UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Identifizierung und Charakterisierung eines neuen PABP-interagierenden Proteins, Makorin RING-Zinkfinger Protein 1 (MKRN1) in Neuronen

Dissertation

zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften Dr. rer. nat. an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften Fachbereich Biologie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Hatmone Miroci

geboren in Deçan

Hamburg 2018

Dissertationsgutachter

Dr. Evita Mohr Prof. Dr. Christian Lohr

Tag der Disputation: 13.7.2018 Vorsitzender: Prof. Dr. Christian Lohr

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis IV				
TabellenverzeichnisVI				
Abkürzungsverzeichnis				
1	Einleit	tung		1
2	Mater	ial ur	nd Methoden	14
2	2.1 N	Aater	ialien	14
	2.1.1	Stan	dardchemikalien	14
	2.1.2	Läng	genstandards	14
	2.1.3	Enz	/me	14
	2.1.4	Biol	ogisches Material (Bakterienstämme, Hefestämme, Zelllinien)	15
	2.1.5	Vek	toren	16
	2.1.6	Vek	tor-Konstrukte	17
	2.1.7	Olig	onukleotide	19
	2.1.8	Anti	körper	21
	2.1.9	Gerä	ite	22
	2.1.10	F	irmenverzeichnis	23
2	2.2 N	Metho	den	26
2	2.2 N 2.2.1	Metho DNA	den	 26
2	2.2 N 2.2.1 2.2.1	/letho DN/ 1.1	den A: Molekularbiologische Methoden Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i> , PCR)	 26 26
2	2.2 N 2.2.1 2.2.1 2.2.1	DN DN 1.1 1.2	den A: Molekularbiologische Methoden Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i> , PCR) Agarosegelelektrophorese	 26 26 26 27
2	2.2 N 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1	Aetho DNA 1.1 1.2 1.3	den A: Molekularbiologische Methoden Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i> , PCR) Agarosegelelektrophorese Isolierung von DNA aus Agarosegelen	 26 26 26 27 27
2	2.2 N 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1	Aetho DNA 1.1 1.2 1.3 1.4	den A: Molekularbiologische Methoden Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i> , PCR) Agarosegelelektrophorese Isolierung von DNA aus Agarosegelen Restriktion von DNA	 26 26 26 27 27 27
2	2.2 N 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1	Metho DNA 1.1 1.2 1.3 1.4 1.5	den A: Molekularbiologische Methoden Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i> , PCR) Agarosegelelektrophorese Isolierung von DNA aus Agarosegelen Restriktion von DNA Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	26 26 26 27 27 27 27 27
2	2.2 N 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1	Metho DNA 1.1 1.2 1.3 1.4 1.5 1.6	den A: Molekularbiologische Methoden Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i> , PCR) Agarosegelelektrophorese Isolierung von DNA aus Agarosegelen Restriktion von DNA Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten Ligation von DNA-Fragmenten	26 26 27 27 27 27 27 27 28
2	2.2 N 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1	Metho DNA 1.1 1.2 1.3 1.4 1.5 1.6 1.7	den A: Molekularbiologische Methoden Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i> , PCR) Agarosegelelektrophorese Isolierung von DNA aus Agarosegelen Restriktion von DNA Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten Ligation von DNA-Fragmenten Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	26 26 26 27 27 27 27 27 28 28
2	2.2 N 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1	Metho DNA 1.1 1.2 1.3 1.4 1.5 1.6 1.7 1.8	den A: Molekularbiologische Methoden Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i> , PCR) Agarosegelelektrophorese Isolierung von DNA aus Agarosegelen Restriktion von DNA Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten Ligation von DNA-Fragmenten Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	26 26 26 27 27 27 27 27 28 28 28
2	2.2 N 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1	Metho DNA 1.1 1.2 1.3 1.4 1.5 1.6 1.7 1.8 1.9	den A: Molekularbiologische Methoden Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i> , PCR) Agarosegelelektrophorese Isolierung von DNA aus Agarosegelen Restriktion von DNA Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten Ligation von DNA-Fragmenten Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen (Mini-, Midi-, Maxi-Präparationen)	26 26 26 27 27 27 27 27 28 28 28 28
2	2.2 N 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1	Metho DN/ 1.1 1.2 1.3 1.4 1.5 1.6 1.7 1.8 1.9 1.10	den A: Molekularbiologische Methoden Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i> , PCR) Agarosegelelektrophorese Isolierung von DNA aus Agarosegelen Restriktion von DNA Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten Ligation von DNA-Fragmenten Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen (Mini-, Midi-, Maxi-Präparationen) Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren (DNA/RNA)	26 26 27 27 27 27 27 28 28 28 28 29 29
2	2.2 N 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1	Metho DNA 1.1 1.2 1.3 1.4 1.5 1.6 1.7 1.8 1.9 1.10 1.11	den A: Molekularbiologische Methoden Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i> , PCR) Agarosegelelektrophorese Isolierung von DNA aus Agarosegelen Restriktion von DNA Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten Ligation von DNA-Fragmenten Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen (Mini-, Midi-, Maxi-Präparationen) Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren (DNA/RNA) DNA-Sequenzierung	26 26 27 27 27 27 27 28 28 28 28 29 29 29
2	2.2 N 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1	Metho DN/ 1.1 1.2 1.3 1.4 1.5 1.6 1.7 1.8 1.9 1.10 1.11 1.12	den A: Molekularbiologische Methoden Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) Agarosegelelektrophorese Isolierung von DNA aus Agarosegelen Restriktion von DNA Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten Ligation von DNA-Fragmenten Herstellung kompetenter E. coli-Zellen Transformation kompetenter E. coli-Zellen Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli-Zellen (Mini-, Midi-, Maxi-Präparationen) Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren (DNA/RNA) DNA-Sequenzierung Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	26 26 27 27 27 27 27 27 27 28 28 29 29 30
2	2.2 N 2.2.1	Metho DN/ 1.1 1.2 1.3 1.4 1.5 1.6 1.7 1.8 1.9 1.10 1.11 1.12 RN/	den A: Molekularbiologische Methoden Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i> , PCR) Agarosegelelektrophorese Isolierung von DNA aus Agarosegelen Restriktion von DNA Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten Ligation von DNA-Fragmenten Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen (Mini-, Midi-, Maxi-Präparationen) Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren (DNA/RNA) DNA-Sequenzierung Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	26 26 27 27 27 27 27 27 27 27 27 27 27 27 27 27 27 27 27 27 28 28 29 29 29 30 30
2	2.2 N 2.2.1	Metho DN/ 1.1 1.2 1.3 1.4 1.5 1.6 1.7 1.8 1.9 1.10 1.11 1.12 RN/ 2.1	den A: Molekularbiologische Methoden Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i> , PCR) Agarosegelelektrophorese Isolierung von DNA aus Agarosegelen Restriktion von DNA Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten Ligation von DNA-Fragmenten Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen (Mini-, Midi-, Maxi-Präparationen) Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren (DNA/RNA) DNA-Sequenzierung Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten A: Molekularbiologische Methoden Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen und Rattengeweben	26 26 27 28 29 29 30 30 30 30
2	2.2 N 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.1 2.2.2 2.2.1 2.2.2 2.2.2 2.2.2 2.2.2	Aletho DN/ 1.1 1.2 1.3 1.4 1.5 1.6 1.7 1.8 1.9 1.10 1.11 1.12 RN/ 2.1 2.2	den A: Molekularbiologische Methoden Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) Agarosegelelektrophorese Isolierung von DNA aus Agarosegelen Restriktion von DNA Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten Ligation von DNA-Fragmenten Herstellung kompetenter E. coli-Zellen Transformation kompetenter E. coli-Zellen (Mini-, Midi-, Maxi-Präparationen) Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren (DNA/RNA) DNA-Sequenzierung Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten A: Molekularbiologische Methoden Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen und Rattengeweben Herstellung von cDNA über Reverse Transkription	26 26 27 27 27 27 27 27 27 28 28 29 29 30 30 31

2.2	2.2.4	Herstellung radioaktiv-markierter cRNA-Sonden	32
2.2	2.2.5	Northern Blot-Analyse	34
2.2	2.2.6	In situ-Hybridisierung	35
2.2.3	H	Iefe-Zwei-Hybrid-System (Yeast Two-Hybrid, YTH)	37
2.2	2.3.1	Prinzip des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems	37
2.2	2.3.2	Transformation von Hefezellen	39
2.2	2.3.3	Toxizitätstest	40
2.2	2.3.4	Proteinextraktion aus Hefe	41
2.2	2.3.5	Hefe-Zwei-Hybrid-Screen (Yeast Mating)	42
2.2	2.3.6	α-Galactosidase Test	42
2.2	2.3.7	Plasmid-Präparation aus Hefezellen	43
2.2.4	Z	/ellkultur	43
2.2	2.4.1	Kultivierung von Zellen (HEK293, HeLa, COS7, NIH 3T3)	43
2.2	2.4.2	Transfektion von Zellen	44
2.2	2.4.3	Kultivierung und Transfektion von primären Hippocampusneuronen	45
2.2	2.4.4	Immuncytochemische Methoden	46
2.2.5	Р	roteinbiochemische Methoden	47
2.2	2.5.1	Proteinbestimmung	47
2.2	2.5.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
2.2	2.5.3	Transfer und immunologische Detektion von Proteinen auf Nitrocellulosemembran	
		(Western Blot)	47
2.2	2.5.4	Expression und Aufreinigung von GST (Glutathion S-Transferase)-Fusionsproteinen	48
2.2	2.5.5	Herstellung von spezifischen Makorin1-Antiseren	49
2.2	2.5.6	Herstellung von Proteinextrakten aus HEK293- oder HeLa-Zellen	49
2.2	2.5.7	Immunpräzipitation aus transient transfizierten HEK293- oder HeLa-Zellen	50
2.2	2.5.8	Identifizierung von PABP- und MKRN1-interagierenden Proteinen, PDZ-Pulldown	50
2.2.6	Р	räparation von Polysomen aus adulten Rattenhippocampi	52
2.2.7	R	NA-Protein-Bindungsstudien durch Affinitätschromatographie	52
Erge	bnis	se	54
3.1	Ide	ntifizierung von PARP-Interaktionspartnern mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-	
	Sys	tems	54
32	Che	arakterisierung der Interaktion von PARP und Makorin1-short <i>in vivo</i>	58
321	CIII K	Communpräzinitation von PARP und Makorin1 short aus transfizierten HEK203 Zellen	58
3.2.1	Δ	Analyse der PABP/Makorin1-short-Interaktion durch einen PD7-Pulldown	50 59
3.2.2	CT.		
5.3	Cha	arakterisierung der interagierenden Domänen von Makorin1-short und PABP.	62
3.3.1	I	dentifizierung der Makorin1-short-Domänen, die für die Interaktion mit PABP	
2.2.5	v	erantwortlich sind	62
3.3.2	10	dentifizierung der PABP-Domanen, die für die Interaktion mit Makorin1-short	

3

		verantwortlich sind	65
3	3.4 Findet eine Interaktion von PABP und Makorin1-short statt, wenn PABP an		
		VP-RNA gebunden ist?	67
3	6.5	Analysen zur in vivo-Expression von Makorin1	68
	3.5.1	Northern Blot-Analyse zur Genexpression von Makorin1 in Rattengewebe	69
	3.5.2	Lokalisation der Makorin1-mRNA in Gehirnschnitten der Ratte	69
	3.5.3	RT-PCR-Analyse zur Genexpression von Makorin1 im Rattenhirn	70
	3.5.4	Western Blot-Analyse zur Charakterisierung der Proteinexpression von Makorin1 im Gehirn	
		der Ratte	72
	3.5.5	Immunzytochemische Analysen zur Verteilung von Makorin1 in neuronalen und	
		nicht-neuronalen Zellen	73
	3.5.6	Kolokalisation von Makorin1-short und PABP in Hippokampusneuronen	75
	3.5.7	Lokalisation von Makorin1 in unterschiedlichen Regionen des Rattenhirns	76
3	5.6	Makorin1-short weist keine Ubiquitin-E3-Ligase-Aktivität auf	77
3	5.7	Ist Makorin1 mit translatierenden Ribosomen assoziiert?	78
3	5.8	Lokalisation von Makorin1 in Synapsen	80
3	5.9	Identifizierung von weiteren Interaktionspartnern von Makorin1-short	81
4	Disk	ussion	85
5	Zusa	nmenfassung	95
6	Sum	mary	98
7			
1	Lite		100
8	Anh	ang	109
8	8.1	Der Genetische Code	109
8	3.2	Aminosäuren, Abkürzungen und Einbuchstaben-Code	110
8	3.3	Makorin1-Sequenzen	111
8	3.4	Charakterisierung von spezifischen Makorin1-Antiseren	113
9	Vera	iffentlichungen	115
10	Dan	ksagung	116
11	Eide	sstattliche Versicherung	117

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung des dendritischen mRNA-Transportes
	in Neuronen
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der Domänenstruktur
	des cytoplasmatischen PABP8
Abbildung 3: S	Stimulation der cap-abhängigen Translationsinitiation unter Bildung
	einer Ringstruktur der translatierenden mRNA
	("closed loop model of translation")10
Abbildung 4:	Schematische Darstellung des Hefe-Zwei-Hybrid Systems
Abbildung 5:	Schematische Darstellung der menschlichen Makorin1-Proteinstruktur
	und der genomischen Organisation des Makorin1-Gens57
Abbildung 6:	Koimmunpräzipitation von T7-Makorin1-short und Flag-PABP
	mit anti-Flag-Agarose
Abbildung 7:	Schematische Darstellung der PDZ-Pulldown Methode
Abbildung 8:	Schematische Darstellung der möglichen PABP/Makorin1-short
	Interaktionen61
Abbildung 9:	Pulldown von endogenem PABP mit Makorin1-short-PDZ
	durch Bindung der PDZ-Domäne an GKAP-Sepharose62
Abbildung 10:	Koimmunpräzipitation von EGFP-Makorin1-Deletionsproteinen
	und Flag-PABP mit anti-Flag [®] -M2-Agarose64
Abbildung 11:	Koimmunpräzipitation von T7-Makorin1-short und
	Flag-PABP-Deletionskonstrukten mit anti-Flag®-M2-Agarose
Abbildung 12:	Interaktion von PABP und Makorin1-short mit der Vasopressin-RNA 68
Abbildung 13:	Northern Blot Analyse der Makorin1-Expression in verschiedenen
	Rattengeweben
Abbildung 14:	In situ-Hybridisierung zur Analyse der Makorin1-mRNA-Lokalisation
	in den Dendriten der hippocampalen Neuronen70
Abbildung 15:	RT-PCR zur Untersuchung der Expression von Makorin1-short und -long
	im Hippocampus der Ratte71
Abbildung 16:	Nachweis von Makorin1-short im Hippocampus der Ratte durch
	Westernblotanalyse73

Abbildung 17:	Überexpression von Makorin1-short in HeLa-Zellen und in primären
	Hippocampusneuronen74
Abbildung 18:	Expression von T7-Makorin1-short in primären Hippocampusneuronen
	und Kolokalisation mit PABP75
Abbildung 19:	Immuncytochemischer Nachweis von endogen exprimiertem Makorin1
	im Gehirn der Ratte76
Abbildung 20:	Expression von T7-Makorin1-short und -long in HEK293-Zellen und
	Behandlung der Zellen mit dem Proteasominhibitor MG-13278
Abbildung 21:	Fraktionierung von Polysomen aus dem Hippocampus der Ratte
Abbildung 22:	Nachweis von Makorin1-short in Präparationen der postsynaptischen
	Dichte (PSD) aus Rattenhippocampus
Abbildung 23:	Schematische Darstellung der PDZ-Pulldown-Methode zur Identifizierung
	von Makorin1-short-Interaktionspartnern82
Abbildung 24:	Affinitätsaufreinigung von Makorin1-short-interagierenden Proteinen
	mit Makorin1-short-PDZ durch Bindung der PDZ-Domäne
	an GKAP-Sepharose
Abbildung 25:	Sequenzvergleich von DUF- und PAM2-Domänen mit dem PABP-
	interagierenden Motiv von Makorin1-short88
Abbildung 26:	Charakterisierung des Makorin1-short-Antiserums (anti-Makorin1-short)
	aus Kaninchen

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Vektoren	16
Tabelle 2: Auflistung der zur Expression verwendeten Vektor-Konstrukte	17
Tabelle 3: Übersicht über die eingesetzten Oligonukleotide	19
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Primär-Antikörper	21
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Sekundär-Antikörper	22
Tabelle 6: Pipettierschema für die Transfektion mit FuGENE 6 in verschiedenen	
Zellkulturplatten.	44
Tabelle 7: Potenzielle Interaktionspartner von PABP	56
Tabelle 8: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse von	
Makorin1-short-bindenden Proteinen aus HEK293-Zellen	84

Abkürzungsverzeichnis

Ago	Argonaute
Arc	Activity-regulated cytoskeleton-associated protein
Arg3.1	Activity regulated gene 3.1
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin (bovine serum albumin)
α-CaMKII	Ca ^{2+/} Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cap	7-Methylguanosinium-Kappe
cDNA	Komplementäre DNA
Ci	Curie
cpm	Radioaktive Zerfälle pro Minute
cRNA	Komplementäre RNA
DAZL	Deleted in azoospermia-like
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DLS	Dendritische Lokalisierungssequenz
DMEM	Dublecco`s Modifiziertes Egle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTE	dentritic targeting element
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Dinatriummethylendiamintetraacetat
EGFP	enhanced green fluorescent protein
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
EJC	Exon Junction Complex
eRF3	eukaryotic release factor 3
FCS	Fötales Kälberserum
GTP	Guanosin-5`-triphosphat
hnRNP	heterogenous nuclear ribonucleoprotein
HRP	Horseradish Peroxidase
IMP1	Insulin-like growth factor II mRNA binding protein 1
iPABP	inducible Poly(A)-Bindungsprotein
IRES	Internal ribosome entry segment
kb	Kilobasen
kDa	Kilo Dalton
KIF5	Kinesin superfamily protein 5
let-7	lethal-7
MAP2	Mikrotubulus-assoziertes Protein 2

MARTA1 und 2	MAP2-RNA trans-acting proteins
mCRD	major protein-coding-region determinant of instability
Met-tRNA	Methionine transfer RNA
min	Minuten
miRNA	MicroRNA
mM	Millimolar (1 mmol/l)
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
mRNP	messenger ribonucleoprotein
NMD	nonsense-mediated mRNA decay
NTP	Ribonukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
PABP	Poly(A)-Bindungsprotein
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAIP1 und 2	PABP-interacting protein 1 und 2
PAM1 und 2	PABP-interacting motifs 1 und 2
PBs	processing bodies
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PTC	premature translation termination codon
RBP	mRNA binding protein
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
rPABP	Poly(A)-Bindungsproteion der Ratte
RNP	ribonucleoprotein particles
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RRM	RNA-Erkennungssequenz (RNA Recognition Motif)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGs	stress granules
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure
U	Unit
UNR	upstream of N-ras
Upf1	up-frameshift suppressor 1 homolog
upf3	Regulator of nonsense transcripts
UTP	Uridin-5`-triphosphat
3`-UTR	3`untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
VP	Vasopressin

v/v	Volumenanteil pro Volumen
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen (etspr. 1 g/100 ml)
WB	Westernblot
WNVCp	West Nile virus capsid protein
YB-1	Y box factor-1
YTH	yeast two-hybrid
ZBP1	zipcode-Bindungsprotein 1
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

Die Modulation des cytoplasmatischen mRNA-Metabolismus stellt einen wichtigen Aspekt der posttranskriptionellen Kontrolle der Genexpression dar. Die Regulationsmechanismen der cytoplasmatischen mRNAs betreffen die Steuerung ihrer Lokalisation, Stabilität und der Translationseffizienz. Diese Mechanismen sind vor allem in polarisierten Zellen, wie z.B. Nervenzellen, von besonderer Bedeutung, da sie eine räumlich und zeitlich differenzierte Proteinexpression ermöglichen. Eine Nervenzelle - ein Neuron - ist aus Dendriten, also Nervenzellausläufern, dem Zellkörper und einem Axon, einem faserartigen Fortsatz, aufgebaut. Die Axone können sehr lang werden und ermöglichen eine elektrische Erregungsleitung zu Signalzwecken über weite Strecken. Die Dendriten empfangen die Signale anderer Neurone, mit denen sie über Synapsen (Kontakte zwischen Axon und Dendrit) kommunizieren. Die Synapsen zwischen den Nervenzellen unterliegen in Abhängigkeit von ihrer Nutzung einer ständigen Veränderung, es werden neue Synapsen gebildet und bereits vorhandene gehen verloren, ein Prozess, der auch als synaptische Plastizität bekannt ist. Die Lokalisierung bestimmter mRNAs in den Dendriten von Säugerneuronen und die anschließende Proteinsynthese an aktivierten Synapsen ist möglicherweise für die strukturelle Reorganisation und damit für die Gedächtnisbildung verantwortlich. Über den molekularen Mechanismus der Gedächtnisbildung ist bisher nicht sehr viel bekannt. Lange Zeit nahm man an, dass die Proteinsynthese nur im Zellkörper stattfindet und dass bei einem spezifischen Signal Proteine selektiv an bestimmte, markierte Synapsen transportiert werden (Frey und Morris, 1997). Die Entdeckung von Polyribosomen in oder in der Nähe von postsynaptischen, dendritischen Dornenfortsätzen, den sogenannten spines, durch Steward und Lewy im Jahr 1982 sowie der spätere Nachweis von mRNAs in distalen Dendriten kultivierter Neurone (Davis et al., 1987) und in vivo (Garner et al., 1988) änderte diese Sichtweise.

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass tatsächlich einige für wichtige synaptische Proteine kodierende mRNAs in Dendriten lokalisiert sind (Martin und Zukin, 2006). Der Transport der mRNAs und die Kontrolle ihrer Translation und/oder Stabilität sind Prozesse, die über RNA-bindende Proteine eng miteinander verknüpft sind.

Gerichteter Transport von mRNAs

Der gerichtete Transport von definierten mRNA-Spezies gehört generell zu den Mechanismen, die eine asymmetrische Verteilung von Makromolekülen ermöglichen und so die polarisierte Natur von Zellen erzeugen. Der Mechanismus der spezifischen mRNA-Lokalisation ist in Eukaryoten von der Hefe bis zum Säugetier weit verbreitet. Beispielsweise ist im Verlauf entwicklungsbiologischer Vorgänge bei der gut untersuchten Drosophila-Oozyte und den frühen Drosophila-Embryonen die differenzierte Verteilung von etwa zwanzig verschiedenen mRNAs auf die unterschiedlichen subzellullären Bereiche für die korrekte Entwicklung des gesamten Organismus grundlegend. Neben der spezifischen mRNA-Lokalisation während der Entwicklung findet der zielgerichtete mRNA-Transport in einzelne Zellkompartimente auch in ausdifferenzierten Zellen statt, wie z.B. Fibroblasten, Astrozyten, Oligodendrozyten und Neuronen (Übersichtsartikel: Mohr und Richter, 2003a). Der mRNA-Transport in Neuronen und anderen Zelltypen wird durch Proteine vermittelt, die als trans-agierende Faktoren bezeichnet werden und die an definierte Sequenzen innerhalb des Transkriptes (cis-agierende Elemente oder auch "zipcodes" genannt) binden. Nach der Synthese werden mRNAs mit Hilfe von Exportproteinen aus dem Zellkern transportiert, und im Zellsoma können weitere mRNA-Bindeproteine (RBPs) daran assoziieren. Auf diese Weise entstehen große mRNP (messenger ribonucleoprotein)-Komplexe, die wiederum mit Motorproteinen assoziieren können. Der Transport zum Bestimmungsort erfolgt Mikrotubuliabhängig (Brendel et al., 2004; Kanai et al., 2004; Bramham and Wells, 2007). Der Transportmechanismus für spezifische mRNAs in den Dendriten ist bisher nicht endgültig geklärt, es existiert jedoch ein Modell, das aus experimentellen Daten mit unterschiedlichen mRNAs resultiert (Abbildung 1).



Abbildung 1: Schematische Darstellung des dendritischen mRNA-Transportes in Neuronen.

Nach der mRNA-Synthese binden nukleäre RNA-Bindungsproteine (*trans*-agierende Faktoren) an spezifische *cis*-agierende Elemente der mRNA und bewirken deren Transport aus dem Zellkern. Im Zytoplasma binden weitere *trans*-agierende Faktoren an das Transkript. So bilden die mRNA und die daran gebundenen Proteine große mRNP-Komplexe, die mithilfe von Motorproteinen entlang von Mikrotubuli in die Dendriten transportiert werden. Dort kann die mRNA, abhängig von synaptischer Aktivität (Stimulierung), lokal translatiert werden (modifiziert nach Mohr, 1999).

Als erste mRNA konnte die mRNA des Mikrotubuli-assozierten Proteins 2 (MAP2) in Dendriten nachgewiesen werden (Garner *et al.*, 1988). Weitere prominente Beispiele für dendritische mRNA-Lokalisation sind mRNAs, die für die α -Untereinheit der Calcium/Calmodulin-abhängigen Kinase II (CamKII) (Burgin *et al.*, 1990), das aktivitätsregulierte Zytoskelett-assozierte Protein Arc/Arg3.1 (Link *et al.*, 1995), die Shank-Proteine 1-3 (Boeckers *et al.*, 2004), SAPAP3 (Kindler *et al.*, 2004), Dendrin (Herb *et al.*, 1997), Jacob (Kindler *et al.*, 2009) sowie Vasopressin (Mohr *et al.*, 1995; Prakash *et al.*, 1997) kodieren.

Als Motorprotein konnte KIF5 identifiziert werden, das zur Kinesin1-Familie (*conventional kinesin*) gehört und *Cargo*-Moleküle zum Plus-Ende der Mikrotubuli transportiert (Hirokawa

und Takemura, 2005). Im Gegensatz zum Axon und distalen Dendriten liegen in proximalen Dendriten die Mikrotubuli in gemischter Polarität vor, sodass hier KIF5 sowohl antero- als auch retrograden Transport vermitteln könnte (Baas, 1998).

Inzwischen wurde verstanden, dass für den dendritischen Transport spezifische Sequenzen in den dendritisch lokalisierten mRNAs verantwortlich sind (Bramham und Wells, 2007; Kindler *et al.*, 2005). Diese spezifischen Sequenzen oder *cis*-agierenden Elemente befinden sich häufig in der 3`-untranslatierten Region (3`UTR) der transportierten mRNA und werden als *dendritic targeting elements* (DTEs) oder *zipcodes* bezeichnet. Die DTE-Sequenzen variieren erheblich in der Länge und können nur wenige Nukleotide oder auch mehr als 1 kb lange Abschnitte umfassen. Aufgrund dieser Heterogenität wird davon ausgegangen, dass für die Bindung interagierender Faktoren die Sekundärstruktur eine wichtige Rolle spielt (Jambhekar und Derisi, 2007). Der dendritische Transport der MAP2-mRNA wird z.B. durch ein 640 Nukleotide umfassendes DTE in der 3`UTR vermittelt (Blichenberg *et al.*, 1999). Die Proteine MARTA1 und MARTA2 (MAP2-RNA *transacting factor*) binden an dieses *cis*-Element und fungieren als *trans*-agierende Faktoren (Rehbein *et al.*, 2000).

Das gut charakterisierte DTE der β -Aktin-mRNA liegt ebenfalls in der 3`UTR. Diese als *zipcode* bezeichnete Sequenz besteht aus 54 Nukleotiden und wird von dem *trans*-agierenden Faktor ZBP1 (*zipcode binding protein*) gebunden und aktivitätsabhängig in die Dendriten transportiert (Tiruchinapalli *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 1999).

Die CamKIIα-mRNA enthält zwei unterschiedliche DTEs und zwei Kopien des Hexanukleotid-Motivs CPE (*cytoplasmatic polyadenylation element*), welches die dendritische Lokalisation durch die Bindung des Proteins CPEB (*cytoplasmatic polyadenylation element binding*) veranlasst (Huang *et al.*, 2003; Mori *et al.*, 2000; Blichenberg *et al.*, 2001). Eines der DTEs der CamKIIα-mRNA besitzt eine starke Homologie zu dem *cis*-Element der Neurogranin C-mRNA und wird auch als A2RE (hnRNP A2 *response element*) bezeichnet, da an diese Sequenz das Protein hnRNP A2 (*heterogenous nuclear ribonucleoprotein* A2) als *trans*-agierender Faktor bindet. Die mRNA von Arg3.1/Arc weist ebenfalls ein A2RE auf und wird abhängig von diesem Element transportiert (Gao *et al.*, 2008). Der dendritische Transport von mRNAs, die das gleiche *cis*-Element aufweisen, wird vermutlich von einer konservierten Gruppe von mRNA-Bindeproteinen vermittelt. Es gibt jedoch auch RBPs, wie die zwei Säugerhomologen des *Drosophila*-Proteins Staufen, Staufen1 und Staufen2, die in primärsequenzunabhängiger

Weise mit mRNAs interagieren und für den dendritischen Transport von mRNAs benötigt werden (Falley *et al.*, 2009; Kanai *et al.*, 2004; Monshausen *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2001).

Die RBPs bilden nach Bindung an die zu transportierenden mRNAs Ribonukleoprotein-Partikel (RNPs), die auch als mRNA-transport granules bekannt sind. Vermutlich sind mRNPs dynamische Strukturen in ständiger Remodellierung, die Prozesse wie Translationsaktivierung, Translationsinhibition oder mRNA-Abbau regulieren. Es gibt verschiedene RNP-Typen mit unterschiedlicher Protein- und RNA-Zusammensetzung, die bis dato beschrieben worden sind, wie die stress granules (SGs), processing bodies (P-bodies), germ granules und die oben genannten mRNA-transport granules (Übersichtsartikel: Buchan, 2014). Die mRNA-transport granules sind spezifisch für Neurone und können mehrere hundert Mega-Dalton schwer sein. Sie enthalten Teile der Translationsmaschinerie wie Ribosomen und Elongationsfaktoren, was darauf hindeutet, dass nicht nur die mRNA selbst, sondern auch die für die lokale Proteinsynthese nötigen Faktoren transportiert werden (Kanai et al., 2004). Die dendritische Lokalisation von mRNAs benötigt Motorproteine, die die Translokation der RNPs entlang des Zytoskeletts ermöglichen. Kanai et al. (2004) gelang die Identifizierung eines solchen Motorproteins, indem sie zeigten, dass die cargo-bindende Domäne der KIF5-Kinesinfamilie mit großen dendritischen RNP-Komplexen assoziiert, welche die mRNAs für CamKIIa und Arc/Arg3.1 enthielten. Außerdem enthielten diese granules mehr als 30 unterschiedliche Proteine, die mit KIF5 in RNA-unabhängiger Weise assoziieren, darunter die Pur-Proteine (Pur α/β), die Staufen-Proteine (Stau 1 und 2) und die RNA-Helikasen DDX1 (DEAD-Box1), DDX3 und DDX5 sowie FMRP (Fragile X Mental Retardation Protein). Mehrere dieser Proteine sind sogar überwiegend nukleär lokalisiert, was darauf hindeutet, dass die Assemblierung der dendritischen RNP-Partikel bereits im Zellkern beginnt. Diese Proteine sind jedoch auch dendritisch lokalisiert. Viele der trans-agierenden Faktoren, die durch ihre Bindung an die cis-Elemente der mRNAs deren Transport in Form von RNA-granules bewirken, könnten, durch Einbeziehung weiterer dendritisch lokalisierter RBPs, an der Regulation der lokalen mRNA-Translation oder -Stabilität beteiligt sein. Ein Beispiel hierfür ist das cytoplasmatische poly(A)-bindende Protein (PABP, PABP1, PABPC1). PABP bindet an den poly(A)-Schwanz von mRNAs und stimuliert die Initiation der Translation. Es bindet aber auch an DLS (dendritic localizer sequence) von mRNAs und könnte somit am mRNA-Transport beteiligt sein. Eine Ziel-mRNA ist die VasopressinmRNA (VP-mRNA). Die DLS der VP-mRNA umfasst die letzten 395 Nukleotide der mRNA und besteht aus einem Teil der kodierenden Sequenzen sowie der gesamten 3°UTR (Mohr et *al.*, 2001, Prakasch *et al.*, 1997). Die Lokalisation der VP-mRNA ist also nicht auf den Zellkörper von Nervenzellen beschränkt, sondern ist diese auch in den Axonen und den proximalen und distalen Abschnitten der Dendriten zu finden (Mohr *et al.*, 1995; Prakash *et al.* 1997).

VP gehört zu einer großen Familie von Peptidhormonen. Seine Synthese erfolgt in Form eines Polyprotein-Vorläuferproteins, dessen Gen in magnocellulären Neuronen des hypothalamisch-neurohypophysären Systems (SON, supraoptic nucleus; PVN, paraventricular nucleus) exprimiert wird. Die Freisetzung des biologisch aktiven Hormons erfolgt nach bestimmten physiologischen Reizen nicht nur vom axonalen Kompartiment in den peripheren Blutkreislauf, sondern auch aus den Dendriten der Neurone in das zentrale Nervensystem (Morris et al., 1993). In peripheren Geweben übt VP verschiedene endokrine Funktionen aus. Als antidiuretisches Hormon stimuliert VP die Rückresorption von Wasser in den distalen Tubuli der Niere, und es regt die Glycogenolyse in der Leber an. VP bewirkt zudem die Blutdruckerhöhung durch das Auslösen der Kontraktion der arteriellen Gefäßmuskulatur (Mohr und Richter, 1994; Birnbaumer, 2000). Das zentralnervös sezernierte VP besitzt eine wichtige Funktion bei der Feinregulation der sekretorischen Aktivität magnocellulärer Neurone. Präsynaptisch reguliert VP die Erregbarkeit afferenter Neurone, und postsynaptisch ist es an der Regulation der Sekretionsrate vasopressinerger Neurone beteiligt (Übersichtsartikel: Ludwig und Pittman, 2003).

Experimentelle Befunde belegen, dass die axonalen und die dendritischen Transkripte unterschiedliche physiologische Bedeutungen besitzen. Während reife magnocelluläre Neurone vermutlich keine Proteinsynthesemaschinerie im Axon aufweisen und die Funktion axonal lokalisierter VP-Transkripte bis heute unklar ist, sind Dendriten zur lokalen Proteinbiosynthese befähigt (Übersichtsartikel: Mohr und Richter, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass dendritisch lokalisierte VP-mRNA lokal translatiert wird (Mohr & Richter, 2003b). Aufgrund zahlreicher experimenteller Hinweise wird angenommen, dass die Translation dendritischer mRNAs nicht konstitutiv erfolgt, sondern in Abhängigkeit von synaptischer Aktivität reguliert wird. Diese Translationskontrolle erfolgt mittels komplexer Protein-RNA-Wechselwirkungen (Bramham und Wells, 2007).

PABP als trans-agierender Faktor bei dem Transport dendritischer mRNAs

Mithilfe von UV-Quervernetzungsanalysen wurde PABP als spezifischer trans-agierender Faktor der VP-mRNA identifiziert. Es wurde zunächst als VP-RBP (VP-RNA-binding protein) bezeichnet. Erst mittels biochemischer Aufreinigungs- und Sequenzierungsmethoden konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um das cytoplasmatische PABP handelt (Mohr et al., 2001). Das PABP bindet an poly(A)- und nicht-poly (A)-Sequenzen und ist an einer Vielzahl von Funktionen beteiligt. PABP kommt nur in Eukaryoten vor, und es existieren verschiedene Proteinvarianten, deren Vorkommen von Organismus zu Organismus unterschiedlich ist. Beispielsweise kodieren die Gene der Metazoen für multiple cytoplasmatische PABPs. Die Gene der Vertebraten kodieren für sechs und die der Arabidopsis für mehr als acht verschiedene PABPs. Es gibt sieben humane PABPs, die folgendermaßen zusammengefasst werden können: cytoplasmatische PABP (PABPC1, PABPC3, PABPC4, auch als iPABP = *inducible* PABP bezeichnet, PABPC4L), embryonale PABP (ePABP, PABPC1L), nukleäres PABP (PABPN1), und das X-chromosomal kodierte Protein PABPC5. Säugetierspezifisch sind PABPC3 (auch tPABP, testis-specific PABP, genannt) und das PABPC5. Die derzeitigen Daten deuten auf eine ubiquitäre Expresssion von PABP1 und PABP4, während die anderen PABP-Familienmitglieder eher gewebespezifisch exprimiert werden (Gorgoni et al., 2004; Brook et al., 2009, Eliseeva et al., 2013). Im Folgenden wird über das cytoplasmatische PABP berichtet.

