Klinik für Kinder- und Jugendmedizin - Abteilung Neuropädiatrie (Prof. Dr. med. J. Gärtner)

im Zentrum Kinderheilkunde und Jugendmedizin der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Die Reaktivierung der FMR1-Transkription in Fibroblasten von Patienten mit Fragilem-X-Syndrom durch Methotrexat

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Benjamin Mielke

aus

Hannover

Göttingen 2014

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

. med. P. Huppke

II. Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. E. Hahn

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Januar 2015

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	5
1.1 Das Fragile-X-Syndrom	5
1.2 Die Beeinflussung der Transkription durch DNA-Methylierung	
1.3 Die Rolle von Folsäure im Rahmen der DNA-Methylierung	
1.4 Die Reaktivierung des FMR1-Transkripts mittels Beeinflussung der DNA-Methy	lierung 16
1.5 Methotrexat	16
1.6 Arbeitshypothese	
2 Material und Methoden	19
2.1 Material	19
2.1.1 Zellen	19
2.1.2 Materialien für die Zellkultur	19
2.1.2.1 Zellkulturmedien, Zusätze und Reagenzien 2.1.2.2 Sonstige Materialien	19 20
2.1.3 Materialien für molekularbiologische und proteinbiochemische Arbeiten	20
2.1.3.1 Chemikalien und Reagenzien	
2.1.3.2 Standard-Lösungen und Puffer	
2.1.3.3 Enzyme	24
2.1.3.4 Nukleinsäuren	
2.1.3.5 Kits zur Bearbeitung von Nukleinsäuren	
2.1.3.6 Antikorper 2.1.3.7 Sonstige Materialien	
2.1.4 Geräte	
2.2 Methoden	
2.2.1 Zellbiologische Methoden	28
2.2.1.1 Kultivierung von Fibroblasten	
2.2.1.2 Passagieren von Fibroblasten	
2.2.1.3 Kryokonservierung von Fibroblasten	
2.2.1.4 Re-Vitalisierung von Fibroblasten	
2.2.1.5 Behandlung der Fibroblasten mit Methotrexat und 5-Aza-2`Deoxycytid	in 29
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	30

2.2.2.1 Präparation von RNA aus Fibroblasten	30
2.2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	
2.2.2.3 Reverse Transkriptase-PCR	
2.2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	
2.2.2.5 DNA-Gelelektrophorese	
2.2.2.6 Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (Real-Time-PCR)	
2.2.2.7 DNA-Sequenzierung	
2.2.2.8 Präparation genomischer DNA aus Fibroblasten	
2.2.2.9 Bisulfitbehandlung der genomischen DNA	
2.2.3 Proteinbiochemische Methoden	
2.2.3.1 Proteinextraktion aus Fibroblasten	
2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BC-Assay	
2.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	
2.2.3.4 Transfer und immunologische Detektion von Proteinen auf	
Nitrozellulosemembran (Western Blot)	
3 Ergebnisse	38
3.1 Reaktivierung der FMR1-Transkription durch Behandlung mit MTX	
3.2 Detektion des <i>FMR1</i> -Genproduktes <i>FMRP</i> in FXS-Patientenzellen nach Behandle MTX	ung mit 50
3.3 Methylierungsanalyse der Promotorregion des FMR1-Gens in Fibroblasten von	
Patienten mit FXS nach MTX-Behandlung	53
4 Diskussion	58
5 Zusammenfassung	63
6 Abkürzungsverzeichnis	64
7 Literaturverzeichnis	68

1 Einleitung

1.1 Das Fragile-X-Syndrom

Das Fragile-X-Syndrom (FXS) gehört zum Formenkreis der X-chromosomalen, mentalen Retardierung (XLMR). Mit einer Inzidenz von 1:2500- 1:5000 in der männlichen und 1:4000 -1:6000 in der weiblichen Bevölkerung ist es eine der bekanntesten genetischen Formen des Autismus sowie die häufigste monogene Ursache einer mentalen Retardierung (Turner et al. 1980, Bagni et al. 2012). Die klinischen Merkmale der Erkrankung wurden erstmals 1943 unter dem Namen seiner Entdecker als Martin-Bell-Syndrom veröffentlicht (Martin und Bell 1943). Die Bezeichnung FXS hingegen basiert auf späteren zytogenetischen Beobachtungen während der Kultur von Patientenzellen. Unter Folsäuremangel entdeckte man in Lymphozyten eine kleine, nicht-kondensierte, "fragil" wirkende Region auf dem langen Arm des X-Chromosoms (Sutherland 1977). Diese konnte 1983 dann mit Hilfe der Elektronenmikroskopie unter der Bezeichnung *FRAXA*-Locus dem Bereich Xq27.3 zugeordnet werden (Harrison et al. 1983).

Klinisch zeichnet sich das FXS durch eine hohe Variabilität des Erscheinungsbildes aus, wobei die mentale Retardierung das wichtigste Symptom darstellt. Die Mehrzahl der Betroffenen haben einen Intelligenzquotienten im Bereich der schweren bis leichten mentalen Retardierung mit Werten zwischen 20 und 70 (Fisch et al. 2002). Kognitive Fähigkeiten wie das Kurzzeitgedächtnis und das Sprachvermögen sind meist eingeschränkt und führen gemeinsam mit oft beobachteter Hyperaktivität und Aufmerksamkeitsdefiziten zu einer negativen Beeinflussung der Lernfähigkeit (Einfeld et al. 1991). In 15-50% der Fälle werden darüber hinaus emotionale Auffälligkeiten unterschiedlicher Ausprägung beschrieben. Diese reichen von ängstlichem Verhalten über depressive Verstimmungen bis zum vollständigen Erscheinungsbild des frühkindlichen Autismus (Cornish et al. 2004). Die Diagnosestellung des FXS erfolgt meist auf Grund der oben genannten Symptome im Vorschulalter, wohingegen sich die Merkmale des somatischen Phänotyps oft erst bei Jugendlichen und Erwachsenen manifestieren. Hierzu gehören eine Akromegalie, die vor allem Kinn, Hände und Füße betrifft, ein langes, schmales Gesicht mit groben, abstehenden Ohren sowie eine Makroorchidie, welche 80% der Männer aufweisen (Chudley und Hagerman 1987, Lachiewicz und Dawson

1994). Des Weiteren zeigt sich bei FXS-Patienten eine Bindegewebsschwäche, die sich als Hyperextensibilität der Gelenke, als Mitralklappenprolaps oder auch in Form einer Hypotonie äußern kann (Hagerman et al. 1983, Loehr et al. 1986). Bei wenigen männlichen Patienten beobachtet man ebenso Minderwuchs, kurze Hände und Füße sowie Fettleibigkeit, Symptome, die an das Prader-Willi-Syndrom erinnern und wahrscheinlich mit einer Dysfunktion des Hypothalamus erklärt werden können (de Vries et al. 1993, Hessl et al. 2004).

Beim Vergleich der Geschlechter fällt auf, dass sich Frauen und Männer kaum in der Inzidenz, jedoch in der Ausprägung des klinischen Phänotyps unterscheiden. So zeigt das FXS bei weiblichen Betroffenen meist einen milderen Verlauf, wobei die kognitive und intellektuelle Beeinträchtigung im Gegensatz zu männlichen Patienten eine größere Variabilität aufweist (Riddle et al. 1998, Hagerman 2008).

Das Fragile-X-Syndrom basiert auf einer Mutation im Fragile X Mental Retardation 1 (FMR1) Gen, welche wiederum eine Suppression der Expression des Genproduktes, Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP), zur Folge hat. Das 38 Kilobasen umfassende FMR1-Gen befindet sich im Bereich Xq27.3 auf dem langen Arm des X-Chromosoms. Es codiert für ein 4,4 Kilobasen großes Transkript, das aus 17 Exons besteht (Eichler et al. 1993). Im Exon 1, das den Bereich der 5`-untranslatierten Region (5' UTR) des Transkripts umfasst, befindet sich eine repetitive Sequenz, die in der Bevölkerung eine unterschiedliche Anzahl von Wiederholungen des Trinukleotids CGG aufweist (Fu et al. 1991). Diese Sequenz zählt zu der so genannten Mikrosatelliten-DNA, eine sich wiederholende, nicht-kodierende Abfolge von bis zu 12 Basenpaaren, die ungefähr 2% des menschlichen Genoms ausmachen und generell eine hohe meiotische Stabilität aufweisen (Barker 2002). Insbesondere bei Trinukleotiden jedoch beobachtet man in der Bevölkerung eine Variabilität der Triplettanzahl, die allerdings keinen pathologischen Wert besitzt. Im Falle des FMR1-Gens besteht eine normale Schwankungsbreite von 6 bis 52 CGG-Repeats (Fu et al. 1991). Wenn die Anzahl der Wiederholungen jedoch 52 übersteigt, kann dieses während der Transmission in der Keimbahn zu einer erheblichen Expansion der Sequenzlänge im Gen der Nachkommen führen. Dieses Phänomen der genetischen Instabilität in Abhängigkeit der Repeat-Anzahl wird als dynamische Mutation bezeichnet (Richards und Sutherland 1997). Man differenziert hierbei beim FXS eine Prämutation mit 52 bis 200 von einer Vollmutation mit 200 bis zu mehreren Tausend Wiederholungen des CGG-Tripletts, wobei lediglich Vollmutationsträger die Symptome der Erkrankung aufweisen (Reiss et al. 1993). Bei Prämutationsträgern hingegen kommt es zu andersartigen klinischen Folgen. So leidet ein Teil der betroffenen Frauen an der Prämaturen Ovarialinsuffizienz (POI), einer ovariellen Dysfunktion mit vorzeitigem Beginn der Menopause, die bereits vor dem dreißigsten Lebensjahr auftreten kann (Schwartz et al. 1994). Darüber hinaus sind mehr als ein Drittel der Männer und jede zwanzigste Frau mit einer Prämutation im höheren Alter vom Fragilen- X- assoziiertem Tremor-/Ataxiesyndrom (FXTAS) betroffen. Es handelt sich hierbei um eine, vor allem im Hippocampus lokalisierte progrediente Neurodegeneration, die sich in Form von Tremor, Ataxie und Demenz äußert (Hagerman et al. 2003, Brouwer et al. 2009). Im Gegensatz hierzu führt die Vollmutation zum klinischen Erscheinungsbild des FXS. Dieser Effekt basiert auf einer Unterdrückung der Expression des FMR1-Genproduktes, welche durch eine Hypermethylierung der Promotorregion respektive der CGG-Repeats sowie einer vorangestellten CpG-Insel hervorgerufen wird (Pieretti et al. 1991). Die gesteigerte DNA–Methylierung als Konsequenz der Triplettexpansion hat zum einen eine direkte Bindungshemmung der Transkriptionsfaktoren, zum anderen die Kondensation des Chromatins zur Folge. Beides unterstützt die Inhibierung der FMR1-Transkription (Kumari et al. 2005). Des Weiteren werden bei FXS-Patienten eine verringerte Acetylierung der Histonproteine H3 und H4 sowie eine Veränderung der Histonmethylierungsstruktur im Gegensatz zum Wildtyp beobachtet. Der genaue Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung, Histonmodifikationen und daraus resultierender Chromatinveränderung ist jedoch bis dato unbekannt (Coffee et al. 1999, Coffee et al. 2002). Es wird angenommen, dass die Hypermethylierung erst einige Zeit nach der Befruchtung im Embryo stattfindet und es demnach in den ersten Entwicklungstagen noch zu einer Synthese vom FMRP kommt (Willemsen et al. 1996).

Das Vererbungsmuster des FXS unterscheidet sich vom anfänglich vermuteten Xchromosomal rezessiven Erbgang. Am auffälligsten wird dies in der Tatsache, dass nichtbetroffene männliche sowie erkrankte weibliche Mutationsträger existieren (Nielsen et al. 1981). Zudem beobachtet man das Phänomen der Antizipation, welches sich ebenso bei anderen Trinukleotiderkrankungen zeigt. Es bedeutet, dass auf Grund der ansteigenden Zahl von CGG-Wiederholungen die Wahrscheinlichkeit betroffener Nachkommen von Generation zu Generation zunimmt (Fu et al. 1991). Die Expansion des Gens von der Prä- zur Vollmutation ist allerdings nur im Rahmen der maternalen Vererbung möglich, da die Vollmutation während der Spermatogenese nicht aufrechterhalten werden kann. Ein männlicher Prämutationsträger hat demnach lediglich klinisch unauffällige Nachkommen, wobei es bei Nachwuchs von Frauen mit Prämutation zu einer Expansion der CGG-Tripletts mit Folge des klinischen Phänotyps kommen kann. Bei schon vorhandener Vollmutation wird diese jedoch von beiden Geschlechtern an die Kinder weitervererbt (Malter et al. 1997). Eine weitere Besonderheit bei Patientinnen stellt die bereits angesprochene mildere Ausprägung sowie eine höhere Variabilität des klinischen Erscheinungsbildes dar. Dieses lässt sich anhand der Lyon-Hypothese erklären, welche besagt, dass in weiblichen somatischen Zellen während der Embryogenese eines der beiden X-Chromosomen inaktiviert wird. Ob dieses mütterlicher oder väterlicher Herkunft ist, hängt vom Zufall ab und ist in verschiedenen Zellen desselben Organismus unterschiedlich (Lyon 1961). Wenn man davon ausgeht, dass bei FXS-Patientinnen nur eines der beiden Gonosomen von der Mutation betroffen ist, findet in allen somatischen Zellen, in denen das nicht-mutierte X-Chromosom aktiv ist, weiterhin eine FMRP-Produktion statt. Die Ausprägung des Phänotyps bei Frauen hängt demnach vom zufälligen Inaktivierungsmuster des mutierten X-Chromosoms ab. In seltenen Fällen sind nicht eine Expansion der CGG-Tripletts, sondern Deletionen unterschiedlicher Größe und Lokalisation im FMR1-Gen für den Verlust des Transkripts verantwortlich (Gedeon et al. 1992, Hammond et al. 1997). Ebenso werden FXS-Patienten beschrieben, bei denen FMRP vorhanden ist, es jedoch auf Grund von Punktmutationen zu einem Funktionsverlust des Proteins kommt (De Boulle et al. 1993, Lugenbeel et al. 1995).

