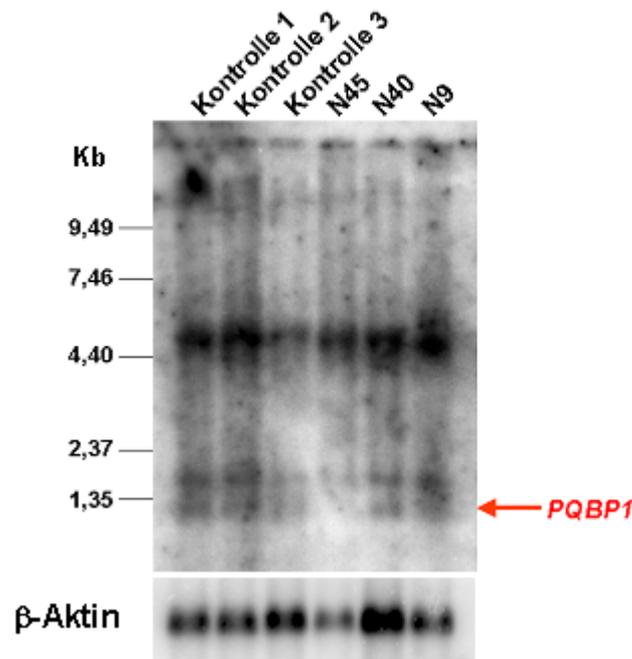


Abb.42: **Northern Blot-Analyse mit einer spezifischen Probe die an Intron 4, Exon 5 und Intron 5 bindet:** Ein PolyA⁺ Northern Blot mit RNA der Patienten mit Mutationen in *PGBP1*(N45, N40 und N9) und drei männlichen Kontrollpersonen (Kontrolle 1,2 und 3) wurde mit einer für Intron 4, Exon 5 und Intron 5 spezifischen Probe hybridisiert. In allen Spuren ist eine *PGBP1* spezifische Bande bei 1,15 Kb zu sehen. Die Hybridisierung mit einer β-Aktin Probe gewährleistete, daß vergleichbare Mengen an PolyA⁺ RNA geblottet worden sind.

3.2.4.5 Zelluläre Lokalisation der mutierten *PGBP1* Proteine

Die oben beschriebenen Northern Blot Ergebnisse haben gezeigt, daß der überwiegende Teil der mutierten *PGBP1* Transkripte bei den Patienten durch *nonsense mediated mRNA decay* abgebaut werden. Es kann allerdings nicht vollständig ausgeschlossen werden, daß auch trunkierte Proteine gebildet werden. Durch Immunfluoreszenzexperimente sollte untersucht werden, ob die trunkierten

Proteine der Patienten, die ein vorzeitiges Stopkodon tragen, eine veränderte zelluläre Lokalisation aufweisen als das Wildtyp PQBP1 Protein.

Die jeweiligen cDNAs der Patienten wurden leseraterkonform von ihrem Translationsstartpunkt bis zum jeweiligen vorzeitigen Translationsstopkodon in einen Expressionsvektor kloniert, in HeLa und U373MG transfiziert und überexprimiert. Dieser Expressionsvektor trägt die Sequenz für ein N-terminales c-MYC Epitop. Die Translation der klonierten Sequenzen in diesem Vektor führen zu Fusionsproteine die N-terminal mit dem c-MYC Epitop markiert sind. Der Nachweis der Fusionsproteine erfolgte mit einem primären Antikörper gegen das c-MYC Epitop und einem sekundären, Cy3-markierten Antikörper (Abb.43).

Die überexprimierten, mutierten PQBP1 Proteine zeigen alle eine veränderte zelluläre Lokalisation im Vergleich zum PQBP1 Wildtyp Protein. Sie sind gleichmäßig im Zytoplasma und im Zellkern verteilt (Abb.43 c-f), während das PQBP1 Wildtyp Protein fast ausschließlich im Zellkern vorzufinden ist (Abb.43 b). Möglicherweise ist diese veränderte, zelluläre Lokalisation durch das Fehlen des vorhergesagten Kerntransportsignals (NLS) verursacht. Durch vorzeitige Stopkodons, die durch die Insertion oder Deletion von 2 bzw. 4 Nukleotiden im DR/ER *Repeat* zustande kommen, entsteht ein trunkiertes Protein, dem sowohl das NLS als auch die C₂-Domäne fehlen. Dadurch scheint der Transport in den Zellkern gestört zu sein. Die Tatsache, daß trotzdem ein Teil der trunkierten Proteine in den Zellkern gelangt, könnte daran liegen, daß NpwBP, ein Protein, welches an die WW-Domäne von PQBP1 bindet, drei Kernlokalisierungssignale trägt und dadurch gebundenes PQBP1 zusammen mit NpwBP in den Zellkern transportiert wird.

