

**Identifizierung und Charakterisierung des
Poly(A)-Bindungsproteins aus *Rattus Norvegicus*
(Berkenhout, 1769) als *trans*-agierender Faktor der dendritisch
lokalisierten Vasopressin mRNA**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg**

vorgelegt von

**Carola Mullin
aus Hamburg**

**Hamburg
2004**

Inhaltsverzeichnis

ii. <u>Abkürzungen</u>	4
iii. <u>Zusammenfassung</u>	6
1. <u>Einleitung</u>	7
2. <u>Materialien</u>	18
2.1. Längenstandard.....	18
2.2. Enzyme.....	18
2.3. Bakterienstämme.....	19
2.4. Eukaryotische Zelllinien und Gewebe.....	19
2.5. Genbank Accession-Nummern.....	20
2.6. Kompetitor cRNA.....	20
2.7. Oligonukleotide.....	21
2.8. Plasmide.....	23
2.9. Antikörper.....	29
2.10. Produkte für die Zellkultur.....	30
2.11. Fertigsysteme.....	31
2.12. Sonstiges.....	31
2.13. Geräte.....	32
2.14. Herstellernachweis.....	34
3. <u>Methoden</u>	37
3.1. DNA	
3.1.1. DNA-Isolierung.....	37
3.1.2. Restriktion von DNA.....	37
3.1.3. DNA-Gelelektrophorese.....	37
3.1.4. Isolierung von cDNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	37
3.1.5. Ligation von DNA-Fragmenten.....	38
3.1.6. Transformation von Bakterien.....	38
3.1.7. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	38
3.1.8. DNA-Sequenzierung.....	39
3.1.9. Radioaktive Markierung von cDNA-Fragmenten.....	39
3.2. RNA	
3.2.1. RNA-Isolierung aus HEK-Tet-On Zellen.....	40
3.2.2. Nicht-denaturierende RNA-Gelelektrophorese.....	40
3.2.3. Denaturierende RNA-Gelelektrophorese.....	40
3.2.4. Northern-Blot-Analyse.....	41
3.2.5. Herstellung radioaktiv markierter cRNA-Sonden.....	42
3.2.6. Herstellung von Biotin-markierter cRNA.....	44
3.2.7. Herstellung von cRNA für Kompetitionsanalysen.....	44

3.3. Protein	
3.3.1.	Herstellung von S-100 Fraktionen aus Geweben..... 45
3.3.2.	Herstellung von S-100 Fraktionen aus eukaryotischen Zelllinien..... 45
3.3.3.	Bestimmung der Protein-Konzentration..... 45
3.3.4.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)..... 46
3.3.5.	Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen..... 46
3.3.6.	Immunologische Detektion von Proteinen auf Nitrocellulose-Membran (Western- Blot)..... 46
3.3.7.	Gekoppelte <i>in vitro</i> Transkription und Translation..... 47
3.3.8.	Depletion von rPABP aus der S-100 Fraktion eines Homogenates aus Rattenhirn..... 47
3.3.9.	Immunpräzipitation von rPABP-Vasopressin-cRNA-Komplexen..... 48
3.3.10.	Immunpräzipitation von Protein-cRNA-Komplexen..... 49
3.3.11.	Deglykosylierung von Proteinen mit N-Glycosidase F*..... 50
3.4. Zellkultur: Molekularbiologische und biochemische Methoden	
3.4.1.	Kultivierung von HEK 293-Zellen (<i>Human Embryonic Kidney Cells</i>)..... 51
3.4.2.	Kultivierung von PC12-Zellen..... 51
3.4.3.	Kultivierung von Rat I und NIH 3T3-Zellen..... 51
3.4.4.	Kultivierung von HEK 293-Tet On-Zellen..... 51
3.4.5.	Transfektion von HEK 293-Zellen mit <i>Poly-Fect</i> (Qiagen)..... 52
3.4.6.	Herstellung von Proteinextrakten aus transfizierten HEK 293-Zellen..... 52
3.4.7.	Fixierung von HEK 293-Zellen auf Deckgläschen für immuncytochemische Analysen..... 53
3.4.8.	Immuncytochemische Analysen..... 53
3.5. Biochemische Reinigung des Vasopressin-mRNA-Bindungsproteins (VP-RBP)	
3.5.1.	Herstellung einer S-90 Fraktion aus Homogenaten des Rattenhirns..... 54
3.5.2.	Ausfällen von Proteinen mit Ammoniumsulfat..... 54
3.5.3.	Entsalzen von Proteinlösungen..... 54
3.5.4.	Heparinsäulenchromatographie..... 55
3.5.5.	Affinitätschromatographie..... 55
3.5.6.	Präparative SDS-Gelelektrophorese..... 56
3.5.7.	Sequenzierung des VP-RBP..... 57
3.6. Methoden zur Untersuchung von RNA-Protein Wechselwirkungen	
3.6.1.	UV-Quervernetzungsanalysen..... 57
3.6.2.	Poly(A)-Sepharose-Protein Bindungsstudien..... 58
3.6.3.	RNA-Protein Bindungsstudien durch Affinitätschromatographie..... 61
3.6.4.	Transiente Ko-Expression des rPABP und der Vasopressin mRNA in HEK 293-Zellen unter Verwendung des Tet-ON™-Systems..... 61

4. Ergebnisse	63
4.1. Charakterisierung von <i>trans</i>-agierenden Faktoren als Bindungspartner der VP mRNA	63
4.1.1. Identifizierung eines VP mRNA bindenden Proteins	65
4.1.2. VP-RBP bindet in spezifischer Weise an VP mRNA	68
4.2. Biochemische Reinigung des VP-RBP durch Affinitätschromatographie	69
4.2.1. Anreicherung des VP-RBP	71
4.2.2. Spezifische Reinigung des VP-RBP durch Affinitätschromatographie	75
4.2.3. Sequenzierung des VP-RBP	78
4.2.4. VP-RBP ist das Poly(A)-Bindungsprotein der Ratte (rPABP)	80
4.3. Charakterisierung der Interaktion des rPABP mit der VP mRNA	81
4.3.1. rPABP bildet mit Vasopressin-cRNA einen Komplex aus	81
4.3.2. Die Interaktion des rPABP mit der VP mRNA erfolgt über die Domänen 3+4	84
4.3.3. Die RNA-Bindungsdomänen RRM 3 und RRM 4 des rPABP binden einzeln nicht an VP-cRNA	89
4.3.4. Die Proteine PABP RRM 1+2 und PABP 3+4 binden an Poly(A)-Ribohomopolymere	92
4.3.5. Interaktion des mittels <i>in vitro</i> Translation hergestellten Proteins rPABP und seiner Deletionsmutanten RRM 1+2, RRM 2+3, RRM 3+4 mit Poly(A)-Sequenzen	94
4.3.6. Die Interaktion mit VP mRNA erfordert das gesamte rPABP	97
4.3.7. Charakterisierung der Funktion des rPABP im VP mRNA-Metabolismus	100
5. Diskussion	109
6. Literaturverzeichnis	122
Anhang	129

Wertetabellen zu den graphischen Darstellungen in Abschnitt 4 (Ergebnisse)

Abkürzungen

<i>arc</i>	<i>activity-regulated cytoskeleton-associated protein</i>
ARE	<u>A</u> U-reiches <u>E</u> lement
<i>arg3.1</i>	<i>activity regulated gene 3.1</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BDNF	<i><u>b</u>rain-<u>d</u>erived <u>n</u>eurotrophic <u>f</u>actor</i>
bp	Basenpaare
BRE	<i>Bruno-response element</i>
BSA	Rinderserum-Albumin (<i><u>b</u>ovine <u>s</u>erum <u>a</u>lbumin</i>)
α -CaMKII	Ca ²⁺ / Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II
CAP	7-Methylguanosinium-Kappe
CARM1	Koaktivator-assoziierte Arginin-Methyltransferase 1 (<i><u>c</u>oactivator-<u>a</u>ssociated <u>a</u>rginine <u>m</u>ethyltransferase</i>)
cDNA	Komplementäre DNA
Ci	Curie
CMV	Cytomegalie-Virus (<i><u>c</u>ytomegalovirus</i>)
cpm	Radioaktive Zerfälle pro Minute
cRNA	komplementäre RNA
CPE	cytoplasmatisches Polyadenylierungs-Element (<i><u>c</u>ytoplasmic <u>p</u>olyadenylation <u>e</u>lement</i>)
CPEB	CPE-Bindungsprotein
CRE	<i><u>c</u>ytosin-<u>r</u>ich <u>e</u>lement</i>
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
°C	Grad Celsius
DLS	<u>D</u> endritische <u>L</u> okalisierungssequenz
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTE	<i><u>d</u>endritic <u>t</u>argeting <u>e</u>lement</i>
EGFP	<i><u>e</u>nhanced <u>g</u>reen <u>f</u>luorescent <u>p</u>rotein</i>
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
eRF3	<i><u>e</u>karyotic <u>c</u>hain <u>r</u>eleasing <u>f</u>actor <u>3</u></i>)
ErEN	<i><u>e</u>rythroid cell-enriched <u>e</u>ndoribonuclease</i>
g	Gramm
α -GlyR	α -Untereinheit des Glycin-Rezeptors
GM-CSF	<i><u>g</u>ranulocyte <u>m</u>acrophage-<u>c</u>olony <u>s</u>timulating <u>f</u>actor</i>
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunden
hPAN2	<i><u>h</u>uman <u>P</u>ABP-dependent poly(A) <u>n</u>uclease <u>2</u></i>
ICC	Immuncytochemie
InsP3r 1	Inositol-1,4,5-Triphosphat-Rezeptor Typ 1

Gag	Gruppen-spezifisches Antigen
GSPT	GTP-Bindungsprotein
HIV-Typ1	<i>human immunodeficiency virus type 1</i>
INS-1 Element	<i>inhibitory/instability element 1</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilo Dalton
KH	<i>hnRNP K-homology</i>
KSRP	<i>human K homology-type splicing regulatory protein</i>
MAP2	Mikrotubulus-assoziierte Protein 2
MARTA1 und MARTA2	<i>MAP2-RNA trans-acting proteins</i>
mCRD	<i>major protein-coding-region determinant of instability</i>
min	Minuten
mM	Millimolar (1 mmol/l)
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
NMDA	<u>N</u> -Methyl- <u>D</u> - <u>A</u> sparat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
NTP	Ribonukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
PABP	<u>P</u> oly(<u>A</u>)- <u>B</u> indung <u>p</u> rotein
rPABP	Poly(A)-Bindungsprotein der Ratte
PAIP1 und 2	<i>PABP-interacting protein 1 and 2</i>
PAM1 und 2	<i>PABP-interacting motifs 1 and 2</i>
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCBP	Poly(C)-Bindungsprotein
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	<u>R</u> ibonukleoprotein
RRM	RNA-Erkennungssequenz (<i>RNA Recognition Motif</i>)
TCA	Trichloressigsäure
tRNA	transfer-RNA
UTP	Uridin-5'-triphosphat
3'-UTR	3'-untranslatierten Region
UV	Ultraviolett
VgRBP71	Vg1-mRNA-Bindungsprotein 71
VP	Vasopressin
VP-RBP	Vasopressin-mRNA-Bindungsprotein
v/v	Volumenanteil pro Volumen
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen (entspr. 1 g/100 ml)
<i>Xlsirt</i>	<i>Xenopus laevis short interspersed repeat transcripts</i>
ZBP1 und 2	<i>zipcode</i> -Bindungsprotein 1 und 2
ZNS	Zentralnervensystem

Zusammenfassung

Die Lokalisierung von mRNAs in definierte subzelluläre Kompartimente wird in Nervenzellen und in zahlreichen nicht-neuronalen Zellsystemen beobachtet. Der gerichtete RNA-Transport, verbunden mit lokaler Translation der Transkripte, ermöglicht die Ausbildung und den Erhalt der polaren Natur von Zellen. Er wird durch Sequenzen innerhalb der transportierten RNA, sogenannte *cis*-agierende Elemente, bestimmt. Diese treten in Wechselwirkungen mit Proteinen, *trans*-agierenden Faktoren genannt, unter Ausbildung von transportkompetenten Ribonukleoprotein-Komplexen.

Die mRNA für das Vasopressin (VP) Vorläuferprotein gehört zu einer Gruppe von Transkripten, die *in vivo*, in magnozellulären Neuronen des Hypothalamus der Ratte, in das Axon und in die Dendriten transportiert werden. In dieser Arbeit wurde ein Protein biochemisch gereinigt, identifiziert und charakterisiert, welches spezifisch an die dendritische Lokalisierungssequenz der VP mRNA (VP-DLS), das *cis*-agierende Element, das den dendritischen Transport in Neuronen vermittelt, bindet. Das Protein wurde als das multifunktionelle Poly(A)-Bindungsprotein der Ratte (rPABP) identifiziert. Das in der Evolution konservierte PABP beinhaltet N-terminal 4 RNA-Bindungsdomänen (RRM, *RNA recognition motif*) sowie einen C-Terminus, der an zahlreichen Protein/Protein-Wechselwirkungen beteiligt ist. PABP bindet mit hoher Affinität an den Poly(A)-Schwanz eukaryotischer mRNAs und fördert durch seine Interaktion mit Initiationsfaktoren am 5'-Ende des Transkriptes die Initiation der Translation. Zudem vermag es an nicht-Poly(A)-Sequenzen zu binden. Diese Interaktionen resultieren in unterschiedlichen Funktionen wie positive und negative Translationskontrolle sowie Stabilisierung/Destabilisierung definierter mRNAs. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass rPABP über seine Domänen RRM 3+4 an die VP-DLS, welche keine längeren Adenin-reichen Abschnitte aufweist, bindet. Für die spezifische Protein/RNA-Interaktion ist jedoch das gesamte PABP erforderlich. Vermutlich wird seine Bindungsspezifität an die VP-DLS durch weitere Proteine moduliert, deren Interaktionsabschnitte der Deletionsmutante RRM 3+4 fehlen. Für diese Annahme spricht auch die Tatsache, dass gereinigtes rPABP nur ineffizient an die VP-DLS bindet.

In dieser Arbeit wurden zudem erste Experimente durchgeführt, um die Funktion des rPABP im Metabolismus der VP mRNA zu analysieren. Die Expression des VP-Vorläuferproteins bei gleichzeitiger Überexpression des PABP in HEK 293-Zellen zeigte eine Reduktion der Konzentrationen des Vorläuferproteins und der VP mRNA. Dies Ergebnis weist auf einen möglichen Einfluss des PABP auf die Stabilität der VP mRNA hin.

1. Einleitung

Vasopressin (VP) gehört zu einer großen Familie von Peptidhormonen, die sowohl in Wirbellosen als auch in Wirbeltieren gefunden werden (Übersicht: Mohr *et al.*, 1990). Die Synthese erfolgt in Form eines Polyprotein-Vorläuferproteins. Bei Säugern besteht es aus einem ko-translational abgespaltenen Signalpeptid, dem Hormonanteil, einem Trägerprotein Neurophysin II sowie einem Glykopeptid, dessen Funktion unbekannt ist. Der VP-Vorläufer wird in neurosekretorischen Vesikeln an die Zellmembran transportiert. Während des Transportes erfolgt eine posttranslationale Prozessierung, bei der der VP-Vorläufer proteolytisch in seine Bestandteile gespalten wird (Abb. 1.) (Sofroniew, 1983, Richter, 1987).

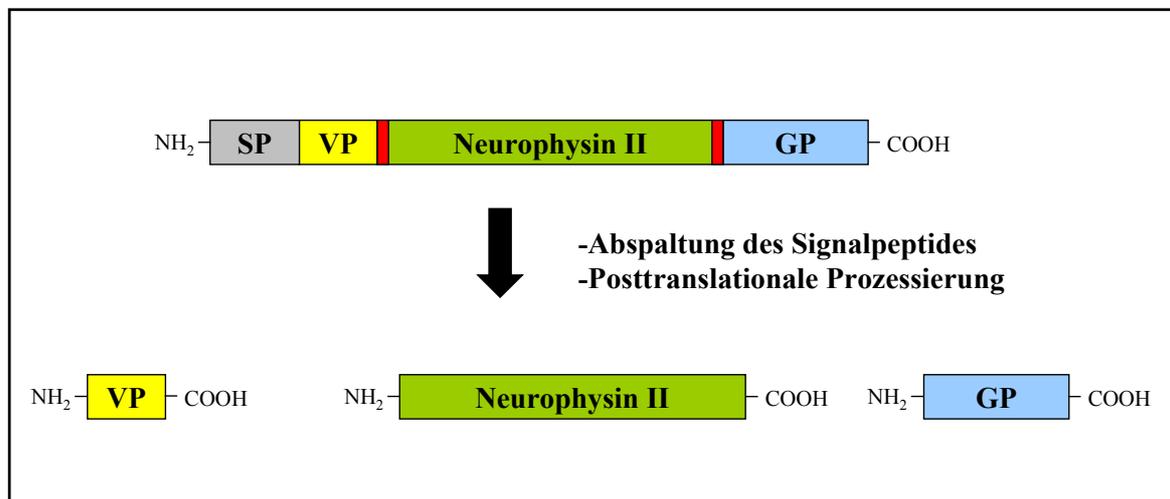


Abb. 1.: Schematische Darstellung des Vasopressin-Polyproteinvorläufers sowie dessen posttranslationelle Prozessierung: Das VP-Prä-Prohormon setzt sich zusammen aus einem Signalpeptid am N-Terminus gefolgt vom Peptidhormon Vasopressin (VP), sowie dem Trägerprotein Neurophysin II im mittleren Bereich und einem Glykopeptid (GP) mit unbekannter Funktion am C-Terminus. Der VP-Vorläufer wird in magnozellulären Neuronen des Hypothalamus synthetisiert. Nach der Synthese wird das Protein in neurosekretorische Vesikel verpackt und axonal zu den Nervenendigungen in der Neurohypophyse transportiert. Während des Transportes erfolgt die proteolytische Spaltung an spezifischen Aminosäureresten (rot gekennzeichnet). Das prozessierte VP wird von den Nervenendigungen in den Körperkreislauf abgegeben. Zudem erfolgt eine Freisetzung aus den Dendriten in das Zentrale Nervensystem (Morris *et al.*, 1993)

Das VP-Gen wird im Zentralnervensystem (ZNS) exprimiert, hauptsächlich in magno- und parvozellulären Neuronen der supraoptischen, paraventriculären und suprachiasmatischen Kerngebiete des Hypothalamus. Die parvozellulären Neurone der paraventriculären

Kerngebiete sind Bestandteil des hypothalamisch-adenohypophysären-adrenalen Systems (Alonso und Assenmacher, 1981), während die magnozellulären Neurone der paraventriculären und supraoptischen Kerngebiete das hypothalamisch-neurohypophysäre System bilden (Hatton, 1990). Nach bestimmten physiologischen Reizen wird VP an den Axonendigungen in der Neurohypophyse in den Körperkreislauf sezerniert (Richter, 1987). In peripheren Geweben entfaltet es seine verschiedenen endokrinen Funktionen. VP stimuliert als antidiuretisches Hormon die Rückresorption von Wasser in den distalen Tubuli der Niere. Außerdem wirkt das Hormon stimulierend auf die Glykogenolyse in der Leber. Der systemische Blutdruck kann durch Kontraktion der arteriellen Gefäßmuskulatur, die durch das VP ausgelöst wird, erhöht werden (Mohr und Richter, 1994; Birnbaumer, 2000). Zudem wird VP auch im Septum und im Hypothalamus des ZNS freigesetzt. Im Hypothalamus der Ratte freigesetztes VP reguliert das hypothalamisch-neurohypophysäre System, welches das Verhalten nach einem Streßstimulus reguliert. Im Septum freigesetztes VP beeinflusst Angstbezogenes Verhalten sowie Lernen und Gedächtnis (Engelmann *et al.*, 2000). VP wirkt im ZNS als Neuromodulator/Neurotransmitter. In dieser parakrinen Funktion ist es an der Ausbildung von Gehirnfunktionen wie Lernen und Gedächtnis sowie Emotionalität beteiligt (Engelmann *et al.*, 1996; Wotjak *et al.*, 1996). Aus den Dendriten magnozellulärer Neurone wird VP intrazerebral exozytiert (Morris *et al.*, 1993). Das dendritisch exozytierte VP ist an der prä- als auch an der postsynaptischen Regulation der Sekretionsrate von VP-Neuronen in den supraoptischen und paraventriculären Kerngebieten des Hypothalamus beteiligt (Übersicht: Ludwig *et al.*, 1998).

Die VP mRNA ist nicht auf den Zellkörper beschränkt, sondern ist sowohl in den Axonen als auch in den proximalen und distalen Abschnitten der Dendriten magnozellulärer Neurone lokalisiert (Mohr *et al.*, 1995; Prakash *et al.*, 1997). Die axonalen VP-Transkripte weisen im Gegensatz zu den somatisch und dendritisch lokalisierten VP-Transkripten kürzere Poly(A)-Schwänze auf (Mohr *et al.*, 1991; Mohr *et al.*, 1995). Es ist gezeigt worden, dass die VP-mRNA in Axonen nicht translatiert wird. Die Funktion der axonalen VP-Transkripte ist daher unbekannt (Mohr *et al.*, 1995). Die dendritischen VP-Transkripte wurden in solchen Bereichen des Dendriten gefunden, die kleine Zisternen, ähnlich dem rauhen endoplasmatischen Reticulum, sowie Polyribosomen und neurosekretorische Granula enthalten (Yulis *et al.*, 1984; Prakash *et al.*, 1997). Die Dendriten magnozellulärer Neurone beinhalten alle Komponenten der Proteinbiosynthese-Maschinerie (Ma & Morris, 2002). Daher wird vermutet, dass die VP-Transkripte nach ihrer Lokalisierung in die Dendriten lokal translatiert werden (Mohr *et al.*, 1995). Die Mechanismen, die zu einer Lokalisierung der VP-

Transkripte führen, sind bisher unbekannt, jedoch wird angenommen, dass für die axonale und dendritische Lokalisierung zwei unterschiedliche Transportmechanismen existieren (Mohr & Richter 2003).

Der gerichtete Transport von definierten mRNA-Spezies gehört generell zu den Mechanismen, die es einer polarisierten Zelle ermöglichen Makromoleküle asymmetrisch zu verteilen. Der Mechanismus der mRNA-Lokalisierung ist in Eukaryoten, von der Hefe bis zum Säugetier, weit verbreitet (Übersichtsartikel: Bashirulla *et al.*, 1998; Mohr & Richter, 2001). Beim Ablauf entwicklungsbiologischer Vorgänge bei verschiedenen Arten, wie z.B. in *Drosophila*, *Xenopus laevis*, *Brachydanio rerio*, *ascidia* und *Saccharomyces cerevisiae* ist die mRNA-Lokalisierung für eine korrekte Entwicklung essentiell (Übersicht: Bashirulla *et al.*, 1998; Beach *et al.*, 1999; King *et al.*, 1999; Lasko, 1999; Mowry & Cote, 1999). Die asymmetrische Verteilung von mRNAs innerhalb der Oocyte von komplexen Organismen bildet die Voraussetzung für die Ausbildung von Entwicklungsmustern, die zur Festlegung der Körperachsen des Embryos notwendig sind. Zum Beispiel wird während der *Drosophila*-Entwicklung durch das anteriore System die Anlage des Kopfes und des Thorax festgelegt. Dieses Entwicklungsmuster entsteht durch den gerichteten Transport der *bicoid*-mRNA, die in den Nährzellen synthetisiert wird, zum anterioren Pol der Oocyte (St. Johnston & Nüsslein-Vollhard, 1992). Neben der *bicoid*-mRNA werden in der *Drosophila*-Oocyte andere maternale mRNAs, wie z.B. *nanos*- und *oskar*-mRNA, zielgerichtet transportiert und lokal translatiert. Diese beiden mRNAs spielen eine Rolle bei der Entwicklung des posterioren Systems (Berleth *et al.*, 1988; Ephrussi *et al.*, 1991; Johnstone & Lasko, 2001). Die *Vg1*-mRNA aus *Xenopus laevis* wird während der Entwicklung der Oocyte zum vegetativen Pol lokalisiert (Mowry & Cote, 1999). Das lokal translatierte Protein ist sowohl an der Entwicklung des Entoderms als auch an der Induktion des Mesoderms beteiligt (Weeks & Melton, 1987; Thomsen & Melton, 1993; Joseph & Melton 1998). Neben der mRNA-Lokalisation während der Entwicklung zeigt sich seit kurzem, dass in ausdifferenzierten somatischen Zellen, wie z.B. Epithelzellen, Fibroblasten, Oligodendrocyten und Neuronen, ebenfalls zielgerichteter mRNA-Transport in einzelne Kompartimente der Zelle stattfindet (Singer, 1996; Steward, 1997; Carson *et al.*, 1998; Kuhl *et al.*, 1998; Bassell *et al.*, 1999; Mohr, 1999). Zudem wurde der gerichtete Transport von nicht-kodierenden Transkripten, wie z.B. der *Xlsirt* (*Xenopus laevis* *short interspersed repeat transcripts*)-RNA aus *Xenopus laevis* beobachtet. Es wird vermutet, dass *Xlsirt*-RNA eine Rolle spielt bei der Verankerung von lokalisierten mRNAs am Zielort innerhalb der Oocyte (Kloc *et al.*, 1994). In Neuronen werden ebenfalls nicht-kodierende Transkripte, wie z.B. die BC1-RNA aus der Ratte, oder die

zu BC1-RNA homologe humane BC200-RNA, lokalisiert (Tiedge *et al.*, 1993a; Tiedge *et al.*, 1993b). Die Funktion dieser RNAs ist bisher nicht hinreichend geklärt, jedoch wird eine Beteiligung der BC1-RNA an der Regulation der Initiation der Translation dendritisch lokalisierter mRNAs vermutet (Wang *et al.*, 2002). Neurone besitzen eine ausgeprägte Polarität. So bestehen ausdifferenzierte Neurone aus einem Zellkörper und zwei verschiedenen Arten von Fortsätzen, den Dendriten und den Axonen. Die Fortsätze dienen zur Signalaufnahme und –weiterleitung. Die Kontaktstellen zwischen Axonen und Dendriten werden Synapsen genannt. Synapsen können durch die Einwirkung von Signalen Strukturveränderungen unterliegen (synaptische Plastizität). Es wird ein Zusammenhang zwischen diesen Strukturveränderungen und Lernvorgängen bzw. dem Gedächtnis vermutet (Steward & Worley, 2002). In Neuronen der Säugetiere werden spezifische mRNAs aus dem Zellkern nicht nur ins Soma, sondern auch in die Dendriten oder seltener auch in die Axone transportiert. Es wird der gerichtet Transport von etwa 400 verschiedenen mRNA-Spezies in Neuronen von Säugetieren vermutet (Eberwine *et al.*, 2002). Die lokalisierten mRNAs codieren für verschiedene Klassen von Proteinen wie z.B. membranintegrierte Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren, Neurotransmitter/Neuromodulatoren, Strukturproteine und Enzyme (Übersicht: Kiebler & DesGroseillers, 2000). Die erste mRNA, die in Neuriten detektiert wurde, ist die mRNA für das Mikrotubulus-assoziierte Protein 2 (MAP2). MAP2-mRNA ist in Neuronen des Hippocampus und des Cortex der Ratte somatodendritisch lokalisiert (Garner *et al.* 1988, Tucker *et al.*, 1989). Die Bindung von MAP2 an Mikrotubuli bewirkt deren Stabilisierung (Shafit-Zagardo & Kalcheva 1998; van Rossum & Hanisch 1999). Die Regulation der Interaktion der beiden Komponenten erfolgt über den Phosphorylierungsstatus des MAP2 (Brugg & Matus, 1991; Illenberger *et al.*, 1996; Itoh *et al.*, 1997). Der Phosphorylierungsstatus seinerseits ist von der Aktivität des NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptors abhängig (Quinlan & Halpain, 1996). Die VP mRNA gehört ebenfalls mit zu den Transkripten, die als eine der ersten in den Neuriten detektiert wurde. Wie oben bereits erwähnt wurde, ist sie in magnozellulären Neuronen des Hypothalamus dendritisch und axonal lokalisiert (Mohr *et al.*, 1991; Mohr *et al.*, 1995). Das selbe Lokalisierungsmuster wie die VP mRNA zeigt die strukturell verwandte Oxytocin mRNA in magnozellulären Neuronen (Mohr *et al.*, 1991; Mohr *et al.*, 1995). Das dendritisch lokalisierte Transkript arc/arg3.1 kodiert für das unmittelbar frühe Gen (*immediate early gene*) arc/arg3.1 (*arc: activity-regulated cytoskeleton-associated protein; arg 3.1: activity regulated gene 3.1*). Die Expression des Gens arc/arg3.1 wird durch synaptische Aktivität induziert (Lyford *et al.*, 1995; Link *et al.*, 1995). Die arc/arg3.1-mRNA wird nach der synaptischen Aktivierung der

NMDA-Rezeptoren ins Soma und in die Dendriten der Neurone des Gyrus Dentatus im Hippocampus lokalisiert. Das im Soma und in den Dendriten exprimierte Protein ist wahrscheinlich mit dem neuronalen Zytoskelett assoziiert. Es wird vermutet, dass das Protein durch Interaktion und durch Modifizierung der Funktion anderer Proteine Einfluß nimmt auf die Aktivitäts-abhängige Antwort (Link *et al.*, 1995; Lyford *et al.*, 1995). Die mRNA der α -Isoform der Ca^{2+} / Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (α -CaMKII) wird in distale Bereiche der Dendriten der Neurone des Hippocampus und des Cortex lokalisiert (Burgin *et al.*, 1990). α -CaMKII ist in der postsynaptischen Dichte, die sehr reich an Proteinen ist und sich unterhalb der postsynaptischen Membran befindet, angereichert. Das Protein ist an Mechanismen der Signaltransduktion beteiligt. Seine Funktion steht im Zusammenhang mit durch Strukturveränderungen an Synapsen hervorgerufenen Lernvorgängen (Mayford *et al.*, 1995; Lisman *et al.*, 1997). Neben der mRNA für Proteine, die an Mechanismen der Signaltransduktion beteiligt sind, wie α -CaMKII, werden auch mRNAs in unterschiedlichen Neuronentypen lokalisiert, die für Rezeptoren kodieren. So wird die mRNA des Inositol-1,4,5-Triphosphat-Rezeptor Typ 1 (InsP3r 1) in proximale und distale Bereiche der Dendriten der Neurone des Cerebellums lokalisiert (Furuichi *et al.*, 1993). Ebenso werden Transkripte, die für verschiedene Untereinheiten von Glutamaterezeptoren kodieren, in Neuronen des Hippocampus dendritisch lokalisiert (Miyashiro *et al.*, 1994). Für die mRNA des Wachstumsfaktors BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) wurde eine Aktivitäts-abhängige Lokalisation in proximale Bereiche der Dendriten von Neuronen des Hippocampus festgestellt (Dugich-Djordjevic *et al.*, 1992, Tongiorgi *et al.*, 1997). Die Funktion einiger Proteine, deren Transkripte dendritisch lokalisiert werden, ist bisher unbekannt. Zu diesen Proteinen zählt das Dendrin, dessen mRNA im Hippocampus, im *Gyrus Dentatus* und im cerebralen Cortex detektiert werden kann (Herb *et al.*, 1997). Ebenso ist die Funktion von L7 unbekannt, dessen mRNA in Fortsätzen von Purkinje Zellen lokalisiert ist (Bian *et al.*, 1996). Das Beispiel der mRNA der α -Untereinheit des Glycin-Rezeptors (α -GlyR) zeigt, dass die Lokalisierung von mRNAs außerhalb des Somas nicht auf Neurone des ZNS beschränkt ist. α -GlyR-mRNA zeigt in Neuronen des Rückenmarks der Ratte ein somatodendritisches Verteilungsmuster (Racca *et al.*, 1997).

Obwohl die hier vorgestellten lokalisierten mRNAs für Proteine aus unterschiedlichen Klassen codieren, sind viele ihrer Translationsprodukte an der Ausbildung der synaptischen Plastizität beteiligt. Daher ist die mRNA-Lokalisierung, verbunden mit lokaler Proteinbiosynthese in den Dendriten von Neuronen, vermutlich ein wichtiger Mechanismus, der zur Ausbildung von Gehirnfunktionen wie Lernen und Gedächtnis beiträgt.

Der Mechanismus des RNA-Transportes ist in *Drosophila* gut untersucht (Übersicht: Bashirullah *et al.*, 1998; Lasko, 1999; Johnstone & Lasko, 2001; Lasko, 2003). So sind etwa 20-30 verschiedene Transkripte bekannt, die in der Entwicklungsphase der Oocyte oder des Embryos an die unterschiedlichen Pole lokalisiert werden. Der Mechanismus der Lokalisierung der *oskar*-mRNA vom anterioren Pol zum posterioren Pol der Oocyte ist sehr komplex. Es wurde gezeigt, dass die *oskar*-mRNA-Lokalisierung abhängig ist von einer Zytoskelettkomponente, den Mikrotubuli (Clark *et al.*, 1994). Mutationen in verschiedenen Genen, wie Cappucino, Spire, Chickadee, Staufen, Bicaudal-D, Mago nashi und Tropomyosin-1 führen zur Delokalisation der *oskar*-mRNA an den posterioren Pol, was auf eine Beteiligung zahlreicher Proteine am Lokalisierungsmechanismus hinweist (Übersicht: Lasko *et al.*, 1999). Generell sind für die Lokalisierung von mRNAs Sequenzabschnitte innerhalb der mRNAs, sogenannte *cis*-agierende Elemente, essentiell für die Bindung an Proteine, die die Lokalisierung der mRNAs vermitteln. Diese *cis*-agierenden Elemente sind meist sehr komplex aufgebaut (Übersicht: Zhou & King, 2004). Innerhalb der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) der *oskar*-mRNA wurden mehrere *cis*-agierende Elemente gefunden, die die Lokalisierung der mRNA während der verschiedenen Stadien der Entwicklung vermitteln. So ist ein Element zuständig für die Akkumulation der *oskar*-mRNA in der frühen Oocyte, während zwei kleinere Elemente für die Freisetzung der mRNA vom anterioren Pol zuständig sind. Ein weiteres *cis*-agierendes Element ist für die Lokalisierung der *oskar*-mRNA zum posterioren Pol essentiell (Kim-Ha *et al.*, 1993). Zudem wurde seit kurzem gezeigt, dass für die Lokalisierung der *oskar*-mRNA das vorherige Spleißen im Kern essentiell ist. Am Spleißvorgang sind Proteine wie Y14/Tsunagi und Mago nashi beteiligt (Hachet & Ephrussi; 2004). An die *cis*-agierenden Elemente können ein oder mehrere Proteine binden, sogenannte *trans*-agierende Faktoren, die zum einen als Adapter fungieren zwischen der mRNA und dem Zytoskelett, an dem entlang die Lokalisierung erfolgt bzw. an dem sie am Zielort verankert wird. So ist das RNA-Bindungsprotein Staufen essentiell für die Lokalisierung sowie für die Aktivierung der Translation der *oskar*-mRNA am Zielort (Ephrussi *et al.*, 1991; Kim-Ha *et al.*, 1991; Micklem *et al.*, 2000). Für die *bicoid*-mRNA wurde zudem gezeigt, dass Staufen an der Verankerung der mRNA am anterioren Pol verantwortlich ist (St. Johnston *et al.*, 1989). Für die räumliche und zeitliche Kontrolle der Translation während der Lokalisierung sind ebenfalls *trans*-agierende Faktoren essentiell. So wird die Translation der *oskar*-mRNA durch die Bindung des Proteins Bruno an ein Sequenzmotiv mit dem Namen *Bruno-response element* (BRE), welches in der 3'-UTR der mRNA lokalisiert ist, reprimiert (Kim-Ha *et al.*, 1995; Gunkel *et al.*, 1998).

Durch die Untersuchung von *Drosophila*-Mutanten sind die Mechanismen der mRNA-Lokalisierung zwar nicht hinreichend geklärt, jedoch sind einige Komponenten bekannt. Im Gegensatz dazu sind in Neuronen die Mechanismen des gerichteten mRNA-Transportes vergleichsweise viel weniger gut untersucht. Es wird jedoch vermutet, dass die Mechanismen bei *Drosophila* und in Neuronen von Vertebraten sehr ähnlich sind. So beginnt die Lokalisierung von spezifischen mRNAs (Abb. 1.2.) möglicherweise im Kern (Übersicht: Schnapp *et al.*, 1999). Nach dem Export ins Cytoplasma assoziieren die mRNAs über die in ihrer Sequenz enthaltenen *cis*-agierenden Elemente an *trans*-agierende Faktoren, die die Rekrutierung zum Cytoskelett und den Transport entlang von Mikrotubuli zum Zielort, den Dendriten oder in seltenen Fällen den Axonen, vermitteln. Es wird vermutet, dass die Lokalisierung von mRNAs entlang des Zytoskeletts in großen Ribonukleoprotein (RNP)-Komplexen erfolgt, die als granuläre Strukturen in der Zelle sichtbar sind (Übersicht: Kiebler & DesGroseillers, 2000). Zudem wird angenommen, dass die Translation dendritischer mRNAs in Abhängigkeit von synaptischer Aktivität reguliert werden kann (Kuhl & Skehel, 1998; Crino & Eberwine, 1996; Übersicht: Steward & Schuman, 2001).

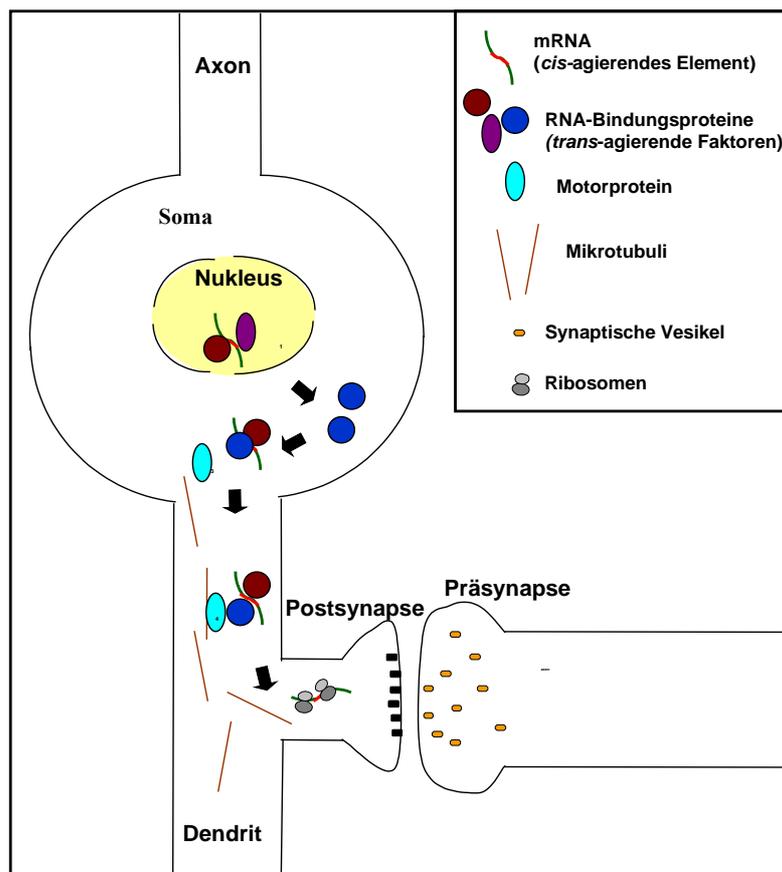


Abb. 1.2.: Schematische Darstellung möglicher Mechanismen der dendritischen mRNA-Lokalisierung in Neuronen (modifiziert nach Mohr, 1999): RNA-Bindungsproteine (*trans*-agierende Faktoren) des Nukleus binden an ein spezifisches *cis*-agierendes Element innerhalb der mRNA und vermitteln den Kernexport der spezifischen mRNA. Außerhalb des Nukleus binden zytoplasmatische *trans*-agierende Faktoren an dasselbe oder an andere *cis*-agierende Elemente innerhalb der mRNA. Diese RNA-Bindungsproteine können die Lokalisierung des Ribonukleoprotein-Komplex mit Hilfe von Motorproteinen entlang von Mikrotubuli in die Dendriten sowie die Translationsregulation der mRNA während der Lokalisierung vermitteln. Die lokalisierte mRNA kann abhängig von synaptischer Aktivität an Ribosomen translatiert werden.

Die Mechanismen, die zu einer Translationskontrolle führen, sind bisher weitestgehend unbekannt. Jedoch wurde gezeigt, dass in der 3'-UTR einiger dendritisch lokalisierter mRNAs, wie der α -CaMKII-mRNA, sich ein sogenanntes cytoplasmatisches Polyadenylierungs-Element (*cytoplasmic polyadenylation element* (CPE)) befindet, welches die Translation der mRNAs in Abhängigkeit von synaptischer Aktivität durch Verlängerung des Poly(A)-Schwanzes der mRNA fördert (Übersicht: Huang *et al.*, 2003). An das CPE bindet das CPE-Bindungsprotein (CPEB). Die Polyadenylierung der mRNA erfolgt nach der

Phosphorylierung des CPEB durch das Protein Aurora. Die Interaktion des CPEB mit dem CPE in der mRNA fördert die dendritische Lokalisierung derselben (Huang *et al.*, 2003). Das Protein Maskin interagiert nach der Polyadenylierung der mRNA mit CPEB und dem eukaryotischen Initiationsfaktor (eIF)4E, dem CAP-Bindungsprotein, und stimuliert so die Translation.

In den RNAs, die in Neuronen lokalisiert werden, sind bisher erst wenige *cis*-agierende Elemente und deren *trans*-agierende Faktoren bekannt. In Zellkulturexperimenten mit mikroinjizierten, primärkultivierten Neuronen aus den oberen Zervikalganglien der Ratte wurde in der VP mRNA ein *cis*-agierendes Element identifiziert, welches als chimäres Transkript in der Lage ist, ein normalerweise nicht lokalisiertes α -Tubulin-Transkript dendritisch zu lokalisieren. Die sogenannte dendritische Lokalisierungssequenz (VP-DLS) umfaßt die letzten 395 Nukleotide der mRNA, bestehend aus Bereichen der codierenden Region und der 3'UTR (Prakash *et al.*, 1997). In der 3'-UTR der somatodendritisch lokalisierten MAP2-mRNA wurde ein 640 Nukleotide umfassendes dendritisches Lokalisierungselement (DTE: *dendritic targeting element*) identifiziert. Zellkulturexperimente, in denen primärkultivierte Neurone des Hippocampus mit einem chimären Konstrukt aus der Sequenz für das fluoreszierende Protein EGFP (*enhanced green fluorescent protein*), dessen mRNA nicht lokalisiert ist, und der Sequenz des DTE transfiziert wurden, zeigen, dass das DTE ausreicht, um das chimäre Transkript dendritisch zu lokalisieren (Blichenberg *et al.*, 1999). Anhand von Experimenten mit primärkultivierten Neuronen des Hippocampus wurde in der 3'UTR der α -CaMKII-mRNA ein 1200 Nukleotide umfassendes dendritisches Lokalisierungselement identifiziert (Blichenberg *et al.*, 2001). Anhand von *in situ*-Hybridisierungen von Gehirnschnitten einer transgenen Maus, in der die 3'-UTR der α -CaMKII-mRNA ersetzt wurde durch die 3'-UTR der nicht dendritisch lokalisierten mRNA für das Rinderwachstumshormon, wurde gezeigt, dass nach einer Entfernung der 3'-UTR der α -CaMKII-mRNA keine dendritische Lokalisierung der mRNA stattfindet (Miller *et al.*, 2002). In der 5'-Region der nicht-kodierenden BC1-RNA wurde ein 62 Nukleotide umfassendes *cis*-agierendes Element identifiziert, welches für die dendritische Lokalisierung der RNA in Neuronen essentiell ist (Muslimov *et al.*, 1997). Ein kurzes Sequenzmotiv von 54 Nukleotiden in der 3'-UTR der β -Actin-mRNA reicht aus, um das Transkript zu lokalisieren (Zhang *et al.*, 2001; Tiruchinapalli *et al.*, 2003). Dieses *cis*-agierende Element wird auch *zipcode* genannt. Die bisher identifizierten *cis*-agierenden Elemente innerhalb lokalisierter mRNAs in Neuronen weisen keine Ähnlichkeit in der Primärsequenz auf.

Anhand biochemischer *in vitro* Experimente wurden einige *trans*-agierende Faktoren identifiziert, die mit *cis*-agierenden Elementen von in Neuronen lokalisierten Transkripten interagieren. So bindet ein Protein aus dem Gehirn der Ratte in spezifischer Weise an die VP-DLS und bildet mit Teilen der mRNA-Sequenz einen 85 kDa Komplex aus. Das Protein wird Vasopressin-mRNA-Bindungsprotein (VP-RBP) genannt (Mohr *et al.*, 2001). Aus dem Gehirn der Ratte wurden ebenfalls zwei Proteine isoliert, die an MAP2-mRNA binden, als MARTA1 und MARTA2 (*MAP2-RNA trans-acting proteins*) bezeichnet (Rehbein *et al.*, 2000). MARTA1 zeigt in Neuronen der Ratte ein überwiegend nukleäres Verteilungsmuster mit geringer Konzentration im Zytoplasma (Rehbein *et al.*, 2002), während über MARTA2 bisher nichts bekannt ist. MARTA1 konnte als Ortholog des humanen KSRP (*human K homology-type splicing regulatory protein*) identifiziert werden (Rehbein *et al.*, 2002). Das Protein besitzt vier KH (*hnRNP K-homology*)-Domänen. Die Funktion von MARTA1 ist bisher noch unbekannt. Das zu KSRP orthologe *zipcode*-Bindungsprotein 2 (ZBP2) aus dem Huhn bindet an das *cis*-agierende Element (*zipcode*) der in jungen Neuronen lokalisierten β -Aktin-mRNA. ZBP2 ist ebenso wie MARTA1 vorwiegend im Kern lokalisiert. Es wird vermutet, dass ZBP2 den nukleären Export der β -Aktin-mRNA ins Cytoplasma vermittelt (Gu *et al.*, 2002). In *Xenopus* existiert ebenfalls ein Ortholog zum KSRP, das VgRBP71 (Vg1-mRNA-Bindungsprotein 71). VgRBP71 ist ein *trans*-agierender Faktor der in Oocyten lokalisierten Vg1 mRNA (Kroll *et al.*, 2002). Es wird vermutet, dass es die Prozessierung der Vg1 mRNA in der Nähe des Polyadenylierungssignals stimuliert, wodurch ein Repressorelement der Translation entfernt wird (Kolev & Huber, 2003). Ein weiterer *trans*-agierender Faktor der β -Aktin-mRNA aus dem Huhn ist das Zipcode-Bindungsprotein 1 (ZBP1) (Ross *et al.*, 1997). ZBP1 wird auch in Neuronen exprimiert und zusammen mit der β -Aktin-mRNA in RNP-Komplexen zu den Wachstumskegeln in den Neuriten Aktivitätsabhängig transportiert (Zhang *et al.*, 2001; Tiruchinapalli *et al.*, 2003). Zudem wird eine Rolle des ZBP1 bei der Regulation der Dendritenmorphologie und dem Synapsenwachstum vermutet, da eine Überexpression des ZBP1 einen Anstieg der Dichte von dendritischen Filopodien bewirkt (Eom *et al.*, 2003).

Da die Funktion vieler Proteine, die als *trans*-agierende Faktoren identifiziert wurden, unbekannt ist, war es ein Ziel dieser Arbeit, den *trans*-agierenden Faktor der VP mRNA, das VP-RBP, biochemisch zu reinigen. Die biochemische Reinigung und Identifizierung bildet die Voraussetzung für funktionelle Analysen.

Es wurde gezeigt, dass zumindest bestimmte Formen synaptischer Plastizität die lokale Translation dendritisch lokalisierter mRNAs erfordern (Kang & Schuman 1996; Casadio *et*

al., 1999). In Dendriten sind die für eine Proteinbiosynthese notwendigen Komponenten, wie z.B. Polyribosomen (Peters *et al.*, 1970; Steward & Levy, 1982), sowie tRNAs und Elongationsfaktoren (Tiedge & Brosius, 1996; Steward *et al.*, 1996; Ma & Morris, 2002), enthalten. Ebenso konnte das für die Synthese von integralen Proteinen notwendige rauhe endoplasmatische Reticulum sowie der Golgi-ähnliche Strukturen in den Dendriten detektiert werden (Tiedge & Brosius, 1996; Torre & Steward, 1996; Gardiol *et al.*, 1999; Pierce *et al.*, 2000; Ma & Morris, 2002). In den Dendriten wurde eine lokale Synthese definierter Proteine bisher nur in wenigen Fällen nachgewiesen. So wurde in kultivierten Neuronen nach Aktivierung durch den Wachstumsfaktor BDNF die Translation eines chimären Transkripts, welches für die Sequenz des GFP (*green fluorescent protein*)-Protein, flankiert von der 5'- und 3'-UTR der α -CaMKII-mRNA, kodiert, in lokalen Bereichen der Dendriten gezeigt (Aakalu *et al.*, 2001). Für den VP-Vorläufer wurde ebenfalls in kultivierten Neuronen gezeigt, dass das Protein nur in den Abschnitten der Dendriten synthetisiert wird, in denen die VP-mRNA zugegen ist. Für diese Experimente wurde ein mutiertes VP-Vorläufer-Konstrukt verwendet, aus dessen Transkription und Translation ein Protein resultiert, welches aufgrund seiner mutierten Aminosäuresequenz im C-Terminus den Ort seiner Synthese, das rauhe endoplasmatische Reticulum, nicht verlassen kann (Mohr & Richter, 2003). Das Vorhandensein der für eine Proteinsynthese essentiellen Komponenten in den Axonen terminal differenzierter Neurone von Säugern wird kontrovers diskutiert (Lasek & Brady, 1981; Übersicht: Steward *et al.*, 1995; Litman *et al.*, 1993; Mohr & Richter, 2000). Für die Axone von unreifen Neuronen in Säugern wurde hingegen gezeigt, dass die chemotaktische Leitung der Wachstumskegel lokale Proteinbiosynthese erfordert, jedoch ist nichts bekannt über die Synthese definierter Proteine (Übersicht: Mc Allister, 2002; Übersicht: Eberwine, 2001; Ming *et al.*, 2002). Für die in magnozellulären Neuronen axonal lokalisierte VP mRNA wurde zudem gezeigt, dass sie nicht mit Ribosomen oder Polysomen assoziiert ist (Mohr *et al.*, 1995). Die Funktion der axonal lokalisierten VP-Transkripte bleibt daher unklar.

