

**Identifizierung, molekulare Analyse und
funktionelle Charakterisierung von
Genen, die an neuronaler Entwicklung und
geistiger Behinderung beteiligt sind**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Kristine Karla Freude
aus Berlin

April 2005

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Hans-Hilger Ropers
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Horst Kreß

Disputation am 24. August 2005

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| INHALTSVERZEICHNIS | 1 |
| 1 EINLEITUNG | 6 |
| 1.1 Identifizierung von menschlichen Krankheitsgenen | 6 |
| 1.2 Identifizierung von Kandidatengenem für monogene Erkrankungen mittels Kopplungsanalysen | 9 |
| 1.3 Pathologische Mutationen | 11 |
| 1.4 Geistige Behinderung | 16 |
| 1.5 Syndromale und nicht-syndromale geistige Behinderung | 18 |
| 1.6 X-chromosomal vererbte geistige Behinderung (XLMR) | 20 |
| 1.7 Identifizierung neuer Gene assoziiert mit nicht-syndromaler XLMR (NS-MRX) | 29 |
| 1.8 Identifizierung von Kandidatengenem für monogene Erkrankungen mittels zytogenetischer Methoden | 32 |
| 1.9 Ziel dieser Arbeit | 35 |
| 2 MATERIAL UND METHODEN | 37 |
| 2.1 Material | 37 |
| 2.1.1 Verwendete Chemikalien und Materialien | 37 |
| 2.1.2 Kits | 40 |
| 2.1.3 Medien | 41 |
| 2.1.4 Antikörper | 42 |
| 2.1.5 Puffer und Lösungen | 42 |
| 2.1.6 Zelllinien | 46 |
| 2.1.7 Vektoren | 46 |
| 2.1.8 Primer und DHPLC-Bedingungen für die Mutationsanalyse von <i>FTSJ1</i> und | |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| <i>PQBP1</i> | 47 | |
| 2.1.9 | Primer für Expressionsanalysen | 51 |
| 2.1.10 | Primer für X-Inaktivierungsstudien | 53 |
| 2.1.11 | Primer für <i>in vitro</i> Mutagenese | 53 |
| 2.1.12 | Primer zur Klonierung von <i>FTSJ1</i> , <i>PQBP1</i> und <i>POU3F2</i> in verschiedene Expressionsvektoren | 54 |
| 2.1.13 | Primer für die Bruchpunktklonierung | 56 |
| 2.1.14 | Datenbanken | 57 |
| 2.2 | Methoden | 59 |
| 2.2.1 | Molekularbiologische Standardmethoden | 59 |
| 2.2.2 | Polymerase-Kettenreaktion | 60 |
| 2.2.3 | Reverse-Transkription | 60 |
| 2.2.4 | Mutationanalyse mittels DHPLC | 61 |
| 2.2.5 | Analyse des X-Inaktivierungsstatus spezifischer Gene | 62 |
| 2.2.6 | Northern Blot | 63 |
| 2.2.7 | Southern Blot | 64 |
| 2.2.8 | Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH) | 64 |
| 2.2.9 | Bruchpunktklonierung | 65 |
| 2.2.10 | Sequenzierung | 66 |
| 2.2.11 | <i>In vitro</i> Mutagenese | 67 |
| 2.2.12 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 67 |
| 2.2.13 | Immunoblot (Western Blot) | 68 |
| 2.2.14 | Transfektion von eukaryotischen Zellen mit Plasmiden | 69 |
| 2.2.15 | Immunfluoreszenz | 70 |
| 2.2.16 | Zellysate für die Immunopräzipitation | 70 |
| 2.2.17 | Proteinbestimmung nach Bradford | 71 |
| 2.2.18 | Koimmunpräzipitation von Proteinen | 71 |
| 2.2.19 | Komplementationsstudien in <i>S. cerevisiae</i> | 72 |
| 3 | ERGEBNISSE | 75 |
| 3.1 | Identifizierung von <i>Netrin G1 (NTNG1)</i> als autosomales Kandidatengen für das Rett-Syndrom (RTT) | 75 |
| 3.1.1 | Patientin mit reziproker balancierter Translokation 46,XX,t(1;7)(p13.3;q31.3) und Rett Syndrom (RTT) | 75 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.1.2 | Physikalische Kartierung der Bruchpunkte auf den Chromosomen 1 und 7 | 77 |
| 3.1.2.1 | Chromosom 7 | 77 |
| 3.1.2.2 | Chromosom 1 | 79 |
| 3.1.3 | Eingrenzung des Bruchpunktbereiches auf Chromosom 1 durch Southern Blot Analyse | 81 |
| 3.1.4 | Klonierung der Bruchpunkte auf dem derivativen Chromosom 1 und dem derivativen Chromosom 7 | 84 |
| 3.1.5 | <i>In silico</i> Analyse der Bruchpunktregion mit dem <i>Netrin G1</i> Gen (<i>NTNG1</i>) | 89 |
| 3.1.6 | Expressionsstudien der beiden Transkriptvarianten von <i>NTNG1</i> | 91 |
| 3.1.7 | <i>In silico</i> Analyse von <i>NTNG1</i> Proteinen | 92 |
| 3.2 | Identifizierung und funktionelle Analyse von X-chromosomalen Genen, die eine Rolle bei geistiger Behinderung spielen | 94 |
| 3.2.1 | Auswahl einer Region auf dem X-Chromosom für eine Mutationsanalyse | 94 |
| 3.2.2 | Auswahl der Gene für die Mutationsanalyse | 95 |
| 3.2.3 | Das <i>FTSJ Homolog 1</i> (<i>FTSJ1</i>) Gen | 97 |
| 3.2.3.1 | Beschreibung der klinischen Merkmale der Indexpatienten und der weiteren betroffenen Familienmitglieder, bei denen Mutationen im <i>FTSJ1</i> Gen nachgewiesen worden sind | 97 |
| 3.2.3.2 | Darstellung der verschiedenen Mutationstypen in <i>FTSJ1</i> | 101 |
| 3.2.3.2.1 | Mutationsanalyse von <i>FTSJ1</i> bei Familie MRX44 | 102 |
| 3.2.3.2.2 | Mutationsanalyse von <i>FTSJ1</i> bei Familie P48 | 103 |
| 3.2.3.2.3 | Mutationsanalyse von <i>FTSJ1</i> bei Familie A3 | 104 |
| 3.2.3.3 | <i>In silico</i> Charakterisierung der <i>FTSJ1</i> Transkripte | 105 |
| 3.2.3.4 | <i>In silico</i> Charakterisierung des <i>FTSJ1</i> Proteins | 110 |
| 3.2.3.5 | Expressionsstudien von <i>FTSJ1</i> in humanen Geweben | 111 |
| 3.2.3.6 | Funktionelle Analyse der Mutation 655G→A bei Familie MRX44 | 113 |
| 3.2.3.7 | Funktionelle Analyse der Mutation 196C→T in Familie P48 | 120 |
| 3.2.3.8 | Funktionelle Analyse der Mutation IVS2+1delG in Familie A3 | 120 |
| 3.2.3.9 | Komplementationsstudien in <i>S. cerevisiae</i> zur Identifizierung des Zielmoleküls des humanen <i>FTSJ1</i> | 123 |
| 3.2.3.9.1 | Komplementationsstudien mit dem <i>mrm2Δ</i> Stamm | 124 |
| 3.2.3.9.2 | Komplementationsstudien mit dem <i>spb1Δ/spb1</i> Stamm | 127 |
| 3.2.3.9.3 | Komplementationsstudien mit dem <i>trm7Δ</i> Stamm | 129 |
| 3.2.4 | Das <i>Polyglutamin Bindeprotein 1</i> Gen (<i>PQBP1</i>) | 135 |
| 3.2.4.1 | Mutationen in <i>PQBP1</i> führen zu syndromaler und nicht-syndromaler geistiger Behinderung | 135 |
| 3.2.4.2 | <i>In silico</i> Analyse der humanen <i>PQBP1</i> Transkripte und der daraus resultierenden | |

| | | |
|------------|---|------------|
| Proteine | 139 | |
| 3.2.4.3 | Untersuchung des X-Inaktivierungsstatus von <i>PQBP1</i> | 142 |
| 3.2.4.4 | Expressionanalysen der mutierten <i>PQBP1</i> Transkripte | 144 |
| 3.2.4.5 | Zelluläre Lokalisation der mutierten <i>PQBP1</i> Proteine | 147 |
| 3.2.4.6 | Zelluläre Lokalisation von <i>PQBP1</i> und <i>POU3F2</i> (Brn2) | 150 |
| 3.2.4.7 | Koimmunpräzipitation von <i>PQBP1</i> und <i>POU3F2</i> | 152 |
| 3.2.4.8 | Zelluläre Lokalisation der <i>PQBP1</i> 641insC Mutante | 154 |
| 4 | DISKUSSION | 156 |
| 4.1 | <i>NTNG1</i> ein neues autosomales Kandidatengen für Rett Syndrom (RTT) | 156 |
| 4.1.1 | Eine Patientin mit RTT, die Trägerin einer balancierten reziproken Translokation t(1;7)(p13.3;q31.3) ist | 156 |
| 4.1.2 | Analyse des Bruchpunktbereiches auf Chromosom 1 | 157 |
| 4.1.3 | Analyse des Bruchpunktbereiches auf Chromosom 7 | 158 |
| 4.1.4 | Potentielle Funktionen der <i>NTNG1</i> Isoformen | 161 |
| 4.1.5 | Mögliche pathologische Auswirkungen einer gestörten <i>NTNG1</i> Expression | 164 |
| 4.1.6 | Zusammenfassung und Ausblick für <i>NTNG1</i> als Kandidatengen für RTT | 167 |
| 4.2 | Mutationen in <i>FTSJ1</i> führen zu nicht-syndromaler geistiger Behinderung | 169 |
| 4.2.1 | Funktionsverlust von <i>FTSJ1</i> in Familie P48 und Familie A3 | 169 |
| 4.2.2 | Abweichende Proteinkonformation von <i>FTSJ1</i> in Familie MRX44 | 170 |
| 4.2.3 | Mögliche Zielmoleküle, die von <i>FTSJ1</i> methyliert werden könnten | 173 |
| 4.2.4 | Zusammenfassung und Ausblick für <i>FTSJ1</i> | 178 |
| 4.3 | Mutationen in <i>PQBP1</i> führen zu nicht-syndromaler und spezifischer geistiger Behinderung | 180 |
| 4.3.1 | Mutationen in <i>PQBP1</i> und ihre Auswirkungen auf Transkriptionsebene | 180 |
| 4.3.2 | C-terminal trunkierte <i>PQBP1</i> Proteinvarianten | 181 |
| 4.3.3 | Interaktion zwischen <i>PQBP1</i> und <i>POU3F2</i> (Brn2) | 184 |
| 4.3.4 | Unterschiedliche Mutationen in <i>PQBP1</i> führen zu nicht-syndromaler und syndromaler, X-chromosomal gekoppelter, geistiger Behinderung | 185 |
| 4.3.5 | Zusammenfassung und Ausblick für <i>PQBP1</i> | 188 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG | 190 |

| | | |
|-----------|------------------------------|------------|
| 6 | SUMMARY | 194 |
| 7 | LITERATUR | 197 |
| 8 | ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 227 |
| 9 | PUBLIKATIONEN | 229 |
| 10 | LEBENS LAUF | 230 |
| 11 | DANKSAGUNG | 233 |
| 12 | ERKLÄRUNG | 234 |
| 13 | ANHANG | 235 |

1 Einleitung

Eines der Hauptanliegen der Humangenetik besteht darin, umfassende Informationen über Struktur und Funktion des Erbmaterials des Menschen zu sammeln. Mittlerweile ist durch die Arbeit des *Human Genome Project* das humane Genom nahezu vollständig kartiert, und die meisten exprimierten Sequenzen und bekannten Gene sind lokalisiert, wobei deren Funktionen größtenteils noch unbekannt beziehungsweise unzureichend erforscht sind. Deshalb wird in den folgenden Jahren der physikalischen Anordnung der Gene im menschlichen Genom eine Analyse der jeweiligen Genfunktionen folgen. Von besonderem Interesse sind hierbei Gene, die mit spezifischen Syndromen oder Krankheitsbildern assoziiert werden können. Durch die Identifizierung solcher krankheitsassoziiierter Gene kann man ein besseres Verständnis der molekularen und physiologischen Grundlagen von Krankheiten erhalten. Dadurch können sich neue oder verbesserte Möglichkeiten in der Diagnostik entwickeln, und langfristig könnte dies zu erfolgversprechenden Therapieansätzen für genetisch bedingte Erkrankungen führen.

1.1 Identifizierung von menschlichen Krankheitsgenen

Es wird vermutet, daß das menschliche Genom ungefähr 20.000 bis 25.000 protein-kodierende Gene umfaßt und nicht wie bisher angenommen 30.000 bis 40.000 (Human Genome Sequencing Consortium, 2004). Höchstwahrscheinlich werden nicht alle Gene mit Krankheitsbildern assoziierbar sein, da viele Gene eine zentrale Rolle während der Embryonalentwicklung spielen und ihr Funktionsverlust letal ist. Bei anderen Genen besteht die Möglichkeit der funktionellen Redundanz, so daß keine Veränderung des Phänotyps auftritt. Neben diesen protein-kodierenden Genen existiert vermutlich die doppelte Anzahl von „Genen“, welche für sogenannte *non-messenger* RNAs kodieren (Eddy, 2001). Diese RNAs werden nicht in Proteine translatiert, sondern agieren beispielsweise als regulatorische *antisense* RNAs und beeinflussen die Transkriptionseffizienz entsprechender *sense* mRNAs (Wutz et al., 1997). Sie können allerdings auch an die mRNA binden und posttranskriptionelle Ereignisse, wie beispielsweise Spleißen (Munroe

et al., 1991), RNA Transport (Okano et al., 1991) und die Stabilität von mRNA im Zytoplasma (Hildebrandt und Nellen 1992), beeinflussen. Mutationen in solchen *non-messenger* RNAs konnten z.B. bei Patienten mit spinozerebellarer Ataxie Typ 8 (*SCA8*) nachgewiesen werden. Vermutlich reguliert die *antisense* RNA die Expression des *KLHL1* (Kelch-like 1) Gens (Nemes et al., 2000), das als Aktin-bindendes Protein beschrieben worden ist (Kim et al., 1999).

Bei genetische verursachten Erkrankungen kann man grundsätzlich zwischen monogenen, polygenen, multifaktoriellen und chromosomalen Ursachen unterscheiden.

Monogene Erkrankungen werden durch Defekte in einem einzelnen Gen verursacht. Die häufigsten monogenen Erkrankungen sind die cystische Fibrose (CF) (Inzidenz: 1:2.000) und die Muskeldystrophie Typ Becker (BMD) und Duchenne (DMD) (Inzidenz: 1:3.500).

CF wird durch Mutationen im *CFTR* Gen (Cystic-Fibrosis-Transmembrane-Conductance Regulator) verursacht, das auf Chromosom 7q31.2 lokalisiert ist (Park et al., 1987). Liegt bei dieser progredienten Erkrankung das Protein in einer mutierten Form vor, kommt es zu einem gestörten Elektrolyt- und Wassertransport in der Zellmembran (Santis et al., 1990).

Die Muskeldystrophien vom Typ Becker und Duchenne werden X-chromosomal vererbt, so daß nur männliche Träger der Mutation erkranken. Als Muskeldystrophie bezeichnet man einen krankhaft fortschreitenden Schwund von Muskelgewebe. Die genetischen Ursachen beider Erkrankungen sind Mutationen im Dystrophin Gen. Dystrophin ist ein Eiweiß, welches wichtig für den Stoffwechsel der Muskeln wichtig ist.

Weitaus komplizierter ist die Situation bei polygenen Krankheiten, wie z.B. bei Alzheimer, Schizophrenie oder Diabetes Typ 1 und 2. Eine Phänotyp-Genotyp-Korrelation bei einer polygenen Erkrankung herzuleiten, ist wesentlich schwieriger als bei einer monogenen Krankheit.

Bei den multifaktoriellen Erkrankungen üben verschiedene Faktoren wie genetische Veranlagung, Umweltfaktoren und im Laufe des Lebens erworbene Veränderungen des genetischen Materials, einen Einfluß auf die Krankheitsentwicklung aus. Zu den multifaktoriell bedingten Erkrankungen zählen beispielsweise Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Krebs.

Darüber hinaus können genetisch bedingte Erkrankungen durch Chromosomenaberrationen, Störungen der Chromosomenzahl oder –struktur, verursacht werden.

Die nachfolgenden Kapitel und Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beschäftigen sich ausschließlich mit Kandidatengen für monogene Erkrankungen.

Generell gibt es zwei häufig verwendete Methoden zur Identifizierung von krankheitsassoziierten Kandidatengen. Das ist einerseits die funktionelle Klonierung und andererseits die positionelle Klonierung.

Bei der funktionellen Klonierung versucht man ein unbekanntes Krankheitsgen basierend auf seiner biochemischen Funktion zu identifizieren. Nach der Isolation des betreffenden Proteins kann man dieses sequenzieren und verschiedene Oligonukleotidkombinationen für die gering degenerierten Abschnitte der betreffenden Aminosäuresequenz synthetisieren. Mittels dieser Oligonukleotide können anschließend spezifische cDNA Klone aus entsprechenden Banken isoliert werden, mit denen man dann genomische Banken untersuchen kann. Eine andere Möglichkeit ist die Herstellung eines spezifischen Antikörpers (AK) gegen das isolierte Protein. Für diese Analyse werden verschiedene cDNA Klone aus entsprechenden Geweben in Expressionsvektoren kloniert, und der spezifische AK sollte dann das Protein, translatiert vom gesuchten cDNA Klon detektieren.

Bei der positionellen Klonierung ist lediglich die genomische Region bekannt, in der das krankheitsassoziierte Gen lokalisiert ist. Die Eingrenzung dieser genomischen Region kann auf verschiedene Arten durchgeführt werden.

Am häufigsten verwendet man Kopplungsanalysen, bei denen die Segregation von polymorphen Markern mit dem pathologischen Phänotyp analysiert werden (s. auch Kapitel 1.2). Andere Möglichkeiten der positionellen Klonierung stellen zytogenetische Analysen von chromosomale Anomalien wie Deletionen oder chromosomale Translokationen dar (s. auch Kapitel 1.8).

1.2 Identifizierung von Kandidatengenen für monogene Erkrankungen mittels Kopplungsanalysen

Eine Möglichkeit monogene Krankheitsursachen zu bestimmen ist die genetische Kartierung mittels Kopplungsanalyse in Familien mit einem oder mehreren betroffenen Patienten. Sie beruht darauf, daß man versucht herauszufinden, wie häufig zwei Loci durch die meiotische Rekombination voneinander getrennt werden. Diese Rekombinationshäufigkeit, auch als Rekombinationsfrequenz bezeichnet, legt den Abstand zwischen zwei Loci fest (gemessen in centiMorgan (cM)). Je näher zwei Gene beieinander liegen, desto seltener werden sie durch meiotische Rekombination voneinander getrennt (White and Lalouel, 1988). Diese Gene werden nicht rekombiniert, d. h. gekoppelt als sogenannter Haplotyp an die Nachkommen weitergegeben.

Für die Kopplungsanalysen von Familien mit Erbkrankheiten benötigt man sogenannte Marker, die sich über das gesamte Genom verteilen. Diese genetischen Marker sind mendelnde Merkmale und müssen einen hohen Grad an Polymorphismen aufweisen, damit eine zufällig ausgewählte Person heterozygot für diesen DNA Abschnitt ist. Das Gen mit dem spezifischen Defekt, das für die Erbkrankheit verantwortlich sein sollte, wird bei allen betroffenen Mitgliedern der Familie mit einem bestimmten Marker gekoppelt vererbt. Anfangs dienten zur Kartierung nur eingeschränkt brauchbare Marker, wie z. B. verschiedene Blutgruppenantigene, die allerdings nur in geringer Anzahl im Genom vorkommen. Dies änderte sich, nachdem Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLPs) als Marker eingesetzt wurden. Mit Hilfe dieser RFLPs war es erstmals möglich, eine genetische Karte des humanen Genoms zu erstellen (Donis-Keller et al., 1987). Allerdings hatten diese Marker nur einen geringen Informationsgehalt, da die meisten RFLPs oft nur zwei Allele aufweisen (Nakamura et al., 1987). Dasselbe Prinzip von Restriktionsverdau und Southern Blot, das bei der Kartierung mit RFLPs verwendet wurde, wurde auch bei der nächsten Generation von Markern verwendet, den VNTR-Markern (variable number of tandem repeats) (Nakamura et al., 1987). Diese Repeats setzen sich aus einer variablen Anzahl sich tandemartig wiederholender DNA-Sequenzen

zusammen. Sie sind zwar hoch polymorph aber hauptsächlich in Zentromer- und Telomerregionen lokalisiert, so daß sie in vielen Fällen nicht hilfreich waren (Vergnaud et al., 1989). Daraufhin verwendete man sogenannte Mikrosatelliten oder STR-Marker (Short Tandem Repeats). Es wurde festgestellt, daß diese repetitiven DNA-Sequenzen bei verschiedenen Individuen variabel sind und mittels PCR Analyse einfach nachweisbar sind (Tautz, 1989; Litt und Luty, 1989). Momentan sind sogenannte „Single Nucleotide Polymorphisms“ (SNPs) die Marker der Wahl, da sie sehr häufig sind, über das gesamte Genom verteilt vorkommen (Wang et al., 1998) und ebenfalls mittels PCR Analysen nachgewiesen werden können.

Kopplungsanalysen beruhen auf dem Prinzip, daß Geschwisterkinder oder andere Familienangehörige mit gleichen Phänotypen in der genomischen Region, in der ein „Krankheitsgen“ liegt, die gleiche, genetisch gekoppelte Rekombinationsvariante geerbt haben sollten. Somit bestände eine Kopplung zwischen dem Phänotyp und dieser genomischen Region. Die zugrunde liegende Annahme bei der Kopplungsanalyse ist, daß bei einem Crossing Over zwischen zwei Loci eine maximale Rekombinationsfrequenz von 50% vorliegt. Dies liegt daran, daß bei einem Crossing Over immer nur zwei der vier Chromatiden beteiligt sind. Außerdem ergibt sich auf Grund der freien Rekombinierbarkeit von Loci auf unterschiedlichen Chromosomen ebenfalls eine maximale Rekombinationsrate von 50%. Darüber hinaus hat man festgestellt, daß ein *Crossing Over* nicht mit gleicher Wahrscheinlichkeit an jeder Stelle im Genom zu erwarten ist. Stattdessen wurde beobachtet, daß es sogenannte *hot spots of recombination* gibt, in denen Rekombinationen gehäuft auftreten (Bryda et al. 1992). Außerdem finden Doppel-*Crossing Overs* wesentlich seltener statt als statistisch zu erwarten wäre, denn ein schon vorhandenes *Crossing Over* führt dazu, daß weitere *Crossing Overs* verhindert werden. Dieses Phänomen ist auch als Chiasma-Interferenz bekannt (Ott, 1991).

Deswegen verwendet man heutzutage die Zwei-Marker-Kartierung, bei der der sogenannte Lod-Wert das statistische Maß für die Kopplung zweier Genloci ist. Bei dieser Methode wird die Wahrscheinlichkeit, daß die beobachtete Segregation von genetischen Merkmalen in einer Familie auf freier Rekombination zwischen den beteiligten Loci beruht, mit der Wahrscheinlichkeit für die beobachtete Konstellation unter der Annahme verglichen, daß die relevanten Gene gekoppelt

sind. Der daraus resultierende Wahrscheinlichkeitsquotient (der „odds“ für die Kopplung) wird als dekadischer Logarithmus (Log of Odds: Lod) angegeben. Ein Lod-Wert kleiner als -2 schließt Kopplung zweier Loci aus, und ein Lod-Wert größer als +3 gilt als Beweis für Kopplung. Die Wahrscheinlichkeit, daß zwei X-chromosomale Loci gekoppelt sind, ist viel größer als für beliebige Loci unbekannter Lokalisation, weshalb ein Lod von +2 für ausreichend angesehen wird, um Kopplung zu beweisen. Mit dieser Methode kann man auch Kopplungsanalysen in Familien durchführen, bei denen keine 100%ige Penetranz des Phänotyps vorliegt, oder die Phase unklar ist, also die Zuordnung der Allele zu einzelnen Chromosomen oder Haplotypen. Darüber hinaus kann man die Ergebnisse verschiedener Familien zu einem Gesamt Lod-Wert kombinieren.

Neben der Zwei-Marker-Kartierung wird immer häufiger die Multimarker-Kartierung verwendet. Mit dieser Methode lassen sich Kopplungsanalysen effizienter durchführen, wenn man gleichzeitig die Daten von mehr als zwei Loci analysieren möchte. Darüber hinaus ist der Informationsgehalt einzelner Marker innerhalb einer Familie oftmals unterschiedlich. Die gleichzeitige Analyse der Marker relativiert dieses Ungleichgewicht. Der wichtigste Unterschied zur Zwei-Marker-Kartierung besteht darin, daß die Reihenfolge der Marker und ihre genetischen Abstände berücksichtigt werden müssen. Diese Kartierungen werden von speziellen Computerprogrammen analysiert.

Kopplungsanalysen mit mehreren Familien, deren betroffene Familienmitglieder einen ähnlichen Phänotyp aufweisen, sind geeignet, um die Lokalisierungsdaten eines krankheitsassoziierten Gens sicher einer genomischen Region zuzuordnen, bevor mit einer Mutationsanalyse des betroffenen Gens begonnen wird. Dies ist sinnvoll, wenn die einzelnen Familien zu klein sind und man davon ausgehen kann, daß es sich um Defekte desselben Gens handelt.

1.3 Pathologische Mutationen

Prinzipiell kann man drei verschiedene Mutationsarten unterscheiden, nämlich die Basensubstitution, bei der ein Nukleotid durch ein anderes ersetzt wird, die Deletion, bei der ein oder mehrere Nukleotide aus der Sequenz entfernt werden, und die Insertion, bei der ein oder mehrere zusätzliche Nukleotide in die Sequenz

eingefügt werden. Solche Sequenzveränderungen können exogene Ursachen haben, wie Mutagene (z.B. radioaktive Strahlung), aber auch endogene Ursachen, z.B. DNA-Replikationsfehler.

Bei einer Basensubstitution muß man zwischen einem kausativem und einem nicht kausativen Austausch von Nukleotiden unterscheiden. Ein kausativer Austausch führt zu einer veränderten Aminosäure des Genproduktes, während das Genprodukt bei einer nicht kausativen oder stillen Mutation unverändert bleibt. Grundlage für die Existenz von stillen Mutationen ist die Tatsache, daß der genetische Kode degeneriert ist, also eine Aminosäure von mehreren Tripletts kodiert wird. Allerdings betrifft dies nur die letzte Position des Tripletts, bei der eine genaue Basenpaarung des Antikodons mit der tRNA nicht notwendig ist. Dieses Prinzip bezeichnet man als sogenannte *Wobble Hypothese* (Crick, 1966). Die *Wobble Hypothese* erklärt gleichzeitig, warum es nicht 61 sondern nur 48 verschiedene Antikodons gibt (Alberts et al., 2002). Nukleotidaustausche an der dritten Position des Tripletts sind oft nicht kausative Austausche. Nukleotidaustausche an der ersten oder zweiten Stelle des Tripletts dahingegen führen häufig zu einer veränderten Aminosäure. Diese Veränderungen müssen nicht zwangsläufig pathologisch sein. Wird jedoch eine saure Aminosäure gegen eine basische Aminosäure ausgetauscht, oder eine negativ geladene Aminosäure gegen eine positiv geladene, so kann es zu einer Konformationsänderung beziehungsweise einer veränderten Bindungsaffinität des Proteins kommen, was letztendlich eine veränderte Proteinfunktion oder einen Funktionsverlust zur Folge haben kann (Bolhuis et al., 1993; Spacey et al., 2004,).

Darüber hinaus gibt es auch stille Mutationen, die bei verschiedenen Individuen einer Population auftreten und zu keiner Änderung einer Aminosäure führen. Nukleotidaustausche treten allerdings wesentlich häufiger in den nichtkodierenden Bereichen des Genoms, also in Introns und Pseudogenen auf. Darüber hinaus gibt es auch Nukleotidaustausche, die zu einer veränderten Aminosäure führen, welche jedoch die Funktion des Proteins nicht pathologisch beeinflusst. Diese nicht pathologischen Nukleotidaustausche werden unter dem Sammelbegriff Polymorphismen zusammengefaßt.

Des Weiteren sind verschiedene Substitutionsmutationen beschrieben worden, die Spleißdonor- oder Spleißakzeptorstellen zerstören. Prinzipiell können solche Formen der Mutation zwei Effekte verursachen. Eine Folge solcher Mutationen ist,

daß ein Exon beim Spleißen übersprungen wird. Diese Form von Mutation kann dazu führen, daß wichtige funktionelle Domänen des Proteins teilweise oder auch gänzlich fehlen. Aber auch wenn keine funktionellen Domänen zerstört sind, kann es zu einer Konformationsänderung des Proteins kommen, welche wiederum eine Veränderung der Funktion zur Folge haben kann. Dadurch können beispielsweise bestimmte Regionen des Proteins, die für spezifische Interaktionen mit anderen Proteinen wichtig sind, nicht mehr zugänglich sein. Die andere Möglichkeit besteht darin, daß ein Nukleotidaustausch an der Spleißakzeptor- oder Spleißdonorstelle zur Aktivierung einer kryptischen Spleißstelle im Intronbereich führt. Diese kryptischen Spleißstellen sind den konservierten Spleißstellen ähnlich, werden aber normalerweise nicht vom Spleißsystem benutzt. Durch die Aktivierung einer solchen kryptischen Spleißstelle kommt es zur Inkorporation von Teilen intronischer Sequenzen. Diese Art von Mutation kann drei unterschiedliche Folgen haben. Zum einen kann die Insertion der Intronsequenz dem Leseraster konform stattfinden, dann werden zusätzliche Aminosäuren in das resultierende Protein eingebaut. Diese Modifikation des resultierenden Proteins kann dadurch entweder toxisch sein, eine veränderte Interaktion mit anderen Proteinen zeigen, oder aber eine völlig neue Funktion aufweisen. Zum anderen besteht aber auch die Möglichkeit, daß die Modifikation an einer Stelle des Proteins auftritt, die keine Veränderung seiner Funktionalität hervorruft.

Eine weitere Möglichkeit einer Spleißstellenmutation besteht darin, daß das gesamte Intron wie eine exonische Sequenz abgelesen und komplett in die resultierende mRNA eingebaut wird. Auch hier ist es wichtig, ob es zu einer Leserasterverschiebung kommt und, wenn dies der Fall ist, an welcher Stelle das vorzeitige Stopkodon liegt. Wird das Intron dem Leseraster konform eingebaut, kann es wieder zur Veränderung von funktionellen Domänen kommen, beziehungsweise zu Konformationsänderungen des Proteins mit entsprechenden Funktionsverlusten oder Funktionsgewinnen (Strachan und Read, 1996).

Eine spezielle Form der Nukleotidsubstitution ist die sogenannte Nonsense-Mutation. Bei dieser Mutation wird ein Nukleotid so ausgetauscht, daß ein Stopkodon entsteht. Auf Grund dieses Stopkodons hört die Translation an dieser Stelle der Sequenz auf, und es kommt zu einem trunkierten Protein. Je nachdem an welcher Stelle der Sequenz diese Mutation auftritt, kommt es zu einem Abbau des Transkriptes durch *Nonsense mediated mRNA decay* (NMD). Transkripte,

deren Stopkodons auf Grund von Nonsense Mutationen mehr als 50 Bp stromaufwärts vom letzten Intron-Exon-Übergang liegen, werden durch den NMD Mechanismus erkannt und abgebaut (Hentze und Kuloznik, 1999). Dieser Mechanismus dient der Zelle zum Schutz vor trunkierten und potentiell toxischen Proteinen. Ist das betroffene Gen auf dem X-Chromosom lokalisiert, kommt es bei männlichen Betroffenen meistens zu einem Funktionsverlust dieses Gens. Bei weiblichen Individuen ist dies durch das Phänomen der X-Inaktivierung etwas komplexer. Durch die Inaktivierung eines X-Chromosoms wird gewährleistet, daß weibliche Individuen die gleiche funktionelle Gendosis wie männliche Individuen besitzen. Das inaktivierte X-Chromosom entwickelt sich zum sogenannten Barr-Körperchen (Barr und Carr, 1961) Normalerweise ist diese Inaktivierung zufällig. Gibt es jedoch in einem X-chromosomalen Gen eine Mutation, die einen negativen Einfluß auf die Genfunktion ausübt, dann kann es zu einer sogenannten schiefen X-Inaktivierung kommen. Bei der schiefen X-Inaktivierung findet keine zufällige Inaktivierung mehr statt. Vielmehr wird ein X-Chromosom präferentiell inaktiviert. Dieses Phänomen wurde erstmalig bei Konduktorinnen des Fragilen X Syndroms beschrieben. Bei einigen Trägerinnen der Mutation ist der pathologische Phänotyp weniger stark ausgeprägt oder gar nicht vorhanden, da die Mutation zu einer präferentiellen X-Inaktivierung zu Gunsten des nicht mutierten X-Chromosoms führt (Heine-Suner et al., 2003). Eine weitere Möglichkeit, daß bei Frauen ein gemäßiger pathologischer Phänotyp auftritt, betrifft die Mutation von Genen, die der X-Inaktivierung entkommen. Gene, die diesem Mechanismus entkommen zeigen eine geringere Methylierung im Bereich ihrer Promotoren, verglichen mit Genen die dem Mechanismus unterliegen (Fillipova et al., 2005). Darüber hinaus zeigen Gene die der X-Inaktivierung entkommen Unterschiede bei der zeitlichen Koordinierung der Replikation und eine veränderte Methylierung der Histone (Disteche et al., 2002). Eine Mutation in einem solchen Gen würde dazu führen, daß sowohl die mutierte als auch die nicht mutierte Kopie des Gens transkribiert wird. Dies hätte zur Folge das 50% des Genproduktes normal wäre und die Ausprägung des pathologischen Phänotyps, im Vergleich zu einem männlichen Träger der gleichen Mutation, schwächer ausgeprägt sein kann (Brown and Greally, 2003).

Prinzipiell ist auf Grund der zufälligen Inaktivierung des X-Chromosoms ein pathologischer Phänotyp bei X-chromosomalen Mutationen bei weiblichen Individuen meist geringfügiger ausgeprägt.

Nonsense-Mutationen, die autosomale Gene betreffen, müssen nicht unbedingt einen pathologischen Phänotyp verursachen, da oftmals die Funktion des nicht mutierte Allels auf dem homologen Chromosom ausreicht. Dieses Phänomen kann man bei vielen autosomal rezessiven Erkrankungen beobachten. Als Beispiel kann man hier das Tay Sachs Syndrom anführen. Das Tay Sachs Syndrom wird durch Mutationen im *Hexosaminidase A* Gen (*HEXA*) verursacht, die allerdings im homozygoten Zustand vorliegen müssen (Myerowitz und Costigan, 1988). Es kann auch zu einer sogenannten Haploinsuffizienz kommen, bei der 50% des Proteins nicht ausreichend sind, um die entsprechende Funktion des Proteins auszuüben. Ein Beispiel hierfür ist *SOX9*: auch wenn nur ein Allel von der Mutation betroffen ist kommt es zum Krankheitsbild der kampomelen Dysplasie (Wagner et al., 1994).

Neben den Substitutionen treten auch Deletionen oder Insertionen von Nukleotiden auf. Meistens führen Deletionen und Insertionen zu einer Verschiebung des offenen Leserasters. Diese Verschiebung resultiert dann oft in der Bildung eines vorzeitigen Stopkodons. Prinzipiell können solche Leserasterverschiebungen entweder zu einem C-terminalen trunkierten Protein führen oder zum Abbau des Transkripts durch NMD. Auch bei diesen Mutationen ist ausschlaggebend, ob das Gen X-chromosomal oder autosomal lokalisiert ist und der Träger der Mutation männlich oder weiblich ist. Demzufolge kommt es entweder zu einem Funktionsverlust, zu Haploinsuffizienz oder zu keinem pathologischen Phänotyp.

Es gibt aber auch Insertionen, bei denen Triplets inseriert werden. Diese Insertionen führen nicht zu einer Leserasterverschiebung, sondern die normale Aminosäuresequenz wird entsprechend der Insertion um eine oder mehrere Aminosäure verlängert. Ein Beispiel hierfür ist das *Huntingtin* Gen. Die Expansion eines CAG Triplets im kodierenden Bereich des Gens führt zum Funktionsverlust des translatierten Huntingtin Proteins. Pathogen ist diese Mutation, wenn ein kritischer Wert der Triplettanzahl überschritten wird. Der pathologische Phänotyp wird wahrscheinlich durch Aggregation des mutierten Proteins verursacht (Walling et al., 1998).

Alle diese minimalen Veränderungen im Genom sind mit den zytogenetischen Methoden nicht nachweisbar (siehe Kapitel 1.8) und müssen deswegen über sogenannte Kopplungsanalysen innerhalb der betroffenen Familien nachgewiesen werden (s. Kapitel 1.2).

1.4 Geistige Behinderung

Laut Internationaler Klassifikation der Krankheiten (International Classification of Disease: ICD) wird geistige Behinderung als ein Zustand verzögerter oder unvollständiger Entwicklung von geistigen Fähigkeiten definiert. Besonders betroffen sind die Fähigkeiten, die während der Entwicklung bis zum 18. Lebensjahr erworben werden, wie Kognition, Sprache, motorische und soziale Fähigkeiten. Geistige Behinderung kann allein auftreten oder zusammen mit anderen Symptomen. Generell überprüft man den intellektuellen Status einer Person mit standardisierten Intelligenztests, wie beispielsweise dem Raven-Test und dem Hamburg-Wechsler-Intelligenztest, die dem jeweiligen Alter der Versuchsperson angepaßt sind. Der Hamburg-Wechsler-Intelligenztest ist ein Verfahren zur Messung der allgemeinen Intelligenz, die bestimmt ist als die Fähigkeit, sinnvoll zu handeln, vernünftig zu denken und sich wirkungsvoll mit der Umwelt auseinander zu setzen. Er untergliedert sich in einen sprach- und in einen handlungsbezogenen Teil. Der Raven-Test ist dagegen ein sogenannter progressiver Matrizen-Test, der in erster Linie das Erfassen abstrakter Muster, das Herstellen von Beziehungen zwischen Einzelementen geometrischer Figuren und die Fähigkeit zum systematischen Denken prüft. Im Gegensatz zum Hamburg-Wechsler-Intelligenztest erfaßt der Raven-Test die sprachfreien, intellektuellen Fähigkeiten. Beide Testverfahren dienen der Ermittlung eines spezifischen Intelligenzquotientens (IQ) Wertes. Liegt der IQ Wert unter 70, dann spricht man von Intelligenzminderung. Je niedriger der IQ Wert, desto ausgeprägter ist die geistige Einschränkung (Tabelle 1)

Tabelle 1: Einteilung der geistigen Behinderung

| Grad der Behinderung | Intelligenzquotient |
|-----------------------------------|----------------------------|
| Leichte geistige Behinderung | 50-70 |
| Moderate geistige Behinderung | 35-50 |
| Schwere geistige Behinderung | 20-35 |
| Sehr schwere geistige Behinderung | < 20 |

Diese Bemessung der geistigen Behinderung mittels Intelligenztest ist nur bei leicht oder moderat geistig behinderten Personen anwendbar. Bei schwererer geistiger Behinderung ist die Durchführung der Tests unmöglich, und die Zuordnung des Grades der Behinderung erfolgt durch Einstufung zu bestimmten kindlichen Entwicklungsphasen. Darüber hinaus werden bei der Diagnose der geistigen Behinderung stets zusätzliche Faktoren berücksichtigt, die das Verhalten im täglichen Leben berücksichtigen. Dies sind das Kommunikationsverhalten, die Selbstversorgung, die Wohnsituation, das Sozialverhalten, die Benutzung der Infrastruktur, die Fähigkeit zur Selbstbestimmung, die Sorge um die eigene Gesundheit und Sicherheit, schulische Grundausbildung und die Freizeitgestaltung. Zusätzlich zu der substantiellen Einschränkung der intellektuellen Fähigkeiten müssen für die Diagnose geistige Behinderung mindestens zwei der oben genannten Bereiche des täglichen Lebens ebenfalls von Einschränkungen betroffen sein (American Psychiatric Association: www.aamr.org). Insgesamt sind ungefähr 2-3% der Bevölkerung von geistiger Behinderung betroffen (Chelly und Mandel, 2001). Die Ursachen für geistige Behinderung sind vielseitig und können in fünf Kategorien eingeteilt werden (s. Tabelle 2).

