

4 Diskussion

4.1 *NTNG1* ein neues autosomales Kandidatengen für Rett Syndrom (RTT)

4.1.1 Eine Patientin mit RTT, die Trägerin einer balancierten reziproken Translokation $t(1;7)(p13.3;q31.3)$ ist

Das Rett-Syndrom (RTT) ist eine genetisch bedingte, progressiv verlaufende, neurologische Entwicklungsstörung. Es ist eine der häufigsten Ursachen der geistigen Behinderung bei Frauen (Armstrong, 1997). Für die Diagnose des RTT Syndroms müssen drei der Hauptkriterien und fünf der unterstützenden Kriterien nachgewiesen werden. Die Hauptkriterien sind: normales Wachstum und Geburt, weitestgehend normale Entwicklung während der ersten 6 bis 18 Monate, normaler Kopfumfang bei Geburt, häufig eine Verminderung des Schädelwachstums zwischen dem 1. und 4. Lebensjahr, der Verlust sozialer Kontaktfähigkeit, eine Störung der Sprachentwicklung und Kommunikationsfähigkeit, mentale Retardierung unterschiedlichen Ausmaßes, Verlust von motorischen Fähigkeiten zwischen dem 1. und 4. Lebensjahr, Handstereotypien und Störungen im Gangbild. Als unterstützende Kriterien gelten: Atemregulationsstörungen, EEG-Abnormalitäten, epileptische Anfälle, Hypotonie im Anfangsstadium, später Spastizität oder Rigidität der Muskulatur, wenig ausgeprägte Muskulatur, Skoliose, schlecht durchblutete Füße, Wachstumsretardation und Bruxismus (Hanefeld et al., 1985).

Neben dem klassischen RTT gibt es auch das so genannte atypische RTT Syndrom. Patienten mit atypischem RTT zeigen zwar einige charakteristische Merkmale des RTT, aber es werden nicht genügend der oben genannten diagnostischen Kriterien erfüllen (Kerr et al., 2001).

Bislang wurde RTT als eine monogene Erkrankung beschrieben, die durch Mutationen im Methyl CpG Bindeprotein 2 (*MECP2*) Gen verursacht wird (Amir et al., 1999 und Renieri et al., 2003). MeCP2 ist ein ubiquitär exprimierter

Transkriptionsfaktor (Tate et al., 1996; Nan et al., 1997), der durch seine Bindung an CpG Dinukleotiden die Transkription stromabwärts gelegener Gene inhibiert (Jones et al., 1998; Nan et al., 1998; Ng und Bird, 1999). Momentan sind bei ca. 90% der Patienten mit klassischem RTT kausative Mutationen in *MECP2* beschrieben worden. Bei den verbleibenden 10% der RTT Patienten ist die genetische Ursache der Erkrankung jedoch noch nicht aufgeklärt. Bei der atypischen Form des RTT liegt die Anzahl der Patienten, bei denen keine Mutationen in *MECP2* gefunden wurden, bei 60-80 %.

Aus diesen Gründen ist es sehr wahrscheinlich, daß Mutationen in anderen, bislang nicht identifizierten Genen ebenfalls zu RTT führen (Hanefeld 1985, Goutiers und Aicardi, 1986; Hagberg und Skjeldal 1994). Erst kürzlich konnte diese Annahme durch die Identifikation von Mutationen im *CDKL5* Gen bei Patienten mit atypischem RTT bestätigt werden (Tao et al., 2004; Weaving et al., 2004). *CDKL5* ist eine Serin/Threonin Kinase mit zur Zeit unbekannter Funktion.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Trägerin der balancierten reziproken Translokation $t(1;7)(p13.3;q31.3)$ erfüllt die oben beschriebenen diagnostischen Kriterien des klassischen RTT. Mutationen in allen bisher beschriebenen, kodierenden Bereichen von *MECP2* wurden ausgeschlossen, einschließlich der neuesten beschriebenen *MECP2* Transkriptvariante (Mnatzakanian et al., 2004). Des weiteren wurden größere Deletionen oder Duplikationen ausgeschlossen und Mutationen im *CDLK5* Gen. Die Übereinstimmung des Phänotyps der Patientin mit den Kriterien für klassisches RTT und das Vorhandensein einer Translokation zwischen Chromosom 1 und 7 waren daher ideale Ausgangspunkte für die Identifizierung eines neuen, autosomalen Kandidatengens für das RTT.

4.1.2 Analyse des Bruchpunktbereiches auf Chromosom 1

Die Analyse der Chromosomenbruchpunktregionen und die Klonierung des Bruchpunktes auf dem derivativen Chromosom 7 führten zur Identifizierung von *NTNG1* als Kandidatengen für RTT. *NTNG1* ist auf Chromosom 1 lokalisiert, und der Translokationsbruchpunkt zerstört die transkriptionelle Einheit dieses Gens. Bislang wurden zwei Transkriptvarianten für das humane *NTNG1* im *Humann Genome Browser* (Version Mai 2004) veröffentlicht. Der hauptsächliche Unterschied zwischen diesen beiden Varianten liegt einerseits in unterschiedlichen

nicht translatierten Exonen im 5' Bereich und andererseits in unterschiedlichen 3' Exonen, die durch alternatives Spleißen generiert werden. Dieser Unterschied im 3' Bereich der beiden Transkripte führt zu unterschiedlichen C-terminalen Enden der resultierenden Proteinvarianten. Durch RT-PCR Experimente konnte gezeigt werden, daß durch das Translokationsereignis bei der Patientin nur eine Transkriptvariante trunziert wurde. Für die andere Transkriptvariante war bei der Patientin im Vergleich zu einer Kontrollpersonen kein Unterschied nachweisbar (s. Kapitel 3.1.6). Dies weist darauf hin, daß vermutlich keine regulatorischen Elemente stromabwärts von der Transkriptvariante 1 durch das Translokationsereignis vom Rest des Transkriptes getrennt werden. Die Expressionsexperimente wurden allerdings mit RNA aus lymphoblastoiden Zelllinien und Fibroblasten durchgeführt, daher besteht die Möglichkeit, daß die Expression und Regulation der Transkription im Gehirn abweichend ist.

Die *in silico* Analyse des vorhergesagten Proteins der Transkriptvariante 2 ergab, daß es eine Erkennungssequenz (ω -Stelle) trägt, die für die Anheftung eines Glykosyl-Inositol-Ankers (GPI-Anker) von Bedeutung ist (Udenfriend und Kodukula, 1995). Demnach könnte auf Grund der chromosomalen Umstrukturierung bei der Patientin diese NTNG1 Proteinvariante im Vergleich zu Kontrollpersonen reduziert sein.

Über diesen GPI Anker werden Proteine an der Plasmamembran befestigt und sind dadurch vermutlich lokale Axonleitmoleküle im Gegensatz zu den löslichen Axonleitmolekülen, die durch den Aufbau eines Gradienten die Leitung der Axone vermitteln (Hinck, 2004). Das vorhergesagte Protein der anderen, nicht vom Bruchpunkt auf Chromosom 1 betroffenen *NTNG1* Transkriptvariante, trägt keine solche Erkennungssequenz und ist somit höchstwahrscheinlich ein lösliches Protein.

4.1.3 Analyse des Bruchpunktbereiches auf Chromosom 7

Auf dem Chromosom 7 sind durch den Translokationsbruchpunkt keine bekannten Gene direkt trunziert. Das nächste bekannte Gen zum Bruchpunktbereich auf Chromosom 7 ist das *Sperm Adhesion Molecule 1 (SPAM1)*, das ca. 160 Kb proximal zum Bruchpunkt liegt. Distal vom Bruchpunkt ist das nächste bekannte

Gen der *G Protein-Coupled Receptor 37 (GPR37)*, welcher 614 Kb entfernt ist. In diesem Falle kann man nicht völlig ausschließen, daß regulatorische Sequenzen dieser oder anderer Gene in der Nähe des Bruchpunktes durch das Translokationsereignis von der Transkriptionseinheit getrennt wurden.

Es wurden bereits nahezu 20 solcher Positionseffekte im Zusammenhang mit unterschiedlichen Krankheitsbildern beschrieben (Kleinjan und van Heyningen, 2005). So existiert beispielsweise ein regulatorisches Element, das über weite Strecken die Transkription des *Sonic Hedgehog* Gens (*SHH*) kontrolliert. Die Trunkierung dieses regulatorischen Elementes durch einen Translokationsbruchpunkt, der 1000 Kb von *SHH* entfernt ist, beeinflußt dessen Expression negativ und führt zu präaxialer Polydaktylie (Lettice et al., 2002).

Ungeachtet dieser Möglichkeit ist es relativ unwahrscheinlich, daß eine Fehlfunktion der oben beschriebenen Gene *SPAM1* und *GPR37* den pathologischen Phänotyp der Patientin verursachen. Das vom *Sperm Adhesion Molecule 1 (SPAM1)* kodierte Protein ist sowohl an der Plasmamembran als auch an der Membran des Akrosoms lokalisiert. *SPAM1* hat eine Hyaluronidaseaktivität, und durch diese Aktivität wird die Durchlässigkeit des Gewebes der Eizelle für das Spermium erhöht (Jones et al., 1995 und Lin et al., 1993).

Das andere Gen, der *G Protein coupled Receptor 37 (GPR37)*, ist noch weiter vom Bruchpunkt entfernt als *SPAM1*. *GPR37* ist ein Transmembranprotein und vermittelt den Transport von Hormonen, endogenen Peptiden und leitet Signale von Neurotransmittern weiter. Es ist im Gehirn exprimiert (Marazziti et al., 1997) und interagiert mit Parkin (*PARK2*), von dem es *in vitro* ubiquitiniert wird. Ist diese Ubiquitinierung gestört, kommt es zur Ansammlung von *GPR37* im Gehirn von juvenilen Parkinson Patienten (Imai et al., 2001). Die ersten Symptome einer juvenilen Parkinsonerkrankung werden meist um das dreißigste Lebensjahr beobachtet, in Ausnahmefällen schon mit dem zwanzigsten Lebensjahr. Die Parkinson Erkrankung ist eine degenerative Erkrankung, bei der die Dopamin produzierenden Zellen nach und nach ihre Funktion einstellen (Barzilai und Melamed, 2003). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit molekulargenetisch analysierte Patientin zeigt eine Entwicklungsregression bereits im Alter von fünf Monaten. *GPR37* kann dadurch nicht vollständig als Kandidatengen ausgeschlossen werden, aber es ist wesentlich wahrscheinlicher, daß der

pathologische Phänotyp durch die Trunkierung einer *NTNG1* Transkriptvariante auf Chromosom 1 verursacht wird.

Direkt durch den Translokationsbruchpunkt auf Chromosom 7 ist ein *Expressed Sequence Tag* (EST) unterbrochen, das aus adultem Gewebe unbekannter Herkunft stammt. Der Bruchpunkt ist im Intron 2 lokalisiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es nicht möglich, die Expression dieses ESTs zu bestätigen. RT-PCR Experimente mit RNAs aus unterschiedlichen Zelltypen (inklusive fötalem Gehirn) durchgeführt wurden, führten zu keinem Nachweis der Expression dieses ESTs. Möglicherweise wird dieses EST gar nicht oder zumindest nicht in den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Geweben exprimiert.