Zusammengefaßt läßt sich sagen, dass die mRNA-Lokalisierung generell ein komplexer Vorgang ist, der sich aus verschiedenen Einzelkomponenten zusammensetzt wie der Lokalisierung selbst, der Verankerung der mRNA am Zielort sowie der Translationskontrolle. In Neuronen sind erst wenige Komponenten der mRNA-Lokalisierungsmaschinerie bekannt. Zudem sind die komplexen Funktionen der an der Lokalisierung beteiligten Proteine nicht hinreichend untersucht. Aus diesem Grund war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, nach der Identifikation des VP-RBP seine Funktion im VP mRNA-Metabolismus zu charakterisieren.

2. Materialien

2.1. Längenstandards

<u>Längenstandard</u>	<u>Hersteller</u>
DNA: Φ X174 RF-DNA/ <i>Hae</i> III-Fragment	MBI Fermentas
DNA-Längenstandard III	MBI Fermentas
(λ -DNA, <i>Hind</i> III/ <i>Eco</i> RI geschnitten)	
100 bp DNA-Leiter	MBI Fermentas
RNA: RNA Millenium™ Size Markers	Ambion
Protein: Full Range Rainbow	Amersham Biosciences
Molecular Weight Marker	
Protein ladder	Gibco BRL

2.2. Enzyme

<u>Enzym</u>	<u>Hersteller</u>
DNA-Polymerasen: <i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Promega
<i>Deep Vent</i> -Polymerase	New England Biolabs
N-Glykosidase F*, recombinant	Roche
Restriktionsendonukleasen: <i>Bam</i> HI	Gibco BRL
<i>Eco</i> RI	Gibco BRL
<i>Not</i> I	Gibco BRL
<i>Sal</i> I	Gibco BRL
<i>Xho</i> I	Gibco BRL
<i>Xba</i> I	Gibco BRL
Ribonuklease A (RNase A)	Boehringer Mannheim
Ribonuklease-Inhibitor (RNase-Inhibitor)	Gibco BRL
RNA-Polymerasen: SP6 RNA-Polymerase	Gibco BRL
T3 RNA-Polymerase	Gibco BRL
T7 RNA-Polymerase	Gibco BRL
T4 DNA-Ligase	Gibco BRL

Die entsprechenden Reaktionspuffer für die Enzyme wurden von denselben Herstellern bezogen und nach deren Angaben eingesetzt.

2.3. Bakterienstämme

<u>Stamm</u>	<u>Referenz</u>
DH5 α TM kompetente Zellen (Genotyp: F ⁻ ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r _k ⁻ , m _k ⁺) phoA supE44 λ ⁻ thi-1 gyrA96 relA1)	Gibco BRL
SURE [®] 2 kompetente Zellen (Genotyp: e14 ⁻ (McrA ⁻) Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan ^r) uvrC [F' proAB lacI ^q Z Δ M15 Tn10 (Tet ^r) Amy Cam ^r] ^a)	Stratagene
TOP 10 F' kompetente Zellen (Genotyp: F' {proAb lacI ^q lacZ Δ M15 Tn10 (tet ^r)} mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80 Δ lacZ Δ M15 Δ lacX74 deoR recA1 araD139 Δ (ara,leu) 7697 ga/U ga/K λ - rpsL(streptomycin ^r) endA1 nupG)	Invitrogen

2.4. Eukaryotische Zelllinien und Gewebe

<u>Zelllinie</u>	<u>Zelltyp</u>	<u>Referenz</u>
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen	Graham et al. (1977)
PC-12	Ratten pheocytochrome Nebennierenzellen	Greene et al. (1976); Levi et al. (1985)
NIH-3T3	Embryonale Mauszellen	Jainchill (1969); Aaronsen and Todaro (1968); Copeland et al. (1979)
Rat1	Ratten Fibroblastenzellen	Topp (1981)
HEK 293-Tet on	Humane embryonale Nierenzellen; Stabil transfiziert mit dem Vektor pTet-On	Clontech

Die in dieser Arbeit verwendeten Gewebe stammen ausschließlich von Wistar Ratten, die in der Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf gezüchtet werden.

2.5. Genbank Accession-Nummern

Die Accession-Nummern der verwendeten Nukleotidsequenzen wurden der GenBank-Datenbank unter folgender Internetadresse entnommen: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Benson *et al.*, 1999)

<u>Sequenz (Abkürzung)</u>	<u>Nummer</u>
<i>Rattus norvegicus</i> Poly(A)-Bindungsprotein (rPABP)	AJ298278
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Poly(A)-Bindungsprotein (sPABP)	M12780
<i>Homo sapiens</i> Poly(A)-Bindungsprotein (hPABP)	P11940
<i>Mus musculus</i> Poly(A)-Bindungsprotein (mPABP)	NM008774
<i>Rattus norvegicus</i> Protein Phosphatase1 alpha (rPP1 α)	S78215
<i>Homo sapiens</i> Neuroglycan C	AF059274

2.6. Kompetitor cRNA

In der nachfolgenden Auflistung sind die für UV-Quervernetzungsanalysen verwendeten Kompetitor cRNAs aufgeführt.

<u>Kompetitor cRNA</u>	<u>Referenz/Accession-Nummer</u>
Vasopressin (Ratte)	M25646
α -Tubulin (Ratte)	V01227
MAP2-a (Ratte)	X51842 (Nukleotide 5383-5552)
MAP2-b (Ratte)	X51842 (Nukleotide 3994-5552)
SSTR3-a (Ratte)	X63574 (Nukleotide 451-1650)
SSTR3-b (Ratte)	X63574 (Nukleotide 3010-3855)

2.7. Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden im Servicelabor des Instituts für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf hergestellt. Sie sind in der folgenden Auflistung dargestellt. Die eingefügten Restriktionsschnittstellen sind in der Sequenz unterstrichen. Folgende Abkürzungen wurden verwendet: T_A = Annealing Temperatur; rPABP = Poly(A)-Bindungsprotein der Ratte.

<u>Bezeichnung und Länge</u>	<u>Sequenz (5'→3')</u>	<u>T_A</u> [°C]	<u>Bemerkung</u>
319 (31-mer)	GCAT <u>GGATCCA</u> ACCCCAGCGCCCCAGCTAC rPABP (203-223)	60	Vorwärts-Primer, BamHI-Schnittstelle
321 (35-mer)	CTGGCGCTCTTCTTTTGCTTCTCGTTCCCTCCGAG rPABP (1324-1310+742-723)	60	Rückwärts-Primer, überlappend
322 (36-mer)	CGGAAGGAACGAGAAAAAGAAGAGCGCCAGGCTCAC rPABP (725-739+1310-1330)	60	Vorwärts-Primer, überlappend
323 (30-mer)	GCAT <u>CTCGAGG</u> ACAGTTGGAACACCAGTGG rPABP (2107-2088)	60	Rückwärts-Primer, XhoI-Schnittstelle
324 (31-mer)	GCATGGATCCGTACGCATCATGTGGTCTAGC rPABP (443-464)	60	Vorwärts-Primer, BamHI-Schnittstelle
325 (31-mer)	GCAT <u>CTCGAGA</u> AAGTTCCGTCTGCCGTTCCAC rPABP (1027-1007)	60	Rückwärts-Primer, XhoI-Schnittstelle
326 (36-mer)	CTCGCGCTCTTCTTTAAGTTCCGTCTGCCGTTCCAC rPABP (1324-1310+1024-1007)	60	Rückwärts-Primer, überlappend
327 (41-mer)	AAGTGGAACGGCAGACGGAAAAAGAAGAGCGCCAGG CTCAC rPABP (1005-1024+1310-1330)	60	Vorwärts-Primer, überlappend
328 (30-mer)	GCATGGATCCCGAGAAGCAGAACTGGAGC rPABP (734-753)	60	Vorwärts-Primer, BamHI-Schnittstelle
329 (32-mer)	GCAT <u>CTCGAGG</u> CGCTGAGCTAAAGCTACATAG rPABP (1309-1288)	60	Rückwärts-Primer, XhoI-Schnittstelle
331 (34-mer)	GCGCATGT <u>CGACGA</u> ACCCCAGCGCCCCAGCTAC rPABP (202-223)	62	Vorwärts-Primer, SalI-Schnittstelle
332 (38-mer)	GCGCATGCGGCCGCGGTGAAGCACGAGTTTCTGTTC G rPABP (2149-2126)	62	Rückwärts-Primer, NotI-Schnittstelle

<u>Bezeichnung und Länge</u>	<u>Sequenz (5'→3')</u>	<u>T_A</u> [°C]	<u>Bemerkung</u>
320 (30-mer)	GCATCTCGAGTGCTTCTCGTTCCTTCCGAG rPABP (742-723)	60	Rückwärts-Primer, XhoI-Schnittstelle
354 (34-mer)	GCATCGATCCGAACTTAAGCGCAAATTTGAGC AG rPABP (1022-1045)	58	Vorwärts-Primer, BamHI-Schnittstelle
356 (42-mer)	GCATGCTCTAGAGCCACCATGAACCCAGCGC CCCCAGCTAC rPABP (200-223)	58	Vorwärts-Primer, XbaI-Schnittstelle, Kozak-Sequenz (GCCACC)
357 (36-mer)	GCATGCGGATCCCTTAGGTGAACTCCTTTGCCCT TGC rPABP (772-752)	58	Rückwärts-Primer, BamHI-Schnittstelle, Stopp-Codon (TTA)
358 (33-mer)	GCATGCTCTAGAGCCACCATGGTACGCATCAT G rPABP (443-461)	53	Vorwärts-Primer, XbaI-Schnittstelle, Kozak-Sequenz (GCCACC), Start-Codon (ATG)
359 (36-mer)	GCATGCGGATCCCTTAAAGTCCGTCTGCCGTTCC CAC rPABP (1027-1007)	53	Rückwärts-Primer, BamHI-Schnittstelle, Stopp-Codon (TTA)
360 (44-mer)	GCATGCTCTAGAGCCACCATGGAACGAGAAGC AGAACTTGGAGC rPABP (731-753)	55	Vorwärts-Primer, XbaI-Schnittstelle, Kozak-Sequenz (GCCACC), Start-Codon (ATG)
361 (33-mer)	GCATGCGGATCCCTTAGCGCTGAGCTAAAGCTA C rPABP (1309-1292)	55	Rückwärts-Primer, BamHI-Schnittstelle, Stopp-Codon (TTA)
362 (36-mer)	GCATGCGGATCCCTTAGACAGTTGGAACACCAG TGGC rPABP (2110-2087)	58	Rückwärts-Primer, BamHI-Schnittstelle
SP6 (18-mer)	ATTTAGGTGACACTATAG	50	Sequenzierprimer
T7 (20-mer)	TAATACGACTCACTATAGGG	50	Sequenzierprimer
T3 (20-mer)	ATTAACCCTCACTAAAGGGA	50	Sequenzierprimer
M13 Reverse (18-mer)	CAGGAAACAGCTATGACC	50	Sequenzierprimer

2.8. Plasmide

pCMV-Tag2B (Stratagene)

Der Vektor beinhaltet ein N-terminales FLAG-Epitop mit vorgeschalteter Kozak-Sequenz und nachfolgender *multiple cloning site* (MCS). Dieser eukaryotische Expressionsvektor besitzt einen CMV-Promotor (CMV=Cytomegalovirus). Er besitzt ebenfalls eine SV40 Polyadenylierungssequenz, die für die Termination der Transkription sowie für die Polyadenylierung der abgeschrieben mRNA von Bedeutung ist. In diesen Vektor wurden verschiedene Teilsequenzen der cDNA für das Poly(A)-Bindungsprotein der Ratte (rPABP) (Abb. 2.1) kloniert. Das rPABP (Aminosäuresequenz siehe Abbildung 4.11) besteht aus vier aufeinander folgenden RNA-Erkennungsdomänen (RRM 1-4; RRM=*RNA recognition motif*) am N-Terminus und einem Prolin-reichen C-Terminus ohne RNA-Bindungsaktivität.

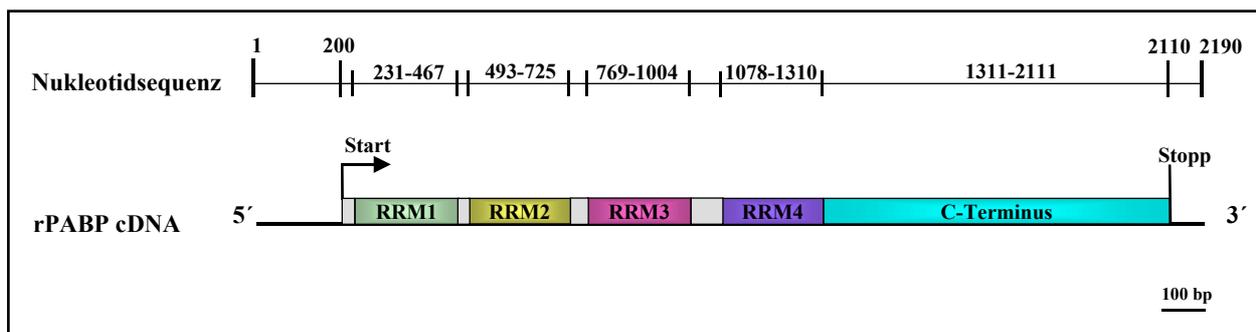


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Nukleotidsequenz der cDNA des Poly(A)-Bindungsproteins der Ratte (rPABP). In der cDNA-Sequenz sind die vier RNA-Erkennungsdomänen (RRM 1-4; RRM=*RNA recognition motif*) am 5'-Ende und der C-Terminus ohne RNA-Bindungsaktivität am 3'-Ende als farbige Boxen hervorgehoben. Das offene Leseraster umfaßt 1911 Nukleotide und startet an Position 200 der cDNA. Es endet an Position 2110 der cDNA.

pCMV-Flag-tag2B/RRM1-4+C

Das Plasmid beinhaltet mit Ausnahme des Start- und des Stopp-Codons die Sequenz des offenen Leserasters der cDNA des rPABP (Nukleotide 203-2107), welche mittels der Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit den Primern 319 und 323 hergestellt wurde. Das PCR-Produkt wurde über die Restriktionsschnittstellen BamHI und XhoI in den Vektor pCMV-Tag2B inseriert.

pCMV-Flag-tag2B/RRM1+2

Dieses Plasmid wurde zusammengesetzt aus dem Vektor pCMV-Tag2B und dem PCR-Produkt mit der Teilsequenz RRM 1 und 2 der cDNA des rPABP (Nukleotide 203-742), welche mit den Primern 319 und 320 hergestellt wurde. Das PCR-Produkt wurde über die Restriktionsschnittstellen BamHI und XhoI in den Vektor inseriert.

pCMV-Flag-tag2B/RRM2+3

Das Plasmid beinhaltet die Teilsequenz RRM 2 und 3 der cDNA des rPABP (Nukleotide 443-1027), welche mit den Primern 324 und 325 über PCR hergestellt wurden. Die Insertion des PCR-Produktes in den Vektor pCMV-tag2B erfolgte über die Restriktionsschnittstellen BamHI und XhoI.

pCMV-Flag-tag2B/RRM3+4

Das Plasmid wurde zusammengesetzt aus einer Teilsequenz der cDNA des rPABP, welche die RRM 3 und 4 umfaßt (Nukleotide 734-1309) und dem Vektor pCMV-Tag2B. Das mit den Primern 328 und 329 über PCR amplifizierte Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen BamHI und XhoI in den Vektor inseriert.

pCMV-Flag-tag2B/RRM3+4+C

Das PCR-Produkt mit einer Teilsequenz der cDNA des rPABP, bestehend aus den RRM 3 und 4 sowie dem C-Terminus (Nukleotide 734-2107), dessen Herstellung mit den Primern 328 und 323 erfolgte, wurde über die Restriktionsschnittstellen BamHI und XhoI in den Vektor pCMV-Tag2B inseriert.

pCMV-Flag-tag2B/RRM3

Das Plasmid setzt sich zusammen aus der über PCR hergestellten Teilsequenz der RRM 3 der cDNA des rPABP (Nukleotidsequenz 734-1027) und dem Vektor pCMV-Tag2B. Das mit den Primern 328 und 325 hergestellte PCR-Produkt wurde über die Restriktionsschnittstellen BamHI und XhoI in den Vektor inseriert.

pCMV-Flag-tag2B/RRM4+C

Mit den Primern 323 und 345 wurde mit Hilfe der PCR eine Teilsequenz der cDNA des rPABP, bestehend aus der RRM 4 und dem C-Terminus (Nukleotide 1022-2107) hergestellt. Die Insertion des PCR-Produktes in den Vektor pCMV-Tag2B erfolgte über die Restriktionsschnittstellen BamHI und XhoI.

PCMV-Flag-tag2B/RRM1+2+C

Das Plasmid beinhaltet die mit Hilfe der Methode der überlappenden PCR (Abb. 2.2) zusammengesetzte Teilsequenz der RRMs 1 und 2 sowie des C-Terminus der cDNA des rPABP (Nukleotide 203-742+1310-2107). Die Herstellung der Teilsequenz RRM 1 und 2 sowie der 5'-Teilsequenz des C-Terminus erfolgte mit den Primern 319 und 321, während die 3'-Teilsequenz der RRM 2 sowie die Teilsequenz des C-Terminus mit den Primern 322 und 323 amplifiziert wurde. Die Zusammensetzung der resultierenden zwei sich überlappenden Teilsequenzen erfolgte mit den zwei PCR-Produkten aus der 1. PCR-Runde als Primer. Das PCR-Produkt wurde anschließend über die Restriktionsschnittstellen BamHI und XhoI in den Vektor pCMV-Tag2B inseriert.

pCMV-Flag-tag2B/RRM2+3+C

Die Herstellung des Plasmides erfolgte ebenso wie das Plasmid pCMV-Flag-tag2B/RRM1+2+C durch überlappende PCR (siehe Abbildung 2.2). In der ersten PCR-Runde wurde die Teilsequenz der RRMs 2 und 3 sowie des 5'-Endes des C-Terminus der cDNA des rPABP mit den Primern 324 und 326 amplifiziert, während die Teilsequenz des C-Terminus und des 3'-Ende der RRM 3 der cDNA des rPABP mit den Primern 327 und 323 synthetisiert wurde. In der folgenden zweiten PCR-Runde, in der die PCR-Produkte der ersten Runde als Primer eingesetzt wurden, erfolgte die Fusion der RRMs 2 und 3 mit dem C-Terminus (Nukleotide 443-1024+1310-2107). Anschließend wurde das PCR-Produkt über die Restriktionsschnittstellen BamHI und XhoI in den Vektor pCMV-Tag2B inseriert.

pCMV-Flag-tag2B/PP1 α (M. Monshausen, 2000)

Das zur Verfügung gestellte Plasmid beinhaltet die cDNA für Protein Phosphatase1 alpha der Ratte (rPP1 α), welche in den Vektor pCMV-tag2B inseriert wurde.

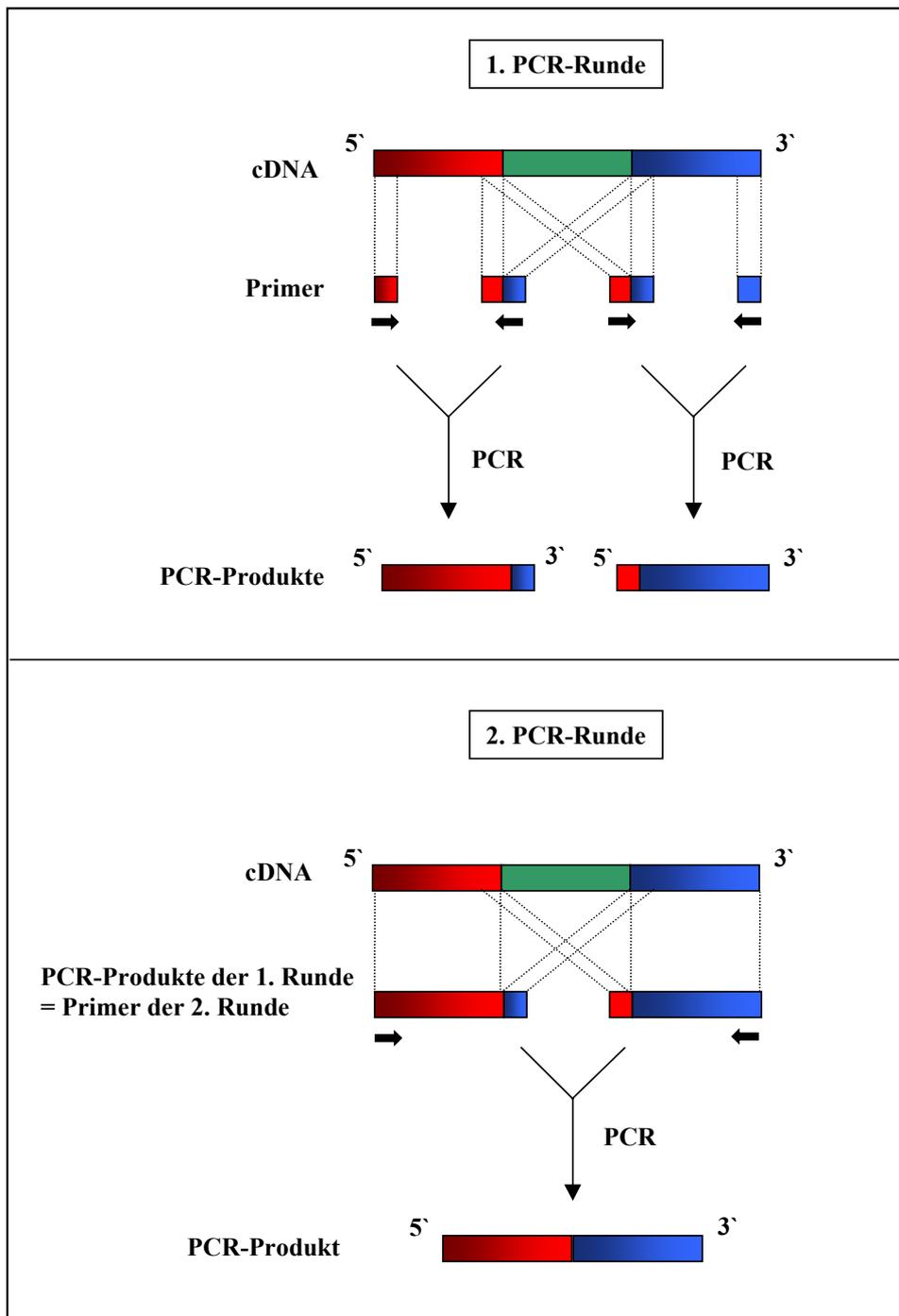


Abb. 2.1. Schema der überlappenden PCR: Von einer cDNA-Matrize werden zwei Teilsequenzen (rot und blau), die auf Grund einer in der Mitte liegenden dritten Teilsequenz (grün) voneinander getrennt sind, durch überlappende PCR miteinander fusioniert. Im ersten Schritt (1. PCR-Runde) erfolgt die Durchführung von zwei verschiedenen PCRs. Im ersten Ansatz befinden sich ein Vorwärts-Primer mit dem 5'-Sequenzende der roten Teilsequenz und ein Rückwärts-Primer, der zusammengesetzt ist aus dem 3'-Bereich der roten Teilsequenz sowie dem 5'-Bereich der blauen Teilsequenz. Im zweiten PCR-Ansatz werden zum einen ein Vorwärts-Primer, der zusammengesetzt ist aus dem 3'-Sequenzbereich der roten Teilsequenz und dem 5'-Bereich der blauen Teilsequenz, und zum anderen ein Rückwärts-Primer mit dem 3'-Sequenzbereich der blauen Teilsequenz eingesetzt. Die resultierenden zwei PCR-Produkte der 1. Runde werden in einem weiteren 3. PCR-Ansatz (2. PCR-Runde) als Primer eingesetzt. Das Ergebnis dieser PCR ist das fusionierte Endprodukt.

pTRE Myc (Clontech)

Das Plasmid zeichnet sich dadurch aus, dass sich am 5'-Ende der MCS ein Promotor (P_{hCMV*}) befindet, der in seiner Sequenz das „Tet-responsive element“ (TRE) beinhaltet. Der Promotor, und damit ebenso die Expression der cDNA, welche in die MCS kloniert wird, kann über das TRE-Element reguliert werden, an welches bei Anwesenheit von Tetracyclin oder Doxycyclin das *reverse tet controlled transactivator* (rtTA)-Protein bindet und somit den Promotor aktiviert. Am 5'-Ende der MCS befindet sich zusätzlich ein Start-Codon mit nachfolgender Sequenz des c-Myc-Epitops, so dass in die MCS inserierte cDNAs, die sich im entsprechenden Leseraster befinden, für Proteine kodieren, deren N-Terminus eine Myc-Tag-Sequenz enthält.

pTRE Myc-PABP

Die Sequenz der cDNA des rPABP wurde mit den Primern 331 und 332 mittels PCR hergestellt (Nukleotide 202-2110). Die Insertion des resultierenden PCR-Produktes in den Vektor pTRE Myc erfolgte über die Restriktionsschnittstellen SallI und NotI. Die cDNA des rPABP wird in eukaryotischen Zellen als Fusionsprotein exprimiert, dessen N-Terminus eine Myc-Tag-Sequenz enthält.

pTRE Myc-Luc (Clontech)

Das Plasmid dient als Kontrollvektor für das Tet-OnTM-System (Clontech). Es beinhaltet die Sequenz der cDNA der Luciferase, welche in den pTRE-Myc Vektor inseriert wurde. Die cDNA der Luciferase kodiert für ein Fusionsprotein, dessen N-Terminus eine Myc-Tag-Sequenz enthält.

pSP64 poly(A) (Promega)

Der Vektor beinhaltet innerhalb seiner Sequenz stromaufwärts der MCS einen SP6-Promotor und stromabwärts der MCS eine Sequenz aus 30 Adenin-Nukleotiden. *In vitro* synthetisierte Transkripte wiesen so einen kurzen Poly(A)-Schwanz auf, der eine optimale Proteinsynthese bei einer *in vitro* Translation (i.v.T.) gewährleistet.

PABP in pSP64poly(A)

Das Plasmid setzt sich zusammen aus der Sequenz der cDNA des rPABP (Nukleotide 200-2187), welche mittels PCR mit Hilfe der Primer 356 und 362 hergestellt wurde, und dem Vektor pSP64poly(A). Mit dem Primer 356 wurde vor dem Start-Codon der Sequenz der cDNA eine Kozak-Sequenz eingefügt, um eine *in vitro* Translation der *in vitro* synthetisierten RNA zu ermöglichen. Das PCR-Produkt wurde über die Restriktionsschnittstellen XbaI und BamHI in den Vektor inseriert.

PABP-RRM 1+2 in pSP64poly(A)

Die Teilsequenz der cDNA des rPABP, welche die RRM 1 und 2 (Nukleotide 200-772) umfaßt, wurde mit den Primern 356 und 357 mittels PCR hergestellt. Vor dem Start-Codon der Teilsequenz wurde durch die PCR zusätzlich eine Kozak-Sequenz sowie am 3'-Ende ein Stopp-Codon eingefügt, um eine *in vitro* Translation der *in vitro* synthetisierten RNA zu ermöglichen. Das PCR-Produkt wurde anschließend über die Schnittstellen XbaI und BamHI in den pSP64poly(A) Vektor inseriert.

PABP-RRM 2+3 in pSP64poly(A)

Das Plasmid wurde zusammengesetzt aus dem PCR-Produkt, welches die Teilsequenz der cDNA des rPABP mit den RRM 2 und 3 (Nukleotide 443-1027) beinhaltet, und dem Vektor pSP64poly(A). Das PCR-Produkt wurde den Primern 358 und 359 hergestellt, wobei am 5'-Ende eine Kozak-Sequenz und ein Start-Codon sowie am 3'-Ende ein Stopp-Codon zusätzlich eingefügt wurde, um eine *in vitro* Translation der *in vitro* synthetisierten RNA zu ermöglichen. Die Insertion des PCR-Produktes in den Vektor erfolgte über die Schnittstellen XbaI und BamHI.

PABP-RRM 3+4 in pSP64poly(A)

Die mit den Primern 360 und 361 mittels PCR hergestellte Teilsequenz der cDNA des rPABP mit den RRM 3 und 4 (Nukleotide 731-1309) über die Restriktionsschnittstellen XbaI und BamHI in den Vektor pSP64poly(A) inseriert. Mit Hilfe des Primers 360 wurde am 5'-Ende eine Kozak-Sequenz und ein Start-Codon und mit dem Primer 361 am 3'-Ende ein Stopp-Codon eingefügt, um eine *in vitro* Translation der *in vitro* synthetisierten RNA zu ermöglichen.

pCMV β Gal-AVP sense (Prakash *et al.*, 1991)

Der eukaryotische Expressionsvektor beinhaltet die gesamte cDNA für den Vasopressin-Vorläufer der Ratte.

pBS PABP Klon 8 (Mohr *et al.*, 2001)

In das Plasmid pBlueskript SK+ wurde die vollständige Sequenz der cDNA des Poly(A)-Bindungsproteins der Ratte inseriert.

CCEx (S. Schumacher)

Das zur Verfügung gestellte Plasmid beinhaltet ein 395 bp großes Teilfragment (1370-1783) der cDNA des *Homo sapiens* Neuroglycan C (hCALEB; CALEB=chicken acidic leucine-rich EGF domain-containing brain protein), welches in den Vektor pCMV-Myc inseriert wurde. Das CALEB-Teilfragment wird in eukaryotischen Zellen als Fusionsprotein exprimiert, dessen N-Terminus eine Myc-Tag-Sequenz enthält.

2.9. Antikörper

In dieser Auflistung verwendete Abkürzungen: ICC=Immuncytochemie, WB=Western Blot

Primäre Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Referenz/Eingesetzte Verdünnung</u>
Anti-Flag-Tag M2, monoklonaler Antikörper aus Maus	Stratagene/ICC: 1:500, WB: 1:1000
Anti-Myc IgG1, monoklonaler Antikörper aus Maus	Sigma/ICC: 1:500, WB: 1:1000
Anti-Neurophysin II RN#4, polyklonaler Antikörper aus Kaninchen	freundlicherweise von Dr. A. G. Robinson (Pittsburgh, USA) zur Verfügung gestellt /WB: 1:10000
Anti-Neurophysin II IgG, aus Kaninchen	Acris/ICC 1:400
Anti-PABP (Ratte) aus Kaninchen	zur Verfügung gestellt von Dr. E. Mohr (Hamburg, Deutschland)/WB: 1:1000
EZ view TM Red ANTI-FLAG [®] M2 Affinity Gel	Sigma

Sekundäre AntikörperAntikörper

Anti-Maus konjugiert mit Cy3, aus Ziege

Anti-Maus konjugiert mit IRDye 800,
aus KaninchenAnti-Kaninchen konjugiert mit
Alexa-Fluor 488, aus ZiegeReferenz/Eingesetzte Verdünnung

Jackson Immunoresearch (Dianova)/

ICC: 1:500

Sigma

Molecular Probes/

ICC: 1:200

2.10. Produkte für die ZellkulturProdukt

Trypsin

Strepto-Hefa (Streptomthenat)

Penicillin

DMEM (*Dulbecco's modified eagle medium*)

Poly-D-Lysin

Fötale Kälberserum (FCS=*fetal calf serum*)Pferdeserum (HS=*horse serum*)Tet approved FBS (FBS=*fetal bovine serum*)PBS (*phosphate buffered saline*:

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung) pH 7,2

Laminin

Doxycyclin

Geneticin

Hersteller

Invitrogen

Sanativa Aktiengesellschaft & Co.

Grünenthal GmbH

Bio Whittaker, Cambrex Bio
Science

Sigma

Sigma

Sigma

Clontech

Sigma

Tebu

Clontech

Clontech

2.11. Fertigsysteme

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
<i>ECLTM Western blotting analysis system</i>	Amersham Biosciences
<i>Gene EluteTM Plasmid Maxi-Prep Kit</i>	Sigma
<i>Nucleobond[®] AX</i>	Macherey-Nagel
<i>Nucleo Spin[®] Plasmid</i>	Macherey-Nagel
<i>PolyFect[®] Transfection Reagent</i>	Qiagen
<i>QIAquickTM PCR Purification Kit</i>	Qiagen
<i>QIAquick[®] Gel Extraction Kit</i>	Qiagen
<i>QIAashredderTM</i>	Qiagen
<i>Ribo MAXTM Large Scale RNA Production System-T7</i>	Promega
<i>RNeasy Midi Kit</i>	Qiagen
<i>RNase-Free DNase Set</i>	Qiagen
<i>RNeasy[®] Mini Kit</i>	Qiagen
<i>TNT[®] Quick Coupled Transcription/Translation Systems</i>	Promega

2.12. Sonstiges

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
Filmmaterial: Agfa Cronex 5	Agfa-Gevaert N.V.
<i>Fuji Medical X-rayfilm</i>	Fuji Film CO. LTD.
Glashomogenisator nach Dounce	Wheaton
<i>NAP-5 Columns</i>	Amersham Biosciences
Ultrazentrifugationsgefäße	Beckmann
Plastibrand Einmal-Küvetten	Brand
PROTRAN [®] Nitrocellulose-Membran	Schleicher & Schuell
Whatman GF/C Filter 25 mm Ø	Whatman
Zeta-Probe Nylonmembran	Bio-Rad
<i>G-50 Spin-Columns</i>	Amersham Biosciences

2.13. Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
Bio Photometer	Eppendorf
CO ₂ -Inkubator	Forma Scientific
Druckluftkompressor Jun-Air	Jun-Air
Elektrophoresekammern:	
<i>DNA Sub CellTM</i>	Bio-Rad
GNA-100	Pharmacia
<i>Mini-PROTEAN[®] 3 Cell</i>	Bio-Rad
Flüssigszintillationszähler WALLAC 1409	Wallac
<i>Gene Amp PCR System 2400</i>	Perkin Elmer
<i>Gel Air Dryer</i>	Bio-Rad
Hybridisierungsöfen	Backofer Laboratoriumsgeräte
Inkubationsschüttler Multitron Version 2	INFORS AG [®] 2000
Inversmikroskop Leitz Diavert	Leitz
Kühlzentrifugen: SORVALL [®] Superspeed RC-5B Und RC2-B	DuPont
<i>Model 438 Slab Dryer</i>	Bio-Rad
<i>Odyssey Infrared Imaging System</i>	LI-COR Biosciences
Phosphoimaging-System:	
BAS Reader FUJI FILM BAS-1800 II	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH
Eraser	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH
BAS cassette 2325 und 2025	Fujifilm
Analyseprogramm: AIDA	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH
Schlauchpumpe	Ismatec

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
Rotoren: SS-34	Sorvall
AS4.13	Kontron
A24.24	Kontron
70.1 Ti	Beckmann
AH 629	Sorvall
<i>Semi-Dry Blotter</i> „Uni Blot SC-Serie“	Merck Eurolab
Spannungsquelle ECPS 3000/150	Pharmacia
<i>Specimen Rotator Fixed 220/240V</i>	Polysciences, Inc.
Spektrophotometer Gene Quant	Pharmacia
Sterilbänke:	
GELAIRE® (horizontaler Luftstrom)	Flow Laboratories
LaminAir® (vertikaler Luftstrom)	Heraeus
Thermostat 5320	Eppendorf
UV-Leuchttisch UVT 28-M	Herolab
Zentrifugen:	
Eppendorf 5415	Eppendorf
Eppendorf 5417R	Eppendorf
Varifuge OR3	Heraeus
Ultrazentrifuge: L7	Beckman
UV-Quervernetzer: UV Stratalinker™1800	Stratagene
Vakuumofen VT 5042	Heraeus

2.14. Herstellernachweis

<u>Hersteller</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Agfa	Agfa-Gevaert, Leverkusen, Deutschland
Aldrich	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ambion	Ambion, Inc., Austin, USA
American National Can™	American National Can™, Greenwich, USA
Amersham	Amersham Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Applied Biosystems	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Bachofer Laboratoriums-Geräte	Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen, Deutschland
B. Braun Melsungen AG	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
BD-Biosciences Clontech	BD-Biosciences Clontech, Palo Alto, USA
Beckman	Beckman, Palo Alto, USA
Becton Dickinson	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Biomol	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg, Deutschland
Bio-Rad	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Biozym	Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
Boehringer Mannheim	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland
BRL Life Technologies	Bethesda Research Laboratories Life Technologies Inc., Gaithersburg, USA
Calbiochem	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden/Taunus, Deutschland
Cambrex Bio Science	Cambrex Bio Science Verviers, Verviers, Belgien
Cellbiology Trading	Cellbiology Trading, Hamburg, Deutschland
Dianova	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
DuPont	Du Pont de Nemours GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Dynal Biotech	Dynal Biotech, Hamburg, Deutschland
Eppendorf	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
Flow Laboratories	Flow Laboratories GmbH, Meckenheim, Deutschland
Fluka	Fluka Chemika-BioChemika, Neu-Ulm, Deutschland
Fuji	Fuji Foto Film Co. Ltd., Tokio, Japan

<u>Hersteller</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Gibco BRL	GIBCO BRL/Life Technologies™ GmbH, Eggenstein, Deutschland
Greiner	Greiner Labortechnik, Nürtingen, Deutschland
Grünenthal GmbH	Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland
Heraeus	Heraeus GmbH, Hannover, Deutschland
Herolab	Herolab/Kendro Laboratory Products, Rodenbach, Deutschland
INFORS AG® 2000	IINFORS HT, Bottmingen, Schweiz
Invitrogen	Invitrogen BV, Leek, Niederlande
J.T. Baker	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland
Jun-Air	JUN-AIR, Nørresundby, Dänemark
Kontron	Kontron Instruments, Eching, Deutschland
Kontron Analytical	Kontron Analytical, Eching, Deutschland
Leitz	Ernst Leitz Wetzlar GmbH, Wetzlar, Deutschland
LI-COR Biosciences	LI-COR Biosciences Corporate Offices, Lincoln, USA
Macherey-Nagel	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
MBI-Fermentas	MBI-Fermentas GmbH., St.-Leon-Rot, Deutschland
Merck	MERCK KgaA Diagnostica Deutschland, Darmstadt, Deutschland
Millipore	Millipore GmbH, Eschborn, Deutschland
Molecular Probes	Molecular Probes Inc., Eugene, USA
New England Biolabs	New England Biolabs GmbH, Schwalbach, Deutschland
Nunc	NUNC GmbH, Wiesbaden-Biebrich, Deutschland
Perkin Elmer Life Science	Perkin Elmer Life Science, Inc., Life and Analytical Sciences, Boston, USA
Pharmacia	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Pineda	Pineda, Berlin, Deutschland
Polysciences, Inc.	Polysciences, Inc., Warrington, USA
Promega	PROMEGA Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland
Qiagen	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Raytest	Raytest GmbH, Straubenhardt, Deutschland
Roche	Roche Diagnostics GmbH/Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland

<u>Hersteller</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Roth	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sartorius	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Schleicher & Schuell	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Deutschland
Sanativa	Sanativa Aktiengesellschaft & Co., Werne, Deutschland
Serva	Serva Feinbiochemika GmbH & Co. KG, Heidelberg, Deutschland
Sigma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Sorvall-Du Pont	Sorvall-Du Pont, Bad-Homburg, Deutschland
Stratagene	Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tebu	Tebu, Norwood, USA
Vivascience	Vivascience Limited, Gloucestershire, Großbritannien
Wallac	Laboratorium Prof. Dr. Berthold GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Deutschland
Whatman	Whatman, Springfield Mill, Großbritannien
Zeiss	Zeiss, Oberkochen, Deutschland

3. Methoden

3.1. DNA

3.1.1. DNA-Isolierung

Zur Isolierung der Plasmid-DNA aus prokaryotischen Zellen wurden je nach Mengenbedarf entweder das Fertigsystem für Minipräparationen der Firma Macherey-Nagel oder für Großpräparationen das Fertigsystem der Firma Sigma verwendet. Für Minipräparationen wurden die Bakterienkulturen in 4 ml, für Großpräparationen in 200 ml LB-Medium mit dem für das Plasmid entsprechenden Antibiotikum (Ampicillin: 10 µg/ml, Kanamycin: 5µg/ml) angeimpft und Übernacht bei 37°C und 250 rpm geschüttelt. Die Isolierung der cDNA aus diesen Kulturen erfolgte nach Angaben der Hersteller der Fertigsysteme.

3.1.2. Restriktion von DNA

Die Spaltung von Plasmid-DNA oder PCR-Produkten wurde mit entsprechenden Restriktionsenzymen (siehe Abschnitt 2.2.) und den dazu gehörenden Puffern nach Herstellerangaben durchgeführt. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von DNA-Ladepuffer (Endkonzentration: 5% Glycerin; 10 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 mM EDTA pH 8,0; 0,02% Bromphenolblau (w/v)) abgestoppt.

3.1.3. DNA-Gelelektrophorese

Die Auftrennung und Analyse von DNA-Fragmenten nach der Restriktion bzw. von PCR-Produkten erfolgte nach Zugabe von DNA-Ladepuffer (s.o.) in der Gelelektrophorese-Kammer *Gel Electrophoresis Apparatus GNA-100* (Pharmacia Biotech) auf horizontalen 0,8%-1%igen TBE-Agarosegelen (0,5 x TBE-Puffer pH 8,3: 50 mM Tris-Base; 50 mM Borsäure; 1 mM EDTA). Beim Gießen der Agarosegele wurde zur späteren Detektion der DNA Ethidiumbromid (Endkonzentration: 10 µg/ml, Sigma) hinzugefügt. Die Detektion der DNA nach der Elektrophorese mittels des interkalierenden Ethidiumbromids erfolgte mit dem 256 nm-UV-Leuchttisch UVT 28-M (Herolab).

3.1.4. Isolierung von cDNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die mit Ethidiumbromid angefärbten und durch UV-Illumination sichtbare DNA wurde aus dem Agarosegel mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die DNA wurde anschließend mit dem *Gel Purification Kit* der Firma Qiagen nach Herstellerangaben aus dem Gelstück eluiert.

3.1.5. Ligation von DNA-Fragmenten

Mit Enzymen verdaute PCR-Produkte oder DNA-Fragmente wurden in zwei- bis dreifachem molaren Überschuß zum Vektor mit Hilfe von 1 U T4-DNA-Ligase (Invitrogen Life Technologies) drei Stunden bei Raumtemperatur ligiert, wobei insgesamt 100 ng DNA eingesetzt wurde (10 ng/ μ l). Alternativ wurden PCR-Produkte, die sich nach mehreren Versuchen nicht in den gewünschten Vektor inserieren ließen, zuerst in den *Topo Zero Blunt* Vektor (Promega) nach Herstellerangaben kloniert. Anschließend erfolgte die Umklonierung in den Zielvektor.

3.1.6. Transformation von Bakterien

Für die Transformation von DNA in Bakterien wurden DH5 α -Zellen (Invitrogen Life Technologies) eingesetzt. Es wurden 1 ng Plasmid-DNA oder die entsprechende Menge eines Ligationsansatzes für die Transformation eingesetzt, deren Durchführung nach Angaben des Herstellers erfolgte. Bei bestimmten Klonierungen, bei denen sich die PCR-Produkte nicht mit der vollständigen oder richtigen Sequenz in den Zielvektor klonieren ließen, wurde für die Transformation *Sure[®] 2* kompetente Zellen (Stratagene) verwendet, die im Gegensatz zu DH5 α -Zellen über weniger DNA-Reparatursysteme verfügen. Die Transformation dieser Zellen erfolgte ebenfalls nach Angaben des Herstellers.

3.1.7. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung von DNA-Sequenzen wurden entweder *Pfu*- (Promega) oder *Deep-Vent*-Polymerase (New England Biolabs) verwendet. Beide Polymerasen verfügen über eine Fehlerkorrekturaktivität, mit der sie den Einbau des korrekten Nukleotids bei der Synthese des DNA-Stranges überprüfen. In einem 100 μ l PCR-Ansatz wurden 50 ng cDNA-Matrize, je 20 pmol der Oligonukleotide (Primer), je 250 μ M der Desoxyribonukleosidtriphosphate, 6% DMSO, 1 x Puffer der entsprechenden Polymerase und 2-5 U Polymerase eingesetzt. Der PCR-Ansatz wurde auf Eis zusammenpipettiert. Anschließend erfolgte die Amplifikation im GENEAMP PCR SYSTEM 2400 (Perkin Elmer). Das Programm wurde, je nach Primeranlagerungstemperatur der verwendeten Oligonukleotide und der Länge des zu amplifizierenden Produktes, variabel gestaltet. Im Folgenden ist ein Standardprogramm aufgeführt:

Reaktion	Temperatur	Dauer	Zyklen
Prä-Denaturierung	96°C	5 min	1
Denaturierung	96°C	30 sec	} 20-30
Anlagerung der Primer	55°C-60°C	30 sec	
Polymerase-Reaktion	72°C	1-2 min	
Abschließende Polymerase-Reaktion		72°C	1

3.1.8. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmiden erfolgte im Service-Labor des Instituts für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie (Universitäts-Krankenhaus Eppendorf). Es wurden 500 ng Plasmid-DNA und 15 pmol des entsprechenden Primers für die Sequenzierreaktion eingesetzt.

3.1.9. Radioaktive Markierung von cDNA-Fragmenten

Die als Sonden eingesetzten cDNA-Fragmente wurden durch Restriktion (Abschnitt 3.1.2.) und anschließender Aufreinigung über ein Agarosegel (Abschnitt 3.1.3.) hergestellt. Die Markierung von cDNA-Fragmenten für Northern Blot-Hybridisierungen erfolgte mit dem *PRIME-IT-II-KIT* (Stratagene) nach Angabe des Herstellers, wobei 50 μCi [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP (3000 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech) für einen Ansatz mit 25 ng cDNA eingesetzt wurde. Die Entfernung der Mononukleotide aus dem Reaktionsansatz erfolgte nach Beendigung der Markierungsreaktion durch Gelfiltration mit G-25-Säulen (Amersham Pharmacia Biotech) nach Angaben des Herstellers. Anschließend erfolgte die Quantifizierung des Einbaus von [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP und die Bestimmung der spezifischen Aktivität des markierten Fragmentes durch Flüssigszintillationszählung (Wallac 1409).

3.2. RNA

3.2.1. RNA-Isolierung aus HEK-TeT-On Zellen

Die Zellen einer 10 cm Zellkulturschale wurden mit einem Zellschaber in ihrem Medium abgeschabt, in ein Zentrifugationsgefäß überführt und in einer Biofuge 13 abzentrifugiert (5 min; 1000 x g). Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das Sediment wurde im Lysispuffer des Fertigsystems *RNeasy® Mini Kit* (Qiagen) aufgenommen. Die Zerkleinerung der Zellen erfolgte mit Hilfe des *QIAshredder™* (Qiagen) nach Vorschrift des Herstellers. Die weitere Aufreinigung mit dem Fertigsystem erfolgte nach Angaben des Herstellers, wobei der vom Hersteller empfohlene zusätzliche Schritt des DNaseI-Verdaues auf der Säule ebenfalls durchgeführt wurde, um eine Verunreinigung der RNA mit DNA auszuschließen.

3.2.2. Nicht-denaturierende RNA-Gelelektrophorese

Die Auftrennung und Analyse von RNA-Fragmente erfolgte in der Gelelektrophorese-Kammer *Gel Electrophoresis Apparatus GNA-100* (Pharmacia Biotech) auf horizontalen 0,8%-1%igen TBE-Agarosegelen (0,5 x TBE-Puffer pH 8,7: 50 mM Tris-Base; 50 mM Borsäure; 1 mM EDTA). Die RNA wurde zuvor 10 min bei 70°C erwärmt, auf Eis abgekühlt und mit 10 x RNA-Ladepuffer versetzt bis zu einer Endkonzentration von 1 x RNA-Ladepuffer (5 % Glycerin (w/v), 10 mM Tris-HCl pH 7,8; 1 mM EDTA pH 8,0; 0,02 % Bromphenolblau (w/v)). Die Detektion der RNA erfolgte wie bei der DNA-Gelelektrophorese (Abschnitt 3.1.3.) beschrieben durch Anfärben mit Ethidiumbromid. Die elektrophoretische Auftrennung der RNA dient der Überprüfung, ob die RNA intakt ist. Sie führt jedoch nicht zu einer exakten Auftrennung der RNA nach dem Molekulargewicht.

3.2.3. Denaturierende RNA-Gelelektrophorese

Für die Analyse von radioaktiv markierten in vitro Transkripten wurden horizontale Formaldehydagarosegele (Formaldehyd 3,7 % (v/v); 1 x MOPS-Puffer (s.u.); Agarose 1,25 % (w/v)) verwendet. Nachdem die RNA-Lösung im Verhältnis 1:11 in Probenpuffer (51,3 % Formamid (v/v); 5,7 % Formaldehyd (v/v); 1 x MOPS-Puffer; 13,5 % Saccharose (v/v); 5,6 mM EDTA; 0,01 % Bromphenolblau; 0,01 % Xylene Cyanol) aufgenommen und für 5 min bei 60°C inkubiert wurden, erfolgte die elektrophoretische Auftrennung (*Gel Electrophoresis Apparatus GNA-100*; Pharmacia Biotech) in 1 x MOPS-Laufpuffer (10 x MOPS pH 7,0: 0,2 M MOPS; 40 mM NaOAc; 5 mM EDTA). Die Detektion der radioaktiven RNA-Fragmente

erfolgte über die Exposition des Geles mit einem Röntgenfilm (Agfa Cronex 5) über Nacht bei -80°C .

3.2.4. Northern-Blot-Analyse

Gelelektrophorese:

Die RNA-Lösung mit jeweils 10 μg Gesamt-RNA sowie eine geeignete Menge RNA-Marker (Ambion) wurden getrocknet (*Speed Vac*; Concentrator Savant) und anschließend in 10 μl Glyoxal/DMSO-Puffer (50 % DMSO (v/v), 0,01 M Na-phosphat pH 7,0; 6,75 % Glyoxal (v/v)) aufgenommen. Die Lösung wurde 1 h bei 50°C inkubiert, auf Eis abgekühlt und nach Zufügen von je 2,5 μl Lade-Puffer (43,5 % Glycerin (w/v), 0,01 M Na-phosphat pH 7,0, 0,3 % Bromphenolblau (w/v)) auf ein horizontales 0,01 M Na-Phosphat-1 % Agarosegel (pH 7,0) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanten 80 Volt (*DNA Sub CellTM* Kammer; Bio-Rad) und bei fortwährender Umwälzung des Puffers durch eine Pumpe (Ismatel).

Übertragung der RNA auf eine Nylonmembran:

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die RNA durch Kapillarkraft aus dem Gel auf eine Nylonmembran (Zeta-Probe, Bio Rad) transferiert, die zuvor durch dreimalige Inkubation für 5 Minuten mit H_2O und einmal 10 Minuten mit dem Transferpuffer äquilibriert wurde. Als Transferpuffer wurde 10 x SSC (1,5 M NaCl, 0,15 M Na-Citrat) verwendet. Der Transfer war nach 18-20 h abgeschlossen. Die Membran wurde anschließend 3 h im Vakuum bei 80°C im Vakuumofen VT5042 (Heraeus) gebacken.