Tabelle 2: Ursachen von geistiger Behinderung

| Kategorie | Ursache |
|--------------------------------------|--|
| traumatische Einwirkungen | z.B.: Gehirnblutungen, Sauerstoffmangel und schwere Kopfverletzungen |
| pränatale und postnatale Infektionen | z.B.: Röteln, Enzephalitis, Meningitis, Cytomegalieviren, Toxoplasmose, Listeriose und HIV Infektionen |
| Genetische Ursachen | z.B.: Chromosomen Anomalien: numerische (z.B. Down Syndrom) und strukturelle Chromosomen Anomalien (z.B. balancierte Translokationen) Mutationen in einzelnen Genen: Rett-Syndrom und die Phenylketonurie (eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung, die zu einer Inaktivierung des Abbaus von Phenylalanin führt) |
| Umweltfaktoren und Ernährung | z.B.: Armut, schlechte soziale Verhältnisse und Unterernährung |
| Toxine | Alkohol und Drogen |

1.5 Syndromale und nicht-syndromale geistige Behinderung

Bei der geistigen Behinderung unterscheidet man syndromale und nicht-syndromale Formen. Die syndromale geistige Behinderung ist charakterisiert durch das Auftreten von zusätzlichen dysmorphen, metabolischen oder neurologischen Symptome zusätzlich zur geistigen Behinderung. Dem gegenüber ist bei der nicht-syndromalen geistigen Behinderung die eingeschränkten, intellektuellen Fähigkeiten das einzige phänotypische Merkmal (Gecz und Mulley, 2000).

Ein Beispiel für syndromale geistige Behinderung ist das Coffin-Lowry Syndrom. Patienten mit dieser Erkrankung zeigen neben mentaler Retardierung, Minderwuchs, progrediente Skelettanomalien (Kyphoskoliose, Pectus carinatum oder excavatum) und charakteristische faziale Dysmorphien. Coffin-Lowry

Syndrom wird verursacht durch Mutationen im *RSK2* (*ribosomal S-6 kinase 2*) Gen (Trivier et al., 1996). Es agiert möglicherweise als Proteinkinase, die über Phosphorylierung CREB (*cAMP response element binding protein*) aktiviert (Harum et al., 2001).

Im Gegensatz dazu sind bei der nicht-syndromalen geistigen Behinderung keine zusätzlichen pathologischen Merkmale vorhanden. Das erste Gen, das als Ursache für nicht-syndromale geistige Behinderung identifiziert wurde, war das *Fragile Mental Retardation 2* Gen *FMR2* (Gecz et al., 1996). Zuvor wurde bereits das *FMR1* Gen als Ursache des Martin Bell-Syndroms, auch als Fragiles X-Syndrom bezeichnet, identifiziert. Die X-chromosomalen Bereiche in denen *FMR1* und *FMR2* lokalisiert sind, zeigen in zytologischen Präparaten, unter Verwendung eines Mediums ohne Folat, bei Mutationen in einem der beiden Gene eine Konstriktion und Instabilität des X-Chromosoms. Auf Grund dieser Tatsache konnte *FMR2* als ein weiteres Gen für geistige Behinderung identifiziert werden. *FMR1* kodiert für das Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP). Dieses Protein kontrolliert unter anderem die Translation von neuronalen mRNAs (Feng et al., 1997). FMRP ist ein wichtiger Bestandteil des Mechanismus der RNA Interferenz und an der Translationskontrolle über Mikro-RNAs beteiligt (Brown et al., 2001; Darnell et al., 2001; Jin et al., 2004). Des weiteren ist RAC1 ein Interaktionspartner von FMRP und gemeinsam regulieren sie das Auswachsen von dendritischen Verzweigungen (Greenough et al., 2001). Eine weitere neuronale Funktion übt FMRP über die Interaktion mit CYFIP/Sra auf die neuronale Plastizität aus (Schenck et al., 2003). Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß FMRP wichtig zur Aufrechterhaltung der neuronalen Plastizität ist und möglicherweise einen Einfluß auf die Kontrolle der Translation spezifischer mRNAs ausübt. Individuen mit Fragile X-Syndrom tragen meistens Mutationen im CGG *Repeat* im untranslatierten 5' Bereich des *FMR1* Gens. Durch pathologische Verlängerungen einer Sequenz aus Wiederholungen des Nukleotidtripletts Cytosin-Guanin-Guanin (CGG-Repeat) kommt es zu einer Hypermethylierung der Promotorregion und dadurch zu einer Inaktivierung des *FMR1* Gens, die ihrerseits einen Funktionsverlust des FMRP Proteins verursacht (Jin und Warren, 2003; Willemsen et al., 2004). Genau wie bei *FMR1* führt eine Erhöhung der Anzahl von CCG Wiederholungen im untranslatierten 5' Bereich des *FMR2* Gens zu dessen Inaktivierung (Gecz et al., 1996).

Die diagnostische Unterteilung zwischen syndromaler und nicht-syndromaler geistiger Behinderung ist allerdings historisch bedingt. Gene, in denen Mutationen zu nicht-syndromaler geistiger Behinderung führen, sind besonders aufschlußreich, da ihre Funktionsanalysen Hinweise auf die biologischen Prozesse geben könnten, die sich ausschließlich auf die Entwicklung von kognitiven Fähigkeiten beziehen. Durch die Analyse von Genen, die nicht-syndromale geistige Behinderung verursachen, kann man weitestgehend ausschließen, daß die geistige Behinderung durch einen unspezifischen Nebeneffekt verursacht wird. Im Gegensatz dazu wird, beispielsweise, die geistige Behinderung bei der Phenylketonurie durch eine toxische Anhäufung von Phenylalanin verursacht, die letztendlich die Entwicklung des Gehirns negativ beeinflusst (Bowden and McArthur, 1972).

Mittlerweile sind etwas über 1200 Einträge in OMIM vorhanden, die in Zusammenhang mit geistiger Behinderung stehen, davon sind 282 Gene relevant, da sie durch molekularbiologische Methoden identifiziert worden sind (Inlow und Restifo, 2004). Mehr als 90 Einträge stehen im Zusammenhang mit nicht-syndromaler geistiger Behinderung. Zusammenfassend kann man festhalten, daß viele Gene einen direkten oder indirekten Einfluß auf die geistige Entwicklung beziehungsweise auf die Gehirnentwicklung haben. Die funktionelle Analyse der bereits beschriebenen Gene und die Identifizierung neuer Gene, die mit dem Phänotyp nicht-syndromaler geistige Behinderung assoziiert sind, ermöglichen einen Einblick und ein besseres Verständnis der molekularen Grundlagen, welche die Entwicklung von kognitiven Fähigkeiten betreffen.

1.6 X-chromosomal vererbte geistige Behinderung (XLMR)

In den vorangegangenen Abschnitten wurde bereits dargestellt, daß viele verschiedene Ursachen zu geistiger Behinderung führen können. Bei der Analyse von genetisch bedingten Faktoren fällt jedoch auf, daß geistige Behinderung bei männlichen Personen wesentlich häufiger auftritt. Daraus konnte man schließen, daß eine große Anzahl von Genen, die eine Rolle bei der Entwicklung von kognitiven Fähigkeiten spielen, auf dem X-Chromosom lokalisiert sein müssten (Lehrke et al., 1972). Darüber hinaus war es wesentlich einfacher, X-

chromosomale Gene zu identifizieren, die mit geistiger Behinderung assoziiert sind, weil die Vererbung der X-chromosomalen krankheitsassoziierten Gene, unabhängig ob sie dominant oder rezessiv vererbt, wesentlich leichter nachzuvollziehen ist als eine autosomalen Vererbung. Die Identifizierung von XLMR assoziierten Genen ist besonders interessant, da dies bei einer Funktionsveränderung oder bei einem kompletten Funktionsverlust des betroffenen Gens in einem männlichen Individuum nicht von einer zweiten Kopie des Gens kompensiert werden kann.

Ist die geistige Behinderung X-chromosomal vererbt, spricht man von X-chromosomal vererbter, syndromaler geistiger Behinderung (S-XLMR) oder von X-chromosomal vererbter, nicht-syndromaler geistiger Behinderung (NS-XLMR). Zur Identifizierung und Charakterisierung von Genen, die ausschließlich für die Entwicklung von kognitiven Fähigkeiten wichtig sind, sind NS-XLMR Gene von besonderem Interesse. Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind 20 Gene auf dem X Chromosom identifiziert worden, deren Fehlfunktionen NS-XLMR verursachen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Genetische Ursachen für NS-XLMR

| Gen | Syndrom oder zusätzliche Symptome außer MRX | Funktion des resultierenden Proteins | Referenz | OMIM Nummer |
|----------------|--|--|-----------------------|--------------------|
| <i>ARHGEF6</i> | Bis jetzt nicht beschrieben | Guanin Nukleotid Austauschfaktor für Rho GTPasen, der zusammen mit Integrin Rac und cdc42 aktiviert. Diese Aktivierung stimuliert das Wachstum von Neuronen. | Kutsche et al., 2000 | 300267 |
| <i>AGTR2</i> | Zurückbildung des <i>Nervus opticus</i> | Angiotensin II Rezeptor 2, der im Gehirn exprimiert wird. Funktion bislang unbekannt. | Vervoort et al., 2002 | 300034 |

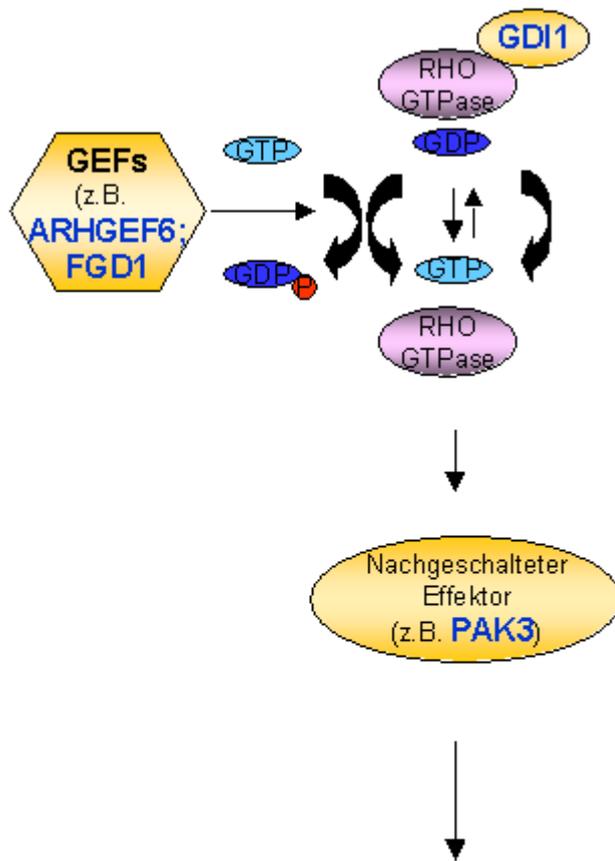
| Gen | Syndrom oder zusätzliche Symptome außer MRX | Funktion des resultierenden Proteins | Referenz | OMIM Nummer |
|----------------------------------|--|--|---|------------------------|
| <i>ARX</i> | Epilepsie; West Syndrom; Partington Syndrom | Humanes Ortholog des <i>D. melanogaster</i> <i>Aristaless</i> Homeobox Gens ARX ist ein Transkriptionsfaktor der unter anderem in Neuronen agiert. | Stromme et al., 2002 Bienvenu et al., 2002 Frints et al., 2002 | 300382 |
| <i>DLG3</i> | Bis jetzt nicht beschrieben | Membran-assoziierte Guanylat Kinase, die eine Verbindung zwischen zwischen den Neuroligninen und ihren Rezeptoren herstellt. Wichtig für die über Rezeptoren vermittelte synaptische Plastizität. | Tarpey et al., 2004 | 300189 |
| <i>ACSL4</i> (<i>FACL4</i>) | Bis jetzt nicht beschrieben | Fettsäure CoA Ligase 4 Reguliert den Ionentransport, z.B. von Kalzium. | Meloni et al., 2002 | 300157 |
| <i>FGD1</i> | Aarskog-Scott Syndrom | Guanin Nukleotid Austauschfaktor (GEF) bindet spezifisch an die RHO GTPase Cdc42 und aktiviert diese. Stimuliert wahrscheinlich das Wachstum von Neuronen. | Lebel et al., 2002 | 305400 |
| <i>FTSJ1</i> | Bis jetzt nicht beschrieben | S-Adenosyl-L-Methionin abhängige Methyltransferase. Wahrscheinlich beteiligt an der Methylierung spezifischer tRNAs und somit wichtig für die Translation. | Freude et al., 2004 | 300499 |

| Gen | Syndrom oder zusätzliche Symptome außer MRX | Funktion des resultierenden Proteins | Referenz | OMIM Nummer |
|-----------------|--|---|----------------------------|------------------------|
| <i>FMR2</i> | Bis jetzt nicht beschrieben | Zellkern spezifisches Protein, welches vermutlich die Transkription aktivieren kann. | Gecz et al., 1996 | 309548 |
| <i>GDI1</i> | Bis jetzt nicht beschrieben | Rab GDI-Dissoziations Inhibitor. Wahrscheinlich an der Reifung von synaptischen Vesikeln beteiligt. | D'Adamo et al., 1998 | 300104 |
| <i>IL1RAPL1</i> | Bis jetzt nicht beschrieben | IL-1 Rezeptor Akzessorisches Protein | Carrie et al., 1999 | 300206 |
| <i>MECP2</i> | Rett Syndrom | Methyl-CpG Bindeprotein. Ubiquitär exprimierter Transkriptionsrepressor, der auch neuronale Gene abschaltet. | Gomot et al., 2003 | 300005 |
| <i>NLGN4</i> | Autismus Asperger Syndrom | NLGN4 gehört zur Familie der Neuroligine, die wichtig für die Entstehung von Synapsen sind. | Laumonnier et al., 2004 | 300427 |
| <i>PAK3</i> | Bisher nicht beschrieben | Serin/Threonin Proteinkinase, die an aktivierte Formen von kleinen GTPasen bindet. PAK3 reguliert die Ausbildung des Aktinskeletts und stimuliert das neuronale Wachstum. | Allen et al., 1998 | 300124 |
| <i>PQBP1</i> | Southerland-Haan Syndrom; Rennpening Syndrom | Polyglutamin Bindeprotein 1. Spielt möglicherweise eine Rolle bei Spleißvorgängen spezifischer Gene. | Kalscheuer et al., 2003 | 300463 |
| <i>RSK2</i> | Coffin-Lowry Syndrom | Serin/Threonin Kinase, phosphoryliert CREB | Merienne et al., 1999 | 300075 |

| Gen | Syndrom oder zusätzliche Symptome außer MRX | Funktion des resultierenden Proteins | Referenz | OMIM Nummer |
|-----------------------------------|--|--|---------------------------|------------------------|
| <i>SLC6A8</i> | Epilepsie | Kreatin Transporter Gen | Rosenberg et al., 2004 | 300036 |
| <i>TM4SF2</i> | Bisher nicht beschrieben | Tetraspanin, Transmembranprotein. Spielt eine Rolle bei der Integrin- vermittelten Signaltransduktion. | Zemni et al., 2000 | 300096 |
| <i>JARID1C</i> (<i>SMCX</i>) | Zusätzlich dysmorphische Merkmale | Spielt eine Rolle bei Umstrukturierungs-Vorgängen des Chromatins. | Jensen et al., 2005 | 314690 |
| <i>ZNF41</i> | Bisher nicht beschrieben | Transkriptionsregulator | Shoichet et al., 2003 | 314995 |
| <i>ZNF81</i> | Bisher nicht beschrieben | Transkriptionsregulator | Kleefstra et al., 2004 | 314998 |

An Hand der aufgelisteten Gene wird deutlich, daß die X chromosomal vererbte, geistige Behinderung äußerst heterogene Ursachen hat, und die Fehlfunktionen der identifizierten NS-XLMR Gene sehr unterschiedliche biologische Vorgänge beeinflussen. Bei einigen der bisher identifizierten NS-XLMR Gene ist es möglich, eine sinnvolle Zuordnung entsprechend ihrer Funktion vorzunehmen.

Eine solche Gruppe bilden die Gene, die eine funktionelle Rolle bei der durch RHO-GTPasen vermittelten Signalübertragung spielen. Ausgelöst wird diese Signalkaskade durch extrazelluläre Moleküle (z.B. Hormone), die an entsprechende Zellrezeptoren binden. Innerhalb der Zelle vermitteln RAS-ähnliche Proteine der RHO-Familie die Weiterleitung des Signals. Diese Übertragungskaskade ist für die Entwicklung und das Wachstum von Neuronen und neuronalen Fortsätzen von Bedeutung (Schmitz et al., 2000 und Brouns et al., 2001).



Steuerung Aktin abhängiger Prozesse:

Migration, Adhäsion, Ablauf des Zellzyklus, Morphogenese, Axonleitung Phagozytose etc.

(Übersichtsartikel: Schmidt and Hall, 2002)

Abb.1: **Schematische Darstellung der Signaltransduktion vermittelt, über RHO GTPasen.** In blauer Schrift sind die verschiedenen Proteine dargestellt, die entweder direkt die über RHO-GTPasen vermittelte Signaltransduktion aktivieren oder wie im Falle von PAK3 ein nachgeschalteter Effektor sind. Mutationen in den entsprechenden Genen sind assoziiert mit X-chromosomaler geistiger Behinderung. Dieser Signaltransduktionsweg ist unter anderem involviert in das Wachstum von Neuronen und die Aufrechterhaltung der synaptischen Plastizität.

NS-XLMR Gene, die regulatorische Funktionen innerhalb dieses zellulären Signaltransduktionsweges ausüben, sind: *ARHGEF6*, *FGD1*, *GDI1*, und *PAK3*.

ARHGEF6 (alternative Genbezeichnungen: *αPIX* und *Cool-2*) und *FGD1* sind beides RHO-spezifische GEFs (*Guanine exchange factors*). *ARHGEF6* ist ein cytoplasmatisches RHO GEF Protein, das die RHO-GTPase durch Austausch des gebundenen GDPs gegen GTP aktiviert (Feng et al., 2002). *FGD1* fungiert

ebenfalls als Guanin Nukleotid Austauschfaktor (GEF), der RHO-GTPasen aktiviert (Zheng et al., 1996).

GDI1 wird spezifisch in neuronalen Geweben exprimiert und reguliert die Aktivität von gehirnspezifischen RHO-GTPasen. Diese befinden sich in einem inaktiven Status, wenn sie GDP gebunden haben und an der Plasmamembran lokalisiert sind. *GDI1* induziert die Ablösung der RHO-GTPasen von der Plasmamembran, vermittelt die Umwandlung von GDP in GTP und überführt somit die inaktiven RHO-GTPasen in einen aktiven Status (D'Adamo et al., 1998).

PAK3 ist eine Kinase, die während der Gehirnentwicklung stark exprimiert ist. Sie agiert in der Signalkaskade nach den RHO-GTPasen (Allen et al., 1998).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß alle diese MRX Gene in die Übertragung von extrazellulären Signalen via RHO-GTPasen involviert sind und daß Mutationen in diesen Genen zu einer Fehlfunktion dieser Signalkaskaden führen. Experimentelle Daten haben gezeigt, daß RHO-GTPasen wichtige Faktoren für das Wachstum von Neuronen sind (Kozma et al., 1997). Jegliche direkte und indirekte Störung ihrer Funktion wirkt sich damit negativ auf die Entwicklung und das Wachstum von Nervenzellen aus.

Ein weiteres NS-XLMR-Gen ist der Angiotensin Rezeptor 2 (*AGTR2*). Das *AGTR2* Protein induziert ebenfalls eine Signalkaskade an der GTPasen beteiligt sind. Jedoch kann man dieses Gen nicht zu der oben genannten Gruppe zuordnen, da über RAC, das ebenfalls zur RHO-Familie der GTP-bindenden Proteine gehört, ein anderer Signaltransduktionsweg aktiviert wird, der letztendlich in der Transkriptionsaktivierung von cJUN spezifischen Genen endet (Murasawa et al., 2000).

Eine weitere Gruppe von NS-XLMR Genen ist entweder direkt oder indirekt an der Regulation der Expression von Genen beteiligt. Zu dieser Gruppe gehören: *ARX*, *MECP2*, *FRM2*, *ZNF41* und *ZNF81*.

ZNF41 und *ZNF81* gehören zur Familie der KRAB/FPB Zinkfingerproteine und nehmen direkt Einfluß auf die Genexpression. Sie sind ubiquitär exprimiert und reprimieren die Transkription ihrer Zielgene, indem sie direkt an spezifische DNA Abschnitte binden (Schultz et al., 2002). Im Gegensatz dazu beeinflussen *ARX*, *MeCP2* und *FRM2* indirekt die Transkription durch Veränderung der Chromatinstruktur. *ARX* ist ein Homeobox Protein, das aus einer sogenannten *Paired*-Domäne und einer C-terminalen *Aristaless*-Domäne besteht. Es agiert als

Transkriptionsrepressor, der eine wichtige Rolle bei der embryonalen Entwicklung spielt (Meijlink et al., 1999). Die genaue Funktion von FRM2 ist noch nicht bekannt, jedoch weisen funktionelle Studien in Hefe und in Säugerzellen auf eine Funktion als Transkriptionsaktivator mit Zellkernlokalisierung hin (Hillman und Gecz, 2001). MeCP2 ist ebenfalls ein ubiquitär exprimierter Transkriptionsrepressor, der an CpG Dinukleotide bindet und als Komplex mit Sin3A und Histonacetylase die Transkription verhindert (Amir et al., 1999).

Eine weitere Einteilung der NS-XLMR Gene in funktionelle Gruppen ist auf Grund ihrer unterschiedlichen Funktionen nicht möglich. Offenbar führen Störungen der verschiedensten zellulären Funktionen zu nicht-syndromaler geistiger Behinderung. Dies können beispielsweise Störungen im Fettstoffwechsel sein, verursacht durch Mutationen in *ACSL4* (*FACL4*) (Meloni et al., 2002). Es können aber auch Defekte im Kreatin Transporter SLC6A8 (Solute Carrier Family 6 Member 8), der den Austausch von Kreatin gegen phosphoryliertes Kreatin und somit Energie für die Skelett- und Herzmuskulatur bereitstellt, zu nicht-syndromaler geistiger Behinderung führen (Rosenberg et al., 2004).

Bei der Auflistung der Gene, die mit nicht-syndromaler geistiger Behinderung assoziiert sind (Tabelle 3), wird deutlich, daß die Hälfte dieser Gene neben der nicht-syndromalen geistigen Behinderung auch syndromale geistige Behinderung verursachen können.

Ein Beispiel für einen genetischen Defekt, der sowohl Ursache für NS-XLMR als auch für S-XLMR sein kann, ist das Rett-Syndrom (RTT). Das Rett-Syndrom ist eine schwere, progressiv fortschreitende, neurologische Entwicklungsstörung, die hauptsächlich weibliche Personen betrifft (Hagberg et al., 2002). Bei dieser Erkrankung kommt es nach einer normalen Entwicklung in den ersten 6 bis 18 Monaten zu einer Regression der Entwicklung, und die bis dahin erworbenen Fähigkeiten werden wieder verlernt. Weitere typische Merkmale dieser Erkrankung sind stereotype Handbewegungen, Verlangsamung des Schädelwachstums, Verlust der Sprachfähigkeit, geistige Behinderung und motorische Störungen (Hagberg et al., 2002). Der genetische Defekt, der dieser Erkrankung zu Grunde liegt, betrifft das Methyl CpG Bindeprotein 2 Gen (*MECP2*), das auf Xq28 lokalisiert ist (Amir et al., 1999). MeCP2 bindet spezifisch an methylierte CpG Nukleotide der DNA und interagiert mit Sin3A und einer Histon Deacetylase. Dieser Komplex vermittelt die Deacetylierung von Histonen und somit durch

Komprimierung des Chromatins die Repression der Expression von Zielgenen (Jones et al., 1998). Neben der geistigen Behinderung sind weitere Symptome für RTT beschrieben worden, die eine Zuordnung in die Kategorie rechtfertigen. Allerdings hat man mittlerweile auch Mutationen in *MECP2* gefunden, die zu nicht-syndromaler geistiger Behinderung führen (Orrico et al., 2000 und Gomot et al., 2003).

Ein weiteres Beispiel ist das *RSK2* Gen, dessen Mutationen sowohl zu dem Coffin-Lowry Syndrom (Coffin et al., 1966), gekennzeichnet durch Skelettabnormalitäten und geistiger Behinderung, als auch zu nicht-syndromaler geistiger Behinderung führen können (Merienne et al., 1999). Diese Beispiele zeigen deutlich, daß sowohl NS-XLMR als auch S-XLMR durch Fehlfunktion von ein und demselben Gen verursacht werden können. Offensichtlich hängt die phänotypische Ausprägung mit der Lokalisation der Mutation innerhalb des betroffenen Gens zusammen. Die Funktionsfähigkeit des resultierenden Proteins kann durch verschiedene Mutationen unterschiedlich stark eingeschränkt beziehungsweise aktiviert werden. Es können beispielsweise unterschiedliche Domänen betroffen sein, so daß die Interaktion mit dem jeweiligen Partner gestört ist. Mutationen in einem Gen können dadurch unterschiedliche Phänotypen erzeugen.

Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, daß Fehlfunktionen in verschiedenen Genen dasselbe Krankheitsbild verursachen.

Bis heute ist RTT als Erkrankung mit monogener Ursache beschrieben worden und in 90% der Fälle konnte die Diagnose RTT mit Mutationen in *MECP2* assoziiert werden. Bei den verbleibenden 10% der Patienten konnte bislang keine Mutation in *MECP2* nachgewiesen werden (Erlandson et al., 2003 und Ariani et al., 2004). Nach neuesten Erkenntnissen jedoch scheint RTT eine Erkrankung mit heterogenen Ursachen zu sein. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß Mutationen im *CDKL5* Gen (auch als *STK9* bezeichnet) atypisches RTT Syndrom verursachen können (Tao et al., 2004; Weaving et al., 2004).

Ein weiteres Beispiel dafür, daß zwei unterschiedliche Gene denselben pathologischen Phänotyp verursachen können, ist die Lissenzephalie. Die Lissenzephalie wird durch eine Migrationsstörung der kortikalen Neuronen verursacht, die zu einer schweren Fehlbildung des Gehirns führen. Als genetische

Ursachen wurden Mutationen im Doublecortin X Gen (*DCX*) (Gleeson et al., 1998) und im Lissenzephalie 1 Gen (*LIS1*) (Chong et al., 1996) gefunden.

1.7 Identifizierung neuer Gene assoziiert mit nicht-syndromaler XLMR (NS-MRX)

Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Analyse der genetischen Ursachen der X-chromosomal vererbten, geistigen Behinderung (XLMR) (siehe Kapitel 1.6). Dieser Krankheit zugrunde liegende, genetische Defekte wurden bereits in mehreren Genen nachgewiesen (siehe Tabelle 3). Damit ist gezeigt, daß es sich um eine äußerst heterogene Erkrankung handelt. Durch das *European X-linked Mental Retardation Consortium* (EURO-MRX; Chelly, Paris; Frijns, Leuven; Hamel, Nijmegen; Moraine, Tours; Ropers, Berlin) wurden Zelllinien und DNA aus Blutproben von Familien mit X-chromosomaler geistiger Behinderung gesammelt. Bei einigen der untersuchten Familien konnten inzwischen genetische Defekte in unterschiedlichen Genen nachgewiesen werden. Dennoch ist bei den meisten Familien (ca. 80%), deren betroffene Mitglieder unter nicht-syndromaler geistiger Behinderung leiden, der zugrunde liegende genetische Defekt noch nicht identifiziert (Ropers et al., 2003).

Der Nachweis genetischer Ursachen für nicht-syndromale geistige Behinderung ist wesentlich schwieriger als der für syndromale geistige Behinderung. Dies liegt hauptsächlich daran, daß man die Kopplungsdaten von Familien mit nicht-syndromaler geistiger Behinderung nicht zusammenfassend analysieren kann, während das bei syndromalen Formen möglich ist, wenn die anderen pathologische Merkmale weitestgehend übereinstimmend sind. Deshalb ist die Erforschung genetischer Ursachen für nicht-syndromale geistige Behinderung erst seit den letzten Jahren erfolgreich. Dies wurde ermöglicht durch die systematische Auswertung der Kopplungsdaten einzelner Familien mit NS-XLMR, durch die gezeigt werden konnte, daß die Wahrscheinlichkeit Gendefekte in bestimmten Regionen des X-Chromosoms zu finden, erhöht ist (Ropers et al., 2003). Die systematische Mutationsanalyse von gehirnexprimierten Genen in diesen Regionen bei betroffenen Mitgliedern gekoppelter Familien, führte zur Identifikation mehrerer

Gene, die in mutierter Form nicht-syndromale geistige Behinderung verursachen können (Ropers und Hamel, 2005).

A

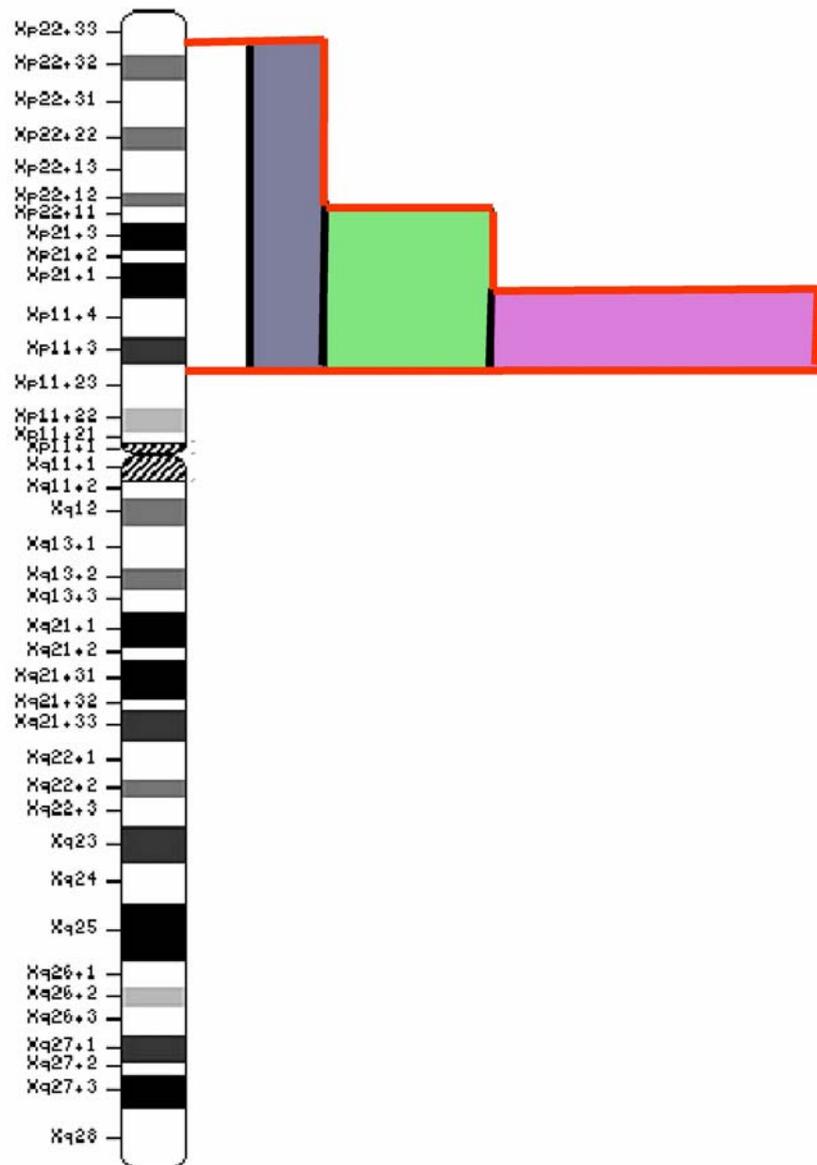


Abb.2A **Verteilung und Gewichtung der Kopplungsintervalle unterschiedlicher Familien mit X-chromosomal gekoppelter geistiger Behinderung (adaptiert aus Ropers et al., 2003)**

Schematische Darstellung der Vorgehensweise bei der Gewichtung der Kopplungsintervalle. Das Kopplungsintervall einer Familie ist als schwarzer, vertikaler Strich gekennzeichnet. Je kürzer das Kopplungsintervall, desto stärker ist seine Gewichtung (rosa Viereck) beziehungsweise je länger das Kopplungsintervall, desto geringer ist seine Gewichtung (blaues Viereck). Diese so für alle Familien ermittelte Gewichtung der Kopplungsintervalle wurde in Form von Rechtecken mit gleichen

Flächeninhalten vorgenommen, wobei die überlappenden Kopplungsintervalle aufsummiert wurden. Verbindet man die Oberkanten der Vierecke, erhält man bei genügend Kopplungsintervallen eine Art Kurve, die die Gewichtungssumme der Kopplungsintervalle darstellt (rot). Je geringer diese ist, desto unwahrscheinlicher ist es, daß in dieser Region Gene lokalisiert sind, die in mutierter Form X-chromosomale geistige Behinderung verursachen. Je höher allerdings die Werte sind (*Peak*), desto wahrscheinlicher ist es, daß in dieser Region Gene lokalisiert sind, die in mutierter Form X-chromosomale geistige Behinderung verursachen, da erheblich mehr betroffene Familien eine Kopplung in dieser Region zeigen.

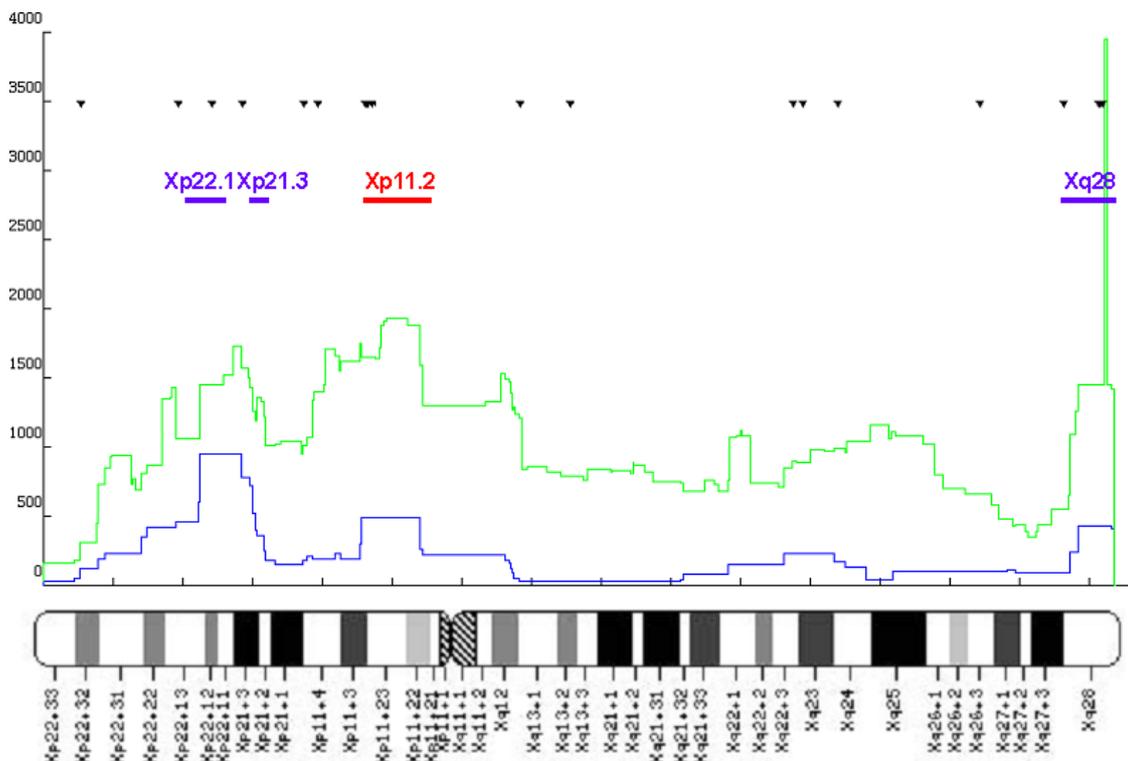


Abb.2B: **Verteilung und Gewichtung der Kopplungsintervalle unterschiedlicher Familien mit X-chromosomal gekoppelter geistiger Behinderung (adaptiert aus Ropers et al., 2003)**

Schematische Darstellung der Verteilung und Gewichtung der Kopplungsintervalle von 156 Familien. Die grüne Kurve repräsentiert das Ergebnis der Verteilung und Gewichtung für alle 156 Familien, während die blaue Kurve die Gewichtung und Verteilung der 32 Familien repräsentiert, bei denen bereits Mutationen in einem X-chromosomalen Gen gefunden worden waren. Die Pfeile im oberen Bereich der Abbildung stehen jeweils für ein Gen, in dem Mutationen identifiziert worden sind und die mit X-chromosomaler geistiger Behinderung assoziiert sind.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die systematische Mutationsanalyse auf die Region Xp11.2 beschränkt, da in dieser Region eine signifikante Überlappung von Kopplungsintervallen von NS-XLMR Familien vorhanden war, und bislang keine Gene identifiziert worden waren.

1.8 Identifizierung von Kandidatengenen für monogene Erkrankungen mittels zytogenetischer Methoden

Die zweite Strategie, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verfolgt wurde, um Kandidatengene für geistige Behinderung zu bestimmen, ist die molekularbiologische Analyse der DNA von Patienten mit balancierten, reziproken Chromosomentranslokationen.

