

**Transport und Translation der dendritisch
lokalisierten shank1-mRNA in *Rattus norvegicus*
(Berkenhout, 1769)**



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

vorgelegt von

Peter Iglauer

Hamburg 2005

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	MATERIAL UND METHODEN	13
2.1	Molekularbiologische Methoden (DNA)	13
2.1.1	DNA-Gelelektrophorese	13
2.1.2	Isopropanolpräzipitation von DNA/RNA	13
2.1.3	Phenol/Chloroform-Extraktion	13
2.1.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	14
2.1.5	Restriktionsverdau von DNA	14
2.1.6	Ligation von DNA-Fragmenten	14
2.1.7	Herstellung glatter DNA-Enden aus 5'überhängenden DNA-Enden	14
2.1.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	14
2.1.9	Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	15
2.1.10	Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> Zellen	15
2.1.11	Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> Zellen	15
2.1.12	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> Zellen	16
2.1.13	Oligonucleotide	16
2.1.14	DNA-Sequenzierung	16
2.2	Molekularbiologische Methoden (RNA)	17
2.2.1	RNA-Gelelektrophorese	17
2.2.2	Präparation von RNA aus Hirngewebe	17
2.2.3	Reverse Transkription/cDNA Herstellung	17
2.2.4	<i>in vitro</i> Transkription	17
2.2.5	<i>Northern Blot</i> Analysen	19
2.2.6	<i>UV-Crosslink</i> Analysen	20
2.2.7	<i>Electrophoretic Mobility Shift</i> (EMSA) Analysen	20
2.2.8	<i>North-Western Blot</i> Analysen	21
2.2.9	<i>In vitro</i> Translation	21
2.2.10	Luziferase-Reportergen Analysen	22
2.2.11	Analyse von ribosomalen Komplexen	22
2.3	Proteinbiochemische Methoden	23
2.3.1	Proteinbestimmung	23
2.3.2	SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE)	23
2.3.3	Coomassie -Färbung von Polyacrylamidgelen	23
2.3.4	<i>Western Blot</i> Analysen	24
2.3.5	Herstellung eines Proteinrohlysats aus Hirngewebe	24
2.3.6	Fraktionierung des Rohlysates mit Heparin-Sepharose	24
2.3.7	Herstellung eines <i>Ribosomal Salt Wash</i>	25
2.3.8	Affinitätschromatographie mit Biotin-gekoppelter RNA	25
2.3.9	Affinitätschromatographie mit <i>Tobra-Tag</i> RNA	26
2.3.10	Massenspektroskopie	27
2.3.11	Expression und Aufreinigung von His-Tag Fusionsproteinen	27
2.4	Zellbiologische Arbeitstechniken	28
2.4.1	Kultivierung und Transfektion von HEK293-Zellen	28
2.4.2	Kultivierung und Transfektion von primären Hippocampus/Cortex -Neuronen	28
2.4.3	Immuncytochemie primärer Hippocampus-Neurone	30
2.5	Statistische Analysen	30
3	ERGEBNISSE	31
3.1	Charakterisierung der shank1-3'UTR	31
3.1.1	Identifizierung der shank1-3'UTR von <i>Rattus norvegicus</i>	31

3.1.2	Vergleich der shank1-3'UTR zwischen verschiedenen Spezies	33
3.2	Identifizierung <i>trans</i>-agierender Faktoren des shank1-DTE	34
3.2.1	Nachweis von shank1-DTE bindenden Proteinen	34
3.2.2	Aufreinigung und Identifizierung <i>trans</i> -agierenden Faktoren	37
3.2.2.1	Anreicherung RNA-bindender Proteine durch Chromatographie	37
3.2.2.2	Anreicherung der <i>trans</i> -agierenden Faktoren durch <i>Ribosomal Salt Wash</i>	39
3.2.2.3	Affinitätschromatographie mit Biotin-16-UTP RNA	41
3.2.2.4	Affinitätschromatographie mit <i>Tobra-Tag</i> RNA	43
3.3	Subzelluläre Lokalisation der <i>trans</i>-agierenden Faktoren	47
3.3.1	Poly-A-bindendes Protein 1	48
3.3.2	Poly-rC-bindende Proteine	49
3.3.3	Gehirnspezifische Spleißfaktoren (brPTB, NOVA1)	51
3.3.4	<i>Acidic Ribosomal Phosphoprotein P0</i>	52
3.4	Direkte Bindung der <i>trans</i>-agierenden Faktoren an das shank1-DTE	53
3.5	Translation der shank1-mRNA	56
3.5.1	Charakterisierung der shank1-5'UTR	57
3.5.1.1	Analyse der Sekundärstruktur der shank1-5'UTR	57
3.5.1.2	<i>Trans</i> -agierende Faktoren der shank1-5'UTR	58
3.5.1.3	Initiation der Translation auf der shank1-5'UTR	58
3.5.2	<i>in vitro</i> Translation von shank1-UTR-fusionierter mRNA	59
3.5.3	<i>in vitro</i> Translation von shank1-5'UTR Deletionskonstrukten	61
3.5.4	Regulation der Translationsinitiation über die shank1-5'UTR	62
3.5.5	Untersuchung der Translationsregulation über shank1 UTRs <i>in vivo</i>	65
3.5.5.1	Cotransfektion von Luziferasekonstrukten in HEK 293 Zellen	65
3.5.5.2	Cotransfektion von Luziferasekonstrukten in cortikale Neuronen	66
3.5.5.3	Constransktion und Transfektion von dicistronischen Luziferasekonstrukten	67
3.5.6	Interne Initiation in der shank1-5'UTR	68
3.6	Beeinflussung der neuronalen Translation durch exogene Stimuli	70
3.6.1	Wirkung von BDNF auf die Translation der shank UTR Reporterkonstrukte	71
3.6.2	Unabhängigkeit der BDNF-induzierten Translationsstimulation von mTOR	72
3.6.3	Einfluß einer Depolarisation mit Kaliumchlorid auf die neuronale Translation	74
3.6.4	Aktivitätsabhängiger Umbau der postsynaptischen Dichte	75
3.6.5	Translationsinhibition durch <i>miniature excitatory postsynaptic currents</i>	77
4	DISKUSSION	79
5	LITERATURVERZEICHNIS	93
6	ANHANG	113
6.1	Firmenverzeichnis	113
6.2	Bakterienstämme, Zelllinien und Tiere	114
6.3	Antikörper	114
6.4	Vektoren	115
6.5	Oligonucleotide	116
6.6	Zusammenfassung	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungen

α CaMKII α -Untereinheit der Ca²⁺/ Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II

Ak Antikörper

AMPA α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isooxalol-Propionsäure

AraC Cytosin- β -D-Arabinofuranosid

Arc *activity-regulated cytoskeleton-associated protein*

AS Aminosäuren

ARP P0 acidic ribosomal phosphoprotein P0

bp Basenpaare

BDNF *Brain Derived Neurotrophic Factor*

BSA *bovine serum albumine*

cDNA *complementary DNA*

cdc42 *cell division cycle 42*

CIRL *calcium independent receptor for α -latrotoxin*

DEAE Diethylaminoethyl

c-src *Proto-oncogene tyrosin kinase Src*

DMEM *Dulbecco's Minimal Essential Medium*

DTE *dendritic targeting element/dendritisches Transportelement*

DTT Dithiothreitol

ECL *Enhanced Chemiluminescence*

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure

EJC *Exon-Exon-Junction Complex*

EMSA *Electrophoretic Mobility Shift Assay*

ERK *extracellular signal regulated Kinase*

EST *Expressed Sequence Tag*

g Erdbeschleunigung

h Stunde

HBSS *Hank's Buffered Saline Solution*

HEK *Human embryonic kidney*

HEPES 4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure

His Histidin

hnRNP *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*

HRP *Horseshoe Peroxidase*

IPTG Isopropyl β -D-Thiogalactopyranosid

IRSp53 *insulin receptor substrate of 53 kD*

kb Kilobasen

kDa Kilodalton

KH hnRNP K-homology

l Liter

LB Luria Bertoni

LTD Langzeitdepression

LTP Langzeitpotenzierung

M molar, Mol/Liter

MAP2 Mikrotubulus assoziiertes Protein 2

MAPK *Mitogen-activated protein Kinase*

MARTA *MAP2 mRNA trans-acting factor*

mGluR metabotroper Glutamat-Rezeptor

min Minute

mRNA *messenger RNA*

mTOR *mammalian target of rapamycin*

NCBI *National Centrum for Biotechnological Information*
NHS *N-Hydroxy-Succinimidyl*
NLS *Nukleäres Lokalisierungssignal*
NMDA *N-Methyl-D-Aspartat*
NOVA1 *neuro-oncological ventral antigen1*
nt *Nukleotide*
PMSF *Phenylmethylsulfonylfluorid*
PABP1 *Poly (A)-Bindeprotein*
PAGE *Polyacrylamid Gelelektrophorese*
PBS *Phosphate Buffered Saline*
PCBP *Poly-rC-binding protein*
PCR *Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)*
PDZ *PSD-95/discs large/zona occludens 1*
PSD *postsynaptische Dichte*
PSD-95 *PSD protein of 95 kD*
PTB *polypyrimidine-tract binding protein*
RNase *Ribonuklease*
shank *SH3 domain and ankyrin repeat containing protein*
RNP *Ribonukleoproteinpartikel*
RRM *RNA Recognition Motive*
RT *Raumtemperatur*
s *Sekunde*
SAM *Sterile Alpha motive*
Sam68 *Src-associated in mitosis protein of 68 kDa*
SAPAP *synapse-associated associated Protein*
SCG *Superior Cervical Ganglia (obere Cervicalganglien)*
SDS *Natriumdodecylsulfat*
SH3 *Src homology 3*
SSC *Salz-Natriumcitrat-Lösung*
TAE *Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan*
TCA *Trichloressigsäure*
TEMED *N,N,N,N'-Tetramethylethylendiamin*
Tris-HCl *Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrochlorid*
tRNA *Transfer-RNA*
TTX *Tetrodotoxin*
U *Einheit für enzymatische Aktivität*
Upm *Umdrehungen pro Minute*
UTR *untranslatierte Region*
Vg1-RBP Vera *Vg1-RNA Bindeprotein/Vg1-RNA binding ER-association*
Vg1 *Vegetative RNA 1*
Vol *Volumen*
(v/v) *Volumen pro Volumen*
(w/v) *Gewicht pro Volumen*
X-Gal *5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid*
ZBP1 *Zipcode Binding Protein 1*
ZBP2 *Zipcode Binding Protein2*

1 Einleitung

Die heutigen Ansichten über die Funktion von Nervenzellen und deren Verschaltung zu hochkomplexen Systemen entwickelten sich mit der Entdeckung der Lichtmikroskopie im 18. Jahrhundert. Das es sich bei Nerven nicht um eine kontinuierliche, drüsenähnliche Masse handelt, eine Ansicht, die sich bis auf den römischen Arzt Claudius Galenus (Galen) zurückverfolgen läßt, sondern um einen Zellverbund mit Neuronen als distinkten, elementaren Signalübertragungseinheiten, wurde erstmals Ende des 19. Jahrhunderts von Ramon y Cajal durch Silberfärbungen nachgewiesen. Mit der Frage, wie einzelne Neuronen miteinander kommunizieren, beschäftigte sich um 1900 Charles Sherrington, der mit der Theorie der „dynamischen Depolarisation“, nach der jedes Neuron über einen Sende- und Empfangsapparat verfügt, den Begriff der Synapse prägte. Einen weiteren Meilenstein stellt die von Donald Hebb 1949 postulierte Theorie dar, nach der dauerhafte oder wiederholte Aktivierung einer Synapse zu langanhaltenden Veränderungen in der Stabilität dieses Kontaktes führt und diese Modifikationen die Grundlage für das Speichern von Erinnerungen darstellen (Hebbsche Regel). Experimentelle Evidenz für diese Theorie lieferten Bliss und Lømo 1973 mit der Entdeckung der Langzeitpotenzierung (*long term potentiation*, LTP) nach kurzer, tetanischer Stimulation von Neuronen des Hippocampus. LTP sowie der entgegengesetzte Effekt, Langzeitdepression (*long term depression*, LTD) stellen die gängigen experimentellen Paradigmen zur Etablierung von Veränderungen der synaptischen Effizienz dar. Während kurzfristige Modulationen der synaptischen Kontakte auf Modifikationen bereits vorhandener Proteine (z.B. Phosphorylierung) beruhen (Davis und Squire, 1984; Goelet et al., 1986; Kandel, 2001), ist für dauerhafte Veränderungen die *de novo* Synthese von Proteinen erforderlich (*late phase* LTP; Frey et al., 1988; Nguyen et al., 1994; Bailey et al., 1996; Jiang und Schuman, 2002). Diese synaptische Plastizität ist in den meisten Fällen auf aktivierte Synapsen beschränkt; eine Eigenschaft die als Eingangsspezifität (*input specificity*) bezeichnet wird (Sutton und Schuman, 2005). Aus diesen Beobachtungen ergibt sich als wesentliche Fragestellung, wie individuelle synaptische Kontakte langfristig verstärkt oder abgeschwächt werden könnten, sofern die erforderlichen Genprodukte allen Synapsen gleichermaßen zur Verfügung stehen. Es sind daher Mechanismen zu postulieren, mittels derer synaptische Proteine, die zur langfristigen Modulation der synaptischen Effizienz erforderlich sind, spezifisch an individuell stimulierte Synapsen gelangen. Eine Hypothese, die diesbezüglich diskutiert wird, ist die Protein-synthese-unabhängige „Markierung“ einer Synapse (*synaptic tag*) durch ihre Aktivierung, wodurch diese selektiv in die Lage versetzt

wird neu synthetisierte Proteine aus dem Zellsoma zu rekrutieren (Frey und Morris, 1997). Obwohl Untersuchungen an *Aplysia*-Neuronen auf die Beteiligung derartiger Mechanismen in der synaptischen Plastizität hinweisen, ist die Natur dieser „Markierung“ weitgehend unbekannt (Martin et al., 1997; Martin und Kosik, 2002).

Ursprünglich wurde angenommen, daß eine Transkription von DNA eng mit der Translation der mRNA verbunden ist. Mittlerweile ist jedoch bekannt, daß diese Prozesse nicht notwendigerweise zeitlich und räumlich gekoppelt sind und die Translation einer autonomen Kontrolle unterliegt (Ostareck-Lederer et al., 2002; Gebauer und Hentze, 2004). Hierauf beruht ein weiteres Konzept, das eine Eingangsspezifität synaptischer Plastizität eröffnet und dem in den letzten Jahren erhöhte Aufmerksamkeit gewidmet wurde. Dieses basiert auf einem dendritischen und axonalen Transport spezifischer mRNAs und deren lokaler Translation unter der Kontrolle individueller Synapsen. Erste Hinweise auf die essentielle Bedeutung der subzellulären Lokalisierung spezifischer mRNAs in der Generierung einer Zellpolarität ergaben sich aus Studien zur frühen Embryonalentwicklung von *Drosophila melanogaster*. Die Determinierung der Körperachsen ist von der korrekten subzellulären Lokalisierung maternaler mRNAs in der Oocyte abhängig, durch deren konzertierte und lokal begrenzte Translation eine Kaskade morphogener Proteingradienten aufgebaut wird. Beispielsweise wird die mRNA der anterioren Determinante bicoid in den Nährzellen synthetisiert und anschließend in den vorderen Teil der Eizelle transportiert (Berleth et al., 1988; Ferrandon et al., 1997). Nach der Befruchtung wird die, bis dahin inaktiv verankerte, mRNA translatiert, wodurch sich ein Konzentrationsgradient des Bicoid Proteins ergibt, der zum hinteren Ende der Oocyte hin abnimmt und für die Ausbildung von Kopf- und Thoraxstrukturen essentiell ist. Ebenso ist die Lokalisierung von oskar mRNA am posterioren Pol der Oocyte für die Bildung der Keimbahn und des Abdomens maßgeblich (Ephrussi et al., 1991; Johnstone und Lasko, 2001). Der cytoplasmatische Transport und die lokale Translation von mRNA wurde seitdem in einer Vielzahl unterschiedlicher Spezies und Zelltypen nachgewiesen (Jansen, 2001). Dies deutet darauf hin, daß es sich hierbei um einen allgemeinen und evolutiv konservierten Mechanismus handelt, der eine spezifische Anreicherung von Proteinen in bestimmten subzellulären Kompartimenten ermöglicht. Beispielsweise wird durch den Transport der ash1-mRNA in auskospende Tochterzellen von *Saccharomyces cerevisiae* der Wechsel des Paarungstyps verhindert (Long et al., 1997; Takizawa et al., 1997). Die elektrische Isolierung von Nervenzellen durch Oligodendrocyten ist von dem Transport und der lokalen Translation der mRNA, die für das *myelin basic protein* (MBP) codiert abhängig. Das Protein wird ausschließlich in den Ausläufern der Zellen exprimiert und würde in anderen Kompartimenten

toxisch wirken (Munro et al., 1999; Kwon et al., 1999). Die mRNA von β -Aktin ist in Fibroblasten von Hühnern in der Nähe von Lamellipodien lokalisiert, bei denen es sich um Aktin-reiche Strukturen mit wichtiger Funktion für die Mobilität der Zelle handelt (Lawrence and Singer, 1986; Kisklaukis et al., 1994; Oleynikov und Singer, 2003). β -Aktin-mRNA konnte ebenfalls in den Wachstumskegeln von Axonen nachgewiesen werden. Es wird vermutet, daß deren lokale Translation eine essentielle Bedeutung in der Entwicklung und Regeneration von Neuronen hat (Zhang et al., 2001; Zheng et al., 2001; Willis et al., 2005). Spezielle mRNAs, die für einen cytoplasmatischen Transport vorgesehen sind, verfügen über regulative Sequenzen (*cis*-agierende Elemente). Diese werden von spezifischen RNA-bindenden Proteinen (*trans*-agierenden Faktoren) erkannt, deren Bindung an das *cis*-agierende Element eine Voraussetzung für einen effizienten cytoplasmatischen Transport darstellt und die zum Teil in die Kontrolle der lokalen Translation als Antwort auf spezifische Stimuli involviert sind (Ross et al., 1997; Ostareck-Lederer et al., 2002; Dreyfuss et al., 2002). Es wird angenommen, daß diese *trans*-agierenden Faktoren direkt oder indirekt mit Motorproteinen wie Kinesin oder Dynein interagieren, die den Transport der mRNA entlang des Cytoskeletts vermitteln können. In den meisten der beschriebenen Fällen liegen die *cis*-agierenden Elemente in den 3'-untranslatierten Regionen (3'UTRs) der mRNAs (Bashirullah et al., 1998; Oleynikov und Singer, 1998; Kindler et al., 2005). So enthält beispielsweise die 3'UTR der bicoid-mRNA eine Sequenz von 625 Nucleotiden, deren Assoziation mit dem RNA-bindendem Protein Staufen essentiell für den Transport an den anterioren Pol der Oocyte ist. Ebenso ist die Bindung von Staufen an die 3'UTR notwendig für die Lokalisation der oskar-mRNA an den posterioren Pol, wobei diese Interaktion gleichzeitig der Translationsrepression während des Transportes dient (Webster et al., 1997; Micklem et al., 2000). Während der Embryonalentwicklung von *Xenopus laevis* ist die Interaktion des *Xenopus*-Orthologs von Staufen (Xstau) sowie des Proteins *Vg1-RBP/Vera* mit der 3'UTR der *vg1*-mRNA für deren korrekte Positionierung am vegetalen Pol der Oocyte notwendig. Gleichzeitig konnte eine Interaktion von Xstau mit dem Motorprotein Kinesin nachgewiesen werden (Mowry und Meltin, 1992; Yoon und Mowry, 2004). Im Falle der β -Aktin-mRNA sind die, als *zipcode*-Element bezeichneten, ersten 54 Nucleotide der 3'UTR für den cytoplasmatischen Transport verantwortlich, deren Interaktion mit diversen RNA-bindenden Proteinen in mehreren Studien belegt wurde (Kisklaukis et al., 1994; Snee et al., 2002; Gu et al., 2002). Ross et al. (1997) wiesen nach, daß für den effizienten subzellulären Transport der mRNA die Interaktion des *zipcodes* mit dem *zipcode binding protein 1* (ZBP1), das strukturelle Homologie zu *Vg1-RBP/Vera* aufweist, obligatorisch ist. Für die cytoplasmatische Lokalisation wird die mRNA

in hochmolekulare Ribonucleoprotein-Komplexe (RNPs) integriert, die entlang des Cytoskeletts transportiert werden. Die Assemblierung dieser mRNP-Partikel wird durch direkte Bindung von Proteinen an die mRNA sowie durch weitere Protein-Protein Interaktionen vermittelt. Nach der Injektion von markierter mRNA, die für das *myelin basic protein* codiert, in Oligodendrocyten konnten Ainger et al., (1993) eine direkte Translokation in Form von Partikel beobachten. Eine Mikroinjektion von bicoid mRNA in *Drosophila*-Oocyten führte zur Ausbildung von RNPs vergleichbarer Größe, die Mikrotubuli-abhängig transportiert wurden und Stauungen enthielten (Ferrandon et al., 1997).

Das erste Anzeichen für eine autonome Translation in dendritischen Kompartimenten war die Entdeckung von Polyribosomen in distalen dendritischen Bereichen, die präferentiell an der Basis dendritischer Dornen lokalisiert sind (Steward und Levy, 1982). Dendritische Dornen sind kleine Ausstülpungen des dendritischen Schaftes mit einer Länge von 0,5 – 2 μm , auf denen sich der größte Teil excitatorischer, glutamaterger Rezeptoren befindet (Harris und Stevens 1989; Hering und Sheng, 2001). Die stark veränderbare Morphologie der Dornen wird durch filamentöse Aktinbündel determiniert und stellt die morphologische Basis synaptischer Plastizität dar, wobei eine enge Korrelation mit dem Reifegrad der Neuronen vorliegt. Während dendritische Dornen bei jüngeren Neuronen meist in filopodien-ähnlicher Gestalt auftreten, kommt es bei zunehmender Ausreifung und Verstärkung synaptischer Kontakte vermehrt zur Bildung pilzförmiger dendritischer Dornen (Yuste und Bonnhoeffer, 2001; Sala et al., 2001). Die weitgehend punktuelle Verteilung der Polyribosomen im Bereich dendritischer Dornen stellt ein Indiz dafür dar, daß die lokale Synthese von Proteinen unter der Kontrolle individueller Synapsen stattfindet. Die Position der Polyribosomen an der Basis dieser Dornen ist optimal um von elektrischen oder biochemischen Ereignissen in der Synapse und dem dendritischen Schaft gleichermaßen beeinflusst werden zu können. In Neuronen des Hippocampus von *R. norvegicus* konnten Ostroff et al. (2002) nach zweistündiger tetanischer Stimulation, durch die eine Langzeitpotenzierung synaptischer Kontakte auslöst wurde, eine Umverteilung der Polysomen in dendritischen Dornen beobachten (Abb.1.1). Die Rekrutierung von Polyribosomen war mit einer Ausweitung des postsynaptischen Kontaktes korreliert. Es wird daher vermutet, daß der lokalen Synthese von Proteinen in dendritischen Dornen eine essentielle Funktion in der aktivitätsabhängigen Stabilisierung synaptischer Kontakte zukommt.

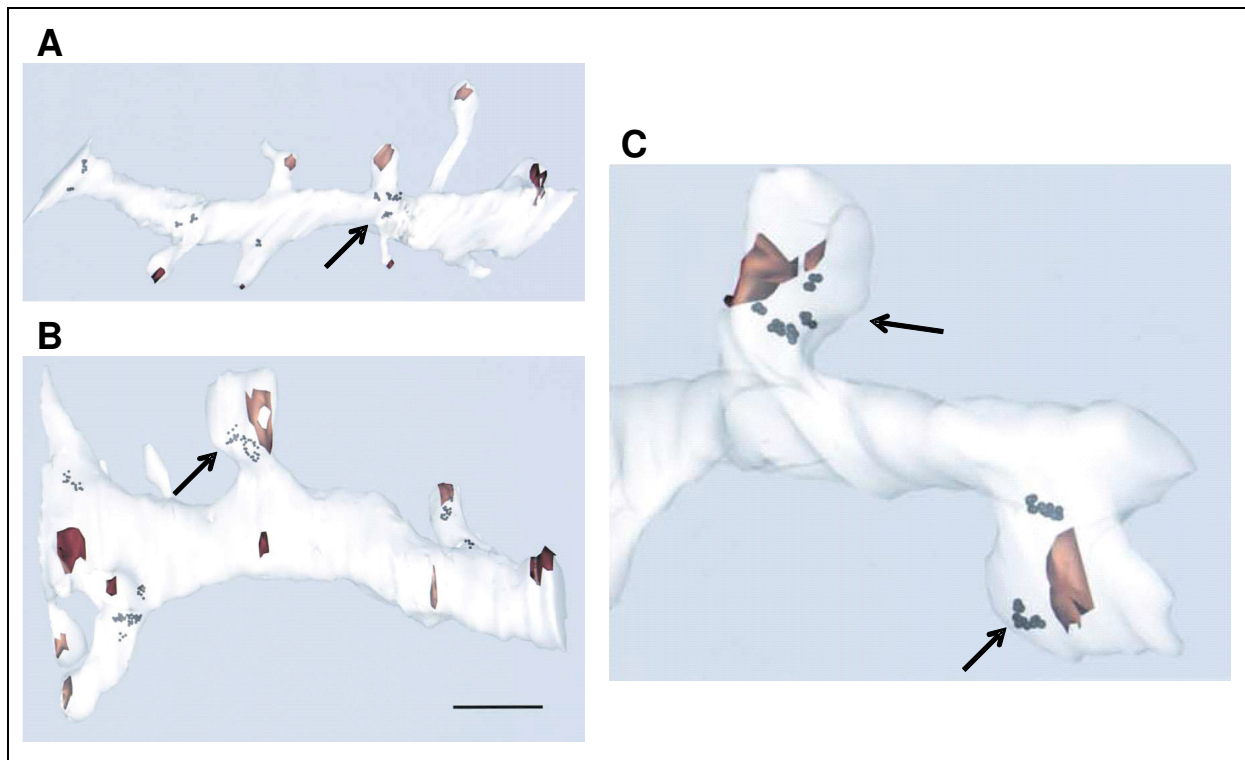


Abbildung 1.1: Dreidimensionale Rekonstruktion von Dendriten mit Polyribosomen (schwarze Pfeile)
A) In nicht stimulierten Dendriten befindet sich die Mehrzahl der Polyribosomen an der Basis der dendritischen Dornen.; die postsynaptische Dichte ist in dunkelrot dargestellt **B, C)** LTP-Induktion führt zu einer deutlichen Zunahme von Polyribosomen innerhalb der dendritischen Dornen (Maßstabsbalken 1 μ M; Ostroff et al., 2002).

Dieses Konzept impliziert die Präsenz spezifischer mRNAs in Dendriten, welche für Proteine mit einer Funktion in der postsynaptischen Signaltransduktion codieren. Bisher wurden mehr als 30 verschiedene mRNA Spezies in distalen Dendriten nachgewiesen, wobei eine Studie von Miyashiro et al. (1994) nahelegt, daß deren Anzahl mit ~400 weitaus höher liegen könnte. Die erste mRNA, deren dendritische Lokalisierung von Garner et al. (1988) durch *in-situ* Hybridisierungen von Rattengehirnschnitten nachgewiesen wurde, codiert für das *microtubulus-associated protein 2* (MAP2). MAP2 ist mit dem neuronalen Cytoskelett assoziiert und kontrolliert Phosphorylierungs-abhängig die Stabilität von dendritischen Mikrotubuli (Brugg und Matus, 1991; Itoh et al., 1997). Ein *cis*-agierendes Element von 640 nt in der 3'UTR, das für den cytoplasmatischen Transport notwendig und hinreichend ist, wurde von Blichenberg et al. (1999) identifiziert und als *MAP2 dendritic targeting element* (MAP2-DTE) bezeichnet. Als *trans*-agierende Faktoren konnten das hauptsächlich kernlokalisierte Protein MARTA1 sowie das cytoplasmatische und Polysomen-assoziierte Protein MARTA2 isoliert werden (Rehbein et al., 2000; Rehbein et al., 2002). Während eine funktionale Bedeutung von MARTA1 für die dendritische Lokalisierung der MAP2-mRNA nicht nachgewiesen ist (Rehbein et al., 2002), ist das homologe Protein aus *Gallus gallus*, das *zipcode binding protein 2* (ZBP2), für die dendritische Lokalisierung von β -Aktin-mRNA

essentiell (Gu et al., 2004). Die von Monshausen et al. (2001) beschriebene Interaktion von Staufen mit dem MAP2-DTE von *R. norvegicus* ist ein weiterer Hinweis auf die konservierte Funktion dieses Proteins in der cytoplasmatischen Lokalisierung spezifischer mRNAs. Ein weiteres dendritisch lokalisiertes Transkript ist die α -Untereinheit der Calcium/Calmodulin-abhängigen Kinase II (α CaMKII; Burgin et al., 1990). In der Postsynapse ist CaMKII stark angereichert und liegt dort vorrangig als Holoenzym aus zwölf Untereinheiten vor (Kolodziej et al. 2000). Die Kinase ist in die Calcium-abhängige Modifikation von Proteinen während der Langzeitpotenzierung involviert (Malinow et al., 1989). In der 3'UTR wurden zwei dendritische Lokalisierungssequenzen identifiziert. Während einerseits ein Element von 30 nt als ausreichend für eine effiziente dendritische Lokalisierung befunden wurde (Mori et al., 2000), wurde zum anderen eine Sequenz von ~1200 nt für diese Funktion vorgeschlagen (Blichenberg et al., 2001). Bislang konnten keine Proteine identifiziert werden, die direkt an diese Sequenzen binden (Kindler et al., 2005). Kanai et al. (2004) zeigten jedoch durch *RNA-interference* Experimente die essentielle Funktion mehrerer RNA-bindender Proteine für den dendritischen Transport der α CaMKII-mRNA, darunter Staufen und hnRNP U. Die Bedeutung der dendritischen Lokalisation der α CaMKII-mRNA für die synaptische Plastizität wurde in einer Studie mit *knockout*-Mäusen von Miller et al., (2002) veranschaulicht. Bei den transgenen Tieren war die 3'UTR der α CaMKII gegen ein nicht funktionales Element ausgetauscht und die mRNA dementsprechend auf das Zellsoma beschränkt. In der Folge zeigten diese Mäuse erhebliche Defizite in der Langzeitpotenzierung und der Hippocampus-abhängigen Konsolidierung von Erinnerungen. Ein rasanter und aktivitätsabhängiger Anstieg der lokalen Synthese von α CaMKII konnte sowohl in Schnitten des Hippocampus, als auch in isolierten postsynaptischen Fraktionen (Synaptoneurosomen) beobachtet werden (Mayford et al., 1995; Scheetz et al., 2000). Weitere cytoplasmatische Proteine, deren mRNA in distalen Dendriten nachzuweisen war, sind unter anderem das ribosomale Protein L7 (Bian et al., 1996), Dendrin (Herb et al., 1996), Vasopressin (Mohr et al., 2002), die Proteinkinase M ζ (Muslimov et al., 2004) und das *synapse-associated associated protein 3* (SAPAP3; Kindler et al., 2004). Ebenso sind mRNAs integraler Membranproteine wie der AMPA-Rezeptoruntereinheit GluR2 (Ju et al., 2004) und der NMDA-Rezeptoruntereinheit NR1 (Gazzaley et al., 1997) in distalen Dendriten gegenwärtig. Die Zellstrukturen, die für die Integration dieser Rezeptoren in die postsynaptischen Membran benötigt werden, rauhes endoplasmatisches Reticulum und Golgi-Apparat, wurden ebenfalls in Dendriten nachgewiesen (Westrum et al., 1980; Broadwell und Cataldo, 1983). In den letzten Jahren wurden in einer Vielzahl von Studien mRNP-Partikel in Neuronen beschrieben (Knowles et

al., 1996; Rook et al., 2000; Köhrmann et al., 1999; Krichevsky und Kosik, 2001; Tiruchinapalli et al., 2003; Grigstone et al., 2005). Knowles et al. (1996) beobachteten die Translokation dieser Partikel in lebenden Neuronen mit einer Geschwindigkeit von ca. 6 $\mu\text{m}/\text{min}$. Des weiteren konnte in dieser Studie die Colokalisation der mRNPs mit der 60 S-Ribosomenuntereinheit, polyadenylierter mRNA sowie dem eukaryotischen Elongationsfaktor 1 α belegt werden. Dies deutet darauf hin, daß spezifische mRNAs und Komponenten der Translationsmaschinerie in identischen mRNPs in dendritische Bereiche transportiert werden. Die Angaben über die Größe der Partikel schwanken in Abhängigkeit von der Nachweismethode zwischen ~200 nm (Krichevsky und Kosik, 2001) und 600-800 nm (Barbarese et al., 1995). Die Depolarisation von Neuronen durch Kaliumchlorid führt zu einer Deassemblierung der mRNPs, wie in elektronenmikroskopischen Aufnahmen belegt wurde (Krichevsky und Kosik, 2001). Die aktivitätsabhängige Auflösung dieser Partikel stellt einen plausiblen Mechanismus dar, wie spezifische mRNAs ausschließlich stimulierten Synapsen zur Verfügung gestellt werden können. Die enorme Komplexität neuronaler mRNPs wird in einer Studie von Kanai et al., (2004) verdeutlicht. Durch Affinitätschromatographie mit einem Fragment des Motorproteins Kinesin wurde dort ein hochmolekularer Komplex mit einer Sedimentationsgeschwindigkeit von 1000 S isoliert. Dieser Wert stimmt mit der von Krichevsky und Kosik (2001) bestimmten Größe dendritischer mRNPs von 200 nm überein, wie im Vergleich mit einem Ribosom deutlich wird; dies ist mit einem Durchmesser von 20 nm und einem Sedimentationskoeffizienten von 80 S etwa 10-12 mal kleiner. Durch massenspektroskopische Analysen konnten insgesamt 42 interagierende Proteine identifiziert werden, unter anderem das *fragile X mental retardation protein* (FMRP), RNA-Helikasen, einige hnRNPs (A0, A1, D und U), ribosomale Proteine sowie Translationsinitiations- und –elongationsfaktoren. Obwohl die Schätzung der tatsächlichen Anzahl der Proteine in den mRNP Komplexen schwierig ist, gehen die Autoren von mindestens 100 beteiligten Komponenten aus, neben den 80 ribosomalen Proteinen. Der Transport dieser Partikel verläuft nicht konstitutiv, sondern kann, wie auch die lokale Translation, von extrazellulären Signalen reguliert werden (Tongiorgi et al., 1997; Rook et al., 2001; Tiruchinapalli, 2003). Die dendritische Lokalisierung der mRNAs der Gruppe der shank (*SH3 domain and ankyrin repeat containing protein*)-Proteine, bei denen es sich um Strukturelemente der sogenannten postsynaptischen Dichte (PSD) handelt, wurde von Zitzer et al. (1999) bei *R. norvegicus* nachgewiesen.