Die RNA-Marker Spur, welche vor dem Transfer vom Gel abgetrennt wurde, wurde über Nacht bei 4°C in 0,5 x TBE mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidiumbromid inkubiert. Anschließend erfolgte die Fotodokumentation auf einem 256 nm-UV-Leuchttisch UVT 28-M (Herolab).

Hybridisierung:

Die Membran wurde für 2-3 h bei 42°C im Hybridisierungsöfen (Bachofer Laboratoriumsgeräte) mit 5 ml *ULTRA hybTM*-Lösung (Ambion) prähybridisiert. Anschließend erfolgte die Hybridisierung bei 42°C nach Zugabe von 1×10^6 cpm der mit ^{32}P markierten cDNA-Sonde (siehe Abschnitt 3.1.9.) pro ml Hybridisierungslösung (10 ml Lösung/Membran) über Nacht im Hybridisierungsöfen. Die Membran wurde im folgenden zweimal für 10 min mit 2 x SSC, 0,1 % SDS und einmal für 15 min mit 1 x SSC, 0,1 % SDS bei RT gewaschen. Anschließend wurde die Membran für einmal 15 min mit 0,2 x SSC, 0,1 % SDS bei RT und einmal für 30 min mit 0,2 x SSC, 1 % SDS bei 50°C gewaschen. Die Hybridisierungssignale wurden mit Hilfe eines Phosphoimaging-Systems (Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH) gemessen und quantitativ ausgewertet. Für die Dokumentation wurde die Membran mit einem Röntgenfilm (Fuji-Film) bei -80°C für 1-2 h exponiert.

3.2.5. Herstellung radioaktiv markierter cRNA -Sonden

Linearisierung der DNA-Matrize

Vor der *in vitro* Transkription wurde die DNA-Matrize zunächst mit einem geeigneten Enzym linearisiert und anschließend einmal mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1(v/v/v)) und ein weiteres Mal mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1(v/v)) extrahiert. Nach Fällung der DNA mit 3 Volumina 100 % Ethanol mit einer Endkonzentration von 75 mM Natrium-Acetat (pH 5,2), erfolgte die Zentrifugation in einer Eppendorf-Zentrifuge (Eppendorf; 25000 x g; 30 min). Im folgenden wurde die DNA in 70 % Ethanol (v/v; in RNase-freiem H₂O) aufgenommen und erneut zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Aufnahme in RNase-freiem H₂O (Endkonzentration der DNA: ca. 1 µg/µl).

Transkription

Ein 5 µl *in vitro* Transkriptionsansatz bestand aus folgenden Komponenten: 0,3 µg DNA Matrize; 1 x Polymerase Puffer (für T3-, T7- oder für SP6-RNA-Polymerase, Gibco BRL); 1 mM (für SP6-RNA-Polymerase) oder 5 mM (für T3-,T7-RNA-Polymerase) DTT; je 0,5 mM ATP, CTP und GTP; 10 µM UTP; 50 µCi ³²P-UTP (800 Ci/mmol, Amersham Biosciences); 8 Einheiten *RNase Out* (Gibco BRL) und 10 Einheiten RNA-Polymerase. Jeder Ansatz enthielt 113 pmol UTP. Der Transkriptionsansatz wurde 1 h bei 37°C (T3- und T7-RNA Polymerase) oder bei 40°C (SP6-RNA Polymerase) inkubiert. Anschließend erfolgte der Abbau der DNA-Matrize für 15 min bei 37°C durch Zugabe 1 Einheit RQ-I DNase (Promega). Der Ansatz wurde auf ein Volumen von 74 µl mit RNase-freiem H₂O aufgefüllt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0 abgestoppt. Von dieser Lösung wurden 2 µl zur späteren Bestimmung der synthetisierten RNA-Menge abgenommen. Die restliche Lösung wurde zur Abtrennung der Mononukleotide durch eine *Sephadex G-50 Spin-Column* (Amersham Biosciences) zentrifugiert.

Quantifizierung der Ausbeute radioaktiv markierter cRNAs

Die Bestimmung der Menge an synthetisierter cRNA erfolgte über die Quantifizierung des prozentualen Einbaus des isotonenmarkierten Nukleotids. Um den prozentualen Einbau zu ermitteln, wurde eine Fällung der Nukleinsäuren im Ansatz mittels Trichloressigsäure (TCE) durchgeführt und die Aktivität vor (*Gesamt cpm*) und nach der TCE-Fällung (*TCE-fällbare cpm*) bestimmt. Für die TCE-Fällung wurden jeweils 10 µl einer 1:50 verdünnten Lösung auf einen Whatman GF/C Filter getropft und 15 min getrocknet. Anschließend erfolgte die Fällung von Makromolekülen in 10 % TCE, 1 % Na-Pyrophosphat für dreimal 5 Minuten bei 4°C. Während dieses Schrittes bleiben Makromoleküle an den Filter gebunden, während Mononukleotide in Lösung bleiben. Anschließend wurden die Filter in 100 % Ethanol für 5 min bei 4°C gewaschen. Für die Bestimmung der insgesamt eingesetzten Menge an Aktivität im Ansatz (*Gesamt cpm*) wurden ebenfalls 10 µl Lösung einer 1:50 Verdünnung auf einen zweiten Filter getropft. Eine TCE-Fällung wurde in diesem Fall nicht durchgeführt. Die Aktivität der Filter wurde durch Flüssigszintillationszählung (Wallac 1409) in Szintillationsflüssigkeit gemessen. Der prozentuale Einbau und die synthetisierte RNA-Menge errechnet sich unter der Annahme, dass alle vier Ribonukleotide zu gleichen Anteilen vorliegen, wie folgt:

$$\begin{aligned}
 \text{Einbau [\%]} &= \text{TCE [cpm]} \times 100 \% : \text{Gesamt [cpm]} \\
 \text{eingebaute UTP-Menge [pmol]} &= 113 \text{ pmol} \times \% \text{ Einbau} : 100 \\
 \text{Summe eingebauter Nukleotide [pmol]} &= \text{eingebaute UTP-Menge} \times 4 \\
 \text{Synthetisierte Menge RNA [\mu g]} &= \text{Summe eingebauter Nukleotide [pmol]} : 3225 \text{ pmol}
 \end{aligned}$$

Durch Bestimmung der TCE-fällbaren Aktivität der durch Gelfiltration gereinigten RNA (siehe Transkription) konnte schließlich die Konzentration der *in vitro* synthetisierten cRNA-Sonde ermittelt werden.

Die *in vitro* Transkripte wurden vor ihrem Einsatz als Sonde in UV-Quervernetzungsanalysen auf einem denaturierenden Agarosegel (Abschnitt 3.2.3.) hinsichtlich ihrer korrekten Größe überprüft.

3.2.6. Herstellung von Biotin-markierter cRNA

Die Synthese Biotin-markierter RNA erfolgte im großen Maßstab durch *in vitro* Transkription mit dem *Ribo MAXTM Large Scale RNA Production System-T7* (Promega) nach Herstellerangaben. Ein 200 µl Transkriptionsansatz beinhaltete folgende Komponenten: 1 x Puffer (aus dem Fertigsystem); je 15 µl der vier Ribonukleosidtriphosphate ATP, GTP, UTP, CTP (aus dem Fertigsystem); 0,3 mM Biotin-markiertes-UTP (Boehringer Mannheim); 10 µg DNA Matrize (siehe Abschnitt 3.2.5) und 20 µl Enzym-Mix (aus dem Fertigsystem). Der Ansatz wurde 4 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte ein 15 Minuten langer RQ-I DNase -Verdau (1 Einheit/µg eingesetzter DNA-Matrize; aus dem Fertigsystem) bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA pH 8,0 (Endkonzentration: 10 mM) gestoppt. Zur Abtrennung der Mononukleotide wurden die *in vitro* Transkripte mittels des *RNeasy Midi Kits* (Qiagen) nach Herstellerangaben gereinigt. Die RNA Konzentration wurde spektralphotometrisch bestimmt, indem die Extinktion bei 260 nm mittels eines Bio Photometers (Eppendorf) gemessen wurde. Alle *in vitro* Transkripte wurden durch eine nicht-denaturierende Agarosegelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.2.2.) auf korrekte Größe und Integrität geprüft.

3.2.7 Herstellung von cRNA für Wettbewerbsanalysen

Ein 20 µl *in vitro* Transkriptionsansatz bestand aus folgenden Komponenten: 2 µg linearisierte DNA Matrize; 1 x Polymerase Puffer (T3-, T7- oder SP6-RNA-Polymerase von Gibco BRL); 1 mM (für SP6-Polymerase) oder 5 mM (für T3-,T7-RNA-Polymerase) DTT; je 0,5 mM ATP, CTP, GTP und UTP; 8 Einheiten RNase Out (Gibco BRL); 30 Einheiten RNA-Polymerase. Um die exakte Quantifizierung der *in vitro* Transkripte durch TCE-Präzipitation (Abschnitt 3.2.6.) zu ermöglichen, enthielt der Ansatz zusätzlich 0,5 µl ³²P-UTP (800 Ci/mmol, 20 mCi/ml Amersham Biosciences). Die *in vitro* Transkription wurde, ebenso wie die Reinigung und Ausbeutebestimmung der synthetisierten cRNA, wie bereits in Abschnitt 3.2.5. dargestellt, durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Überprüfung der *in vitro* Transkripte auf einem Agarosegel (siehe Abschnitt 3.2.2.).

3.3. Protein

3.3.1. Herstellung von S-100 Fraktionen aus Geweben

Die Gewebe wurden adulten Wistar Ratten entnommen und in 5-fachem Volumen kaltem Puffer 1 (10 mM HEPES pH 7,8; 1 mM K-Acetat; 1,5 mM EDTA; 2 mM DTT; 2 % Glycerin (v/v); 1x Proteaseinhibitor (*CompleteTM*, Roche)) mit Hilfe eines Ultraturrax mechanisch zerkleinert. Nachdem die Freilegung der Zellkerne durch eine optische Überprüfung im Mikroskop belegt wurde, erfolgte die Zentrifugation des Homogenats für 10 Minuten in einer SORVALL®Superspeed RC-5B-Kühlzentrifuge (Du Pont) bei 16500 x g und 4°C. Der Überstand wurde in Ultrazentrifugengefäße überführt und bei 100000 x g 1h in einer L7-Ultrazentrifuge (Beckmann) zentrifugiert. Die resultierende S-100 Fraktion wurde abgenommen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.3.2. Herstellung von S-100 Fraktionen aus eukaryotischen Zelllinien

Für die Präparation von S-100 Fraktionen aus Zelllinien wurden jeweils fünf konfluent bewachsene Petrischalen mit 14 cm Durchmesser verarbeitet. Die Zellen wurden mit 13 ml PBS pro Schale gewaschen und in je 10 ml PBS mit Hilfe eines Zellschaber abgelöst. Nach Überführung in ein 50 ml Zentrifugationsgefäß wurde die Zellsuspension bei 2500 x g und 4°C (Megafuge; Heraeus Sepatech) für 5 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 5-fachem Volumen kalten Puffer 1 (siehe 3.3.1.) aufgenommen und mit Hilfe eines Glashomogenisators nach Dounce (Pistill eng eingepaßt) homogenisiert. Die Freisetzung der Zellkerne wurde mikroskopisch überprüft. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 16500 x g für 10 min bei 4°C (SORVALL®Superspeed RC-5B-Kühlzentrifuge, Du Pont). Der resultierende Überstand wurde abgenommen und für 1 h bei 4°C und 100000 x g (L7-Ultrazentrifuge, Beckmann) zentrifugiert. Der Überstand (S-100-Fraktion) wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.3.3. Bestimmung der Protein-Konzentration

Für die Bestimmung der Protein-Konzentration wurde das *Protein Assay Reagent* (Bio-Rad) nach Angaben des Herstellers verwendet. Als Standard diente BSA (0,5 mg/ml), welches in einer Eichreihe mit 7 Werten von 0-10 µg in 20 µl H₂O eingesetzt wurde.

3.3.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinlösungen wurden mit 5 x Laemmli-Puffer (Endkonzentration: 80 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2 % SDS; 0,1 M DTT; Laemmli *et al.*, 1970) versetzt und 10 min bei 80-100°C inkubiert. Anschließend wurden sie auf 8-15 %ige SDS-Polyacrylamidgele (Laemmli *et al.*, 1970) aufgetragen und bei 200 Volt in 1 x SDS-Laufpuffer (25 mM Tris-Base; 19,2 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS) in einer Mini-PROTEAN®II Elektrophoresekammer (Bio-Rad) für 30-50 min aufgetrennt. Die Größe der aufgetrennten Proteine wurde anhand von Längenstandards (FULL RANGE Rainbowmarker von Amersham Biosciences, BenchMark von Invitrogen) ermittelt. Die Gele wurden anschließend entweder mit dem Reagenz *Roti-Blue* (Roth) nach Herstellerangaben gefärbt, oder die Proteine wurden für Westernblot-Analysen aus den Gelen auf Nitrocellulose-Membranen transferiert (Abschnitt 3.3.5. und 3.3.6.).

3.3.5. Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrocellulose-Membranen

Die durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden elektrophoretisch mit einem *Semi-Dry Blotter* (Merck) nach Anleitung der Hersteller auf PROTRAN® Nitrocellulose-Membranen (Schleicher & Schuell) übertragen. Der Transfer erfolgte in Transferpuffer (50 mM Tris; 30 mM Glycin; 10% Methanol (v/v); Tobwin *et al.*, 1979) bei maximal 30 Volt und 150 mA für 40-60 min. Der Erfolg des Transfers wurde durch eine 1 minütige Anfärbung der Proteine auf der Nitrocellulose-Membran mit Hilfe von *Ponceau S Solution* (Sigma) überprüft.

3.3.6. Immunologische Detektion von Proteinen auf Nitrocellulose-Membran (Western-Blot)

Die Nitrocellulose-Membran mit den transferierten Proteinen wurde 1 h bei RT und leichtem Schütteln in Blockierlösung (0,3 % Tween 20 (w/v); 10 % Magermilchpulver (w/v) in 1 x PBS pH 7,4) inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem gewünschten 1. Antikörper, der jeweils in der für ihn spezifischen Konzentration (Abschnitt 2.8.) in Blockierlösung verdünnt wurde, über Nacht bei 4°C und leichtem Schütteln inkubiert. Die Membran wurde mit PBS-T-Puffer (0,3% Tween 20 (w/v) in 1 x PBS pH 7,4) dreimal für jeweils 10 Minuten (Ausnahme: Anti-Neurophysin II RN#4 Antikörper; 3 x 15 min) gewaschen und mit einem geeigneten Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Abschnitt 2.8.), der ebenfalls in Blockierlösung verdünnt wurde, für 2 h bei RT und leichtem Schütteln inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen der Membran in PBS-T-Puffer für jeweils 10 Minuten erfolgte die Detektion des Sekundärantikörpers mittels des *ECLTM Western Blotting Analysis System* (Amersham Pharmacia) nach Angaben des Herstellers. Das Ergebnis wurde mit Hilfe eines Agfa Cronex 5-Röntgenfilmes (Agfa) dokumentiert.

3.3.7. Gekoppelte *in vitro* Transkription und Translation

Für die *in vitro* Translation von Proteinen in Reticulocytenslysat vom Kaninchen wurde das *TNT® Quick Coupled Transcription/Translation System* (Promega) verwendet. Das System zeichnet sich dadurch aus, daß Transkription und Translation in einem Reaktionsansatz durchgeführt werden können. Die Menge an synthetisiertem Protein kann anhand des im Reaktionsansatz enthaltenen bzw. des ins Protein eingebauten ³⁵S-Methionins quantifiziert werden. Für die *in vitro* Transkription/Translation wurden die Plasmide PABP in pSP64poly(A), PABP-RRM 1+2 in pSP64poly(A), PABP-RRM 2+3 in pSP64poly(A) und PABP-RRM 3+4 in pSP64poly(A) (siehe 2.8.) verwendet. Die DNA-Matrizen wurden vor der Zugabe zum Reaktionsansatz mit einem geeigneten Restriktionsenzym am 3'-Ende linearisiert. Die *in vitro* Transkription/Translation und die anschließende Berechnung des Einbaus der mit ³⁵S markierten Methionin-Reste in das translatierte Protein wurde nach dem Protokoll der Herstellerfirma durchgeführt. Die Menge und Konzentration des jeweiligen Translationsproduktes wurde schließlich unter Berücksichtigung der Anzahl von Methionin-Resten im Proteinmolekül berechnet. Anschließend erfolgte die Auftrennung der synthetisierten Proteine durch SDS-Gelelektrophorese, um durch Autoradiographie die korrekte Synthese der Proteine anhand ihrer Molekulargewichte zu überprüfen.

3.3.8 Depletion von rPABP aus der S-100 Fraktion eines Homogenates aus Rattenhirn

Antikörperkopplung an *Dynabeads® Protein A*

Für die vollständige Depletion des rPABP war es notwendig, den gegen dieses Protein gerichteten Antikörper im Überschuß einzusetzen. 20 µg des Kaninchen αPABP Antikörpers bzw. 20 µg Immunglobulin G aus dem Kaninchen als Kontrolle wurden an magnetische *Dynabeads® Protein A* (DynaL Biotech; 250 µl pro Ansatz) gebunden. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Vor der Kopplung wurden je 125 µl Dynabeads viermal mit je 1 ml PBS-T (PBS pH 8,0 (137 mM NaCl; 2,6 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,7 mM KH₂PO₄), 0,1 % (v/v) Tween) gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation des Reaktionsgemisches aus Antikörper und *Dynabeads* in 125 µl PBS, pH 8,0 über Nacht bei 4°C unter Rotation (*Specimen Rotator Fixed 220/240V*, Polysciences Inc.).

Nach Abnahme des Überstandes wurden die *Dynabeads* viermal in je 1 ml PBS-T gewaschen. Schließlich wurden die mit Antikörper beladenen *Dynabeads* in 180 µl PBS-T aufgenommen.

Depletion

Für die Depletion wurden je 10 µl der mit Antikörper-beladenen *Dynabeads* verwendet (s.o.). Sie wurden mit je 60 µg Protein (S-100 Fraktion eines Homogenates aus Rattenhirn) in einem Volumen von 60 µl in Puffer 1 (10 mM HEPES pH 7,8; 40 mM KCl; 1,5 mM EDTA; 2 mM DTT; 2 % Glycerin (w/v); 1x Proteaseinhibitor (*CompleteTM*, Roche)) über Nacht bei 4°C unter Rotation. Der Überstand wurde von den *Dynabeads* getrennt, in Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Der Erfolg der Depletion des rPABP wurde anhand einer Westernblot-Analyse (3.3.4.-3.3.6.) überprüft.

3.3.9 Immunpräzipitation von rPABP-Vasopressin-cRNA-Komplexen

Zunächst wurde eine UV-Quervernetzung (3.6.1.) mit der S-100 Fraktion eines Homogenates aus Rattenhirn durchgeführt, um das rPABP mit der VP-cRNA-Sonde (3.2.5.) kovalent zu verbinden. Für dieses Experiment war es notwendig, daß für die Immunpräzipitation der Komplexe mit dem Kaninchen α -PABP Antikörper bzw. dem Kaninchen IgG als Kontrolle dasselbe Ausgangsmaterial eingesetzt wurde. Daher wurde zunächst die UV-Quervernetzungsanalyse in einem Ansatz durchgeführt. Er enthielt 40 fmol cRNA, 140 µg Protein (S-100 Fraktion eines Homogenates aus Rattenhirn) in 120 µl Bindungspuffer (10 mM HEPES pH 7,8; 4 % Glycerin (w/v); 40 mM KCl; 1,5 mM EDTA pH 8,0; 2 mM DTT; 6,7 µg/ml Hefe tRNA; 2,5 mg/ml Heparin). Nach 20 minütiger Inkubation des Ansatzes bei RT wurde der Reaktionsansatz in einem *UV-crosslinker* (Stratagene) mit UV-Licht bestrahlt (254 nm, 1200 mJ). Anschließend erfolgte ein 10 minütiger Verdau mit RNase A Typ IIA (80 µg, Sigma).

Für die Immunpräzipitation wurden zunächst Kaninchen α -PABP Antikörper bzw. Kaninchen IgG als Kontrolle an *Dynabeads[®] Protein A* gekoppelt (siehe 3.3.8.). Von der vorbereiteten Lösung aus mit Antikörper beladenen *Dynabeads* in PBS-T (180 µl) wurden pro Immunpräzipitationsansatz 45 µl eingesetzt. Der Überstand wurde entfernt. Anschließend wurden jeweils 45 µl des UV-Quervernetzungsansatzes (dies entspricht je 15 fmol cRNA und je 52,5 µg Protein) zu den mit Antikörper gekoppelten *Dynabeads* gegeben. Die Ansätze wurden über Nacht bei 4°C rotiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen. Die *Dynabeads* wurden viermal mit je 1 ml PBS pH 8,0 (137 mM NaCl; 2,6 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,7 mM KH₂PO₄) gewaschen.

Die *Dynabeads* wurden in 1 x Laemmli-Probenpuffer (Laemmli *et al.*, 1970) aufgenommen und für 10 min gekocht. Anschließend erfolgte eine SDS-Gelelektrophorese (3.3.4.). Die radioaktiv markierten Protein-cRNA-Komplexe wurden nach Trocknen des Geles durch Autoradiographie detektiert.

3.3.10 Immunpräzipitation von Protein-cRNA-Komplexen

Für dieses Experiment wurden Teilsequenzen der cDNA des rPABP in HEK 293-Zellen exprimiert (Abschnitte 3.4.4.-3.4.5.). Die exprimierten Proteine enthielten ein Vektor-kodiertes Flag-Tag. Mit diesen Proteinen und der über *in vitro* Transkription hergestellten (Abschnitt 3.2.5.) und mit ^{32}P -markierten Vasopressin-cRNA wurde eine UV-Quervernetzung (Abschnitt 3.6.1.) durchgeführt. Die gebildeten Protein-cRNA-Komplexe wurden anschließend über das Flag-Tag mit *EZ viewTM Red ANTI-FLAG[®] M2 Affinity Gel* (Sigma) präzipitiert. Die präzipitierten Protein-cRNA-Komplexe wurden in einer SDS-Gelelektrophorese (3.3.4.) aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert (Abschnitt 3.3.5.) und mittels Autoradiographie detektiert. Anschließend wurde mit derselben Nitrocellulose-Membran eine Westernblot-Analyse (3.3.6.) mit einem monoklonalen Maus anti-Flag-Tag Antikörper durchgeführt, um die erfolgreiche Immunpräzipitation aller Proteine, auch derjenigen, die keinen Komplex mit der radioaktiv markierten cRNA ausgebildet haben, zu dokumentieren.

Für die UV-Quervernetzung wurden 120 µg Gesamtprotein und 15 fmol ^{32}P -markierter cRNA eingesetzt. Die Bindungspartner wurden in 45 µl Bindungspuffer (10 mM HEPES pH 7,8; 4 % Glycerin (w/v); 40 mM KCl; 1,5 mM EDTA pH 8,0; 2 mM DTT; 6,7 µg/ml Hefe tRNA; 2,5 mg/ml Heparin.) für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestrahlung des Reaktionsansatzes in einem *UV-crosslinker* (Stratagene) mit UV-Licht (254 nm, 1200 mJ). Abschließend wurde ein 10 minütiger Verdau mit RNase A Typ IIA (30 µg/Ansatz) durchgeführt.

Für die Immunpräzipitation wurde das *EZ viewTM Red ANTI-FLAG[®] M2 Affinity Gel* (20 µl pro Präzipitationsansatz, Sigma) viermal in je 1 ml PBS pH 8,0 aufgenommen und abzentrifugiert (835 x g, 4°C, 5 min). Anschließend erfolgte die Aufnahme des Sedimentes in Präzipitationspuffer (2 mM DTT; 10 mM HEPES pH 7,8; 5 mM KCl; 1 x Proteaseinhibitor (*CompleteTM*, Roche); 0,01 % Triton). Nach erneuter Sedimentierung mittels Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, und der UV-Quervernetzungsansatz wurde hinzugefügt. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte über Nacht bei 4°C und Rotation. Nach einer kurzen Zentrifugation (835 x g, 4°C, 5 min) des Ansatzes wurde der Überstand abgenommen.

Das Gel wurde anschließend dreimal in je 250 µl Präzipitationspuffer aufgenommen und abzentrifugiert (835 x g, 4°C, 5 min). Anschließend wurde das Gel in Laemmli-Probenpuffer (Laemmli *et al.*, 1970) aufgenommen und für 10 min gekocht. Schließlich erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Immunpräzipitate auf einem SDS-Gel sowie die Detektion der Protein/RNA-Komplexe bzw. der Flag-Tag-Fusionsproteine wie oben dargestellt.

3.3.11 Deglykosylierung von Proteinen mit N-Glycosidase F*

Für die Deglykosylierung wurden cytosolische Proteinextrakte transfizierter Zellen eingesetzt sowie als Kontrolle Kaninchen Immunglobulin G (IgG). Dazu wurden 4 Teile der Proteinlösungen mit 1 Teil 5-fach konzentriertem Denaturierungspuffer (Endkonzentration: 0,1 M 2-Mercaptoethanol, 0,1 % (w/v) SDS) gemischt und für 5 min bei 90°C inkubiert. Nach dem Abkühlen erfolgte die Deglykosylierung, die über Nacht in 25 µl-Ansätzen bei 35°C durchgeführt wurde. Jeder Ansatz enthielt 22,8 µg cytosolischen Proteinextrakt, 60 mM Tris-HCl, pH 8,6, 0,06 % (w/v) SDS, 60 mM 2-Mercaptoethanol, 0,8 % (v/v) NP-40 sowie Glycosidase F (0,5 Einheiten pro Ansatz). Ein zweiter Ansatz enthielt kein Enzym. Die Deglykosylierung von Kaninchen IgG erfolgte in identischer Weise, jedoch enthielten die Ansätze lediglich je 4 µg Protein. Die Reaktion wurde durch Zugabe von je 6,25 µl 5-fach konzentriertem Laemmli Probenpuffer und Inkubation der Ansätze für 10 min bei 80°C beendet. Die Proteine wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt (3.3.4.). Zur Immundetektion (3.3.6.) wurden die Proteine des cytosolischen Extraktes auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert (3.3.5.). Das SDS-Gel, das die Kaninchen IgG-Ansätze enthielt, wurde mit kolloidalem Coomassie (Roti-Blue, Roth) nach Angaben des Herstellers gefärbt.

3.4. Zellkultur: Molekularbiologische und biochemische Methoden

3.4.1. Kultivierung von HEK 293-Zellen (Human Embryonic Kidney Cells)

HEK 293-Zellen wurden in 10 cm Petrischalen in einer Zellzahl von 3×10^6 in DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's media*) mit 10% Fötalem Kälberserum (FCS: *Fetal calf serum*), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin ausplattiert und bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank (Forma Scientific) inkubiert. Nach zwei bis drei Tagen wurden die konfluent gewachsenen Kulturen geteilt. Dazu erfolgte ein einmaliges Waschen der Zellen mit 5 ml PBS pH 7,2. Nach erneuter Zugabe von 5 ml PBS wurden die Zellen durch Klopfen an den Gefäßboden abgelöst. Anschließend wurden sie für 5 min bei 1000 x g und RT zentrifugiert (Labofuge GL, Heraeus), in Wachstumsmedium suspendiert und gezählt. Die Zählung erfolgte in einer Doppel-Neubauer Zählkammer.

3.4.2. Kultivierung von PC12-Zellen

PC12-Zellen wurden in DMEM, das 10 % Pferdeserum, 5% FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin enthielt, in 10 cm Schalen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Umsetzung erfolgte nach ca. 4-5 Tagen. Die Zellen wurden einmal mit 5 ml PBS pH 7,2 gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin-Lösung (0,25 % (v/v) in PBS pH 7,2) versetzt. Nach ihrer Ablösung vom Boden des Kulturgefäßes wurden 2 ml Medium hinzugefügt, und die Zellen wurden in ein Zentrifugationsgefäß überführt. Die Zentrifugation erfolgte für 5 min bei 1000 x g und RT (Labofuge GL, Heraeus). Das Zellsediment wurde in Wachstumsmedium aufgenommen. Es wurden $2,2-5 \times 10^6$ der Zellen pro 10 cm Schale ausplattiert.

3.4.3. Kultivierung von RatI-Zellen und NIH 3T3-Zellen

RatI- und NIH 3T3- Zellen wurden wie HEK 293-Zellen kultiviert (siehe Abschnitt 3.4.1.). Das Umsetzen der Zellen erfolgte wie für PC12-Zellen beschrieben nach Trypsinierung (siehe Abschnitt 3.4.2.).

3.4.4. Kultivierung von HEK 293-Tet On-Zellen

HEK 293-Zellen wurden in Medium aus 95 % (v/v) DMEM, 5 % (v/v) FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 100 µg/ml Geneticin gehalten. Die Umsetzung erfolgte alle drei bis vier Tage nach Trypsinierung (siehe Abschnitt 3.4.2.).

3.4.5. Transfektion von HEK 293-Zellen mit *Poly-Fect* (Qiagen)

HEK 293-Zellen wurden in einer Zelldichte von $2,4 \times 10^6$ pro 10 cm Petrischale ausplattiert. Nach 24 h Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ erfolgte die Transfektion eukaryotischer Expressionsvektoren mit Hilfe des Reagenz *Poly-Fect* (Qiagen) nach Herstellerangaben. In der Regel wurden die Zellen für weitere 48 h im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

3.4.6. Herstellung von Proteinextrakten aus transfizierten HEK 293-Zellen

Methode 1:

Transfizierte HEK 293-Zellen wurden mit 5 ml PBS pH 7,2 pro 10 cm Kulturschale gewaschen. Anschließend erfolgte das Ablösen der Zellen in 5 ml PBS mit Hilfe eines Zellschabers. Die Zellsuspensionen von drei Zellkulturschalen, die zuvor mit demselben Vektor transfiziert wurden, wurden in einem Zentrifugationsgefäß vereinigt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Zellen bei $2506 \times g$, 4°C für 15 min (Megafuge, Heraeus). Das Zellsediment wurde in 100 µl Lysispuffer (2 mM DTT; 10 mM HEPES pH 7,8; 5 mM KCl; 1 x Proteaseinhibitor (CompleteTM, Roche); 0,01 % (w/v) Triton X-100) aufgenommen und in einen 1 ml Glashomogenisator nach Dounce (Wheaton, USA) überführt. Nach der Homogenisierung erfolgte die mikroskopische Überprüfung der Freisetzung der Kerne. Das Homogenat wurde anschließend in einer Eppendorffzentrifuge (Eppendorf) bei $25000 \times g$, 4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Methode 2:

Für die Herstellung eines Proteinextraktes aus transfizierten HEK-Tet On-Zellen wurden die Zellen einer 10 cm Kulturschale mit einem Zellschaber in Medium abgelöst und in ein Zentrifugationsgefäß überführt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 5 min bei RT und $1000 \times g$ (Labofuge GL, Heraeus). Das Zellsediment wurde einmal mit 10 ml PBS pH 7,2 gewaschen und nach erneuter Zentrifugation und Abnahme des Überstandes in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend erfolgte die Aufnahme des Zellsediments in 100 µl Lysispuffer 2 (2 mM DTT; 10 mM HEPES pH 7,8; 5 mM KCl; 1 x Proteaseinhibitor (CompleteTM, Roche); 0,02 % (w/v) Triton X-100). Die Homogenisation der Zellen erfolgte durch 15-maliges Aufziehen in einer 1 ml Spritze mit einer aufgesetzten Kanüle (23 gauge). Die Freisetzung der Kerne wurde mikroskopisch kontrolliert.

Das Homogenat wurde anschließend in einer Eppendorffzentrifuge (Eppendorf) bei 25000 x g, 4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.4.7. Fixierung von HEK 293-Zellen auf Deckgläschen für immuncytochemische Analysen

Auf Deckgläschen in 12-Lochschalen kultivierte Zellen ($0,2 \times 10^6$ Zellen/cm²) wurden zunächst vorfixiert, um ein Abschwimmen der semiadhärenten Zellen zu vermeiden. Dazu wurde dem Medium das gleiche Volumen an Fixierlösung (4% Paraformaldehyd (w/v), 4% Saccharose (w/v) in 1 x PBS pH 7,2) hinzugefügt, und die Schalen wurden 5 min bei RT inkubiert. Nach dem Entfernen der Lösung wurde jeweils 1ml der Fixierlösung pro Napf auf die Deckgläschen gegeben und für weitere 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen zweimal für 5 min mit je 2 ml 4 % Saccharose (w/v) in PBS pH 7,2 gewaschen. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte durch die Inkubation mit je 2 ml 0,3 % Triton X-100 (w/v) in PBS für 5 min. Nach der Permeabilisierung wurde die Lösung abgesaugt, und es wurde eine UV-Quervernetzung (1200 mJ, Stratagenelinker) durchgeführt. Anschließend wurden die Deckgläschen zweimal für 5 min mit PBS gewaschen und sofort für immuncytochemische Analysen eingesetzt.

3.4.8. Immuncytochemische Analyse

Die Deckgläschen mit den fixierten Zellen wurden mit der Zellseite nach unten für 1 h in 60 µl Blockierlösung (10 % (v/v) Ziegenserum, 0,1 % (w/v) BSA, 0,1 % (v/v) Tween-20 in PBS pH 7,2) gelegt, die zuvor auf einem mit Parafilm überzogenen Objektträger pipettiert wurde. Anschließend wurden die Deckgläser in 60 µl Primärantikörperlösung (Primärantikörper verdünnt in Blockierlösung; Verdünnung je nach eingesetztem Antikörper siehe Abschnitt 2.9.) über Nacht bei 4°C inkubiert. Es erfolgte ein fünffacher Waschschrift mit je 2 ml 0,1 % (w/v) Tween-20 in PBS pH 7,2 für je 10 min. Sodann wurden die Deckgläser in je 60 µl Sekundärantikörperlösung (Sekundärantikörper verdünnt in Blockierlösung; Verdünnung je nach eingesetztem Antikörper verschieden, siehe Abschnitt 2.9.) für 2-3 h bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Deckgläser fünfmal mit je 2 ml 0,1 % (w/v) Tween-20 in PBS pH 7,2 gewaschen. Im letzten Waschschrift wurde der Waschlösung DAPI in einer Endkonzentration von 10^{-5} mg/ml hinzugefügt, um die Zellkerne anzufärben. Die Deckgläschen wurden abschließend mit *FluoroGuard Antifade Reagent* (BIO-RAD) eingedeckelt, mit Nagellack am Objektträger fixiert und unter dem Mikroskop betrachtet.

3.5. Biochemische Reinigung des Vasopressin-mRNA-Bindungsproteins (VP-RBP)

3.5.1. Herstellung einer S-90 Fraktion aus Homogenaten des Rattenhirns

Es wurden 30 Gramm Rattengehirn auf Eis mechanisch vorzerkleinert. Die Gehirnstücke wurden in 150 ml eiskaltem Puffer (1 mM K-Acetat; 1.5 mM Mg-Acetat; 2 mM DTT; 10 mM HEPES pH 7,8; 1 x Proteaseinhibitor (*CompleteTM*, Roche)) mit einem Glashomogenisator nach Dounce (40 ml, Wheaton, USA) in ca. 40 ml-Portionen homogenisiert. Die Freisetzung der Zellkerne wurde mikroskopisch überprüft. Das Homogenat wurde auf SS 34-Zentrifugationsgefäße verteilt und in der SORVALL®Superspeed RC-5B-Kühlzentrifuge (Du Pont) bei 16500 x g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Nach der Abdekantierung des Überstandes in ein vorgekühltes Becherglas wurden die Sedimente in 100 ml Puffer erneut homogenisiert, und der Zentrifugenschritt wurde wiederholt. Die Überstände wurden vereint. In sechs AH 629-Zentrifugationsgefäßen wurde jeweils eine 5 ml Saccharoselösung (Puffer + 30 % (w/v) Saccharose als Kissen) vorgelegt, auf die der Überstand vorsichtig geschichtet wurde. Es erfolgte eine Zentrifugation in einer L7-Ultrazentrifuge (Beckmann) bei 90000 x g, 4°C für 3,5 h. Die Überstände (S-90 Fraktionen) wurden abgenommen und in einen vorgekühlten Glasmeßzylinder pipettiert, um das Volumen zu bestimmen.

3.5.2. Ausfällen von Proteinen mit Ammoniumsulfat

Im weiteren Verlauf der Proteinreinigung wurden die Proteine gefällt, indem die S-90 Fraktion mit Ammoniumsulfat versetzt wurde (Endkonzentration: 45 % Sättigung bei 4°C (S. Englard *et al.*, 1990)). Die Ammoniumsulfatkonzentration, bei der das VP-RBP in großen Mengen ausfällt, wurde in Vorversuchen ermittelt. Nach der Fällung wurde der Ansatz auf sechs Zentrifugationsgefäße verteilt und in der Megafuge (Heraeus) bei 2506 x g, 4°C für 30 min zentrifugiert. Nach Abnahme der Überstände wurden die Sedimente in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zum nächsten Reinigungsschritt bei -80°C gelagert.

3.5.3. Entsalzen von Proteinlösungen

Um die mit Ammoniumsulfat gefällten Proteine zu entsalzen, wurden die Sedimente in je 3 ml Puffer 2 (10 mM HEPES pH 7,8; 10 mM NaCl; 2 mM DTT; 1 mM EDTA; 2% (w/v) Glycerin, 0,5 mM PMSF (Phenylmethylsulfonyl-Fluorid)) gelöst. Das Entsalzen von je 1,5 ml erfolgte über eine 5 ml *Hi Trap Desalting* Säule (Amersham Biosciences) in Puffer 2 nach Angaben des Herstellers.

Die resultierende Proteinlösung wurde entweder direkt für eine Heparinsäulenchromatographie eingesetzt, oder sie wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.5.4. Heparinsäulenchromatographie

Um das VP-RBP weiter zu reinigen, wurde eine Chromatographie mit Heparin als Liganden durchgeführt. Dazu wurde eine 5 ml *HiTrap Heparin* Säule (Amersham Biosciences) verwendet. Das Prinzip der Auftrennung von Proteinen anhand dieser Chromatographie beruht auf Ionenaustausch, da Heparin negativ geladen ist. Die Säule wurde mit 50 ml Puffer 2 (3.5.3.) äquilibriert. 4 ml der entsalzten Proteinlösung (3.5.3.) wurde mit Hilfe einer sterilen 5ml Einwegspritze 4 Mal auf die Säule aufgetragen. Danach erfolgte die Entfernung ungebundener Proteine durch Waschen der Säule mit 50 ml Puffer 2. Gebundene Proteine wurden mit einem aufsteigendem NaCl-Stufengradienten (0,1 M, 0,2 M, 0,3 M, 0,4 M und 0,5 M NaCl in Puffer 2) von der Säule eluiert, wobei das Eluat innerhalb einer Konzentrationsstufe in 7 einzelnen Fraktionen mit einem Volumen von 1,5 ml aufgefangen wurde.

3.5.5. Affinitätschromatographie

Für die spezifische Reinigung des VP-RBP wurden biotinylierte VP-Transkripte (Abschnitt 3.2.6.) an Streptavidin-beschichtete paramagnetische Partikel (Promega) gekoppelt, die mit den entsalzten Fraktionen einer Heparinsäulenchromatographie (siehe 3.5.4. und 3.5.3.) inkubiert wurden. Die Proteine, die spezifisch an die VP-Transkripte gebunden hatten, konnten nach mehreren Waschschritten, wobei man die magnetischen Eigenschaften der paramagnetischen Partikel ausnutzte, mit 1 M NaCl oder SDS eluiert werden.

Kopplung der biotinylierten VP-cRNA an Streptavidin-beschichtete paramagnetische Partikel

Für eine präparative Reinigung wurden 6 ml mit Streptavidin beschichtete paramagnetische Partikel (1 mg/ml, Promega) eingesetzt. Diese wurden zunächst dreimal mit je 10 ml PBS pH 7,4 gewaschen. Anschließend erfolgte die Kopplung der biotinylierten VP-Transkripte. Dazu wurden 3000 pmol RNA zusammen mit 250 μg Hefe tRNA in insgesamt 10 ml PBS gegeben. Zur Bestimmung der Konzentration der Nukleinsäuren durch Messung der Extinktion bei 260 nm (OD_{260}) wurden von dieser Lösung 20 μl abgenommen, um nach der Kopplung die Kopplungseffizienz zu bestimmen. Anschließend wurde die Lösung zu den paramagnetischen Partikel gegeben. Der Ansatz wurde 30 min bei RT unter Rotation inkubiert. Der Überstand, der nicht gebundene RNA-Moleküle enthielt, wurde abgenommen. Die paramagnetischen Partikel wurden mit Hilfe eines Magneten an der Gefäßwand fixiert.

Von der Überstandslösung wurden ebenfalls 20 µl zur Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration nach erfolgter Kopplung abgenommen. Aus der Differenz der Konzentration der Nukleinsäuren im Ausgangsmaterial und im Überstand nach der Bindung kann die Kopplungseffizienz ermittelt werden. Sie betrug in der Regel zwischen 10-30 %. Anschließend wurden die mit VP-Transkripten gekoppelten paramagnetischen Partikel dreimal mit je 10 ml PBS gewaschen. und dreimal mit je 10 ml Inkubationspuffer (10 mM HEPES pH 7,8; 40 mM KCl, 2 % (w/v) Glycerin; 2 mM DTT; 1,5 mM EDTA pH 8,0) äquilibriert.

Affinitätschromatographie

Alle Schritte wurden bei RT durchgeführt. Für die Reinigung durch Affinitätschromatographie wurden 8-10 mg Protein aus entsalzten Fraktionen der Heparinsäulenchromatographie in 20 ml Bindungspuffer (10 mM HEPES pH 7,8; 40 mM KCl; 2 % (w/v) Glycerin, 2 mM DTT; 1,5 mM EDTA pH 8,0; 1 x Proteaseinhibitor (*CompleteTM*, Roche); 2,5 mg/ml Heparin) zu den mit VP-Transkripten gekoppelten paramagnetischen Partikeln gegeben. Der Ansatz wurde 25 min bei RT unter Rotation inkubiert. Anschließend wurde der Überstand, der nicht gebundene Proteine enthielt, entfernt. Die paramagnetischen Partikel wurden für zwei min mit 10 ml Bindungspuffer gewaschen. Anschließend wurden sie zweimal mit 10 ml und einmal mit 2 ml Bindungspuffer ohne Heparin Zusatz für jeweils 2 min gewaschen. Die spezifisch an die VP-Transkripte gebundenen Proteine wurden zunächst für 10 min mit 1 ml 10 mM HEPES pH 7,8; 40 mM KCl; 2 % (w/v) Glycerin; 2 mM DTT; 1,5 mM EDTA pH 8,0; 1 x Proteaseinhibitor; 1 M NaCl inkubiert. Nach Abnahme des Eluates (NaCl-Eluat) erfolgte ein zweiter Elutionsschritt mit 1ml 10 mM HEPES pH 7,8; 2 mM DTT; 0,1 % (w/v) SDS für 10 min. Nach der Abnahme dieses Eluates (1. SDS-Eluat) wurden die Partikel ein zweites Mal mit 0,5 ml desselben Puffers für 5 min inkubiert (2. SDS-Eluat). Alle Eluate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.5.6. Präparative SDS-Gelelektrophorese

Die drei Eluate (3.5.5.) wurden separat in *Viva-Spin columns* (Sartorius) etwa 10-fach konzentriert. Die Konzentrate wurden mit 5 x Laemmli-Probenpuffer (Endkonzentration: 1 x) versetzt, 10 min bei 80 °C inkubiert und auf ein 8%iges SDS-Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine im Gel mit kolloidalem Coomassie (*Roti-Blue*, Roth) nach Angaben des Herstellers angefärbt. Das VP-RBP wurde aus dem Gel ausgeschnitten und bis zur Sequenzierung des Proteins bei -20°C gelagert.

3.5.7. Sequenzierung des VP-RBP

Die Sequenzierung und der Vergleich der Sequenzen mit einer Datenbank wurde von Dr. Friedrich Buck (Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Zunächst wurden die Gelstücke dreimal für 2 h in H₂O inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Gelstücke in Acetonitril für 30 min. Die Gelstücke wurden in 100 µl Puffer 3 (50 mM Tris-HCl, pH 8,5; 1 mM EDTA) aufgenommen. Nach Zugabe von 1 µg der Endoproteinase LysC (Roche Molecular Biochemicals) wurde der Reaktionsansatz über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 1 µl Trifluoressigsäure gestoppt. Der Überstand wurde abgenommen und verwahrt. Die Gelstücke wurden sodann in 100 µl Puffer 4 (50 % Trifluoressigsäure (v/v); 50 % Acetonitril (v/v)) für 1 h inkubiert. Beide Überstände wurden vereinigt. Die in dieser Lösung enthaltenen proteolytischen Fragmente wurden über HPLC (130A, Applied Biosystems) mit einer *C4 reverse phase column* (Vydac C4, Porengröße 300 Å; Partikelgröße 5 mm; 2,1 x 250 mm) aufgetrennt. Die Peptide wurden mit einem linearen Gradienten (0-100 % B in 50 min; Lösung A: 0,1 % Trifluoressigsäure in H₂O; Lösung B: 70 % Acetonitril; 0,09 % Trifluoressigsäure) mit einer Durchlaufrate von 200 ml pro min eluiert. Fraktionen, in denen Peptide enthalten waren, wurden bei 210 nm detektiert, in silikonisierten Reaktionsgefäßen aufgefangen und sofort eingefroren. Die Peptidsequenzen wurden durch Edmann Abbau in einem *Automatic Sequencer 476A* (Applied Biosystems) bestimmt.

3.6. Methoden zur Untersuchung von RNA-Protein Wechselwirkungen

3.6.1. UV-Quervernetzungsanalysen

Es wurden UV-Quervernetzungsanalysen mit Proteinextrakten aus Rattengewebe sowie aus verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Pro Ansatz wurden 10-40 µg des entsprechenden Proteinextraktes (siehe Legenden der Abbildungen im Ergebnisteil) mit 5 fmol mit ³²P markierter cRNA-Sonde (Abschnitt 3.2.5.) in einem Gesamtvolumen von 15 µl in Bindungspuffer 2 (10 mM HEPES pH 7,8; 4 % Glycerin (w/v); 40 mM KCl; 1,5 mM EDTA pH 8,0; 2 mM DTT; 6,7 µg/ml Hefe tRNA; 2,5 mg/ml Heparin) für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze in einem UV-crosslinker (Stratagene) mit UV-Licht bestrahlt (254 nm, 1200 mJ). Danach erfolgte ein 10 minütiger Verdau mit 10 µg RNase A Typ IIA (10µg/µl; Sigma), der durch Zugabe von 4 µl 5 x Laemmli-Probenpuffer (Laemmli *et al.*, 1970) abgestoppt wurde.

Die Ansätze wurden nach 10 min Inkubation bei 80°C auf einem 8-10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Abschnitt 3.3.4.). Das Gel wurde auf einem *Gel-air dryer* (Bio-Rad) unter Vakuum bei 80°C 2 h getrocknet. Anschließend erfolgte die Exposition des getrockneten Geles mit einem Röntgenfilm (Fuji-Film) über Nacht bei -80°C.

3.6.2. Poly(A)-Sephrose-Protein Bindungsstudien

Vorbereitung der Poly(A)-Sephrose

Für Bindungsstudien von Proteinen an Poly(A)-Ribohomopolymere wurde Poly(A)-SephroseTM 4B (Amersham Biosciences; ca. 98 A-Reste) verwendet. Zunächst wurden 0,5 g der Sepharose 5 min in 20 ml Puffer A (1 M NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 7,5) zum Aufquellen inkubiert. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurde die Matrix mit 50 ml Puffer B (90 % (v/v) Formamid; 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM EDTA, pH 8,0) gewaschen. Nach Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min wurde die Matrix fünfmal mit Bindungspuffer 1 (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 2,5 mM MgCl₂; 100 mM KCl; 1 mg/ml Heparin; 1x Proteaseinhibitor (*Complete*TM EDTA-frei, Roche)) gewaschen.

Interaktion von Flag-Tag-PABP-Fusionsproteinen mit Poly(A)-Sequenzen

Die Bindungsstudien wurden mit zwei unterschiedlich zusammengesetzten Bindungspuffern durchgeführt. Dazu wurde die vorbereitete Poly(A)-Sephrose auf zwei Ansätze aufgeteilt (ca. 0,25 g pro Ansatz). Anschließend wurde sie in je 300 µl des jeweiligen Bindungspuffers aufgenommen. Zum einen wurde der Bindungspuffer 1 (s.o.), der zusätzlich 0,5 % (w/v) Triton X-100 enthielt, verwendet. Bindungspuffer 2 enthielt 10 mM HEPES pH 7,8; 4 % Glycerin (v/v); 40 mM KCl; 1,5 mM EDTA, pH 8,0; 2 mM DTT; 6,7 µg/ml Hefe tRNA; 2,5 mg/ml Heparin. Dieser Puffer wurde ebenfalls für UV-Quervernetzungsanalysen (siehe Abschnitt 3.6.1.) benutzt. Die Bindungsstudien wurden mit drei verschiedenen in HEK 293-Zellen exprimierten PABP-Deletionsmutanten durchgeführt. Aus diesem Grunde erfolgte eine Aufteilung der beiden Ansätze in jeweils drei Reaktionsgefäße. Zunächst wurden jeweils 100 µl der Poly(A)-Sephrose (je 0,083 g) bei 10000 x g, 4°C für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde sie dreimal mit je 1 ml des jeweiligen Bindungspuffers äquilibriert. Danach wurden je 180 µg des jeweiligen Proteinextraktes in Bindungspuffer 1/0,5 % (w/v) Triton X-100 bzw. Bindungspuffer 2 in einem Gesamtvolumen von 200 µl vorbereitet. Nach Abnahme von jeweils 20 µl zur späteren Bestimmung der Ausgangsmenge der jeweiligen PABP-Deletionsmutante wurde der Rest der Lösung einem der Poly(A)-Sephrose-Ansätze zugefügt. Alle Ansätze wurden für 30 min bei Raumtemperatur unter Rotation inkubiert.