Prinzipiell kann man zwischen zwei Arten von Chromosomenanomalien unterscheiden. Dies sind einerseits numerische Anomalien und andererseits strukturelle Anomalien. Diese beiden Formen von Chromosomenanomalien können entweder in sämtlichen Körperzellen auftreten oder nur einzelne Zellen betreffen. Wenn sämtliche Zellen betroffen sind, muß die Chromosomenanomalie schon in der Gametogenese entstanden sein. Chromosomenanomalien, die alle Körperzellen betreffen, bezeichnet man als konstitutionelle Anomalien, während Chromosomenanomalien, die nur wenige Körperzellen betreffen, als somatische Anomalie bezeichnet werden. Die numerischen Chromosomenanomalien werden in Polyploidien, Aneuploidien und Mixoploidien unterteilt. Als Polyploidie bezeichnet man das Vorhandensein einer zusätzlichen Kopie eines Chromosomensatzes. Individuen einer mit solchen Chromosomenanomalie sind nicht entwicklungsfähig. Unter einer Aneuploidie versteht man den Gewinn oder Verlust von einzelnen Chromosomen. So wird beispielsweise das Down-Syndrom durch ein zusätzliches Chromosom 21 verursacht (Lejeune et al., 1959), während das Turner-Syndrom durch den Verlust eines X-Chromosoms verursacht wird (Ford et al., 1959). Die dritte Form von numerischen Chromosomenanomalien ist die Mixoploidie, bei der sich während der embryonalen Entwicklung Zellen mit einem aneuploiden oder polyploiden Chromosomensatz entwickeln und es bei weiteren Teilungen der Zellen zu einer Mosaikstruktur des Individuums kommt.

Strukturelle Chromosomenanomalien werden durch Brüche in den Chromosomen verursacht. Bei diesem Ereignis kommt es darauf an, bei wie vielen Chromosomen und an welcher Position im Chromosom eine Bruchstelle entsteht. Gibt es nur eine Bruchstelle in einem Chromosom, so kann diese entweder einfach repariert werden, oder das entstandene Bruchstück ohne Zentromer geht bei der weiteren Teilung der Zelle verloren. Als Konsequenz würde den Tochter-Zellen ein Teil eines bestimmten Chromosoms und damit auch dessen genetische Information fehlen (Strachan and Read, 1996).

Finden dagegen zwei Brüche in einem Chromosom statt, so kann es zu einer Inversion des chromosomalen Bereiches zwischen den beiden Bruchstellen kommen. Sind bei diesem Ereignis Gene oder regulatorische Sequenzen durch die Bruchpunkte in ihrer Einheit zerstört, so kann dieses zu einem pathologischen Phänotyp führen. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, daß das Chromosomenstück verloren geht und die Bruchpunkte innerhalb des betroffenen Chromosoms miteinander fusionieren. Dadurch ginge sämtliche genetische Information, die auf diesem Chromosomenabschnitt lokalisiert war, verloren. In diesem Fall spricht man von einer Deletion (Strachan and Read, 1996).

Finden zwei Brüche an unterschiedlichen Chromosomen statt, kann es zu einem balancierten Austausch von azentrischen Bruchstücken kommen. Alternativ dazu können die DNA-Doppelstrangenden der Bruchpunkte so miteinander verbunden werden, daß ein derivatives Chromosom mit zwei Zentromeren entsteht, während das andere kein Zentromer besitzt. Dieses führt zu erheblichen Schwierigkeiten bei jeder nachfolgenden Teilung, und die Zellen sind nicht überlebensfähig. Darüber hinaus können auch mehr als zwei Brüche in verschiedenen Chromosomen auftreten, welche zu Inversionen beziehungsweise azentrischen Translokationen führen können (Strachan and Read, 1996).

Höchstwahrscheinlich werden diese Anomalien, die durch Brüche der Chromosomen hervorgerufen werden, durch eine fehlerhafte Reparatur der Chromatiden bei dem Prozeß des *Crossing over* während der Prophase I verursacht. In der Prophase I der Meiose findet die Paarung der homologen Chromosomen statt. Während dieser Phase der Reduktionsteilung kommt es zu *Crossing over*-Ereignissen zwischen den homologen Chromosomen. Das *Crossing over*-Ereignis wird durch einen Doppelstrangbruch eingeleitet. Die darauf folgende DNA-Reparatur-Synthese wird unter Zuhilfenahme des homologen

Chromosoms durchgeführt. Dabei kommt es zum reziproken Austausch von genetischem Material zwischen den homologen Chromosomen. Erfolgen diese oben beschriebenen Ereignisse zwischen nicht homologen Chromosomen, kann es zu illegitimen Doppelstrangbruch-Reparaturen kommen, die in Translokationen resultieren. Alternativ dazu können Doppelstrangbrüche bei zwei unterschiedlichen Chromosomen stattfinden, die daraufhin über den sogenannten *Nonhomologous End Joining Pathway* (NHEJ) reziprok verknüpft werden (Pfeiffer et al., 2004). Die meisten Träger von balancierten Chromosomenaberrationen sind phänotypisch unauffällig und nur etwa 6% der Patienten mit balancierten Translokationen zeigen einen pathologischen Phänotyp (Bugge et al., 2000). Dies liegt entweder daran, daß keine Gene oder regulatorischen Elemente unterbrochen beziehungsweise beeinträchtigt werden, oder aber eine funktionelle Redundanz des betroffenen Gens vorliegt. Allerdings leiden die symptomlosen Träger balancierter Translokationen an einer reduzierten Fertilität, denn bei der Reduktionsteilung werden Keimzellen gebildet, die Hybridchromosomen enthalten. Bei der Verschmelzung der mütterlichen Eizelle und des väterlichen Spermiums werden normalerweise zwei haploide Chromosomensätze zu einem diploiden Chromosomensatz vereinigt. Ist einer der beiden Elternteile Träger einer balancierten Translokation, besteht zu 25% die Wahrscheinlichkeit einer partiellen Trisomie oder zu 25% die Wahrscheinlichkeit einer partiellen Monosomie bei der Befruchtung. Die befruchteten Eizellen mit Chromosomenaberrationen sind oftmals nicht überlebensfähig, und deshalb haben Träger einer balancierten Translokation ein 50% höheres Risiko einer Fehlgeburt gegenüber Menschen mit einem normalen Karyotyp (Stern et al., 1999).

Unbalancierte Translokationen kommen durch Verlust oder Gewinn von Chromosomenmaterial zustande, welche in partieller Monosomie bzw. partieller Trisomie resultieren. Solche Strukturabweichungen eines Chromosoms werden oftmals durch eine balancierte Translokation von Chromosomenabschnitten bei einem Elternteil verursacht. Beispiele hierfür sind für alle Chromosomen beschrieben worden. Ein bekanntes Beispiel für eine partielle Monosomie ist das Katzenschrei-Syndrom, welches durch eine Deletion am kurzen Arm des Chromosoms 5 verursacht wird (Lejeune 1963).

Von wissenschaftlich größerem Interesse in Bezug auf die Analyse von Genfunktionen sind balancierte Translokationen, die durch die chromosomale

Umstrukturierung zu einer direkten Unterbrechung eines Gens führen, da bei ihnen ausgeschlossen werden kann, daß der Phänotyp durch Verlust oder Gewinn von Chromosomenmaterial zustande gekommen ist. Anhand dieser balancierten Translokationen kann man krankheitsassoziierte Gene identifizieren und ihre Funktion analysieren (Tommerup, 1993).

Basierend auf der Studie von balancierten Translokationen sind erfolgreiche Genotyp-Phänotyp-Assoziationen für verschiedene Gene aufgezeigt worden. So wurde beispielsweise an Hand von unterschiedlichen X-chromosomalen und autosomalen Translokationen das krankheitsassoziierte Gen auf Xp21 lokalisiert (Greenstein et al., 1977; Verellen et al., 1978 und Canki et al., 1979) und später das Dystrophin Gen, welches in mutierter Form Ursache der Duchenne-Muskeldystrophie identifiziert (Ray et al., 1985).

Dieser Ansatz zur Charakterisierung einer Genfunktion ist am aussagekräftigsten, wenn nur ein Gen auf einem der derivativen Chromosomen unterbrochen ist. Sind auf beiden Chromosomen Gene unterbrochen, ist es wesentlich schwieriger den Funktionsverlust eines Gens oder einer Kopie eines Gens dem jeweiligen Phänotyp eindeutig zuzuordnen. Noch komplexer wird die Analyse, wenn es durch die Translokation zu einem Fusionsgen kommt. Es wird dann äußerst problematisch zu bestimmen, ob das entsprechende Krankheitsbild auf den Funktionsverlust oder die Haploinsuffizienz eines der beiden Gene zurückzuführen ist, oder ob das neue Fusionsgen pathogen ist.

1.9 Ziel dieser Arbeit

Mentale Retardierung ist eine äußerst heterogene Erkrankung, bei der jedoch erst ein geringer Prozentsatz der zu Grunde liegenden genetischen Faktoren bekannt sind. Insgesamt sind ungefähr 2-3% der Bevölkerung von geistiger Behinderung betroffen (Chelly und Mandel, 2001). Demnach ist geistige Behinderung immer noch eines der größten ungelösten Probleme der klinischen Genetik und ein wichtiger Aspekt der Gesundheitsvorsorge.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Strategien angewandt, um Gene zu identifizieren, deren Defekte zu geistiger Behinderung führen. Dies war zum einen die systematische Suche nach Mutationen in Familien

mit X-chromosomal vererbter geistiger Behinderung und zum anderen die Untersuchung einer Patientin mit balancierter Chromosomenaberration.

Zur Zeit sind nur bei 17% der Familien, die von X-chromosomaler geistiger Behinderung betroffen sind, Mutationen in spezifischen Genen beschrieben (Ropers et al., 2003). Da diese Erkrankung äußerst heterogene Ursachen hat und bislang 42 Gene identifiziert worden sind (Ropers et al., 2005), besteht durchaus die Möglichkeit, daß Mutationen in bis zu 100 unterschiedlichen Genen zu X-chromosomaler geistiger Behinderung führen können (Ropers et al., 2003). Aus diesem Grunde wurde eine vergleichende Kopplungsanalyse durchgeführt um Regionen zu auf dem X-Chromosom festzulegen, in denen die Wahrscheinlichkeit groß war bisher nicht beschriebene Gene zu entdecken, die assoziiert sind mit X-chromosomaler geistiger Behinderung (Ropers et al., 2003). An die Ermittlung von Genen mittels Mutationanalyse schloß sich ihre funktionelle Charakterisierung an, um Ursachen und Wirkungsweisen der betreffenden, mutierten Genprodukte nachvollziehen zu können.

Die zytogenetische Untersuchung der DNA einer Patientin mit Rett-Syndrom ergab, daß diese Trägerin einer balancierten Translokation zwischen dem Chromosom 1 und Chromosom 7 ist. Die meisten Rett-Syndrom Patienten sind jedoch Träger von Mutationen im *MECP2* Gen. Allerdings ist diese Genotyp-Phänotyp Korrelation nicht bei allen Rett-Syndrom Patienten nachweisbar. Durch die Analyse der Translokationsbruchpunkte der Patientin und die Untersuchung eventuell unterbrochener Gene bestand somit die Möglichkeit ein autosomales Gen zu identifizieren, das mit dem Rett-Syndrom assoziiert ist.

Diese funktionelle Analysen der ermittelten Gene können letztendlich zu einem besseren Verständnis der Pathogenese genetisch bedingter Krankheiten führen, und ermöglichen einen besseren Einblick in die normale und gestörte Gehirnentwicklung bzw. Gehirnfunktion.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Im Folgenden sind die verwendeten Materialien wie Chemikalien, Kits, Lösungen, Medien, Enzyme, Plasmide, eingesetzte Primer, Bakterienstämme, Hefestämme und verwendete Datenbanken für die *in silico* Analyse von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen aufgelistet.

2.1.1 Verwendete Chemikalien und Materialien

In der Tabelle 4 sind die verwendeten Chemikalien und Materialien mit Verweis auf den jeweiligen Hersteller dargestellt.

Tab.4: Verwendete Chemikalien und Materialien

| Hersteller | Produkt |
|-------------------------------|--|
| Aldrich | Kresolrot-Ladepuffer |
| Amersham | [α - ³² P]dCTP, Rainbow™ Proteinmarker, RNA Guard, MicroSpin™ G-50 Columns, Pd(N) ₆ (Random Hexamer) |
| Applied Biosystems | Taq-DNA-Polymerase, ABI Prism BidDye Terminator Cycle Sequenzierungs-kit |
| Becton, Dickinson and Company | Difco™ Yeast nitrogen Base w/o Amino Acids |
| Biorad | Amoniumpersulfat (APS) |
| Clontech | Multiple Tissue Northern Blots, Advantage-GC PCR Kit |
| Difco | Bacto-Agar, Bacto-Hefe, Bacto-Tryptone, Hefe Stickstoffbasen |
| Dynal | Dynabeads Oligo(dT) ₂₅ |

| Hersteller | Produkt |
|---------------------|--|
| Fermentas | dNTPs, DNA-Längenmarker (1Kb und 100 Bp Leiter) |
| Fisher | Serologische Pipetten, Zellkulturflaschen, TPP Zellkultur Testplatten |
| Fluka | Diethylpyrokarbonat (DEPC), Formaldehyd, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) |
| GibcoBRL | TEMED |
| HT Biotechnology | Hybridime |
| Invitrogen | Agarose (ultra pure), fötales Kälberserum (FCS), Trypsin/EDTA Lösung, Opti-MEM Medium, RNA-Längenmarker, TRIZOL®Reagenz, X-Gal (5-Brom-4-Chlor-indolyl-D-galaktopyranosid), Reverse Transkriptase, Kanamycin |
| Kodak | BIOMAX MS Film |
| Merck | Chloroform, D(+)-Glukose, DMSO, EDTA, Glycerol, PEG ₆₀₀₀ |
| Millipore | Dialysefilter |
| New England Biolabs | Restriktionsenzyme, T4-DNA-Ligase |
| Nutricia | Protifar Milchpulver |
| Pharmacia | Hexanukleotide |
| Perkin Elmer | Western Lightning Chemiluminescence Substrate |
| Roche | Protein A Agarose, Heringssperma-DNA, PVDF-Western Membran |

| Hersteller | Produkt |
|---------------------|--|
| Roth | TritonX100, Acrylamid/Bisacrylamid Stammlösung, Ethanol, Methanol, Chloroform, Tween20, Complete Mini (Protease Inhibitor Cocktail Tablets), Roti+ Membran (NB), Deckgläser und Objektträger |
| Serva | 4'-6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI), Ethidiumbromid, Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG), BSA, SDS |
| Sigma | Paraformaldehyd, β -Mercaptoethanol, Bradford Reagenz, Ampicillin |
| TPP | Plastik für Zellkultur (Zellkulturflaschen und 6-well-Platten) |
| Vector Laboratories | Vectashield™ Mounting Medium |
| Whatman | 3 MM Papier |

Sonstige Standardchemikalien und Materialien wurden von den Herstellern Appli-Chem, Merck, Roth oder Sigma bezogen.

2.1.2 Kits

In Tabelle 5 sind die Kits aufgelistet, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

Tab.5: **Eingesetzte Kits**

| Bezeichnung | Verwendungszweck | Hersteller |
|--|------------------------------------|--------------------|
| QIAGEN Plasmid Mini, Midi, Maxi Kit | Aufreinigung von Plasmid-DNA | Qiagen |
| QIAquick Gel Extraction Kit | DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen | Qiagen |
| QIAquick PCR Purification Kit | Aufreinigung von PCR-Produkten | Qiagen |
| SuperScript™III First-Strand Synthesis System for RT-PCR | Herstellung von cDNA | Invitrogen |
| Quantum RNA Classic I und II 18S | Semiquantitative RT-PCR | Ambion |
| BD Advantage™ 2 PCR Enzyme System | Amplifikation GC reicher Sequenzen | BD Bioscience |
| AmpliTaq® DNA Polymerase Kit | PCR | Applied Biosystems |
| Taq PCR Core Kit | Amplifikation GC reicher Sequenzen | QIAGEN |
| QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit | Durch PCR induzierte Mutation | Stratagene |

2.1.3 Medien

In Tabelle 6 sind die Medien aufgelistet, die zur Anzucht von Hefen und Bakterien benutzt wurden.

Tab.6: Medien

| Bezeichnung | Verwendungszweck | Zusammensetzung |
|--|--|--|
| LB-Medium (Luria-Bertani, Vollmedium) | Standard-Medium bei der Anzucht von <i>E. coli</i> | Sambrook et al., 1989 |
| Low salt LB | Medium zur Anzucht von <i>E. coli</i> , die mit dem pBudCE4 Vektor transformiert worden sind | 10g Trypton 5g NaCl 5g Hefeextrakt 15g Agar |
| SC (synthetic complete) Drop out media (-URA) | Medium zur Anzucht von Hefen, die mit dem pYES2 Vektor transformiert worden sind | 0,4% SC-drop out mix ohne Uracil 1% Hefestickstoffbasen w/o Aminosäuren 2,5% Glukose 3% Bacto Agar |
| SCM (synthetic complete) Drop out media (-LEU) | Medium zur Anzucht von Hefen, die mit dem pYES2 Vektor transformiert worden sind | 0,4% SCM-drop out mix ohne Leucin 1% Hefestickstoffbasen w/o Aminosäuren 2,5% Glukose 3% Bacto Agar |
| YPD | Vollmedium zur Anzucht von Hefen | 2% Pepton 1% Yeast extract 2% D-Glucose 2% Bacto Agar |

Bei Verwendung von Flüssigmedien wurde kein Agar zugesetzt.

2.1.4 Antikörper

In Tabelle 7 sind die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper aufgeführt.

Tab.7: **Verwendete Antikörper**

| Antikörper gegen | Herkunft | Hersteller |
|---------------------------------------|----------|------------|
| myc- monoklonal | Maus | Clontech |
| anti V5 monoklonal | Ziege | Invitrogen |
| anti-Maus-cy3 | Esel | Dianova |
| anti-Ziege-FITC | Esel | Dianova |
| anti-Maus-HRP | Ziege | Dianova |
| anti-Ziege-HRP | Maus | Sigma |
| Fluorescein Avidin D (FITC-Avidin) | - | Vector |
| Anti-Digoxygenin-cy3 | Maus | Dianova |

2.1.5 Puffer und Lösungen

In Tabelle 8 sind die verwendeten Puffer und Lösungen aufgelistet.

Tab.8: **Puffer und Lösungen**

| Name | Zusammensetzung |
|-----------------------------------|--|
| 5X Blotting Puffer (Western Blot) | 29,1 g Tris p.a. 14,65 g Glycin 18,75 ml 10% SDS auf 1l (Bidest-Wasser) |
| DEPC-H ₂ O | 0,1% (v/v) DEPC, zweifach autoklaviert |
| Ethidium Bromid | 10 mg/ml |
| Kresolrot | 1 mM Kresolrot |

| Name | Zusammensetzung |
|----------------------------|---|
| Heringssperma DNA | 10 mg/ml gescherte Heringssperma-DNA |
| Lymphozyten Kulturmedium | RPMI 1640 Medium ohne L-Glutamin 20% FCS Penicillin 100 U/ml Streptomycin 100 µg/ml L-Glutamin 2 mM 2,5 µg/ml Phytohemagglutinin (PHA L) |
| PEG Hybridisierungslösung | 250 mM NaCl 125 mM Na ₂ HPO ₄ 1 mM EDTA 7% (w/v) SDS 10% (w/v) PEG6000 |
| 3,7% Paraformaldehyd (PFA) | 3,7% PFA in 1,2 PEM |
| PEG Puffer | 250 mM NaCl 125 mM Di-Natrium-Hydrogenphosphat 1 mM EDTA 7% (w/v) SDS 10% (w/v) PEG ₆₀₀₀ |
| 10x PEM | 1 M PIPES 0,05 M EGTA 0,02 M MgCl ₂ pH7 |
| 5X OLB (-dCTP) | 0,1 mM dATP, dGTP, dTTP 1 M HEPES 0,425 mM 5'-pd(N) ₆ 25 mM MgCl ₂ 250 mM Tris 0,36% (v/v) β-Mercaptoethanol |

| Name | Zusammensetzung |
|---|---|
| 1X PBS | 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,3 |
| 1X PBST | 1 ml TWEEN 20 zu 1L 1X PBS |
| Lysepuffer (für Extraktion von genomischer DNA) | 10 mM Tris/HCl pH 7,5 25 mM EDTA 75 mM NaCl pH 7,5 |
| Lysepuffer (für Extraktion von Proteinen) | 10 mM Tris/HCl pH7,8 150 mM NaCl 1mM EDTA, 1% Nonidet p-40 1mM PMSF Protease Inhibitor Cocktail (1 Tablette auf 10 ml) |
| 20X SSC | 300 mM Natriumcitrat 3 mM NaCl pH 7.0 |
| SDS-PAGE-Puffer | 0.125 M Tris 1.25 M Glycin 0.5 % SDS (v/v) |
| 50X TAE | 2 M Tris 5,71% (v/v) Essigsäure 50 mM EDTA pH 8,0 |
| 1X TE | 10 mM Tris 1 mM EDTA pH 7,5 |

| Name | Zusammensetzung |
|------------------------------------|--|
| 10X MOPS | 200 mM MOPS 10 mM EDTA 85 mM NaAc pH 7,5 |
| NB-Waschpuffer 1 | 2X SSC 0,1% SDS in DEPC-H ₂ O |
| NB-Waschpuffer 2 | 0,1X SSC 0,1% SDS in DEPC-H ₂ O |
| RNA-Ladepuffer | 50% Formamid 2,2 M Formaldehyd 1 x MOPS 40µg/ml EtBr |
| Phosphat-Puffer | 50 mM Na ₂ HPO ₄ 50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 7,2 |
| PLATE Mix | 45% PEG 4000 (steril) 1M Li Oac 1M Tris-Cl (pH 7,5) 0,5M EDTA |
| Elektrophorese Puffer für RNA Gele | 1 x MOPS 2,2 M Formaldehyd |
| SB-Denaturierungspuffer | 1,5 M NaCl 0,5 M NaOH |
| SB-Waschpuffer | 40 mM Na ₂ HPO ₄ 40 mM NaH ₂ PO ₄ 0,5% SDS |

2.1.6 Zelllinien

In Tabelle 9 sind die Zelllinien und ihre Anzuchtmedien aufgeführt, die für die unterschiedlichen Transfektionen verwendet wurden.

Tab. 9: **Verwendete Zelllinien**

| Zelllinie | Beschreibung | Medium |
|-----------|---|--|
| HeLa | Humane Zervixkarzinomzellen | DMEM, 10% Fötale Rinderserum |
| COS7 | Nierenzellen der afrikanischen grünen Meerkatze | DMEM, 10% Fötale Rinderserum |
| U373MG | Humane Astrozytoma-Zelllinie | EMEM, 2mM Glutamine, 1% nicht essentielle Aminosäuren, 1mM Natrium Pyruvat, 10% Fötale Rinderserum |
| Neuro2A | Maus-Neuroblastom-Zelllinie | DMEM, 10% Fötale Rinderserum, 1% nicht essentielle Aminosäuren |

2.1.7 Vektoren

In Tabelle 10 sind die unterschiedlichen Klonierungsvektoren und ihre Eigenschaften aufgeführt. Die Vektorkarten sind dem Anhang zu entnehmen.

Tab.10: **Klonierungsvektoren**

| Vektor | Beschreibung | Verwendungszweck |
|-----------|--|--|
| pCMVtag3A | Expressionvektor mit N-terminalem c-MYC Epitop und Kanamycinresistenz | Immunfluoreszenzexperimente mit FTSJ1 und PQBP1 |
| pBudCE4 | Expressionvektor mit zwei Klonierungsstellen. Die eine mit C-terminalem c-MYC Epitop, die andere mit C-terminalem V5 Epitop. Zeozinresistenz | Koimmunpräzipitation und Koimmunfluoreszenz mit PQBP1 und POU3F2 |

| Vektor | Beschreibung | Verwendungszweck |
|-----------|--|--|
| pYES2 | Expressionsvektor mit Galaktose induzierbarem Promotor | Komplementationsstudien mit FTSJ1 |
| pAE | Expressionsvektor mit konstitutivem Promotor | Komplementationsstudien mit FTSJ1 |
| pGEMTeasy | Klonierungsvektor | Klonierung von PCR-Produkten für die Sequenzierung |

2.1.8 Primer und DHPLC-Bedingungen für die Mutationsanalyse von *FTSJ1* und *PQBP1*

Für die Mutationsanalyse (s. Kapitel 2.2.4) wurden Primer ausgewählt, die in den jeweiligen flankierenden Intronsequenzen lokalisiert sind. In Tabelle 11 sind die Primer inklusive PCR-Bedingungen für die Mutationsanalyse von *FTSJ1* aufgelistet und in Tabelle 12 die für *PQBP1*.

Tab.11: Primer für die *FTSJ1* Mutationsanalyse

| Exon | Sense Primer Sequenz (5'-3') | Antisense Primer Sequenz (5'-3') | MgCl ₂ Konzentration | T _A (°C) | Produkt- größe in Bp |
|------|---------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|---------------------|----------------------------|
| 1a | GAA TCG CTG GCA ACT TGC GC | TCC GCC CGC ATT CCT GTC C | 2 mM | 64°C | 380 |
| 1b | CTA TTG AGG CAC GCC TGC AC | AGT TGC TTA CTC TGC CAT CC | 2 mM | 61°C | 400 |
| 2 | GTG GTA GCC CAT TCA TCT GG | AGT CAG CCC ACC TAC CAC AG | 2 mM | 62°C | 301 |
| 3 | GTT GGA GAA GTG GGT GCA G | GCC CAC ATC AGC CTA GTT TC | 3 mM | 63°C | 205 |

| Exon | Sense Primer Sequenz (5'-3') | Antisense Primer Sequenz (5'-3') | MgCl₂ Konzentration | T_A (°C) | Produkt- größe in Bp |
|-------------|---|---|---|---------------------------|-------------------------------------|
| 4 | GGA GCG AAA CTA GGC TGA TG | TGC ATA GAC CCC AGG TAA GG | 3 mM | 63°C | 195 |
| 5 | ATC TGA GGG CAG CAG CAG TGG | AGG GAG AGG CAG GGA GTA AC | 3 mM | 61°C | 247 |
| 6 | AAG ATG CAC AGA GCC AGA TG | GCA ATG TTC AGA GCC TGT GG | 3 mM | 60°C | 204 |
| 7 | AGT ATA TGC AGG CCC AGC TC | GGT GAG AAG GCA AAG ACA GC | 2 mM | 62°C | 244 |
| 8 | TGG TGG AGT AGA GGG AGG TC | TCA TAG CCC TGA CAG ACA GC | 4 mM | 62°C | 310 |
| 9 | GCT GTC TTT GCC TTC TCA CC | TTG CAT AAG GTG TGG CAG AG | 2 mM | 59°C | 368 |
| 10 | AGG CAT CCT GAC CTT GTC C | CTC CCA CCC ACC TAC TGT TG | 3 mM | 61°C | 181 |
| 11 | ACC ATC TCC CTA CCC CTC TG | TGG GTC AGA AAA AGG CAC AC | 3 mM | 60°C | 291 |
| 12 | CCT TTC CTG CCT CCC AAT AG | TTG CTC CCT GCT CTA TCT CC | 3 mM | 62°C | 393 |
| 13a | TAT GAT GGA GCT CCA CTG CA | TGG CTT CTA TCC AGG TTA AG | 3 mM | 58°C | 390 |
| 13b | CCT CTT CAG GAG TGT CCT G | TCT GCT TCA TTC CAA GAG G | 3 mM | 58°C | 302 |

| Exon | Sense Primer Sequenz (5'-3') | Antisense Primer Sequenz (5'-3') | MgCl ₂ Konzentration | T _A (°C) | Produkt- größe in Bp |
|------|---------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|---------------------|----------------------------|
| 13c | CAG TAC CTG GGA TTT TCC CAC | GCA GAA CCC TTT GGC ATC TG | 3 mM | 62°C | 314 |

Tab.12: Primer für die *PQBP1* Mutationsanalyse

| Exon | Sense Primer Sequenz (5'-3') | Antisense Primer Sequenz (5'-3') | MgCl ₂ Konzentration | T _A (°C) | Produkt- größe in Bp |
|------|------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|------------------------|-------------------------|
| 1a | TTC TGC CAT TTG TTC ATT GC | CCT CCA GCT CCA AAA GAG TG | 4 mM | 60°C | 226 |
| 1b | GGA TGA GCC CAT TTC TGA AG | TTT GAG GAT GCC TCT CTT GG | 3 mM | 60°C | 376 |
| 1 | TTT GTT CGT CTG TCC CTA GG | AAC AAA AGT GCC TGT CGA GG | 4 mM | 60°C | 163 |
| 2 | TCT CTA GGC TCT ACA TGT AG G | ACA ACC AAG GTC AGC ACA GG | 3 mM | 60°C | 248 |
| 3 | AAG AGT TGA GGA TCC AAG GC | TGA GAA CTG CTA AGA TCA CTC | 3 mM | 59°C | 218 |
| 4 | TCC TGG GGT GGC AAG AGG | AGT GCA CCC TGC ACC TTG | 2 mM | 59°C | 379 |
| 5 | GAG GGT GCT GTG GTA CAT GG | CAA TGA GGA ATG GAG GAA GG | 3.5 mM | 59°C | 248 |
| 6 | ACA TCA CCC ATC CCC ATC CC | TTG CCG ACT TGG GTT GGG C | 3 mM | 61°C | 298 |

| Exon | Sense Primer Sequenz (5'-3') | Antisense Primer Sequenz (5'-3') | MgCl ₂ Konzentration | T _A (°C) | Produkt- größe in Bp |
|------|----------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|------------------------|-------------------------|
| IVS4 | ATC GGG ACC GCG GGT ATG AC | TGG TGT CCA CGT ACT GAG TC | 3 mM | 63°C | 416 |
| IVS5 | TCT ATT GAA GAC TTTG CCC | TCT TGG CCT CAT TCC GC | 3 mM | 54°C | 273 |

Der Tabelle 13 und der Tabelle 14 kann man das Pufferverhältnis und die Temperaturbedingungen für die DHPLC-Analysen entnehmen.

Tab.13: Bedingungen für die DHPLC-Analyse für *FTSJ1*

| Exon | % Puffer B | | | Temperatur (°C) |
|------|-------------------|----------------------|-----------------------|--------------------|
| | Ladekonzentration | Initialkonzentration | Elutionskonzentration | |
| 1a | 56 | 59 | 69 | 64.0-64.9 |
| 1b | 58-53 | 61-56 | 71-66 | 55.0-64.0 |
| 2 | 54 | 57 | 67 | 62.0-62.8 |
| 3 | 49 | 52 | 62 | 65.0-65.5 |
| 4 | 48-50 | 51-53 | 61-63 | 61.8-64.8 |
| 5 | 51-52 | 54-55 | 64-65 | 61.0-63.0 |
| 6 | 48-50 | 51-53 | 61-63 | 61.8-64.2 |
| 7 | 51-52 | 54-55 | 64-65 | 63.1-63.9 |
| 8 | 53-54 | 56-57 | 66-67 | 63.5-64.8 |
| 9 | 54-56 | 57-59 | 67-69 | 62.8-64.4 |
| 10 | 48-49 | 51-52 | 61-62 | 61.2-62.7 |
| 11 | 53-54 | 56-57 | 66-67 | 62.0-64.8 |
| 12 | 56-57 | 59-60 | 69-70 | 55.4-55.8 |
| 13a | 56 | 59 | 69 | 56.6-57.8 |
| 13b | 54.3-53.8 | 57.3-56.8 | 67.3-66.8 | 54.9-56.4 |
| 13c | 54.6-53.1 | 57.6-56.1 | 67.6-66.1 | 53.2-55.0 |

Tab.14: Bedingungen für die DHPLC-Analyse für *PQBP1*

| Exon | % Puffer B | | | Temperatur (°C) |
|------|-------------------|----------------------|-----------------------|--------------------|
| | Ladekonzentration | Initialkonzentration | Elutionskonzentration | |
| 1a | 48-50 | 51-53 | 61-63 | 61.8-66.0 |
| 1b | 49-57 | 52-60 | 62-70 | 60.2-64.4 |
| 1 | 45-47 | 48-50 | 58-60 | 62.0-66.0 |
| 2 | 50-52 | 53-55 | 63-65 | 60.5-62.5 |
| 3 | 50-51 | 53-54 | 63-64 | 61.5-63.5 |
| 4 | 54-58 | 57-61 | 67-71 | 60.0-63.6 |
| 5 | 52 | 55 | 65 | 62.1 |
| 6 | 51-54 | 54-57 | 64-67 | 60.2-64.7 |
| IVS4 | 55-57 | 58-60 | 68-70 | 61.0-63.5 |
| IVS5 | 51-53 | 54-56 | 64-66 | 60.9-63.2 |

2.1.9 Primer für Expressionsanalysen

In Tabelle 15 sind die Primer und die PCR-Bedingungen für die RT-PCR Experimente für *FTSJ1* aufgeführt. In Tabelle 16 sind die Primer und das Primer/Competimer Verhältnis für die Expressionsanalyse von *NTNG1* mittels semiquantitativer RT-PCR aufgelistet.

Tab.15: RT-PCR Primer für *FTSJ1*

| Sense Primer Sequenz (5'-3') | Antisense Primer Sequenz (5'-3') | MgCL ₂ Konzentration | T _A (°C) | Produktgröße in Bp |
|---|--|------------------------------------|---------------------|-----------------------|
| Ex2for CTT CAA ACT GCT ACA ACT GG | Ex5rev TGG ATG ATC TCC TTG GCA G | 1,5 mM | 58°C | 238 |
| Ex7for ACA TTG CTA CAC ATG TCC TG | Ex10rev TCC AGC TGG TTG AAA TCT GG | 1,5 mM | 59°C | 250 |

Tab.16: Primer für semiquantitative RT-PCR für *NTNG1*

| Sense Primer Sequenz (5'-3') | Antisense Primer Sequenz (5'-3') | Primer/Competimer Verhältnis | T _A (°C) | Produktgröße in Bp |
|---|---|---------------------------------|---------------------|-----------------------|
| Ex4for AAC ATG GCA GCC CTA TCA GT | Ex5rev GAA TGT GAG CAC AAC ACT AC | 1:9 | 59°C | 455 |
| Ex1for ACC TGT CAA AGT CAC TGA TC | Ex2rev GAG TGA TCC TCA ATG TTC AC | 1:15 | 58°C | 261 |
| Ex7for GAA TGT CTG CGA CAA CGA GC | Ex7rev CAC AAT ATG CTC TGC AGC TG | 2:8 | 60°C | 475 |

In Tabelle 17 sind sowohl die Primer als auch ihre Bedingungen für die Herstellung von Sonden zur Detektion von *PQBP1* und *FTSJ1* mRNA aufgeführt.

Tab.17: Primer für Northern Blot Proben

| Name | Sense Primer Sequenz (5'-3') | Antisense Primer Sequenz (5'-3') | MgCl ₂ Konzentration | T _A (°C) | Produktgröße in Bp |
|----------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|---------------------|-----------------------|
| FTSJ1 NB | GAC GGA CGT CAA AGG ACA AG | AAC TGC GGT CCG AAT CAT AG | 3 mM | 60°C | 744 |
| PQBP1 NB Exon4 | AGA AAA GTT GGA CCG GAG CC | TTC TTG CTC TTG GGA TAG GG | 3 mM | 60°C | 256 |
| PQBP1 NB IVS4- Exon5 | TCG GTG AGA CCA ACA AGG TG | CTG CCG GTC AAA GAG TCA GG | 3 mM | 61°C | 457 |

2.1.10 Primer für X-Inaktivierungsstudien

In Tabelle 18 sind die Primer und Bedingungen aufgelistet, die bei der Analyse des X-Inaktivierungsstatus von *PQBP1* verwendet wurden.

Tab.18: Primer für X-Inaktivierungsstudien

| Name | Sense Primer Sequenz (5'-3') | Antisense Primer Sequenz (5'-3') | MgCL ₂ Konzentration | T _A (°C) | Produkt- größe in Bp |
|----------------|-----------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|---------------------|----------------------------|
| PQBP1 Ex1-3 | TTG GCC AAG AGA GGC ATC CTC | TGC TTC TCA GCT TCT TGG CC | 1,5 mM | 60°C | 233 |
| HPRT | TGG CGT CGT GAT TAG TGA TG | TAT CCA ACA CTT CGT GGG GT | 1,5 mM | 60°C | 502 |
| RPS4X | TAA AAT CGA TGG CAA GGT CC | CCG CCA GTC TTT TGT CTC TC | 1,5mM | 60°C | 543 |

2.1.11 Primer für *in vitro* Mutagenese

In Tabelle 19 sind die Primer aufgeführt, die bei der *in vitro* Mutagenese der Insertion 641C von *PQBP1* verwendet wurden.

Tab.19: Primer für *in vitro* Mutagenese

| Name | Primer Sequenz (5'-3') |
|----------|---|
| InsC for | CAT ACT CAG ACG CCC CCC CGG GGC ACG TGG TCA ACA |
| InsC rev | TGT TGA CCA CGT GCC CCG GGG GGG CGT CTG AGT AGT |

2.1.12 Primer zur Klonierung von *FTSJ1*, *PQBP1* und *POU3F2* in verschiedene Expressionsvektoren

Die Primer, ihre Bedingungen und die entsprechenden Restriktionsenzyme die zur Herstellung der betreffenden cDNA und ihrer anschließenden Klonierung in den jeweiligen Expressionsvektor verwendet wurden, sind in Tabelle 20 aufgelistet.