Die PSD ist ein dichtes Netzwerk von Proteinen mit einer Dicke von 40–50 nm, das direkt unterhalb der postsynaptischen Membran lokalisiert ist (Abb. 1.2; Harris und Stevens 1989) und durch eine Vielzahl von Protein-Protein Interaktionen ausgebildet wird, die von sogenannten Gerüstproteinen dirigiert werden. Die PSD ist mit dem Aktin-Cytoskelett der dendritischen Dornen assoziiert und dient der kontrollierten Verankerung von Rezeptoren in der postsynaptischen Membran (Adam und Matus, 1996; Ziff, 1997; Sheng und Kim, 2000). Es wird angenommen, daß diese Struktur eine essentielle Rolle in der Regulation synaptischer Funktionen und Plastizität spielt. Ein wesentliches Strukturprotein der PSD ist das *postsynaptic density protein 95* (PSD-95), das direkt mit NMDA- (Kornau et al., 1995) und Kainat-Rezeptoren (Garcia et al., 1998) als auch indirekt über das Protein Stargazin mit AMPA-Rezeptoren interagiert (Chen et al., 2000). Während der N-Terminus von PSD-95 mit Glutamat-Rezeptoren interagiert, ist der C-Terminus an Proteine der *SAP90/PSD-95 associated protein* (SAPAP)-Familie gebunden (Kindler et al., 2004; Welch et al., 2004). SAPAPs stellen eine weitere wichtige Gruppe von postsynaptischen Gerüstproteinen dar, die nicht nur eine starre Komponente des postsynaptischen Proteingerüsts sind, sondern darüber hinausgehende Funktionen in der postsynaptischen Signaltransduktion haben (Haraguchi et al., 2000). Diese wiederum binden mit den letzten Aminosäuren des C-Terminus an die *PSD-95/discs large/zona occludens1* (PDZ)-Domäne der shank-Proteine, die eine zentrale Gruppe von Strukturproteinen der PSD darstellen und vor einigen Jahren von mehreren Arbeitsgruppen unabhängig entdeckt wurden (Böckers et al., 1999; Lim et al., 1999; Yao et al., 1999; Zitzer et al., 1999; Naisbitt et al., 1997; 1999). Die Familie der shank-Proteine umfaßt drei Isoformen, die mit einer Länge von ~2000 Aminosäuren und einer molekularen Masse von >200 kD relativ groß sind. Bei *R. norvegicus* wird shank1 fast ausschließlich im Gehirn, shank2 stark im Gehirn und in geringeren Mengen in Niere als auch Leber und shank3 hauptsächlich im Herz und stark in Gehirn und Milz exprimiert (Lim et al., 1999; Zitzer et al., 1999). Die shank-mRNAs enthalten mehrere Spleißstellen, die teilweise entwicklungsabhängig verwendet werden, sowie alternative Startcodons, deren funktionale Bedeutung allerdings unbekannt ist (Böckers et al., 1999; Lim et al., 1999; Yao et al., 1999; Zitzer et al., 1999.; Sheng und Kim, 2000). Die vollständigen Proteine enthalten im N-terminalen Bereich 5-6 Wiederholungen von *ankyrin* Motiven auf die eine *src-homology 3* (SH3) Domäne und eine PDZ Domäne folgen. Eine lange prolinreiche Region liegt im mittleren Bereich und ein *sterile alpha motive* (SAM) im Bereich des C-Terminus (Abb. 1.2 A). Diese Domänenstruktur ist bei allen Mitgliedern der shank-Proteinfamilie konserviert, wobei die Identität der Proteine auf Aminosäureebene zwischen 63 und 87 %

liegt. Übereinstimmend mit der Funktion als Gerüstprotein der PSD können multiple Protein-Protein Interaktionen von diesen Domänen vermittelt werden. Beispielsweise wurde die direkte Interaktion der PDZ-Domäne mit dem *calcium-independent receptor for α -latrotoxin* (CIRL, Kreienkamp et al., 2000; Tobaben et al., 2000) und dem C-Terminus eines Rezeptors für Somatostatin (SSTR2, Zitzer et al., 1999) nachgewiesen. Die prolinreiche Region bindet mehrere Partner, zu denen unter anderem das Protein Homer zählt, das als Homodimer mit metabotropen Glutamatrezeptoren interagiert. Die Interaktion mit dem Insulinrezeptorsubstrat p53 (IRSp53) wird durch das kleine G-Protein cdc42 reguliert und steht im Zusammenhang mit der kontrollierten Assemblierung makromolekularer Komplexe zwischen Shank und PSD-95 (Bockmann et al., 2002; Soltau et al., 2004). Als Interaktionspartner der SH3-Domäne wurde das Protein Densin-180 identifiziert und dessen wesentliche Bedeutung für die neuronale Morphologie belegt (Quitsch et al., 2005). Durch die Assoziation der Aktin-bindenden Proteine Cortactin mit der prolinreichen Region sowie von α -Fodrin mit den ankyrin-Wiederholungen sind die Shank-Proteine mit dem Cytoskelett der dendritischen Dornen verbunden (Wu und Montone, 1998; Böckers et al., 2001). Durch die SAM Domäne wird eine homomere und heteromere Multimerisation vermittelt, durch die Shank-Proteine in der PSD vernetzt werden können (Naisbitt et al., 1999). In Hippocampus-Neuronen sind die Shank-Proteine immunocytochemisch in einem punktiertem Muster nachweisbar und zeigen eine Kolo-kalisation mit Markerproteinen excitatorischer Synapsen. Im Zellkörper und dem dendritischen Schaft sind diese Proteine hingegen nur in geringer Menge vorhanden (Naisbitt et al., 1999; Yao et al., 1999; Lim et al., 1999). In Immunogold-Markierungen wurde gezeigt, daß Shank zwar gleichmäßig über die gesamte Breite der PSD verteilt, allerdings in tieferen Schichten bei ~ 30 nm konzentriert ist. PSD-95 hingegen kommt gehäuft in den ersten 5-10 nm vor (Valtschanoff und Weinberg, 2001). Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften werden die Shank-Proteine als „*major scaffolding*“ Proteine bezeichnet, denen durch ihre zentrale Lage in der PSD und der engen Verbindung zum Cytoskelett eine herausragende Bedeutung in der Verankerung und Anordnung postsynaptischer Rezeptoren zukommt (Sheng und Kim, 2000). Eine erhöhte Expression von Shank1 führt zu einer beschleunigten Ausreifung und einer deutlichen Vergrößerung des terminalen Bereiches dendritischer Dornen, wobei die Formation von Dornen mit mehreren Synapsen unterstützt wird (Sala et al., 2001).

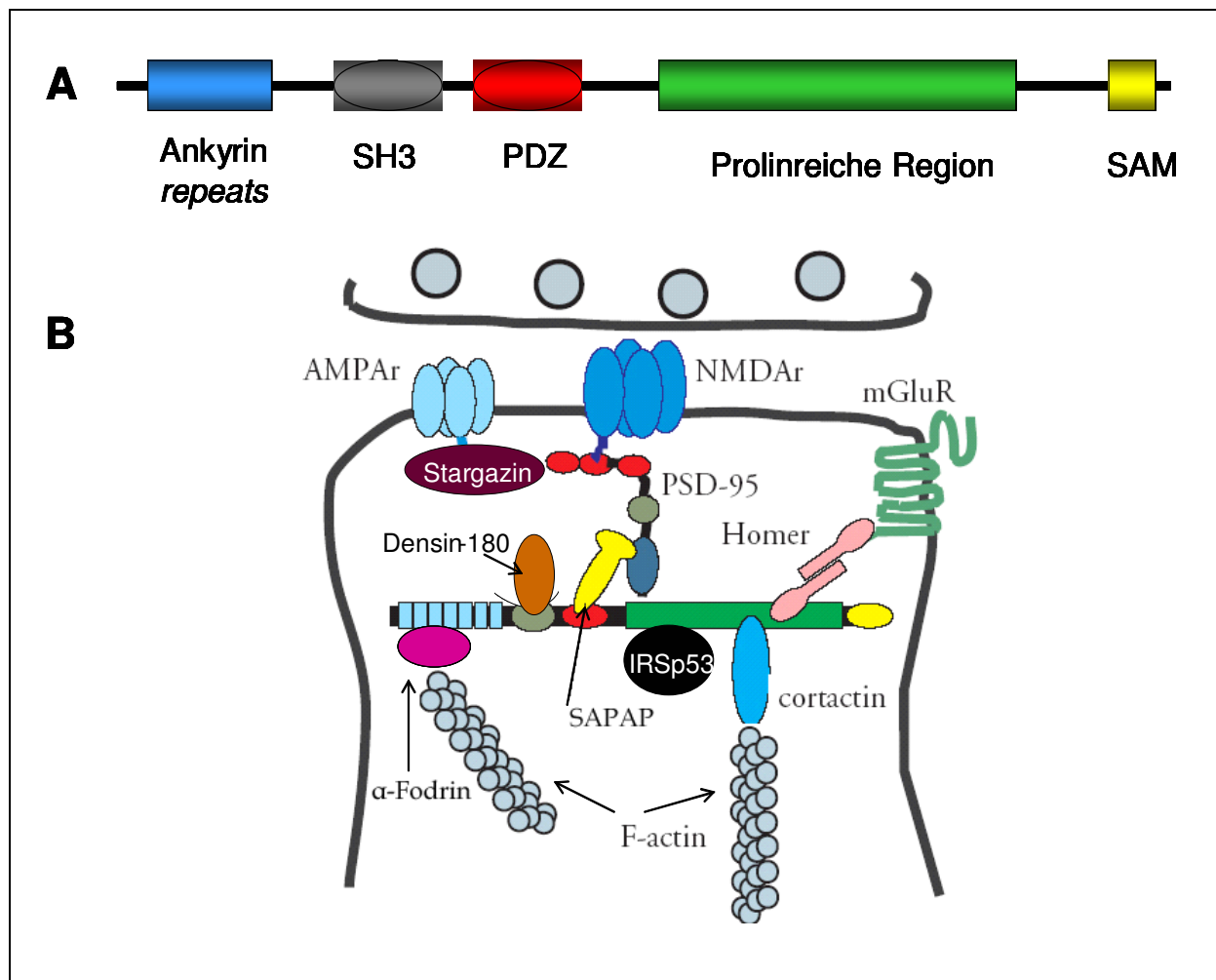


Abbildung 1.2: A) schematische Darstellung der Domänenstruktur der shank-Proteine (PDZ: *PSD-95/discs large/Zona occludens1*; SH3: *src homology domain*; SAM: *sterile alpha motive*) B) Schematische Darstellung der Struktur der postsynaptischen Dichte. Shank ist durch die Interaktion der prolinreichen Region mit Cortactin und der Ankyrin-Wiederholungen mit α -Fodrin mit dem F-Aktin Cytoskelett des dendritischen Dorns assoziiert. Die PDZ-Domäne von shank bindet den C-Terminus von SAPAP und ist somit über PSD-95 indirekt mit NMDA- und AMPA-Rezeptoren assoziiert. Durch die Bindung eines Homodimers des Proteins Homer an die prolinreiche Region können metabotrope Glutamaterezeptoren (mGluR) in der postsynaptischen Membran verankert werden. An die SH3 Domäne bindet das Protein Densin-180 und der vorderen Teil der prolinreichen Region bindet IRSp53 (Modifiziert nach Sheng und Kim, 2000).

Die mRNAs der drei shank-Proteine wurden durch *in-situ* Hybridisierung von Gewebeschnitten des Cerebellums und des Hippocampus von *R. norvegicus* in distalen dendritischen Bereichen nachgewiesen. Aufgrund der laminaren Strukturen, die durch die Purkinjezellen des Cerebellums bzw. durch die Pyramidenzellen des Hippocampus ausgebildet werden, eignen sich diese Hirnstrukturen in besonderer Weise um die dendritische Lokalisation spezifischer mRNAs zu untersuchen. So kann im Cerebellum deutlich zwischen der Purkinjezellschicht, welche die Zellkörper dieser Neuronen enthält, der Körnerzellschicht, durch die sich Kletterfasern und die Axone der Purkinjezellen ziehen, und der Molekularschicht, in der die großen und weitverzweigten Dendriten der Purkinjezellen enden,

unterschieden werden. Der Nachweis der mRNAs von shank1 und shank2 in der Molekularschicht ist ein deutlicher Beleg für deren dendritischen Transport in Purkinjezellen; shank3 wird in den Körnerzellen exprimiert und kann daher nicht in die Molekularschicht transportiert werden. Der Gehalt und die Lokalisierung der shank2-mRNA im Cerebellum scheint in engem Zusammenhang mit der postnatalen Entwicklung zu stehen. Im Hippocampus wurde nach einem vergleichbaren Prinzip die dendritische Lokalisierung von shank1 und shank3-mRNA in Pyramidenzellen belegt. Die biologische Relevanz des Transportes der mRNAs unterschiedlicher shank-Isoformen in verschiedenen Hirnregionen ist nicht bekannt (Zitzer et al., 1999; Böckers et al., 2004). Mit der Verwendung von GFP-Reporterkonstrukten, die verschiedene Bereiche der 3'UTR von shank1 enthielten, und anschließender *in-situ* Hybridisierung konnte Segger-Junius (2003) die dendritische Lokalisierung der mRNA in einer granulären Form in kultivierten Hippocampus-Neuronen aufzeigen. Des weiteren wurde die Sequenz, die für eine effiziente dendritische Lokalisation erforderlich ist auf die ersten ~ 200 Nucleotide der 3'UTR eingegrenzt und als *shank1 dendritic targeting element* (shank1-DTE) bezeichnet. Ein vorrangiges Thema dieser Arbeit ist die Identifikation und Charakterisierung *trans*-agierender Faktoren, die mit dem shank1-DTE interagieren und wahrscheinlich eine regulative Funktion auf den cytoplasmatischen Transport und/oder die Kontrolle der lokalen Translation der mRNA ausüben. Des weiteren sollte die Regulation der lokalen Translation von shank1-mRNA in Neuronen und deren Abhängigkeit von extrazellulären Stimuli analysiert werden.

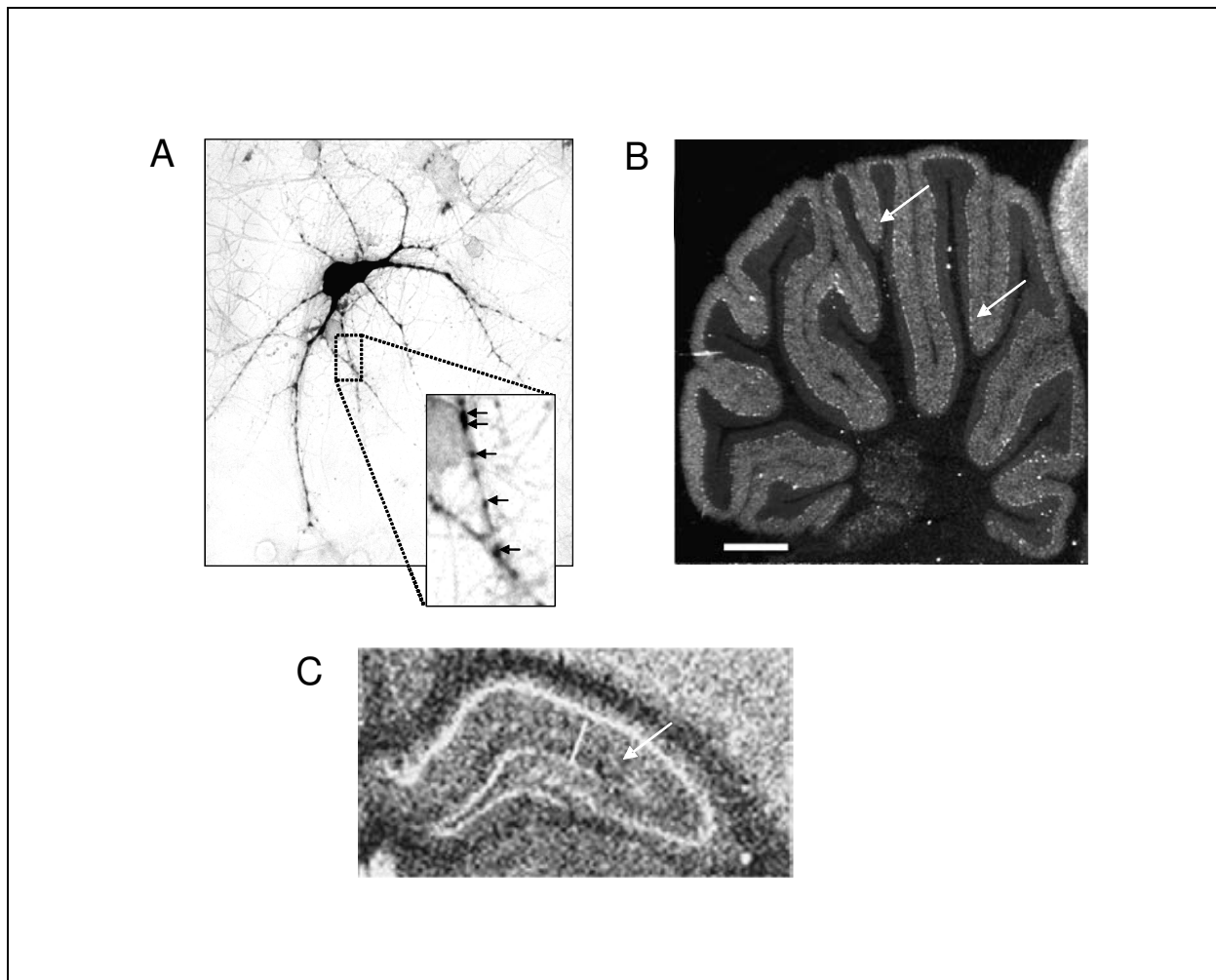


Abbildung 1.3 Dendritische Lokalisierung der shank1-mRNA **A)** Die *in-situ* Hybridisierung mit einem vereinzelt kultivierten Hippocampus-Neuron zeigt die Präsenz der shank1-mRNA in distalen dendritischen Bereichen in einer granulären Struktur. Die Partikel haben einen Durchmesser von ca. 500 nm **B)** Bei *in-situ* Hybridisierung von Gewebeschnitten des Rattengehirns mit ^{35}S -markierten RNA-Sonden ist die shank1-mRNA in der molekularen Schicht des Cerebellums nachweisbar, welche die Dendriten der Purkinjezellen enthält **C)** Ebenso kann ist die shank1-mRNA in den Dendriten von Pyramidenzellen des Hippocampus, die durch den weißen Strich markiert sind, detektiert werden (Segger-Junius, 2003; Böckers et al., 2004; Maßstabsbalken = 1mm)

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden (DNA)

2.1.1 DNA-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde in nicht-denaturierenden 1-2 %-igen horizontalen Agarosegelen (7 x 9 cm) in TAE-Puffer durchgeführt (Sambrock et al., 1989). Die Proben wurden vor dem Beladen mit 5-fachem DNA-Ladepuffer versetzt und bei einer konstanten Spannung von 80-100 V aufgetrennt. Der Nachweis der DNA-Banden erfolgte mittels Ethidiumbromid (0,2 µg/ml), das nach Interkalierung in den DNA-Strang auf einem UV-Leuchttisch (*UVT-28M, Herolab*) bei 356 nm sichtbar gemacht wurde. Zur Größenbestimmung wurden die beiden DNA-Leitern *Gene Ruler 100 bp* und λ DNA / *EcoRI* + *HindIII* (*MBI Fermentas*) eingesetzt.

TAE-Puffer: 100 mM Tris/Acetat, pH 8,0 ; 5 mM EDTA

5-facher DNA-Ladepuffer: 40 mM Tris/HCl, pH 8,0 ; 30 % (v/v) Glycerin ; 0,25 (w/v) Bromphenolblau;
0,25 % (w/v), Xylenyanol,

2.1.2 Isopropanolpräzipitation von DNA/RNA

Zur Ausfällung von Nucleinsäuren aus wässrigen Lösungen wurde eine Mischung aus Isopropanol (7/10 Volumen) und Natriumacetat (3 M; 1/10 Volumen) verwendet. Das Präzipitat wurde für 20 min bei 20.000 g und RT zentrifugiert, die pelletierte DNA zweimal in 70 %-igem Ethanol gewaschen und nach Trocknung in Wasser gelöst.

2.1.3 Phenol/Chloroform-Extraktion

Falls DNA oder RNA für nachfolgende Reaktionen von assoziierten Proteinen befreit werden mußte, so wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion angewandt. Eine Mischung aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol (24:24:1) wurde in gleichem Volumen zur DNA/RNA-Lösung gegeben, stark geschüttelt und die Phasen durch Zentrifugation bei 20.000 g für 3 min getrennt. Die wässrige Phase wurde abgenommen und der Vorgang mit reinem Chloroform wiederholt. Die Nucleinsäuren im Überstand wurden durch Isopropanol ausgefällt und mittels DNA/RNA-Gelelektrophorese auf ihre Integrität überprüft.

2.1.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit dem *Gel Extraktion Kit* (*Millipore*) nach Herstellerangaben durchgeführt. Eine Präzipitation mit Isopropanol zur Konzentration und Aufreinigung wurde angeschlossen.

2.1.5 Restriktionsverdau von DNA

Zum Restriktionsverdau von Plasmid-DNA wurde diese mit einer ausreichenden Menge an einem spezifischen Restriktionsenzym in einem adäquaten Puffer für mindestens eine Stunde bei einer enzymespezifischen Temperatur (meist 37°C) inkubiert (*New England Biolabs*). Der Erfolg der Restriktion wurde mittels DNA-Gelelektrophorese überprüft.

2.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden in einem Massenverhältnis von ungefähr 3 (einzubauende DNA) zu 1 (Vektor) zusammen mit 1 U T4-Ligase in einem enzymespezifischen Puffer (*Roche*) über Nacht bei 16°C inkubiert (Sambrock et al., 1989).

2.1.7 Herstellung glatter DNA-Enden aus 5'überhängenden DNA-Enden

Falls für eine Ligation glatte DNA-Enden benötigt wurden, wurden diese in einer Auffüllreaktion mit T4-DNA Polymerase (*MBI Fermentas*) produziert. Die DNA wurde zusammen mit 1 U des Enzyms in Y^{+} -Puffer (*MBI Fermentas*) und einer dNTP-Konzentration von 0,5 mM (pro dNTP) für 15 min bei 37°C inkubiert.

2.1.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden die thermostabilen Polymerasen *Taq* (*Promega*) und *Pfu* (*Stratagene*) eingesetzt. Bei einer Standardreaktion in einem Volumen von 50 µl wurden 20-100 ng Matrizen-DNA, je 10 pmol der beiden Oligonucleotide und 1-2 U DNA-Polymerase eingesetzt. Die Magnesium-Konzentration variierte je nach Länge und Struktur der zu amplifizierenden DNA zwischen 1,5 und 4 mM. Durchgeführt wurde die Reaktion im *GeneAmp PCR System 2400* (*Perkin Elmer*) nach folgendem Protokoll:

Denaturierung bei 94°C für 30 sec
Oligonucleotid-Anlagerung bei 50 – 60°C für 30 sec
Elongation bei 72 °C mit je 1 min pro kB

Die PCR-Produkte wurden in einer Gelelektrophorese analysiert. Sollte das Produkt mittels überhängender Adenosin-Nucleotide in einen „T-Vektor“ (*pCR[®] II-TOPO*, *Invitrogen* oder *pGEM[®]-T Easy*, *Promega*) kloniert werden, so wurde der letzte Elongationsschritt auf 10 min ausgedehnt (nur bei Reaktionen, die *Taq*-Polymerase enthielten).

2.1.9 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren

Die Konzentration von Nucleinsäuren wurde photometrisch durch Messung der Extinktion bei 260 nm mit dem Spektrophotometer *Genequant* (*Amersham Biosciences*) bestimmt. Durch zusätzliche Messung der Extinktion bei 280 nm wurde die Reinheit der Nucleinsäuren bzw. deren Restproteingehalt ermittelt.

2.1.10 Herstellung transformationskompetenter *E. coli* Zellen

Transformationskompetente *Escherischia coli* Bakterien wurden mit der Rubidiumchlorid-Methode nach Mandel und Higa (1970) hergestellt (siehe auch Sambrook et al., 1989). Hierzu wurde eine 5 ml Vorkultur des jeweiligen Stammes in LB-Medium mit 15 µg/ml Tetracyclin angeimpft, die über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert wurde. Diese diente wiederum zum Start einer Hauptkultur von 200 ml, die solange bei 37°C geschüttelt wurde, bis eine Extinktion von 0,4 – 0,5 bei 600 nm erreicht war. Die Zellen wurden für 5 min bei 4000 g und 4°C pelletiert und auf Eis in 60 ml TFB I-Puffer resuspendiert. Es folgte eine zweite Zentrifugation (5 min, 4000 g, 4°C) nach der die Bakterien in 8 ml TFB II-Puffer resuspendiert wurden. Die Suspension wurde in Aliquots von je 200 µl aufgeteilt und direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

LB-Medium: Bacto-Pepton 10g/l; NaCl 10 g/l; Hefe-Extrakt 5g/l; pH 7,5

LB-Agar: Bacto-Pepton 10g/l; NaCl 10 g/l; Hefe-Extrakt 5g/l; Bacto-Agar 16g/l; pH 7,5

TBF I-Puffer: 30 mM KOAc; 50 mM MnCl₂; 100 mM RbCl; 10 mM CaCl₂; 15 % (v/v) Glycerin; pH 5,8

TFB II-Puffer: 10 mM MOPS; 75 mM CaCl₂; 10 mM RbCl; 15 % (v/v) Glycerin; pH 7,0

2.1.11 Transformation von kompetenten *E. coli* Zellen

Zur Transformation von *E. coli* Zellen wurden 1-10 µl eines Ligationsansatzes mit 100 µl kompetenter Bakteriensuspension versetzt. Nach 10 Minuten auf Eis folgte ein Hitzeschock

bei 42°C für 1 min, nachdem die Suspension wieder heruntergekühlt und 900 µl LB-Medium hinzugefügt wurden, schüttelte die Kultur mit 500-800 Upm bei 37°C für eine Stunde. Die Bakterien wurden zur Selektion auf LB-Platten mit Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.1.12 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen

Zur Isolierung kleinerer DNA-Mengen aus *E. coli* wurde die TELT-Lyse Methode nach Holmes und Quigley (1981) eingesetzt. Das Pellet aus 1,5 ml Bakterienkultur (20.000 g, 30 sec) wurde in 250 µl TELT-Lyse Puffer resuspendiert und mit 250 µg Lysozym versetzt. Die Suspension wurde auf Eis gekühlt, für fünf Minuten auf 94°C erhitzt und wieder auf Eis überführt. Danach wurden unlösliche Bestandteile abzentrifugiert (20.000 g, 20 min) und die DNA durch Isopropanol-Präzipitation isoliert. Größere Mengen an Plasmid-DNA wurden durch Anionenaustausch-Chromatographie nach alkalischer Lyse mit dem *Nucleobond AX Kit* (*Macherey Nagel*), der Anleitung des Herstellers folgend, gewonnen. Für die Transfektion von kultivierten Neuronen wurde das *Nucleobond EF Kit* (*Macherey Nagel*) verwendet um endotoxinfreie DNA zu erhalten.

TELT-Lysepuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 62,5 mM EDTA; 2,5 mM LiCl; 0,4 % (v/v) Triton X-100

2.1.13 Oligonucleotide

Die während dieser Arbeit verwendeten Oligonucleotide wurden im Servicelabor des Institutes für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie (Universitätskrankenhaus Eppendorf) synthetisiert. Die Oligonucleotide mußten teilweise mittels G-25 Säulen (*Amersham Biosciences*) oder Ethanol-Präzipitation gereinigt werden, anschließend wurde die Konzentration auf 10 pmol/µl eingestellt.

2.1.14 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen von DNA wurden vom Servicelabor des Institutes für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie (Universitätskrankenhaus Eppendorf) nach der Didesoxy-Methode (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Es wurden hier je 500 ng Plasmid-DNA mit einem geeigneten Sequenzierprimer zur Verfügung gestellt, die dort mit dem *ABI PrismPRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (*Applied Biosystems*) nach Herstellerangaben aufgearbeitet wurden. Die Analyse der fluoreszenzmarkierten Fragmente erfolgte durch den *ABI PRISM 377 DNA Sequencer* (*Applied Biosystems*).

2.2 Molekularbiologische Methoden (RNA)

2.2.1 RNA-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von RNA dienten 1 %-ige horizontale Agarosegele in TAE Puffer. Die RNA wurde zuvor zur Denaturierung mit formamidhaltigem RNA-Ladepuffer (*Peqlab*) versetzt und für 10 min auf 70°C erhitzt. Der Gellauf und Nachweis der Nucleinsäuren war mit dem der DNA-Gelelektrophorese identisch. Um einer Degradierung durch RNasen vorzubeugen wurden ausschließlich RNase-freie Chemikalien und Diethylpyrocarbornat (DEPC)-behandeltes Wasser eingesetzt. Die Größe der RNA-Moleküle wurde durch die RNA-Leitern *RNA-Ladder High Range* und *RNA-Ladder Low range* (*Peqlab*) bestimmt.