Anschließend wurde der Überstand nach Zentrifugation (s.o.) abgenommen, und die Ansätze wurden dreimal mit je 1 ml des jeweiligen Bindungspuffers gewaschen. Danach wurde die Poly(A)-Sephrose aller Ansätze, ebenso die zu Beginn abgenommenen Ausgangsproteinlösungen, in Laemmli-Probenpuffer (Laemmli *et al.*, 1970) aufgenommen, 15 min gekocht und auf ein SDS-Gel aufgetragen (Abschnitt 3.3.4.). Nach gelelektrophoretischer Auftrennung erfolgte der Transfer der Proteine auf eine Nitocellulose-Membran (Abschnitt 3.3.5.). Die anschließende Westernblot-Analyse wurde auf das *Odyssey Infrared Imaging System* (LI-COR Biosciences) abgestimmt und nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Die PABP-Deletionsmutanten wurden mit einem Maus anti-Flag-Tag M2 Antikörper (Primärantikörper) sowie mit einem Ziege anti-Maus IRD ye 800 (IR: Infra Red) als Sekundärantikörper detektiert. Die Fluoreszenz des Sekundärantikörpers liegt im infraroten Spektralbereich. Sie konnte anschließend mit dem *Infrared Imaging System* ausgewertet werden, welches die Linearität der Fluoreszenz im infraroten Bereich für eine quantitative Analyse ausnutzt.

Bindungsversuche mit *in vitro* translatierten PABP-Deletionsmutanten

Die vorbereitete Poly(A)-Sephrose (0,5 g) wurde in 250 µl Bindungspuffer 1 aufgenommen und bei 10000 x g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde sie in 250 µl Bindungspuffer 1/0,5 % (w/v) Triton X-100 suspendiert. Die Bindungsstudien wurden mit jeweils 20 µl dieser Suspension durchgeführt. Der Überstand wurde nach Zentrifugation (5 min, 10000 x g, 4°C) quantitativ abgenommen. Die Lösungen mit den in Gegenwart von ³⁵S-Methionin *in vitro* translatierten PABP-Teilsequenzen (siehe Abschnitt 3.3.6.), deren Bindungseigenschaften an Poly(A)-Homopolymere überprüft werden sollte, wurden im Vorwege vorbereitet. Dazu wurden äquimolare Mengen in jeweils 100 µl Bindungspuffer 1/0,5 % (w/v) Triton X-100 verdünnt. Von diesen Lösungen wurden jeweils 5 µl zur Bestimmung der eingesetzten Menge (*Input*) abgenommen.

Die verbleibenden restlichen 95 µl der Proteinlösungen wurden mit Poly(A)-Sephrose vermischt und für 10 min bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose bei 10000 x g für 5 min bei RT abzentrifugiert. Der Überstand wurde quantitativ abgenommen und aufbewahrt. Die Sepharose wurde viermal mit je 250 µl Bindungspuffer 1/0,5 % Triton X-100 für 5 min (RT) gewaschen und jeweils bei 10000 x g für 5 min zentrifugiert. Die Elution der an Poly(A)-Ribohomopolymere gebundenen PABP-Deletionsmutanten erfolgte durch Zugabe von 20 µl 0,4 % (w/v) SDS in H₂O und Inkubation bei 80 °C für 10 min.

Anschließend wurde die Poly(A)-Sephrose abzentrifugiert (10000 x g, 5 min, RT). Je 5 µl der Eluate, ebenso die zu Beginn des Experimentes abgenommenen 5 µl der jeweiligen Translationsansätze (*Input*), wurden zur Bestimmung der Radioaktivität durch Flüssigzintillationszählung eingesetzt.

Auf Grund der unterschiedlichen Anzahl von Methionin-Resten der *in vitro* translatierten PABP-Deletionsmutanten war deren spezifische Aktivität unterschiedlich. Da jedoch für die oben beschriebenen Experimente äquimolare Mengen an Protein eingesetzt wurde, mußten für eine exakte Quantifizierung der Proteinbindungseigenschaften an Poly(A)-Ribohomopolymere adäquate Kontrollen durchgeführt werden. Dazu wurde ein *in vitro* Translationsansatz (Abschnitt 3.3.7) ohne Zugabe von Plasmid-DNA durchgeführt. Dieser Ansatz diente dazu, für jedes der eigentlichen Bindungsexperimente parallel einen Kontrollansatz mit der gleichen Menge an Radioaktivität durchzuführen. Auf diese Weise wurde das Ausmaß der unspezifischen Bindung des ³⁵S-Methionins an Poly(A)-Sephrose ermittelt. Es wurde in der vorliegenden Arbeit als „Kontrollindex“ bezeichnet. Die in den Bindungsexperimenten ermittelten Werte wurden mit diesem Faktor korrigiert.

1) Berechnung der insgesamt eingesetzten Menge an Radioaktivität = *100 % Input*:

$$100 \% \text{ Input} = 19 \cdot \text{Input [cpm]}$$

2) Berechnung des Kontrollindex = *Kontrollindex*

$$\text{Kontrollindex} = \frac{\frac{100 [\%]}{100 \% \text{ Input Kontrolle [cpm]} \cdot 4} \cdot \text{Eluat Kontrolle [cpm]} \cdot 4}{X \mu\text{l Kontrolleextrakt} [\mu\text{l}]} \cdot y \mu\text{l Proteinextrakt} [\mu\text{l}]$$

3) Berechnung % Bindung der PABP-Deletionmutante an Poly(A)-Sephrose = *% Bindung*

$$\% \text{ Bindung} = \frac{100 [\%]}{100 \% \text{ Input [cpm]}} \cdot \text{Eluat [cpm]} \cdot 4 \text{ — } \text{Kontrollindex} [\%]$$

3.6.3. RNA-Protein Bindungsstudien durch Affinitätschromatographie

Die Untersuchung der RNA-Protein Bindung wurde mit Hilfe der Methode der Affinitätschromatographie mit paramagnetischen Partikeln (Promega, siehe Abschnitt 3.5.5.), an die zuvor biotinylierte *in vitro* Transkripte (cRNA, Abschnitt 3.2.6.) der entsprechend zu untersuchenden RNAs gekoppelt wurden, durchgeführt. Auch für diese Experimente wurden *in vitro* translatierte PABP-Deletionmutanten eingesetzt (Abschnitt 3.4.5.).

Kopplung der biotinylierten cRNA an paramagnetische Partikel

Für jede eingesetzte cRNA Spezies wurden 0,6 ml Streptavidin-beschichtete paramagnetische Partikel (1 mg/ml) verwendet. Die Partikel wurden zunächst dreimal mit je 1 ml PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Kopplung von je 100 pmol biotinylierter cRNA in je 1 ml PBS für 60 min bei RT und Rotation. Nach Abnahme des Überstandes erfolgte ein dreimaliger Waschschrift mit je 1 ml Bindungspuffer 1/0,5 % Triton X-100 (siehe Abschnitt 3.6.2.). Anschließend wurden die mit cRNA gekoppelten paramagnetischen Partikel in vier gleich große Teilansätze (entsprechend der Anzahl der PABP-Deletionsmutanten) aufgeteilt. Jedem Teilansatz wurde schließlich das jeweilige *in vitro* translatierte Protein in 95 µl Bindungspuffer 1/0,5 % Triton X-100 zugefügt. Die Ansätze wurden 30 min bei RT und Rotation inkubiert. Das Waschen, die Elution der gebundenen Proteine sowie die Auswertung der RNA-Protein Interaktion erfolgte wie unter Abschnitt 3.6.2. beschrieben.

Nach der Berechnung der prozentualen Bindung der *in vitro* translatierten PABP-Deletionmutanten an die jeweilige cRNA wurde dieser Wert als % Bindung pro pmol RNA berechnet.

3.6.4. Transiente Ko-Expression des rPABP und der Vasopressin mRNA in HEK 293-Zellen unter Verwendung des Tet-ONTM-Systems

Das Tet-On-System (Clontech) gestattet es, die Expression von cDNAs in eukaryotischen Zellen durch Zugabe von Tetracyclin (oder Doxycyclin) präzise und dosisabhängig zu regulieren. Das System basiert auf zwei regulatorischen Elementen des Tetracyclin-Resistenz-Operons von *E. coli*: dem Tet-Repressor-Protein (TetR) und der Tet-Operator (tet O) DNA-Sequenz. Beide Elemente werden, auf getrennten Plasmiden, durch Transfektion in eukaryotische Zellen eingebracht. Das pTet-On Plasmid kodiert für das *reverse tet controlled transactivator* (rtTA)-Protein, das die Transkription eines verantwortlichen Gens (s.u.) in Gegenwart von Tetracyclin (bzw. Doxycyclin) aktiviert.

Für die nachfolgend beschriebenen Experimente wurden HEK 293-Zellen verwendet, die bereits mit dem Plasmid pTet-On stabil transfiziert waren (HEK 293-Tet-On, Clontech). Der kodierende Bereich verschiedener cDNAs (siehe unten) wurde in das Plasmid pTRE Myc kloniert (siehe Abschnitt 2.8.). Es beinhaltet das *Tet-responsible Element* (TRE), das aus sieben Kopien der *tet O*-Sequenz besteht. Die Bindung des rtTA-Proteins an das TRE ist nur in Gegenwart von Tetracyclin (bzw. Doxycyclin) möglich und führt zur dosisabhängigen Expression der in den Vektor pTRE Myc einklonierten cDNA. Der Vektor kodiert zusätzlich für ein Myc-Epitop (Myc-Tag), so dass von der Vektor-exprimierten RNA ein Fusionsprotein mit einem N-terminalen Myc-Tag translatiert wird.

Um einen möglichen Einfluß des rPABP auf die Translation oder Stabilität der VP mRNA zu untersuchen, wurden HEK 293-Tet On-Zellen transient mit je 4 µg der Plasmide pTRE Myc-PABP und pCMVβGal-AVP sense (bzw. pTRE Myc-Luc und pCMVβGal-AVP sense als Kontrolle) (siehe Abschnitt 2.8.) transfiziert. Für jede Versuchsserie wurden HEK 293-Tet On-Zellen in 8 Parallelansätzen transfiziert (siehe Abschnitt 3.4.5.). 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen aller Schalen durch Trypsin abgelöst, vereint und sorgfältig gemischt. Anschließend wurden sie erneut auf 8 Petrischalen verteilt und weiter kultiviert. Mit diesem Schritt wurde einer möglicherweise unterschiedlichen Transfektionseffizienz begegnet. Doxycyclin wurde dem Kulturmedium in unterschiedlichen Konzentrationen zugefügt: 200, 400 und 800 ng/ml (je 2 Schalen für jede Konzentration). Die Zellen von zwei weiteren Schalen wurden in Abwesenheit des Antibiotikums kultiviert. 48 h nach Zugabe des Antibiotikums wurden die Zellen jeder Schale geerntet (siehe Abschnitt 3.4.6. Methode 2) und separat weiter verarbeitet. Es wurde entweder die RNA isoliert (siehe Abschnitt 3.2.1.), oder es wurde ein Proteinextrakt aus den Zellen hergestellt (siehe Abschnitt 3.4.6. Methode 2). Mit Hilfe von Northern-Blot Hybridisierungsexperimenten wurde die VP mRNA-Menge in Abhängigkeit von der Expression des rPABP quantifiziert (siehe Abschnitt 3.2.4.). Parallel dazu wurde deren Translation durch Western-Blot Analysen abgeschätzt (siehe Abschnitt 3.3.5. und 3.3.6.).

4.0 Ergebnisse

4.1. Charakterisierung von *trans*-agierenden Faktoren als Bindungspartner der VP mRNA

Die VP mRNA gehört zu einer Gruppe von Transkripten, die gerichtet in die Neuriten von Nervenzellen transportiert werden (Prakash *et al.*, 1997). Als *cis*-agierendes Element wurden die letzten 395 Nukleotide der RNA identifiziert, als dendritische Lokalisierungssequenz (DLS) bezeichnet (Mohr, 1999). Um mögliche *trans*-agierende Faktoren als Mediator des gerichteten Transportes zu charakterisieren, wurden UV-Quervernetzungsanalysen mit ³²P-markierten VP-cRNA Sonden (*in vitro*-Transkripte der gesamten cDNA des VP-Vorläufers) und Proteinextrakten aus Rattenhirn durchgeführt. Protein/RNA-Komplexe, die sich ausbilden, können durch Bestrahlung mit UV-Licht kovalent quervernetzt werden. Nicht-komplexierte RNA wird anschließend mit RNase A abgebaut. Die Protein/RNA-Komplexe werden auf denaturierenden SDS-Gelen aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert. Die Methode ist schematisch in der Abb. 4.1. dargestellt.

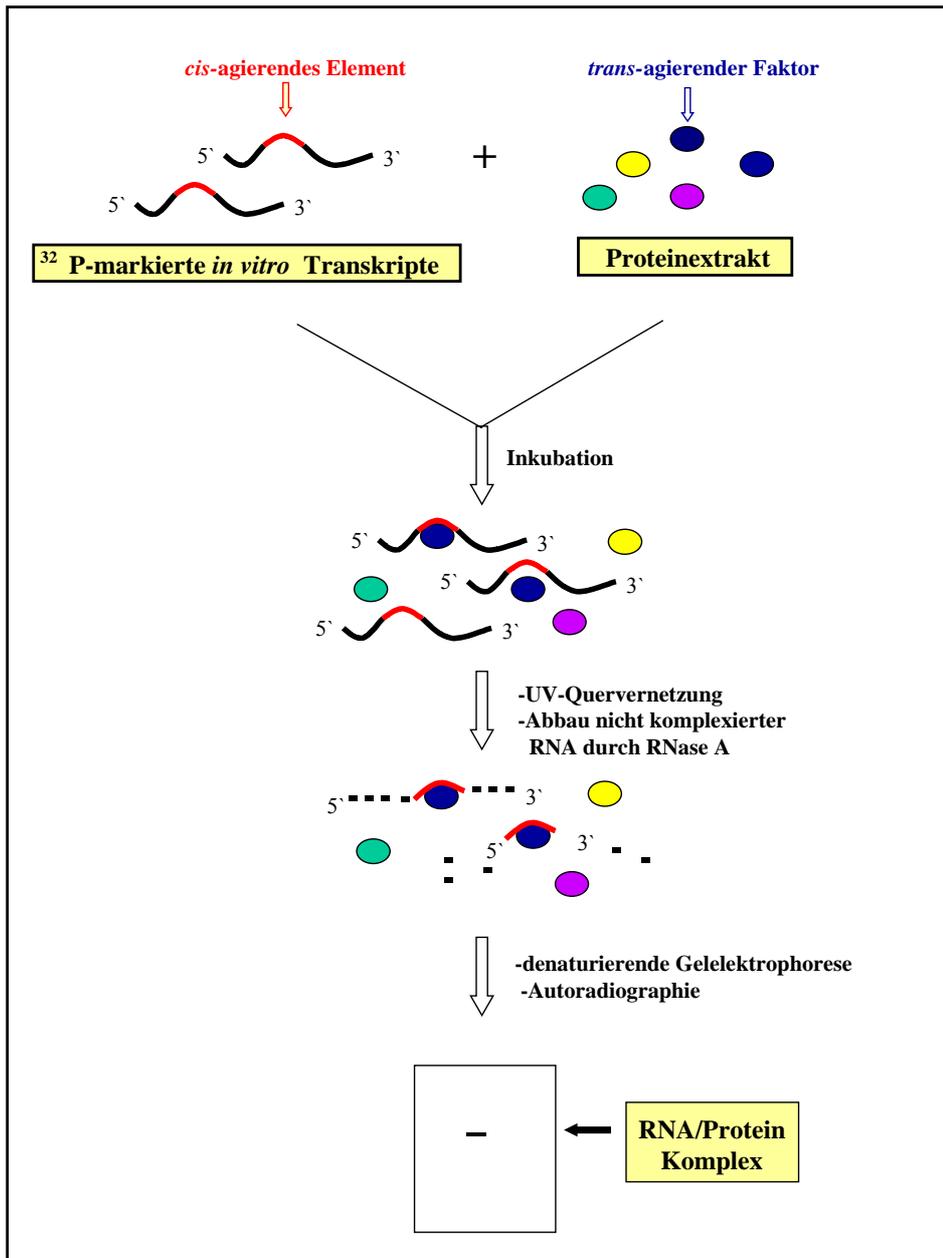


Abb. 4.1.: Schematische Darstellung der experimentellen Durchführung einer UV-Quervernetzungsanalyse: Mit ^{32}P -markierte *in vitro* Transkripte, die innerhalb ihrer Sequenz ein *cis*-agierendes Element besitzen, werden zusammen mit einem Proteinextrakt inkubiert, in dem Proteine enthalten sind, die als *trans*-agierende Faktoren an das *cis*-Element binden können. Die gebildeten cRNA-Protein-Komplexe werden durch Bestrahlung mit UV-Licht kovalent verknüpft. cRNA, die nicht über eine kovalente Verknüpfungsstelle geschützt ist, wird durch RNase A abgebaut. Das Gemisch aus Proteinen und cRNA-Protein-Komplexen wird durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend erfolgt die Detektion der cRNA-Protein-Komplexe durch Autoradiographie.

4.1.1. Identifizierung eines VP mRNA bindenden Proteins

Grundlage für die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse bildeten Experimente, in denen mit Hilfe von UV-Quervernetzungsanalysen ein Protein identifiziert wurde, das mit der DLS der VP mRNA interagiert. Es wurde als VP mRNA-bindendes Protein (VP-RBP) bezeichnet (Mohr *et al.*, 2001). Um dieses Protein detaillierter zu charakterisieren, wurden die im Folgenden beschriebenen Experimente durchgeführt.

Aufgrund der Expression des VP-Gens im Hypothalamus des Rattengehirns war es von Interesse zu wissen, in welchen Regionen des Rattengehirns das VP-RBP vorkommt. Die im Folgenden durchgeführten UV-Quervernetzungsanalysen mit *in vitro* transkribierter VP-cRNA als Sonde und verschiedenen Proteinextrakten zeigen, dass VP-RBP nicht auf den Hypothalamus beschränkt ist, sondern offensichtlich auch in anderen Hirnregionen exprimiert wird. Auf dem Autoradiogramm der UV-Quervernetzungsexperimente, welches in Abbildung 4.2.A dargestellt ist, ist der Komplex aus VP-cRNA und VP-RBP (Pfeilmarkierung) in den Proteinextrakten aus unterschiedlichen Gehirnregionen, wie Cortex, Cerebellum, Hypothalamus und Hippocampus, der Ratte gezeigt. Er weist eine Größe von etwa 85 kDa auf. Nimmt man an, dass ungefähr 20-30 Nukleotide der radioaktiv markierten Sonde durch die Interaktion mit dem VP-RBP vor Abbau durch die RNase geschützt sind, die einem Molekulargewicht von ca. 7-10 kDa entsprechen, ergibt sich für das VP-RBP ein Molekulargewicht von etwa 75-78 kDa. Bei gleicher eingesetzter Proteinmenge der Extrakte aus unterschiedlichen Hirnregionen und jeweils gleicher Menge radioaktiv markierter VP-cRNA-Sonde ist die Signalstärke in allen Spuren etwa gleich. Dies zeigt, dass VP-RBP im Cortex, im Cerebellum, im Hypothalamus und Hippocampus gleichmäßig exprimiert wird.

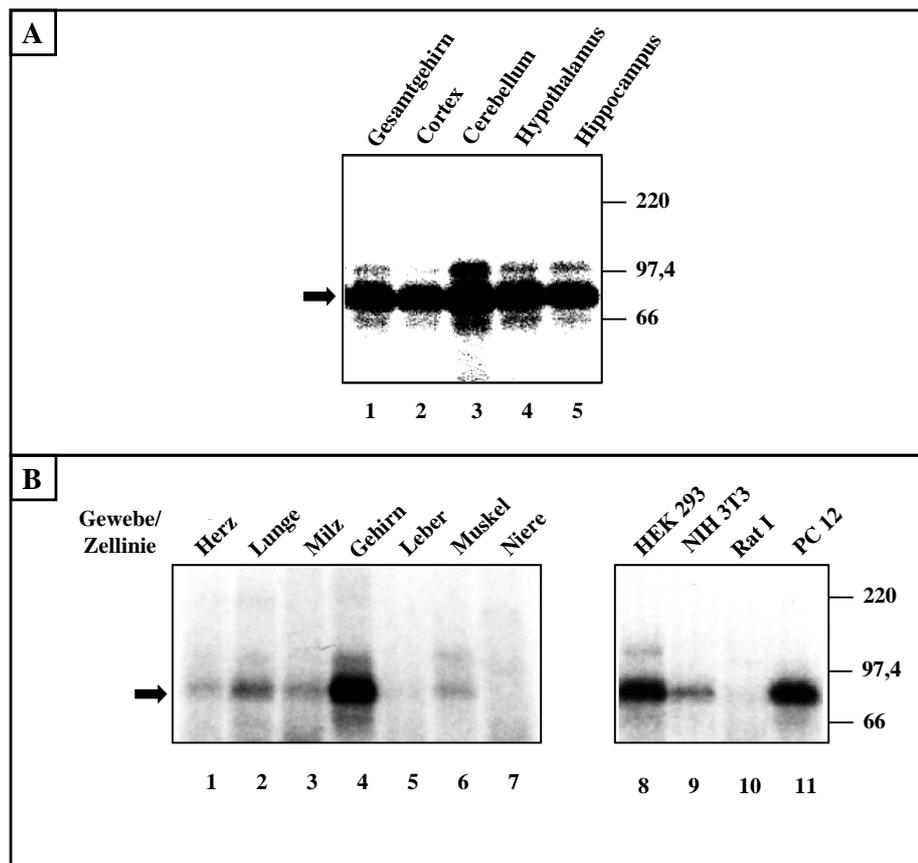


Abb. 4.2.: Autoradiogramme von UV-Quervernetzungsanalysen mit ^{32}P -markierten Vasopressin-*in vitro*-Transkripten als Sonde (5 fmol pro Ansatz) und Proteinextrakten aus verschiedenen Rattengeweben sowie aus unterschiedlichen Zelllinien (10 μg pro Ansatz). Die Pfeile markieren den durch die Quervernetzung entstandenen Komplex aus VP-cRNA und VP-RBP: A) Die Bindungsaktivität des VP-RBP ist bei gleicher eingesetzter Proteinmenge im Extrakt aus dem gesamten Gehirn der Ratte (Spur 1) ebenso groß wie in den Proteinextrakten einzelner Gehirnregionen wie Cortex, Cerebellum, Hypothalamus oder Hippocampus (Spuren 2-5). B) Ein Vergleich der Bindungsaktivität des VP-RBP im Proteinextrakt aus Gehirn (Spur 4) mit der Bindungsaktivität in Extrakten peripherer Gewebe wie Herz, Lunge, Milz, Leber, Muskel, Niere (Spuren 1-3 und 5-7) ergibt für letztere eine bedeutend geringere oder wie z.B. für den Proteinextrakt aus Niere (Spur 7) fehlende Bindungsaktivität. Die Menge an bindungsaktiven VP-RBP in Proteinextrakten aus HEK 293- (Spur 8) und PC 12-Zellen (Spur 11) ist geringer als in Proteinextrakt aus Gehirn, jedoch ist in diesen deutlich mehr als in Proteinextrakten aus NIH 3T3-Zellen (Spur 9) und Rat I-Zellen (Spur 10) vorhanden.

Aus diesem Ergebnis lässt sich die Frage ableiten, ob das VP-RBP ein für das Gehirn spezifisches Protein ist, oder ob bindungsaktives VP-RBP auch in anderen Geweben detektiert werden kann.

UV-Quervernetzungsanalysen mit Proteinextrakten aus peripheren Rattengeweben im Vergleich zum Proteinextrakt aus dem Gehirn der Ratte mit radioaktiv markierter VP-cRNA (Abbildung 4.2.B) zeigt, dass VP-RBP auch in Herz (Spur 1), Lunge (Spur 2), Milz (Spur 3) und Muskel (Spur 6), vorhanden ist. Proteinextrakte aus Gehirn (Spur 4) weisen jedoch mit Abstand die höchste Bindungsaktivität auf. In den Extrakten aus Leber und Niere (Spur 5 und 7) ist lediglich eine geringfügige bzw. keine Bindungsaktivität zu verzeichnen.

Wie der Abbildung 4.2.B (Spuren 8-11) zu entnehmen ist, ist das VP-RBP zudem in Proteinextrakten aus kultivierten Zellen vorhanden. Die UV-Quervernetzungsanalysen zeigen, dass die Bindungsaktivität in den Extrakten aus kultivierten Zelllinien verschieden ist. In Proteinextrakten aus NIH 3T3 - und Rat I- Zellen (Spuren 9 und 10) wird eine geringe bzw. keine Bindungsaktivität des VP-RBP festgestellt. In Proteinextrakten aus HEK 293- und PC 12-Zellen (Spuren 8 und 11) hingegen werden moderate Mengen an bindungsaktiven VP-RBP detektiert. Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass VP-RBP offensichtlich kein artspezifisches Protein ist, da Rat I- und PC12-Zellen aus der Ratte, HEK 293-Zellen aus dem Mensch und NIH 3T3-Zellen aus der Maus stammen.

Anhand der UV-Quervernetzungsanalysen konnte festgestellt werden, die VP-RBP Expression ist nicht auf das Gehirn der Ratte beschränkt, sondern ubiquitär vorhanden. Die Expression des VP-RBP ist außerdem nicht artsspezifisch auf die Ratte beschränkt, sondern sie ist auch in der Maus und im Menschen zu finden. Dies ließ bereits vermuten, dass es sich beim VP-RBP um ein konserviertes RNA-Bindungsprotein handelt.

4.1.2. VP-RBP bindet in spezifischer Weise an VP mRNA

Um die Spezifität der Bindung von VP-RBP an VP mRNA zu untersuchen, wurden UV-Quervernetzungsanalysen mit Proteinextrakten aus dem Gehirn der Ratte durchgeführt, in denen zusätzlich zu der radioaktiv markierten VP-cRNA unterschiedliche nicht radioaktiv markierte cRNAs im 100-fachen molarem Überschuß hinzugefügt wurden. Die Bindung des VP-RBP an andere mRNAs sollte zu einer Kompetition und somit zur Abnahme der Signalstärke führen. Als Kompetitoren wurden verschiedene *in vitro* synthetisierte cRNAs eingesetzt, wie z.B. α -Tubulin cRNA der Ratte. Für diese mRNA wurde kein Transport in die Dendriten von Nervenzellen festgestellt (Prakash *et al.*, 1997). Weitere in diesem Experiment verwendete Kompetitor-cRNAs umfassen *in vitro* transkribierte cDNA Teilsequenzen des Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (MAP2) und des Somatostatin Rezeptors 3 (SSTR3) der Ratte. Die MAP2 mRNA und die SSTR3 mRNA werden in die Dendriten kultivierter Nervenzellen transportiert (Blichenberg *et al.*, 1999; Mohr, unveröffentlichte Ergebnisse). In vielen Fällen befinden sich die Lokalisierungselemente in der 3'UTR und nicht in kodierenden Regionen der mRNAs, so dass für dieses Experiment jeweils Fragmente dieser Abschnitte als Kompetitoren ausgewählt wurden (MAP2-a: 3'UTR; MAP2-b: kodierende Region; SSTR3-a: codierende Region; SSTR3-b: 3'UTR). Wie man der Abbildung 4.3. entnehmen kann, wird im Kontrollansatz ohne Zugabe von Kompetitor-cRNA (Spur 1) der 85 kDa Komplex aus VP-cRNA und VP-RBP gebildet, während die Zugabe von unmarkierter VP-cRNA im Überschuß (Spur 2) die Bindung an die mit ^{32}P -markierte VP-cRNA verhindert. Im Gegensatz dazu wird bei Zugabe von α -Tubulin-cRNA als Kompetitor (Spur 3) die Komplexbildung nicht beeinflusst. Die cRNAs MAP2-a (Spur 4) und MAP2-b (Spur 5) verhindern ebenso wenig wie die cRNAs SSTR3-a (Spur 6) und SSTR3-b (Spur 7) die Komplexbildung. Diese Kompetitionsanalysen belegen die Spezifität der Interaktion des VP-RBP mit VP-cRNA.

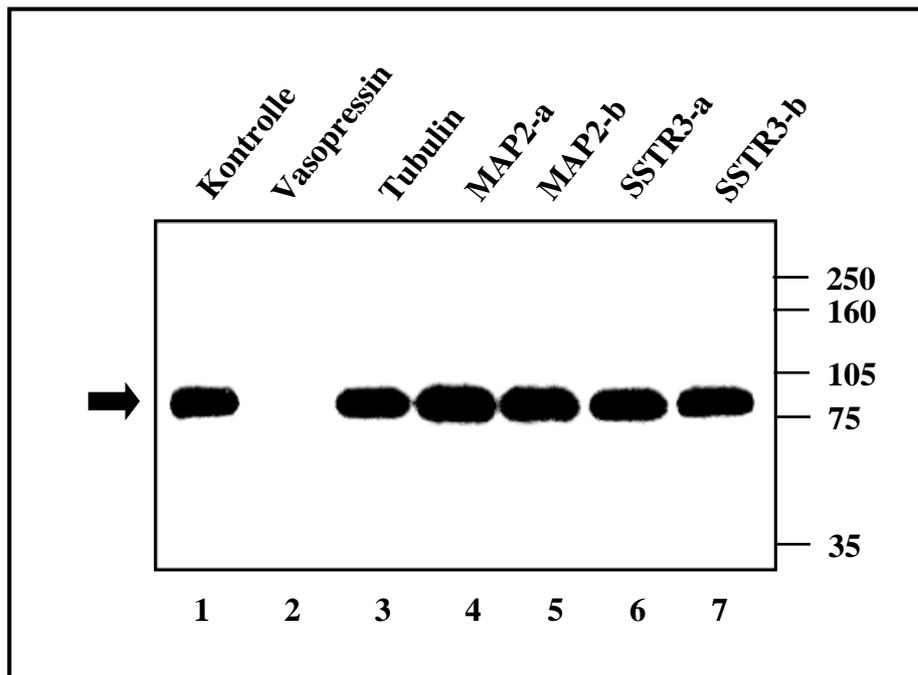


Abb. 4.3.: Analyse der Spezifität der Bindung von VP-RBP an VP mRNA: Autoradiogramm einer UV-Quervernetzungsanalyse mit Proteinextrakten aus Gehirn adulter Ratten und der mit ^{32}P -markierten *in vitro* transkribierten VP-cRNA als Sonde. Zu den jeweiligen Reaktionsansätzen wurden außer in der Kontrolle (Spur 1) nicht radioaktiv markierte *in vitro* Transkripte im 100-fachen molaren Überschuss hinzugefügt. Die Bildung des 85 kDa Komplex aus radioaktiv markierter VP-cRNA und VP-RBP (Spur 1; Pfeilmarkierung) wird durch Zugabe von unmarkierter VP-cRNA (Spur 2) als Kompetitor verhindert, während die Zugabe von α -Tubulin-cRNA (Spur 3) die Komplexbildung nicht beeinflusst. Die cRNAs MAP2-a und MAP2-b (Spur 4 und 5), die aus *in vitro* transkribierten cDNA Teilsequenzen des Mikrotubuli-assoziierten Proteins 2 der Ratte bestehen (MAP2-a: 3'UTR mit dendritischer Lokalisierungssequenz; MAP2-b: codierende Region), und die cRNAs SSTR3-a und SSTR3-b (Spur 6 und 7), die aus *in vitro* transkribierten cDNA Teilsequenzen des Somatostatin Rezeptors 3 der Ratte bestehen (SSTR3-a: codierende Region; SSTR3-b: 3'UTR), kompetierten die Bindung zwischen VP-cRNA und VP-RBP nicht. Bei den Kompetitoren handelt es sich um sense *in vitro* Transkripte ohne Poly(A)-Schwanz.

4.2. Biochemische Reinigung des VP-RBP

Für die Identifizierung des VP-RBP durch Sequenzierung des Proteins war es notwendig, dieses zunächst biochemisch zu reinigen, um es von der Masse der anderen Proteine abzutrennen und in ausreichenden Mengen anzureichern. Die biochemische Reinigung setzte sich aus mehreren Einzelschritten zusammen und ist in Abbildung 4.4. schematisch dargestellt. Einzelne Schritte der biochemischen Reinigung des VP-RBP wurden zunächst im Hinblick auf ihre Anwendbarkeit und zur Optimierung des Aufreinigungserfolges geprüft, so dass im Folgenden die optimierte Reinigungsstrategie beschrieben wird.

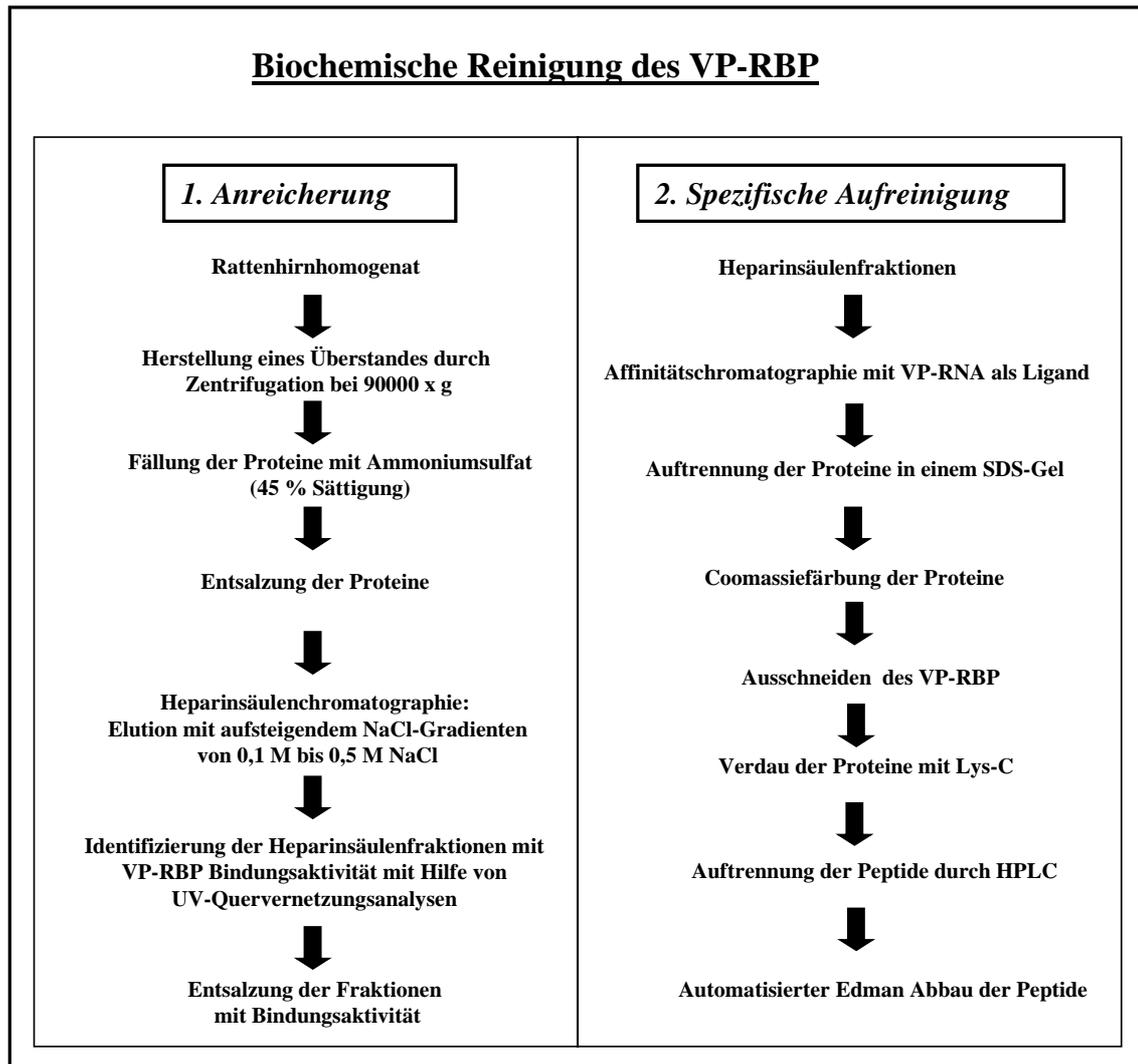


Abb. 4.4.: Schema der biochemischen Reinigung des VP-RBP:

1. Anreicherung des VP-RBP: Nach Homogenisierung von 30g Gehirn (Ratte) wurde durch Zentrifugation bei 90000 x g ein Überstand hergestellt, aus dem das VP-RBP zusammen mit anderen Proteinen mit Ammoniumsulfat (45 % Sättigung) ausgefällt wurde. Nach der Entsalzung der ausgefallten Proteine wurde eine Heparinsäulenchromatographie durchgeführt, bei der die Proteine mit aufsteigendem Natriumchlorid-Gradienten von 0,1 M bis 0,5 M NaCl eluiert wurden. Anschließend erfolgte die Entsalzung derjenigen Heparinsäulenfraktionen, in denen mit Hilfe von UV-Quervernetzungsanalysen mit radioaktiv markierter VP-cRNA als Sonde Bindungsaktivität des VP-RBPs festgestellt wurde,
2. Spezifische Aufreinigung des VP-RBP: Mehrere entsalzte Heparinsäulenfraktionen mit starker Bindungsaktivität des VP-RBP wurden vereint und für eine Affinitätschromatographie mit immobilisierter biotinylierter VP-cRNA als spezifischen Liganden eingesetzt. Das Eluat dieser Affinitätschromatographie wurde auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Nach Anfärbung der Proteine mit kolloidalem Coomassie wurde das VP-RBP aus dem Gel ausgeschnitten. Das Protein wurde mit Lys-C verdaut. Die resultierenden Peptide wurden mittels HPLC (*high-performance liquid chromatography*) aufgetrennt. Individuelle Peptide wurden mittels automatisierten Edman Abbau sequenziert.

4.2.1. Anreicherung des VP-RBP

Für die biochemische Reinigung des VP-RBP wurden zunächst 30 g Gehirn aus adulten Ratten homogenisiert. Anschließend erfolgte die Abtrennung von Zellkernen, Mitochondrien und Zelltrümmern durch Zentrifugation bei 16500 x g. Der Überstand wurde bei 90000 x g zentrifugiert, um Ribosomen und Polysomen abzutrennen. Im resultierenden Überstand (S-90) sollten sich die Proteine befinden, die frei im Zytoplasma der Gehirnzellen vorliegen. In diesem Überstand wurde nach einer Überprüfung mittels UV-Quervernetzungsanalysen der größte Anteil an VP-RBP gefunden. Aus diesem erfolgte die Fällung der Proteine mit Ammoniumsulfat mit einer Sättigung von 45 %, wobei zuvor überprüft wurde, dass bei dieser Ammoniumsulfatkonzentration das VP-RBP quantitativ ausfällt. Das Präzipitat enthielt etwa 120 mg Protein.

Je 20 mg Protein wurde durch Heparinsäulenchromatographie weiter aufgetrennt. Das Prinzip dieser Chromatographie beruht auf Ionenaustausch, da Heparin negativ geladen ist. In Vorversuchen wurde festgestellt, dass das VP-RBP an Heparin bindet. Daher sollte es sich um ein basisches Protein handeln. Die an die Heparinsäule gebundenen Proteine wurden mit einem aufsteigendem Natriumchlorid-Stufengradienten von 0,1 M bis 0,5 M NaCl eluiert, wobei das Eluat in 7 Fraktionen von je 1,5 ml pro NaCl-Konzentration aufgefangen wurde. Es wurden insgesamt sechs Heparinsäulenchromatographien durchgeführt, um die Ausgangsmenge an Protein aus 30 g Rattenhirn zu verarbeiten. Um die Reproduzierbarkeit der Heparinsäulenchromatographie zu überprüfen, erfolgte die Erstellung der Elutionsprofile von zwei verschiedenen Heparinsäulenchromatographien anhand der gemessenen Proteinkonzentrationen der einzelnen Fraktionen (Abb.4.5.). Der Vergleich der Elutionsprofile ergab nahezu identische Proteinkonzentrationen in den einzelnen Fraktionen.

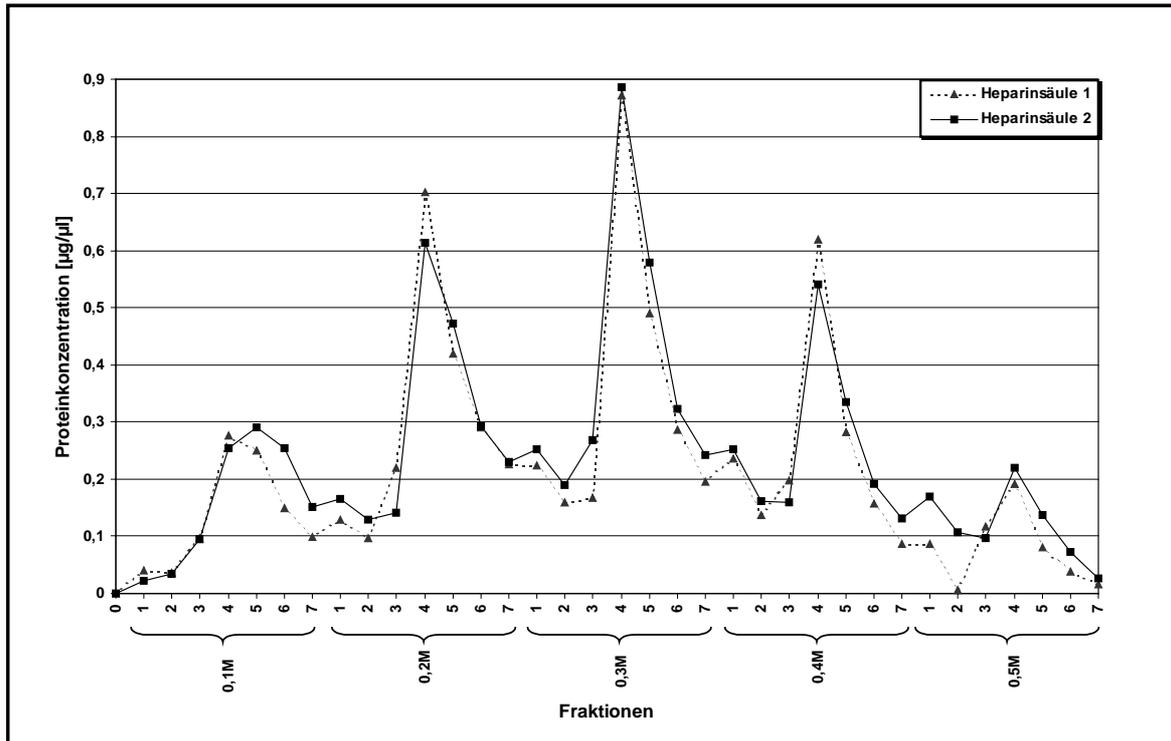


Abb. 4.5.: Elutionsprofile zweier Heparinsäulenchromatographien: Auf der X-Achse ist der jeweils in 7 Fraktionen pro Konzentrationsstufe aufgeteilte Natriumchlorid-Gradient, der Konzentrationen von 0,1 M NaCl bis 0,5 M NaCl enthält, dargestellt. Auf der Y-Achse befinden sich die gemessenen Proteinkonzentrationen in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Beide Elutionsprofile stimmen weitestgehend überein, so dass die Heparinsäulenchromatographie bezogen auf den Proteingehalt in den einzelnen Fraktionen reproduzierbar ist.

Um diejenigen Heparinsäulenfraktionen zu bestimmen, in denen eine Anreicherung des VP-RBP erfolgte, wurden UV-Quervernetzungsanalysen mit ^{32}P -markierter VP-cRNA und den individuellen Heparinsäulenfraktionen durchgeführt. Die Bindungsaktivität des VP-RBP wurde mit Hilfe eines Phosphoimaging-Systems quantitativ ausgewertet. Diese Analyse ergab für die 0,2 M und 0,5 M Natriumchlorid Konzentrationsstufe, jeweils in den Fraktionen 4 und 5, sehr hohe Bindungsaktivität, wie es auf den Autoradiogrammen in Abbildung 4.6. dargestellt ist (Pfeilmarkierung). In der 0,4 M Natriumchlorid Konzentrationsstufe wurde ebenfalls eine meist geringe Bindungsaktivität festgestellt, die gleichmäßig auf alle Fraktionen verteilt war. In den 0,1 M und 0,3 M Natriumchlorid Konzentrationsstufen wurde keine Bindungsaktivität festgestellt.

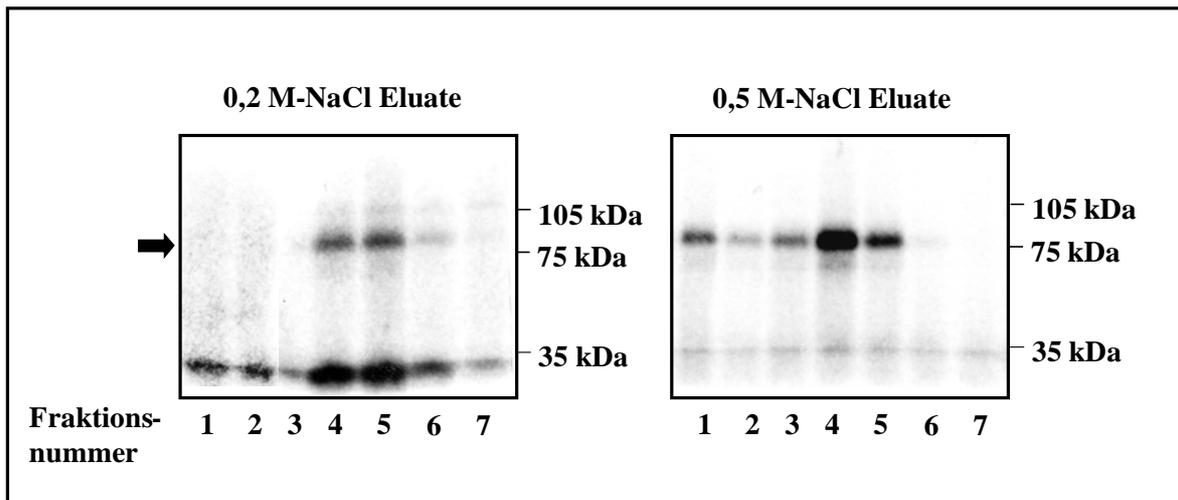


Abb. 4.6.: Autoradiogramme von UV-Quervernetzungsanalysen mit radioaktiv markierter VP-cRNA (5 fmol) als Sonde und den mit 0,2 M NaCl bzw. 0,5 M NaCl eluierten Proteinen einer Heparinsäulenchromatographie, die jeweils in 7 Fraktionen aufgeteilt waren, als Proteinextrakte. Durch die UV-Quervernetzung wurde ein 85 kDa großer Komplex aus VP-cRNA und VP-RBP gebildet (Pfeil). Die Fraktionen 4 und 5 der jeweiligen Konzentrationsstufe erwiesen sich als Fraktionen mit der höchsten Bindungsaktivität des VP-RBP, während in den anderen Fraktionen wenig bis keine Bindungsaktivität vorhanden war.

Für die weitere Reinigung wurden jeweils die Fraktionen 4 und 5 der 0,2 M und der 0,5 M NaCl-Eluate verwendet, da sie die höchste Bindungsaktivität aufwiesen. Aufgrund der Tatsache, dass das VP-RBP bei zwei verschiedenen Salzkonzentrationsstufen, 0,2 M NaCl und 0,5 M NaCl, von der Heparinsäule eluiert wurde, stellte sich die Frage, ob zwei verschiedene VP-RBPs mit unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften, jedoch mit demselben Molekulargewicht existieren. Aus diesem Grund wurden die Spitzenfraktionen der 0,2 M NaCl Konzentrationsstufe getrennt von denen der 0,5 M NaCl Konzentrationsstufe weiter gereinigt.

Die Anreicherung des VP-RBP, ausgedrückt als Bindungsaktivität, während der biochemischen Reinigung ist in Abbildung 4.7. dargestellt.

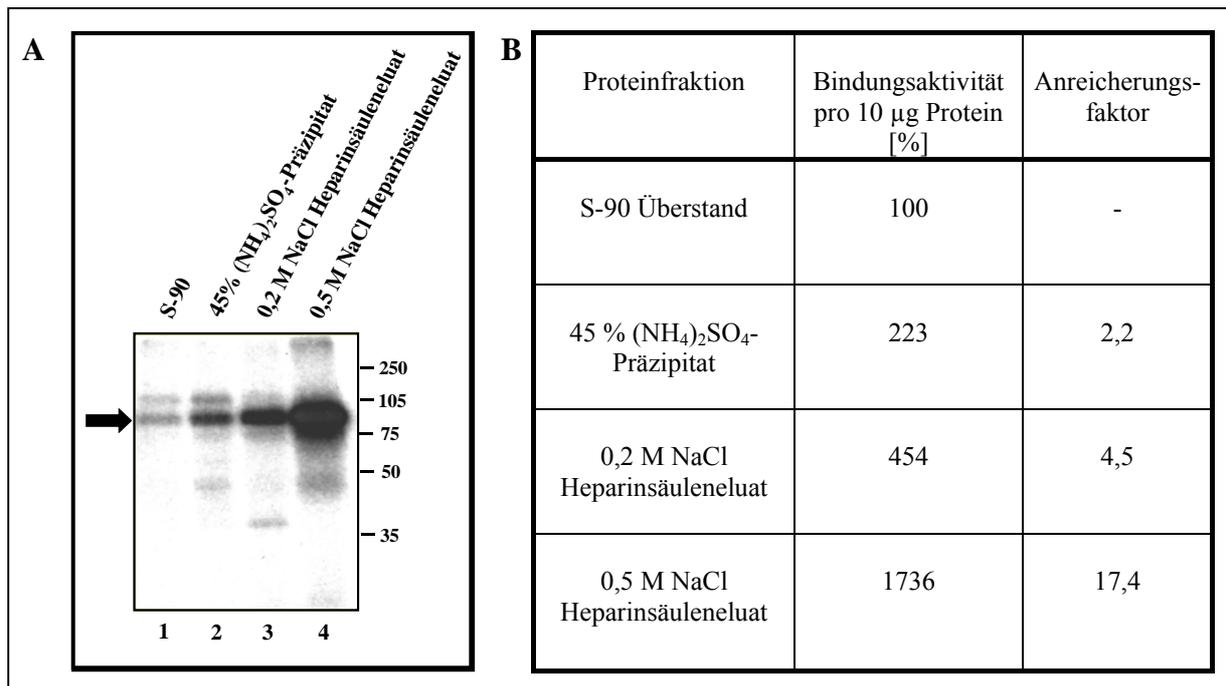


Abb. 4.7.: Anreicherung des VP-RBP während der biochemischen Reinigung:

A) Dargestellt ist das Autoradiogramm einer UV-Quervernetzungsanalyse mit ³²P-markierten Vasopressin Transkripten (5 fmol pro Ansatz) als Sonde. Der Pfeil markiert den 85 kDa Komplex aus VP-RBP und VP-cRNA. Die Bindungsaktivität des VP-RBP steigt bei gleichbleibender Proteinmenge (10 µg pro Ansatz) vom ersten Aufreinigungsschritt der S-90 Fraktion (Spur 1) über das entsalzte Ammoniumsulfatpräzipitat (Spur 2) bis zu den Fraktionen 5 der 0,2 M und 0,5 M NaCl Heparinsäuleneluaten (Spur 3 und 4) an.