PABP besteht N-terminal aus vier nicht-identischen RNA-Bindungsdomänen vom Typ RRM (*RNA-recognition motif*) sowie C-terminal aus einer prolinreichen Region und einer strukturierten C-terminalen Domäne (PABC oder MLLE genannt) (schematisch dargestellt in Abbildung 2). Die sogenannte MLLE-Domäne, die nur in PABPs vorkommt, ist nach ihrem hochkonservierten Aminosäuremotiv Met-Leu-Leu-Glu benannt und ist mit den RRMs durch einen ungeordneten Pro/Met-reichen *Linker* verbunden. Die RRMs unterscheiden sich in ihrer Spezifität, RNA- und Protein-Interaktionen einzugehen. Die C-terminale Region bindet keine RNA, ist aber für die PABP/PABP-Interaktion erforderlich. Da PABP an dem poly(A)-Schwanz von mRNAs bindet, führt die PABP/PABP-Interaktion zu einer geordneten Oligomerisation der PABP-Moleküle an den poly(A)-Sequenzen und wirkt so stabilisierend. Hierfür ist der Pro/Met-reiche *Linker* verantwortlich. Die MLLE-Domäne ist für die Interaktion von PABP mit anderen Proteinen, die ein PAM2 (*PABP interacting motif 2*)-Motiv enthalten, zuständig (Übersichtsartikel: Eliseeva *et al.*, 2013).



Abbildung 2: Schematische Darstellung der Domänenstruktur des cytoplasmatischen PABP.

Das PABP enthält N-terminal vier RNA-Bindungsdomänen (RRM) und C-terminal eine prolinreiche Region sowie eine strukturierte C-terminale Domäne, die PABC- oder MLLE-Domäne genannt wird. Die MLLE-Domäne ist für die Interaktion von PABP mit anderen Proteinen verantwortlich, aber auch die RRM-Domänen können Proteininteraktionen eingehen.

Weitere Funktionen von PABP

Das PABP spielt eine wichtige Rolle bei vielen zellulären Vorgängen wie der Translation, dem mRNA-Abbau und dem nukleären Export. PABP bindet mit hoher Affinität an den poly(A)-Schwanz von mRNA-Molekülen. Generell ist diese Interaktion für die effiziente Initiation der Translation sowie für eine Stabilisierung der Transkripte erforderlich (Kahvejian *et al.*, 2005). Die eukaryotische Translation läuft in drei Schritten ab: Initiation, Elongation und Termination. In allen drei Phasen spielen regulatorische Mechanismen eine wesentliche Rolle. Der Schritt der Initiation ermöglicht die effektivste Kontrolle der Translation und unterliegt daher einer komplexen Regulation (Hinnebusch, 2014; Mead *et al.*, 2014; Merrick und Harris, 2014).

Eukaryotische mRNAs verfügen neben der kodierenden Sequenz über nichtkodierende Bereiche, mit einer *cap*-Struktur (7-Methylguanosin-*cap*, m7GpppN) am 5'-Ende und einer poly(A)-Sequenz am 3'-Ende. Zwischen der *cap*-Struktur und dem Translationsstart befindet sich die 5`-untranslatierte Region (5`-UTR), zwischen dem Stoppkodon und dem poly-A-Schwanz die 3'-UTR. Es werden zwei Arten der Translationsinitiation unterschieden: Die klassische 5'*cap*-abhängige Initiation und die Initiation über sogenannte IRES (*internal ribosome entry site*)-Elemente, die *cap*-unabhängig erfolgt und zuerst in Viren beschrieben wurde (Pelletier und Sonenberg, 1988).

Die *cap*-abhängige Initiation erfolgt in mehreren mRNA-unabhängigen und -abhängigen Schritten, an denen eukaryotische Initiationsfaktoren (eIFs) beteiligt sind. Unabhängig von der mRNA bildet sich der ternäre eIF2-GTP-Met-tRNA-Komplex. Zusammen mit den Faktoren eIF1, 1A, 3 und 5 sowie der gebundenen 40S-Ribosomenuntereinheit bildet der eIF2-Komplex den sogenannten 43S-Prä-Initiationskomplex. Dieser Komplex wird an das 5'- Ende der mRNA mit Hilfe des eIF4F-Komplexes rekrutiert. Der eIF4F-Komplex besteht aus dem cap-bindenden Protein eIF4E, dem Adapterprotein eIF4G (bindet eIF3) und der RNAabängigen Helikase eIF4A. eIF4A ist eine ATP-abhängige Helikase und kann, stimuliert durch eIF4B, Sekundärstrukturen in der cap-nahen Region der mRNA auflösen. Der Komplex bewegt sich in 5'-3'-Richtung entlang der mRNA, bis ein Startkodon in einem geeigneten Kontex erkannt wird. Die Erkennung des Startkodons löst die Hydrolyse von eIF2-GTP und die Positionierung der Met-tRNA an die P-Position des Ribosoms aus. Nach GTP-Hydrolyse und Dissoziation der Faktoren bindet eIF5B-GTP und rekrutiert die 60S-Ribosomenuntereinheit an den Met-tRNA-mRNA-Komplex (Kapp und Lorsch, 2004).

Die Initiation der Translation wird durch an poly(A)-Schwanz gebundenes PABP stimuliert. Hierbei interagiert PABP über die RRMs 1+2 mit dem N-Terminus von eIF4G und bewirkt eine Zirkularisierung der mRNA (*closed-loop model*), die ein effizienteres Ablesen durch die Ribosomen ermöglicht (Abbildung 3A) (Gallie, 1991; Wells *et al.*, 1998; Imataka *et al.*, 1998). Durch diese Interaktion werden die Bindungen von eIF4G an mRNA (Pestova *et al.*, 2007; Yanagiya *et al.*, 2009), von eIF4E an die *cap*-Struktur und von PABP an den poly(A)-Schwanz verstärkt (Mangus *et al.*, 2003; Gorgoni und Gray, 2004). PABP interagiert außerdem mit eIF4B und PAIP-1 (PABP-*interacting protein 1*), was zur Steigerung der eIF4A-Helikaseaktivität führen kann. PAIP-1 ist ein Protein mit einer Ähnlichkeit zum mittleren Drittel von eIF4G und interagiert mit eIF4A. PAIP-1 kann somit als Coaktivator für die *cap*-abhängige Translation fungieren (Craig *et al.*, 1998; Martineau *et al.*, 2008). Hierbei interagiert PAIP-1 mit PABP durch seine zwei PAM-Motive. PAM1 bindet an den N-Terminus von PABP (RRM1 und -2), während PAM2 an die MLLE-Domäne von PABP assoziiert (Abbildung 3B).

Die enge Assoziation zwischen dem 5⁻ und dem 3⁻Ende der mRNA befähigt die Ribosomen eventuell zu einer Reinitiierung der Translation auf der gleichen mRNA (*Recycling*) im Anschluss an die Termination. Die Interaktion zwischen dem C-Terminus von PABP und dem N-Terminus des Terminationsfaktors eRF3 ist in diesem Zusammenhang ebenfalls von Bedeutung (Abbildung 3C) (Uchida *et al.*, 2002).



Abbildung 3: Stimulation der *cap*-abhängigen Translationsinitiation unter Bildung einer Ringstruktur der translatierten mRNA ("*closed loop model of translation*").

Die eukaryotische mRNA besitzt am 5`-Ende eine 7-Methylguanosinium-Kappe (*cap*) und einen poly(A)-Schwanz am 3`-Ende. Das Protein eIF4E bindet an die *cap*-Struktur am 5`-Ende. Die ATP-abhängige Helikase eIF4A (im Bild als 4A bezeichnet) entfernt Sekundärstrukturen in der *cap*-nahen Region der mRNA. Das Protein eIF4G fungiert als Adapterprotein zwischen eIF4E und eIF4A. Zusammen bilden die Proteine eIF4E, eIF4A und eIF4G den eIF4F-Komplex. **A**) Das an den poly(A)-Schwanz gebundene PABP interagiert mit eIF4G und erhöht die Affinität von eIF4E für die *cap*-Struktur, was zur Steigerung der Translationseffizienz führt. **B**) Die Interaktion von PABP mit PAIP-1 stimuliert die Initiation der Translation durch Steigerung der eIF4A-Helikaseaktivität. **C**) Die Bildung der mRNA-Ringstruktur erleichtert nicht nur die Translationsinitiation, sondern auch das Ribosomen-*Recycling*. Hierbei ist die Interaktion von PABP mit dem Terminationsfaktor eRF3 wichtig (modifiziert nach Eliseeva *et al.*, 2013).

PABP ist jedoch auch mit nicht-poly(A)-Sequenzen in den unterschiedlichsten Regionen verschiedener mRNAs assoziiert, z.B. mit der DLS der VP-mRNA. Als Teil größerer Proteinkomplexe ist es an der Kontrolle der Translation (positiv und negativ, also

translationsfördernd bzw. translationsinhibierend) beteiligt. Durch die Bindung an interne Areiche Regionen in der 3`UTR von mRNAs bewirkt PABP eine Steigerung der Translation wie bei der im Retikulozytenlysat aus Kaninchen enthaltenen YB (Y box factor)-1-mRNA beschrieben wurde (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 kann ebenso durch direkte Potein-Protein-Interaktionen mit spezifischen RNAbindenden Proteinen zur 3`UTR rekrutiert werden. Durch die Interaktion mit Mitgliedern der DAZL (deleted in azoospermia-like)-Proteinfamilie kann PABP die Translation in Keimzellen aktivieren (Collier et al., 2005). In manchen Fällen bewirkt die Interaktion von PABP mit 3`UTR-assozierten Proteinen eine Translationsinhibierung, wie beispielsweise bei den mRNAs von numb, c-mos, doublecortin, p21^{WAF1} und Adenomatous Polyposis Coli. Diese mRNAs enthalten das cis-Element für das Protein Musashi 1 (Msi1), dessen Interaktion mit PABP letztlich seine Bindung an eIF4G verhindert, und es folgt eine Inhibition der Translation. Die Bindung von Msi1 an PABP, welche ausschließlich in Neuronen beobachtet wurde, ist RNA-unabhängig, was auf eine direkte Wechselwirkung dieser Proteine schließen lässt (Kawahara et al., 2008; Ohyama et al., 2011).

PABP ist auch an der Translationsinhibition der eigenen mRNA beteiligt. Bei hohen PABP-Niveaus in der Zelle inhibiert PABP durch die Bindung an ein Adenin-reiches Element (ARS: *adenine-rich autoregulatory sequences*) in der 5`-UTR der PABP-mRNA die eigene Synthese. Hierbei wird die Interaktion der ribosomalen 60S-Untereinheit mit dem Prä-Initiationskomplex verhindert (Patel *et al.*, 2005).

Darüber hinaus spielt PABP beim mRNA-Umsatz und bei der mRNA-Stabilität eine Rolle. Durch Bindung an dem poly(A)-Schwanz schützt PABP diesen vor dem Abbau durch Deadenylasen und blockiert das *decapping* (Ford *et al.*, 1999; Wilusz *et al.*, 2001a). 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 kodierenden Region der mRNA bindet (Grosset *et al.*, 2000). Dieser Proteinkomplex, der zusätzlich zu PABP auch UNR (*upstream of N-ras*), Paip1, hnRNPD (*heterogenous nuclear ribonucleoprotein D*) und hnRNPQ (*heterogenous nuclear ribonucleoprotein Q*) enthält, rekrutiert spezifische Deadenylasen an die c-FosmRNA. PABP mRNA-spezifische Funktionen hat zudem bei der Regulation der translationsabhängigen Stabilität verschiedener mRNAs. So wurde gezeigt, dass PABP an der Regulation der microRNA (miRNA)-abhängigen mRNA-Deadenylierung beteiligt ist (Fabian et al., 2009). miRNAs sind kurze Einzelstrang-RNAs, die etwa 18-25 Nukleotide lang sind. Sie vermitteln die Bindung von RISC (RNA-induced silencing complex) an solche mRNAs, die komplementäre target-Sequenzen zur miRNAs in der 3'UTR besitzen. Die Interaktion zwischen der miRNA und der Ziel-mRNA muss nicht komplett komplementär sein, dazu sind 2-7 Nukleotide der miRNA ausreichend. Neben der microRNA enthält miRISC (miRNA- und RISC-haltiger RNA-Protein-Komplex) auch Argonauten (Ago)-Proteine, die entweder die Translationsinhibierung einer mRNA oder aber deren Degradation durch einen Mechanismus, der noch nicht ganz verstanden ist, bewirken. Manche Studien weisen darauf hin, dass die miRNAs die mRNA-Translation während des Initiationsschrittes beeinflussen, während andere Studien eine Repression der Translation durch die miRNA-Maschinerie bei späteren Schritten, nach der Initiation vermuten lassen (Filipowicz et al., 2008). Zusätzlich zu den Ago-Proteinen spielen die GW182-Proteine eine Schlüsselrolle in der miRNA-abhängigen Repression. Die direkte Interaktion von GW182 mit Ago-Proteinen ist essentiell für die miRNA-abhängige Translationsrepression und den mRNA-Abbau (Eulalio et al., 2008). PABP interagiert direkt mit der C-terminalen Region von GW182 und reguliert die Stabilität von let-7 miRNA-gebundenden mRNAs. Diese Interaktion wird für die miRNA-abhängige Deadenylierung benötigt (Fabian et al., 2009). Fabian et al. vermuten, dass durch die Bindung von miRISC an die target-mRNA in der 3`UTR und die darauffolgende Bindung von GW182 an PABP die Interaktion von PABP und elF4G verhindert wird, weshalb es nicht zur mRNA-Zirkularisierung (closed-loop-Bildung) kommt. Dies führt zu einer Repression der Translation. Es folgt eine Deadenvlierung, die durch Rekrutierung von Deadenvlasen durch GW182 herbeigeführt wird.

Durch die Interaktion mit dem Terminationsfaktor eRF3 spielt PABP nicht nur bei der Regulation der effizienten Translation, sondern auch bei der Regulation der mRNA-Stabilität eine wichtige Rolle. Die Interaktion von PABP mit eRF3 reduziert die Anzahl der PABP-Moleküle, die an den poly(A)-Schwanz binden (Hoshino *et al.*, 1999). Jede Translationsrunde führt so zur Verkürzung des ungeschützten poly(A)-Schwanzes. Wird der poly(A)-Schwanz auf 10-15 Nukleotide verkürzt, setzt der zelluläre Mechanismus des mRNA-Abbaus ein (Magnus *et al.*, 2003). Die PABP-eRF3-Interaktion könnte auch bei der Regulation und dem Auslösen des als NMD (*nonsense-mediated mRNA decay*) bezeichneten mRNA-Abbaus eine wichtige Rolle spielen. Der NMD ist ein Mechanismus, der zum schnellen Abbau von mRNAs mit vorzeitigen Stoppcodons führt. Solche Stoppcodons, sogenannte PTCs (*premature translation termination codons*), gelangen durch Mutationen oder Spleißfehler in das offene Leseraster von Transkripten. Die Schlüsselproteine des NMD sind Upf1 (*up-frameshift suppressor 1 homolog*) und der *Exon Junction Complex* (EJC). Es wurde gezeigt, dass PABP mit Upf11 um die Bindung an eRF3 (*eukaryotic polypeptide chain release factor 3*) kompetitiert. Eine Überexpression von PABP führt zu einer erhöhten Kompetition, was eine Verminderung des NMD-abhängigen mRNA-Abbaus zur Folge hat (Singh *et al.*, 2008). Außerdem zeigen Studien, dass PABP abhängig von seiner relativen Positionierung zum Translations-Terminations-Komplex die Initiation des NMD inhibieren kann (Silva *et al.*, 2008; Ivanov *et al.*, 2008,).

Zielsetzung dieser Arbeit

Wie in der Einleitung beschrieben, ist PABP als *trans*-agierender Faktor beim dendritischen VP-mRNA-Metabolismus beteiligt und es interagiert darüber hinaus mit zahlreichen Proteinen, sodass es diverse Aspekte der Proteinbiosynthese und des mRNA-Umsatzes/Metabolismus steuert.

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von neuen PABP-Interaktionspartnern, die eine Rolle bei der dendritischen Lokalisierung und/oder Translation der Vasopressin-mRNA oder auch anderer dendritisch lokalisierter mRNAs spielen könnten. Zu diesem Zweck wurde unter Verwendung des Hefe-Zwei-Hybrid-System (YTH, *yeast two-hybrid*) das PABP als Köderprotein für Beuteproteine eingesetzt, die von einer neuronalen humanen cDNA-Bibliothek kodiert wurden. Mit Hilfe dieser Technik konnten sieben potenzielle PABP-Interaktionspartner identifiziert werden. In dieser Arbeit wurde das Augenmerk auf die Interaktion von PABP mit Makorin1-short, einer C-terminal verkürzten Isoform des Proteins Makorin1, gelegt. Diese Interaktion wurde mit Hilfe weiterer Methoden im Zellkultursytem sowie im Rattenhirn untersucht. Zudem wurde die Lokalisation des Makorin1-short in Nervenzellen sowie im Gehirn der Ratte charakterisiert, um so ein besseres Verständnis von der Funktion dieses Proteins zu bekommen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Standardchemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anderes vermekt, von den Firmen Merck, Sigma oder Roth in p.A. Qualität bezogen.

2.1.2 Längenstandards

<u>Längenstandard</u>

<u>Hersteller</u>

DNA:	ΦX174 RF-DNA/HaeIII-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
Protein:	Full Range-Rainbow	AmershamBiosciences
	Molecular Weight Marker	
	Protein ladder	Gibco BRL

2.1.3 Enzyme

<u>Enzym</u>	<u>Hersteller</u>
Restriktionsendonukleasen:	Fermentas, New England Biolabs, Invitrogen Life Technologies, MBI
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Stratagene
Proof Start DNA-Polymerase	Qiagen

Ribonuklease A (RNase A)	Boehringer Mannheim
Ribonuklease-Inhibitor (RNase-Inhhibitor)	Gibco BRL
SP6 RNA-Polymerase	Gibco BRL
T3 RNA-Polymerase	Gibco BRL
T7 RNA-Polymerase	Gibco BRL
T4-DNA Ligase	Invitrogen
CIP-Phosphatase	New England Biolabs
Trypsin	Invitrogen

2.1.4 Biologisches Material (Bakterienstämme, Hefestämme, Zelllinien)

<u>Bakterienstämme</u>	
E. coli TOP F 10	Invitrogen
E. <i>coli</i> DH5 TM kompetente Zellen	Gibco BRL
E. coli BL21DE3	Stratagene
E. coli XL-Blue	Stratagene
<u>Hefestämme</u>	
S. cerevisiae AH109	BD Clontech
S. cerevisiae Y187	BD Clontech
<u>Zelllinien</u>	
HEK293 (Human Embryonic Kidney)	ATCC
COS7	ATCC
NIH-3T3	Jainchill (1969), Aronsen and
	Todaro (1968), Copeland et al.
	(1979)
RatI	Topp (1981)

HeLa

DSMZ, Acc 57

2.1.5 Vektoren

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Vektoren

Vektor	Herkunft	Beschreibung
pcDNA3.1 T7-Ntag	Roth et al. 1997	Expression von Fusionsproteinen mit dem N-
		terminalen T7-Peptid-Tag (MASMTGGDDMG) in
		eukaryotischen Zellen
pcDNA3.1 mycHis A	Invitrogen	Expression von Fusionsproteinen mit dem C-terminalen
		Polyhistidin- und myc-Peptid-Tag (EQKLISEEDL) in
		eukaryotischen Zellen
pcDNA6 mycHis B und C	Invitrogen	Expression von Fusionsproteinen mit dem N-
		terminalen Polyhistidin- und myc-Peptid-Tag
		(EQKLISEEDL) in eukaryotischen Zellen
pEGFP-N1	Clontech	Expression von Fusionsproteinen mit dem C-terminalen
		Grün-fluoreszierenden Protein (EGFP, enhanced green
		fluorescent protein) in eukaryotischen Zellen
pEGFP-C1	Clontech	Expression von Fusionsproteinen mit dem N-
		terminalen Grün-fluoreszierenden Protein EGFP in
		eukaryotischen Zellen
pPDZ-N1	Zur Verfügung gestellt	Bei diesem Vektor handelt es sich um den pEGFP-N1-
	von Dr. Stefan Kindler,	Vektor, aus dem die Sequenz für EGFP mit BamH I
	UKE, Hamburg	und Not I entfernt wurde und an dieser Stelle die
		Sequenz für die PDZ-Domäne von SSTRIP
		(somatostatin receptor interacting protein) reinkloniert
		wurde
pCMV-2B	Stratagene	Expression von Fusionsproteinen mit dem N-
		terminalen Flag-tag in eukaryotischen Zellen
pGEX-6P2	Amersham	Expression von Fusionsproteinen mit dem N-
	Bioscience	terminalen GST-Protein (Glutathion-S-Thransferase) in
		prokaryotischen Zellen
pGBKT7	Clontech	Köder-Plasmid im Hefe Zwei-Hybrid-System mit
		GAL4 DNA-Bindungsdomäne
pACT2	Clontech	Bilbliotheksplasmid im Hefe Zwei-Hybrid-System mit
		GAL4 Aktivierungsdomäne

2.1.6 Vektor-Konstrukte

Tabelle 2: Auflistung der zur Expression verwendeten Vektor-Konstrukte.

h, *human*; r, *rat*; nt, Nukleotid-Rest; M1, Makorin1; PABP, *poly(A)-binding protein*; EGFP, *enhanced green fluorescent protein*; PCR, *polymerase chain reaction*

Bezeichnung	Protein	Beschreibung
	Sequenzbereich	
	GenBank accession no.	
pcDNA31T7-Ntag/M1-	hMakorin1-short	Mit den Primern 376 und 382 wurde die gesamte
short	nt 7 1450	codierende Region und ein Teil der 3'UTR über PCR
SHOT	AM226049	emplifiziert und über die Destriktionsschrittstellen
	AM230048	
		EcoRI/NotI in den Vektor inseriert
pcDNA3.1 T7-Ntag/	hMakorin1-long	Mit den Primen 376 und 377 wurde die codierende
M1-long	nt 159-1604	Region nach einer Reversen Transkription von
	NM013446	HEK293-Zell-RNA über PCR amplifiziert und über
		die Restriktionsschnittstellen EcoR I/Not I in den
		Vektor inseriert
pcDNA3.1 mycHis A/	hMakorin1-short	Mit den Primern 387 und 386 wurde ein Teil der
M1-short-K1	nt 260-993	codierenden Region über PCR amplifiziert und über
	AM236048	die Restriktionsschnittstellen EcoR I/Not I in den
		Vektor inseriert
pcDNA3.1 mycHis A/	hMakorin1-short	Mit den Primern 388 und 386 wurde ein Teil der
M1-short-K2	nt 340-993	codierenden Region über PCR amplifiziert und über
	AM236048	die Restriktionsschnittstellen EcoR I/Not I in den
		Vektor inseriert
pcDNA3.1 mycHis A/	hMakorin1-short	Mit den Primern 389 und 386 wurde ein Teil der
M1-short-K3	nt 712-993	codierenden Region über PCR amplifiziert und über
	AM236048	die Restriktionsschnittstellen EcoR I/Not I in den
		Vektor inseriert
pcDNA3.1 mycHis A/	hMakorin1-short	Mit den Primern 376 und 390 wurde ein Teil der
M1-short-K4	nt 7-726	codierenden Region über PCR amplifiziert und über
	AM236048	die Restriktionsschnittstellen EcoR I/Not I in den
		Vektor inseriert
pcDNA3.1 mycHis A/	hMakorin1-short	Mit den Primern 376 und 396 wurde ein Teil der
M1-short-K5	nt 7-261	codierenden Region über PCR amplifiziert und über
	AM236048	die Restriktionsschnittstellen EcoR I/Not I in den
		Vektor inseriert

Bezeichnung	Protein	Beschreibung
	Sequenzbereich	
	GenBank accession no.	
pcDNA3.1 mycHis A/	hMakorin1-short	Mit den Primern 376 und 395 wurde ein Teil der
M1-short-K6	nt 7-339	codierenden Region über PCR amplifiziert und über
	AM236048	die Restriktionsschnittstellen EcoR I/Not I in den
		Vektor inseriert
pcDNA6 mycHis B/	hMakorin1-short	Aus dem Plasmid pEGFP-C1/M1-short wurde die
M1-short	nt 7-993	gesamte codierende Sequenz mit Xho I und Sac II
	AM236048	rausgeschnitten und in den korrespondierenden
		Restriktionsschnittstellen des Vektors kloniert
pcDNA6 mycHis C/	hMakorin1-long	Aus dem Plasmid pcDNA3-T7-Ntag/M1-long wurde
M1-long	nt 159-1604	die gesamte codierende Region mit EcoR I und Not I
	NM013446	rausgeschnitten und in den korrespondierenden
		Restriktionsschnittstellen des Vektors kloniert
pEGFP-N1/PABP	rPABP	Mit den Primern 383 und 383a wurde die gesamte
	nt 203-2107	codierende Region über PCR amplifiziert und über
	AJ298278	die Restriktionsschnittstellen Xho I/BamH I in den
		Vektor inseriert
pEGFP-C1/M1-short	hMakorin1-short	Mit den Primern 391 und 385 wurde die gesamte
	nt 7-993	codierende Region über PCR amplifiziert und über
	AM236048	die Restriktionsschnittstellen Xho I/EcoR I in den
		Vektor inseriert
pEGFP-C1/	hMakorin1-short	Mit den Primern 391 und 397 wurde ein Teil der
M1-short-F1	nt 7-726	codierenden Region über PCR amplifiziert und über
	AM236048	die Restriktionsschnittstellen Xho I/EcoR I in den
		Vektor inseriert
pEGFP-C1/	hMakorin1-short	Mit den Primern 392 und 385 wurde ein Teil der
M1-short-F2	nt 260-993	codierenden Region über PCR amplifiziert und über
	AM236048	die Restriktionsschnittstellen Xho I/EcoR I in den
		Vektor inseriert
pEGFP-C1/	hMakorin1-short	Mit den Primern 393 und 385, Xho I/EcoR I wurde
M1-short-F3	nt 340-993	ein Teil der codierenden Region über PCR
	AM236048	amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen
		Xho I/EcoR I in den Vektor inseriert
pEGFP-C1/	hMakorin1-short	Mit den Primern 394 und 385 wurde ein Teil der
M1-short-F4	nt 712-993	codierenden Region über PCR amplifiziert und über
	AM236048	die Restriktionsschnittstellen Xho I/EcoR I in den
		Vektor inseriert
	1	l

Bezeichnung	Protein	Beschreibung
	Sequenzbereich	
	GenBank accession no.	
pPDZ-N1/PABP	rPABP	Mit den Primern 383 und 383a wurde die gesamte
	nt 200-2107	codierende Region über PCR amplifiziert und über
	AJ298278	die Restriktionsschnittstellen Xho I/BamH1 in den
		Vektor inseriert. Genbank accession no. AJ298278
pPDZ-N1/M1-short	hMakorin1-short	Mit den Primern 384 und 385 wurde die gesamte
	nt 7-1450	codierende Sequenz und ein Teil der 3'UTR über
	AM236048	PCR amplifiziert und über die
		Restriktionsschnittstellen Xho I/EcoR I in den
		Vektor inseriert
pGEX-6P2/M1-short	hMakorin1-short	Aus dem Plasmid pcDNA3-T7-Ntag/M1-sh wurde
	nt 7-1450	die codierende Region und ein Teil der 3'UTR mit
	AM236048	EcoR I/Not I rausgeschnitten und in den
		korrespondierenden Restriktionsschnittstellen des
		Vektors kloniert
pGBKT7/PABP	rPABP	Mit den Primern 367 und 368 wurde die gesamte
	nt 203-2107	codierende Region über PCR amplifiziert und über
	AJ298278	die Restriktionsschnittstellen EcoR I/BamH I in den
		Vektor inseriert.

2.1.7 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von dem Service-Labor des Instituts für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie (IZKN, Universitäts-Krankenhaus Eppendorf, UKE) hergestellt.

Tabelle 3: Übersicht über die eingesetzten Oligonukleotide

Bezeichnung und	Sequenz $(5' \rightarrow 3')$	Schnittstelle
Länge	Protein, (Nukleotid-Rest), GenBank accession number	
367	GCATGAATTCAACCCCAGCGCCCCCAGC	EcoR I
(28-mer)	rPABP, (203-221), AJ298278	
368	GCATGGATCCGACAGTAGGAACACCAGTG	BamH I
(29-mer)	rPABP, (2107-2089), AJ298278	
371	GCATGAATTCATGAACCCCAGCGCCCCAG	EcoR I
(30-mer)	rPABP, (200-219), AJ298278	

Restriktionsschnittstellen sind fett markiert; r, rat; h, human; PABP, poly(A)-binding protein

Bezeichnung und	Sequenz $(5' \rightarrow 3')$	Schnittstelle
Länge	Protein, (Nukleotid-Rest), GenBank accession number	
371a	GCAT GAATTC ACCATGGCGAACCCCAGCGCCCCAG	EcoR I
(36-mer)	rPABP, (200-Ala-219), AJ298278	
376	GCAT GAATTC TGATGGCGGAGGCTGCAACTCCC	EcoR I
(33-mer)	hMakorin1-long, (159-179), NM013446	
377	GCAT GCGGCCGC TAGATCCAAGTCATAAAAATC	Not I
(33-mer)	hMakorin1-long, (1604-1584), NM013446	
382	GCATGCGGCCGCTCGTTTAAATAAATTTATTTCTTGTAGC	Not I
(40-mer)	hMakorin1-short, (1450-1423), AM236048	
383	GCATCTCGAGACCATGGCGAACCCCAGCGCCCCAG	Xho I
(36-mer)	rPABP, (203-219), AM236048	
383a	GCAT GGATCC TCGACAGTTGGAACACCAGTG	BamH I
(31-mer)	rPABP, (2107-2087), AM236048	
384	GCATCTCGAGACCATGGCGGAGGCTGCAACTCCC	Xho I
(34-mer)	hMakorin1-short, (7-27), AM236048	
385	GCAT GAATTC TCTTTATGATCTTGCTCTCAAATTG	EcoR I
(35-mer)	hMakorin1-short, (1450-1423), AM236048	
386	GCATGCGGCCGCTCCTTTATGATCTTGCTCTCAAATTG	Not I
(38-mer)	rMakorin1-short (993-970), BC079407	
387	GCAT GAATTC ACCATGGCGTATAGTGTAGTGTGCAAG	EcoR I
(37-mer)	hMakorin1-short, (260-279), AM236048	
388	GCAT GAATTC ACCATGGCGTTGAAACAGGAAGCAAC	EcoR I
(36-mer)	hMakorin1-short, (340-352), AM236048	
389	GCAT GAATTC ACCATGGCGTGTGACATGTGTGGGCTG	EcoR I
(37-mer)	hMakorin1-short (712-729), AM236048	
390	GCATGCGGCCGCTCCCCACACATGTCACAAGAATC	Not I
(35-mer)	hMakorin1-short, (726-706), AM236048	
391	GCATCTCGAGCGACCATGGCGGAGGCTGCAACTCCC	Xho I
(36-mer)	hMakorin1-short, (7-27), AM236048	
392	GCATCTCGAGCGACCATGGCGTATAGTGTAGTGTGC	Xho I
(36-mer)	hMakorin1-short, (260-276), AM236048	
393	GCATCTCGAGCGACCATGGCGTTGAAACAGGAAGCAAC	Xho I
(38-mer)	hMakorin1-short, (340-359), AM236048	
394	GCATCTCGAGCGACCATGGCGTGTGACATGTGTGGG	Xho I
(36-mer)	hsMakorin1-short, (712-726), AM236048	
395	GCATGCGGCCGCTCTGGTTTGCTATGTTCATATCTGC	Not I
(37-mer)	hMakorin1-short, (339-317), AM236048	
396	GCATGCGGCCGCTCCGGACTGTCAGAGAGGTC	Not I
(32-mer)	hMakorin1-short, (261-244), AM236048	

Bezeichnung und	Sequenz $(5' \rightarrow 3')$	Schnittstelle
Länge	Protein, (Nukleotid-Rest), GenBank accession number	
397	GCAT GAATTC TTACCCACACATGTCACAAGAATC	EcoR I
(34-mer)	hMakorin1-short, (726-706), AM236048	
423	TGTTCAGCGCAGCAAGGAC	RT-PCR
(19-mer)	rMakorin1-short, (819-837), NM_001004233	Vorwärts-Primer
424	AGATTTAACGGATGGTGGATTTTT	RT-PCR
(24-mer)	rMakorin1-short, (1349-1372), NM_001004233	Rückwärts-Primer
425	GTGGGATCTGCATGGAGGTGGTCT	RT-PCR
(24-mer)	rMakorin1-long, (23043-23068), AAHX01058705,	Vorwärts-Primer
426	CCTTCGTTGGGCCTGGTATCTGCT	RT-PCR
(24-mer)	rMakorin1-long, (22662-22685), AAHX01058705	Rückwärts-Primer

2.1.8 Antikörper

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Primär-Antikörper

ICC: Immunzytochemie, WB: Western Blot, IP: Immunpräzipitation

Antikörper	Verwendung,	Herkunft
	eingesetzte	
	Verdünnung	
Anti-EGFP (polyklonal), Kaninchen	WB: 1:2500	Rockland
Anti-EGFP (monoklonal), Maus	WB: 1:5000	Rockland
Anti-Flag M2 (monoklonal), Maus	WB: 1:1000,	Stratagene
	ICC: 1:500	
Anti-Flag M2 Affinity Gel	IP	Sigma-Aldrich
Anti-Makorin1 (polyklonal),	WB: 1:10000	Pineda
Kaninchen	ICC/IHC: 1:5000	
Anti-Myc IgG1 (monoklonal), Maus	WB: 1:1000,	Sigma-Aldrich
	ICC: 1:500	
Anti-T7 (monoklonal), Maus	WB/ICC: 1:10000	Novagen
Anti-PABP (polyklonal), Kaninchen	WB: 1:1000	Pineda
Anti-GFAP (monoklonal), Maus	ICC/IHC: 1:1000	Sigma
Anti-Myelin (monoklonal), Maus	ICC/IHC: 1:2000	Chemicon
Anti-MAP2 (monoklonal), Maus	ICC/IHC: 1:500	Chemicon

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Sekundär-Antikörper

ICC: Immunzytochemie, WB: Western Blot, IP: Immunpräzipitation

Antikörper	Verwendung, eingesetzte Verdünnung	Herkunft
Anti-Kaninchen IgG HRP	WB: 1:5000	Jackson Immunoresearch
	NID 1 5000	x 1 x 1
Anti-Maus IgG HRP	WB: 1:5000	Jackson Immunoresearch
		(Dianova)
Anti-Meerschwein HRP	WB: 1:5000	Jackson Immunoresearch
Anti-Kaninchen Alexa Fluor488, Ziege	ICC: 1:500	Molecular Probes
Anti-Maus Alexa Fluor488, Ziege	ICC: 1:500	Molecular Probes
Anti-Kaninchen Cy3, Ziege	ICC: 1:500	Jackson Immunoresearch
Anti-Maus Cy3	ICC: 1:500	Jackson Immunoresearch
Anti-Meerschwein Cy3, Esel	ICC: 1:500	Jackson Immunoresearch

2.1.9 Geräte

Agarosegelkammern	Sub Cell (Bio-Rad)
	GNA-100 (Pharmacia)
Bio Photometer	Eppendorf
Blot-Apparatur	Semi-Dry (Merck Darmstadt)
CO ₂ -Inkubator	Heraeus
Elektrophoresekammer	Mini-Protean III System
	(BioRad München)
Flüssigszintillationszähler	WALLAC 1409 (Wallac)
Geltrockner	Gel Air Dryer (Bio-Rad)
Heizblock	Thermomixer compact (Eppendorf Hamburg)
Hybridisierungsofen	Bachhofer Laboratoriumsgeräte
Inkubationsschüttler	Multitron Version 2 (INFORS AG 2000)
Mikroskope	Axiovert 135 (Zeiss) in Kombination mit einer
	Hamamatsu-Digitalkamera und Openlab Software
	(Improvision),
	Konfokalmikroskop: Leica SP2 mit Leica SP2 Software

pH-Meter	Radiometer Copenhagen
Rotoren	SS-34 (Sorvall), 70.1 Ti (Kontron),
	AH 629 (Beckmann)
Sterilbank	Hera Safe (Heraeus, Hanau)
Thermozycler	Gene Amp PCR System (Perkin Elmer, Weiterstadt)
UV-Leuchttisch	UVT 28-M (Herolab)
Zentrifugen	Eppendorf 5415D, Eppendorf 5417 R
	(Eppendorf), Varifuge OR3 (Heraeus),
	Ultrazentrifuge L7 (Beckmann), SORVALL Superspeed
	RC-5B und RC2-B (DuPont)

2.1.10 Firmenverzeichnis

Abcam Limited, Cambridgeshire, UK Agfa-Gevaert, Leverkusen, Deutschland Ambion, Inc., Austin, USA Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Heidelberg, Deutschland Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland **BD-Biosciences Clontech, Palo Alto, USA** Beckmann, Palo Alto, USA Beckton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg, Deutschland BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland Bethesda Research Laboratories Life Technologies Inc., Gaithersburg, USA Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden/Taunus, Deutschland Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland Difco (Clontech Laboratories GmbH), Heidelberg, Deutschland Du Pont de Nemours GmbH, Bad Homburg, Deutschland Dynal GmbH, Hamburg, Deutschland Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland Fluka, Sigmma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland Gibco (Invitrogen Life Technologies), Karlsruhe, Deutschland Greiner Labortechnik, Nürtingen, Deutschland

Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland Heraeus GmbH, Hannover, Deutschland Herolab/Kendro Laboratory Products, Rodenbach, Deutschland Invitrogen Life Technologies (Invitrogen Corporation), Karlsruhe Jackson Immuno Research, West Grove, USA J.T.Baker, Deventer, Holland Kontron Instruments, Eching, Deutchland Leitz (Ernst Leitz Wetzlar) GmbH, Wetzlar, Deutschland Leica Microsystems, Heidelberg, Deutschland Macherey-Nagel, Düren, Deutschland MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth, Deutschland Merck Bioscience, Darmstadt, Deutschland Millipore GmbH, Eschborn, Deutschland Molecular Probes Europe BV, Leiden, Niederlande New England Biolabs GmbH, Schwalbach, Deutschland Novagen, Schwalbach, Deutschland Nunc GmbH, Wiesbaden-Biebrich, Deutschland Perkin Elmer Life Science, Boston, USA Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Deutschland Pierce, Bonn, Deutschland Pineda, Berlin, Deutschland Promega GmbH, Mannheim, Deutschland Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland Raytest GmbH, Straubenhardt, Deutschland Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland Roth, Karlsruhe, Deutschland Santa Cruz Biotechnologie Inc, Heidelberg, Deutschland Sartorius, Göttingen, Deutschland Schleicher & Schuell GmbH, Taufkirchen, Deutschland Serva, Heidelberg, Deutschland Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland Sorvall-Du Pont, Bad-Homburg, Deutschland Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande Vivascience Limited, Gloucestershire, Großbritanien

Wallac, Laboratorium Prof. Dr. Berthold GmbH & Co. KG, Bad Wildbad Whatman, Springfield Mill, Großbritannien Zeiss, Oberkochen, Deutschland
2.2 Methoden

2.2.1 DNA: Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Die Amplifizierug von DNA erfolgte in dem *PCR-Thermocycler* Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer) in einem Reaktionsvolumen von 50 µl. Der Reaktionsansatz wurde auf Eis wie folgt zusammenpipettiert:

10-50 ng cDNA-Matrize
je 50 pmol Oligonukleotid (*Primer*)
200 μM dNTP (Desoxyribonukleosidtriphosphat)-Mix
2-5 U Pfu- (Promega) oder Proof Start-Polymerase (Qiagen)
5 μl 10 x PCR-Reaktionspuffer
ad 50 μl mit H₂O

Das PCR-Programm variierte je nach Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide und der Länge des zu amplifizierenden Produktes. Im Folgenden ist ein PCR-Standardprogramm dargestellt.