2.2.2 Präparation von RNA aus Hirngewebe

Zur Gewinnung von Gesamt-RNA aus Rattengehirn wurden 1-2 g frisch präpariertes Gewebe in 10 ml *PeqGold RNA Pure-Lösung* (*Peqlab*) homogenisiert und nach Herstellerangaben aufgearbeitet. Die Integrität der isolierten RNA wurde mittels Gelelektrophorese überprüft und die Konzentration photometrisch bestimmt. Für die weitere Aufreinigung von mRNA über Oligo-dT-Nucleotidsäulen wurde das *Micro Fast Track KitTM 2.0* (*Invitrogen*) nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.3 Reverse Transkription/cDNA Herstellung

Um aus der gewonnenen RNA komplementäre DNA (cDNA) herzustellen wurde eine reverse Transkription durchgeführt; pro Reaktion wurden hierbei 10 µg Gesamt-RNA oder 1 µg mRNA eingesetzt. Um Startpunkte für die Polymerase zu generieren wurden entweder oligo-dT-Nucleotide oder zufällige Nucleotidhexamere bzw. beide in Kombination verwendet. Als reverse Transkriptase diente *Superscript II* (*Invitrogen*), von der 1-2 U pro Ansatz in einem mitgelieferten Puffer eingesetzt wurden; die dNTP-Konzentration betrug jeweils 1 mM. Die Reaktion wurde für 60 min bei 37°C inkubiert.

2.2.4 *in vitro* Transkription

Zur *in vitro* Transkription von RNA nach Sambrock et al. (1989) wurde zunächst das Plasmid am 3' Ende der abzuschreibenden Sequenz mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert. Die Restriktion wurde in einer Gelelektrophorese überprüft und die DNA anschließend durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt. Je nach zur Verfügung

stehendem Promotor wurden drei unterschiedliche RNA-Polymerasen verwendet: T7-, T3- und SP6-Polymerase (*Fermentas*), wobei ein adäquater Puffer jeweils mitgeliefert wurde. Die Reaktion wurde angesetzt wie folgt:

2 µl RNA-Polymerase (2 U)
1 µl RNase Inhibitor
5 µl 10x T3/T7 oder SP6 RNA-Polymerase Puffer
2 µg linearisierte Plasmid-DNA
40 µl mit DEPC-H ₂ O

Der Ansatz wurde 2-3 h bei 37°C inkubiert und die DNA anschließend für 15 min mit 1 U DNase I verdaut. Es folgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion; die Integrität der RNA wurde mittels Gelelektrophorese überprüft und die Konzentration photometrisch bestimmt. Zur Produktion größerer RNA-Mengen (3-5 mg) wurde das *T7 RiboMAXTM Express Large Scale RNA Production SystemTM* (*Promega*) nach Herstellerangaben eingesetzt (Inkubationszeit von 30 min). Falls nur ein T3-Promotor zur Verfügung stand wurde der *T7-Enzyme Mix* gegen eine entsprechende Menge T3-Polymerase und RNase-Inhibitor (*Fermentas*) ausgetauscht. Wurde mRNA mit einem 7-Methylguanosin-*cap* verwendet, so wurde diese mit dem *Message-MachineTM-Kit* (*Ambion*) nach Herstellerangaben produziert. Für *UV-Crosslink*- und *Electrophoretic Mobility Shift* Analysen (EMSA) wurden radioaktiv markierte RNA-Sonden benötigt. Hierzu erfolgte die *in vitro* Transkription in Anwesenheit von ³²P-markiertem UTP (*Amersham Biosciences*). Die Reaktion wurde nach folgendem Schema angesetzt:

0,25 µl 20x NTP-Mix
1 µl 5x Transkriptionspuffer (T3/T7 oder SP6)
0,13 µl 0,5 M DTT
0,3 µl RNase-Inhibitor
2,5 µl ³² P-UTP (62,5 pmol)
0,5 µg linearisierte Plasmid-DNA
0,5 µl RNA-Polymerase (5U)
20x NTP-Mix: je 10mM ATP, CTP, GTP, 200 µM UTP

Die Reaktion wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert und nach Abbau der Plasmid-DNA durch 1 U DNase I (*Promega*; 15 min bei 37°C) mit nucleasefreiem Wasser auf 100 µl aufgefüllt. Zur Überprüfung der *in vitro* Transkription ist die Bestimmung des, in die RNA inkorporierten Anteils des ³²P-UTPs notwendig. Hierzu wurden zunächst 2 µl des Reaktionsansatzes in 98 µl H₂O aufgenommen. 5 µl dieser Verdünnung wurden als Referenzwert (vor Entfernung nicht eingebauter Nucleotide) auf *Whatman*-Papier aufgetragen. Der restliche Ansatz wurde über eine *G25*-Säule (*Amersham Biosciences*) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Von der gereinigten *in vitro* Transkription wurden ebenfalls 2 µl entnommen, mit H₂O auf 100 µl aufgefüllt und 5 µl dieser Verdünnung auf *Whatman*-Papier aufgetragen. Nach Trocknung wurde dieses zur vollständigen Entfernung freier Nucleotide für 15 min in ca. 30 ml 10 % Trichloressigsäure (TCA) und 1 % Pyrophosphat inkubiert. Nach gänzlicher Trocknung wurden die *Whatman*-Papiere in ein Szintillations-Röhrchen überführt und 1,5 ml Szintillations-Cocktail (*OptiPhase HiSafeTM Wallac Scintillation Products*) hinzugegeben bevor die Radioaktivität als *counts per minute* (cpm) in dem *Liquid Scintillation Counter - Wallac 1409* (*Wallac Scintillation Products*) gemessen wurde. Die Einbaurate ergibt sich aus dem Quotienten der Messungen. Anhand des Anteiles des eingebauten ³²P-UTP und der Sequenz (bzw. des Uracil-Gehaltes) kann ebenfalls die Konzentration der radioaktiv markierten RNA berechnet werden.

Zur Kopplung an Streptavidin-Partikel wurde RNA mit inkorporiertem Biotin-16-UTP (*Roche*) produziert. Die Transkription wurde wie oben beschrieben durchgeführt, wobei lediglich die Konzentrationen der Nucleotide variierte. Die Endkonzentration von ATP, CTP und GTP lag bei 1mM und die von nicht markiertem UTP bei 250 nM; Biotin-16-UTP war in einer Konzentration von 25 nM vorhanden. Eine Einbaurate von 1:10 wird allerdings nicht erreicht, da der Einbau von Biotin-16-UTP gegenüber dem von UTP sterisch behindert ist. Es folgte eine Reinigung über eine *G25*-Säule (*Amersham Biosciences*) zur Entfernung nicht inkorporierter Nucleotide.

2.2.5 Northern Blot Analysen

Zum Nachweis spezifischer mRNAs in Hirngewebe wurden *Northern Blot* Analysen durchgeführt. 10 µg Gesamt-RNA bzw. 1 µg mRNA wurden in einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt. Die Gelelektrophorese fand zur besseren Auftrennung der RNA-Moleküle in MOPS-Puffer mit einem Formaldehydanteil von 6,6 % (v/v) statt. Die aufgetrennte RNA wurde über Nacht durch Kapillarkraft auf eine Nitrocellulosemembran (*Protean, Schleicher & Schüll*) transferiert und dort mittels UV-Licht (254 nm, 1kJ) fixiert; zum Transfer wurde SSC-

Puffer verwendet. Eine mit ^{32}P -dATP (*Amersham Biosciences*) markierte DNA-Sonde wurde mit dem *Rediprime II* System (*Amersham Biosciences*) nach Herstellerangaben produziert. Die Hybridisierung der DNA-Sonde mit der aufgetrennten RNA fand in 10 ml *Ultrasensitive Hybridization Buffer* (*Ambion*) über Nacht bei 65°C statt. Im Anschluß wurde die Membran in SSC-Puffer mit 0,1 % SDS gewaschen bis nur noch ein geringer radioaktiver Hintergrund meßbar war und für eine Autoradiographie eingesetzt.

MOPS-Puffer: 20 mM MOPS, pH 7,0; 5 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA

SSC-Puffer: 250 mM NaCl; 25 mM Natriumacetat, pH 7,0

2.2.6 UV-Crosslink Analysen

Zum Nachweis von RNA-Protein Interaktionen wurden *UV-Crosslink* Analysen angewandt. Hierbei wurden 5-10 fmol einer radioaktiven RNA-Sonde zusammen mit 5-10 µg eines Proteinlysates oder 300-500 ng eines aufgereinigten rekombinanten *His-Tag* Proteins für 20 min bei RT inkubiert; die Reaktion fand in einem Gesamtvolumen von 20 µl in RNA-Bindungspuffer statt. Es folgte eine Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm, 1 Joule pro cm²) um eine kovalente Verbindung zwischen der radioaktiven RNA und interagierenden Proteinen herzustellen. Essentiell ist die Verwendung besonders dünnwandiger Reaktionsgefäße, da sonst ein Großteil des UV-Lichtes absorbiert wird (*GeneAmpTM Thin-walled Reaction Tubes*, *Applied Biosystems*). Während eines anschließenden Verdaus mit 7 U RNase A für 10 min bei 37°C war die kovalent gebundene RNA vor einem Abbau geschützt und blieb mit den Proteinen assoziiert. Anschließend wurde eine SDS-Gelelektrophorese durchgeführt und das Gel 3-4 h unter Vakuum bei 80°C getrocknet (*Slab Dryer*, *BioRad*). Nach einer Autoradiographie von 1-3 Tagen (*Cronex 5 Medical X-Ray Film*, *Agfa*) konnten RNA-Protein-Komplexe als distinkte Bande nachgewiesen werden.

RNA-Bindungspuffer: 1mM DTT; 5 % Glycerin (v/v); 5 µg/µl Heparin; 10 mM HEPES , pH 7,6

2.2.7 Electrophoretic Mobility Shift (EMSA) Analysen

Als weiterer Nachweis für RNA-Protein Interaktionen wurden EMSA Analysen durchgeführt. Bei Auftrennung von RNA-Protein Komplexen in einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel ist deren Laufgeschwindigkeit im Vergleich zu freier RNA verzögert. Es wurde 1 fmol radioaktiv markierter RNA zusammen mit 5-10 µg eines Proteinlysates oder 300-500 ng eines aufgereinigten rekombinanten *His-Tag* Proteins in 20 µl RNA-Bindungspuffer für 20 min bei RT inkubiert. Die Reaktionen wurden mit 5-fachem EMSA-

Ladepuffer versetzt und direkt in einem Gel (17,5 cm x 19 cm, *Hoefer Scientific Instruments*) mit folgender Zusammensetzung aufgetrennt:

1 ml 10x TBE
4 ml <i>Rotiphorese-Gel 30 (Roth)</i>
0,625 ml 80 % Glycerin
14,375 ml DEPC-H ₂ O
0,3 ml 10 % APS
20µl TEMED

Die Elektrophorese wurde in 0,5-fachem TBE-Puffer bei einer konstanten Spannung von 250-300 V für 2-3 h bei 4°C durchgeführt. Das Gel wurde anschließend unter Vakuum bei 80°C über Nacht getrocknet (*Slab Dryer, BioRad*) und für eine Autoradiographie verwendet.

TBE-Puffer: 90 mM Tris/HCl, pH 7,5; 45 mM Borat; 2mM EDTA

5-fach EMSA Ladepuffer: 80 % (v/v) Glycerin; 0,5 % (w/v) Bromphenolblau; 0,5 % (w/v) Xylenxyanol

2.2.8 *North-Western Blot Analysen*

Um die Interaktion von Proteinen und RNA in *North-Western Blot* Analysen nachzuweisen wurden ca. 500 ng eines aufgereinigten Fusionsprotein für eine SDS-Gelelektrophorese verwendet und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (siehe 2.3.4). Diese wurde über Nacht unter leichtem Schütteln in TBS-Puffer bei 4°C inkubiert um eine Renaturierung der Proteine zu erreichen. Zum Nachweis einer RNA-Bindungsaktivität der transferierten Proteine wurde eine radioaktiv markierte RNA-Sonde verwendet. Diese wurde in 10 ml RNA-Bindungspuffer verdünnt und über Nacht bei 30°C mit der Membran inkubiert. Es wurde solange mit 0,1 x SSC gewaschen bis der radioaktive Hintergrund niedrig war. RNA-Protein Komplexe konnten im Anschluß durch Autoradiographie nachgewiesen werden.

TBS-Puffer: 150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7,9

2.2.9 *In vitro* Translation

Zur *in vitro* Translation von RNA wurde Nuclease-behandeltes *Rabbit Reticulocyte* Lysat (*Promega*) verwendet. Anstelle der vom Hersteller empfohlenen 1 µg wurden lediglich 500 ng RNA eingesetzt. Ansonsten wurden die Angaben befolgt und die Reaktion für 90 min bei 30°C inkubiert. Der Nachweis der Proteine erfolgte über SDS-Gelelektrophorese und anschließende Autoradiographie, sofern die Translation in Anwesenheit von ³⁵S-Mehtonin

(Amersham Biosciences) durchgeführt wurde. Die Aktivität von *in vitro* translatierter *Photinus*-Luziferase wurde mit dem *Luciferase Assay System* (Promega) bestimmt.

2.2.10 Luziferase-Reportergen Analysen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Luziferasen vom Glühwürmchen (*Photinus*) und Seestiefmütterchen (*Renilla*) als Reportergene eingesetzt. Sofern in einem Zelllysats oder einer *in vitro* Translation nur die *Photinus*-Luziferase quantifiziert werden sollte wurde das *Luciferase Assay System* (Promega) verwendet. Falls die Aktivität der Luziferasen beider Spezies in demselben Zelllysats nacheinander bestimmt werden sollte wurde das *Dual Luciferase Assay System* (Promega) eingesetzt. In beiden Fällen wurde nach Angaben des Herstellers verfahren. Die Messung der Lichtintensität wurde in einem Luminometer durchgeführt (*Microlumat LB 96 P*, Berthold EG&G).

2.2.11 Analyse von ribosomalen Komplexen

Die Assoziation von mRNA mit 40 S-Ribosomenuntereinheiten sowie 80 S-Ribosomen wurde (mit Modifikationen) nach der von Gray und Hentze (1994) etablierten Methode untersucht. Zunächst wurde eine *in vitro* Translation von RNA mit 7-Methylguanosin-cap durchgeführt, wobei die Reaktion hier bereits 5 min nach Zugabe der RNA durch Überführen auf Eis gestoppt wurde. Als codierende mRNA wurde *Photinus*-Luziferase verwendet, vor welche die vollständige shank1-5'UTR kloniert wurde; zur Kontrolle diente nicht modifizierte *Photinus*-Luziferase mRNA. Zum Nachweis von 80 S-Ribosomen wurde die Elongation durch Cycloheximid (1mM) inhibiert, was zu einer Akkumulation von Ribosomen am Startcodon der mRNA führt. Die alleinige Assoziation der kleinen 40 S ribosomalen Untereinheit mit der RNA konnte mittels des nicht-hydrolysierbaren GTP-Analogs γ -S-GTP (1 mM) aufgezeigt werden. Die GTP-abhängige Rekrutierung der großen ribosomalen Untereinheit (60 S) an das Startcodon wurde so unterbunden. Das Reticulocytenlysats wurde für 20 min bei 30°C vor Zugabe der RNA mit diesen Translationsinhibitoren präinkubiert. Im direkten Anschluß an die Initiationsreaktion wurden die entstandenen Komplexe in einem 5-25 %-igen Sucrosegradienten in SG-Puffer aufgetrennt (Wang et al, 2001). Das Gesamtvolumen des Gradienten betrug 10,5 ml, wobei dem Gradienten ein Kissen mit 0,5 ml 60 %-iger Sucrose unterlegt wurde. Zentrifugiert wurde in einem TH 641-Rotor (*Beckman Instruments*) bei 30.000 Upm für 3 h bei 4°C, anschließend wurden von oben 25 Fraktionen von je 0,4 ml abgenommen. Der Nachweis der Komplexe erfolgte bei nicht-radioaktiven

Ansätzen durch Messung der Extinktion bei 260 nm. Sofern die RNA leicht radioaktiv markiert wurde (~ 10.000 cpm pro Reaktion) konnte deren Verteilung über die Fraktionen durch Messung der Radioaktivität mittels des *Liquid Scintillation Counters* (Berthold EG&G) bestimmt werden.

SG-Puffer: 20 mM Tris/HCl, pH 7,5 ; 100 mM KCl ; 1,5 mM Magnesiumacetat ; 2 mM DTT

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Proteinbestimmung

Die Konzentration von Proteinen wurde mit dem Bicinchoninsäure-Verfahren nach Smith et al. (1985) bestimmt, wobei das *BCATM Protein Assay Reagent* der Firma *Pierce* nach Herstellerangaben eingesetzt wurde. Die Messung der Extinktion fand in einem *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)-Messgerät bei 620 nm statt (*Titertek Multiskan Plus*, *Flow Laboratories*). Als Referenz wurde die Extinktion einer *Bovine Serum Albumin* (BSA)-Verdünnungsreihe von 0,1 bis 1 mg/ml bestimmt.

2.3.2 SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen in Polyacrylamidgelen erfolgte nach der von Laemmli 1970 entwickelte Methode (siehe auch Sambrook et al., 1989). Zur Herstellung der 6-12 %-igen Gele und der anschließenden Elektrophorese in SDS-Laufpuffer wurde das *Mini-PROTEAN III* System (*BioRad*) verwendet. Die Proben wurden mit 5-fachem Laemmli-Puffer versetzt und vor dem Auftragen auf das Gel für 5 min auf 95°C erhitzt. Die Trennung fand bei einer konstanten Spannung von 120–180 V statt; zur Größenbestimmung wurde der *Full Range Rainbow Marker* (*Amersham Biosciences*) eingesetzt.

5-facher Laemmli-Puffer: 300 mM Tris/HCl, pH 6,8; 50 % (v/v) Glycerin; 10 % (v/v) β -Mercaptoethanol
7,5 % (w/v) SDS 0,25 % (w/v) Coomassie G-250

SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris/HCl, pH 8,8, 192 mM Glycerin, 0,1 % (w/v) SDS

2.3.3 Coomassie -Färbung von Polyacrylamidgelen

Zum direkten Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen diente eine Coomassie-Blaufärbung. Das Gel wurde für ca. 30 min in Coomassie-Färbelösung bei RT leicht geschüttelt und anschließend solange mit Entfärbelösung behandelt, bis Proteinbanden vor dem Hintergrund erkennbar waren. Alternativ wurde eine kolloidale Coomassie-Lösung der Firma *Roth* nach Herstellerangaben verwendet, wobei die Färbung meist über Nacht stattfand. Zur Trocknung diente das *Gel-Air-Drying* System (*BioRad*).

Coomassie-Färbelösung: 40 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 0,1 % (w/v) Coomassie G-250
Entfärbelösung 50 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure

2.3.4 Western Blot Analysen

Zum immunologischen Nachweis spezifischer Proteine wurden die Proben zunächst durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Für den Transfer auf eine Nitrocellulosemembran (*PROTRAN*, *Schleich & Schüll*) wurde eine *Mini-Trans-Blot* Apparatur (*BioRad*) genutzt. Der Transfer wurde bei 4°C für 1 h bei einer konstanten Spannung von 100 V in Transferpuffer durchgeführt. Die Membran wurde daraufhin kurz in TBS-T gewaschen und für 1 h bei RT in Blockierlösung geschwenkt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte unter leichtem Schütteln entweder für 1-2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C in Blockierlösung. Anschließend wurde die Membran 3 mal für 10 min in TBS-T gewaschen und für 1 h bei RT mit einem geeigneten, mit HRP-Peroxidase konjugiertem Sekundärantikörper inkubiert. Im Anschluß an 3 weitere Waschschrte von je 10 min wurde das Enzym mittels eines chemilumineszenten Substrates (*ECL*, *Enhanced Chemiluminescence*, *Amersham Biosciences*) nachgewiesen. Das Signal wurde durch Exposition eines Röntgenfilms detektiert (*Cronex 5 Medical X-Ray Film*, *Agfa*).

TBS-T-Puffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,9; 150 mM NaCl; 0,2 % (w/v) Tween-20

Blockierlösung: TBS-T mit 5 % (w/v) fettarmes Milchpulver

Transferpuffer: 25 mM Tris/HCl; pH 8,8; 20 % (v/v) Methanol; 192 mM Glycin; 0,02 % (w/v) SDS

2.3.5 Herstellung eines Proteinrohlysats aus Hirngewebe

Zur Isolierung von Proteinen aus Hirngewebe wurde dieses zunächst auf Eis mit einem Skalpell in kleinere Stücke zerschnitten. Diese wurden entweder in einem ~ 4-fachem Volumen RNA Bindungspuffer mit Proteaseinhibitoren oder zur Herstellung eines *Ribosomal Salt Wash* in HKMD-Puffer aufgenommen und mit einem Glashomogenisator (*Wheaton*) so lange behandelt, bis keine Gewebestücke mehr sichtbar waren. Die unlöslichen Bestandteile wurden für 15 min bei 4.444 g und 4°C sedimentiert; der Überstand wurde abgenommen, auf flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

HKMD-Puffer: 10mM HEPES, pH 7,5; 1mM Kaliumacetat; 1,5 mM Magnesiumacetat; 2mM DTT;

Proteaseinhibitoren: 0,2 mM PMSF; 1µg/ml Pepstatin A; 10µg/ml Leupeptin

2.3.6 Fraktionierung des Rohlysates mit Heparin-Sepharose

Zur Anreicherung RNA-bindender Proteine wurden vorgepackte *HiTrapTM Heparin-Sepharose* Affinitätssäulen (5 ml, *Amersham Biosciences*) nach Herstellerangaben eingesetzt. Die an der Säule gebunden Proteine wurden mit einer aufsteigenden Konzentration von NaCl

(0,1–1,5 mM) in Fraktionen eluiert. Zur anschließenden Entsalzung der Proben wurden *HiTrapTM Desalting* Säulen (*Amersham Biosciences*) nach Herstellerangaben verwendet.

2.3.7 Herstellung eines *Ribosomal Salt Wash*

Aus 20 – 25 g Rattengehirnen wurde zunächst ein Rohlysate mit einem Volumen von ~ 200 ml in HKMD-Puffer hergestellt. Dies wurde in 6 Ansätzen vorsichtig über ein Kissen aus 5 ml 30 %-iger Sucroslösung in HKMD-Puffer geschichtet. Es folgte eine Ultrazentrifugation für 3,5 h bei 100.000 g und 4°C (L7-65 Ultrazentrifuge, AH 649 Rotor, *Beckman Instruments*). Das entstandene Pellet aus Polysomen und mRNPs wurde mit HKMD-Puffer + 5 % Glycerin gewaschen und auf flüssigem Stickstoff schockgefroren bzw. direkt weiterverarbeitet. Zur Ablösung assoziierter Proteine wurden die Pellets in 12 ml HKMD-Puffer mit einem Glashomogenisator (*Wheaton*) resuspendiert, mit 4 ml HKMD-Puffer + 4M NaCl (Endkonzentration 1M) versetzt und für 45 min bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Die Suspension wurde auf zwei Zentrifugationsbehälter eines TH 641 Rotors (*Beckman Instruments*) aufgeteilt, und nicht-abgelöste Bestandteile in einem zweiten Zentrifugationsschritt von 45 min bei 100.000 g und 4°C sedimentiert (*L7-65 Ultracentrifuge*, *Beckman Instruments*). Die im Überstand verbliebene Proteinlösung wird als *Ribosomal Salt Wash* (RSW) bezeichnet. Die Entsalzung des RSW wurde entweder mittels *HiTrapTM Desalting* Säulen (*Amersham Biosciences*) oder Dialyse über Nacht bei 4°C gegen RNA-Bindungspuffer mit einer Ausschlußgröße von 14–16 kD durchgeführt. Während der Entsalzung bildete sich ein Präzipitat das durch Zentrifugation für 10 min bei 4.444 g und 4°C entfernt wurde.

2.3.8 Affinitätschromatographie mit Biotin-gekoppelter RNA

Biotinylierte RNA wurde an Streptavidin-ummantelte Partikel (*Promega*) gekoppelt. Zur Bindung der RNA wurden 3 ml der Partikel-Suspension dreimal in 0,5-fachem SSC-Puffer und einmal in Biotinbindungspuffer gewaschen. Diese wurden anschließend mit ~ 1,5 nmol der Biotin-RNA für 45 min bei RT in Biotinbindungspuffer in Gegenwart von 0,1 mg/ml Hefe-tRNA auf einem Rotator inkubiert. Zur Entfernung nicht-gebundener RNA wurden die Partikel anschließend 3 mal mit Biotinbindungspuffer gewaschen. Die Effizienz der Kopplung wurde durch Bestimmung der Nucleinsäure-Konzentrationen des Ausgangsmaterials sowie des Überstandes und der Waschschrte annähernd bestimmt. Nach mehrfachem Waschen in RNA-Bindungspuffer wurden die Partikel mit 5 mg eines vorangereicherten Proteinextraktes

in 5 ml RNA-Bindungspuffer für 30 min bei RT auf einem Rotator inkubiert. Die verwendeten Proteinextrakte wurden zuvor mit 1 ml der Steptavidinpartikel-Suspension ohne RNA-Ummantelung für 10 min bei RT präinkubiert um die Menge unspezifisch an die Matrix bindender Proteine zu reduzieren. Es folgten 4 Waschschrte mit RNA-Bindungspuffer zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine. In einem ersten Elutionsschritt wurden die Partikel für 15 min bei RT in RNA-Bindungspuffer + 1M NaCl auf einem Rotator inkubiert. Es schloß sich ein zweiter, stringenterer Elutionsschritt an, bei dem die Partikel in Laemmli-Puffer für 10 min auf 95°C erhitzt wurden. Das Ergebnis der Affinitätsreinigung wurde durch SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Coomassie-Färbung überprüft.

Biotinbindungspuffer: 10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 1 M NaCl; 1 mM EDTA

2.3.9 Affinitätschromatographie mit *Tobra-Tag* RNA

Das Tobramycin-Aptamer (*Tobra-Tag*, Hartmuth et al., 2002, 2004) wurde in den Polylinker des *pGEM®-T Easy*-Vektors (*Promega*) eingefügt. Somit bestand die Möglichkeit über einen T7-Promotor große Mengen an shank1-DTE RNA herzustellen, die am 3'-Ende mit einem *Tobra-Tag* fusioniert war. Zur Vorbereitung der Tobramycin-Matrix wurden 2 ml NHS-Sepharose (*Qiagen*) 4 mal mit 9 ml HCl (1mM) bei 4°C gewaschen, wobei je für 1 min mit 1500 g bei 4°C abzentrifugiert wurde. Die Matrix wurde über Nacht in 1 ml Kopplungspuffer mit Tobramycin (5 mM, *Fluka*) bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Anschließend wurde 3 mal mit PBS und 2 mal mit PBS + 0,3 % Natriumazid gewaschen. Die Tobramycin-Matrix kann bis zu 3 Monate bei 4°C in PBS + 0,3 % Natriumazid gelagert werden. Direkt vor der Verwendung wurden je 50 µl der Matrix mit 5 ml Blockierpuffer über Nacht bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Durch Verwendung von tRNA und *Bovine Serum Albumin* (BSA) in diesem Puffer wurde die unspezifische Bindung von RNA oder Proteinen des Ausgangsmaterials an die Matrix minimiert. Zur Kopplung an die Tobramycin-Matrix wurden jeweils 200-300 µg *Tobra-Tag* RNA für 45 min in 1 ml Bindungspuffer bei RT auf einem Rotator mit dieser inkubiert. Anschließend wurde 3 mal mit 1 ml Bindungspuffer gewaschen. Zur Affinitätsreinigung wurde die RNA-ummantelte Matrix zusammen mit 3-5 mg RSW in 10 ml RNA-Bindungspuffer für 30 min bei RT auf einem Rotator inkubiert. Nach 3 Waschschrten mit 1 ml RNA-Bindungspuffer erfolgten zwei Elutionen in je 400 µl optimalem RNA-Bindungspuffer mit 25 mM Tobramycin für 15 min bei 4°C auf einem Rotator. Die Eluate wurden vereinigt und mit 90 µl TCA (100 %) für 30 min bei RT präzipitiert. Die ausgefällten Proteine wurden 15 min bei 20.000 g abzentrifugiert und zweimal mit einer Mischung aus Diethylether und Ethanol (1:1) gewaschen. Nach kurzem

Trocknen wurden die Proteinpräzipitate durch Aufkochen in 50 µl Laemmli-Puffer gelöst. Die eingesetzte *Tobra-Tag* RNA wurde mit ^{32}P -UTP (*Amersham Biosciences*) leicht radioaktiv markiert (je ~ 20.000 cpm), wodurch die Effizienz der einzelnen Verfahrensschritte durch Radioaktivitätsbestimmung im *Liquid Scintillation Counter* - *Wallac 1409* (*Wallac Scintillation Products*) überprüft werden konnte.

Kopplungspuffer: 80 mM Tris/HCl, pH 8,1 bei 21,5°C; 145 mM KCl; 4 mM CaCl_2 ; 4 mM MgCl_2 ; 0,8 mM DTT; 0,1 mg/ml Hefe-tRNA

Blockierpuffer: 80 mM Tris/HCl, pH 8,1 bei 21,5°C; 300 mM KCl; 4 mM CaCl_2 ; 4 mM MgCl_2 ; 0,8 mM DTT; 0,1 mg/ml Hefe-tRNA; 0,5 mg/ml BSA

2.3.10 Massenspektroskopie

Die Identifizierung aufgereinigter Proteine erfolgte, nach Ausschneiden aus dem Polyacrylamidgel, durch tryptische Spaltung und Analyse in einem ESI-Qtof2-Massenspektrometer im Servicelabor des Instituts für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie (Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf).

2.3.11 Expression und Aufreinigung von His-Tag Fusionsproteinen

Zur Aufreinigung von rekombinanten Proteinen aus *E. coli* wurde ein Nickel-bindender His₆-Tag verwendet. Als Vektoren wurden pQE32 (*Qiagen*) und pET16b (*Novagen*) eingesetzt, die beide zur Fusion eines C-terminalen His₆-Tags an das codierte Protein dienen. Zunächst wurde eine 5 ml Vorkultur der *E. coli* Klonen über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Hiermit wurde eine Hauptkultur von 300-500 ml angeimpft und so lange bei 37°C geschüttelt, bis eine Extinktion von ~ 0,6 bei 600 nm erreicht war. Dann wurde die Expression der Fusionsproteine in der Kultur durch Zugabe von Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (1 mM, IPTG, *Roth*) induziert. Die Zellen wurden für 10 min bei 2000 g und 4°C abzentrifugiert, in $\frac{1}{10}$ Kulturvolumen TBS-Puffer resuspendiert und erneut 15 min bei 500 g und 4°C pelletiert. Da im Folgenden RNA-Interaktionsstudien geplant waren, mußte die Aufreinigung unter nicht-denaturierenden Bedingungen stattfinden. Hierzu wurde das Bakterienpellet zunächst in 5 ml His-Lysepuffer resuspendiert, mit 5 mg Lysozym versetzt und für 30 min auf Eis gestellt. Der Aufschluß der Zellen erfolgte durch Ultraschallbehandlung (*Sonifier B-12*, *Branson Sonic Power Company*), wobei ein Eisbad die Erwärmung des Lysates verhinderte. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 20.000 g und 4°C abgetrennt. Zur Kopplung der Fusionsproteine wurde der Überstand mit 2 ml Ni-NTA Agarose (*Qiagen*) versetzt und für 30 min bei 4°C leicht schüttelnd inkubiert. Die Agarose wurde für 2 min bei 500 g sedimentiert und der Überstand abgenommen. Es folgten 5 Waschschrte His-Waschpuffer

und anschließend zwei Elutionen, bei denen die Agarose für 15 min bei 4°C in His-Elutionspuffer geschüttelt wurde.

His-Lysepuffer: 50 mM NaH₂PO₄, pH 8,0; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol; Proteaseinhibitoren

His-Waschpuffer: Lysepuffer mit 20 mM Imidazol

Elutionpuffer: Lysepuffer mit 250 mM Imidazol

2.4 Zellbiologische Arbeitstechniken

2.4.1 Kultivierung und Transfektion von HEK293-Zellen

Humane embryonale Nierenzellen HEK293 (ATCC) wurden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, *Gibco Life Technologies*) kultiviert, das mit 10 % fötalem Kälberserum supplementiert wurde. Die Zellen wurden in Kulturschalen (*Nunc, Sarstedt*) bei feuchter Atmosphäre mit 5 % CO₂ bei 37°C inkubiert. Zum Umsetzen und Aufteilen der Kulturen wurden diese mit Versene-Puffer gewaschen und durch kurze Inkubation mit 0,25 % Trypsin (*Invitrogen*) von der Oberfläche abgelöst. Zur weiteren Kultivierung wurde die Zellsuspension in einem Verhältnis von 1:5 – 1:10 mit frischem Medium verdünnt und auf neue Petrischalen verteilt. Die Transfektion der Zellen erfolgte durch Calciumphosphat-Präzipitation nach Sambrock et al. (1989). Für eine Zellkulturschale von einem Durchmesser von 10 cm wurden 10 µg Plasmid-DNA verwendet. Diese wurden zu 500 µl einer Calciumchloridlösung (250 mM) gegeben und anschließend, bei gleichzeitiger Einleitung von Luftblasen, mit 500 µl 2-fachem HBSP-Puffer vermischt. Während der folgenden 20 min bei RT bildeten sich DNA-enhaltende Calciumphosphat-Präzipitate, die tropfenweise auf die zu 50-80 % konfluent bewachsenen Kulturschalen verteilt wurden. Nach 6-8 h, die den Zellen für die effiziente Aufnahme des Präzipitates durch Phagocytose blieben, wurde die Kultur mit PBS-Puffer gewaschen und das Medium erneuert. Die Expression der transfizierten Konstrukte erfolgte versuchsabhängig für 24 – 48 h.