Zur Erforschung der Funktion von *FMRP* im Organismus wurde zunächst die Expression des Proteins in verschiedenen Geweben untersucht. Hierbei fällt auf, dass in fast jedem Organ eine Expression nachgewiesen werden kann, am höchsten ist diese jedoch im Gehirn, den Ovarien sowie im Hodengewebe (Devys et al. 1993). Es besteht folglich ein Zusammenhang zwischen der physiologischen gewebeabhängigen Expression von *FMRP* und den Hauptsymptomen mentale Retardierung und Makroorchidie. Im Zuge von postmortalen Untersuchungen humanen neuronalen Gewebes von FXS-Patienten sowie der Sektion von *FMR1-Knockout*-Mäusen wurden morphologische Veränderungen der Neurondendriten nachgewiesen. Diese sind, analog zum Rett- sowie Downsyndrom, verlängert und schmal, und es werden apikale Verdichtungen im Bereich der Synapsen beschrieben. Diese Veränderungen werden als morphologisches Korrelat der mentalen Retardierung angesehen, möglicherweise ausgelöst durch eine gestörte Neuronenreifung (Hinton et al. 1991, Comery et al. 1997). Es handelt sich bei FMRP um ein maximal 631 Aminosäuren umfassendes Zellprotein mit einem theoretischen Molekulargewicht von 67 bis 80 Kilodalton. Beim Menschen sind 12 Isoformen bekannt, die sich auf Grund alternativen Spleißens in ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden. Die Tatsache, dass das Protein in Säugetieren, Hühnern sowie in Drosophilia exprimiert wird, lässt auf eine hohe evolutionäre Konservierung schließen (Siomi et al. 1993). Die zelluläre Lokalisation von FMRP wurde erstmals mittels Immunfluoreszenzmikroskopie von Neuronen untersucht. Hierbei zeigte man, dass sich der überwiegende Anteil des Proteins im Zytoplasma und eine kleinere Menge im Zellkern befindet (Devys et al. 1993). Rückschlüsse auf seine Funktion, insbesondere im Neuron, lassen sich mittels Betrachtung der verschiedenen funktionellen Domänen ziehen. Die Entdeckung eines sogenannten nukleären Lokalisationssignals (NLS) in Exon 1 bis 5 sowie eines nukleären Exportsignals (NES) in Exon 14 machte deutlich, dass es sich um ein nukleozytoplasmatisches Protein handelt (Feng et al. 1997). Darüber hinaus besitzt FMRP mehrere Sequenzabschnitte, die eine Homologie zu RNAbindenden Proteinen aufweisen. Es handelt sich hierbei um zwei KH-Domänen in Exon 8 und 10, die mit dem heteronukleären Ribonukleinprotein K (hnRNP K) übereinstimmen sowie einer Arginin/Glycin-reichen Sequenz (RGG-Box) in Exon 15, wie sie auch beim heteronukleären Ribonukleinprotein U (hnRNP U) vorkommt. Bei direkter Erforschung der RNA-Bindeeigenschaften konnte gezeigt werde, dass FMRP in vitro ungefähr 4% der mRNA aus fetalem menschlichen Gehirn bindet (Ashley et al. 1993). Darüber hinaus wurde eine Assoziation mit translatierenden Polyribosomen festgestellt, die in Form von sogenannten schweren mRNP-Komplexen (messenger ribonucleoprotein patricle) mit einem Molekulargewicht von 660 Kilodalton vorliegen. Diese Komplexe enthalten verschiedene RNA sowie Proteine, unter anderem das Fragile X related proteine 1 (FXRP1) und das Fragile X related proteine 2 (FXRP2) (Zhang et al. 1995). Beide weisen eine 86%ige bzw. 70%ige Übereinstimmung mit der Proteinsequenz von FMRP sowie die gleichen funktionellen Domänen auf und werden, da sie auf Chromosom 3 und 17 codiert werden, als seine autosomalen Homologen bezeichnet (Tamanini et al. 2000). Ihre Aufgabe besteht vermutlich in der Modulation der Bindungsaffinität von FMRP zu verschiedenen RNA-Molekülen, von denen bereits mehrere hundert ermittelt werden konnten. Es handelt sich hierbei vor allem um die eigene FMRPmRNA sowie einer Reihe anderer Transkripte, deren zugehörige Proteine, wie zum Beispiel das antimikrotubuläre Protein 1B (MAP1B), eine Rolle in der neuronalen Entwicklung und Zellfunktion spielen (Brown et al. 2001). Die meisten dieser Moleküle beinhalten die so genannte G-Quartett Struktur, eine Sequenz, die hohe Affinität zur RGG-Box des FMRP aufweist (Darnell et al. 2001). Darüber hinaus wurde in einigen mRNA-Molekülen eine Tertiärstruktur entdeckt, die mit der KH2-Domäne des Proteins interagiert und als kissingcomplex oder loop-loop pseudoknot bezeichnet wird (Darnell et al. 2005). Mittels Bindung dieser mRNA-Moleküle führt FMRP schließlich zu einer Inhibierung ihrer Translation und spielt somit eine Rolle in der Regulation der Proteinbiosynthese (Darnell et al. 2001, Laggerbauer et al. 2001). Vermutlich wird FMRP an Ribosomen im Zytoplasma synthetisiert und erreicht mittels NLS den Zellkern, wo es daraufhin mit spezifischer RNA und anderen Proteinen in einen mRNP-Komplex eingefügt wird. Dieser gelangt anhand der NES ins Zytoplasma, interagiert dort mit dem RNA induced silencing complex (RISC), dessen genauer Mechanismus bis dato unklar ist, und assoziiert schließlich mit Ribosomen im Zellkörper bzw. im neuronalen Dendriten (Jin und Warren 2003). Die Aufgabe von FMRP besteht folglich im Transport der mRNA zum Bestimmungsort sowie der Regulation von lokaler Proteinsynthese. Eine Möglichkeit zur Beeinflussung dieser Funktion stellt die Phosphorylierung von Serinresten dar. So wurde eine Assoziation von phosphorylierten FMRP mit inaktiven sowie unphosphorylierten FMRP mit aktiven translatierenden Ribosomen nachgewiesen (Ceman et al. 2003). Zum anderen beobachtet man eine Beeinflussung der lokalen FMRP-Synthese als Folge eines synaptischen Reizes durch Gruppe 1 Glutamat-Rezeptoren (mGluR) (Weiler et al. 1997). Ihre Aktivierung führt initial zu einem Abbau von FMRP im Proteasom, was wiederum auf Grund der nun fehlenden Inhibierung die Translation verschiedener mRNAs zur Folge hat. Da es auf diesem Wege auch zur Translation der FMRP-mRNA kommt, steigt die Konzentration des Proteins erneut an, was wieder zur Inhibierung der Proteinsynthese in der Synapse führt (Hou et al. 2006). Die reizabhängige rasche Aktivierung sowie anschließende Inaktivierung der lokalen Proteinsynthese im Dendriten spielen eine große Rolle in der Aufrechterhaltung der synaptischen Plastizität und sind folglich bedeutend für Gedächtnis und Lernprozesse. Wesentlich ist hier die so genannte Long-term-depression (LTD) sowie ihr Gegenstück, die Long-term-potentiation (LTP), für deren Dynamik rasche mRNA-Synthese vonnöten ist. Eine Änderung der LTD basiert auf der Internalisation von membranständigen AMPA- sowie NMDA-Rezeptoren, welche durch die Aktivierung von mGluR stimuliert wird (Weiler et al. 1997). Bei FXS-Patienten führt das Fehlen von FMRP folglich zu einer Beeinträchtigung der synaptischen Plastizität. Man entdeckte im Hippocampus von FMR1-Knockout-Mäusen anhand elektrophysiologischer Untersuchungen eine Steigerung der mGLuR-abhängigen LTD, die sich mit dem Wegfall der negativen Regulation durch *FMRP* erklären lässt (Huber et al. 2002). Es kommt demnach bei mGluR-Aktivität, auf Grund fehlender Terminierung der Translation durch *FMRP*, zur gesteigerten Proteinsynthese mit daraus resultierender überschießender *LTD*. Diese lässt sich mit den klinischen sowie morphologischen Veränderungen bei FXS-Patienten in Verbindung bringen. Vermutlich bewirkt der dauerhafte *LTD*-Anstieg eine Verlangsamung der Synapsenreifung und fördert somit die mentale Retardierung. Darüber hinaus besteht eine Assoziation zwischen der gesteigerten Internalisierung von AMPA- sowie NMDA-Rezeptoren und der Veränderungen an den Dendritendornen, welche beim FXS als verlängert und dünn beschrieben werden (Bear et al. 2004).

Die Behandlung des FXS basiert bis dato auf einer symptomatischen Therapie. Je nach Ausprägung des klinischen Phänotyps wird eine Entwicklungs-, Sprach-, bzw. Verhaltensförderung empfohlen. Ferner können bei Hyperaktivität und Unruhezuständen bekannte Psychostimulanzien, wie zum Beispiel Methylphenidat oder auch Antidepressiva eingesetzt werden (Berry-Kravis und Potanos 2004). Die neuen Erkenntnisse der letzten Jahre über die Pathophysiologie des FXS eröffnen jedoch eine zusätzliche, kausale Therapieoption. Da in der Pathogenese eine überschießende Reaktion auf einen mGluR-Reiz eine bedeutende Rolle spielt, werden Substanzen in Erwägung gezogen, die an diesem Rezeptor als Antagonisten fungieren und somit dem LTD-Anstieg entgegenwirken. Hierzu zählen unter anderem 2-Methyl-6-(phenylethynyl)-pyridin (MPEP) sowie Fenobam, deren Wirksamkeit bereits in tierexperimentellen Studien nachgewiesen werden konnte. So führte die Behandlung von FMR1-Knockout-Mäusen mit MPEP zu einer signifikanten Verbesserung der zuvor beobachteten Verhaltensauffälligkeiten (Yan et al. 2004). Darüber hinaus konnte an Neuronen in vitro durch gleichzeitige Gabe von MPEP und Fenobam ein Rückgang der FXS-typischen Morphologie im Bereich der dendritschen Dornen beobachtet werden (de Vrij et al. 2008). Der Einsatz von mGluR-Antagonisten wird zusätzlich durch die Ergebnisse eines Experimentes unterstützt, bei dem in Mäusen neben dem FMR1-Gen auch das mGluR-kodierende Gen (GRM5) inhibiert worden ist. Man beobachtete auch in diesem Fall einen deutlichen Rückgang der Symptomatik im Vergleich zu anderen FMR1-Knockout-Mäusen (Dolen et al. 2007). Für die Therapie beim Menschen befinden sich zurzeit mehrere Substanzen in klinisch-pharmakologischer Testung. Es handelt sich hierbei unter anderem um die Substanz STX107, einen hochpotenten, selektiven mGluR-Antagonisten der Firma Merck sowie um das bereits erwähnte Fenobam (Berry-Kravis et al. 2009). Eine hierzu alternative Therapieoption stellt die Beeinflussung des GABAergen Systems dar, welches bei der Genese von Schlaflosigkeit, Angst, Autismus sowie auch bei Gedächtnis und Lernprozessen eine Rolle spielt. Auf Grund der Ähnlichkeit mit den Symptomen des FXS wird vermutet, dass es auch beim FXS zu einer negativen Beeinflussung dieses Systems kommt und die Gabe von GABA_A-Agonisten zu einer Besserung des klinischen Erscheinungsbildes führt (D'Hulst und Kooy 2007). Benzodiazepine, wie zum Beispiel das Diazepam, stellen eine große bekannte Gruppe von GABA_A-Agonisten dar, ihre Verwendung wird jedoch auf Grund des Abhängigkeitspotenzials sowie der sedierenden Wirkung bei FXS-Patienten nicht empfohlen (Nemeroff 2003). Vielmehr wird der Einsatz von neuroaktiven Steroiden, die einen allosterischen Modulator am GABA_A-Rezeptor darstellen, in Erwägung gezogen. Als Beispiel ist hier das Ganaxolone zu nennen, eine Substanz, die ursprünglich zur Therapie der Epilepsie entwickelt wurden ist und sich bis dato in Phase II der klinischen Testung befindet (Reddy und Rogawski 2009). Ferner stellt das Breitbandantibiotikum Minozyklin, welches hauptsächlich im Rahmen der Aknebehandlung Jugendlicher Verwendung findet, eine Therapieoption dar. Bei FXS-Patienten konnte durch Gabe dieser Substanz eine Verbesserung der kognitiven Defizite sowie des Sozialverhaltens erreicht werden (Paribello et al. 2010, Utari et al. 2010, Leigh et al. 2013). Am Mausmodell zeigte sich darüber hinaus ein Rückgang der pathologischen Veränderungen im Bereich der Synapsen (Bilousova et al. 2009). Auf welche Weise Minozyklin den Pathomechanismus des FXS beeinflusst, ist bis dato nicht vollständig geklärt. Vermutlich spielt eine Hemmung der Matrix-Metallopeptidase 9 (MMP9), eines Enzyms, dessen Aktivität beim FXS erhöht ist, hierbei eine Rolle (Dziembowska et al. 2013).

1.2 Die Beeinflussung der Transkription durch DNA-Methylierung

Die Methylierung der DNA spielt in der Pathogenese des FXS eine entscheidende Rolle, da die Hypermethylierung der CGG-*Repeats* bzw. der CpG-Inseln im *FMR1*-Gen die Syndromverursachende Inhibierung der *FMRP*-Expression zur Folge hat (Pieretti et al. 1991).

Die DNA-Methylierung stellt einen Mechanismus in der Regulation der gewebeabhängigen Transkription bestimmter Gene dar, welche vor allen Dingen am Promotor sowie den ersten Exons stattfindet. Es kommt hier, im Bereich der CpG Inseln, zur kovalenten Bindung eines Methylrestes an das 5'-Kohlenstoffatom des Pyrimidinringes der Base Cytosin, von der in Vertebraten ca. 3-5% in methylierter Form als 5'-Methylcytosin vorliegen (Ehrlich et al. 1982). Dieser Prozess erfolgt erstmalig beim Embryo im Rahmen der frühen Zellteilungen und wird an dieser Stelle als De-Novo-Methylierung der zuvor gänzlich unmethylierten elterlichen DNA-Stränge bezeichnet (Howlett und Reik 1991). Nach fortgeschrittener Reifung des Kindes fallen dann jedoch gewebeabhängige Unterschiede im Methylierungsmuster der CpG-Inseln identischer Gene eines Organismus auf. Diese korrelieren mit der Aktivität des Gens in den verschiedenen Geweben, wobei eine vermehrte Methylierung gewöhnlich zur Reduktion der Expression führt. Folglich liegen die CpG-Inseln von ubiquitär und konstant exprimierten Genen, den sogenannten housekeeping-Genen, vornehmlich in unmethylierter Form vor (Bird 1986). 60-70% aller humanen Gene weisen ein solches Promotor- assoziiertes CpG-reiches Areal auf, wobei 5`Methylcytosin auch außerhalb diesem auftreten kann. Diese Non-CpG-Methylierung an CpA- oder CpT-Dinukleotiden besitzt anscheinend keine regulative Funktion und wird unter anderem mit dem Prozess der Kanzerogenese sowie viralen Infektionen in Verbindung gebracht (Clark et al. 1995).

Die biochemische Reaktion der Methylierung erfolgt größtenteils im Anschluss an die Replikation und wird von den DNA-Methyltransferasen (DNMT) katalysiert. Diese im Zellkern bzw. an der Kernmembran lokalisierten Enzyme lassen sich in Kategorien mit unterschiedlichen Funktionen einteilen. Die DNMT1 ist für die Weitergabe des mütterlichen Methylierungsmusters an die DNA der Tochterzellen im Rahmen der Mitose verantwortlich. Ihre maximale Aktivität wird zum Zeitpunkt der S-Phase des Zellzyklus erreicht, wo es zu einer Übertragung der Methylgruppe vom Donator S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) auf das Cytosinmolekül des unmethylierten Tochterstranges kommt (Caiafa und Zampieri 2005). Dieser Vorgang weist eine Fehlerquote von ungefähr 4% auf, woraus geringe Unterscheide im Methylierungsmuster auch von klonalen Zellpopulationen resultieren (Riggs et al. 1998). Die DNMT1 verwendet als Schablone hemimethylierte DNA, was einen Unterschied zu den Enzymen DNMT3A und DNMT3B der bereits erwähnten *De-Novo*-Methylierung darstellt. Diese erstmals im Embryo stattfindende Reaktion führt zu einer nahezu vollständigen Methylierung aller CpG-Inseln. Im Laufe der normalen Entwicklung und Differenzierung der Körperzellen kommt es anschließend zu einer partiellen gewebeanhängigen Demethylierung. Ihre Bedeutung spiegelt sich in der Tatsache wider, dass ein Fehlen der *De-Novo*-Methylierung innerhalb der ersten acht Schwangerschaftstage zum Tode des Kindes führt (Jones 2002). Des Weiteren wurde ein Enzym namens DNMT2 entdeckt, welches vermutlich bei der Methylierung retroviraler DNA in humanen Zelle von Bedeutung ist (Yoder und Bestor 1998). Eine Demethylierung von 5`-Methylcytosin erfolgt zum einen spontan bei Abwesenheit von Methyltransferasen, zum anderen auf aktivem Wege mittels DNA-Demethylasen, wie zum Beispiel der 5-Methylcytosin-DNA-Glycosylase (5-MCDG) (Richardson 2003).

Die Methylierung der DNA stellt allerdings nicht den alleinigen Faktor für die Inhibierung der Transkription dar. Es handelt sich hierbei vielmehr um einen sekundären, stabilisierenden Prozess an bereits inaktivierten Genen. Die primäre Inhibierung wird mittels Änderungen an den Histonproteinen und damit in der Chromatinkonformation vollzogen. So führt eine durch die Histon-Methyltransferase katalysierte Methylierung des Histonproteins H3, die eine Verdichtung des Chromatins zur Folge hat, zu einer Zunahme der DNA-Methylierung (Bannister et al. 2001, Tamaru und Selker 2001). Als Folge dessen wird die Bindung zwischen den CpG-Dinukleotiden der DNA und verschiedenen Transkriptionsfaktoren wie z.B. E2F, NFkB oder des cAMP- abhängigen Aktivators CREB verhindert (Tate und Bird 1993). Darüber hinaus existieren Proteine, die erst auf Grund der Methylierung des Erbgutes zu einer DNA-Interaktion fähig sind und somit die Anlagerung der oben genannten Transkriptionsfaktoren blockieren. Es handelt sich hierbei um die Methyl-CpG-Bindeproteine MeCP2, MBD1, MBD2 und MDB4 (Nan et al. 1996, Cross et al. 1997). Eine weitere Fähigkeit dieser besteht in der Aktivierung von Histondeacetylasen (HDAC), also Enzymen, die eine Deacetylierung der Histonproteine H3 sowie H4 katalysieren. Da die Acetylreste an den Histonproteinen eine Auflockerung des Chromatins bewirken, hat ihre Entfernung dementsprechend eine Kondensation mit resultierender Suppression des Transkripts zur Folge (Wolffe und Pruss 1996, Jones et al. 1998).