Wichtig ist in diesem Zusammenhang, daß das EST wahrscheinlich nicht in fötalem Gehirn exprimiert wird. Die für den Expressionsnachweis eingesetzten RNAs repräsentieren ein Gemisch von fötalen Gehirngeweben unterschiedlicher Embryonalstadien. Man kann daraus schließen, daß das EST anscheinend in keinem fötalen Stadium exprimiert wird. Diese Ergebnisse können eine Funktion dieses ESTs bei der embryonalen Entwicklung nicht ausschließen, aber vermutlich spielt dieses Gen bei der embryonalen Entwicklung keine vorrangige Rolle. Auch die *in silico* Translation der publizierten Sequenz dieses ESTs führte zu keinem längeren, offenen Leserahmen. Somit besteht einerseits die Möglichkeit, daß es sich bei diesem EST bisher nur um das 3' Ende eines Gens handelt und eine Verknüpfung mit eventuell vorhandenen 5' gelegenen ESTs möglich wäre; andererseits wäre es auch denkbar, daß dieses EST falsch vorhergesagt worden ist. Bei der Evaluierung der Programme, die an Hand von Sequenzen verschiedene Exone eines Gens voraussagen, hat man nämlich festgestellt, daß mehr als 50% der Vorhersagen falsch sind (Burset und Guigo, 1996).

Auch unter Berücksichtigung der Möglichkeit, daß dieses EST ein Teil eines bisher unbekanntes Gens ist, erscheint *NTNG1*, basierend auf der Proteinfunktion als Axonleitmolekül, der ZNS spezifischen Expression (Nakashiba et al., 2000) und der Expression in fötalem Gehirn (s. Kapitel 3.1.6), als das wahrscheinlichere Kandidatengen für den RTT Phänotyp der Patientin.

4.1.4 Potentielle Funktionen der NTNG1 Isoformen

Basierend auf der Homologie der konservierten funktionellen Domänen wurde das NTNG1 Protein in die Familie der Netrine eingeordnet (Nakashiba et al., 2000). Die klassischen Mitglieder der Netrin Familie sind sezernierte Axonleitmoleküle, die phylogenetische mit den Lamininen verwandt sind. Diese phylogenetische Verwandtschaft beruht auf dem Vorhandensein der für Laminine typischen EGF (*Epidermal Growth Factor*) ähnlichen Motive. Diese bestehen aus sogenannten LE *Repeats* (*Laminin Epidermal Growth Factor* ähnliches Motiv) und sind konservierte funktionelle Domänen, die für unterschiedliche Proteininteraktionen von Bedeutung sind. Welche Proteine an diese LE *Repeats* binden, ist derzeit noch nicht bekannt, aber offensichtlich existieren mehrere Interaktionspartner, da man in *C. elegans* zeigen konnte, daß verschiedene Deletionen in den unterschiedlichen LE *Repeats* zu abweichenden neuronalen Fehlbildungen führen (Hedgecock et al., 1990; Wadsworth et al., 1996).

Grundsätzlich sind Netrine konservierte Proteine, die von *C. elegans* bis zu den Vertebraten vorkommen (Serafini et al., 1994). Die Netrine der Wirbeltiere sind verstärkt in der ventralen Mittellinie exprimiert, wo sie die kommissuralen Axone anziehen, während sie auf trochleare Axone eine abstoßende Wirkung zeigen (Colamarino und Tessier-Lavigne, 1995). Diese bifunktionelle Eigenschaft der Netrine wird durch die Bindung an zwei unterschiedliche Rezeptoren vermittelt. Die anziehenden Eigenschaften werden hauptsächlich über den Netrin Rezeptor *Deleted in Colorectal Cancer* (DCC) vermittelt. Der Name DCC kommt dadurch zustande, daß das entsprechende Protein bei kolorektalen Karzinomen und auch bei anderen Karzinomarten merklich reduziert ist. Die Rezeptoren, die die abstoßenden Eigenschaften der Netrine vermitteln, gehören zur Unc-5 Familie. Der Name Unc-5 ist übernommen von dem Gennamen des homologen Proteins in *C. elegans*. Unc ist die Bezeichnung eines Kreuzungsstammes von *C. elegans* und bedeutet *UNCoordinated*.

Ursprünglich wurde Ntn1, auch bezeichnet als Laminin-1, in *Mus musculus* identifiziert, wo es als hauptsächlich über einen GPI Anker an der Plasmamembran verankertes Axonleitmolekül beschrieben wurde (Nakashiba et al., 2000). Obwohl die Funktionen der humanen NTNG1 Proteine bislang

unbekannt sind, kann man dennoch, basierend auf der starken Konservierung der Aminosäuresequenz (96% identische Aminosäuren) zwischen dem Maus Ntng1 und dem humanen NTNG1, annehmen, daß die humanen NTNG1 Proteine eine vergleichbare Funktion wie die Maus Ntng1 Proteine ausüben.

Auch wenn NTNG1 in die Familie der Netrine einzuordnen ist, gibt es einige Eigenschaften und Proteindomänen, die einzigartig für NTNG1 sind. So sind fünf von sechs in *Mus musculus* beschriebenen Ntng1 Protein Varianten durch einen Glykosylphosphatidyl (GPI) Anker an der Plasmamembran befestigt. Ein weiterer wichtiger Unterschied ist, daß Ntng1 nicht in der ventralen Mittellinie exprimiert wird und somit vermutlich eine divergente Funktion im Vergleich zu den klassischen Netrinen ausübt (Nakashiba et al., 2000; Yin et al., 2002). Darüber hinaus ist NTNG1 nicht in der Lage, an die Rezeptoren DCC beziehungsweise an Unc-5 zu binden, an die die klassischen Netrine binden.

Vermutlich sind die an der Plasmamembran verankerten Axonleitmoleküle bevorzugt an der Führung axonaler Wachstumskegel über kürzere Strecken beteiligt. Dem gegenüber stehen die sezernierten Proteine, die die axonalen Wachstumskegel durch Aufbau eines Diffusionsgradienten über längere Strecken führen (Nakashiba et al., 2002). Expressionsstudien, die mittels Northern Blot Analyse durchgeführt wurden, zeigten, daß *NTNG1* ausschließlich im zentralen Nervensystem exprimiert wird, wobei die stärkste Expression im Thalamus nachweisbar war (Lin et al., 2003). Der Thalamus fungiert als subkortikale Sammelstelle für die Sinnessysteme (außer Geruchssinn) mit Umschaltung zur Großhirnrinde und ist dadurch die Schaltstelle für sensorische und motorische Funktionen. Eine Fehlfunktion in diesem Bereich des Gehirns wird im Falle der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patientin auf Grund eines ihrer pathologischen Merkmale unterstützt. Durch eine EEG-Untersuchung, die eine abnormale Aktivität während des Schlafens zeigte, wurde eine Epilepsie bei der Patientin diagnostiziert (s. Kapitel 3.1.1). Der Thalamus ist außerdem maßgeblich an der Entstehung der rhythmischen Schlafaktivität des Gehirns beteiligt, und es ist bekannt, daß krankhafte Formen dieser Prozesse eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Epilepsie spielen (Kostopoulos, 2001).

Neuere experimentelle Daten haben gezeigt, daß Ntng1 im Thalamus in den thalamocorticalen und nicht corticothalamischen Axonen nachweisbar ist (Lin et al., 2003). Der Unterschied zwischen diesen beiden Arten von Nervenzellen liegt

in ihrer Ausrichtung und Signalweiterleitung. Bei den thalamocorticalen Nervenzellen ist der Zellkern im Thalamus lokalisiert, und das Axon mit seinen Dendriten stellt eine Verbindung zum Kortex her. Durch diese Nervenzellen werden sensorische Reize, aber auch Emotionen an den Kortex weitergeleitet. Bei den corticothalamischen Nervenzellen dagegen ist es genau umgekehrt: der Zellkern ist im Kortex lokalisiert, und Axone und Dendriten stellen eine Verbindung zum Thalamus her. Dementsprechend findet bei diesen Nervenzellen eine Weiterleitung der Signale vom Kortex in den Thalamus statt. Über diesen Weg werden beispielsweise Signale weitergeleitet, die für die Kontrolle von Bewegungen (*motor pathway*) wichtig sind. Eine Verringerung der Proteinmenge von NTNG1 würde somit die Weiterleitung von sensorischen Reizen übermmittelt durch die thalamocorticalen Axone vom Thalamus in den Kortex stören.

Des Weiteren konnte in einem anderen Zusammenhang gezeigt werden, daß eine fehlerhafte Verschaltung von thalamocorticalen Axonen zu neurologischen Erkrankungen wie beispielsweise Autismus führt. In diesem Falle wurde die Funktionsstörung der thalamocorticalen Axone durch eine homozygote Deletion des *Monoamin Oxidase A Gens (Maoa)* beziehungsweise des *Serotonin Transporters (Sert)* in Mäusen verursacht (Alvarez et al., 2002).

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Patientin zeigt ebenfalls autistische Verhaltensweisen. Da NTNG1 für eine korrekte Funktion solcher thalamocorticaler Axone wichtig ist, unterstützt dieses phänotypische Merkmal die Annahme, daß eine Reduzierung des NTNG1 Proteins für den pathologischen Phänotyp der Patientin verantwortlich ist.

Durch die chromosomale Umstrukturierung bei der Patientin wird die *NTNG1* Transkriptvariante, welche für die über GPI-Anker befestigte Proteinvariante kodiert, auf dem derivativen Chromosom zerstört. Das gerade diese verankerte Form eine besondere Bedeutung hat, wird an Hand funktioneller Studien der verankerten murinen Ntng1 Proteinvarianten deutlich. Kürzlich wurde ein Ligand für Ntng1, das Protein NGL-1, beschrieben. Dieser Ligand stimuliert das Wachstum von Neuronen, wenn er über einen Oberflächenrezeptor an thalamocorticalen Axone gebunden ist (Lin et al., 2003). Bei der Behandlung der Zellen mit der Phosphatidylinositol spezifischen Phospholipase C (PC-PLC), die Phosphatidylinositol in zwei Moleküle spaltet, wird der GPI-Anker zerstört und das verankerte Protein von der Plasmamembran abgelöst (Sharom et al., 2002). Mit

dieser Methode war es möglich zu beweisen, daß Ntng1 ein Oberflächenrezeptor für NGL-1 ist und das Wachstum von Neuronen durch die Ablösung von der Plasmamembran gestört wird. Durch eine Zugabe von löslichem Ntng1 im Überschuß konnte der negative Effekt teilweise wieder aufgehoben werden (Lin et al., 2003). Diese Untersuchung zeigt deutlich, daß die über einen GPI Anker an der Plasmamembran befestigten Ntng1 Proteinvarianten für die Interaktion mit dem Liganden wichtig sind und für eine korrekte Leitung der thalamocorticalen Axone zuständig sind.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß eine Reduzierung von NTNG1, verursacht durch die Bruchpunkt bedingte Unterbrechung von *NTNG1*, zu einer Fehlfunktion thalamocorticaler Axone führen könnte. Offensichtlich ist eine optimale Regulierung der Proteinmenge für die Funktion von NTNG1 von Bedeutung.