B) Quantitative Auswertung des radioaktiven Signals aus Abbildung A mit Hilfe des *Phosphoimaging-Systems*: Es findet von der S-90 Fraktion ausgehend zum 45 % Ammoniumsulfatpräzipitat eine 2,2-fache, zum 0,2 M NaCl Heparinsäuleneluat eine 4,5-fache und zum 0,5 M NaCl Heparinsäuleneluat eine 17,4-fache Anreicherung von Bindungsaktivität statt.

Das Autoradiogramm der UV-Quervernetzungsanalyse zeigt bei gleicher eingesetzter Proteinmenge einen deutlichen Anstieg von Bindungsaktivität im 45 % Ammoniumsulfatpräzipitat (Abb. 4.7. A, Spur 2) im Vergleich zur S-90 Fraktion (Spur 1). Nach der Auftrennung durch Heparinsäulenchromatographie ist jeweils in der Fraktion 5 der 0,2 M NaCl und der 0,5 M NaCl Konzentrationsstufen eine weitere Anreicherung von VP-RBP Bindungsaktivität zu verzeichnen (Spuren 3 und 4). Die durch UV-Quervernetzung gebildeten Komplexe der 0,2 M NaCl und der 0,5 M NaCl Heparinsäuleneluaten weisen die gleiche elektrophoretische Mobilität auf. Die quantitative Auswertung mit einem *Phosphoimaging-System* ergab (Abb. 4.7. B) eine 2,2-fache Anreicherung von Bindungsaktivität für das Ammoniumsulfatpräzipitat, eine 4,5-fache für die Heparinsäulenspitzenfraktion der 0,2 M NaCl Konzentrationsstufe und eine 17,4-fache für die Heparinsäulenspitzenfraktion der 0,5 M NaCl Konzentrationsstufe im Vergleich zur Ausgangsfraktion S-90.

4.2.2. Spezifische Reinigung des VP-RBP durch Affinitätschromatographie

Für die Affinitätschromatographie wurde *in vitro* transkribierte VP-cRNA über deren biotinylierte UTP-Reste an mit Streptavidin beschichtete paramagnetische Partikel gekoppelt. Nach der Kopplung erfolgte die Inkubation mit dem Proteinextrakt aus 10 entsalzten Heparinsäulenspitzenfraktionen (ca. 8 mg). Nach drei Waschschrritten wurden die an VP-cRNA gebundenen Proteine eluiert. Zunächst erfolgte die Elution mit 1 M NaCl, mit dem jedoch sowohl bei der Affinitätschromatographie mit den Fraktionen der 0,2 M NaCl Konzentrationsstufe (0,2 M/NaCl-Eluat) als auch bei der Affinitätschromatographie mit den Fraktionen der 0,5 M NaCl Konzentrationsstufe (0,5 M/NaCl-Eluat) lediglich geringe Mengen VP-RBP eluiert werden konnten. Aus diesem Grunde wurde ein weiterer Elutionsschritt mit 0,1 % SDS durchgeführt, durch den das VP-RBP in großen Mengen eluiert wurde (0,2 M/SDS-Eluat; 0,5 M/SDS-Eluat). Die Elution mit SDS hat gegenüber der Elution mit 1 M NaCl jedoch den Nachteil, dass das VP-RBP denaturiert wird. Die in den einzelnen Phasen der Affinitätschromatographie vorhandenen Proteine wurden jeweils für 0,2 M NaCl und 0,5 M NaCl Konzentrationsstufe getrennt im analytischen Maßstab gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt (Abbildung 4.8. A und B). Ein Vergleich der Proteine der Ausgangslösung (jeweils in Spur 1) mit denen des Überstandes (Lösung mit ungebundenen Proteinen) (Spur 2), läßt keine Depletion eines Proteins erkennen. In den Waschlösungen 1-2 (Spur 3-4) werden keine Proteine detektiert. In der Waschlösung 3 (Spur 5) der 0,5 M NaCl-Fraktion sind zwei Proteine sichtbar, die jedoch nicht der angenommenen Größe des VP-RBP von 78 kDa entsprechen und in der 0,2 M NaCl-Fraktion nicht vorkommen. In den Eluaten (Spur 6) beider Konzentrationsstufen sind mehrere Proteine sichtbar, wovon zwei Proteine mit 78 und 70 kDa in größeren Mengen vorhanden sind. Vom 78 kDa großen VP-RBP (Sternmarkierung) ist mehr vorhanden, als vom 70 kDa Protein, bei dem es sich vermutlich um Rinderserumalbumin (BSA) handelt. BSA ist im Lagerungspuffer der paramagnetischen Partikel vorhanden. Dieses Protein ist nach einer Affinitätschromatographie, die ohne Zugabe von Proteinlösung durchgeführt wurde, ebenfalls im Eluat enthalten (Daten hier nicht gezeigt). Daher handelt es sich um ein unspezifisches Protein, das nicht an die spezifische cRNA sondern an die paramagnetischen Partikel bindet.

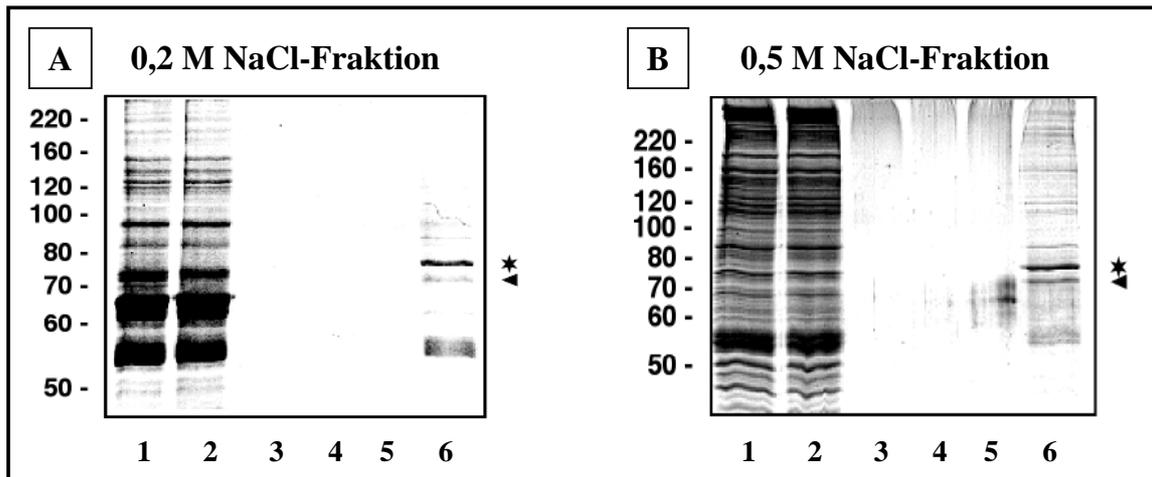


Abb. 4.8.: Dokumentation des Proteingehaltes in den einzelnen Phasen der Affinitätschromatographie mit VP-cRNA als Ligand: **A)** für die Reinigung der Heparinsäuleneluat der 0,2 M NaCl Konzentrationsstufe **B)** für die Reinigung der Heparinsäuleneluat der 0,5 M NaCl Konzentrationsstufe. Die Proteine wurden auf einem 8 %igen SDS-Polyacrylamidgel der Größe nach aufgetrennt (das Molekulargewicht in kDa ist jeweils auf der linken Seite dargestellt) und mit Coomassie angefärbt. In Spur 1 ist jeweils die Ausgangsproteinlösung aufgetragen. In Spur 2 befindet sich der Überstand nach der Bindung (ungebundene Proteine). In Spur 3-5 wurden die Waschlösungen 1-3 aufgetragen, während sich in Spur 6 die mit SDS eluierten Proteine befinden. Im Eluat beider Konzentrationsstufen ist von der Ausgangsproteinlösung ausgehend eine Anreicherung des ca.78 kDa großen VP-RBP (Stern) zu verzeichnen. Außerdem wird die Anreicherung eines zweiten ca.70 kDa großen Proteins (Pfeil) in den beiden Eluaten sichtbar, bei dem es sich vermutlich um Rinderserumalbumin (BSA) handelt.

Eine weitere Analyse, in der die Proteine der vier verschiedenen Eluate (0,2 M/NaCl; 0,2 M/SDS; 0,5 M/NaCl; 0,5 M/SDS) gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt wurden, zeigte zum einen, dass die Menge des 78 kDa Proteins im 0,2 M/NaCl-Eluat sehr gering war im Vergleich zur Menge im 0,5 M/NaCl-Eluat (hier nicht gezeigt). Zum anderen wiesen die 78 kDa Proteine aus allen vier verschiedenen Eluaten die gleiche elektrophoretische Mobilität auf, wie es für das 0,5 M/NaCl-Eluat und das 0,5 M/SDS-Eluat in Abbildung 4.9. A dargestellt ist (Sternmarkierung). Es stellte sich jedoch die Frage, ob das 78 kDa Protein aus allen vier Eluaten tatsächlich das VP-RBP darstellte. Das 78 kDa Protein sollte, wenn es dem VP-RBP entspricht, an VP-Transkripte binden. Aus diesem Grund wurden UV-Quervernetzungsanalysen mit radioaktiv markierten VP *in vitro* Transkripten als Sonde und den Proteinlösungen aus den einzelnen Phasen der Affinitätschromatographie der 0,5 M NaCl Konzentrationsstufe durchgeführt (Abb.4.9.). Eine UV-Quervernetzung mit den Proteinlösungen aus der Affinitätschromatographie der 0,2 M NaCl Konzentrationsstufe wurde nicht durchgeführt, da die vorige Analyse gezeigt hatte, dass lediglich geringe Mengen des 78 kDa Proteins im 1 M NaCl Eluat enthalten waren, die für eine UV-Quervernetzung nicht ausreichend waren.

Die SDS-Eluate konnten für die UV-Quervernetzung nicht eingesetzt werden, da die Proteine dieser Lösungen durch das SDS denaturiert wurden und dementsprechend nicht mehr an die cRNA binden sollten. Jedoch weisen, wie bereits erwähnt wurde, die mit SDS eluierten Proteine und die mit 1 M NaCl eluierten Proteine beider Konzentrationsstufen dieselbe elektrophoretische Mobilität auf.

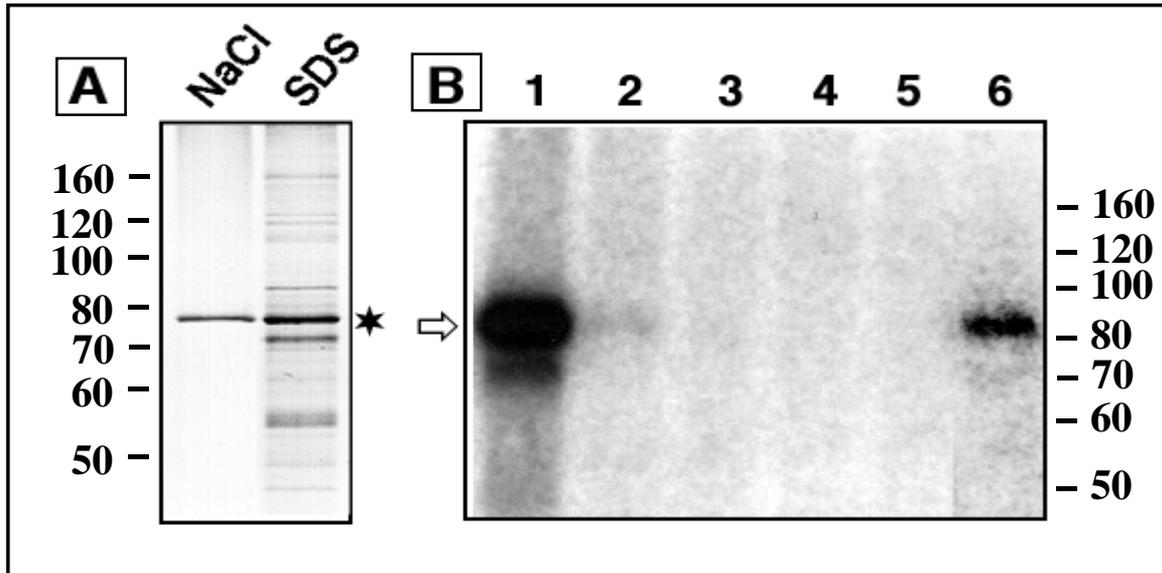


Abb. 4.9.: Überprüfung der Bindungsaktivität des VP-RBP in den einzelnen Phasen der Affinitätschromatographie mit VP-cRNA als Liganden und den Heparinsäulenspitzenfraktionen der 0,5 M NaCl Konzentrationsstufe als Proteinextrakt: **A)** Darstellung der auf einem 8 %igen SDS-Polyacrylamidgel nach der Größe (links ist der Größenmarker in kDa dargestellt) aufgetrennten und mit Coomassie gefärbten Proteinen. In der linken Spur befinden sich die mit NaCl eluierten und in der rechten die mit SDS eluierten Proteine der Affinitätschromatographie. In beiden Spuren ist ein 78 kDa großes Protein zu sehen (Sternmarkierung). Aufgrund der gleichen elektrophoretischen Mobilität werden beide als VP-RBP bezeichnet. **B)** Autoradiogramm der UV-Quervernetzung: Es wurden jeweils 5 fmol der radioaktiv markierten VP-cRNA als Sonde und 20 µl folgender Lösungen für die Analyse eingesetzt: Ausgangsproteinlösung der Affinitätschromatographie (Spur 1), nicht gebundene Proteine (=Überstand, Spur 2), Waschlösungen 1-3 (Spur 3-5), mit 1 M NaCl eluierte Proteine (Spur 6). Die VP-RBP Bindungsaktivität (Pfeil) ist in der Ausgangsproteinlösung höher als in der Lösung mit den eluierten Proteinen, obwohl das VP-RBP in letzterer angereichert ist (siehe Abb. 4.8). Im Überstand und in den Waschlösungen ist wenig bis keine Bindungsaktivität zu verzeichnen.

Die UV-Quervernetzungsanalyse mit der Ausgangsproteinlösung der Affinitätschromatographie (Abb. 4.9. B, Spur 1) zeigt, dass sich ein 85 kDa Komplex aus VP-cRNA und VP-RBP (Pfeil) ausbildet, der wie erwartet durch den RNA-Anteil im Komplex etwas größer ist als das mit SDS oder NaCl eluierte 78 kDa VP-RBP allein (Abb. 4.9. A, Stern). Ein Komplex mit derselben elektrophoretischen Mobilität tritt ebenfalls in der Lösung mit den durch 1 M NaCl eluierten Proteinen auf (Abb. 4.9. B, Spur 6). Die Intensität des Signals in der Lösung mit dem gereinigten Protein entspricht jedoch nicht der aufgrund der Anreicherung des VP-RBP im Vergleich zur Ausgangsproteinlösung (Abbildung 4.8.) erwarteten Höhe. Sie ist bedeutend geringer als in der Ausgangsproteinlösung. Diese Ergebnis wird später ausführlicher diskutiert.

Im Überstand nach der Bindung (Abbildung 4.9., Spur 2) und in den nachfolgenden Waschlösungen (Abbildung 4.9., Spur 3-5) ist keine Bindungsaktivität festzustellen. Diese Ergebnis weist auf eine quantitative Bindung des VP-RBP an die mit VP-cRNA gekoppelten paramagnetischen Partikel hin.

4.2.3. Sequenzierung des VP-RBP

Die Proteine des 0,2 M SDS/Eluates sowie des 0,5 M/SDS-Eluates und des 0,5 M/NaCl-Eluates wurden anschließend getrennt voneinander auf einem präparativen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Das jeweilige mit Coomassie angefärbte VP-RBP wurde ausgeschnitten. Die für die Sequenzierung weiteren erforderlichen experimentellen Schritte wurden von Dr. Friedrich Buck (Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) durchgeführt. Um das Protein in Peptide aufzuspalten, erfolgte ein Verdau mit Endoproteinase Lys C. Die resultierenden proteolytischen Fragmente wurden mittels HPLC (*high-performance liquid chromatography*) aufgetrennt. Die Sequenz jeweils eines Peptides des entsprechenden VP-RBP aus dem 0,2 M/SDS-Eluat, aus dem 0,5 M/SDS-Eluat und aus dem 0,5 M/NaCl-Eluat wurde durch Edman Abbau bestimmt. Die resultierenden drei Peptidsequenzen und das Ergebnis des Vergleichs dieser Sequenzen mit den Sequenzen der *Swissprot*-Proteinsequenzen-Datenbank sind in Tabelle 4.10. dargestellt.

Tabelle 4.10.: Peptidsequenzen einzelner Peptide des Vasopressin-mRNA-Bindungsproteins

Proteinaufreinigung	Peptidsequenz	Identität (%) zum Maus PABP-1
Heparinsäule: 0,2 M NaCl Affinitätschromatographie: 0,1% SDS	EFSPFGTITSAK	100%, AS 313-324
Heparinsäule: 0,5 M NaCl Affinitätschromatographie: 0,1% SDS	NFGEDMDDERL	100%, AS 197-207
Heparinsäule: 0,5 M NaCl Affinitätschromatographie: 1 M NaCl	GYGFVHFETQEAER	100%, AS 139-153

4.10.: Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen einzelner Peptide des VP-RBP, die aus zwei verschiedenen Affinitätschromatographien, zum einen mit den Heparinsäulenfraktionen der 0,2 M NaCl und zum anderen mit den Fraktionen der 0,5 M NaCl Konzentrationsstufe, stammen. Das erste Peptid ist 12 Aminosäuren lang und stammt aus der mit SDS eluierten Fraktion der Affinitätschromatographie der 0,2 M NaCl Konzentrationsstufe. Das zweite, 11 Aminosäuren lange, Peptid stammt aus der mit SDS eluierten Fraktion und das dritte, 15 Aminosäuren lange, aus der mit 1 M NaCl eluierten Fraktion der Affinitätschromatographie der 0,5 M NaCl Konzentrationsstufe. Alle drei Peptidsequenzen stimmen zu 100 % mit der Aminosäuresequenz des PABP-1 der Maus überein.

Aus der Tabelle 4.10. läßt sich entnehmen, dass sowohl das 12 Aminosäure umfassende Peptid aus dem 0,2 M/SDS-Eluat als auch das aus 11 Aminosäuren bestehende Peptid aus dem 0,5 M/SDS-Eluat und das 15 Aminosäuren umfassende Peptid aus dem 0,5 M NaCl-Eluat eine 100 %ige Übereinstimmung mit dem Poly(A)-Bindungsprotein-1 (PABP-1) der Maus aufweisen. Aus diesen Daten läßt sich ableiten, dass es sich bei den getrennt gereinigten Proteinen, trotz der zwei unterschiedlichen Konzentrationen, mit denen diese von der Heparinsäule eluiert wurden, um dasselbe Protein handelt. Dieses Protein, welches spezifisch an die VP-mRNA bindet, ist das PABP der Ratte (rPABP).

Eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche biochemische Verhalten des rPABP ist, dass das Protein, welches mit 0,2 M NaCl von der Heparinsäule eluiert wurde, andere posttranslationelle Modifikationen, wie z.B. Phosphorylierungen, besitzt als das Protein, welches mit 0,5 M NaCl von der Heparinsäule eluiert wurde. Dieser interessante Aspekt konnte in dieser Arbeit nicht abschließend untersucht werden, wird aber später diskutiert.

4.2.4. VP-RBP ist das Poly(A)-Bindungsprotein der Ratte (rPABP)

Das 72 kDa große PABP ist ein ubiquitäres im Tier und Pflanzenreich weit verbreitetes Protein. Das evolutionär hochkonservierte Protein besteht aus vier RNA-bindenden Domänen, die als RRM's bezeichnet werden (RRM: *RNA Recognition Motif*) und einem C-Terminus (Blobel, 1973; Burd & Dreyfuss, 1994) (Abb.4.11.). Der C-Terminus ist sehr reich an Prolin und vermittelt Protein-Protein Interaktionen (Burd *et al.*, 1991).

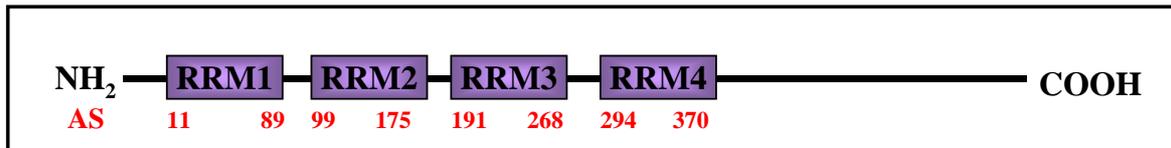


Abb. 4.11.: Schematische Darstellung der Domänenstruktur des PABP der Ratte. Das Protein besitzt vier RNA Bindungsdomänen (RRM:*RNA Recognition Motif*) am N-Terminus und einen Prolinreichen C-Terminus, welcher Protein-Protein Interaktionen vermittelt. Die gesamte Aminosäuresequenz des PABP beinhaltet 636 Aminosäuren (AS) (Mohr *et al.*, 2001; Genbank Accession-Nummer: S78215).

PABP ist ein multifunktionelles Protein (Übersicht in Mohr *et al.*, 2001). Es bindet mit hoher Affinität an 3'-Poly(A)-Schwänze von eukaryotischen mRNAs. Durch die Interaktion des PABP mit dem eukaryotischen Initiationsfaktor (eIF)4F, der am 5'-Ende der mRNA bindet, wird die Initiation der Translation stimuliert. PABP bindet mit geringer Affinität an nicht-Poly(A)-Sequenzen in verschiedenen Bereichen unterschiedlicher mRNAs und bildet dabei zum Teil Komplexe mit anderen Proteinen aus. In diesem Zusammenhang wirkt es mit an der translationsabhängigen mRNA Degradation sowie an einer positiven oder negativen Translationskontrolle.

Für diese Arbeit stellte sich die Frage, welche Rolle das multifunktionelle rPABP im VP-mRNA Metabolismus einnimmt. Da die VP-DLS, mit der das rPABP spezifisch interagiert, keine Adenin-reichen Sequenzen oder einen Poly(A)-Schwanz enthält, war eine Beteiligung des rPABP bei der Translationsinitiation der VP-mRNA in diesem Zusammenhang nicht sehr wahrscheinlich.

4.3. Charakterisierung der Interaktion des rPABP mit der VP mRNA

4.3.1. rPABP bildet mit Vasopressin-cRNA einen Komplex aus

Zunächst war es notwendig den Nachweis zu erbringen, dass das gereinigte rPABP dem VP-RBP entspricht. Dazu wurde aus einem Proteinextrakt aus Gehirn der Ratte (S100) das PABP quantitativ mit einem polyklonalen Kaninchen anti-rPABP Antikörper depletiert. Als Kontrolle diente ein mit Kaninchen IgG depletierter S100-Extrakt. Die in den depletierten Extrakten enthaltene Menge an rPABP wurden durch eine Westernblot-Analyse mit einem Kaninchen anti-rPABP Antikörper überprüft. Die Extrakte wurden anschließend für eine UV-Quervernetzungsanalyse mit ³²P-markierter VP-cRNA als Sonde eingesetzt (Abbildung 4.13.). Wenn das rPABP essentiell ist für die Ausbildung des zuvor beobachteten 85 kDa Komplex mit der VP-cRNA, sollte sich in der UV-Quervernetzungsanalyse mit dem Proteinextrakt, in dem das rPABP depletiert wurde, kein Komplex ausbilden.

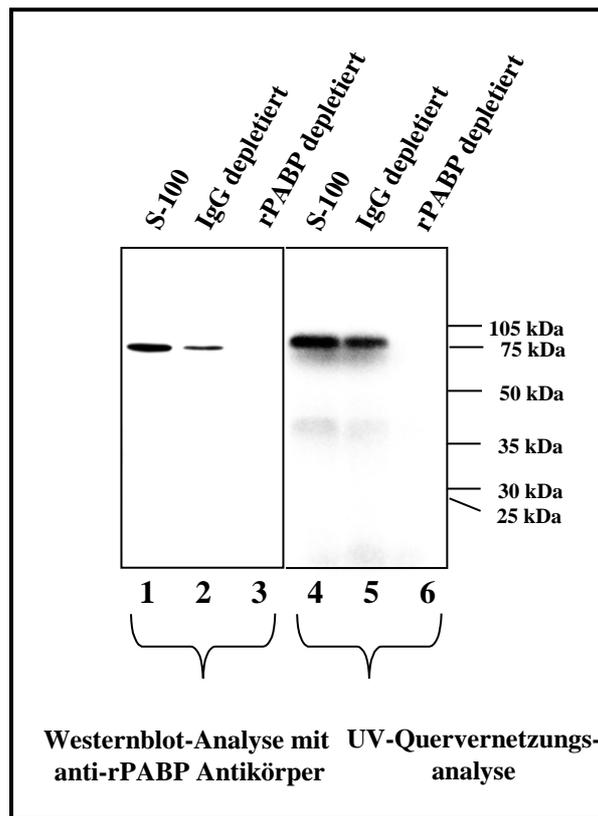


Abb. 4.13.: rPABP ist essentiell für die Ausbildung des 85 kDa Komplexes aus VP-cRNA und VP-RBP. Proteinextrakte aus Gehirn der Ratte (S-100) wurden zum einen mit Kaninchen IgG und zum anderen mit anti-rPABP Antikörper depletiert. Die An- oder Abwesenheit des rPABP in den Extrakten (jeweils 10 µg Protein) wurde mittels einer Westernblot-Analyse mit anti-rPABP Antikörper überprüft (Autoradiogramm auf der linken Seite). Das 72 kDa große rPABP ist im undepletierten (Spur 1) und im mit IgG depletierten S-100 (Spur 2) sichtbar, während im mit anti-rPABP Antikörper depletierten S-100 (Spur 3) kein rPABP mehr detektiert werden kann, da dieses zuvor quantitativ aus dem Proteinextrakt entfernt wurde. Die mittels Westernblot-Analyse überprüften Proteinextrakte (jeweils 10 µg) wurden anschließend für eine UV-Quervernetzungsanalyse mit ^{32}P -markierter VP-cRNA (5 fmol pro Ansatz) eingesetzt (Autoradiogramm im rechten Teil der Abbildung). Der 85 kDa Komplex bildet sich im undepletierten (Spur 4) und im mit Kaninchen IgG depletierten (Spur 5) S-100 aus, während im mit anti-PABP Antikörper depletierten Proteinextrakt (Spur 6) keine Komplexbildung zu beobachten ist.

Die Überprüfung der vorhandenen Menge an rPABP in dem undepletierten und in dem mit Kaninchen IgG depletierten S-100 mittels Westernblot-Analyse mit anti-rPABP Antikörper zeigt, dass in diesen Extrakten das 72 kDa große rPABP vorhanden ist (Abb. 4.13.; Spuren 1, 2). Im mit α -PABP depletierten Proteinextrakt ist mittels Western-Analyse kein PABP mehr detektierbar (Abb. 4.13.; Spur 3).

Die UV-Quervernetzungsanalysen mit diesen Extrakten und VP-cRNA als Sonde (Abb.4.13.; rechte Seite) zeigt, dass in den beiden Kontrollextrakten, in denen das rPABP vorhanden ist, der 85 kDa Komplex mit der VP-cRNA ausgebildet wird (Spuren 4, 5), während in dem mit anti-rPABP Antikörper depletierten Proteinextrakt der Komplex fehlt (Spur 6). Das rPABP ist somit essentiell für die Ausbildung des 85 kDa Komplexes aus VP-cRNA und VP-RBP.

Es stellte sich die Frage, ob das rPABP nicht nur essentiell für die Ausbildung des 85 kDa Komplexes, sondern auch selbst in diesem Komplex enthalten ist. Um dieser Frage nachzugehen, wurde eine UV-Quervernetzungsanalyse mit ³²P-markierter VP-cRNA und Proteinextrakt aus Gehirn der Ratte (S-100) durchgeführt. Der resultierende Komplex aus VP-cRNA und VP-RBP sollte, wenn das VP-RBP dem rPABP entspricht, mit anti-rPABP Antikörper präzipitiert werden können. Um für die Kontrollen dieselbe Ausgangsmenge an Komplexen einsetzen zu können, wurde der Ansatz einer UV-Quervernetzungsanalyse in drei Ansätze aufgeteilt. Der erste Ansatz, mit dem die Komplexbildung aus VP-cRNA und VP-RBP dokumentiert werden sollte, wurde nicht weiter behandelt. Aus dem zweiten Ansatz erfolgte die Immunpräzipitation mit Kaninchen IgG, um eine unspezifische Bindung des Komplexes an Antikörper auszuschließen. Aus dem dritten Ansatz erfolgte die Immunpräzipitation mit dem für das rPABP spezifischen anti-rPABP Antikörper. Die Proteine der resultierenden Präzipitate und des unbehandelten Anteils des Ansatzes der UV-Quervernetzungsanalyse wurden elektrophoretisch auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Die Komplexe aus Protein und cRNA wurden anschließend mittels Autoradiographie detektiert (Abb. 4.14.).

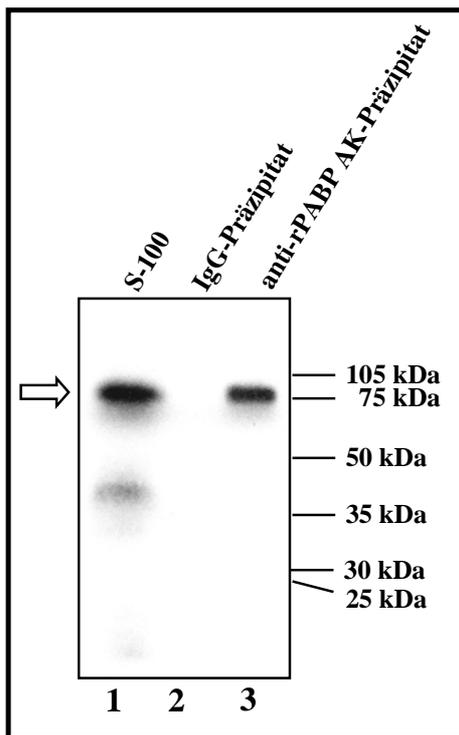


Abb. 4.14.: rPABP und VP-cRNA bilden einen Komplex: Autoradiogramm einer UV-Quervernetzungsanalyse mit Proteinextrakt aus Gehirn der Ratte (60 μg) und radioaktiv markierter VP-cRNA als Sonde (15 fmol) Spur 1: unbehandelt, Spur 2: nach Immunpräzipitation mit Kaninchen IgG, Spur 3: nach Immunpräzipitation mit anti-rPABP Antikörper. Der bei der UV-Quervernetzung gebildete 85 kDa Komplex (Pfeil) aus VP-cRNA und VP-RBP, welcher im unbehandelten Ansatz der UV-Quervernetzungsanalyse in Spur 1 zu sehen ist, wird durch den anti-rPABP Antikörper präzipitiert (Spur 3). Mit Kaninchen IgG (Spur 2) wird der 85 kDa Komplex nicht immunpräzipitiert.

Das Autoradiogramm (Abb. 4.14.) zeigt den durch UV-Quervernetzung entstandenen 85 kDa Komplex aus VP-cRNA und VP-RBP im unbehandelten Proteinextrakt aus Gehirn der Ratte (Spur 1). Im mit Kaninchen IgG immunpräzipitierten Ansatz (Spur 2) fehlt dieser Komplex, so dass eine unspezifische Bindung des 85 kDa Komplexes an Antikörper auszuschließen ist. Der Komplex wird jedoch mit dem für rPABP spezifischen anti-rPABP Antikörper präzipitiert (Spur 3). Aus diesem Resultat läßt sich ableiten, dass das rPABP selbst im Komplex mit der VP-cRNA enthalten ist. Folglich entspricht das gereinigte rPABP dem VP-RBP.

4.3.2. Die Interaktion des rPABP mit der VP mRNA erfolgt über die Domänen RRM

3+4

Nachdem festgestellt wurde, dass das rPABP dem VP-RBP als Bindungsprotein an VP-mRNA entspricht, stellte sich die Frage, welche Domänen oder Teilabschnitte des Proteins für diese Interaktion notwendig sind. Um die Fragestellung zu beantworten, wurden zunächst sieben verschiedene Teilsequenzen der cDNA des rPABP in den eukaryotischen Expressionsvektor pCMV Flag-tag 2B kloniert. Nach transienter Transfektion von HEK 293 Zellen mit diesen Plasmiden, um die entsprechenden Proteine zu exprimieren (Aminosäuresequenzen in Abb. 4.15.), wurden die resultierenden Proteinextrakte für RNA-Protein Bindungsversuche eingesetzt.

Alle von diesen Vektoren exprimierten Proteine beinhalten ein Plasmid-codiertes *Flag-Tag* am N-Terminus. Das *Flag-Tag* besteht aus neun Aminosäuren, welche das Epitop für einen monoklonalen Maus anti-Flag-Tag Antikörper bilden. Die Detektion der Proteine erfolgte mit Hilfe dieses Antikörpers.

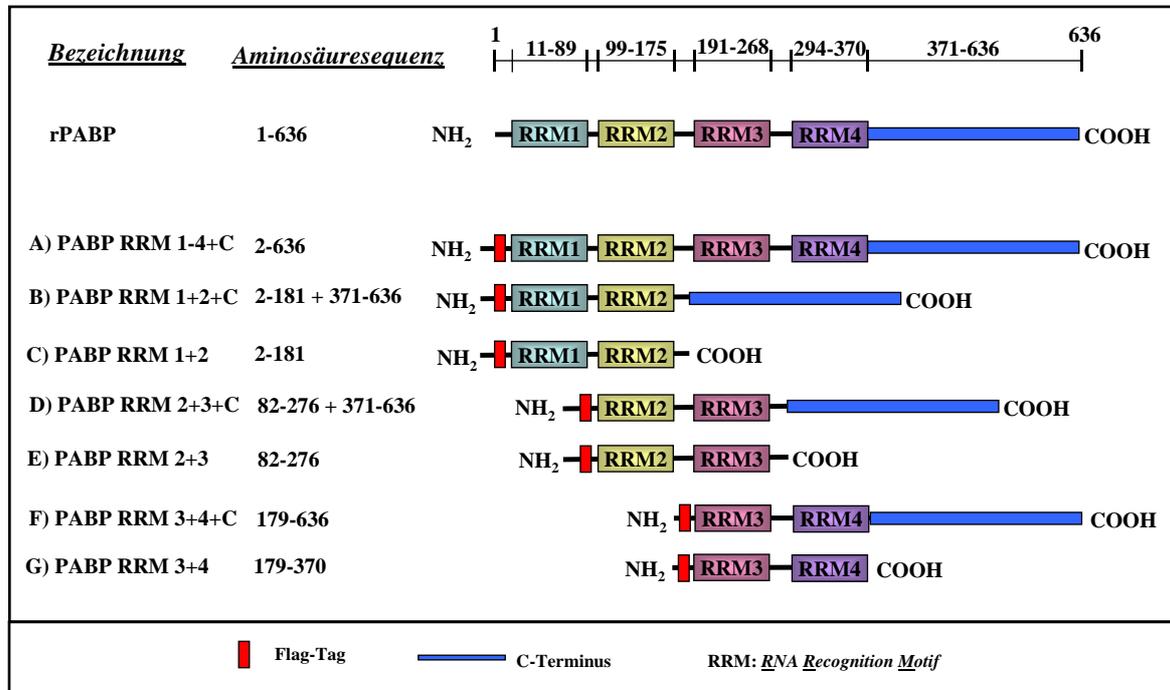


Abb. 4.15.: Schematische Darstellung der Vektor-exprimierten Flag-Tag-rPABP Fusionsproteine.

Es wurden sieben verschiedene Teilsequenzen der cDNA des rPABP nach PCR-Amplifizierung in den eukaryotischen Expressionsvektor pCMV Flag-tag 2B kloniert. Die in HEK 293-Zellen exprimierten Proteine beinhalten ein Vektor-codiertes 9 Aminosäuren langes *Flag-Tag* am N-Terminus (rote Box). Das erste Protein (A) umfaßt die gesamte Aminosäuresequenz des rPABP mit Ausnahme des Start-Methionins. Die Proteine B und C beinhalten die Aminosäuresequenz der RRM1+2 des rPABP. An das Protein B wurde zusätzlich die Aminosäuresequenz des C-Terminus des rPABP fusioniert. Die Proteine D und E umfassen die Aminosäuresequenz der RRM2+3, wobei das Protein D ebenfalls mit dem C-Terminus des rPABP fusioniert wurde. Das Konstrukt F beinhaltet die Aminosäuresequenz der RRM3+4 und des nachfolgenden C-Terminus, während das Konstrukt G lediglich aus der Aminosäuresequenz der RRM3+4 besteht.

Das Protein PABP RRM 1-4+C (Abb. 4.15., A) umfaßt die gesamte Sequenz des rPABP mit Ausnahme des Start-Methionins, d.h. die RNA-Bindungsdomänen 1-4 und den C-Terminus. Die Teilsequenz der cDNA, welche die RRM1+2 codiert, wurde jeweils mit (Abb. 4.15., B) bzw. ohne C-Terminus (Abb. 4.15. C) kloniert und exprimiert. Ebenso wurde die Teilsequenzen der cDNA, welche für die RRM2+3 codiert, jeweils mit (Abb. 4.15., D) und ohne C-Terminus (Abb. 4.15., E) kloniert und exprimiert.

Ein weiteres rekombinantes Protein beinhaltet die RRM 3+4 und den C-Terminus (Abb. 4.15., F). Außerdem wurde die Teilsequenz der cDNA, welche für die RRM 3+4 codiert, kloniert und exprimiert (Abb. 4.15., G). Die Expression der RRM erfolgte nicht einzeln, sondern immer in Kombinationen von zwei RRM gleichzeitig, da aus Daten in der Literatur bekannt war, dass einzelne RRM zumindest nicht an Poly(A)-Sequenzen binden (Burd *et al.*, 1991).

Die Expression der Proteine wurde durch eine immunzytochemische Analyse mit einem monoklonalen Maus anti-Flag -Tag Antikörper überprüft (Abb 4.16.).

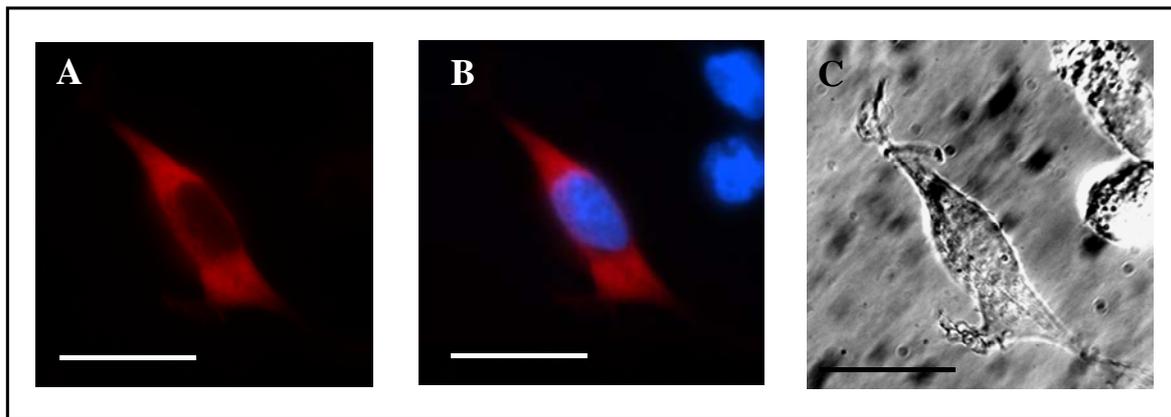


Abb. 4.16.: Nachweis des rekombinanten Proteins PABP RRM 1-4+C in transfizierten HEK 293-Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz: Die Detektion des rekombinanten Proteins erfolgte mit dem anti-Flag-Tag Antikörper aus der Maus und dem Sekundärantikörper anti-Maus gekoppelt mit Cy3 aus der Ziege. Die Mikroskopaufnahmen zeigen A: PABP RRM 1-4+C (rot), B: PABP RRM 1-4+C (rot) und den mittels DAPI angefärbten Zellkern (blau), C: Phasenkontrastaufnahme; (Kalibrierungsbalken: 20 μm). Das rekombinante Protein PABP RRM 1-4+C (rot) ist ebenso wie es für das PABP in der Literatur gezeigt wurde, überwiegend zytoplasmatisch in der Zelle verteilt, während der Kern (blau) kaum durch das Protein angefärbt ist. Diese immunzytochemische Analyse steht stellvertretend für die restlichen sechs in Abb. 4.15. aufgeführten Proteine, die dasselbe Erscheinungsbild aufweisen.

In Abbildung 4.16 ist der Nachweis des rekombinanten Proteins PABP RRM 1-4+C in HEK 293 Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz dargestellt. Dieser Nachweis wird exemplarisch für die sieben rekombinanten Proteine gezeigt. Die immunzytochemischen Analysen zeigten die Expression aller rekombinanten Proteine. Die sieben Proteine sind in den Zellen überwiegend zytoplasmatisch verteilt. Dieses Ergebnis stimmt mit den aus der Literatur bekannten Daten überein, dass das humane PABP zwischen dem Kern und dem Zytoplasma „shuttelt“ und überwiegend zytoplasmatisch verteilt ist (Afonina *et al.*, 1998).

Im Anschluß an die immunzytochemischen Analysen wurde die korrekte Größe der rekombinanten Proteine mittels Westernblot-Analyse überprüft (Daten hier nicht gezeigt).

Alle rekombinanten Proteine wurden in geeigneten Mengen und mit der korrekten Größe exprimiert. Sie wurden für UV-Quervernetzungsanalysen mit radioaktiv markierter VP-cRNA eingesetzt. Aus diesen Ansätzen wurden die rekombinanten Proteine mit Hilfe des anti-Flag-Tag Antikörpers immunpräzipitiert. Danach erfolgte die gelelektrophoretische Trennung der resultierenden Immunpräzipitate auf einem SDS-Gel, und deren Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran. Zunächst wurden die Protein-RNA-Komplexe mittels Autoradiographie detektiert. Wie die Autoradiographie (Abb. 4.17., A) zeigt, befindet sich die radioaktiv markierte VP-cRNA nur in den Präzipitaten der rekombinanten Proteine, welche die RRM 3+4 enthalten (d.h. PABP RRM 3+4, PABP RRM 3+4+C und PABP RRM 1-4+C) (Abb. 4.17., A). Die anderen rekombinanten Proteine (PABP RRM 1+2, PABP RRM 1+2+C, PABP RRM 2+3 und PABP RRM 2+3+C) binden dementsprechend nicht an VP-cRNA. Der C-Terminus des rPABP ist für die Bindung der VP-cRNA nicht notwendig, da das rekombinante Protein PABP RRM 3+4 auch ohne C-Terminus bindet. Das rekombinante Protein Protein Phosphatase1 alpha ($PP1\alpha$) der Ratte wurde in diesem Experiment eingesetzt, da es ebenfalls ein Vektor-codiertes Flag-Tag am N-Terminus beinhaltet und somit die unspezifische Bindung der VP-cRNA an das Flag-Tag überprüft werden kann. Die $PP1\alpha$ bindet nicht an VP-cRNA (Abb. 4.17., A), womit eine unspezifische Bindung der VP-cRNA an das Vektor-codierte Flag-Tag auszuschließen ist. Aus dem als Kontrolle dienenden Ansatz der UV-Quervernetzungsanalyse mit dem Proteinextrakt aus untransfizierten HEK 293-Zellen wurde kein Protein-VP-cRNA-Komplex immunpräzipitiert. Dieses zeigt die Spezifität des anti-Flag-Tag Antikörpers. Im Anschluß daran wurden die rekombinanten Proteine mittels Westernblot-Analyse mit einem anti-Flag-Tag Antikörper nachgewiesen. Wie die Abbildung 4.17. B zeigt, wurden alle sieben rekombinanten Proteine des rPABP und das rekombinante Protein $PP1\alpha$, welches ebenfalls ein Vektor-codiertes Flag-Tag am N-Terminus beinhaltet, exprimiert und können durch einen anti-Flag-Tag Antikörper immunpräzipitiert werden. Zusammenfassend läßt sich sagen, dass die Interaktion des rPABP mit der VP mRNA über die Domänen RRM 3+4 erfolgt.

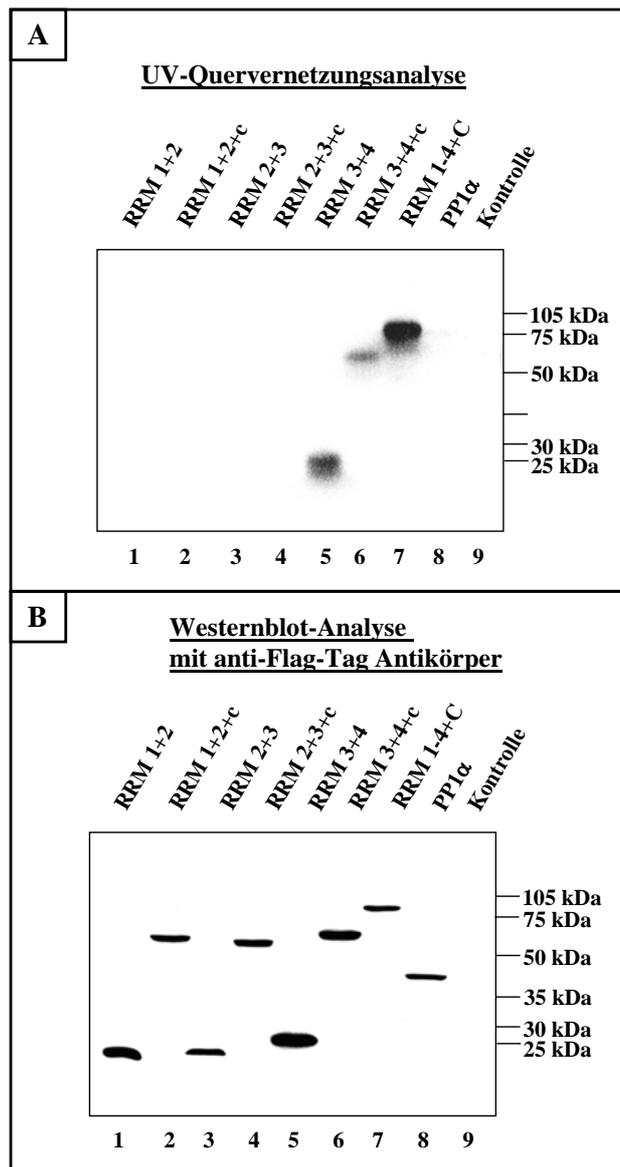


Abb. 4.17.: RNA-Protein-Bindungsstudie mit ^{32}P -markierter VP-cRNA und PABP-Teilsequenzen mit einer Vektor-codierten Flag-Tag-Sequenz am N-Terminus: **A)** Autoradiogramm der nach einer UV-Quervernetzungsanalyse mit Hilfe eines anti-Flag-Tag-Antikörpers immunpräzipitierten und auf Nitrocellulose-Membran transferierten Komplexe aus VP-cRNA und rekombinanten Proteinen: Die rekombinanten Proteine, welche die RRM 3+4 umfassen (d.h. PABP RRM 3+4 (Spur 5), PABP RRM 3+4+c (Spur 6) und PABP RRM 1-4+c (Spur 7)) bilden einen Komplex mit der VP-cRNA aus, während die Proteine, welche die RRM 1+2 und 2+3 umfassen (d.h. PABP RRM 1+2 (Spur 1), PABP RRM 1+2+c (Spur 2), PABP RRM 2+3 (Spur 3), PABP RRM 2+3+c (Spur 4)) nicht an die VP-cRNA binden. Das rekombinante Protein Protein Phosphatase 1 alpha der Ratte (PP1 α) (Spur 8), welches ebenfalls ein Vektor-codiertes Flag-Tag am N-Terminus beinhaltet, bindet ebenfalls nicht an VP-cRNA. Zudem ist im Präzipitat aus dem Ansatz der UV-Quervernetzungsanalyse mit dem Proteinextrakt aus untransfizierten HEK 293-Zellen (Kontrolle) (Spur 9) kein Protein-cRNA-Komplex enthalten **B)** Westernblot-Analyse mit einem anti-Flag-Tag Antikörper und der Nitrocellulose-Membran aus A: Diese Analyse bestätigt die Immunpräzipitation aller sieben eingesetzten PABP-Teilsequenzen und des rekombinanten Proteins PP1 α .

4.3.3 Die RNA-Bindungsdomänen RRM 3 und RRM 4 des rPABP binden einzeln nicht an VP-cRNA

Um zu überprüfen, ob für die Interaktion des rPABP mit der VP-cRNA die beiden RRM 3+4 gemeinsam notwendig sind, wie es für die Interaktion der RRM 1+2 mit Poly(A)-Sequenzen in der Literatur gezeigt wurde (Burd *et al.*, 1991), wurden zwei weitere Konstrukte hergestellt. Das erste beinhaltet die Teilsequenz der cDNA des rPABP, die für RRM 3 kodiert (Abb. 4.18., H). Das zweite Konstrukt kodiert RRM 4 sowie den C-Terminus des rPABP (Abb. 4.18., I). Beide Teilsequenzen wurden nach der Herstellung mittels PCR ebenfalls in den eukaryotischen Expressionsvektor pCMV-Flag tag 2B kloniert, welcher das N-terminale Flag-Tag kodiert. Die Sequenz der RRM 4 des rPABP wurde mit dem C-Terminus zusammen kloniert, da RRM 4 allein nicht in HEK 293-Zellen exprimiert wurde. Zum Vergleich wurde das Konstrukt G herangezogen (Abb. 4.18.), welches die Sequenz der cDNA des rPABP beinhaltet, die für die RRM 3+4 codiert. Das exprimierte rekombinante Protein PABP RRM 3+4 sollte wie zuvor gezeigt an VP-cRNA binden.