Durch die Immunfluoreszenzexperimente konnte gezeigt werden, daß die mutierten PQBP1 Proteine eine veränderte, zelluläre Lokalisation zeigen. Bei diesem Stand der Ergebnisse könnte der Phänotyp der Patienten entweder durch die veränderte zelluläre Lokalisation von PQBP1 verursacht werden, oder durch das Fehlen der C-terminalen Domäne oder durch eine insgesamt gestörte Proteinkonformation.

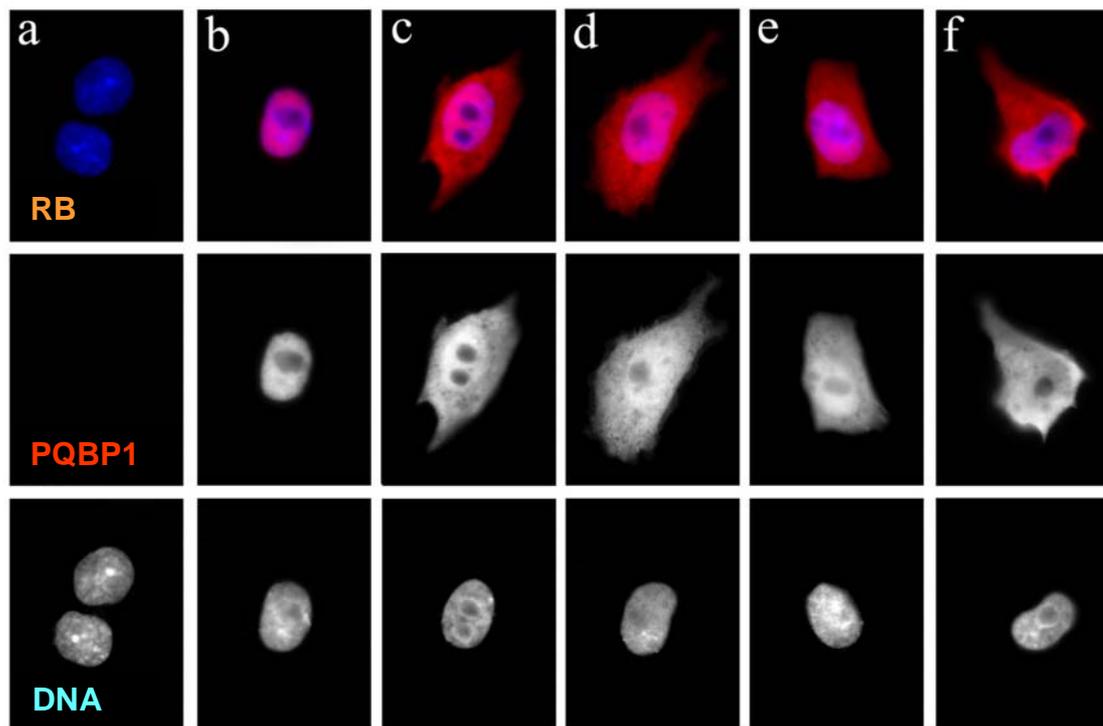


Abb.43: Zelluläre Lokalisation des Wildtyp PQBP1 Proteins (rot) und der trunkierten, mutierten PQBP1 Proteine (rot) : In der oberen Reihe ist das blaue Signal der Zellkernfärbung mittels DAPI und das rote Signal der c-MYC-Fusionsproteine mittels Cy3 als überlappende Signale sichtbar. In der mittleren Reihe ist nur das rote Signal der c-MYC-Fusionsproteine mittels Cy3 im Graukanal dargestellt. In der unteren Reihe ist die DNA Färbung mittels DAPI im Graukanal dargestellt. In diesem Falle wurden HeLa Zellen transfiziert. **(a)** Die Zellen sind mit dem leeren pCMVtag3A-Vektor transfiziert worden **(b)** Die Zellen sind mit dem pCMVtag3A-Vektor, der die Wildtyp *PQBP1* Sequenz enthält (Referenzsequenz Acc. Nr. AJ242829), transfiziert worden **(c)** Die Zellen sind mit dem pCMVtag3A-Vektor, der die *PQBP1* Sequenz mit der Duplikation AG enthält, transfiziert worden (N9) **(d)** Die Zellen sind mit dem pCMVtag3A-Vektor, der die Sequenz mit der Deletion AGAG enthält, transfiziert worden (N45) **(e)** Die Zellen sind mit dem pCMVtag3A-Vektor, der die *PQBP1* Sequenz mit der Deletion AGAG enthält, transfiziert worden (MRX55) **(f)** Die Zellen sind mit dem pCMVtag3A-Vektor, der die *PQBP1* Sequenz mit der Deletion AG enthält, transfiziert worden (N40). Das Wildtyp PQBP1 Protein zeigt eine überwiegend Zellkern-spezifische Lokalisation, wo hingegen die mutierten, trunkierten Proteine gleichmäßig im Zytoplasma und im Zellkern lokalisiert sind.

3.2.4.6 Zelluläre Lokalisation von PQBP1 und POU3F2 (Brn2)