4.1.5 Mögliche pathologische Auswirkungen einer gestörten NTNG1 Expression

Durch die balancierte Translokation bei der Patientin zwischen Chromosom 1 und Chromosom 7 wird die transkriptionelle Einheit der *NTNG1* Variante 2 zerstört. Diese Proteinvariante ist höchstwahrscheinlich über einen GPI-Anker an der Plasmamembran befestigt. Die andere Proteinvariante, die nicht durch das Translokationsereignis beeinträchtigt ist, ist höchstwahrscheinlich löslich.

Durch RT-PCR Analyse konnte nachgewiesen werden, daß die Expression der Variante 2 bei der Patientin deutlich reduziert ist (s. Kapitel 3.1.6). Demnach ist es relativ wahrscheinlich, daß die durch einen GPI-Anker an der Plasmamembran befestigte Proteinvariante von NTNG1 reduziert ist.

Die Bedeutung von GPI-verankerten Axonleitmolekülen für die einwandfreie Ausbildung des Nervensystems konnte durch Analysen des RGMA Proteins gezeigt werden. RGMA ist ein Axonleitmolekül, das eine abstoßende Wirkung auf die Wachstumskegel von Axonen ausübt. Es übernimmt sowohl bei der korrekten Nervenbildung im Hippocampus als auch für das Wachstum von entorhinalen Axonen eine bedeutende Rolle. Durch Entfernung des GPI-Ankers mit PI-PLC konnte gezeigt werden, daß die normale Innervierung gestört wird. Das zeigt, daß

die Wachstumsleitung für enthorinale Axone durch das an der Plasmamembran verankerte RGMA für eine korrekte Verschaltung der Neuronen wichtig ist (Brinks et al., 2004). Somit sind durch GPI-Anker befestigte Proteinvarianten der Axonleitmoleküle wichtig für die Ausbildung des Nervensystems. Ihre Funktion kann nur bedingt von anderen Axonleitmolekülen übernommen werden.

In Abschnitt 4.1.4 wurde bereits erwähnt, daß die an der Plasmamembran verankerte Isoform von NTNG1 zusammen mit dem NGL-1 Liganden für die Wachstumsleitung von thalamocorticalen Axonen von Bedeutung ist (Lin et al., 2003). Bei der Patientin liegt höchstwahrscheinlich eine Reduktion dieser Proteinvariante vor, und offensichtlich ist die verbleibende *NTNG1* Expression vom intakten Chromosom 1 nicht ausreichend, um einen pathologischen Phänotyp zu verhindern. Die CT und MRT Untersuchungen der Patientin zeigten keine offensichtlichen Strukturveränderungen im Gehirn, so daß man zum jetzigen Zeitpunkt nur vermuten kann, daß es womöglich zu einer Beeinflussung des Längenwachstums und der Komplexität der thalamocorticalen Axone kommt. Es besteht aber auch die Möglichkeit, daß *NTNG1* neben der Wachstumsleitfunktion eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der synaptischen Plastizität spielt, die bei einem heterozygoten Verlust einer funktionellen Kopie gestört ist, während die Ausrichtung der thalamocorticalen Axone davon nicht beeinflusst wird. Dadurch, daß nur eine Kopie der Transkriptvariante 2 des *NTNG1* Gens durch den Bruchpunkt zerstört ist, kann man davon ausgehen, daß der pathologische Phänotyp durch die so genannte Haploinsuffizienz verursacht wird. Bei einer Haploinsuffizienz ist nur eine Kopie des Gens durch Mutation oder Translokation zerstört, jedoch reicht die verbleibende Expression, die von der nicht betroffenen Kopie resultiert, nicht aus, um eine normale Genfunktion auszuüben. Ein in diesem Zusammenhang interessantes Gen ist *Dyrk1A*, das an der Differenzierung von Neuronen beteiligt ist. Ein homozygoter Verlust dieser Protein Kinase, untersucht in homozygoten *Knockout* Mäusen, ist schon im Stadium der Organogenese lethal. Ein heterozygoter Verlust von *Dyrk1A* dagegen führt zu einem verlangsamten Wachstum der Neuronen und einem verkleinerten Gehirn. Wird durch die Deletion eines Allels von *Dyrk1A* die notwendige Expression nicht erreicht, so werden die Länge und die Komplexität des Neuropils negativ beeinflusst. Als Neuropil bezeichnet man die gesamte Region in der Nervenzellen die Verbindungen zu anderen Nervenzellen herstellt. Letztendlich führt ein

heterozygoter Verlust von *Dryk1A* zu einer Verkürzung der somatosensorischen Neuronen im Kortex und im Thalamus (Fotaki et al., 2002). Somit wird deutlich, daß oftmals nur eine intakte Kopie nicht ausreichend ist um die normale Genfunktion aufrecht zu erhalten. Offensichtlich ist dies auch der Fall für die Transkriptvariante 2 des *NTNG1* Gens.

Bislang existiert kein Mausmodell für *Ntng1*, aber es wäre denkbar, daß ein kompletter Verlust von *Ntng1* schon während der Embryonalentwicklung letal ist. Allerdings wäre es auch möglich, daß ein anderes Protein die Funktion von *Ntng1* teilweise ersetzt. So kann beispielsweise der Axonleitdefekt, verursacht durch den Funktionsverlust von JSAP-1, durch eine Überexpression von JIP1 ausgeglichen werden. Die resultierenden Proteine beider Gene interagieren mit C-jun N-terminalen Kinasen (JNKs), und das gestörte Wachstum der Axone im *Corpus callosum* konnte durch die Überexpression von JIP1 ausgeglichen werden (Ha et al., 2005). Ein vergleichbarer Effekt bei *NTNG1* wäre theoretisch möglich, doch bis jetzt gibt es keine Hinweise auf ein Protein, das eine überlappende Funktion mit *NTNG1* hat. Es existiert zwar ein zweites Protein zu *NTNG1*, das *NTNG2*, das einen hohen Grad der Übereinstimmung auf Aminosäureebene zeigt, aber die *in situ* Expressionsanalysen beider RNAs in Maus (*Ntng1* und *Ntng2*) weisen ein komplementäres Expressionsmuster dieser beiden Netrine auf (Nakashiba et al., 2002). Dies spricht dafür, daß *Ntng2* einen Funktionsverlust von *Ntng1* nicht ausgleichen kann.

Dennoch kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, daß ein trunkiertes *NTNG1* Protein gebildet wird, das womöglich mit dem Wildtyp Protein oder einem anderen Protein interagiert und dadurch ein dominant negativer Effekt entsteht. Ein dominant negativer Effekt kann durch eine Bindung des trunkierten Proteins mit dem Wildtyp Protein entstehen, daß wiederum zu einer veränderten Funktion oder zu einer Aggregation der Proteine führt.

4.1.6 Zusammenfassung und Ausblick für *NTNG1* als Kandidatengen für RTT

Pathologische Untersuchungen der Gehirne von RTT Patientinnen haben gezeigt, daß es bei dieser Krankheit weder zu umfangreichen Entwicklungsstörungen des Gehirns noch zu einem Abbau der Neuronen kommt. Jedoch wurde bei RTT Patienten nachgewiesen, daß die Neuronen verkürzt sind und enger beieinander liegen. Neben den Neuronen sind auch die Dendriten verkürzt, und es liegt eine allgemeine Reduzierung der dendritischen Verzweigungen vor (Armstrong et al., 2002). Aktuelle Veröffentlichungen bestätigen, daß es bei RTT Patienten nicht zu Gehirnefehlbildungen kommt, sondern zu einer Änderung der neuronalen Plastizität und zu einer vorzeitigen Einstellung der neuronalen Entwicklung statt umfangreicher Strukturveränderungen des Gehirns (Wenk et al., 1993; Baumann et al., 1995; Armstrong et al., 2003; Johnston et al., 2004).

Bei der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patientin wurde im Alter von 7 Monaten bei einer CT und MRT Untersuchung eine leichte Atrophie des Gehirns vermutet (s.a. Kapitel 3.1.1). Diese Atrophie stellte sich im Laufe der weiteren Entwicklung des Kindes als ein verlangsamtes Wachstum des Gehirns und des Kopfes heraus. Abgesehen davon hat die Trägerin der Translokation keine offensichtlichen Gehirnefehlbildungen. Allerdings wird durch die Translokation eine Transkriptvariante von *NTNG1* zerstört und somit liegt höchstwahrscheinlich eine Reduktion funktioneller *NTNG1* Proteine vor. *NTNG1* ist vermutlich an der Wachstumsleitung von thalamocortikalen Axonen (TCAs) beteiligt, und möglicherweise reicht ein Dosiseffekt aus, um das Wachstum dieser Axone negativ zu beeinflussen.

Während der embryonalen Entwicklung breiten sich TCAs in ventraler Richtung vom dorsalen Thalamus über die laterale Oberfläche des ventralen Thalamus aus. Wenn sie den Hypothalamus erreicht haben, machen sie eine laterale Wendung in das ventrale Telencephalon und wachsen danach in dorsolateraler Richtung zum endgültigen Ziel, dem Neokortex (Braisted et al., 1999; Tuttle et al., 1999). Thalamocorticale Axone haben ihren Ursprung im dorsalen Thalamus und übertragen sensorische Informationen aus der Peripherie in den Neokortex (Molnar et al., 2003). Darüber hinaus sind TCAs wichtig für die richtige

Differenzierung der Cortex Schichten (Agmon et al., 1993). Der cerebrale Cortex, auch als Großhirnrinde bezeichnet, ist zusammen mit dem Neocortex, der einzigartig für die Säugetiere ist, für die höheren kognitiven Fähigkeiten und komplexen Verhaltensweisen verantwortlich.

Die Patientin zeigt autistische Verhaltensweisen, die ebenfalls charakteristisch für RTT sind. Möglicherweise ist dies bedingt durch eine eingeschränkte Fähigkeit der Aufnahme von sensorischen Umweltreizen. Die Ursache dafür könnten entweder nicht korrekt ausgewachsene TCAs sein, oder aber die synaptische Plastizität zwischen verschiedenen TCAs kann nicht aufrechterhalten werden beziehungsweise sie ist gestört. Eine solche Fehlfunktion könnte die gestörte Interaktion der Patientin mit ihrer Umwelt möglicherweise erklären. Um diese Vermutungen weiter zu untersuchen, könnte man heterozygote *Knockout* Mäuse für *Ntng1* erzeugen und durch Präparationen des Gehirns eventuelle Veränderungen des Wachstumsverhalten der TCAs im Vergleich zu Wildtyp Gehirnpriparationen untersuchen. Unterstützend könnte man sogenannte *Neurite Outgrowth Assays* durchführen (Smit et al., 2003), um das Wachstumsverhalten von TCAs in Bezug auf eine reduzierte Dosis der GPI-verankerten *Ntng1* zu analysieren.

Die Übereinstimmungen des Phänotyps bei RTT Patienten mit *MECP2* Mutationen mit dem Phänotyp der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patientin legen die Vermutung nahe, daß *NTNG1* und *MeCP2* möglicherweise beide in einer Signalkaskade agieren.