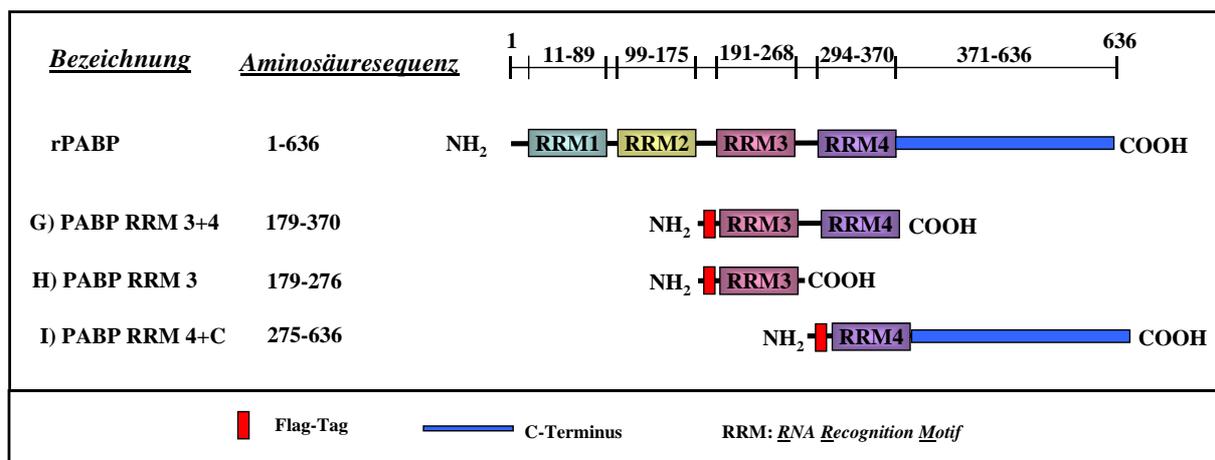


Abb. 4.18.: Schematische Darstellung der Vektor-exprimierten Proteine PABP RRM 3+4 (G), PABP RRM 3 (H) und PABP RRM 4+C (I): Die drei verschiedenen Teilsequenzen der cDNA des rPABP wurden über PCR hergestellt und in den eukaryotischen Expressionsvektor pCMV-Flag tag 2B kloniert. Die Proteine wurden in HEK 293-Zellen exprimiert. Das rekombinante Protein G beinhaltet die RRM 3+4, während das rekombinante Protein H die RRM 3 des rPABP umfaßt. Das rekombinante Protein I besteht aus der RRM 4 und dem C-Terminus des rPABP. Alle drei Proteine beinhalten ein Plasmid-codiertes Flag-Tag am N-Terminus (rot).

Nach transienter Transfektion der Plasmide und Expression der rekombinanten Proteine in HEK 293-Zellen wurden die resultierenden Proteinextrakte für UV-Quervernetzungsanalysen mit radioaktiv markierter VP-cRNA eingesetzt. Danach erfolgte die Immunpräzipitation der rekombinanten Proteine mit Hilfe eines anti-Flag-Tag Antikörpers. Die Immunpräzipitate wurden elektrophoretisch getrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die Komplexe aus rekombinanten Proteinen und VP-cRNA wurden mittels Autoradiographie detektiert. Wie das Autoradiogramm in Abb 4.19. A zeigt, binden die Deletionsmutanten PABP RRM 3 und PABP RRM 4+C nicht an die radioaktiv markierte VP-cRNA, da keine entsprechenden Komplexe detektiert werden konnten. Lediglich das Protein PABP RRM 3+4, wie bereits gezeigt wurde (Abb. 4.17.), bildete mit VP-cRNA einen Komplex aus. Die anschließende Westernblot-Analyse mit einem anti-Flag-Tag Antikörper (Abb. 4.19. B) belegt, dass alle drei rekombinanten Proteine präzipitiert wurden. Die immunologische Detektion von zusätzlichen Proteinen mit Molekulargewichten von 28 und 31 kDa, wovon das 28 kDa Protein ebenfalls im Kontrolleextrakt aus nicht transfizierten HEK 293-Zellen detektiert wird, ist von der verwendeten Charge des Antikörpers abhängig und somit unspezifisch.

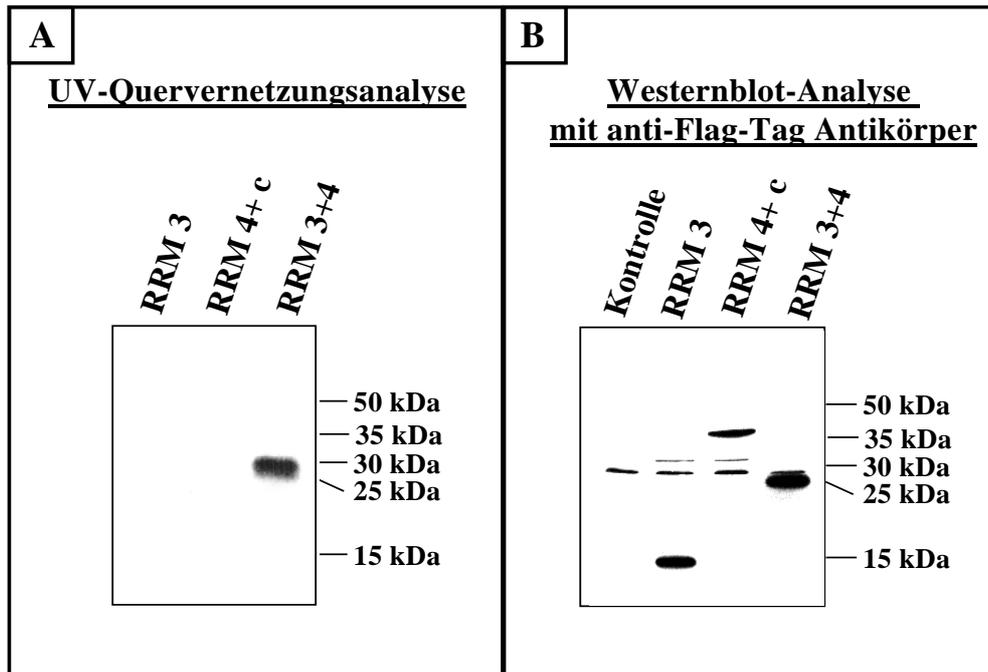


Abb. 4.19.: RNA-Protein-Bindungsanalyse mit radioaktiv markierter VP-cRNA und den rekombinanten Proteinen PABP RRM 3, PABP RRM 4+C und PABP RRM 3+4: **A)** Autoradiogramm der nach einer UV-Quervernetzungsanalyse mit Hilfe eines anti-Flag-Tag Antikörpers immunpräzipitierten und auf eine Nitrocellulose-Membran transferierten Komplexe aus VP-cRNA und rekombinanten rPABP-Deletionsmutanten: Die rekombinanten Proteine PABP RRM 3 und PABP RRM 4+C binden nicht an die mit ^{32}P -markierte VP-cRNA, da auf dem Autoradiogramm die entsprechenden Komplexe nicht sichtbar sind. Das rekombinante Protein PABP RRM 3+4 bildet mit VP-cRNA einen sichtbaren Komplex aus. **B)** Westernblot-Analyse mit dem anti-Flag-Tag Antikörper und der Nitrocellulose-Membran aus A: Alle drei rekombinanten Proteine wurden immunpräzipitiert. Der Antikörper detektiert in den Präzipitaten von PABP RRM 3 und PABP RRM 4+C zwei weitere Proteine mit 28 und 31 kDa, wovon das 28 kDa Protein ebenfalls im Kontrollpräzipitat detektiert wird.

Zusammengefaßt läßt sich sagen, dass für die Bindung des PABP an VP-mRNA die RRM 3 und 4 gemeinsam erforderlich sind. Damit entsprach das Bindungsverhalten des PABP an die VP-mRNA demjenigen, welches aufgrund von Daten aus der Literatur zu erwarten war. In der Literatur ist beschrieben, dass die RRM 1+2 des PABP in Hefe (Burd *et al.*, 1991), *Xenopus* (Nietfeld *et al.*, 1990; Kuhn und Pieler, 1996) und Mensch (Rahul *et al.*, 1999) mit hoher Affinität an Poly(A)-Sequenzen binden. Die RRM 3+4 hingegen binden mit präferentiell an Poly(U)-Sequenzen (Deardorff und Sachs, 1997). Da die VP-cRNA-Sonde, die für die Experimente in dieser Arbeit verwendet wurde, weder einen Poly(A)-Schwanz noch längere Poly(A)-reiche Sequenzen beinhaltet, war zu vermuten, dass die Bindung an die mRNA über die RRM 3+4 des rPABP erfolgen sollte.

3.3.4. Die Proteine PABP RRM 1+2 und PABP RRM 3+4 binden an Poly(A)-Ribohomopolymere

Um zu zeigen, dass die in HEK 293-Zellen exprimierten rekombinanten Proteine PABP RRM 1+2 und PABP RRM 2+3 generell zur RNA-Interaktion befähigt sind, wurden weitere Bindungsexperimente durchgeführt. In der Literatur wurde beschrieben, dass die RRM 1+2 mit hoher Affinität an Poly(A)-Sequenzen binden (Burd *et al.*, 1991). Daher sollte das rekombinante Protein PABP RRM 1+2 ebenfalls mit Poly(A)-Sequenzen interagieren. Es wurde das Bindungsverhalten der drei rekombinanten Proteine PABP RRM 1+2, PABP RRM 2+3 und PABP RRM 3+4 an Adenin-Ribohomopolymere mit einer Länge von durchschnittlich 98 Nukleotiden untersucht.

Das Experiment wurde in zwei verschiedenen Bindungspuffern durchgeführt. Der erste Puffer entsprach dem Bindungspuffer, der in den UV-Quervernetzungsanalysen mit VP-cRNA eingesetzt und mit dem eine spezifische Bindung des rPABP nachgewiesen wurde. Der zweite Bindungspuffer wurde von Burd *et al.* (1991) eingesetzt, um die Bindung der in Gegenwart von ³⁵S-Methionin *in vitro* translatierten Teilsequenzen des PABP aus *S. cerevisiae* an Ribohomopolymere zu untersuchen. Es wurde in diesem Puffer eine bevorzugte Bindung der Teilsequenz RRM 1+2 des PABP aus *S. cerevisiae* an Poly(A)-Ribohomopolymere festgestellt. Der erste Puffer beinhaltet im Gegensatz zum zweiten Puffer eine größere Menge an Heparin, sowie eine geringere Menge an Salzen. Zudem enthält der erste Puffer zusätzlich tRNA.

Die zuvor im jeweiligen Bindungspuffer äquilibrierte Poly(A)-Sephrose wurde mit den in HEK 293-Zellen exprimierten rPABP-Deletionsmutanten inkubiert. Die an Poly(A)-Sequenzen gebundenen rekombinanten Proteine wurden anschließend eluiert, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die rPABP-Deletionsmutanten wurden mittels einer Westernblot-Analyse mit einem anti-Flag-Tag Antikörper detektiert. Die Quantifizierung der Menge an rekombinanten Protein auf der Nitrocellulose-Membran erfolgte mittels der Messung der Fluoreszenzintensität des Sekundärantikörpers mit Hilfe des *Odyssey Infrared Imaging System* (LI-COR Biosciences). Sie wurde in Verhältnis gesetzt zu der Menge an rekombinanten Protein, die für das Experiment eingesetzt wurde. Die eingesetzte Menge wurde ebenfalls mittels Westernblot-Analyse und anschließender Auswertung mit Hilfe des *Odyssey Infrared Imaging System* bestimmt.

Wie man der Tabelle 4.20. entnehmen kann, bindet in beiden Puffern das rekombinante Protein PABP RRM 3+4 bevorzugter an Poly(A)-Sequenzen als das rekombinante Protein PABP RRM 1+2. Das rekombinante Protein PABP RRM 2+3 bindet in beiden Puffern nur geringfügig an Poly(A)-Sequenzen. Durch dieses Experiment läßt sich eine hohe Affinität der rPABP-Deletionsmutante PABP RRM 3+4 zu Poly(A)-Sequenzen feststellen.

Tabelle 4.20.: Quantitative Auswertung der Bindung der rekombinanten Proteine PABP RRM 1+2, PABP RRM 2+3 und PABP RRM 3+4 des rPABP an Poly(A)-Sequenzen mit dem *Odyssey Infrared Imaging System*.

Eingesetzte Proteine	% Bindung an Poly(A)-Sequenzen Puffer 1 (UV-Quervernetzungspuffer)	% Bindung an Poly(A)-Sequenzen Puffer 2 (Burd <i>et al.</i> , 1991)
PABP RRM 1+2	1,7	1,3
PABP RRM 2+3	0,3	0,5
PABP RRM 3+4	20,0	7,6

Tabelle 4.20.: Angegeben ist der prozentuale Anteil des an Poly(A)-Sequenzen gebundenen rekombinanten Proteins in Bezug auf die für dieses Bindungsexperiment eingesetzte Menge an rekombinanten Protein. Die Bindungsanalyse erfolgte in zwei verschiedenen Puffern. Puffer 1 entspricht dem in UV-Quervernetzungsanalysen, in denen eine spezifische Bindung von VP-mRNA an rPABP festgestellt wurde, angewendeten Puffer. Puffer 2 (Burd *et al.*, 1991) entspricht dem Bindungspuffer, in dem eine präferentielle Bindung des in Gegenwart von ³⁵S-Methionin *in vitro* translatierten Proteins RRM 1+2 des PABP aus *S. cerevisiae* an Poly(A)-Sequenzen festgestellt wurde. Die in dieser Tabelle angegebenen Werte zeigen, dass das Protein PABP RRM 3+4 bevorzugter an Poly(A)-Sequenzen bindet als PABP RRM 1+2. Das Protein PABP RRM 3+4 bindet bevorzugter im Puffer 1 als im Puffer 2. Das Protein PABP RRM 2+3 bindet nur sehr geringfügig an Poly(A)-Sequenzen.

Eine hochaffine Bindung an Poly(A)-Sequenzen wurde inzwischen auch für die RRM 3+4 des humanen PABP demonstriert (Sladic *et al.*, 2003). Die Diskrepanz im Bindungsverhalten von Teilsequenzen des PABP der Hefe (Burd *et al.*, 1991), bzw. von Säugern (Sladic *et al.*, 2003; hier dargestellte Ergebnisse), an Poly(A)-Ribohomopolymere beruht möglicherweise darauf, dass das Protein der Hefe einen weitaus geringeren Grad an Sequenzidentität zum PABP der Ratte aufweist (58,2 %) als dies beim entsprechenden Protein des Menschen der Fall ist (99,5 %). Abschließend sei angemerkt, dass dieses Experiment lediglich einmal durchgeführt wurde, da das Gerät zur Quantifizierung des Bindungsversuches nur für einen Versuch zur Verfügung stand.

4.3.5. Interaktion des mittels *in vitro* Translation hergestellten Proteins rPABP und seiner Deletionsmutanten RRM 1+2, RRM 2+3, RRM 3+4 mit Poly(A)-Sequenzen

Da das Ergebnis dieser Arbeit ein anderes Bindungsverhalten der in HEK 293-Zellen exprimierten Deletionsmutanten des rPABP an Poly(A)-Sequenzen aufzeigt als die in der Literatur beschriebenen mittels *in vitro* Translation hergestellten Deletionsmutanten des PABP aus *S. cerevisiae*, ergab sich die Frage, ob das unterschiedliche Bindungsverhalten auf die unterschiedliche Synthese der Deletionsmutanten zurückzuführen ist. Die Methode der Expression in HEK 293-Zellen hat gegenüber der Methode der *in vitro* Transkription und Translation im Reticulozytenlysat den Vorteil, dass mögliche Faktoren, die für eine Modifizierung der exprimierten Proteine notwendig sind, in lebenden Zellen eher vorhanden sind als im Reticulozytenlysat. Um Daten zu erhalten, die mit den Angaben aus der Literatur besser vergleichbar sind, wurden die Deletionsmutanten des rPABP ebenfalls *in vitro* translatiert. Die mittels *in vitro* Translation synthetisierten Proteine sind in der Abbildung 4.21. schematisch dargestellt.

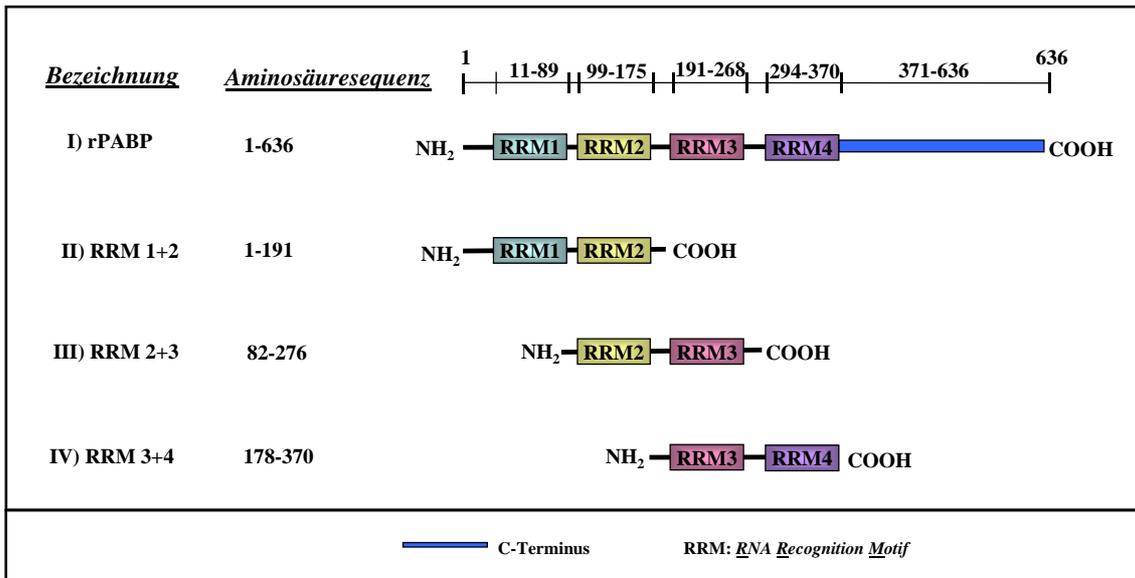


Abb. 4.21: Schematische Darstellung des mittels *in vitro* Translation synthetisierten rPABP und seiner Deletionsmutanten: Die gesamte Sequenz oder Teilsequenzen der cDNA des rPABP wurden mittels PCR hergestellt. Die Konstrukte wurden für die gekoppelte *in vitro* Transkription/Translation mit dem System *TNT® Quick Coupled Transcription/Translation* (Promega) in den Vektor pSP64Poly(A) kloniert. Das Protein rPABP (I) umfaßt die vollständige Aminosäuresequenz des rPABP mit den RRM 1-4 und dem C-Terminus, während die restlichen drei Proteine (II-IV) Deletionsmutanten des rPABP darstellen. Das Protein II beinhaltet die RRM 1+2, während die Deletionsmutante III die RRM 2+3 und die Deletionsmutante IV die RRM 3+4 des rPABP umfaßt.

Das Protein rPABP (I) beinhaltet die vollständige Aminosäuresequenz des rPABP. Die Deletionsmutante II umfaßt die RRM 1+2. Die Aminosäuresequenz dieser Deletionsmutante war um 10 Aminosäuren länger als das in HEK 293-Zellen exprimierte Protein PABP RRM 1+2. Die Aminosäuresequenz der längeren Variante RRM 1+2 reicht bis zum ersten RNA-Erkennungsmotiv der RRM 3. Für diesen Versuch wurde eine längere Variante verwendet, um eine möglicherweise schlechtere Bindung an Poly(A)-Sequenzen aufgrund fehlender Aminosäuren auszuschließen. Die Deletionsmutante III beinhaltete die RRM 2+3, während das Konstrukt IV die RRM 3+4 des rPABP umfaßt.

Um die synthetisierte Menge an Protein quantitativ bestimmen zu können, erfolgte die *in vitro* Translation in Gegenwart von ³⁵S-Methionin. Die korrekte Synthese der vier Proteine wurde zunächst durch deren Auftrennung auf einem SDS-Gel und anschließender Autoradiographie überprüft (Daten hier nicht gezeigt).

Die Poly(A)-Ribohomopolymere wurden wie im vorigen Bindungsexperiment nach Angaben des Herstellers vorbereitet und mit dem Bindungspuffer (Burd *et al.*, 1991) äquilibriert. Anschließend erfolgte die Inkubation der *in vitro* translatierten Proteine mit den Poly(A)-Ribohomopolymeren in Bindungspuffer. Für den Bindungsversuch wurden äquimolare Mengen der vier verschiedenen Proteine eingesetzt. Nach der Eliminierung von unspezifisch bindenden Proteinen durch mehrmaliges Waschen mit Bindungspuffer erfolgte die Elution der Proteine von den Poly(A)-Sequenzen mit 0,4 % SDS. Die Quantifizierung der prozentualen Bindung der vier verschiedenen Proteine an Poly(A)-Sequenzen erfolgte mittels Flüssigszintillationszählung. Wie man der Abbildung 4.22. entnehmen kann, bindet das gesamte rPABP mit Abstand am effizientesten an Poly(A)-Sequenzen. Die Effizienz der Bindung an Poly(A)-Sequenzen nimmt ausgehend von der PABP-Deletionsmutante RRM 3+4, über RRM 2+3 bis zur PABP-Deletionsmutante RRM 1+2 ab. Dieses Ergebnis divergiert mit den Daten aus der Literatur, in denen für die RRMs 1+2 aus der Hefe gezeigt wurde, dass sie bevorzugt und genauso gut an Poly(A)-Sequenzen binden wie das gesamte PABP (Burd *et al.*, 1991). Das Ergebnis der unter 4.3.4. dargestellten Experimente wurde mit dieser Analyse bestätigt. Die RRMs 3+4 des rPABP binden effizienter an Poly(A)-Sequenzen als die RRMs 1+2. Mit der *in vitro* translatierten Deletionsmutante RRM 2+3 wurde jedoch im Gegensatz zum vorigen Experiment mit der in HEK 293-Zellen exprimierten Deletionsmutante PABP RRM 2+3 eine Bindung an Poly(A)-Sequenzen festgestellt. Diese Diskrepanz ließe sich möglicherweise dadurch erklären, dass die Konzentration der in den Zellen exprimierten Proteine lediglich abgeschätzt werden konnte, während die Konzentration der *in vitro* translatierten Proteine exakt quantifiziert werden konnten, so dass von diesen äquimolare Mengen eingesetzt wurden. Zudem konnte die Bindungsanalyse mit den in HEK 293-Zellen exprimierten Deletionsmutanten lediglich einmal durchgeführt werden.

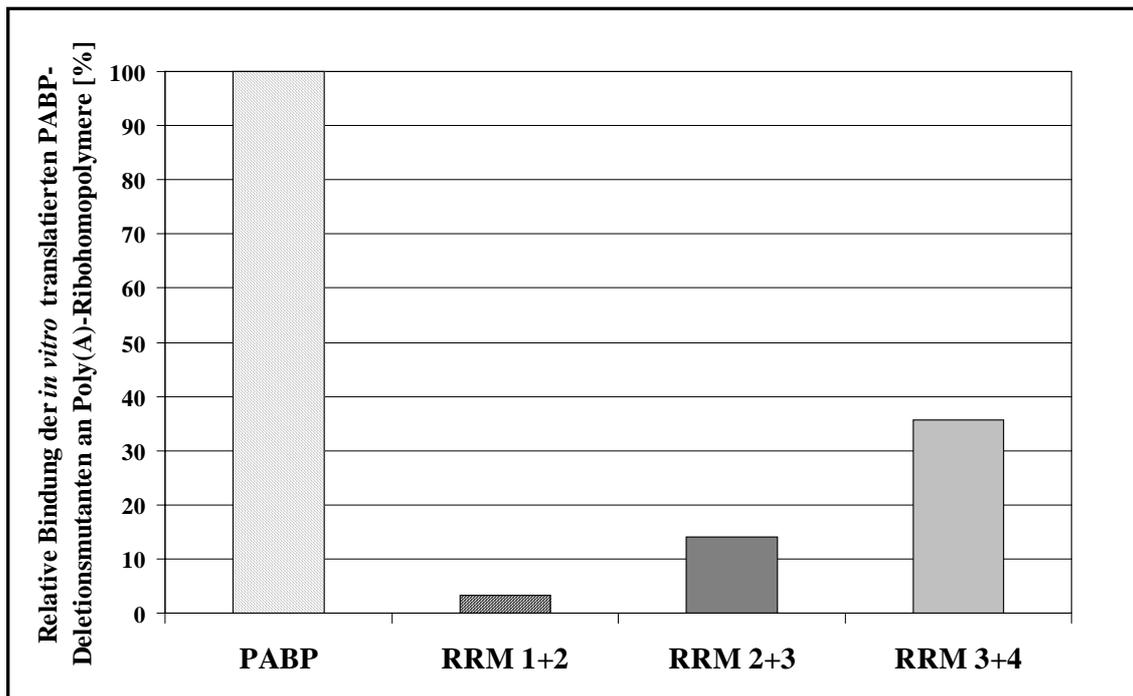


Abb. 4.22.: Schematische Darstellung des Ergebnis der Bindungsstudie des *in vitro* translatierten rPABP und der *in vitro* translatierten PABP-Deletionsmutanten RRM 1+2, RRM 2+3 und RRM 3+4 an Poly(A)-Sequenzen (n=2): Das Diagramm zeigt die relative Bindung der *in vitro* translatierten Proteine an Poly(A)-Sequenzen bezogen auf die Bindung des rPABP (=100%). Das rPABP bindet am effizientesten an Poly(A)-Sequenzen. Die Bindungseffizienz nimmt ausgehend von RRM 3+4, über RRM 2+3 bis RRM 1+2 ab.

4.3.6. Die effiziente Interaktion mit VP mRNA erfordert das gesamte rPABP

Da das Ergebnis aus dem vorigen Experiment (Abschnitt 4.3.5.) zeigte, dass das gesamte rPABP effizienter an Poly(A)-Sequenzen bindet als Teilsequenzen des rPABP, wurde die Bindung der Deletionsmutante RRM 3+4 im Vergleich zum gesamten Protein an VP RNA analysiert. Die Analyse wurde in Form einer Affinitätschromatographie durchgeführt, bei der die entsprechenden cRNAs an Streptavidin-beschichtete paramagnetische Partikel gekoppelt werden. Als Kontrolle für dieses Experiment wurden VP-antisense und α -Tubulin-cRNA (Nukleotidsequenz der cDNA: 1-451) eingesetzt, da in der Literatur gezeigt wurde, dass diese cRNAs nicht an rPABP binden (Mohr *et al.*, 2001). Nach der Äquilibration der an paramagnetische Partikel gekoppelten cRNAs mit dem Bindungspuffer (Burd *et al.*, 1991) wurden diese mit dem *in vitro* translatierten rPABP (I, Abb. 4.21.) oder der *in vitro* translatierten Deletionsmutante 3+4 (IV, Abb. 4.21.) inkubiert. Die weitere

Versuchsdurchführung und die quantitative Auswertung mittels Flüssigzintillationszählung erfolgte wie im vorigen Experiment (Abschnitt 4.3.5.). Der Einsatz verschiedener Mengen cRNA (3,8-6,8 pmol pro Ansatz), bedingt durch variable Kopplungseffizienzen der unterschiedlichen *in vitro* Transkripte an die paramagnetischen Partikel, wurde bei der quantitativen Auswertung berücksichtigt. Wie man der Abb. 4.23. entnehmen kann, bindet das gesamte rPABP effizient und in spezifischer Weise an VP-sense-cRNA. Die Interaktion mit VP-antisense-Transkripten sowie mit α -Tubulin-cRNA ist, wie erwartet, vergleichsweise gering. Die Deletionsmutante PABP RRM 3+4 zeigt zwar eine Tendenz zur präferentiellen Bindung an VP-sense-cRNA, die Effizienz dieser Bindung ist jedoch deutlich geringer als die des gesamten rPABP, obwohl äquimolare Mengen beider Proteine für diese Bindungsstudien eingesetzt wurden. Offensichtlich ist nur das gesamte Protein in der Lage, in optimaler Weise an seine Zielsequenz innerhalb der VP-mRNA zu binden. Somit ist das Bindungsverhalten des rPABP an VP-mRNA ähnlich demjenigen an Poly(A)-Sequenzen. Auch in diesem Fall interagiert das gesamte Protein sehr viel besser als Teilsequenzen verschiedener Kombinationen von RRMs (siehe 4.3.5.)

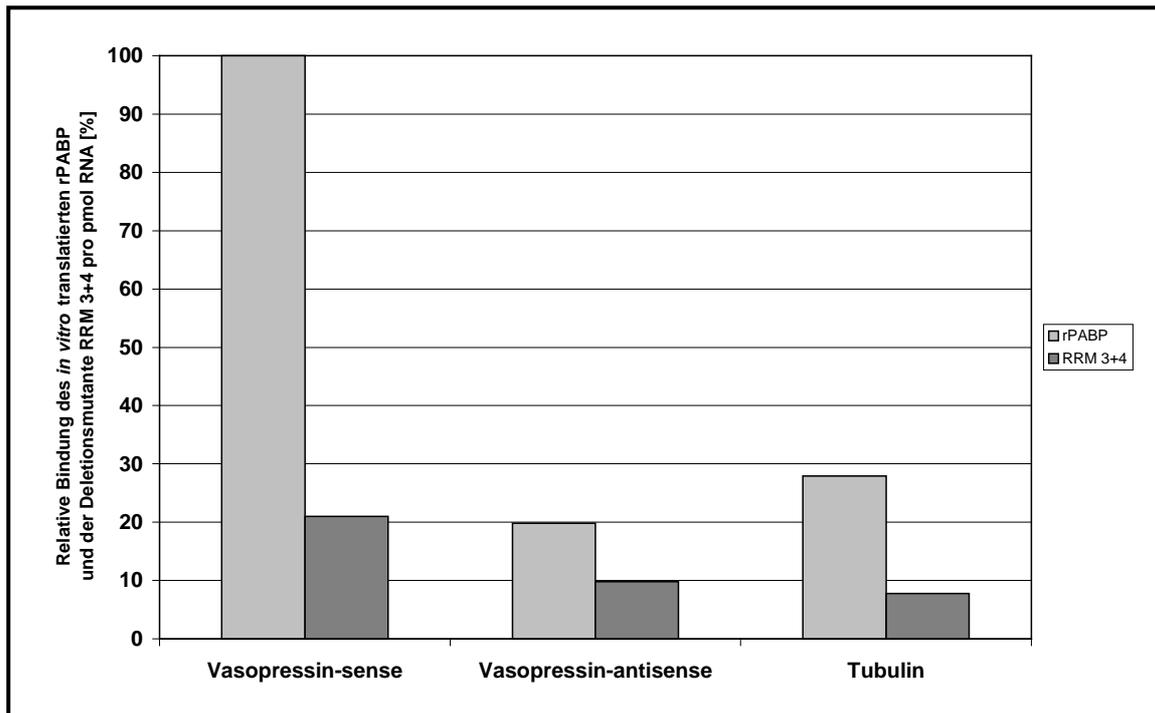


Abb. 4.23.: Schematische Darstellung der Analyse der Bindung der mittels *in vitro* Translation synthetisierten Proteine rPABP und der PABP-Deletionsmutante RRM 3+4 an verschiedene *in vitro* transkribierte cRNAs (n=2): Dargestellt ist die relative Bindung der Proteine rPABP und PABP RRM 3+4 an die cRNAs VP-sense, VP-antisense, und α -Tubulin pro pmol der eingesetzten cRNA. Die Prozentzahlen sind bezogen auf die Bindung des rPABP an VP-sense-cRNA mit 100 %. Das rPABP bindet am effizientesten an VP-sense-cRNA. RPABP bindet in geringem Maße an VP-antisense- und α -Tubulin-cRNA. Die PABP-Deletionsmutante RRM 3+4 bindet bedeutend uneffizienter als das rPABP an alle cRNAs.

4.3.7. Charakterisierung der Funktion des rPABP im VP mRNA-Metabolismus

PABP ist ein Protein, das generell einen Einfluß auf die Translation von mRNAs und/oder deren Stabilität besitzt. Es ist als ein abundantes und ubiquitäres Protein in der Literatur beschrieben. (Gallie, 1998; Mangus *et al.*, 2003). Um die Funktion des rPABP im Metabolismus der VP mRNA zu untersuchen, wurde ein Zellkultursystem verwendet, welches die Expression der VP mRNA zusammen mit einer induzierbaren Expression des rPABP ermöglicht. Die zusätzliche Induktion der Expression des rPABP sollte zur Überexpression von PABP in der Zelle führen. Das System, welches auch Tet-On-System (Clontech) genannt wird (siehe Abschnitt 3.6.4.), ermöglicht die stufenweise Induktion der Expression des rPABP (bzw. des Proteins Luciferase, das als Kontrolle eingesetzt wurde) durch Zugabe einer entsprechenden Dosis Doxycyclin ins Kulturmedium der mit den entsprechenden Expressionsvektoren transfizierten HEK 293-Tet-On-Zellen. Für die Transfektion wurde das Plasmid pTRE Myc-PABP, welches für das rPABP mit einem Vektor-codierten Myc-Tag am N-Terminus codiert, sowie pCMV β Gal-AVP sense, welches für den VP-Vorläufer codiert, (bzw. als Kontrolle pTRE Myc-Luc (Luciferase mit Vektor codierten Myc-Tag am N-Terminus) und pCMV β Gal-AVP sense) eingesetzt. Die Induktion der Myc-PABP Expression (bzw. der Myc-Luciferase Expression) erfolgte mit 800 ng/ml Doxycyclin. Ein Teil der Zellen wurde als Kontrolle jeweils in Abwesenheit des Antibiotikums kultiviert. 50 h nach dem Zeitpunkt der Induktion erfolgte zunächst eine immunzytochemische Analyse der Zellen, um die Expression der Proteine zu untersuchen. Das Vektor-exprimierte Myc-rPABP und die Myc-Luciferase wurden mit Hilfe eines anti-Myc Antikörpers detektiert. Als Sekundärantikörper für die Detektion des Myc-rPABP bzw. der Myc-Luciferase fungierte ein anti-Maus Antikörper, der mit Cy3 gekoppelt ist und aus der Ziege stammt (rote Fluoreszenz). Das VP-Vorläuferprotein wurde mit einem anti-Neurophysin II Antikörper (anti-NPII Antikörper) detektiert. Der entsprechende Sekundärantikörper, anti-Kaninchen konjugiert mit Alexa 488, stammt ebenfalls aus der Ziege (grüne Fluoreszenz). Die erste Betrachtung der Zellen, in denen das Myc-rPABP nach Induktion mit Doxycyclin exprimiert wurde, zeigte zum einen, dass die meisten Zellen beide Proteine, das Myc-rPABP und das VP-Vorläuferprotein, exprimieren. Zum anderen wurde eine geringere Konzentration des VP-Vorläufers in diesen Zellen im Vergleich zu den nicht induzierten Zellen beobachtet. Aus diesem Grund wurde der Versuch unternommen, die Expression des VP-Vorläufers bei sehr geringer (keine Induktion durch Doxycyclin) bzw. hoher Expression des PABP zumindest semi-quantitativ zu ermitteln. Dazu wurden die Zellen mit einer Digitalkamera aufgenommen, wobei eine gleichbleibende Belichtungszeit gewählt wurde. Die Zellen wurden anhand ihrer

Fluoreszenzintensitäten, die die jeweiligen Konzentrationen der Proteine in der Zelle reflektieren, den Werten 1, 2, 3 oder 4 zugeordnet (Abb. 4.24.). Diese Werte wurden mit der entsprechend zugeordneten Zellzahl multipliziert. Aus der Addition der so ermittelten Werte ergibt sich eine Gesamtintensität, welche ein Maß für die Menge an exprimiertem Protein in den ausgewählten und analysierten Zellen darstellt. Wie man der Abbildung 4.25. entnehmen kann, nimmt die Expression des VP-Vorläufers in den Zellen, in denen das Myc-rPABP exprimiert wurde, im Vergleich zu den Zellen, in denen die Expression des Myc-rPABP nicht induziert wurde, ab (Abb. 25. A). Bei der Expression der Myc-Luciferase als Kontrolle hingegen, nimmt die Expression des VP-Vorläufers tendenziell zu im Vergleich zu den Zellen, in denen die Myc-Luciferase nicht induziert wurde (Abb. 4.25. B). Anhand dieser immunocytochemischen Analyse kann jedoch nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass die induzierte Expression des Myc-rPABP auch tatsächlich zur Überexpression des gesamten PABP in der Zelle führt. Dieser Tatbestand wurde jedoch angenommen.

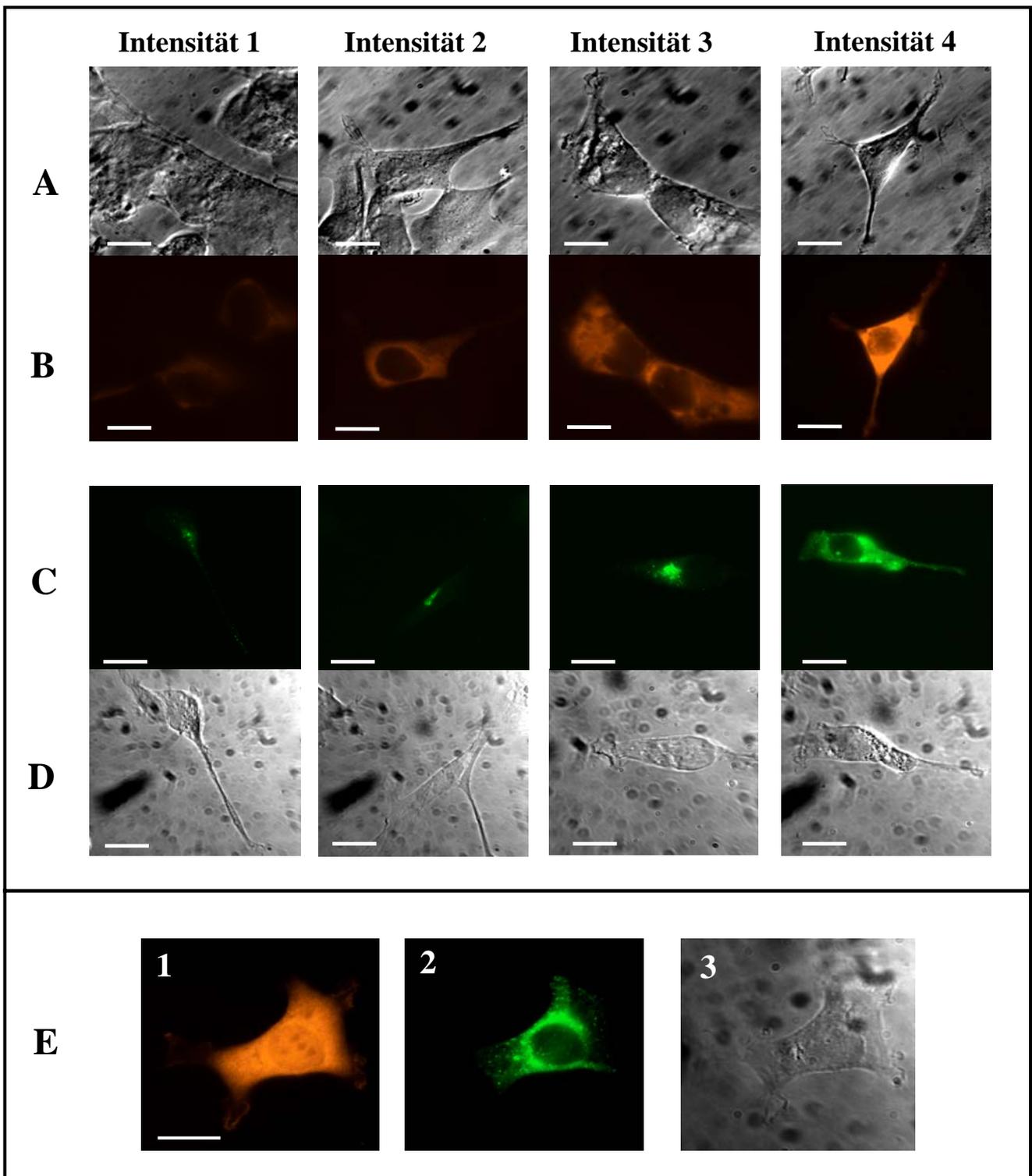


Abb. 4.24.: Nachweis der rekombinanten Proteine VP-Vorläuferprotein, Myc-rPABP und Myc-Luciferase in Hek 293-Tet-On-Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz: Dargestellt ist die optische Einteilung der Myc-PABP (rot)-Fluoreszenz (Reihe B) und der Fluoreszenz des VP-Vorläuferproteins (grün) (Reihe C) in die Fluoreszenzintensitäten 1-4. In Reihe A und D sind die Phasenkontrastaufnahmen der Zellen aus den Reihen B und C dargestellt. In der Reihe E ist die Ko-Expression der rekombinanten Myc-Luciferase (1, rot) und des rekombinanten VP-Vorläuferproteins (2, grün) in einer Zelle dargestellt (3: Phasenkontrast). Die Myc-Luciferase-Fluoreszenz wird ebenfalls in die Fluoreszenzintensitäten 1-4 eingeteilt (hier nicht gezeigt). (Kalibrierungsbalken: 20 μm)

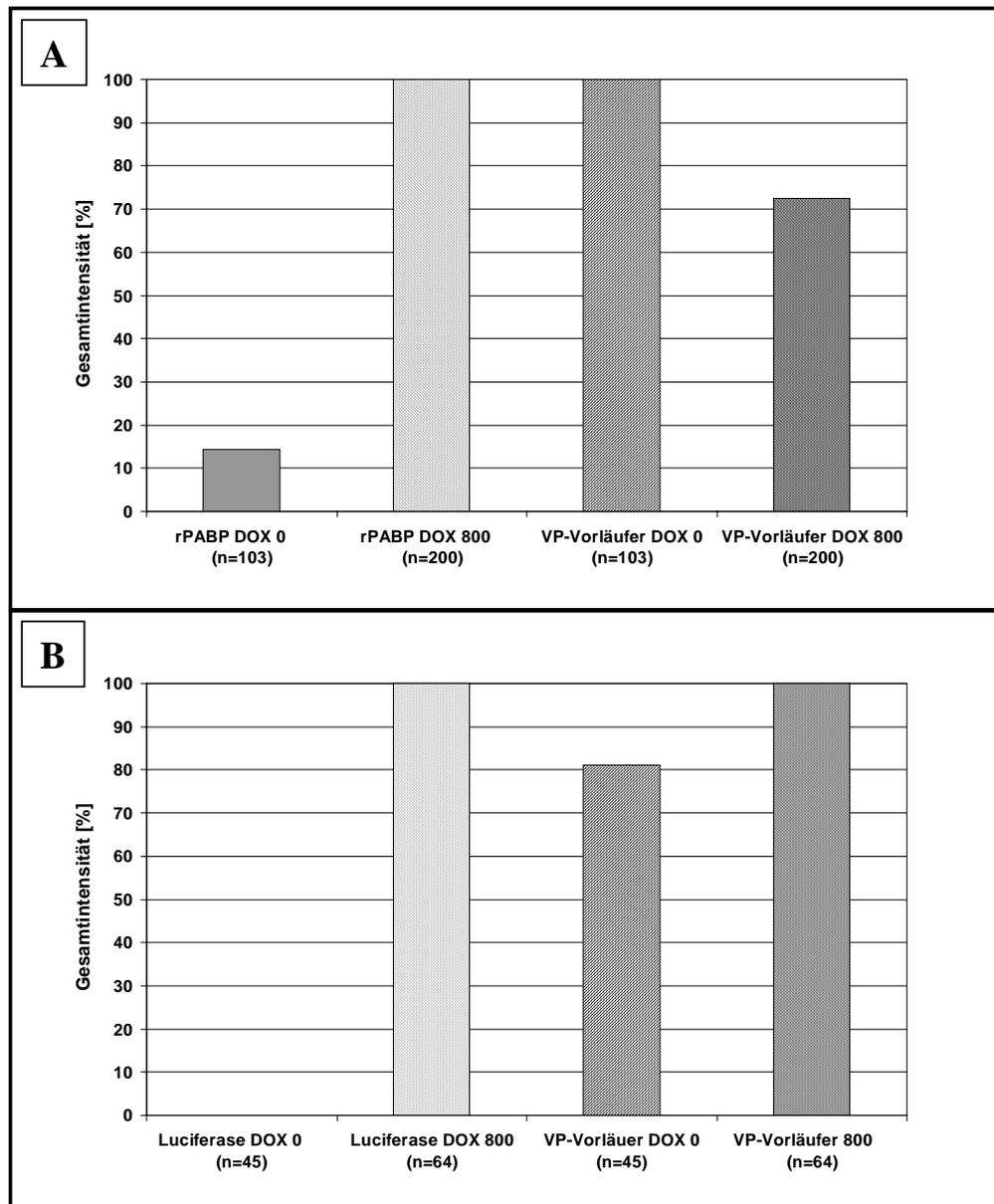


Abb. 4.25.: Schematische Darstellung der Fluoreszenzintensitätsauswertung von **A)** mit Myc-rPABP- und VP-Vorläufer-Konstrukten und **B)** mit Myc-Luciferase- und VP-Vorläufer-Konstrukten ko-transfizierten HEK 293-Tet-On-Zellen: Die Expression des Myc-rPABP bzw. die der Myc-Luciferase wurde mit 800 ng/ml Doxycyclin (DOX) induziert. Die Gesamtintensität der Fluoreszenz der Sekundärantikörper, mit denen Myc-rPABP, Myc-Luciferase und der NP-Vorläufer detektiert wurden, wurde ermittelt. Sie ist ein Maß für die Expression der Proteine in den ausgewählten und analysierten Zellen. Dargestellt ist die relative Gesamtintensität, die jeweils für Myc-rPABP, den VP-Vorläufer oder der Myc-Luciferase ermittelt wurde. Sie ist bezogen auf den für das jeweilige exprimierte Protein höchsten ermittelten Intensitäts-Wert mit 100 % in den induzierten Zellen im Vergleich zu den nicht induzierten Zellen. A) Die Expression des VP-Vorläufers nimmt bei Überexpression des PABP in der Zelle ab. B) Die Expression des VP-Vorläufers nimmt bei Überexpression der Myc-Luciferase zu.

Die immunzytochemische Analyse zeigte eine Abnahme der Expression des VP-Vorläufers bei einer Überexpression des PABP in der Zelle. Eine mögliche Erklärung für die Abnahme des VP-Vorläuferproteins wäre, dass die Translation der VP-mRNA in negativer Weise reguliert wird oder dass die VP-mRNA destabilisiert wird. Daher mußte in weiteren Experimenten die Menge an VP-mRNA und die Menge an VP-Vorläuferprotein bei Überexpression des PABP überprüft werden. Für diese Experimente wurde wieder das Tet-On-System verwendet, jedoch erfolgte die Induktion der Expression des Myc-rPABP oder der Myc-Luciferase stufenweise durch die Zugabe von 200, 400 und 800 ng/ml Doxycyclin ins Kulturmedium. Der Kontrollansatz wurde in Abwesenheit von Doxycyclin kultiviert. 50 h nach dem Zeitpunkt der Induktion wurde aus den Zellen zum einen Proteinextrakte hergestellt und zum anderen die RNA isoliert. Da das VP ein sekretorisches Protein ist, wurde neben den Proteinextrakten auch ein Teil des Kulturmediums für Westernblot-Analysen eingesetzt. Zunächst erfolgte die Detektion des Myc-rPABP in den Proteinextrakten mit Hilfe eines monoklonalen Maus anti-Myc Antikörpers. Wie man der Abbildung 4.26 Reihe A entnehmen kann, steigt die Expression des induzierten Myc-rPABP mit steigender Konzentration an Doxycyclin an. Da nicht bekannt war, ob die Expression des rekombinanten Myc-rPABP die Expression des endogenen humanen PABP der HEK 293-Zellen beeinflusst, wurden beide Proteine mit Hilfe des anti-PABP Antikörpers, welcher das PABP verschiedener Spezies erkennt (Mohr, persönliche Mitteilung), in einer Westernblot-Analyse gemeinsam detektiert. Die Abbildung 4.26. Reihe B zeigt, dass der Gehalt an PABP insgesamt mit ansteigender Doxycyclinkonzentration zunimmt. Nach dieser Bestätigung der ansteigenden Überexpression des PABP wurde das VP-Vorläuferprotein sowohl im Zellextrakt als auch im Medium mit Hilfe eines anti-Neurophysin II Antiserums in einer Westernblot-Analyse detektiert. Der Gehalt an VP-Vorläuferprotein im Kulturmedium wurde untersucht. Wie die Abbildung 4.26. zeigt, detektiert das Antiserum sowohl im Zellextrakt (Reihe C) als auch im Medium (Reihe D) zwei Proteine, deren apparentes Molekulargewicht etwa 14 bzw. 17,5 kDa beträgt. Auf die Natur der beiden vom anti-Neurophysin II Antiserum detektierten Proteine wird am Ende dieses Abschnitts näher eingegangen. Für das nachfolgend beschriebene Ergebnis ist diese Tatsache ohne Bedeutung.

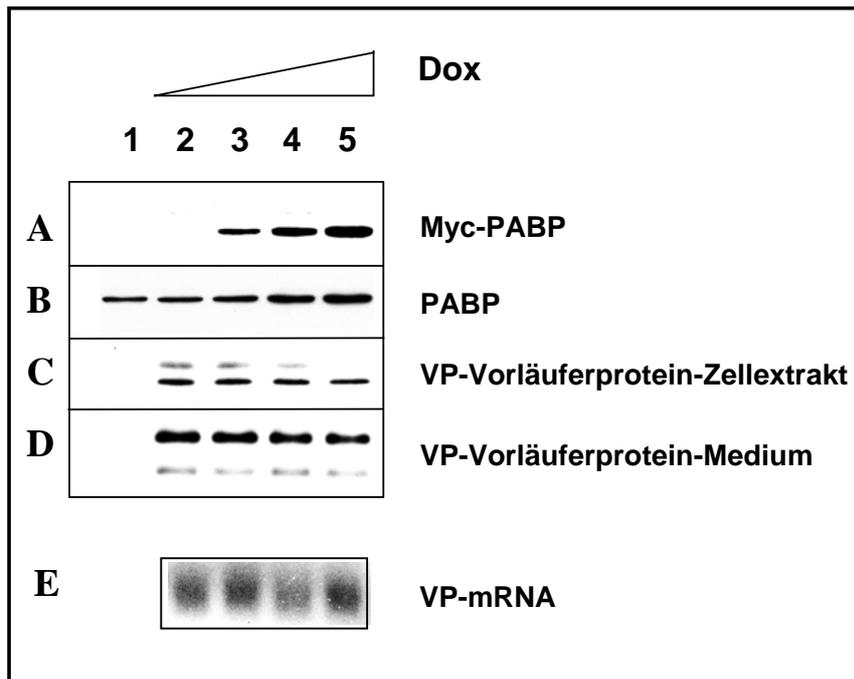


Abb. 4.26.: Reihe A-D: Dargestellt sind Westernblot-Analysen mit den Proteinextrakten aus HEK 293-Tet-On-Zellen, in denen Myc-rPABP und VP-Vorläuferprotein koexprimiert wurden: In Spur 1 befindet sich jeweils Proteinextrakt aus untransfizierten Zellen, während sich in Spur 2-5 Proteinextrakte aus transfizierten Zellen befinden. Spur 2: in Abwesenheit von Doxycyclin (Dox), Spur 3: mit 200 ng Dox, Spur 4: mit 400 ng Dox, Spur 5: mit 800 ng Dox. Die Menge an exprimierten Myc-PABP nimmt mit steigender Doxycyclinkonzentration zu (Reihe A, 10 µg Protein pro Ansatz). Die Menge an Gesamt-PABP (endogenes humanes PABP+rPABP) nimmt, ausgehend vom Proteinextrakt aus nicht induzierten Zellen, mit steigender Doxycyclinkonzentration zu (Reihe B, 10 µg Protein pro Ansatz). Die Menge an VP-Vorläuferprotein im Zellextrakt (Reihe C, 25 µg Protein pro Ansatz) und im Medium (Reihe D, 10 µl pro Ansatz) nimmt mit steigender Doxycyclinkonzentration und steigender Überexpression des PABP ab. **Reihe E:** Dargestellt ist das Autoradiogramm einer Northern-Hybridisierung mit den mRNAs aus HEK 293-Tet-On-Zellen (10 µg pro Ansatz), in denen Myc-rPABP und VP-Vorläuferprotein koexprimiert wurden, und einer VP-cDNA als Sonde: Die Menge an VP-mRNA nimmt bei Zunahme der Doxycyclinkonzentration (oder gesteigerter Expression des PABP) ab. Quantitative Werte aus der Analyse der radioaktiven Signale mit einem *Phosphoimaging*-System bezogen auf den Wert für nicht induzierte Zellen in Spur 2 mit 100 %; Spur3: 108 %; Spur 4: 74,9 %; Spur 5: 75,8 %).