Mittels *Yeast-Two-Hybrid* Experimenten wurde PQBP1 als Interaktionspartner von POU3F2 ermittelt. Dabei wurde gezeigt, daß der isolierte Poly-Glutamin-Abschnitt von POU3F2 mit dem DR/ER Repeat von PQBP1 eine Bindung eingeht (Waragai et al., 1999). POU3F2, auch als Brn2 bezeichnet, ist ein Transkriptionsaktivator (Schreiber et al., 1993), der hauptsächlich im zentralen Nervensystem exprimiert wird und eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Schwann`schen Zellen spielt (Jaegle et al., 2003). Auf Grund der wichtigen Rolle im zentralen Nervensystem und der gezeigten Interaktion mit PQBP1 erschien POU3F2 als ein idealer Kandidat, der durch eine gestörte Interaktion mit PQBP1 in seiner Funktion als neuronaler Transkriptionsfaktor beeinträchtigt sein könnte. Eine Störung der Interaktion von PQBP1 und POU3F2 könnte zu einer funktionellen Beeinträchtigung von POU3F2 führen, und als Konsequenz wäre die Entwicklung von kognitiven Defiziten denkbar.

Es stellte sich in diesem Zusammenhang die Frage, ob die mutierten und trunkeierten PQBP1 Proteine noch in der Lage sind, POU3F2 zu binden. Wäre dies der Fall, könnte man vermuten, daß die mutierten PQBP1 Proteine POU3F2 im Zytoplasma zurückhalten würden. Um diese Frage zu klären, wurde ein Expressionsvektor mit zwei Klonierungsstellen benutzt. Damit kann sichergestellt werden, daß nach einer erfolgreichen Transfektion beide Proteine in ein und derselben Zelle exprimiert werden.

PQBP1 wurde in die Klonierungsstelle von pBudCE4 kloniert, die die Sequenz für ein C-terminales c-MYC-Epitop trägt. *POU3F2* wurde in die zweite Klonierungsstelle von pBudCE4 kloniert, die die Sequenz für ein N-terminales V5-Epitop trägt. Die klonierte *POU3F2* cDNA für diesen Versuch stammt aus *Rattus norvegicus*. Diese cDNA wurde in Form eines Klons freundlicherweise von Dr. McEvelly zur Verfügung gestellt. Es wurde der *Rattus norvegicus* Klon verwendet, da auf Grund der GC-reichen Nukleotidsequenz die RT-PCR des humanen *POU3F2* nicht fehlerfrei funktioniert hat. Trotz Verwendung unterschiedlichster PCR-Kits fehlten im RT-PCR Produkt des humanen POU3F2 grundsätzlich 18 Guanin- und Cytosinnukleotide, die für einen Glutaminabschnitt kodieren. Das humane POU3F2 und das der Ratte sind auf Aminosäureebene zu 99% identisch,

dadurch ist anzunehmen, daß das humane PQBP1 auch mit dem POU3F2 der Ratte interagiert.