Versene-Puffer: 8,8 mM Na₂HPO₄; 0,7 mM KH₂PO₄, pH 7,4; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1 mM EDTA

PBS-Puffer: 8,8 mM Na₂HPO₄; 0,7 mM KH₂PO₄, pH 7,4; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl

2-fach HBSP-Puffer: 50 mM HEPES, pH 7,0; 280 mM NaCl; 10 mM KCl; 1,5 mM Na₂PO₄, 12 mM Glucose

2.4.2 Kultivierung und Transfektion von primären Hippocampus/Cortex -Neuronen

Die Kultivierung von primären Hippocampus- bzw. Cortex-Neuronen erfolgte nach der von Brewer et al. (1993) beschriebenen Methode. Für die Präparation wurden Rattenembryonen des Stammes *Wistar* in einem Alter von 18 – 20 Tagen (Befruchtungstag = 0) verwendet. Die trächtigen Muttertiere wurden von der Tierhaltung des Universitätskrankenhauses Eppendorf bereitgestellt. Die Präparation von Hippocampi oder Cortices der Embryonen wurde in HBSS-Puffer (*Invitrogen*) unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Nach der Entfernung

sämtlicher Meningenreste wurde das Hirngewebe für 20-30 min bei 37°C in HBSS-Puffer mit 0,25 % (w/v) Trypsin (15 ml bei Hippocampus-; 50 ml bei Cortexneuronen) unter leichtem Schütteln inkubiert. Zur Sedimentation der trypsinisierten Hippocampi wurde das Reaktionsgefäß für 5 min aufrecht gestellt, anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und durch frischen HBSS-Puffer ersetzt. Dieser Vorgang wurde 3 mal wiederholt, bis das Trypsin nahezu vollständig aus der Suspension entfernt war. Trypsiniertes cortikales Gewebe wurde hingegen durch Einsaugen in eine 10 ml Pipette aus dem Puffer entfernt; diese Prozedur wurde bis zu 5 mal wiederholt. In einem Volumen von 2 ml (Hippocampus) bzw. 6-8 ml (Cortex) HBSS-Puffer wurden die Zellen durch Trituration vereinzelt. Hierzu wurde das Gewebe wiederholt in einer feuerpolierten Pasteurpipette auf- und abgezogen. Dies wurde mit einer zweiten Pasteurpipette, deren Durchmesser auf ca. die Hälfte eingesmolzen war, wiederholt bis kein zusammenhängendes Gewebe mehr sichtbar war. Anschließend wurde die Zellsuspension mit Plattiermedium auf ein Volumen von 10 ml bzw. 50 ml aufgefüllt. Die Zellzahl in der Suspension wurde bestimmt und auf ~ 120.000 Zellen pro ml für Hippocampus-Neurone und ~ 250.000 – 300.000 Zellen pro ml für Cortex-Neurone durch Zugabe von Plattiermedium eingestellt. Von dieser Suspension wurde je 1 ml auf eine Kavität einer 12-Loch Schale (*Nunclon™ Δ Surface, Nunc GmbH*) ausplattiert. Für eine ausreichende Anheftung der nicht-adhärenenten Zellen wurden die Kavitäten zuvor für 1-2 h mit Poly-L-Lysin (1mg/ml in Boratpuffer; *Sigma*) beschichtet. Bei der Kultivierung von Hippocampus-Neuronen wurden die Kavitäten zuvor mit Deckgläsern (Ø 18 mm, *Marienfeld*) ausgelegt. 3 h später wurde das Plattiermedium gegen Neurobasalmedium mit 2 % (v/v) B-27 Supplement (*Invitrogen*), 0,5 mM L-Glutamin (*Sigma*) und 25 µM Glutamat (*Sigma*) ausgetauscht. 3 Tage nach der Präparation wurde die Hälfte des Medienvolumens erneuert, wobei kein Glutamat mehr hinzugegeben wurde. Zusätzlich wurde der Kultur nun 5 µM Cytosin-β-D-Arabinofuranosid (*AraC, Sigma*) hinzugefügt um das Wachstum nicht-neuronaler Zellen zu inhibieren. Auf die Verwendung von Antibiotika wie Penicillin zur Prävention bakterieller Kontaminationen wurde meist verzichtet. Durch Wirkung auf GABA_A-Rezeptoren bewirkt Penicillin eine erhöhte neuronale Aktivität innerhalb der Kultur und könnte so insbesondere die Ergebnisse der Luziferase-Experimente verfälschen (Twyman et. al 1992, Tyler und Pozzo-Miller, 2003). Die Kultivierung der Zellen erfolgte in feuchter Atmosphäre mit 5 % CO₂ bei 37°C. Die Transfektion der primären Neurone erfolgte nach 7 Tagen in Kultur mittels Calciumphosphat-Präzipitation (Sambrock et al, 1989). Zur Transfektion wurden pro Kavität 5 µg endotoxinfreie Plasmid-DNA in 50 µl einer Calciumlösung (250 mM) verdünnt. Unter der Einleitung von Luftblasen wurden 50 µl

2-facher BBS-Puffer hinzugemischt und das Präzipitat nach 20 min tropfenweise auf die Neuronen verteilt. Nach 3 h wurden die Zellen 4 mal mit HBSS-Puffer gewaschen und mit frischem Neurobasalmedium (ohne Glutamat und AraC) versorgt. Die Analyse erfolgte 24h (Luziferasen) bis 7 Tage (Immuncytochemie) nach der Transfektion.

HBSS (*Hanks buffered salt solution*): 10-fach HBSS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} (*Invitrogen*); 10 mM HEPES pH 7,3

2-fach BBS-Puffer: 50 mM BES, pH 6,90-6,96; 280 mM NaCl; 1,5 mM Na_2HPO_4

RIPA-Puffer: 50 mM, Tris/HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 % (v/v) NP-40, 0,5 % (w/v), Natriumdesoxycholat
0,1 % SDS, Proteaseinhibitoren

Plattiermedium: DMEM; 20 % (w/v) Glucose; 10 % (v/v) Pferdeserum

2.4.3 Immuncytochemie primärer Hippocampus-Neurone

Zur Fixierung wurden die kultivierten Hippocampus-Neurone für 15 min mit 4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS inkubiert, anschließend 3 mal mit PBS gewaschen und durch Behandlung mit 0,5 % (v/v) Triton X-100 in PBS für 5 min permeabilisiert. Nach 3 weiteren Waschschritten in PBS wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit 2 % Pferdeserum (*Invitrogen*) in PBS für 2h bei RT blockiert. Primäre und sekundäre Antikörper wurden ebenfalls in 2 % Pferdeserum in PBS für 2 h bei RT bzw. über Nacht bei 4°C mit den Zellen inkubiert. Die Deckgläser wurden anschließend auf einem Objektträger in Glyceringelatine (*Sigma*) eingebettet. Für den Nachweis und die Dokumentation der Fluoreszenzsignale wurde ein Aristoplan-Fluoreszenzmikroskop (*Leitz*) in Kombination mit einer CCD Digital Kamera (C4742-95-12NRB; *Hamamatsu*) verwendet. Als Filter dienten ein N2.1-Filter (Anregung: 515-560 nm, Emission: 580 nm, *Leica*) sowie ein L5-Filter (Anregung 480 nm, Emission 505 nm, *Leica*) und als bildverarbeitende Programme *Openlab 2.2.5*. (*Improvision*), *ImageJ 1.34N* (*NCBI*) sowie *Adobe Photoshop 6.0* (*Adobe Systems Incorporated*).

2.5 Statistische Analysen

Alle Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Zur statistischen Analyse wurde unabhängige *students-t*-Tests durchgeführt, wobei ein Wahrscheinlichkeitswert von $p < 0,05$ als signifikant betrachtet wurde. Zur Auswertung wurde das Programm *Origin 5.0* (*Microcal Software Incorporated*) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der shank1-3'UTR

3.1.1 Identifizierung der shank1-3'UTR von *Rattus norvegicus*

Während die vollständige 3'UTR der humanen shank1-mRNA von 633 nt mit Polyadenylierungssignal (AATAAA; 627-632 nt) und Poly-A-Schwanz bereits bekannt war (Zitzer et al., 1999; *NCBI* Nr. AY 461451), war die shank1-3'UTR von *Rattus norvegicus* bei Beginn dieser Arbeit mit 596 nt nur unvollständig und ohne ein Polyadenylierungssignal annotiert (*NCBI* Nr. NM 031751). Daher wurde zunächst versucht die gesamte 3'UTR der Ratte zu identifizieren. Die Amplifikation der Sequenz durch die 3'RACE-Methode (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) mit oligo-dT-Nucleotiden als Startpunkt für eine PCR, erwies sich als nicht durchführbar. Nach Ableitung von spezifischen Oligonucleotiden aus vorläufigen Datenbankeinträgen der genomischen Sequenz von *R. norvegicus* konnten mittels PCR, mit cDNA aus Rattenhirn als Matrize, weitere Teile der 3'UTR amplifiziert werden. Mit der Unterstützung von kommerziell erhältlichen *Expressed Sequence Tags* (ESTs, *Invitrogen*) konnte so eine 3'UTR mit einer Länge von 2350 nt identifiziert werden (*NCBI* Nr. AY461452). Ein Polyadenylierungssignal befindet sich kurz vor Ende der identifizierten Sequenz bei 2313-2318 nt. Zwischen den Nucleotiden in Position 2248 -2260 befinden sich zwei zusätzliche, direkt aufeinander folgende Polyadenylierungssignale.

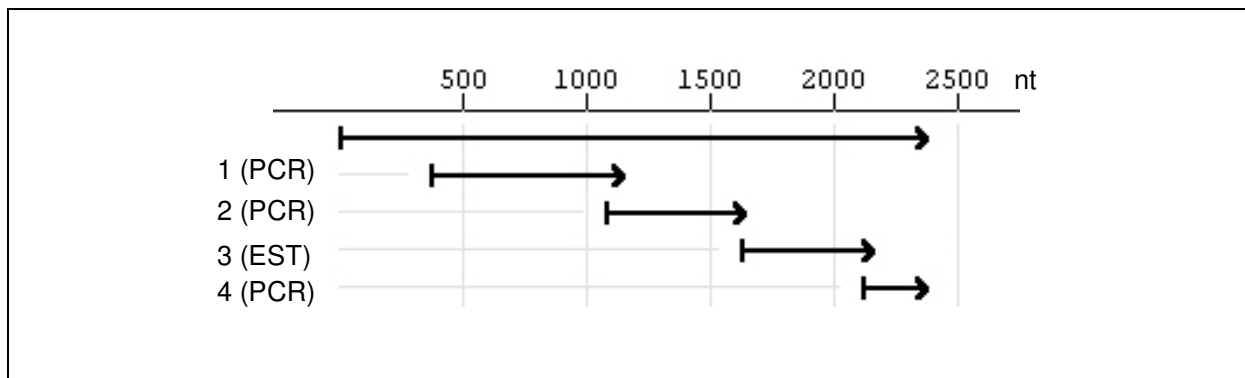


Abbildung 3.1 Identifizierung der shank1-mRNA 3'UTR (2350 nt): Position der neu klonierten Fragmente **1** (369-1134) PCR aus cDNA mit den Oligonucleotiden 3'UTR A1 und 3'UTR trace 670 revers **2** (1076-1626) PCR mit 3'UTR Lücke forward und 3'UTR Lücke revers **3** (1610- 2136) EST BF 416156 (*Invitrogen*) **4** (2103-2350) PCR mit 3'UTR EF2 und 3'UTR Poly-A revers.

Trotz der drei Polyadenylierungssignale ist unklar, ob es sich hierbei um die vollständige Sequenz der shank1-3'UTR handelt. In der *NCBI*-Gendatenbank sind drei EST-Sequenzen aufgeführt, die in 5'-Richtung mit dem Ende der identifizierten shank1-3'UTR Sequenz und in 3'-Richtung mit einem hypothetischen Gen überlappen (hypothetical LOC 292874, *NCBI* Nr. XM 238106.1). Für dieses Gen ist ein putatives offenes Leserasters annotiert, dessen codierende Sequenz in Gegenrichtung zu der von shank1 liegt (Abb. 3.1. A). Dies war von Interesse, da in den letzten Jahren ~ 2500 native *antisense*-Transkripte bei Säugetieren entdeckt wurden, die in viele Aspekte der Genexpression (u.a. Translation) involviert (Lavorgna et al., 2004). Daher wurde untersucht, ob es sich bei dem hypothetischen Gen um ein *antisense*-Transkript der shank1-mRNA handelt, bzw. diese Sequenz Teil der 3'UTR ist. Durch spezifische reverse Oligonucleotide, die in 3'Richtung von den identifizierten 2350 nt hybridisieren, konnten keine weiteren cDNA Fragmente amplifiziert werden. Es wurde daher eine *Northern Blot* Analysen mit mRNA aus dem Gehirn von *R. norvegicus* durchgeführt, bei denen ein EST-Klon (BE 100436), der eine Teilsequenz des hypothetischen Gens enthielt, zur Herstellung einer mit ^{32}P -dATP radioaktiv markierten DNA-Sonde eingesetzt wurde. Die doppelsträngige Sonde sollte in der Lage sein, mit mRNA-Transkripten beider Orientierungen zu hybridisieren; es konnte hierbei jedoch nur ein einzelnes Signal in der Größe von ~ 1800 nt detektiert werden (Abb. 3.2.B). Es ist anzunehmen, daß es sich hierbei um die mRNA des hypothetischen Gens handelt, dessen 5'Ende der Sequenz nicht vollständig in der *NCBI*-Datenbank annotiert ist. Somit konnte zwar gezeigt werden, daß das hypothetische Genprodukt LOC 292874 im Gehirn exprimiert wird, die Abwesenheit eines Signals im Bereich von 9.000 - 10.000 nt, in dem bekanntermaßen die shank1-mRNA detektiert wird (Zitzer et al., 1999) legt jedoch nahe, daß die eingesetzte Sonde kein Teil der 3'UTR von shank1 ist.

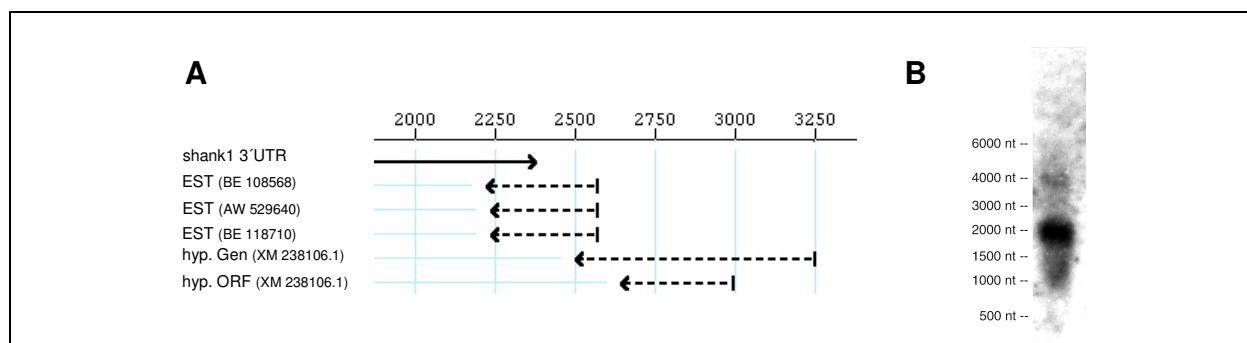


Abbildung 3.2 **A**) Möglicherweise ist die shank1-3'UTR mit den klonierten 2350 nt noch nicht vollständig identifiziert, wie durch überlappende ESTs angedeutet wird **B**) Um das hypothetische Gen LOC 292874 als potentiell *antisense*-Transkript zu identifizieren wurde ein *North-Western Blot* mit mRNA aus Gehirn und dem EST 100436 als Sonde durchgeführt.

3.1.2 Vergleich der shank1-3'UTR zwischen verschiedenen Spezies

Ein Vergleich der humanen 3'UTR mit den identifizierten 2350 nt der 3'UTR von *R. norvegicus* zeigte eine starke Übereinstimmung in den ersten ~ 200 nt (192 nt beim Menschen; 207 nt bei *R. norvegicus*) von 75 % und eine Übereinstimmung von 78 % in den letzten 488 nt vor dem 3'Ende der Rattensequenz; die Region von 207 -1881 nt der 3'UTR von *R. norvegicus* ist in der humanen cDNA nicht vorhanden. Die cDNA Sequenz ist kontinuierlich mit der genomischen Sequenz und wird somit von einem einzelnen Exon codiert. Die humane 3'UTR entsteht im Gegensatz hierzu durch das Herausspleißen eines Introns von 1738 nt. Für andere Spezies liegen keine cDNA Sequenzen vor, bei Datenbankanalyse der genomischen Sequenzen konnten jedoch die gesamten 2350 nt der identifizierten shank1-3'UTR mit einer Übereinstimmung von 91 % auf Chromosom 7 von *Mus musculus* lokalisiert werden. Auch *Bos taurus* scheint mit den ersten 227 nt der shank1-3'UTR bei einer Übereinstimmung von 78 % über ein möglicherweise funktionales DTE zu verfügen. Im Genom von *Canis lupus* ist der Bereich von 1578–2233 nt mit einer Identität von 80 % auf Chromosom 1 lokalisiert. Die benachbarte Lage eines shank-Orthologs in 5'Richtung ging jeweils aus Datenbankeinträgen hervor (NCBI). Es ist zu erwarten, daß die tatsächlichen Homologieverhältnisse der shank-Gene mit zunehmender Vollständigkeit der Datenbankeinträge, insbesondere von cDNA-Sequenzen, detaillierter nachvollzogen werden können.

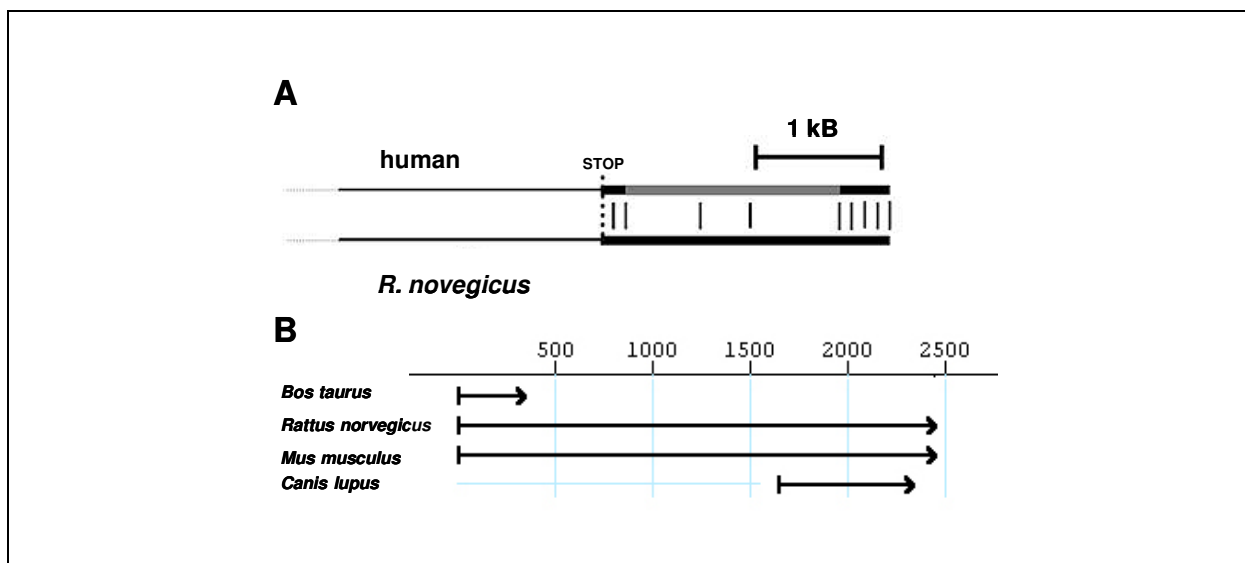


Abbildung 3.3 A) schematischer Vergleich der shank1-3'UTR von *R. norvegicus* mit der humanen 3'UTR. Die codierenden Regionen sind als schmale Linien, die 3'UTRs als breite schwarze Linien dargestellt; die breite graue Linie zeigt die Lage des großen Introns in der humanen 3'UTR. Die vertikalen Linien weisen auf Positionen mit hoher Übereinstimmung zwischen humanen und *R. norvegicus* Sequenzen hin. B) Alignment der shank1-3'UTR von *R. norvegicus* mit bekannten genomischen Sequenzen anderer Spezies.

3.2 Identifizierung *trans*-agierender Faktoren des shank1-DTE

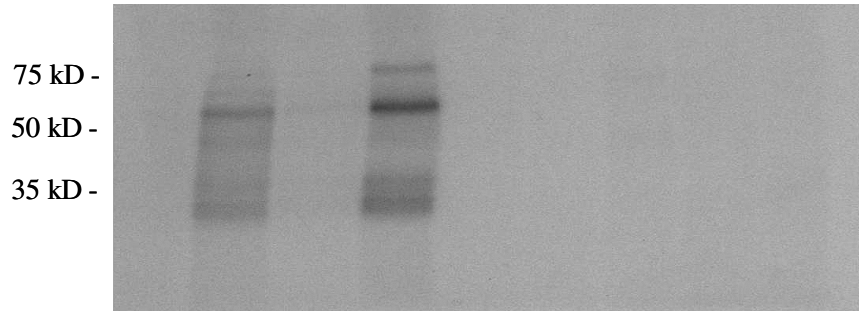
Kurz vor Beginn dieser Arbeit konnte das dendritische *targeting element* der shank1-RNA in den ersten ~ 200 Nucleotiden der 3'UTR identifiziert werden. Bei der Verwendung längerer 3'UTR Fragmente (den ersten 350 nt bzw. 588 nt) war die Transporteffizienz zusätzlich leicht verstärkt (Segger-Junius, 2003; Böckers et al., 2004). Daraus ergab sich als wichtige Frage ob bzw. welche *trans*-agierenden Faktoren spezifisch mit diesen RNA-Sequenzen interagieren und somit einen Transport in den distalen Bereich von Dendriten vermitteln können. Zunächst sollte daher eine spezifische Bindung von Proteinen an den vorderen Teil der 3'UTR gezeigt werden, diese anschließend biochemisch isoliert und durch massenspektroskopischen Analyse identifiziert werden.

3.2.1 Nachweis von shank1-DTE bindenden Proteinen

Zum Nachweis einer direkten Interaktion des shank1-DTE mit *trans*-agierenden Faktoren wurden *UV-Crosslink* Analysen durchgeführt. Hierzu wurde in einer *in vitro* Transkription mit ^{32}P -UTP radioaktiv markierte RNA hergestellt und mit einem Proteinrohlysate aus Rattenhirn inkubiert. Entstandene RNA-Protein Komplexe wurden mittels UV-Bestrahlung durch kovalente Bindungen vernetzt, womit der dort gebundene Teil der Sonde vor einem folgenden Verdau durch RNase A geschützt war. Nach einer SDS-Gelelektrophorese wurden diese Komplexe als distinkte Banden in einer Autoradiographie nachgewiesen. Die Höhe der Banden in der SDS-Gelelektrophorese aufgrund der assoziierten RNA um einige kD vergrößert. (Das durchschnittliche Molekulargewicht eines RNA-Nucleotides ist mit 330 g/mol ca. dreimal größer als das von Aminosäuren.). Für diese Experimente wurden die ersten 350 nt der shank1-3'UTR eingesetzt, da mit diesen die höchste Transporteffizienz von knapp 60 % erzielt werden konnte (Böckers et al., 2004).

Um die Interaktion der shank1-RNA mit *trans*-agierenden Faktoren *in vitro* nachvollziehen zu können, war zunächst die Bestimmung geeigneter Puffereigenschaften notwendig, da die Bindung stark von Salzkonzentrationen und pH-Wert beeinflusst wird. Bei *UV-Crosslink* Analysen unter verschiedenen Konditionen zeigte sich, daß schon mittlere Salzgehalte diese Interaktionen erheblich stören können. Eine Kaliumchlorid (KCl)-Konzentration von 200 mM führte zu einer deutlichen Signalabschwächung und bereits bei einer Magnesiumchlorid-Konzentration von 15 mM war die Bindung fast vollständig reprimiert. Als Kompetitor zum Ausschluß von Interaktionen der Sonde mit unspezifisch bindenden Proteinen wurde sowohl

Heparin als auch Hefe-tRNA getestet. Bei der Verwendung von tRNA war bei einer Konzentration von 0,5 mg/ml kein Signal mehr erkennbar (Abb. 3.4). Als optimaler RNA-Bindungspuffer wurde daher 10 mM HEPES (pH 7,6) 1 mM DTT, 5 % Glycerin und 5 µg/µl Heparin verwendet.



MgCl₂ (mM)	15	0	15	0	15	15	0	15	0
KCl (mM)	200	200	0	0	200	200	0	200	0
Heparin (0,5µg/µl)	+	+	+	+	+	-	-	+	+
tRNA (0,5µg/µl)	-	-	-	-	+	+	+	+	+
pH	7,6	7,6	7,6	7,6	7,4	7,6	7,6	7,6	7,6

Abbildung 3.4 *UV-Crosslink* Analysen mit den ersten 350 nt der shank1-3'UTR und Proteinrohlysat aus Rattengehirn mit verschiedenen Pufferkonditionen.

Durch *UV-Crosslink* Analysen unter optimalen Pufferkonditionen wurde die direkte Bindung von mehreren Proteinen in der Größenordnung von ~ 35-70 kD an das shank1-DTE nachgewiesen. Ein deutliches Signal wurde bei > 75 kD detektiert, drei schwächere Banden befanden sich bei 40, 60 und 70 kD. Im Bereich von 50-55 kD war ein starkes, eher diffuses Signal zu erkennen. Hierbei handelte es sich wahrscheinlich um mehrere Komplexe dieser Größe, deren Signale sich überlagerten (Abb. 3.5). Daher ist davon auszugehen, daß mindestens fünf RNA-bindende Proteine direkt mit dem shank1-DTE interagieren, die somit als *trans*-agierende Faktoren des dendritischen Transportes der shank1 RNA in Frage kommen.

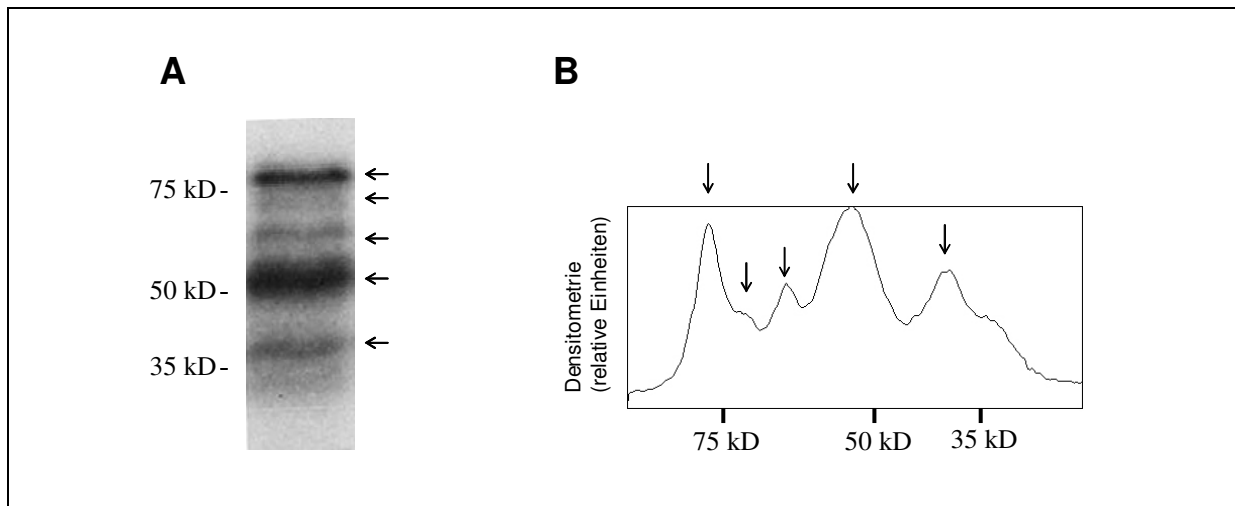


Abbildung 3.5 A) *UV-Crosslink* Analysen mit den ersten 350 nt der shank1-3'UTR und Proteinrohlysat aus Rattenhirn unter optimalen Pufferkonditionen B) Densitometrische Auswertung von A) (ImageJ 1.34N).

Um nachzuweisen, daß es sich bei den beobachteten Interaktionen um die spezifische Bindung von Proteinen an das shank1-DTE handelt wurden Kompetitionen mit nicht-radioaktiv markierter RNA durchgeführt. Kommt es zu einer Bindung der fraglichen Proteine an die kompetierende RNA, so ist eine Verdrängung der Sonde und damit einhergehend eine Reduktion der Signalstärke zu erwarten. So wurde mit einem steigenden Überschuß (10-, 20-, 50-fach) der ersten 350 nt der shank1-3'UTR eine graduelle Reduktion der Intensität aller *UV-Crosslink* Banden erzielt. Im Folgenden wurde untersucht ob die Bindung der Proteine an die shank1-DTE Sonde ebenfalls durch Konkurrenz mit dem 640 nt langem DTE der MAP2-mRNA beeinträchtigt wird. Auffallend ist hierbei die vollständige Unterdrückung des Signals bei >75 kD bereits bei 10-fachem Überschuß. Des weiteren kam es zu einer graduellen Abnahme der Intensität der Bande bei ~ 70 kD. Die Komplexe bei 40-, 50- und 60 kD waren auch bei 50-facher Konkurrenz nicht beeinträchtigt. Eine spezifische Bindung dieser Proteine an das shank1-DTE konnte somit belegt werden (Abb. 3.6 A). Zum weiteren Nachweis für eine spezifische Interaktion *trans*-agierender Faktoren mit dem shank1-DTE wurden EMSA Analysen mit den ersten 126 nt der 3'UTR und Rohlysat aus Rattengehirn durchgeführt. Die Laufgeschwindigkeit von RNA-Protein Komplexen ist in einem nicht-denaturierendem Gel gegenüber freier RNA vermindert, wodurch diese als „verschobene Komplexe“ (*shifted complex*) in einer Autoradiographie sichtbar werden. Die RNA wurde hierzu wieder mit ^{32}P -UTP radioaktiv markiert. Die Konkurrenz mit nicht radioaktivem shank1-DTE (126 nt) bewirkte eine Reduktion der Intensität und *shift*-Höhe des Komplexes. Bei 500-facher Überkonkurrenz lag nur noch ein sehr geringer Anteil der Sonde in Assoziation mit Proteinen vor. Um die Spezifität der Bindung an das shank1 DTE nachzuweisen wurde der letzte Teil

der identifizierten 3'UTR von 2103 - 2350 nt zur Kompetition verwendet. Hier wurde auch bei 500-facher Überkompetition kein Einfluß auf Intensität oder Höhe des Komplexes festgestellt (Abb. 3.6 B). Die spezifische Interaktion von *trans*-agierenden Proteinen mit dem shank1-DTE konnte somit bewiesen werden.