Vorgang	Temperatur	Dauer	Zyklen
Prä-Denaturierung	95°C	5 min	1
Denaturierung	94°C	1 min)
Primer - Anlagerung	50-65°C	1 min	25-35
Elongation	72°C	30 sec – 4 min	J
Abschließende Elongation	72°C	7 - 10 min	1

PCR-Standardprogramm:

Zur Überprüfung der PCR-Produkte wurde ein Aliquot der PCR-Ansätze in einem Agarosegel aufgetrennt (Kapitel 2.2.1.2). Der Rest der Reaktionsansätze wurde mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben gereinigt.

2.2.1.2 Agarosegelelektrophorese

Die Charakterisierung und Isolierung von DNA-Fragmenten nach der Restriktion oder von PCR-Produkten erfolgte nach 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)) in einer horizontalen Elektrophoreseapparatur mit 0,8-1,8%-igen (w/v) Agarosegelen bei Spannungen zwischen 70 und 100 V in 0,5 x TBE-Puffer (50 mM Tris-Base, 50 mM Borsäure, 1mM EDTA, pH 8,3). Zur Detektion der DNA wurde Ethidiumbromid 0,5 μ g/ml (Sigma) beim Gießen der Agarosegele hinzugefügt. Die Detektion der aufgetrennten DNA-Fragmente erfolgte mit einer 356 nm UV-Leuchtplatte (UVT 28-M, Herolab).

2.2.1.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Das zu isolierende DNA-Fragment wurde mithilfe eines UV-Transilluminators im Agarosegel lokalisiert und mit einem Skalpell herausgeschnitten. Die DNA wurde anschließend mit dem *QIAquick Agarose Gel Extraction* Kit (Qiagen) aus der Agarose entsprechend der Vorschrift des Herstellers isoliert.

2.2.1.4 Restriktion von DNA

Zur Herstellung gewünschter DNA-Fragmente wurden PCR-Produkte oder Plasmid-DNA mit entsprechenden Restriktionsenzymen und den dazu gehörenden Puffern nach Herstellerangaben inkubiert. Die Enzymreaktionen wurden durch Zugabe von 1/5 Volumen DNA-Ladepuffer (Endkonzentration: 5% Glycerin, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA pH 8,0, 0,02% Bromphenolblau (w/v)) gestoppt.

2.2.1.5 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Bei einigen Ligationen wurde die linearisierte Plasmid-DNA zuvor dephosphoryliert, um eine Religation des Plasmids zu vermeiden. Dazu wurde 1 U der Alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm (Invitrogen, Karlsruhe) in den Restriktionsansatz der Plasmid-DNA gegeben und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde der Ansatz auf 65°C für 15 Minuten erhitzt, um das Enzym zu inaktivieren. Anschließend wurde die Plasmid-DNA entsprechend Kapitel 2.2.1.2 und 2.2.1.3 gereinigt und zur Ligation eingesetzt.

2.2.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten in linearisierte Plasmide wurden etwa 100-200 ng beider DNAs in einem molaren Verhältnis von 1:1 bis 3:1 im entsprechenden Reaktionspuffer zusammengegeben und mit Hilfe von 1U T4-DNA-Ligase (Invitrogen Life Technologies) ligiert. Der Ligationsansatz wurde 2-4 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16°C inkubiert. Von diesem Ansatz wurden 10 ng DNA zur Transformation von kompetenten Bakterien (Kapitel 2.2.1.8) eingesetzt.

2.2.1.7 Herstellung kompetenter E. coli-Zellen

Medien:

- LB-Medium: 10 g/l Bacto-Pepton, 7,5 g/l NaCl, 5 g/l Hefe-Extrakt, Einstellung des pH-Wertes auf 7,4, autoklavieren; Antibiotika-Zusätze: 100 μg/l Ampicillin oder 50 μg/l Kanamycin
- LB-Platten: 10 g/l Bacto-Pepton, 7,5 g/l NaCl, 5 g/l Hefe-Extrakt, 15 g/l Bacto-Agar, Einstellung des pH-Wertes auf 7,4, autoklavieren; Antibiotika-Zusätze: 100 µg/l Ampicillin oder 50 µg/l Kanamycin

2 ml LB-Medium wurden mit einer Kolonie *E. coli* TOP10F`angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Mit der gesamten 2 ml-Kultur wurde eine 200 ml-Kultur angeimpft und bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,3-0,6 bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Bakterienzellen wurden bei einer Zentrifugation von 15 min bei 4°C und 3000 rpm pelletiert. Das Bakterienpellet wurde in 20 ml eiskaltem TSB (*transformation buffer*)-Puffer aufgenommen (1x LB-Medium pH 6,1, 10% (w/v) PEG (Polyethylenglycol, MW 8000), 5% (v/v) DMSO (Dimethylsulfoxid), 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂) und 10 min bei 4°C inkubiert. Die Bakterienzellen wurden in 500 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.1.8 Transformation kompetenter E. coli-Zellen

Für die Transformation von 10 ng Plasmid-DNA oder 10 μ l Ligationsansatz (Kapitel 2.2.1.6) wurden 100 μ l kompetente *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut. Die DNA wurde auf ein 80 μ l Volumen mit H₂O eingestellt und mit 20 μ l 5x KCM (0,5 M KCl, 0,15 M CaCl₂, 0,25 M MgCl₂) versetzt. Der Ansatz wurde kurz auf Eis inkubiert und mit den 100 μ l kompetenten *E. coli*-Zellen vermischt. Nach einer Inkubation für 20 min auf Eis wurde der gesamte Ansatz mit 800 μ l LB-Medium versetzt und 40 min bis 1 h bei 37°C geschüttelt. Je nach Bedarf wurde ein Teil (bei Retransformation von Plasmid-DNA) oder der gesamte Ansatz (bei Transformation mit einem Ligationsansatz) auf LB-Agarplatten mit der entsprechenden Antibiotika-Selektion ausplattiert. Die LB-Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert, bis die *E. coli*-Kolonien gut zu sehen waren.

2.2.1.9 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen (Mini-, Midi-, Maxi-Präparationen)

Für Minipräparationen von Plasmid-DNA wurden 3 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit einer transformierten *E. coli*-Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Das Pellet von 2 ml der Bakteriensuspension wurde zur Isolierung der DNA verwendet. Die Isolierung erfolgte mit Hilfe des Fertigsystems für Minipräparationen der Firma Qiagen. Für die Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA aus 100-300 ml Bakteriensuspensionen wurden entsprechende Fertigsysteme für Midi- bzw. Maxipräparationen verwendet. Die isolierte DNA wurde in H₂O aufgenommen. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt (siehe Kapitel 2.2.1.10). Die Lagerung erfolgte bei -20° C.

2.2.1.10 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren (DNA/RNA)

Die Konzentration von DNA- bzw. RNA-Lösungen wurde spektralphotometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm im Biophotometer (Eppendorf) bestimmt. Eine Extinktion von $E_{260} = 1$ entspricht einer DNA- bzw. RNA-Konzentration von 50 µg/ml bzw. 40 µg/ml. Die Reinheit der DNA/RNA wurde durch die Ratio der Absorption bei 260 nm und 280 nm überprüft. Es wurden nur DNA-Lösungen mit $E_{260}/E_{280} = 1,8$ und RNA-Lösungen mit $E_{260}/E_{280} = 2,0$ verwendet.

2.2.1.11 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen erfolgten im Service-Labor des Instituts für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie bzw. im Institut für Pathologie (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) mit dem 377 ABI PRISMTM Sequenzierungsautomat (Applied Biosystems). Für die Sequenzierung wurden ca. 500 ng DNA und 10 pmol des entsprechenden Sequenzierprimers in einem 11 μ l Gesamtvolumen eingesetzt und mit dem *ABI Prism*® *BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems)

entsprechend der Angaben des Herstellers sequenziert. Das Verfahren entspricht der Didesoxy-Methode nach Sanger (Sanger *et al.* 1977).

2.2.1.12 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die DNA-Fragmente, die zur Herstellung von Sonden eingesetzt wurden, wurden durch Restriktion (Kapitel 2.2.1.4) und anschließender Aufreinigung über ein Agarosegel (Kapitel 2.2.1.2 und 2.2.1.3) hergestellt. Die Markierung von DNA-Fragmenten für Northern Blot-Hybridisierungen erfolgte mit dem Prime-It II Random Primer Labelling Kit (Stratagene) nach Angaben des Herstellers. Für jeden Ansatz wurden 30 ng DNA und 50 μ Ci [α^{32} P]dCTP (3000 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech) eingesetzt. Nach Beendigung der Markierungsreaktion wurde der Ansatz über eine PCR Purification Column (Qiagen) gereinigt. Anschließend erfolgte die Quantifizierung des Einbaus von $[\alpha^{32}P]dCTP$ und die Bestimmung der spezifischen Aktivität des markierten Fragmentes durch Flüssigszintillationszählung (Wallac 1409).

2.2.2 RNA: Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellkulturen und Rattengeweben

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus HEK293- oder HeLa-Zellen wurden die Zellen einer 10 cm Zellkulturschale mit einem Schaber in ihrem Medium abgeschabt und in ein 15 ml Falcon-Gefäß überführt. Die Zellen wurden in einer Kühlzentrifuge abzentrifugiert (5 min, 1000 x g), mit 10 ml eiskaltem PBS (*phosphate buffered saline*, Sigma) gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde im Lysispuffer des Fertigsystems *RNeasy*[®] *Mini Kit* (Qiagen) aufgenommen. Die Zerkleinerung der Zellen erfolgte mit Hilfe des *QIAshredder*TM (Qiagen). Die weitere Aufreinigung erfolgte mit dem Fertigsystem nach Herstellerangaben. Die Qualität der RNA wurde durch Elektrophorese im 1%igen Agarosegel überprüft. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.2.2.2 Herstellung von cDNA über Reverse Transkription

Zur Herstellung von cDNA wurden ca. 2 µg Gesamt-RNA in einem 20 µl Gesamtvolumen eingesetzt. In einem RNase-freien Mikrozentrifugengefäß wurde folgender Ansatz zusammenpipettiert:

> 0,5 μl Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (500 μg/ml) 1 μl Gesamt-RNA (2 μg) 11,5 μl H₂O (RNas- frei)

Der Ansatz wurde für 10 min bei 70°C inkubiert, dann sofort auf Eis gestellt. Nach kurzer Zentrifugation wurden folgende Komponenten dazugegeben:

4 μl 5x Superscrip-Puffer (Invitrogen)
1 μl 0,2 M DTT
<u>1 μl dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP)</u>
19 μl Gesamtvolumen des Ansatzes

Nach einer Inkubation von 10 min bei 37°C wurde 1 μ l (200U) der Reversen Transkriptase *SuperScriptTM II* (Invitrogen Life Technologies) zu dem Reaktionsansatz gegeben und für eine weitere Stunde bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Um das Enzym zu inaktivieren, wurde der Ansatz 15 min bei 70°C inkubiert. Für die anschließende PCR wurden 2 μ l des cDNA-Produktes als Template eingesetzt.

2.2.2.3 Herstellung von Biotin-markierter cRNA

Die Synthese von Biotin-markierter cRNA erfolgte mit dem *Ribo MAXTM Large Scale RNA Production System-T7* (Promega). Die Transkriptionsreaktion erfolgte in einem 100 μ l Gesamtvolumen und wurde wie folgt zusammenpipettiert:

5x Puffer	20 µl
100 mM rNTP-Mix (Ribonukleosidtriphosphate ATP, GTP, UTP, CTP)	30 µl
10 mM Biotin-markiertes-UTP	3 µl
5 μg Template-DNA	x μl
Enzym-Mix	10 µl
H ₂ O	ad 100 µl

Der Ansatz wurde 4 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte ein RQ1 DNase-Verdau (1 U/µg DNA) für 15 min bei 37°C. Die *in vitro*-Transkripte wurden mit dem *RNeasy Midi Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben gereinigt. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch durch Messung der Extinktion bei 260 nm mit Hilfe eines Bio-Photometers (Eppendorf) bestimmt. Es wurde eine Ausbeute von ca. 400-500 µg RNA erzielt. Zum Schluß wurden die *in vitro*-Transkripte durch eine nicht-denaturierende Agarosegelektrophorese auf die richtige Größe überprüft.

2.2.2.4 Herstellung radioaktiv-markierter cRNA-Sonden

Linearisierung der Template-DNA

Vor der *in vitro* Transkription wurde die Template-DNA mit einem geeigneten Enzym linearisiert und 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. Die DNA wurde dann mit 3 Volumina 100% Ethanol nach Zugabe von Natrium-Acetat (Endkonzentration 75 mM, pH 5,2) gefällt und für 30 min bei 25000 x g (Eppendorf-Zentrifuge) zentrifugiert. Das DNA-Sediment wurde einmal mit 70% Ethanol (v/v, in RNase-freiem H₂O) gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA in RNase-freiem H₂O aufgenommen, so dass die Konzentration der DNA in etwa 1 µg/µl betrug.

In vitro Transkription mit SP6- bzw. T3/T7 –RNA Polymerase

Ein 5 µl Transkriptionsansatz wurde folgendermaßen zusammenpipettiert:

	<u>SP6</u>	<u>T3/T7</u>
Template-DNA, ca. 1 µg/µl	0,4 µl	0,4 µl
5 x SP6 Puffer	1,0 µl	
5 x T3/T7 Puffer		1,0 µl
20 mM DTT	0,25 µl	
100 mM DTT		0,25 µl
20 x Nukleotid-Mix	0,25 µl	0,25 µl
RNase-Inhibitor, 10 u/µl	0,2 µl	0,2 µl
³² P-UTP	2,5 µl	2,5 µl
RNA-Polymerase, 20 u/µl (Gibco BRL)	0,4 µl	0,4 µl

Zusammensetzung des 20 x Nukleotid-Mixes: 10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM GTP, 180 µM UTP, 20 µM Br-UTP

Endkonzentration der Nukleotide im Ansatz: ATP, GTP und CTP: je 500 µM UTP+Br-UTP: 10 µM (50 pmol/Ansatz) ³²P-UTP (800 Ci/mmol, 20 mCi/ml, Amersham Biosciences): 12,6 µM (63 pmol/Ansatz) UTP (gesamt): 22,6 µM (113 pmol/Ansatz)

Der Transkriptionsansatz wurde 1 h bei 37°C (T3- und T7-RNA Polymerase) oder bei 40°C (SP6-RNA Polymerasen) inkubiert. Anschließend erfolgte der Abbau der Template-DNA durch Zugabe von 1 u RQ1-DNase (Promega) und einer Inkubation für 15 min bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 μ l 0,5 M EDTA, pH 8.0 abgestoppt und der Ansatz auf ein Volumen von 74 μ l mit RNase-freiem H₂O aufgefüllt. Von diesem Ansatz wurden 2 μ l zur späteren Bestimmung der sythentisierten RNA-Menge abgenommen. Der restliche Ansatz wurde mit Hilfe einer *Sephadex G-50 Spin-Column* (Amersham Biosciences) gereinigt, um die nicht eingebauten Nukleotide zu entfernen.

Quantifizierung der Ausbeute radioaktiv-markierter cRNAs

Um die Menge an synthetisierter cRNA zu ermitteln, wurde zuerst der prozentuale Einbau des isotopenmarkierten Nukleotids berechnet. Um den prozentualen Einbau zu bestimmen, wurde eine Fällung der cRNA mithilfe von Trichloressigsäure (TCE) durchgeführt und die Radioaktivität vor (Gesamt cpm) und nach der TCE-Fällung (TCE-fällbare cpm) bestimmt. Für die TCE-Fällung wurden jeweils 10 µl einer 1:50 Verdünnung auf einen Whatman GF/C-Glasfaserfilter pipettiert und getrocknet. Es folgte die Fällung von Makromolekülen in 50-100 ml 10% TCE, 1% Na-Pyrophosphat für dreimal je 5 min bei 4°C. Die Makromoleküle bleiben hierbei an den Filter gebunden, während die Mononukleotide in Lösung gehen. Im Anschluss wurden die Filter in 96% Ethanol für 5 min bei 4°C gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Für die Bestimmung der insgesamt eingesetzten Radioaktivität (Gesamt-cpm) im Ansatz wurden ebenfalls 10 µl einer 1:50 Verdünnung auf einen zweiten Filter pipettiert, aber in diesem Fall wurde eine TCE-Fällung nicht durchgeführt. Die Aktivität der Filter wurde durch Flüssigszintillationszählung (Wallac 1409) in Szintillationsflüssigkeit gemessen. Unter der Annahme, dass alle vier Ribonukleotide zu gleichen Anteilen vorliegen, wurde der prozentuale Einbau und die synthetisierte cRNA-Menge wie im Folgenden dargestellt berechnet:

Einbau [%] = TCE [cpm] x 100% / Gesamt [cpm] Eingebaute UTP-Menge [pmol] = 113 pmol x %Einbau / 100 Summe eingebauter Nukleotide [pmol] = eingebaute UTP-Menge x 4 Synthetisierte cRNA-Menge $[\mu g]$ = Summe eingebauter Nukleotide [pmol] / 3225 pmol

2.2.2.5 Northern Blot-Analyse

Gelelektrophorese

Die RNA-Lösungen mit jeweils 10-25 µg Gesamt-RNA sowie die geeigneten Marker-Proben wurden im Vakuum (*Speed Vac* Concentrator Savant) getrocknet und 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 Ansätze wurden 1 h bei 50°C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 2,5 µl Lade-Puffer (43,5% Glycerin (w/v), 0,01 Na-phosphat pH 7,0, 0,3% Bromphenolblau (w/v)) wurden die Proben auf ein horizontales 1%-Agarosegel (Laufpuffer: 0,01 M Na-phosphat pH 7,0) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei konstanten 80 Volt (DNA Sub CellTM Kammer, Bio Rad) und unter ständiger Durchmischung des Puffers durch eine Pumpe (Ismatel) für 3- 4 h durchgeführt.

Übertragung der RNA auf eine Nylonmembran

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die RNA durch Kapillarkräfte aus dem Gel auf eine Nylonmembran (Zeta-Probe, Bio Rad) transferiert. Die Membran wurde zuvor einmal mit 0,1 M NaOH für 20 min gewaschen, um sie RNase-frei zu machen, und dann dreimal für je 10 min mit H₂O gespült. Die Äquilibrierung der Membran erfolgte für 10 min in 10 x SSC Transferpuffer (1,5 M NaCl, 0,15 M Na-Citrat). Zum Transfer der RNA auf die Membran wurde 18-20 h geblottet. Im Anschluß wurde die Membran 3 h bei 80°C im Vakuumofen VT5042 (Heraeus) gebacken.

Die Marker-Spur, die vor dem Transfer vom Gel abgetrennt wurde, wurde über Nacht bei 4°C in 0,5 x TBE mit 1 μ g/ml Ethidiumbromid inkubiert und dann auf dem 256 nm-UV-Leuchttisch UVT 28-M (Herolab) detektiert.

Hybridisierung

Die Membran wurde für 1 h bei 42°C im Hybridisierungsofen (Bachofer *ULTRA hybTM*-Hybridisierungslösung Laboratoriumsgeräte) mit 10 ml (Ambion) prähybridisiert. Die mit ³²P-markierte DNA-Sonde (Kapitel 2.2.1.12) wurde zur Denaturierung 10 min im Wasserbad gekocht und sofort auf Eis gestellt. Es wurden 1 x 10⁶ cpm der Sonde pro ml Hybridisierlösung eingesetzt (10 ml Lösung/Membran). Die Hybridisierung erfolgte über Nacht im Hybridisierungsofen bei 42°C. Daraufhin folgten mehrere Waschschritte bei RT: zweimal für 10 min mit 2 x SSC, 0,1% SDS, einmal für 15

min mit 1 x SSC, 0,1% SDS, einmal für 15 min mit 0,2 x SSC, 1 % SDS. Abschließend wurde die Membran einmal für 30 min mit 0,2 x SSC, 1% SDS bei 50°C gewaschen.

Für die Dokumentation wurde die Membran mit einem Röntgenfilm (Fuji-Film) bei -80°C für 1-2 h exponiert.

2.2.2.6 In situ-Hybridisierung

Vorbereitung der Schnitte

Für die *in situ*-Hybridisierung wurden sagittale Gehirnschnitte der Ratte verwendet. Für die Herstellung der Schnitte wurde das frisch präparierte Gehirn der Ratte in pulverisiertem Trockeneis eingefroren und bei -70°C gelagert. Es wurden 16 µm dicke Kryoschnitte hergestellt und auf -20°C kalte Superfrost-Objektträger aufgebracht (nur die Stelle, an der der Schnitt liegen sollte, wurde von der anderen Seite mit den Daumen angewärmt), sofort wieder gekühlt und bis zum Gebrauch bei -70°C gelagert.

Die Fixierung der Schnitte erfolgte in 4% Paraformaldehyd in PBS, pH 7,3, für 10 min bei 4°C. Anschließend wurden die Schnitte zweimal für je 5 min mit 1 x PBS gewaschen. Zur Inaktivierung des endogenen Biotins bzw. zum Einbringen negativer Ladungen an basische Proteine wurden die Schnitte für 10 min in Acetylierungspuffer (0,1 M Triethanolamin (Sigma T 1377), 0,9% NaCl, 0,25% Essigsäureanhydrid (Sigma A 6404)) inkubiert. Es folgte eine Inkubation in einer aufsteigenden Ethanolreihe für je 5 min (60%, 80%, 90%, 95%, 100%) und in Chloroform für 5 min, dann wieder in 100% Ethanol für 5 min. Im Anschluß wurden die Schnitte an der Luft getrocknet.

In vitro Transkription

Für die radioaktive Markierung wurde ³⁵S-UTP verwendet und die *in vitro* Transkription mit dem Kit *IMaxiscript* (Ambion) entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt. Folgender *in vitro*-Transkriptionsansatz wurde zusammenpipettiert:

μl

DNA-Template	1 µg
10 x Transcription Buffer	2 µl
10 mM ATP	1 µl
10 mM CTP	1 µl
10 mM GTP	1 µl
³⁵ S-UTP	5 µl
T3 oder T7 Enzym-Mix	2 µl
RNase-freies H ₂ O	ad 20

Um die nicht eingebauten Nukleotide zu entfernen, wurde der Transkriptionsansatz nach der Reaktion mit Hilfe einer *Sephadex G-25 Spin-Column* (Amersham) nach Herstellerangaben gereinigt.

Hybridisierung

Zur Prähybridisierung wurden die Objektträger flach in eine feuchte Kammer, die ein mit 50% Formamid-getränktes Filterpapier enthielt, gelegt. Pro Objektträger wurden 0,5-1 ml Prähybridisierungspuffer (entspricht dem Hybridisierungspuffer, jedoch ohne Dextransulfat) aufpipettiert. Es folgte eine Inkubation für 2-3 h bei 50°C. Nach der Inkubation wurde der Prähybridisierungspuffer von den Objektträgern dekantiert und 100 μ l Hybridisierungspuffer mit 1 x 10⁶ cpm der gewünschten radioaktiv markierten Sonde aufpipettiert. Schließlich wurde ein Deckglas aufgelegt und bei 50°C über Nacht inkubiert.

Hybridisierungspuffer:	Endkonzentration	
Entionisiertes Formamid	50%	
20 x Hybridisation salts	5 x	
100 x Denhardts	5 x	
10% SDS	0,2%	
1 M DTT	10 mM	
Dextransulfat	10%	
Heringspermien-DNA	$250 \mu g/ml$	
Hefe-tRNA	$250 \mu g/ml$	

20 x *Hybridisation salts*: 3 M NaCl, 0,1 M PIPES, 0,1 M EDTA, pH 6,8 100 x Denhardts: 2% Ficoll, 2% Polyvinylpyrrolidon, BSA

Nach der Hybridisierung wurden die Schnitte 3-mal für je 5 min in 4 x SSC gewaschen und einer RNase A-Behandlung für 30 min bei 37°C (in 0,5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 40 μ g RNase A/ml) unterzogen. Es folgte eine weitere Inkubation im gleichen Puffer ohne RNase A für 30 min bei 37°C und zwei weitere Waschschritte für je 15 min in 2 x SSC bei 50°C.

Vor der Durchführung der Autoradiografie wurden die Schnitte durch eine Alkoholreihe dehydriert und dann auf einen Röntgenfilm gelegt (Kodak Biomax MR). Die Exposition erfolgte für mehrere Tage.

2.2.3 Hefe-Zwei-Hybrid-System (Yeast Two-Hybrid, YTH)

2.2.3.1 Prinzip des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems

Das YTH-System ist eine Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen in Hefen, in der Regel in der Bäckerhefe Saccharomyces cerevisiae. In einem Screening-Verfahren können in einem Ansatz mit einer cDNA-Bank als "Beute" (Prey) mögliche Interaktionspartner identifiziert werden. Alternativ kann bei dem so genannten "Single Mating" gezielt die Interaktion von bestimmten Proteinen untersucht werden. Es wurde erstmalig 1989 von Fields und Song beschrieben. Das System beruht auf den Eigenschaften des Transkriptionsfaktors GAL4, der die Expression von Genen einleitet, die für Enzyme des Galaktosestoffwechsels kodieren (Johnston, 1987). GAL4 besitzt zwei strukturelle Domänen, die jeweils eine spezifische Funktion ausüben. Die N-terminale Domäne (GAL4-DNA-Bindungsdomäne, GAL4-BD) bindet an spezifische, regulatorische DNA-Sequenzen in der Promotorregion des Zielgens, die C-terminale Domäne (GAL4-Aktivierungsdomäne, GAL4-AD) aktiviert die Transkription des nachgeschalteten Gens. Im YTH-System sind diese Domänen voneinander getrennt und mit Proteinen fusioniert, die auf eine Interaktion getestet werden. In dieser Arbeit wurde das Matchmaker 3 Yeast Two-Hybrid System (Clontech) verwendet. Das Fusionsprotein mit der GAL4-BD (einkloniert in dem pGBKT7-Plasmid), fungiert als Köderprotein "Bait". Das Fusionsprotein mit der GAL4-AD (einkloniert in dem pACT2-Plasmid) wird als Beuteproteine "Prey" bezeichnet. Die hier im YTH-System eingesetzten, haploiden Hefestämme AH109 und Y187 sind defizient für den GAL4-Transkriptionsfaktor. Der Hefestamm AH109 wird mit dem Köderplasmid und der Hefestamm Y187 mit dem Beuteplasmid transformiert. Diese beiden Hefestämme werden gepaart, was als "Mating" bezeichnet wird. Findet eine Protein-Protein-Interaktion zwischen Köder- und Beuteprotein statt, kommen die Domänen des GALA-Proteins in räumlicher Nähe und es entsteht ein funktioneller GAL4-Transkriptionsfaktor. Der GAL4-Transkriptionsfaktor erkennt definierte UA (upstream activating)-Sequenzen und bindet an den Promotor, so dass die Transkription von nachgeschalteten Reportergenen aktiviert wird. In Abbildung 4 ist das YTH-System schematisch dargestellt.



Abbildung 4: Schematische Darstellung des Hefe-Zwei-Hybrid Systems

Das zu untersuchende Fusionsprotein mit der GAL4-DNA-Bindedomäne fungiert als Köderprotein. Das Köderprotein bindet an die GAL4-Bindestelle (GAL-Promotor) vor einem Reportergen im Genom einer Hefezelle. Findet eine Interaktion des Beuteproteins (Fusionsprotein aus Protein Y und der GAL4-Aktivierungsdomäne) mit dem Köderprotein statt, wird die GAL4-Aktivierungsdomäne in räumliche Nähe zur GAL4-DNA-Bindedomäne gebracht und die funktionelle Rekonstitution des GAL4-Transkriptionsfaktors bewirkt. Dies führt zur Expression des Reportergens, über welches die Interaktion detektiert werden kann.

Der Hefestamm AH109 verfügt über HIS3, ADE2, lacZ und MEL1 als Reportergene und der Hefestamm Y187 besitzt lacZ als Reportergen. Durch das Weglassen von bestimmten Aminosäuren auf oder in synthetischen Medien, für die die Hefestämme auxotroph sind, kann die Selektion durchgeführt werden. Bei den Selektionsmarkern wird zwischen Transformationsmarkern (Anwesenheit des Plasmids in der Hefezelle) und den Interaktionsmarkern (aktivierte Reportergene durch **Protein-Protein-Interaktion**) unterschieden. Das hier verwendete pGBKT7-Köderplasmid enthält das TRP1-Gen zur Selektion in Trp-auxotrophen Hefestämmen in Trp-Selektionsmedium. Das pACT2-Beuteplasmid enthält das LEU2-Gen zur Selektion in Leu-auxotrophen Hefestämmen in Leu--Selektionsmedium. Die Reportergene HIS3, ADE2, lacZ und MEL1 in den beiden Hefestämmen dienen als Interaktionsmarker. Hier erfolgt die Selektion auch durch Wachstumsanalysen auf oder in entsprechenden Selektionsmedien oder durch Farbreaktionen. Wie vorher beschrieben enthält der Hefestamm AH109 mehrere Reportergene, die dazu dienen, die Anzahl falsch positiver Klone zu minimieren. Diese Reportergene stehen unter der Kontrolle des GAL4- und eines Minimalpromotors (TATA-Box).

Durch die Aktivierung der Gene HIS3 und ADE2 sind die Hefen in der Lage, auf Histidinund Adenin-Mangelmedien zu wachsen. Die Transkription des lacZ-Gens führt zu Bildung des Enzyms β -Galaktosidase, das nach Aufschluss der Hefezellen durch Umsetzung eines Substrates zu einem gefärbten Produkt nachgewiesen werden kann.

Die Aktivierung des MEL1-Gens führt zur Bildung des sekretorischen Enzyms α -Galaktosidase. Dessen Aktivität kann durch Aufbringen eines geeigneten Substrates auf die Agarplatten nachgewiesen werden, ohne die Hefezellen zu zerstören.

Hefestämme:

AH109:	MATα, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1 _{UAS} -GAL1 _{TATA} -HIS3, GAL2 _{UAS} -GAL2 _{TATA} -ADE2, URA3::MEL1 _{UAS} -MEL1 _{TATA} -lacZ
Y187:	MATα, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3,112, gal4Δ, met, gal80Δ, URA3::GAL1 _{UAS} -GAL1 _{TATA} -lacZ

Plasmide:

Die im *Matchmaker* YTH-System 3 verwendeten Plasmide, pGBKT7 und pACT2, lassen sich sowohl in geeigneten Stämmen von *Saccharomyces cerevisiae*, als auch in *E. coli*-Stämmen amplifizieren (so genannte *Shuttle*-Plasmide).

2.2.3.2 Transformation von Hefezellen

Medien

Das komplexe YPD-Medium (Clontech) wurde hauptsächlich für die Kultivierung von untransformierter Hefe eingesetzt.

Das definierte DOB (*Dropout Base*)-Medium (Qbiogene) ist ein Minimalmedium, das für die Selektion von transformierten Hefen eingesetzt wurde. Zur Herstellung des Selektionsmediums wurde das DOB-Medium mit einem CSM (*complete supplement mixture*, *Qbiogene*)-Gemisch verschiedener Aminosäuren und Nukleosiden versetzt, dem eine oder mehrere Aminosäuren fehlen.

- YPDA-Medium: 20 g/l Difco-Peptone, 10 g/l Hefeextrakt, 2% (w/v) Glucose, 0,003% Adenin-Hemisulfat, pH 5,8
- YPDA-Agarplatten: 20 g/l Bacto-Agar, 20 g/l Difco-Peptone, 10 g/l Hefeextrakt, 2% (w/v) Glucose, 0,003% Adenin-Hemisulfat, pH 5,8
- DOB-Medium: 1,7 g/l Yeast Nitrogen Base, 5 g/l Ammoniumsulfat, 20 g/l Dextrose

• Selektionsmedien DOB mit verschiedenen Zusätzen:

DOB/-L: 27 g/l DOB, 0,69 g/l CSM-Leu⁻ DOB/-T: 27 g/l DOB, 0,74 g/l CSM-Trp⁻ DOB/-L-T: 27 g/l DOB, 0,64 g/l CSM-Leu⁻, Trp⁻ DOB/-A-H-L-T: 27 g/l DOB, 0,61 g/l CSM-Ade⁻, His⁻, Leu⁻, Trp⁻

• Selektionsplatten enthalten zusätzlich zu den Selektionsmedien 20 g/l Bacto-Agar

Für die Transformation von Hefezellen wurde eine Kolonie des Hefestamms AH109 bzw. Y187 in 50 ml YPDA-Medium suspendiert und bei 30°C 16-18 h geschüttelt (OD_{600nm} sollte > 1,5 sein). Am nächsten Tag wurden mit ca. 1 ml dieser Übernachtkultur weitere 50 ml YPDA-Medium angeimpft, sodass die OD_{600nm} etwa 0,2-0,3 betrug. Die Kultur wurde erneut bei 30°C für ca. 4 h geschüttelt, bis eine OD_{600nm} von 0,5-0,6 erreicht wurde. Die Zellen wurden 5 min bei 1000 x g sedimentiert und einmal mit 25 ml H_2O gewaschen. Das Zellsediment wurde in 1 ml 100 mM Lithiumacetat resuspendiert, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und anschließend bei 16.000 x g für 15 s in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 400 µl 100 mM Lithiumacetat aufgenommen. Von dieser Suspension wurden 50 µl je Transformationsansatz aliquotiert und die Zellen für 15 s bei 16.000 x g sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen. Zu den Hefezellsedimenten wurden 240 µl 50% (w/v) PEG 3350 (Polyethylenglykol), 36 µl 1 M Lithiumacetat, 50 µl denaturierte Heringspermien-DNA (2 mg/ml) und 34 µl (1-10 µg) Plasmid-DNA zugegeben. Die Ansätze wurden gemischt, bis das Sediment gut suspendiert war und 30 min bei 30°C inkubiert. Dann wurde ein Hitzeschock für 30 min bei 42°C durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen 15 s bei 16.000 x g sedimentiert. Die Zellen wurden in 0,5-1 ml H₂O aufgenommen. Je 100 µl dieser Suspension wurden auf geeignete Selektionsplatten ausplattiert und für ca. 3-5 Tage bei 30°C inkubiert.