Der Abb. 4.26. ist zu entnehmen, dass auf der Ebene der Proteinexpression eine leichte Reduktion der Konzentration des VP-Vorläufers sowohl im Zellextrakt als auch im Kulturmedium (dort sogar deutlicher) bei einer Überexpression des PABP zu beobachten ist. Somit wurde das Ergebnis aus der immunocytochemischen Analyse bestätigt. Um die Menge der mRNA des VP-Vorläufers bei der stufenweise durchgeführten Überexpression des PABP zu bestimmen, wurde eine Northern-Hybridisierung mit einer VP-cDNA-Sonde durchgeführt. Wie das in Abbildung 4.26. Reihe E dargestellte Autoradiogramm sowie die quantitative Auswertung mit einem *Phosphoimaging*-System zeigt, nimmt die Menge an VP-mRNA mit steigender Doxycyclinkonzentration um ca. 25 % ab. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass die beobachtete Reduktion des VP-Vorläufers bei Überexpression des PABP nicht auf eine negative Translationsregulation, sondern möglicherweise auf eine verminderte Stabilität der mRNA zurückzuführen ist. Als Kontrolle für die hier beschriebenen Experimente wurden gleichartige Experimente mit der Myc-Luciferase durchgeführt. Wie man der Abbildung 4.28. entnehmen kann, wurde die Expression der Myc-Luciferase stufenweise durch die Zugabe von Doxycyclin ins Medium gesteigert (Reihe A). Die ansteigende Expression der Myc-Luciferase bleibt ohne Einfluß auf die Konzentration des endogenen humanen PABP, die in allen Extrakten sehr ähnlich ist (Abb. 4.28. Reihe B). Eine Veränderung der Konzentration des VP-Vorläufers im Zellextrakt bei zunehmender Expression der Myc-Luciferase ist nicht zu erkennen (Reihe C), jedoch ist eine leichte Zunahme des ins Medium sekretierten Anteils (Reihe D) zu beobachten. Ebenso konnte für die VP-mRNA in diesem Zusammenhang keine Reduktion der mRNA-Menge sondern, wie die quantitative Auswertung mit einem *Phosphoimaging*-System belegt, eine kontinuierliche Zunahme um etwa 45 % festgestellt werden (Abb. 4.28. Reihe E).

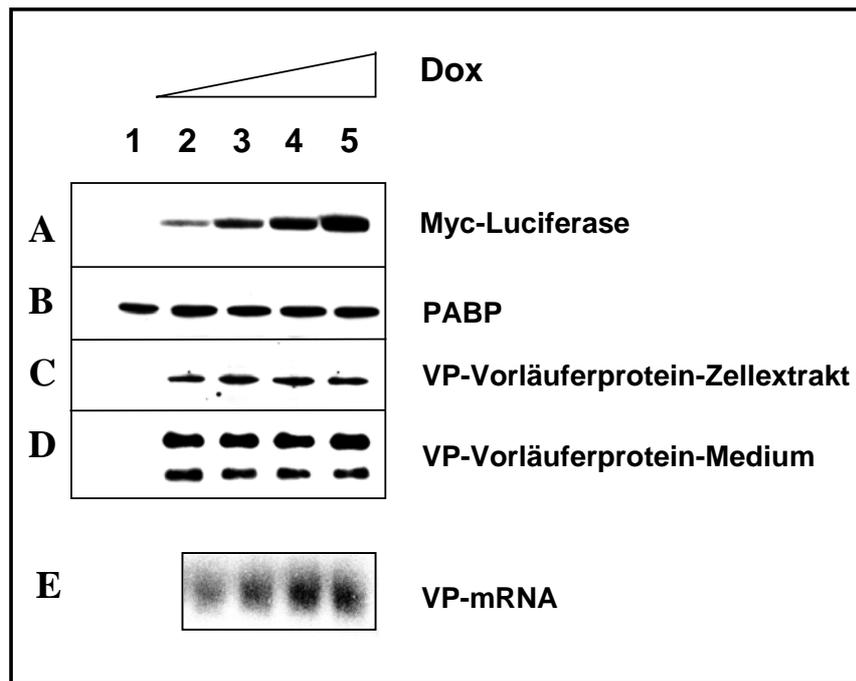


Abb. 4.28.: Reihe A-D: Dargestellt sind Westernblot-Analysen mit den Proteinextrakten aus HEK 293-Tet-On-Zellen, in denen Myc-Luciferase und VP-Vorläuferprotein koexprimiert wurden: In Spur 1 befindet sich jeweils Proteinextrakt aus untransfizierten Zellen, während sich in Spur 2-5 Proteinextrakte aus transfizierten Zellen befinden. Spur 2: in Abwesenheit von Doxycyclin (Dox), Spur 3: mit 200 ng Dox, Spur 4: mit 400 ng Dox, Spur 5: mit 800 ng Dox. Die Menge an exprimierter Myc-Luciferase nimmt mit steigender Doxycyclinkonzentration zu (Reihe A, 10 µg Protein pro Ansatz). Die Menge an Gesamt-PABP (endogenes humanes PABP) ist in allen Proteinextrakten etwa gleich (Reihe B, 10 µg Protein pro Ansatz). Die Menge an VP-Vorläuferprotein im Zellextrakt (Reihe C, 25 µg Protein pro Ansatz) bleibt trotz steigender Doxycyclinkonzentration und steigender Überexpression der Myc-Luciferase gleich, während im Medium (Reihe D, 10 µl pro Ansatz) eine leichte Zunahme der Menge an sekretiertem Protein zu verzeichnen ist. **Reihe E:** Dargestellt ist das Autoradiogramm einer Northern-Hybridisierung mit den mRNAs aus HEK 293-Tet-On-Zellen (10 µg pro Ansatz), in denen Myc-Luciferase und VP-Vorläuferprotein koexprimiert wurden, und einer VP-cDNA als Sonde: Die Menge an VP-mRNA nimmt bei Zunahme der Doxycyclinkonzentration (oder gesteigerter Expression der Myc-Luciferase) zu. Quantitative Werte aus der Analyse der radioaktiven Signale mit einem *Phosphoimaging*-System bezogen auf den Wert für nicht induzierte Zellen in Spur 2 mit 100 %; Spur 3: 127,6 %; Spur 4: 138,5 %; Spur 5: 145,2 %.

Der gesamte unprozessierte VP-Vorläufer, bestehend aus dem VP, dem Neurophysin II und einem Glycopeptid besitzt ein Molekulargewicht von etwa 15 kDa. Ein zusätzlicher Kohlenhydratanteil erhöht das Molekulargewicht. Somit könnte das, in den Westernblot-Analysen vom anti-Neurophysin II Antikörper detektierte Protein von 17,5 kDa die glykosylierte Form des VP-Vorläufers repräsentieren, während das Protein mit der geringeren elektrophoretischen Mobilität die nicht-modifizierte Form darstellen könnte. Um zu klären, ob

das Protein in einer glycosylierten und nicht-glycosylierten Form vorliegt, wurde der VP-Vorläufer in HEK 293-Zellen exprimiert. Ein Teil des resultierenden Proteinextraktes wurde mit N-Glycosidase F* behandelt, während der andere Teil nicht behandelt wurde. Der VP-Vorläufer in diesen Extrakten wurde mittels Westernblot-Analyse mit Hilfe des Neurophysin II-Antikörpers detektiert. Wie man der Abbildung 4.27. A entnehmen kann findet keine Deglykosylierung des VP-Vorläuferproteins statt, da die Menge des 17,5 kDa Protein im unbehandelten sowie im Extrakt, welcher mit dem Enzym behandelt wurde, gleich bleibt. Das 14 kDa Protein wird in diesen Extrakten nicht detektiert. Eine Fehlfunktion der N-Glycosidase F* kann ausgeschlossen werden, da in einem parallel durchgeführten Kontrollansatz das Protein Immunglobulin G (IgG) durch das Enzym deglykosyliert wurde (Abbildung 4.27. B). Eine andere mögliche Erklärung für die Detektion des 14 und des 17,5 kDa Proteins in den Extrakten aus induzierten Zellen wäre, dass das VP-Vorläuferprotein sehr reich an Cystein ist und aufgrund dessen nicht vollständig denaturiert wird. Für diese Annahme spricht auch, dass sich das Mengenverhältnis der zwei Proteine je nach verwendeten Deanturierungspuffer (mit oder ohne β -Mercaptoethanol) ändert.

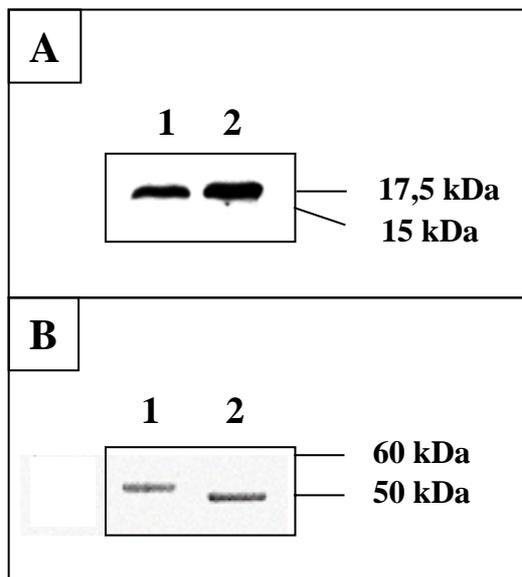


Abb. 4.27.: **A)** Westernblot-Analyse mit anti-Neurophysin II Antikörper und Proteinextrakten aus HEK 293-Zellen, welche mit VP-Vorläufer-Konstrukten transfiziert wurden. Spur 1: unbehandelt; Spur 2: nach Behandlung mit Glykosidase F* (0,5 Einheiten). Der VP-Vorläufer wird durch die Glykosidase F*-Behandlung nicht deglykosyliert **B)** Dargestellt ist das elektrophoretisch aufgetrennte und mit Coomassie angefärbte IgG (4 μ g): Spur 1: unbehandelt; Spur 2: nach Behandlung mit Glykosidase F* (0,5 Einheiten). Die elektrophoretische Mobilität des IgG (Spur 1) ändert sich nach Behandlung mit Glykosidase F* (Spur 2). Das Protein wurde deglykosyliert.

Zusammengefaßt kann man sagen, dass diese Experimente möglicherweise auf eine destabilisierende Wirkung des überexprimierten PABP auf die VP-mRNA hinweisen.

5. Diskussion

Die Mechanismen des gerichteten mRNA-Transports spezifischer mRNAs in die Neuriten von Nervenzellen sind bisher nur unzureichend geklärt. Es wird vermutet, dass etwa 400 mRNA-Spezies in Nervenzellen in definierte subzelluläre Kompartimente lokalisiert werden (Eberwine *et al.*, 2002). Die Lokalisierung erfolgt entlang, bzw. mit der Hilfe, von Komponenten des Zytoskeletts (Basell *et al.*, 1994; Litman *et al.*, 1994; Knowles *et al.*, 1996). In letzter Zeit wurden innerhalb lokalisierter mRNAs sogenannte *cis*-agierende Elemente identifiziert, die essentiell sind für den gerichteten Transport. Spezifische Proteine, die als *trans*-agierende Faktoren bezeichnet werden, binden an diese *cis*-agierenden Elemente und vermitteln die Lokalisierung der mRNA entlang des Cytoskeletts sowie deren Verankerung am Zielort (Übersicht: Kiebler & DesGrosseillers, 2000). Es wird vermutet, dass mRNAs in großen RNP-Komplexen lokalisiert werden, die als granuläre Strukturen in Neuronen sichtbar sind (Knowles *et al.*, 1996; Krichevsky & Kosik, 2001). Die in diesen RNP-Komplexen enthaltenen *trans*-agierende Faktoren sind vermutlich auch neben der Lokalisierung auch an der Translationsregulation der mRNA beteiligt (Übersicht: Huang *et al.*, 2003). Während die Funktion der mRNA-Lokalisierung in die Axone differenzierter Nervenzellen nicht hinreichend geklärt ist (Mohr *et al.*, 1995), wird für die dendritisch lokalisierten Transkripte eine Rolle bei der Ausbildung synaptischer Plastizität vermutet, da diese die dendritische Translation von mRNAs erfordert (Kang & Schuman 1996). In den Dendriten wurde eine lokale Synthese von Proteinen nachgewiesen (Aakalu *et al.*, 2001; Mohr & Richter, 2003). Die Translation dendritischer mRNAs kann in Abhängigkeit von synaptischer Aktivität reguliert werden (Übersicht: Steward & Schuman, 2001).

VP-mRNA ist in magnozellularen Neuronen sowohl dendritisch als auch axonal lokalisiert (Mohr *et al.*, 1995). Für die dendritisch lokalisierten Transkripte wird die Translation sowie die Sekretion des synthetisierten Peptidhormons aus den Dendriten angenommen (Mohr & Richter, 2003). In Zellkulturexperimenten wurde ein *cis*-agierendes Element der VP-mRNA identifiziert, welches als DLS (Dendritische Lokalisierungssequenz) bezeichnet wird. Die DLS umfaßt sowohl Teilsequenzen der kodierenden Region als auch die 3'-UTR der VP-mRNA (Prakash *et al.*, 1997). Erste *in vitro* Experimente identifizierten ein Protein, welches in spezifischer Weise mit der DLS interagiert. Es wurde zunächst VP-RBP genannt.

Ziel dieser Arbeit war es, dass VP-RBP biochemisch zu reinigen, um es charakterisieren und seine Funktion ermitteln zu können. Mittels biochemischer Reinigung und Sequenzierung wurde das VP-RBP als PABP der Ratte (rPABP) identifiziert. Mit *in vitro* Experimenten

konnte gezeigt werden, dass das rPABP essentiell ist für die Ausbildung des Komplexes aus VP-cRNA und dem VP-RBP. Zudem wurde durch eine Immunpräzipitation des Komplexes mit einem anti-rPABP Antikörper gezeigt, dass das VP-RBP dem rPABP entspricht.

PABP ist ein ubiquitäres im Tier- und Pflanzenreich weit verbreitetes Protein (Blobel, 1973; Baer & Kornberg, 1983; Sachs *et al.*, 1987; Marhoul & Adams, 1996; Le *et al.*, 1997; Sigrist *et al.*, 2000). Es ist zudem sehr abundant, so wurde z.B. in HeLa Zellen eine Konzentration des humanen PABP von 4 μM festgestellt (Görlach *et al.*, 1994). PABP besitzt vier RNA-Bindungsdomänen (RRM 1-4), sowie einen Prolin-reichen C-Terminus. In der Literatur ist berichtet worden, dass die RRM unterschiedliche Bindungsaffinitäten an Ribohomopolymeren aufweisen. So binden die RRM 1+2 aus der Hefe bevorzugt und in gleichem Maße wie das gesamte Protein an Poly(A)-Sequenzen, während die RRM 3+4 bevorzugt an Poly(U)- und Poly(G)-Sequenzen binden (Burd *et al.*, 1991; Deardorff & Sachs; 1997). In der Hefe ist RRM 4 zusammen mit einem Bereich aus dem C-Terminus essentiell für das Leben der Zelle (Burd *et al.*, 1990). Aufgrund seiner hohen Bindungsaffinität zu den 3'-Poly(A)-Schwänzen von eukaryotischen mRNAs (Blobel, 1973) nimmt das PABP eine Schlüsselrolle bei der Translationsinitiation ein. Eukaryotische mRNA zeichnet sich nicht nur durch ihren variablen langen Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende, sondern auch durch ihre 7-Methylguanosinium-Kappe (Cap-Struktur) am 5'-Ende aus. Die Initiation der Translation erfolgt zum einen über den Komplex eIF4F (*eukaryotic initiation factor 4F*), der aus drei Untereinheiten besteht: dem Cap-Bindungsprotein eIF4E (Sonnenberg *et al.*, 1979), der ATP-abhängigen RNA-Helikase eIF4A (Rozen *et al.*, 1990), welche unter Verbrauch von ATP Sekundärstrukturen in der 5'-UTR der mRNA entfernt, sowie der Untereinheit eIF4G, welche mit den beiden anderen Untereinheiten interagiert und die Bindung von eIF4E an die Cap-Struktur fördert (Haghighat & Sonnenberg, 1997). Zum anderen ist die Bindung von PABP an den Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der mRNA für die Translationsinitiation notwendig (Tarun & Sachs, 1995; Preiss & Hentze, 1998). Das PABP bindet gleichzeitig an den Poly(A)-Schwanz der mRNA und an den N-Terminus von eIF4G (Tarun & Sachs, 1996; Imataka *et al.*, 1998), so dass eine zirkuläre Struktur entsteht (*closed-loop*) (Jacobson, 1996; Wells *et al.*, 1998), die vermutlich durch die räumliche Anordnung des 5'- und des 3'-Endes nebeneinander die Reinitiation der Translation, die Formung des Initiationskomplexes oder das Binden der 60S ribosomalen Untereinheit fördert (Tarun & Sachs, 1995; Searfoss *et al.*, 2001; Kahvejian *et al.*, 2002) (Abbildung 4.1.). Die von PABP an eIF4G erfolgt über die RRM 1+2 des PABP und dem N-Terminus des eIF4G (Imataka *et al.*, 1998).

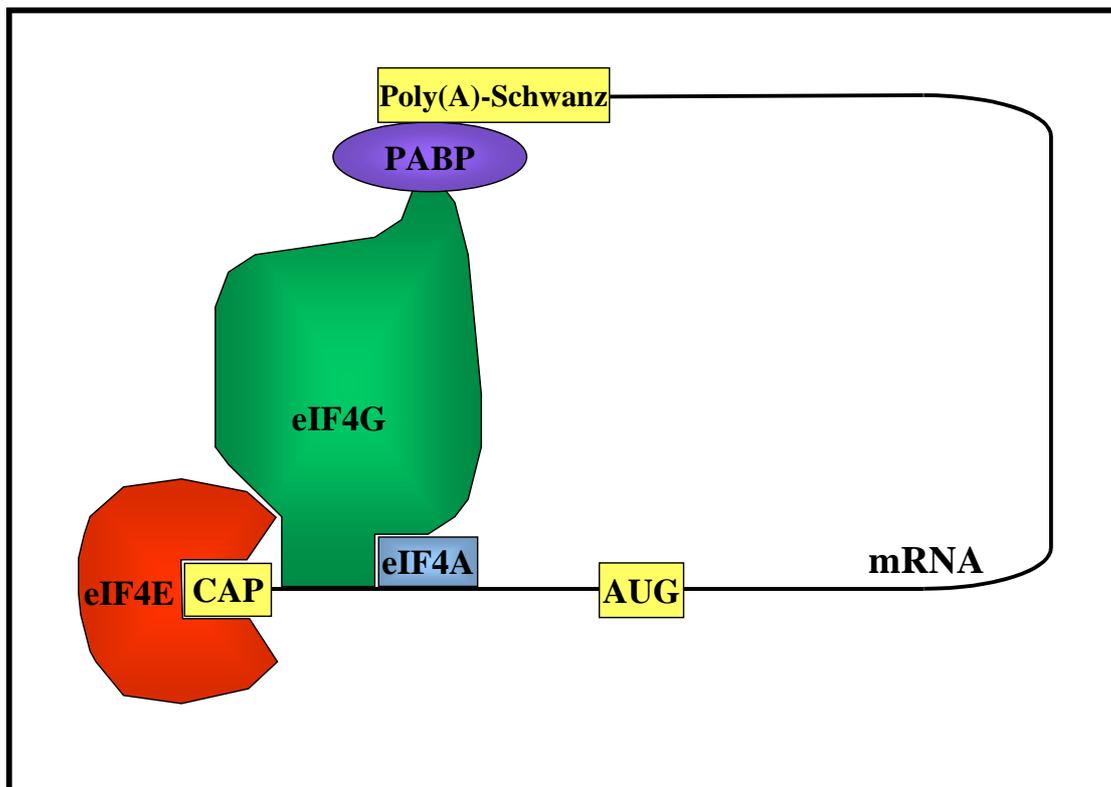


Abb. 4.12: Dargestellt ist ein vereinfachtes Schema der Translationsinitiation in eukaryotischen Zellen nach Craig *et al.*, 1998 und Sachs & Buratowski, 1997 (modifiziert):

Eukaryotische mRNA zeichnet sich durch eine 7-Methylguanosisin-Kappe (CAP) am 5'-Ende und einen Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende aus. An die Cap-Struktur am 5'-Ende bindet das Protein eIF4E. Das Protein eIF4A entfernt als ATP-abhängige Helikase Sekundärstrukturen in der 5'-UTR der mRNA, während das Protein eIF4G als Brücke zwischen eIF4E und eIF4A fungiert. Das PABP bindet sowohl an den Poly(A)-schwanz der mRNA als auch an eIF4G, so dass das 5'- und das 3'-Ende der mRNA räumlich angenähert werden und eine zirkuläre Struktur entsteht (closed-loop model (Wells *et al.*, 1998; Jacobson, 1996)), welche die Translationsinitiation fördert. Die Translation beginnt am Start-Codon (AUG).

Der C-Terminus vermittelt die Interaktion des Proteins mit Proteinen, welche unterschiedliche Funktionen ausüben können. So binden die Proteine PAIP1 (*PABP-interacting protein 1*) und PAIP2 (*PABP-interacting protein 2*) an den C-Terminus des humanen PABP. Diese Proteine üben antagonistische Funktionen bei der Regulation der Translationsinitiation aus (Craig *et al.*, 1998; Khaleghpour *et al.*, 2001). PABP bindet über den C-Terminus sowie die RRM1+2 an PAIP1. PAIP1 besitzt zwei Bindungsstellen, PAM1 am C-Terminus und PAM2 am N-Terminus (*PABP-interacting motifs 1 and 2*), über die die Bindung an PABP erfolgt (Roy *et al.*, 2002). PAIP1 bindet gleichzeitig an PABP und eIF4A, der Untereinheit des eukaryotischen Initiationskomplex eIF4 (Craig *et al.*, 1998). Die gleichzeitige Interaktion von PAIP1 mit PABP und eIF4A bewirkt vermutlich zum einen eine Zirkularisierung sowie die

Stimulation der Translation einer Reporter-mRNA in Säugetierzellen (Craig *et al.*, 1998; Roy *et al.*, 2001). Das zu PAIP1 antagonistische PAIP2 bindet nicht nur an den C-Terminus sondern auch an die RRM_s 2+3 des PABP. Das sehr saure PAIP2 beinhaltet zwei PABP-Bindungsstellen, die erste ist im C-Terminus und die zweite ist in einer zentralen Region des PAIP2 (Khaleghpour, 2001a). PAIP2 kompetiert die Bindung von PAIP1 an PABP. Zudem vermindert es die Bindung von PABP an Poly(A)-Sequenzen (Khaleghpour, 2001b). Jedoch führt nur die Interaktion von PAIP2 mit dem N-Terminus des PABP zu einer Inhibition der Translation. Das Sequenzmotiv am C-Terminus von PAIP2, welches die Interaktion mit PABP vermittelt wurde auch in anderen Proteinen gefunden. Eines dieser Proteine ist der eRF3 (eRF3: *eukaryotic chain releasing factor 3*) (Khaleghpour, 2001a). eRF3 bindet als eRF3/GSPT (GSPT: GTP-Bindungsprotein)-Komplex ebenfalls an den C-Terminus des PABP. Die Bindung des Komplexes an PABP führt zur Translationstermination und RNA-Destabilisierung (Hoshino *et al.*, 1999; Hosado *et al.*, 2003; Uchida *et al.*, 2002). Der eRF3/GSPT-Komplex besteht aus eRF1 (eRF1: *eukaryotic chain releasing factor 1*), welcher am Ende der Translation an das Stopp-Codon der eukaryotischen mRNA bindet, und eRF3, der die Freisetzung der Polypeptidkette nach GTP-Hydrolyse vermittelt. PABP ist in diesem Komplex an der Translationstermination beteiligt (Hoshino *et al.*, 1999; Hosada *et al.*, 2003). Der humane eRF3 kann zudem mit dem hPAN2 (*human PABP-dependent poly(A) nuclease*)-Komplex, bestehend aus der Deadenylase *hPan2* und der regulatorischen Einheit *hPan3*, interagieren. Die 3'-5'-Exonukleaseaktivität von *hPan2* kann durch das PABP stimuliert werden (Uchida *et al.*, 2004). Diese Interaktionen führen zum Abbau der mRNA. Der Abbau ist jedoch mit der Translationstermination gekoppelt (Hosoda *et al.*, 2003). Über den C-Terminus des PABP kann zudem die Dimerisierung von zwei PABP-Molekülen erfolgen (Kuhn & Pieler, 1996). Der C-Terminus ist außerdem essentiell für den Kernimport/Export (Afonina *et al.*, 1998). Der C-Terminus des PABP stellt zudem ein Ziel für virale Proteine dar. So schalten Polioviren aus der Familie der Picornaviren durch die Spaltung von PABP und des eukaryotischen Initiationsfaktors eIF4F mittels der Proteasen 2A und 3C die Proteinsynthese der Wirtszelle aus (Joachims *et al.*, 1999). PABP interagiert über RRM₄ mit einem weiteren Protein, dem Poly(C)-Bindungsprotein (PCBP). So inhibiert PABP indirekt durch diese Interaktion die Aktivität der Endoribonuklease ErEN (*erythroid cell-enriched endoribonuclease*), welche für den Abbau der 3'-UTR der stabilen α -Globulin-mRNA zuständig ist. PCBP bindet an ein Cytosin-reiches Element (CRE: *cytosin-rich element*) in der 3'-UTR der α -Globulin-mRNA, wodurch ein RNP-Komplex (α -Komplex) ausgebildet wird, welcher die Aktivität der ErEN vermindert und somit die Stabilität der mRNA vermittelt.

PABP stimuliert die Bindung von PCBP an CRE, während PCBP seinerseits die Bindung von PABP an den Poly(A)-Schwanz stimuliert (Übersicht: Wang & Kiledjian 2000). Neben der Funktion als Mitinitiator der Translation sowie der Translationstermination kann PABP auch einen regulatorischen Einfluß auf die Translation selbst ausüben. So inhibiert es seine eigene Synthese durch die Bindung an ein Adenin-reiches Element in der 5'-UTR der PABP-mRNA, wodurch die Interaktion der ribosomalen 60S-Untereinheit mit dem Prä-Initiationskomplex verhindert wird (Bag, 2001). Eine weitere Inhibition der Translation wurde bei der Interaktion des PABP mit der Gag-mRNA (*gag: group specific antigen*) des HIV-Typ1 (*human immunodeficiency virus type 1*) beobachtet (Afonina *et al.*, 1997). PABP bindet an ein sogenanntes INS-1 Element (*inhibitory/instability element 1*) in der codierenden Region der Gag-mRNA mit der Folge, dass die Synthese des Gag-Proteins abnimmt. Ein vom PABP ausgeübter positiver Effekt auf die Translation einer mRNA wurde für die Interaktion des Proteins mit der im Retikulozytenlysat aus Kaninchen enthaltenen YB-1-mRNA beschrieben (Skabkina *et al.*, 2003). *In vitro* Experimente zeigten, dass der positive Einfluß des PABP auf die Translation der YB-1-mRNA vom Poly(A)-Schwanz unabhängig ist. PABP übt zudem zwei antagonistische Funktionen aus. Zum einen trägt es zur Stabilität von mRNAs bei, indem es den Poly(A)-Schwanz vor dem Abbau durch Nukleasen schützt (Ford *et al.*, 1999; Wilusz *et al.*, 2001a), und zum anderen wird die Destabilisierung von mRNAs durch die Stimulation von Nukleaseaktivitäten eingeleitet, die die Deadenylierung der mRNA zur Folge haben (Uchida *et al.*, 2004). Der Prozeß der mRNA-Stabilisierung/Destabilisierung ist mit der Translation verbunden (Jacobson *et al.*, 1996), so dass PABP möglicherweise eine entscheidende Rolle beim mRNA-Umsatz spielt. Für die c-Fos-mRNA wurde gezeigt, dass PABP in einem Protein-Komplex enthalten ist, welcher an ein Instabilitätselement (mCRD: *major protein-coding-region determinant of instability*) innerhalb der codierenden Region der mRNA bindet (Grosset *et al.*, 2000). Die Funktion des mCRD-Elementes hängt von der Entfernung zum Poly(A)-Schwanz ab. Eine Überexpression der im Komplex enthaltenen Proteine stabilisiert die cFos-mRNA, indem die Deadenylierung inhibiert wird. Es wird vermutet, dass sich durch die Interaktion eines an der Translation beteiligten Ribosoms eine Konformationsänderung des bindenden Komplexes erfolgt, die eine Brückenbildung vom Poly(A)-Schwanz zum mCRD-Element aufhebt, so dass eine Deadenylierung der mRNA erfolgen kann, welche in den Abbau derselben mündet. Für viele instabile mRNAs wurde gezeigt, dass ein AU-reiches Element (ARE) innerhalb der 3'-UTRs der mRNAs die Translation und die mRNA-Stabilisierung/Destabilisierung steuert (Wilusz *et al.*, 2001b). Experimente mit dem GM-CSF (*granulocyte macrophage-colony stimulating factor*) ARE

zeigten, dass PABP vom Poly(A)-Schwanz deplaziert wird, wenn das ARE in der 3'-UTR eines Reportertranskripts enthalten ist (Grosset *et al.*, 2004). In letzter Zeit wird PABP auch in Verbindung genannt mit lokalisierten RNAs. So interagiert es mit den beiden in Neuronen dendritisch lokalisierten nicht-codierenden Transkripten BC1-RNA aus der Ratte und der zur BC1-RNA homologen BC200 aus dem Menschen (Muddashetty *et al.*, 2002). Die Funktion beider Interaktionspartner ist in diesem Zusammenhang nicht geklärt, jedoch wird für die BC1-RNA eine Rolle bei der Regulation der Translation dendritischer mRNAs vermutet (Wang *et al.*, 2002). PABP wurde zudem in einem Komplex gefunden, welcher an das *cis*-agierende Element der lokalisierten *bicoid*-mRNA aus *Drosophila* bindet. Es wird eine Rolle des Komplexes bei der Lokalisierung der *bicoid*-mRNA angenommen (Arn *et al.*, 2003). Zusammengefaßt kann man sagen, dass PABP ein multifunktionelles Protein ist, welches, gemeinsam mit weiteren Proteinen in der Zelle, an verschiedenen Prozessen beteiligt ist, wie der Translationsinitiation, der negativen und positiven Translationsregulation, mRNA-Stabilisierung/Destabilisierung, sowie vermutlich auch an Aspekten der mRNA-Lokalisierung.

In dieser Arbeit wurde das Bindungsverhalten des rPABP an VP-RNA *in vitro* charakterisiert. Die Interaktion des rPABP mit der VP-mRNA erfolgt über die RRM 3+4. Die RRM 1+2 und 2+3 binden nicht an VP-mRNA. Der C-Terminus des rPABP bindet nicht an VP-mRNA, da RRM 3+4 auch ohne C-Terminus an die mRNA bindet und Kombinationen von nicht bindenden RRM mit dem C-Terminus wie 1+2+C und 2+3+C ebenfalls nicht binden. Zudem binden RRM 3 oder RRM 4 alleine nicht an die VP-mRNA. Wie das Experiment mit dem mittels *in vitro* Translation synthetisierten rPABP und der Deletionsmutante RRM 3+4 zeigt, ist offensichtlich für die effiziente Bindung an VP-mRNA das gesamte Protein erforderlich. Die Bindung der Deletionsmutante RRM 3+4 an VP-RNA entspricht in etwa der unspezifischen Bindung des gesamten Proteins an VP-antisense-RNA. Dieses Ergebnis konnte man durchaus erwarten, da in der Literatur Daten publiziert sind, die zeigen, dass eine bevorzugte Bindung der RRM 3+4 des PABP aus der Hefe an nicht Poly(A)-Sequenzen erfolgt (Burd *et al.*, 1991), die DLS der VP-mRNA jedoch keine Poly(A)-reichen Sequenzen beinhaltet. Jedoch wurde ein ähnliches Bindungsverhalten wie von rPABP an VP-mRNA auch für die Bindung von rPABP an BC1-RNA und BC200-RNA beobachtet (unveröffentlichte Daten aus der Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Brosius (Institut für Experimentelle Pathologie (ZMBE), Münster) und Dr. Kremerskothen (Institut für Experimentelle Tumorbologie; Münster)). Mit Hilfe verschiedener *in vitro* Methoden wurde gezeigt, dass die Bindung des PABP an diese Transkripte über die RRM 3+4 erfolgt. Die

einzigste Ausnahme bildete BC1-RNA, bei der auch eine Bindung des PABP über die RRM_s 2+3 festgestellt wurde. Die Sequenzabschnitte innerhalb der beiden kleinen nicht-codierenden RNAs, BC1 und BC200, die als mit PABP interagierende Sequenzen identifiziert wurden, sind sehr reich an Adenin-Resten (Muddashetty *et al.*, 2002), daher würde man eine Bindung des PABP über die RRM_s 1+2 erwarten, für die in Experimenten mit dem PABP aus der Hefe eine hochaffine Bindung an Poly(A)-reiche Sequenzen gezeigt wurde (Burd *et al.*, 1991). In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass das *in vitro* translatierte gesamte rPABP am effizientesten an Poly(A)-Sequenzen bindet gefolgt von den RRM_s 3+4 und RRM_s 2+3. Die RRM_s 1+2 binden am ineffizientesten an Poly(A)-Sequenzen. Auch dieses Ergebnis entsprach nicht dem Ergebnis, welches man aufgrund des in der Literatur beschriebenen Bindungsverhaltens der Teilsequenzen des PABP aus der Hefe an Poly(A)-Sequenzen erwarteten würde (Burd *et al.*, 1991). Zudem bindet das gesamte PABP viel besser als die Teilsequenzen an Poly(A)-Sequenzen, während in der Literatur eine in gleichem Maße hochaffine Bindung der RRM_s 1+2 wie das gesamte PABP der Hefe beschrieben wird (Burd *et al.*, 1991). Die Bindung aller drei Deletionsmutanten zusammen entsprach ca. der Hälfte der Bindung des gesamten rPABP. Eine mögliche Erklärung für diesen Sachverhalt wäre, dass das gesamte Protein in der Lage ist über seinen Prolin-reichen C-Terminus kooperativ zu binden, was zur erleichterten Assoziation weiterer PABP-Moleküle führen kann (Burd *et al.*, 1991; Kühn & Pieler, 1996). Den Deletionsmutanten hingegen fehlt der C-Terminus, was sich in einer ineffizienteren Bindung an die Poly(A)-Sequenzen manifestieren könnte.

Diese Diskrepanz zwischen den in der Literatur publizierten Daten und den Ergebnissen dieser Arbeit kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen wurden für die Experimente in dieser Arbeit äquimolare Mengen der Deletionsmutanten eingesetzt, während für die Experimente, die in der Literatur beschrieben sind, gleiche Mengen an Radioaktivität ohne Berücksichtigung der Anzahl der in den Proteinen enthaltenen radioaktiv-markierten Methionine eingesetzt wurden, so dass die Bindungsexperimente mit nicht äquimolaren Mengen an Protein durchgeführt wurden. Neuere Daten aus der Literatur zeigen für das humane PABP ebenfalls eine hoch affine Bindung des gesamten Proteins, gefolgt von den RRM_s 3+4, an Poly(A)-Sequenzen (Sladic *et al.*, 2003). Jedoch wird für die Bindung der RRM_s 1+2 eine fast gleich effiziente Bindung wie die der RRM_s 3+4 gezeigt. Die Bindung der RRM_s 2+3 an Poly(A)-Sequenzen wurde nicht untersucht. Die Quantifizierung der eingesetzten Proteinmengen für die Experimente mit den humanen PABP-Deletionsmutanten erfolgte zudem nicht über den Einsatz von Radioaktivität, sondern über den ungenaueren Vergleich der mit Sypro Orange gefärbten Proteine mit einem BSA-Standard mit Hilfe eines

entsprechenden Gerätes zur Auswertung (Sladic *et al.*, 2003). Das Bindungsverhalten des humanen PABP ist dem des rPABP sehr ähnlich. Die Diskrepanz im Bindungsverhalten von Teilsequenzen des PABP aus der Hefe (Burd *et al.*, 1991) bzw. aus Säugern (hier dargestellte Ergebnisse; Sladic *et al.*, 2003) an Poly(A)-Ribohomopolymere beruht möglicherweise auf dem geringeren Grad an Sequenzidentität zwischen dem Protein aus der Hefe und den Proteinen aus Säugern. In Abbildung 5.1. ist eine Übersicht über die Sequenzidentität von PABPs aus verschiedenen Arten dargestellt. Die Abbildung zeigt, dass das PABP aus *Mus musculus* und aus *Homo sapiens* annähernd zu 100 % identisch sind mit dem PABP aus *Rattus norvegicus*, während das PABP aus *Saccharomyces cerevisiae* lediglich 58 % Identität aufweist. Das PABP aus *Xenopus laevis* besitzt mit 94 % ebenfalls eine hohe, während das PABP aus *Drosophila* mit 62 % Identität eine niedrige Identität zum rPABP zeigt.

		Identität [%]							
		1	2	3	4	5	6		
Divergenz [%]	1		94,3	57,9	99,7	62,6	99,5	1	<i>Homo sapiens</i>
	2	5,9		57,5	94,3	62,2	94,2	2	<i>Xenopus laevis</i>
	3	60,9	61,7		58,2	54,9	58,2	3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	4	0,3	5,9	60,3		62,7	99,8	4	<i>Mus musculus</i>
	5	51,5	52,1	67,8	51,1		62,7	5	<i>Drosophila melanogaster</i>
	6	0,5	6,1	60,3	0,2	51,1		6	<i>Rattus norvegicus</i>
		1	2	3	4	5	6		

Abb. 5.1.: Schematische Darstellung eines Sequenzvergleiches von PABPs aus verschiedenen Spezies nach der Jotun Hein Methode (Software-Programm: DNA-STAR): Dargestellt sind jeweils die Identität und die Divergenz zwischen den Aminosäuresequenzen.

Für das PABP aus dem Menschen wurde außerdem gezeigt, dass es über die RRM3+4 an RNA bindet, die viele Adenin-Uracil-Reste beinhaltet (AU-reiche Sequenzen) (Sladic *et al.*, 2003). Die DLS der VP-mRNA beinhaltet ebenfalls AU-reiche Abschnitte, so dass diese möglicherweise die Bindung der VP-mRNA an die RRM3+4 des rPABP vermitteln.

Abschließend muß erwähnt werden, dass für keines der hier gezeigten Experimente eine Konkurrenz durch endogen vorhandene Poly(A)-mRNA derjenigen RRM3, welche nicht an Poly(A)-Sequenzen binden, ausgeschlossen werden kann. So dass die niedrige Effizienz der Bindung der RRM1+2 möglicherweise auf die Konkurrenz der Bindung durch die im Retikulocytenlysat nach der Transkription enthaltene cRNA der PABP-Deletionsmutanten mit Poly(A)-Schwanz zurückzuführen ist. Jedoch ist die Konzentration dieser cRNA gering im

Vergleich zu den eingesetzten Poly(A)-Ribohomopolymeren und VP-Transkripten. Zudem könnte endogen vorhandenes PABP die Bindung der Deletionsmutanten kompetieren, jedoch sollte die Konzentration des endogenen PABP durch den Einsatz des selben Retikulocytenlysats für die gekoppelte *in vitro* Transkription/Translation in allen Ansätzen gleich sein. Eine mögliche Lösung dieses Problems wäre die Expression der PABP-Deletionsmutanten in Bakterien gekoppelt mit einer Reinigung der rekombinanten Proteine, damit eine Beeinflussung der Bindung durch andere Proteine ausgeschlossen wird.

Das gereinigte rPABP aus den 1 M NaCl-Eluaten der Affinitätschromatographie mit VP-cRNA als Liganden bindet sehr viel ineffizienter an VP-mRNA als das nicht gereinigte Protein aus der S-90 Fraktion. Zudem bindet das rPABP aus peripheren Geweben mit geringerer Effizienz als das Protein aus dem Gehirn. Eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Bindungsverhalten wäre, dass PABP im Komplex mit weiteren Proteinen vorliegt, die die Bindung des rPABP an VP-mRNA stimulieren. Dieser Komplex könnte eine für das Gehirn spezifische Zusammensetzung beinhalten oder dort angereichert sein. Ein derartiges Verhalten ist nicht unerwartet. snRNA Bindungsprotein U2B'' beinhaltet ebenso wie PABP ein RNP-Motiv. Für dieses Protein wurde gezeigt, dass es nur in Anwesenheit eines zweiten Proteins, dem U2A', spezifisch an U2 snRNA zu binden vermag. Der Bereich von U2B'', welcher mit U2A' interagiert, beinhaltet einen Teil des RNP-Motivs (Scherly *et al.*, 1990). Dieses Beispiel zeigt, dass Proteine mit RNP-Motiven Komplexe mit weiteren Proteinen ausbilden können, die das Bindungsverhalten an RNA modifizieren können. Ein weiteres Indiz für eine mögliche Komplexbildung des PABP mit weiteren Proteinen ist auch das unterschiedliche Elutionsverhalten des PABP während der Chromatographie mit Heparin als Liganden, bei der ein Teil des PABP mit 0,2 M NaCl, ein weiterer Teil dagegen erst mit 0,5 M NaCl eluiert wurde. PABP aus der 0,2 M NaCl-Fraktion bindet spezifischer als das PABP aus der 0,5 M NaCl-Fraktion an VP-mRNA (Mohr *et al.*, 2001). Eine mögliche Erklärung für dieses unterschiedliche Bindungsverhalten des PABP ist, dass durch die Erhöhung der Salzkonzentration während der Chromatographie Interaktionspartner verloren gehen, die die Spezifität der Bindung beeinflussen können. In dieser Arbeit wurde zudem gezeigt, dass RRM 3+4 unspezifischer an VP-mRNA bindet als das gesamte PABP. Vermutlich fehlen der Deletionsmutante Teile des gesamten Moleküls, an die Interaktionspartner binden. Zudem könnte das unterschiedliche Bindungsverhalten des PABP auch auf das Vorhandensein von PABPs mit unterschiedlichen kovalenten Modifikationen zurückzuführen sein. Eine mögliche Form der Modifikation ist die Phosphorylierung. Phosphorylierte Formen des PABP sind im Tierreich bisher nicht beschrieben worden, jedoch

wurden in Pflanzen bereits eine phosphorylierte Form des PABP entdeckt. So ist für das PABP des Weizen anhand einer zwei-dimensionalen Gelelektrophorese gezeigt worden, dass es in verschiedenen Phosphorylierungsformen vorliegt (Le *et al.*, 2000). Die Phosphorylierung des PABP spezifiziert die Bindung an Poly(A)-Sequenzen und die Interaktion mit den Interaktionspartnern des PABP wie z.B. eIF4F und eIF4B. Das humane PABP bildet ein Substrat für die Koaktivator-assoziierte Arginin-Methyltransferase (CARM1: *coactivator-associated arginine methyltransferase*). Die Methylierungsstelle, welche durch CARM1 methyliert wird, liegt im C-Terminus des PABP (Lee & Bedford, 2002). Methylierungen beeinflussen Protein-Protein Wechselwirkungen, die für verschiedene Prozesse in der Zelle verantwortlich sind wie z.B. der nukleäre Im- und Export von Proteinen, sowie die Transkription oder die Signaltransduktion (Mc Bride & Silver, 2001). Aufgrund der Interaktion des C-Terminus des PABP mit mehreren Proteinen, die bereits vorgestellt wurden (PAIP1/2; eRF3) kann eine Methylierung desselben eine Bedeutung haben für die Translationsregulation oder Translationstermination.

Aufgrund seiner verschiedenen Funktionen, wie der Beteiligung an der Translation, Translationskontrolle und mRNA Stabilisierung/Destabilisierung, ist das PABP ein multifunktionelles Protein. In dieser Arbeit wurden erste Schritte unternommen, um die Funktion des an die DLS der VP-mRNA gebundenen rPABP zu untersuchen. Es wurden Experimente durchgeführt, die den Einfluß des PABP bei einer Überexpression desselben auf die Translation bzw. Stabilität der VP-mRNA analysierten. In einem Zellkultursystem erfolgte die Expression des VP-Vorläufers bei gleichzeitiger Überexpression des PABP. Die semiquantitative Auswertung einer immunocytochemischen Analyse zeigte die Reduktion der Menge an exprimierten VP-Vorläufer, welche möglicherweise entweder auf eine negative Translationskontrolle oder auf eine geringe mRNA Stabilität zurückzuführen ist. Daher wurde in dieser Arbeit ein weiteres Zellkulturexperiment durchgeführt, in dem eine stufenweise Überexpression des gesamten PABP nach transienter Transfektion des entsprechenden Konstruktes zusammen mit einem Konstrukt, welches für das VP-Vorläuferprotein codiert, erfolgte. Eine Westernblot-Analyse zeigte, dass die Menge an intrazellulärem VP-Vorläufer sowie die Menge an dem VP-Vorläuferprotein, das ins Medium sezerniert wird, bei Überexpression des PABP leicht reduziert wird. Eine Northernblot-Hybridisierung mit VP-DNA als Sonde zeigte, dass gleichzeitig mit der Reduktion des VP-Vorläuferproteins auch die VP-mRNA reduziert wird. Kontrollexperimente, in denen an Stelle des rPABP die Luciferase überexprimiert wurde mit gleichzeitiger Expression des VP-Vorläufers, zeigten keinen Effekt in Bezug auf die Menge der VP-mRNA oder der Menge an

VP-Vorläuferprotein. Die Ergebnisse deuten vermutlich auf einen Einfluß des überexprimierten PABP auf die Halbwertszeit der VP-mRNA hin. Jedoch können die Ergebnisse dieser Experimente lediglich als erste Hinweise betrachtet werden. Es sind auf jeden Fall noch weitere Experimente erforderlich, wie z.B. die genaue Quantifizierung der Halbwertszeit der VP-mRNA bei einer gleichzeitigen Überexpression des PABP, um die Funktion des PABP im Metabolismus der VP-mRNA zu beschreiben. In diesen Experimenten konnte lediglich ein Zeitpunkt im Metabolismus der VP-mRNA betrachtet werden. Besser wäre die Betrachtung des zeitlichen Verlaufes vom Zeitpunkt der Induktion der Überexpression bis zur Überexpression des PABP. Zudem ist die hier angewendete Methode der transienten Transfektion nicht ideal, besser wäre eine stabile Zelllinie, welche das induzierbare PABP-Konstrukt gemeinsam mit einem VP-Expressionkonstrukt beinhaltet, um eine gleichbleibende Expression der Proteine zu erhalten. Jedoch kann man aufgrund der Daten aus der immunocytochemischen Analyse sagen, dass die transiente Transfektion ebenfalls zu verwertbaren Ergebnissen geführt hat. Im Verlauf dieser Arbeit wurden zwar entsprechende stabile Zelllinien hergestellt, jedoch war eine Induktion des PABP in diesen Zelllinien nicht mehr möglich, da das PABP auch ohne Induktion überexprimiert wurde. Die Verwendung von HEK 293-Zellen für diese Experimente war ebenfalls nicht ideal, weil möglicherweise diesen nicht-neuronalen Zellen Faktoren fehlen, die die Interaktion des PABP mit der VP-mRNA beeinflussen können. Jedoch ist die Transfektionseffizienz von Neuronen (1-2 %) sehr viel geringer als die von HEK 293-Zellen (etwa 50 %), so dass sie für biochemische Analysen nicht sehr gut geeignet sind. Zudem wurde den oben beschriebenen Experimenten nicht untersucht, ob der durch das überexprimierte PABP ausgelöste Effekt ein direkter oder indirekter ist. Um diesen Aspekt zu untersuchen sind mehrere Experimente möglich. Zum einen könnte man die Bindungsstelle des PABP innerhalb der DLS der VP-mRNA entfernen. Eine weitere Variante wäre, die VP-DLS in die Sequenz einer nicht lokalisierten mRNA wie z.B. α -Tubulin-mRNA einzusetzen und dieses chimäre Konstrukt zusammen mit dem PABP zu exprimieren. Auch der Einsatz eines Konstruktes, welches für die VP-antisense-mRNA codiert, wäre in diesem Zusammenhang denkbar. Die hier gezeigte Reduktion der VP-mRNA bei Überexpression des PABP könnte vielleicht Teil eines Mechanismus, der zum Abbau dendritisch lokalisierter VP-mRNA führt, sein. Der Abbau der VP-mRNA in den Dendriten könnte für die Funktion der lokalisierten mRNA wichtig sein, da VP-mRNA im Gegensatz zu einigen anderen dendritisch lokalisierten Transkripten, wie z.B. *arc/arg3.1* (*arc: activity-regulated cytoskeleton-associated protein; arg 3.1: activity regulated gene 3.1*)-mRNA, nicht Aktivitäts-abhängig, sondern stetig in die Dendriten lokalisiert wird.

Es wäre interessant diesen Aspekt näher zu untersuchen, da generell der Abbau dendritisch lokalisierter mRNAs bisher nicht untersucht wurde.