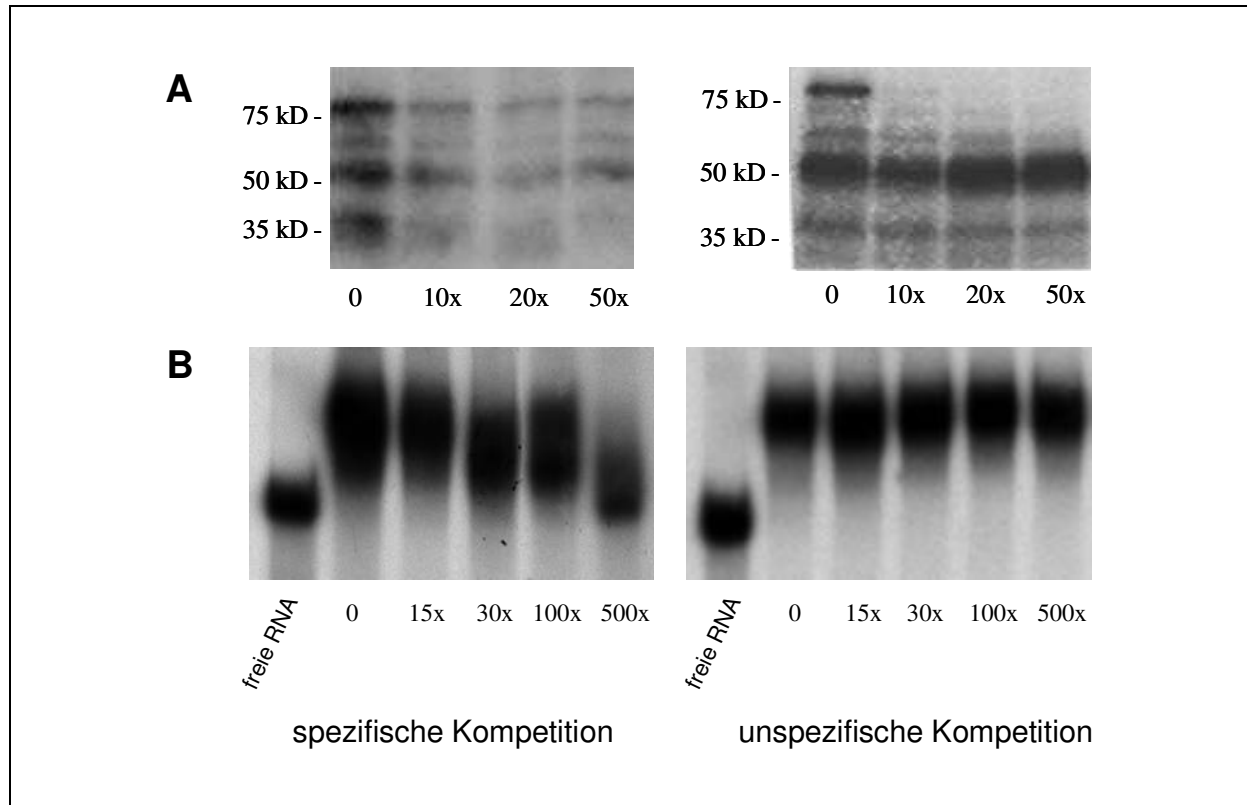


Abbildung 3.6 A) kompetitive UV-Crosslink Analysen mit den ersten 350 nt der shank1-3'UTR und Proteinrohlysat aus Rattenhirn; zur unspezifischen Kompetition wurden die 640 nt des MAP2-DTEs eingesetzt. B) kompetitive EMSA Analysen mit den ersten 126 nt der shank1-3'UTR; zur unspezifischen Kompetition wurden die letzten 247 nt der identifizierten 3'UTR eingesetzt.

3.2.2 Aufreinigung und Identifizierung *trans*-agierenden Faktoren

3.2.2.1 Anreicherung RNA-bindender Proteine durch Chromatographie

Nachdem die spezifische Bindung mehrerer Proteine an das shank1-DTE nachgewiesen werden konnte, wurden diese biochemisch isoliert und identifiziert. Um als finalen Aufreinigungsschritt eine Affinitätschromatographie mit dem shank1-DTE durchführen zu können, war eine vorhergehende Anreicherung der RNA-bindenden Proteine aus dem Rohlysat notwendig. Herkömmliche Methoden der Anionenaustauschchromatographie mittels Phospho- oder DEAE-Cellulose, die hier für einen initialen Reinigungsschritt in Frage kämen, zeigen keine außerordentlich hohe Spezifität für RNA/DNA-bindende Proteine (Ehrlich et al., 1993; Zhuang et al., 1992). Durch Verwendung des sulfalthaltigen Glucosaminoglycans Heparin als Chromatographie-Ligand kann diese erheblich gesteigert werden, da hier durch

Struktur und Verteilung der negativ geladenen Reste die generellen Bindungseigenschaften von RNA/DNA nachgeahmt werden und somit eine eingeschränkte Ligandenspezifität gegeben ist (Amersham Biosciences, Technical Note # 18-1118-32). Nachdem eine 5 ml Heparinsäule mit 10 mg Proteinrohlysat beladen wurde, wurden die matrixgebundenen Proteine mittels eines linearen NaCl-Gradienten (0,1 – 1,5 M) eluiert und in 1ml-Fractionen gesammelt. Nach Coomassie-Färbung zeigte sich, daß so eine gleichmäßige Verteilung der Proteine über elf Fractionen erreicht wurde (Abb. 3.7 A). Zum Nachweis der shank1-DTE Bindungsaktivität wurden nach Entfernung des Salzes über *HiTrap*[®]-*Desalting* Säulen *UV-Crosslink* Analysen mit den Eluat-Fractionen durchgeführt. Die Bindung von *trans*-agierenden Faktoren war auf die Fraction beschränkt, die bei einer Konzentration von 400 mM NaCl eluiert wurde; im Vergleich zum Rohlysat waren die Signale dort um ein Vielfaches verstärkt (Abb. 3.7 B). Eine effektive Voraufreinigung der RNA-bindenden Proteine durch Heparin-Sepharose wurde somit erreicht und die positive Fraction als Ausgangsmaterial für eine Affinitätschromatographie mit dem shank1-DTE eingesetzt. Auch nach Wiederholung der relativ aufwendigen Prozedur konnten hieraus jedoch keine Proteine isoliert werden, die für eine massenspektroskopische Analyse verwertbar waren; darüber hinaus stand jeweils nur ein geringes Probenvolumen zur Verfügung. Daher wurde eine Methode gesucht, die eine schnelle, unkomplizierte und gut reproduzierbare Anreicherung der *trans*-agierenden Faktoren in einem größeren Stil ermöglicht.

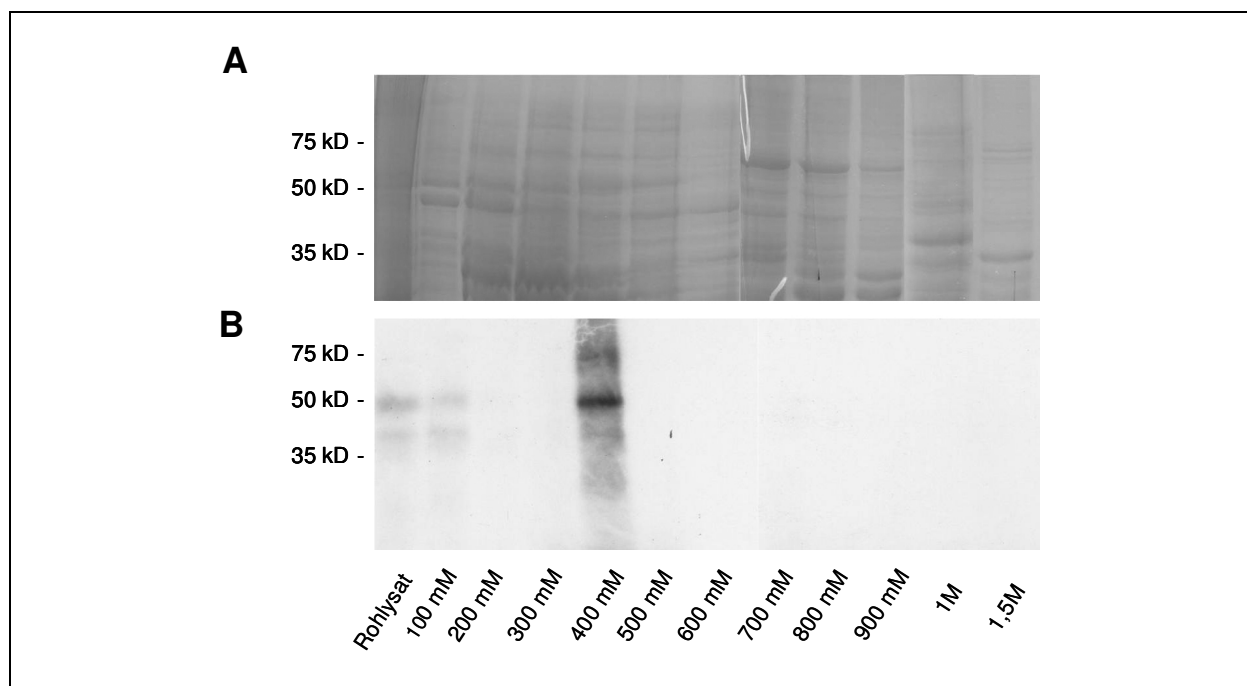


Abbildung 3.7 A) Proteinrohlysat wurde durch Chromatographie mit einer Heparinsäule fraktioniert; je 20 µl wurden in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Coomassie-Lösung gefärbt B). *UV-Crosslink* Analysen mit den Fractionen nach Entsalzung

3.2.2.2 Anreicherung der *trans*-agierenden Faktoren durch *Ribosomal Salt Wash*

Eine hervorragende Möglichkeit zur Anreicherung der shank1-DTE bindenden Proteine wurde mit der von Brewer und Ross (1990) entwickelten Methode des *Ribosomal Salt Wash* (RSW) gefunden. Mittels Ultrazentrifugation wurden zellfreie Extrakte hergestellt die Polysomen enthielten. In einem weiteren Schritt konnten die resuspendierten Polysomen durch Inkubation in einer Hochsalzlösung von assoziierten Proteinen getrennt werden. Wurden die Polysomen in einem zweiten Ultrazentrifugationsschritt wieder sedimentiert, verblieben diese Proteine im Überstand, in welchem sie, im Vergleich zum Rohlysate, stark aufkonzentriert waren (Abb. 3.8 und 3.9). Da dendritischer RNA-Transport in mRNPs stattfindet, ist zu vermuten, daß zumindest einige der *trans*-agierenden Proteine in diesen Strukturen zu finden sind. Von besonderem Interesse war daher die Beobachtung von Krichevsky und Kosik (2001), daß diese schweren RNA-Partikel nach Ultrazentrifugation noch unterhalb der Polysomen zu liegen kommen. Bei der Präparation des RSW als Ausgangsmaterial für die Isolierung *trans*-agierender Faktoren des shank1-DTEs konnten diese als relativ kleines, schwarzes Pellet am Boden des Zentrifugenbehälters unter einer 1-2 cm dicken, hellbraunen Polysomensicht beobachtet werden. Es ist anzunehmen, daß auch diese Strukturen während der Hochsalzbehandlung aufgelöst werden und deren Proteinbestandteile ebenfalls im RSW zu finden sind.

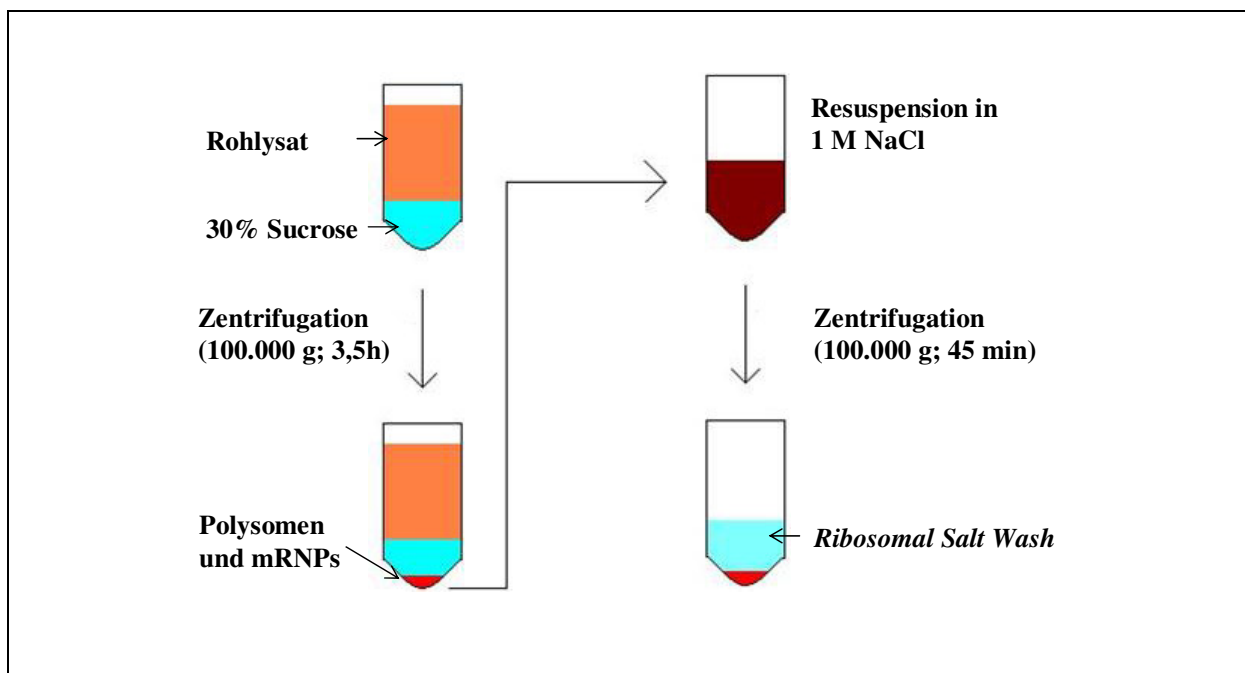


Abbildung 3.8 schematische Darstellung der *Ribosomal Salt Wash* Prozedur (Brewer und Wilson, 1990)

Um die Anreicherung der shank1-DTE-bindenden Proteine im RSW nachzuweisen wurden *UV-Crosslink* Analysen mit identischen Mengen Rohlysate und RSW (5 µg Protein) vor und nach der Entsalzung durchgeführt. Eine deutliche Zunahme der Signalstärke wurde bereits mit dem noch salzhaltigem RSW beobachtet, die durch Entfernung des NaCl noch weiter intensiviert werden konnte (Abb. 3.9 A, B). Durch *Western Blot* Analysen war es weiterhin möglich eine starke Anreicherung von Staußen1 im RSW aufzuzeigen (Abb. 3.9 C). Dieses Protein ist Bestandteil neuronaler mRNPs (Köhrmann, 1999) dessen funktionale Beteiligung am dendritischen Transport der shank1-mRNA durch Transfektion dominant-negativer Konstrukte belegt werden konnte (Segger-Junius, 2003). Das Poly-A-Bindungsprotein PABP1 ist mit translatierenden Polyribosomen assoziiert (Hensold et al., 1996) und ebenfalls in mRNP-Partikeln vorhanden (Wang et al., 2001; Mohr et al., 2004). Da dieses Protein sehr abundant ist (Görlach et al., 1994), konnte mit der Methode des RSW nur eine geringe Anreicherung erzielt werden (Abb. 3.9 D). Als negative Kontrolle wurde ein *Western Blot* mit einem Antikörper gegen Neurochondrin durchgeführt. Dieses Protein wird spezifisch in Knochen und neuralem Gewebe exprimiert und interagiert mit dem C-Terminus des Rezeptors für das Melanin-konzentrierende Hormon (MCH, Francke et al., 2005). Während Neurochondrin im Rohlysate deutlich nachweisbar war, wurde im RSW nur ein sehr stark abgeschwächtes Signal sichtbar. Interessanterweise war ein Protein von ~ 90 kD, das von diesem Antikörper unspezifisch gebunden wurde stark im RSW angereichert (Abb. 3.9 E). Es konnte somit gezeigt werden, daß in dem RSW RNA-bindende Proteine spezifisch angereichert sind; unter diesen offenbar auch solche, die mit dem dendritischen Transport von RNA in einem funktionalen Zusammenhang stehen. Da die oben aufgeführten Ansprüche an einen geeigneten initialen Aufreinigungsschritt somit erfüllt waren, wurde weiterhin mit RSW als Ausgangsmaterial der Affinitätschromatographie gearbeitet.

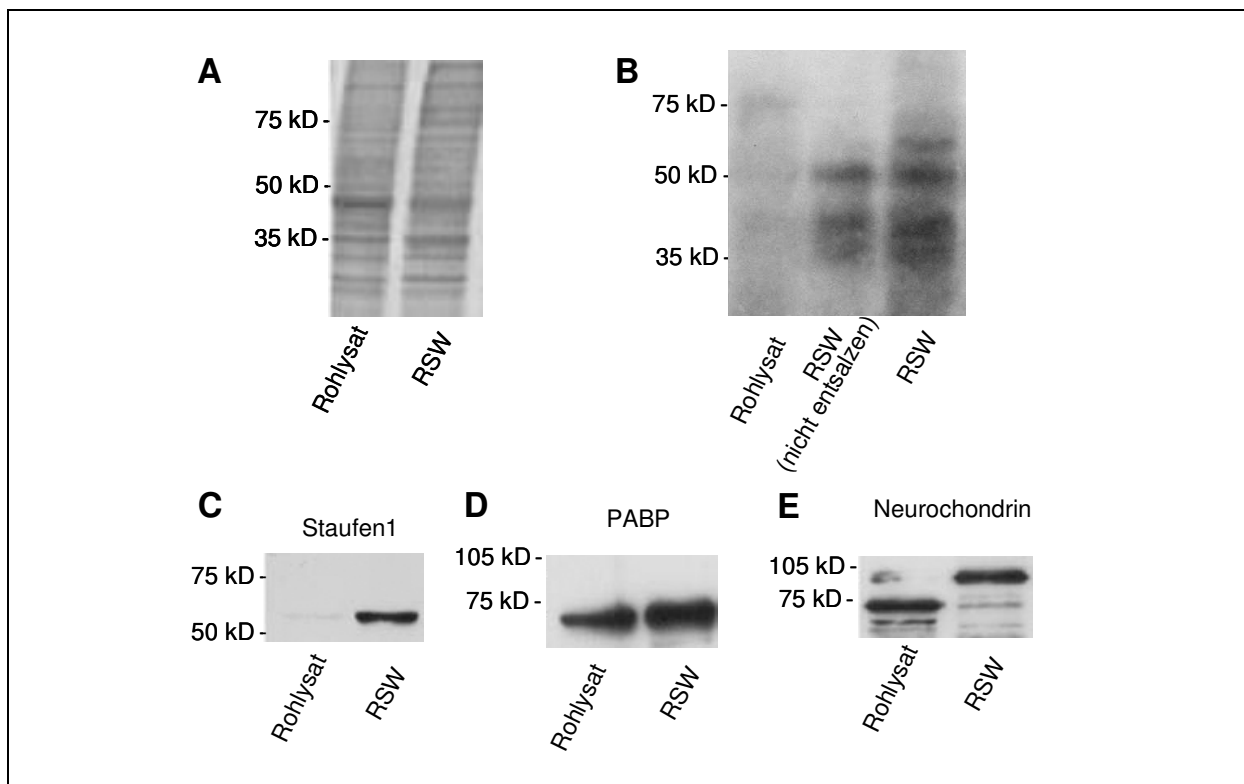


Abbildung 3.9 A) je 5 µg Proteinrohlysate oder RSW wurden in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Coomassie-Lösung gefärbt B) UV-Crosslink Analysen mit je 5 µg Proteinrohlysate oder RSW (vor bzw. nach der Entsalzung) C-E) Western Blot Analysen von je 5 µg Proteinrohlysate und RSW mit spezifischen Antikörpern gegen Staufen1, PABP1 und Neurochondrin.

3.2.2.3 Affinitätschromatographie mit Biotin-16-UTP RNA

Zur Isolierung der *trans*-agierenden Faktoren aus dem RSW diente eine Affinitätschromatographie mit dem shank1-DTE als Ligand, wofür die RNA zunächst an einer Matrix immobilisiert werden mußte. Hierfür wurde die starke Interaktion zwischen dem Protein Streptavidin und dem Vitamin Biotin ausgenutzt. Bei der *in vitro* Transkription von RNA wurde anstatt UTP in mehreren Positionen Biotin-16-UTP eingebaut, wodurch es möglich war die RNA an Streptavidin-ummantelte magnetische Partikel zu koppeln (Nielsen et al., 1999; Rehbein et al., 2002; Mohr et al., 2001). Die so präparierte Matrix wurde zur Aufreinigung der *trans*-agierenden Proteine aus dem RSW verwendet. Trotz Prä-inkubation des RSW mit RNA-freien Partikeln und der Verwendung von 5 mg/ml Heparin während der Bindungsreaktion wurden hier offensichtlich zum größten Teil unspezifisch bindende Proteine isoliert. Bei einem Vergleich der Bandenmuster zeigte sich, daß insbesondere abundante Proteine des Ausgangsmaterials mit der Matrix assoziiert waren. Bei der Bande von ~25 kD in der SDS-Elution handelt es sich um ein Dimer von Streptavidin (Tetramer mit 4x 13 kD). Die einzige Ausnahme stellte eine Bande von ~72 kD dar. Bei der Elution durch Salz konnten

nur geringe Mengen dieses Proteins von der Matrix abgelöst werden, während bei der SDS-Elution eine deutliche Bande zu erkennen war (Abb.3.10 A). Um dies Protein weiter zu untersuchen wurde, nach Entfernung des Salzes über *HiTrap*[®]-*Desalting* Säulen, eine *UV-Crosslink* Analyse mit der NaCl-Elution und den ersten 350 nt der shank 3'UTR durchgeführt. Hierbei konnte ein Protein-RNA Komplex von >75kD detektiert werden, der unter Berücksichtigung des Laufunterschiedes dem 72 kD Protein zugeordnet werden kann (Abb. 3.10 B). Ein Komplex dieser Größe wurde bereits in den *UV-Crosslink* Analysen mit Rohlysate nachgewiesen. Aufgrund der unspezifischen Bindungen gingen aus diesen Versuchsansätzen keine Proben hervor, die für massenspektroskopische Analysen verwendet wurden, allerdings konnte im weiteren Verlauf der Arbeit gezeigt werden, dass es sich bei dem Protein von 72 kD wahrscheinlich um das Poly-(A)-bindende Protein 1 (PABP1) handelt (Abb. 3.18 A). Der starke Hintergrund bei dieser Methode stellte ein Hindernis für die Isolierung weiterer *trans*-agierender Faktoren dar. Ein weiterer Nachteil der Methode liegt in dem zufälligen Einbau von Biotin in den RNA-Strang, wodurch die, für eine effiziente Bindung notwendige, Ausbildung einer nativen Sekundärstruktur sterisch behindert werden kann. Es wurde daher eine Methode gesucht, welche die Immobilisierung der RNA ohne Beeinträchtigung der Sekundärstruktur sowie spezifischere Elutionsvarianten ermöglicht.

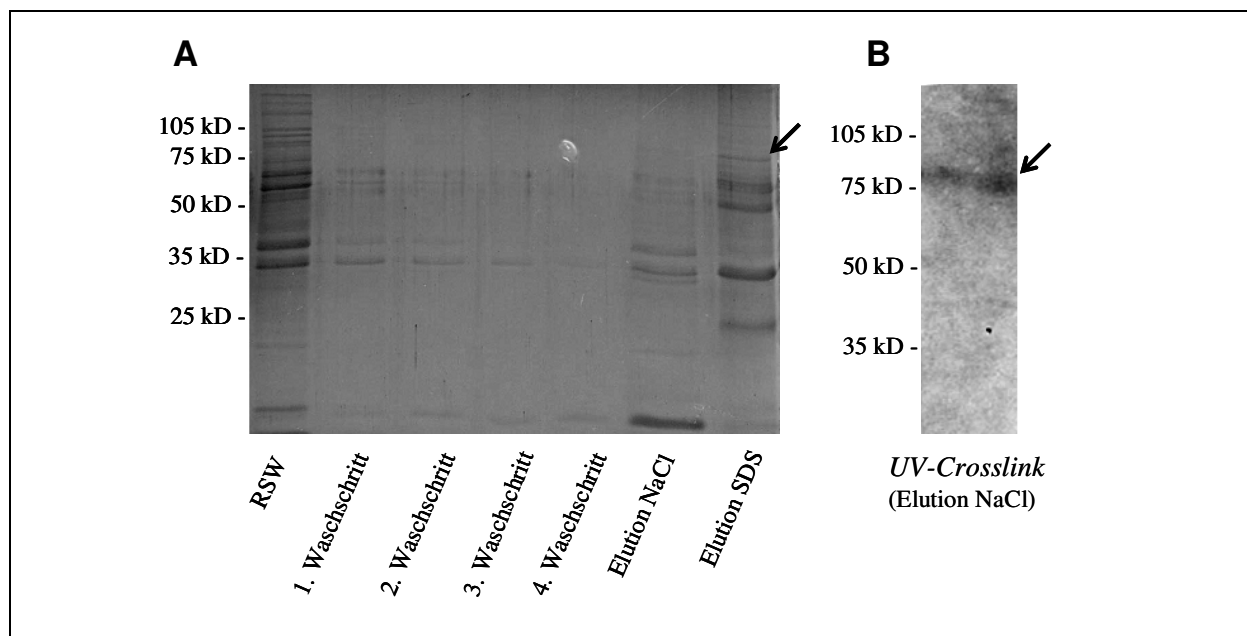


Abbildung 3.10 Affinitätschromatographie mit den ersten 350 nt der shank1-3'UTR und RSW A) SDS-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung von je 50 µl des Ausgangsmaterials, der Waschschritte und der NaCl- und SDS-Eluate. Der Pfeil deutet auf ein spezifisch isoliertes Protein von 72 kD. B) *UV-Crosslink* Analyse mit dem NaCl-Eluat nach Entfernung des Salzes. Der Pfeil deutet auf das detektierte Signal von >75 kD.

3.2.2.4 Affinitätschromatographie mit *Tobra-Tag* RNA

Eine geeignete experimentelle Methode zur Isolierung RNA-bindender Proteine wurde von Bachler et al. (1999) beschrieben. Hierbei konnte die hohe Affinität des Antibiotikums Streptomycin zu einem kurzen RNA-Aptamer von 44 nt ausgenutzt werden, um RNA die mit diesem *Strepto-Tag* fusioniert war, an einer Matrix zu immobilisieren. Bei einem direkten Vergleich zur Immobilisierung der RNA mittels Biotin stellte sich heraus, daß die Affinitätsreinigung durch den *Strepto-Tag* eine wesentlich hintergrundärmere Aufreinigung ermöglicht, da die RNA mitsamt den gebundenen Proteinen durch Konkurrenz mit freiem Streptomycin spezifisch von der Matrix eluiert werden kann. Ein äquivalenter Ansatz wurde von Hartmuth et al. (2002) veröffentlicht; dort wurde ein 44 nt langer *Tobra-Tag* eingesetzt, der mit hoher Affinität an das Antibiotikum Tobramycin bindet. Für die Aufreinigungen der *trans*-agierenden Faktoren des shank1-DTE wurde diese Methode aufgrund mehrerer Vorteile ausgewählt. Zum einen ist die Kopplung von Tobramycin an NHS-Sepharose wesentlich simpler als die Immobilisierung von Streptomycin an Epoxy-Sepharose. Des weiteren ist die Bindung von *Strepto-Tag* RNA von Magnesium-Ionen abhängig (>3 mM), welche als störend für die *in vitro* Interaktion befunden wurden. Es wurde zudem gezeigt, daß die *Tobra-Tag* Methode in eukaryotischen Systemen eingesetzt werden kann. Einen weiteren wichtigen Aspekt stellt die Stabilität der Sekundärstruktur der zu bindenden RNA-Aptamere dar. Mit dem Programm *mfold* (Mathews et. al, 1999; Zuker et al., 2004) kann die optimale Sekundärstruktur einer RNA-Sequenz und die während der Faltung freiwerdende Energie berechnet werden. Für den *Strepto-Tag* ergibt sich hierbei ein Wert von $-9,9$ kcal/mol und bei dem wesentlich stabileren *Tobra-Tag* wurde ein Wert von $-28,5$ kcal/mol ermittelt. Bei der *mfold* Berechnung der optimalen Sekundärstruktur der ersten 588 nt der shank1-3'UTR mit einem am 3'-Ende fusionierten *Tobra-Tag* konnte bestätigt werden, daß beide Sekundärstrukturen voneinander nicht beeinträchtigt werden (Abb. 3.11).

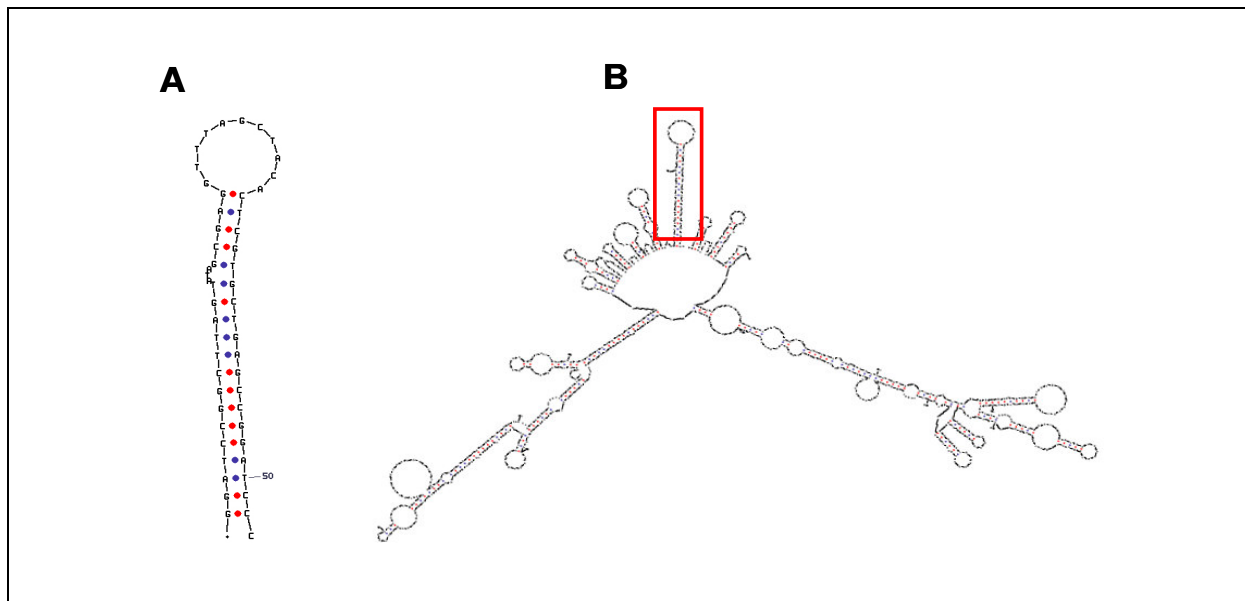


Abbildung 3.11 Nach Berechnung des Programms *mfold* wird die Sekundärstruktur des Tobra-Tags (A) durch Fusion mit den ersten 588 nt der shank1-3 UTR nicht beeinflusst (B)

Zur Affinitätschromatographie wurden *Tobra-Tag* Konstrukte der ersten 133 nt und 588 nt der shank1-3 UTR eingesetzt. Als Negativkontrolle zur Identifizierung unspezifisch bindender Proteine wurde außerdem die revers komplementäre (*antisense*) RNA der ersten 588 nt mit dem *Tobra-Tag* Aptamer fusioniert. Während der *in vitro* Transkription wurde die RNA leicht mit ^{32}P -UTP markiert, wodurch die Effizienz der einzelnen Reinigungsschritte einfach nachverfolgt werden konnte. Mittels *in vitro* Transkription wurden je Ansatz 500 μg *Tobra-Tag* RNA hergestellt, von denen ungefähr die Hälfte an 50 μl der Tobramycin-Matrix gekoppelt werden konnte. Während der Inkubation mit dem RSW kam es zum Teil zu einer deutlichen Abnahme der Matrix-gebundenen RNA welche wahrscheinlich auf den Abbau durch endogene RNasen zurückzuführen ist. Der Anteil der im Überstand verbliebenen Radioaktivität schwankte erheblich während der einzelnen Experimenten zwischen 20-80 %. Ein wirksamer Schutz vor diesem Abbau durch RNase-Inhibitoren war bei dem Volumen von 10 ml, in dem die Bindungsreaktion stattfand, nicht möglich. In zwei folgenden Elutionsschritten durch spezifische Konkurrenz mit 25 mM freiem Tobramycin wurde eine 80-100 %-ige Elution der an der Matrix verbliebenen RNA erreicht (Abb. 3.12 A).