2.2.3.3 Toxizitätstest

Um zu überprüfen, ob das gewünschte Köderprotein PABP auf die mit pGBKT7-PABP transformierten AH109-Hefezellen toxisch wirkt, wurden 50 ml DOB/-T-Medium (mit 15 μ g/ml Kanamycin) mit einer 2-3 mm Kolonie angeimpft und 24 h bei 30°C und 250 rpm geschüttelt. Die Hefekultur wies eine OD_{600nm}>1 auf, was einem normalen Hefewachstum entspricht. Das exprimierte PABP wirkt dementsprechend nicht toxisch auf die Hefezellen.

2.2.3.4 Proteinextraktion aus Hefe

Lösungen

Cracking-Puffer Stammlösung:	8 M Harnstoff	
	5% (w/v) SDS	
	40 mM Tris-HCl, pH 6,8	
	0,1 mM EDTA	
	0,4 mg/ml Bromphenolblau	
Cracking-Puffer komplett:	1 ml Cracking-Puffer Stammlösung	
	10 μl β-Mercaptoethanol (14, 4 M)	
	45 µl Protease-Inhibitor Complete (25x)	

5 ml DOB/-T Medium wurden mit einer Hefekolonie angeimpft und über Nacht bei 30°C und 250 rpm inkubiert. Mit der gesamten Übernachtkultur wurden 50 ml YPDA-Medium angeimpft und erneut bei 30°C und 250 rpm inkubiert, bis eine OD_{600nm} von 0,4-0,6 (4-8 h) erreicht wurde. Der gemessene OD_{600nm}-Wert wurde mit dem Kulturvolumen multipliziert, um so das Volumen des Cracking-Puffers für die OD_{600nm}-Einheiten bestimmen zu können. Die Hefezellen wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 1000 x g und 4°C sedimentiert und mit 50 ml eiskaltem H₂O gewaschen. Die Hefezellen wurden wieder zentrifugiert und in 100 µl auf 60°C vorgewärmten Cracking-Puffer (komplett) pro 7,5 OD_{600nm}-Zelleinheiten aufgenommen. Im Laufe der weiteren Prozedur wurde alle 7 min 1 µl frisches PMSF (100 mM) pro 100 µl Cracking-Puffer zugefügt. Die Zellsuspension wurde mit 80 µl Glasperlen (425-600 µm, Sigma) pro 7,5 OD_{600nm}-Zelleinheiten versetzt und 10 min bei 70°C inkubiert. Die Suspension wurde anschließend 1 min stark gemischt und für 5 min bei 16.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und auf Eis gestellt. Das Sediment wurde mit weiteren 100 µl Cracking-Puffer versetzt. Nach 5 min Inkubation bei 100°C wurde die Suspension erneut 1 min gemischt und wie oben zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit dem ersten Überstand vereinigt und zur Analyse entweder sofort auf ein SDS-Gel aufgetragen oder bei -80°C gelagert.

50 µl PMSF (100 mM)

2.2.3.5 Hefe-Zwei-Hybrid-Screen (Yeast Mating)

Zellen des Hefestammes AH109 wurden mit dem gewünschten Köderplasmid pGBKT7-PABP transformiert (Kapitel 2.2.3.2). Mit einer Kolonie der transformierten Hefen wurden 50 ml DOB/-T-Medium (mit 20 mg/l Kanamycin) angeimpft und für 24 h bei 30°C und 250 rpm geschüttelt. Die Hefekultur sollte dann eine OD_{600nm}>1 aufweisen. Die Zellen wurden bei 1000 x g für 5 min zentrifugiert, und das Pellet wurde in 5 ml DOB/-T-Medium resuspendiert. Eine 1 ml Probe der MatchmakerTM Human Brain Pretransformed Library (Clontech, Zellsuspension von S. cerevisiae Y187, prätransformiert mit einer humanen Gehirn-cDNA-Bank) wurde bei RT aufgetaut und zusammen mit den 5 ml der AH109-Köderkultur in einen 2 1 Erlenmeyerkolben, der 45 ml 2x YPDA-Medium (mit 50 µg/ml Kanamycin) enthielt, gegeben. Der Ansatz wurde anschließend für 24 h bei 30°C und 50 rpm inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen für 10 min bei 1000 x g zentrifugiert, und das Pellet wurde in 10 ml 0,5x YPDA-Medium (mit 50 µg/ml Kanamycin) resuspendiert. Um die Mating-Effizienz zu bestimmen, wurden je 100 µl einer 1:10000, 1:100 und 1:10 Verdünnung auf je drei verschiedene Selektionsplatten (DOB/-L, DOB/-T, DOB/-L-T) ausgestrichen. Der Rest des Mating-Ansatzes wurde in 200 µl Aliquots auf 52 DOB/-T-L-H-A-Selektionsplatten ausgestrichen und 5 Tage bei 30°C inkubiert.

2.2.3.6 *a*-Galactosidase Test

Mit dem α -Galactosidase Test wurde die Protein-Interaktion von positiven Klonen aus dem Hefe-Zwei-Hybrid-*Screen* überprüft. Dazu wurden die entsprechenden Hefe-Klone auf DOB/-T-L-H-A-Masterplatten ausgestrichen, die vorher mit 200 µl X- α -Gal-Lösung (4 mg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- α -D-Galactopyranosid in Dimethylformamid (DMF)) überschichtet und für 15 min bei 30°C getrocknet wurden. Wird das Reportergen MEL1 aktiviert, welcher für das Sekretionsenzym α -Galactosidase kodiert, führt dies zur Hydrolyse von X- α -Gal und es entsteht ein blaues Endprodukt (5-Brom-4-chlor-3-indol).

Nach zwei bis drei Tagen waren die Klone groß genug, so daß die Blaufärbung zu erkennen war. Die Masterplatten wurden mit Paraffin verschlossen und bei 4°C gelagert. Es wurden auch Glycerolkulturen angelegt, die bei -70°C gelagert wurden.

2.2.3.7 Plasmid-Präparation aus Hefezellen

Für die Analyse der exprimierten Proteine von positiven Klonen aus den Hefe-Zwei-Hybrid-*Screens* wurden zunächst die entsprechenden Plasmide aus den Hefezellen isoliert.

Dazu wurden 3 ml DOB/-L-Medium mit einer transformierten Kolonie des Hefestamms AH109 bzw. Y187 angeimpft und zwei Tage bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Hefezellen wurden für 5 min bei 1000 x g zentrifugiert, und das Zellpellet wurde in 100 µl STET-Puffer (8% Sucrose, 50 mM Tris/HCl, 50 mM EDTA, 5% Triton X-100, pH 8,0) suspendiert. Zur Lyse wurden die Hefezellen zusammen mit 0,2 g Glasperlen (425-600 µm, Sigma) für 5 min gemischt. Dann wurden weitere 100 µl STET-Puffer zu der Suspension gegeben und für 5 min auf 100°C erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Die unlöslichen Zellbestandteile und die Glasperlen wurden für 10 min bei 16.000 x g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand nach Zugabe von 0,5 Volumen (90 µl) Ammoniumacetat für eine Stunde bei -80°C inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation (30 min, 16000 x g, 4°C) wurden 180 µl des Überstandes mit 2 Volumina (360 µl) absolutem Ethanol versetzt und 30 min bei -80°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch eine weitere Zentrifugation (30 min, 16.000 x g, 4°C) sedimentiert und das Sediment nach dem Trocknen in 100 µl H₂O aufgenommen. Die DNA wurde dann mit Hilfe des QIAEX II Agarose Gel Extraction Kits (Qiagen) gereinigt. Die DNA wurde zuerst mit 20 µl H₂O für 5 min bei RT und dann mit weiteren 20 µl H₂O für 5-10 min bei 50°C eluiert. Das gesamte Eluat wurde in TopF10-Zellen transfomiert (Kapitel 2.2.1.8). Aus den Bakterien konnten anschließend größere Mengen Plasmid-DNA isoliert (Kapitel 2.2.1.9) und zur Analyse über Restriktionsverdau (Kapitel 2.2.1.4) und DNA-Sequenzierung (Kapitel 2.2.1.11) eingesetzt werden.

2.2.4 Zellkultur

2.2.4.1 Kultivierung von Zellen (HEK293, HeLa, COS7, NIH 3T3)

Zellkulturmedium:	DMEM (+ 10% FCS) (<u>D</u> ulbecco's <u>m</u> odified <u>E</u> agle's <u>m</u> edia):
	4500 mg/ml Glukose, 10% [v/v] FCS (<i><u>Fetal calf serum</u></i> ,
	inaktiviert; 30 min, 56°C), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml
	Streptomycin
Versene-Puffer pH 7,4:	0,54 mM EDTA, 136,89 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,24 mM
	Na ₂ HPO ₄ , 1,32 mM KH ₂ PO ₄ , autoklaviert
1 x PBS pH 7,2:	Sigma, autoklaviert

HEK293-, HeLa-, COS7- und NIH 3T3-Zellen wurden als *monolayer*-Kulturen bei 37°C und in einer 5%-igen CO₂-Atmosphäre in 10 cm Zellkulturschalen kultiviert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM (+ 10% FCS). Nach zwei bis drei Tagen wurden die konfluent gewachsenen Zellen passagiert. Dazu wurden die Zellen einmal mit PBS pH 7,2 (HEK293) oder mit Versene-Puffer pH 7,4 (HeLa, COS7, NIH 3T3) gewaschen und mit 0,25% Trypsin in PBS oder Versene-Puffer inkubiert, bis sich die Zellen von den Schalen ablösten. Zur Inhibierung der Trypsinaktivität wurden die von der Zellkulturschale abgelösten Zellen mit 10 ml DMEM (+ 10% FCS) versetzt. Die Zellsuspension wurde mit frischem Zellkulturmedium 1:5 bis 1:10 verdünnt und auf neue Kulturschalen überführt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Hämocytometer (Doppel-Neubauer-Zählkammer).

2.2.4.2 Transfektion von Zellen

Transfektion mit FuGENE-6

Zur Transfektion mit FuGENE 6 (Roche) wurden die Zellen 24 h vor der Transfektion auf 10 cm Platten, 6 cm Platten oder 12-Loch-Platten in DMEM mit 10% hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserum ohne Antibiotika-Zusätze ausplattiert. Für die Transfektion in 6 cm Zellkulturschalen wurden 200 μ l OptiMEM (Invitrogen) in einem Eppendorfgefäß vorgelegt und 6 μ l FuGENE 6 dazugegeben. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurden 2 μ g DNA des gewünschten Plasmids dazugegeben. Bei einer Ko-Transfektion wurde von jedem Plasmid 1 μ g DNA eingesetzt. Es folgte eine weitere Inkubation bei RT für 20-30 min. Der Transfektionsansatz wurde tropfenweise auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen für 24-48 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Für die anderen Plattengrößen wurde der Transfektionsansatz nach Tabelle 6 angepasst.

Tabelle 6: Pipettierschema für die Transfektion mit FuGENE 6 in verschiedenenZellkulturplatten.

Plattentyp	OptiMEM	FuGENE 6	Plasmid-DNA
10 cm	600 µl	18 µl	бµg
6 cm	200 µl	6 µl	2 µg
12-Loch	50 µl	1,5 µl	0,5 µg

Transfektion mit Calciumphosphat

Zur Transfektion größerer Zellmengen in 10 cm Zellkulturschalen wurde die Calciumphosphat-Methode verwendet. Dazu wurden 10 µg Plasmid-DNA in 500 µl 250 mM CaCl₂ tropfenweise zu 500 µl 2 x HBS (1,5 mM Na₂HPO₄, 50 mM HEPES, 280 mM NaCl, 10 mM KCl, 12 mM Glucose, pH 7,1) gegeben, und der Ansatz wurde 20 min bei RT inkubiert. Das Präzipitat wurde vorsichtig auf die etwa 70% konfluent-gewachsenen Zellen gegeben und im Brutschrank inkubiert. Nach etwa 6 h wurde das Medium abgesaugt. Die Zellen wurden einmal mit 10 ml PBS pH 7,2 (HEK293) oder mit Versene-Puffer pH 7,4 (HeLa, COS7, NIH 3T3) gewaschen. Nach dem Waschen wurde frisches Medium auf die Zellen gegeben.

2.2.4.3 Kultivierung und Transfektion von primären Hippocampusneuronen

Hippocampusneurone der Ratte wurden entsprechend den publizierten Methoden (Blichenberg *et al.*, 1999) von Rattenembryonen (E19) präpariert, mit folgender Modifikation: Die Neurone wurden in 12-Loch-Platten auf Deckgläschen ohne Beschichtung in Neurobasalmedium (Invitrogen) kultiviert, das zusäzlich B27 (Invitrogen) enthielt. Die präparierten Neurone wurden freundlicherweise von Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von Hans-Jürgen Kreienkamp und Stefan Kindler zur Verfügung gestellt (Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf).

Die Transfektion der Neurone erfolgte nach 7 Tagen Kultivierung mit der Calciumphosphat-Kopräzipitations-Methode. Dazu wurden für die Transfektion von Neuronen auf zwei Deckgläschen 10 µg DNA in 90 µl sterilem destilliertem Wasser gelöst, eingesetzt in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß 10 µl 2,5 M CaCl₂-Lösung zugetropft, gemischt und kurz zentrifugiert. Unter konstanter Luftzufuhr in dem Reaktionsgefäß (mithilfe einer Pasteurpipette) wurden tropfenweise 100 µl 2x BBS-Puffer (50 mM BES, pH 6,90-6,96, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄) dazugegeben. Der Ansatz wurde 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden pro Deckgläschen 100 µl des Ansatzes zu den Neuronen getropft. Nach ca. 4 h Inkubation im Brutschrank wurden die gebildeten CaPO₄-Kristalle durch Waschen mit HBSS-Puffer (*Hanks buffered salt solution*, Invitrogen) entfernt. Die Neurone wurden in Neurobasalmedium weiterkultiviert. Am nächsten Tag wurden die Neurone auf Deckgläschen fixiert (Kapitel 2.2.4.4), und die Immunzytochemie wurde durchgeführt.

2.2.4.4 Immuncytochemische Methoden

Immunzytochemische Analyse von Proteinen in HEK-, HeLa- und COS7-Zellen sowie in primären Hippocampusneuronen

Auf Deckgläschen in 12-Loch-Platten kultivierte Zellen wurden durch Zugabe von einem Volumen Fixierlösung (1% oder 4% Paraformaldehyd (w/v) in 1x PBS pH 7,2) zum Medium vorfixiert. Nach einer zehnminütigen Inkubation bei RT wurde die Lösung abgesaugt und durch jeweils 1 ml Fixierlösung pro Loch ersetzt. Es folgte eine weitere Inkubation für 15 min bei RT. Anschließend wurden die Zellen zweimal je 5 min mit 1x PBS pH 7,2 gewaschen. Zum Permeabilisieren wurden die Zellen mit 0,3% Triton X-100 (w/v) in PBS für 5 min bei RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen für je 5 min mit PBS wurden die Zellen sofort für immunzytochemische Analysen eingesetzt.

Zur Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen wurden die Zellen für eine Stunde bei RT mit TNB-1 (0,1 M Tris-HCl pH 7,5, 0,15 M NaCl, 1% *DuPont Blocking Reagens*) inkubiert. Die Inkubation mit der Blockierlösung bzw. mit den primären und sekundären Antikörpern erfolgte in einer feuchten Kammer, wobei die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten auf 50 µl der entsprechenden Lösung gelegt wurden, die vorher auf Parafilm pipettiert wurden. Die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper (verdünnt in TNB-1) erfolgte für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Die Deckgläser wurden dreimal je 5 min mit PBS; pH 7,2 gewaschen und mit entsprechenden fluoreszierenden Sekundärantikörpern (verdünnt in TNB-1) bei RT für eine Stunde inkubiert. Zuletzt wurden die Zellen viermal mit PBS gewaschen und auf Objektträger in *Permafluor Mounting Medium* (Beckman Coulter) oder PeqGOLD (*ProLong Gold antifade reagent with DAPI*, Invitrogen) eingebettet. Die Verdünnungen der verwendeten Antikörper sind den Tabellen 4 und 5 zu entnehmen.

Immunhistochemische Analyse von Proteinen in Rattenhirnschnitten

Für immunhistochemische Analysen wurden 15 μm dicke, auf Objektträgern fixierte Kryoschnitte von adulten Rattengehirnen verwendet. Die Schnitte wurden direkt nach dem Schneiden für 10 min in vorgekühltem Aceton (bei -20°C) fixiert, dann kurz bei RT getrocknet und bei -25°C bis zur Immunhistochemie gelagert. Die Schnitte wurden 20 min bei Raumtemperatur aufgetaut und an der Luft getrocknet und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur in 1% PFA (w/v) in 1x PBS pH 7,2 fixiert. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min mit 1x PBS pH 7,2 wurden die Schnitte für 5 min mit 0,3% Triton X-100 (w/v) in 1x PBS permeabilisiert. Die Schnitte wurden erneut zweimal mit PBS gewaschen und wie oben bei der Immunzytochemie beschrieben mit Blockierlösung und mit Primär- und

Sekundärantikörpern inkubiert. Es wurden ca. 150 µl der jeweiligen Lösungen direkt auf die Schnitte pipettiert und in einer feuchten Kammer wie oben beschrieben inkubiert.

2.2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.2.5.1 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Bradford Methode (Bradford, 1976). Dazu wurde das *Protein Assay Reagent* (Bio-Rad) nach Angaben des Herstellers verwendet. Als Standard diente BSA (*bovine serum albumin*; 0,5 mg/ml), das in einer Eichreihe mit 6 Konzentrationen von 0-10 μ g in 20 μ l H₂O eingesetzt wurde.

2.2.5.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch SDS-PAGE (Laemmli, 1970) und wurde mit der Elektrophoresekammer *Mini-PROTEAN®II* (Bio Rad, München) durchgeführt. Je nach Größe der zu detektierenden Proteine wurden 8-15% ige SDS-Polyacrylamid-Gele (Sambrook *et al.*, 1989) verwendet. Die Proteinlösungen wurden mit 5-fach konzentriertem Probenpuffer (50% Glycerin [v/v], 0,5 M DTT, 10% SDS [w/v], 0,4 M Tris-HCl pH 6,8, Bromphenolblau; Laemmli *et al.*, 1970) versetzt und zur Denaturierung für 10 min auf 80-100°C erhitzt. Die Proben wurden anschließend auf das Gel geladen und bei 200 Volt im 1 x SDS-Laufpuffer (25 mM Tris-Base, 19,2 mM Glycin, 0,1% SDS [w/v]) für 30-60 min aufgetrennt. Die Größe der Proteine wurde anhand vorgefärbter Protein-Molekulargewichtsstandards (*Full Range Rainbow Marker* von Amersham Bioscience und *BenchMark* von Invitrogen) bestimmt. Im Anschluss wurden die Gele entweder mit dem Reagenz *Roti-Blue* (Roth) gefärbt, oder die Proteine wurden für *Western Blot*-Analysen aus den Gelen auf Nitrocellulose-Membranen transferiert (Kapitel 2.2.5.3).

2.2.5.3 Transfer und immunologische Detektion von Proteinen auf Nitrocellulosemembran (*Western Blot*)

Zum Nachweis von Proteinen im *Western Blot* wurden diese nach Auftrennung durch SDS-PAGE (Kapitel 2.2.5.2) elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran (*PROTAN*, Schleicher & Schuell) mit einem *Semi-Dry Blotter* (Merck) nach Anleitung des Herstellers transferiert. Der Transfer erfolgte in Transferpuffer (50 mM Tris, 30 mM Glycin, 10% Methanol [v/v], Towbin et al., 1979) bei maximal 30 Volt und 150 mA für ca. eine Stunde. Transfer wurde durch eine einminütige Anfärbung der Proteine auf der Der Nitrocellulosemembran mit Hilfe von Ponceau S Solution (Sigma) überprüft. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blockierlösung (5% Magermilchpulver [w/v], 0,3% Tween 20 [v/v] in 1 x PBS pH 7,4) inkubiert. Es folgte die Inkubation mit dem gewünschten 1. Antikörper, der entsprechend (Tabelle 4) in Blockierlösung verdünnt wurde, über Nacht bei 4°C oder für 2-4 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln. Nach drei zehnminütigen Waschschritten mit PBS-T (0,3% Tween 20 [v/v] in 1 x PBS pH 7,4) folgte die Inkubation mit einem geeigneten HRP (horseradish *peroxidase*)-gekoppelten Sekundärantikörper (Tabelle 4) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 min wurden die mit dem Sekundärantikörper markierten Proteine mit dem **ECL-Reagenz** (Enhanced Chemiluminescence, Lumi-Light Western Blotting Substrate, Roche Diagnostics) nach Herstellerangaben detektiert. Das Chemilumineszenzsignal wurde auf einem Röntgenfilm (Cronex 5 Medical X-Ray Film, Agfa) festgehalten.

2.2.5.4 Expression und Aufreinigung von GST (Glutathion S-Transferase)-Fusionsproteinen

Für die Expression von GST-Fusionsproteinen wurde die gewünschte DNA-Sequenz in den Vektor pGEX6P2 kloniert und in E.coli BL21-Zellen transformiert (Kapitel 2.2.1.8). 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin (LB-Amp) wurden mit einer einzelnen transformierten Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Mit 4 ml dieser Vorkultur wurden 200 ml LB-Amp angeimpft und bei 37° geschüttelt, bis eine OD_{600nm} von 0,6 erreicht wurde. Zur Induktion der Proteinexpression wurde IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid, Endkonzentration 0,5 mM) zu der Bakterienkultur gegeben und für weitere 2 h bei 30°C inkubiert. Die Bakterienzellen wurden anschließend durch Zentrifugation (15 min, 3500 rpm, 4°C, Heraeus) pelletiert und einmal mit 10 ml TBS-Puffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,0) gewaschen. Die Zellsedimente wurden über Nacht bei -20°C eingefroren. Zur Zelllyse wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und in 10 ml TBS, das 10 mM DTT und Protease-Inhibitoren (1 µg/ml Pepstatin A, 1 mM PMSF) enthielt, resuspendiert. Zu der Suspension wurden 100 µl Lysozym (10 mg/ml) gegeben und 20 min bei 4°C langsam gerührt. Nach der Inkubation wurde das Zelllysat auf Eis mit einem Ultraschallstab (SONIFER[®] B-12, Branson Sonic Power) auf Stufe 5 für 5 x 5 sec beschallt.

Anschließend erfolgte die Zugabe von 1,5 ml 10% N-Lauroylsarcosin in TBS. Nach 20 min Inkubation unter Rühren auf Eis wurden 2 ml 10% Triton X-100 in TBS zugegeben und für weitere 30 min gerührt. Die Zellsuspension wurde für 20 min bei 4° und 15000 rpm (Sorvall A8.24) zentrifugiert. Zum Binden des GST-Fusionsproteins wurde der Überstand mit 1 ml Glutathion-Sepharose (Amersham Bioscience) versetzt, die zuvor mit TBS äquilibriert wurde. Der Ansatz wurde für 4 h bei 4°C unter Rotieren inkubiert. Die Sepharosematrix wurde für 5 min bei 4°C und 500 x g sedimentiert und anschließend dreimal mit je 10 ml eiskaltem TBS gewaschen. Die an Sepharose gekoppelten GST-Fusionsproteine wurden zweimal mit je 2 ml Elutionspuffer (10 mM reduziertes Glutathion in 50 mM Tris-HCl pH 8,0) für 15 min bei 4°C eluiert. Zur Analyse des Fusionsproteins wurde eine kleine Menge im SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie (Coomassie-Brillant-Blau R-250) gefärbt (Kapitel 2.2.5.2). Der Rest der Proteinlösung wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.5.5 Herstellung von spezifischen Makorin1-Antiseren

Zur Herstellung eines gegen Makorin1 gerichteten Antiserums wurde die gesamte kodierende cDNA von humanem Makorin1-short in den pGEX-6P2-Vektor kloniert und in *E. coli* BL21-Zellen als GST-Makorin1-short-Fusionsprotein exprimiert und wie oben (Kapitel 2.2.5.4) beschrieben aufgereinigt. 1 mg Fusionsprotein wurde als Lösung für die Immunisierung von zwei Kaninchen und einem Meerschweinchen der Firma *Pineda Antikörper-Service*, Berlin, zugeschickt. Die Seren der immunisierten Tiere wurden im *Western Blot* getestet. Dazu wurden Proteinextrakte aus HEK293-Zellen, die vorher mit pcDNA3-T7-Makorin1-short transfiziert wurden, über SDS-PAGE aufgetrennt und im *Western Blot* jeweils mit den Seren inkubiert (Kapitel 2.2.5.3).

2.2.5.6 Herstellung von Proteinextrakten aus HEK293- oder HeLa-Zellen

Transfizierte oder nicht transfizierte HEK293- bzw. HeLa-Zellen in 6 cm Schalen wurden einmal mit 5 ml PBS pH 7,2 gewaschen. Anschließend wurden sie in 5 ml PBS mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und die Zellen wurden bei 1500 rpm für 5 min bei 4°C (Megafuge, Heraeus) sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 500 µl Lysispuffer (120 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5% [w/v] Nonidet P-40, 1 x Proteaseinhibitor (*CompleteTM*, Roche)) aufgenommen, homogenisiert und 30 min bei 4°C inkubiert. Das Homogenat wurde zur Entfernung der DNA sowie der anderen unlöslichen Zellbestandteile für 15 min bei 16.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und entweder sofort verwendet oder zur späteren Verwendung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Alternativ wurden die Zellen mit RIPA-Puffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,5, 1% NP-40, 0,1% SDS, 0,5% Natriumdesoxycholat, 5 mM EDTA, 1 x Proteaseinhibitor (*CompleteTM*, Roche)) lysiert. Dazu wurden die Zellen wie oben beschrieben mit PBS gewaschen, und es wurden 500 μ l RIPA-Puffer direkt in die Schale pipettiert, die anschließend 30 min bei 4°C inkubiert wurde. Das Homogenat wurde wie oben zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

2.2.5.7 Immunpräzipitation aus transient transfizierten HEK293- oder HeLa-Zellen

Für die Immunpräzipitation wurden 2-3 μ g der gewünschten Antikörper bzw. Kaninchen IgG als Kontrolle an magnetische *Dynabeads® Protein A* (Dynal Biotech) oder an Protein A/G-Agarose (Pierce) gebunden. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Vor der Inkubation mit den Antikörpern wurden je 25 μ l der *Dynabeads* bzw. Protein-A-Agarose dreimal mit je 1 ml Lysispuffer oder RIPA-Puffer gewaschen und anschließend mit den Antikörpern für 2 h inkubiert. Zur Entfernung der nichtgebundenen Antikörper wurde die Agarose bzw. die *Beads* dreimal mit Lysis- oder RIPA-Puffer gewaschen und mit dem hergestellten Proteinextrakt (Kapitel 2.2.5.6) für 4-6 h oder über Nacht bei 4°C unter Rotation inkubiert. Vor der Inkubation wurden von dem Proteinextrakt 50 μ l für die spätere Analyse entnommen und mit 5x Laemmli-Puffer versetzt. Die Agarose bzw. die *Beads* wurden sedimentiert und fünfmal mit je 1 ml Lysis- oder RIPA-Puffer gewaschen. Im Anschluß wurden die Sedimente in 50 μ l 2x Laemmli-Puffer resuspendiert und für 10 min gekocht.

Im Falle einer Immunpräzipitation mit dem anti-FLAG Antikörper wurden *EZ viewTM ANTI-FLAG® M2-Agarose-Beads* (Sigma-Aldrich) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Lysate und Immunpräzipitate wurden mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.2.5.2) und *Western Blot* (Kapitel 2.2.5.3) analysiert.

2.2.5.8 Identifizierung von PABP- und MKRN1-interagierenden Proteinen, PDZ-Pulldown

Der PDZ (*PSD-95/discs large/ZO-1*)-*Pulldown* ist eine Affinitätsaufreinigungsmethode (Brendel *et al.*, 2004; s. Beschreibung in Kapitel 3.2.2), bei der sich die sehr starke und spezifische Interaktion zwischen der PDZ-Domäne des neuronalen Proteins SSTRIP

(*somatostatin receptor interacting protein*)/Shank und dem C-Terminus des Proteins GKAP (*cGMP-dependent Kinase Anchoring Protein*) zu Nutze gemacht wird (Naisbitt *et al.*, 1999; Tu *et al.*, 1999).

Zur Durchführung des Versuches wird die kodierende cDNA von dem gewünschten Protein in den pPDZ-Vektor kloniert. Dieser Vektor enthält die Sequenz der PDZ-Domäne von SSTRIP/Shank, sodass ein Fusionsprotein aus dem zu untersuchendem Potein und der Cterminal fusionierten PDZ-Domäne entsteht. Das Fusionsprotein wird in Zellkultur transient überexprimiert und aus den Zellen ein Gesamtproteinlysat hergestellt. Das Proteinlysat wird mit einem synthetischen Peptid aus den letzten zehn C-terminalen Aminosäuren von GKAP, das kovalent an NHS-Sepharose gekoppelt wurde, inkubiert. Die PDZ-Domäne bindet an das GKAP-Motiv und der Proteinkomplex kann durch Sedimentation isoliert werden.

Zur Identifizierung von PABP- und MKRN1-interagierenden Proteinen wurden HEK293-Zellen (je zwölf 10 cm Schalen) mit pPDZ-PABP-N1 bzw. pPDZ-Makorin1-N1 mit der Calciumphosphat-Methode transfiziert. Untransfizierte HEK293-Zellen dienten zur Kontrolle. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert. Jeweils die Hälfte der Zellysate wurde für einen RNAse-freien *Pulldown* verwendet, die andere Hälfte der Zellysate wurde mit RNAse behandelt.

Vor der Lyse mit je 1ml/Schale RIPA-Puffer + RNAse Out (100 U/ml) bzw. RIPA-Puffer + RNAse A (40 μ g/ml) wurden die Zellen zweimal mit je 10 ml kaltem PBS pro Schale gewaschen. Die Lyse erfolgte für 15 min bei 4°C. Anschließend wurden die Lysate in Eppendorfgefäße überführt und 15 min bei 16000 rpm und 4°C (Eppendorf-Tischzentrifuge) zentrifugiert. Die Überstände von jeweils 6 Eppendorfgefäßen wurden in einem 15 ml Falcon-Gefäß vereinigt. Danach erfolgte die Zugabe von PMSF (100 µM) sowie von 80 µl einer einmal mit RIPA-Puffer gewaschenen GKAP-NHS-Sepharose-Suspension. Die Zelllysat-GKAP-Sepharose-Suspension wurde über Nacht bei 4°C in einem Überkopf-Schüttler inkubiert. Anschließend wurde der GKAP-Sepharose-Komplex für 1 min bei 4°C und 1200 rpm (Megafuge, Heraeus) sedimentiert und fünfmal mit je 1 ml RIPA-Puffer gewaschen. Die an den GKAP-Sepharose-Komplex gebundenen Proteine wurden zweimal mit je 30 µl 2x Laemmli-Probenpuffer für 5 min gekocht und die Eluate vereinigt. 30 µl der Eluate wurden auf einem SDS-Gel (Kapitel 2.2.5.2) aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine mit kolloidalem Coomassie (Roti-Blue, Roth) nach Angaben des Herstellers angefärbt. Die Proteinbanden wurden ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert (Dr. Friedrich Buck und Sönke Harder. Institut für Klinische Chemie/Zentrallaboratorien. Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf).

2.2.6 Präparation von Polysomen aus adulten Rattenhippocampi

Zur Präparation der Polysomen wurden zwei Hippocampi adulter Ratten in 2 ml Homogenisationspuffer (20 mM HEPES, pH 7,8, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0,5% Triton X-100, 2 mM DTT, 1 x Complete EDTA-free, 100 μ g/ml Cycloheximid, 100 u/ml RNase OUT) homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 16.400 x g bei 4°C für 10 min zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen. Der Überstand, in dem sich die Polysomen befinden, wurde auf einen 15-45%-igen (15%, 25%, 35%, 45%) Saccharose-Stufengradienten geschichtet. Der Gradient wurde mit einem Kissen von 0,5 ml 60%-iger Saccharose unterlegt. Insgesamt betrug das Volumen des Gradienten 10,5 ml. Die Ultrazentrifugation erfolgte in einem TH 641-Rotor (Beckman Instruments) bei 41.000 rpm (150.000 x g) für 105 min bei 4°C. Nach der Zentrifugation wurden 1 ml-Fraktionen (10 Fraktionen) mit der Pipette von oben abgenommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

Zur Fällung der RNA wurden von allen Fraktionen des Gradienten je 200 µl abgenommen. Diese wurden jeweils mit EDTA (10 mM), Hefe-tRNA (0,044 mg/ml) und 2,5 Volumina absolutem Ethanol versetzt und für 2 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Das RNA-Sediment wurde in RNase-freiem Wasser gelöst und mit Hilfe von *PeqGold RNA Pure* (PeqLab) nach Herstellerangaben gereinigt. Die Integrität der isolierten RNA wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. Die Konzentration wurde photometrisch durch Messung der Extinktion bei 260 nm mittels eines Biophotometers (Eppendorf) bestimmt.

2.2.7 RNA-Protein-Bindungsstudien durch Affinitätschromatographie

Für die Analyse von Proteinen, die an Vasopressin-mRNA binden, wurden biotinylierte VP-Transkripte (Kapitel 2.2.2.3) an Streptavidin-beschichtete paramagnetische Partikel (Promega) gekoppelt, die mit Proteinlysaten aus dem Rattenhirn oder HEK293-Zellen inkubiert wurden. Die an die VP-Transkripte spezifisch gebundenen Proteine wurden nach mehrmaligem Waschen mit 1x Laemmli-Probenpuffer eluiert. Kopplung der biotinylierten VP-cRNA an Streptavidin-beschichtete paramagnetische Partikel Für die Kopplung der VP-cRNA (Kapitel 2.2.2.2) wurden 0,6 ml mit Streptavidinbeschichtete paramagnetische Partikel (1 mg/ml, Promega) eingesetzt, die dreimal mit je 1 ml PBS pH 7,4 gewaschen wurden. Anschließend erfolgte die Kopplung von 300 pmol biotinylierter RNA in 1 ml PBS für 3 h unter Rotation bei 4°C. Vor und nach der Inkubation mit paramagnetischen Partikeln wurden 20 Bestimmung den μl zur der Nukleinsäurekonzentration durch Messung der Extinktion bei 260 nm abgenommen, um anschließend die Kopplungseffizienz berechnen zu können.

Nach der Inkubation wurden die paramagnetischen Partikel mit Hilfe eines Magneten an der Gefäßwand festgehalten. Der Überstand mit der nicht-gebundenen RNA wurde abgenommen und verworfen. Die mit biotinylierter RNA gekoppelten Partikel wurden dreimal mit je 1 ml PBS gewaschen und dreimal mit je 1 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) äquilibriert.

Die Kopplungseffizienz betrug in der Regel 10-30 Prozent.

Affinitätschromatographie

Für die Untersuchung von RNA-Protein-Interaktionen wurde ca. 1 mg Protein in 0,5-1 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, 1x Proteaseinhibitor (*CompleteTM*, Roche), 2,5 mg/ml Heparin) zu den mit VP-Transkripten gekoppelten paramagnetischen Partikel gegeben. Der Ansatz wurde 30 min bei RT unter Rotation inkubiert. Anschließend wurde der Überstand mit den nicht gebundenen Proteinen entfernt. Die paramagnetischen Partikel wurden einmal für 2 min mit 1 ml Bindungspuffer und zweimal für je 2 min mit Bindungspuffer ohne Heparin gewaschen. Die spezifisch an die VP-Transkripte gebundenen Proteine wurden mit 50 μ l 2x Laemmli-Probenpuffer für 10 min bei 100°C eluiert. Das Eluat wurde auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine im Gel durch kolloidales Coomassie (*Roti-Blue*, Roth) nach Angaben des Herstellers angefärbt oder im *Western Blot* detektiert.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung von PABP-Interaktionspartnern mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems

Um die Funktionen von PABP bei der dendritischen Lokalisierung, der Translation sowie dem Metabolismus verschiedener mRNAs besser zu verstehen, sollten neue Protein-Interaktionspartner für PABP identifiziert werden. Dazu wurde das Hefe-Zwei-Hybrid (YTH)-System verwendet, das im Kapitel 2.2.3.1 vorgestellt wurde.