1.3 Die Rolle von Folsäure im Rahmen der DNA-Methylierung

Die Folsäure, auch als Vitamin B₉, Vitamin B₁₁ oder Folat bezeichnet, ist ein für den Menschen essentielles Vitamin, welches mit der Nahrung aufgenommen und anschließend im Duodenum sowie Jejunum aktiv resorbiert wird. Insbesondere Spinat, Spargel, Getreide und Leber weisen erhebliche Mengen an Folsäure auf, wohingegen es in Muskelfleisch, Obst und Fisch kaum vorhanden ist. In seiner chemischen Zusammensetzung betrachtet, besteht Folat aus einem Pteridinring, einer para-Aminobenzoesäure und Glutamat, wobei verschiedene chemische Modifikationen am Molekül auftreten können. So gibt es Unterschiede im Hydrierungsgrad des Pteridinringes sowie in der Bindung eines C1-Moleküles. Ferner beobachtet man Variationen in der Menge der Glutamatstrukturen, da Folsäure, insbesondere zum Zwecke der Speicherung, in Form von Polyglutamaten vorliegt. Der menschliche Organismus benötigt die Folsäure in ihrer aktiven, vollständig reduzierten Form, dem Tetrahydrofolat (THF). Da in der Nahrung lediglich die oxidierte Form, also Folat vorliegt, ist eine Reduktion des Moleküls vonnöten. Diese geschieht zum einen durch die Vitamin B12abhängige Folsäure-Reduktase, wobei Dihydrofolsäure (DHF) entsteht, zum anderen mittels Reduktion der entstandenen DHF, katalysiert durch die DHF-Reduktase. Die aus diesen Reaktionen hervorgehende THF besitzt nun die Fähigkeit zur Bindung von C₁-Molekülen sowie ihrer Übertragung auf ein geeignetes Substrat. Im Falle der DNA-Methylierung, bei der THF indirekt zum Transfer eines Methylrestes auf die Cytosinbase erforderlich ist, stellt die Aminosäure Homocystein diesen C1-Akzeptor dar. Es entsteht anschließend, über einen Zwischenschritt, an dem Cobalamin (Vitamin B₁₂) beteiligt ist, die Aminosäure Methionin, welche wiederum unter Verwendung von ATP zum oben bereits erwähnten S-Adenosyl-Methionin (SAM) reagiert (Loeffler 2007). SAM stellt einen universellen Überträger von Methylgruppen dar, der in diesem Zusammenhang seinen Methylrest unter Einsatz einer DNA-Methyltransferase (DNMT) auf das Cytosinmolekül der DNA überträgt und somit zur Entstehung von 5'-Methylcytosin führt. Die THF ist theoretisch ebenfalls in der Lage, hierbei als direkter Methylgruppenüberträger anstelle von SAM zu fungieren. Dennoch scheint dieser Mechanismus auf Grund des deutlich geringeren Gruppenübertragungspotenziales keine entscheidende Rolle zu spielen (Berg et al. 2007). Letztendlich stellt das Vorhandensein von zellulärer THF im Rahmen der DNA-Methylierung und folglich auch für die Entstehung des FXS einen wesentlichen Faktor dar. So konnte 1977, wie bereits oben beschrieben, ein Zusammenhang zwischen der Entstehung des "fragilen" X- Chromosoms und einem Folsäuremangel während der Kultur von Patientenzellen gezeigt werden, was bis zur Entdeckung des *FMR1*-Gens die einzige Möglichkeit zur Diagnose darstellte (Sutherland 1977, Sutherland 1979).

1.4 Die Reaktivierung des FMR1-Transkripts mittels Beeinflussung der DNA-Methylierung

Die zentrale Bedeutung von DNA-Hypermethylierung im Rahmen der Pathogenese des FXS lässt vermuten, dass eine Hemmung dieser zur Wiederaufnahme der *FMR1*-Transkription beitragen könnte. So konnte *in vitro* über eine Inhibition der DNMT mittels 5-Aza-2`Deoxycytidin (5-AzaD) in Leukozyten eine Reaktivierung des *FMR1*-Transkripts gezeigt werden (Chiurazzi et al. 1998). Diese Substanz ist unter dem Namen Decitabin seit 2012 als Zytostatikum für die Behandlung akuter myeloischer Leukämien zugelassen. Allerdings hat die Therapie mit Decitabin erhebliche unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW) zur Folge. Eine weitere Möglichkeit zur Beeinflussung der DNA-Methylierung stellt, wie in Kapitel 1.3 beschrieben, möglicherweise die Reduktion der zellulären Verfügbarkeit von Tetrahydrofolsäure und damit ebenso des Methylgruppendonators SAM dar. Um dies zu erreichen, böte sich, auch auf dem Hintergrund der klinischen Erfahrung, die Verwendung von Methotrexat an.

1.5 Methotrexat

Methotrexat (MTX) ist ein Zytostatikum aus der Gruppe der Antimetabolite. Es wird zur Therapie verschiedener maligner Erkrankungen sowie in der Rheumatologie und Immunologie eingesetzt. Mit seiner chemischen Struktur, einem Pteridinring, einer para-Aminobenzoesäure sowie einem Glutaminsäurerest weist dieses Molekül eine Ähnlichkeit zur Folsäure auf. Ein Unterschied zu dieser besteht lediglich in einer N-Methylierung am para-Aminobenzoesäurerest sowie an einer Aminogruppe an Position 4 des Pteridinringes. MTX interagiert, ebenso wie auch Folsäure, mit der DHF-Reduktase und führt auf diesem Wege zu einer kompetitiven Hemmung dieses Enzyms, woraus wiederum ein Überschuss an DHF bzw. ein Mangel an THF resultiert. Da der Organismus dieses reduzierte Folat zur Synthese von Purinund Pyrimidinbasen benötigt, kommt es zu einer Störung der DNA-Synthese und folglich zu einer Hemmung der Zellteilung. Des Weiteren erfolgt in der Zelle mittels Folsäure-Polyglutamatsynthetase (FPGS) eine Polyglutamierung des MTX. Diese MTX-Polyglutamate (MTX-PG) hemmen neben der DHF-Reduktase auch die Thymidylat-Synthetase (TS), welche Deoxy-Uridin-Monophosphat (dUMP) zu Deoxy-Thymidin-Monophosphat (dTMP) umsetzt und induzieren auf diese Weise eine zusätzliche Inhibierung der DNA-Synthese (Allegra et al. 1985). Ein Zusammenhang zwischen MTX, DNA-Methylierung und so auch dem FXS besteht in der Beeinflussung des Homocystein / Methionin-Stoffwechsels. Wie bereits in Kapitel 1.3 beschrieben, sind THF, Homocystein sowie Methionin mittels Bildung von SAM für die Synthese von 5'Methylcytosin erforderlich. Wenn nun über eine Hemmung der DHF-Reduktase die Konzentration von THF sinkt, führt dies über einen Mangel des Methylgruppendonators SAM zu einer Hypomethylierung der DNA (Kremer 2004).

MTX wurde erstmals 1949 zur Behandlung der akuten lymphatischen Leukämie bei Kindern angewandt. Heutzutage befindet es sich im Rahmen der Therapie von hämatologischen Neoplasien, einigen soliden Tumoren sowie bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises im klinischen Einsatz. MTX wird je nach Alter, Krankheitsbild und Verträglichkeit in einer Dosierung von weniger als 15mg/m² KOF bis zu einer Hochdosistherapie vom mehr als 1000mg/m² KOF verwendet. Die gewöhnliche Darreichungsform stellt die orale und die intravenöse Applikation dar, wobei ebenfalls eine intramuskuläre, intraarterielle oder intrathekale Anwendung möglich ist. Nach Aufnahme liegt MTX im Blut zu 50% an Serumproteinen gebunden vor und gelangt zum einen passiv anhand von Diffusion, zum anderen aktiv, über Carrier-vermittelte Transportsysteme in die Körperzellen (Huennekens et al. 1992). Die höchsten Methotrexatspiegel werden dabei in Leber und Nieren erreicht, die niedrigsten weist auf Grund der geringen Blut-Hirnschrankenpassage der Liquorraum auf. So werden hier selbst unter MTX-Dauerinfusion lediglich 1-5% der Höhe des Serumspiegels erreicht (Lippens und Winograd 1988). Die Elimination von MTX geschieht hauptsächlich in unveränderter Form mittels glomerulärer Filtration und tubulärer Sekretion auf dem renalen Wege, wobei die Clearance eine hohe Variabilität aufweist. Dabei spielen insbesondere die glomeruläre Filtrationsrate (GFR), die Hydrierung des Patienten sowie der pH-Wert eine Rolle (Huffman et al. 1973).

Bei der Therapie mit MTX kann es, je nach Behandlungsdauer und Dosis, zum Auftreten von zahlreichen reversiblen unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAW) kommen. Auf Grund der Beeinträchtigung der DNA-Synthese betreffen diese vor allen Dingen hoch proliferatives Gewebe, wie z.B. die Epithelien der Schleimhäute, die Haarfollikel und das blutbildende System im Knochenmark. Es resultieren hieraus eine häufig beobachtete Mukositis, Haarausfall sowie eine Myelosuppression. Da MTX anfangs insbesondere in den Schleimhäuten akkumuliert, treten die UAW hier meist als erstes und zudem bei niedrigeren Dosierungen auf. Des Weiteren werden eine renale, hepatische und bei sehr hohen Dosierungen auch eine Neurotoxizität beschrieben. Neben der symptomatischen Behandlung, wie z.B. der Hydratation und Alkalisierung, um einer Ansammlung von MTX in der Niere entgegenzuwirken, stellt die so genannte *Leucovorin-Rescue* eine wirksame Methode zur Linderung der Schleimhautbeschwerden sowie der Myelosuppression dar. Es handelt sich hierbei um die Gabe von Leucovorin, das 5-Formyl-Derivat der THF, welches die Wirkung von MTX in der Zelle antagonisiert, indem es den Syntheseschritt von THF-Derivaten durch die DHF-Reduktase überbrückt (Djerassi 1967).

1.6 Arbeitshypothese

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob eine Reaktivierung der *FMR1*-Transkription durch Behandlung mit MTX eine Therapieoption für Patienten mit FXS darstellt. Zu diesem Zweck wurden kultivierte Fibroblasten von Patienten mit FXS mit unterschiedlichen Dosen MTX behandelt und anschließend untersucht, ob es zu einer Veränderung der Methylierung des *FMR1*-Promotors gekommen ist und ob *FMR1*-mRNA und *FMRP* nachgewiesen werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen

Es wurden Fibroblasten eines 35-jährigen, männlichen Patienten mit Fragilem-X-Syndrom (FXS) verwendet, welche eine Mutation im *FMR1*-Gen aufweisen. Die Zellen wurden von Coriell Cell Repositories, US (#GM04026) bezogen.

Als Kontrollzelllinie wurden Wild-Typ-Fibroblasten verwendet, die von Prof. Dr. Kurt von Figura aus dem Zentrum Biochemie und Molekulare Zellbiologie des Universitätsklinikums Göttingen bezogen wurden.

2.1.2 Materialien für die Zellkultur

2.1.2.1 Zellkulturmedien, Zusätze und Reagenzien

5-Aza-2`Deoxycytidin	Sigma, Deisenberg
Accutase	ΡΑΑ, Α
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, US
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) low glucose	ΡΑΑ, Α
Dulbecco's PBS (1x)	ΡΑΑ, Α
Fötales Kälberserum (FCS)	ΡΑΑ, Α
L-Glutamin	ΡΑΑ, Α
Methotrexat	Calbiochem, US

2.1.2.2 Sonstige Materialien

10cm-Gewebekulturschalen	Sarstedt, Nümbrecht
Kryoröhrchen (1ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen mit Filter (10, 100, 1000µl)	Eppendorf. Hamburg
Auslaufpipetten (1, 2, 5, 10, 25ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (0.2, 1.5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Sterile Schraubdeckelröhrchen (15, 50ml)	Greiner, Frickenhausen

2.1.3 Materialien für molekularbiologische und proteinbiochemische Arbeiten

2.1.3.1 Chemikalien und Reagenzien

Aceton	Roth, Karlsruhe
Agarose	Bioline, Luckenwalde
Ammoniumpersulfat	Roth, Karlsruhe
BC Assay Reagent A	Interchim, F
BC Assay Reagent B	Interchim, F
Blotting Grade Blocker Milchpulver	BioRad, US
Bovines Serum- Albumin (BSA)	Interchim, F
Chloroform	Merck, Darmstadt
Zitronensäure	Roth, Karlsruhe
D-Glucose	Roth, Karlsruhe
Dextran	Roth, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Deisenberg

EDTA – Lösung (0,5M)	AppliChem, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Glycin	Research Organics, US
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Lumi-Light Western Blotting Substrate	Roche, Grenzach
Methanol	Baker, NL
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Natriumdeoxycholat	AppliChem, Darmstadt
Nonidet P-40 (NP-40)	Sigma, Deisenberg
peqGOLD TriFastT [™]	peqLab, Erlangen
Rotiphorese [®] Gel 30	Roth, Karlsruhe
Salzsäure 37%	Merck, Darmstadt
SDS-Lösung 20%	Roth, Karlsruhe
TEMED [®]	Roth, Karlsruhe
Triton X – 100	Roth, Karlsruhe
Tris-Base	Roth, Karlsruhe
Tris-HCL	Roth, Karlsruhe
Tween ^R 20	Roth, Karlsruhe

2.1.3.2 Standard-Lösungen und Puffer

Blockierlösung (Western Blot)	5	%	Blotting Grade Blocker
			Milchpulver
		in	PBS-T
DEPC H ₂ O	0,001	%	DEPC
		in	H ₂ 0
DNA-Ladepuffer, 6x			Fermentas, St. Leon-Rot
GelRed			Biotium, US
SDS-Laufpuffer (SDS-PAGE)	25	mM	Tris-Base
	19,2	mM	Glycin
	0,1	%	SDS
	in	H ₂ O	
PBS	137	mM	NaCl
	8,8	mM	Na ₂ HPO ₄
	2,7	mM	КСІ
	0,7	mM	KH ₂ PO ₄
	in	H ₂ 0 be	ei pH 7,4

PBS-T	0,1	%	Tween ^R 20
		in	PBS

PCR-Reaktionspuffer, 10x

Proteinladepuffer, 4x (SDS-PAGE)

Qiagen,	Hild	en

160	mΜ	Tris-HCl
140	mΜ	SDS
2	%	Glycerin
4	mg/ml	Dithiothreitol (DTT)
0,1	g	Bromphenolblau

Proteinmarker (SDS-PAGE) PageRuler[™]

Fermentas, St. Leon-Rot

Q-Solution (PCR)			Qiagen, Hilden
RIPA-Puffer	50	mМ	Tris-HCl
	400	mМ	NaCl
	1	%	NP-40
	0,8	%	Na-Deoxycholat
	5	mМ	EDTA
	0,1	%	SDS
		in	H ₂ O
TAE	100	mМ	Tris/Acetat
	5	mМ	EDTA
		in	H₂O bei pH 8.0

38	mМ	Glycin
47	mM	Tris-Base
0,03	%	SDS
20	%	Methanol

2.1.3.3 Enzyme

HotStar-Taq [®] Polymerase	Qiagen, Hilden
iQ™SYBR [®] Green Supermix	BioRad, US
RNase H™	Invitrogen, Karlsruhe
RNase OUT™	Invitrogen, Karlsruhe
SuperScript III™	Invitrogen, Karlsruhe
Taq [®] Polymerase	Qiagen, Hilden

2.1.3.4 Nukleinsäuren

dNTP MixpeqLab, ErlangenMolekulargewichtstandard GeneRuler™ (100bp)Fermentas, St. Leon-Rot

Folgende Oligonukleotide wurden als Primer für PCR, Real-Time-PCR und Bisulfit-Sequenzierung verwendet.

Bezeichnung	Sequenz	Schmelztemperatur
FMR1 forward	5'- GCTAAAGTGAGGATGATAAAG - 3'	57°C

FMR1 reverse	5'- ATCCTTATGTGCCGCCTCTTTGG - 3'	57°C
FMR1 2 F	5′- GTTATTGAGTGTATTTTTGTAGAAATGGG- 3′	61°C
FMR1 3 R	5'- CCCTCTCTCTCAAATAACCTAAAAAC - 3'	61°C
FMR1 6 R	5´- CACGCCCCTAACAAC - 3´	61°C
FMR1 7 F	5´- GGTTATTTGAAGAGAGAGGG – 3´	61°C
GAPDH forward	5´- GAGTCAACGGATTTGGTCGT – 3´	61°C
GAPDH reverse	5′- GACAAGCTTCCCGTTCTCAG - 3`	61°C
HPRT forward	5´- ATTAGCGATGATGAACCAGG - 3´	61°C
HPRT reverse	5′ - GTCAGCAAAGAACTTATAGCC -3′	61°C

Tabelle 1: Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion aus Martinsried bezogen und in einer Verdünnung von 10µM eingesetzt.