Nach der Elution wurden die Proteine durch TCA-Fällung konzentriert, in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit kolloidaler Coomassie-Lösung gefärbt. Nach Dokumentation des Gels wurden die Banden von Interesse ausgeschnitten und durch Massenspektroskopie analysiert. Das gefärbte Polyacrylamidgel einer Affinitätsreinigung, bei

der das 588 nt 3'UTR *Tobra-Tag* Konstrukt sowie die Negativkontrolle eingesetzt wurden, ist in Abb. 3.12. B dargestellt. In diesem Versuch konnten vier Proteine identifiziert werden, die spezifisch an das shank1-DTE binden: *cytoplasmatic Poly-(A) binding protein 1* (PABP1, 75 kD), *heteronuclear Ribonucleoprotein K* (hnRNP K, 66 kD), *brain-specific Polypyrimidine-tract binding protein* (brPTB, 52 kD) und *Neuro-oncological ventral antigen 1* (NOVA1, 50 kD). Das *far-upstream element binding protein 1* (FBP1, 70 kD) und *MAP2-RNA trans-acting factor 1* (MARTA1, 90 kD) zeigten eine unspezifische Interaktion sowohl mit der shank1-mRNA als auch der Negativkontrolle. Das in der Negativkontrolle stark angereicherte Protein von ~ 45 kD wurde als *heteronuclear Ribonucleoprotein H1* identifiziert. Im niedermolekularen Bereich zwischen 20-35 kD war insbesondere bei der Negativkontrolle die offenbar unspezifische Bindung einer Reihe von Proteine zu beobachten, die nicht weiter untersucht wurden. In mehreren Experimenten konnten insgesamt acht Proteine mit einer Größe zwischen ~35 und 75 kD durch *Tobra-Tag* Affinitätschromatographie mit den ersten 588 nt der shank 3'UTR isoliert und mittels Massenspektroskopie identifiziert werden (Tabelle 3.1).

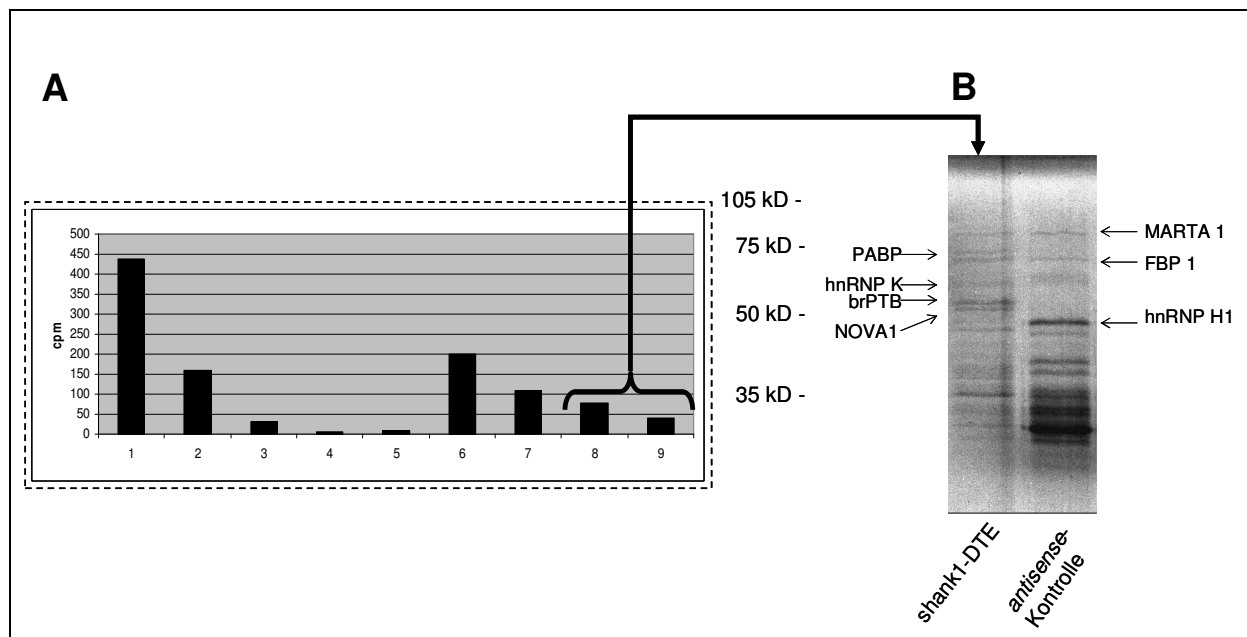


Abbildung 3.12 A) Der Verlauf der *Tobra-Tag* Affinitätschromatographie wurde durch Messung der Radioaktivität während der einzelnen Schritte nachverfolgt: 1) *in vitro* Transkription 2) Kopplungsüberstand 3-5) Waschschrte 6) Matrix vor der Proteinbindung 7) Matrix nach der Proteinbindung 8) erste Elution durch Kompetition mit Tobramycin 9) zweite Elution B) SDS-Gelelektrophorese und kolloidale Coomassie-Färbung der 3*Tobra-Tag* Elution (~60% des Gesamtvolumens); links: *Tobra-Tag* RNA mit den ersten 588nt der shank1-3'UTR; rechts: Negativkontrolle mit der revers komplementären Sequenz. Die Pfeile deuten auf Banden, die aus dem Gel ausgeschnitten und mittels Massenspektroskopie identifiziert wurden.

Sofern geeignete Antikörper zur Verfügung standen wurde die spezifische Interaktion der identifizierten Proteine mit dem shank1-DTE durch *Western Blot* Analysen bestätigt. Hierbei konnte die spezifische Bindung von PABP1 und brPTB (bzw. PTB, eine Differenzierung ist mit dem verwendeten Antikörper nicht möglich) an die ersten 588 nt, sowie hnRNP K und NOVA 1 an die ersten 133 nt der shank1-3'UTR nachgewiesen werden (Abb. 3.13). Mit dem *Ribosomal Salt Wash* als Ausgangsmaterial und der anschließenden *Tobra-Tag* Affinitätschromatographie konnte ein geeignetes System zur biochemischen Aufreinigung *trans*-agierender Faktoren dendritisch transportierter mRNAs etabliert werden.

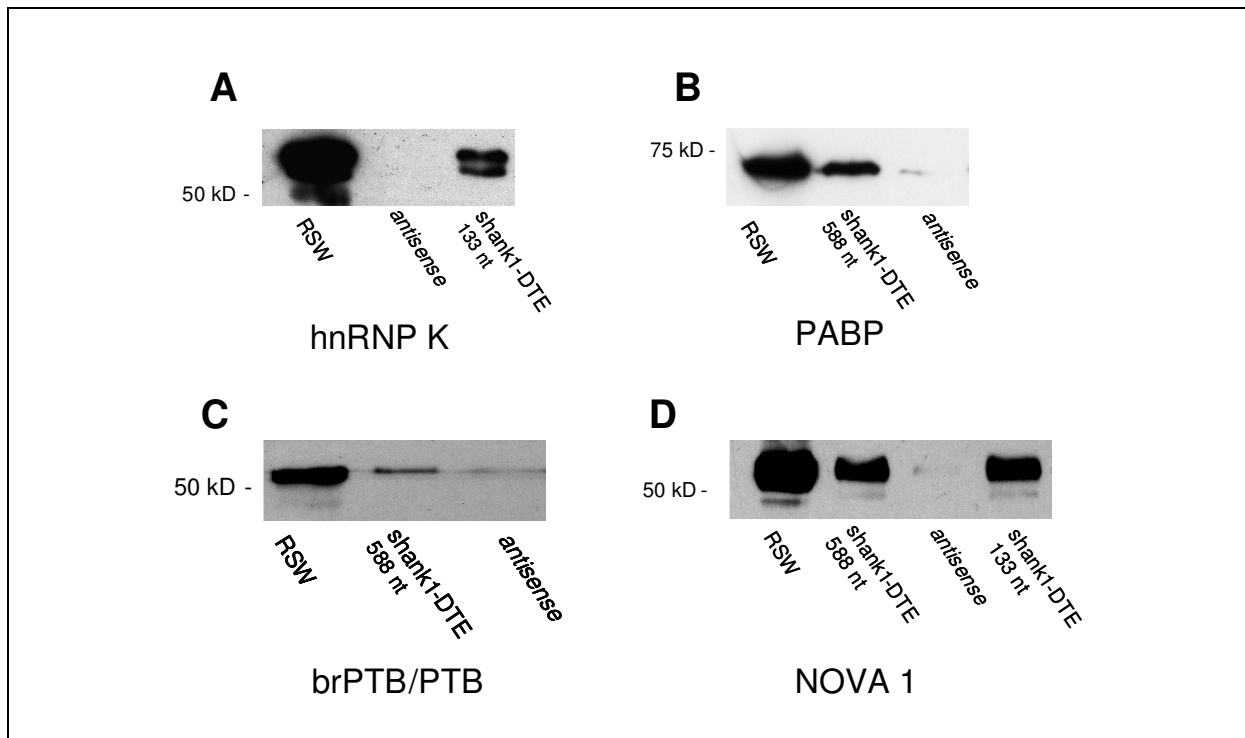


Abbildung 3.13 *Western Blot* Analysen von RSW Ausgangsmaterial (0,1 % vol) und der *TobraTag* Elutionen (10 %vol.) mit spezifischen Antikörpern **A**) hnRNP K **B**) PABP1 **C**) brPTB/PTB **D**) NOVA1.

Tabelle 3.1 *Trans*-agierende Faktoren des shank1-DTEs die durch *Tobra-Tag* Affinitätschromatographie und Massenspektroskopie identifiziert wurden. Neben alternativen Bezeichnungen und Abkürzungen ist, falls vorhanden, die Zugriffsnummer der NCBI-Datenbank angegeben.

Bezeichnung	Abkürzungen	NCBI Nr. (<i>Rattus norvegicus</i>)
<i>Heterogenus nuclear Ribonucleoprotein K</i>	hnRNP K	nicht annotiert
<i>Heterogenus nuclear Ribonucleoprotein E1</i>	hnRNP E1, α CP1, PCBP1	Vorhersage: XP575592
<i>Poly-(rC)-Binding Protein 2</i>	PCBP2, α CP2, hnRNP E2	Vorhersage: AAH97410 AAH78909
<i>Poly-(rC)-Binding Protein 3</i>	PCBP3, α CP3	nicht annotiert
<i>Poly-(A)-Binding Protein 1</i>	PABP1	AAH83176
<i>Brain Polypyrimidin-Tract Binding Protein</i>	brPTB, PTB2	BC082076
<i>Neuro-Oncological-Ventral Antigen 1</i>	NOVA 1	Vorhersage: XP234098 Q80WA4
<i>Acidic Ribosomal Phosphoprotein</i>	ARP P0	NP071797

3.3 Subzelluläre Lokalisation der *trans*-agierenden Faktoren

Nachdem mehrere *trans*-agierende Faktoren des shank1-DTE identifiziert werden konnten, stellte sich die Frage nach deren cytoplasmatischen Lokalisierung in Neuronen des Hippocampus. Nach Überexpression einer chimären mRNA aus GFP und dem shank1-DTE wurde in anschließenden *in-situ* Hybridisierungen gezeigt, daß diese im Dendriten in einer granulären Struktur vorliegt (Segger-Junius, 2003; Böckers et al., 2004). Die Größe dieser Partikel entspricht mit einem mittleren Durchmesser von $\sim 0,5 \mu\text{m}$ ungefähr derjenigen von dendritischen mRNPs (Barbarese et al., 1995; Krichevsky und Kosik, 2001; Kanai et al., 2004). Falls es sich bei den isolierten Proteinen um Bestandteile dendritisch lokalisierter mRNPs handelt, setzt dies die Präsenz dieser Faktoren in distalen dendritischen Kompartimenten voraus. Dabei ist ebenfalls von Interesse, ob ein Nachweis in einer granulären Struktur möglich ist, der auf eine Lokalisation in mRNPs schließen läßt (Rook et al., 2000; Krichevsky und Kosik, 2001; Tiruchinapalli et al., 2003). Die subzelluläre Lokalisierung von endogenem PABP1 und hnRNP K wurde mittels spezifischer Antikörper

an primären embryonalen Hippocampus-Neuronen der Ratte nach zwei Wochen Kulturdauer untersucht. Für die restlichen identifizierten Proteine standen keine Antikörper zur Verfügung, die zur Verwendung in der Immuncytochemie geeignet sind. Aus diesem Grunde wurden die codierenden Sequenzen jener Proteine (außer PCBP1, s.u.) mittels PCR aus Rattenhirn cDNA amplifiziert und in den *pCMV-TAG 2C*-Vektor kloniert, der mittels eines eukaryotischen Promotors eine Expression in Neuronen ermöglicht. Die Proteine wurden mit einem kurzen C-terminalen *FLAG-TAG*[®] (ca. 1kD) fusioniert und konnten über diesen in der Immuncytochemie nachgewiesen werden. Die Hippocampus-Neuronen wurden nach 7 Tagen in Kultur mit diesen Konstrukten transfiziert und nach weiteren 7 Tagen für die Untersuchung fixiert. Um Aussagen über die Lokalisation der *trans*-agierenden Faktoren in Dendriten treffen zu können, wurde gleichzeitig das Mikrotubulus-assoziierte Protein 2 (MAP2) als spezifischer Marker dendritischer Kompartimente (Caceres et al., 1984) dargestellt. Im Folgenden sind die beobachteten subzellulären Lokalisierungen gezeigt und zusätzlich eine Übersicht der Domänenstruktur der *trans*-agierenden Faktoren aufgeführt.

3.3.1 Poly-A-bindendes Protein 1

Cytoplasmatisches PABP1 besitzt 4 N-terminale *RNA Recognition* Motive (RRM) von je 80 - 100 Aminosäuren (AS) und einen divergenten C-Terminus mit einer prolinreichen Region dessen primäre Funktion in der Ausbildung von Protein-Protein Interaktionen liegt (Abb. 3.14 A; Burd und Dreyfuss, 1994; Mohr et al., 2001). Die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von endogenem PABP1 zeigt eine somatodendritische Verteilung unter Ausschluß des Zellkerns. Im Gegensatz zu MAP2 ist bei stärkerer Vergrößerung eine granuläre Verteilung des Proteins in distalen Dendriten zu erkennen. Diese Partikel befinden sich gehäuft in den Verzweigungspunkten des Dendritenbaums, was ebenfalls von dendritischen mRNPs beobachtet wurde (Abb. 3.14 B; Krichevsky und Kosik, 2001).

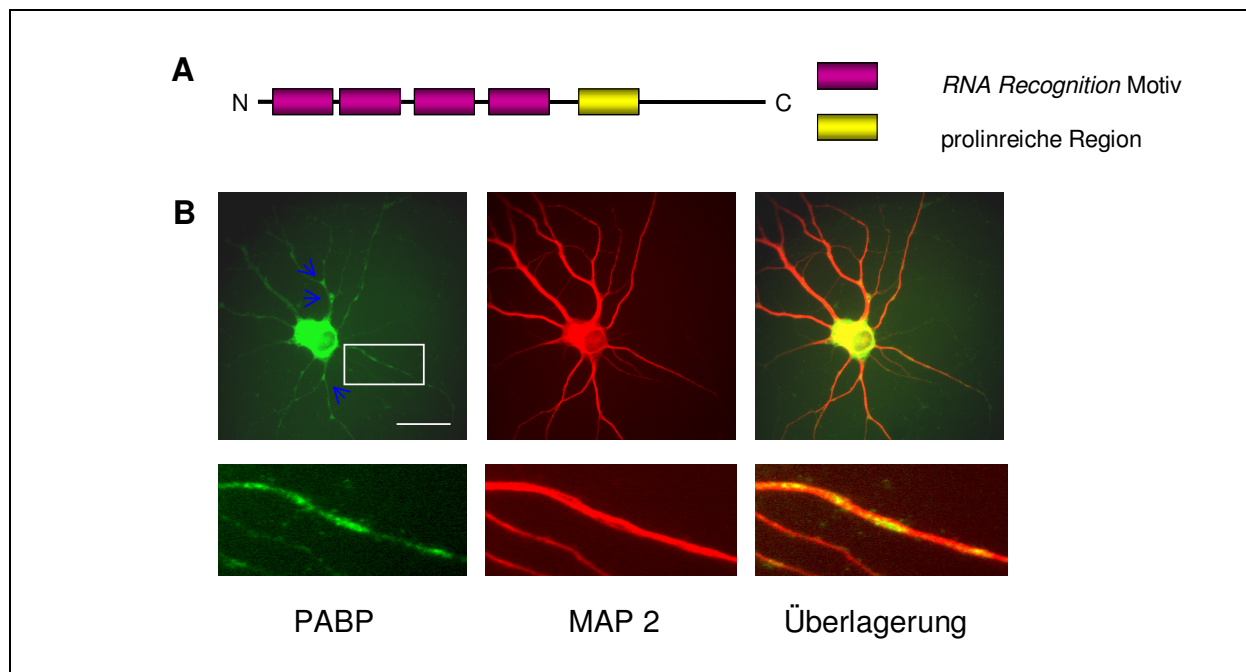


Abbildung 3.14 **A)** schematische Darstellung der Domänenstruktur von PABP1 (636 AS) **B)** Embryonale Hippocampus-Neurone wurden 14 Tage nach der Präparation fixiert und die Lokalisation von endogenem PABP1 mit einem polyklonalen Antikörper aus Kaninchen nachgewiesen. Dendritische Kompartimente wurden mit einem monoklonalen, murinen Antikörper gegen MAP2 identifiziert. Die blauen Pfeile deuten auf Verzweigungspunkte des Dendritenbaums (Maßstabsbalken= 20 μ m).

3.3.2 Poly-rC-bindende Proteine

hnRNP K gehört zur Gruppe der Poly-rC-bindenden Proteine und enthält zwei N-terminale und eine C-terminale RNA-bindende KH-Domäne (hnRNP K *Homology*), die erstmals bei diesem Protein beschrieben wurde. Zwischen diesen befindet sich die prolinreiche *K-interactive* Region, die viele der hnRNP K-Protein Interaktionen ausbildet. Weiterhin verfügt das Protein sowohl über ein N-terminales Kernlokalisierungssignal als auch über eine spezielle *hnRNP K nuclear shuttling Domäne*, die ebenfalls mit dem Kernimport und –export in Zusammenhang steht (Abb. 3.15 A; Michael et al., 1997; Bomsztyk et al, 1997; 2004; Makeyev und Liebhaber, 2002). Als pendelndes Kernprotein konnte hnRNP K gleichermaßen in Soma und Kern nachgewiesen werden. Das Signal erstreckte sich bis in den distalen Dendritenbereich und lag dort in einem granulären Verteilungsmuster vor. Die Poly-rC-bindenden Proteine 1-4 (PCBP 1-4) verfügen über eine identische Anordnung von drei KH-Domänen, wobei weitere charakteristische Domänen fehlen (Abb. 3.15 B; Makeyev und Liebhaber, 2002). Die drei vorherrschenden PCBP-Formen in humanen und murinen Zellen sind PCBP1 (hnRNP E1), PCBP2 sowie ein alternatives Spleißprodukt von PCBP2, dem ein internes Exonsegment von 93 bp fehlt und das die häufigste Form von PCBPs darstellt

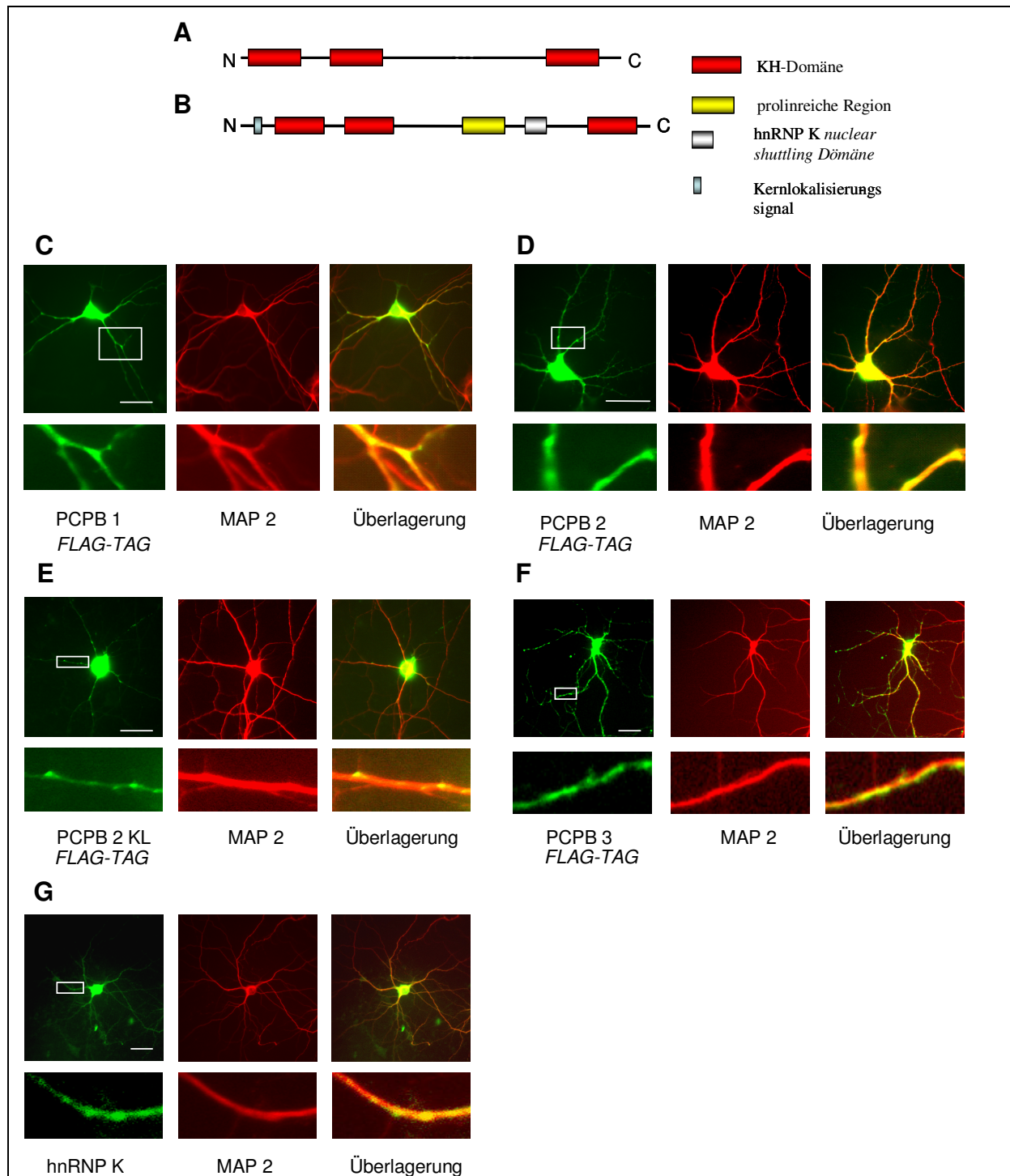


Abbildung 3.15 **A**) schematische Darstellung der Domänenstruktur von PCBP 1-3 (PCBP1: 356 AS; PCBP2: 349 AS; PCBP2 KL: 256 AS; PCBP3: 339 AS) **B**) schematische Darstellung der Domänenstruktur von hnRNP K (463 AS) **C-F**) dendritische Lokalisation von PCBP 1-3: Embryonale Hippocampus-Neurone wurden nach 7 Tagen in Kultur mit *FLAG-TAG* PCBP-Konstrukten transfiziert und nach weiteren 7 Tagen in Kultur fixiert. Die Lokalisation der rekombinanten PCBPs wurde mit einem monoklonalen murinen, gegen den *FLAG-TAG* gerichteten, Antikörper nachgewiesen. Zur spezifischen Markierung von Dendriten wurde ein polyklonaler Antikörper gegen MAP2 aus Kaninchen eingesetzt. **G**) dendritische Lokalisation von hnRNP K: Embryonale Hippocampus-Neurone wurden nach 14 Tagen in Kultur fixiert und endogenes hnRNP K mit einem monoklonalen, murinen Antikörper nachgewiesen. Dendritische Kompartimente wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen MAP2 aus Kaninchen identifiziert (Maßstabsbalken= 20 µm).

(Funke et al., 1996, Chkheidze et al., 1999). Ein Konstrukt dieser PCBP2 KL genannten Variante wurde ebenfalls mittels PCR unter Verwendung derselben Oligonucleotide hergestellt. Bei der Untersuchung der cytoplasmatischen Lokalisation dieser Proteine stellte sich in allen Fällen eine somatodendritische Lokalisation unter Einbezug des Zellkerns heraus. In distalen dendritischen Kompartimenten wurde ein ausgeprägtes granuläres Verteilungsmuster der Fluoreszenzsignale nachgewiesen (Abb. 3.15 C-G).

3.3.3 Gehirnspezifische Spleißfaktoren (brPTB, NOVA1)

brPTB, die hirnspezifische Isoform von PTB (hnRNP I) besitzt eine identische Domänenstruktur, bestehend aus 2 N-terminalen und 2 C-terminalen RRM's zwischen denen eine alaninreiche Region liegt; im N-terminalen Bereich des Proteins befindet sich ein zweiteiliges Kernlokalisierungssignal (Abb. 3.16 A). Die Identität zu PTB, bei dem es sich um ein hnRNP handelt, das zwischen Kern und Cytoplasma pendelt (Kamath et al., 2001) liegt auf Aminosäureebene bei 73,5 % (Kikuchi et al., 2000). In Hippocampus-Neuronen konnte das rekombinante *FLAG-TAG* Protein hauptsächlich im Zellkern unter Aussparung des Nucleolus nachgewiesen werden. Zusätzlich war ein schwaches Signal mit diffuser Verteilung im Soma und proximalen Dendriten erkennbar. In distalen dendritischen Bereichen konnten keine Fluoreszenzsignale detektiert werden (Abb. 3.16 C).

NOVA1 enthält eine N-terminale und 2 C-terminale KH Domänen, die eine alaninreiche Region eingrenzen (Abb. 3.16 B; Buckanovich und Darnell, 1997). In den immunocytochemischen Untersuchungen konnte eine somatodendritische Lokalisierung festgestellt werden, wobei die Färbung im Kern etwas schwächer erschien. Im distalen Dendriten der Neuronen waren anstatt einer granulären Verteilung allerdings eher diffuse Signale zu beobachten (Abb. 3.16 D) Diese Ergebnisse sind übereinstimmend mit der von Polydorides et al. (2000) beobachteten Lokalisation von NOVA1 und brPTB in Motorneuronen des murinen Rückenmarks.

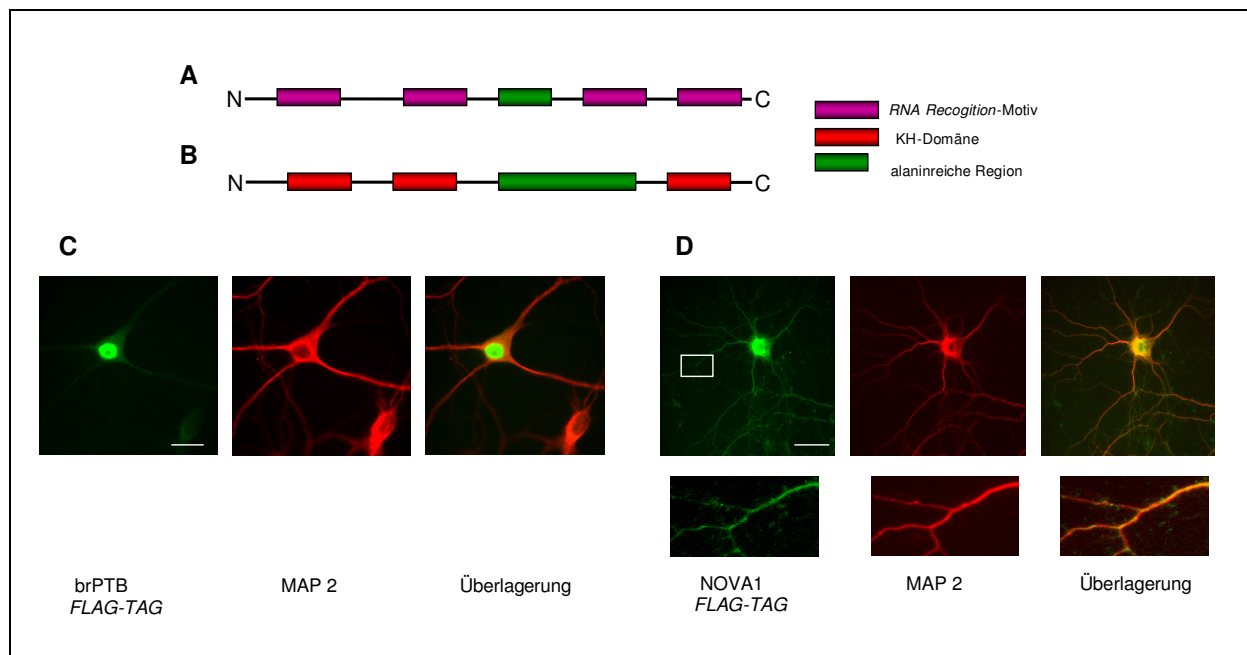


Abbildung 3.16 **A**) schematische Darstellung der Domänenstruktur von brPTB (533 AS) **B**) schematische Darstellung der Domänenstruktur von NOVA1 (507 AS) **C, D**) subzelluläre Lokalisation von brPTB und NOVA1: Embryonale Hippocampus-Neurone wurden nach 7 Tagen in Kultur mit dem brPTB bzw. NOVA1-*FLAG-TAG*-Konstrukt transfiziert und nach weiteren 7 Tagen fixiert. Die Lokalisation der rekombinanten Proteine wurde mit einem monoklonalen murinen Antikörper nachgewiesen, der gegen den *FLAG-TAG* gerichtet war. Zur spezifischen Markierung von Dendriten wurde ein polyklonaler MAP2-Antikörper aus Kaninchen eingesetzt (Maßstabsbalken = 20 µm).

3.3.4 Acidic Ribosomal Phosphoprotein P0

ARP P0 stellt das einzige isolierte Protein dar, das über keine bekannten RNA-bindenden Motive verfügt; im C-terminalen Bereich befindet sich eine alaninreiche Region (Abb. 3.17 A). Dies Phosphoprotein, ist neben ARP P1 und ARP P2 Bestandteil des ribosomalen Stiels (*ribosomal stalk*) der großen ribosomalen Untereinheit, kann jedoch in Assoziation mit beiden Ribosomenuntereinheiten wie auch frei im Cytoplasma nachgewiesen werden (Tsurugi und Ogata, 1985; Gonzalo und Reboud, 2003; Brendel et al., 2004). Der immuncytochemische Nachweis des *FLAG-TAG* Proteins in Hippocampus-Neuronen zeigte eine somatodendritische Lokalisation sowie, eine mehr oder weniger ausgeprägte granuläre Struktur in distalen Dendriten (Abb. 3.17 B).