Neben diesen Experimenten, die möglicherweise zu einem besseren Verständnis der Funktion von *NTNG1* beitragen und Rückschlüsse auf mögliche pathologische Folgen einer *NTNG1* Fehlfunktion zulassen, ist es erforderlich, Mutationsanalysen bei Patienten mit RTT durchzuführen, um die Relevanz von *NTNG1* als Krankheitsgen für RTT zu bestimmen.

4.2 Mutationen in *FTSJ1* führen zu nicht-syndromaler geistiger Behinderung

4.2.1 Funktionsverlust von *FTSJ1* in Familie P48 und Familie A3

Die Familien P48 und A3 sind Familien, deren männliche Träger mit Mutationen in *FTSJ1* an nicht-syndromaler, geistiger Behinderung leiden.

In der Familie P48 wurde bei allen erkrankten männlichen Mitgliedern und allen gesunden heterozygoten Konduktorinnen eine *Nonsense*-Mutation (196C→T) in Exon 4 von *FTSJ1* gefunden. Bei dieser Basensubstitution handelt es sich um eine nichtsynonyme Substitution, bei der ein Kodon, spezifisch für eine bestimmte Aminosäure, durch ein Stopkodon ersetzt wird. Dadurch entsteht ein vorzeitiges Terminationskodon in Exon 4.

Die in Familie A3 gefundene Mutation zerstört durch die Deletion eines Nukleotids die Spleißdonorstelle in Intron 2. Dadurch wird eine kryptische Spleißstelle in Intron 2 aktiviert, was dazu führt, daß intronische Sequenz nicht Leseraster konform in die resultierende mutierte mRNA integriert wird. Als Resultat dieser Mutation entsteht in Exon 3 ebenfalls ein vorzeitiges Terminationskodon.

Bei beiden unterschiedlichen Mutationen konnte durch Northern Blot Analyse nachgewiesen werden, daß die mutierten *FTSJ1* Transkripte nicht stabil sind und durch NMD abgebaut werden. Das man auf dem Northern Blot von A3 keinen vollständigen Abbau der Transkripte sieht, liegt möglicherweise an einer anderen Degradationsgeschwindigkeit. Es ist aber auch möglich das auf Grund der Menge an RNA noch schwache Banden für *FTSJ1* detektierbar sind (s. Kapitel 3.2.3.8). Vorzeitige Stopkodons führen in der Regel zu einem Abbau des trunkierten Transkriptes durch NMD. 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 NMD Mechanismus degradiert werden (Hentze und Kulozik, 1999). Dies ist ein Schutzmechanismus der Zelle, um die Anhäufung von trunkierten und möglicherweise toxischen Proteinen zu vermeiden (s. a. Kapitel 3.2.3.9 und 3.2.3.11) (Frischmeyer und Dietz, 1999; Hentze und Kulozik, 1999). Für die

männlichen Träger der beschriebenen Mutationen bedeutet der Abbau der trunkierten *FTSJ1* ein Verlust des funktionellen *FTSJ1*-Genproduktes (*loss of function*), da sie nur eine Kopie dieses Gens auf dem X-Chromosom besitzen.

Viele der bisher in der Literatur beschriebenen Mutationen in Genen, die auf dem X-Chromosom lokalisiert sind und deren Fehlfunktionen zu geistiger Behinderung führen, resultieren in trunkierten Transkripten und konsequenterweise in einem Funktionsverlust des betroffenen Gens (Chelly et al., 1999). Dies gilt auch beispielsweise für Mutationen, die in den Genen *PAK3* und *DLG3* detektiert wurden (Bienvenu et al., 2000; Tarpey et al., 2004). *PAK3* (p21-aktivierende Kinase) gehört zur Familie der PAK-Gene, deren Proteine eine Verbindung sowohl zwischen den RHO-GTPasen und dem Aktinzytoskelett als auch zwischen den MAP-Kinasen herstellen. Für dieses Gen ist eine *Nonsense*-Mutation beschrieben worden, die wahrscheinlich zu einem Abbau des trunkierten Transkript führt (Allen et al., 1998). *DLG3* kodiert für das Synapsen-assoziierte Protein 102 (SAP102), das zur Familie der Membran-assoziierten Guanylat Kinasen gehört. Diese Proteine spielen eine wichtige Rolle in neuronalen Zellen, wie beispielsweise bei der gezielten Verteilung von Rezeptoren und Ionenkanälen (Fujita und Kurachi, 2000). In der kodierenden Sequenz für *DLG3* wurde sowohl eine *Nonsense*-Mutation, als auch eine Spleißstellenmutation, die letztendlich in einem vorzeitigen Stopkodon resultiert, identifiziert (Tarpey et al., 2004). Der Funktionsverlust dieser beiden, auf dem X-Chromosom liegenden Gene, wie auch der Funktionsverlust von *FTSJ1*, führt jeweils zu nicht-syndromaler, geistiger Behinderung.

4.2.2 Abweichende Proteinkonformation von *FTSJ1* in Familie MRX44

Einige Mitglieder der Familie MRX44 sind ebenfalls von nicht-syndromaler, geistiger Behinderung betroffen. Anhand einer Mutationsanalyse wurde das Gen *FTSJ1* auf Besonderheiten untersucht und es konnte folgendes festgestellt werden. Der Nukleotidaustausch des letzten 3' gelegenen Nukleotids in Exon 9 von *FTSJ1* führt bei allen erkrankten männlichen Mitgliedern und allen gesunden heterozygoten Konduktorinnen der Familie MRX44 zu einem Leseraster konformen Überspringen von Exon 9. Eine Mutation im Bereich der Exon und Intron Grenzen kann sich auf das Spleißverhalten des Spleißosoms auswirken

und zu einer veränderten mRNA führen, da die Nukleotide an diesen Grenzen hochkonserviert sind (Burge et al., 1999). Insgesamt führen annähernd 15% der Nukleotidaustausche, die eine genetisch Erkrankung verursachen, zu einem Spleißdefekt, der in einer veränderten mRNA resultiert (Krawczak et al., 1992).

Bei der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mutation der Familie MRX44 an der 3' Spleißstelle von Exon 9 liegt ein Austausch von Cytosin nach Adenosin vor. Diese Mutation zerstört die Erkennungsstelle für die Bindung von U1snRNP, eine Komponente des Spleißosoms.

Eine Erklärung für das Herausspleißen von Exon 9 wäre, daß die Veränderung der Spleißdonorstelle von Exon 9 dazu führt, daß das Exon als solches nicht mehr erkannt wird. Das würde dazu führen, daß dieses Exon als intronische Sequenz gelten würde. Dementsprechend binden die Komponenten, die für die Erkennung der Exon- und Intronübergänge zuständig sind, an der Spleißdonorstelle von Exon 8 und an der Spleißakzeptorstelle von Exon 10. Exon 9 wird dadurch mit der restlichen, intronischen Sequenz über Lariatbildung herausgespleißt. Es wird jedoch kein trunkiertes Transkript gebildet, denn dieses Herausspleißen geht Leseraster konform von statten. Dies konnte durch die Northern Blot Ergebnisse (s. Kapitel 3.2.3.6) bestätigt werden, da das Transkript ohne Exon 9 stabil zu sein scheint und nicht über NMD abgebaut wird.

Dennoch hat das Fehlen von Exon 9 in der mRNA bei der Translation entsprechende Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz von FTSJ1. Die durch das Exon 9 kodierten 28 Aminosäuren sind bei den Trägern der Mutation nicht in die Proteinsequenz integriert.

Das homologe Protein von FTSJ1 in *E. coli* (Ftsj/Rrmj) wurde bereits mittels Röntgenstrukturanalyse untersucht. Dabei konnte man feststellen, daß die katalytisch aktive, funktionelle Domäne aus alternierenden α -Helices und β -Faltblättern konstruiert ist, die eine Vertiefung für den Kofaktor S-Adenosyl-L-Methionin bilden. Mit Hilfe dieses Kofaktors wird im Falle von Ftsj in *E. coli* die 23S rRNA der 50S ribosomalen Untereinheit methyliert (Bugl et al., 2000).

Die *in silico* Analyse basierend auf einer Angleichung (*alignment*) der Ftsj und FTSJ1 Aminosäuresequenzen zeigte eine Übereinstimmung der Proteine für diese funktionelle Domäne von 35%. Auch wenn diese Konservierung nicht sehr hoch ist, sind alle S-Adenosyl-L-Methionin abhängigen Methyltransferasen bezüglich

der Konstruktion ihrer funktionellen Domänen aus alternierenden α -Helices und β -Faltblättern stark konserviert (Kagan und Clarke, 1994). Daher ist anzunehmen, daß die S-Adenosyl-Bindedomäne von FTSJ1 ebenfalls aus alternierenden α -Helices und β -Faltblättern besteht. Auf Grund der Sequenzhomologien kann man erwarten, daß die von Exon 9 kodierten Aminosäuren höchstwahrscheinlich das C-terminale Ende der funktionellen S-Adenosyl-L-Methionin Bindedomäne repräsentieren.

Unter der Annahme, daß ein solches mutiertes FTSJ1 Protein synthetisiert wird, bestünde die Möglichkeit, daß es eine veränderte Konformation hat und dadurch die Methyltransferasefunktion nicht oder wenigstens schlechter ausüben kann. Allerdings kann man auch nicht ausschließen, daß diese Konformationsänderung zu einem wesentlich aktiveren Protein führt. Des Weiteren kann diese mutationsbedingte Konformationsänderung aber auch zur Folge haben, daß das ursprüngliche Zielmolekül nicht mehr erkannt wird und eventuell ein anderes Zielmolekül methyliert werden könnte.

Ein erster Hinweis auf eine veränderte Proteinkonformation konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch Immunfluoreszenzexperimente erbracht werden. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigten, daß das transient überexprimierte Wildtyp FTSJ1 gleichmäßig im Zellkern und im Zytoplasma verteilt ist. Dem gegenüber ist das transient überexprimierte mutierte FTSJ1 (FTSJ1 Δ Exon9) vermehrt im Zytoplasma lokalisiert (s. Kapitel 3.2.3.6). Eine Änderung der zellulären Lokalisation kann ein Hinweis auf eine veränderte Proteinfunktion sein. So konnte beispielsweise schon für das *ATP7A* Gen, das für eine Kupfer abhängige ATPase kodiert, gezeigt werden, daß ein Leseraster konformes Herausspleißen eines Exons zu einer veränderten zellulären Lokalisation führt (Qi und Byers, 1998). Aus dieser veränderten zellulären Lokalisation war es ebenfalls möglich zu schlußfolgern, daß das Protein seine Funktion nicht mehr adäquat ausüben kann. Mutationen in *ATP7A* führen entweder zu Menkes-Syndrom oder zu Okzipitalhorn-Syndrom (Qi und Byers, 1998). Diese Erkrankungen werden verursacht durch eine Kupfertransportstörung, da auf Grund der mutationsbedingten Veränderung des ATP7A dessen Kupferbindungsregion in ihrer Funktionalität eingeschränkt ist. Menkes-Syndrom ist gegenüber dem Okzipitalhorn-Syndrom die schwerwiegendere Erkrankung.