2.1.3.5 Kits zur Bearbeitung von Nukleinsäuren

Big Dye [®] Terminator v3.1 Sequencing Kit	Applied Biosystem, US
EpiTect bisulfite Kit	Qiagen, Hilden
QiAMP [®] DNA Kit (250)	Qiagen, Hilden
SuperScript III [™] First Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.3.6 Antikörper

Antikörper	Verwendung	Herkunft
	(eing. Verdünnung)	
Anti-FMRP–AK,	Western Blot	Euromedex, F
monoclonal mouse	(1:2000)	(FMR-AS)
	Immunzytochemie	
	(1:1600)	
Anti-FMRP–AK,	Western Blot	Sigma-Aldrich, US
monoclonal rabbit	(1:2000)	(F4055)
	Immunzytochemie	
	(1:1600)	
Anti-GAPDH-AK,	Western Blot	Abcam, UK
monoclonal	(1:2500)	(ab8245)
Anti-Mouse-AK,	Western Blot	Jackson Immuno Research, US
HRP-gekoppelt	(1:25000)	(715-035-151)

Tabelle 2: Antikörper

2.1.3.7 Sonstige Materialien

96-Loch-Microtiterplatten

Kanülen 18G

Nitrozellulosemembran

Parafilm

StarLab, Ahrensburg BD, IRL Whatman, Dassel Pechiney, UK

Pasteurpipetten
Pipettenspitzen (20, 200 , 1000µl)
Reaktionsgefäße (0.2 , 1.5ml)
Reaktionsgefäße (2.0ml)
Skalpelle
Zellschaber

2.1.4 Geräte

Analysewaage Typ L2200P	Sartorius, Göttingen
Brutschrank Typ 400 HY	Bachofer, Reutlingen
Fastblot B43	Biometra, Göttingen
Gentic Analyzer 3100	Applied Biosystems ,US
Heizblock Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg
iQ 5 Cycler	BioRad, US
Luminescent Image Analyzer Typ LAS-400 mini	Fujifilm , Düsseldorf
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank HERA safe	Fischer Scientific, Schwerte
Mikroskop Nikon, Typ Eclipse TS100	Nikon GmbH. Düsseldorf
Mikroskop Typ Axio Imager M.1	Carl Zeiss, Göttingen
Mikrowellenherd	Siemens, München
Mikrozentrifuge, Typ 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Mikrozentrifuge Typ MIKRO 200 R	Hettich , Tuttlingen
Multi-Mode Microplate Reader Typ S-HT	BioTek, Bad Friedrichshall
pH-Meter Typ InoLab	WTW, Weilheim

WU, Mainz

HMD, UK

Sarstedt, Nümbrecht

Sarstedt, Nümbrecht

Eppendorf, Hamburg

Sarstedt, Nümbrecht

T3000 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Tischkühlzentrifuge, Typ ROTANTA/R	Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge, Typ Universal 320	Hettich, Tuttlingen
Ultra pure water system Typ Milli Q Plus	Millipore, Schwalbach
Ultraschall-Prozessor UP 50H	Dr. Hielscher, Teltow
UV-Transluminator Typ BioDocAnalyse	Biometra, Göttingen
Vortex Genie 2	Bender & Hobbein, CH
Zellkulturinkubator HERAcell 150	Fischer Scientific, Schwerte

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung von Fibroblasten

Zellkulturarbeiten wurden ausschließlich an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die verwendeten Fibroblasten wurden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) low glucose* mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) und 2mM L-Glutamin in 10cm-Gewebekulturschalen bei 37°C in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre kultiviert. Angesetzte Kulturmedien wurden stets bei 4°C aufbewahrt und die benötigte Menge vor der Benutzung im 37°C-Wasserbad erwärmt.

2.2.1.2 Passagieren von Fibroblasten

Zum Passagieren wurden die Fibroblasten nach Entfernung des Mediums einmal mit PBS gewaschen und anschließend nach Zugabe von 1ml Accutase bei 37°C unter mikroskopischer Kontrolle bis zur Ablösung der Zellen inkubiert. Die Zellsuspension wurde daraufhin mit dem

neunfachen Volumen an Kulturmedium resuspendiert und auf neue Gewebekulturschalen überführt.

2.2.1.3 Kryokonservierung von Fibroblasten

Für die Kryokonservierung wurden die Fibroblasten nach Entfernung des Mediums einmal mit PBS gewaschen und nach Ablösung der Zellen mittels Accutase in Kulturmedium aufgenommen. Nach anschließender Zentrifugation für fünf Minuten bei 61 x g wurde der Überstand entfernt, die Fibroblasten in 2ml Einfriermedium (70% DMEM; 20% FBS; 10% DMSO) resuspendiert und die Zellsuspension in Kryoröhrchen überführt. Die Lagerung erfolgte zunächst über Nacht in einem Einfrierbehälter bei -80°C und anschließend zur langfristigen Lagerung bei -150°C.

2.2.1.4 Re-Vitalisierung von Fibroblasten

Die Kryoröhrchen wurden aus dem -150°C-Schrank entnommen, für eine Minute bei Raumtemperatur erwärmt und anschließend bis zum vollständigen Auftauen mit 1ml Kulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 20ml vorgewärmtes Medium überführt und fünf Minuten bei 61 x g zentrifugiert. Nach anschließender Aufnahme des Zellsediments in vorgewärmtes Kulturmedium erfolgte die Ausplattierung auf Gewebekulturschalen.

2.2.1.5 Behandlung der Fibroblasten mit Methotrexat und 5-Aza-2`Deoxycytidin

Kurz vor der Behandlung der Fibroblasten wurde die Konzentration des FCS im Kulturmedium von 10% auf 5% reduziert. Die Zellen wurden mit Methotrexat in Konzentrationen von 0,5 – 4 µg pro Milliliter Medium sowie mit 5-Aza-2`Deoxycytidin in einer Konzentration von 1µg pro Milliliter Medium behandelt. Methotrexat wurde in isotoner Natriumchloridlösung, 5-Aza-2`Deoxycytidin in PBS gelöst. Die Behandlung mit beiden Präparaten erfolgte in 24h-Pulsen.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Präparation von RNA aus Fibroblasten

Die Fibroblasten einer 10cm-Gewebekulturschale wurden mittels Accutase abgelöst, anschließend bei 61 x g zentrifugiert und in 100µl Kulturmedium resuspendiert. Nach Zugabe von 1ml *peqGOLD TriFast*[™] wurde die RNA-Präparation nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die gewonnene Gesamt-RNA wurde in 30µl DEPC-H₂O gelöst und nach photometrischer Bestimmung der Konzentration zur reversen Transkription eingesetzt.

2.2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen wurde photometrisch unter Verwendung des *Nano Drop ND-1000* durchgeführt. Dazu wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 260nm (OD₂₆₀) gemessen, wobei für die OD₂₆₀ von 1,0 folgende Referenz-Konzentrationen zugrunde gelegt wurden:

50µg/ml für die Doppelstrang-DNA

40µg/ml für RNA

Zusätzlich konnte die Reinheit einer DNA-Lösung durch Bestimmung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 280nm überprüft werden.

Für reine DNA gilt: OD₂₆₀/OD₂₈₀> 1,8 (Sambrook et al. 1989).

2.2.2.3 Reverse Transkriptase-PCR

Die reverse Transkriptase-PCR ist eine Methode zum Nachweis der Genexpression spezifischer Gene in Zellmaterial, Geweben oder Blutserum. Die aus den genannten Materialien isolierte mRNA wurde dafür in cDNA umgeschrieben. Zur cDNA-Synthese mittels *SuperScript III™ First-* *Strand Synthesis System for RT-PCR* wurden 2,5 – 3μg Gesamt-RNA eingesetzt. Der Reaktionsansatz und die Reaktionsbedingungen wurden wie folgt gewählt:

x μl RNA (2,5 – 3μg)

1 μl 50μM Oligo (dT₂₀)-Oligonukleotid

1 µl 10mM dNTP mix

x μl H2O ad 10 μl

Nach einer fünfminütigen Inkubation bei 65°C wurde der Ansatz für eine Minute auf Eis abgekühlt und anschließend folgende Reagenzien hinzugefügt:

 $2 \ \mu l \ 10x \ RT$ -Puffer

4 μl 25mM MgCl₂

2 μl 0,1M DTT

1 µl RNase OUT™

1 μl SuperScript[™] III RT

Zur nun folgenden cDNA-Synthese wurde der Ansatz für 50 Minuten bei 50°C und anschließend für fünf Minuten bei 85°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 μ l *RNase H*^m erfolgt eine abschließende Inkubation für 20 Minuten bei 37°C.

Mit der synthetisierten cDNA wurden im Folgenden PCR (2.2.2.4) und Real-Time-PCR (2.2.2.6) durchgeführt.

2.2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht durch selektive Amplifikation die Vervielfältigung kleinster Mengen DNA *in vitro*. Polymerase-Kettenreaktionen wurden mit thermostabiler *HotStar-Taq[®]Polymerase* bzw. *Taq[®]Polymerase* in 200µl Reaktionsgefäßen durchgeführt. Je nach Zielsetzung wurden 25µl bzw. 50µl Reaktionsansätze verwendet. Ein PCR-Standardansatz setzte sich wie folgt zusammen:

xμl DNA

x μl H₂0

10 μ M Oligonukleotid 5' \rightarrow 3'

10 μ M Oligonukleotid 3' \rightarrow 5'

4,9 nM dNTP Mix

- 1 x Q-Solution (5x)
- 1 x PCR-Reaktionspuffer (10x)
- 1 U Polymerase

Der Ansatz wurde nach folgendem Temperaturschema im PCR-Cycler inkubiert, wobei die Anlagerungs-Temperatur vom Schmelzpunkt der Oligonukleotide abhing. Zur Denaturierung der DNA und Aktivierung der *HotStar-Taq[®]Polymerase* wurde der Ansatz zuerst für 15 Minuten bei 95°C erhitzt. Bei Verwendung von *Taq[®]Polymerase* entfällt dieses. Jeder der 35 Amplifikationszyklen umfasste folgende Schritte:

Hitzedenaturierung	bei 95°C	für 30 Sekunden
Oligonukleotid-Anlagerung	bei 57-61°C	für 30 Sekunden
Polymerase-Reaktion	bei 72°C	für 40 Sekunden

Die PCR-Zyklen wurden durch einen finalen Syntheseschritt von fünf Minuten bei 72°C abgeschlossen und die Reaktion durch Abkühlen auf 4°C gestoppt. Die amplifizierten DNA-Abschnitte wurden anschließend mittels Gelelektrophorese (2.2.2.5) aufgetrennt oder bei 4°C gelagert.

2.2.2 DNA-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden in horizontalen 2%igen Agarosegelen aufgetrennt. Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer, der auch als Laufpuffer diente, gelöst und mit 1,5 µl *GelRed* pro 150ml Agarosegel versetzt. Nach Auftrennung der DNA-Fragmente bei 85 Volt erfolgte die Gelanalyse mittels UV-Transluminator (BioDocAnalyse) mit integrierter Videokamera bei einer Wellenlänge von 356nm. Für die Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde der Gene $Ruler^{TM}$ verwendet.

2.2.2.6 Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (Real-Time-PCR)

Die Real-Time-PCR wurde zur quantifizierbaren selektiven Amplifikation der in 2.2.2.3 synthetisierten cDNA verwendet. Für die Reaktionen, welche in Dreifach-Bestimmungen durchgeführt wurden, wurde folgender Ansatz gewählt:

5µl cDNA

0,5µl Oligonukleotid 5' \rightarrow 3' (10pmol)

```
0,5µl Oligonukleotid 3' → 5' (10pmol)
```

6,5µl H₂O

12,5µl iQ™SYBR Green Supermix

Folgende Programmeinstellungen wurden für den *iQ 5 Cycler* verwendet:

Zyklus 1:	2 Minuten	bei 50° C
Zyklus 2:	10 Minuten	bei 95° C
Zyklus 3:	30 Sekunden	bei 95° C
	30 Sekunden	bei 61° C
	30 Sekunden	bei 72° C
Zyklus 4:	1 Minute	bei 95° C
Zyklus 5:	1 Minute	bei 60° C
Zyklus 6:	15 Sekunden	bei 55° C

Bei der Datenanalyse wurde darauf geachtet, dass die PCR im Messbereich über eine Effizienz von etwa 100% (Produktverdoppelung) verfügte. Des Weiteren wurde die Reaktionsspezifität mittels Schmelzkurve überprüft.

2.2.2.7 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Analyse von Methylierungsmustern bestimmter Genabschnitte verwendet. Hierzu wurde vorerst eine Bisulfitbehandlung der DNA durchgeführt (2.2.2.9). Anschließend erfolgte die Sequenzierung unter Zuhilfenahme des Sequenzierungskits *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* sowie sequenzspezifischen Oligonukleotiden (2.2.2.7).

Für die Sequenzierungs-PCR wurde folgender Ansatz verwendet:

x ng	DNA
2 µl	5x Cycle-Sequencing-Puffer
1 µl	Big Dye
0,5 μl	Oligonukleotid (10pmol)
ad 10 µl	H ₂ 0

Der Reaktionsansatz wurde anschließend nach folgendem Schema, welches 24 Wiederholungen umfasst, im PCR-Cycler inkubiert:

Zyklus 1:	10 Sekunden	bei 96° C
Zyklus 2:	4 Minuten	bei 60°C

Im Anschluss daran wurde eine Ethanolpräzipitation der PCR-Produkte durchgeführt für die folgender Ansatz gewählt wurde:

10 µl PCR-Produkt

120 μl H₂0

10 μ l 3M NaAcetat

220 μl 100%iges Ethanol

Nach kurzem Mischen auf dem Vortex sowie einer 20-minütigen Zentrifugation bei 17960 x g wurde der Überstand verworfen und der Rückstand mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 17960 x g wurde das Präzipitat bei 60°C getrocknet und anschließend in 10µl Formamid aufgenommen.

Die DNA-Fragmente wurde mittels DNA-Sequenzer *ABI PRISM, 3100 Genetic Analyzer* analysiert. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte anhand der *Sequenzing Analysis Software Version 5.1* sowie der *Data Collection Software 2.0* von Applied Biosystems.

2.2.2.8 Präparation genomischer DNA aus Fibroblasten

Die Präparation genomischer DNA (gDNA) wurde nach Vorschrift des Herstellers QIAGEN unter Verwendung des *QIAamp^R DNA Kits* durchgeführt. Es wurden hierfür Fibroblasten einer 10cm-Gewebekulturschale mittels Accutase abgelöst und in 200µl PBS resuspendiert. Die gewonnene DNA wurde anschließend für die Bisulfitbehandlung (2.2.2.9) eingesetzt oder bei 4°C gelagert.

2.2.2.9 Bisulfitbehandlung der genomischen DNA

Die Bisulfitbehandlung und anschließende Reinigung der genomischen DNA aus Fibroblasten wurde nach Vorschrift des Herstellers QIAGEN unter Verwendung des *EpiTect Bisulfite Kits* durchgeführt. Die behandelte gDNA wurde anschließend zur PCR eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Proteinextraktion aus Fibroblasten

Zur Proteinextraktion wurden die Fibroblasten nach Entfernung des Mediums zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit 750µl RIPA-Puffer pro 10cm-Gewebekulturschale bei 4°C für 15 Minuten inkubiert. Das auf diese Weise gewonnene Zelllysat wurde in 2ml Eppendorfgefäße überführt und anschließend bei 4°C für 20 Minuten und 18620 x g zentrifugiert. Ein Teil des Überstandes wurde anschließend zur photometrischen Proteinkonzentrationsbestimmung mittels *BC-Assay* (2.2.3.2) verwendet. Die Lagerung der Proteinlösung erfolgte nach Schockgefrierung mit flüssigem Stickstoff bei - 80C°.

2.2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BC-Assay

Die Proteinbestimmung wurde photometrisch durch Erhebung von Doppelwerten in 96-Well-Platten durchgeführt. Zur Erstellung einer Eichgeraden wurden 0, 2.5, 5, 7.5, 10 und 15µl einer BSA Standardlösung (2 mg/ml) in die 96-Well-Platte pipettiert und anschließend mit Wasser auf 25µl aufgefüllt. Von den Proteinproben wurden 5µl in 20µl Wasser zur Konzentrationsbestimmung eingesetzt. Anschließend wurden zu jeder Probe 200 µl einer Mischung aus *BC-Assay Reagent A* und *BC-Assay Reagent B* im Verhältnis 50:1 hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 37°C wurde die Absorption im *Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader* bei einer Wellenlänge von 562nm gemessen und der Proteingehalt der Proben mit Hilfe der Eichgeraden bestimmt.

2.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen wurden 10% ige SDS-Polyacrylamidgele verwendet. Pro Gelspur wurden 2,5 – 300 μ g Protein geladen und bei 180V in 1x SDS-Laufpuffer aufgetrennt.
Die Proteinproben wurden dazu mit einem drittel Volumen des 4x Proteinladepuffer versetzt und vor dem Auftragen für 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Zur Bestimmung der Proteingrößen wurde der vorgefärbte Molekulargewichtsstandard *PageRuler*[™] verwendet.