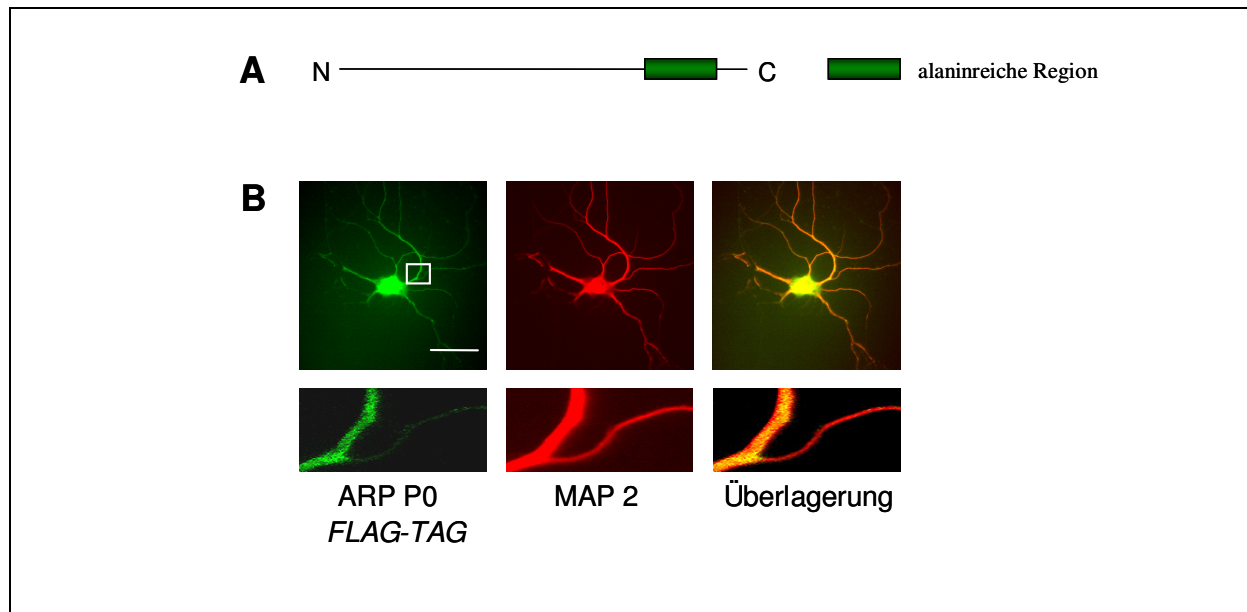


Abbildung 3.17 **A)** schematische Darstellung der Domänenstruktur von ARP P0 (316 AS) **B)** Embryonale Hippocampus-Neurone wurden nach 7 Tagen in Kultur mit dem ARP P0 FLAG-TAG Konstrukt transfiziert und nach weiteren 7 Tagen fixiert. Die Lokalisation des rekombinanten ARP P0 wurde mit einem monoklonalen murinen, gegen den FLAG-TAG gerichteten, Antikörper nachgewiesen. Zur spezifischen Markierung von Dendriten wurde ein polyklonaler MAP2-Antikörper aus Kaninchen eingesetzt. (Maßstabsbalken= 20 µm)

3.4 Direkte Bindung der *trans*-agierenden Faktoren an das shank1-DTE

Es konnten durch *Tobra-Tag* Affinitätschromatographie verschiedene *trans*-agierende Faktoren des shank1 DTEs identifiziert werden, die bis auf ARP P0 alle bekannte RNA-Bindemotive enthalten. Hierbei war von Interesse, welche dieser Proteine direkt an das shank1-DTE binden. Eine Aufreinigung über Protein-Protein Interaktionen konnte während der *Tobra-Tag* Affinitätschromatographie nicht ausgeschlossen werden. Daher wurden alle Proteine rekombinant hergestellt und isoliert um im Folgenden Protein-RNA Interaktionsstudien durchzuführen. Zu diesem Zweck wurden die offenen Leseraster der shank1-DTE bindenden Proteine in den QE32 Vektor kloniert, der eine heterologe Expression in *Escherischia coli* Zellen mit einem Nickel-bindendem C-terminalen *His₆-Tag* ermöglicht (Baneyx et al., 1999). hnRNP K und PCBP1 wurden bereits in einem Expressionsvektor (*pET 16b*) mit einem C-terminalen *His₆-Tag* zur Verfügung gestellt (M. Hentze, EMBL, Heidelberg). Es stellte sich heraus, daß bei Expression der RNA-bindenden Proteine in *E. coli* in den üblicherweise verwendeten TOP 10 F' Zellen meist keine genügende Proteinmenge produziert werden konnte. Insgesamt wurden daher 6 verschiedene *E. coli* Stämme auf ihr Potential zur Expression der *trans*-agierenden Faktoren überprüft (Abb. 3.19). ARP P0, das keine bekannten RNA-Bindemotive enthält, konnte hingegen problemlos

exprimiert werden. Die native Aufreinigung der *His-Tag* Fusionsproteine über Nickel-Sephadex war bei hnRNP K, hnRNP E1, PCBP2, PCBP2 KL, PCBP3, PABP1 und NOVA1 möglich; nicht gelungen ist dies mit brPTB und ARP P0.

Zum Nachweis einer direkten Interaktion der rekombinanten Proteine mit dem shank1-DTE wurden mehrere Verfahren angewandt. Am deutlichsten konnte die direkte Bindung für PABP1 belegt werden. Durch *UV-Crosslink* Analysen mit dem aufgereinigten *His-Tag* Protein und den ersten 588 nt der shank1-3'UTR war ein RNA-Protein Komplex mit einer Größe von >75kD nachweisbar. In einem parallelen Ansatz mit der revers komplementären RNA wurde dieses Signal nicht detektiert und somit die Spezifität der Bindung gezeigt (Abb. 3.18 A). Zum weiteren Beweis einer direkten Interaktion diente eine *North-Western Blot* Analyse. Nach einer SDS-Gelelektrophorese wurde rekombinantes PABP1 auf eine Membran transferiert und nach Renaturierung des Proteins zum Nachweis der Bindungsaktivität mit radioaktiv markiertem shank1-DTE inkubiert. In einer anschließenden Autoradiographie wurde ein deutliches Signal bei <75 kD detektiert (Abb. 3.18 B). Des weiteren wurde in EMSA Analysen die Bindung von rekombinantem PABP1 an die ersten 126 nt der 3'UTR belegt (Abb. 3.18 C). Ebenso deuten auch *supershift*-EMSA Versuche mit dem Rohlysate auf PABP1 als *trans*-agierenden Faktor des shank1 DTEs hin. Bei dieser Methode wird das Rohlysate vor Zugabe der Sonde mit spezifischen Antikörpern für 1h präinkubiert. Durch eine Bindung des Antikörpers an die RNA-bindenden Proteine kann meistens eine weitere Verzögerung der Laufgeschwindigkeit des Protein-RNA Komplexes beobachtet werden (*supershift*). Ein anderer Effekt, der gelegentlich vorkommt, ist eine Abnahme der Signalintensität (*neutralizing effect*). Die Bindung des Antikörpers an bestimmte Epitope des RNA-bindenden Proteins verursacht Konformationsänderungen und hat so eine Verminderung der Affinität zur Ziel-RNA zur Folge (Wilson und Brewer, 1999). So war nach Präinkubation mit einem Antikörper gegen PABP1 eine deutliche Verringerung der Intensität der RNA-Protein Komplexe zu beobachten; die Verwendung eines Antikörpers gegen Staufen1 hatte hingegen keine Auswirkungen (Abb.3.18 D). Weiterhin wurde die direkte Bindung von hnRNP K und hnRNP E1 an die ersten 588 nt der shank1-3'UTR nachgewiesen. Nach der Inkubation der rekombinanten Proteine mit radioaktiv markierter RNA konnte in EMSA Analysen ein Komplex mit verzögerter Laufgeschwindigkeit nachgewiesen werden; mit rekombinanten PCBP2 wurden hingegen weniger deutliche Veränderungen beobachtet (Abb. 3.18 E). Insgesamt ließ sich somit eine direkte Bindung von

PABP1, hnRNP K und PCBP1 an das shank1-DTE belegen. In keinem der Versuchsansätze konnte dies von brPTB, NOVA1, PCBP2, PCBP2 KL, PCBP3 oder ARP P0 gezeigt werden.

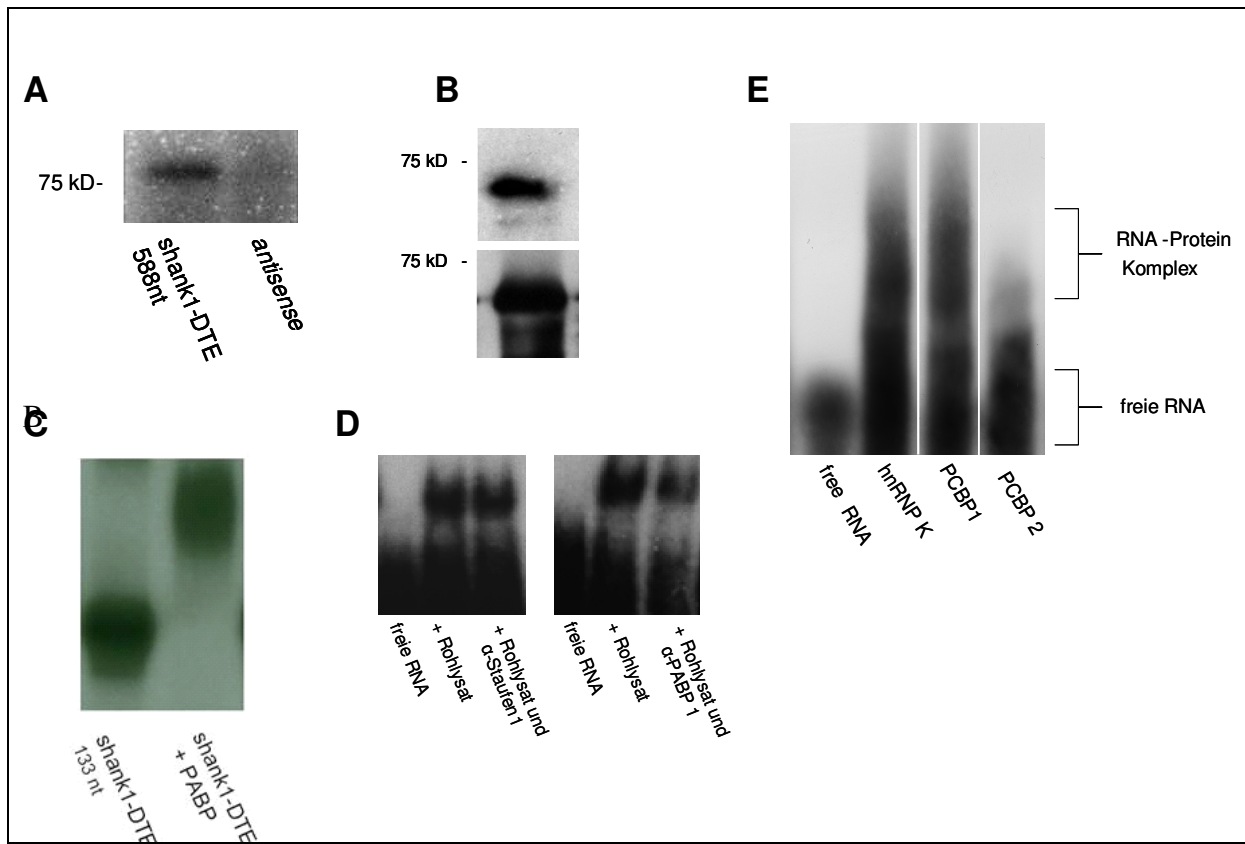


Abbildung 3.18 Direkte Interaktion von PABP1, hnRNP K und PCBP1 mit dem shank1-DTE: **A)** *UV-Crosslink* Analysen mit rekombinantem PABP1 und den ersten 588 nt der shank1-3'UTR (links) und der revers komplementären Sequenz als Negativkontrolle **B)** oben: *Western Blot* Detektion von rekombinantem PABP1 mit einem spezifischen Antikörper; unten: *North-Western Blot* mit rekombinantem PABP1 und den ersten 588 nt der shank1-3'UTR **C)** EMSA mit rekombinantem PABP1 und den ersten 126 nt der shank1-3'UTR **D)** *Supershift* - EMSA mit Rohlysate aus Rattenhirn und den ersten 350 nt der shank1-3'UTR; links: Präinkubation des Lysates mit einem Antikörper gegen Staufen1 rechts: Präinkubation des Lysates mit einem Antikörper gegen PABP1 **E)** EMSA Analyse mit den ersten 588 nt der shank1-3'UTR und rekombinantem hnRNP K, PCBP1 und PCBP2.

Protein	Coomassie-Färbung	<i>E. coli</i> Stämme	native Aufreinigung	shank1-DTE Bindung	dendritische Lokalisierung
hnRNP K	75 kD- 	BL21 DE3	+	+	+
hnRNP E1	50 kD- 	BL21 DE3	+	+	+
PCBP 2	75 kD- 	XL1	+	—	+
PCBP 2 KL	35 kD- 	XL1, M15	+	—	+
PCBP 3	50 kD- 	XL1	+	—	+
PABP	75 kD- 	TOP 10 F', XL1	+	+	+
brPTB	75 kD- 	M 15	—	—	—
NOVA1	50 kD- 	TOP 10F'	+	—	+
ARP P0	35 kD-  30 kD- 	TOP 10F', XL1, M15, BL21 DE3	—	—	+

Abbildung: **3.19** Expression der *trans*-agierenden Faktoren des shank1-DTEs als rekombinante *His₆-Tag* Proteine in *E. coli* und native Aufreinigung über Nickel-Sepharose: Dargestellt sind Coomassie-Färbungen der rekombinanten Proteine nach SDS-Gelelektrophorese. Bei brPTB und ARP P0 war die native Isolierung nicht erfolgreich; es sind daher die entsprechenden Banden aus dem Bakterienrohlysat gezeigt. Des weiteren sind die *E. coli* Stämme aufgeführt, in denen eine Expression der rekombinanten Proteine möglich war. Eine direkte Interaktion mit dem shank1-DTE konnte von hnRNP K, hnRNP E1 und PABP1 nachgewiesen werden. Mit Ausnahme von brPTB sind alle Proteine in distalen Dendriten von kultivierten embryonalen Hippocampus-Neuronen aus *R. norvegicus* lokalisiert.

3.5 Translation der shank1-mRNA

Das Konzept des dendritischen RNA-Transportes impliziert, daß die mRNA in einem inaktiven Zustand vorliegt, bis diese unter der Kontrolle individueller Synapsen lokal translatiert wird (Krichevsky und Kosik, 2001; Steward und Schuman, 2001). In einem zweiten Teil der Arbeit wurden daher Mechanismen untersucht, mittels derer die Translation der shank1-mRNA reguliert werden kann. Von besonderem Interesse waren hierbei die 5'- und 3'- untranslatierten Regionen aufgrund ihrer essentiellen Rolle für die Bestimmung der Translationseffizienz des offenen Leserasters (Kozak, 1987; Mazumder, 2003; VanDongen und VanDongen, 2004; Pickering und Willis, 2005;).

3.5.1 Charakterisierung der shank1-5'UTR

3.5.1.1 Analyse der Sekundärstruktur der shank1-5'UTR

Ungefähr 10 % aller mRNAs besitzen eine untypisch lange 5'UTR (Kozak M., 1987), zwei Drittel davon codieren für proto-Onkogene oder Proteine, die mit dem Zellwachstum im Zusammenhang stehen (Clemens und Bommer, 1999; Willis, 1999). Längere 5'UTRs neigen zur Formation stabiler Sekundärstrukturen, die das Abtasten des 43 S-Prä-Initiationskomplexes während der *cap*-abhängigen Translation behindern (Wood et al., 1996; Pickering und Willis, 2005). Der Grad dieser Beeinträchtigung ist maßgeblich von der Größe und Stabilität der Sekundärstrukturen abhängig. Die humane shank1-mRNA enthält eine 5'UTR von 634 nt mit einem GC-Gehalt von 77 % und sollte demnach in der Lage sein translationsinhibierende Strukturen auszubilden. Die mit dem Programm *mfold* (Zuker et al., 2004) berechnete optimale Sekundärstruktur zeigt ausgedehnte Haarnadelschleifen von unterschiedlicher Länge, die sich über die gesamte Sequenz erstrecken. Die längste Abfolge von Basenpaarungen befindet sich zwischen den Nucleotiden von Position 115 und 418 (Abb. 3.20). Die berechnete freie Energie während der RNA-Faltung liegt bei -324,1 kcal/mol und damit deutlich über den ~ 50 kcal/mol die für eine effektive Behinderung des prozessierenden Prä-Initiationskomplexes notwendig sind (Kozak, 1986; Kozak, 1989; Pickering und Willis, 2005). Von *R. norvegicus* sind auf genomischer Ebene entsprechende Sequenzbereiche mit hoher Homologie in der NCBI-Datenbank annotiert. Die Amplifikation dieser cDNA mittels PCR erwies sich als nicht durchführbar.

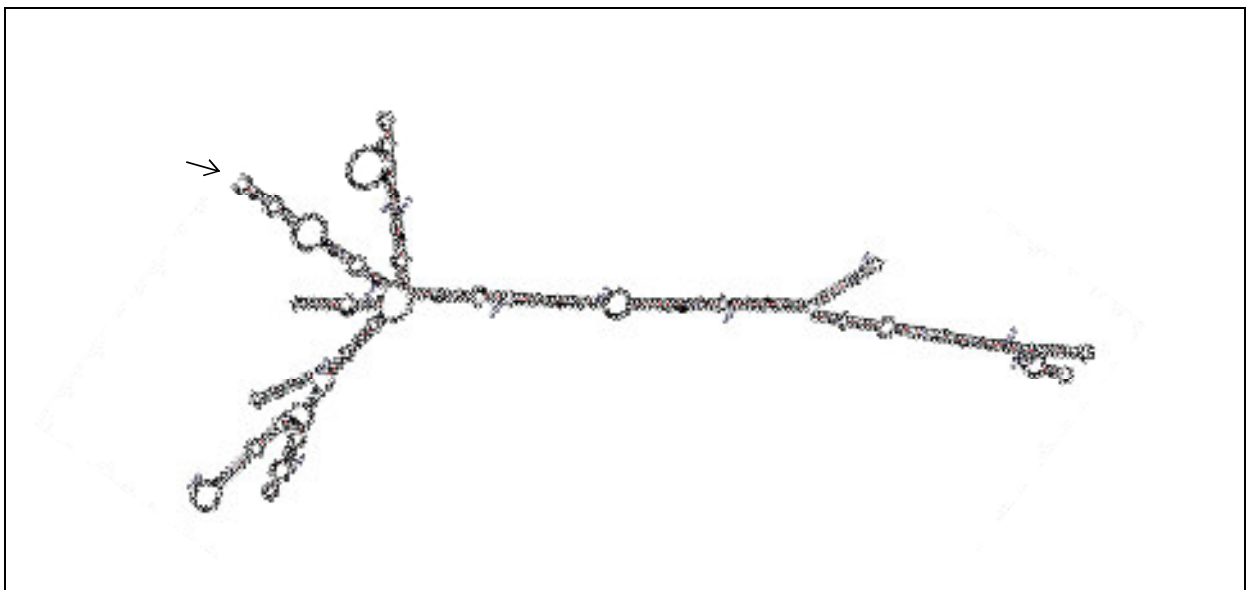


Abbildung 3.20 Optimale Sekundärstruktur der shank1-5'UTR nach Berechnung des Programms *mfold*. Der Pfeil zeigt auf das 5' Ende der Sequenz. Bei der Faltung wurde eine freie Energie von -324,1 kcal/mol ermittelt.

3.5.1.2 *Trans*-agierende Faktoren der shank1-5'UTR

Die Bindung *trans*-agierender Faktoren an die 5'UTR ist ein weiterer Mechanismus, über den die Translation einer mRNA reguliert werden kann. Erstmals beschrieben wurde dies von Gray und Hentze (1994) für die Interaktion des *Iron-response-element* (IRE) in der 5'UTR von Ferritin-mRNA und dem *Iron-response regulatory protein* (IRP), dessen Bindung bei niedrigen Eisenkonzentrationen den Translationsstart blockiert. Zur Identifikation *trans*-agierender Faktoren der shank1-5'UTR wurden *UV-Crosslink* Analysen durchgeführt, bei denen fünf distinkte Banden im Autoradiogramm erkennbar waren (Abb. 3.21). Schwache Signale konnten bei ~ 40, 65 und 80 kD detektiert werden, eine etwas stärkere Bande befand sich zwischen 55 - 60 kD und die starke diffuse Färbung im Bereich von ~ 50 kD läßt, wie auch bei den Analysen mit dem shank1-DTE, wahrscheinlich auf die direkte Bindung mehrerer Proteine dieser Größenordnung an die shank1-5'UTR schließen.

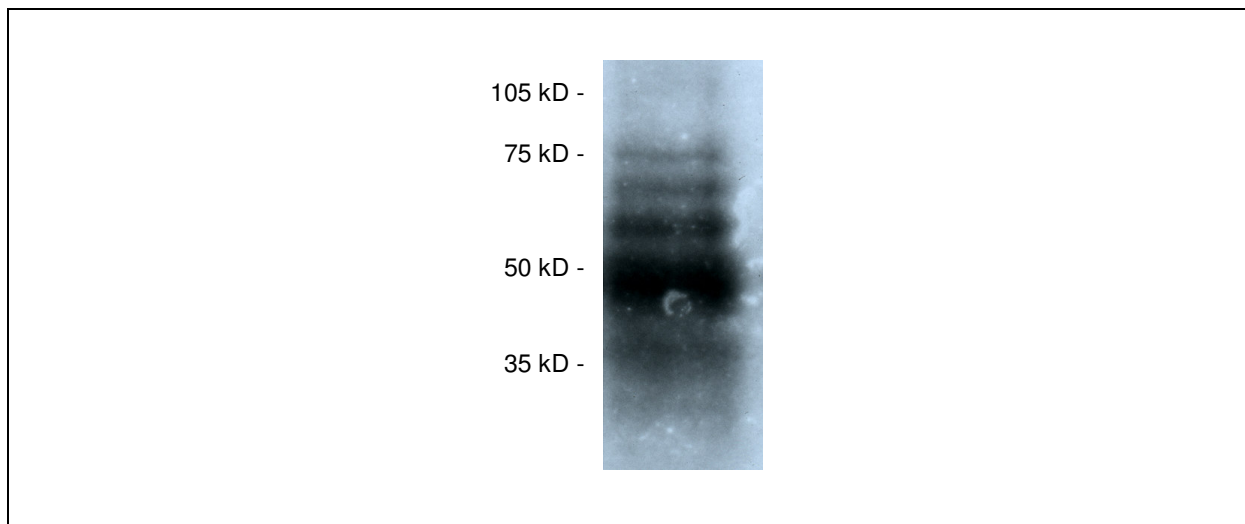


Abbildung 3.21 *UV-Crosslink* Analyse mit der shank1-5'UTR und Proteinrohlysat aus Rattengehirn.

3.5.1.3 Initiation der Translation der shank1-5'UTR

Weitere wichtige *cis*-agierende Elemente der Translationskontrolle sind sogenannte *upstream open reading frames* (uORFs) und *upstream startcodons* (uAUGs). Bei uORFs handelt es sich um kleinere offene Leseraster, die vor der hauptsächlichen codierenden Sequenz einer mRNA liegen und während einer *cap*-abhängigen Translation als erste vom Ribosom übersetzt werden. Nach dem Stopcodon des uORFs kommt es zu einer Freisetzung des Ribosoms von der RNA, wodurch die Translation des Hauptleserasters negativ beeinträchtigt wird. Dieser Mechanismus unterstützt eine niedrige Translationsrate, da nur ein geringer Teil der

Ribosomen das eigentliche Startcodon durch Reinitiation nach dem uORF oder Übergehen des Stopcodons (*leaky scanning*) erreichen kann (Wang und Rothnagel, 2004). Bei uAUGs ist kein Stopcodon vor dem Hauptleseraster vorhanden. Die Leseraster von *out of frame* AUGs sind in Bezug auf das Hauptleseraster verschoben, so daß von diesem Startcodon ausgehend kein funktionsfähiges Protein translatiert werden kann; dies führt ebenfalls zu einer Reduktion der Translation des Hauptgenproduktes. Falls beide Startcodons im selben Leseraster liegen (*in frame* uAUGs), kann diese Sequenz translatiert und als 5' codierende Sequenz fusioniert mit dem hauptsächlichen Genprodukt exprimiert werden. Schätzungen zufolge enthalten ~ 50 % aller humanen mRNAs uORFs oder uAUGs (Rogozin et al., 2001; Suzuki et al., 2000; Pesole et al., 2000). Nach bioinformatischen Analysen von Iacono et al. (2005) scheinen uORFs bei Nagern und Mensch wesentlich häufiger aufzutreten als uAUGs, wobei bei *in frame* uAUGs etwa 2-3 mal seltener als *out-of frame* uAUGs vorkommen. Die Effizienz der Translation an einem Startcodon ist stark von der Sequenz der benachbarten Nucleotide abhängig (Kozak, 1987). Von besonderer Bedeutung sind hier ein Purin in -3 und ein Guanodin in +4 Position relativ zum Adenosin des Startcodons (A/GXXATGG). Um die shank 5'UTR auf das Vorkommen von uORFs und/oder uAUGs hin zu untersuchen, wurde der Initiations-Kontext der vorkommenden ATG-Triplets analysiert. Hierzu wurde das Programm *ATGpr* eingesetzt, mit dem die Vorhersage von Translationsinitiationsstellen mit hoher Genauigkeit möglich ist (Nadershahi et. al, 2004). Neben dem annotierten Startcodon der humanen shank1-mRNA an Position 635 (AGCATGA; Verlässlichkeit: 0,36 von 1) wurde weiteres ATG in Position 422 in einem nahezu optimalen Kontext gefunden (ACAATGA, Verlässlichkeit: 0,84 von 1). Es handelt sich hierbei um ein *in frame* uAUG über das eine 5'codierende Region von 71 Aminosäuren entsteht. Die Existenz dieser shank1-Variante mit verlängertem N-Terminus wurde nach Herstellung eines spezifischen Antikörpers durch *Western Blot* Analysen belegt (Kreienkamp, unveröffentlicht).

3.5.2 *in vitro* Translation von shank1-UTR-fusionierter mRNA

Um die Auswirkungen der 5'- und 3' UTR auf die Translation der shank1-mRNA zu analysieren wurde eine *in vitro* Translation in einem Nuclease-behandelten Lysat aus Reticulocyten von Kaninchen durchgeführt. Hierzu wurden die nicht-translatierten Regionen in den „Blaulicht“-Vektor subkloniert. Dieser enthält in der multiplen Klonierungsstelle eine Sequenz, die für das Enzym Luziferase aus dem Glühwürmchen (*Photinus*) codiert. Mittels dieser Konstrukte wurde chimäre Luziferase-mRNA hergestellt, die mit den shank1-UTRs fusioniert war (Abb. 3.22 A).

Nach der *in vitro* Translation wurde die produzierte Luziferase durch Messung der Lichtintensität in einem Luminometer quantifiziert. Bei Fusion der shank1-5'UTR an das Reportergen war eine Repression der Translation mehr als 90 % zu beobachten. Die Expression der Reporter-RNA mit den ersten 588 nt der shank1-3'UTR führte zu einer deutlichen Zunahme des Signals um ~ 80 %. Mit einem äquivalenten Konstrukt, das die vollständige humane 3'UTR mit einer Länge von 633 nt enthielt, wurde eine Steigerung um über 60 % beobachtet.

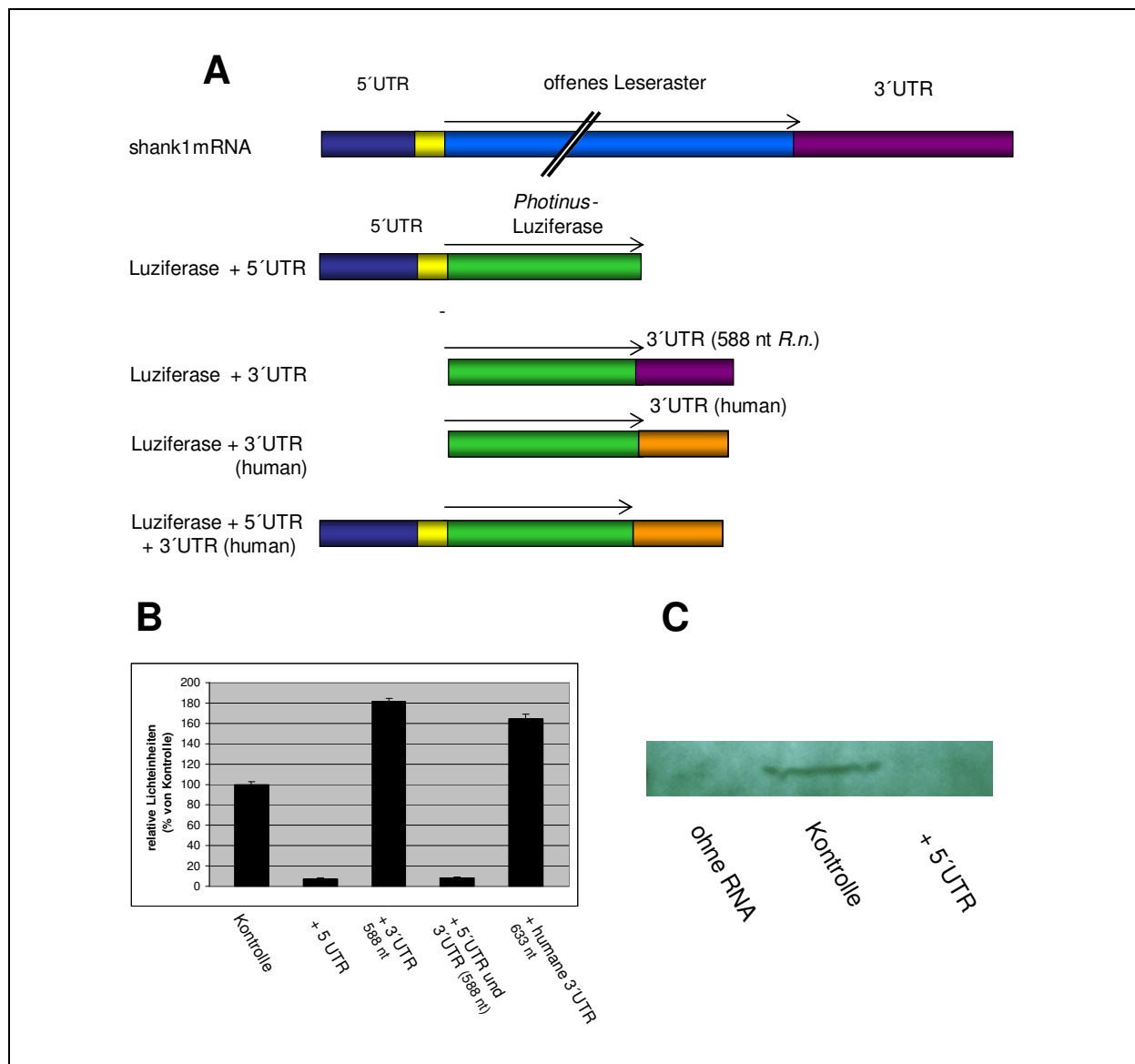


Abbildung 3.22 Auswirkungen der shank1-UTRs auf die *in vitro* Translation eines Reportergens:

A) Schematische Darstellung der eingesetzten *Photinus*-Luziferase Konstrukte: Es wurden *Photinus*-Luziferase Konstrukte mit der humanen 5'UTR, den ersten 588 nt der 3'UTR von *R. norvegicus*, der humanen 3'UTR sowie der humanen 5' und 3'UTR hergestellt B) *in vitro* transkribierte RNA wurde zur *in vitro* Translation von Luziferase in Reticulocytenlysate eingesetzt. Die Aktivität der produzierten Luziferase wurde bestimmt und das Verhältnis zur Kontrolle berechnet (n=4) C) 10 µl der Translationsreaktion wurden in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und in die *Photinus*-Luziferase inkorporiertes ³⁵S-Methionin mittels Autoradiographie nachgewiesen.

Bei der Expression einer Luziferase-mRNA, die sowohl die 5'UTR als auch die humane 3'UTR enthielt, kam es zu einer Repression der Translation um über 90 %, wobei im Vergleich zum 5'UTR-Konstrukt eine leichte Zunahme um ~ 12 % zu verzeichnen war (Abb. 3.22 B). Zusätzlich wurde die Effizienz der *in vitro* Translation durch den Einbau von ³⁵S-Methionin überprüft. Die Lysate wurden in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und radioaktive Signale durch Autoradiographie nachgewiesen. Während in der Kontrollreaktion eine Bande in der Größe der *Photinus*-Luziferase sichtbar war, wurde im Ansatz mit der 5'UTR-Luziferase-mRNA wie auch in einer Kontrolle ohne Zugabe von RNA kein Protein detektiert (Abb. 3.22 C). Neben einem weiteren Nachweis für die translationsreprimierende Wirkung der shank1 5-UTR zeigt dies, daß die Reduktion des Luziferasesignals nicht auf einen Aktivitätsverlust des Reporterproteins durch Fusion mit den 71 Aminosäuren des uORFs zurückzuführen ist.

3.5.3 *in vitro* Translation von shank1-5'UTR Deletionskonstrukten

Zur weiteren Analyse der Translationsinhibition durch die shank1-5'UTR wurden zwei Deletionskonstrukte hergestellt. Hierfür wurden endogene Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *NotI* und *StuI* verwendet, da sich die Amplifikation dieser Sequenz mittels PCR bereits als enorm schwierig erwies. Bei der Analyse der *in vitro* Translationseffizienz in Reticulocytenlysat zeigte sich, daß durch die Entfernung der ersten 138 nt der 5'UTR eine Steigerung von ~ 5 % auf über 40 % der Kontrolle erreicht wurde. Durch Deletion der ersten 583 nt, wovon auch das Startcodon des uAUGs betroffen ist, wurde dieser Wert auf ca. 80 % gesteigert.