Neben einer eingeschränkten oder veränderten Funktion kann es aber auch zu einem kompletten Verlust des Proteins kommen, obwohl eine stabile mRNA nachweisbar ist. Homozygote Mutationen z. B. im *SMN1* Gen (*Survival Motor Neuron Gene*) verursachen eine spinale Muskelatrophie. Ein Nukleotidaustausch in diesem Gen führt zur Zerstörung einer exonischen Spleißverstärkerstelle (*Exonic Splicing Enhancer*), die zum Herausspleißen eines Exons führt. In diesem Falle konnte gezeigt werden, daß das translatierte, mutierte Protein instabil ist und degradiert wird (Monani et al., 1999). Auch dies wäre im Falle von FTSJ1 möglich, kann aber nur mit einem spezifischen Antikörper auf Proteinebene überprüft werden.

Ob es im Falle von FTSJ1 Δ 9 zu einem Funktionsverlust, Funktionsgewinn oder aber zu einer Methylierung eines anderen Zielmoleküls kommt, läßt sich beim jetzigen Stand der Ergebnisse nicht eindeutig sagen. Eine Abweichung von der normalen Funktion ist aber auf Grund der erwarteten, umfangreichen strukturellen Veränderungen des Proteins höchstwahrscheinlich.

4.2.3 Mögliche Zielmoleküle, die von FTSJ1 methyliert werden könnten

FTSJ1 ist ein Mitglied der Familie der S-Adenosyl-L-Methionin (AdoMet) abhängigen Methyltransferasen. Wie bereits erwähnt wurde, haben alle Mitglieder dieser Familie eine charakteristische Methyltransferase-Bindedomäne, die aus alternierenden α -Helices und β -Faltblättern aufgebaut ist (Cheng und Roberts 2001). Darüber hinaus benutzen alle dieser Familie zugehörigen Methyltransferasen S-Adenosyl-L-Methionin (AdoMet) als Kofaktor (Cantoni, 1952). AdoMet abhängige Methyltransferasen sind an vielen unterschiedlichen biologischen Vorgängen beteiligt, wie beispielsweise an der Signaltransduktion (Djordjevic et al., 1999), Proteinreparatur (Ichikawa und Clarke, 1998), X-Inaktivierung (Riggs und Pfeifer, 1992), Imprinting (Shemer et al., 1996), Abschaltung von Genen (Bird et al., 1993) und an der Translation von Proteinen (Holmes, 1999). Die Übertragung der Methylgruppe auf das Zielmolekül findet durch eine Alkylierungsreaktion statt. Das AdoMet ist dabei an der Bindungsdomäne der jeweiligen Methyltransferase gebunden. Durch einen nukleophilen Angriff auf die Methylgruppe des AdoMet wird diese abgespalten und

auf das entsprechende Zielmolekül übertragen. Dabei entsteht als Nebenprodukt das S-Adenosylhomocystein (AdoHyc) (Coward et al., 1971 und Coward et al., 1977) (Abb.44).

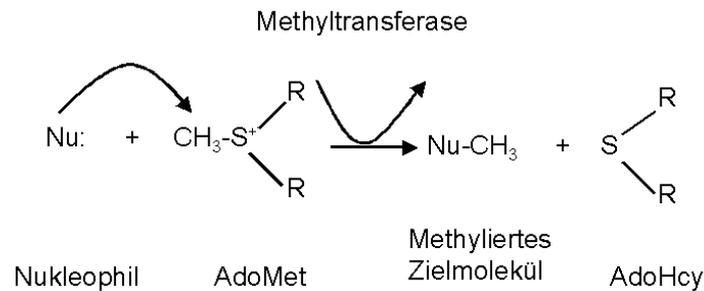


Abb.47: **Chemischer Vorgang bei der Methylierung mittels AdoMet als Kofaktor verschiedenster Methyltransferasen**

Ftsj, auch als Rrmj beschrieben, wurde als erstes in *E. coli* beschrieben (Ogura et al., 1991). Es ist Teil des *ftsJ-ftsH* Operons, das unter der Kontrolle eines Hitzeschockpromotors steht, der für eine verstärkte Transkription nach einer Temperaturerhöhung verantwortlich ist (Hager et al., 2002). Neben diesen Eigenschaften ist Ftsj eine AdoMet abhängige Methyltransferase, die spezifisch an Position 2552 der 23S rRNA ein 2'-O-Methyluridin erzeugt. Diese Methylierungsreaktion findet an der bereits gefalteten 23S rRNA statt, die innerhalb der 50S Untereinheit des Ribosoms lokalisiert ist. Sie ist essentiell für die Zusammensetzung der ribosomalen Untereinheiten und für die Stabilität des Ribosoms. Dadurch hat der Funktionsverlust von Ftsj auch einen erheblichen Einfluß auf das Wachstum der Bakterien. Ftsj Deletionsstämme wuchsen in der Tat erheblich schlechter als Wildtypstämme (Bugl et al., 2000).

Neben dem homologen Protein in *E. coli* existieren drei paraloge Proteine von FTSJ1 in *S. cerevisiae*, deren Zielmoleküle bereits publiziert sind (Kressler et al., 1999; Pintard et al., 2002a; Pintard et al., 2002b). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch unternommen, den Phänotyp der entsprechenden drei Hefe Deletionsstämme mit dem humanen FTSJ1 Protein zu komplementieren, um so das Zielmolekül von FTSJ1 zu ermitteln. Es konnte bereits für andere humane Gene gezeigt werden, daß die Homologie zum entsprechenden Hefe Gen ausreichend ist, um einen Deletionsphänotyp in der Hefe zu komplementieren

(Davey and Beach, 1995; Longo et al., 1997; Udell et al., 1998; Loewith et al., 2000). Diese funktionelle Redundanz läßt dann den Rückschluß zu, daß die gleichen Zielmoleküle sowohl von der Hefe Methyltransferase als auch von der humanen Methyltransferase methyliert werden können.

Eines dieser Gene von *S. cerevisiae* ist MRM2. Es methyliert an Position 2791 die 21S rRNA des mitochondrialen Ribosoms, und eine Deletion von MRM2 führt zu einer thermosensitiven Atmung und zu einem schnellen Verlust von mitochondrialer DNA (Pintard et al., 2002a). Dieser Deletionsstamm zeigt weiterhin eine Wachstumsverzögerung, die durch die Gabe von Glycerin als einziger Kohlenstoffquelle verstärkt werden kann. Glycerin wird in einem endothermen Prozeß durch die Glukoneogenese zu Glukose umgewandelt, der teilweise an den Mitochondrien stattfindet. Die Methylierung der 21S rRNA kann bei dem MRM2 Deletionsstamm nicht korrekt durchgeführt werden, was zu einer Beeinträchtigung des mitochondrialen Translationsapparates führt (Myers et al., 1985; Fearon und Mason, 1992). Dieses wiederum führt dazu, daß der *mrm2Δ* Stamm bei der ATP Synthese durch die Atmungskette beeinträchtigt ist. Dieser Effekt wird durch die Zugabe von Glycerin verstärkt, da die Zelle mehr Energie aufwenden muß, um Glycerin zu verstoffwechseln, als bei Glukose als Kohlenstoffquelle. Das bedeutet, daß sowohl die Glukoneogenese als auch die Energiegewinnung an sich durch die Atmungskette beeinträchtigt sind. Die Transformation des *mrm2Δ* Stammes mit dem humanen *FTSJ1* führte zu keiner signifikanten Verbesserung des Wachstumsverhaltens.

Bei einer phylogenetischen Einordnung von Mrm2p und anderen S-Adenosyl-L-Methionin abhängigen Methyltransferasen basierend auf ihrer Aminosäuresequenzen wird deutlich, daß Mrm2p die phylogenetisch am weitesten entfernte Methyltransferase der Hefe zu *FTSJ1* ist (Ching et al., 2002). Eine solche molekulare, phylogenetische Einordnung beruht auf der Annahme, daß die evolutive Distanz zweier Taxa mit deren genetischer Distanz korreliert (Li und Graur, 1991).

Dementsprechend war es nicht überraschend, daß das humane *FTSJ1* nicht die Funktion von Mrm2p übernehmen kann und demzufolge kein funktionelles Homolog ist. Die Ergebnisse der *Rescue* Versuche werden von den Ergebnissen der Immunfluoreszenz unterstützt, bei denen eine gleichmäßige Verteilung des

humanen FTSJ1 im Zytoplasma und im Zellkern vorlag (s. Kapitel 3.2.3.6). Hätte das humane FTSJ1 eine ähnliche Funktion wie Mrm2p, würde man jedoch eine verstärkte Lokalisation an den Mitochondrien erwarten.

Das zweite paraloge Gen zu *FTSJ1* ist *SPB1*. Spb1p ist involviert in die Methylierung der 60S ribosomalen Untereinheit (Kressler et al., 1999). Wie schon erwähnt, zeigten die Immunfluoreszenzergebnisse eine gleichmäßige Verteilung von FTSJ1 in allen Zellkompartimenten, mit Ausnahme der Nukleoli. Die Ribosomen Biogenese und ihre Methylierung durch Methyltransferasen findet jedoch in den Nukleoli statt (Tschochner und Hurt, 2003). Die Immunfluoreszenzexperimente zeigten jedoch keine Lokalisierung des humanen FTSJ1 innerhalb der Nukleoli (s. Kapitel 3.2.3.6). Deshalb war es relativ unwahrscheinlich, daß das humane FTSJ1 das funktionelle Homolog von Spb1p ist und den entsprechenden Deletionsphänotyp komplementieren kann. Die Komplementationsstudien waren nicht aussagekräftig genug, da der Deletionsstamm bereits ein vergleichbares Wachstum wie der Wildtypstamm zeigte. Darüber hinaus war eine Überprüfung der genetischen Situation des Deletionsstammes mit Hilfe von RT-PCR nicht möglich, da nur eine Kopie des *SPB1* deletiert ist, denn der homozygote Zustand ist letal. Es ist relativ wahrscheinlich, daß FTSJ1 auf Grund der zellulären Lokalisation kein funktionelles Homolog zu Spb1p ist. Dennoch kann man dies erst völlig ausschließen, wenn das von FTSJ1 methylierte Zielmolekül identifiziert ist.

Das dritte paraloge Gen zu *FTSJ1* ist *TRM7*. Trm7p ist eine tRNA Methyltransferase, welche die Antikodonschleife an Position 32 und 34 der tRNAs spezifisch für Leucin, Phenylalanin und Tryptophan methyliert (Pintard et al., 2002b). Immunfluoreszenzexperimente in der Hefe zeigten bereits, daß Trm7p im Zytoplasma lokalisiert ist (Pintard et al., 2002b). Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzexperimente, die mit dem humanen FTSJ1 durchgeführt wurden (s. Kapitel 3.2.3.6), ergaben sowohl eine zytoplasmatische Lokalisation als auch eine nukleare Lokalisation von FTSJ1. Demnach wäre es durchaus möglich, daß FTSJ1 das funktionelle Homolog von Trm7p ist.

Auch mit dem *trm7Δ* Stamm wurden *Rescue* Experimente durchgeführt. Diese führten jedoch zu keinem Ergebnis, da bereits der Deletionsstamm ebenfalls ein dem Wildtypstamm vergleichbares Wachstumsverhalten zeigte. Die Überprüfung

des *trm7Δ* Stammes mittels RT-PCR bezüglich seines genetischen Status haben ergeben, das TRM7 deletiert ist. Des Weiteren wurden RT-PCR Experimente durchgeführt um nachzuweisen, daß das humane *FTSJ1* in der Hefe exprimiert ist. Auch diese Ergebnisse waren positiv, so daß man zumindest davon ausgehen kann, daß ein *FTSJ1* Transkript hergestellt wird (s. Kapitel 3.2.3.12). Da jedoch kein Antikörper für das humane FTSJ1 verfügbar ist, war ein Nachweis auf Proteinebene bisher nicht möglich.