2.2.3.4 Transfer und immunologische Detektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembran (Western Blot)

Zur immunologischen Detektion von Proteinen wurden diese nach der Auftrennung in SDS-Gelen elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Transfer erfolgte nach Angaben des Herstellers von Membran und Blot-Apparatur in Transferpuffer für etwa eine Stunde bei 1-2 mA pro cm² Nitrozellulosemembran. Nach der Übertragung wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blockierlösung inkubiert. Die Reaktion mit dem primären Antikörper, der entsprechend in Blockierlösung verdünnt wurde, erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach drei fünfminütigen Waschschritten mit PBS-T folgte die Inkubation mit einem entsprechenden *HRP*-gekoppelten Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Im Anschluss an drei weitere Waschschritte mit PBS-T erfolgte die Detektion der Antikörper-markierten Proteine mit *Lumi-Light Western Blotting Substrate* nach Angaben des Herstellers im *Luminescent Image Reader (LAS-4000 Mini)*.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Behandlung von Fibroblasten eines Patienten mit Fragilem-X-Syndrom (FXS) mit Methotrexat (MTX), einem Analogon der Folsäure, zu einer reduzierten Methylierung des Promotors, einer Reaktivierung der Transkription des *FMR1*-Gens und einer Expression von *FMRP* führt.

3.1 Reaktivierung der *FMR1*-Transkription durch Behandlung mit MTX

Bei Menschen mit FXS finden sich in der Mehrzahl mehr als 200 CGG-Tripletts im 5' untranslatierten Bereich (UTR) des *FMR1*-Gens. Dies führt zu einer Methylierung des entsprechenden DNA-Abschnittes sowie des Promotors, wodurch die Transkription des *FMR1*-Gens und die Expression von *FMRP* verhindert werden. In der Vergangenheit konnte durch Gabe des Methyltransferasehemmstoffes 5-Aza-2`Deoxycytidin (5-AzaD) erfolgreich die Reexpression des *FMR1*-Gens gezeigt werden. Diese Substanz dient als Substratanalogon zu Cytidin und wird, wenn im Überschuss vorhanden, bei der Zellteilung anstelle von Cytidin in entstehende DNA-Stränge eingebaut. 5-AzaD kann selbst aus sterischen Gründen nicht methyliert werden und führt so nach dem Einbau in zuvor methylierte Regionen zur Demethylierung (Chiurazzi et al. 1998). Eine weitere Option zur Beeinflussung der DNA-Methylierung und damit möglicherweise Reaktivierung der *FMR1*-Transkription stellt die Behandlung mit MTX dar. Es hemmt die Synthese von Tetrahydrofolsäure, einem aktiven Metaboliten von Folat, welcher als indirekter Methylgruppendonator dient und führt auf diese Weise zu einer negativen Beeinflussung der DNA-Methylierung.



Abb. 1: Schema des Versuchsablaufs. Zur Reaktivierung der *FMR1*-Transkription wurden die Patientenzellen, wie in Kapitel 2.2.1.1 beschrieben, kultiviert und währenddessen mit MTX in unterschiedlicher Konzentration und Dauer behandelt. Im Anschluss folgten die Extraktion der RNA (2.2.2.1) sowie die cDNA-Synthese mittels Reverser-Transkriptase-PCR (2.2.2.3). Es wurde ferner eine semiquantitative PCR mit *FMR1*-spezifischen Oligonukleotiden durchgeführt (2.2.2.4), wobei die Effizienz der cDNA-Synthese mit dem konstant exprimierten Gen GAPDH (*housekeeping*-Gen) überprüft wurde. Als Vergleich dienten Fibroblasten eines gesunden Probanden.



Abb. 2: Auswahl der für die PCR verwendeten Oligonukleotide. Schematische Darstellung des Exon 4 bis Exon 6 umfassenden Bereichs der genomischen DNA (gDNA) des *FMR1*-Gens. Die roten Pfeile kennzeichnen die Positionen der verwendeten Oligonukleotide, die zum Nachweis des *FMR1*-Transkripts verwendet wurden.

Das 38 Kilobasen umfassende *FMR1*-Gen besteht aus 17 Exons und kodiert für ein 4,4 Kilobasen großes Transkript. *Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP)*, das Genprodukt von *FMR1*, besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von 78 Kilodalton. Darüber hinaus sind 20 kürzere Isoformen bekannt, die durch alternatives Spleißen entstehen. Um das *FMR1*-Transkript in den Patienten- und Kontrollfibroblasten nachweisen zu können, wurden Oligonukleotide in Exon 4 und Exon 6 platziert (Abb. 2), da dieser Bereich nicht vom alternativen Spleißen betroffen ist.

In unbehandelten Zellen ist keine FMR1-Transkription nachweisbar

Zunächst wurde aus unbehandelten Patientenfibroblasten sowie den Kontrollfibroblasten RNA isoliert, die anschließend zur Synthese von cDNA verwendet wurde. Mit Hilfe der *FMR1*spezifischen Oligonukleotide konnte in den Kontrollfibroblasten ein 204bp großes Fragment nachgewiesen werden. Die Patientenprobe wies kein Transkript auf (siehe Abb. 3). Zur Kontrolle der cDNA-Synthese wurde ein ähnlich großes Fragment aus dem GAPDH–Gen amplifiziert. Wie zu erwarten war, konnte in beiden Proben eine Bande detektiert werden.



Abb. 3: *FMR1*-Transkription in unbehandelten Patienten- und Kontrollfibroblasten. Im Anschluss an die Amplifikation mittels PCR wurden die Fragmente in einem 2%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion erfolgte durch Zusatz von 1% GelRed. Es wurden jeweils 5µl des Ansatzes für FMR1 sowie 3µl für GAPDH verwendet.

Nach Behandlung mit MTX ist eine FMR1 Transkription nachweisbar

Die MTX-Behandlung der Patientenfibroblasten wurde zunächst in 25cm²-Gewebekulturflaschen über einen Zeitraum von zwei bis 48 Stunden mit 0,3 µg MTX/ml Medium durchgeführt. Da unter diesen Bedingungen kein *FMR1*-Transkript nachweisbar war, wurde die Behandlungsdauer verlängert sowie die MTX–Konzentration erhöht. Zudem wurde die Kultur der Fibroblasten zur Steigerung der Zellmenge auf 10cm-Gewebekulturschalen fortgeführt. Der Nachweis von *FMR1*-mRNA gelang erstmals bei einer Konzentration von 0,5 µg MTX/ml Medium. Die Behandlung erfolgte in 24h Pulsen, wobei das Medium jeweils nach 48h erneuert wurde. Als Positivkontrolle wurden Patientenzellen mit 5-AzaD behandelt.



Abb. 4: Reaktivierung der FMR1-Transkription durch MTX ist nachweisbar. Im Anschluss an die PCR wurden die Amplifikate in einem 2%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion erfolgte durch Zusatz von 1% GelRed. Es wurden jeweils 5µl des Ansatzes für *FMR1* sowie 3µl für GAPDH verwendet.

Wie in Abbildung 4 dargestellt, konnte sowohl in den unbehandelten Patientenfibroblasten (P-unbehandelt) als auch in den für vier Tage mit 1 μ g 5-AzaD /ml Medium behandelten Zellen (P+5AzaD, 4d, 1 μ g/ml) kein *FMR1*-Transkript nachgewiesen werden. Wurden die Zellen allerdings für sieben Tage in Anwesenheit von 1 μ g 5-AzaD/ml Medium kultiviert (P+5AzaD, 7d, 1 μ g/ml), konnte aus der cDNA das erwartete 204 bp große Fragment als Nachweis der *FMR1*-Transkription amplifiziert werden (siehe Abb. 4). Einen vergleichbaren Effekt erreichte die Behandlung mit MTX. Hierbei schien eine Dosisabhängigkeit zu bestehen. Im Vergleich zu

den mit 0,5 µg MTX /ml Medium (P+MTX 4d bzw. 7d, 0,5µg/ml) war bei den mit 1 µg MTX/ml Medium behandelten Zellen (P+MTX 4d bzw. 7d, 1µg/ml) eine stärkere Bande nachweisbar. Diese Aussage beruht an diesem Punkt jedoch nur auf dem visuellen Vergleich zu der Ladekontrolle GAPDH im Agarosegel. Daneben wurde die *FMR1*-Transkription in Fibroblasten einer gesunden Kontrollperson untersucht (WT). Diese wiesen, wie zu erwarten war, die stärkste *FMR1*-Expression auf. Mittels Sequenzierung konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den Banden tatsächlich um das 204bp-große Fragment des *FMR1*-Transkripts handelt.

Die Transkriptmenge steigt mit der MTX-Konzentration

Im weiteren Verlauf wurde die Abhängigkeit der Effektivität der Transkriptionsreaktivierung von der MTX-Konzentration untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Patientenzellen über sieben Tage mit 0,5 µg/ml Medium, 1 µg/ml Medium und 2 µg MTX/ml Medium behandelt. Als Positivkontrolle dienten Patientenzellen, die in einem mit 1 µg 5-AzaD /ml versetzten Medium kultiviert wurden. Daneben wurden sowohl unbehandelte Patientenfibroblasten als auch Kontrollfibroblasten nach sieben Tagen Kultur analysiert. Die Zugabe der Substanzen erfolgte wie auch in allen folgenden Experimenten in 24h-Pulsen, wobei das Kulturmedium jeweils nach 48h erneuert wurde.



Abb. 5: Die Transkriptreaktivierung von *FMR1* ist abhängig von der MTX-Konzentration. Im Anschluss an die Amplifikation mittels PCR wurde die DNA in 2%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion erfolgte durch Zusatz von 1% GelRed. Es wurden jeweils 5µl des Ansatzes für *FMR1* sowie 3µl für GAPDH verwendet

Wie zu erwarten, war nach der Gabe von 5-AzaD die Transkription von *FMR1* nachzuweisen. Hierbei konnte durch eine dreitägige Verlängerung der Behandlung eine Erhöhung der Transkriptmenge beobachtet werden. Die über sieben Tage andauernde Behandlung mit unterschiedlichen MTX-Konzentrationen wies eine ähnliche Tendenz auf. Mit steigender MTX-Dosis wurde mehr *FMR1*-Transkript detektiert, wobei aber rein visuell zwischen der Behandlung mit 1 µg/ml Medium und 2 µg/ml Medium zunächst kein Unterschied zu beobachten war (siehe Abb. 5).

Die Transkriptmenge steigt mit der Behandlungsdauer

Nachdem gezeigt wurde, dass sich die Transkriptmenge mit zunehmender MTX-Konzentration erhöhte, wurde die Abhängigkeit von der Behandlungsdauer untersucht. Unbehandelte Patientenzellen wurden hierzu mit Patientenzellen verglichen, die für vier bzw. sieben Tage mit 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml und 4 µg MTX /ml Medium behandelt wurden. Zur Kontrolle wurden Patientenzellen für sieben Tage mit 1 µg 5-AzaD/ml Medium kultiviert.



Abb. 6: Die Transkriptmenge steigt mit der Behandlungsdauer. Im Anschluss an die Amplifikation mittels PCR wurde die DNA in 2%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion erfolgte durch Zusatz von 1% GelRed. Es wurden jeweils 5µl des Ansatzes für *FMR1* sowie 3µl für GAPDH verwendet

Im Vergleich zu der viertägigen Behandlung war nach sieben Tagen mit 0,5 μg/ml bzw. 1 μg MTX/ml Medium eine deutliche Steigerung der Transkriptmenge zu beobachten (siehe Abb. 6). Dieser Effekt ging jedoch mit zunehmender MTX-Konzentration verloren. Bei der Behandlung mit 2 μg MTX /ml Medium schien die siebentägige Behandlung nur noch eine minimale Erhöhung der Transkriptmenge hervorzurufen. Die Kultivierung in Anwesenheit von $4 \ \mu g \ MTX/ml$ Medium führte dahingegen zu einer Reduktion der Transkription bei längerer Behandlungsdauer.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurden zur weiteren Untersuchung der Relation von Transkriptmenge und Behandlungsdauer Versuche mit 1 und 2 μg MTX/ml Medium über einen Zeitraum von vier, fünf, sechs und acht Tagen durchgeführt.



Abb. 7: Einfluss von der Behandlungsdauer auf die Transkriptmenge. Im Anschluss an die Amplifikation mittels PCR wurde die DNA in 2%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion erfolgte durch Zusatz von 1% GelRed. Es wurden jeweils 5µl des Ansatzes für *FMR1* sowie 3µl für GAPDH verwendet

Auch diesmal war eine Abhängigkeit der Transkriptmenge vom Behandlungszeitraum zu erkennen. Patientenzellen, die über vier Tage in 1 bzw. 2 µg MTX/ml Medium kultiviert wurden, zeigten nur eine sehr geringe *FMR1*-Transkription (siehe Abb. 7). Bei Behandlungen über fünf, sechs und sieben Tage waren mit beiden MTX-Dosierungen jeweils eine deutliche PCR-Bande nachweisbar, wobei die Kultur über acht Tage mit 2 µg MTX/ml Medium am effektivsten war.

Als nächstes wurden die Experimente mit einer Behandlungsdauer von 14 Tagen durchgeführt. Als MTX-Dosierung wurden 2 µg/ml Medium gewählt. Um eine valide quantitative Aussage über die Reaktivierung der Transkription treffen zu können, wurde neben der semiquantitativen PCR ebenfalls eine Real-Time-PCR zur Bestimmung der relativen Expression durchgeführt. Die *FMR1*-Expression der behandelten Patientenfibroblasten wurde hierbei mit derer der unbehandelten Zellen mittels DeltadeltaCT-Methode verglichen (Livak und Schmittgen 2001).





Abb. 8: Reaktivierung der *FMR1*-Transkription in Patientenzellen durch MTX nach Verdopplung der Behandlungsdauer auf 14 Tage. a.) Im Anschluss an die Amplifikation mittels PCR wurde die DNA in 2% igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion erfolgte durch Zusatz von 1% GelRed. Es wurden jeweils 5µl des Ansatzes für *FMR1* sowie 3µl für GAPDH verwendet.

b.) Das Diagramm stellt die relative Expression des *FMR1*-Transkripts dar. Diese wurde mittels Real-Time-PCR in Dreifachbestimmungen untersucht. Anschließend wurde die *FMR1*-Expression der behandelten, mit derer der unbehandelten Fibroblasten, mittels Deltadelta-CT Methode in Beziehung gesetzt. Abweichungen der Messwerte sind als Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.) angegeben.

Neben den unbehandelten Patientenzellen, die erneut kein Signal zeigten, konnte bei allen anderen eine PCR-Bande nachgewiesen werden, wobei sich diese wiederum bei den Kontrollzellen sowie bei Kultur mit 5-AzaD am deutlichsten zeigte (siehe Abb. 8a). Zwischen den MTX-Behandlungen über sieben, neun, 12 und 14 Tagen war bei diesem Experiment mittels PCR kein Unterschied zu erkennen. In der Real-Time-PCR zeigte sich jedoch eine 47 | S e i t e Steigerung der Transkription in Abhängigkeit der Behandlungsdauer. So war die *FMR1*-Transkription bei einer Behandlung über 14 Tage, im Vergleich zur zwölftägigen Anwendung um das zehnfache erhöht, der Unterschied zwischen sieben, neun und 12 Tagen lag dahingegen nur im Bereich einer zwei bzw. dreifachen Steigerung (Abb. 8b). Auch fiel auf, dass die mit 5-AzaD behandelten Fibroblasten in der semiquantitativen PCR die stärkste Bande aufwiesen, mittels Real-Time-PCR jedoch nur ungefähr die Hälfte des Transkripts der über 14 Tage mit MTX behandelten Zellen nachzuweisen war. Der vorangegangene Versuch wurde unter identischen Bedingungen wiederholt. Wiederum ergab sich in der Real-Time-PCR die höchste Transkriptionsrate bei den Kulturen, die über 14 Tage mit MTX behandelt wurden.





Abb. 9: Wiederholung des vorangegangen Versuches zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit. Siehe Abb. 8.

3.2 Detektion des *FMR1***-Genproduktes** *FMRP* **in FXS-Patientenzellen** nach Behandlung mit MTX

Das Fehlen des *FMR1*-Genproduktes *FMRP* auf Grund einer Inhibierung der Transkription ist ursächlich für die Entstehung des Phänotyps bei Patienten mit FXS. Es handelt sich hierbei um ein ca. 630 Aminosäuren umfassendes mRNA-Bindeprotein, welches eine Rolle bei der Entstehung und Reifung von Neuronen sowie deren Synapsen spielt.