Tab.20: Klonierungsprimer

| Name | Sense Primer Sequenz (5'-3') | Antisense Primer Sequenz (5'-3') | MgCl ₂ Konzentration | T _A (°C) | Restriktions- enzyme |
|--------------------------------|---|--|------------------------------------|------------------------|---|
| FTSJ1 pCMVtag3A | TAC ATG GAT CCG ATG GGA CGG ACG TCA AAG GA | TAC ATG TCG ACT TAA GGT GAA CAA CTC ATT TCA TTG | 1,5 mM | 59°C | Sense Primer <i>Bam</i> HI; antisense Primer <i>Eco</i> RI |
| PQBP1 WT pCMVtag3A | TAC ATG AAT TCG ATG CCG CTG CCC GTT GCG | TAC ATG TCG ACG CAG GAT CAC CAG AAA GC | 3 mM | 60°C | Sense Primer <i>Eco</i> RI; antisense Primer <i>Sa</i> II |
| PQBP1 Del.AG pCMVtag3A | TAC ATG AA TCG ATG CCG CTG CCC GTT GCG | TAC ATG TCG ACT CAT ACC CGC GGT CCC GAT C | 3 mM | 60°C | Sense Primer <i>Eco</i> RI; antisense Primer <i>Sa</i> II |
| PQBP1 Del.AGAG pCMVtag3A | TAC ATG AAT TCG ATG CCG CTG CCC GTT GCG | TAC ATG TCG ACT TAC TGC CTT CTT GCT CTT GG | 3 mM | 60°C | Sense Primer <i>Eco</i> RI; antisense Primer <i>Sa</i> II |
| PQBP1 Ins.AG pCMVtag3A | TAC ATG AAT TCG ATG CCG CTG CCC GTT GCG | TAC ATG TCG ACT TAC TGC CTT CTT GCT CTT GG | 3 mM | 60°C | Sense Primer <i>Eco</i> RI; antisense Primer <i>Sa</i> II |

| Name | Sense Primer Sequenz (5'-3') | Antisense Primer Sequenz (5'-3') | MgCl ₂ Konzentration | T _A (°C) | Restriktions- enzyme |
|------------------------------|---|--|------------------------------------|------------------------|---|
| PQBP1 WT pBudCE4 | TAC ATG TCG ACA CTA TCA GCT ATG CCG CTG | TAC ATT CTA GAA TCC TGC TGC TTG GTT CG | 3 mM | 60°C | Sense Primer <i>SalI</i> ; antisense Primer <i>XbaI</i> |
| PQBP1 Del.AG pBudCE4 | TAC ATG TCG ACA CTA TCA GCT ATG CCG CTG | TAC ATT CTA GAT ACC CGC GGT CCC GAT C | 3 mM | 60°C | Sense Primer <i>SalI</i> ; antisense Primer <i>XbaI</i> |
| PQBP1 Del.AGAG pBudCE4 | TAC ATG TCG ACA CTA TCA GCT ATG CCG CTG | TAC ATT CTA GAC TGC CTT CTT GCT CTT GG | 3 mM | 60°C | Sense Primer <i>SalI</i> ; antisense Primer <i>XbaI</i> |
| PQBP1 Ins.AG pBudCE4 | TAC ATG TCG ACA CTA TCA GCT ATG CCG CTG | TAC ATT CTA GAC TGC CTT CTT GCT CTT GG | 3 mM | 60°C | Sense Primer <i>SalI</i> ; antisense Primer <i>XbaI</i> |
| POU3F2 pBudCE4 | TAC ATG GTA CCA TGG CGA CCG CAG CGT CTA AC | TAC ATC AGA TCT CTC TGG ACG GGC GTC TGC ACC | 3 mM | 62°C | Sense Primer <i>KpnI</i> ; antisense Primer <i>BglII</i> |
| FTSJ1 pYES2 | ATA TTA AGC TTG ATG GGA CGG ACG TCA AAG | ATA TAT CTA GAT TAA GGT GAA CAA CTC ATT TC | 1,5mM | 59°C | Sense Primer <i>BamHI</i> ; antisense Primer <i>SalI</i> |
| FTSJ1 pAE | ATA TTG GAT CCA TGG GAC GGA CGT CAA AG | ATA TAG TCG ACT TAA GGT GAA CAA CTC ATT TC | 1,5mM | 59°C | Sense Primer <i>HindIII</i> ; antisense Primer <i>XbaI</i> |

2.1.13 Primer für die Bruchpunktklonierung

In Tabelle 21 sind die Primer aufgelistet, die für die Bruchpunktklonierung nach Siebert et al., 1995 (s. Kapitel 2.2.9) verwendet wurden.

Tab.21: Primer für die Bruchpunktklonierung

| Name | Funktion | Sequenz (5'-3') |
|---|---|--|
| Adapter lang | Adapter | CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CTC GAG CGG CCG CCC GGG CAG GT |
| Adapter kurz (für Blunt- Enden mit *5'- Phosphatmodifikation) | Adapter | *ACC TGC CC |
| AP1 | Primer, der spezifische an den Adapter bindet (1.PCR) | GGA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC |
| AP2 | Primer, der spezifische an den Adapter bindet (Nested PCR) | TAT AGG GCT CGA GCG GC |
| Chr.1 spez. Primer 1 | Sequenzspezifischer Primer (1. PCR) für Bruchpunktklonierung | GAA ATT GTA AAA CCT GAT GAT TCT GAA C |
| Chr.1 spez. Primer 2 | Sequenzspezifischer Primer (Nested PCR) für Bruchpunktklonierung | CCT TAA ACT TAA GGC TAT ACA TTC AAC |
| Chr.1 spez. Primer vorwärts | Sequenzspezifischer Primer für die Bruchpunkt-überspannende PCR auf derivativen Chromosom 7 | AGC TAC CTA CTG GTG TGG TA |
| Chr.7 spez. Primer rückwärts | Sequenzspezifischer Primer für die Bruchpunkt-überspannende PCR auf derivativen Chromosom 7 | CAG ATG AAA GCG CCT TGA AG |

| Name | Funktion | Sequenz (5'-3') |
|---------------------------------|---|-------------------------------|
| Chr.7 spez. Primer vorwärts | Sequenzspezifischer Primer für die Bruchpunkt-überspannende PCR auf derivativen Chromosom 1 | AGG TAC AAC CTA ATT CTC TG |
| Chr.1 spez. Primer rückwärts | Sequenzspezifischer Primer für die Bruchpunkt-überspannende PCR auf derivativen Chromosom 1 | AAC CTG ATG ATT CTG AAC TG |

2.1.14 Datenbanken

In Tabelle 22 sind die Datenbanken aufgeführt, die für die *in silico* Analyse von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen benutzt wurden.

Tab.22: **Benutzte Datenbanken**

| Name | Internetadresse | Verwendungszweck |
|------------------------------|---|--|
| NCBI | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ | Blast, Alignment, Bestimmung des offenen Leserahmens |
| UniGene | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unigene | ESTs und Expressionsmuster |
| UCSC Human Genome Browser | http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway | Versionen: April 2003; Juli 2003 und April 2004 Bestimmung der Genstruktur |
| NIX Analysis | http://www.hgmp.mrc.ac.uk/Registered/Webapp/nix/ | Analyse genomischer Regionen |

| Name | Internetadresse | Verwendungszweck |
|---|---|---|
| Detection/prediction of GPI cleavage site (GPI-anchor) in a protein | http://129.194.185.165/dgpi/index_en.html | Nachweis der Erkennungssequenz, die zur Anheftung eines GPI-Ankers führen könnte |
| BCM Search Launcher | http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/multi-align.html | Aligment mehrerer Nukleotid- oder Proteinsequenzen, Reverse und Complement |
| XLMR Genes Update WebSite | http://xlmr.interfree.it/home.htm | Auflistung bisher bekannter Gene auf dem X-Chromosom, die in mutierter Form geistige Behinderung verursachen können |
| Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM | Auflistung aller mendelnden Erbkrankheiten |

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit dem QIAGEN Plasmid Mini Kit, bzw. mit dem QIAGEN Plasmid Maxi Kit nach den Angaben des Herstellers. Die Konzentration und Reinheit von präparierter DNA wurde anhand der Lichtabsorption bei den Wellenlängen 260 und 280 nm bestimmt. Das Absorptionsmaximum von DNA beträgt 260 nm, das von Proteinen 280 nm. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Die Verunreinigung der DNA mit Proteinen kann aus dem Verhältnis OD₂₆₀/ OD₂₈₀ bestimmt werden, welches bei reiner DNA bei 1,7 bis 1,9 liegt.

Die Präparation von genomischer DNA erfolgte aus lymphoblastoiden Zelllinien oder Fibroblasten. Diese Zellen wurden zuvor kultiviert und auf eine Zelldichte von 5×10^5 angereichert. Danach folgte eine Behandlung mit Trypsin/EDTA für 3 min bei 37°C, die Zellen wurden bei 300 rpm durch Zentrifugation pelletiert und mit PBS gewaschen. Der Zellaufschluß erfolgte über Nacht bei 37°C durch Zugabe von 1 ml Lysepuffer. Durch eine zusätzliche Zugabe von Proteinase K (50 µg/ml) wurden die Proteine abgebaut. Anschließend erfolgte eine Phenol-Chloroformextraktion. Dafür wurde die Nukleinsäureprobe mit dem äquivalenten Volumen eines Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol-Gemischs (25:24:1) versetzt. Nach der Durchmischung des Ansatzes und Phasentrennung durch Zentrifugation für 10 min bei 14000 rpm wurde die obere Phase abgenommen und mit einem äquivalenten Volumen an Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) eine Minute intensiv gemischt und erneut zentrifugiert. Die in der wässrigen Phase enthaltenen Nukleinsäuren präzipitierten unter Einwirkung von Isopropanol, wodurch zugleich Chloroform-Reste entfernt werden konnten. Danach wurde das DNA-Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und schließlich in TE-Puffer resuspendiert. Restriktionverdaus und Ligationen wurden nach Angaben des Herstellers (meist New England Biolabs) durchgeführt. Agarosegelelektrophoresen, die Färbung von DNA mit Ethidiumbromid sowie die Herstellung elektrokompetenter und hitzekompetenter Zellen wurden nach den von Sambrook *et al.* (1989) beschriebenen Standardmethoden durchgeführt.

Die Elektroporation von kompetenten Zellen zur Transformation mit rekombinaten Plasmiden erfolgte mit dem Easyject von Equibio nach Angaben des Herstellers. Für eine Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde das QIAquick Gel Extraction Kit benutzt, und die Reinigung von PCR-Produkten erfolgte über das QIAquick PCR Purification Kit (beide von Qiagen) nach den Angaben des Herstellers.

Alle DNA Proben wurden in TE Puffer aufgenommen.

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Durch die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) lassen sich geringste Mengen an DNA vervielfältigen. Dabei amplifiziert das hitzestabile Enzym DNA-Polymerase ein durch zwei entgegengerichtete Primer begrenztes DNA-Fragment in hintereinander geschalteten Zyklen. Ein Zyklus besteht aus drei temperaturabhängigen Schritten: Denaturierung des Doppelstranges (95°C), Anlagerung der Primer an komplementäre Einzelstrangsequenzen bei primer-abhängiger Hybridisierungstemperatur (50-65°C) und Synthese des jeweils komplementären Stranges ausgehend von jedem Primer bei 72°C.

Ein üblicher PCR Ansatz enthielt in einem Volumen von 50 µl:

2 Units DNA-Polymerase, 1x PCR-Puffer, 250 µM dNTP, 1 µM Primer 1, 1 µM Primer 2, DNA (Plasmid-DNA oder chromosomale DNA), 10 mM MgCl₂ und bidestilliertes Wasser.

2.2.3 Reverse-Transkription

Die Reverse Transkriptase (RT) ist ein Enzym, das entsprechend zum RNA Template einen komplementären Strang synthetisieren kann. Das resultierende Produkt wird als cDNA bezeichnet. In dieser Arbeit wurde für die RT-Reaktion Gesamt-RNA verwendet, die zuvor aus lymphoblastoiden Zelllinien oder Fibroblasten präpariert wurde. Die Isolation von Gesamt-RNA erfolgte mit dem TRIZOL® Reagenz nach Vorschrift des Herstellers (GibcoBRL).

Zur Herstellung von cDNA wurde zu 1 µg RNA 1 µl Oligo(dT)-Adaptor-Primer (50 µM) gegeben und auf 13 µl mit Reinst-Wasser aufgefüllt. Nach 5 min bei 70°C wurde der Versuchsansatz sofort auf Eis gestellt. Anschließend wurden 5 µl 5x Reaktionspuffer, 0,5 µl dNTPs (10mM dNTP Mix) und 1 µl Superscript III Reverse Transkriptase (Invitrogen) zugegeben und mit Wasser auf 25 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 1 h bei 50°C inkubiert und die Reaktion anschließend durch Erhitzen (70°C für 15 min) gestoppt. Die resultierende cDNA konnte nun für PCRs verwendet werden.

2.2.4 Mutationanalyse mittels DHPLC

Diese Mutationsanalyse beinhaltet die Vervielfältigung (mittels PCR) der einzelnen Exone der untersuchten Gene mit Primern (s. Tabelle 11 und 12) in den flankierenden Intronsequenzen und die anschließende Analyse dieser PCR-Produkte durch die *Denaturing High Pressure Liquid Chromatography* (DHPLC). Physikalisch beruht die DHPLC auf dem Prinzip des veränderten Laufverhaltens eines DNA-Heteroduplexes. Ein Heteroduplex besteht aus zwei komplementären DNA-Einzelsträngen, die auf Grund einer Mutation an einer bestimmten Position in einem der beiden Stränge eine einzelsträngige Region bilden, welche das elektrophoretische oder chromatographische Laufverhalten des Heteroduplexes im Vergleich zu dem der Homoduplexe verändert. Bei der DHPLC werden die DNA-Fragmente mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) analysiert (O'Donovan et al., 1998) und die Absorption gemessen. Nukleotidaustausche äußern sich in einem veränderten Elutionsverhalten, das sich bei der photometrischen Auswertung in einem veränderten Absorptionsspektrum äußert und bei der graphischen Darstellung eine Verschiebung des *Peaks* zur Folge hat. Bei der Mutationsanalyse in der vorliegenden Arbeit wurden jeweils 20 µl der PCR-Ansätze, die auf der DNA zweier männlicher Patienten amplifiziert wurden gemischt und bei 95°C für 5 min denaturiert. Anschließend fand ein *Reannealing* für 10 min bei Raumtemperatur statt. Diese DNA-Duplices wurden in die Säule der DHPLC Apparatur injiziert und unter Verwendung eines Aceton-Nitril Gradienten mit einer Durchflußrate von 0,9 ml/min eluiert. Während der Prozedur des Ladens des PCR-Produktes, des Waschens und der letztendlichen Elution des PCR-

Produktes wurde ein Aceton-Nitril-Puffer verwendet mit entsprechend unterschiedlichen Anteilen von Puffer A und Puffer B (s. Tabelle 13 und 14). Die Ladekonzentration des Aceton-Nitril-Puffers hat den geringsten Anteil von Puffer B. Bei der Initialkonzentration des Aceton-Nitril-Puffers steigt der Anteil von Puffer B und bei der Elutionskonzentration ist der Anteil von Puffer B am größten. Die entsprechenden Verhältnisse der beiden Puffer zueinander und das Schmelzprofil der PCR-Fragmente wurde mit dem Transgenomic WAVEMAKER® Programm (Version 4.1) berechnet. Konnte ein abweichendes Elutionsprofil beobachtet werden, wurde das entsprechende PCR-Produkt erneut mit der DNA des Patienten amplifiziert, auf einem Agarosegel separiert, mit dem QIAquick Gel Extraction Kit aufgereinigt und sequenziert.

2.2.5 Analyse des X-Inaktivierungsstatus spezifischer Gene

Der X-Inaktivierungsstatus von *PQBP1* wurde durch RT-PCR Analysen auf cDNA untersucht. Dazu wurde Gesamt-RNA aus Hamsterhybridzelllinien isoliert (s. Kapitel 2.2.3). Bei den Hamsterhybridzelllinien handelt es sich um zwei unterschiedliche Zelllinien. Eine trägt ein inaktives humanes X-Chromosom und die andere ein aktives humanes X-Chromosom. Auf den cDNAs der Hamsterhybridzellen werden anschließend 3 verschiedene PCR-Produkte mittels RT-PCR amplifiziert. Als Positivkontrolle werden spezifische Primer für *RPSX4* (Tab.18) verwendet, das der X-Inaktivierung entkommt. Als Negativkontrolle wurden spezifische Primer für *HPRT* (Tab.18) verwendet, welches der X-Inaktivierung unterliegt. Das *PQBP1* Gen wurde mit spezifischen Primern (Tab.18) amplifiziert. Die Amplifikate wurden anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen und ausgewertet.

2.2.6 Northern Blot

Für die Northern Blot Analysen wurden entweder käufliche Multiple Tissue Blots (BD Biosciences, Heidelberg) oder selbst hergestellte PolyA⁺ Northern Blots verwendet.

Die PolyA⁺ RNA wurde mittels Oligo(dT) Dynabeads® (DYNAL) nach Anweisung des Herstellers über einen Magneten von der ribosomalen RNA getrennt. Anschließend wurde diese PolyA⁺ RNA auf einem 1%igen Agarosegel, das Formamid und MOPS enthält, separiert. Die aufgetrennte PolyA⁺ RNA wurde aus dem Agarosegel durch Blotting mittels Kapillarkräften auf eine Hybond XL Membran (Amersham) transferiert und durch UV-Crosslinking fixiert.

Die Prähybridisierung der Northern Blots wurde unter Verwendung von ULTRAhyb (Ambion) durchgeführt.

Als Sonden wurden PCR-Produkte (s. Tabelle 17) verwendet, die auf cDNA amplifiziert worden sind. Diese PCR-Sonden wurden mit [α -³²P] dCTPs radioaktiv markiert, wobei die Markierung unter Verwendung von Hexanukleotiden und einem dNTP-Mix ohne dCTP's mittels Klenow Fragment für 1 Stunde bei 37°C stattfand. Die nicht eingebauten Nukleotiden wurden durch Fraktionierung über eine Sephadex G50-Säule (Amersham-Pharmacia-Biotech) nach Angaben des Herstellers abgetrennt. Die radioaktiv markierte Probe wurde zu der Prähybridisierungslösung gegeben, und es wurde eine Hybridisierung bei 42°C über Nacht durchgeführt. Danach wurde die Membran 2x für 10 min in NB Waschpuffer 1 und bei Bedarf für 1x 20min bei 60°C in Waschpuffer 2 (s. Tabelle 8) gewaschen. Die verbleibende Radioaktivität der Blots sollte größer als 20 cps sein.

Die Membran wurde auf einer Phosphoimager-Platte über Nacht exponiert, und die Signale wurden am Phosphoimager (Molecular Dynamics Storm 860 Phosphoimager) ausgewertet.

2.2.7 Southern Blot

Für die Southern Blot Analyse wurde genomische DNA (18µg pro Ansatz) gereinigt, mit Restriktionsendonukleasen verdaut und mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (s. Kapitel 2.2.1). Zur Depurinierung der DNA wurde das Gel zunächst für 15 min in 250 mM HCl und für 15 min in Wasser geschwenkt und anschließend zur Denaturierung für 30 min in 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl und zur Neutralisation für 30 min in 0,5 M Tris/HCl; pH 7,5/1,5 M NaCl geschüttelt. Der Transfer der DNA auf eine Roti+ Nylonmembran (Roth) wurde mit 10x SSC mit einer Dauer von 16h durchgeführt. Danach wurde die DNA mittels UV Crosslinking auf der Membran fixiert.

Die sich anschließende Präybridisierung fand in PEG-Puffer mit denaturierter Heringssperma-DNA für 1h statt.

Die DNA Sonden wurden radioaktiv mit [α -³²PdCTP], nach der gleichen Vorgehensweise wie bei den Sonden für die Northern Blot Analyse (s. Kapitel 2.2.6), markiert. Zu der markierten Sonde wurde Hybridime (10 µg/ml) gegeben, der Ansatz wurde denaturiert und in die Präybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung fand bei 65°C für 16h statt. Anschließend wurde die Membran mehrmals mit dem SB Waschpuffer bei 65°C gewaschen bis die Membran eine verbleibende radioaktive Aktivität von 5-15 cps aufwies. Die Membran wurde anschließend mit einem BIOMax Film (Kodak) für 2-3 Tage bei -80°C exponiert und in einer Entwicklermaschine (Curix 60 von AGFA) entwickelt.

2.2.8 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Diese Technik ermöglicht es, strukturelle Veränderungen der Chromosomen, wie beispielsweise Translokationen, auf molekularer Ebene nachzuweisen. Die Methode beruht darauf, daß spezifische, fluoreszenzmarkierte Nukleotidsequenzen einer Sonde an die komplementären Nukleotidsequenzen des Chromosoms hybridisieren.

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung wurde in diesem Fall mit Biotin oder Digoxigenin markierten DNA-Sonden auf Metaphasechromosomen der Patientin

durchgeführt. Die Metaphasechromosomen wurden aus Blutzellen gewonnen. Menschliches Blut wurde mit Lymphozyten-Kulturmedium für 72h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 10 µg/ml Colcemid zugegeben und erneut für 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde eine Chromosomenpräparation (5 mM KCl hypotoner Schock; Methanol-Eisessig-Fixierung) durchgeführt.

Bei den verwendeten DNA-Sonden handelte es sich um PAC- und BAC- Klone, die aus der Sammlung des *UCSC Golden Path* stammen. Der Einbau von Digoxigenin bzw. Biotin erfolgte durch Nick-Translation (Rigby et al., 1977). Der anschließende Nachweis der markierten Sonden erfolgte entweder durch den Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper Avidin-FITC (Fluorescein-5-Isothiocyanat) oder für Biotin markierte Sonden mit Anti-Digoxin-Cy3 (Wirth et al., 1999). Fluorophore sind organische Moleküle, die durch die Absorption von Photonen einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden. Bei der Rückkehr in ihren Grundzustand emittieren sie Energie in Form von Photonen, die über ein Fluoreszenzmikroskop als Signal detektiert werden können.

2.2.9 Bruchpunktklonierung

Durch die Southern Blot Analyse kann der chromosomale Bruchpunktbereich auf etwa 500 bis 1000 Basenpaare eingegrenzt werden. Allerdings ist zu diesem Zeitpunkt nur die Sequenz der Bruchpunktregion des Chromosoms bekannt, das mittels Southern Blot Analyse untersucht worden ist. Um auch die Sequenz des anderen, an der chromosomalen Umstrukturierung beteiligten Chromosoms und damit eine exakte Bestimmung des Bruchpunktes auf Nukleotidebene zu erhalten, wurde eine Bruchpunktklonierung nach Siebert et al., 1995 durchgeführt. Dafür wurde die Patienten DNA mit einem spezifischen Restriktionsenzym (in diesem Fall *DraI*) verdaut und anschließend durch Ethanolpräzipitation gereinigt und gefällt. Durch Alkohol-Fällungen werden Nukleinsäuren aufkonzentriert und gleichzeitig von unerwünschten Pufferkomponenten befreit. Die Nukleinsäurelösung wurde mit 0,05 bis 0,1 Volumenanteilen 3 M Natriumacetat (pH 4.8) und 2 bis 2,5 Volumenanteilen eiskaltem Ethanol versetzt. Der Ansatz mußte entweder über Nacht bei -20°C inkubiert werden. Anschließend konnten

die Nukleinsäuren abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit Ethanol gewaschen werden und schließlich in TE-Puffer aufgenommen werden.

Die verwendeten Adaptoren (in diesem Fall Adapter lang und Adapter kurz) wurden hybridisiert (s. Tab. 21), und es fand eine Ligation mit den Adaptoren und der verdauten DNA statt. Die Adaptoren binden spezifisch an die Restriktionschnittstellen der mit *DraI* verdauten DNA und erlauben die Bindung der Adapterprimer (s. Tab. 21). Diese Adapterprimer ermöglichen die Amplifikation des Bruchpunktfragmentes mit einem sequenzspezifischen Primer, der in der bereits bekannten Sequenz des einen Chromosoms bindet, während der adapterspezifische an den Adapter bindet und somit auch die Amplifikation des unbekanntes Sequenzabschnittes des zweiten Chromosoms ermöglicht. Die Amplifikation wird durch zwei PCRs erlangt. Bei der zweiten PCR handelt es sich um eine *nested* PCR, die es ermöglicht, die meist geringen Mengen des ersten Amplifikats spezifisch zu vervielfältigen. Anschließend wurde das PCR Produkt über Agarosegel-Extraktion aufgereinigt (s. Kapitel 2.2.1), in den pGEM-TEasy™ Vektor kloniert und sequenziert (s. Kapitel 2.2.10).

2.2.10 Sequenzierung

Die Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmiden wurde mit dem ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit (APPLIED BIOSYSTEMS) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte nach dem Prinzip der „Kettenabbruchmethode“ nach Sanger (Sanger et al., 1977) unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten dNTPs (Lee et al., 1992). Die anschließende Sequenzierung (Auftrennung über Kapillaren und Detektion der Fluoreszenzsignale) wurde von der Servicegruppe des MPI auf einem ABI PRISM 377 DNA Sequencer durchgeführt.

2.2.11 *In vitro* Mutagenese

In das Plasmid pCMVtag3A-PQBP1WT wurden mittels *in vitro* Mutagenese folgende Mutation eingefügt: 641insC. Die Mutagenese wurde mit Hilfe des QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.12 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese lassen sich Proteine ihrer Größe nach in einer Polyacrylamidmatrix auftrennen. Durch Inkubation der Proteine mit dem stark anionischen Detergenz SDS (in Verbindung mit einem Reduktionsmittel (DTT oder β -Mercaptoethanol) und hoher Temperatur) werden diese vollständig denaturiert und dissoziiert. Durch die Bindung an das SDS erhalten die Proteine eine negative Ladung. Dadurch wandern sie im Polyacrylamidgel bei der elektrophoretischen Auftrennung entsprechend ihrer Größe zum positiven Pol. Im Wesentlichen diente die Methode von Laemmli (1970) als Grundlage hierfür. Vor dem Auftagen auf das Gel wurden die Proben mit 5 μ l SDS-PAGE-Puffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Die SDS-Gelelektrophorese wurde in einer Mini-PROTEAN III-Apparatur von BioRad durchgeführt. Ein feinporiges 20%iges Trenngel (s. Tabelle 23) wurde dabei von einem großporigen 5%igen Sammelgel (s. Tabelle 24) überschichtet. Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA pro Gel und 200V Spannung. Die Gele wurden für die Westernblot-Analyse weiter verwendet.

Tab.23: Zusammensetzung des Trenngels

| Komponente | Volumen (in ml) zur Herstellung von 5ml Trenngel |
|---|--|
| H ₂ O | 2,6 |
| Acrylamid/bis-Acrylamid 37,5:1 Mix (Roth) | 1,0 |
| 1,5M Tris (pH8,8) | 1,3 |
| 10% SDS | 0,05 |
| 10% APS (Biorad) | 0,05 |
| TEMED (GibcoBRL) | 0,004 |

Tab.24: Zusammensetzung des Sammelgels

| Komponente | Volumen (in ml) zur Herstellung von 5ml Trenngel |
|---|--|
| H ₂ O | 0,68 |
| Acrylamid/bis-Acrylamid 37,5:1 Mix (Roth) | 0,17 |
| 1,5M Tris (pH6,8) | 0,13 |
| 10% SDS | 0,01 |
| 10% APS (Biorad) | 0,01 |
| TEMED (GibcoBRL) | 0,001 |

2.2.13 Immunoblot (Western Blot)

Mit diesem Verfahren werden die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylindendifluorid (PVDF)-Membran transferiert, auf der sie mit spezifischen Antikörpern detektiert werden können. In dieser Arbeit wurden die SDS-Gele nach dem Gellauf für 15 min in 1xBlotting-Puffer (mit 20% Methanol) gelegt. Die PVDF-Membranen (Roche) wurden wie folgt vorbereitet: 2 sek in Methanol, 2 min in Wasser, 15 min in Blotting-Puffer. Whatman Papier (Biorad) wurde kurz in Blotting-Puffer getaucht.

Im Anschluß daran wurde der Blot folgendermaßen in einer Trans-Blot SD Semidry Transfer Cell (Biorad) aufgebaut:

- (Kathode)

Whatman Papier (3 Lagen)

Gel

PVDF-Membran

Whatman Papier (3 Lagen)

+ (Anode)

Es wurde bei 20V für 30 min geblottet.

Im Anschluss daran wurde die Membran zum Blocken in 5% Milchpulver in PBST gelegt und für 30 min bei RT inkubiert. Nun erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in PBST+1% BSA (Verdünnung nach Angaben des Herstellers) bei 4°C für 16h. Anschließend wurde 3x für 5 min mit PBST gewaschen. Darauf folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Verdünnung nach Angaben des Herstellers) in PBST für 30 min. Nach erneutem 3x Waschen für jeweils 5 min erfolgte die Detektion mit Western Lightning Chemiluminescence Reagent (Perkin Elmer) nach den Angaben des Herstellers.

2.2.14 Transfektion von eukaryotischen Zellen mit Plasmiden

Bei der transienten (ohne Selektionsdruck) Transfektion von eukaryotischen Zellen mit Plasmid-DNA kann mit Hilfe von positiv geladenen polykationischen Lipiden die Komplexierung und Aufnahme der negativ geladenen DNA in die Zellen erleichtert werden. Hierfür wurde das Polyfect Transfektionsreagenz (QIAGEN) sowie das für Polyfect optimierte Medium Opti-MEM von GibcoBRL verwendet. Polyfect ist ein sogenanntes Dendrimer (ein Polymer mit einer symmetrisch fraktalen, räumlichen Struktur), an dessen verzweigten Enden geladene Aminosäuren gebunden sind, die mit der negativ geladenen DNA interagieren. DNA und Polyfect bilden kompakte Strukturen, die an die Zelloberflächen binden und über unspezifische Endozytose in die Zellen aufgenommen werden.

Die Transfektion erfolgte nach Angaben des Herstellers. Für die Immunfluoreszenzexperimente wurden 1,5 µg DNA pro Deckgläschen, und für die

Transfektion von Zellkulturflaschen (Oberfläche: 150 cm²) wurden 24 µg DNA pro Zellkulturflasche, verwendet.

2.2.15 Immunfluoreszenz

Einen Tag vor der Transfektion wurden 1x10⁵ Zellen pro *well* in eine 6-*well*-Platte ausgesät. Die Zellen wurden wie oben beschrieben transfiziert und nach 24 bis 48 Stunden mit 1,2x PEM gewaschen. Anschließend erfolgte eine Fixierung mit 3,7% Paraformaldehyd in 1,2x PEM für 10 min bei RT. Nach dem Waschen mit PBS wurden sie mit 0,2% TritonX100 in PBS für 10 min bei RT permeabilisiert. Daraufhin wurde 4 mal für je 3 min mit PBS gewaschen. Im Anschluß daran erfolgte das Abblocken unspezifischer Bindungsstellen mit 1% BSA in PBS für 20 min bei RT. Daraufhin wurde eine Inkubation mit dem primären Antikörper in PBS+1%BSA nach Angaben des Herstellers über Nacht durchgeführt. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit dem sekundären Antikörper in PBS (Verdünnung nach Herstellerangaben) für 30min bei RT inkubiert. Die Zellen wiederum mit PBS gewaschen und in Mounting-Medium (enthält DAPI) eingebettet. Die Signale wurden anschließend unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops (Zeiss) ausgewertet.

2.2.16 Zellysate für die Immunopräzipitation

Die zu lysierenden, transfizierten Zellen wurden ein Mal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 200 µl kaltem Zellysis-Puffer (10 mM Tris/Hcl pH7,8, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Nonidet p-40, 1mM PMSF und einem Protease Inhibitor Cocktail) inkubiert. Der Aufschluß der Zellen erfolgte durch den Zellysis-Puffer und Verwendung einer 21 µm Nadel. Die DNA und Zellwandbestandteile wurden durch Zentrifugation entfernt. Der Überstand mit den Proteinen wurde abgenommen und für die Koimmunpräzipitation eingesetzt. Die Konzentration der Proteine wurde mittels Bradford-Assay gemessen.

2.2.17 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Bradford-Assay verwendet. Bei der Bindung von Coomassie brilliant blue G-250 an Proteine im sauren Milieu verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes (465nm ohne Protein, 595nm mit Protein). Die Änderung der Absorption bei 595nm ist proportional zu der an den Farbstoff gebundenen Proteinmenge. Zunächst wurde eine Eichreihe erstellt. Dazu wurde BSA in 1:1000 verdünntem Probenpuffer auf die folgenden Konzentrationen verdünnt: 1µg/ml, 2µg/ml, 4µg/ml, 5µg/ml, 7,5µg/ml, 10µg/ml. Die Proben wurden 1:1000 in H₂O verdünnt. Je 80µl der BSA-Verdünnungen bzw. der verdünnten Proben wurden mit 20µl Bradford-Reagenz (Sigma) gemischt und in eine Mikrotiterplatte (Falcon) pipettiert. Die Messung der Absorption bei 595nm erfolgte im Spektralphotometer (Anthos 2020). Die Proteinkonzentration der Proben wurde über eine Standardkurve bestimmt.

2.2.18 Koimmunpräzipitation von Proteinen

Mittels Koimmunpräzipitation können Proteine bzw. Proteinkomplexe aufgereinigt und angereichert werden. Das zu reinigende Protein wird an einen Antikörper gekoppelt. Über diesen Antikörper kann das Protein dann an die Protein A-Agarose Kügelchen binden.

Protein-A ist ein Protein der bakteriellen Zellwand aus *Staphylococcus aureus*, das eine hohe Affinität zur Fc-Region vieler Immunglobuline der Säuger besitzt. Somit bietet sich dieses Protein zur Aufreinigung und Anreicherung von Immunkomplexen an, da nach der Bindung des Fc-Teils der Fab-Anteil weiterhin für die Antigenbindung verfügbar ist.

Zur Immunpräzipitation der gewünschten Proteine wurden wie bereits beschrieben Zellysate hergestellt (s. Kapitel 2.2.16). Es wurde jeweils 1 mg Protein in 1ml Lysispuffer verdünnt. Zunächst wurde ein *Precleaning* durchgeführt, das unspezifische Bindungen an die Protein-A-Agarose verhindern sollte. Dafür wurden 50 µl Protein-A-Agarose zu dem 1ml Ansatz zugegeben und für 1h bei 4°C inkubiert. Nach Abzentrifugation der Protein-A-Agarose wurde zu dem Überstand

1-2 µg Antikörper gegeben und der Ansatz wurde über Nacht in einem Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 75µl Protein-A-Agarose zugegeben und weitere 2h bei 4°C inkubiert. Die Protein-A-Agarose an die nun der Antikörper mit dem Zielprotein und dem Interaktionspartner des Zielproteins gebunden sind, wurde 3 mal gewaschen, das Pellet in 20 µl Lysispuffer aufgenommen, mit 5x SDS-PAGE-Puffer (5 µl) und 1 M DDT (3,8 µl) versetzt und 5min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurde die Protein-A-Agarose abzentrifugiert und der Überstand, in dem sich der Proteinkomplex befindet, auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Anschließend wurde ein Westernblot durchgeführt mit einem Antikörper spezifisch für das Epitop des überexprimierten Interaktionspartner des Proteins, welches über die Bindung an die Protein-A-Agarose aus dem Proteinmix isoliert wurde.

2.2.19 Komplementationsstudien in *S. cerevisiae*

Zur Identifizierung des möglichen funktionellen Homologs des humanen FTSJ1 Proteins wurden verschiedene *S. cerevisiae* Deletionsstämme mit Expressionsvektoren, in die die cDNA des humanen *FTSJ1* kloniert worden ist, transformiert. Bei den Deletionsstämmen handelt es sich um Stämme bei denen die transkriptionelle Einheit eines der drei paralogen Gene zu FTSJ1 durch Insertion des Kanamycin Resistenzgens zerstört wurde (s. Tabelle 25). Außer bei dem SPB1 Deletionsstamm handelt es sich um einen homozygoten *Knockout* der jeweiligen Gene.

Tab.25: *S. cerevisiae* Stämme

| Accession Nr. | Deletiertes Gen | Genotyp |
|--------------------------------------|-----------------|---|
| YBL4409 (Pintard et al., 2002) | <i>trm7Δ</i> | BMA64; MAT α <i>trm7Δ::TRP1</i> ; <i>ade2</i> , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>trp1-Δ</i> , <i>ura3</i> , <i>can1-100</i> |

| Accession Nr. | Deletiertes Gen | Genotyp |
|-----------------------------------|---|--|
| YBL4363 (Pintard et al., 2002) | <i>trm7Δ</i> + pBL579 (TRM7) | BMA64; MAT α <i>trm7Δ::TRP1</i> ; <i>ade2</i> , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>trp1-Δ</i> , <i>ura3</i> , <i>can1-100</i> |
| YBR061c (Euroscarf) | <i>trm7Δ</i> | BY4743; Mat a/ ; <i>his3 1/his3 1</i> ; <i>leu2 0/leu2 0</i> ; <i>lys2 0/LYS2</i> ; MET15/ <i>met15 0</i> ; <i>ura3 0/ura3 0</i> ; YBR061c::kanMX4/YBR061c |
| Y23461 (Euroscarf) | <i>spb1Δ/spb1</i> | BY4743; Mat a/ α ; <i>his3Δ1/his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0/leu2Δ0</i> ; <i>lys2Δ0/LYS2</i> ; MET15/ <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0/ura3Δ0</i> ; YCL054w::kanMX4/YCL054w |
| Y04503 (Euroscarf) | <i>mrm2Δ</i> | BY4743; Mat a/ α ; <i>his3Δ1/his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0/leu2Δ0</i> ; <i>lys2Δ0/LYS2</i> ; MET15/ <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0/ura3Δ0</i> ; YGL136c::kanMX4/YGL136c |
| Y00000 | Kein Gen deletiert \Rightarrow Wildtypstamm | MATa; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> |

Die *FTSJ1* cDNA wurde entweder in den Expressionvektor pAE mit einem konstitutiven Promotor oder in den Expressionvektor pYES2 mit einem Galaktose-induzierbaren Promotor kloniert (verwendete Primer siehe Tabelle 20). Anschließend wurden sie in den entsprechenden Hefestamm mittels der *Modified Lithium Acetate Yeast Transformation* Methode (Kaiser et al., 1994) transformiert. Der Einbau des Plasmids verleiht den Zellen eine URA Prototrophie, was eine Selektion auf Uracil-defizientem Medium ermöglicht. Anschließend wurde eine Kolonie gepickt und über Nacht in Uracil-defizientem Flüssigmedium bei 30° inkubiert. Die Zellsuspensionen der transformierten Stämme und Kontrollen wurden anschließend auf eine OD von 0,3 bei 600nm eingestellt. Anschließend wurde von dieser Suspension eine Verdünnungsreihe hergestellt, bei der jeweils eine Verdünnung um 1:5,4 angefertigt wurde. Insgesamt wurden 5

Verdünnungsschritte durchgeführt, die auf Feststoffmedien aufgestempelt worden sind. Bei der letzten Verdünnung der Suspension sollte idealerweise nur noch eine Kolonie bei der Positivkontrolle wachsen. Durch die Einstellung auf die gleiche OD und eine identische Verdünnungsreihe ist es möglich, das Wachstum unterschiedlicher Hefestämme zu vergleichen.

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 Dismorphien 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.