Zur Durchführung des YTH-Systems wurde die gesamte kodierende cDNA-Sequenz des PABP der Ratte in das pGBKT7-Plasmid einkloniert und in den Hefestamm AH109 transformiert. Hierbei wird PABP als Fusionsprotein mit der GAL4-DNA-Bindedomäne exprimiert und dient in diesem Fall als Köderprotein. Das pACT2-Beuteplasmid, in das bereits eine humane Gehirn-cDNA-Bibliothek einkloniert war (Clontech), wurde in den Hefestamm Y187 transformiert, und es wurden Fusionsproteine mit der GAL4-Aktivierungsdomäne exprimiert. Um die transformierten Hefezellen zu selektieren, wurden Mangelmedien eingesetzt, denen bestimmte Aminosäuren fehlen. Die AH109- und Y187-Hefestämme wurden auf Trp⁻ bzw. auf Leu⁻-Selektionsplatten ausgestrichen. Der pGBKT7-Vektor enthält ein TRP1-Gen, sodass die mit diesem Vektor transformierten Hefezellen in oder auf Trp⁻-Mangelmedien wachsen können. Der pACT2-Vektor dagegen enthält ein LEU2-Gen, das zum Wachstum der Hefezellen auf Leu⁻-Mangelmedien führt.

Die Überexpression von Proteinen kann eine toxische Wirkung auf die Hefezellen ausüben. Dies wurde für PABP überprüft, indem das Wachstum der mit dem PABP-Fusionsgen transformierten, auf dem Trp⁻-Mangelmedium selektierten Hefezellen nach 24 h durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm bestimmt wurde. In diesem Fall wies das Hefewachstum eine $OD_{600nm}>1$, was ein normales Wachstum bedeutet. Somit wirkt das PABP-Köderprotein nicht toxisch auf die Hefezellen.

Prüfung auf Transaktivierung der Reportergene durch das Köderprotein

Wie bereits in Kapitel 2.2.3.1 ausführlich beschrieben, dienen die Reportergene HIS3, ADE2 und MEL1 als Interaktionsmarker beim Hefe-zwei-Hybrid-System (YTS). Die Expression dieser Reportergene unterliegt dem GAL4-Promoter. Die hier im YTH-System eingesetzten, haploiden Hefestämme AH109 und Y187 sind defizient für den GAL4-Transkriptionsfaktor. Das bedeutet, dass die Reportergene nur dann aktiviert werden, wenn es zu einer Interaktion des Köderproteins (Fusionsprotein mit der GAL4-DNA-Bindedomäne) mit den Beuteproteinen (Fusionsproteine mit der GAL4-DNA-Aktivierungsdomäne) kommt und so ein funktioneller GAL4-Transkriptionsfaktor entsteht. Dieser ermöglicht durch die Bindung an dem GAL-Promoter erst die Expression der Reportergene.

Durch die Aktivierung der Gene HIS3 und ADE2 sind die Hefen in der Lage, auf Histidinund Adenin-Mangelmedien zu wachsen. Die Aktivierung des MEL1-Gens führt zur Bildung des sekretorischen Enzyms α -Galaktosidase.

Um eine Transaktivierung der Reportergene HIS3 und ADE2 das Köderprotein PABP allein auszuschließen, wurde das Wachstum der mit pGBKT7-PABP transformierten AH109-Hefen auf Trp⁻/Ade⁻/His⁻-Selektionsplatten getestet (der Vektor pGBKT7 enthält die kodierende TRP1-Sequenz). Die mit pGBKT7-PABP transformierten Hefen wuchsen nicht auf diesen Selektionsplatten. Das bedeutet, dass das Köderprotein allein (GAL4-DNA-Bindedomäne-PABP) nicht zu einer Transkriptionsaktivierung der ADE2- und HIS3-Gene führt.

Weiterhin wurde die Transaktivierung des Reportergens MEL1 durch das Köderprotein ausgeschlossen. Dazu wurden die mit pGBKT7-PABP transformierten AH109-Hefen auf Trp⁻/X- α -Gal-Selektionsplatten ausgestrichen. Es waren keine blauen Kolonien zu erkennen, also wurde das Enzym α -Galaktosidase, das durch die Umsetzung des Substrats X- α -Gal eine Blaufärbung der Hefekolonien bewirkt hätte, nicht gebildet und somit fand im Umkehrschluss keine Aktivierung des MEL1-Gens statt. Der Ausschluß der Transaktivierung durch das Köderkonstrukt bestätigte, dass dieses für weitere Versuche geeignet war.

Hefe-Zwei-Hybrid-Screen

Durch Paarung (*Mating*) der transformierten Hefestämme AH109 und Y187 resultieren diploide Zellen, die sowohl das Köderprotein als auch die von der cDNA-Bank kodierten Fusionsproteine enthalten. Interagieren aus der cDNA-Bank kodierte Proteine mit PABP, entsteht so ein funktioneller GAL4-Transkriptionsfaktor, der die Reportergene aktiviert.

Die Paarungseffizienz der Hefestämme betrug 15%. Bei dem durchgeführten *Screen* wurden 3,9 x 10^7 Transformanden untersucht. Diese wurden auf Trp⁻/Leu⁻/Ade⁻/His⁻-Selektionsplatten ausgestrichen. Davon besaßen insgesamt 119 Klone die Fähigkeit zu wachsen. Um falschpositive Klone auszuschließen, wurden diese Klone einem α -Galaktosidase-Test unterzogen, der bei 104 Klonen positiv war.

Identifizierung der Klone

Zur Identifizierung der Hefeklone wurden die Plasmide isoliert, durch Restriktionsverdau analysiert und anschließend sequenziert. Von Klonen, die ein gleiches Restriktionsmuster aufwiesen, wurde jeweils nur einer sequenziert. Die von den pACT2-Klonen kodierten Proteine sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Identifiziertes Protein	GenBank accession	Häufigkeit
	number	
Makorin1-short	AM236048	20
PAIP1	NM_183323.2	18
RhoGEF 4	NM_015320	8
Ataxin-2	NM_002973	6
Plecstrin homology domain	AB209716.1	7
Pyruvat kinase	NM_001316318	8
Tetratricopeptide repeat domain 3 (TTC3)	NM_001001894	4

Tabelle 7: Potenzielle Interaktionspartner von PABP

Retransformation der identifizierten Klone

Um die Bindungsspezifität von PABP und den Beuteproteinen zu untersuchen, wurden Retransformationsversuche mit den identifizierten Klonen durchgeführt. Dazu wurden AH109-Hefen mit den jeweiligen Beuteprotein-Plasmiden (in Tabelle 7 aufgeführt) und dem pGBKT7-PABP-Plasmid kotransformiert. Als Kontrolle wurden AH109-Hefen mit Beuteprotein-Plasmiden und dem leeren pGBKT7-Vektor kotransformiert.

Die Retransformationsversuche zeigten alle ein positives Ergebnis, der Kontrollansatz mit dem leeren pGBKT7-Vektor war dagegen negativ. Eine unspezifische Interaktion von Beuteproteinen mit der GAL4-Bindedomäne oder mit den Promotorregionen der Reportergene, die zum Wachstum der Hefe auch auf den Selektionsplatten (Trp⁻/Leu⁻/Ade⁻/His⁻) geführt hätte, konnte somit ausgeschlossen werden.

Makorin1-short: Neuer Interaktionspartner von PABP

Der am häufigsten isolierte Klon (20 Mal) kodiert für eine C-terminal verkürzte Isoform des Proteins Makorin1 (hier Makorin1-short genannt). Im Vergleich dazu wurde der für PAIP-1 kodierende Klon 18 Mal gefunden. PAIP-1 ist seit langem als PABP-Interaktionspartner bekannt und ist sehr gut charakterisiert (Craig *et al.*, 1998). Ataxin-2 ist ebenfalls als Interaktionspartner von PABP beschrieben worden (Ralser *et al.*, 2005).

In dieser Arbeit wurde die Interaktion von PABP mit Makorin1-short näher charakterisiert, da dieser Klon am häufigsten isoliert wurde. Wie schematisch in der Abbildung 5A dargestellt, ist Makorin1 (hier Makorin1-long genannt) ein modular aufgebautes Protein mit vier C₃H-Typ-Zinkfingern und einem sogenannten Makorin-Typ-Zinkfinger, der eine ungewöhnliche Anordnung von Cystein- und Histidinresten aufweist. Zusätzlich besitzt Makorin1-long eine hoch konservierte C₃HC₄-Typ RING (*Really Interesting New Gene*)-Finger-Domäne (Gray *et al.*, 2000).



Abbildung 5: Schematische Darstellung der menschlichen Makorin1-Proteinstruktur und der genomischen Organisation des Makorin1-Gens

A: Makorin1-long ist ein modulares Protein, das vier Zinkfinger- (ZF), eine Makorin-Typ-Zinkfinger- (MTZF) und eine RING-Finger-Domäne (RF) enthält. B: Im Vergleich zu Makorin1-long fehlen Makorin1-short die letzten 6 Aminosäuren von der RING-Finger-Domäne, mit den darin enthaltenen zwei essentiellen Cysteinresten (RFΔCC). Das C-terminale Zinkfinger-Motiv fehlt ebenfalls. C: Die oberste Zeichnung zeigt die genomische Organisation des menschlichen Makorin1-Gens, das aus 8 Exons besteht. Die zwei unteren Zeichnungen zeigen die mRNAs, die für Makorin1-long und Makorin1-short kodieren. Sie entstehen durch alternatives Spleißen und differenzielle Polyadenylierung. Poly(A): Polyadenylierungssignal, Stopp: Stopp-Codon, rote und blaue Rechtecke: kodierende Exons der alternativen Formen

C₃H-Typ-Zinkfinger können häufig RNA-bindende Motive sein, so ist Makorin1 vermutlich auch ein RNA bindendes Protein (Gray *et al.*, 2000), obwohl bisher keine Ziel-RNAs für

Makorin1 bekannt sind. Die RING-Finger-Domäne vermittelt Protein/Protein-Interaktionen und ist charakteristisch für E3-Ubiquitinligasen (Übersichtsartikel: Hunter, 2007).

Alle in dieser Arbeit identifizierten PABP-interagierenden Makorin1-Klone kodieren für eine kürzere Proteinvariante, Makorin1-short. Bei dieser Variante ist der C-Terminus verkürzt. Der C-terminale Zinkfinger fehlt, und die RING-Finger-Domäne ist um die letzten sechs Aminosäuren verkürzt (Abbildung 5B). Die C-terminal verkürzte RING-Finger-Domäne ist vermutlich als E3-Ubiquitinligase nicht mehr funktionsfähig, da ihr zwei Cysteinreste fehlen, die essentiell für die Bindung des zweiten Zinkions sind. Das humane Makorin1-short-Protein besteht aus 329 Aminosäuren und weist eine berechnete Molekularmasse von 35,2 kDa auf. Im Vergleich dazu besteht Makorin1-long aus 482 Aminosäuren und besitzt eine Molekularmasse von 53,3 kDa (Gray *et al.*, 2000). Die Makorin1-short-mRNA entsteht durch alternatives Spleißen und differenzielle Polyadenylierung, schematisch dargestellt in Abbildung 5C.

3.2 Charakterisierung der Interaktion von PABP und Makorin1-short *in vivo*

Wie im vorigen Kapitel beschrieben, findet im Hefe-Zwei-Hybrid-System eine Interaktion von PABP und Makorin1-short statt. Diese Interaktion wurde anschließend *in vivo* in Säugerzellen überprüft. Dazu wurden zwei Methoden eingesetzt: die Koimmunpräzipitation und ein sogenannter PDZ-*Pulldown* (Kapitel 3.2.2).

3.2.1 Koimmunpräzipitation von PABP und Makorin1-short aus transfizierten HEK293-Zellen

Zur Koimmunpräzipitation wurde die gesamte kodierende Region von Makorin1-*short* in den pcDNA3-T7-Vektor kloniert, sodass das Protein in eukaryotischen Zellen nach Transfektion mit einem N-terminalen T7-*tag* exprimiert wurde. Das PABP wurde in den pCMV-2B-Vektor kloniert und so mit einem N-terminalen Flag-*tag* transient exprimiert.

Beide Konstrukte wurden in HEK293-Zellen kotransfiziert und die Zellen nach etwa 18 Stunden Expression mit RIPA-Puffer lysiert. Die Immunpräzipitation wurde mit einem Mausanti-Flag-Antikörper, der kovalent an Agarose gebunden ist, durchgeführt. Zur Kontrolle wurde parallel eine Immunpräzipitation mit einem Lysat nicht-transfizierter Zellen durchgeführt. Das Zelllysat (*Input*), der Überstand nach Immunpräzipitation sowie das Immunpräzipitat (Eluat) wurden im *Western Blot* analysiert. Der *Western Blot* (Abbildung 6, links) zeigt, dass T7-Makorin1-short mit dem Flag-PABP sehr gut kopräzipitiert. Im Kontrollansatz dagegen ist erwartungsgemäß weder Flag-PABP noch T7-Makorin1-short im Input, Überstand und Eluat nachzuweisen. Detektiert wurde nur das endogene PABP im Input und Überstand mit dem anti-PABP-Antikörper.

Die Interaktion von PABP und Makorin1-short im Hefesystem wurde somit auch in HEK293-Zellen *in vivo* bestätigt.



Abbildung 6: Koimmunpräzipitation von T7-Makorin1-short und Flag-PABP mit anti-Flag-Agarose.

Die Fusionsproteine T7-Makorin1-short und Flag-PABP wurden in HEK293-Zellen transient überexprimiert und die Zellextrakte zur Immunpräzipitation mit einem anti-Flag-Antikörper, der kovalent an Agarose gebunden ist, inkubiert. Input (I), Überstand nach Immunpräzipitation (Ü) und Eluat (Proteine eluiert von der anti-Flag-Agarose, E) wurden mit anti-T7- oder mit anti-PABP-Antikörpern im *Western Blot* analysiert. Der *Western Blot* zeigt, dass Makorin1-short in transient transfizierten HEK293-Zellen mit PABP interagiert.

3.2.2 Analyse der PABP/Makorin1-short-Interaktion durch einen PDZ-Pulldown

Die PABP-Makorin1-short-Interaktion wurde im Zellsystem auch mithilfe des sogenannten PDZ-*Pulldowns* verifiziert. Der PDZ-*Pulldown* ist eine Affinitätsaufreinigungsmethode (Brendel *et al.*, 2004), welche sich die sehr starke und spezifische Interaktion zwischen der PDZ-Domäne des neuronalen Proteins SSTRIP/Shank und dem C-Terminus des Proteins GKAP zu Nutze macht (Naisbitt *et al.*, 1999; Tu *et al.*, 1999). Für die Durchführung dieser Analyse wurde ein synthetisches Peptid, bestehend aus den letzten 10 C-terminalen Aminosäuren von GKAP, das das Bindemotiv für die SSTRIP/Shank-PDZ-Domäne enthält, kovalent an NHS-Sepharose gekoppelt. Das zu untersuchende Protein wird als Fusionsprotein mit der PDZ-Domäne in einer Zellkultur überexprimiert. Daraus wird ein Zelllysat hergestellt

und mit der GKAP-Sepharose A inkubiert. Das Fusionsprotein interagiert mit dem an die Sepharose gekoppelten Peptid und kann leicht isoliert und aufgereinigt werden. Die mit dem Fusionsprotein interagierenden Proteine werden mitisoliert und können anschließend durch SDS-PAGE aufgetrennt und im *Western Blot* analysiert werden.

Zur Durchführung des Versuches wurde die vollständige kodierende cDNA von Makorin1short in den pPDZ-Vektor kloniert. Dieser Vektor enthält die Sequenz der PDZ-Domäne von SSTRIP/Shank, sodass ein Fusionsprotein aus Makorin1-short und der C-terminal fusionierten PDZ-Domäne exprimiert wird. Das Fusionsprotein wurde in HEK293-Zellen transient überexprimiert und aus den Zellen wurde ein Gesamtproteinlysat hergestellt. Das Proteinlysat wurde mit der GKAP-Sepharose inkubiert. So kann das Makorin1-short-PDZ-Fusionsprotein an die GKAP-Sepharose binden (Abbildung 7). Da PABP bereits als RNAbindendes Protein bekannt ist und Makorin1-short aufgrund seiner Struktur möglicherweise ebenfalls ein RNA-bindendes Protein ist, wurde zusätzlich untersucht, ob seine Interaktion mit PABP RNA-abhängig oder -unabhängig erfolgt. Wenn beide Proteine an RNA binden, könnte die RNA als "Brücke" fungieren und eine Sedimentation beider Proteine wäre möglich, ohne dass sie direkt miteinander interagieren (Abbildung 8C).

Zur Überprüfung der RNA-Abhängigkeit wurde die Hälfte des Zelllysats vor der Inkubation mit der GKAP-Sepharose mit RNase A versetzt. Die andere Hälfte wurde ohne Abbau der RNA mit der GKAP-Sepharose inkubiert.

Das Fusionsprotein und die damit interagierenden Proteine (z.B. PABP) werden wie bereits erwähnt an der Sepharose immobilisiert, und der gesamte Komplex kann isoliert und aufgereinigt werden. In Abbildung 7 ist die Methode schematisch dargestellt.



Abbildung 7: Schematische Darstellung der PDZ-Pulldown Methode (Beschreibung siehe Text)

Die isolierten Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem anti-PDZ- und einem anti-PABP-Antikörper im *Western Blot* analysiert. Die in Abbildung 9 dargestellten Ergebnisse (Spuren 1-3) zeigen, dass Makorin1-short mit dem endogenen PABP interagiert. Diese Interaktion bleibt auch nach Abbau mit RNase A bestehen (Spuren 4-6). Zur Kontrolle wurde parallel ein PDZ-*Pulldown* mit einem Lysat nicht-transfizierter Zellen durchgeführt. Im *Input* und im Überstand (Spuren 7 und 8) ist das endogene PABP nachzuweisen, im Eluat (Spur 9) dagegen nicht, was einen weiteren Hinweis für die Spezifität der PABP/Makorin1-short-Interaktion darstellt. Zusätzlich zeigt dies auch, dass es sich um eine Interaktion handelt, die nicht zufällig durch RNA vermittelt wird. Möglich wäre allerdings, dass die Interaktion durch weitere Proteine vermittelt wird und nur indirekt erfolgt. Eine schematische Darstellung dieser möglichen Interaktionen ist in Abbildung 8 dargestellt.



Abbildung 8: Schematische Darstellung der möglichen PABP/Makorin1-short-Interaktionen.

Die Interaktion von PABP mit Makorin1-short kann direkter Natur sein (**A**), aber auch durch andere Proteine (Protein X) (**B**) oder RNA (**C**) vermittelt werden.


Abbildung 9: *Pulldown* von endogenem PABP mit Makorin1-short-PDZ durch Bindung der PDZ-Domäne an GKAP-Sepharose.

Das rekombinante Fusionsprotein Makorin1-short-PDZ wurde in HEK293-Zellen transient exprimiert. Die Proteinextrakte mit oder ohne Abbau der RNA mit RNase A wurden mit GKAP-Sepharose inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und im *Western Blot* mit anti-PDZ- oder anti-PABP-Antikörpern analysiert. Die Interaktion von PABP und Makorin1-short ist RNA-unabhängig, sie bleibt auch nach RNase A-Abbau bestehen. I, *Input*; Ü, Überstand nach der Affinitätsreinigung; E, Eluat, Proteine eluiert von der GKAP-Sepharose.

3.3 Charakterisierung der interagierenden Domänen von Makorin1-short und PABP

Im Folgenden wurden die für eine Interaktion zwischen PABP und Makorin1-short essentiellen Bereiche der beiden Proteine näher charakterisiert. Dazu wurden verschiedene Konstrukte sowohl für das PABP- als auch für das Makorin1-short-Protein gentechnisch hergestellt, die für Deletionsmutanten kodieren. Die PABP-Deletionsmutanten wurden jeweils mit Makorin1-short bzw. die Makorin1-short-Deletionsmutanten mit PABP in HEK293-Zellen exprimiert. Die Interaktionsanalyse erfolgte über Koimmunpräzipitationen und *Western Blot*-Analysen.

3.3.1 Identifizierung der Makorin1-short-Domänen, die für die Interaktion mit PABP verantwortlich sind

Für die Durchführung dieser Experimente wurden Makorin1-short Deletionsmutanten (schematisch dargestellt in Abbildung 10A) so in den pEGFP-Vektor kloniert, dass Fusionsproteine mit einem N-terminalen EGFP-*tag* in Säugerzellen exprimiert werden konnten. Die Deletionskonstrukte wurden jeweils mit dem vollständigen PABP-Protein mit

N-terminal fusioniertem Flag-Epitop in HEK293-Zellen transient ko-exprimiert und mit anti-Flag[®]-M2-Agarose immunpräzipitiert. Die gebundenen Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und im *Western Blot* mit einem anti-GFP- bzw. einem anti-PABP-Antikörper analysiert. Die *Western Blot*-Analysen (Abbildung 10B) demonstrieren, dass die Interaktion von Makorin1-short mit PABP im Bereich der Aminosäuren 111-234 vermittelt wird. Dieser Bereich umfasst die Zinkfinger (ZF)-Domäne 3 und die Aminosäuren zwischen den Zinkfinger (ZF)-Domänen 2 und 3. Die verkürzte RING-Finger-Domäne (RFΔCC), die Makorin-Typ-Zinkfinger-Domäne (MTZF) sowie EGFP alleine werden nicht zusammen mit PABP präzipitiert. Das zeigt, dass diese Domänen nicht mit PABP interagieren. Ebenso scheinen die Zinkfinger (ZF)-Domänen 1 und 2 für diese Interaktion nicht essentiell zu sein, auch beim Fehlen dieser Domänen findet eine Interaktion statt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10A zusammengefasst.



Abbildung 10: Koimmunpräzipitation von EGFP-Makorin1-Deletionsproteinen und Flag-PABP mit anti-Flag[®]-M2-Agarose.

A: Schematische Darstellung der rekombinanten EGFP-Makorin1-short Fusionsproteine, die zusammen mit Flag-PABP in HEK293-Zellen transient exprimiert wurden. B: Für die Immunpräzipitation wurde zu den Proteinextrakten anti-Flag-Agarose gegeben. Die gebundenen Proteine wurden nach Elution durch SDS-PAGE aufgetrennt und im *Western Blot* mit anti-EGFP- bzw. anti-PABP-Antikörpern analysiert. Die Makorin1-short/PABP- Interaktion erfolgt innerhalb des Aminosäurebereichs 111-234 (A).

ZF, Zinkfinger-Domäne; MTZF, Makorin-Typ-Zinkfinger-Domäne; RF∆CC, trunkierte RING-Finger-Domäne; AS, Aminosäure.

3.3.2 Identifizierung der PABP-Domänen, die für die Interaktion mit Makorin1short verantwortlich sind

Wie bereits beschrieben, besitzt PABP vier RRMs (*RNA recognition motif*). Es ist bekannt, dass die RRMs nicht nur RNA-bindende Motive darstellen, sondern auch unabhängig von RNA mit anderen Proteinen interagieren können. Die RRMs von PABP binden z.B. an die Proteine Paip1, Paip2, eIF4G und GW182 (Roy *et al.*, 2002, Khaleghpour *et al.*, 2001, Berlanga *et al.*, 2006, Imataka *et al.*, 1998). Das folgende Experiment diente zur Untersuchung, ob und welche RRMs von PABP mit Makorin1-short interagieren können.

Ähnlich wie für Makorin1-short wurden auch für PABP Deletionsmutanten, die für unterschiedliche Kombinationen der RRMs 1-4 kodieren, in den pCMV-2B Vektor kloniert. In Abbildung 11A sind diese Konstrukte schematisch dargestellt. Dabei werden die Deletionsmutanten als Fusionsproteine mit einem N-terminalen Flag-Epitop exprimiert. Die PABP-Konstrukte wurden zusammen mit pT7-Makorin1-short, das für ein Fusionsprotein mit einem N-terminalen T7-Epitop kodiert, transient in HEK293-Zellen transfiziert. Mit den Zelllysaten wurde eine Immunpräzipitation mit der anti-Flag-Agarose durchgeführt. Der *Western Blot* zeigt, dass Makorin1-short bevorzugt mit RRM 1+2 und RRM 2+3 und weniger effizient, jedoch auch mit RRM 3+4 interagiert (Abbildung 11B, Gelspuren 1-9). Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, dass mindestens zwei der vier RRMs von PABP an der Interaktion mit Makorin1-short beteiligt sind. Bei der Expression von T7-Makorin1-short in Abwesenheit von Flag-PABP präzipitiert der anti-Flag-Antikörper das Protein nicht (Abbildung 11B, Spuren 10-12), wodurch die Interaktionsspezifität zwischen den Konstrukten und T7-Makorin1 untermauert wird.



Abbildung 11: Koimmunpräzipitation von T7-Makorin1-short und Flag-PABP-Deletionskonstrukten mit anti-Flag[®]-M2-Agarose.

A: Schematische Darstellung vom Wildtyp-PABP (wt) und der rekombinanten Flag-PABP-Fusionsproteine, die in HEK293-Zellen zusammen mit T7-Makorin1-short transient exprimiert wurden.

B: Für die Immunpräzipitation wurden die Proteinextrakte mit anti-Flag-Agarose inkubiert, die gebundenen Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und im *Western Blot* mit anti-Flag- oder mit anti-T7-Antikörper analysiert. Alle RRM (RNA-*recognition motifs*) -Kombinationen (RRM 1+2, RRM 2+3, RRM 3+4) zeigen eine Interaktion mit T7-Makorin1-short, RRM 3+4 interagieren weniger effizient. I, *Input*; Ü, Überstand nach Immunpräzipitation; E, Eluat, eluierte Proteine von der anti-Flag[®]-M2-Agarose.

Α

3.4 Findet eine Interaktion von PABP und Makorin1-short statt, wenn PABP an VP-RNA gebunden ist?

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, bindet PABP an VP-mRNA, und zwar an nichtpoly(A)-Sequenzen (Mohr *et al.*, 2001). Die Interaktion mit der dendritischen Lokalisierungssequenz erfolgt ausschließlich über die RRMs 3+4 (Mullin *et al.*, 2004). Auch die Interaktion von Makorin1 und PABP, wie im vorigen Kapitel dargestellt, erfolgt über mindestens zwei RRMs. Die Interaktion von PABP/Makorin1 ist RNA-unabhängig (Kapitel 3.2.2). Es ist daher denkbar, dass Makorin1 nur mit freien PABP-Molekülen interagieren kann. Daher wurde im folgenden Experiment untersucht, ob die PABP-Interaktion mit Makorin1 auch dann persistiert, wenn PABP an eine Zielsequenz (RNA, hier die VP-RNA) gebunden ist.

Zur Durchführung des Experiments wurde biotinylierte VP-cRNA durch *in vitro* Transkription (Kapitel 2.2.2.3) hergestellt und an mit Streptavidin beschichtete paramagnetische Partikel gebunden. Nach der Bindung erfolgte die Inkubation mit Zelllysat aus T7-Makorin1-short und Flag-PABP transfizierten HEK293-Zellen. Die nicht an die VP-cRNA gebundenen Proteine wurden durch Waschen entfernt und die gebundenen Proteine mit Laemmli-Probenpuffer eluiert. Um unspezifische Bindungen an die cRNA auszuschließen, wurde parallel ein Ansatz mit biotinylierter Tubulin-cRNA, woran PABP nicht bindet, als Kontrolle durchgeführt. Die Bindung von T7-Makorin1-short und endogen exprimiertem bzw. von Flag-PABP an die VP-cRNA sowie Tubulin-cRNA wurde durch SDS-PAGE und *Western Blot*-Analyse mit anti-Makorin1-short- und anti-PABP-Antiseren überprüft. Das Ergebnis der *Western Blot*-Analyse zeigt, dass T7-Makorin1-short zusammen mit endogenem (Abbildung 12, Spuren 1-3) und rekombinant exprimiertem PABP (Abbildung 12, Spuren 4-6) an VP-cRNA bindet.

Die Rekrutierung von Makorin1-short an die VP-cRNA erfolgt vermutlich über PABP, obwohl man eine direkte Bindung von Makorin1-short an die VP-cRNA nicht ausschließen kann. Zur Überprüfung wäre es jedoch erforderlich, das endogene PABP aus dem Zelllysat zu depletieren, was nicht vollständig gelang.

Das Kontrollexperiment (Abbildung 12, Spuren 7-9) zeigt, dass Makorin1-short nicht an den hier verwendeten Abschnitt aus dem kodierenden Bereich der Tubulin-cRNA – die keine Zielsequenz für PABP ist – bindet.



Abbildung 12: Interaktion von PABP und Makorin1-short mit der Vasopressin-RNA.

Durch *in vitro*-Transkription wurde biotinylierte VP-cRNA hergestellt, diese an Streptavidin-beschichtete paramagnetische Partikel gebunden und mit Proteinlysat aus HEK293-Zellen, die vorher mit T7-Makorin1-short oder mit T7-Makorin1-short und Flag-PABP transfiziert Worden waren, inkubiert. Die an die VP-RNA gebundenen Proteine wurden eluiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und im *Western Blot* mit anti-PABP- oder mit anti-T7-Antikörpern analysiert. Sowohl T7-Makorin1-short als auch Flag-PABP bzw. PABP binden an die VP-RNA (Spuren 3 und 6). Im Kontrollansatz mit der Tubulin-RNA ist keine Interaktion festzustellen. I, *Input*; Ü, Überstand nach Inkubation mit der VP-RNA; E, Eluat, eluierte Proteine von der biotinylierten VP-RNA.

3.5 Analysen zur in vivo-Expression von Makorin1

Alle bis zu den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen publizierten Daten bezogen sich auf Makorin1-long. Über die kurze Form von Makorin1 war nichts bekannt. Daher wurden hier detaillierte Untersuchungen zur Makorin1-Expression auf mRNA- und Proteinebene durchgeführt. Über Makorin1-long ist bekannt, dass die mRNA ubiquitär in verschiedenen nicht-neuronalen und neuronalen Gewebetypen von Mensch und Maus exprimiert wird (Gray *et al.*, 2000).

Hier wurde die mRNA-Expression in verschiedene Gewebetypen der Ratte mithilfe der *Northern Blot*-Hybridisierung untersucht. Mit der RT-PCR-Methode wurde die mRNA-Expression von Makorin1-short und Makorin1-long im Gehirn der Ratte analysiert. Weiterhin wurde die Proteinexpression von Makorin1-short und Makorin1-long über SDS-PAGE und *Western Blot* sowie durch immunzytochemische und immunhistochemische Analysen untersucht.

3.5.1 Northern Blot-Analyse zur Genexpression von Makorin1 in Rattengewebe

Zur Untersuchung der Genexpression von Makorin1 in der Ratte wurde ein Northern Blot (Clontech) mit PolyA+-RNA aus verschiedenen Rattengeweben verwendet. Der Northern Blot wurde mit einer mit ³²P-markierten Makorin1-Sonde hybridisiert. In Abbildung 13 ist das Ergebnis der Northern Blot-Analyse gezeigt. Die höchste Expression ist in den Testis und im Gehirn zu sehen. Die Transkripte erscheinen bei etwa 3,2 und 2,0 kb. Diese entsprechen vermutlich den durch alternatives Spleißen und differentielle Polyadenylierung generierten mRNAs, die für Makorin1-long bzw. Makorin1-short kodieren. In den Testis ist eine zusätzliche kleinere Bande bei etwa 0,75 kb zu sehen (durch einen Stern markiert). In verschiedenen Mausgeweben wird ein Transkript dieser Größe ebenfalls exprimiert. Es wurde berichtet, dass dieses Transkript durch die Transkription des Makorin1-Pseudogens (makorin1p1) entsteht. Die Funktion dieses Transkriptes bestehe in der Stabilisierung der Makorin1-mRNA (Hirotsune et al., 2003). Neuere Daten haben die Expression des Pseudogens jedoch widerlegt (Gray et al., 2006). Demnach entspricht das 0,75 kb Transkript eher einer weiteren, durch alternatives Spleißen und differentielle Polyadenylierung generierten mRNA, die die Exons 1-3 enthält, die vom Makorin1-Mausgen transkribiert werden (Gray et al., 2006).



Abbildung 13: Northern Blot Analyse der Makorin1-Expression in verschiedenen Rattengeweben.

Der *Multiple Tissue Northern-Blot* (Clontech) mit PolyA+-RNA aus verschiedenen Geweben der Ratte wurde mit einer ³²P-markierten Makorin1-Sonde hybridisiert. Es wurden zwei Makorin1-Transkriptgrößen detektiert, die vermutlich Makorin1-long (3,2 kb) und -short (2 kb) entsprechen. Eine dritte Transkriptvariante wurde im Testis der Ratte bei etwa 0,75 kb detektiert (Stern).

3.5.2 Lokalisation der Makorin1-mRNA in Gehirnschnitten der Ratte

Um die Lokalisation der mRNA im Gehirn der Ratte zu untersuchen, wurde eine *in situ*-Hybridisierung mit Gehirnschnitten einer adulten Ratte durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte mit einer mit ³⁵S-markierten Makorin1-*antisense*-RNA-Sonde hybridisiert. Die Transkription erfolgte von dem Klon hMKRN1-short in pBlueScript (nt 7-339). Zur Kontrolle

sense RNA

wurden Schnitte mit einer Makorin1-*sense*-RNA-Sonde hybridisiert. In der Abbildung 14A ist die hippocampale Struktur deutlich markiert, was auf eine Lokalisation der Makorin1-mRNA in dem Zellkörperbereich der hippocampalen Neuronen hindeutet. In den Kontrollschnitten dagegen, in Abbildung 14C dargestellt, ist keine Markierung der hippocampalen Struktur zu sehen.

Die Dendriten der Pyramidenzellen der Hippocampus-Formation befinden sich in der Molekularschicht (ML, *molekular layer*). Die Molekularschicht ist nicht markiert, was bedeutet, dass die Makorin1-mRNA in den Dendriten nicht vorhanden ist.

Eine mRNA-Expression von Makorin1 ist auch im Cerebellum (Daten nicht gezeigt) und im Neocortex (Abbildung 14A) zu sehen.

anti-sense RNA



Abbildung 14: *In situ*-Hybridisierung zur Analyse der Makorin1-mRNA-Lokalisation in den Dendriten der hippocampalen Neuronen

Adulte Rattenhirnschnitte wurden mit ³⁵S-markierter Makorin1-*anti-sense*-Sonde (**A**) und zur Kontrolle mit ³⁵Smarkierter Makorin1-*sense*-Sonde (**C**) hybridisiert. A: Die hippocampale Struktur ist stark markiert, dies bedeutet eine Lokalisation der Makorin1-mRNA in den Zellkörpern der Neuronen. **B:** Eine höhere Auflösung der in A mit einem Rechteck markierten hippocampalen Struktur. In der Molekularschicht (ML) des Hippocampus, in der sich die Dendriten der Pyramidenzellen befinden, ist keine Makorin1-mRNA zu detektieren. ML, *molecular layer*.

3.5.3 RT-PCR-Analyse zur Genexpression von Makorin1 im Rattenhirn

Aus den Daten der *in situ*-Hybridisierung (Kapitel 3.5.2) geht hervor, dass die Makorin1mRNA-Expression im Hippocampus am größten ist. Daher wurde für die RT-PCR-Analyse der verschiedenden Makorin1-mRNA-Varianten cDNA aus dem Rattenhippocampus eingesetzt.