Die Immunfluoreszenz Experimente haben gezeigt, daß die mutierten, trunkierten PQBP1 Proteine wie erwartet gleichmäßig im Zellkern und im Zytoplasma verteilt sind (Abb.44). Dagegen ist POU3F2, wie für einen Transkriptionsfaktor zu erwarten, in allen Fällen im Zellkern lokalisiert (Abb.44 a-e). Somit ist eine Kolo-kalisation von PQBP1 und POU3F2 mittels Immunfluoreszenz nicht nachweisbar. Diese Experimente zeigen aber, daß die mutierten PQBP1 Proteine anscheinend nicht an POU3F2 binden und dieses dadurch auch nicht im Zytoplasma zurückhalten. Dies läßt vermuten, daß die mutierten PQBP1 Proteine auf Grund der Mutation keine Bindung mit POU3F2 mehr eingehen können.

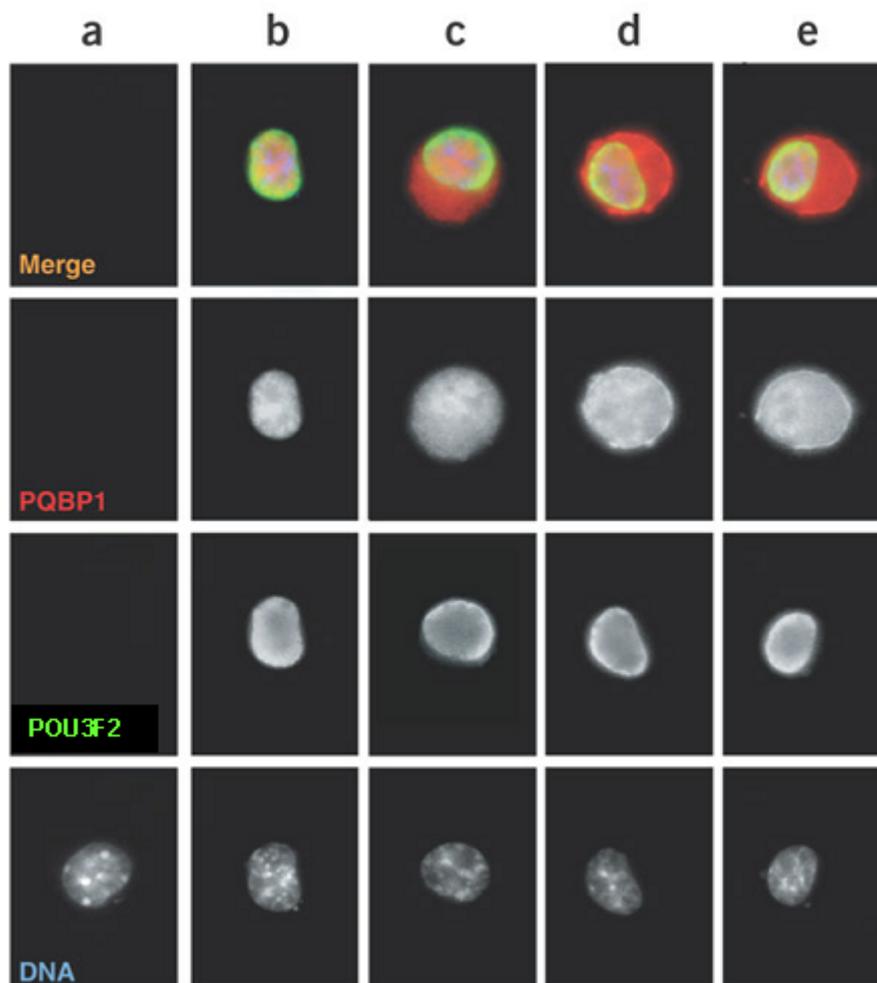


Abb.44:**Zelluläre Lokalisation des Wildtyp PQBP1 Proteins (rot), des Wildtyp POU3F2 Proteins (grün) und der mutierten, trunkierten PQBP1 Proteine (rot):** In der oberen Reihe ist das blaue Signal der Zellkernfärbung mittels DAPI, das rote Signal der c-MYC-Fusionsproteine mittels Cy3 und das grüne Signal der V5-Fusionsproteine mittels FITC, als überlappende Signale sichtbar. In diesem Falle wurden U373MG Zellen transfiziert (a) Die Zellen sind mit dem leeren pBudCE4-Vektor transfiziert worden (b) Die Zellen sind mit dem pBudCE4-Vektor, der die Wildtyp *PQBP1* Sequenz enthält (Referenzsequenz Acc. Nr. AJ242829) und die Wildtyp *POU3F2* Sequenz enthält (Referenzsequenz Acc. Nr. XM_345510), transfiziert worden (c) Die Zellen sind mit dem pBudCE4-Vektor, der die mutierte *PQBP1* Sequenz mit der Duplikation AG enthält und die Wildtyp Sequenz von *POU3F2*, transfiziert worden (d) Die Zellen sind mit dem pBudCE4-Vektor, der die mutierte *PQBP1* Sequenz mit der Duplikation AGAG enthält und die Wildtyp Sequenz von *POU3F2*, transfiziert worden (e) Die Zellen sind mit dem pBudCE4-Vektor, der die mutierte *PQBP1* Sequenz mit der Deletion AG enthält und die Wildtyp Sequenz von *POU3F2*, transfiziert worden

3.2.4.7 Koimmunpräzipitation von PQBP1 und POU3F2

Um eine genauere Aussage über den Status der Interaktion zwischen PQBP1 und POU3F2 machen zu können, muß ein direkter Nachweis über Koimmunpräzipitation erbracht werden.