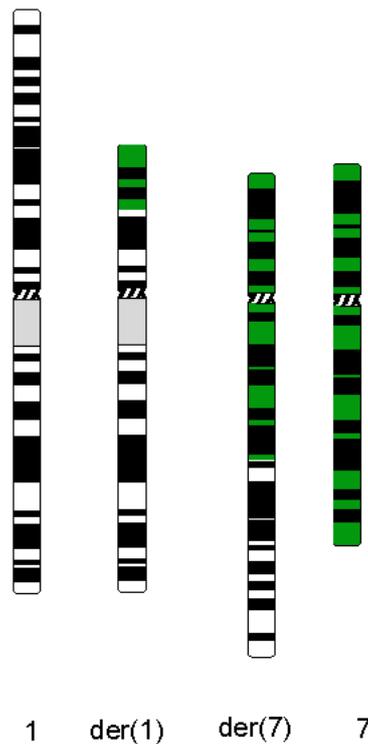


Abb. 3: **Ideogramm** der normalen Chromosomen 1 (weiß) und 7 (grün) und der derivativen Translokationschromosomen der(1) und der(7) der Patientin mit dem Karyotyp 46,XX,t(1;7)(p13.3;q31.3)

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

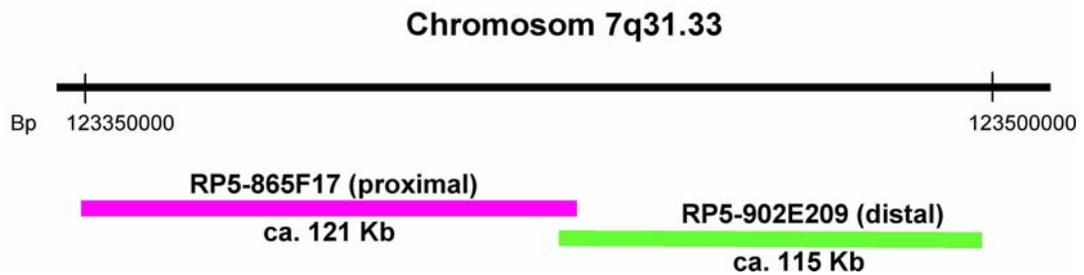


Abb.4: **Schematische Darstellung der Bruchpunktregion von Chromosom 7:** Lokalisierung des proximalen PAC Klons RP5-865F17 (AC006010) und des distalen PAC Klons RP5-902E20 (AC006148) auf Chromosom 7

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).

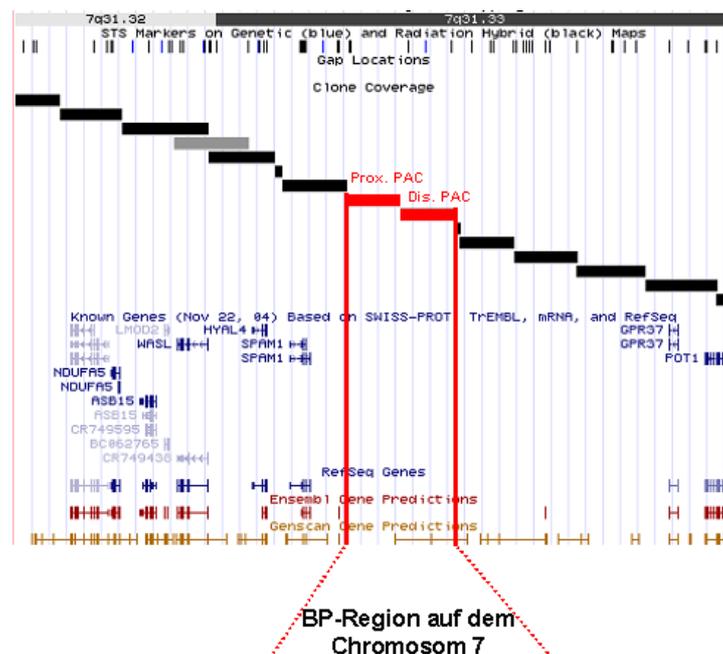
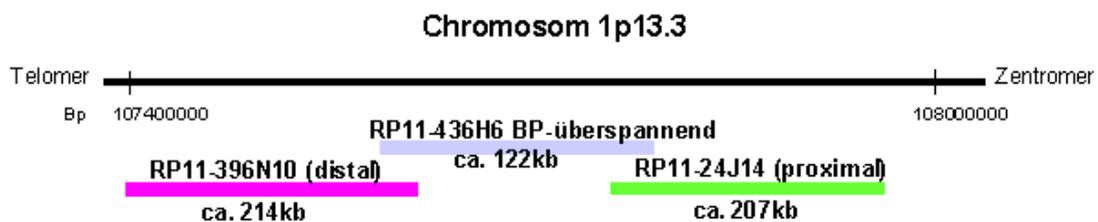


Abb.5: **Ausschnitt aus der Bruchpunkt-Region von Chromosom 7.** Der proximale PAC Klon und der distale PAC Klon sind rot hervorgehoben und die genomische Region auf dem Chromosom 7, die diese beiden PAC Klone überspannen, ist ebenfalls rot gekennzeichnet. Bekannte Gene sind in blau dargestellt.

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

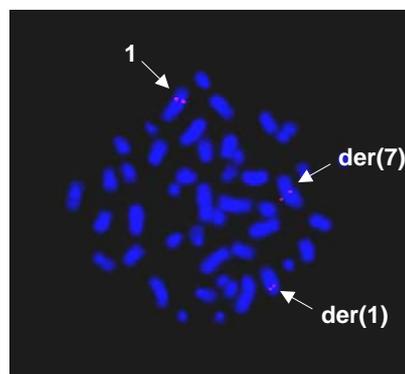


Abb.6: **A: Schematische Darstellung der Bruchpunktregion von Chromosom 1** Lokalisierung des proximalen BAC Klons RP11-24J14 (AC016085), des distalen BAC Klons RP11-396N10 (AL590427) und des Bruchpunkt-überspannenden BAC Klons RP11-436H6 (AL513187) auf Chromosom 1.

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).

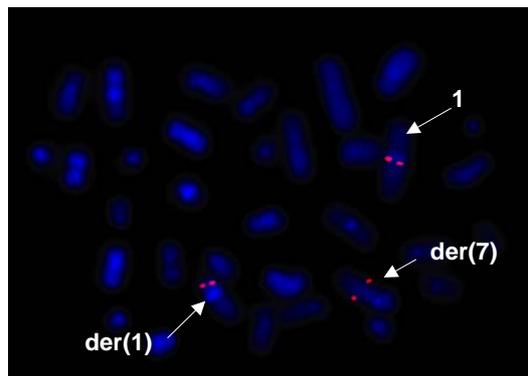


Abb.7: **Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung des BAC Klons RP11-24J14** auf Metaphase-Chromosomen der Patientin. Auch dieser BAC Klon zeigt Signale auf dem normalen Chromosom 1, dem derivativen Chromosom 1 und dem derivativen Chromosom 7 und ist somit ebenfalls Bruchpunkt-überspannend. Die Signale sind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

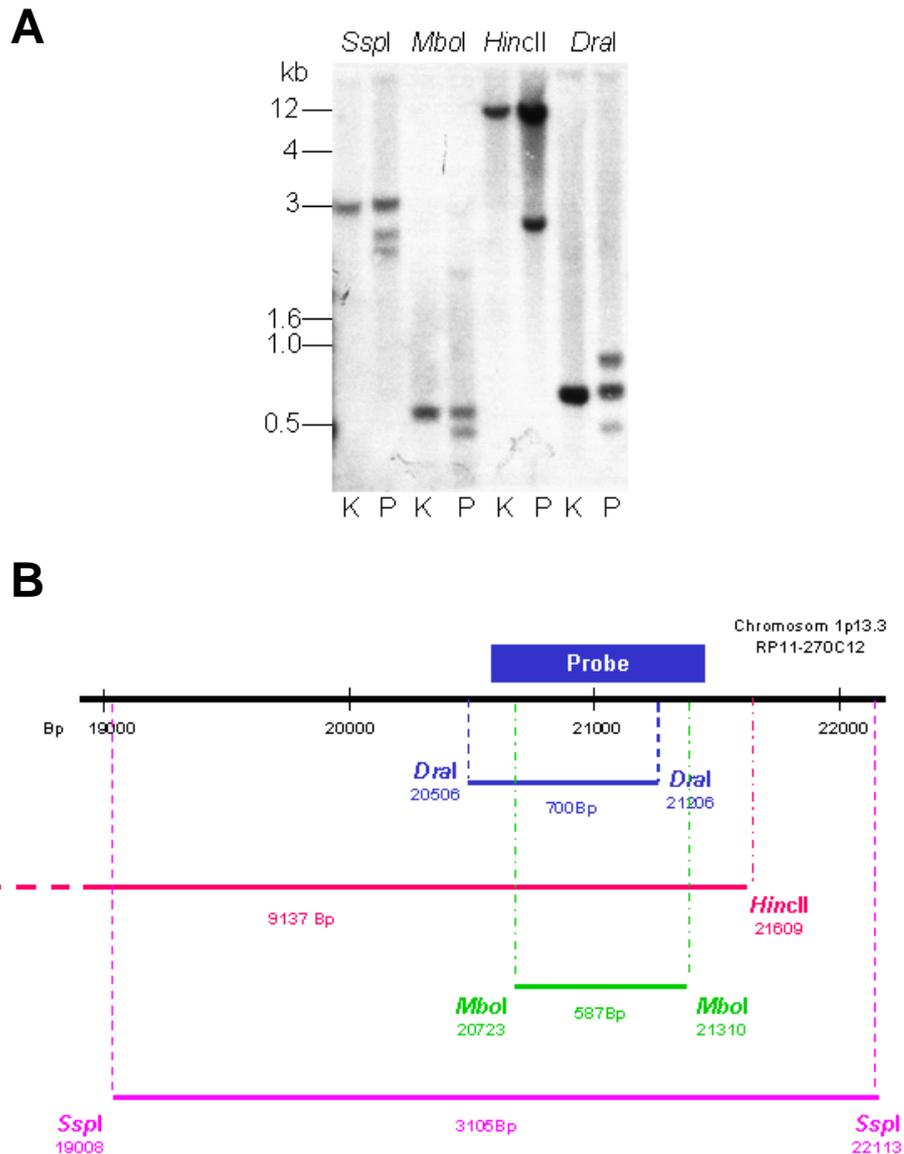


Abb.8: **Southern Blot Analyse der Bruchpunktregion auf Chromosom 1**

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.

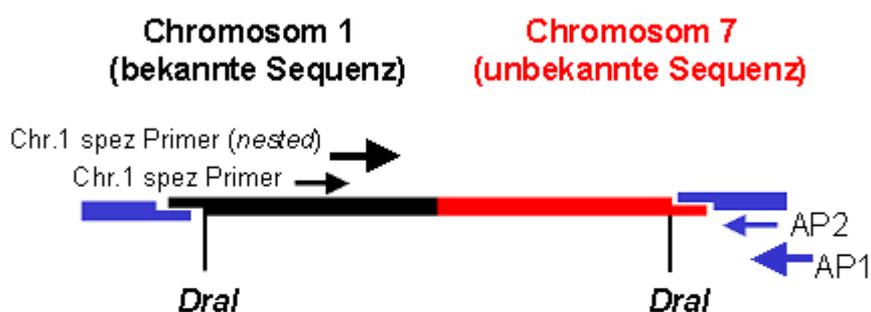
B Schematische Übersicht der genomischen Region 1p13.3 auf Chromosom 1 in der sich der Chromosomenbruchpunkt befindet. Sowohl die erwarteten Restriktionsstellen von *HincII* (dunkelrosa), *SspI* (flieder), *MboI* (grün) und *DraI* (blau) als auch die erwarteten Restriktionsfragmentgrößen sind abgebildet. 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

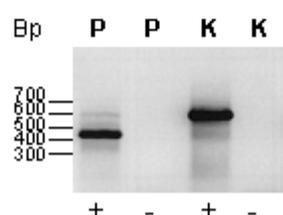


Abb.9: Klonierung des Bruchpunktes auf Chromosom 1

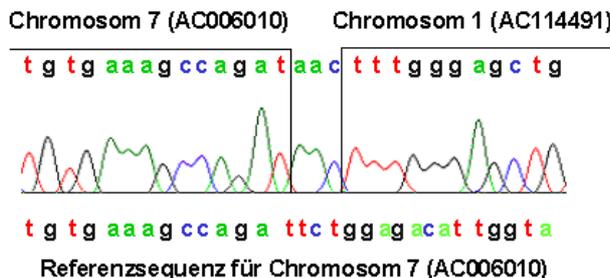
A: Schematische Darstellung der PCR zur Klonierung des Bruchpunktes. Die verwendeten sequenzspezifischen Primer und die Adapterprimer (AP) sind eingezeichnet.

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

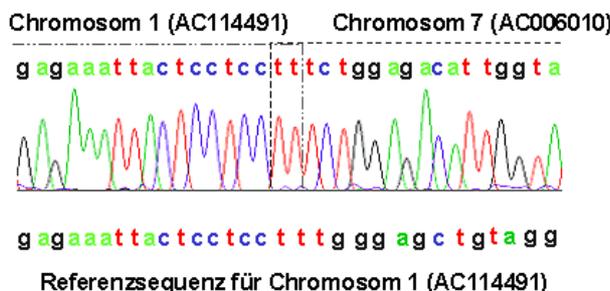


Abb.10: Chromatogramme der Bruchpunktsequenzen beider derivativer Chromosomen

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).

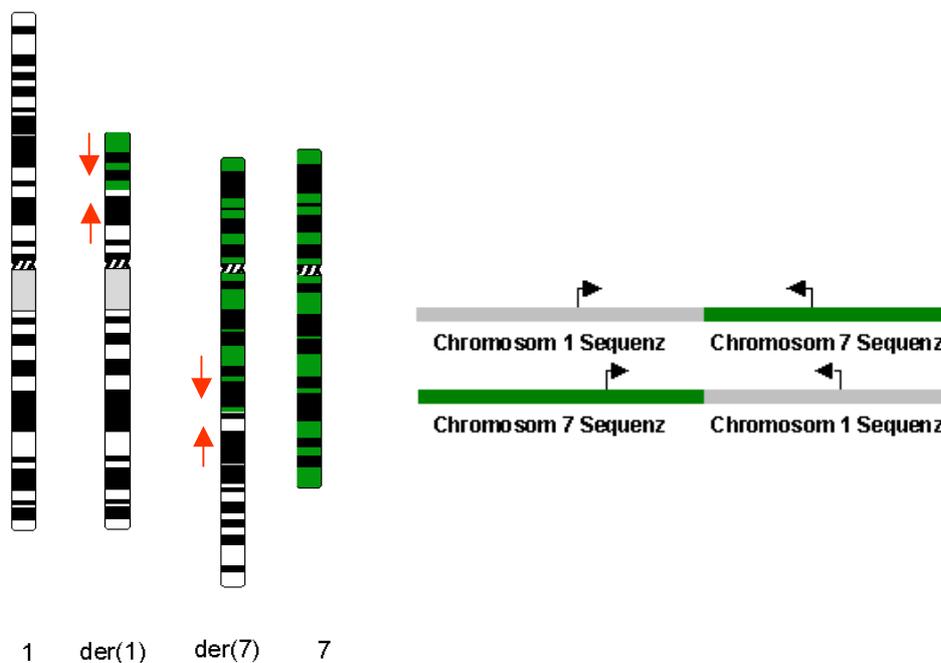


Abb.11: **Amplifikation der Bruchpunktsequenzen beider derivativer Chromosomen:** Die Lage der verwendeten Primer ist mit Pfeilen schematisch dargestellt. Eine Amplifikation dieser PCR Produkte ist nur auf der DNA der Translokationschromosomen der Patientin möglich.

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.

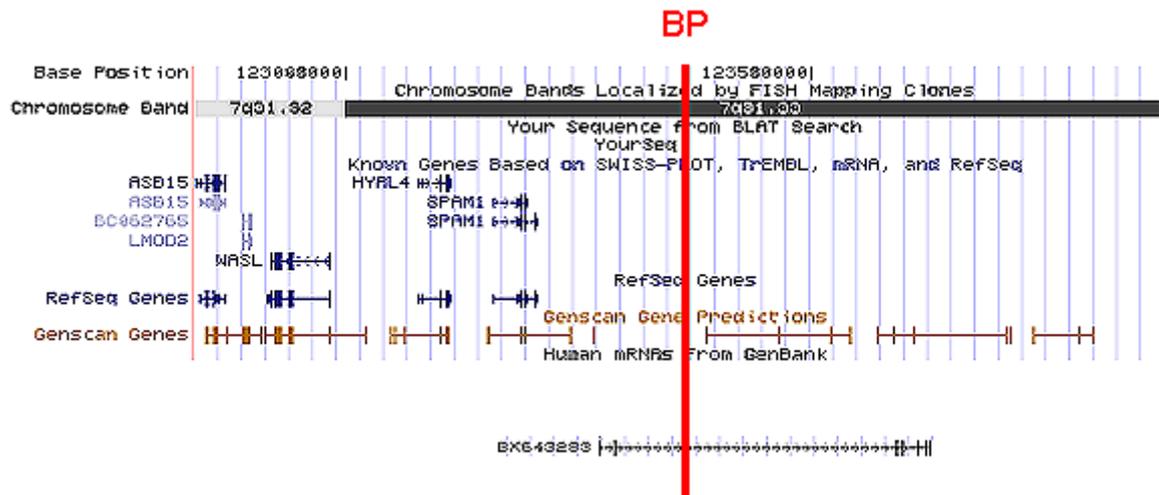


Abb.12: **Genomische Region des Bruchpunktbereiches auf Chromosom 7:** Der rote Balken repräsentiert den Bruchpunkt, der die genomische Einheit eines vorhergesagten gespleißten ESTs zerstört (BX643283)

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.

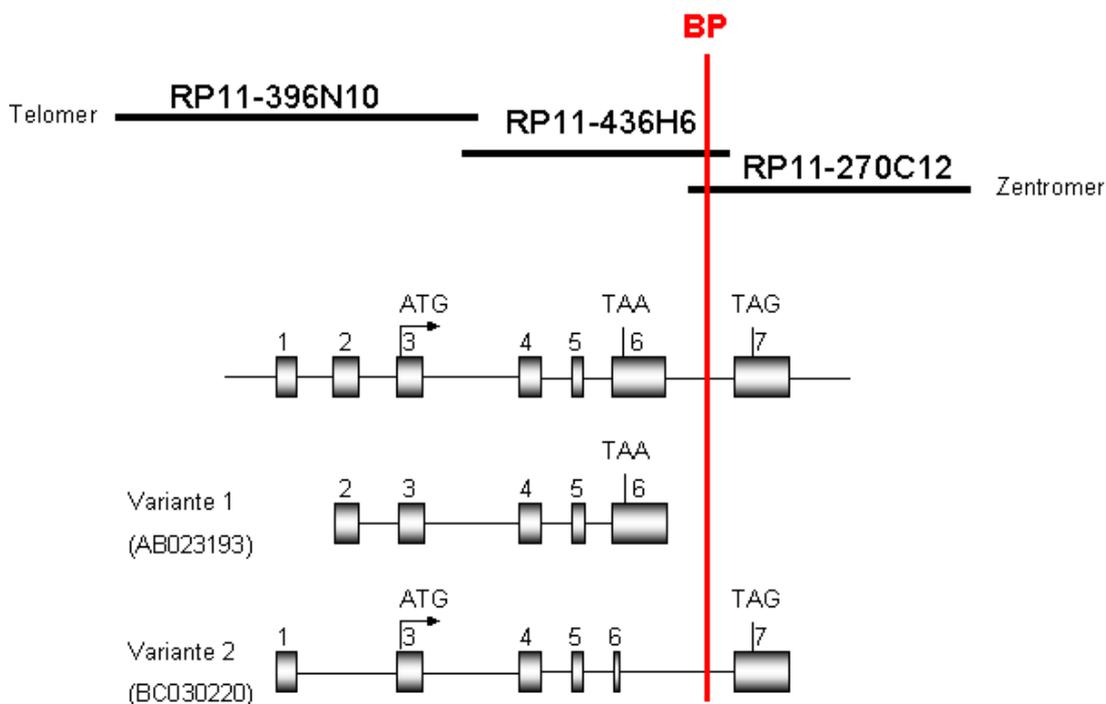


Abb.13: **Schematische Darstellung der *NTNG1* Transkriptvarianten:** In der oberen Zeile sind die BAC Klone eingezeichnet, die Sequenzen der *NTNG1* Exone enthalten. In der zweiten Zeile ist die Verteilung der Exone in der genomischen Sequenz mit entsprechenden Translations- und Stoppcodons dargestellt. 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.

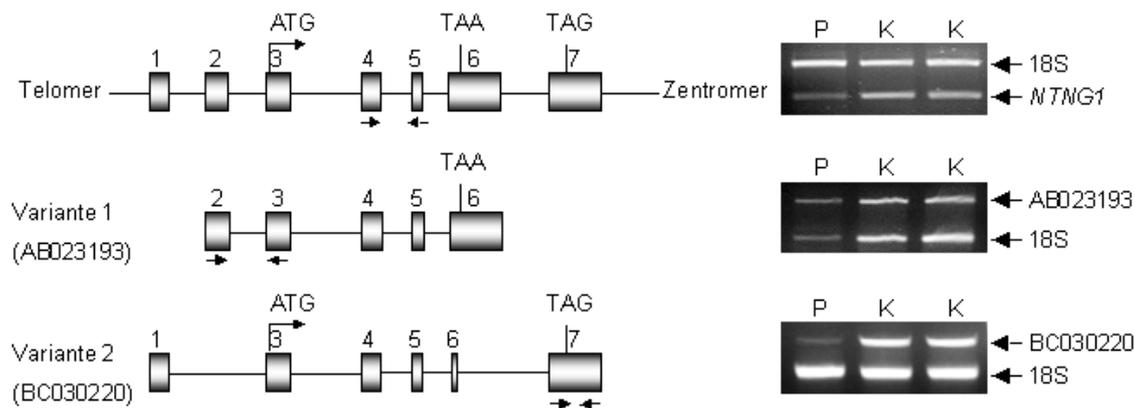


Abb.14: **Expressionsanalyse der beiden Transkriptvarianten von *NTNG1* mit RNA der Patientin und einer Kontrollperson:** P steht für Patientin, K steht für Kontrollperson. In der oberen Zeile ist das Ergebnis der semiquantitativen RT-PCR dargestellt, bei der beide Transkriptvarianten amplifiziert werden, 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 *Ntng1* (*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.

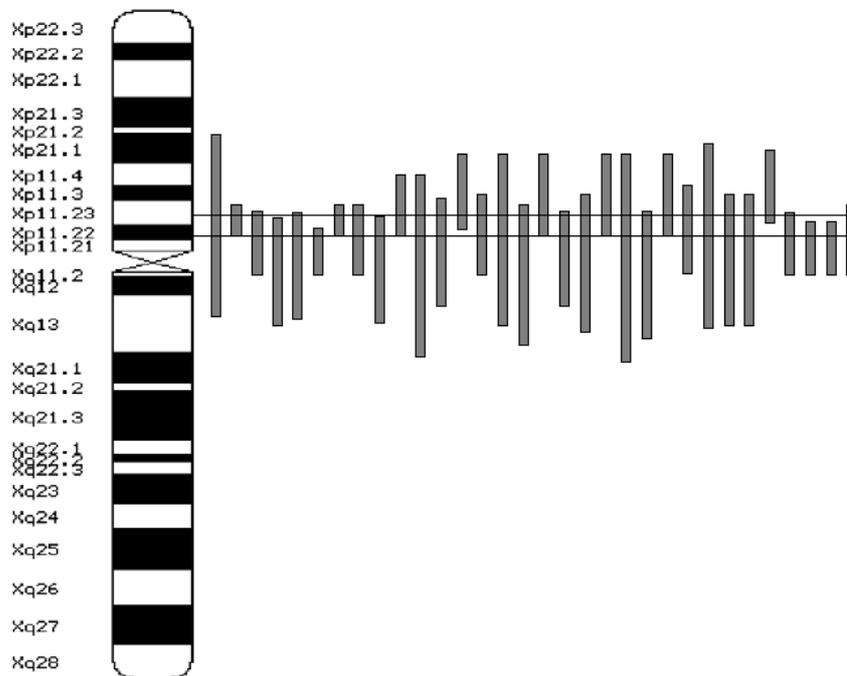


Abb.15: Schematische Darstellung der Kopplungsintervalle verschiedener NS-XLMR Familien, die alle die genomische Region Xp11.2 überspannen

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

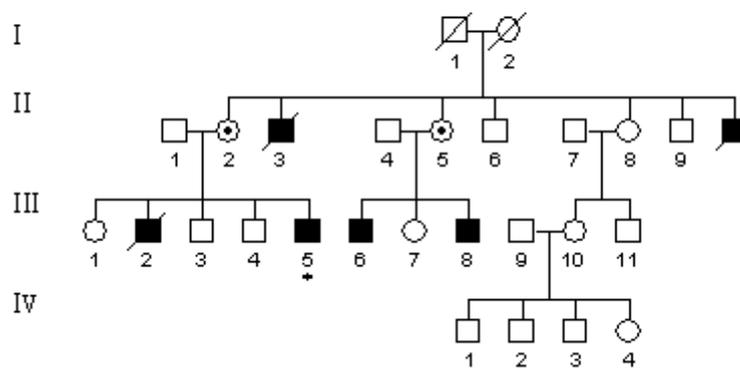


Abb.16: **Stammbaum der Familie MRX44:** Hemizygoten Träger der Mutation sind durch ausgefüllte Quadrate gekennzeichnet. Heterozygote Überträgerinnen der Mutation tragen einen Punkt innerhalb des Kreises. Durchgestrichene Kreise bzw. Quadrate bedeuten, daß die Person bereits verstorben ist. Der Indexpatient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

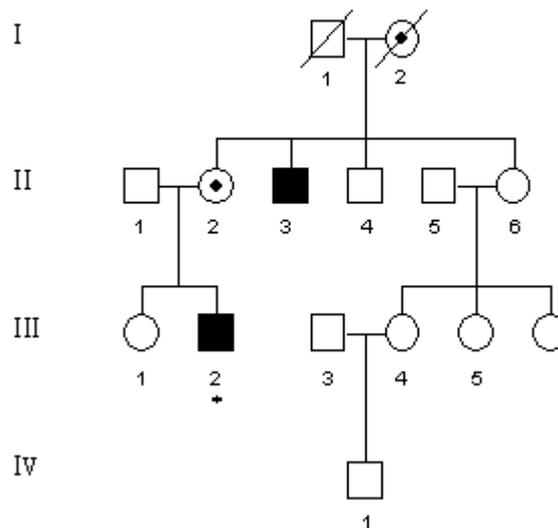


Abb.17: **Stammbaum der Familie P48:** Hemizygoter Träger der Mutation sind durch ausgefüllte Quadrate gekennzeichnet. Heterozygote Überträgerinnen der Mutation tragen einen Punkt innerhalb der Kreise. Durchgestrichene Kreise bzw. Quadrate bedeuten, daß die Person bereits verstorben ist. Der Indexpatient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

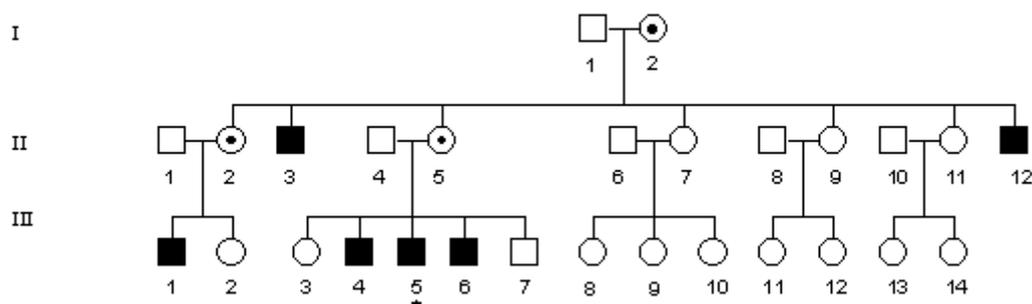


Abb.18: **Stammbaum der Familie A3:** Hemizygote Träger der Mutation sind durch ausgefüllte Quadrate gekennzeichnet. Heterozygote Überträgerinnen der Mutation tragen einen Punkt innerhalb der Kreise. Der Indexpatient der Familie ist durch einen Stern gekennzeichnet.

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.

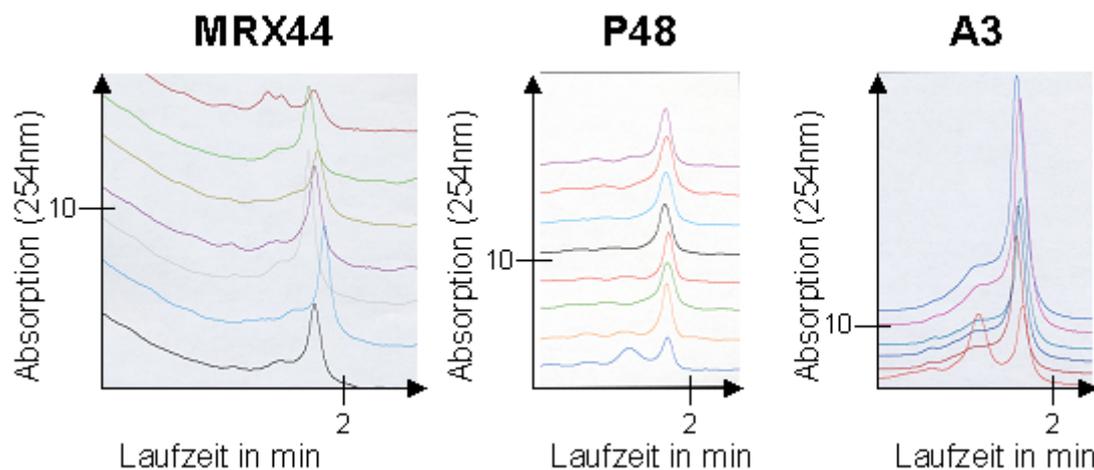


Abb.19: **Darstellung der DHPLC Analyse:** Auf allen Abbildungen ist die graphische Auswertung des Laufverhaltens, untersucht mittels DHPLC Analyse, verschiedener Hetero- und Homoduplexe dargestellt. Ein Nukleotidaustausch führt zur Bildung eines Heteroduplex, der im Gegensatz zu einem Homoduplex ein 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

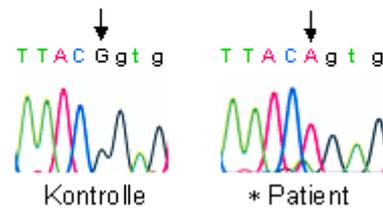


Abb.20: **Ausschnitt aus dem Chromatogramm der *FTSJ1* Exon-9-Sequenz des Indexpatienten von Familie MRX44 und einer Kontrolle:** Die Nukleotide, die zur Exonsequenz gehören, sind in Großbuchstaben dargestellt, diejenigen der Intronsequenz sind in Kleinbuchstaben dargestellt. Beide Chromatogramme zeigen 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.

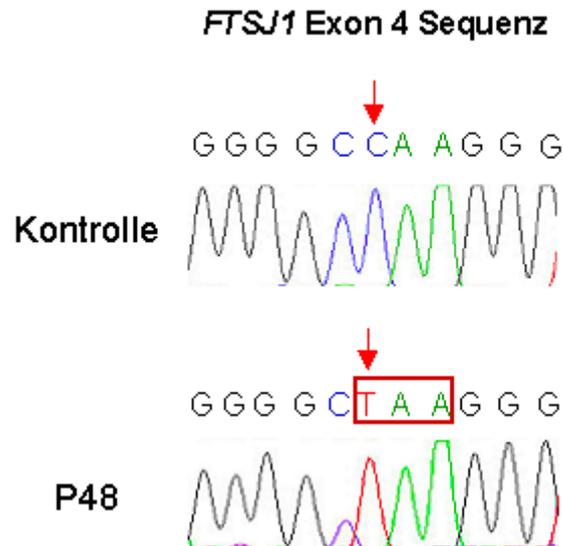


Abb.21: **Ausschnitt aus den Chromatogrammen der FTSJ1 Exon 4-Sequenz des Indexpatienten von Familie P48 und einer Kontrolle:** Beide Chromatogramme zeigen einen Ausschnitt aus der Sequenz von Exon 4. Im oberen Chromatogramm ist die Sequenz von Exon 4 einer männlichen Kontrollperson dargestellt. Im unteren 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)).

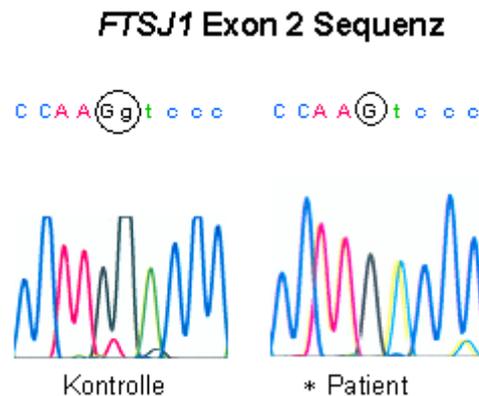


Abb.22: **Ausschnitt aus den Chromatogrammen der *FTSJ1* Exon 2-Sequenz des Indexpatienten von Familie A3 und einer Kontrolle:** Die Nukleotide der Exonsequenz sind in Großbuchstaben dargestellt, diejenigen der Intronsequenz in Kleinbuchstaben. Beide Chromatogramme zeigen die Nukleotide am Übergang von 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.

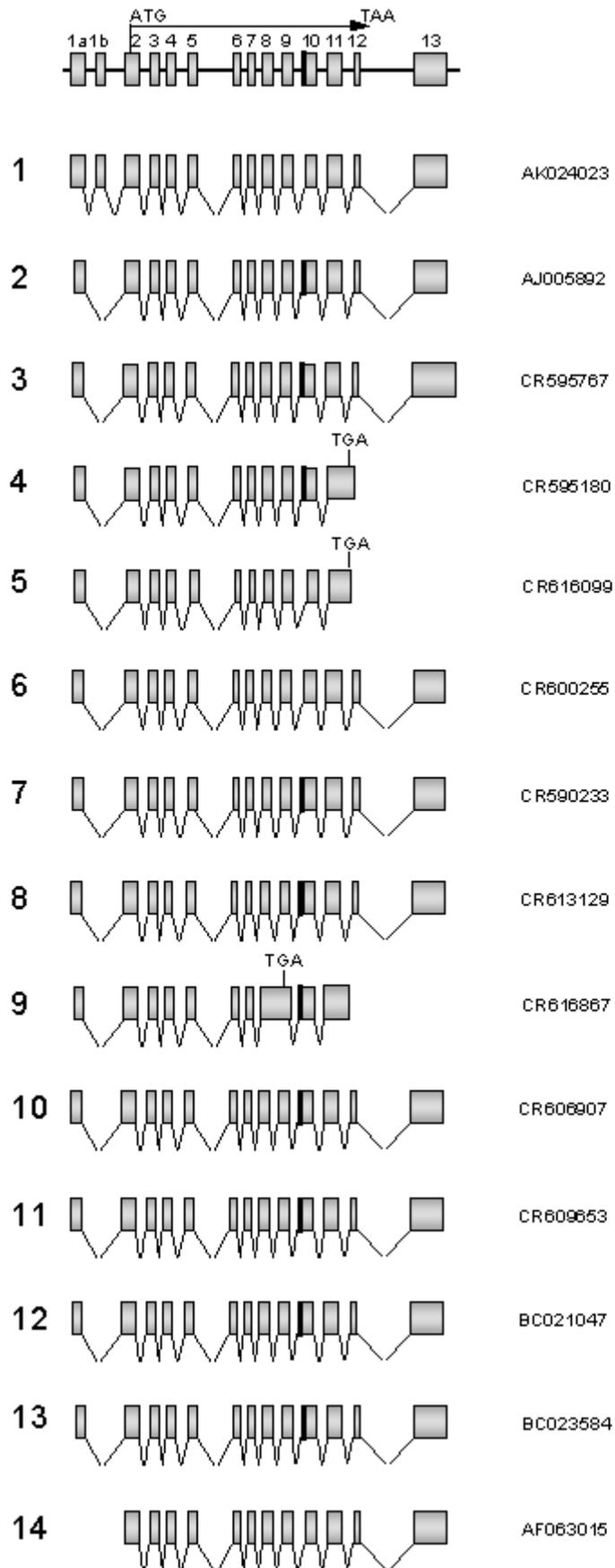


Abb. 23: **Schematische Darstellung der *FTSJ1* Transkriptvarianten** (nicht maßstabsgerecht):
In der obersten Zeile ist die Verteilung der Exone von *FTSJ1* innerhalb der genomischen Sequenz schematisch dargestellt. Es sind sowohl das Startkodon für die Translation in Exon 2 (das für alle Spleißvarianten 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).

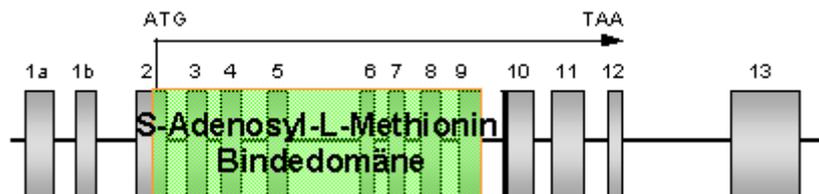


Abb.24: **Schematische Darstellung der FTSJ1 Exone:** Dargestellt ist die genomische Verteilung der Exone. In grün sind die Exone markiert, die für die vorhergesagte S-Adenosyl-L-Methionin Bindedomäne kodieren.

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.

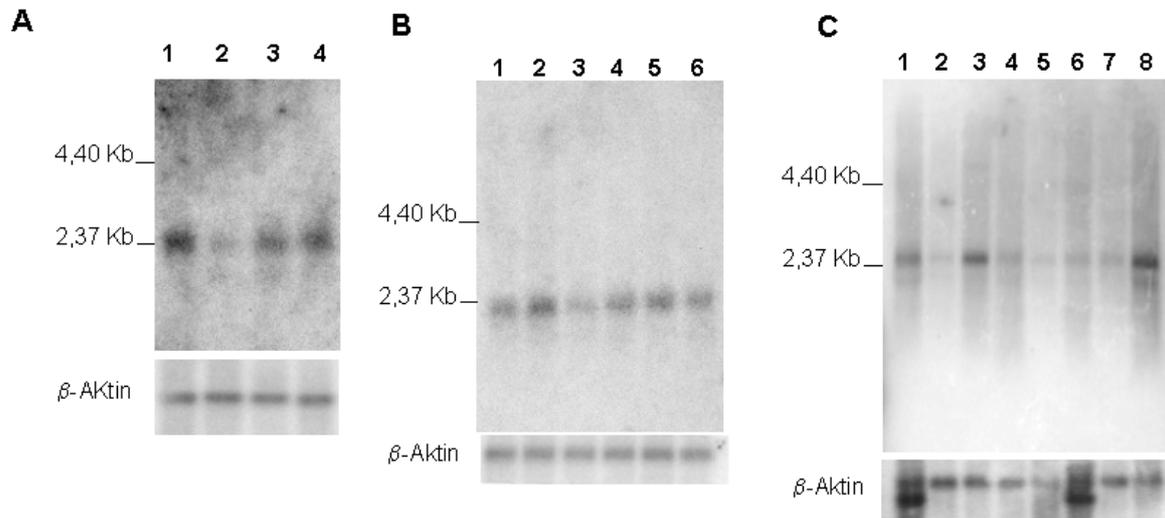


Abb.25: **Expressionsanalyse von *FTSJ1* in verschiedenen humanen Geweben:**

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.