Für die RT-PCR-Analyse wurden spezifische Primer für die Makorin1-short- bzw. Makorin1long-Sequenzen verwendet. Dies war möglich, da die 3 UTRs (*untranslated region*) von Makorin1-short- und -long-mRNA nicht identisch sind. Die Lage der spezifischen Primer ist in Abbildung 15A dargestellt. Vor der Durchführung der PCR-Reaktionen wurde cDNA durch Reverse Transkription (RT) der Gesamt-RNA aus dem Rattenhippocampus hergestellt. Es konnten beide Makorin1-Varianten amplifiziert und somit auf mRNA-Ebene im Rattenhippocampus (Abbildung 15B, Spuren 1 und 4) nachgewiesen werden. Die PCR-Produkte wiesen die erwartete Größe auf und die Sequenzierung dieser Fragmente bestätigte die Zuordnung zur Makorin1-Sequenz. Als Kontrollen wurden PCRs mit Gesamt-RNA als *Template* ohne vorherige Reverse Transkription durchgeführt (Abbildung 15B, Spuren 3 und 6). Es wurden dabei keine Produkte erhalten, was bedeutet, dass die oben beschriebenen PCR-Produkte nicht durch eine Amplifizierung genomischer DNA entstanden sind, sondern beide Makorin1-Varianten auf mRNA-Ebene exprimiert werden. Kontrollen ohne *Template* wurden ebenfalls durchgeführt, um Kontaminationen mit Makorin1-cDNA enthaltenden Plasmiden auszuschließen (Abbildung 15B, Spuren 2 und 5).



Abbildung 15: RT-PCR zur Untersuchung der Expression von Makorin1-short und -long im Hippocampus der Ratte. A: Schematische Darstellung der Lage der *Primer*, die für die Amplifikationsreaktionen verwendet wurden. B: RNA aus dem Rattenhippocampus als *Template* für die Reverse Transkription. Die PCR-Produkte wurden durch eine Agarose-Gelelektrophorese detektiert und die Größen mit Hilfe des Markers (M, 100 bp-*ladder*) ermittelt. Für Makorin1-short wurde ein Produkt mit der Größe von 554 bp (Spur 1) und für Makorin1-long wurde ein Produkt mit der Größe von 407 bp (Spur 4) erwartet und detektiert. Als Kontrollen wurden PCRs in Abwesenheit von *Template* (Spuren 2 und 5) durchgeführt sowie PCRs mit RNA als *Template*, die nicht revers transkribiert wurde (Spuren 3 und 6).

3.5.4 *Western Blot*-Analyse zur Charakterisierung der Proteinexpression von Makorin1 im Gehirn der Ratte

Die Analyse der Makorin1-Expression auf RNA-Ebene ergab, dass beide mRNAs, für Makorin1-long und -short, im Gehirn der Ratte exprimiert werden.

Für die Analyse der Makorin1-Expression im Rattenhirn auf Protein-Ebene wurden *Western Blot*-Experimente durchgeführt. Die Blots wurden zur Detektion des Makorin1-Proteins mit dem speziell hergestellten anti-Makorin1-short-Antiserum (siehe Anhang) aus Kaninchen inkubiert. Dieses Antiserum ist gegen das humane rekombinant exprimierte Makorin1-Protein gerichtet, detektiert jedoch aufgrund der hohen Homologie (92%) auch das Protein der Ratte. Wie weiter unten beschrieben, wurde durch immunzytochemische Analysen festgestellt, dass

ähnlich wie die mRNA auch das Makorin1-Protein am stärksten in der hippocampalen Gehirnregion exprimiert wird (siehe Kapitel 3.5.7), daher wurden die *Western Blot*-Analysen mit Proteinextrakten aus dieser Region durchgeführt.

Das Antiserum detektiert eine Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 35 kDa, die sehr wahrscheinlich Makorin1-short entspricht (Abbildung 16, Spur 1). Makorin1-long könnte der sehr feinen, ca. 55 kDa-großen Bande entsprechen (mit einem Sternchen markiert). Zum Vergleich wurde das humane T7-Makorin1-short und -long in HEK293-Zellen überexprimiert und der Proteinextrakt parallel im selben Gel laufen gelassen (Abbildung 16, Spuren 2 und 3). Zur Bestätigung, dass das Antiserum auch das Rattenprotein erkennt, wurde rekombinantes, mit einem myc/His-Epitop markiertes Makorin1-short aus der Ratte ebenfalls in HEK293-Zellen überexprimiert und im *Western Blot* mit dem Antiserum gegen das humane Protein detektiert (Abbildung 16, Spur 4). Ein Proteinextrakt aus nichttransfizierten HEK293-Zellen wurde ebenfalls auf das Gel aufgetragen (Abbildung 16, Spur 5). Hier wurde kein Makorin1 detektiert, was die Spezifität des Antiserums unterstreicht. Die rekombinanten Proteine weisen im Vergleich zum endogenen Protein im Hippocampus ein etwas höheres Molekulargewicht auf. Dies ist auf die markierenden *tags* zurückzuführen.

Da die Makorin1-long-Bande nur sehr schwach ist, ist Makorin1-short offensichtlich die vorherrschende Proteinvariante im Hippocampus der Ratte. Auf mRNA-Ebene werden beide Varianten gut exprimiert. Es ist bereits bekannt, dass Makorin1-long eine Ubiquitin-E3-Ligase-Aktivität besitzt und darüber hinaus besitzt es die Fähigkeit zur Autoubiquitinylierung (Kim *et al.*, 2005). Diese Tatsache erklärt möglicherweise die geringe Proteinkonzentratition auf Proteinebene der Variante. Wie in Kapitel 3.6 beschrieben, konnte gezeigt werden, dass Makorin1-short die Fähigkeit zur Autoubiquitinylierung nicht besitzt.



Abbildung 16: Nachweis von Makorin1-short im Hippocampus der Ratte durch Westernblotanalyse.

Die Proteine aus dem Rattenhippocampus wurden mit anti-Makorin1 Antiserum im *Western Blot* inkubiert (Spur 1). Humane T7-markierte Fusionsproteine, Makorin1-short (Spur 2) und -long (Spur 3), die in HEK293-Zellen exprimiert wurden und im gleichen SDS-Gel gelaufen sind, wurden ebenfalls mit dem anti-Makorin1 Antiserum inkubiert. Der Antikörper gegen humanes Makorin1-short erkennt auch das rekombinante Myc-Hismarkierte Makorin1-short der Ratte (Spur 4). Nichttransfizierte Kontrollextrakte sind in Spur 5 dargestellt. Der *Western Blot* zeigt, dass Makorin1-short die vorherrschende Variante im Hippocampus der Ratte ist.

3.5.5 Immunzytochemische Analysen zur Verteilung von Makorin1 in neuronalen und nicht-neuronalen Zellen

Um der Frage nach der subzellulären Lokalisation der Makorin1-Proteine nachzugehen, wurden weitere Analysen durchgeführt. Die Transfektion von HeLa-Zellen mit einem Makorin1-short-Myc kodierenden Expressionsvektor und die anschließende immunzytochemische Analyse zeigt, dass das Fusionsprotein Makorin1-short-Myc sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma lokalisiert ist (Abbildung 17, A und B), obwohl Makorin1 kein klassisches Kernlokalisierungssignal (NLS, *nuclear localization signal*) enthält. Makorin1-long weist in HeLa-Zellen eine ähnliche Verteilung (Daten nicht gezeigt) auf.

In primär kultivierten Neuronen der Ratte ist die endogene Expression von Makorin1 sehr gering, daher wurden primäre Neurone ebenfalls mit Makorin1-short-Myc transfiziert, um so eine Aussage über die subzelluläre Verteilung dieses Proteins treffen zu können. In transfizierten Zellen kann zudem eine Kolokalisation mit PABP untersucht werden. Dies ist in nicht-transfizierten Zellen nicht möglich, da die anti-Makorin1- und anti-PABP-Antikörper beide aus Kaninchen stammen. Die transiente Transfektion von primären hippocampalen Neuronen mit dem Makorin1-short-Myc kodierenden Expressionsvektor und die

anschließende Immundetektion mit dem anti-Makorin1-short-Antiserum und dem sekundären anti-Kaninchen-Alexa Fluor488-Antikörper zeigen, dass das Protein sehr abundant im Zellkörper und in MAP2-positiven Dendriten lokalisiert ist (Abbildung 17, C und D). Zur Detektion der MAP2-positiven Dendriten wurde die hippocampale Neuronenkultur parallel mit einem anti-MAP2- und einem sekundären anti-Maus-Cy3-Antikörper inkubiert. MAP2 (*microtubule-associated protein 2*) ist ein Marker des dendritischen Cytoskeletts. Eine Immunfärbung eines MAP2-negativen Neuriten ist auch zu beobachten (Abbildung 17, C und D, durch Pfeilspitzen angezeigt), nach der Morphologie zu urteilen, handelt es sich wahrscheinlich um ein Axon.



Abbildung 17: Überexpression von Makorin1-short in HeLa-Zellen und in primären Hippocampusneuronen.

A: HeLa-Zellen wurden mit Myc-markierten Makorin1-short kodierenden Konstrukten transient transfiziert und mit einem monoklonalen anti-Myc-Antikörper nachgewiesen. Das rekombinante Fusionsproteine Makorin1-short-Myc wurde sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma detektiert. Eine DAPI-Färbung der Zellkerne ist in (**B**) gezeigt. **C:** Das Fusionsprotein Makorin1-short-Myc wurde in für 7 Tage kultivierten Hippocampusneuronen überexprimiert und mit anti-Makorin1-short-Antiserum immungefärbt. Das rekombinante Protein wurde im

Zellkörper und in den Dendriten detektiert. Zum Nachweis der Neuronen wurde eine Doppelfärbung mit dem anti-MAP2-Antikörper durchgeführt (**D**). Sekundäre Antikkörper: s. Beschreibung im Text. Das Fusionsprotein Makorin1-short-Myc ist auch in MAP-2-negativen Neuriten lokalisiert (durch Pfeilspitzen angezeigt).

3.5.6 Kolokalisation von Makorin1-short und PABP in Hippokampusneuronen

In HEK293-Zellen findet eine Interaktion von Makorin1 und PABP statt. Es stellte sich die Frage, ob sie auch in Neuronen miteinander interagieren. Um dies zu untersuchen, wurden hippocampale Neurone mit dem T7-Makorin1-short kodierenden Vektor transient transfiziert und mit einem anti-PABP-Antikörper aus dem Kaninchen und einem anti-T7-Antikörper aus der Maus nachgewiesen (Abbildung 18). T7-Makorin1-short ist zum Teil mit dem endogenen PABP kolokalisiert (Abbildung 18C). Daneben gibt es sowohl PABP- als auch Makorin1-short-positive Bereiche, wo keine Interaktion stattfindet. Die Kolokalisation lässt vermuten, dass rekombinantes Makorin1-short und endogenes PABP zumindest in einigen Bereichen der Dendriten interagieren.



Abbildung 18: Expression von T7-Makorin1-short in primären Hippocampusneuronen und Kolokalisation mit PABP.

Das Fusionsprotein T7-Makorin1-short wurde in *in vitro* kultivierten Hippocampusneuronen (isoliert aus Rattenembryonen am E19) exprimiert. Die Neurone wurden mit dem anti-T7-Antikörper (**A**) und anti-PABP-Antikörper (**B**) immungefärbt. Die Überlagerung der Aufnahmen zeigt, dass ein Teil von PABP und Makorin1-short kolokalisieren (**C** und **D**, Kolokalisation mit Pfeilspitzen markiert)

3.5.7 Lokalisation von Makorin1 in unterschiedlichen Regionen des Rattenhirns

Immunhistochemische Analysen mit aufeinander folgenden Schnitten von unterschiedlichen Rattenhirnregionen mit dem anti-Makorin1-Antikörper zeigten, dass Makorin1 zwar schwach aber ubiquitär im Gehirn exprimiert wird (Bilder nicht gezeigt). Die höchste Immunaktivität ist in den Neuronen der hippocampalen Formation zu sehen (Abbildung 19A). Makorin1 ist im Zellkern, im Zellkörper sowie in den proximalen Dendriten zu beobachten (Abbildung 19C). Da Makorin1-long im Gehirnlysat mittels *Western Blot* kaum nachzuweisen ist (da sehr wenig vorhanden), kann man davon ausgehen, dass diese Immunfärbung die zelluläre Verteilung von Makorin1-short widerspiegelt.



Abbildung 19: Immuncytochemischer Nachweis von endogen exprimiertem Makorin1 im Gehirn der Ratte.

Saggitale Rattenhirnschnitte im Hippocampusbereich wurden mit anti-Makorin1-short Antikörper aus Kaninchen und einem Cy3-gekoppelten Zweitantikörper immungefärbt (A). Die stärkste Immunreaktivität ist im Bereich der neuronalen Zellkörper zu sehen (durch einen Pfeil gezeigt). Eine höhere Auflösung der hippocampalen Neuronen zeigt eine Makorin1-Färbung im Kern und im Zytoplasma, die sich bis in die proximalen Bereiche der Dendriten hinein erstreckt (C). Eine DAPI-Färbung der Zellkerne ist in B und D dargestellt.

3.6 Makorin1-short weist keine Ubiquitin-E3-Ligase-Aktivität auf

Über Makorin1-long ist bereits bekannt, dass es als Ubiquitin-E3-Ligase die kovalente Bindung von Ubiquitinresten an Substratproteine katalysiert. Zu diesen Substratproteinen gehören eine Reihe von Proteinen wie z.B. die katalytische Untereinheit der Telomerase Reverse Transkriptase, hTERT (Kim et al., 2005), das mit Filamin A interagierende Protein I, L-FILIP (Shimada et al., 2009), der Tumorsupressor p53/TP53, der Cyclin-abhängige Kinase Inhhibitor 1A, CDKN1A/p21 (Lee et al., 2009), der Tummorsupressor p14ARF (Ko et al., 2012), das Adapterprotein FADD (Fas-associated protein with death domain; Lee et al., 2012) und das <u>West Nile virus capsid protein</u>, WNVCp (Ko et al., 2010). Darüber hinaus besitzt das Makorin1-long Protein die Fähigkeit, sich selbst zu ubiquitinylieren (Kim et al., 2005). Dem C-Terminus von Makorin1-short fehlen der C-terminale Zinkfinger sowie die letzten sechs Aminosäuren der RING-Finger-Domäne, die für die Bindung des zweiten Zinkions und so für die Ubiquitin-E3-Ligase-Funktion essentiell sind. Daher sollte Makorin1short keine E3-Ligase-Aktivität besitzen. Dies konnte auch tatsächlich durch Überexpression von T7-Makorin1-long bzw. -short in HEK293-Zellen gezeigt werden. Dazu wurden mit T7-Makorin-long bzw. -short transfizierte Zellen vor der Proteinextraktion mit dem Proteasominhibitor MG-132 behandelt, um den proteasomalen Abbau von selbstubiquitinyliertem Makorin1-long (Kim et al., 2005) bzw. Makorin1-short zu verhindern. Die HEK293-Zellen wurden für 1 h, 2 h und 4 h mit MG-132 (Endkonzentration 10 µM) behandelt, anschließend wurden die Proteine extrahiert und im Western Blot mit einem anti-T7-Antikörper detektiert. Die Konzentration von Makorin1-long in transfizierten, aber unbehandelten Zellen ist sehr niedrig (Abbildung 20A, Spur 1). Die Makorin1-long Konzentration steigt deutlich nach Zugabe von MG-132 (Abbildung 20A, Spuren 2, 3 und 4). Bei 4 stündiger Behandlung treten höhermolekulare Banden (Abbildung 20A, Spur 4, mit einem Sternchen markierte Banden) auf, die wahrscheinlich ubiquitinylierte Formen von Makorin1-long repräsentieren. Wie erwartet ist dieser Effekt bei Makorin1-short nicht zu beobachten. Anders als bei Makorin1-long ist die kurze Variante ohne Schwierigkeiten im HEK293-Zelllysat nachzuweisen und deren Konzentration variiert nicht in Abhängigkeit von MG-132 (Abbildung 20B, Spuren 1-4). Da Makorin1-short sich selbst offenbar nicht ubiquitinyliert, ist vermutlich die E3-Ligase-Aktivität dort nicht vorhanden. Makorin1-short hat daher wahrscheinlich andere Aufgaben in der Zelle als die Ubiquitinylierung von Targetproteinen.



Abbildung 20: Expression von T7-Makorin1-short und -long in HEK293-Zellen und Behandlung der Zellen mit dem Proteasominhibitor MG-132.

A: Makorin1-long besitzt die Fähigkeit zur Autoubiquitinylierung. Das Protein wird in HEK293-Zellen nur dann effizient exprimiert, wenn der proteasomale Abbau durch Addition von MG-132 (Endkonzentration: 10 μl) inhibiert wird. MG-132 wurde für 1, 2 oder 4 h (Spuren 2-4) vor der Proteinextraktion zugesetzt. Die Proteine wurden im *Western Blot* mit dem anti-T7-Makorin1-Antikörper detektiert. Die höhermolekularen Banden (markiert mit Sternchen) zeigen vermutlich ubiquitinylierte Formen von Makorin1-long.

B: Makorin1-short fehlt die Fähigkeit zur Autoubiquitinylierung. Die Addition von MG-132 für die verschiedenen Zeitspannen beeinflusst die Konzentration von Makorin1-short nicht (Spuren 2-4).

3.7 Ist Makorin1 mit translatierenden Ribosomen assoziiert?

Da Makorin1 als neuer Interaktionspartner von PABP identifiziert wurde und über PABP bereits bekannt war, dass es bei der Proteintranslation, mRNA-Stabilisierung und Translationskontrolle involviert ist, stellte sich die Frage, ob Makorin1 als putativ mRNA-bindendes Protein (Gray *et al.*, 2000) an diesen Vorgängen beteiligt ist. Zunächst sollte untersucht werden, ob Makorin1-short – wie PABP – mit translatierenden Ribosomen assoziiert ist. Dazu wurde eine Fraktionierung von Polysomen aus dem Hippocampus der Ratte durchgeführt. Das Lysat wurde auf einen 15-45%-igen Saccharosesegradienten geschichtet. Nach der Ultrazentifugation wurden von oben nach unten 9 Fraktionen von je 1 ml abgenommen. Eine kleine Menge jeder Fraktion wurde im SDS-Gel aufgetragen und im *Western Blot* mit einem anti-PABP- bzw. anti-Makorin1-Antikörper aus dem Kaninchen detektiert (Abbildung 21, A und B). Aus einem Teil jeder Fraktion wurde die RNA gefällt, gereinigt und anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (Abbildung 21C). Die Darstellung der großen (28 S) und der kleinen (18 S) ribosomalen RNA lässt die Fraktionierung nachvollziehen und ermöglicht den Vergleich mit dem *Western Blot*. Wie erwartet ist PABP in allen Ribosomen/Polysomen-enthaltenden Fraktionen des Gradienten zu

detektieren (Abbildung 21A, Spuren 4-9). In den Teilen des Gradienten mit leichteren mRNP-Partikeln sind ebenfalls hohe Mengen an PABP enthalten (Abbildung 21A, Spuren 1-3).

Makorin1-short dagegen ist ausschließlich in den Fraktionen mit nichttranslatierenden mRNP-Partikeln zu finden (Abbildung 21B, Spuren 1-3), dementsprechend ist es mit translatierenden Ribosomen nicht assoziiert. Zusätzlich zur 35 kDa-Bande ist eine etwas größere Bande im *Western Blot* zu beobachten. Möglicherweise repräsentiert diese eine kovalent modifizierte, z.B. phosphorylierte, Form von Makorin1-short. Das Protein hat mehrere potentielle Serin/Threonin Phorphorylierungsstellen (Vorhersage bei http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos).

Diese Daten lassen vermuten, dass Makorin1-short möglicherweise eine Rolle bei der Initiation der Translation spielt.



Abbildung 21: Fraktionierung von Polysomen aus dem Hippocampus der Ratte

Polysomen aus Rattenhippocampi wurden in einem 15-45% Saccharosegradienten durch Ultrazentrifugation fraktioniert. Die einzelnen Fraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und im *Western Blot* mit dem anti-PABP-Antikörper (**A**) oder mit dem anti-Makorin1-short-Antikörper (**B**) analysiert. **C:** Die RNA aus den einzelnen Fraktionen wurde isoliert und mithilfe einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Die RNA wurde durch Assoziation mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Makorin1-short ist ausschließlich in den mRNP-Fraktionen zu finden und ist nicht mit translatierenden Ribosomen assoziiert. 28 S und 18 S: große und kleine ribosomale RNA.

3.8 Lokalisation von Makorin1 in Synapsen

Immuncytochemische Analysen lassen vermuten, dass Makorin1-short in dendritischen Dornen (sog. *spines*) lokalisiert ist (siehe Abbildung 22E).

Um dieser Frage nachzugehen, wurden hippocampale Synaptosomen sowie Fraktionen von postsynaptischen Dichten (PSD) der Ratte präpariert und im *Western Blot* analysiert. Synaptosomen sind durch Zellfraktionierung isolierte präsynaptische und postsynaptische Endigungen einer Nervenzelle. Erstmalig wurden Synaptosomen im Jahr 1962 isoliert (Gray und Whittaker, 1962). Die PSD (*postsynaptic density*) ist ein Bereich direkt unter der postsynaptischen Membran, der im Elektronenmikroskop als besonders elektronendicht erscheint (Harris und Stevens, 1989). Die PSD besteht aus einer Vielzahl von Proteinen, die miteinander interagieren und mit dem Cytoskelett der dendritischen Dornen assoziiert sind. Sie dient vermutlich vor allem der kontrollierten Verankerung der postsynaptischen Rezeptormoleküle.

Die *Western Blot*-Analyse zeigte, dass sowohl Makorin1-short als auch PABP im Vergleich zum gesamten hippocampalen Homogenat in diesen Fraktionen moderat angereichert sind (Abbildung 22, A und B). Die anschließende Inkubation des *Western Blots* mit Antikörpern gegen post- und präsynaptische Proteine bestätigt die Qualität der Synaptosomen- und PSD-Präparationen. Während der postsynaptisch lokalisierte N-methyl-D-Aspartat Rezeptor 1 (NMDA R1) in der PSD-Fraktion stark angereichert ist (Abbildung 22C), ist Synaptophysin, eine präsynaptische Komponente, kaum mehr zu detektieren (Abbildung 22D). Die synaptische Lokalisation von Makorin1 wurde durch eine Immunfärbung von mit Makorin1short transfizierten hippocampalen Neuronen bestätigt. Zusätzlich zum dendritischen Lumen sind dornenähnliche Ausstülpungen zu sehen, vermutlich dendritische Dornen, die das Makorin1-Protein enthalten (Abbildung 22E).



Abbildung 22: Nachweis von Makorin1-short in Präparationen der postsynaptischen Dichte (PSD) aus Rattenhippocampus.

Jeweils gleiche Proteinmengen von Hippocampilysat (H), Synaptosomen (S) oder PSDs (P) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Der *Western Blot* wurde nacheinander mit den folgenden Antikörpern behandelt; A: anti-Makorin1 aus Kaninchen, B: anti-PABP aus Kaninchen, C: anti-NMDA R1 (N-methyl-D-aspartate receptor 1) aus der Maus und D: anti-Synaptophysin aus der Maus. Makorin1-short und PABP sind in den PSDs nachzuweisen, genauso wie der positive Marker NMDA R1. Der negative Marker Synaptophysin dagegen ist zwar in den Synaptosomen, kaum aber in der PSD-Fraktion nachzuweisen.

E: Dendrit von *in vitro* kultiviertem Neuron (präpariert aus neugeborenen Ratten), in dem das Fusionsprotein T7-Makorin1-short überexprimiert und mit anti-T7-Antikörper immungefärbt wurde. Die Immunfärbung zeigt, dass Makorin1-short in den dendritischen Dornen zu detektieren ist, die durch Pfeilspitzen markiert sind. H, Homogenat/Hippocampus; S, Synaptosomen-Präparation aus H; P, PSD-Präparation aus H

3.9 Identifizierung von weiteren Interaktionspartnern von Makorin1short

Die in Kapitel 3.7 gezeigten Daten deuten auf eine Funktion von Makorin1-short bei der Translationsinitiation hin. Die Translation wird in der Regel durch eine Kombination vieler Proteine reguliert, daher wurde zur Identifizierung von weiteren Interaktionspartnern von Makorin1-short ein PDZ-*Pulldown* durchgeführt, der bereits im Abschnitt 3.2.2 beschrieben wurde.

Für die Durchführung des Experiments wurde die gesamte kodierende cDNA von Makorin1short in den pPDZ-Vektor kloniert und in HEK293-Zellen als Fusionsprotein mit einem Cterminalen PDZ-*tag* transient exprimiert. Das Zelllysat wurde mit GKAP-Sepharose inkubiert. Der GKAP-Sepharose/Makorin1-short-PDZ Komplex und somit auch die an Makorin1-short gebundenen Proteine wurden sedimentiert (Abbildung 23). Die aufgereinigten Proteine wurden eluiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt (Abbildung 24). Das Kontroll-Experiment mit nicht-transfiziertem HEK293-Zelllysat zeigt, dass die detektierten Banden spezifisch sind.

Die Proteinbanden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, um die Proteine zu extrahieren. Ihre Identifizierung erfolgte massenspektrometrisch. Sie sind in der Tabelle 8 aufgelistet. Als prominenter Interaktionspartner von Makorin1-short wurde das endogene PABP identifiziert.



Abbildung 23: Schematische Darstellung der PDZ-*Pulldown*-Methode zur Identifizierung von Makorin1short-Interaktionspartnern

Die gelben Figuren, die mit einem Fragezeichen markiert sind, stellen mögliche mit Makorin1-shortinteragierende Proteine dar, die identifiziert werden sollen.





Das rekombinante Fusionsprotein Makorin1-short-PDZ wurde in HEK293-Zellen transient exprimiert. Die Proteinextrakte wurden mit GKAP-Sepharose inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden eluiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Die gefärbten Banden wurden ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert. Die identifizierten Proteine sind rechts im Bild angegeben. Auch das endogene PABP bindet an Makorin1-short-PDZ.

Upf 1, Up-frameshift suppressor 1 homolog; **NFAR-2**, Nuclear factor associated with dsRNA; **NCBP80**, Nuclear cap binding Protein 80 kDa Untereinheit; **HNRNP-R**, heterogenous nuclear ribonucleoprotein R; **PABP**, poly(A) binding protein; **USF2**, Upstream stimulatory factor 2 isoform 1; **SRSF10**, serine/arginine-riche splicing factor 10; **HNRNP A2/B1**, heterogenous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 isoform B1; **HNRNP H3**, heterogenous nuclear ribonucleoprotein H3; **SRSF7**, serine/arginine -rich splicing factor 7; **SRSF9**, serine/arginine -rich splicing factor 9; **SRSF1**, serine/arginine -rich splicing factor 1.

Bande [kDa]	Protein	Protein ID
150	Upf 1 , Up-frameshift suppressor 1 homolog	NP_002902
110	NFAR-2, Nuclear factor associated with dsRNA	AAD51099
90	NCBP80 , Nuclear cap binding Protein 80 kDa Untereinheit	S50082
90	HNRNP-R, heterogenous nuclear ribonucleoprotein R	O43390
78	PABP , <i>poly</i> (<i>A</i>) <i>binding protein</i>	AJ298278
45	PABP-Abbauprodukt	
38	USF2 , Upstream stimulatory factor 2 isoform 1	NP_003358
38	SRSF10, serine/arginine-riche splicing factor 10	075494
37	HNRNP A2/B1 , heterogenous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 isoform B1	NP_112533
37	HNRNP H3, heterogenous nuclear ribonucleoprotein H3	P31942
32	SRSF7, serine/arginine -rich splicing factor 7	Q16629
30	SRSF9 , serine/arginine -rich splicing factor 9	Q13242.1
30	SRSF1, serine/arginine -rich splicing factor 1	Q07955

 Tabelle 8: Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse von Makorin1-short-bindenden Proteinen

 aus HEK293-Zellen

Die mit Makorin1-short interagierenden Proteine, die hier mit der PDZ-*Pulldown*-Methode identifiziert wurden, sind hauptsächlich RNA-bindende Proteine. Diese Proteine sind alle in irgendeiner Weise am RNA-Metabolismus beteiligt, daher ist es sehr wahrscheinlich, dass Makorin1-short ebenfalls solche Funktionen besitzt.

In einem *Pulldown* mit PABP-PDZ wurden zum Teil identische Proteine gefunden (Daten nicht gezeigt). Dies spricht für gemeinsame Funktionen von PABP und Makorin1-short.

4 Diskussion

Da die Nervenzellen für ihre Funktionalität in der Lage sein müssen, sowohl schnell auf äußere Reize zu reagieren als auch ihre synaptische Sensitivität in plastischer Weise anzupassen, sind der gerichtete mRNA-Transport und die lokale Proteinbiosynthese in den Dendriten und an den Synapsen von sehr großer Bedeutung, weil sie einen grundlegenden Beitrag zu der differenziellen neuronalen Reaktivität leisten.

Der gezielte mRNA-Transport außerhalb des Zellkerns wird einerseits durch Sequenzen innerhalb der zu transportierenden mRNAs (*cis*-agierende Sequenzen) reguliert und andererseits durch spezifische Proteine (*trans*-agierende Faktoren), die an die *cis*-Sequenzen binden. Ein Beispiel hierfür ist der Transport der VP-mRNA in die Dendriten der Nervenzellen und deren lokale Translation (Mohr und Richter, 2004). Das PABP fungiert hierbei als *trans*-agierender Faktor und bindet spezifisch an die dendritische Lokalisierungssequenz (*cis*-agierende Sequenz innerhalb eines Teils der kodierenden Region sowie der 3`UTR) der VP-mRNA. Es ist seit langem bekannt, dass PABP auch an nichtpoly(A)-Sequenzen bindet (Mohr *et al.*, 1995, Prakash *et al.*, 1997, Mohr *et al.*, 2001, Mullin *et al.*, 2004).

Da in aller Regel der mRNA-Transport von einer Kombination verschiedener Proteine vermittelt wird (Doyle und Kiebler, 2011; Di Liegro *et al.*, 2014), wurde mittels *Yeast Two-Hybrid-Screen* nach PABP-interagierenden Proteinen gesucht, die in solche Prozesse eingebunden sein könnten. In diesem *Screen* wurde neben bekanntermaßen mit PABP-interagierenden Proteinen (PAIP1, Ataxin-2) am häufigsten Makorin1 gefunden, und zwar ausschließlich eine C-terminal verkürzte Isoform (hier Makorin1-short genannt).

Das MAKORIN1-Gen gehört als Stammgen zu einer Genfamilie, die für putative RNAbindende Proteine kodiert. Diese Proteine enthalten zwei bis vier C₃H-Zinkfinger, eine neue Zinkfingerstruktur mit ungewöhnlicher Cystein/Histidin-Anordnung (Makorin-Typ-Zinkfinger) und eine RING-Finger-Domäne. Das MAKORIN1-Gen ist hoch konserviert, und es wurden Orthologe von Mensch, Maus, Känguru, Huhn, Fruchtfliege und Fadenwurm kloniert (Gray *et al.*, 2000). Das humane Makorin1-long besitzt eine 92%ige bzw. 27%ige Sequenzidentität zum Maus- bzw. Drosophila-Makorin1-Protein. Das Gen besteht aus acht Exons, die für ein Protein aus 482 Aminosäuren kodieren (Gray *et al.*, 2000). Dieses enthält vier C₃H-Zinkfinger, eine Makorin-Typ-Zinkfinger- und eine RING-Finger-Domäne. Über das Makorin1-long-Protein ist bereits bekannt, dass es mit der C-terminalen Domäne von hTERT, der katalytischen Untereinheit des Telomerase-Ribonukleoproteins, interagiert (Kim *et al.*, 2005). Hierbei fungiert Makorin1-long als eine E3-Ubiquitin-Ligase, die die Ubiquitinylierung der Telomerase und deren proteasomalen Abbau herbeiführt. Für diese Aktivität ist der C-terminale Bereich des Moleküls einschließlich der RING-Finger-Domäne erforderlich. Die lange Makorin1-Variante übt auch bei anderen Proteinen wie p53 und p21 (Lee *et al.*, 2009), L-FILIP (*filamin A interacting protein 1*; Shimada *et al.*, 2009), *West Nile*-Viruscapsidprotein (WNVCp; Ko *et al.*, 2010), FADD (*fas-associated protein with death domain*; Eun-Woo Lee *et al.*, 2012) und PPARγ (Kim *et al.*, 2014) eine Funktion als E3-Ubiquitin-Ligase aus. Zudem wurde beschrieben, dass rekombinant exprimiertes Makorin1long in der Zelle sehr instabil ist, da es sich selbst ubiquitinyliert, um anschließend abgebaut zu werden (Kim *et al.*, 2005).

Im Gegensatz zu Makorin1-long ist über die Funktion von Makorin1-short bisher nichts bekannt. Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurde erstmalig die vollständige humane cDNA-Sequenz für Makorin1-short isoliert. Ein Sequenzvergleich zwischen Mensch und Ratte zeigt eine 92% ige Sequenzidentität auf Proteinebene (Sequenzvergleich siehe Anhang) und eine 91%ige Sequenzidentität auf cDNA-Ebene. Die humane Makorin1-short-Variante besteht aus 329 Aminosäuren. Sie resultiert aus der Translation eines Transkripts, das nur die ersten fünf Exons enthält. Das kurze Transkript entsteht durch alternatives Spleißen und den Gebrauch eines Polyadenylierungssignals, das sich im Intron stromabwärts des fünften Exons befindet. Makorin1-short weist eine unvollständige RING-Finger-Domäne auf. Es fehlen die letzten sechs Aminosäuren dieser Domäne (RFACC), die für die Bindung des zweiten Zinkions in dieser Domäne essentiell sind. Darüber hinaus fehlt der C-terminale Zinkfinger. Wie die in Abbildung 20 dargestellten Ergebnisse zeigen, besitzt das Makorin1-short aufgrund der C-terminalen Verkürzung nicht mehr die Fähigkeit zur Autoubiquitinylierung. Die Expressionsrate in mehreren Zelllinien war stets relativ hoch (Daten nicht gezeigt) und die Behandlung der Zellen mit einem Proteasominhibitor hatte keinen Einfluss auf die zelluläre Makorin1-short-Konzentration (Abbildung 20). Die Konzentration von Makorin1long dagegen war selbst bei Überexpression sehr niedrig. Durch eine Behandlung der lebenden Zellen mit einem Proteasominhibitor konnte die Konzentration des Proteins deutlich erhöht werden. Zusätzlich wurden höhermolekulare Banden von Makorin1-long beobachtet, die wahrscheinlich ubiquitinylierte Formen darstellen; dies traf auf die kurze Form des Proteins nicht zu. Vermutlich besitzt die kurze Form des Makorin1-Proteins daher keine E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität mehr, sondern erfüllt möglicherweise andere Aufgaben in der Zelle als das C-terminal verlängerte Protein. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zwar auch eine Interaktion von Makorin1-long mit dem PABP bestätigt (Ergebnisse nicht gezeigt). Ob Makorin1-long gemeinsame Funktionen mit PABP ausübt, müsste allerdings noch untersucht werden.

Aufgrund der Präsenz der Zinkfinger wird vermutet, dass Makorin1 ein RNA-bindendes Protein darstellt (Gray *et al.*, 2000). RING-Finger-Domänen dagegen sind als Protein-Protein-Interaktionsdomänen beschrieben worden und kommen z.B. in E3-Ubiquitin-Ligasen und in Tumorsuppressor-Proteinen vor (Brzovic *et al.*, 2001, Wei *et al.*, 2003, Kim *et al.*, 2005). Überraschenderweise zeigten die Versuche mit Makorin1-short-Deletionsmutanten, dass die Bindung von Makorin1-*short* an PABP nicht über die trunkierte RING-Finger-Domäne erfolgt (Abbildung 10). Die Interaktion mit PABP findet innerhalb des Bereiches der Aminosäuren 111-234 statt. Dieser Bereich umfasst die Zinkfinger-Domäne 3 und die Aminosäuren zwischen den Zinkfinger-Domänen 2 und 3.

Die Versuche mit Makorin-short und verschiedenen PABP-Deletionsmutanten (RRM 1+2, RRM 2+3, RRM 3+4) führten alle zu einer Interaktion (Abbildung 11). Dieses Ergebnis zeigt, dass an dieser Interaktion mindestens zwei der vier RRMs von PABP beteiligt sind. Die PABP/Makorin1-short Interaktion wurde mithilfe verschiedener Ansätze (Immunpräzipitation in Zellkultur und im Rattenhirn, PDZ-Pulldown, Interaktion mit der VP-RNA) gezeigt. Sie erfolgt auch in Abwesenheit von RNA (Abbildung 9).

Mittlerweile (nicht im Rahmen dieser Doktorarbeit) wurde durch weitere Struktur- und Bindungsanalysen die Interaktion von Makorin1-short mit PABP sehr gut charakterisiert (Miroci *et al.*, 2012). Diese Studien zeigen, dass die Bindung von Makorin1-short an PABP ausschließlich über ein PAM2 (*PCI/PINT associated module 2*)-ähnliches Motiv vermittelt wird. Dieses Motiv befindet sich im Bereich der Aminosäuren 161-193 zwischen den Zinkfinger-Domänen 2 und 3. Andere Bereiche im Makorin1-short-Molekül tragen nicht zu der Interaktion bei. Diese Befunde stimmen mit den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen überein (Interaktionsbereich: innerhalb der Aminosäurensequenz 111-234).