Nachdem mittels MTX die *FMR1*-Transkription in Patientenfibroblasten reaktiviert werden konnte (3.1), wurde nun der Nachweis von *FMRP* in diesen Zellen angestrebt. Hierzu wurden die Fibroblasten identisch zu Kapitel 3.1 kultiviert und währenddessen einer MTX-Behandlung unterzogen. Es folgten die Proteinextraktion mittels RIPA-Puffer (2.2.3.1) sowie eine SDS-PAGE (2.2.3.3) mit anschließendem Western Blot (2.2.3.4). Zur Detektion des *FMRP* im Proteinextrakt wurde ein monoklonaler Antikörper aus der Maus eingesetzt, der spezifisch ein Epitop am N-terminalen Ende des Proteines erkennt (2.1.3.6).



Abb. 10: Versuchsablauf zum Nachweis von FMRP in Fibroblasten nach MTX-Behandlung

Die vorangegangenen Experimente zur Reaktivierung der *FMR1*-Transkription lassen nicht darauf schließen, ob und in welchen Mengen die entstandenen Transkripte in das entsprechende Protein umgewandelt werden. Da davon ausgegangen werden muss, dass mit Hilfe der Western Blot-Analyse auch geringe *FMRP*-Mengen detektiert werden müssen, wurde zunächst an unterschiedlichen Mengen Gesamtproteinextrakten aus Wildtyp-Fibroblasten die Sensitivität des Antikörpers überprüft.



Abb. 11: Nachweis von *FMRP* im Proteinextrakt aus Wildtyp-Fibroblasten. Die Abbildung zeigt das Ergebnis des Nachweises von *FMRP* und GAPDH in Proteinextrakten unterschiedlicher Konzentrationen aus Wildtyp-Fibroblasten mittels Western Blot. Unterschiedliche Mengen Gesamtproteinextrakt (0,25 – 30 μg) aus Wildtyp-Fibroblasten wurden verwendet, um die Sensitivität des spezifischen monoklonalen Anti-*FMRP*-Antikörpers zu testen. Die humane Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) wurde als Ladekontrolle verwendet und mit Hilfe eines Molekulargewichtstandards wurden die Größen der detektierten Signale abgeschätzt.

Im Proteinextrakt der Wildtyp-Fibroblasten konnte die Ladekontrolle GAPDH in allen Proben detektiert werden, wobei die Stärke des Signals proportional zur Gesamtproteinkonzentration ansteigt. Mit einem schwachen Signal wurde *FMRP* dagegen erstmals in 1µg Gesamtproteinextrakt detektiert (siehe Abb. 11).

Anschließend wurde untersucht, ob durch die Gabe von MTX eine Reaktivierung der *FMRP*-Synthese in Fibroblasten von Patienten mit FXS zu erreichen ist. Hierzu wurden die Zellen wie in Kapitel 2.2.1.1 kultiviert und währenddessen mit 1 bzw. 2 µg MTX/ml Medium über vier bis acht Tage behandelt. Zur Positiv- bzw. Negativkontrolle diente der Nachweis von *FMRP* in unbehandelten Patientenzellen, Wildtyp-Fibroblasten sowie in mit 5-AzaD behandelten Patientenfibroblasten. Als Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen das Protein GAPDH (2.1.3.6) verwendet.



Abb. 12: Nachweis von *FMRP* in Patientenzellen nach Behandlung mit MTX. Die Abbildung zeigt das Ergebnis des Nachweises von *FMRP* in Patientenfibroblasten nach Behandlung mit MTX. Es wurden Zellextrakte mit der Proteinkonzentration von 50 μ g eingesetzt. Als Molekulargewichtstandard (M) wurde ein Proteinmarker verwendet (2.1.3.2).

In allen Proteinextrakten ließ sich eine ähnliche Menge an GAPDH detektieren. Die Wildtyp-Fibroblasten zeigen darüber hinaus eine deutliche Bande des *FMR*-Proteins, welche sich bei den unbehandelte sowie den mit 5-AzaD behandelten Patientenzellen nicht nachweisen ließ. Bei den FXS-Fibroblasten, welche für sechs Tage mit 2 µg MTX/ml Medium bzw. über 8 Tage mit 1µg MTX/ml Medium behandelt wurden, war eine schwache Bande für das *FMRP* zu detektieren, die sich in den übrigen mit MTX behandelten Zellen nicht nachweisen ließ (siehe Abb. 12). Dieses Ergebnis war jedoch nicht reproduzierbar.

3.3 Methylierungsanalyse der Promotorregion des FMR1-Gens in Fibroblasten von Patienten mit FXS nach MTX-Behandlung

In Kapitel 3.1 konnte gezeigt werden, dass es durch MTX-Behandlung möglich ist, die *FMR1*-Transkription in Fibroblasten von Patienten mit FXS zu reaktivieren. Da beim FXS eine Hypermethylierung der Promotorregion ursächlich für die Inhibierung der Gen-Transkription ist, wurde nun mittels Bisulfit-Sequenzierung untersucht, ob die Behandlung der Zellen zu einer Reduktion der Methylierung führt.

Die DNA wurde vor der Sequenzierung einer Behandlung mit Natriumbisulfit unterzogen. Hierdurch ist es möglich, in der anschließenden Sequenzanalyse 5-Methyl-Cytosin von nichtmethyliertem Cytosin zu unterscheiden und so den Methylierungsstatus der DNA zu beurteilen.





Abb. 13: Bisulfitsequenzierung zur Beurteilung des Methylierungsstatus der gDNA. a.) Die Abbildung zeigt die Schritte der Konvertierung von nicht-methyliertem Cytosin zu Uracil durch Natriumbisulfit. Die Reaktion beginnt mit einer Sulfonierung des Cytosin zu Cytosinsulfonat, aus dem anschließend nach hydrolytischer Deaminierung Uracilsulfonat entsteht. Dieses reagiert schließlich durch eine Alkali-Desulfonierung zu Uracil.

b.) Im Rahmen einer im Anschluss durchgeführten PCR wird Uracil dann als Thymin gelesen. In der Sequenzanalyse stellt sich das nicht-methylierte Cytosin schließlich als Thymin und das methylierte Cytosin (C_M) weiterhin als Cytosinbase dar.



Abb. 14: Versuchsablauf zur Methylierungsanalyse der Promotorregion des FMR1-Gens

Für die Analyse des Methylierungsstatus wurden die Fibroblasten identisch zu Kapitel 3.1 kultiviert und währenddessen für sieben Tage mit MTX bzw. 5-AzaD behandelt. Anschließend erfolgten die Präparation der genomischen DNA (2.2.2.8), eine Bisulfitbehandlung (2.2.2.9) sowie die Sequenzierung der *FMR1*-Promotorregion (2.2.2.7).

Die eingesetzten Oligonukleotide wurden hierbei so gewählt, wie sie bereits im Rahmen einer anderen Arbeit bei der Untersuchung des Einflusses von L-Carnitin auf den Methylierungsstatus des *FMR1*-Gens verwendet worden sind (Pascale et al. 2003). Sie umfassen einen Abschnitt des Gens, welcher 52 CpG-Inseln enthält und sich in der *FMR1*-Promotorregion befindet. Dies ist einer der Bereiche, an dem beim FXS die Hypermethylierung der DNA erfolgt.



Abb. 15: Wahl der Oligonukleotid-Primer zur Sequenzierung der *FMR1*-Promotorregion. Die Abbildung zeigt die Sequenz der *FMR1*-Promotorregion und die Position der Oligonukleotide, die für die PCR bzw. Sequenzierung verwendet wurden. In dieser sind 52 CpG-Inseln enthalten, welche in der Darstellung fett gedruckt sowie nummeriert sind. Die gerahmten Abschnitte zeigen Bindestellen von Transkriptionsfaktoren (Kumari und Usdin 2001, Pascale et al. 2003).

Zur Testung der Methode wurde zunächst eine Bisulfitsequenzierung von Patienten-Fibroblasten, welche mit 5-AzaD behandelt worden sind, durchgeführt. Bei der Behandlung von Leukozyten mit dieser Substanz konnte durch Chiurazzi et al. bereits eine Demethylierung der zuvor hypermethylierten Promotorregion im FMR-1 Gen nachgewiesen werden (Chiurazzi et al. 1998).



Abb. 16: Analyse des Methylierungsstatus der *FMR1*-Promotorregion nach Behandlung mit 5-AzaD. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Ausschnitt der Methylierungsanalyse der *FMR1*-Promotorregion von Patientenzellen, welche für 7 Tage mit 1µg 5-AzaD / ml Medium behandelt wurden sind. Die Nummerierung kennzeichnet die CpG-Inseln und stimmt mit derjenigen aus Abbildung 15 überein. An den mit Pfeil markierten Stellen zeigt sich in der Sequenzanalyse neben Methylcytosin, welches sich nach Bisulfitbehandlung als Cytosin darstellt, partiell auch unmethyliertes Cytosin, welches hier als Thymin gelesen wird (Brendel et al. 2013).

Es zeigte sich, dass im Bereich mancher CpG-Inseln der *FMR1*-Promotregion nach Behandlung mit 5-AzaD auch bei Fibroblasten eine partielle Demethylierung auftritt.

Es wurde nun der Methylierungsstatus von Fibroblasten, welche mit MTX behandelt wurden sind, mit unbehandelten und Wildtyp-Fibroblasten verglichen.



Abb. 17: Vergleich des Methylierungsstatus der *FMR1*-Promotorregion von mit MTX behandelten, unbehandelten sowie Wildtyp-Fibroblasten. Für die siebentägige Behandlung der Zellen wurden 2 µg MTX/ml Medium verwendet. Die Nummerierung kennzeichnet die CpG-Inseln und stimmt mit der aus Abbildung 15 überein. In der Sequenzanalyse der Wildtyp-Fibroblasten (WT) zeigt sich keine Methylierung der CpG-Inseln, d.h. die Base Cytosin stellt sich hier als Thymin (T) dar. Die unbehandelten (FXS unbeh.) sowie mit MTX (FXS MTX) behandelten Zellen weisen an dieser Stelle Methylcytosin auf, was sich in der Sequenzanalyse als Cytosin (C) darstellt. Die Basen Adenin (A), Guanin (G) und Thymin (T) bleiben nach Bisulfitsequenzierung unverändert.

Bei den Wild-Typ-Fibroblasten konnte, wie erwartet, keine DNA-Methylierung im untersuchten Abschnitt nachgewiesen werden. Bei den Patientenfibroblasten zeigte sich eine Methylierung der CpG-Inseln, wobei jedoch kein Unterschied im Methylierungsmuster der mit MTX behandelten sowie der unbehandelten Zellen nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 17).

4 Diskussion

Das Fragile-X-Syndrom (FXS) ist eine hereditäre Erkrankung, die durch die Expansion von CGG-*Repeats* im Exon 1 des *FMR1*-Gens verursacht wird. Durch die Expansion kommt es zu einer Hypermethylierung der DNA, die durch eine Inhibierung der Transkription zu einem Ausfall des *FMR1*-Genproduktes *FMRP* führt (Fu et al. 1991, Verkerk et al. 1991).

Es wird angenommen, dass eine gestörte Synaptogenese ursächlich für die mentale Retardierung und die Verhaltensauffälligkeiten beim FXS ist. Mit zunehmender Aufklärung der molekularen Pathologie hofft man, jetzt auch therapeutisch eingreifen zu können. Die größte Hoffnung ruht derzeit auf den Glutamatantagonisten, die in Tierversuchen die Symptomatik des FXS bessern konnten und die sich derzeit in der klinischen Testung befinden (Bhogal und Jongens 2010). Ansatzpunkt dieser Medikamente ist der neuronale Glutamatrezeptor, der bei Aktivierung die Proteinsynthese an der Synapse stimuliert. Die Verbindung zur Pathogenese des FXS besteht darin, dass *FMRP* die Translation von mRNA verhindert, indem es diese bindet und somit als negativer Regulator der Proteinsynthese fungiert. Durch die Abwesenheit von *FMRP* kommt es somit zu einer gesteigerten Proteinsynthese an der Synapse, welche zu morphologischen Veränderungen des Dendriten und so zur kognitiven Beeinträchtigung führt (Weiler et al. 1997). Die Hemmung des Glutamatrezeptors hat also einen ähnlichen Effekt auf die Proteinsynthese in der Synapse wie die Anwesenheit von *FMRP*. Glutamatantagonisten greifen in die Pathophysiologie des FXS ein, ohne direkt Einfluss auf das *FMRP* und seine Konzentration in der Zelle zu nehmen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein anderer Therapieansatz gewählt. Es wurde untersucht, ob es gelingt, durch eine Reduktion der DNA-Hypermethylierung das *FMR1*-Gen und somit die *FMRP*-Synthese zu reaktivieren. Es ist unbekannt, welche Menge an *FMRP* benötigt wird, um die Entstehung des FXS-Phänotyps zu verhindern oder die Symptomatik zu bessern. Allerdings existieren Mutationsträger, die immunhistochemisch eine deutliche Verminderung der *FMRP*-Konzentration aufweisen und trotzdem klinisch unauffällig sind (Smeets et al. 1995). Die Reaktivierung könnte also auch dann einen klinischen Effekt haben, wenn sie unvollständig ist.

Die Methylierung der DNA erfolgt durch eine enzymvermittelte Übertragung einer Methylgruppe auf die Base Cytosin. Als direkter Methylgruppendonator dient das S-Adenosyl Methionin (SAM), an dessen Synthese unter anderem Tetrahydrofolsäure (THF), die reduzierte Form der Folsäure, beteiligt ist. Ein Mangel an zellulärer THF führt zu einem Mangel an SAM, was wiederum die Methylierung der DNA verringert (Kremer 2004).

Es konnte bereits durch Chiurazzi et al. gezeigt werden, dass die Hemmung der DNA-Methylierung zu einer Reaktivierung des *FMR1*-Gens führt. Es wurden hierbei mit Hilfe der Substanz 5-Aza-2`Deoxycytidin (5-Azad) die DNA-Methyltransferasen (DNMT), welche die Methylierung von Cytosin zu 5-Methyl-Cytosin katalysieren, gehemmt (Chiurazzi et al. 1998). Im September 2012 erfolgte in der Europäischen Union die Zulassung dieser Substanz unter dem Namen Decitabin als Zytostatikum für die Therapie der akuten myeloischen Leukämie. Eine Behandlung von FXS-Patienten mit dieser Substanz ist allerdings auf Grund häufig auftretender, schwerwiegender unerwünschter Arzneimittelwirkungen (UAW) nicht praktikabel, zumal eine solche Behandlung bei FXS-Patienten lebenslang sein müsste. Ziel dieser Arbeit war es daher, eine Substanz zu finden, die wie 5-AzaD zu einer verminderten Methylierung führt, aber weniger Nebenwirkungen aufweist.

Wie oben bereits beschrieben, führt ein Mangel an THF, das als indirekter Methylgruppendonator dient, ebenfalls zu einer Reduktion der DNA-Methylierung. So konnte bereits unter folsäurearmer Diät beim Menschen eine Hypomethylierung der DNA nachgewiesen werden (Jacob et al. 1998, Rampersaud et al. 2000). In dieser Arbeit wurde der zelluläre Folsäuremangel durch das Medikament Methotrexat hervorgerufen, einen kompetitiven Hemmstoff der Dihydrofolsäure-Reduktase, der die Synthese von THF blockiert. Es wurde bereits gezeigt, dass eine Therapie mit dieser Substanz die DNA-Methylierung in Zellen negativ beeinflusst (Nesher et al. 1991, Kishi et al. 2000, Winter-Vann et al. 2003).

Für die maßgebliche Symptomatik des FXS sind pathologische Veränderungen in Neuronen des ZNS verantwortlich. Da *FMRP* jedoch ubiquitär exprimiert wird und beim FXS das *FMR1*-Gen in allen Geweben betroffen ist, wurden Fibroblasten von Patienten mit FXS für die Experimente verwendet (Devys et al. 1993). Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der Fibroblasten mit MTX zu einer Reaktivierung des *FMR1*-Transkripts führt. Der Grad der Reaktivierung korrelierte positiv mit der Dosis sowie der Behandlungsdauer (3.1). Als Positivkontrolle wurden die Fibroblasten mit 5-AzaD behandelt. Mit dieser Substanz konnte bereits bei Lymphoblasten eine Reaktivierung des Transkripts herbeigeführt werden

(Chiurazzi et al. 1998). Auch bei Behandlung der Fibroblasten zeigte sich hier ein positives Ergebnis (3.1).