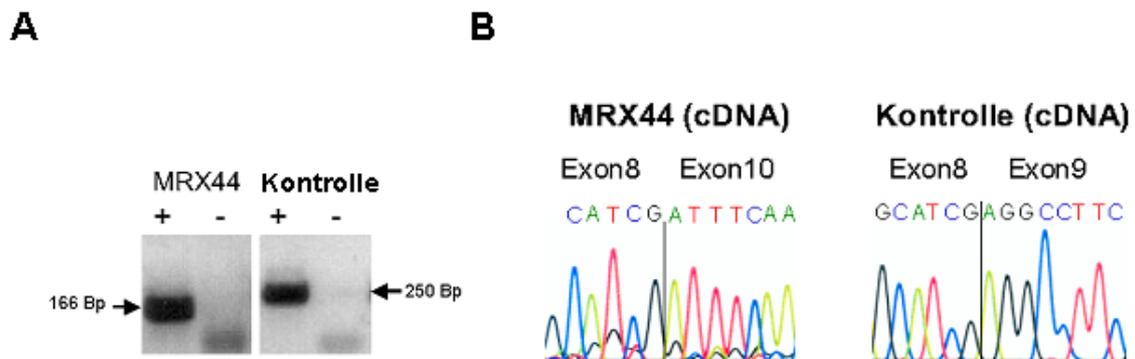


Abb.27: RT-PCR Analyse der Mutation 655G→A :

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.

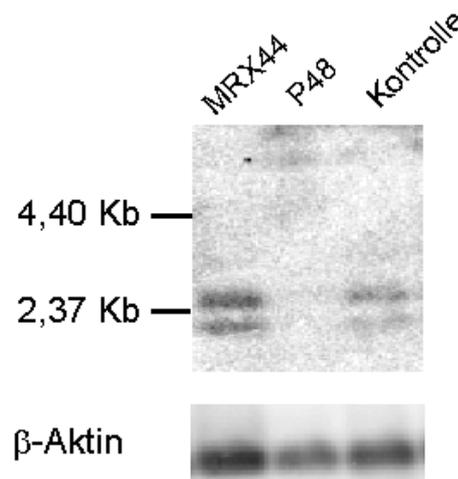


Abb.28: **Northern Blot Analyse von PolyA⁺ RNA der Indexpatienten von Familie MRX44 und P48:** PolyA⁺ RNA wurde aus lymphoblastoiden Zelllinien der Indexpatienten sowohl von Familie MRX44 und Familie P48 als auch von einer männlichen Kontrollperson isoliert und auf eine Nylonmembran transferiert. In 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 FT SJ1 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).

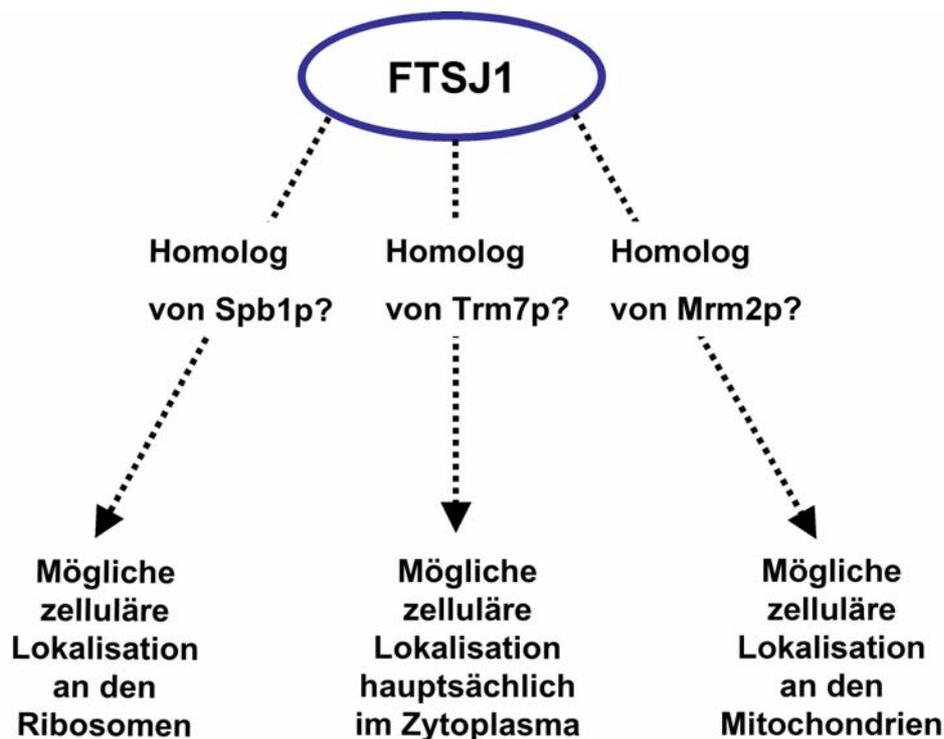


Abb.29: Schematische Darstellung der möglichen zellulären Lokalisation des humanen FTSJ1

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.

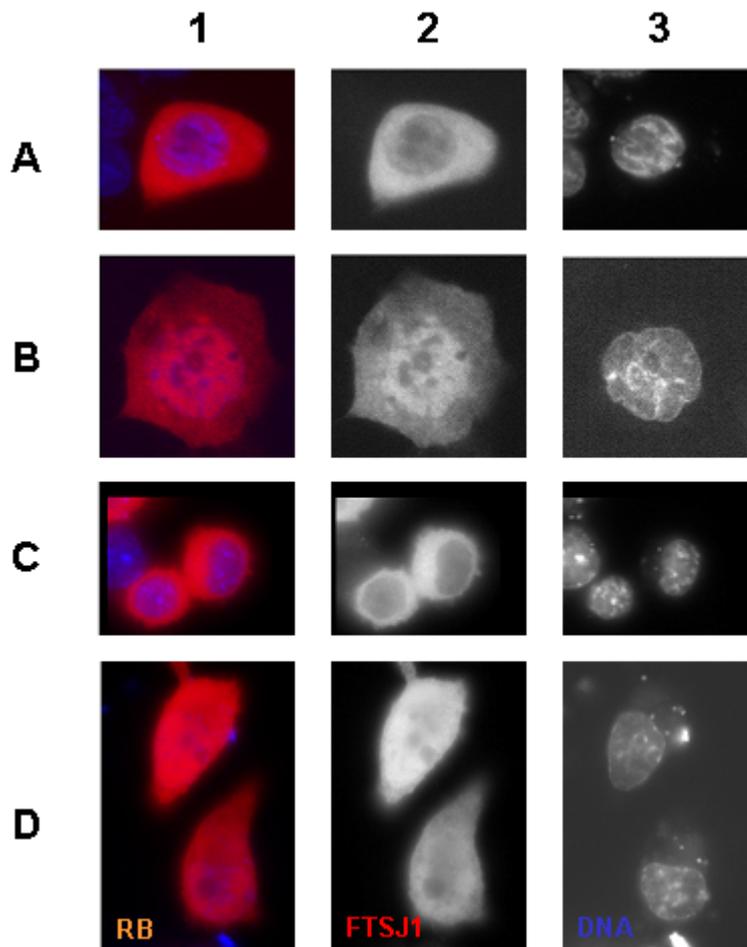


Abb.30: Immunfluoreszenz Experimente mit Wildtyp FTSJ1 und FTSJ1 Δ Exon 9:

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).

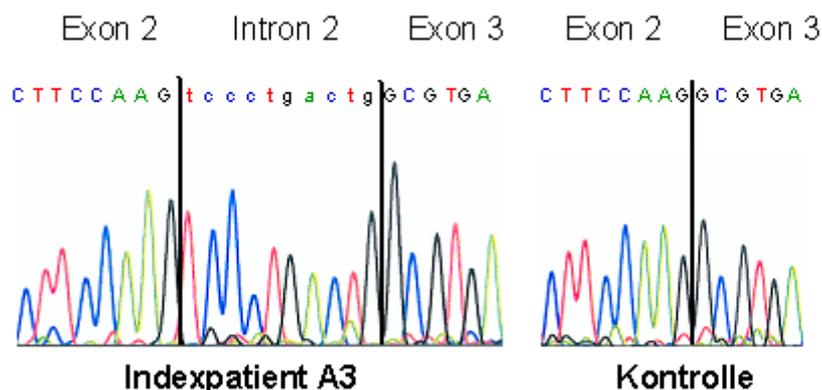


Abb.31: **RT-PCR Analyse der Mutation IVS2+1delG:** Ausschnitt aus den Sequenzierungschromatogrammen der RT-PCR Produkte des Indexpatienten und der Kontrollperson. Dargestellt ist der Übergang von Exon 2 zu Exon 3. In die cDNA des Indexpatienten sind 10 intronische Nukleotide inkorporiert. In der cDNA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

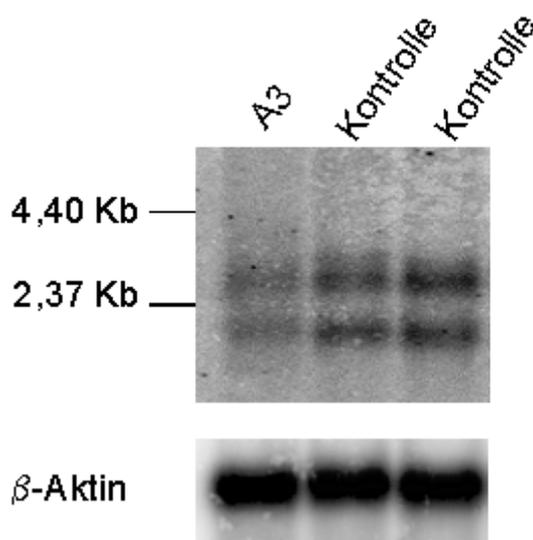


Abb.32: Northern Blot Analyse von PolyA⁺ RNA der Indexpatienten von Familie A3: PolyA⁺ RNA wurde aus lymphoblastoiden Zelllinien des Indexpatienten von Familie A3 und von zwei männlichen Kontrollperson isoliert und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Membran wurde mit einer radioaktiv markierten 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 leerem 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 leeren 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.

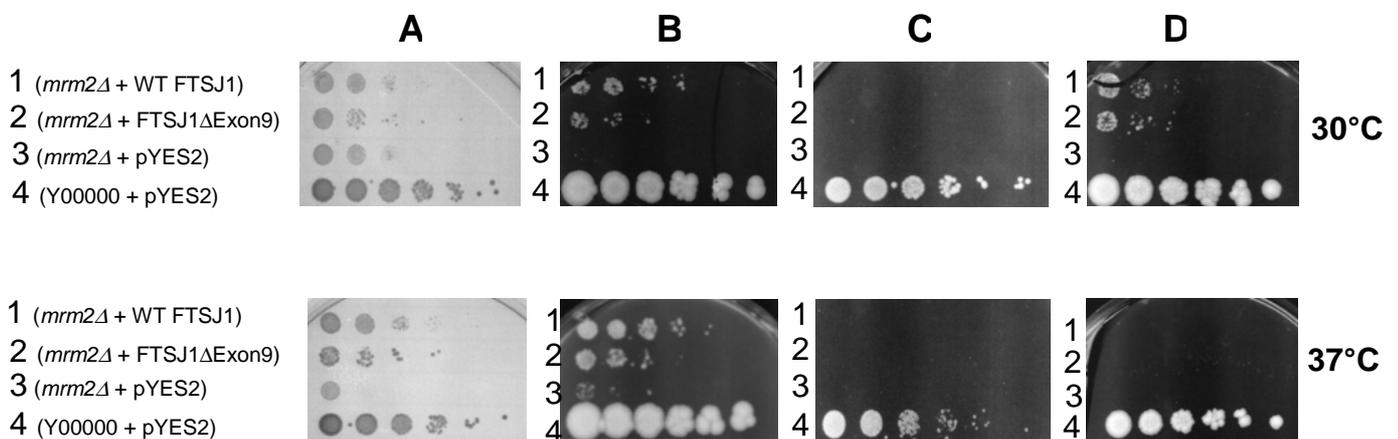


Abb.33: ***mrm2*Δ-Rescue-Experimente**: Der *mrm2*Δ Stamm wurde mit verschiedenen pYES2 Konstrukten transformiert. 1: *mrm2*Δ + WT *FTSJ1* 2: *mrm2*Δ + *FTSJ1*ΔExon9 3: *mrm2*Δ + pYES2 4: Y00000 (Hefewildtypstamm) + pYES2. Die Transformanten wurden auf eine OD von 0,3 (bei 560 nm) eingestellt. Diese 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.

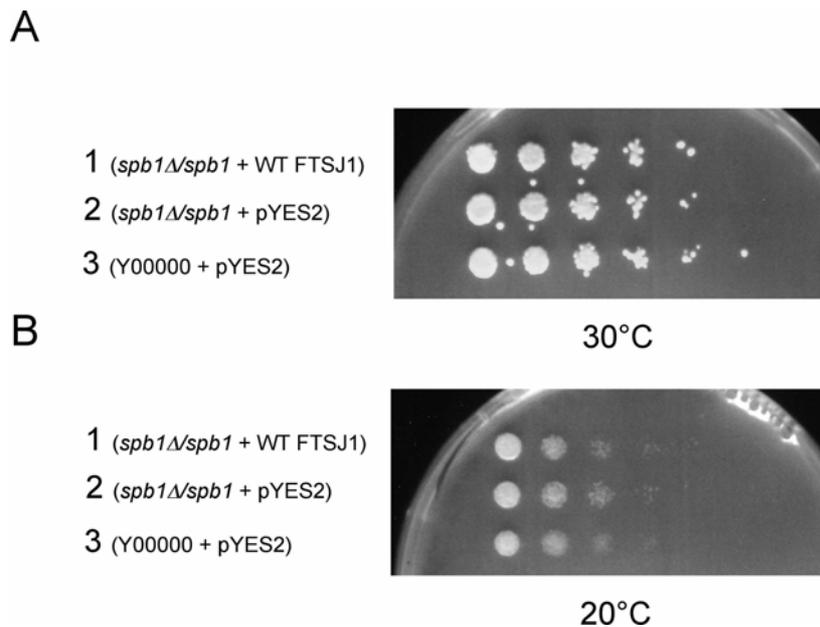


Abb.34: ***spb1Δ/spb1*-Rescue-Experimente**: Der *spb1Δ/spb1* Stamm wurde mit verschiedenen pYES2 Konstrukten transformiert. **1** *spb1Δ/spb1* + WT *FTSJ1* **2**: *spb1Δ/spb1* + pYES2 **3**: Y00000 (Hefewildtypstamm)+ pYES2. Die Hefesuspensionen wurden wie beim *mrm2Δ*-Rescue-Experiment verdünnt. Nach 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 *FTSJ1Δ*Exon9 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).

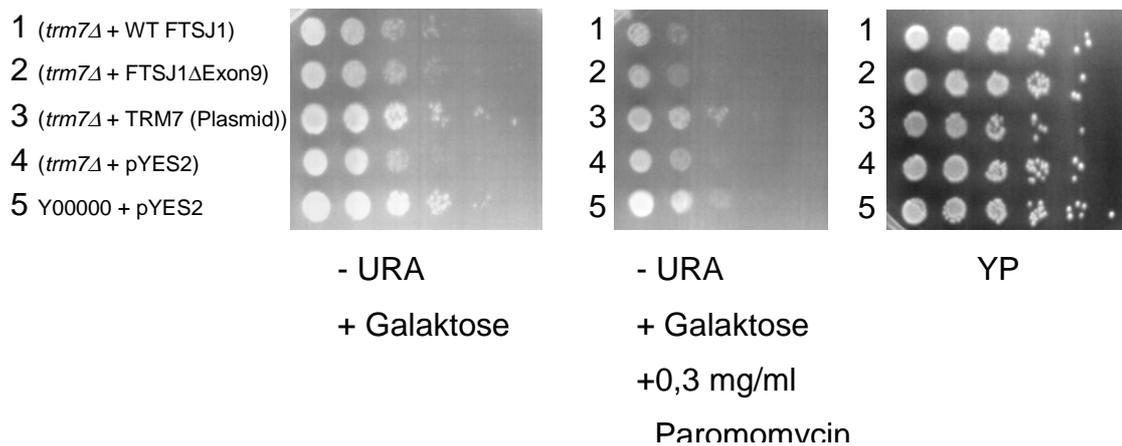
Diese Experimente zeigen, daß TRM7 in den Deletionsstämmen nicht exprimiert wird. Außerdem ist der Nachweis gelungen, daß die humanen *FTSJ1* Genkonstrukte in der Hefe transkribiert werden. TRM7 kodiert für eine S-Adenosyl-L-Methionin Methyltransferase, die zwei spezifische Basen in der Antikodonschleife 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

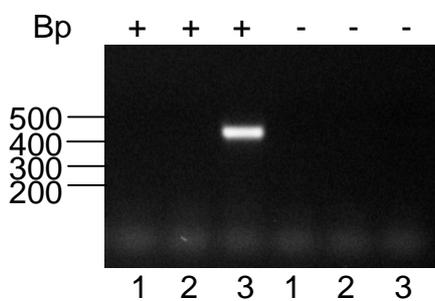
| Transformierter Hefestamm | Vektor | Insert | Selektionsmarker | Wachstumseffekt |
|---------------------------|--------|----------------------|------------------|-----------------------------|
| <i>trm7</i> Δ (Y03198) | pYES2 | Wildtyp <i>FTSJ1</i> | URA3 | Fast normales Wachstum |
| <i>trm7</i> Δ (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>trm7Δ</i> (Y03198) | pAE | Wildtyp FTSJ1 | LEU2 | Normales Wachstum |
| <i>trm7Δ</i> (Y03198) | pAE | - | LEU2 | Schlechtes Wachstum |
| Wildtyp Hefestamm (Y00000) | pAE | - | LEU2 | Normales Wachstum |

A

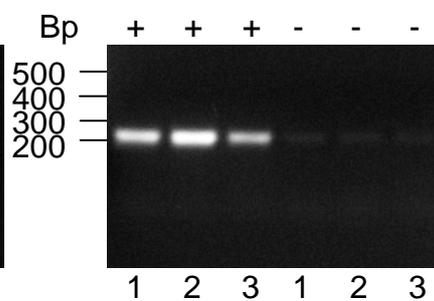


B



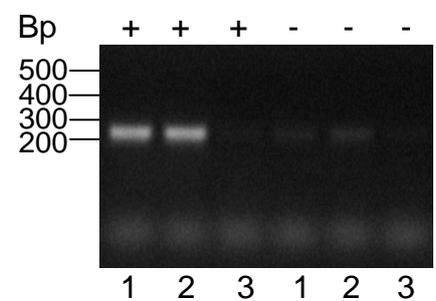
TRM7
S.cerevisiae

C



β-Aktin
S.cerevisiae

D



FTSJ1
Homo sapiens

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*.

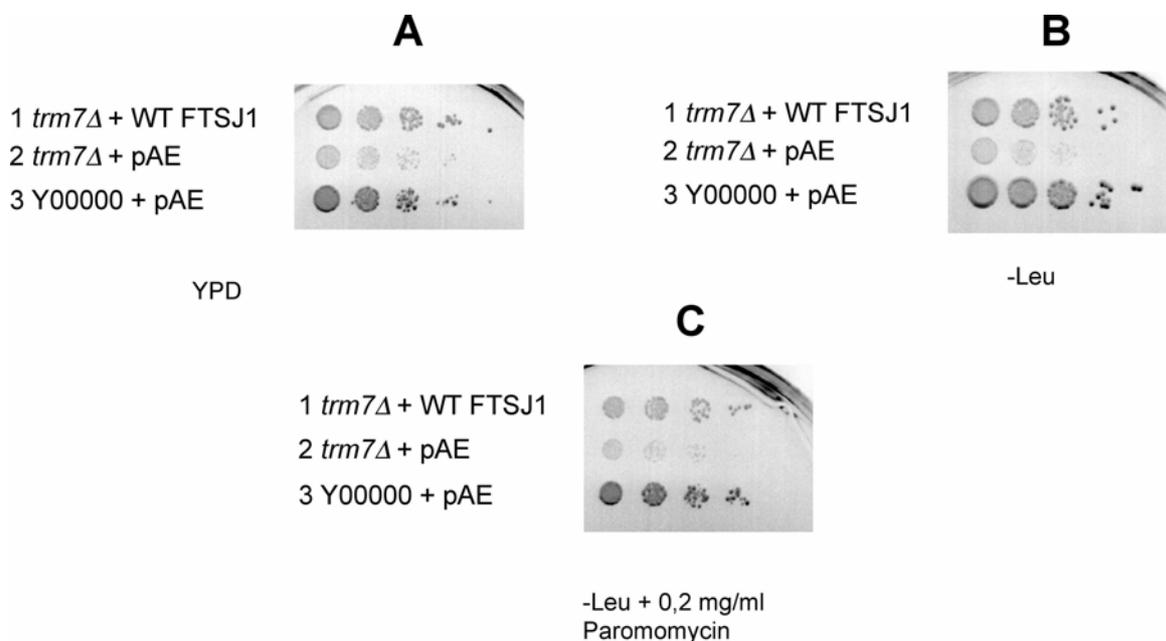


Abb.36: *trm7Δ-Rescue*-Experimente mit neuem Deletionsstamm und pAE-Konstrukten:

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-

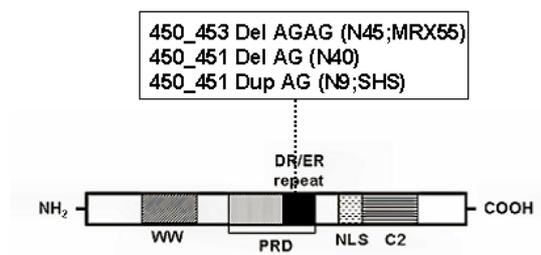
defizienten Medium ist das Wachstumsverhalten mit dem Wachstum auf YPD-Platten (A) vergleichbar. **C** Auf einem Medium ohne Leucin und mit 0,2 mg/ml Paromomycin wird dieser Effekt noch verstärkt.

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 | acagagagagagagcgagacagggaacgggatcgggaccgc...tga | 265 | AS |
| | R E R E R D R E R D R D R | | |
| N9/SHS | acagagagagagagcgagacagggaacgggatcgggaccgcg...taa | 194 | AS |
| | R E R E S E T G N G I G T A | | |
| N45/MRX55 | acagagagagcgagacagggaacgggatcgggaccgcg...taa | 192 | AS |
| | R E S E T G N G I G T A | | |
| N40 | acagagagagagcgagacagggaacgggatcgggaccgcgtga | 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).

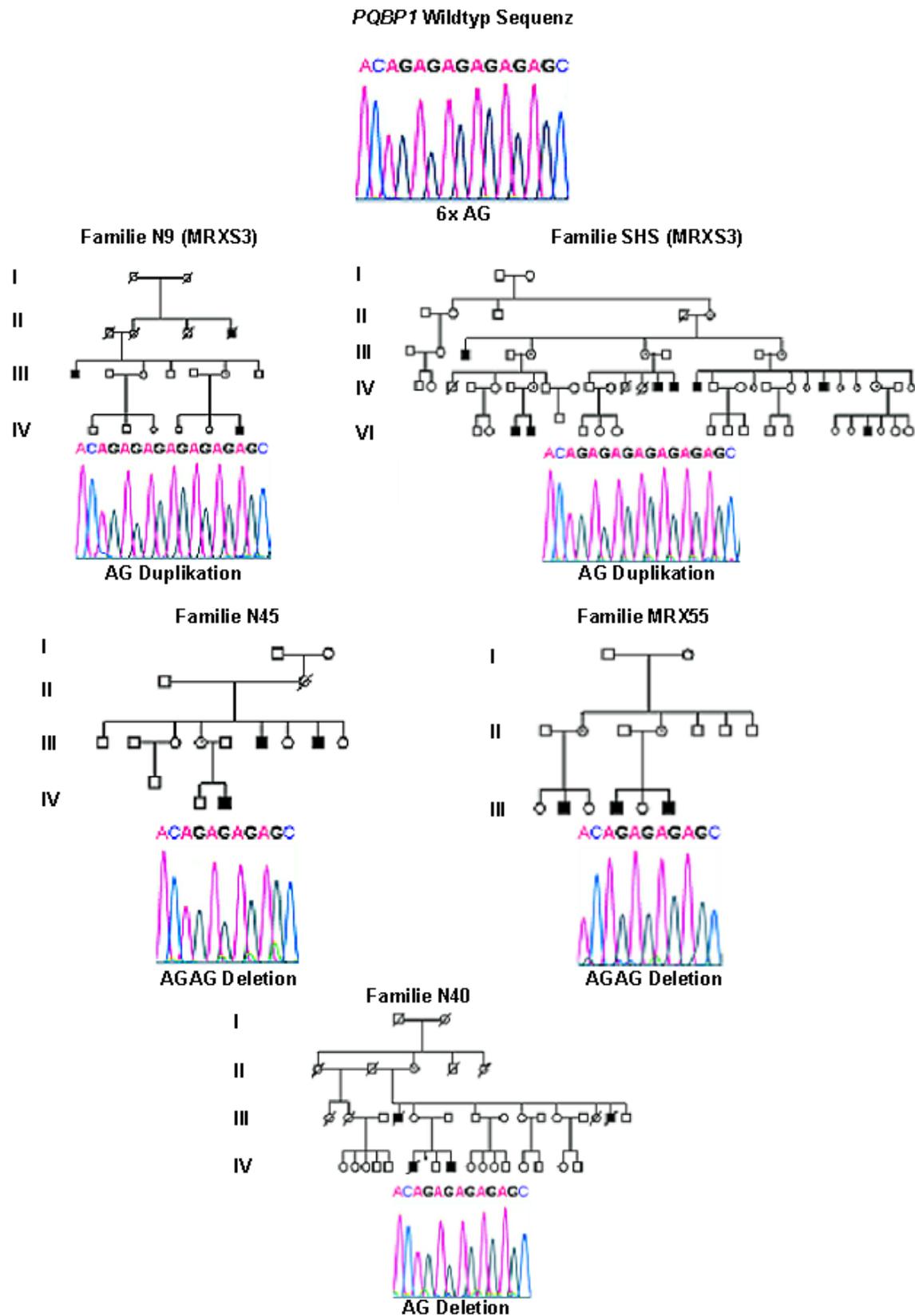


Abb.38: Darstellung der Stammbäume der Familien, bei denen Mutationen in *PQBP1* gefunden wurden und Ausschnitte aus den Chromatogrammen von Exon 4 der

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.

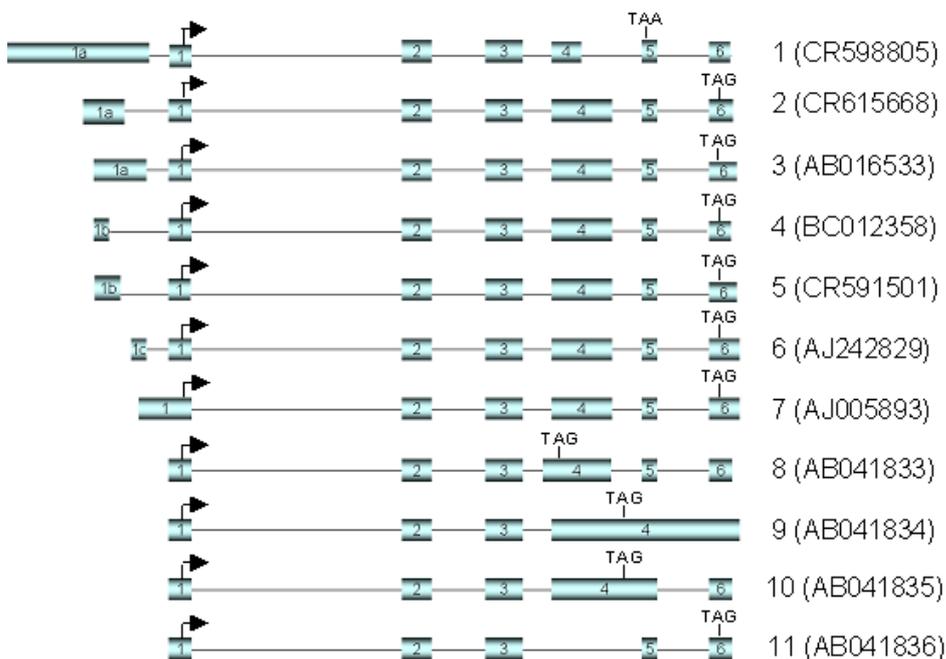


Abb.39: **Schematische Darstellung der Transkriptvarianten von *PQBP1*** (nicht maßstabsgerecht). Die Translationsstartpunkte sind durch Pfeile dargestellt, die jeweiligen Translationsstopkodons sind ebenfalls für jede Variante eingezeichnet.

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 mildereren, 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.

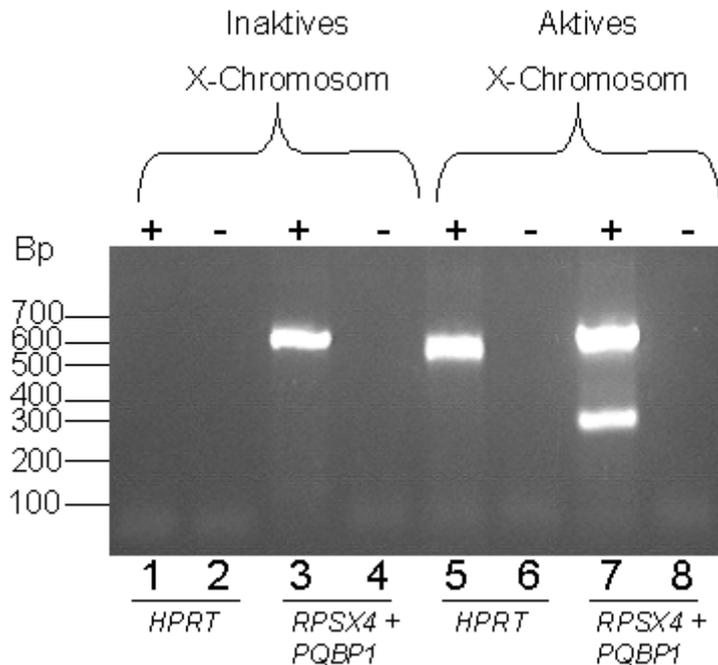


Abb.40: **PCR-Analyse zur Feststellung des X-Inaktivierungsstatus von *PQBP1***. In der ersten Spur ist kein PCR-Produkt sichtbar. Hier wurde ein Aliquot der PCR, die mit *HPRT* spezifischen Primern, mit der cDNA gewonnen aus der Hamsterzelle mit dem inaktiven X-Chromosom, durchgeführt wurde, aufgetragen. 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 trunkeierten 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).

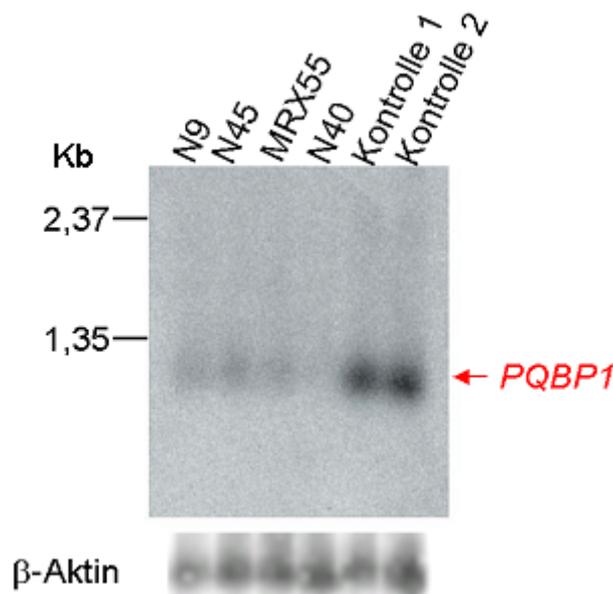


Abb.41: **Northern Blot-Analyse mit Exon 4 spezifischer Probe:** Ein PolyA⁺ Northern Blot mit RNA der Patienten mit Mutationen in *PQBP1* und zwei männlichen Kontrollpersonen wurde mit einer für Exon 4 spezifischen Probe hybridisiert. Bei der RNA der Kontrollen ist eine spezifische Bande bei ca. 1,15 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.

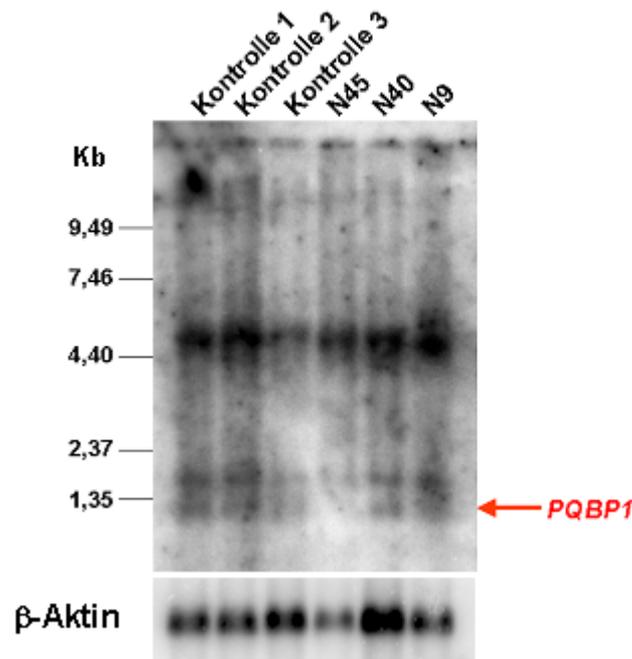


Abb.42: **Northern Blot-Analyse mit einer spezifischen Probe die an Intron 4, Exon 5 und Intron 5 bindet:** Ein PolyA⁺ Northern Blot mit RNA der Patienten mit Mutationen in *PQBP1*(N45, N40 und N9) und drei männlichen Kontrollpersonen (Kontrolle 1,2 und 3) wurde mit einer für Intron 4, Exon 5 und Intron 5 spezifischen Probe hybridisiert. In allen Spuren ist eine *PQBP1* 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 *PQBP1* Proteine

Die oben beschriebenen Northern Blot Ergebnisse haben gezeigt, daß der überwiegende Teil der mutierten *PQBP1* 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.

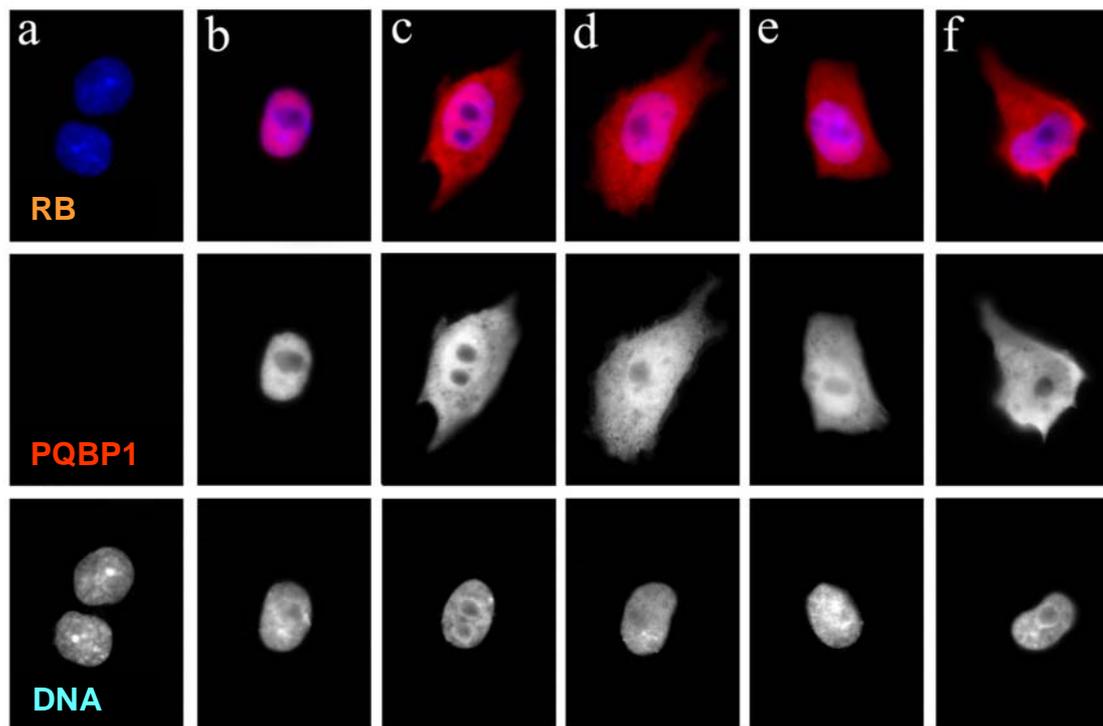


Abb.43: Zelluläre Lokalisation des Wildtyp PQBP1 Proteins (rot) und der trunkierten, mutierten PQBP1 Proteine (rot) : In der oberen Reihe ist das blaue Signal der Zellkernfärbung mittels DAPI und das rote Signal der c-MYC-Fusionsproteine mittels Cy3 als überlappende Signale sichtbar. In der mittleren 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.

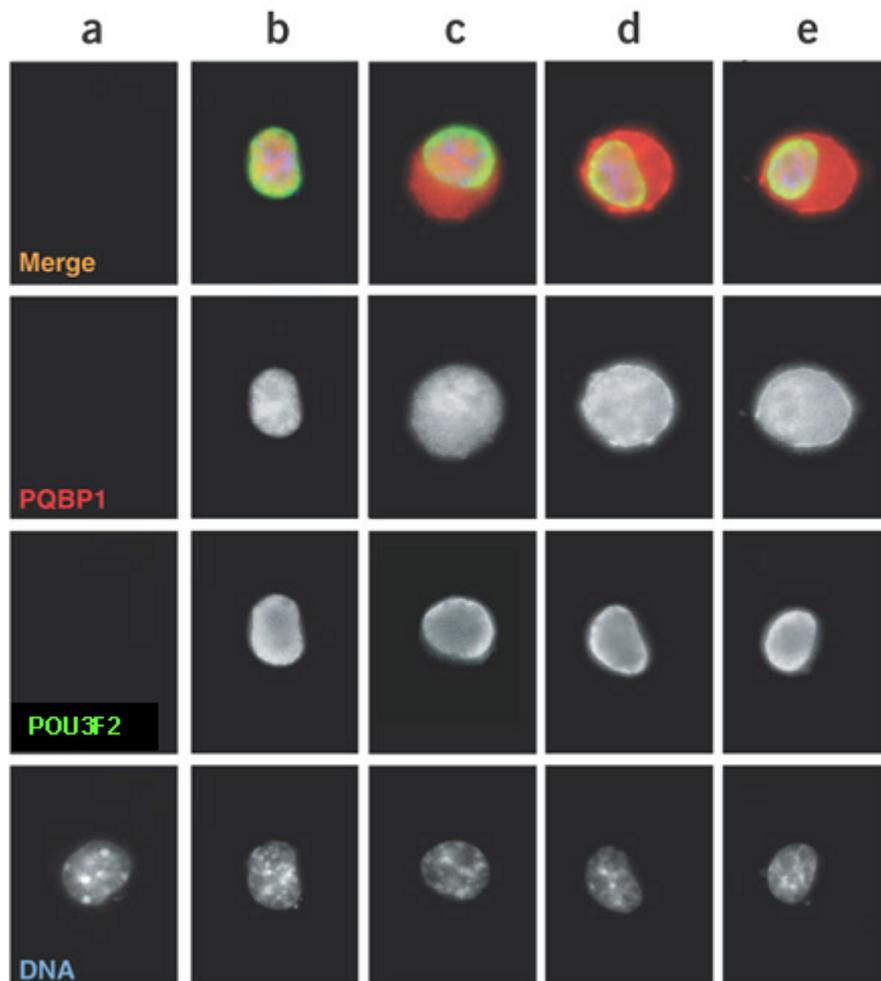


Abb.44:**Zelluläre Lokalisation des Wildtyp PQBP1 Proteins (rot), des Wildtyp POU3F2 Proteins (grün) und der mutierten, trunkierten PQBP1 Proteine (rot):** In der oberen Reihe ist das blaue Signal der Zellkernfärbung mittels DAPI, das rote Signal der c-MYC-Fusionsproteine mittels Cy3 und das grüne Signal 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.