Nach Rücksprache mit Dr. Lapeyre (Centre de Recherche de Biochimie Macromoléculaire du CNRS, Montpellier, Frankreich) wurde ein neuer Stamm aus der Stammsammlung isoliert, welcher verglichen mit dem Wildtypstamm zumindest ein verzögertes Wachstum zeigte. Eine Wiederholung der *Rescue* Experimente zeigten, daß das humane FTSJ1 den TRM7 Deletionsphänotyp retten konnte. Demnach scheint das humane FTSJ1 ebenfalls eine tRNA Methyltransferase zu sein, und die Homologie zwischen dem humanen FTSJ1 und dem Trm7p der Hefe ist ausreichend um den Funktionsverlust von TRM7 bei dem entsprechenden Deletionsstamm zu komplementieren. Unterstützt werden diese *Rescue*-Ergebnisse durch die Ergebnisse der zellulären Lokalisation von FTSJ1, die dafür sprechen, daß FTSJ1 eine ähnliche Funktion wie TRM7 haben könnte und möglicherweise dessen funktionelles Homolog ist.

Homologe AdoMet abhängige Methyltransferasen sind neben *E. coli* und *S. cerevisiae* auch in *D. melanogaster* beschrieben worden. Bei der Analyse der von AdoMet abhängige Methyltransferasen verschiedenster Organismen konnte gezeigt werden, daß es in *D. melanogaster* zwei homologe Methyltransferasen zu Trm7p gibt, und je eine homologe Methyltransferase zu Mrm2p beziehungsweise zu Spb1p (Pintard et al., 2002 und Ching et al., 2002). Da *D. melanogaster* ein phylogenetisch jüngerer Organismus ist als *S. cerevisiae*, ist es durchaus möglich, daß neben FTSJ1 noch eine weitere Methyltransferase existiert, die in die phylogenetische Gruppe von TRM7 eingeordnet werden kann.

Neben FTSJ1 existieren noch die humanen Methyltransferasen FTSJ2 und FTSJ3 (Accession Nr. BC017106 und Accession Nr. BC036710). Durch einen Vergleich der Aminosäuresequenz läßt sich FTSJ3 in die phylogenetische Gruppe von SPB1 einordnen, während FTSJ2 eine eigene Untergruppe mit homologen AdoMet abhängigen Methyltransferasen aus *C. elegans* und *D. melanogaster* bildet (Ching

et al., 2002). Wenn eine vierte humane AdoMet abhängige Methyltransferase existiert, wie das für *D. melanogaster* gezeigt werden konnte, so ist sie bisher noch nicht beschrieben worden. Wäre dies der Fall, dann könnte diese vierte AdoMet abhängige Methyltransferase möglicherweise den Funktionsverlust von FTSJ1 teilweise ausgleichen.

4.2.4 Zusammenfassung und Ausblick für FTSJ1

Die molekularbiologischen Untersuchungen der drei unterschiedlichen Mutationen in *FTSJ1* bei drei verschiedenen Familien haben gezeigt, daß bei Familie P48 und Familie A3 ein Funktionsverlust von FTSJ1 vorliegt. Bei der dritten Mutation ist eine eindeutige Aussage wesentlich schwieriger, da ein stabiles Transkript hergestellt wird, bei dem das Exon 9 Leseraster konform herausgespleißt wurde. Dem entsprechend ist zu erwarten, daß dies zu Konsequenzen bei der Faltung des nativen Proteins führt. Ob dieses Protein letztendlich stabil ist, bleibt unklar. Möglicherweise ist die Funktion verändert oder aber es kommt auch zu einem Funktionsverlust. Befürwortet wird letzteres Szenario wegen der übereinstimmenden, phänotypischen Eigenschaften der Patienten in allen drei Familien.

Die grundlegende Frage ist allerdings, wie es zu nicht-syndromaler geistiger Behinderung ohne weitere pathologische Merkmale kommen kann, da *FTSJ1* ubiquitär exprimiert wird und wahrscheinlich eine fundamentale Rolle bei der Translation spielt. Die Analysen der Deletionstämme für die entsprechenden paralogen Hefegenen zeigten, daß alle ein vermindertes Wachstum aufwiesen (Kressler et al., 1999, Pintard et al., 2002a, Pintard et al., 2002b). Wie oben schon erwähnt wurde, ist es eher unwahrscheinlich daß die mitochondriale 21S rRNA das Zielmolekül von FTSJ1 ist. Es könnte sein, daß FTSJ1 durch seine Methylierungsfunktion an der Biogenese der Ribosomen beteiligt ist. Wenn ein Funktionsverlust eines solchen Gens vorliegen würde, würde man allerdings erwarten, daß die Patienten wesentlich gravierendere, gesundheitliche Probleme aufweisen oder aber dieser Funktionsverlust nicht mit dem Leben vereinbar ist. Die Ribosomen sind komplexe Ribonukleoproteine an denen die Translation sämtlicher zellulären Proteine stattfindet. Eine Mutation, die dazu führt, daß keine

funktionsfähigen Ribosomen gebildet werden, ist normalerweise letal, wie in der Hefe für homozygote Deletionen von *SPB1* gezeigt werden konnte (Kressler et al., 1999).

Im Falle von *FTSJ1* führen zwei der Mutation in *FTSJ1* höchstwahrscheinlich zu einem kompletten Funktionsverlust, was dagegen spricht, das *FTSJ1* an der Zusammensetzung funktioneller Ribosomen beteiligt ist.

Es ist wesentlich wahrscheinlicher, daß *FTSJ1* eine tRNA Methyltransferase ist. Diese Annahme konnte auch durch die *Rescue*-Versuche mit den *trm7Δ* Stämmen untestützt werden. Wenn noch ein weiteres humanes Homolog zu *FTSJ1* existiert (neben *FTSJ2* und *FTSJ3*), wie es für *D. melanogaster* gezeigt werden konnte (Ching et al., 2002), wird vielleicht von diesem Protein der Funktionsverlust von *FTSJ1* teilweise kompensiert. Ein geringer Unterschied in der Metylierungsfunktion könnte zu einer geringfügigen Änderung der Translationseffizienz führen, die wiederum sich hauptsächlich im ZNS und im Gehirn auswirkt. Neuronale Zellen reagieren oftmals sensibler als andere Zellen des Körpers auf geringfügige Veränderungen der Expression verschiedener Proteine.

Ein Protein, das im ganzen Organismus exprimiert ist und in allen Organen eine Funktion ausübt, aber nur einen ZNS und gehirnspezifischen Phänotyp verursacht, ist beispielsweise das MeCP2. Mutationen in *MECP2* sind die Hauptursache für das Rett-Syndrom (s.a. Kapitel 4.1). Eine genauere Analyse der Expression in verschiedenen Entwicklungsstadien von Mensch und Maus hat gezeigt, daß MeCP2 erst ab einem bestimmten Reifezustand der Neuronen in reichlichen Mengen vorhanden ist (Shahbazian et al., 2002). MeCP2 ist in allen Geweben exprimiert, aber die verstärkte Expression in Nervenzellen ab einem bestimmten Entwicklungszustand impliziert eine besondere regulatorische Rolle von MeCP2 in diesen Zellen. Ähnliches wäre auch für *FTSJ1* denkbar. Darüber hinaus wäre es auch möglich, daß *FTSJ1* durch gewebespezifische Regulationsfaktoren post-transkriptionell reguliert wird. Dem entsprechend wäre eine Untersuchung der Verteilung des *FTSJ1* Proteins sinnvoll. Möglicherweise ergibt sich daraus ein Hinweis auf eine verstärkte Expression in neuronalen Geweben und vielleicht ist auch die Expression von *FTSJ1* in unterschiedlichen Entwicklungsstadien abweichend.

Eine genaue Quantifizierung des *Rescue*-Effektes von FTSJ1 im *trm7Δ* Stamm mittels FACS-Analyse wäre ebenfalls sinnvoll.

Um die tRNA als Zielmolekül zu bestätigen, daß durch FTSJ1 methyliert wird, müßte man mit den für Trm7p spezifischen tRNAs *in vitro* Methylierungsuntersuchungen durchführen, bei denen der Einbau radioaktiv markierter Methylgruppen nachgewiesen wird (Jiang et al., 1997).

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

4.3.1 Mutationen in *PQBP1* und ihre Auswirkungen auf Transkriptionsebene

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei unterschiedliche Mutationen von *PQBP1* in fünf verschiedenen Familien identifiziert. Alle Mutation sind in einer kurzen *Repeat* Region in Exon 4 lokalisiert. Es handelt sich bei diesen Mutationen um eine Insertion von zwei Nukleotiden bei den Trägern der Mutation in Familie N9 sowie in Familie SHS (MRXS3), eine Deletion von zwei Nukleotiden bei den Trägern der Mutation in Familie N40 und eine Deletion von vier Nukleotiden bei den Trägern der Mutation in den Familien N45 und MRX55 (s.Kapitel 3.2.4.1). Alle diese Mutationen führen zu einer Verschiebung des Leseraster und resultieren in Mutationstyp spezifischen, vorzeitigen Stopkodons. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die überwiegende Anzahl der trunkierten Transkripte durch NMD abgebaut werden (s. Kapitel 3.2.4.4). Eine Ausnahme bildet die Transkriptvariante 9 und wahrscheinlich auch die Transkriptvariante 10. Bei der Transkriptvariante 9 werden Intron 4 und Intron 5 nicht herausgespleißt, sondern in die reife mRNA integriert. Die Transkriptvariante 10 beinhaltet nur Intron 5. Durch entsprechende Northern Blot Experimente mit einer cDNA Probe, die an Intron 4, Exon 5 und Intron 5 bindet, war es möglich, eine spezifische Bande der erwarteten Größe repräsentativ für das *PQBP1* Transkript zu detektieren (s. Kapitel 3.2.4.4). Eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Transkriptvarianten war mittels Northern Blot nicht möglich, da die Hybridisierung

von Proben, die spezifisch an Intron 4 beziehungsweise Intron 5 binden, auf Grund der geringen Größe der Proben nicht durchführbar war. Somit ist es nicht möglich zu entscheiden, ob beide Varianten oder nur die Transkriptvariante 9 stabil exprimiert werden. Alle übrigen trunkierten *PQBP1* Transkriptvarianten werden über NMD abgebaut (s. Kapitel 3.2.4.4), mit Ausnahme der Transkriptvariante 11, die kein Exon 4 und somit auch keine Mutation enthalten kann.

An Hand dieser Ergebnisse konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß kein kompletter Funktionsverlust aller *PQBP1* Transkriptvarianten vorliegt. Höchstwahrscheinlich werden die von Transkriptvariante 9 und 11 und möglicherweise auch die von Transkriptvariante 10 kodierten *PQBP1* Proteinvarianten in den Patienten hergestellt.