Für die Koimmunpräzipitation wurden HeLa Zellen und U373MG Zellen mit den pBudCE4 *PQBP1*- und den *POU3F2*-Konstrukten transfiziert und überexprimiert. Genau wie bei den Koimmunfluoreszenzen war es wichtig, daß die Expression von *PQBP1* und *POU3F2* in ein und derselben Zelle gewährleistet ist. Deshalb wurden dieselben Konstrukte wie bei der Immunfluoreszenz auch bei der Koimmunpräzipitation verwendet. Nach 24 und 48 Stunden wurden die Zellen abtrypsinisiert und der Zellaufschluß erfolgte unter Verwendung einer 21 µm Nadel. Das Proteingemisch wurde anschließend mit Protein-A-Agarose und einem Antikörper gegen das c-MYC-Epitop inkubiert. Dadurch wird die mit dem c-MYC-Epitop fusionierte PQBP1 Protein über den Antikörper an die Protein-A-Agarose gebunden. POU3F2, der mögliche Interaktionspartner von PQBP1, würde durch Bindung an diesen ebenfalls nach dem Waschen der Protein-A-Agarose in diesem Komplex übrig bleiben. Das so isolierte Proteingemisch wurde auf ein SDS Gel geladen und geblottet. Der beim Western Blot verwendete Antikörper war gegen den V5-Tag gerichtet und sollte somit überexprimiertes POU3F2 detektieren, das

zuvor bei der Aufreinigung an PQBP1 gebunden hatte. Dieser Versuch wurde auch mit einer umgekehrten Anwendung der Antikörper durchgeführt, so daß zuerst alle POU3F2 Proteine mit V5-Epitop an den Antikörper binden und nach Waschung und Western Blot möglicherweise gebundenes PQBP1, durch Verwendung eines Antikörpers gegen das c-MYC-Epitop, nachgewiesen werden kann.

Entgegen der Literatur (Waragai et al, 1999) war es im vorliegenden Experiment nicht möglich eine Interaktion zwischen POU3F2 und PQBP1 nachzuweisen. Einerseits waren die Signale extrem schwach und andererseits war bei der Hälfte aller Experimente auch eine schwache Bande in der Negativkontrolle zu sehen (Abb.45). Als Negativkontrolle dienten Zellen, die nur POU3F2 oder PQBP1 überexprimierten. Auch eine Änderung der Zusammensetzung der verwendeten Puffer konnte die Ergebnisse der Experimente nicht ändern.