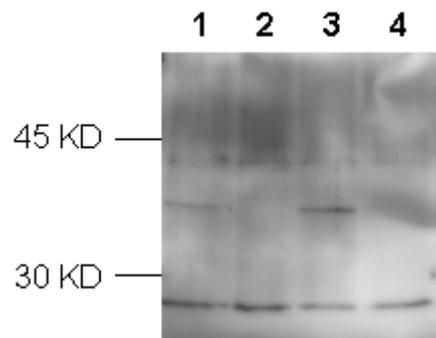


Abb.45: **Koimmunpräzipitation von PQBP1 und POU3F2:** PQBP1 WT und POU3F2 WT wurden in den Expressionvektor pBudCE4 kloniert und in U373MG-Zellen transient überexprimiert. Aus diesen Zellen wurde Gesamtprotein extrahiert und eine Koimmunpräzipitation durchgeführt. **1:** U373MG + PQBP1 WT; **2:** U373MG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

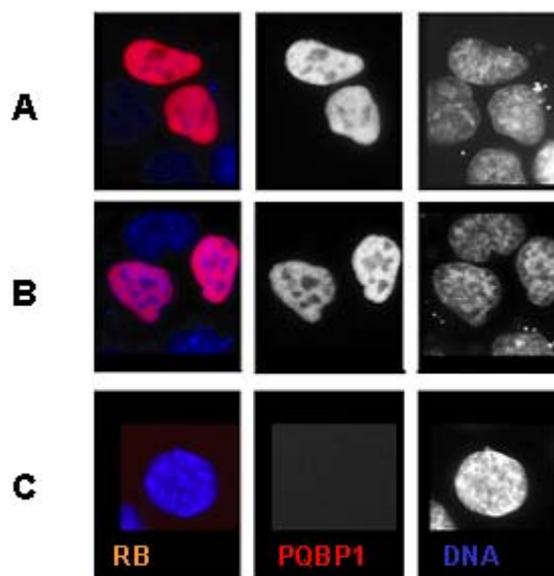


Abb.46: **Zelluläre Lokalisation des mutierten, trunkeierten PQBP1 Proteins (641insC)** In der linken Spalte ist das blaue Signal der Zellkernfärbung mittels DAPI und das rote Signal der c-MYC-Fusionsproteine mittels Cy3 als überlappende Signale sichtbar. In der mittleren Spalte ist nur das rote Signal 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

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 Gehirnpräparationen 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 kodierte 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).

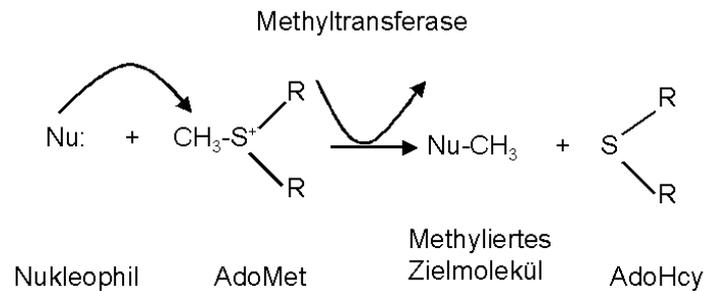


Abb.47: **Chemischer Vorgang bei der Methylierung mittels AdoMet als Kofaktor verschiedenster Methyltransferasen**

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 Kernlokalisierungssignal (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 Kernlokalisierungssignale 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.

5 Zusammenfassung

Geistige Behinderung ist eine äußerst heterogene Erkrankung. Schwere Formen dieser Erkrankung, charakterisiert durch einen IQ geringer als 50, haben hauptsächlich genetische Ursachen, wobei viele durch einen Defekt in einem einzigen Gen verursacht werden. In letzter Zeit ist der Nachweis einiger dieser genetischen Defekte, hauptsächlich auf dem X Chromosom, gelungen. Trotzdem bleibt die molekulare Ursache von X-chromosomal gekoppelter geistiger Behinderung (XLMR) in vielen Fällen immer noch ungeklärt. Hingegen hat die Identifizierung von autosomalen Genen, die eine Rolle bei der Entwicklung von kognitiven Fähigkeiten spielen, gerade erst begonnen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es einen Beitrag zur Erweiterung des Verständnisses der molekularbiologischen Ursachen von geistiger Behinderung zu leisten. Diese Erkrankung ist immer noch eines der größten ungelösten Probleme der klinischen Genetik und ein wichtiger Aspekt der Gesundheitsvorsorge.

Als Ursache für X-chromosomale nicht-syndromale geistige Behinderung (NS-XLMR) sind bereits mehrere Gene identifiziert worden. Dennoch legt die geringe Mutationshäufigkeit in den bislang identifizierten Genen bei Familien mit NS-XLMR nahe, daß ungefähr 30 bis 100 weitere NS-XLMR Gene existieren (Ropers et al., 2003). Kürzlich konnte durch die Analyse von Kopplungsdaten verschiedener Familien gezeigt werden, daß ungefähr 30% der genetischen Defekte auf dem proximalen Arm des X-Chromosoms lokalisiert sind (Ropers et al., 2003). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine systematische Analyse von gehirnspezifisch exprimierten Genen, die in dieser Region des X-Chromosoms lokalisiert sind, durchgeführt. Diese Untersuchungen zeigten, daß Mutationen in den X-chromosomal Genen *FTSJ1* und *PQBP1* bei männlichen Patienten zu geistiger Behinderung führen. Ebenso konnte gezeigt werden, daß die unterschiedlichen Mutationen in den verschiedenen Familien mit der Erkrankung kosegregiert.

Die Funktion des humanen *FTSJ1* Proteins ist bislang nicht beschrieben worden. Dennoch läßt der Vergleich mit den entsprechenden paralogenen Genen in der Hefe und dem orthologen Gen in *E. coli* die Schlußfolgerung zu, daß das humane *FTSJ1* ebenfalls eine S-Adenosyl-L-Methionin abhängige Methyltransferase ist.

Darüber hinaus konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels Komplementationsstudien mit dem humanen FTSJ1 in den entsprechenden Hefedeletionsstämmen gezeigt werden, daß FTSJ1 eine tRNA-Methyltransferase ist. Somit scheint FTSJ1 eine Rolle in dem fundamentalen Prozeß der Translation von Proteinen zu spielen. Im Gegensatz dazu ist der Phänotyp der Patienten mit Mutationen in FTSJ1 relativ mild ausgeprägt, und obwohl FTSJ1 ubiquitär exprimiert wird, scheint die Expression während der embryonalen Entwicklung des Gehirns besonders kritisch zu sein. Diese Annahme wird durch eine verstärkte Expression in fötalen Gehirngewebe unterstützt. Darüber hinaus ist es wahrscheinlich, daß das Gehirn auf Defekte in der Translationsmaschinerie sensibler als andere Körperorgane reagiert. Eine weitere Möglichkeit wäre, daß ein anderes Protein teilweise die Funktion von FTSJ1 übernehmen könnte. Eine *in vitro* Untersuchung des Methylierungsstatus der entsprechenden tRNAs wäre eine Möglichkeit um diese Fragen zu klären.

Das zweite X-chromosomale Gen, das in mutierter Form geistige Behinderung verursacht und im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht worden ist, ist *PQBP1*. Die molekularbiologische Analyse der RNA von Patienten mit Mutationen in *PQBP1* hat ergeben, daß die überwiegende Anzahl der Transkriptvarianten über den sogenannten *nonsense mediated mRNA* (NMD) Mechanismus abgebaut werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß der pathologische Phänotyp wahrscheinlich durch einen Funktionsverlust der überwiegenden Anzahl der *PQBP1* Proteinvarianten verursacht wird. Möglicherweise wird der pathologische Phänotyp durch eine Kombination aus Funktionsverlust und modifizierter Funktion der mutierten, stabilen *PQBP1* Proteinvarianten verursacht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die zelluläre Lokalisation der mutierten *PQBP1* Proteine im Vergleich zur zellulären Lokalisation der Wildtyp *PQBP1* Hauptproteinvariante untersucht. Die beobachtete, veränderte zelluläre Lokalisation der mutierten Proteine unterstützt die Hypothese von einer veränderten Funktion verglichen mit dem Wildtyp Protein. Mehrere Interaktionspartner sind bereits für *PQBP1* beschrieben worden, und einige dieser Interaktionspartner weisen auf eine Rolle von *PQBP1* beim Spleißen von mRNA hin. Die präzise Aufgabe, die *PQBP1* bei diesem Prozeß übernimmt, ist jedoch noch nicht erforscht. Weitere Analysen der unterschiedlichen Interaktionspartner von *PQBP1* und deren Zusammenspiel mit *PQBP1* müssen demnach noch eingehender untersucht werden. Des Weiteren ist

es ziemlich wahrscheinlich, daß die unterschiedlichen PQBP1 Proteinvarianten verschiedene Aufgaben innerhalb der Zelle übernehmen, die entweder durch dessen Funktionsverlust oder aber durch eine veränderte Funktion der mutierten Proteinvarianten gestört werden. Weitere funktionelle Analysen sind notwendig, um ein besseres Verständnis der zellulären Prozesse zu erlangen, an denen PQBP1 beteiligt ist.

Der zweite Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag bei der Identifizierung von autosomalen Genen, die eine Rolle bei der Entwicklung von kognitiven Fähigkeiten spielen. Die zytogenetische Analyse der DNA von Patienten mit geistiger Behinderung, die Träger einer balancierten, reziproken Translokation sind, können zur Identifikation von Kandidatengen führen, die im oder in der Nähe des chromosomalen Bruchpunktes liegen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine solche molekulare Untersuchung der DNA einer weiblichen Patientin mit Rett Syndrom durchgeführt. Dabei wurde *NTNG1* als Kandidatengen identifiziert und mittels RT-PCR Experimenten gezeigt, daß eine Transkriptvariante dieses Gens durch die chromosomale Umstrukturierung unterbrochen wird und in reduzierter Menge vorliegt. Diese Transkriptvariante kodiert für eine Glykosylphosphatidylinositol (GPI) verankerte Proteinvariante von *NTNG1*. Alle Proteinvarianten von *NTNG1* agieren als Axonleitmoleküle und sind für das Wachstum und die Ausrichtung von thalamokortikalen Axonen (TCAs) wichtig. Die TCAs wiederum sind für die Weiterleitung von Signalen aus dem Thalamus in den Kortex verantwortlich. Die Reduzierung einer *NTNG1* Proteinvariante bei der Patientin führt möglicherweise zu einem verminderten Wachstum bzw. zu einer Fehlverschaltung solcher TCAs. Eine solche Entwicklungsstörung wäre eine mögliche Erklärung für die kognitiven Defizite der Patientin, und würde die Hypothese unterstützen, daß *NTNG1* eine Rolle bei der Pathogenese des Rett Syndroms spielen könnte. Weitere *in vitro* Experimente mit neuronalen Zellen müßten zeigen, daß das Wachstum von TCAs, verursacht durch Haploinsuffizienz einer Variante von *NTNG1*, gestört wird. Darüber hinaus könnte *NTNG1*, auf Grund der phänotypischen Überlappung des Rett Syndroms und der geistigen Behinderung, ein autosomales Kandidatengen für geistige Behinderung sein.

Zum Abschluß läßt sich festhalten, daß im Rahmen der vorliegenden Arbeit sowohl autosomale als auch X-chromosomale Gene mit unterschiedlichen

Funktionen in Zusammenhang mit geistiger Behinderung gebracht werden konnten. Die Identifizierung von zwei neuen Genen für NS-XLMR, *FTSJ1* und *PQBP1*, bestätigen, daß es sich bei geistiger Behinderung um eine sehr heterogene Erkrankung handelt. Keines der beiden Proteine interagiert mit bereits beschriebenen Genprodukten, die in mutierter Form XLMR verursachen, oder agiert in deren Signaltransduktionswegen.

Vorgänge wie Axonleitung, vermittelt durch *NTNG1*, tRNA Methylierung, vermittelt durch *FTSJ1* und Spleißen von mRNA, vermittelt durch *PQBP1* scheinen wichtige Prozesse bei der Entwicklung des Gehirns zu sein.

Die Identifizierung von Genen, die für kognitive Fähigkeiten verantwortlich sind, stellen somit einen guten Ausgangspunkt dar, um ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen zu erlangen, die der Funktion des Gehirns zu Grunde liegen.

6 Summary

Mental retardation is a very heterogeneous disorder. Severe forms, defined by an IQ of <50, have predominantly genetic causes, and many are due to defects in single genes. Recently progress has been made in the identification of the relevant gene defects, most notably on the human X-chromosome. However, most of the underlying molecular causes of X-linked mental retardation have still to be identified, and the search for autosomal genes that play a role in mental retardation is in its infancy. The aim of this study was to contribute to the molecular understanding of mental retardation, which is the largest unsolved problem in clinical genetics and a very important healthcare issue.

Several genes involved in nonspecific X-linked mental retardation (NS-XLMR) have been identified by genetic analysis so far. However, the low mutation frequency in these NS-XLMR genes in families with X-linked inheritance of MR indicates that still 30-100 NS-XLMR genes have yet to be detected (Ropers et al., 2003). Recently, it has been shown by analysis of linkage data from several families that approximately 30% of these genetic defects cluster on the proximal Xp (Ropers et al., 2003). Within the framework of this study, a systematic mutation screen of brain-expressed genes from this region was designed and performed. This analysis revealed that mutations in the X-chromosomal genes *FTSJ1* and *PQBP1* definitively result in mental retardation in male patients. For each gene, mutations cosegregated with the disorder in several families.

The function of human *FTSJ1* has not been investigated; however, studies on related yeast and *E. coli* proteins suggest that it functions as a S-Adenosyl-L-Methionine-dependent methyltransferase. Within the framework of this study, rescue experiments with human *FTSJ1* in yeast deletion strains verified its role as a methyltransferase. Moreover, these results suggested that *FTSJ1* functions specifically as a t-RNA methyltransferase. Which implies a role for *FTSJ1* in protein translation. Although *FTSJ1* is ubiquitously expressed, the phenotype of patients with mutations in this gene is relatively mild. Probably the activity of *FTSJ1* is most critical during brain development; this is supported by its high expression in fetal brain. Moreover brain structures could be more sensitive than other organs to defects in the translational machinery. Another possibility is that another protein could partially compensate the loss of function of *FTSJ1*. Further

functional studies, investigating the methylation sites of particular tRNAs might help clarify these questions.

The second X-chromosomal gene involved in mental retardation and investigated in this work is *PQBP1*. Molecular analysis of RNA derived from patients with mutations in *PQBP1* showed that the majority of normal splice variants of *PQBP1* are degraded by NMD. Indicating that the disorder likely arises from a loss of function of the majority of the PQBP1 proteins, perhaps together with a modified PQBP1 function resulting from the remaining stable transcripts. These stable mutant proteins were investigated within the framework of this study, and the fact that they exhibit a modified cellular localization with respect to the wild type proteins supports this hypothesis. Various interaction partners for PQBP1 have been described, and it seems that PQBP1 is involved in RNA splicing. The precise role of PQBP1 in this process is still unclear and has to be investigated by more precise analysis of the relationships between PQBP1 and its interaction partners. Furthermore, it is likely that the different PQBP1 proteins fulfill numerous different functions that may be affected by the abnormal proteins present in affected individuals. Further studies aim to explore these functional questions. The second focus of this work was the identification of autosomal genes that might play a role in cognitive function. The cytogenetic and subsequent molecular analysis of DNA from mentally retarded patients carrying balanced chromosomal rearrangements can lead to the identification of candidate disease genes lying at or near the breakpoints.

In this study, through such molecular characterization of DNA from a female Rett syndrome patient carrying a balanced translocation between chromosomes 1 and 7, the candidate gene *NTNG1* was identified. One transcript variant of the *NTNG1* gene is disrupted, and semi-quantitative RT-PCR experiments on a cell line from the patient showed that transcripts from this particular variant are reduced compared to controls. This transcript variant encodes a GPI anchored protein variant of NTNG1. All protein variants of NTNG1 act as axon guidance cues and are important for positioning thalamocortical axons (TCA). Thalamocortical axons are critical for transducing signals from the thalamus to the cortex. A dosage-dependent incorrect wiring of TCAs could explain the cognitive defects in this patient and thereby supports a role for NTNG1 in Rett Syndrome. Moreover, given the phenotypic overlap between this disorder and mental retardation, these results

bring the *NTNG1* gene to the forefront as an autosomal candidate mental retardation gene. Taken together, the results of this work demonstrated the presence of two novel NS-XLMR genes. Furthermore, detection of disease-causing mutations in *FTSJ1* and *PQBP1* confirmed the genetic heterogeneity of mental retardation in that neither one nor the other protein is involved in pathways or interactions with previously described genes involved in XLMR. Interestingly, both proteins are involved in basic cellular processes. *FTSJ1* acts as a tRNA methyltransferase involved in translation, and *PQBP1* seems to participate in mRNA splicing.

Finally, the identification of genes involved in cognitive function provides a starting point for gaining a better understanding of the molecular mechanisms critical for brain function. In this study, both autosomal and X-linked genes with diverse functions could be linked to mental retardation, implicating processes including axon guidance, RNA methylation, and regulation of mRNA splicing in the development of the brain, and thereby providing novel insights into the molecular aspects of cognition.

7 Literatur

Agmon A, Yang L, O'Dowd D, Jones E (1993) Organized growth of thalamocortical axons from the deep tier of terminations into layer IV of developing mouse barrel cortex. *Journal of Neuroscience*

Alberts BJ, A; Lewis, J; Raff, M; Roberts, K; Walter, P (2002) *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed.

Allen KM, Gleeson JG, Bagrodia S, Partington MW, MacMillan JC, Cerione RA, Mulley JC, Walsh CA (1998) PAK3 mutation in nonsyndromic X-linked mental retardation. *Nat Genet* 20:25-30

Alvarez C, Vitalis T, Fon EA, Hanoun N, Hamon M, Seif I, Edwards R, Gaspar P, Cases O (2002) Effects of genetic depletion of monoamines on somatosensory cortical development. *Neuroscience* 115:753-764

Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY (1999) Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 23:185-188

Andersen B, Rosenfeld MG (1994) Pit-1 determines cell types during development of the anterior pituitary gland. A model for transcriptional regulation of cell phenotypes in mammalian organogenesis. *J Biol Chem* 269:29335-29338

Ariani F, Mari F, Pescucci C, Longo I, Bruttini M, Meloni I, Hayek G, Rocchi R, Zappella M, Renieri A (2004) Real-time quantitative PCR as a routine method for screening large rearrangements in Rett syndrome: Report of one case of MECP2 deletion and one case of MECP2 duplication. *Hum Mutat* 24:172-177

Armstrong DD (1997) Review of Rett syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:843-849

- Armstrong DD (2002) Neuropathology of Rett syndrome. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 8:72-76
- Armstrong DD, Deguchi K, Antalfy B (2003) Survey of MeCP2 in the Rett syndrome and the non-Rett syndrome brain. *J Child Neurol* 18:683-687
- Barr ML, Carr DH (1961) Correlations between sex chromatin and chromosomes *Acta Cytol* 6:34-45
- Barzilai A, Melamed E (2003) Molecular mechanisms of selective dopaminergic neuronal death in Parkinson's disease. *Trends Mol Med* 9:126-132
- Bauman ML, Kemper TL, Arin DM (1995) Pervasive neuroanatomic abnormalities of the brain in three cases of Rett's syndrome. *Neurology* 45:1581-1586
- Berry LD, Gould KL (1997) Fission yeast *dim1(+)* encodes a functionally conserved polypeptide essential for mitosis. *J Cell Biol* 137:1337-1354
- Bienvenu T, des Portes V, McDonnell N, Carrie A, Zemni R, Couvert P, Ropers HH, Moraine C, van Bokhoven H, Fryns JP, Allen K, Walsh CA, Boue J, Kahn A, Chelly J, Beldjord C (2000) Missense mutation in PAK3, R67C, causes X-linked nonspecific mental retardation. *Am J Med Genet* 93:294-298
- Bienvenu T, Poirier K, Friocourt G, Bahi N, Beaumont D, Fauchereau F, Ben Jeema L, Zemni R, Vinet MC, Francis F, Couvert P, Gomot M, Moraine C, van Bokhoven H, Kalscheuer V, Frints S, Gecz J, Ohzaki K, Chaabouni H, Fryns JP, Desportes V, Beldjord C, Chelly J (2002) ARX, a novel Prd-class-homeobox gene highly expressed in the telencephalon, is mutated in X-linked mental retardation. *Hum Mol Genet* 11:981-991
- Billuart P, Bienvenu T, Ronce N, des Portes V, Vinet MC, Zemni R, Carrie A, Beldjord C, Kahn A, Moraine C, Chelly J (1998) Oligophrenin 1 encodes a

- rho-GAP protein involved in X-linked mental retardation. *Pathol Biol (Paris)* 46:678
- Bird A, Wolffe A (1999) Methylation-induced repression-bells, braces and chromatin. *Cell*
- Blackwood EM, Kadonaga JT (1998) Going the distance: a current view of enhancer action. *Science* 281:61-63
- Bolhuis PA, Ponne NJ, Bikker H, Baas F, Vianney de Jong JM (1993) Molecular basis of an adult form of Sandhoff disease: substitution of glutamine for arginine at position 505 of the beta-chain of beta-hexosaminidase results in a labile enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1182:142-146
- Bork P, Sudol M (1994) The WW domain: a signalling site in dystrophin? *Trends Biochem Sci* 19:531-533
- Bowden JA, McArthur CL, 3rd (1972) Possible biochemical model for phenylketonuria. *Nature* 235:230
- Braisted JE, Tuttle R, O'Leary D D (1999) Thalamocortical axons are influenced by chemorepellent and chemoattractant activities localized to decision points along their path. *Dev Biol* 208:430-440
- Brinks H, Conrad S, Vogt J, Oldekamp J, Sierra A, Deitinghoff L, Bechmann I, Alvarez-Bolado G, Heimrich B, Monnier PP, Mueller BK, Skutella T (2004) The repulsive guidance molecule RGMA is involved in the formation of afferent connections in the dentate gyrus. *J Neurosci* 24:3862-3869
- Brouns MR, Matheson SF, Settleman J (2001) p190 RhoGAP is the principal Src substrate in brain and regulates axon outgrowth, guidance and fasciculation. *Nat Cell Biol* 3:361-367

-
- Brown CJ, Greally JM (2003) A stain upon the silence: genes escaping X inactivation. *Trends Genet* 19:432-438
- Brown V, Jin P, Ceman S, Darnell JC, O'Donnell W T, Tenenbaum SA, Jin X, Feng Y, Wilkinson KD, Keene JD, Darnell RB, Warren ST (2001) Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. *Cell* 107: 477-487
- Bryda EC, DePari JA, Sant'Angelo DB, Murphy DB, Passmore HC (1992) Multiple sites of crossing over within the Eb recombinational hotspot in the mouse. *Mamm Genome* 2:123-129
- Bugge M, Bruun-Petersen G, Brondum-Nielsen K, Friedrich U, Hansen J, Jensen G, Jensen PK, Kristoffersson U, Lundsteen C, Niebuhr E, Rasmussen KR, Rasmussen K, Tommerup N (2000) Disease associated balanced chromosome rearrangements: a resource for large scale genotype-phenotype delineation in man *J Med Genet.* 37(11): 858-65
- Bugl H, Fauman EB, Staker BL, Zheng F, Kushner SR, Saper MA, Bardwell JC, Jakob U (2000) RNA methylation under heat shock control. *Mol Cell* 6:349-360
- Burge CB, Padgett RA, Sharp PA (1998) Evolutionary fates and origins of U12-type introns. *Mol Cell* 2:773-785
- Burset M, Guigo R (1996) Evaluation of gene structure prediction programs. *Genomics* 34:353-367
- Busch A, Engemann S, Lurz R, Okazawa H, Lehrach H, Wanker EE (2003) Mutant huntingtin promotes the fibrillogenesis of wild-type huntingtin: a potential mechanism for loss of huntingtin function in Huntington's disease. *J Biol Chem* 278:41452-41461

- Caldas T, Binet E, Bouloc P, Costa A, Desgres J, Richarme G (2000) The FtsJ/RrmJ heat shock protein of *Escherichia coli* is a 23 S ribosomal RNA methyltransferase. *J Biol Chem* 275:16414-16419
- Canki ND, B.; Tivadar, I (1979) Dystrophie musculaire de Duchenne chez une petite fille porteuse d'une translocation t(X;3) (p21;q13) de novo. *Genet*
- Cantoni G (1952) The nature of the active methyl donor formed enzymatically from l-methionine and adenosinetriphosphate. *J Amer Chem Soc*
- Carrie A, Jun L, Bienvenu T, Vinet MC, McDonnell N, Couvert P, Zemni R, Cardona A, Van Buggenhout G, Frints S, Hamel B, Moraine C, Ropers HH, Strom T, Howell GR, Whittaker A, Ross MT, Kahn A, Fryns JP, Beldjord C, Marynen P, Chelly J (1999) A new member of the IL-1 receptor family highly expressed in hippocampus and involved in X-linked mental retardation. *Nat Genet* 23:25-31
- Cattaneo E, Rigamonti D, Goffredo D, Zuccato C, Squitieri F, Sipione S (2001) Loss of normal huntingtin function: new developments in Huntington's disease research. *Trends Neurosci* 24:182-188
- Chelly J (1999) Breakthroughs in molecular and cellular mechanisms underlying X-linked mental retardation. *Hum Mol Genet* 8:1833-1838
- Chelly J, Mandel JL (2001) Monogenic causes of X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet* 2:669-680
- Chen HI, Sudol M (1995) The WW domain of Yes-associated protein binds a proline-rich ligand that differs from the consensus established for Src homology 3-binding modules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7819-7823
- Cheng X, Roberts RJ (2001) AdoMet-dependent methylation, DNA methyltransferases and base flipping. *Nucleic Acids Res* 29:3784-3795

- Ching YP, Zhou HJ, Yuan JG, Qiang BQ, Kung Hf HF, Jin DY (2002) Identification and characterization of FTSJ2, a novel human nucleolar protein homologous to bacterial ribosomal RNA methyltransferase. *Genomics* 79:2-6
- Chong SSLN, C.; Roschke, A. V.; Tanigami, A.; Pack, S. D.; Smith, A. C. M.; Carozzo, R.; Dobyns, W. B.; Ledbetter, D. H. (1996) Point mutations and an intragenic deletion in three ILS patients confirm LIS1 as the lissencephaly causative gene in isolated lissencephaly sequence and Miller-Dieker syndrome. *Am J Hum Genet*
- Coffin GSS, E.; Wegienka, L. C. (1966) Mental retardation with osteocartilaginous anomalies. *Am J Dis Child*
- Colamarino SA, Tessier-Lavigne M (1995) The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons. *Cell* 81:621-629
- Consortium IHGS (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431:931-945
- Coward J, Sweet W (1971) Kinetics and mechanism of methyl transfer from sulfonium compounds to various nucleophiles. *J Org Chem* 36:2337-2346
- Coward J (1977) Chemical mechanisms of methyl transfer reactions: comparison of methylases with nonenzymic "model reactions". *The biochemistry of adenosylmethionine*, Columbia University Press
- Crick FH (1966) Codon--anticodon pairing: the wobble hypothesis. *J Mol Biol* 19:548-555
- D'Adamo P, Menegon A, Lo Nigro C, Grasso M, Gulisano M, Tamanini F, Bienvenu T, Gedeon AK, Oostra B, Wu SK, Tandon A, Valtorta F, Balch WE, Chelly J, Toniolo D (1998) Mutations in GDI1 are responsible for X-linked non-specific mental retardation. *Nat Genet* 19:134-139

- Darnell JC, Jensen KB, Jin P, Brown V, Warren ST, Darnell RB (2001)
Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. *Cell* 107: 489-499
- Davey S, Beach D (1995) RACH2, a novel human gene that complements a fission yeast cell cycle checkpoint mutation. *Mol Biol Cell* 6:1411-1421
- Davies SW TM, Cozens BA, DiFiglia M, Sharp AH, Ross CA, Scherzinger E, Wanker EE, Mangiarini L, Bates GP (1997) Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell*
- Deqaqi SC, N'Guessan M, Forner J, Sbiti A, Beldjord C, Chelly J, Sefiani A, Des Portes V (1998) A gene for non-specific X-linked mental retardation (MRX55) is located in Xp11. *Ann Genet* 41:11-16
- DH BMuC (1961) Correlations between sex chromatin and sex chromosomes. *Acta Cytologica*
- Disteche CM, Filippova GN, Tsuchiya KD (2002) Escape from X inactivation. *Cytogenet Genome Res* 99:36-43
- Djordjevic S, Stock A, Chen Y, Stock J (1999) Protein methyltransferases involved in signal transduction. In *Structure and Function of AdoMet-Dependent Methyltransferases*. World Scientific Publishing Co
- Donis-Keller H, Green P, Helms C, Cartinhour S, Weiffenbach B, Stephens K, Keith TP, Bowden DW, Smith DR, Lander ES, et al. (1987) A genetic linkage map of the human genome. *Cell* 51:319-337
- Eddy SR (2001) Non-coding RNA genes and the modern RNA world
Nat Rev Genetics 2(12):919-29

- Einbond A, Sudol M (1996) Towards prediction of cognate complexes between the WW domain and proline-rich ligands. *FEBS Lett* 384:1-8
- Erlanson A, Samuelsson L, Hagberg B, Kyllerman M, Vujic M, Wahlstrom J (2003) Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) detects large deletions in the MECP2 gene of Swedish Rett syndrome patients. *Genet Test* 7:329-332
- Escribano VM, and Mazon MJ (2000) Disruption of six novel ORFs from *Saccharomyces cerevisiae* chromosome VII and phenotypic analysis of the deletants. *Yeast*, 16, 621–630
- Fearon K, Mason TL (1992) Structure and function of MRP20 and MRP49, the nuclear genes for two proteins of the 54 S subunit of the yeast mitochondrial ribosome. *J Biol Chem* 267:5162-5170
- Feng Y, Gutekunst CA, Eberhart DE, Yi H, Warren ST, Hersch SM (1997) Fragile X mental retardation protein: nucleocytoplasmic shuttling and association with somatodendritic ribosomes. *J Neurosci* 17:1539-1547
- Feng Q, Albeck JG, Cerione RA, Yang W (2002) Regulation of the Cool/Pix proteins: key binding partners of the Cdc42/Rac targets, the p21-activated kinases. *J Biol Chem* 277:5644-5650
- Fillipova GN, Cheng MK, Moore JM, Truong JP, Hu YJ, Nguyen DK, Tsuchiya KD, Disteche CM (2005) Boundaries between chromosomal domains of X inactivation and escape bind CTCF and lack CpG methylation during early development. *Dev Cell* 8:31-42
- Fisher EMC, Beer-Romero P, Brown LG, Ridley A, McNeil JA, Lawrence JB, Willard HF, Bieber FR, Page DC (1990) Homologous ribosomal protein genes on the human X and Y chromosomes: escape from X inactivation and possible implications for Turner syndrome. *Cell* 63: 1205-1218

- Ford CE, Jones KW, Polani PE, De Almeida JC, Briggs JH (1959) A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). *Lancet* 1:711-713
- Fotaki V, Dierssen M, Alcantara S, Martinez S, Marti E, Casas C, Visa J, Soriano E, Estivill X, Arbones ML (2002) Dyrk1A haploinsufficiency affects viability and causes developmental delay and abnormal brain morphology in mice. *Mol Cell Biol* 22:6636-6647
- Freude K, Hoffmann K, Jensen LR, Delatycki MB, des Portes V, Moser B, Hamel B, van Bokhoven H, Moraine C, Fryns JP, Chelly J, Gecz J, Lenzner S, Kalscheuer VM, Ropers HH (2004) Mutations in the FTSJ1 gene coding for a novel S-adenosylmethionine-binding protein cause nonsyndromic X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* 75:305-309
- Frints SG, Froyen G, Marynen P, Willekens D, Legius E, Fryns JP (2002) Re-evaluation of MRX36 family after discovery of an ARX gene mutation reveals mild neurological features of Partington syndrome. *Am J Med Genet* 112:427-428
- Frischmeyer PA, Dietz HC (1999) Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum Mol Genet* 8:1893-1900
- Fujita A und Kurachi Y (2000) SAP family proteins *Biochem Biophys Res Commun.* 269(1):1-6.
- Gavva NR, Gavva R, Ermekova K, Sudol M, Shen CJ (1997) Interaction of WW domains with hematopoietic transcription factor p45/NF-E2 and RNA polymerase II. *J Biol Chem* 272:24105-24108
- Gecz J, Gedeon AK, Sutherland GR, Mulley JC (1996) Identification of the gene FMR2, associated with FRAXE mental retardation. *Nat Genet* 13:105-108

-
- Gecz J, Mulley J (2000) Genes for cognitive function: developments on the X. *Genome Res* 10:157-163
- Gleeson JG, Allen KM, Fox JW, Lamperti ED, Berkovic S, Scheffer I, Cooper EC, Dobyns WB, Minnerath SR, Ross ME, Walsh CA (1998) Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell* 92:63-72
- Gomot M, Gendrot C, Verloes A, Raynaud M, David A, Yntema HG, Dessay S, Kalscheuer V, Frints S, Couvert P, Briault S, Blesson S, Toutain A, Chelly J, Desportes V, Moraine C (2003) MECP2 gene mutations in non-syndromic X-linked mental retardation: phenotype-genotype correlation. *Am J Med Genet* 123A:129-139
- Goutieres F, Aicardi J (1986) Atypical forms of Rett syndrome. *Am J Med Genet Suppl* 1:183-194
- Govek EE, Newey SE, Akerman CJ, Cross JR, Van der Veken L, Van Aelst L (2004) The X-linked mental retardation protein oligophrenin-1 is required for dendritic spine morphogenesis. *Nat Neurosci* 7:364-372
- Greenough WT, Klintsova AY, Irwin SA, Galvez R, Bates KE, Weiler IJ (2001) Synaptic regulation of protein synthesis and the fragile X protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98:7101-7106.
- Greenstein RMR, M. P.; Chan, T. S (1977) An X-autosome translocation in a girl with Duchenne muscular dystrophy (DMD): evidence for DMD gene localization. *Pediat Res*
- Ha HY, Cho IH, Lee KW, Song JY, Kim KS, Yu YM, Lee JK, Song JS, Yang SD, Shin HS, Han PL (2005) The axon guidance defect of the telencephalic commissures of the JSAP1-deficient brain was partially rescued by the transgenic expression of JIP1. *Dev Biol* 277:184-199

- Hagberg BA, Skjeldal OH (1994) Rett variants: a suggested model for inclusion criteria. *Pediatr Neurol* 11:5-11
- Hagberg B, Hanefeld F, Percy A, Skjeldal O (2002) An update on clinically applicable diagnostic criteria in Rett syndrome. Comments to Rett Syndrome Clinical Criteria Consensus Panel Satellite to European Paediatric Neurology Society Meeting, Baden Baden, Germany, 11 September 2001. *Eur J Paediatr Neurol* 6:293-297
- Hager J, Staker BL, Bugl H, Jakob U (2002) Active site in RrmJ, a heat shock-induced methyltransferase. *J Biol Chem* 277:41978-41986
- Hamel BC, Smits AP, van den Helm B, Smeets DF, Knoers NV, van Roosmalen T, Thoonen GH, Assman-Hulsmans CF, Ropers HH, Mariman EC, Kremer H (1999) Four families (MRX43, MRX44, MRX45, MRX52) with nonspecific X-linked mental retardation: clinical and psychometric data and results of linkage analysis. *Am J Med Genet* 85:290-304
- Hanefeld F (1985) The clinical pattern of the Rett syndrome. *Brain Dev* 7:320-325
- Harum KH, Alemi L, Johnston MV (2001) Cognitive impairment in Coffin-Lowry syndrome correlates with reduced RSK2 activation. *Neurology* 56: 207-214, 2001
- Hedgecock EM, Culotti JG, Hall DH (1990) The unc-5, unc-6, and unc-40 genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in *C. elegans*. *Neuron* 4:61-85
- Heine-Suner D, Torres-Juan L, Morla M, Busquets X, Barcelo F, Pico G, Bonilla L, Govea N, Bernues M, Rosell J (2003) Fragile-X syndrome and skewed X-chromosome inactivation within a family: a female member with complete inactivation of the functional X chromosome. *Am J Med Genet* 122A:108-114

- Hentze MW, Kulozik AE (1999) A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell* 96:307-310
- Hildebrandt, M. und Nellen, W. (1992) Differential antisense transcription from the *Dictyostelium* EB4 gene locus: implications on antisense-mediated regulation of mRNA stability. *Cell*, 69, 197–204
- Hinck L, (2004) The versatile Roles of “Axon Guidance” Cues in Tissue Morphogenesis. *Dev. Cell* 7:783-793
- Hillman MA, Gecz J (2001) Fragile XE-associated familial mental retardation protein 2 (FMR2) acts as a potent transcription activator. *J Hum Genet* 46:251-259
- Holmes W (1999) tRNA Methyltransferases. AdoMet-Dependent Methyltransferases: Structure and Function in World Scientific Publishing
- Ichikawa J, Clarke S (1998) A Highly Active Protein Repair Enzyme from an Extreme Thermophile: The L-Isoaspartyl Methyltransferase from *Thermotoga maritima*. *ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS*
- Imai Y, Soda M, Inoue H, Hattori N, Mizuno Y, Takahashi R (2001) An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell* 105:891-902
- Ingram VM (1959) Abnormal human haemoglobin. III. The chemical difference between normal and sickle cell haemoglobins. *Biochim Biophys Acta* Dec: 402-411
- Inlow JK und Restifo LL (2004) Molecular and comparative genetics of mental retardation. *Genetics* 2: 835-81
- Iwamoto K, Huang Y, Ueda S. (2000) Genomic organization and alternative transcripts of the human PQBP-1 gene *Gene* 259(1-2):69-73.