4.3.2 C-terminal trunkierte *PQBP1* Proteinvarianten

Die Hauptisoform von *PQBP1* wird von der überwiegenden Anzahl von Transkriptvarianten kodiert und besteht aus vier charakteristischen funktionellen Domänen (Iwamoto et al., 2000). Ausgehend vom N-terminalen Ende des Proteins kommt zuerst die WW-Domäne. WW Domänen bestehen aus 35-40 Aminosäuren mit zwei hochkonservierten Tryptophanen und binden an Peptide mit der Konsensussequenz PPXY (Chen und Sudol, 1995). Es konnte gezeigt werden, daß die WW Domäne von *PQBP1* in der Lage ist, die Transkription durch eine Bindung an Promotoren zu aktivieren, wenn zuvor eine Aktivierung von *PQBP1* durch Bindung mit einem entsprechenden, zur Zeit noch nicht identifizierten Interaktionspartner stattfindet (Komuro et al., 1999a). Ein möglicher Interaktionspartner könnte die RNA Polymerase II (RNA Pol II) sein, für die bereits gezeigt werden konnte, daß sie an die WW Domäne verschiedener anderer Proteine bindet (Gavva et al., 1997; Komuro et al., 1999b). Infolgedessen könnte *PQBP1* ein Gen-spezifischer Transkriptionsfaktor sein, der an der Initiation der Transkription bestimmter Gene, und dadurch an der Kontrolle der Genexpression, beteiligt ist. Die Kontrolle der Genexpression findet auf unterschiedlichen Stufen, angefangen von der Organisation des Chromatins auf genomischer Ebene bis zur letztendlichen Kontrolle der Proteinaktivität und -stabilität, statt (Villard, 2004).

Eine bedeutende Stellung nimmt bei diesen Kontrollmechanismen die Kontrolle der Initiation der Genexpression ein (Mitchell et al., 1989). So verursachen beispielsweise Mutationen im *POU Domain Class 1 Transcription Factor* (*POU1F1*), der als Transkriptionsaktivator agiert, geistige Behinderung und einen Hypophysen-Hormon-Mangel. *POU1F1* hat, wie *PQBP1*, unterschiedliche Funktionen, was dazu führt, daß verschiedene Mutationen in *POU1F1* zu einer Variabilität des pathologischen Phänotyps führt. Das mutierte *POU1F1* bindet in der Promotorregion der Zielgene, kann aber deren Transkription nicht aktivieren. Darüber hinaus verhindert die Bindung des mutierten *POU1F1* die Bindung des Wildtyp *POU1F1* (Andersen und Rosenfeld, 1994; Radovick et al., 1992). Ein vergleichbarer Effekt wäre für die mutierten *PQBP1* Proteine denkbar, die aus den beiden stabilen, nicht von dem Abbau durch NMD betroffenen Varianten resultieren, da sie alle noch die WW Domäne enthalten. Wenn diese Domäne trotz der zu erwartenden Konformationsänderungen, die durch die mutationsbedingten Veränderungen der Aminosäuresequenzen der C-terminalen Ende der Proteine verursacht werden können, noch zusammen mit der RNA Pol II an die Promotorregion von Zielgenen binden kann, bestünde die Möglichkeit, daß die Transkription spezifischer Zielgene nicht mehr aktiviert werden kann. Die Konformationsänderung des Proteins kann aber andererseits auch dazu führen, daß *PQBP1* nicht mit der RNA Pol II interagieren kann. Auch dies würde die Aktivierung der Transkription entsprechender Zielgene verhindern.

Die zweite Domäne von *PQBP1*, C-terminal von der WW Domäne lokalisiert, ist ein Bereich aus konservierten, alternierenden, sauren und basischen Aminosäuren, in dem ebenfalls der sogenannte *DR/ER Repeat* lokalisiert ist. Diese Domäne ist einzigartig für *PQBP1*, und es wurden verschiedene Interaktionspartner beschrieben, die an diese Domäne binden. So konnte beispielsweise gezeigt werden, daß der Polyglutaminabschnitt von *POU3F2*, auch *Brn-2* genannt, an den *DR/ER Repeat* von *PQBP1* bindet (Waragai et al., 1999). *POU3F2* ist ein neuronaler Transkriptionsfaktor, dessen Aktivität die Myelinisierung von Schwann'schen Zellen vermittelt (Jeagle et al., 2003). Des weiteren bindet *PQBP1* über den *DR/ER Repeat* an die Polyglutaminabschnitte von *Ataxin-1* (Okazawa et al., 2002) und *Huntingtin* (Waragai et al., 1999). Ebenso wurde in diesen Veröffentlichungen beschrieben, daß die Bindungsaffinität positiv mit einer Expansion des Polyglutaminabschnittes korreliert. Die Mutationen,

welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit bei den Indexpatienten verschiedener Familien identifiziert wurden, liegen alle in dem kodierenden Bereich für den DR/ER *Repeat*. Dennoch betrifft die mutationsbedingte Leserasterverschiebung bei allen untersuchten Patienten nicht die Aminosäuren, die den DR/ER *Repeat* repräsentieren, sondern führt zu einer Veränderung der C-terminalen Aminosäuren nach diesem *Repeat*. Trotzdem kann man nicht ausschließen, daß die allgemein zu erwartende Konformationsänderung der mutierten Proteine die Interaktion dieser Domäne mit den oben beschriebenen Proteinen negativ beeinflusst beziehungsweise verhindert. Ob die Mutationen letztendlich die Interaktion mit den polyglutaminhaltigen Interaktionspartnern negativ beeinflussen, wurde durch Koimmunpräzipitation von PQBP1 und POU3F2 überprüft (s. Kapitel 4.3.3) und konnte entgegen der Literatur (Waragai et al., 1999) nicht bestätigt werden.

Der nächste, C-terminal vom DR/ER *Repeat* lokalisierte Abschnitt ist ein vorausgesagtes Kernlokalisationsignal (NLS: *Nuclear Localisation Signal*). Bei allen in der vorliegenden Arbeit identifizierten Mutationen ist dieses NLS durch die Änderung der Aminosäuresequenz zerstört. Aus diesem Grunde lokalisierten alle trunkierten Proteine, die mittels Immunfluoreszenz untersucht worden sind, sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma. Dem gegenüber war bei dem Wildtyp PQBP1 eine fast ausschließliche Lokalisation im Zellkern detektiert worden (s. Kapitel 3.2.4.5). Daß trotzdem noch ein erheblicher Anteil der mutierten PQBP1 Proteine im Zellkern lokalisiert, liegt möglicherweise daran, daß der Interaktionspartner von PQBP1, das NpwBP, an dessen WW-Domäne bindet (Komuro et al., 1999). Wenn diese Interaktion trotz möglicher Konformationsänderung des Proteins stattfindet, dann könnten beide Proteine im Zellkern lokalisieren, da das NpwBP drei Kernlokalisations-signale trägt. Die übrigen mutierten PQBP1 Proteine, die im Zytoplasma verbleiben, interagierten womöglich zu diesem Zeitpunkt des Experiments nicht mit NpwBP.

Eine weitere Mutation in Exon 5, die ebenfalls zu einer Leserasterverschiebung führt (Lenski et al., 2004), wurde durch *in vitro* Mutagenese nachgebildet. Die durch die Mutation verursachte Leserasterverschiebung und Änderung der Aminosäuresequenz führt in diesem Fall nicht zu einer Zerstörung des vorhergesagten NLS. Die Untersuchung dieses mutierten Proteins zeigte, daß dieses wie das Wildtyp PQBP1, hauptsächlich im Zellkern lokalisiert ist (s. Kapitel

3.2.4.8). Durch dieses Experiment konnte bestätigt werden, daß es sich bei dieser Domäne tatsächlich um ein Kernlokalisierungssignal handelt.

Die letzte, C-terminale Domäne ist die sogenannte C₂ Domäne. Diese Domäne ist ebenfalls einzigartig für PQBP1 und steht in keinem funktionellen Zusammenhang mit bereits publizierten kalziumabhängigen C₂ Domänen, die Phospholipide binden (Nalefski und Falke, 1996). Die C₂ Domäne von PQBP1 interagiert mit U5-15kD. U5-15kD ist das humane Homolog zu Dim1p in *S. cerevisiae* (Waragai et al., 2000). Dim1p ist eine Dimethylase, die die rRNA der kleinen Untereinheit des Ribosoms methyliert. Ein *Knockout* dieses Gens verhindert die Prozessierung der prä-rRNA und die Zelle bleibt in der G₂-Phase arretiert (Berry und Gould, 1997). Das humane Homolog U5-15kD zu Dim1p ist durch die Isolation von Ribonukleotidpartikeln identifiziert worden und scheint deshalb ebenfalls in Spleißmechanismen involviert zu sein (Reuter et al., 1999). Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, das PQBP1 auf Grund dieser Interaktion an bestimmten Spleißvorgängen in der Zelle beteiligt ist. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten mutierten Protein besitzen alle keine C₂-Domäne mehr. Demnach liegt für diese Domäne ein fast vollständiger Funktionsverlust vor. Die einzige Proteinvariante die wahrscheinlich stabil ist und eine C₂-Domäne besitzt, wird von der Transkriptvariante 11 translatiert (s. Kapitel 3.2.4.2). Die Wildtyp PQBP1 Proteine, die von den Transkriptvarianten 9 und 10 kodiert werden besitzen diese C₂-Domäne ebenfalls nicht. Dies impliziert, daß auch diese Wildtyp PQBP1 Proteinvarianten möglicherweise eine abweichende Funktion von der PQBP1 Hauptproteinvariante ausüben.

4.3.3 Interaktion zwischen PQBP1 und POU3F2 (Brn2)

Wie schon im vorangegangenen Kapitel beschrieben wurde, bindet der Polyglutaminabschnitt von POU3F2 an den DR/ER *Repeat* von PQBP1 (Waragai et al., 1999). Die mutierten Proteinvarianten von PQBP1 besitzen alle noch die DR/ER *Repeat*-Domäne und verbleiben zu ca. 50% im Zytoplasma, wie mittels Immunfluoreszenz Experimente nachgewiesen werden konnte (s. Kapitel 3.2.4.5). Deshalb läßt sich die Hypothese aufstellen, daß möglicherweise ein Teil des POU3F2 durch das mutierte PQBP1 im Zellkern zurückgehalten wird.

Dadurch könnte es zu einer Einschränkung der Funktion von POU3F2 als neuronalem Transkriptionsfaktor kommen. POU3F2 und POU3F1 zeigen in den späten Vorläuferzellen und in den wachsenden Neuronen während der Entwicklung des Neokortex ein überlappendes Expressionsmuster. Ein *Knockout* dieser beiden Gene in der Maus führt zu einer abnormalen Bildung des Kortexes und zu Migrationsstörungen der Neuronen (Sugitani et al., 2002). Ein *Knockout* von POU3F2 führt zusätzlich noch zu einem Verlust von Neuronen im Nucleus supraopticus und im Nucleus paraventricularis (Nakai et al., 1995 und Schonemann et al., 1995). Der Neokortex macht ungefähr 85% der gesamten Gehirnmasse des Menschen aus und existiert nur bei Säugetieren. Er ist verantwortlich für höhere kognitive Fähigkeiten wie beispielsweise Sprache, Lernfähigkeit, Gedächtnis und komplexe Gedankengänge.