Um den Methylierungsstatus des FMR1-Gens in behandelten Fibroblasten zu untersuchen, wurde mittels Bisulfitsequenzierung (3.3) ein Bereich der DNA analysiert, der 52 CpG-Inseln enthält und in welchem es beim Gesunden zur Bindung von Transkriptionsfaktoren kommt (Pascale et al. 2003). Die Anlagerung dieser Transkriptionsfaktoren an das DNA-Molekül wird beim FXS durch Methylierung der CpG-Inseln verhindert (Kumari und Usdin 2001, Pascale et al. 2003). Es konnte jedoch mittels Bisulfitsequenzierung kein signifikanter Unterschied zwischen dem Methylierungsstatus der unbehandelten sowie der mit MTX behandelten Fibroblasten nachgewiesen werden. Bei Analyse der Zellen, die mit 5-AzaD behandelt worden sind, zeigte sich dahingegen eine partielle Demethylierung der CpG-Inseln (3.3). Möglicherweise war die Anzahl der Zellen, in denen eine Demethylierung durch MTX-Behandlung stattgefunden hat, zu gering, um sie mittels Bisulfitanalyse nachzuweisen. Nicht auszuschließen ist aber auch, dass die Reaktivierung des Transkripts nach MTX-Behandlung auf Grund anderer Effekte entstanden ist, die die Substanz auf zellulärer Ebene auslöst. So beeinflusst MTX neben dem Homozystein- / Methioninstoffwechsel auch die Produktion der Purin- und Pyrimidinbasen und damit die Synthese von DNA und Proteinen sowie deren Methylierung (Kremer 2004).

Im Anschluss an die Detektion der *FMR1*-mRNA wurde der Nachweis des *FMR1*-Genproduktes *FMRP* in den behandelten Zellen angestrebt. Es gelang jedoch kein reproduzierbarer Nachweis dieses Proteins mittels Western Blot (3.2). Auch bei der Behandlung mit 5-AzaD konnte kein *FMRP* detektiert werden.

Für den fehlenden Nachweis von *FMRP* trotz Nachweis von *FMR1*-mRNA gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. Feng et al. postulierten schon 1995, dass es bei FXS-Fibroblasten auf Grund der Verlängerung des CGG-*Repeats* zu einer verringerten Translation auf Ebene der kleinen Ribosomenuntereinheit kommt (Feng et al. 1995). In einer anderen Arbeit wurde im Rahmen einer Vollmutation eine bis zu 40% verminderte Konzentration von *FMRP* nachgewiesen, obwohl im hier verwendeten Mausmodel keine Methylierung der CpG-Inseln aufgetreten ist (Brouwer et al. 2007). Möglicherweise resultiert also der fehlende Nachweis von *FMRP* in Fibroblasten nach MTX-Behandlung aus einer ineffektiven Translation. Sollte diese Hypothese zutreffen, wäre der Therapieansatz einer Reaktivierung des *FMR1*-Gens ohne eine gleichzeitige Reduzierung der CGG-*Repeats* wahrscheinlich nicht effektiv genug, um einen klinischen Effekt erwarten zu lassen.

Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass die Experimente das Potential des Therapieansatzes geringer erscheinen lassen als es eigentlich ist. So findet sich in Fibroblasten eine deutlich geringere Expression von *FMRP* verglichen mit Neuronen, den eigentlichen Zielzellen dieses Therapieansatzes (Devys et al. 1993). Eine MTX-Behandlung von FXS-Neuronen ist wahrscheinlich auf Grund dessen effektiver als die von Fibroblasten. Zusätzlich wurde beschrieben, dass es in Zellkulturexperimenten zu einer *De-Novo*-Methylierung von CpG-Inseln kommt, die mit der Anzahl der Zellzyklen zunimmt. Die Expression von Genen, deren Genprodukt unter den Kulturbedingungen nicht benötigt wird, unter anderem möglicherweise auch *FMR1*, wird so zunehmend effektiv unterdrückt (Wilson und Jones 1983, Jones et al. 1990). Tatsächlich fiel auch bei den Experimenten, die in dieser Arbeit vorgestellt werden auf, dass bei der Behandlung der Fibroblasten mit MTX die Reaktivierung des *FMR1*-Transkripts mit zunehmender Anzahl der Zellzyklen ineffizienter wurde.

Um die Möglichkeit einer MTX-Therapie bei FXS-Patienten nicht vorschnell aufzugeben, sollten daher weitere Experimente durchgeführt werden. Optimal wäre ein Therapieversuch im Mausmodell. Hier könnte nicht nur der Effekt auf Neurone analysiert werden, sondern auch, ob die Re-Expression von FMRP zu einer messbaren Veränderung im Verhalten führt. Unglücklicherweise kommt es jedoch in den bisher generierten Mausmodellen trotz großer Repeat-Anzahl nicht zu einer Methylierung (Brouwer et al. 2007). In allen derzeit bekannten Tiermodellen für das FXS ist das FMR1-Gen deletiert oder anderweitig defekt. Diese Tiermodelle sind daher ungeeignet für die Reaktivierung des FMR1-Gens. Eine heute noch sehr aufwendige, jedoch in Zukunft zunehmend verfügbarere Möglichkeit, ist die Untersuchung von Neuronen, die aus Stammzellen generiert wurden. In einer solchen Neuronenkultur könnte neben der Expression von FMRP unter MTX auch der Effekt auf die Synaptogenese untersucht werden. Eine weitere Möglichkeit, den Effekt von MTX bei FXS zu untersuchen, wären FXS-Patienten, die auf Grund einer Zweiterkrankung ohnehin dieses Medikament erhalten. Im Kindesalter wären dies insbesondere Patienten mit rheumatoiden Erkrankungen. Bei diesen Patienten bestände die Möglichkeit, die FMRP-Expression in Lymphozyten zu untersuchen.

Zusammenfassend betrachtet zeigen die Experimente dieser Arbeit, dass es zwar möglich ist, in Fibroblasten von FXS-Patienten *FMR1*-mRNA nach Behandlung mit MTX nachzuweisen, *FMRP* mit den gewählten Methoden aber nicht nachweisbar war. Es erscheint daher unwahrscheinlich, dass dieser Therapieansatz eine klinische Anwendung finden wird, zumal auf Grund der geringen Blut-Hirnschrankenpassage hohe Plasmaspiegel benötigt würden, um eine adäquate Konzentration von MTX im Liquor zu erreichen und daher mit schweren Nebenwirkungen der Therapie zu rechnen wäre (Lippens und Winograd 1988). Die weitere Forschung sollte sich daher darauf konzentrieren, andere Substanzen zu identifizieren, mit denen das *FMR1*-Gen reaktiviert werden kann. Diese sollten weniger toxisch und besser liquorgängig sein.

5 Zusammenfassung

Das Fragile-X-Syndrom (FSX) wird durch eine Expansion von CGG-Tripletts im 5' untranslatierten Bereich (UTR) des *Fragile X Mental Retardation 1*-Gens (*FMR1*) verursacht. Auf Grund dieser Expansion tritt in der *FMR1*-Promotorregion eine Hypermethylierung der DNA auf, welche eine Bindungshemmung der Transkriptionsfaktoren und somit eine Unterdrückung der Genexpression zur Folge hat. Das Gen codiert für ein Protein, *Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP)*, welches unter anderem eine Rolle in der Aufrechterhaltung der synaptischen Plastizität spielt. Die Abwesenheit von *FMRP* ist ursächlich für das klinische Erscheinungsbild der Betroffenen, die als Hauptsymptom kognitive Defizite aufweisen.

Im Rahmen einer früheren Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der Hypermethylierung der DNA in Lymphozyten durch den Methyltransferasehemmstoff 5-Aza-2`Deoxycytidin (5-AzaD) zu einer Reaktivierung der Genexpression und somit zu einer Re-Synthese von *FMRP* führt. Auf Grund der Toxizität stellt diese Substanz jedoch keine Therapieoption dar.

Es wurde nachgewiesen, dass ein Folsäuremangel ebenfalls eine Hypomethylierung der DNA zur Folge hat, da Tetrahydrofolsäure eine Rolle in der Synthese des Methylgruppendonators S-Adenosyl-Methionin (SAM) spielt. Methotrexat, eine Substanz die eine geringere Toxizität als 5-AzaD aufweist, führt über eine Synthesehemmung der zellulären Tetrahydrofolsäure auf diese Weise zu einer Hypomethylierung der DNA. Um herauszufinden, ob MTX eine Therapieoption darstellen könnte, wurden Fibroblasten von Patienten mit FXS kultiviert und währenddessen mit MTX behandelt. Hierbei trat eine dosisabhängige Reaktivierung der *FMR1*-Transkription auf. Mittels Western Blot konnte *FMRP* allerdings nicht reproduzierbar detektiert werden. Auch in der Untersuchung des Methylierungsstatus der *FMR1*-Promotorregion zeigte sich nach Behandlung keine Reduktion der Methylierung. Der fehlende Nachweis von *FMRP* in den behandelten Patientenzellen macht es unwahrscheinlich, dass MTX im Rahmen dieser Erkrankung klinische Anwendung finden wird, zumal auf Grund der geringen Liquorgängigkeit hohe Plasmaspiegel diese Substanz vonnöten wären.

6 Abkürzungsverzeichnis

5-AzaD	5-Aza-2`Deoxycytidin
A	Adenin
Ak	Antikörper
АТР	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
с	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary DNA
CREB	CRE-Bindeprotein
DAPI	4´,6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHF	Dihydrofolsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dTMP	Deoxy-Thymidin-Monophosphat

DTT	Dithiothreitol
dUMP	Deoxy-Uridin-Monophosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
etc.	et cetera
EtOH	Ethanol
FBS	fötales Rinderserum
FMR1	Fragile X Mental Retardation Gen 1
FMRP	Fragile X Mental Retardation Protein
FXRP	Fragile X Related Protein
FXS	Fragiles -X-Syndrom
FXTAS	Fragiles - X - assoziiertes Tremor-/Ataxiesyndrom
G	Guanin
g	Gramm
×g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GABA	Gammaaminobuttersäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
hnRNP	heteronukleäres Ribonukleinprotein
HRP	Horseradish Peroxidase
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
КОГ	Körperoberfläche
I	Liter
LTD	Long Term Depression
М	Molar, Mol/Liter

MAP1B	antimikrotubuläres Protein 1B
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
MMP 9	Matrix-Metallopeptidase 9
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
mRNP	messenger Ribonucleoprotein Particle
МТХ	Methotrexat
NES	nukleäres Exportsignal
NLS	nukleäres Lokalisierungssignal
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NP-40	Nonidet P-40
OD ₂₆₀	optische Dichte bei 260nm
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
рН	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
POI	Prämature Ovarialinsuffizienz
RGG	Arginin-Glycin-Glycin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	reverse Transkriptase
S	Svedbergeinheit
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SDS	Natrium lauryl sulfat/Natrium do de cylsulfat

т	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Таq	Thermophilus aquaticus
TEMED	Tetramethylethylendiamin
THF	Tetrahydrofolat
Tris	Tris (Hydroxymethyl) - aminoacetat
U	Enzymeinheit (Unit)
UAW	unerwünschte Arzneimittelwirkung
UV	ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp
XLMR	X-Chromosomale Mentale Retardierung
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
%	Prozent

7 Literaturverzeichnis

Allegra CJ, Chabner BA, Drake JC, Lutz R, Rodbard D , Jolivet J (1985): Enhanced inhibition of thymidylate synthase by methotrexate polyglutamates. J Biol Chem <u>260</u>, 9720-9726.

Ashley CT, Jr., Wilkinson KD, Reines D, Warren ST (1993): FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding. Science <u>262</u>, 563-566.

Bagni C, Tassone F, Neri G, Hagerman R (2012): Fragile X syndrome: causes, diagnosis, mechanisms, and therapeutics. J Clin Invest <u>122</u>, 4314-4322.

Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, Kouzarides T (2001): Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. Nature <u>410</u>, 120-124.

Barker GC (2002): Microsatellite DNA: a tool for population genetic analysis. Trans R Soc Trop Med Hyg <u>96 Suppl 1</u>, 21-24.

Bear MF, Huber KM, Warren ST (2004): The mGluR theory of fragile X mental retardation. Trends Neurosci <u>27</u>, 370-377.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L:Stryer Biochemie. 6.Auflage; Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2007, 770-771.

Berry-Kravis E, Potanos K (2004): Psychopharmacology in fragile X syndrome--present and future. Ment Retard Dev Disabil Res Rev <u>10</u>, 42-48.

Berry-Kravis E, Hessl D, Coffey S, Hervey C, Schneider A, Yuhas J, Hutchison J, Snape M, Tranfaglia M, Nguyen DV, Hagerman R (2009): A pilot open label, single dose trial of fenobam in adults with fragile X syndrome. J Med Genet <u>46</u>, 266-271.

Bhogal B, Jongens TA (2010): Fragile X syndrome and model organisms: identifying potential routes of therapeutic intervention. Dis Model Mech <u>3</u>, 693-700.

Bilousova TV, Dansie L, Ngo M, Aye J, Charles JR, Ethell DW, Ethell IM (2009): Minocycline promotes dendritic spine maturation and improves behavioural performance in the fragile X mouse model. J Med Genet <u>46</u>, 94-102.

Bird AP (1986): CpG-rich islands and the function of DNA methylation. Nature <u>321</u>, 209-213.

Brendel C, Mielke B, Hillebrand M, Gärtner J, Huppke P (2013): Methotrexat treatment of FraX fibroblasts results in FMR1 transcription but not in detectable FMR1 protein levels. J Neurodev Disord <u>5</u>, 23-29.

Brouwer JR, Mientjes EJ, Bakker CE, Nieuwenhuizen IM, Severijnen LA, Van der Linde HC, Nelson DL, Oostra BA, Willemsen R (2007): Elevated Fmr1 mRNA levels and reduced protein expression in a mouse model with an unmethylated Fragile X full mutation. Exp Cell Res <u>313</u>, 244-253.

Brouwer JR, Willemsen R, Oostra BA (2009): The FMR1 gene and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet <u>150B</u>, 782-798.

Brown V, Jin P, Ceman S, Darnell JC, O'Donnell WT, 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 <u>107</u>, 477-487.

Caiafa P, Zampieri M (2005): DNA methylation and chromatin structure: the puzzling CpG islands. J Cell Biochem <u>94</u>, 257-265.

Ceman S, O'Donnell WT, Reed M, Patton S, Pohl J, Warren ST (2003): Phosphorylation influences the translation state of FMRP-associated polyribosomes. Hum Mol Genet <u>12</u>, 3295-3305.

Chiurazzi P, Pomponi MG, Willemsen R, Oostra BA, Neri G (1998): In vitro reactivation of the FMR1 gene involved in fragile X syndrome. Hum Mol Genet <u>7</u>, 109-113.

Chudley AE, Hagerman RJ (1987): Fragile X syndrome. J Pediatr <u>110</u>, 821-831.

Clark SJ, Harrison J, Frommer M (1995): CpNpG methylation in mammalian cells. Nat Genet <u>10</u>, 20-27.

Coffee B, Zhang F, Warren ST, Reines D (1999): Acetylated histones are associated with FMR1 in normal but not fragile X-syndrome cells. Nat Genet <u>22</u>, 98-101.

Coffee B, Zhang F, Ceman S, Warren ST, Reines D (2002): Histone modifications depict an aberrantly heterochromatinized FMR1 gene in fragile x syndrome. Am J Hum Genet <u>71</u>, 923-932.

Comery TA, Harris JB, Willems PJ, Oostra BA, Irwin SA, Weiler IJ, Greenough WT (1997): Abnormal dendritic spines in fragile X knockout mice: maturation and pruning deficits. Proc Natl Acad Sci U S A <u>94</u>, 5401-5404.

Cornish K, Sudhalter V, Turk J (2004): Attention and language in fragile X. Ment Retard Dev Disabil Res Rev <u>10</u>, 11-16.

Cross SH, Meehan RR, Nan X, Bird A (1997): A component of the transcriptional repressor MeCP1 shares a motif with DNA methyltransferase and HRX proteins. Nat Genet <u>16</u>, 256-259.

D'Hulst C, Kooy RF (2007): The GABAA receptor: a novel target for treatment of fragile X? Trends Neurosci <u>30</u>, 425-431.

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 <u>107</u>, 489-499.

Darnell JC, Fraser CE, Mostovetsky O, Stefani G, Jones TA, Eddy SR, Darnell RB (2005): Kissing complex RNAs mediate interaction between the Fragile-X mental retardation protein KH2 domain and brain polyribosomes. Genes Dev <u>19</u>, 903-918.

De Boulle K, Verkerk AJ, Reyniers E, Vits L, Hendrickx J, Van Roy B, Van den Bos F, de Graaff E, Oostra BA, Willems PJ (1993): A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. Nat Genet <u>3</u>, 31-35.

de Vries BB, Fryns JP, Butler MG, Canziani F, Wesby-van Swaay E, van Hemel JO, Oostra BA, Halley DJ, Niermeijer MF (1993): Clinical and molecular studies in fragile X patients with a Prader-Willi-like phenotype. J Med Genet <u>30</u>, 761-766.

de Vrij FM, Levenga J, van der Linde HC, Koekkoek SK, De Zeeuw CI, Nelson DL, Oostra BA, Willemsen R (2008): Rescue of behavioral phenotype and neuronal protrusion morphology in Fmr1 KO mice. Neurobiol Dis <u>31</u>, 127-132.

Devys D, Lutz Y, Rouyer N, Bellocq JP, Mandel JL (1993): The FMR-1 protein is cytoplasmic, most abundant in neurons and appears normal in carriers of a fragile X premutation. Nat Genet <u>4</u>, 335-340.