Bisher sind erst wenige *trans*-agierende Faktoren bekannt, welche an Lokalisierungssignale dendritisch lokalisierter mRNAs binden. MARTA1, ein *trans*-agierender Faktor der MAP2-mRNA der Ratte, ist das Ortholog des humanen KSRP (human K homology-type splicing regulatory protein). Das Protein besitzt vier KH (*hnRNP K-homology domain*)-Domänen und ist überwiegend nukleär und wenig zytoplasmatisch verteilt (Rehbein *et al.*, 2000; Rehbein *et al.*, 2002). Über die Funktion von MARTA1 in Zusammenhang mit der dendritisch lokalisierten MAP2-mRNA ist ebensowenig bekannt wie die Funktion eines zweiten *trans*-agierenden Faktors der MAP2-mRNA, dem MARTA2 (Rehbein *et al.*, 2002). Jedoch ist für das zu KSRP orthologe *zipcode*-Bindungsprotein 2 (ZBP2) aus dem Huhn eine mögliche Funktion bekannt. Es wird vermutet, dass ZBP2 den nukleären Export der β -Aktin-mRNA ins Cytoplasma vermittelt (Gu *et al.*, 2002). ZBP2, bindet an das *cis*-agierende Element (*zipcode*) der in Neuronen lokalisierten β -Aktin-mRNA. Das Protein ist wie MARTA1 vorwiegend im Kern lokalisiert. Ein weiteres Ortholog des KSRP, ist das VgRBP71 aus *Xenopus*, welches als *trans*-agierender Faktor an die in Oocyten lokalisierte Vg1 mRNA bindet (Kroll *et al.*, 2002). VgRBP71 spielt vermutlich eine Rolle bei der Prozessierung der Vg1 mRNA. So stimuliert es die Prozessierung der Vg1 mRNA in der Nähe des Polyadenylierungssignals, wodurch ein Repressorelement der Translation entfernt wird (Kolev & Huber, 2003). Das Zipcode-Bindungsprotein 1 (ZBP1) ist ebenfalls ein *trans*-agierender Faktor der β -Aktin-mRNA aus dem Huhn (Ross *et al.*, 1997). ZBP1 wird in Neuronen exprimiert und zusammen mit der β -Aktin-mRNA in RNP-Komplexen zu den Wachstumskegeln in den Neuriten Aktivitätsabhängig transportiert (Zhang *et al.*, 2001; Tiruchinapalli *et al.*, 2003). Vermutlich reguliert ZBP1 die Dendritenmorphologie und das Synapsenwachstum, da eine Überexpression des ZBP1 einen Anstieg der Dichte von dendritischen Filopodien bewirkt (Eom *et al.*, 2003).

Über die Funktion von Staufen, das mit dem MAP2-DTE interagiert (Monshausen *et al.*, 2001) ist bisher wenig bekannt, jedoch existiert in *Drosophila* ein Staufen-Ortholog, für das eine Beteiligung an der subzellulären Lokalisierung der maternalen *bicoid*- und *oskar*-Transkripte an den anterioren bzw. den posterioren Pol der *Drosophila*-Oocyte gezeigt wurde. In dieser Funktion trägt es zur Ausbildung der Körperachsen des Embryos bei (Ephrussi *et al.*, 1991; Kim-Ha *et al.*, 1991; St Johnston *et al.*, 1989; St Johnston *et al.*, 1991). Zudem ist Staufen essentiell für die Aktivierung der Translation der *oskar*-mRNA am Zielort (Micklem *et al.*, 2000). Staufen ist auch für die Verankerung der *bicoid*-mRNA am anterioren Pol verantwortlich (St Johnston *et al.*, 1989). Außerdem ist es an der Lokalisierung der prospero-

mRNA in Neuroblasten beteiligt (Li *et al.*, 1997; Broadus *et al.*, 1998). Das Protein enthält fünf doppelsträngige RNA-Bindungsdomänen (St Johnston *et al.*, 1992). Es wurden Orthologe des Proteins Staufen auch in der Maus und im Menschen detektiert (Kiebler *et al.*, 1999; Marion *et al.*, 1999; Wickham *et al.*, 1999). Das Protein Staufen der Ratte wird in verschiedenen peripheren Geweben und im Hippocampus sowie im cerebralen Cortex exprimiert. Es existieren verschiedene Isoformen des Proteins, die unterschiedliche RNA-Bindungseigenschaften aufweisen (Monshausen *et al.*, 2001). Die Staufen-Isoformen sind wie die MAP2-mRNA somato-dendritisch lokalisiert. Zudem wurde eine Ko-Lokalisation von Staufen mit Mikrotubuli und dem rauen endoplasmatischen Retikulum beobachtet (Monshausen *et al.*, 2001).

Die bisher bekannten *trans*-agierenden Faktoren dendritisch lokalisierter mRNAs zeigen wenig Übereinstimmungen im Aufbau und in den Funktionen sowie den Interaktionspartnern. Wahrscheinlich sind die für die Lokalisierung erforderlichen *trans*-agierenden Faktoren noch unbekannt. Die bisher bekannten Mechanismen der mRNA-Lokalisierung in *Drosophila* zeigen, dass die Lokalisierung ein vielschichtiger Prozeß ist, die unterschiedliche zusammengesetzte RNPs zu unterschiedlichen Phasen der Lokalisierung sowie die Verankerung und Translationsaktivierung erfordert (Übersichten: Bashirullah *et al.*, 1998, Lasko *et al.*, 1999; Johnstone & Lasko, 2001; Lasko, 2003). In dieser Arbeit wurden erste Hinweise auf eine Rolle des PABP beim Abbau der dendritisch lokalisierten VP-mRNA erhalten, jedoch können weitere Funktionen des PABP im VP-mRNA-Metabolismus nicht ausgeschlossen werden. So wäre eine Bindung des PABP an andere dendritische mRNAs möglich. In diesem Zusammenhang tritt das Polymerase III-Transkript BC1 in den Vordergrund, welches ebenfalls an PABP bindet und dendritisch lokalisiert ist (Muddashetty *et al.*, 2002). Die Funktion dieser RNA ist bisher nicht hinreichend geklärt, jedoch wird eine Beteiligung der BC1-RNA an der Regulation der Initiation der Translation dendritisch lokalisierter mRNAs vermutet (Wang *et al.*, 2002). Diese Arbeit bildet eine Grundlage für weiterführende Experimente zur Charakterisierung der molekularen Zusammensetzung der VP-mRNA-Transportmaschinerie sowie der Untersuchung ihrer Funktionen während der dendritischen Lokalisierung der VP-mRNA.

6. Literatur

1. **Aakalu, G., Smith, W.B., Nguyen, N., Jiang, C. & Schuman, M. (2001).** Dynamic Visualization of Local Protein Synthesis in Hippocampal Neurons. *Neuron* **30**, 489-502.
2. **Afonina, E., Stauber, R. & Pavlakis, G.N. (1998).** The human poly(A)-binding protein 1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *J. Biol. Chem.* **273**, 13015-13021.
3. **Afonina, E., Neumann, M. & Pavlakis, G.N. (1997).** Preferential Binding of Poly(A)-binding Protein 1 to an Inhibitory RNA Element in the Human Immunodeficiency Virus Type 1 gag mRNA. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 2307-2311.
4. **Alonso, G. & Assemacher, I. (1981).** Radioautographic studies on the neurohypophysial projections of the supraoptic and paraventricular nuclei in the rat. *Cell Tissue Res.* **219**, 525-534.
5. **Arn, E.A., Cha, B.J., Theurkauf, W.E. & Macdonald, P.M. (2003).** Recognition of a bicoid mRNA Localization Signal by a Protein Complex Containing Swallow, Nod, and RNA Binding Proteins. *Developmental Cell* **4**(1), 41-51.
6. **Baer, B.W. & Kornberg, R.D. (1983).** The protein responsible for the repeating structure of cytoplasmic poly(A)-ribonucleoprotein. *J. Cell Biol.* **96**, 717-721.
7. **Bag, J. (2001).** Feedback Inhibition of Poly(A)-binding Protein mRNA Translation. *The J. of Biological Chemistry.* **276**, 47352-47360
8. **Bashirullah, A., Cooperstock, R.L. & Lipshitz, H.D. (1998).** RNA Localization in Development. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 335-394.
9. **Bassell, G.J., Taneja, K.L., Kislauskis, E.H., Sandell, C.L., Powers, C.M., Ross, A., Singer, R.H. (1994).** Actin filaments and the spatial positioning of mRNAs. *Adv. Exp. Med. Biol.* **358**, 183-189.
10. **Bassell, G.J., Oleynikov, Y., & Singer, R.H. (1999).** The travels of mRNAs through all cells large and small. *FASEB* **13**(3), 447-457.
11. **Beach, D.L., Salmon, E.D. & Bloom, K. (1999).** Localization and anchoring of mRNA in budding yeast. *Current Biology* **9**, 569-578
12. **Berleth, T., Burri, M., Thoma, G., Bopp, D., Rickstein, S., Frigerio, G., Noll, M., & Nüsslein-Volhard, C. (1988).** The role of localization of bicoid RNA in organizing the anterior pattern of Drosophila embryo. *EMBO J.* **7**(6), 1749-1756.
13. **Bertrand, E., Chartrand, P., Schaefer, M., Shenoy, S.M., Singer, R.H. & Long, R.M. (1998).** Localization of Ash1 mRNA particles in living yeast. *Mol. Cell* **2**, 437-445.
14. **Bian, F., Chu, T., Schilling, K. & Oberdick, J. (1996).** Differential mRNA transport and the regulation of protein synthesis: Selective sensitivity of Purkinje cell dendritic mRNAs to translational inhibition. *Mol. Cell. Neurosci.* **7**, 116-133.
15. **Birnbaumer, M. (2000).** Vasopressin receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* **11**(10), 406-410.
16. **Blichenberg, A., Schwanke, B., Rehbein, M., Garner, C.C., Richter, D. & Kindler, S. (1999)** Identification of a *cis*-acting dendritic targeting element in MAP2 mRNAs. *J. Neurosci.* **19**, 8818-8829
17. **Blichenberg, A., Rehbein, M., Müller, R., Garner, C.C., Richter, D. & Kindler, S. (2001)** Identification of a *cis*-acting dendritic targeting element in the mRNA encoding the alpha subunit of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *European Journal of Neuroscience* **13**, 1881-1888
18. **Blobel, G. (1973).** A protein of molecular weight 78,000 bound to the polyadenylate region of eukaryotic messenger RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 924-928.
19. **Broadus, J., Fuerstenberg, S., Doe, C.Q. (1998).** Staufen-dependent localization of prospero mRNA contributes to neuroblast daughter-cell fate. *Nature* **391**(6669), 792-795.
20. **Brugg, B., Matus, A. (1991).** Phosphorylation determines the binding of microtubule-associated protein 2 (MAP2) to microtubules in living cells. *J. Cell Biol.* **114**, 735-743.
21. **Burd, C.G., Matunis, E.L. & Dreyfuss, G. (1991).** The multiple RNA-binding domains of the mRNA poly(A)-binding protein have different RNA-binding activities. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 3419-3424.
22. **Burgin, K.E., Waxham, M.N., Rickling, S., Westgate, S.A., Mobley, W.C., Kelly, P.T. (1990).** In situ hybridization histochemistry of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in developing rat brain. *J. Neurosci.* **10**, 1788-1798.
23. **Carson, J.H., Kwon, S., Barbarese, E. (1998).** RNA trafficking in myelinating cells. *Curr. Opin. Neurobiol.* **8**(5), 607-612.
24. **Clark, I.E., Jan, L.Y., & Jan, Y.N. (1997).** Reciprocal localization of Nod and kinesin fusion proteins indicates microtubule polarity in the Drosophila oocyte, epithelium, neuron and muscle. *Development* **124**, 461-470.
25. **Craig, W.B., Haghghat, A., Yu, A.T.K., & Sonnenberg, N. (1998).** Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation. *Nature* **392**, 520-523.
26. **Crino, P.B., & Eberwine, J. (1996).** Molecular Characterization of the dendritic Growth Cone: Regulated mRNA Transport and Local Protein Synthesis. *Neuron.* **17**, 1173 – 1187.

27. **Deardorff, J.A. & Sachs, A.B. (1997).** Differential Effects of Aromatic and Charged Residue Substitutions in the RNA Binding Domains of the Yeast Poly(A)-binding Protein. *J. Mol. Biol.* **269**, 67-81.
28. **Deo, R.C., Bonnano, J.B., Sonenberg, N. & Burley, S.K. (1999).** Recognition of Polyadenylate RNA by the Poly(A)-Binding Protein. *Cell* **98**, 835-845.
29. **Dugich-Djordjevic, M.M., Tocco, G., Willoughby, D.A., Najm, I., Pasinetti, G., Thompson, R.F., Baudry, M., Lapchak, P.A. & Hefti, F. (1992).** BDNF mRNA expression in the developing rat brain following kainic acid-induced seizure activity. *Neuron* **8**, 1127-1138.
30. **Eberwine, J. (2001).** Molecular Biology of Axons: „A Turning Point...“. *Neuron* **32**, 959-968.
31. **Eberwine, J., Belt, B., Kacharina, J.E., Miyashiro, K. (2002).** Analysis of subcellularly localized mRNAs using in situ hybridization, mRNA amplification, and expression profiling. *Neurochem. Res.* **27**(10), 1065-1077.
32. **Engelmann, M., Wotjak, C.T., Neumann, I., Ludwig, M., & Landgraf, R. (1996).** Behavioral consequences of intracerebral vasopressin and oxytocin: focus on learning and memory. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **20**, 341-358.
33. **Engelmann, M., Wotjak, C.T., Ebner, K., Landgraf, R. (2000).** Behavioural impact of intraseptally released vasopressin and oxytocin in rats. *Exp. Physiol.* **85**, 1255-1305.
34. **Eom, T., Antar, L.N., Singer, R.H. & Bassell, G.J. (2003).** Localization of a beta-Actin Messenger Ribonucleoprotein Complex with Zipcode-Binding Protein Modulates the Density of Dendritic Filopodia and Filopodial Synapses. *The Journal of Neuroscience* **23**, 10433-10444.
35. **Ephrussi, A., Dickinson, L.K., & Lehmann, R. (1991).** Oscar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant nanos. *Cell* **66**(1), 37-50.
36. **Furuichi, T., Simon-Chazottes, D., Fujino, I., Yamada, N., Hasegawa, M., Miyawaki, A., Yoshikawa, S., Guenet, J.L., & Mikoshiba, K. (1993).** Widespread expression of inositol 1,4,5-triphosphate receptor type 1 gene (*Insp3r1*) in the mouse central nervous system. *Receptors Channels* **1**(1), 11-24.
37. **Gardioli, A., Racca, C. & Triller, A. (1999).** Dendritic and postsynaptic protein synthetic machinery. *J. Neurosci.* **19**(1), 168-179.
38. **Garner, C.C., Tucker, P.R. & Matus, A. (1988).** Selective localization of messenger RNA for cytoskeletal protein MAP2 in dendrites. *Nature* **336**, 674-677.
39. **Görlach, M., Burd, C.G., Dreyfuss, G. (1994).** The mRNA Poly(A)-Binding Protein: Localization, Abundance, and RNA-Binding Specificity. *Experimental Cell Research* **211**, 400-407.
40. **De Gregorio, E., Preiss, T., & Hentze, M.W. (1999).** Translation driven by an eIFG core domain *in vivo*. *The EMBO Journal* **18**, 4865-4874.
41. **Grosset, C., Chen, C.A., Xu, N., Sonenberg, N., Jacquemin-Sablon, H. and Shyu, A. (2000).** A Mechanism for Translationally Coupled mRNA Turnover: Interaction between the Poly(A) Tail and a c-fos RNA Coding Determinant via a Protein Complex. *Cell* **103**, 29-40.
42. **Grosset, C., Biniface, R., Duchez, P., Solanilla, A., Cosson, B., Ripoche, J. (2004).** In vivo studies of translational repression mediated by the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor AU-rich element. *J. Biol. Chem.* **279**(14), 13354-13362.
43. **Gu, W., Pan, F., Zhang, H., Bassell, G.J. & Singer, R.H. (2002).** A predominantly nuclear protein affecting cytoplasmic localization of beta-actin mRNA in fibroblasts and neurons. *The Journal of Cell Biology* **156**, 41-51.
44. **Gunkel, N., Yano, T., Markussen, F.-H., Olsen, L.C., & Ephrussi, A. (1998).** Localization-dependent translation requires a functional interaction between the 5' and the 3' ends of oskar mRNA. *Genes Dev.* **12**, 1652-1664.
45. **Hachet, O., Ephrussi, A. (2004).** Splicing of oskar RNA in the nucleus is coupled to its cytoplasmic localization. *Nature* **428** (6986), 959-963.
46. **Haghighat, A. & Sonenberg, N. (1997).** eIF4G dramatically enhances the binding of eIF4E to the mRNA 5'-cap structure. *J. Biol. Chem.* **272**, 21677-21680.
47. **Hatton, G.I. (1990).** Emerging concepts of structure-function dynamics in adult brain: the hypothalamo-neurohypophysial system. *Prog. Neurobiol.* **34**, 437-504
48. **Hartmuth, K., Vornlocher, H.P., Luhrmann, R. (2004).** Tobramycin affinity tag purification of spliceosomes. *Methods Mol. Biol.* **257**, 47-64.
49. **Herb, A., Wisden, W., Catania, M.V., Marechal, D., Dresse, A., & Seeburg, P.H. (1997).** Prominent dendritic localization in forebrain neurons of a novel mRNA and its product, dendrin. *Mol. Cell Neurosci.* **8** (5), 367-374.
50. **Herskowitz, I., Andrews, B., Kruger, W., Ogas, J., Sil, A., Coburn, C., & Peterson, C. (1992).** Integration of multiple regulatory inputs in the control of HO expression in yeast. In *Transcriptional Regulation*. McKnight, S.L., and Yamamoto, K.R. (eds). Plainview, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 949-974.
51. **Hosoda, N., Kobayashi, T., Uchida, N., Funakoshi, Y., Kikuchi, Y., Hoshino, S. & Katada, T. (2003).** Translation termination factor eRF3 mediates mRNA decay through the regulation of deadenylation. *J. Biol. Chem* **272**, 38287-38291

52. Hoshino, S., Hosada, N., Araki, Y., Kobayashi, T., Uchida, N., Funakoshi, Y. and Katada, T. (1999). Novel Function of the Eukaryotic Polypeptide-Chain Releasing Factor 3 (eRF3/GSPT) in the mRNA Degradation Pathway. *Biochemistry (Moscow)* **64**, 1367-1372
53. Hoshino, S., Imai, M., Kobayashi, T., Uchida, N. & Katada, T. (1999). The Eukaryotic Polypeptide Chain Releasing Factor (eRF3/GSPT) Carrying the Translation Termination Signal to the 3'-Poly(A) Tail of mRNA. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 16677-16680
54. Huang, Y., Carson, J.H., Barbarese, E. & Richter, J.D. (2003). Facilitation of dendritic mRNA transport by CPEB. *Genes & Development* **17**, 638-653
55. Imataka, H., Gradi, A. & Sonnenberg, N. (1998). A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *EMBO J.* **17**, 7480-7489
56. Illenberger, S., Drewes, G., Trinczek, B., Biernat, J., Meyer, H.E., Olmsted, J.B., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E. (1996). Phosphorylation of microtubule-associated proteins MAP2 and MAP4 by the protein kinase p110mark. Phosphorylation sites and regulation of microtubule dynamics. *J. Biol. Chem.* **271**, 10834-10843.
57. Itoh, T.H., Hisanaga, S., Hosoi, T., Kishimoto, T., Hotani, H. (1997). Phosphorylation states of microtubule-associated protein 2 (MAP2) determine the regulatory role of MAP2 in microtubule dynamics. *Biochemistry* **36**, 12574-12582.
58. Jacobson, A. (1996). Poly(A) metabolism and translation: the closed-loop model. In J.W.B. Hershey, M.B. Mathews, and N. Sonnenberg (ed.), *Translational control*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
59. Joachims, M., Van Breugel, P.C., Lloyd, R.E. (1999). Cleavage of poly(A)-binding protein by enterovirus proteases concurrent with inhibition of translation in vitro. *J. Virol.* **73**(1), 718-727.
60. Johnstone, O., & Lasko, P. (2001). Translational regulation and RNA localization in *Drosophila* oocytes and embryos. *Annu. Rev. Genet.* **35**, 365-406.
61. Joseph, E.M., & Melton, D.A. (1998). Mutant Vg1 ligands disrupt endoderm and mesoderm formation in *Xenopus* embryos. *Development* **125** (146), 2677-2685.
62. Kahvejian, A., Roy, G., and Sonnenberg, N. (2002). The mRNA closed loop model: the function of PABP and PABP-interacting proteins in mRNA translation. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*
63. Khalegpour, K., Svitkin, Y.V., Craig, A.W., De Maria, C.T., Deo, R.C., Burley, S.K., Sonnenberg, N. (2001a). Translational repression by a novel partner of human poly(A) binding protein, Paip 2. *Mol. Cell.* **7**(1), 205-216.
64. Khalegpour, K., Kahvejian, A., De Crescenzo, G., Roy, G., Svitkin, Y.V., Imataka, H., O'Connor-McCourt, M. & Sonnenberg, N. (2001b). Dual Interactions of the Translational Repressor Paip2 with Poly(A) binding protein. *Mol. And Cellular Biol.* **21**, 5200-5213.
65. Kiebler, M.A. & DesGroseillers, L. (2000). Molecular Insights into mRNA Transport and Local Translation in the Mammalian Nervous System. *Neuron* **25**, 19-28.
66. Kim-Ha, J., Smith, J.C., Macdonald, P.M. (1991). Oskar mRNA is localized to the posterior pole of the *Drosophila* oocyte. *Cell* **66**(1), 23-35.
67. Kim-Ha, J., Webster, P.J., Smith, J.L., & Macdonald, P.M. (1993). Multiple RNA regulatory elements mediate distinct steps in localization of oskar mRNA. *Development* **119**, 169-178.
68. Kim-Ha, J., Kerr, K., & Macdonald, P.M. (1995). Translational regulation of oskar mRNA by Bruno, an ovarian RNA-binding protein, is essential. *Cell* **81**, 403-412.
69. Kindler, S., Mohr, E., Rehbein, M. & Richter, D. (2001). Extrasomatic Targeting of MAP2, Vasopressin and Oxytocin mRNAs in Mammalian Neurons. *Results and Problems in Cell Differentiation* **34**, 83-104.
70. King, M.L., Zhou, Y., & Buburenko, M. (1999). Polarizing genetic information in the egg: RNA localization in the frog oocyte. *Bio essays* **21**(7), 546-557
71. Kloc, M., Etkin, L.D. (1994). Delocalization of Vg1 mRNA from the vegetal cortex in *Xenopus* oocytes after destruction of Xlsirt RNA. *Science* **265** (5175), 1101-1103.
72. Knowles, R.B., Sabry, J.H., Martone, M.E., Deerinck, T.F., Ellisman, M.H., Bassell, G.J. & Kosik, K.S. (1996). Translocation of RNA granules in living neurones. *J. Neurosci.* **16**, 7812-7820.
73. Kolev, N.G. and Huber, P.W. (2003). VgRBP71 Stimulates Cleavage at a Polyadenylation Signal in Vg1 mRNA, Resulting in the Removal of a cis-Acting Element that Represses Translation. *Molecular Cell* **11**, 745-755.
74. Krichevsky, A.M., & Kosik, K.S. (2001). Neuronal RNA Granules: A Link between RNA Localization and Stimulation-Dependent Translation. *Neuron* **32**, 683-696.
75. Kroll, T.T., Zhao, W., Jiang, C. & Huber, P.W. (2002). A homolog of FBP2/KSRP binds to localized mRNAs in *Xenopus* oocytes. *Development* **129**, 5609-5619
76. Kuhl, D. & Skehel, P. (1998). Dendritic localization of mRNAs. *Curr Opin Neurobiol.* **8**(5), 600 – 606.
77. Kühn, U. & Pieler, T. (1996). *Xenopus* poly(A) binding protein: Functional Domains in RNA Binding and Protein-Protein Interaction. *J. Mol. Biol.* **256**, 20-30.

78. **Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
79. **Lasek, R.J., Brady, S.T. (1981).** The axon: a prototype for studying expressional cytoplasm. *Cold Spring Harb. Sym. Quant. Biol.* **46**, 113-124
80. **Lasko, P. (1999).** RNA sorting in *Drosophila* oocytes and embryos. *The FASEB Journal* **13**, 421-433
81. **Lasko, P. (2003).** Cup-ling oskar RNA localization and translational control. *J. Cell Biol.* **163** (6), 1189-1191.
82. **Le, H., Tanguay, R.L., Balasta, M.L., Wei, C., Browning, K.S., Metz, A.M., Goss, D.J. & Gallie, D.R (1997).** Translation Initiation Factors eIF-iso 4G and eIF-4B Interact with the Poly(A)-binding Protein and Increase Its RNA Binding Activity. *The Journal Of Biological Chemistry* **272**, 16247-16255.
83. **Le, H., Brownings, K.S. & Gallie, D.R. (2000).** The Phosphorylation State of Poly(A)-binding Protein Specifies Its Binding to Poly(A) RNA and Its Interaction with Eukaryotic Initiation Factor (eIF) 4F, eIFiso4F, and eIF4B. *The Journal Of Biological Chemistry* **275**, 17452-17462.
84. **Lee, J. & Bedford, M.T. (2001).** PABP1 identified as an arginine methyltransferase substrate using high-density protein arrays. *EMBO reports* **3**, 268-273.
85. **Li, P., Yong, X., Wasser, M., Cai, Y., Chia, W. (1997).** Inscuteable and Staufens mediate asymmetric localization and segregation of prospero RNA during *Drosophila* neuroblast cell divisions. *Cell* **90** (3), 437-447.
86. **Link, W., Konietzko, U., Kauselmann, G., Krug, M., Schwanke, B., Frey, U., Kuhl, D. (1995).** Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 5734-5738.
87. **Lisman, J., Malenka, R.C., Nicole, R.A., & Malinov, R. (1997).** Learning mechanisms: the case for CaMKII. *Science* **276** (5321), 2001-20002.
88. **Litman, P., Barg, J., Ginzburg, I. (1994).** Microtubules are involved in the localization of tau mRNA in primary neuronal cell cultures. *Neuron* **13**(6), 1463-1474.
89. **Litman, P., Barg, J., Rindzoonski, L., Ginzburg, I. (1993).** Subcellular localization of tau mRNA in differentiating neuronal cell culture: implications for neuronal polarity. *Neuron* **10**(4), 627-638.
90. **Ludwig, M. (1998).** Dendritic Release of Vasopressin and Oxytocin. *Journal of Neuroendocrinology* **10**, 881-895.
91. **Lyford, G.L., Yamagata, K., Kaufmann, W.E., Barnes, C.A., Sanders, L.K., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Lanahan, A.A., Worley, P.F. (1995).** Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* **14**, 433-445.
92. **Ma, D., Morris, J.F. (2002).** Protein synthetic machinery in the dendrites of the magnocellular neurosecretory neurons of wild-type Long-Evans and Homozygous Brattleboro rats. *J. Chem. Neuroanat.* **23**, 171-186.
93. **Marhoul, J.F. & Adams, T.H. (1996).** *Aspergillus* fabM encodes an essential product that is related to poly(A)-binding proteins and activates development when overexpressed. *Genetics* **144**, 1463-1470.
94. **Marion, R.M., Fortes, P., Beloso, A., Dotti, C., Ortin, J. (1999).** A human sequence homologue of Staufens is an RNA-binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biol.* **19**(3), 2212-2219.
95. **Mayford, M., Wang, J., Kandel, E.R., & O`Dell, T.J. (1995).** CaMKII regulates the frequency-response function of hippocampal synapses for the production of both LTD and LTP. *Cell* **81**(6), 891-901.
96. **McAllister, A.K. (2002).** Spatially Restricted Actions of BDNF. *Neuron*, **36**, 549-553.
97. **McBride, A.E. and Silver, P.A. (2001).** State of the Arg: Protein Methylation at Arginine Comes of Age. *Cell* **106**, 5-8.
98. **Melo, E.O., Dhalia, R., Martins de Sa, C., Standart, N. and de Melo Neto, P. (2003).** Identification of a C-terminal Poly(A)-binding Protein (PABP)-PABP Interaction Domain. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 46357-46368.
99. **Micklem, D.R., Adams, J., Grünert, S. and St Johnston, D. (2000).** Distinct roles of two conserved Staufens domains in oskar mRNA localization and translation. *EMBO Journal* **19**, 1366-1377.
100. **Miller, S., Yasuda, M. Coats, J.K., Jones, Y. (2002).** Disruption of Dendritic Translation of CaMKII alpha Impairs Stabilization of Synaptic Plasticity and Memory Consolidation. *Neuron* **36**, 507-519.
101. **Ming, G., Wong, S.T., Henley, J., Yuan, X., Song, H., Spitzer, N.C. and Poo, M. (2002).** Adaptation in the chemotactic guidance of nerve growth cones. *Nature* **417**, 411-418.
102. **Miyashiro, K., Dichter, M., & Eberwine, J. (1994).** On the nature and differential distribution of mRNAs in hippocampal neurites: implications for neuronal functioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**(23), 10800-10804.
103. **Mohr, E., Morley, S.D. & Richter, D. (1990).** Evolution, expression and regulation of the vasopressin-oxytocin gene family. In: Schwartz, T. W., Hilstedt, L.M. und Rehfeld, J.F. (Hsg.): Neuropeptides and their receptors. Alfred Benzon Symposium 29. Munksgaard, Kopenhagen; S. 74-91

104. **Mohr, E., Fehr, S., und Richter, D. (1991).** Axonal transport of neuropeptide encoding mRNAs within the hypothalamo-hypophyseal tract of rats. *EMBO J.* **10**, 2419-2424.
105. **Mohr, E. (1999).** Subcellular RNA Compartmentalization. *Progress in Neurobiology*, **57**, 507-525.
106. **Mohr, E., Richter, D. (2000).** Axonal mRNAs: functional significance in vertebrates and invertebrates. *J. Neurocytol.* **29** (11-12), 783-791.
107. **Mohr, E., Fuhrmann, C. & Richter, D. (2001).** VP-RBP, a protein enriched in brain tissue, specifically interacts with the dendritic localizer sequence of rat vasopressin mRNA. *Eur. J. Neuroscience* **13**, 1107-1112.
108. **Mohr, E., Kächele, I., Mullin, C. & Richter, D. (2002).** Rat vasopressin mRNA: a model system to characterize *cis*-acting elements and *trans*-acting factors involved in dendritic mRNA sorting. *Progress in Brain Research* **139**, 211-224.
109. **Mohr, E., Morris, J.F. & Richter, D. (1995).** Differential subcellular mRNA targeting: Deletion of a single nucleotide prevents the transport to axons but not to dendrites of rat hypothalamic magnocellular neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4377-4381.
110. **Mohr, E., Prakash, N., Vieluf, K., Fuhrmann, C., Buck, F. & Richter, D. (2001).** Vasopressin mRNA localization in nerve cells: Characterization of *cis*-acting elements and *trans*-acting factors. *PNAS* **98**, 7072-7079.
111. **Mohr, E. & Richter, D. (1994).** Vasopressin in the regulation of body functions. *Journal of Hypertension* **12**, 345-348.
112. **Mohr, E. & Richter, D. (2001).** Messenger RNA on the move: implications for cell polarity. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology* **33**, 669-679.
113. **Mohr, E., Richter, D. (2003).** Local synthesis of the rat Vasopressin precursor in dendrites of in cultured nerve cells. *Molecular Brain Research* **114**, 115-122.
114. **Mohr, E. & Richter, D. (2003).** Molecular determinants and physiological relevance of extrasomatic RNA localization in neurons. *Frontiers in Neuroendocrinology* **24**, 128-139.
115. **Monshausen, M., Putz, U., Rehbein, M., Schweizer, M., DesGrosseillers, L., Kuhl, D., Richter, D. & Kindler, S. (2001).** Two rat brain Staufen isoforms differentially bind RNA. *Journal of Neurochemistry* **76**, 155-165.
116. **Morris, J.F., Pow, D.V., Sokol, H.W., Ward, A. (1993).** Dendritic release of peptides from magnocellular neurons in normal rats, Brattleboro rats and mice with hereditary nephrogenic diabetes insipidus. Vasopressin John Libbey Eurotext Ltd., 171-182.
117. **Mowry, K.L. & Cote, C.A. (1999).** RNA sorting in *Xenopus* oocytes and embryos. *FASEB.* **13**, 435 – 445.
118. **Muddashetty, R., Khanam, T., Kondrashov, A., Bundman, M., Iacoangeli, A., Kremerskothen, J., Duning, K., Barnekow, A., Huttenhofer, A., Tiedge, H., Brosius, J. (2002).** Poly(A)-binding protein is associated with neuronal BC1 and BC200 ribonucleoprotein particles. *J. Mol. Biol.* **321**, 433-445.
119. **Muslimov, I.A., Santi, E., Homel, P., Perini, S., Higgins, D. and Tiedge, H. (1997).** RNA Transport in Dendrites: A *cis*-Acting Targeting Element Is Contained within Neuronal BC1 RNA. *The Journal of Neuroscience* **17**, 4722-4733.
120. **Nasmyth, K. (1993)** Regulating the HO endonuclease in yeast. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **3**, 286-294
121. **Nietfeld, W., Mentzel, H., and Pieler, T. (1990).** The *Xenopus laevis* poly(A) binding protein is composed of multiple functionally independent RNA binding domains. *EMBO J.* **9**, 3699-3705.
122. **Peters, A., Palay, S.I., & Webster, H. (1970).** The fine structure of the nervous system: The cells and their process. *Herper Sc Roy, N.Y.*
123. **Pierce, J.P., van Leyen, K., McCarthy, J.B. (2000).** Translocation machinery for synthesis of integral membrane and secretory proteins in dendritic spines. *Nature Neuroscience* **3**, 311-313.
124. **Prakash, N., Fehr, S., Mohr, E., Richter, D. (1997).** Dendritic localization of rat vasopressin mRNA: ultrastructural analysis and mapping of targeting elements. *Eur. J. Neuroscience* **9**, 523-532.
125. **Preiss, T. and Hentze, M.W. (1998).** Dual function of the messenger RNA cap structure in poly(A)-tail-promoted translation in yeast. *Nature* **392**, 516-520.
126. **Putz, U., Kremerskothen, J., Skehel, P., and Kuhl, D. (2000).** RNA-protein interactions reconstituted by a tri-hybrid-system in yeast hybrid technologies, in *Biotechniques Books* (Zhu L., ed), in press. Eaton Publishing, Natick, USA.
127. **Putz, U., J., Skehel, P., and Kuhl, D. (1996).** A tri-hybrid system for the analysis and detection of RNA-protein interactions. *Nucleic Acids Res.* **24**, 42838-4840.
128. **Quinlan, E.M., Halpain, S. (1996).** Postsynaptic mechanisms for bidirectional control of MAP2 phosphorylation by glutamate receptors. *Neuron* **16**, 357-368.
129. **Racca, C., Gardiol, A., & Triller, A. (1997).** Dendritic and postsynaptic localizations of glycine receptor α subunit mRNAs. *J. Neurosci.* **17**, 1691-1700.
130. **Rehbein, M., Kindler, S., Horke, S. & Richter, D. (2000).** Two *trans*-acting rat brain proteins, MARTA1 and -2, interact specifically with the dendritic targeting element in MAP2 mRNAs. *Mol. Brain Res.* **79**, 192-201.

131. **Rehbein, M., Wege, K., Buck, F., Schweizer, M., Richter, D. & Kindler, S. (2002).** Molecular characterization of MARTA1, a protein interacting with the dendritic targeting element of MAP2 mRNAs. *Journal of Neurochemistry* **82**, 1039-1046.
132. **Richter, D. (1987).** Biochemistry and biology of vasopressin, oxytocin, and their corresponding neurophysins. In Smith, C. W. (ed.), *The Peptides*, **8**, Academic Press, London, 41-75.
133. **Richter, J.D. (2001).** Think globally, translate locally: What mitotic spindles and neuronal synapses have in common. *PNAS* **98**, 7069-7071.
134. **Roy, G., De Crescenzo, G., Khaleghpour, K., Kahvejian, A., O'Connor-McCourt, M. & Sonenberg, N. (2002).** Paip1 Interacts with Poly(A) Binding Protein through Two Independent Binding Motifs. *Mol. Cell., Biol.* **22**, 3769-3782.
135. **Rozen, F. et al. (1990).** Bidirectional RNA helicase activity of eucaryotic translation initiation factors 4A and 4F. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 1134-1144.
136. **Sachs, A.B., & Buratowski, S. (1997).** Common themes in translational and transcriptional regulation. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 189-192.
137. **Sachs, A.B., Davis, R.W. & Kornberg, R.D. (1987).** *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 3268-3276.
138. **Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989).** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.*
139. **Scherly, D., Bollens, W., Dathan, N.A., von Venrooij, W.J., Mattaj, W. (1990).** Major determinants of the specificity of interaction between small nuclear ribonucleoproteins U1A and U2B^{''} and their cognate RNAs. *Nature*, **345** (6275), 502-506.
140. **Schnapp, B.J. (1999).** RNA localization: A glimpse of the machinery. *Current Biology* **9**, 725-727.
141. **Searfoss, A., Dever, T.E., and Wickner, R. (2001).** Linking the 3' poly(A) tail to the subunit joining step of translation initiation: relations of Pab1p, eucaryotic translation initiation factor 5B (Fun 12p), and Ski2p-Slh1p. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 4900-4908.
142. **Shan, J., Munro, T.P., Barbarese, E., Carson, J.H. & Smith, R. (2003).** A Molecular Mechanism for mRNA Trafficking in Neuronal Dendrites. *The Journal of Neuroscience* **23**, 8859-8866.
143. **Sigrist, S.J., Thiel, P.R., Reiff, D.F., Lachance, P.E., Lasko, P. & Schuster, C.M. (2000).** Postsynaptic translation affects the efficacy and morphology of neuromuscular junctions. *Nature* **405**, 1062-1065.
144. **Skabkina, O.V., Skabkin, M.A., Popova, N.V., Lyabin, D.N., Penalva, L.O. & Ovchinnikov, L.P. (2003).** Poly(A)-binding Protein Positively Affects YB-1 mRNA Translation through Specific Interaction with YB-1 mRNA-. *J. Biol. Chem.* **278**, 18191-18198.
145. **Shafit-Zagardo, B., Kalcheva, N. (1998).** Making sense of the multiple MAP-2 transcripts and their role in the neuron. *Mol. Neurobiol* **16**, 149-162.
146. **Sladic, R.T., Lagnado, C.A., Bagley, C.J. and Goodall, G.J. (2003).** Human PABP binds AU-rich RNA via RNA-binding domains 3 and 4. *Eur. J. Biochem.* **271**, 450-457.
147. **Sofroniew, M.V. (1983).** Vasopressin and oxytocin in the mammalian brain and spinal cord. *Trends Neurosci.* **6**, 467-472.
148. **Sonnenberg, N., Rupprecht, K.M., Hecht, S.M. & Shatkin, A.J. (1979).** Eukaryotic mRNA cap binding protein: purification by affinity chromatography on sepharose-coupled m7GDP. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **76**, 4345-4349.
149. **Steward, O. (1997).** mRNA localization in neurons: a multipurpose mechanism? *Neuron* **18** (1), 9-12.
150. **Steward, O. & Levy, W.B. (1982).** Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus. *J. Neurosci.* **2**(3), 284-291
151. **Steward, O. & Schuman, M. (2001).** Protein Synthesis At Synaptic Sites On Dendrites. *Annu. Rev. Neurosci* **24**, 299-325.
152. **Steward, O., Worley, P. (2002).** Local synthesis of proteins at synaptic sites on dendrites: role in synaptic plasticity and memory consolidation? *Neurobiol. Learn. Mem.* **78**(3), 508-527.
153. **St. Johnston, D., Driever, W., Berleth, T., Richstein, S., Nüsslein-Vollhard, C. (1989).** Multiple steps in the localization of bicoid RNA to the anterior pole of the Drosophila oocyte. *Development.* **107**, Suppl. 13-9.
154. **St. Johnston, D., Nüsslein-Vollhard, C. (1992).** The Origin of Pattern and Polarity in the Drosophila Embryo. *Embryology*, **68**, 201-219.
155. **Takizawa, P.A., DeRisi, J.L., Wilhelm, J.E., Vale, R.D. (2000).** Plasma membrane compartmentalization in yeast by messenger RNA transport and a septin diffusion barrier. *Science* **290**, 341-344.
156. **Tarun, S.Z.Jr & Sachs, A.B. (1995).** A common function for mRNA 5' and 3' ends in translation initiation in yeast. *Genes Dev.* **9**, 2997-3007.
157. **Tarun, S.Z.Jr & Sachs, A.B. (1996).** Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *EMBO J.* **15**, 7168-7177.
158. **Thomas, G.H. & Melton, D.A. (1993).** Processed Vg1 protein is an axial mesoderm inducer in Xenopus. *Cell* **74**(3), 433-441.
159. **Tiedge, H., Zhou, A., Thorn, N.A. & Brosius, J. (1993a).** Transport of BC1 RNA in hypothalamo-neurohypophyseal axons. *J. Neurosci.* **13**, 4214-4219.

160. **Tiedge, H., Chen, W., Brosius, J. (1993b).** Primary structure, neural-specific expression, and dendritic location of human BC200 RNA. *J. Neurosci.* **13**(6), 2382-2390.
161. **Tiedge, H. & Brosius, J. (1996).** Translational machinery in dendrites of hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* **16**(22), 7171-81.
162. **Tiruchinapalli, D.M., Oleynikov, Y., Kelic, S., Shenoy, S.M., Hartley, A., Stanton, P.K., Singer, R.H. and Bassell, G.J. (2003).** Activity-Dependent Trafficking and Dynamic Localization of Zipcode Binding Protein 1 and beta-Actin mRNA in Dendrites and Spines of Hippocampal Neurons. *The Journal of Neuroscience* **23**, 3251-3261.
163. **Tongiorgi, E., Righi, M., Cattaneo, A. (1997).** Activity-dependent dendritic targeting of BDNF and TrkB mRNAs in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **17**(24), 9492-9505.
164. **Torre, E.R. & Steward, O. (1992).** Demonstrating of local protein synthesis within dendrites using a new cell culture system that permits the isolation of living axons and dendrites from their cell bodies. *J. Neurosci.* **12**(3), 762-772.
165. **Uchida, N., Hoshino, S. and Katada, T. (2004).** Identification of a Human Cytoplasmic Poly(A) Nuclease Complex Stimulated by Poly(A)-binding Protein. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 1383-1391.
166. **van Rossum, D., Hanisch, U.K. (1999).** Cytoskeletal dynamics in dendritic spines: direct modulation by glutamate receptors? *Trends Neurosci.* **22**, 290-259.
167. **Wang, H., Iacoangeli, A., Popp, S., Muslimov, I.A., Imataka, H., Sonenberg, N., Lomakin, I.B. & Tiedge, H. (2002).** Dendritic BC1 RNA: Functional Role in Regulation of Translation Initiation. *Journal of Neuroscience* **22**, 10232-10241.
168. **Wang, Y., Killian, J., Hamasaki, K., and Rando, R.R. (1996).** RNA Molecules That Specifically and Stoichiometrically Bind Aminoglycoside Antibiotics with High Affinities. *Biochemistry* **35**, 12338-12346.
169. **Wang, Z. and Kiledjian, M. (2000).** The Poly(A)-Binding Protein and an mRNA Stability Protein Jointly Regulate an Endoribonuclease Activity. *Molecular and Cellular Biology* **20**, 6334-6341.
170. **Weeks, D.C., & Melton, D.A., (1987).** A maternal mRNA localized to the vegetal hemisphere in *Xenopus* eggs codes for a growth factor related to TGF-beta. *Cell.* **51** (5), 861-867.
171. **Wells, S.E., Hillner, P.E., Vale, R.D., and Sachs, A.B. (1998).** Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol. Cell* **2**, 135-140.
172. **Wells, D.G., Dong, X., Quinlan, E.M., Huang, Y., Bear, M.F., Richter, J.D. & Fallon, J.R. (2001).** A Role for the Cytoplasmic Polyadenylation Element in NMDA Receptor-Regulated mRNA Translation in Neurons. *The Journal of Neuroscience* **21**, 9541-9548.
173. **Wickham, L., Duchaine, T., Luo, M., Nabi, I.R., DesGroseillers, L. (1999).** Mammalian staufen is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol. Cell Biol.* **19**(3), 2220-2230.
174. **Wilusz, C.J., Gao, M., Jones, C.L., Wilusz, J., Peltz, S.W. (2001a).** Poly(A)-binding proteins regulate both mRNA deadenylation and decapping in yeast cytoplasmic extracts. *RNA* **7**(10), 1416-24.
175. **Wilusz, C.J., Wormington, M., Peltz, S.W. (2001b).** The cap-to-tail guide to mRNA turnover. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**(4), 237-246.
176. **Wotjak, C.T., Kubota, M., Liebsch, G., Montkowski, A., Holsboer, F., Neumann, I. & Landgraf, R. (1996).** Release of Vasopressin within the rat paraventricular nucleus in response to emotional stress: a novel mechanism of regulating adrenocorticotrophic hormone secretion? *J. Neurosci.* **16**, 7725-7732.
177. **Yulis, C.R., Peruzzo, B. & Rodriguez, E.M. (1984).** Immunocytochemistry and ultrastructure of the neuropil located ventral to the rat supraoptic nucleus. *Cell Tissue Res.* **236**, 171-180.
178. **Zhang, H.L., Eom, T., Oleynikov, Y., Shenoy, S.M., Liebelt, D.A., Dictenberg, J.B., Singer, R.H. & Bassell, G.J. (2001).** Neurotrophin-Induced Transport of a β -Actin Levels and Stimulates Growth Cone Motility. *Neuron* **31**, 261-275.
179. **Zhou, Y. and King, M.L. (2004).** Sending RNAs into the future: RNA Localization and Germ Cell Fate. *IUBMB Life* **56**, 19-27.

Anhang

A. Wertetabellen zu den graphischen Abbildungen in Abschnitt 4 (Ergebnisse)

A.1. Tabelle zu Abbildung 4.22, Seite 97 (Bindungsstudie des *in vitro* translatierten rPABP und der *in vitro* translatierten PABP-Deletionsmutanten RRM 1+2, RRM 2+3 und RRM 3+4 an Poly(A)-Sequenzen)

Proteine	PABP	RRM 1+2	RRM 2+3	RRM 3+4
relative Bindung an Poly(A)-Sequenzen in %	100,00	3,34	14,13	35,69

A.2. Tabelle zu Abbildung 4.23., Seite 98 (Bindungsstudie der mittels *in vitro* Translation synthetisierten Proteine rPABP und der PABP-Deletionsmutante RRM 3+4 an verschiedene *in vitro* transkribierte cRNAs)

		Eingesetzte cRNAs		
		Vasopressin-sense-cRNA	Vasopressin-antisense-cRNA	α -Tubulin-cRNA
Eingesetzte Proteine	rPABP relative Bindung in %	100,00	19,80	27,94
	RRM 3+4 Relative Bindung in %	20,98	9,79	7,79

A.3. Tabellen zu Abbildung 4.25., Seite 102 (Darstellung der Fluoreszenzintensitätsauswertung von A) mit Myc-rPABP- und VP-Vorläufer-Konstrukten und B) mit Myc-Luciferase- und VP-Vorläufer-Konstrukten ko-transfizierten HEK 293-Tet-On-Zellen)

Transfizierte Konstrukte/Induktion mit Doxycyclin (DOX)	Myc-rPABP/ DOX 0 ng/ml (n=103)	Myc-rPABP/ DOX 800 ng/ml (n=200)	VP-Vorläufer/ DOX 0 ng/ml (n=103)	VP-Vorläufer/ DOX 800 ng/ml (n=200)
Gesamtintensität in %	14,43	100	100	72,45

Transfizierte Konstrukte/Induktion mit Doxycyclin (DOX)	Myc-Luciferase/ DOX 0 ng/ml (n=45)	Myc-Luciferase/ DOX 800 ng/ml (n=64)	VP-Vorläufer/ DOX 0 ng/ml (n=45)	VP-Vorläufer/ 800 ng/ml (n=64)
Gesamtintensität in %	0	100	81,14	100

Danksagung

Herrn Prof. Dr. D. Richter danke ich für die Ermöglichung dieser Arbeit sowie für die vielen interessanten Kongresse, die ich besuchen durfte. Herrn Prof. Dr. H. Bretting danke ich für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Bei Frau Dr. E. Mohr möchte ich mich für die qualifizierte Betreuung der Arbeit sowie die vielen praktischen Ratschläge bedanken. Zudem möchte ich mich ganz herzlich bei den vielen guten Seelen des Institutes bedanken, ohne die die Durchführung der Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Allen voran Frau Reinhardt, die mich in der Endphase der Arbeit sehr gut unterstützt hat, sowie Frau Christiansen, Frau Stübe, Herr Hönck und Herr Harder die immer ein offenes Ohr übrig haben. Frau Dr. Rehbein möchte ich meinen ganz besonderen Dank aussprechen für die guten Ratschläge und tatkräftige Unterstützung. Herrn Dr. F. Buck und seinem Team möchte ich für die Sequenzierung sowie für alle guten Ratschläge danken.

Bei allen Mitgliedern des Instituts möchte ich mich für die Unterstützung und das gute Arbeitsklima bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Torsten, der mich in jeder Situation unterstützt hat. Zudem möchte ich mich bei meiner gesamten Familie für ihre Anteilnahme bedanken.

Lebenslauf

Name: Carola Mullin, geb. Fuhrmann
Geburtsdatum: 01.11.72
Geburtsort: Hamburg
Familienstand: verheiratet seit Juni 2001

Grundschule: Ludwig-Frahm-Schule in Hamburg (1979-1983)
Gymnasium: Ludwig-Meyn-Schule in Uetersen (1983-1992)
Abschluß: Abitur

Sommersemester 1993: Studium an der Universität Hamburg, Fakultät für Chemie, Studienrichtung Chemie (Dipolm)

Wintersemester 1993: Wechsel zum Studiengang Biologie (Diplom), Universität Würzburg

September 1998 bis September 1999: Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Molekulare Infektionsbiologie in Würzburg unter der Leitung von Prof. Dr. J. Hacker („Herstellung einer *Candida albicans*-Promotorgenbank zur Identifizierung von *in vivo* induzierten Genen“)

ab Februar 2000: Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von PD Dr. E. Mohr am Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie des Universitäts-Krankenhauses Eppendorf, Hamburg, Betreuung durch Prof. Dr. D. Richter

Hamburg, den 13. Mai 2004

Carola Mullin

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. D. RICHTER
Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. H. BRETTING

Tag der Disputation: 25. Juni 2004

Hamburg, den 11. Juni 2004



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Arno Frühwald'.

Professor Dr. Arno Frühwald
Dekan