- Jaegle M, Ghazvini M, Mandemakers W, Piirsoo M, Driegen S, Levavasseur F, Raghoenath S, Grosveld F, Meijer D (2003) The POU proteins Brn-2 and Oct-6 share important functions in Schwann cell development. *Genes Dev* 17:1380-1391
- Jensen LR, Amende M, Gurok U, Moser B, Gimmel V, Tzschach A, Janecke AR, Tariverdian G, Chelly J, Fryns JP, Van Esch H, Kleefstra T, Hamel B, Moraine C, Gecz J, Turner G, Reinhardt R, Kalscheuer VM, Ropers HH, Lenzner S (2005) Mutations in the JARID1C gene, which is involved in transcriptional regulation and chromatin remodeling, cause X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet.* 76(2): 227-36
- Jiang H, Motorin Y, Jin Y, Grosjean H (1997) Pleiotropic effects of intron removal on base modification pattern of yeast tRNAPhe: an in vitro study. *Nucleic Acids Res*
- Jin P, Warren ST (2003) New insights into fragile X syndrome: from molecules to neurobehaviors. *Trends Biochem Sci* 28:152-158
- Jin P, Zarnescu DC, Ceman S, Nakamoto M, Mowrey J, Jongens TA, Nelson DL, Moses K, Warren ST (2004) Biochemical and genetic interaction between the fragile X mental retardation protein and the microRNA pathway. *Nature Neurosci.* 7: 113-117,
- Johnston MV (2004) Clinical disorders of brain plasticity. *Brain Dev* 26:73-80
- Jones MH, Davey PM, Aplin H, Affara NA (1995) Expression analysis, genomic structure, and mapping to 7q31 of the human sperm adhesion molecule gene SPAM1. *Genomics* 29:796-800
- Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 19:187-191

- Kagan RM, Clarke S (1994) Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes. *Arch Biochem Biophys* 310:417-427
- Kaiser C, Michaelis S und Mitchell A (1994) *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 208–210
- Kalscheuer VM, Freude K, Musante L, Jensen LR, Yntema HG, Gecz J, Sefiani A, Hoffmann K, Moser B, Haas S, Gurok U, Haesler S, Aranda B, Nshedjan A, Tzschach A, Hartmann N, Roloff TC, Shoichet S, Hagens O, Tao J, Van Bokhoven H, Turner G, Chelly J, Moraine C, Fryns JP, Nuber U, Hoeltzenbein M, Scharff C, Scherthan H, Lenzner S, Hamel BC, Schweiger S, Ropers HH (2003) Mutations in the polyglutamine binding protein 1 gene cause X-linked mental retardation. *Nat Genet* 35:313-315
- Kerr AM, Nomura Y, Armstrong D, Anvret M, Belichenko PV, Budden S, Cass H, Christodoulou J, Clarke A, Ellaway C, d'Esposito M, Francke U, Hulten M, Julu P, Leonard H, Naidu S, Schanen C, Webb T, Engerstrom IW, Yamashita Y, Segawa M (2001) Guidelines for reporting clinical features in cases with MECP2 mutations. *Brain Dev* 23:208-211
- Kim IF, Mohammadi E, Huang RC (1999) Isolation and characterization of IPP, a novel human gene encoding an actin-binding, kelch-like protein. *Gene* 1-2: 73-83
- Kleefstra T, Yntema HG, Oudakker AR, Banning MJ, Kalscheuer VM, Chelly J, Moraine C, Ropers HH, Fryns JP, Janssen IM, Sistermans EA, Nillesen WN, de Vries LB, Hamel BC, van Bokhoven H (2004) Zinc finger 81 (ZNF81) mutations associated with X-linked mental retardation. *J Med Genet* 41:394-399
- Kleinjan DA, van Heyningen V (2005) Long-range control of gene expression: emerging mechanisms and disruption in disease. *Am J Hum Genet*. 76:8-32

- Komuro A, Saeki M, Kato S (1999a) Association of two nuclear proteins, Npw38 and NpwBP, via the interaction between the WW domain and a novel proline-rich motif containing glycine and arginine. *J Biol Chem* 274:36513-36519
- Komuro A, Saeki M, Kato S (1999b) Npw38, a novel nuclear protein possessing a WW domain capable of activating basal transcription. *Nucleic Acids Res* 27:1957-1965
- Kostopoulos L, Lioubavina N, Karring T, Uraguchi R (2001) Role of chitin beads in the formation of jaw bone by guided tissue regeneration. An experiment in the rat. *Clin Oral Implants Res* 12:325-331
- Kozma R, Sarner S, Ahmed S, Lim L (1997) Rho family GTPases and neuronal growth cone remodelling: relationship between increased complexity induced by Cdc42Hs, Rac1, and acetylcholine and collapse induced by RhoA and lysophosphatidic acid. *Mol Cell Biol* 17:1201-1211
- Krawczak M, Reiss J, Cooper DN (1992) The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet* 90:41-54
- Kressler D, Rojo M, Linder P, Cruz J (1999) Spb1p is a putative methyltransferase required for 60S ribosomal subunit biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 27:4598-4608
- Kronegg J, Buloz D, (1999), Detection/prediction of GPI cleavage site (GPI-anchor) in a protein (DGPI), Retrieved [retrieve date] from <http://129.194.185.165/dgpi/>
- Kurokawa D, Kiyonari H, Nakayama R, Kimura-Yoshida C, Matsuo I, Aizawa S (2004) Regulation of Otx2 expression and its functions in mouse forebrain and midbrain. *Development* 131:3319-3331

- Kutsche K, Yntema H, Brandt A, Jantke I, Nothwang HG, Orth U, Boavida MG, David D, Chelly J, Fryns JP, Moraine C, Ropers HH, Hamel BC, van Bokhoven H, Gal A (2000) Mutations in ARHGEF6, encoding a guanine nucleotide exchange factor for Rho GTPases, in patients with X-linked mental retardation. *Nat Genet* 26:247-250
- Laumonnier F, Bonnet-Brilhault F, Gomot M, Blanc R, David A, Moizard MP, Raynaud M, Ronce N, Lemonnier E, Calvas P, Laudier B, Chelly J, Fryns JP, Ropers HH, Hamel BC, Andres C, Barthelemy C, Moraine C, Briault S (2004) X-linked mental retardation and autism are associated with a mutation in the NLGN4 gene, a member of the neuroligin family. *Am J Hum Genet* 74:552-557
- Lebel RR, May M, Pouls S, Lubs HA, Stevenson RE, Schwartz CE (2002) Non-syndromic X-linked mental retardation associated with a missense mutation (P312L) in the FGD1 gene. *Clin Genet* 61:139-145
- Lee LG, Connell CR, Woo SL, Cheng RD, McArdle BF, Fuller CW, Halloran ND, Wilson RK (1992) DNA sequencing with dye-labeled terminators and T7 DNA polymerase: effect of dyes and dNTPs on incorporation of dye-terminators and probability analysis of termination fragments. *Nucleic Acids Res.* 25; 20(10):2471-83
- Lehrke R (1972) Theory of X-linkage of major intellectual traits. *Am J Ment Defic* 76:611-619
- Lejeune J, Turpin R, Gautier M (1959) [Chromosomal diagnosis of mongolism]. *Arch Fr Pediatr* 16:962-963
- Lejeune J, Lafourcade J, Berger R, Vialatte J, Boeswillwald M, Seringe P, Turpin R (1963) [3 Cases of Partial Deletion of the Short Arm of a 5 Chromosome]. *C R Hebd Seances Acad Sci* 257:3098-3102

- Lenski C, Abidi F, Meindl A, Gibson A, Platzer M, Frank Kooy R, Lubs HA, Stevenson RE, Ramser J, Schwartz CE (2004) Novel truncating mutations in the polyglutamine tract binding protein 1 gene (PQBP1) cause Renpenning syndrome and X-linked mental retardation in another family with microcephaly. *Am J Hum Genet* 74:777-780
- Lettice LA, Horikoshi T, Heaney SJ, van Baren MJ, van der Linde HC, Breedveld GJ, Joosse M, Akarsu N, Oostra BA, Endo N, Shibata M, Suzuki M, Takahashi E, Shinka T, Nakahori Y, Ayusawa D, Nakabayashi K, Scherer SW, Heutink P, Hill RE, Noji S (2002) Disruption of a long-range cis-acting regulator for Shh causes preaxial polydactyly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:7548-7553
- Li W, Graur D (1991) *Fundamentals of Molecular Evolution*. Sinauer Association, Sunderland MA
- Lin Y, Kimmel LH, Myles DG, Primakoff P (1993) Molecular cloning of the human and monkey sperm surface protein PH-20. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10071-10075
- Lin JC, Ho WH, Gurney A, Rosenthal A (2003) The netrin-G1 ligand NGL-1 promotes the outgrowth of thalamocortical axons. *Nat Neurosci* 6:1270-1276
- Litt M LJ (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet*
- Loewith R, Meijer M, Lees-Miller SP, Riabowol K, Young D (2000) Three yeast proteins related to the human candidate tumor suppressor p33(ING1) are associated with histone acetyltransferase activities. *Mol Cell Biol* 20:3807-3816

- Longo VD, Ellerby LM, Bredesen DE, Valentine JS, Gralla EB (1997) Human Bcl-2 reverses survival defects in yeast lacking superoxide dismutase and delays death of wild-type yeast. *J Cell Biol* 137:1581-1588
- Lyon MF (1961) Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.) *Nature* 190:372-3
- MacDonald ME, Novelletto A, Lin C, Tagle D, Barnes G, Bates G, Taylor S, Allitto B, Altherr M, Myers R, et al. (1992) The Huntington's disease candidate region exhibits many different haplotypes. *Nat Genet* 1:99-103
- Marazziti D, Golini E, Gallo A, Lombardi MS, Matteoni R, Tocchini-Valentini GP (1997) Cloning of GPR37, a gene located on chromosome 7 encoding a putative G-protein-coupled peptide receptor, from a human frontal brain EST library. *Genomics* 45:68-77
- Meijlink F, Beverdam A, Brouwer A, Oosterveen TC, Berge DT (1999) Vertebrate aristaless-related genes. *Int J Dev Biol* 43:651-663
- Meloni I, Muscettola M, Raynaud M, Longo I, Bruttini M, Moizard MP, Gomot M, Chelly J, des Portes V, Fryns JP, Ropers HH, Magi B, Bellan C, Volpi N, Yntema HG, Lewis SE, Schaffer JE, Renieri A (2002) FAACL4, encoding fatty acid-CoA ligase 4, is mutated in nonspecific X-linked mental retardation. *Nat Genet* 30:436-440
- Merienne K, Jacquot S, Pannetier S, Zeniou M, Bankier A, Gecz J, Mandel JL, Mulley J, Sassone-Corsi P, Hanauer A (1999) A missense mutation in RPS6KA3 (RSK2) responsible for non-specific mental retardation. *Nat Genet* 22:13-14
- Mitchell PJ, Tjian R (1989) Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245:371-378

- Mnatzakanian GN, Lohi H, Munteanu I, Alfred SE, Yamada T, MacLeod PJ, Jones JR, Scherer SW, Schanen NC, Friez MJ, Vincent JB, Minassian BA (2004) A previously unidentified MECP2 open reading frame defines a new protein isoform relevant to Rett syndrome. *Nat Genet* 36:339-341
- Molnar Z, Higashi S, Lopez-Bendito G (2003) Choreography of early thalamocortical development. *Cereb Cortex* 13:661-669
- Monani UR, Lorson CL, Parsons DW, Prior TW, Androphy EJ, Burghes AH, McPherson JD (1999) A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum Mol Genet* 8:1177-1183
- Murasawa S, Matsubara H, Mori Y, Masaki H, Tsutsumi Y, Shibasaki Y, Kitabayashi I, Tanaka Y, Fujiyama S, Koyama Y, Fujiyama A, Iba S, Iwasaka T (2000) Angiotensin II initiates tyrosine kinase Pyk2-dependent signalings leading to activation of Rac1-mediated c-Jun NH2-terminal kinase. *J Biol Chem* 275:26856-26863
- Munroe SH, Lazar MA (1991) Inhibition of c-erbA mRNA splicing by a naturally occurring antisense RNA. *J Biol Chem* 33:22083-6
- Myerowitz R (1988) Splice junction mutation in some Ashkenazi Jews with Tay-Sachs disease: evidence against a single defect within this ethnic group. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:3955-3959
- Myers AM, Pape LK, Tzagoloff A (1985) Mitochondrial protein synthesis is required for maintenance of intact mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 4:2087-2092
- Nakada Y, Parab P, Simmons A, Omer-Abdalla A, Johnson JE (2004) Separable enhancer sequences regulate the expression of the neural bHLH transcription factor neurogenin 1. *Dev Biol* 271:479-487

- Nakai S, Kawano H, Yudate T, Nishi M, Kuno J, Nagata A, Jishage K, Hamada H, Fujii H, Kawamura K, et al. (1995) The POU domain transcription factor Brn-2 is required for the determination of specific neuronal lineages in the hypothalamus of the mouse. *Genes Dev* 9:3109-3121
- Nakamura Y, Leppert M, O'Connell P, Wolff R, Holm T, Culver M, Martin C, Fujimoto E, Hoff M, Kumlin E (1987) Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 235:1616-1622
- Nakashiba T, Ikeda T, Nishimura S, Tashiro K, Honjo T, Culotti JG, Itohara S (2000) Netrin-G1: a novel glycosyl phosphatidylinositol-linked mammalian netrin that is functionally divergent from classical netrins. *J Neurosci* 20:6540-6550
- Nakashiba T, Nishimura S, Ikeda T, Itohara S (2002) Complementary expression and neurite outgrowth activity of netrin-G subfamily members. *Mech Dev* 111:47-60
- Nalefski EA, Falke JJ (1996) The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci* 5:2375-2390
- Nan X, Campoy FJ, Bird A (1997) MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* 88:471-481
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393:386-389
- Nemes JP, Benzow KA, Moseley ML, Ranum LP, Koob MD (2000) The SCA8 transcript is an antisense RNA to a brain-specific transcript encoding a novel actin-binding protein (KLHL1). *Hum Mol Genetics* 10: 1543-51
- Ng HH, Bird A (1999) DNA methylation and chromatin modification. *Curr Opin Genet Dev* 9:158-163

- O'Donovan MC, Oefner PJ, Roberts SC, Austin J, Hoogendoorn B, Guy C, Speight G, Upadhyaya M, Sommer SS, McGuffin P (1998) Blind analysis of denaturing high-performance liquid chromatography as a tool for mutation detection. *Genomics* 52:44-49
- Ogura T, Tomoyasu T, Yuki T, Morimura S, Begg KJ, Donachie WD, Mori H, Niki H, Hiraga S (1991) Structure and function of the *ftsH* gene in *Escherichia coli*. *Res Microbiol* 142:279-282
- Okazawa H, Sudol M, Rich T (2001) PQBP-1 (Np/PQ): a polyglutamine tract-binding and nuclear inclusion-forming protein. *Brain Res Bull* 56:273-280
- Okazawa H, Rich T, Chang A, Lin X, Waragai M, Kajikawa M, Enokido Y, Komuro A, Kato S, Shibata M, Hatanaka H, Mouradian MM, Sudol M, Kanazawa I (2002) Interaction between mutant ataxin-1 and PQBP-1 affects transcription and cell death. *Neuron* 34:701-713
- Okano, H., Aruga, J., Nakagawa, T., Shiota, C. and Mikoshiba, K. (1991) Myelin basic protein gene and the function of antisense RNA in its repression in myelin-deficient mutant mouse. *J. Neurochem.*, 56, 560–567
- Okuda T, Hattori H, Takeuchi S, Shimizu J, Ueda H, Palvimo JJ, Kanazawa I, Kawano H, Nakagawa M, Okazawa H (2003) PQBP-1 transgenic mice show a late-onset motor neuron disease-like phenotype. *Hum Mol Genet* 12:711-725
- Orrico A, Lam C, Galli L, Dotti MT, Hayek G, Tong SF, Poon PM, Zappella M, Federico A, Sorrentino V (2000) MECP2 mutation in male patients with non-specific X-linked mental retardation. *FEBS Lett* 481:285-288
- Ott J (1991) *Analysis of Human Genetic Linkage*. John hopkins University Press Park MT, J. R.; Blair, D. G.; Dean, M.; Parsa, N. Z.; Vande Woude, G. F (1987) The CF locus is distal to and upstream from the met protooncogene transcription unit which is located at 7q31-32. *Cytogenet Cell Genet*

- Pfeiffer P, Feldmann E, Odersky A, Kuhfittig-Kulle S, Goedecke W (2004) Analysis of DNA double-strand break repair by nonhomologous end joining in cell-free extracts from Mammalian cells. *Methods Mol Biol* 291:351-372
- Pintard L, Bujnicki JM, Lapeyre B, Bonnerot C (2002a) MRM2 encodes a novel yeast mitochondrial 21S rRNA methyltransferase. *Embo J* 21:1139-1147
- Pintard L, Lecointe F, Bujnicki JM, Bonnerot C, Grosjean H, Lapeyre B (2002b) Trm7p catalyses the formation of two 2'-O-methylriboses in yeast tRNA anticodon loop. *Embo J* 21:1811-1820
- Qi M, Byers P (1998) Constitutive skipping of alternatively spliced exon 10 in the ATP7A gene abolishes Golgi localization of the menkes protein and produces the occipital horn syndrome. *Human Molecular Genetics*
- Radovick S, Nations M, Du Y, Berg LA, Weintraub BD, Wondisford FE (1992) A mutation in the POU-homeodomain of Pit-1 responsible for combined pituitary hormone deficiency. *Science* 257:1115-1118
- Ray PN, Belfall B, Duff C, Logan C, Kean V, Thompson MW, Sylvester JE, Gorski JL, Schmickel RD, Worton RG (1985) Cloning of the breakpoint of an X;21 translocation associated with Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 318:672-5
- Renieri A, Meloni I, Longo I, Ariani F, Mari F, Pescucci C, Cambi F (2003) Rett syndrome: the complex nature of a monogenic disease. *J Mol Med* 81:346-354
- Reuter K, Nottrott S, Fabrizio P, Luhrmann R, Ficner R (1999) Identification, characterization and crystal structure analysis of the human spliceosomal U5 snRNP-specific 15 kD protein. *J Mol Biol* 294:515-525

- Rigby PW, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I (1977) *J Mol Biol.* 1977 113:237-51.
- Riggs AD, Pfeifer GP (1992) X-chromosome inactivation and cell memory. *Trends Genet* 8:169-174
- Rizo J, Sudhof TC (1998) C2-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain. *J Biol Chem* 273:15879-15882
- Ropers HH, Hamel BC (2005) X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet.* 6:46-57.
- Ropers HH, Hoeltzenbein M, Kalscheuer V, Yntema H, Hamel B, Fryns JP, Chelly J, Partington M, Gecz J, Moraine C (2003) Nonsyndromic X-linked mental retardation: where are the missing mutations? *Trends Genet* 19:316-320
- Rosenberg EH, Almeida LS, Kleefstra T, deGrauw RS, Yntema HG, Bahi N, Moraine C, Ropers HH, Fryns JP, deGrauw TJ, Jakobs C, Salomons GS (2004) High prevalence of SLC6A8 deficiency in X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* 75:97-105
- Sambrook J, Fritsch EF und Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M (1977) Nucliotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 24; 265 (5596):687-95
- Santis G, Osborne L, Knight RA, Hodson ME (1990) Independent genetic determinants of pancreatic and pulmonary status in cystic fibrosis. *Lancet* 336:1081-1084

- Schenck A, Bardoni B, Langmann C, Harden N, Mandel JL, Giangrande A (2003) CYFIP/Sra-1 controls neuronal connectivity in *Drosophila* and links the Rac1 GTPase pathway to the fragile X protein. *Neuron* 38(6):887-98
- Schmitz AA, Govek EE, Bottner B, Van Aelst L (2000) Rho GTPases: signaling, migration, and invasion. *Exp Cell Res* 261:1-12
- Schmidt A and Hall A (2002) The Rho Exchange Factor Net1 Is Regulated by Nuclear Sequestration. *J. Biol. Chem.* 277: 14581-14588
- Schonemann MD, Ryan AK, McEvilly RJ, O'Connell SM, Arias CA, Kalla KA, Li P, Sawchenko PE, Rosenfeld MG (1995) Development and survival of the endocrine hypothalamus and posterior pituitary gland requires the neuronal POU domain factor Brn-2. *Genes Dev* 9:3122-3135
- Schreiber E, Tobler A, Malipiero U, Schaffner W, Fontana A (1993) cDNA cloning of human N-Oct3, a nervous-system specific POU domain transcription factor binding to the octamer DNA motif. *Nucleic Acids Res* 21:253-258
- Schultz DC, Ayyanathan K, Negorev D, Maul GG, Rauscher FJ, 3rd (2002) SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev* 16:919-932
- Serafini T, Kennedy TE, Galiko MJ, Mirzayan C, Jessell TM, Tessier-Lavigne M (1994) The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell* 78:409-424
- Shahbazian MD, Zoghbi HY (2002) Rett syndrome and MeCP2: linking epigenetics and neuronal function. *Am J Hum Genet* 71:1259-1272
- Sharom FJ, Lehto MT (2002) Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins: structure, function, and cleavage by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochem Cell Biol* 80:535-549

- Shemer R, Birger Y, Dean WL, Reik W, Riggs AD, Razin A (1996) Dynamic methylation adjustment and counting as part of imprinting mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6371-6376
- Shoichet SA, Hoffmann K, Menzel C, Trautmann U, Moser B, Hoeltzenbein M, Echenne B, Partington M, Van Bokhoven H, Moraine C, Fryns JP, Chelly J, Rott HD, Ropers HH, Kalscheuer VM (2003) Mutations in the ZNF41 gene are associated with cognitive deficits: identification of a new candidate for X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* 73:1341-1354
- Siebert PD, Chenchik A, Kellogg DE, Lukyanov KA, Lukyanov SA (1995) An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res* 23:1087-1088
- Smit M, Leng J and Klemke R (2003) Assay for neurite outgrowth quantification. *Biotechniques* 35:254-256
- Spacey SD, Hildebrand ME, Materek LA, Bird TD, Snutch TP (2004) Functional implications of a novel EA2 mutation in the P/Q-type calcium channel. *Ann Neurol* 56:213-220
- Stern C, Pertile M, Norris H, Hale L, Baker HW (1999) Chromosome translocations in couples with in-vitro fertilization implantation failure. *Hum Reprod* 14:2097-2101
- Strachan T, Read AP (1996), 1.Aufl. Spektrum Akademischer Verlag
- Stromme P, Mangelsdorf ME, Shaw MA, Lower KM, Lewis SM, Bruyere H, Lutcherath V, Gedeon AK, Wallace RH, Scheffer IE, Turner G, Partington M, Frints SG, Fryns JP, Sutherland GR, Mulley JC, Gecz J (2002) Mutations in the human ortholog of *Aristaless* cause X-linked mental retardation and epilepsy. *Nat Genet* 30:441-445

- Sudol M, Chen HI, Bougeret C, Einbond A, Bork P (1995) Characterization of a novel protein-binding module--the WW domain. *FEBS Lett* 369:67-71
- Sugitani Y, Nakai S, Minowa O, Nishi M, Jishage K, Kawano H, Mori K, Ogawa M, Noda T (2002) Brn-1 and Brn-2 share crucial roles in the production and positioning of mouse neocortical neurons. *Genes Dev* 16:1760-1765
- Sutherland GR GA, Haan EA, Woodroffe P, Mulley JC (1988) Linkage studies with the gene for an X-linked syndrome of mental retardation, microcephaly and spastic diplegia (MRX2). *Am J Med Genet*
- Tao J, Von Esch H, Hagedorn-Greiwe M, Hoffmann K, Moser B, Raynaud M, Sperner J, Fryns JP, Schwinger E, Gécz J, Ropers HH, Kalscheuer VM (2004) Mutations in the X-linked cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5/STK9) gene are associated with severe neurodevelopmental retardation. *Am J Med Genet* 75: 1149-54
- Tarpey P, Parnau J, Blow M, Woffendin H, Bignell G, Cox C, Cox J, Davies H, Edkins S, Holden S, Kornly A, Mallya U, Moon J, O'Meara S, Parker A, Stephens P, Stevens C, Teague J, Donnelly A, Mangelsdorf M, Mulley J, Partington M, Turner G, Stevenson R, Schwartz C, Young I, Easton D, Bobrow M, Futreal PA, Stratton MR, Gecz J, Wooster R, Raymond FL (2004) Mutations in the DLG3 gene cause nonsyndromic X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* 75:318-324
- Tate P, Skarnes W, Bird A (1996) The methyl-CpG binding protein MeCP2 is essential for embryonic development in the mouse. *Nat Genet* 12:205-208
- Tautz D (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res* 17:6463-6471
- Tommerup N (1993) Mendelian cytogenetics. Chromosome rearrangements associated with mendelian disorders. *J Med Genet* 30:713-727

- Tschochner H, Hurt E (2003) Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol* 13:255-263
- Trivier E, De Cesare D, Jacquot S, Pannetier S, Zackai E, Young I, Mandel JL, Sassone-Corsi P, Hanauer A Mutations in the kinase Rsk-2 associated with Coffin-Lowry syndrome. *Nature* 384: 567-570
- Tuttle R, Nakagawa Y, Johnson JE, O'Leary DD (1999) Defects in thalamocortical axon pathfinding correlate with altered cell domains in Mash-1-deficient mice. *Development* 126:1903-1916
- Udell CM, Lee SK, Davey S (1998) HRAD1 and MRAD1 encode mammalian homologues of the fission yeast rad1(+) cell cycle checkpoint control gene. *Nucleic Acids Res* 26:3971-3976
- Udenfriend S, Kodukula K (1995) How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Annu Rev Biochem* 64:563-591
- Verellen CM, V.; DeMeyer, R.; Freund, M.; Laterre, C.; Worton, R (1978) Expression of an X-linked recessive disease in a female due to non-random inactivation of the X chromosome. *Am J Hum Genet*
- Vergnaud G (1989) Polymers of random short oligonucleotides detect polymorphic loci in the human genome. *Nucleic Acids Res* 17:7623-7630
- Vervoort VS, Beachem MA, Edwards PS, Ladd S, Miller KE, de Mollerat X, Clarkson K, DuPont B, Schwartz CE, Stevenson RE, Boyd E, Srivastava AK (2002) AGTR2 mutations in X-linked mental retardation. *Science* 296:2401-2403
- Villard J (2004) Transcription regulation and human diseases. *Swiss Med Wkly* 134:571-579

- Wadsworth WG, Bhatt H, Hedgecock EM (1996) Neuroglia and pioneer neurons express UNC-6 to provide global and local netrin cues for guiding migrations in *C. elegans*. *Neuron* 16:35-46
- Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantès J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustert E, et al. (1994) Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9. *Cell* 79:1111-1120
- Walling HW, Baldassare JJ, Westfall TC (1998) Molecular aspects of Huntington's disease. *J Neurosci Res* 54:301-308
- Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, Ghandour G, Perkins N, Winchester E, Spencer J, Kruglyak L, Stein L, Hsie L, Topaloglou T, Hubbell E, Robinson E, Mittmann M, Morris MS, Shen N, Kilburn D, Rioux J, Nusbaum C, Rozen S, Hudson TJ, Lander ES, et al. (1998) Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 280:1077-1082
- Waragai M, Lammers CH, Takeuchi S, Imafuku I, Udagawa Y, Kanazawa I, Kawabata M, Mouradian MM, Okazawa H (1999) PQBP-1, a novel polyglutamine tract-binding protein, inhibits transcription activation by Brn-2 and affects cell survival. *Hum Mol Genet* 8:977-987
- Waragai M, Junn E, Kajikawa M, Takeuchi S, Kanazawa I, Shibata M, Mouradian MM, Okazawa H (2000) PQBP-1/Npw38, a nuclear protein binding to the polyglutamine tract, interacts with U5-15kD/dim1p via the carboxyl-terminal domain. *Biochem Biophys Res Commun.* 273(2): 592-5
- Weaving LS, Christodolou J, Williamson SL, Friend KL, McKenzie OLD, Archer H, Evans J, Clarke A, Pelka GJ, Tam PPL, Watson C, Lahooti H, Ellaway CJ, Bennetts B, Leonard H, Gecz J (2004) Mutations of CDKL5 Cause a Severe Neurodevelopmental Disorder with Infantile Spasms and Mental Retardation. *Am J Med Genet* 75: 1079-93

- Wenk GL, O'Leary M, Nemeroff CB, Bissette G, Moser H, Naidu S (1993) Neurochemical alterations in Rett syndrome. *Brain Res Dev Brain Res* 74:67-72
- White R, Lalouel JM (1988) Sets of linked genetic markers for human chromosomes. *Annu Rev Genet* 22:259-279
- Willemsen R, Oostra BA, Bassell GJ, Dichtenberg J (2004) The fragile X syndrome: from molecular genetics to neurobiology. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 10:60-67
- Wirth J, Nothwang HG, van der Maarel S, Menzel C, Borck G, Lopez-Pajares I, Brondum-Nielsen K, Tommerup N, Bugge M, Ropers HH, Haaf T (1999) Systematic characterisation of disease associated balanced chromosome rearrangements by FISH: cytogenetically and genetically anchored YACs identify microdeletions and candidate regions for mental retardation genes *J Med Genet*. 1999 36:271-8.
- Wutz A, Smrzka OW, Schweifer N, Schellander K, Wagner EF, Barlow DP (1997) Imprinted expression of the *Igf2r* gene depends on an intronic CpG island. *Nature* 389(6652):745-9
- Yin Y, Miner JH, Sanes JR (2002) Laminets: laminin- and netrin-related genes expressed in distinct neuronal subsets. *Mol Cell Neurosci* 19:344-358
- Yoshioka M, Yorifuji T, Mituyoshi I (1998) Skewed X inactivation in manifesting carriers of Duchenne muscular dystrophy. *Clin Genet* 53:102-107
- Zemni R, Bienvenu T, Vinet MC, Sefiani A, Carrie A, Billuart P, McDonnell N, Couvert P, Francis F, Chafey P, Fauchereau F, Friocourt G, des Portes V, Cardona A, Frints S, Meindl A, Brandau O, Ronce N, Moraine C, van Bokhoven H, Ropers HH, Sudbrak R, Kahn A, Fryns JP, Beldjord C, Chelly J (2000) A new gene involved in X-linked mental retardation identified by analysis of an X;2 balanced translocation. *Nat Genet* 24:167-170

Zheng Y, Fischer DJ, Santos MF, Tigyi G, Pasteris NG, Gorski JL, Xu Y (1996)
The faciogenital dysplasia gene product FGD1 functions as a Cdc42Hs-
specific guanine-nucleotide exchange factor. *J Biol Chem* 271:33169-33172

8 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|--|
| Abb. | Abbildung |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| AS | Aminosäure |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| Bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserum Albumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| °C | Grad Celsius |
| cDNA | complementary DNA (engl.), komplementäre DNA |
| Ci | Curie |
| Cpm | counts per minute (engl.), Zählungen pro Minute |
| DABCO | 1,4-diazobicyclo-2,2,2-octan |
| DAPI | 4i-6-Diamidino-2-phenylindol |
| dATP | desoxy-Adenosintriphosphat |
| dCTP | desoxy-Cytidintriphosphat |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| dGTP | desoxy-Guanosintriphosphat |
| DHPLC | denaturing high-performance liquid chromatography |
| DMEM | Dulbecco´s Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | desoxyribonucleic acid (engl.), Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleosid-5i-triphosphat |
| DTT | Dithiothreitol |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EST | Expressed Sequence Tag |
| EtBr | Ethidiumbromid |
| g | Gramm |
| HEPES | 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure |
| IPTG | Isopropyl-£]-D-Thiogalactopyranosid |
| Kb | Kilobasen |

| | |
|----------------------|---|
| kDa | kilo Dalton |
| l | Liter |
| LB | Luria-Bertani |
| m | milli |
| M | molar |
| μ | mikro |
| MOPS | 3-Morpholinopropansulfonsäure |
| MR | mental retardation (engl.) geistige Behinderung |
| MRNA | messenger RNA (engl.), Boten-RNA |
| n | nano |
| NMD | nonsense mediated mRNA decay (engl.), Nonsense vermittelter mRNA-Abbau |
| NS-MRX | non-syndromic X-linked mental retardation (engl.) nicht- syndromale geistige Behinderung |
| OD | optische Dichte |
| OLB | oligo labeling buffer (engl.), Oligo-Markierungspuffer |
| PCR | polymerase chain reaction (engl.), Polymerase-Kettenreaktion |
| RTT | Rett Syndrom |
| RT-PCR | Reverse Transkriptions-PCR |
| RNA | ribonucleic acid (engl.), Ribonukleinsäure |
| s. | siehe |
| <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : Bäckerhefe |
| SDS | sodium dodecylsulfate (engl.), Natriumdodecylsulfat |
| Tab. | Tabelle |
| Taq | <i>Thermus aquaticus</i> |
| tRNA | transfer-RNA |
| XLMR | X-linked mental retardation (engl.) X-chromosomal gekoppelte geistige Behinderung |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

9 Publikationen

Kalscheuer VM, **Freude K**, Musante L, Jensen LR, Yntema HG, Gecz J, Sefiani A, Hoffmann K, Moser B, Haas S, Gurok U, Haesler S, Aranda B, Nshedjan A, Tzschach A, Hartmann N, Roloff TC, Shoichet S, Hagens O, Tao J, Van Bokhoven H, Turner G, Chelly J, Moraine C, Fryns JP, Nuber U, Hoeltzenbein M, Scharff C, Scherthan H, Lenzner S, Hamel BC, Schweiger S, Ropers HH (2003) Mutations in the polyglutamine binding protein 1 gene cause X-linked mental retardation. *Nat Genet* 35:313-3

Freude K, Hoffmann K, Jensen LR, Delatycki MB, des Portes V, Moser B, Hamel B, van Bokhoven H, Moraine C, Fryns JP, Chelly J, Gecz J, Lenzner S, Kalscheuer VM, Ropers HH (2004) Mutations in the FTSJ1 gene coding for a novel S-adenosylmethionine-binding protein cause nonsyndromic X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* 75:305-309

Isabella Borg^{1,2,3*}, **Kristine Freude^{1*}**, Sabine Kübart¹, Kirsten Hoffmann¹, Corinna Menzel¹, Franco Laccone⁴, Helen Firth³, Malcolm A. Ferguson-Smith², Niels Tommerup⁵, Hans-Hilger Ropers¹, David Sargan², Vera M. Kalscheuer¹ (2005) Disruption of Netrin G1 by a balanced chromosome translocation in a girl with Rett syndrome accepted for publication in *Eur J Hum Genet*

10 Lebenslauf

Nachname: Freude
Vorname: Kristine Karla
Geburtstag: 22.11.1973
Geburtsort: Berlin
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1980-1986 Grunewald-Grundschule Berlin
1986-1990 Orientierungsstufe Walther-Rathenau-Gymnasium,
Berlin
1990-1994 Erich-Hoepner-Gymnasium Berlin

Schulabschluß: **Abitur** im Sommer 1994

Universitätsausbildung:

1994 Humboldt-Universität Berlin
LA Sonderschulpädagogik Germanistik

1995-2001 Freie Universität Berlin
Biologie **Diplom**

2001 **Diplomarbeit** am Robert Koch Institut in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Appel unter der Anleitung von Frau Dr. Lewin, Berlin
Thema: Klonierung von DNA-Fragmenten aus schnellwachsenden Bakterien in das langsamwachsende *Mycobacterium bovis* BCG zur Charakterisierung des Wachstumsverhaltens

- 2001-2005 **Doktorarbeit** am Max-Planck Institut für molekulare Genetik in der Abteilung von Herrn Prof. Dr. Ropers unter der Anleitung von Frau Dr. Kalscheuer, Berlin
Thema: Identifizierung, molekulare Analyse und funktionelle Charakterisierung von Genen die an neuronaler Entwicklung und geistiger Behinderung beteiligt sind
- Seit Februar 2005 PostDoc im Institut für Zell- und Entwicklungsbiologie an der University of California, Irvine, USA, in der Abteilung von Frau Dr. Sander.

Nebentätigkeiten:

- 1998-2002 Tutorin im FB Mikrobiologie Freie Universität Berlin
- 1998-2003 Schulhelfer an der Hans-Fallada-Grundschule Berlin

Fortbildungen und Konferenzen:

- 07.2001 European Society of Mycobacteriology (ESM) Annual Meeting, Berlin
- 04.2003 European School of Genetic Medicine, Bertinoro (Italien)“16th Course in Medical Genetics”
- 10.2003 German Society for Human Genetics (GFH) Annual Medical Genetics Conference, Marburg
Poster Presentation: “A female patient with Rett Syndrome carrying a *de novo* t(1;7)(p22;q32) balanced translocation”
- 11.2003 American Society of Human Genetics (ASHG) Annual Meeting, Los Angeles (USA)
Vortrag: “A new player in X-linked mental retardation”

04.2004 Human Genome Meeting (HGM), Berlin (Germany)
Vortrag: "FTSJ1: A novel player in X-linked mental
retardation"

06.2004 European Society of Human Genetics (ESHG) Annual
Meeting, München
Poster Presentation:
"FTSJ1: a novel player in X-linked mental retardation"

11 Danksagung

An erster Stelle gebührt mein Dank Herrn Prof. Dr. Hans-Hilger Ropers sowohl für die Schaffung der wissenschaftlichen und finanziellen Rahmenbedingungen, als auch für die Begutachtung und Durchsicht dieser Dissertation.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Horst Kreß für seine ständige Diskussionsbereitschaft, die Durchsicht meiner Dissertation trotz gesundheitlicher Probleme und die äußerst hilfreichen Verbesserungsvorschläge derselben.

Frau Dr. Vera Kalscheuer danke ich für die lehrreiche Zeit in ihrer Arbeitsgruppe, Ihr Engagement bezüglich meiner Projekte und für die Durchsicht meiner Dissertation.

Frau Kirsten Hoffmann und Frau Ute Fischer danke ich für die praktischen Ratschläge und die Unterstützung bei meinen molekularbiologischen Untersuchungen. Darüber hinaus für die seelisch-moralische Unterstützung während dieser lehrreichen Lebensphase.

Bei Frau Susanne Freier und Frau Hannelore Madle möchte ich mich für die Einführung in die Zellkulturarbeit bedanken.

Meinen Abteilungskollegen Olivier Hagens, Dr. Lars Riff Jensen, Stella-Amrei Kunde, Sybille Krauss, Dr. Sarah Shoichet und Dr. Jennifer Winter danke ich besonders für die herzliche Atmosphäre im Labor, die sehr zur Vollendung dieses Werks beigetragen hat.

Ein ganz besonders herzliches Dankeschön geht an Stella-Amrei Kunde, ohne deren Hilfe die Abgabe der Dissertation aus dem fernen Kalifornien nicht möglich gewesen wäre.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank meinen Eltern, die mich moralisch und finanziell während meiner langen Studienzeit unterstützt haben und all meinen Freunden, die mich stets zum Durchhalten ermutigt haben.

12 Erklärung

Hiermit erkläre ich, Kristine Karla Freude, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als der angegebenen Quellen als Hilfsmittel benutzt habe.

Berlin, den

Hiermit erkläre ich, Kristine Karla Freude, daß die vorliegende Arbeit in dieser oder ähnlicher Form an keiner anderen Hochschule zur Promotion eingereicht wurde; des weiteren erkläre ich, daß bisher kein Promotionsversuch an einer anderen Universität erfolgt ist.

Berlin, den

13 Anhang

- pGEMTeasy
- pCMVtag3A
- pBudCE4
- pYES2
- pAE