Eine Fehlentwicklung der Neuronen im Neokortex, die durch eine gestörte Interaktion zwischen PQBP1 und POU3F2 verursacht wird, wäre eine viel versprechende Hypothese, die die geistige Behinderung bei Patienten mit Mutationen in *PQBP1* erklären könnte. Allerdings konnte eine Interaktion zwischen beiden Proteinen weder durch Immunfluoreszenz noch durch Koimmunpräzipitation nachgewiesen werden (s. Kapitel 3.2.4.6 und Kapitel 3.2.4.7). Die bereits veröffentlichte Interaktion zwischen beiden Proteinen beruht darauf, daß bei *Yeast-two-Hybrid* Experimenten der isolierte Polyglutaminabschnitt von POU3F2 mit PQBP1 interagiert. Eine Koimmunpräzipitation mit beiden Proteinen war entgegen der Literatur nicht möglich (Waragai et al., 1999).

Es kann aber auch sein, daß in den verwendeten Zelllinien keine Interaktion stattfindet, die jedoch in Gehirnzellen *in vivo* vorhanden sein könnte. Zuletzt besteht natürlich auch immer die Möglichkeit, daß die Versuchsbedingungen nicht optimal waren und die Interaktion unter anderen Bedingungen nachweisbar wäre.

4.3.4 Unterschiedliche Mutationen in *PQBP1* führen zu nicht-syndromaler und syndromaler, X-chromosomal gekoppelter, geistiger Behinderung

Die Ergebnisse haben gezeigt, daß es bei den hier untersuchten Mutationen von *PQBP1* zu keinem vollständigen Funktionsverlust des Proteins kommt. Es konnte

nachgewiesen werden, daß eine, eventuell auch zwei, entstehende, mutierte Transkriptvarianten von *PQBP1* stabil sind. Dennoch führt die sich anschließende *in silico* Translation zu einem gegenüber der Wildtyp Variante veränderten Protein mit abweichendem C-terminalen Ende. Bislang konnte nicht geklärt werden, welche Konformationsänderungen auf Grund der veränderten Aminosäuresequenz entstehen und ob das einen Einfluß auf die übrigen funktionellen Domänen hat. Da allerdings schon die Wildtyp Varianten von *PQBP1* unterschiedliche C-terminale Enden besitzen, ist nicht auszuschließen, daß die beiden verbleibenden Varianten auch mit der Wildtyp Aminosäuresequenz eine andere Funktion als die Hauptvariante von *PQBP1* ausüben. Gegen einen Funktionsverlust aller *PQBP1* Proteinvarianten sprechen auch die verschiedenen, pathologischen Phänotypen der Patienten, die sowohl unterschiedliche als auch gleiche Mutationen in *PQBP1* aufweisen (s. Tabelle 31, Kapitel 3.2.4.1). Außerdem existieren zwei weitere Mutationen in *PQBP1*, bei denen es sehr unwahrscheinlich ist, daß es zu einem Abbau der mutierten Transkripte über den NMD Mechanismus kommt. Die eine Mutation ist die insC-Mutation, die zwar zu einer Leserasterverschiebung führt, aber in einem vorzeitigen Stopkodon im letzten kodierenden Exon resultiert (Lenski et al., 2004). Dadurch ist nicht zu erwarten, daß das trunkierte Transkript über NMD abgebaut wird. Die zweite Mutation ist ein Nukleotidaustausch der zu einem Aminosäureaustausch an Position 65 der *PQBP1* Hauptproteinvariante führt. Durch diesen Austausch kommt es zu einer Veränderung des stark konservierten PPXY-Motivs der WW-Domäne (Abidi et al., 2004 Poster Nr. 2611 bei der ASHG Konferenz in Toronto, Kanada). Beide Patienten zeigen neben phänotypischer Varianz dieselben pathologischen Merkmale wie geistige Behinderung und Mikrozephalie, wie die übrigen Patienten mit Mutationen in *PQBP1*. Diese Übereinstimmung des Phänotyps bei den unterschiedlichen Patienten legt nahe, daß es sich nicht um einen Funktionsverlust von *PQBP1* handeln kann.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß *Knockdown* Mäuse, bei denen *Pqbp1* mittels RNAi vollständig ausgeschaltet wurde, nicht entwicklungsfähig waren (Dr. Walther, unpublizierte Ergebnisse). Allerdings sind bei der Maus bisher nur zwei Transkriptvarianten beschrieben, welche sich in ihrer 5' nichttranslatierten Region unterscheiden. Für die beiden humanen Transkriptvarianten, welche trotz ihrer Mutationen höchstwahrscheinlich stabil sind, sind bis jetzt keine homologen

Transkriptvarianten in der Maus bekannt. Dadurch, daß ein vollständiger Funktionsverlust von *Pqbp1* in der Maus zu keinen überlebensfähigen Nachkommen führt, ist es sehr wahrscheinlich, daß die beiden oder wenigstens eine der beiden, trotz Mutation stabilen humanen Transkriptvarianten in eine mutierte Proteinvariante translatiert wird. Höchstwahrscheinlich können diese humanen mutierten Proteinvarianten immer noch eine oder mehrere überlebenswichtige Funktionen ausüben und teilweise den Verlust der übrigen PQBP1 Proteinvarianten kompensieren.

Den zwei Transkriptvarianten in der Maus stehen elf unterschiedliche humane Transkriptvarianten für *PQBP1* gegenüber. Offensichtlich ist es im Laufe der Evolution zu einer Veränderung des *PQBP1* Gens gekommen. Bestätigt wird dies durch die Tatsache, daß für den Chimpanzen bisher drei verschiedene Transkriptvarianten im *Human Genome Browser* beschrieben worden sind (Accession Nr. NM_005710; NM_144494 und NM_144495). Genau wie bei dem humanen *PQBP1* gibt es dort eine Variante, bei der die Exons 4 bis 6 inklusive intronischer Sequenzen zusammengespleißt werden (Accession Nr. NM_144494), diese entspricht der humanen Transkriptvariante, die basierend auf den Northern Blot Resultaten bei den Patienten mit Mutationen in PQBP1 stabil ist.

Generell läßt sich zum jetzigen Zeitpunkt keine Aussage darüber treffen, ob die einzelnen humanen Proteinvarianten, die durch die elf verschiedenen Transkriptvarianten kodiert werden, unterschiedliche Funktionen ausüben. Da sie aber teilweise abweichende C-terminale Enden besitzen, wäre dies durchaus möglich. Darüber hinaus wäre es denkbar, daß die eine oder andere Proteinvariante einen besonderen Einfluß auf die Entwicklung von kognitiven Fähigkeiten hat. Darüber hinaus könnte das Vorhandensein der Transkriptvariante NM_144494 im Chimpanzen ein Hinweis darauf sein, daß möglicherweise diese Transkriptvariante, die bis jetzt nur im Chimpanzen und im Menschen nachgewiesen worden ist, eine Rolle bei der Entwicklung von kognitiven Fähigkeiten spielt.

Bei den Trägern der Mutationen in *PQBP1* kommt es zu keinem vollständigen Funktionsverlust, aber es kommt zu einem Funktionsverlust der Transkriptvarianten, die für die Hauptproteinvariante von PQBP1 kodieren.

Bei dem jetzigen Stand der Ergebnisse ist es nicht möglich, auf Grund der Mutation und den daraus *in silico* resultierenden, trunkierten PQBP1 Proteinen generell einen Rückschluß auf den pathologischen Phänotyp zu ziehen.

4.3.5 Zusammenfassung und Ausblick für PQBP1

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei unterschiedliche Mutationen in *PQBP1* in fünf verschiedenen Familien identifiziert. Alle männlichen Träger der Mutation zeigen neben anderen pathologischen Merkmalen eine geistige Behinderung. Es konnte gezeigt werden, daß alle Transkriptvarianten von PQBP1, abgesehen von Transkriptvariante 9 und wahrscheinlich auch 10, über NMD abgebaut werden. Es wurde zwar nicht experimentell bestätigt, aber die Transkriptvariante 11, ohne Exon 4, sollte ebenfalls bei den Patienten stabil sein und translatiert werden. Für die übrigen Transkriptvarianten liegt ein Funktionsverlust vor, was dazu führt, daß die Hauptproteinvariante von PQBP1 bei den Patienten nicht mehr hergestellt wird. Die verbleibende Proteinvariante, die durch Translation der mutierten Transkriptvarianten 9 und 10 entsteht, fehlt die C₂-Domäne, die für die Interaktion mit U5-15kD wichtig ist und wahrscheinlich eine Rolle beim Spleißen spezifischer mRNA spielt (Waragai et al., 2000)

Dennoch kann man nicht schlußfolgern, daß der pathologische Phänotyp der Patienten lediglich durch den Verlust dieser Domäne zustande kommt. Vielmehr ist zu erwarten, daß sich die Proteinkonformation auf Grund der abweichenden C-terminalen Aminosäuresequenz und dem vorzeitigen Stopkodon ändert. Beim derzeitigen Stand der Ergebnisse läßt sich deshalb nicht sagen, ob spezifische Interaktionen gestört sind. Allerdings kann man vermuten, daß immer noch funktionelles PQBP1 in den Patienten synthetisiert wird, da ein vollständiger *Knockout* von *Pqbp1* in Mäusen letal ist. Transgene Mäuse hingegen, welche das humane PQBP1 überexprimieren, zeigen einen neuronalen Phänotyp, der sich allerdings erst ab einem Alter von 22 Monaten entwickelt. Es kommt bei diesen Mäusen zu einer Reduktion der Neuronen im anterioren Horn und im Cerebellum (Okuda et al., 2003). Diese Ergebnisse stützen die Annahme, daß eine korrekte PQBP1 Funktion von besonderer Bedeutung für neuronale Zellen ist,

insbesondere, da sonst keine anderen phänotypischen Auffälligkeiten vorhanden sind.

Um ein besseres Verständnis der Pathogenese der Patienten mit Mutationen in *PQBP1* und für die generelle Funktion von PQBP1 zu erlangen, müßten Interaktionsstudien mit den mutierten Proteinen beispielsweise in Form von Koimmunpräzipitationen durchgeführt werden. An Hand dieser Studien könnte man feststellen, ob bei den verschiedenen, mutierten Proteinen eine Interaktion mit dem einen oder anderen Partner gestört ist. Darüber hinaus könnte man *Yeast Two Hybrid* Experimente durchführen, um weitere Interaktionspartner zu identifizieren. Da sich *Knockout* Mäuse als letal erwiesen haben, wäre es sinnvoll, transgene Mäuse herzustellen, die anstatt des murinen *Pqbp1* die Haupttranskriptvariante des mutierte humane PQBP1 exprimieren. Möglicherweise führt diese Überexpression zu pathologischen Interaktionen mit anderen Proteinen, die Rückschlüsse auf die Pathogenese beim Menschen zulassen.

Aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchung konnte nachgewiesen werden, daß Mutationen in *PQBP1* X-chromosomal vererbte geistige Behinderung verursachen. Welche biologischen Prozesse durch eine mutierte Form von PQBP1 gestört oder verändert sind, muß noch geklärt werden.