Djerassi I (1967): Methotrexate infusions and intensive supportive care in the management of children with acute lymphocytic leukemia: follow-up report. Cancer Res <u>27</u>, 2561-2564.

Dolen G, Osterweil E, Rao BS, Smith GB, Auerbach BD, Chattarji S, Bear MF (2007): Correction of fragile X syndrome in mice. Neuron <u>56</u>, 955-962.

Dziembowska M, Pretto DI, Janusz A, Kaczmarek L, Leigh MJ, Gabriel N, Durbin-Johnson B, Hagerman RJ, Tassone F (2013): High MMP-9 activity levels in fragile X syndrome are lowered by minocycline. Am J Med Genet A <u>161A</u>, 1897-1903.

Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, Gehrke C (1982): Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. Nucleic Acids Res <u>10</u>, 2709-2721.

Eichler EE, Richards S, Gibbs RA, Nelson DL (1993): Fine structure of the human FMR1 gene. Hum Mol Genet <u>2</u>, 1147-1153.

Einfeld S, Hall W, Levy F (1991): Hyperactivity and the fragile X syndrome. J Abnorm Child Psychol <u>19</u>, 253-262.

Feng Y, Zhang F, Lokey LK, Chastain JL, Lakkis L, Eberhart D, Warren ST (1995): Translational suppression by trinucleotide repeat expansion at FMR1. Science <u>268</u>, 731-734.

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 <u>17</u>, 1539-1547.

Fisch GS, Simensen RJ, Schroer RJ (2002): Longitudinal changes in cognitive and adaptive behavior scores in children and adolescents with the fragile X mutation or autism. J Autism Dev Disord <u>32</u>, 107-114.

Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, Verkerk AJ, Holden JJ, Fenwick RG, Jr., Warren ST, et al. (1991): Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. Cell <u>67</u>, 1047-1058.

Gedeon AK, Baker E, Robinson H, Partington MW, Gross B, Manca A, Korn B, Poustka A, Yu S, Sutherland GR et al. (1992): Fragile X syndrome without CCG amplification has an FMR1 deletion. Nat Genet <u>1</u>, 341-344.

Hagerman PJ (2008): The fragile X prevalence paradox. J Med Genet <u>45</u>, 498-499.

Hagerman RJ, McBogg P, Hagerman PJ (1983): The fragile X syndrome: history, diagnosis, and treatment. J Dev Behav Pediatr <u>4</u>, 122-130.

Hagerman PJ, Greco CM, Hagerman RJ (2003): A cerebellar tremor/ataxia syndrome among fragile X premutation carriers. Cytogenet Genome Res <u>100</u>, 206-212.

Hammond LS, Macias MM, Tarleton JC, Shashidhar Pai G (1997): Fragile X syndrome and deletions in FMR1: new case and review of the literature. Am J Med Genet <u>72</u>, 430-434.

Harrison CJ, Jack EM, Allen TD, Harris R (1983): The fragile X: a scanning electron microscope study. J Med Genet <u>20</u>, 280-285.

Hessl D, Rivera SM, Reiss AL (2004): The neuroanatomy and neuroendocrinology of fragile X syndrome. Ment Retard Dev Disabil Res Rev <u>10</u>, 17-24.

Hinton VJ, Brown WT, Wisniewski K, Rudelli RD (1991): Analysis of neocortex in three males with the fragile X syndrome. Am J Med Genet <u>41</u>, 289-294.

Hou L, Antion MD, Hu D, Spencer CM, Paylor R, Klann E (2006): Dynamic translational and proteasomal regulation of fragile X mental retardation protein controls mGluR-dependent long-term depression. Neuron <u>51</u>, 441-454.

Howlett SK, Reik W (1991): Methylation levels of maternal and paternal genomes during preimplantation development. Development <u>113</u>, 119-127.

Huber KM, Gallagher SM, Warren ST, Bear MF (2002): Altered synaptic plasticity in a mouse model of fragile X mental retardation. Proc Natl Acad Sci U S A <u>99</u>, 7746-7750.

Huennekens FM, Vitols KS, Pope LE. Fan J (1992): Membrane transport of folate compounds. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) <u>Spec No</u>, 52-57.
Huffman DH, Wan SH, Azarnoff DL, Hogstraten B (1973): Pharmacokinetics of methotrexate. Clin Pharmacol Ther <u>14</u>, 572-579.

Jacob RA, Gretz DM, Taylor PC, James SJ, Pogribny IP, Miller BJ, Henning SM und Swendseid ME (1998): Moderate folate depletion increases plasma homocysteine and decreases lymphocyte DNA methylation in postmenopausal women. J Nutr <u>128</u>, 1204-1212.

Jin P, Warren ST (2003): New insights into fragile X syndrome: from molecules to neurobehaviors. Trends Biochem Sci <u>28</u>, 152-158.

Jones PA (2002): DNA methylation and cancer. Oncogene <u>21</u>, 5358-5360.

Jones PA, Wolkowicz MJ, Rideout WM, 3rd, Gonzales FA, Marziasz CM, Coetzee GA, Tapscott SJ (1990): De novo methylation of the MyoD1 CpG island during the establishment of immortal cell lines. Proc Natl Acad Sci U S A <u>87</u>, 6117-6121.

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 <u>19</u>, 187-191.

Kishi T, Tanaka Y, Ueda K (2000): Evidence for hypomethylation in two children with acute lymphoblastic leukemia and leukoencephalopathy. Cancer <u>89</u>, 925-931.

Kremer JM (2004): Toward a better understanding of methotrexate. Arthritis Rheum <u>50</u>, 1370-1382.

Kumari D, Usdin K (2001): Interaction of the transcription factors USF1, USF2, and alpha - Pal/Nrf-1 with the FMR1 promoter. Implications for Fragile X mental retardation syndrome. J Biol Chem <u>276</u>, 4357-4364.

Kumari D, Gabrielian A, Wheeler D, Usdin K (2005): The roles of Sp1, Sp3, USF1/USF2 and NRF-1 in the regulation and three-dimensional structure of the Fragile X mental retardation gene promoter. Biochem J <u>386</u>, 297-303.

Lachiewicz AM, Dawson DV (1994): Do young boys with fragile X syndrome have macroorchidism? Pediatrics <u>93</u>, 992-995.

Laggerbauer B, Ostareck D, Keidel EM, Ostareck-Lederer A, Fischer U (2001): Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. Hum Mol Genet <u>10</u>, 329-338.

Leigh MJ, Nguyen DV, Mu Y, Winarni TI, Schneider A, Chechi T, Polussa J, Doucet P, Tassone F, Rivera SM, Hessl D, Hagerman RJ (2013): A randomized double-blind, placebo-controlled trial of minocycline in children and adolescents with fragile x syndrome. J Dev Behav Pediatr <u>34</u>, 147-155.

Lippens RJ, Winograd B (1988): Methotrexate concentration levels in the cerebrospinal fluid during high-dose methotrexate infusions: an unreliable prediction. Pediatr Hematol Oncol <u>5</u>, 115-124.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods <u>25</u>, 402-408.

Loeffler G, Petrides P, Heinrich P; Biochemie und Pathobiochemie; hrsg. v. Loeffler G, Petrides P, Heinrich P; Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2007, 707-709

Loehr JP, Synhorst DP, Wolfe RR, Hagerman RJ (1986): Aortic root dilatation and mitral valve prolapse in the fragile X syndrome. Am J Med Genet <u>23</u>, 189-194.

Lugenbeel KA, Peier AM, Carson NL, Chudley AE, Nelson DL (1995): Intragenic loss of function mutations demonstrate the primary role of FMR1 in fragile X syndrome. Nat Genet <u>10</u>, 483-485.

Lyon MF (1961): Gene action in the X-chromosome of the mouse (Mus musculus L.). Nature <u>190</u>, 372-373.

Malter HE, Iber JC, Willemsen R, de Graaff E, Tarleton JC, Leisti J, Warren ST, Oostra BA (1997): Characterization of the full fragile X syndrome mutation in fetal gametes. Nat Genet <u>15</u>, 165-169.

Martin J, Bell J (1943): A pedigree of mental defect showing sex-linkage. Neurol. Neurosurg. Psychiatry <u>6</u>, 154-157.

Nan X, Tate P, Li E, Bird A (1996): DNA methylation specifies chromosomal localization of MeCP2. Mol Cell Biol <u>16</u>, 414-421.

Nemeroff (2003): The role of GABA in the pathophysiology and treatment of anxiety disorders. Psychopharmacological Bull <u>37</u>, 133-146.

Nesher G, Moore TL, Dorner RW (1991): In vitro effects of methotrexate on peripheral blood monocytes: modulation by folinic acid and S-adenosylmethionine. Ann Rheum Dis <u>50</u>, 637-641.

Nielsen KB, Tommerup N, Poulsen H, Mikkelsen M (1981): X-linked mental retardation with fragile X. A pedigree showing transmission by apparently unaffected males and partial expression in female carriers. Hum Genet <u>59</u>, 23-25.

Paribello C, Tao L, Folino A, Berry-Kravis E, Tranfaglia M, Ethell IM, Ethell DW (2010): Openlabel add-on treatment trial of minocycline in fragile X syndrome. BMC Neurol <u>10</u>, 91.

Pascale E, Battiloro E, Cimino Reale G, Pietrobono R, Pomponi MG, Chiurazzi P, Nicolai R, Calvani M, Neri G, D'Ambrosio E (2003): Modulation of methylation in the FMR1 promoter region after long term treatment with L-carnitine and acetyl-L-carnitine. J Med Genet <u>40</u>, e76.

Pieretti M, Zhang FP, Fu YH, Warren ST, Oostra BA, Caskey CT, Nelson DL (1991): Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. Cell <u>66</u>, 817-822.

Rampersaud GC, Kauwell GP, Hutson AD, Cerda JJ, Bailey LB (2000): Genomic DNA methylation decreases in response to moderate folate depletion in elderly women. Am J Clin Nutr <u>72</u>, 998-1003.

Reddy DS, Rogawski MA (2009): Neurosteroid replacement therapy for catamenial epilepsy. Neurotherapeutics <u>6</u>, 392-401.

Reiss AL, Freund L, Abrams MT, Boehm C, Kazazian H (1993): Neurobehavioral effects of the fragile X premutation in adult women: a controlled study. Am J Hum Genet <u>52</u>, 884-894.

Richards RI, Sutherland GR (1997): Dynamic mutation: possible mechanisms and significance in human disease. Trends Biochem Sci <u>22</u>, 432-436. Richardson B (2003): Impact of aging on DNA methylation. Ageing Res Rev <u>2</u>, 245-261. Riddle JE, Cheema A, Sobesky WE, Gardner SC, Taylor AK, Pennington BF, Hagerman RJ (1998): Phenotypic involvement in females with the FMR1 gene mutation. Am J Ment Retard <u>102</u>, 590-601.

Riggs AD, Xiong Z, Wang L, LeBon JM (1998): Methylation dynamics, epigenetic fidelity and X chromosome structure. Novartis Found Symp <u>214</u>, 214-225; discussion 225-232.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T in: Molecular cloning. A laboratory manual; hrsg.v. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989, 3.1.1, 3.1.13

Schwartz CE, Dean J, Howard-Peebles PN, Bugge M, Mikkelsen M, Tommerup N, Hull C, Hagerman R, Holden JJ, Stevenson RE (1994): Obstetrical and gynecological complications in fragile X carriers: a multicenter study. Am J Med Genet <u>51</u>, 400-402.

Siomi H, Siomi MC, Nussbaum RL, Dreyfuss G (1993): The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. Cell <u>74</u>, 291-298.

Smeets HJ, Smits AP, Verheij CE, Theelen JP, Willemsen R, van de Burgt I, Hoogeveen AT, Oosterwijk JC, Oostra BA (1995): Normal phenotype in two brothers with a full FMR1 mutation. Hum Mol Genet <u>4</u>, 2103-2108.

Sutherland GR (1977): Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. Science <u>197</u>, 265-266.

Sutherland GR (1979): Heritable fragile sites on human chromosomes I. Factors affecting expression in lymphocyte culture. Am J Hum Genet <u>31</u>, 125-135.

Tamanini F, Kirkpatrick LL, Schonkeren J, van Unen L, Bontekoe C, Bakker C, Nelson DL, Galjaard H, Oostra BA, Hoogeveen AT (2000): The fragile X-related proteins FXR1P and FXR2P contain a functional nucleolar-targeting signal equivalent to the HIV-1 regulatory proteins. Hum Mol Genet <u>9</u>, 1487-1493.

Tamaru H, Selker EU (2001): A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in Neurospora crassa. Nature <u>414</u>, 277-283.

Tate PH, Bird AP (1993): Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. Curr Opin Genet Dev <u>3</u>, 226-231.

Turner G, Daniel A, Frost M (1980): X-linked mental retardation, macro-orchidism, and the Xq27 fragile site. J Pediatr <u>96</u>, 837-841.

Utari A, Chonchaiya W, Rivera SM, Schneider A, Hagerman RJ, Faradz SM, Ethell IM, Nguyen DV (2010): Side effects of minocycline treatment in patients with fragile X syndrome and exploration of outcome measures. Am J Intellect Dev Disabil <u>115</u>, 433-443.

Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang FP et al. (1991): Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. Cell <u>65</u>, 905-914.

Weiler IJ, Irwin SA, Klintsova AY, Spencer CM, Brazelton AD, Miyashiro K, Comery TA, Patel B, Eberwine J, Greenough WT (1997): Fragile X mental retardation protein is translated near synapses in response to neurotransmitter activation. Proc Natl Acad Sci U S A <u>94</u>, 5395-5400.

Willemsen R, Oosterwijk JC, Los FJ, Galjaard H, Oostra BA (1996): Prenatal diagnosis of fragile X syndrome. Lancet <u>348</u>, 967-968.

Wilson VL, Jones PA (1983): DNA methylation decreases in aging but not in immortal cells. Science <u>220</u>, 1055-1057.

Winter-Vann AM, Kamen BA, Bergo MO, Young SG, Melnyk S, James SJ, Casey PJ (2003): Targeting Ras signaling through inhibition of carboxyl methylation: an unexpected property of methotrexate. Proc Natl Acad Sci U S A <u>100</u>, 6529-6534.

Wolffe AP, Pruss D (1996): Hanging on to histones. Chromatin. Curr Biol <u>6</u>, 234-237.

Yan QJ, Asafo-Adjei PK, Arnold HM, Brown RE, Bauchwitz RP (2004): A phenotypic and molecular characterization of the fmr1-tm1Cgr fragile X mouse. Genes Brain Behav <u>3</u>, 337-359.

Yoder JA, Bestor TH (1998): A candidate mammalian DNA methyltransferase related to pmt1p of fission yeast. Hum Mol Genet <u>7</u>, 279-284.

Zhang Y, O'Connor JP, Siomi MC, Srinivasan S, Dutra A, Nussbaum RL, Dreyfuss G (1995): The fragile X mental retardation syndrome protein interacts with novel homologs FXR1 and FXR2. Embo J <u>14</u>, 5358-5366.

Lebenslauf

Am 29.03.1983 wurde ich in Hannover als Sohn von Ursula Hindersmann und Klaus-Günter Mielke geboren. In den Jahren 1989 bis 1994 besuchte ich die Grundschule und in den Jahren 1994 bis 1997 die Orientierungsstufe der Hellwinkelschule in Wolfsburg. Im Anschluss wechselte ich auf das Theodor-Heuss-Gymnasium in Wolfsburg und 1998, auf Grund eines Umzuges meiner Eltern, auf das Gymnasium Hankensbüttel, wo ich im Juni 2002 die Abiturprüfung erfolgreich ablegte.

Meinen Zivildienst leistete ich direkt im Anschluss beim Rettungsdienst des Deutschen Roten Kreuzes in Uelzen ab. In diesem Rahmen wurde ich zum Rettungssanitäter ausgebildet.

Bis zum Beginn meines Medizinstudiums im Oktober 2004 an der TU Dresden war ich hier als hauptamtlicher Mitarbeiter beschäftigt. Nachdem ich im September 2006 den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung bestanden hatte, wechselte ich an die Georg-August-Universität Göttingen. Im Rahmen meines Studiums arbeitete ich als studentische Hilfskraft im Zentrum für Anatomie und weiterhin als Rettungssanitäter beim Deutschen Roten Kreuz in Uelzen. Darüber hinaus bin ich seit Mai 2009 als Doktorand in der Arbeitsgemeinschaft von Prof. Dr. Peter Huppke in der Abteilung Neuropädiatrie der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universitätsmedizin Göttingen beschäftigt.

Am 11.5.2011 bestand ich den 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung. Am 1. August 2011 begann ich die Ausbildung zum Facharzt für Anästhesie am Zentrum Anästhesiologie, Rettungs- und Intensivmedizin der Universität Göttingen.