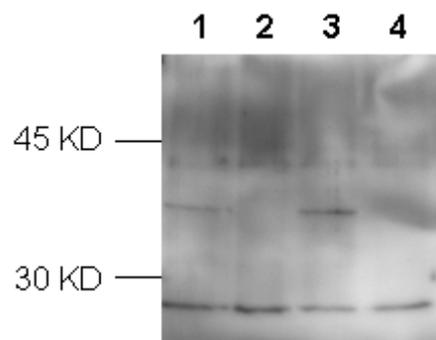


Abb.45: **Koimmunpräzipitation von PQBP1 und POU3F2:** PQBP1 WT und POU3F2 WT wurden in den Expressionvektor pBudCE4 kloniert und in U373MG-Zellen transient überexprimiert. Aus diesen Zellen wurde Gesamtprotein extrahiert und eine Koimmunpräzipitation durchgeführt. **1:** U373MG + PQBP1 WT; **2:** U373MG + pBudCE4; **3:** U373MG + PQBP1 WT und POU3F2 WT; **4:** U373MG

3.2.4.8 Zelluläre Lokalisation der PQBP1 641insC Mutante

Kürzlich wurden zwei weitere Mutationen in PQBP1 beschrieben. Bei der einen handelt es sich um eine Deletion von zwei Nukleotiden in Exon 4 (575_576delAG), bei der anderen um eine Insertion von einem Nukleotid in Exon 5 (641insC) (Lenski et al., 2004). Für eine weitere funktionelle Analyse von PQBP1 war die Insertionsmutation in Exon 5 besonders interessant. Diese Mutation resultiert in einem vorzeitigen Translationsstopkodon an Position 226 der Aminosäuresequenz; das vorhergesagte Zellkerntransportsignal bleibt aber dabei erhalten.

Mittels Mutagenese wurde die Mutation 641insC nachgebildet und in einen Expressionsvektor kloniert mit einer N-terminalen Sequenz für ein c-MYC-Epitop. Durch Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, daß das mutierte Protein genau wie das Wildtyp PQBP1 ausschließlich im Zellkern lokalisiert ist (Abb.46). Dieses Experiment zeigt, daß das vorhergesagte Kernlokalisationsignal tatsächlich funktionell ist.

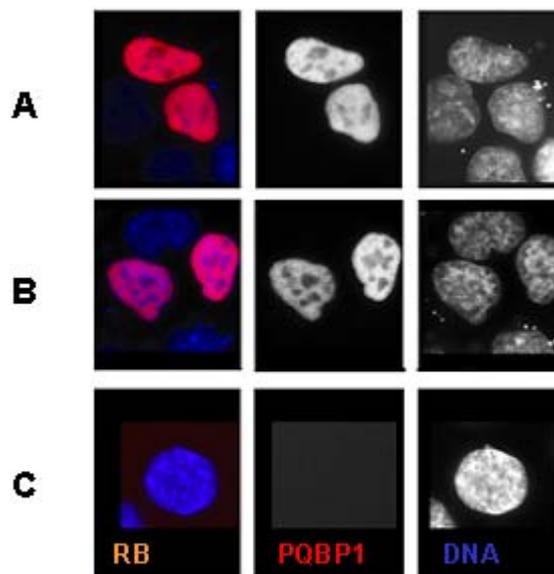


Abb.46: **Zelluläre Lokalisation des mutierten, trunkeierten PQBP1 Proteins (641insC)** In der linken Spalte ist das blaue Signal der Zellkernfärbung mittels DAPI und das rote Signal der c-MYC-Fusionsproteine mittels Cy3 als überlappende Signale sichtbar. In der mittleren Spalte ist nur das rote Signal der c-MYC-Fusionsproteine mittels Cy3 im Graukanal dargestellt. In der rechten Spalte ist die DNA Färbung mittels DAPI im Graukanal dargestellt. In diesem Falle wurden HeLa Zellen transfiziert. **A** Die Zellen sind mit dem pCMVtag3A-Vektor, der die Wildtyp *PQBP1* Sequenz enthält (Referenzsequenz Acc. Nr.

AJ242829), transfiziert worden **B** Die Zellen sind mit dem pCMVtag3A-Vektor, der die *PQBP1* Sequenz mit der Insertion 641C enthält, transfiziert worden **C** Die Zellen sind mit dem pCMVtag3A-Vektor ohne *Insert* transfiziert worden