Das PAM2-ähnliche Motiv von Makorin1-short weist Merkmale von zwei beschriebenen Motiven auf, nämlich PAM2 und DUF (*domain of unknown function*). Dabei hat die Sequenzspanne der Aminosäuren 161-176 insbesondere Ähnlichkeit mit den PAM2-Motiven von verschiedenen, bekanntermaßen an PABP-bindenden Proteinen, wie z. B. PAIP2, PAIP1 und ATXN2 (Kozlov *et al.*, 2004). Bei Makorin1-short ist jedoch ein hochkonservierter Leucin-Rest (Leu¹²⁸ in PAIP1, Leu¹¹¹ in PAIP2 und Leu⁹¹³ in ATXN2) durch einen Aspartat-Rest ersetzt (Asp¹⁶⁵). Die darauffolgende Region der Aminosäuren 177-193 weist Ähnlichkeit

mit dem C-terminalen Teil sogenannter DUF-Domänen auf (Abbildung 25). Solche DUF-Domänen fungieren in PABP-interagierenden Proteinen als PABP-Bindungsdomänen und stellen Äquivalente von PAM2-Motiven dar, wie es beispielsweise bei der GW182-Proteinfamilie der Fall ist (Kozlov *et al.*, 2010). Die Fähigkeit der PAM2-ähnlichen Domäne von Makorin1-short an PABP zu binden, unterscheidet sich jedoch von jener der PAM2/DUF-Domänen der anderen PABP-interagierenden Proteine. Letztere interagieren ausschließlich mit dem C-terminalen Teil von PABP, der sogenannten MLLE (MademoiseLLE)-Domäne (Khaleghpour *et al.*, 2001, Roy *et al.*, 2002). Die PAM2-ähnliche Domäne von Makorin1-short interagiert indes bevorzugt mit den RRMs 1 und 2 und in einem geringeren Maße mit den RRMs 2 und 3, RRMs 3 und 4 sowie dem C-terminalen Teil von PABP (Miroci *et al.*, 2012).

Makorin1-short ist in der Lage, auch mit anderen RRM-enthaltenden Proteinen zu interagieren, wie beispielsweise mit dem Translationsregulator IMP1 (*Insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 1*), der N-terminal zwei RRM-Domänen aufweist (Miroci *et al.*, 2012; *Supplemental Figures*).

Hs	TNRC6A	1605	<mark>S</mark> VN <mark>WPP<mark>EF</mark>RP<mark>G</mark>E PWKG YP</mark>	1622
Hs	TNRC6B	1471	<mark>S</mark> SNAS <mark>WPPEF</mark> QP <mark>G</mark> VPWK G I Q	1490
Hs	TNRC6C	1382	<mark>S</mark> IN WPP <mark>EF</mark> HP <mark>G</mark> VPWKG LQ	1399
Dm	GW182	953	TAYTDLVQ <mark>EF</mark> EP <mark>G</mark> KPWKG SQ	971
Hs	PAIP1	126	<mark>SKL</mark> SVNAP <mark>EF</mark> YPSG Y S S SY T	145
Hs	PAIP2	109	<mark>S</mark> N <mark>L</mark> NP <mark>NA</mark> K <mark>EF</mark> V <mark>P</mark> GVKYGNI	127
Hs	ATXN2	908	VRK <mark>S</mark> T <mark>L</mark> NP <mark>NAKEF</mark> NPRSF	925
Hs	MKRN	161	AG <mark>S</mark> EDWV <mark>NA</mark> I <mark>EF</mark> V <mark>P</mark> GQ	176
Hs	MKRN	177	P YC G RTAPSO	CTEAPLOG 193

Abbildung 25: Sequenzvergleich von DUF- und PAM2-Domänen mit dem PABP-interagierenden Motiv von Makorin1-short.

Die konservierten Sequenzen innerhalb der DUF-Domänen der GW182-Proteinfamilie sind in lila und die innerhalb der PAM2-Domänen der PABP-bindenden Proteinen (PAIP1, PAIP2 und ATXN2) in gelb hervorgehoben. Die streng konservierten Reste innerhalb beider Domänen sind in türkis hervorgehoben. Ein hochkonservier Leucin-Rest innerhalb der PAM2-Domänen (in rot hervorgehoben) ist bei Makorin1-short durch einen Aspartat-Rest ersetzt. Die Zahlen beziehen sich auf die Aminosäureposition innerhalb der jeweiligen Proteine. Dm, *Drosophila melanogaster;* Hs, *Homo sapiens;* TNRC, *trinucleotide repeat containing gene protein;* Aminosäuresequenz, Einbuchstaben-Code (siehe Anhang). (Miroci *et al.*, 2012)

Die Bindungsstudien mit PABP und der VP-RNA (Abbildung 12) zeigen, dass Makorin1short an PABP auch dann bindet, wenn dieses an die dendritische Lokalisierungssequenz der VP-mRNA gebunden ist. Es ist denkbar, dass Makorin1-short an anderer Stelle an die VPmRNA bindet. Ob Makorin1-short tatsächlich ein RNA-bindendes Protein ist, müsste detaillierter untersucht werden. An den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Bereich der Tubulin-RNA bindet es zumindest nicht (Abbildung 12).

Über die Expression von Makorin1 auf mRNA- und Proteinebene im Zentralnervensystem ist bisher wenig bekannt. Durch in situ-Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass Makorin1 im Gehirn der Ratte exprimiert wird, und zwar hauptsächlich in der hippocampalen Struktur im Zellkörperbereich der Neuronen, im Neocortex (Abbildung 14) sowie im Cerebellum (Daten nicht gezeigt). Die Makorin1-mRNA tritt im Zellkörperbereich der Neuronen, jedoch nicht in den Dendriten auf, was eine lokale dendritische Translation des Makorin1-Proteins ausschließt. Weiterhin wurde durch ein Northern Blot-Experiment und eine RT-PCR-Analyse gezeigt, dass beide mRNAs (die kurze und die lange Makorin1-Variante) im Rattenhirn zu finden sind (Abbildung 13 und Abbildung 15). Auf Proteinebene überwiegt allerdings die kurze Variante. Die Konzentration der langen Form ist sehr gering, vermutlich aufgrund ihrer Autoubiquitinylierungsaktivität und des anschließenden proteasomalen Abbaus. In Neuronen konnte das Makorin1-Protein im Zellkern, im Soma und in den proximalen Dendriten detektiert werden, was auf Aufgaben im Zellkern und im Cytoplasma schließen lässt (Abbildung 17 und Abbildung 19). Diese Annahme wird durch das Ergebnis des Pulldown-Experiments (Abbildung 24) unterstützt, bei welchem potentielle Interaktionspartner von Makorin1-short detektiert wurden. Es wurden dabei mehrere Regulatoren der Transkription bzw. des Spleißvorgangs (USF2; NFAR-2; SRSF1, -7, -9 und -10; HNRNP A2/B1, -H3, -R; NCBP80), die Aufgaben im Zellkern ausüben, sowie das im Cytoplasma wirkende Upf1-Protein identifiziert. Die SRSF- sowie die HNRNP-Proteine enthalten RRM-Domänen, über die die Interaktion mit Makorin1-short vermittelt wird.

Die Verteilung von Makorin1 in den Dendriten ist nicht homogen, das Protein scheint dort vielmehr in granulären Strukturen lokalisiert zu sein, die an RNA-*granules* erinnern. RNA-*granules* können verschiedene Funktionen ausüben. Die zwei wichtigsten RNA-*granules*-Typen sind die *stress granules* (SGs), welche inhibierte Translationsinitiations-Komplexe enthalten, und die *P-Bodies* (PBs, *processing bodies*), in denen am mRNA-Abbau beteiligte Faktoren enthalten sind. Die Klassifizierung der RNA-*granules* basiert auf ihrer

89

Zusammensetzung, ihrer Lokalisation in der Zelle, dem Zelltyp, der Zellantwort auf einen Stimulus und weiteren funktionellen Eigenschaften (Anderson et al., 2014). Die meisten bisher bekannten SG-Komponenten sind in nicht-neuronalen Zellen identifiziert worden. SGs in nicht-neuronalen Zellen enthalten die kleine ribosomale Untereinheit, Komponenten des Translationsinitiations-Komplexes, mRNA-bindende Proteine, die den mRNA-Transport regulieren, sowie stressabhängige RNA-bindende Faktoren (Anderson und Kedersha, 2006). Die P-Bodies enthalten neben mRNPs fast alle Enzyme, die im Zellplasma am RNA-Abbau beteiligt sind, wie z.B. Deadenylasen, Decapping-Enzyme und Exonukleasen. Des Weiteren enthalten die *P-Bodies* auch NMD-Faktoren oder Faktoren, die am Abbau durch siRNAs oder miRNAs beteiligt sind, aber sie enthalten kein PABP (Anderson und Kedersha, 2006; Parker und Sheth, 2007). Die Proteinzusammensetzung der neuronalen mRNP-granules ist ähnlich aber nicht identisch mit der von PBs und SGs in nicht-neuronalen Zelltypen. Die neuronalen RNA-granules enthalten mRNA, die kleine und die große ribosomale Untereinheit, Translationsinitiationsfaktoren, Motorproteine und RNA-bindende Proteine (beispielsweise FMRP, Staufen, PABP), die die mRNA-Funktion regulieren (Sossin und DesGroseilliers, 2006). Auf molekularer Ebene sind jedoch neuronale RNA-granules bisher nur unzureichend charakterisiert worden. Bislang scheinen sie als Transport- und Speicherorte für translationsinhibierte mRNAs zu dienen. Wenn die Synthese von einzelnen Proteinen an bestimmten Synapsen benötigt wird, wird die translationale Repression aufgehoben. Wie alle mRNAs müssen dendritische mRNAs nach einer gewissen Zeit abgebaut werden. Dies geschieht in RNA-granules, die das spezifische Equipment für diese Aufgabe besitzen, ähnlich den PBs in nicht-neuronalen Zellen.

PABP ist ein wichtiger Faktor bei der Translation und spielt eine entscheidende Rolle beim RNA-Metabolismus. In Neuronen kann zumindest eine partielle Kolokalisation von Makorin1-short und PABP beobachtet werden (Abbildung 18, C und D), daher sind gemeinsame Funktionen der beiden Proteine auch *in vivo* zu vermuten. Vermutlich ist Makorin1-short als PABP-Interaktionspartner ebenfalls am RNA-Metabolismus beteiligt, zumal Makorin1-short auch mit einem weiteren Regulator der Translation, dem IMP1 (*Insuline-like growth factor II mRNA-binding protein 1*), interagiert, wie inzwischen gezeigt wurde (Miroci *et al.*, 2012; *Supplement Figure 4*).

Für eine Beteiligung von Makorin1-short am RNA-Metabolismus sprechen darüber hinaus die Ergebnisse des *Pulldowns* (Kapitel 3.9). Alle dabei identifizierten Proteine sind am RNA-Metabolismus beteiligt, wie z.B. das Upf1- und das NFAR-2-Protein, die bei der Regulation der Translation mitwirken (Imanachi *et al.*, 2012; Pfeifer *et al.*, 2008).

Durch einen Polysomengradienten konnte gezeigt werden, dass Makorin1-short im Gegensatz zu PABP nicht an der aktiven Translation beteiligt ist, da es nicht an Polysomen gebunden ist (Abbildung 21B). Makorin1-short ist nur in den leichten mRNP-Fraktionen zu detektieren, ein Hinweis auf eine wahrscheinliche Beteiligung bei der Proteinsynthese auf der Ebene der Translationsinitation. Inzwischen wurde durch sogenannte Tethering-Experimente gezeigt, dass Makorin1-short nach der Bindung an eine Reporter-mRNA die Reporter-Proteinsynthese erheblich stimuliert, während die mRNA-Stabilität nicht beeinflusst wird, was eine Interaktion von Makorin1-short mit der Translationsmaschinerie annehmen lässt (Miroci et al., 2012). Weiterhin wurde in dieser Arbeit eine Assoziation von Makorin1-short mit dendritisch lokalisierten mRNAs, wie MAP2 und Arc/Arg3.1, in lebenden Neuronen festgestellt. Dies lässt vermuten, dass Makorin1-short möglicherweise die Proteinsynthese in den Dendriten reguliert. Ob Makorin1-short eine Rolle bei der Translation der VasopressinmRNA spielt, ist noch zu klären. Es konnte jedenfalls gezeigt werden, dass Makorin1-short in vitro an die kodierende Vasopressin-RNA-Sequenz bindet, allerdings ist unklar, ob die Bindung direkt oder indirekt über PABP erfolgt (Abbildung 12). Ein Zusammenspiel von Makorin1-short und PABP beim Metabolismus der dendritischen Vasopressin-mRNA ist denkbar.

Weiterhin weist die Präsenz des Makorin1-short-Proteins in isolierten hippocampalen Synaptosomen sowie in der postsynaptischen Dichte (Abbildung 22) auf eine mögliche Beteiligung bei der Regulation der lokalen Proteinbiosynthese in Dendriten und Synapsen hin. Die Annahme einer potentiellen Funktion von Makorin1-short für die synaptische Plastizität wurde inzwischen durch das im Folgenden dargestellte Experiment unterstützt. Die Induzierung der neuronalen Plastizität durch die hochfrequente Stimulation des *Tractus perforans* (*perforant path*) bewirkt *in vivo* eine Akkumulation von Makorin1-short in der aktivierten dendritischen Lamina des *Gyrus dentatus* (Miroci *et al.*, 2012). Eine solche Stimulation erhöht auch die aktivitätsabhängige Translation dendritischer mRNAs, die für die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Kinase II α -Untereinheit (α CaMKII), für MAP2 und für Arc kodieren (Steward *et al.*, 1999, Steward *et al.*, 1998). Mit den dendritisch lokalisierten MAP2und Arc/Arg3.1-mRNAs ist Makorin1-short *in vivo* assoziiert, allerdings ist es noch nicht bekannt in welcher Weise (Miroci *et al.*, 2012). Diese Tatsache untermauert jedenfalls die Vermutung einer Beteiligung des Makorin1-short-Proteins bei der Translation.

Bisherige Daten zeigen, dass vermutlich viele mRNA-Arten der aktivitätsabhängigen Translationsaktivierung unterworfen sind. Es gibt dagegen keinen Anhalt für eine Gesamterhöhung der dendritischen Proteinsynthese als globale Antwort auf die neuronale Aktivierung, zumal die geringe Ribosomenkonzentration in der Synapse einen limitierenden Faktor darstellt (Schuman *et al.*, 2006). Zum Beispiel verändert sich die dendritische Verteilung von PABP nach der synaptischen Stimulation nicht, wie die Ergebnisse dieses Experimentes zeigen (Miroci *et al.*, 2012). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass PABP bereits an alle polyadenylierten dendritischen mRNAs gebunden ist und es in der aktivierten Lamina zu keiner weiteren Akkumulation kommen muss. Durch die *in situ*-Hybridisierung wurde festgestellt, dass keine Makorin1-mRNA in den Dendriten lokalisiert ist (Abbildung 14). Das bedeutet, dass die Akkumulation von Makorin1 in der stimulierten dendritischen Lamina eher die aktivitätsabhängige Neuverteilung des Proteins darstellt und nicht aufgrund seiner lokalen Synthese zustande kommt.

Mittlerweile sind viele Proteine bekannt, die die lokale Proteinbiosythese an Synapsen blockieren, entsprechende Stimulatoren sind dagegen bisher nicht bekannt. Makorin1-short könnte dort gemeinsam mit anderen Proteinen solch eine translationsstimulierende Funktion ausüben. Durch die Fähigkeit an verschiedene PABP-Bereiche zu binden, könnte Makorin1-short die Rekrutierung, die Neuverteilung sowie die Bindung von unterschiedlichen Faktoren an das N-terminale, RRM1-4 enthaltende Ende sowie an die C-terminale MLLE-Domäne von PABP vermitteln. Beide PABP-Bereiche interagieren mit unterschiedlichen Proteinen (Kozlov *et al.*, 2001). Für eine Beteiligung von Makorin1-short an der Translationskontrolle spricht auch die Fähigkeit von Makorin1-short mit IMP1 (*auch als ZBP1 bekannt*), einem PABP-bindenden und bei der Translationsregulation involvierten Protein, zu interagieren (Patel *et al.*, 2006; Miroci *et al.*, 2012, *Supplement Figure* 4; Nicastro *et al.*, 2017).

Unabhängig von einer möglichen Beteiligung an der Translationskontrolle ist für Makorin1short auch eine Rolle beim dendritischen mRNA-Metabolismus im Zusammenhang mit PABP und Upf1 denkbar. In dem in dieser Arbeit dargestellten *Pulldown*-Experiment wurde Upf1 als mit Makorin1-short interagierendes Protein isoliert (Abbildung 24). Diese Interaktion konnte inzwischen auch durch Koimmunpräzipitation im Labor von Dr. Evita Mohr bestätigt werden (Klockow, 2014).

Upf1 ist eine Schlüsselkomponente sowohl beim Auslösen des zellulären Qualitätskontrollmechanismus, des *Nonsense*-vermittelten mRNA-Abbaus (NMD), als auch bei der Rekrutierung von RNA-abbauenden Enzymen (Kashima *et al.*, 2006; Isken *et al.*, 2008). Der NMD-Mechanismus führt zu einem raschen Abbau von mRNAs mit vorzeitigen Stoppcodons. Solche Stoppcodons, so genannte PTCs, gelangen durch Mutationen oder Spleißfehler in das offene Leseraster von Transkripten. Neben Upf1 ist der EJC eine Schlüsselkomponente des NMD (Giorgi *et al.*, 2007; Ivanov *et al.*, 2008).

PABP spielt durch die Interaktion mit eRF3 bei der Translationstermination eine wichtige Rolle. Eine ineffiziente Termination, die aus der fehlenden Interaktion von PABP mit dem terminierenden Ribosom resultiert, löst ebenfalls den NMD-Mechanismus aus. PABP und Upf1 üben eine antagonistische Funktion bei der normalen Translationstermination aus, PABP stimuliert sie, während Upf1 inhibierend wirkt (Silva et al., 2008; Ivanov et al., 2008). Der NMD-Mechanismus ist nicht nur auf den Zellkörper beschränkt, da z.B. auch die dendritisch lokalisierte Arc/Arg3.1-mRNA ein natürliches NMD-Substrat darstellt (Giorgi et al., 2007; Peebles und Finkbeiner, 2007). Das Arc/Arg3.1-Protein ist essentiell für die synaptische Plastizität und somit für Lernvorgänge und Gedächtnisbildung (Bramham et al., 2008 und 2010). Für die Ausübung seiner Funktion ist nicht nur eine schnelle, aktivitätsabhängige Expression von Arc/Arg3.1 wichtig, sondern auch ein zeitlich und räumlich getrennter Abbau des Arc/Arg3.1-Proteins und seiner mRNA (Bramham et al., 2008). Makorin1-short könnte eine Rolle bei der Feinregulation der Translation der Arc/Arg3.1-mRNA spielen, da es sowohl mit der Arc/Arg3.1-mRNA als auch mit Upf1 und PABP assoziiert (Miroci et al., 2012; Klockow, 2014). Da die Arc/Arg3.1-mRNA ein natürliches Substrat des NMD ist und daher sehr schnell abgebaut wird, ist ihre Translationseffizienz nur sehr gering. Durch die Interaktion von Makorin1-short mit Upf1 könnte PABP in den Proteinkomplex rekrutiert werden und so als Antagonist den NMD-Mechanismus inhibieren, wiederum einer Steigerung der Arc/Arg3.1was zu Proteinkonzentration führen könnte (Klockow, 2014).

In Anbetracht der im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse sowie der inzwischen weiter geführten Experimente lässt sich zusammenfassend sagen, dass Makorin1-short sehr wahrscheinlich an der Translationskontrolle dendritisch lokalisierter mRNAs beteiligt ist. Weiterhin deuten die Daten darauf hin, dass Makorin1-short gemeinsam mit PABP an der Feinregulation des Abbaus natürlicher, dendritischer NMD-Substrate beteiligt sein könnte (Klockow, 2014). Da Makorin1-short nicht nur im Cytosol lokalisiert ist, sondern auch im Zellkern zu finden ist, übt es hier vermutlich entsprechend andere Funktionen als im Cytosol aus. In dem im Ergebnisteil dargestellten *Pulldown*-Experiment (Abbildung 24) wurden passend dazu mehrere Regulatoren der Transkription bzw. des Spleißvorgangs (USF2; NFAR-2; SRSF1, -7, -9 und -10; HNRNP A2/B1, -H3, -R; NCBP1) identifiziert. Die SRSF-sowie die HNRNP-Proteine enthalten RRM-Domänen, über die die Interaktion mit Makorin1-short stattfinden könnte.

Von mehreren mRNA-bindenden Proteinen ist bekannt, dass sie multiple Funktionen ausüben. Beispielsweise ist das hochkonservierte DNA- und RNA-bindende Purα-Protein bei

der DNA-Replikation, der Transkription und der Translation beteiligt (Gallia *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2006). Ein weiteres Beispiel sind die Staufen1- und Staufen2-Proteine, die beim dendritischen Transport von mRNAs (Tang *et al.*, 2001, Falley *et al.*, 2009) sowie bei der Kontrolle der mRNA-Stabilität, beim sogenannten *staufen1-mediated decay* (SMD) beteiligt sind (Kim *et al.*, 2005, Park *et al.*, 2013). Staufen2 ist darüber hinaus notwendig für die Ausbildung der dendritischen Dornen. Fehlt das Protein, sinkt die Zahl der dendritischen Dornen und ihre Struktur ist zusätzlich verändert (Goetze *et al.*, 2006). Sollte Makorin1-short ein mRNA direkt bindendes Protein sein, würden sich seine mutmaßlich multiplen Funktionen in diese Ergebnisse gut einreihen.

Abschließend kann festgehalten werden, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit das Makorin1-short-Protein erstmalig als PABP-Interaktionspartner identifiziert und auf mRNAsowie Proteinebene charakterisiert, seine vorwiegend hippocampale Lokalisation innerhalb des Gehirns sowie subzelluläre Verteilung beschrieben und mittels mehrerer Ansätze seine möglichen Funktionen sowie weiteren Interaktionspartner untersucht wurden. Dabei konnten grundlegende Erkenntnisse gewonnen werden, die mit den Ergebnissen späterer Veröffentlichungen konformgehen.

5 Zusammenfassung

Für die Reaktion auf äußere Reize muss ein Organismus in der Lage sein, die Expression bestimmter Gene schnell und präzise kontrollieren zu können. Beim Prozess des Lernens und der Gedächtnisbildung ist dieser Vorgang im Gehirn von großer Bedeutung, da die neuronalen Vernetzungen sich in ständiger Veränderung befinden. Die Kontrolle der Genexpression kann dabei auf Ebene der Transkription, der mRNA-Prozessierung, des Transports einer mRNA aus dem Zellkern und der Translation bis hin zur Degradation einer mRNA erfolgen. Dabei kommt dem gerichteten Transport einiger mRNA-Spezies in bestimmte Zellkompartimente von Neuronen und nicht-neuronalen Zellen eine besondere Rolle zu. In Neuronen, die durch tausende Synapsen miteinander verknüpft sind und auf Reize schnell reagieren müssen, ist der gerichtete mRNA-Transport in die Dendriten und die lokale Translation an Synapsen von besonderer Bedeutung. Der Transport von mRNAs in die Dendriten erfolgt in messenger Ribonukleoproteinpartikeln (mRNPs), die mit Hilfe von Motorproteinen entlang des Zytoskeletts in die Dendriten gelangen. Dieser Transport wird durch Sequenzen (cis-agierende Elemente) innerhalb der zu transportierenden mRNA gesteuert, die mit bestimmten Proteinen (trans-agierende Faktoren) unter Ausbildung von mRNPs interagieren. Zu den trans-agierenden Faktoren gehört auch das multifunktionelle Poly(A)-Bindungsprotein (PABP), das spezifisch unter anderem an das cis-Element der -Vasopressin-mRNA- bindet und deren Transport in die Dendriten vermittelt. PABP ist ein während der Evolution hochkonserviertes Protein und weist zahlreiche Funktionen in eukaryotischen Zellen auf. Es besteht N-terminal aus vier nicht-identischen RNA-Bindungsdomänen vom Typ RRM (RNA-recognition motif) und C-Terminal aus einer prolinreichen Region und einer strukturierten C-terminalen Domäne (PABC oder MLLE genannt).

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems wie am Modell der Ratte ein neuer Interaktionspartner von PABP identifiziert. Hierbei handelt es sich um die kurze Variante des Makorin RING-Zinkfinger Proteins 1 (Makorin1, MKRN1). Diese Interaktion konnte sowohl im artifiziellen Hefe-Zwei-Hybrid-System als auch im Zellkultursystem von Säugern durch Koimmunpräzipitation und mit Hilfe eines sogenannten PDZ-*Pulldowns* bestätigt werden.

Makorin1 ist ein modular aufgebautes Protein: N-terminal weist es drei Zinkfinger sowie einen Makorin-Typ-Zinkfinger auf. C-terminal folgen eine RING-Finger-Domäne sowie ein weiteres Zinkfinger-Motiv. Bei der kurzen Proteinvariante ist der C-Terminus verkürzt. Der C-terminale Zinkfinger fehlt, und die RING-Finger-Domäne ist um die letzten sechs Aminosäuren verkürzt.

Zur Identifizierung des Interaktionsbereiches wurden Versuche mit Makorin1- und PABP-Deletionsmutanten durchgeführt. Diese zeigten, dass bei der PABP/Makorin1-short-Interaktion der Aminosäurebereich 111-234 beteiligt ist. Dieser Bereich umfasst die Zinkfinger-Domäne 3 und die Aminosäuren zwischen den Zinkfinger-Domänen 2 und 3. Die RING-Finger-Domäne und der Makorin-Typ Zinkfinger binden nicht an das PABP. Seitens PABP sind an dieser Interaktion mindestens zwei der vier RRMs beteiligt.

Über die Funktion des Makorin1-Proteins ist bisher kaum etwas bekannt. Aufgrund der Präsenz der Zinkfinger wird vermutet, dass Makorin1 ein RNA-bindendes Protein darstellt. Die lange Makorin1-Variante fungiert bei einigen Proteinen als eine E3-Ubiquitinligase und ist zu Auto-Ubiquitinylierung fähig. Es konnte gezeigt werden, dass die verkürzte Proteinvariante aufgrund der unvollständigen RING-Finger Domäne diese Funktion nicht mehr besitzt.

Bei der Analyse verschiedener Gewebe der Ratte (Herz, Gehirn, Milz, Lunge, Leber, Muskel, Niere, Testis) wurde festgestellt, dass die mRNA-Expression beider Makorin1-Varianten im Gehirn und im Hoden am stärksten ist.

Parallel zur mRNA-Expression wurde die Proteinexpression im Gehirn sowohl durch *Western Blot*-Analysen als auch immunzytologisch und immunhistochemisch nachgewiesen. Die protein-chemische Analyse zeigte darüberhinaus, dass die kurze Makorin1-Isoform überwiegt. Wie erwartet entsprachen im Gehirn die Intensitäten der Proteinverteilung denen der mRNA-Verteilung.

Die Untersuchungen zur intrazellulären Verteilung von endogenem Makorin1 in eukaryotischen HeLa-Zellen bewiesen die Präsenz sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma. In Neuronen wurde es in Somata, in den Dendriten und in den Nuklei detektiert. In isolierten hippocampalen Synaptosomen sowie in der postsynaptischen Dichte (PSD) ist die kurze Makorin1-Isoform angereichert. Dies wurde postuliert und hier zum ersten Mal

gezeigt und ist deswegen von besonderer Bedeutung, besitzen diese Neuronenstrukturen bei der synaptischen Plastizität und damit bei Lernprozessen und Gedächtnis doch eine zentrale Rolle.

Die Überprüfung, ob Makorin1-short sowie PABP an der aktiven Translation beteiligt sind, ergab in der Tat den starken Hinweis, dass eine Beteiligung bei der Proteinsynthese auf der Ebene der Translationsinitation gegeben ist. Ob Makorin1-short bei der Translationsregulation der -Vasopressin-mRNA- in den Dendriten eine Rolle spielt, ist bisher offen. Mit Hilfe einer Affinitätschromatographie mit immobilisierter RNA konnte *in vitro* jedoch gezeigt werden, dass Makorin1 an die -Vasopressin-mRNA- bindet. Ob diese Bindung direkt oder indirekt über das PABP erfolgt, müssen weitere Experimente zeigen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen zudem auch auf eine mögliche Beteiligung von Makorin1-short am mRNA-Abbau durch den NMD (*nonsense-mediated mRNA decay*)-Mechanismus hin. Es wurde das UPF1-Protein, ein Schlüsselprotein von NMD, als potenzieller Interaktionspartner identifiziert.
6 Summary

For higher organisms the central nervous system is the key organ to ensure rapid adaption to environmental cues by controlling the expression of neuronal genes. The ability to react to external stimuli has to be fast, as it is of great importance for learning and memory formation due to the fact that the patterns of neural connections are continuously in the process of change. Gene expression can be controlled at different levels including transcription, mRNA processing, mRNA export from the nucleus, translation and mRNA degradation. mRNAtransport into defined cell compartments occurs both in neurons and non-neuronal cells. For neurons, which each are connected with neighboring cells via thousands of synapses, the directed and fast mRNA-transport into dendrites and local translation at synapses is of outstanding importance. Dendritic mRNA transport is mediated by messenger ribonucleoprotein particles (mRNPs) that are dragged along cytoskeletal structures by motor proteins. It is specified by sequences (cis-acting elements) within mRNAs that interact with certain proteins (trans-acting factors) to collectively constitute mRNPs. A trans-acting factor described previously is the multifunctional poly(A)-binding protein (PABP), which among others specifically binds to the *cis*-acting element within vasopressin mRNA, thus presumably mediating its transport into dendrites. PABP is a protein highly conserved throughout evolution and exerts numerous functions in eukaryotic cells. N-terminally it consists of four non-identical RNA binding RRM-type domains (RNA-recognition motif), while C-terminally it comprises a proline-rich region and a structured C-terminal domain called PABC or MLLE. In the experimental work presented here, a novel PABP-interacting partner has been identified using a yeast two-hybrid screen. It represents a shorter isoform of the human Makorin RING-zinc finger of protein 1 (Makorin1, MKRN1). In addition to the artificial yeast two-hybrid system, the interaction could be confirmed in a mammalian cell culture system, both by co-immunoprecipitation and a method called PDZ-pulldown.

Makorin1 is a modular protein: N-terminally it consists of three zinc fingers and a Makorintype zinc finger, C-terminally it harbors a RING finger domain and a another zinc finger motif. The shorter protein variant identified here (Makorin1 short) is truncated at the Cterminus and lacks the C-terminal zinc finger as well as the last six amino acids of the RING finger domain.

In order to characterize the sites of interaction between the proteins, experiments using Makorin1- as well as PABP deletion mutants were carried out. A significant result was

revealed: an area within Makorin1 spanning amino acids 111-234 is necessary for the PABP/Makorin1-short interaction. This sequence includes the zinc finger domain 3 and the amino acids linking zinc finger domains 2 and 3. The RING finger domain and the Makorin1-type zinc finger do not bind to PABP. As far as PABP is concerned at least two of the four RRMs are involved in the interaction between both proteins.

So far, hardly anything is known about the function of Makorin1. Because of the presence of zinc fingers it is supposed that Makorin1 is an RNA-binding protein. The long Makorin1 variant acts as E3 ubiquitin ligase for some proteins and is capable of autoubiquitination, whereas the short protein variant does not appear to catalyze its own ubiquitination because of its incomplete RING finger domain.

When investigating mRNA expression of both Makorin1 variants in different rat tissues (heart, brain, spleen, lung, liver, muscle, kidney, testis) it could be clearly demonstrated that the mRNA expression is strongest in the brain and the testis. In addition, corresponding rat brain Makorin1 protein expression was demonstrated by Western blot experiments as well as immunocytological and immunohistochemical analyses, in which the Makorin1-short isoform predominated.

The intracellular distribution of endogenous Makorin1 in mammalian HeLa cells included the nucleus and cytoplasm. In rat neurons it could be detected in the nucleus, somata and dendrites.

The short Makorin1 isoform was enriched both in isolated hippocampal synaptosomes and the postsynaptic density (PSD). These structures play a central role in synaptic plasticity as well as in learning and memory processes.

Furthermore, it could be shown that Makorin1-short, is not involved in ongoing translation. Rather, the results point to a possible role in regulating protein synthesis at the translationinitiation level. It is still to be resolved, whether Makorin1-short takes part in the translational regulation of vasopressin mRNA in dendrites. However, it could be shown that it binds to vasopressin mRNA *in vitro* by performing affinity chromatography studies with immobilized RNA. Whether this binding occurs directly or is mediated by PABP, remains to be shown by further experiments.

Moreover, the results of this work suggest another possible role of Makorin1-short, namely in mRNA decay by the NMD (nonsense-mediated mRNA decay) mechanism, because the UPF1 protein, a key factor of the NMD process, could be identified as a potential interaction partner of Makorin1-short. Further experiments are needed in order to elucidate this function in more detail.

7 Literaturverzeichnis

Anderson P., Kedersha N. (2006). RNA granules. J. Cell. Biol. 172, 803-808.

Anderson P., Kedersha N., Ivanov P. (2015). Stress granules, P-bodies and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 1849, 861-70.

Baas P.W. (1998) The role of motor proteins in establishing the microtubule arrays of axons and dendrites. *J. Chem. Neuroanat.* 14, 175-180.

Birnbaumer M. (2000) Vasopressin receptors. Trends endocrinol. Metab. 11(10), 406-410.

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.

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-depenent protein kinase II. *European Journal of Neuroscience* 13, 1881-1888.

Boeckers T.M., Segger-Junius M., Iglauer P., Bockmann J., Gundelfinger E.D., Kreutz M.R., Richter D., Kindler S., and Kreienkamp H.J. (**2004**). Differential expression and dendritic transcript localization of Shank family members: identification of a dendritic targeting element in the 3`untranslated region of Shank1 mRNA. *Mol. Cell. Neurosci.* 26, 182–190.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Bramham C.R., Wells D.G., (2007). Dendritic mRNA: transport, translation and function. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 5-14.

Brendel C., Rehbein, M. Kreienkamp H.J., Buck F., Richter D., Kindler S. (2004). Characterization of Staufen 1 ribonucleoprotein complexes. *Biochem. J.* 384, 239-246.

Brook M., Smith J. W. and Gray N. K. (2009). The DAZL and PABP families: RNA-binding proteins with interrelated roles in translational control in oocytes. *Reproduction* 137, 595–617.

Brzovic P.S., Rajagopal P, Hoyt D.W., King M.C., Klevit R.E. (**2001**). Structure of a BRCA1-BARD1 heterodimeric RING-RING complex. *Nature Structural & Molecular Biology*. 8 (10): 833–7.

Buchan J.R. (2014). mRNP granules: Assembly, function, and connections with disease. *RNA Biol*. 11:8, 1-12.

Bühler M., Steiner S., Mohn F., Paillusson A., Mühlemann O. (**2006**). EJC-independent degradation of nonsense immunoglobulin-mu mRNA depends on 3' UTR length. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13(5), 462-464.

Burgin K.E., Waxham M.N., Rickling S., Westgate S.A., Mobley W.C., Kelly P.T. (**1990**). In situ hybridisation histochemistry of Ca2+/calmodulin-depedent protein kinase in developing rat brain. *J. Neurosci.* 10, 1788-1798.

Chan W.K., Huang L., Gudikote J.P., Chang Y.F., Imam J.S., MacLean J.A. 2nd, Wilkinson M.F. (2007). An alternative branch of the nonsensemediated decay pathway. *EMBO J.* 26, 1820–1830.

Chang Y.F., Imam J.S., Wilkinson M.F. (**2007**). The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu. Rev Biochem.* 76, 51-74.

Collier B., Gorgoni B., Loveridge C., Cooke H. J. and Gray N. K. (2005). The DAZL family proteins are PABP-binding proteins that regulate translation in germ cells. *EMBO J*. 24, 2656–2666.

Craig A. W., Haghighat A., Yu A. T. and Sonenberg N. (**1998**). Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation. *Nature* 392, 520–523.

Davis L., Banker G.A., Steward O. (**1987**). Selective dendritic transport of RNA in hippocampal neurons in culture. *Nature* 330(6147), 477-479.

Di Liegro C.M., Schiera G., Di Liegro I. (2014). Regulation of mRNA transport, localization and translation in the nervous system of mammals. *Int J Mol Med.* 33, 747–762.

Doyle M., Kiebler M.A. (2011). Mechanisms of dendritic mRNA transport and its role in synaptic tagging. *EMBO J.* 30, 3540–3552.

Eliseeva I.A., Lyabin D.N., Ovchinnikov L.P. (2013). Poly(A)-binding proteins: structure, domain organization, and activity regulation. *Biochemistry (Mosc)*. 78(13), 1377-1391.

Eulalio A., Behm-Ansmant I., Izaurralde E. (2007). P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8, 9–22.

Eulalio A., Huntzinger E. & Izaurralde E. (**2008**). GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nature Structural & Molecular Biology* 15, 346 – 353.

Fabian M.R., Mathonnet G., Sundermeier T., Mathys H., Zipprich J.T., Svitkin Y.V., Rivas F., Jinek M., Wohlschlegel J., Doudna J.A., Chen C.Y., Shyu A.B., Yates J.R. 3rd, Hannon G.J., Filipowicz W., Duchaine T.F., Sonenberg N. (**2009**). Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation. *Mol. Cell* 35, 868-880.

Falley K., Schütt J., Iglauer P., Menke K., Maas C., Kneussel M., Kindler S., Wouters F. S., Richter D., & Kreienkamp H. J. (**2009**). Shank1 mRNA: Dendritic transport by kinesin and translational control by the 5`untranslated region. *Traffic* 7, 844–857.

Filipowicz W., Bhattacharyya S.N. & Sonenberg N. (**2008**). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature Rev. Genet.* 9, 102-114.

Ford L.P., Watson J., Keene J.D., Wilusz J. (**1999**). ELAV proteins stabilize deadenylated intermediates in a novel in vitro mRNA deadenylation/degradation system. *Genes Dev.* 13(2), 188-201.

Frey U., Morris RG. (1997). Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature*, 385(6616), 533-536.

Gallie D. R. (1991). The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes Dev.* 5(11), 2108-2116.

Gao Y., Tatavarty V., Korza G., Levin M. K. & Carson J. H. (**2008**). Multiplexed dendritic targeting of alpha calcium calmodulin-dependent protein kinase II, neurogranin, and activityregulated cytoskeleton-associated protein RNAs by the A2 pathway. *Molecular Biology of the Cell* 5, 2311–2327.

Garneau N.L., Wilusz J., Wilusz C.J. (2007). The highways and byways of mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 113–126.

Garner C.C., Tucker P.R. & Matus A. (1988). Selective Lokalisation of messenger RNA for cytoskeletal protein MAP2 in dendrites. *Nature* 336, 674-677.

Gehring N.H., Kunz J.B., Neu-Yilik G., Breit S., Viegas M.H., Hentze M.W., Kulozik A.E. (**2005**). Exon-junction complex components specify distinct routes of nonsense-mediated mRNA decay with differential cofactor requirements. *Mol. Cell* 20, 65–75.

Gingras A.C., Raught B., Sonenberg N. (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 913-963.

Gorgoni B. and Gray N. K. (2004). The roles of cytoplasmic poly(A)-binding proteins in regulating gene expression: a developmental perspective. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* 3, 125–141.

Gray E.G., Whittaker V.P. (1962). The isolation of nerve endings from brain: an electronmicroscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. *J Anat.* Jan, 96, 79-88.

Gray T.A., Hernandez, L., Carey A.H., Schaldach M.A., Smithwick M.J., Rus K., Marshall Graves J.A., Stewart C.L. and Nicholls R. D. (2000). The ancient source of a distinct gene family encoding proteins featuring RING and C(3)H zinc finger motifs with abundant expression in developing brain and nervous system. *Genomics* 66, 76–86.

Gray T.A., Wilson A., Fortin P.J., Nicholls R.D. (**2006**). The putatively functional Mkrn1-p1 pseudogene is neither expressed nor imprinted nor does it regulate its source gene in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 12039–12044.

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.

Harris K. M., Stevens J. K. (1989). Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to theirbiophysical characteristics. *J Neurosci.*, Vol 9(8), 2982-97.

Herb A., Wisden W., Catania M., Marechal D., Dresse A., & Seeburg P. (**1997**). Prominent dendritic localization in forebrain neurons of a novel mRNA and its product, dendrin. *Molecular and Cellular Neuroscience* 8, 367–374.

Hinnebusch A.G. (2014). The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. *Annu. Rev. Biochem.* 83, 779–812.

Hirokawa N., Takemura R. (2005). Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 201-214.

Hirotsune S., Yoshida N., Chen A., Garrett L., Sugiyama F., Takahashi S., Yagami K., Wynshaw-Boris A., Yoshiki A. (**2003**). An expressed pseudogene regulates the messenger-RNA stability of its homologous coding gene. *Nature* 423(6935), 91-96.

Holbrook J.A., Neu-Yilik G., Hentze M.W., Kulozik A.E. (2004). Nonsense-mediated decay approaches the clinic. *Nat. Genet.* 36, 801–808.

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. Direct association of erf3/GSPT with polyadenylate-binding protein. *J. Biol. Chem.* 274(24), 16677-16680.

Huang Y., Carson J.H., Barbarese E. & Richter J.D. (2003). Facilitation of dendritic mRNA transport by CPEB. *Genes & Development* 17, 638-653.

Huang Y.-S. und Richter J. D. (2004). Regulation of local mRNA translation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 308-313.

Hunter T. (2007). The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond. *Mol Cell*. 28(5), 730-738.

Imamachi N., Tani H., und Akimitsu N. (**2012).** Up-frameshift protein1 (UPF1): Multitalented entertainer in RNA decay. *Drug Discov. Ther.* 6, 55-61.

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.

Isken O., Kim Y.K., Hosoda N., Mayeur G.L., Hershey J.W. and Maquat L.E. (**2008**). Upf1 phosphorylation triggers translational repression during nonsense-mediated mRNA decay. *Cell* 133, 314–327.

Ivanov P.V., Gehring N.H., Kunz J.B., Hentze M.W., Kulozik A.E. (**2008**). Interactions between UPF1, eRFs, PABP and the exon junction complex suggest an integrated model for mammalian NMD pathways. *EMBO J.* 27, 736–747.

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 Labaratory Press*.

Jambhekar A. and Derisi J.L. (2007). *Cis*-acting determinants of asymetric, cytoplasmic RNA transport. *RNA* 13, 625-642.

Jiang C., Schuman E.M. (2002). Regulation and function of local protein synthesis in neuronal dendrites. *Trends Biochem. Sci.*, 27(10), 506-13.

Johnston M. (1987). A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of Saccharomyces cerevisiae. *Microbiol. Rev.* 51(4), 458-476.

Kahvejian A., Svitkin Y.V., Sukarieh R., M'Boutchou M.N., Sonenberg N. (**2005**). Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes Dev.* 19, 104–113.

Kanai Y., Dohmae N., Hirokawa N. (**2004**). Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* 43:513-525.

Kapp L.D., Lorsch J.R. (2004). The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 657-704.

Kashima I., Yamashita A., Izumi N., Kataoka N., Morishita R., Hoshino S., Ohno M., Dreyfuss G., Ohno S. (**2006**). Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev.* 20, 355–367.

Kawahara H., Imai T., Imataka H., Tsujimoto M., Matsumoto K., Okano H. (**2008**). Neural RNAbinding protein Musashi1 inhibits translation initiation by competing with eIF4G for PABP. *J. Cell. Biol.* 181(4), 639-653.

Khaleghpour K., Kahvejian A., De Crescenzo G., Roy G., Svitkin Y.V., Imataka H., O'Connor-McCourt M. and Sonenberg N. (**2001**). Dual interactions of the translational repressor Paip2 with poly(A)-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 21, 5200–5213.

Kim J.H., Park S.M., Kang M.R., Oh S.Y., Lee T.H., Muller M.T., Chung I.K. (**2005**). Ubiquitinligase MKRN1 modulates telomere length homeostasis through a proteolysis of hTERT. *Genes Dev* 19, 776-781.

Kindler S., Rehbein M., Classen B., Richter D. and Boeckers T.M. (**2004**). Distinct spatiotemporal expression of SAPAP transcripts in the developing rat brain: A novel dendritically localized mRNA. *Brain Research: Molecular Brain Research* 1, 14–21.

Kindler S., Wang H., Richter D. & Tiedge H. (2005). RNA transport and local control of translation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21, 223–245.

Kindler S., Dieterich D.C., Schutt J., Sahin J., Karpova A., Mikhaylova M., Schob C., Gundelfinger E.D., Kreienkamp H.J. and Kreutz M.R. (**2009**). Dendritic mRNA targeting of Jacob and N-methyl-d-aspartate-induced nuclear translocation after calpain-mediated proteolysis. *Journal of Biological Chemistry* 37, 25431–25440.

Klockow W. (2014). Dissertation: Untersuchungen zur Expression des RNA-bindenden Proteins Makorin1 im Gehirn der Ratte. Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.

Ko A., Lee E.W., Yeh J.Y., Yang M.R., Oh W., Moon J.S., Song J. (2010). MKRN1 induces degradation of West Nile virus capsid protein by functioning as an E3 ligase. *J Virol*. 84(1), 426-436.

Ko A., Shin J.Y., Seo J., Lee K.D., Le, E.W., Lee M.S., Lee H.W., Choi I.J., Jeong J.S., Chun K.H., Song J. (**2012**). Acceleration of gastric tumorigenesis through MKRN1-mediated posttranslational regulation of p14ARF. *J Natl Cancer Inst.* 104(21), 1660-1672.

Kozlov G., De Crescenzo G., Lim N.S., Siddiqui N., Fantus D., Kahvejian A., Trempe J.F., Elias D., Ekiel I., Sonenberg N., O'Connor-McCourt M. and Gehring K. (**2004**). Structural basis of ligand recognition by PABC, a highly specific peptide binding domain found in poly(A)-binding protein and a HECT ubiquitin ligase. *EMBO J.* 23, 272–281

Kozlov G., Safaee N., Rosenauer A. and Gehring K. (**2010**) Structural basis of binding of P-bodyassociated proteins GW182 and ataxin-2 by the Mlle domain of poly(A)-binding protein. *J. Biol. Chem.* 285, 13599–13606.

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259), 680-685.

Le Hir H., Izaurralde E., Maquat L.E., Moore M.J. (2000). The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *EMBO J.* 19, 6860–6869.

Lee E.W., Lee M.S., Camus S., Ghim J., Yang M.R., Oh W., Ha N.C., Lane D.P., Song J. (**2009**). Differential regulation of p53 and p21 by MKRN1 E3 ligase controls cell cycle arrest and apoptosis. *EMBO J.* 28, 2100-2113.

Lee E.W., Kim J.H., Ahn Y.H., Seo J., Ko A., Jeong M., Kim S.J., Ro J.Y., Park K.M., Lee H.W., Park E.J., Chun K.H., Song J. (2012). Ubiquitination and degradation of the FADD adaptor protein regulate death receptor-mediated apoptosis and necroptosis. *Nat. Commun.* 3, 978.

Lehner B., Sanderson C.M. (2004). A protein interaction framework for human mRNA degradation. *Genome Res.* 14, 1315-1323.

Link W., Konietzko, U., Kauselmann G., Krug M., Schwanke B., Frey U., Kuhl D. (**1995**). Somatodendritic expression of an immediate early gen is regulated by synaptic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5734-5738.

Ludwig M., Pittman Q.J. (2003). Talking back: dendritic neurotransmitter release. *Trends Neurosci.* 26(5), 255-261.

Mangus D.A., Evans M.C. and Jacobson A. (2003). Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biol.* 4, 223.

Martin K.C., Zukin R.S. (2006). RNA trafficking and local protein synthesis in dendrites: an overview. *J Neurosci*, 26(27), 7131-4134.

Martineau Y., Derry M. C., Wang X., Yanagiya A., Berlanga J.J., Shyu A.B., Imataka H., Gehring K. and Sonenberg N. (**2008**). Poly(A)-binding protein-interacting protein 1 binds to eukaryotic translation initiation factor 3 to stimulate translation. *Mol. Cell. Biol.* 28, 6658–6667.

Mead E.J., Masterton R.J., von der Haar T., Tuite M.F., Smales C.M. (2014). Control and regulation of mRNA translation. *Blochem. Soc. Trans.* 42, 151–154.

Mendell J.T., Sharifi N.A., Meyers J.L., Martinez-Murillo F., Dietz H.C. (**2004**). Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutes genomic noise. *Nat. Genet.* 36, 1073–1078.

Merrick W.C., Harris M.E. (2014). Control not at initiation? Bah, humbug! EMBO J. 33, 3-4.

Miroci H., Schob C., Kindler S., Ölschläger-Schütt J., Fehr S., Jungenitz T., Schwarzacher S.W., Bagni C., Mohr E. (**2012**). Makorin ring zinc finger protein 1 (MKRN1), a novel poly(A)-binding protein-interacting protein, stimulates translation in nerve cells. *J. Biol. Chem.* 287(2), 322-334.

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. U S A* 92, 4377-4381.

Mohr E. (1999). Sucellular RNA Compartmentalization. Progress in Neurobiology 57, 507-525.

Mohr E. und Richter D. (2000). Axonal mRNAs: functional significance in vertebrates and invertebrates. *J. Neurocytol.* 29, 787-795.

Mohr E. und Richter D. (2003a). Molecular determinants and physiological relevance of extrasomatic RNA localization in neurons. *Front. Neuroendocrinol.* 24, 128-139.

Mohr E. und Richter D. (2003b). Local synthesis of the rat vasopressin precursor in dendrites of in vitro cultured nerve cells. *Mol. Brain Res.* 114, 115-122.

Mohr E., Richter D. (2004). Subcellular vasopressin mRNA trafficking and localtranslation in dendrites. *J. Neuroendocrinol.* 16, 333-339.

Mohr E., Morris J.F. & Richter D. (**1995**). Differential subcellular mRNA targeting: Deletion of a single nucleotid prevents the transport to axons but not to dendrites of rat hypothalamic magnocellular neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4377-4381.

Mohr E., Prakash N., Vieluf K., Fuhrmann C., Buck F. und Richter D. (2001). VP mRNA localization in nerve cells: characterization of cis-acting elements and trans-acting factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 98, 7072-7079.

Mohr E. & Richter D. (1994). Vasopressin in the regulation of body funktions. *Journal of Hypertension* 12, 345-348.

Monshausen M., Putz U., Rehbein M., Schweizer M., DesGroseillers L., Kuhl D., Richter D. & Kindler S. (**2001**). Two rat brain Staufen isoforms differentially bind RNA. *Journal of Neurochemistry* 1, 155–165.

Mori Y., Imaizumi K., Katayama T., Yoneda T., Tohyama M. (2000). Two cis-acting elements in the 3' untranslated region of alpha-CaMKII regulate its dendritic targeting. *Nat. Neurosci.* 11, 1079-1084.

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.

Naisbitt S., Kim E., Tu J.C., Xiao B., Sala C., Valtschanoff J., Weinberg R.J., Worley P.F., Sheng M. (**1999**). Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron* 23(3), 569-582.

Nicastro G., Candel A.M., Uhl M., Oregioni A., Hollingworth D., Backofen R., Martin S.R., Ramos A. (2017). Mechanism of β -actin mRNA Recognition by ZBP1.*Cell Rep.* 18(5),1187-1199.

Ohyama T., Nagata T., Tsuda K., Kobayashi N., Imai T., Okano H., Yamazaki T., Katahira M. (**2012**). Structure of Musashi1 in a complex with target RNA: the role of aromatic stacking interactions. *Nucleic Acids Res.* 40(7), 3218-3231.

Omwancha J., Zhou X.F., Chen S.Y., Baslan T., Fisher C.J., Zheng Z., Cai C., Shemshedini L. (**2006**). Makorin RING finger protein 1 (MKRN1) has negative and positive effects on RNA polymerase II-dependent transcription. *Endocrine* 29, 363-373.

Parker R., Sheth U. (2007). P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell* 25, 635-646.

Parker R. and Song H. (2004). The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 121–127.

Patel G.P., Ma S. and Bag J. (**2005**). The autoregulatory translational control element of poly(A)binding protein mRNA forms a heteromeric ribonucleoprotein complex. *Nucleic Acids Res.* 33, 7074– 7089.

Pelletier J., Sonenberg N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334(6180), 320-325.

Pestova T.V., Lorsch J.R. and Hellen C.U.T. (**2007**). The mechanism of translation initiation in eukaryotes. In Translational Control in Biology and Medicine (Mathews, M.B., Sonenberg, N. and Hershey, J.W.B., eds). pp, 87–128, *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor*.

Pfeifer I., Elsby R., Fernandez M., Faria P.A., Nussenzveig D.R., Lossos I.S., Fontoura B.M.A., Martin W.D., Barber G.N. (**2008**). NFAR-1 and -2 modulate translation and are required for efficient host defense. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(11), 4173–4178.

Prakash N., Fehr S., Mohr E., Richter D. (**1997**). Dendritic lokalization of rat vasopressin mRNA ultrastructural analysis and mappingof targeting elements. *Eur. J. Neuroscience* 9, 523-532.

Ralser M., Albrecht M., Nonhoff U., Lengauer T., Lehrach H., Krobitsch S. (2005). An integrative approach to gain insights into the cellular function of human ataxin-2. *J. Mol. Biol.* 246(1), 203-214

Rehbein M., Kindler S., Horke S. Richter D. (**2000**). Two trans-acting rat brain proteins, MARTA1 und -2, interact specifically with the dendritic targeting element in MAP2 mRNAs. *Mol. Brain Res.* 79, 192-2001.

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.

Roy G., De Crescenzo G., Khaleghpour K., Kahvejian A., O'ConnorMcCourt M., and Sonenberg N. (**2002).** Paip1 interacts with poly(A)binding protein through two independent binding motifs. *Mol. Cell. Biol.* 22, 3769–3782.

Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manuel. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.*

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 74(12), 5463-5467.

Schuman E.M., Dynes J.L., and Steward O. (2006). Synaptic regulation of translation of dendritic mRNAs. *J. Neurosci.* 26, 7143–7146.

Shimada H., Shiratori T., Yasuraoka M., Kagaya A., Kuboshima M., Nomura F., Takiguchi M., Ochiai T., Matsubara H., Hiwasa T. (2009). Identification of Makorin 1 as a novel SEREX antigen of esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 9, 232.

Silva, A.L., Ribeiro, P., Inacio, A., Liebhaber, S.A. and Romao, L. (2008). Proximity of the poly(A)binding protein to a premature termination codon inhibits mammalian nonsense mediated mRNA decay. *RNA* 12, 2160–2170.

Singh G., Rebbapragada I. & Lykke-Andersen J. (**2008**). A competition between stimulators and antagonists of upf complex recruitment governs human nonsense-mediated mRNA decay. *PLoS Biol.* 6, e111.

Skabkina O.V., Skabkin M.A., Popova N.V., Lyabin D.N., Penalva L.O. and 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.

Smith R.W.P. and Gray N.K. (2010). Poly(A)-binding protein (PABP): a common viral target. *Biochem. J.* 426, 1-11.

Sofroniew, M.V. (1983). Vasopressin and oxytocin in the mammalian brain and spinal cord. *Trends Neurosci.* 6, 467-472.

Sossin W.S., DesGroseilliers L. (2006). Intracellular trafficking of RNA in neurons. *Traffic* 7, 1581-1589.

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.

Steward O., Wallace C.S., Lyford G.L., and Worley P.F. (**1998**). Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron* 21, 741–751.

Steward O., and Halpain S. (1999). Lamina-specific synaptic activation causes domain-specific alterations in dendritic immunostaining for MAP2 and CAM kinase II. J. Neurosci. 19, 7834–7845.

Sutton M.A. und Schuman E.M. (2005). Local translational control in dendrites and its role in long-term synaptic plasticity. *J. Neurobiol.* 64, 116-131.

Tang S.J., Meulemans D., Vazquez L., Colaco N., & Schuman E. (**2001**). A role for a rat homolog of staufen in the transport of RNA to neuronal dendrites. *Neuron* 3, 463–475.

Tange T.O., Shibuya T., Jurica M.S., Moore M.J. (**2005**). Biochemical analysis of the EJC reveals two new factors and a stable tetrameric protein core. *RNA* 11, 1869–1883.

Tiruchinpalli D.M., Oleynikov Y., Kelic S., Shenoy S.M., Hartley A., Stanton P.K., Singer R.H., Bassell G.J. (**2003**). Activity-dependent Trafficing and Dynamic Localization of Zipcode Binding Protein 1 and beta-Actin mRNA in Dendrites and Spines of Hippocampal Neurons. *J. of Neurosci.* 23, 3251-3261.

Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (**1979**). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 76(9), 4350-4354.

Tu J.C., Xiao B., Naisbitt S., Yuan J.P., Petralia R.S., Brakeman P., Doan A., Aakalu V.K., Lanahan A.A., Sheng M., Worley P.F. (**1999**). Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins. *Neuron* 23(3), 583-92.

Uchida N., Hoshino S., Imataka H., Sonenberg N. and Katada T. (2002). A novel role of the mammalian GSPT/eRF3 associating with poly(A)-binding protein in cap/poly(A)-dependent translation. *J. Biol. Chem.* 277, 50286–50292.

Wei X., Yu Z.K., Ramalingam A, Grossman S.R., Yu J.H., Bloch D.B., Maki C.G. (2003). Physical and functional interactions between PML and MDM2. *J Biol Chem.* 278(31):29288-97.

Wells S. E., Hillner P. E., Vale R. D., & Sachs A. B. (1998). Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol.Cell*, 2(1), 135-140.

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), 1416-1424.

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.

Yanagiya A., Svitkin Y.V., Shibata S., Mikami S., Imataka H. and Sonenberg N. (**2009**). Requirement of RNA binding of mammalian eukaryotic translation initiation factor 4GI (eIF4GI) for efficient interaction of eIF4E with the mRNA cap. *Mol. Cell. Biol.* 29, 1661–1669.

Zhang H.L., Singer R.H., Bassell G.J. (**1999**). Neurotrophin regulation of β -actin mRNA and protein localization within growth cones, *J. Cell. Biol.* 147, 59-70.

8 Anhang

8.1 Der Genetische Code

Erste Base		Dritte Base			
	U	С	А	G	
U	Phenylalanin	Serin	Tyrosin	Cystein	U
	Phenylalanin	Serin	Tyrosin	Cystein	С
	Leucin	Serin	STOP	STOP	А
	Leucin	Serin	STOP	Tryptophan	G
С	Leucin	Prolin	Histidin	Arginin	U
	Leucin	Prolin	Histidin	Arginin	С
	Leucin	Prolin	Glutamin	Arginin	А
	Leucin	Prolin	Glutamin	Arginin	G
Δ	Isoleucin	Threonin	Asparagin	Serin	U
	Isoleucin	Threonin	Asparagin	Serin	С
	Isoleucin	Threonin	Lysin	Arginin	А
	Methionin/START	Threonin	Lysin	Arginin	G
G	Valin	Alanin	Asparaginsäure	Glycin	U
	Valin	Alanin	Asparaginsäure	Glycin	С
	Valin	Alanin	Glutaminsäure	Glycin	А
	Valin	Alanin	Glutaminsäure	Glycin	G

Einbuchstaben-Code	Abkürzung	Aminosäure	
A Ala		Alanin	
C	Cys	Cystein	
D	Asp	Asparaginsäure	
Е	Glu	Glutaminsäure	
F	Phe	Phanylalanin	
G	Gly	Glycin	
Н	His	Histidin	
I	Ile	Isoleucin	
К	Lys	Lysin	
L	Leu	Leucin	
М	Met	Methionin	
Ν	Asn	Asparagin	
Р	Pro	Prolin	
Q	Gln	Glutamin	
R	Arg	Arginin	
S	Ser	Serin	
Т	Thr	Threonin	
V	Val	Valin	
W	Trp	Tryptophan	
Y	Tyr	Tyrosin	

8.2 Aminosäuren, Abkürzungen und Einbuchstaben-Code

8.3 Makorin1-Sequenzen

Homo sapiens Makorin1-short-mRNA, *GenBank accession no.*: AM236048, kodierende Sequenz: 7-996

1 acagtaatgg cggaggctgc aactcccgga acaacagcca caacatcagg agcaggagcg 61 gcagcggcga cggcggcagc agceteeece acceegatee ceacagteae egeeegtee 121 ctgggggggg gcggaggggg cggcggcagc gacggcagcg gcggcggctg gactaaacag 181 gtcacctgca ggtattttat gcatggggtt tgtaaggaag gagacaactg tcgctactcg 241 catgacetet etgacagtee gtatagtgta gtgtgcaagt atttteageg agggtaetgt 301 atttatggag accgctgcag atatgaacat agcaaaccat tgaaacagga agaagcaact 361 gctacagage taactacaaa gtcatecett getgetteet caagtetete ategatagtt 421 ggaccacttg ttgaaatgaa tacaggcgaa gctgagtcaa gaaattcaaa ctttgcaact 481 gtaggagcag gttcagagga ctgggtgaat gctattgagt ttgttcctgg gcaaccctac 541 tgtggccgta ctgcgccttc ctgcactgaa gcacccctgc agggctcagt gaccaaggaa 601 gaatcagaga aagagcaaac cgccgtggag acaaagaagc agctgtgccc ctatgctgca 661 gtgggagagt gccgatacgg ggagaactgt gtgtatctcc acggagattc ttgtgacatg 721 tgtgggctgc aggtcctgca tccaatggat gctgcccaga gatcgcagca tatcaaatcg 781 tgcattgagg cccatgagaa ggacatggag ctctcatttg ccgtgcagcg cagcaaggac 841 atggtgtgtg ggatctgcat ggaggtggtc tatgagaaag ccaaccccag tgagcgccgc 901 ttcgggatcc tctccaactg caaccacacc tactgtctca agtgcattcg caagtggagg 961 agtgctaagc aatttgagag caagatcata aagtgagact cctccccagt cttcatttgt 1021 gctttctctt ttggggaaga atttagtaac ttgtgccaac tttcaaccag atggaccgca 1081 tttaaatgca tgcattttat cttgaaactg ggatattcta atggggattt cttctttgta 1141 tttcagctag cttctaggtt agttggtcta tctactttta tttgaatgag gaaaccctgt 1201 gtatcagtta gaatcttcgt gctttttctg aggagattgt gtttaatgga ttattagcca 1261 gtttaggctc agtgaacaaa ctgatctagc tctgaatgta tgtttcctga cgttttacat 1321 ttccactttc ctattccatt cattaagcta gccaacaatc caccatcctt taaagattgt 1381 teteataact gaacaaaaac cacataatet aaacagagea aagetacaag aaataaattt 1441 atttaaacga a

111

Homo sapiens Makorin1-short-Proteinsequenz, GenBank accession no.: AAH79407

MAEAATPGTT ATTSGAGAAA ATAAAASPTP IPTVTAPSLG AGGGGGGSDG SGGWTKQVT
CRYFMHGVCK EGDNCRYSHD LSDSPYSVVC KYFQRGYCIY GDRCRYEHSK PLKQEEATAT
ELTTKSSLAA SSSLSSIVGP LVEMNTGEAE SRNSNFATVG AGSEDWVNAI EFVPGQPYCG
RTAPSCTEAP LQGSVTKEES EKEQTAVETK KQLCPYAAVG ECRYGENCVY LHGDSCDMCG
LQVLHPMDAA QRSQHIKSCI EAHEKDMELS FAVQRSKDMV CGICMEVVYE KANPSERRFG
ILSNCNHTYC LKCIRKWRSA KQFESKIIK

Rattus norvegicus Makorin1-short-Proteinsequenz, GenBank accession no.: CAJ84705

1 MAEAAAPGTT ATTSGAGAAA AAVAAASLTS IPTVAAPSPG AGGGGGGSDG SGGGWTKQVT 61 CRYFMHGVCK EGDNCRYSHD LSDSPYGVVC KYFQRGYCVY GDRCRYEHSK PLKQEEVTAT 121 DLSAKPSPAA SSSLPSGVGS LAEMNPGEAE SRNPNFPTVG AGSEDWVNAI EFVPGQPYCG 181 RTAPSCTEVP LQGSVTKEES EKEPTTVETE KQLCPYAAVG ECRYGENCVY LHGDSCDMCG 241 LQVLHPMDAA QRSQHIKSCI EAHEKDMELS FAVQRSKDMV CGICMEVVYE KANPSERRFG 301 ILSNCNHTYC LKCIRKWRSA KQFESKIIK

Proteinsequenz-Vergleich von Makorin1-short: Homo sapiens/Rattus norvegicus

Proteinsequenz-Identität: 92 %

 MAEAAAPGTT ATTSGAGAAA AAVAAASLTS IPTVAAPSPG AGGGGGGSDG MAEAATPGTT ATTSGAGAAA ATAAAASPTP IPTVTAPSLG AGGGGGGSDG
SGGGWTKQVT CRYFMHGVCK EGDNCRYSHD LSDSPYGVVC KYFQRGYCVY SGGGWTKQVT CRYFMHGVCK EGDNCRYSHD LSDSPYSVVC KYFQRGYCIY
GDRCRYEHSK PLKQEEVTAT DLSAKPSPAA SSSLPSGVGS LAEMNPGEAE GDRCRYEHSK PLKQEEATAT ELTTKSSLAA SSSLSSIVGP LVEMNTGEAE
SRNPNFPTVG AGSEDWVNAI EFVPGQPYCG RTAPSCTEVP LQGSVTKEES SRNSNFATVG AGSEDWVNAI EFVPGQPYCG RTAPSCTEAP LQGSVTKEES
EKEPTTVETE KQLCPYAAVG ECRYGENCVY LHGDSCDMCG LQVLHPMDAA EKEQTAVETK KQLCPYAAVG ECRYGENCVY LHGDSCDMCG LQVLHPMDAA

- 251 QRSQHIKSCI EAHEKDMELS FAVQRSKDMV CGICMEVVYE KANPSERRFG QRSQHIKSCI EAHEKDMELS FAVQRSKDMV CGICMEVVYE KANPSERRFG
- 301 ILSNCNHTYC LKCIRKWRSA KQFESKIIK ILSNCNHTYC LKCIRKWRSA KQFESKIIK

8.4 Charakterisierung von spezifischen Makorin1-Antiseren

Für Untersuchungen an dem endogen exprimierten Makorin1-Protein, sowohl in Säugetierzellen als auch im Rattenhirn, werden spezifische Antikörper benötigt. Zur Herstellung eines gegen Makorin1 gerichteten Antiserums, wurde die gesamte kodierende cDNA von humanem Makorin1-short in den pGEX-6P2-Vektor kloniert und in *E.coli*-BL21 Zellen als GST-Makorin1-short Fusionsprotein exprimiert und aufgereinigt. Zur Analyse des Fusionsproteins wurde eine kleine Menge im SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. In Abbildung 26A ist das mit Coomassie gefärbte Gel gezeigt; es ist eine Proteinbande erwartungsgemäß bei etwa 65 kDa (errechnetes Molekulargewicht ca. 60,2 kDa) zu sehen.

Von der Firma Pineda Antikörper-Service, Berlin, wurden zwei Kaninchen und ein Meerschweinchen immunisiert. Die Seren der immunisierten Tiere wurden anschließend im Western Blot getestet. Dazu wurden HEK293-Zellen mit dem Plasmid pcDNA3-T7-Makorin1-short transfiziert, das die Expression von Makorin1-short mit einem N-terminalen T7-Epitop ermöglicht. Proteinextrakte von diesen transfizierten Zellen und von nichttransfizierten Kontrollzellen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit den jeweiligen Seren inkubiert. Das Meerschweinchen-Antiserum zeigte keine gute und spezifische Immunantwort, sodass auf die Verwendung dieses Serums verzichtet wurde. Die Seren der Kaninchen zeigten eine sehr gute und spezifische Immunantwort. Das Ergebnis ist in Abbildung 26B gezeigt. Beide Seren konnten eine deutliche Bande für das T7-Makorin1short-Fusionsprotein mit dem erwarteten Molekulargewicht detektieren. Das errechnete Molekulargewicht von Makorin1-short beträgt 35,2 kDa, das Fusionsprotein mit dem T7-Epitop läuft etwas höher. Das Serum von Tier 2 (Abbildung 26B, Spuren 5-8) zeigt eine etwas stärkere Immunantwort, weshalb entschieden wurde, dieses für alle weiteren Makorin1-Analysen in einer 1:10000 Verdünnung zu verwenden. Im Lysat der nicht-transfizierten Kontrollzellen dagegen zeigten keine der beiden Kaninchen-Antiseren eine Immunantwort. Die endogene Proteinkonzentration von Makorin1 in HEK293-Zellen scheint für die Detektion im *Western Blot* nicht ausreichend zu sein.



Abbildung 26: Charakterisierung des Makorin1-short-Antiserums (anti-Makorin1-short) aus Kaninchen. A: Expression des humanen GST-Makorin1-short Fusionsproteins (60,2 kDa) in *E. coli*-BL21 Zellen und Isolation aus dem Proteinlysat durch Inkubation mit Glutathion-Sepharose. Das Fusionsprotein wurde von der Sepharose mit Gluthation eluiert und im SDS-Gel durch Coomasssie-Färbung überprüft. Das Fusionsprotein weist die richtige Größe auf und wurde zur Immunisierung eingesetzt **B:** Lysate von transient-transfizierten HEK293-Zellen mit dem Fusionsprotein T7-Makorin1-short und von nicht-transfizierten HEK293-Zellen wurden im *Western Blot* mit dem anti-Makorin1-short-Antiserum aus zwei Kaninchen (Antiserum und Antiserum 2) behandelt. Es wurden zwei unterschiedliche Verdünnungen getestet 1:5000 und 1:10000. Die Antiseren beider Tiere erkennen das Fusionsprotein T7-Makorin1-short, allerdings zeigt das Antiserum aus Kaninchen 2 eine etwas stärkere Immunantwort. Für die weiteren Versuche wurde das Antiserum von Kaninchen 2 in einer 1:10000 Verdünnung eingesetzt. Beim Lysat der nicht-transfizierten HEK293-Zellen wird nichts erkannt.

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass der hergestellte Antikörper auch Makorin1-long erkennt, da beide Proteine in den ersten 329 Aminosäuren eine identische Aminosäuresequenz aufweisen. Makorin1-long ist C-terminal um 153 Aminosäuren länger.

9 Veröffentlichungen

Hatmone Miroci, Claudia Schob, Stefan Kindler, Janin Ölschläger-Schütt, Susanne Fehr, Tassilo Jungenitz, Stephan W. Schwarzacher, Claudia Bagni and Evita Mohr (2012), Makorin Ring Zinc Finger Protein 1 (MKRN1), a Novel Poly(A)-binding Protein, Stimulates Translation in Nerve Cells.

J. Biol. Chem., 287:1322-1334.

10 Danksagung

Als erstes gilt mein Dank Prof. Dr. Dietmar Richter und PD Dr. Evita Mohr für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Zellbiologie und Neurobiologie zu beginnen sowie Prof. Dr. med. Gabriele M. Rune, sie am Institut für Neuroanatomie fertig zu stellen. Ganz besonders danke ich PD Dr. Evita Mohr für die kompetente Anleitung und die fachliche Unterstützung.

Für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit am Fachbereich Biologie danke ich Prof. Dr. Christian Lohr.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des ehemaligen Instituts für Zellbiologie und Neurobiologie, insbesondere der Arbeitsgruppen Mohr, Kreienkamp, Kindler und Buck, sowie bei den Mitarbeitern des Instituts für Neuroanatomie für den fachlichen Austausch und das angenehme Arbeitsklima.

Für die Finanzierung dieser Forschungsarbeit bedanke ich mich bei dem Graduiertenkolleg 336 "Molekulare Endokrinologie – Molekularer Stoffwechsel" und vor allem bei dem Sprecher des Graduiertenkollegs, Prof. Dr. H. J. Seitz, der bis zur Fertigstellung für stetige Motivation und tatkräftige Unterstützung sorgte.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die moralische Unterstützung und ebenfalls für die Motivation. Ein ganz besonderer Dank geht hier an Danuta Dudzinski.

Zu guter Letzt danke ich meinem Ehemann Bislim für seine liebevolle Begleitung sowie meinen Kindern Ledion, Eduan und Dionart dafür, dass sie mir viel Freude schenken.

11 Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit, dass ich diese Dissertation selbstständig ohne Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Alle den benutzten Quellen wörtlich oder sinngemäß entnommenen Stellen sind als solche einzeln kenntlich gemacht.

Diese Arbeit ist bislang keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt worden.

Unterschrift

Hatmone Miroci