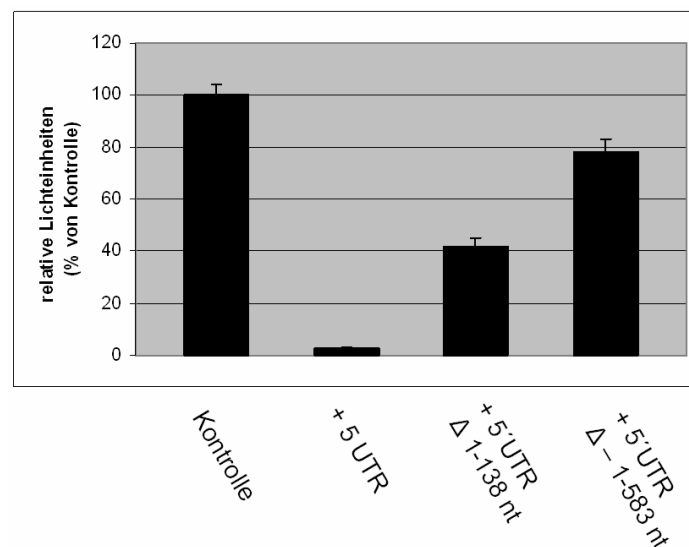


Abbildung 3.23 Analyse der Translationseffizienz von shank1-5'UTR Deletionskonstrukten: *in vitro* transkribierte RNA wurde zur *in vitro* Translation von *Photinus*-Luziferase in Reticulocytenlysat eingesetzt. Die Aktivität der produzierten Luziferase wurde bestimmt und das Verhältnis zur Kontrolle berechnet (n=4).

3.5.4 Regulation der Translationsinitiation über die shank1-5'UTR

Aufgrund der bisherigen Untersuchungen war anzunehmen, daß die shank1-5'UTR die Translation während der Phase der Initiation inhibiert. Zur Klärung dieser Frage wurde eine von Gray und Hentze (1999) entwickelte Methode zur Analyse von mRNA-assoziierten Initiationskomplexen angewandt. Es wurden hierzu ebenfalls *in vitro* Translationsversuche mit Reticulocytenlysats durchgeführt, wobei es jedoch nicht zur Expression des Proteins kam, da die Reaktion bereits nach 5 min gestoppt wurde. Diese Zeit ist ausreichend für die *in vitro* Assemblierung von Initiationskomplexen (Wang et al., 2001; Kozak, 2004). Zusätzlich wurde das Lysat mit Translationsinhibitoren präinkubiert, die diesen Prozeß an definierten Stellen unterbrechen. Auf diese Weise können ribosomale Komplexe in bestimmten Stadien akkumuliert und nach Dichtegradientenzentrifugation quantifiziert werden. Zum Nachweis der Inhibition während der Initiationsphase durch die shank1-5'UTR wurde das Lysat mit Cycloheximid behandelt, welches die Peptidyltransferaseaktivität der 60 S-Ribosomenuntereinheit hemmt und somit zur Anreicherung translationskompetenter 80 S-Ribosomen führt. Es konnte zunächst gezeigt werden, daß die 80 S-Ribosomen nach Zentrifugation und Fraktionierung unter den beschriebenen Bedingungen in den Fraktionen 14-18 zu finden sind. Im Vergleich zur RNA-freien Kontrollreaktion ist die Extinktion bei 260 nm, einer Wellenlänge bei der sowohl Proteine als auch Nucleinsäuren absorbieren, in diesen Fraktionen der Initiationsreaktion deutlich höher (in Relation zu benachbarten Fraktionen; Abb. 3.24 C, D). Weiterhin zeigt eine *Western Blot* Analyse der Fraktionen, daß L7, ein ribosomales Protein der 60 S-Ribosomenuntereinheit, in diesen Fraktionen stark angereichert war (Abb. 3.24 B). Um eine Inhibition der Bildung von 80 S-Ribosomen durch die shank1-5'UTR zu belegen, wurde die RNA mit geringen Mengen ^{32}P -UTP markiert, so daß deren Verteilung über die Fraktionen mittels Szintillationszählung bestimmt werden konnte. Während in der Kontrollreaktion mit Luziferase-mRNA ein deutlicher Anstieg der Radioaktivität in den Fraktionen 14-19 gemessen wurde, blieb dieser bei Verwendung von Luziferase-mRNA mit der fusionierten shank1-5'UTR vollständig aus (Abb. 3.24 A). Hierdurch wird deutlich, daß die shank 5'UTR die Entstehung vollständiger 80S-Ribosomen blockiert und die zuvor beobachtete Inhibition der Translation bereits in der Initiationsphase stattfindet.

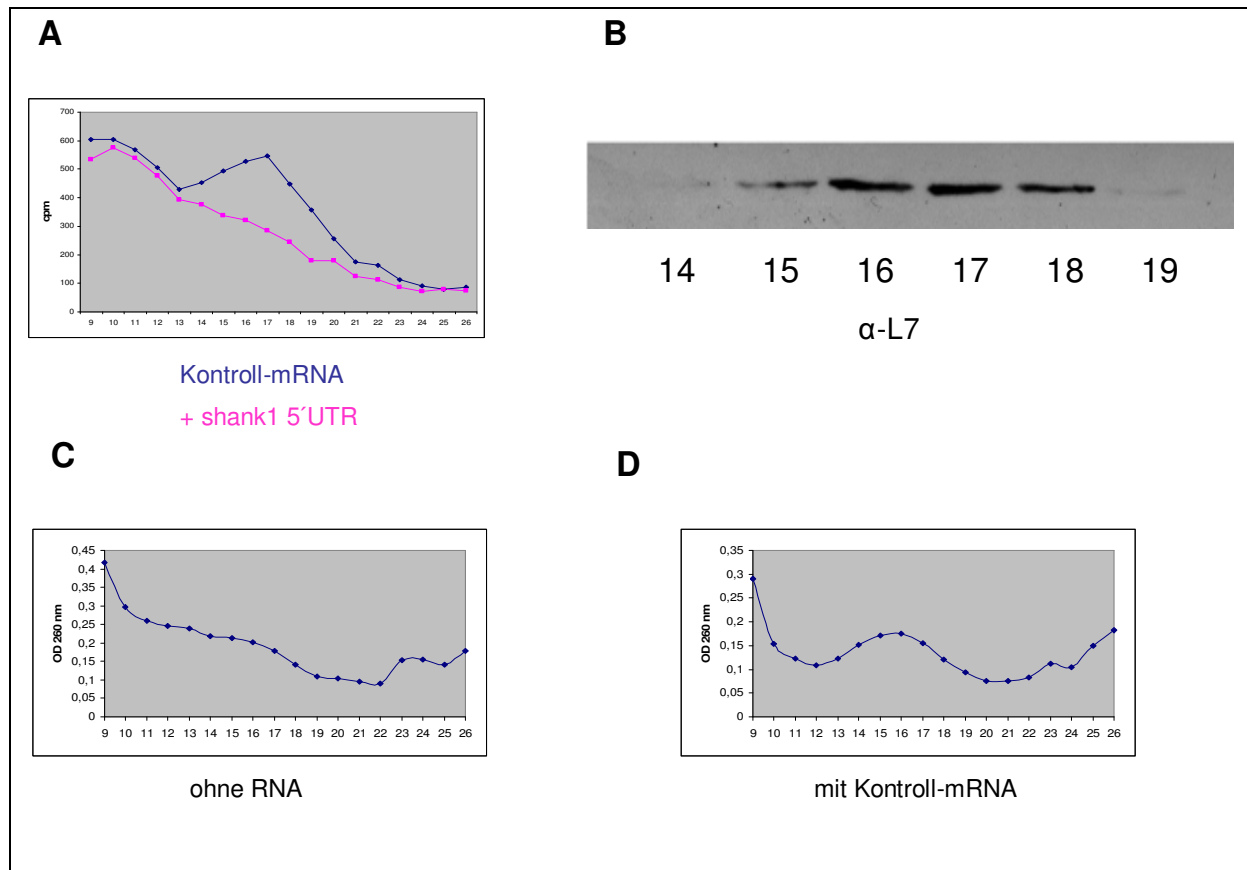


Abbildung 3.24 Analyse von ribosomalen Komplexen (80 S): **A**) Ein mit Cycloheximid präinkubierter *in vitro* Translationsinitiationsansatz (50 μ l) mit *Photinus*-Luziferase mRNA (Kontrolle) und *Photinus*-Luziferase die mit shank1-5'UTR fusioniert war, wurde durch Ultrazentrifugation über einen 5-25 %-igen Sucrosegradienten aufgetrennt und 25 Fraktionen von je 400 μ l von oben ausgehend gesammelt. Die Radioaktivität der Fraktionen wurde durch Szintillationszählung quantifiziert. **B**) *Western Blot* Analysen der Fraktionen mit einem spezifischem Antikörper gegen das L7 Protein der 60S-Ribosomenuntereinheit **C-D**) Nach Präinkubation mit Cycloheximid wurden *in vitro* Translationsreaktionen mit (D) oder ohne (C) Zugabe von Kontroll-RNA wie unter A) beschrieben fraktioniert und die Extinktion der Fraktionen bei 260 nm bestimmt.

In einem weiteren Experiment wurde analysiert in welcher Phase die Initiation durch die shank1-5'UTR beeinträchtigt wird. Ein häufiger Mechanismus, über den die Translation einer mRNA reguliert werden kann ist die Effizienz der Rekrutierung des 43 S-Prä-Initiationskomplexes an das 7'Methyl-Guanosin *cap* der mRNA (Mathews et al., 2000; Sutton und Schuman, 2005). Diese kann auch durch Sekundärstrukturen im vorderen Bereich der 5'UTR negativ beeinflusst sein (Kozak, 1989). Daher wurde untersucht, ob die Bindung des Prä-Initiationskomplexes an eine mRNA *in vitro* von der shank1-5'UTR blockiert wird. Zu diesem Zweck wurde das Reticulocytenslysate mit γ -S-GTP, einem nicht-hydrolysierbaren GTP-Analog, präinkubiert. Die GTP-abhängige Rekrutierung der 60S-Ribosomenuntereinheit am Startcodon ist hierdurch nicht möglich, womit eine Akkumulation von RNA-assoziierten 40S-Ribosomenuntereinheiten erreicht wird. Die Lysate wurden nach der Translationsinitiation wie beschrieben durch Ultrazentrifugation aufgetrennt und fraktioniert. Die 40 S-Ribosomenuntereinheit konnte durch Messung der Extinktion bei 260 nm

(Abb. 3.25 C, D) und *Western Blot* Analysen mit einem Antikörper gegen das assoziierte ribosomale Protein S6 (Abb. 3.25 B) in den Fraktionen 11-15 lokalisiert werden. In diesen Fraktionen konnte während der Experimente mit ^{32}P -UTP-markierter mRNA eine vergleichbare Zunahme der Radioaktivität sowohl in der Kontrolle, als auch bei Einsatz der shank1-5'UTR-Luziferase-mRNA gemessen werden (Abb. 3.25 A). Dies deutet darauf hin, daß die Rekrutierung des Prä-Initiationskomplexes *in vitro* nicht von der 5'UTR beeinflusst wird und der translationsinhibierende Effekt über eine Behinderung des Abtast-Prozesses der 40S-Ribosomemuntereinheit durch Sekundärstrukturen zustande kommt.

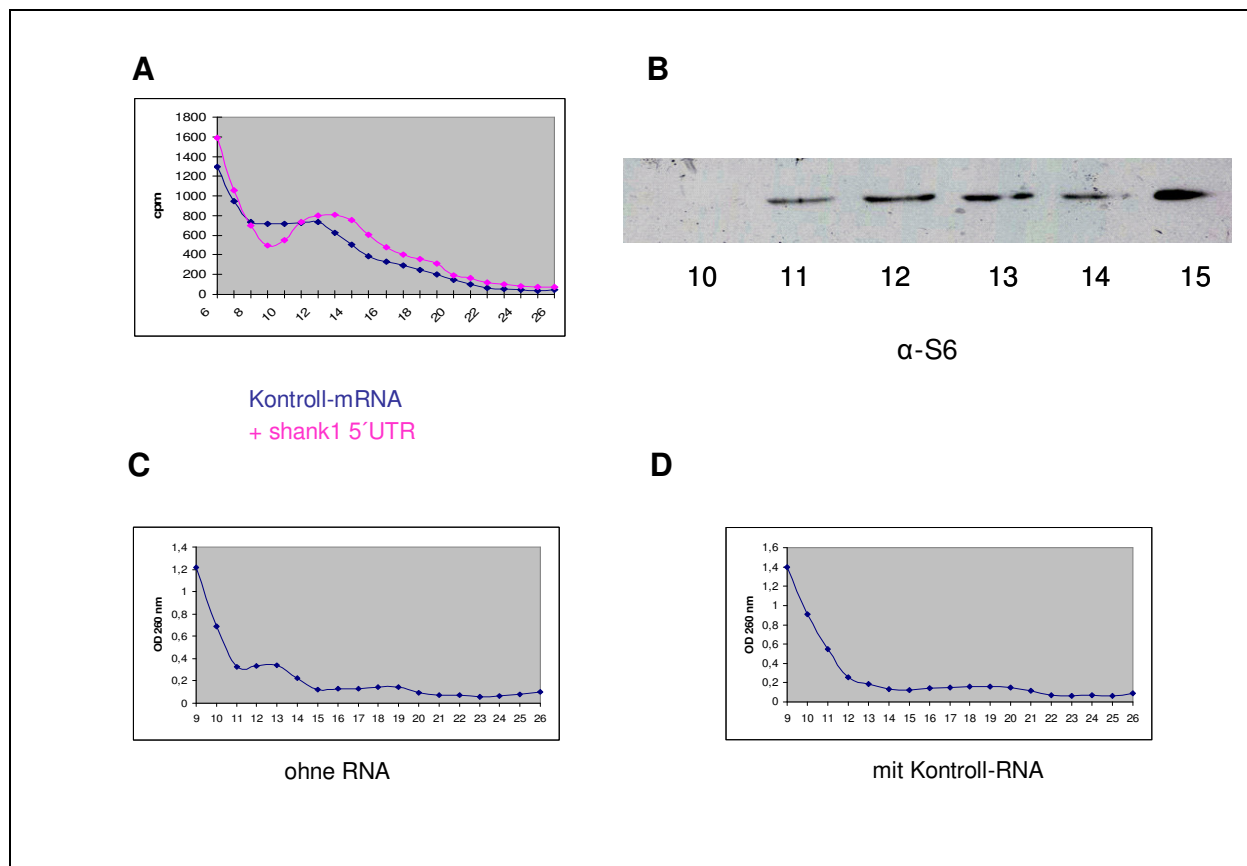


Abbildung 3.25 Analyse von ribosomalen Komplexen (40 S): **A)** Eine mit γ -S-GTP präinkubierte Translationsinitiationsreaktion (50 μl) wurde durch Ultrazentrifugation über einen 5-25 %-igen Sucrosegradienten aufgetrennt und 25 Fraktionen von je 400 μl von oben ausgehend gesammelt. Die Radioaktivität der Fraktionen wurde durch Szintillationszählung quantifiziert. **B)** *Western Blot* Analysen der Fraktionen mit einem spezifischen Antikörper gegen das S6 Protein der 40S-Ribosomenuntereinheit **C-D)** Nach Präinkubation mit γ -S-GTP wurden *in vitro* Translationsreaktionen mit (D) oder ohne (C) Zugabe von RNA wie unter A) beschrieben fraktioniert und die Extinktion der Fraktionen bei 260 nm bestimmt.

3.5.5 Untersuchung der Translationsregulation über shank1 UTRs *in vivo*

Nachdem *in vitro* eine Inhibition der Translation durch die shank1-5'UTR, sowie eine Stimulation durch die 3'UTR belegt werden konnten, wurde überprüft werden ob diese Effekte auch in eukaryotischen Zellen zu beobachten sind.

3.5.5.1 Cotransfektion von Luziferasekonstrukten in HEK 293 Zellen

Hierzu wurden die Luziferase-Konstrukte mit den shank1-UTRs zunächst in den *pCMV*-Vektor subkloniert, der über einen starken Promotor die Expression in Säugerzellen ermöglicht. Um die Expression der *Photinus*-Luziferase zuverlässig messen zu können, ist es notwendig die Effizienz der Transfektion der Zellen mit dem DNA-Konstrukt quantitativ erfassen zu können. Dies wurde mit einer zweiten Luziferase erreicht, die aus einem als Seestiefmütterchen (*Renilla*) bezeichneten Tiefseeorganismus stammt und deren Aktivität von einem anderen Substrat und veränderten Pufferbedingungen abhängt. Mit einem kommerziell erhältlichen System ist es möglich, die Aktivität beider Luziferasen direkt hintereinander in derselben Probe zu messen. Nach Messung der Aktivität der *Photinus*-Luziferase wird der Reaktion der *STOP & GLO*[®]-Puffer mit geeignetem Substrat für die *Renilla*-Luziferase hinzugefügt. Unter diesen Bedingungen kann deren Aktivität gemessen werden, während die Lichtemission durch die *Photinus*-Luziferase nahezu vollständig unterdrückt wird. Durch die Bildung des Quotienten aus den gemessenen Lichteinheiten (*Photinus*:-*Renilla*-Aktivität) ergibt sich ein, gegenüber der Transfektionseffizienz normalisierter Wert, durch den die Translationseffizienz der *Photinus*-Luziferase *in vivo* quantifiziert werden kann. Das offene Leseraster der *Renilla*-Luziferase wurde ebenfalls in den *pCMV*-Vektor kloniert und zusammen mit den shank1-UTR *Photinus*-Luziferase-Konstrukten in HEK293 Zellen transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und die Luziferaseaktivität bestimmt. Durch die Fusion der shank1-5'UTR wurde die Expression der *Photinus*-Luziferase wieder signifikant um mehr als 80 % reduziert. Interessanterweise war hier im Gegensatz zu den *in vitro* Experimenten bei Fusion der *Photinus*-Luziferase-mRNA mit der humanen 3'UTR eine signifikante Reduktion der Expression des Reporter um ~ 20 % zu beobachten. Bei dem Konstrukt das beide UTRs enthielt, war die Expression auf ~ 13 % der Kontrolle reduziert. Dies stellt eine weitere leichte Repression im Vergleich zum 5'UTR Konstrukt dar, die allerdings knapp unterhalb der Signifikanzgrenze liegt ($p = 0,07$; Abb. 3.26).

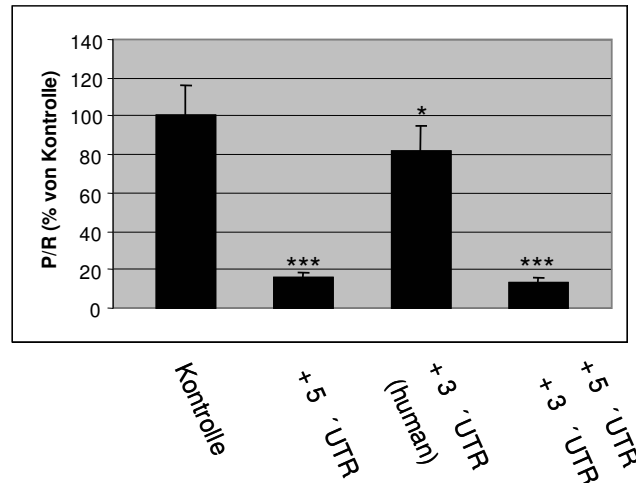


Abbildung 3.26 Auswirkungen der shank1-UTRs auf die Expression eines Reportergens *in vivo*: HEK293 Zellen wurden mit den *Photinus*-Luziferasekonstrukten und dem *Renilla*-Luziferasevektor cotransfiziert und nach 24 h lysiert. Die Expression beider Luziferasen wurde quantifiziert, das Verhältnis der Aktivität von *Photinus*- zu *Renilla*-Luziferase berechnet und ins Verhältnis zur Kontrolle gesetzt (n=8, $p < 0,001$ für das 5'UTR und 5'+3'UTR Konstrukt, $p < 0,05$ für das 3'UTR Konstrukt)

3.5.5.2 Cotransfektion von Luziferasekonstrukten in cortikale Neuronen

Im einem nächsten Schritt wurde die Expressionseffizienz der Reporterkonstrukte in neuronalen Zellen untersucht. Hierzu wurden 7 Tage alte Kulturen von embryonalen Cortex-Neuronen aus *R. norvegicus* mit den *Photinus*-Luziferasekonstrukten und dem *Renilla*-Luziferasevektor cotransfiziert. 24 h später wurden die Zellen lysiert und die Aktivität der Luziferasen quantifiziert. Die shank1-5'UTR führt hierbei wiederum zu einer signifikanten Reduktion der Expression auf etwa 40 % der Kontrollreaktion. Durch Fusion der *Photinus*-Luziferase-mRNA mit der humanen 3'UTR kam es zu keinen signifikanten Änderungen der Expression. Auffallend bei diesen Experimenten ist die erhebliche Standardabweichung von bis zu 30 % des Mittelwertes, die Auskunft über die verhältnismäßig große Streuung der Meßwerte gibt (Abb. 3.27). Des weiteren kann bei diesen Experimenten nicht ausgeschlossen werden, daß den beobachteten Differenzen auch unterschiedliche Transkriptionsraten zugrundeliegen. Da weniger drastische Effekte, als die Inhibition durch die 5'UTR bei dieser Varianz nur sehr schwer festgestellt werden können, wurde ein System etabliert, welches eine Messungen der Translationseffizienz in Neuronen mit höherer Genauigkeit ermöglicht.

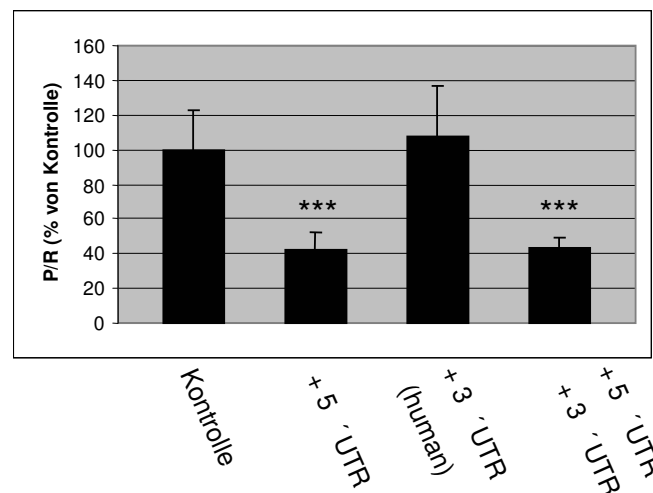


Abbildung 3.27 Auswirkungen der shank1-UTRs auf die *in vivo* Expression eines Reportergens in Neuronen: Embryonale Cortex-Neurone wurden nach 7 Tagen in Kultur mit den *Photinus*-Luziferasekonstrukten und dem *Renilla*-Luziferasevektor cotransfiziert und 24 h später lysiert. Die Expression beider Luziferasen wurde quantifiziert, das Verhältnis der Aktivität von *Photinus*- zu *Renilla*-Luziferase berechnet und ins Verhältnis zur Kontrolle gesetzt (N=8, $p < 0,001$ für das 5'UTR- und 5'+3'UTR-Konstrukt, $p > 0,05$ für das 3'UTR Konstrukt).

3.5.5.3 Konstruktion und Transfektion von dicistronischen Luziferasekonstrukten

Um die beschriebenen Schwierigkeiten zu umgehen wurden dicistronische Konstrukte hergestellt, in deren 5'-Region eine offenes Leseraster für die *Photinus*-Luziferase liegt, neben das die humane 5'UTR bzw. die ersten 588 nt der 3'UTR von *R. norvegicus* subkloniert wurden. Auf demselben RNA-Strang folgt eine, aus dem Encephalomyocarditis-Virus (EMCV) stammende, *Internal Ribosomal Entry Site* (IRES), über welche das in 5'-Richtung gelegene offene Leseraster der *Renilla*-Luziferase *cap*-unabhängig translatiert werden kann (Abb. 3.28 A). Die Effizienz des IRES-vermittelten Ribosomeneintritts (und des *leaky scanning*) wird durch Modifikationen im 5' gelegenen Bereich der mRNA nicht beeinflusst, womit die Aktivität der *Renilla*-Luziferase als interne Kontrolle auf derselben RNA verwendet werden kann (Myers et al., 2004). Bei der Bestimmung der Expressionseffizienz der Luziferase-Konstrukte in kortikalen Neuronen wurde durch die Nutzung dieser dicistronischen Vektoren eine deutliche Reduktion der Standardabweichung auf ca. 5 bis 10 % des Mittelwertes erreicht. Bei Gegenwart der shank1-5'UTR vor dem *Photinus*-Luziferase Leseraster wurde eine Reduktion der Translation um mehr als 90 % beobachtet. Wie bei der Cotransfektion von HEK293 Zellen zeigte auch dieser Versuch eine translationsinhibierende Wirkung der 3'UTR. Durch die Klonierung der ersten 588 nt der 3'UTR hinter das Leseraster der *Photinus*-Luziferase wurde deren Translation signifikant um ~ 25 % vermindert. Die Translationsinhibition durch die 5'UTR konnte somit *in vivo* belegt werden. Im Gegensatz zu den *in vitro* Experimenten, bei denen die 3'UTR eine Stimulation

der Translation bewirkte, konnte *in vivo* eine signifikante Reduktion in der Expression der *Photinus*-Luziferase beobachtet werden. Die Versuche ein dicistronisches Konstrukt zu erhalten, das sowohl die humane 5'UTR als auch Teile der 3'UTR von *R. norvegicus* beinhaltet, waren nicht erfolgreich.

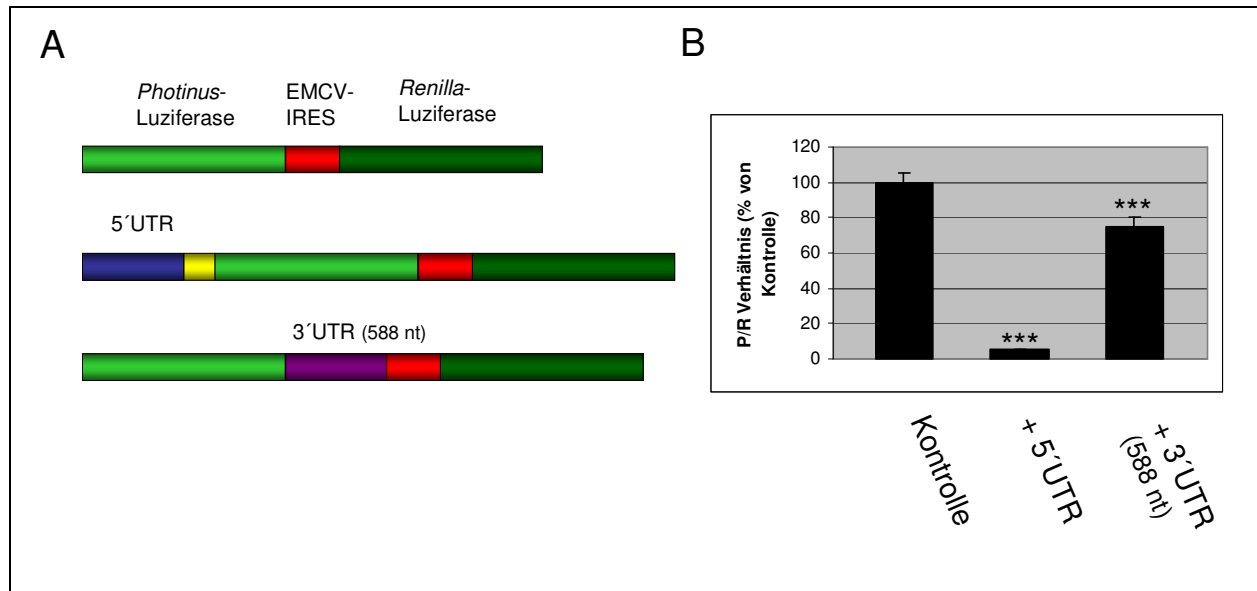


Abbildung 3.28 Auswirkungen der shank1-UTRs auf die *in vivo* Expression von dicistronischen Luziferasekonstrukten in Cortex-Neuronen **A**) schematische Darstellung der verwendeten dicistronischen Luziferasekonstrukte mit der humanen 5'UTR bzw. den ersten 588 nt der 3'UTR von *R. norvegicus* (gelb= uAUG N-Terminus) **B**) Embryonale Cortex-Neurone wurden nach 7 Tagen in Kultur mit den dicistronischen Luziferasekonstrukten transfiziert und nach 24 h lysiert. Die Expression der Luziferasen wurde quantifiziert, das Verhältnis der Aktivität von *Photinus*- zu *Renilla*-Luziferase berechnet und ins Verhältnis zur Kontrolle gesetzt (5'UTR-Konstrukt: n=8, p<0,001; 3'UTR-Konstrukt: n=8; p<0,001).

3.5.6 Interne Initiation in der shank1-5'UTR

Neben der *cap*-abhängigen Initiation der Translation existiert ein weiterer Mechanismus, über den 40 S-Ribosomenuntereinheiten an die 5'UTR einer mRNA rekrutiert werden können. Hierzu dienen Sequenzbereiche, die einzigartige Sekundärstrukturen ausbilden und als *Internal Ribosomal Entry Site* (IRES) bezeichnet werden. Diese interne Initiation ist von, in 5'-Richtung gelegenen, stabilen Sekundärstrukturen und uORFs/uAUGs nicht beeinträchtigt und stellt somit eine mögliche Erklärung für die gelegentlich beobachtete effiziente Translation von eukaryotischen mRNAs mit einer sekundärstruktur- und uORF/uAUGreichen 5'UTR dar (VanDongen und VanDongen, 2004). Des weiteren wiesen Pinkstaff et al. (2001) eine interne Translationsinitiation von fünf dendritisch lokalisierten mRNAs nach. Dobson et al. (2005) demonstrierten dies ebenfalls für die dendritisch lokalisierte mRNA des BDNF-Rezeptors TrkB. Da anzunehmen ist, daß für die Inhibition der Translationsinitiation durch die shank1-5'UTR die ausgeprägte Sekundärstruktur ursächlich ist, wurde untersucht,

ob auch hier eine interne Initiation über ein IRES-Element möglich ist. Hierzu wurden ebenfalls dicistronische Luziferase-Konstrukte eingesetzt, in deren multiple Klonierungsstelle zwischen den offenen Leserastern 5'UTR Sequenzen subkloniert wurden, die auf eine interne Initiation hin untersucht werden sollten. Die Aktivität der 5'gelegenen *cap*-abhängig translatierten *Photinus*-Luziferase wurde hierbei als Kontrolle zur Normalisierung gegen die Transfektionseffizienz verwendet. Eine interne Initiation kann mit diesen Konstrukten durch eine gesteigerte Translation der *Renilla*-Luziferase im Verhältnis zum Leervektor aufgezeigt werden. Bei der Kontrollreaktion kommt es aufgrund von *leaky scanning* oder Reinitiation im Bereich der multiplen Klonierungsstelle zu einer basalen Expression der *Renilla*-Luziferase. Die 5'UTR des *activity-regulated gene*, von der Pinkstaff et al. (2001) eine interne Initiation in Neuronen belegen konnten, wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Es wurden zwei verschiedene Konstrukte mit der shank1-5'UTR hergestellt. Während die *Renilla*-Luziferase einerseits durch das *in frame* uAUG teilweise als Fusionsprotein mit der shank1 5'codierenden Region exprimiert wird, wurde dies in dem anderen Konstrukt artifiziell *out of frame* gesetzt. Mit dieser Strategie sollte die Position einer eventuell vorhandenen IRES lokalisiert werden. Liegt die IRES in 5'Richtung vom uAUG so wäre kein Unterschied in der Translationseffizienz von *in frame*- und *out of frame* uAUG- mRNA zu erwarten. Liegt diese jedoch in 3'Richtung vom uAUG, so wäre von einer Reduktion der *Renilla*-Luziferaseaktivität bei dem *out-of frame* uAUG-Konstrukt im Vergleich zum *in frame* uAUG-Konstrukt auszugehen, da keine funktionsfähige Luziferase von diesem Startcodon ausgehend translatiert wird (Abb. 3.29 A). Cortikale Neuronen wurden 24 h nach der Transfektion mit diesen Konstrukten lysiert und die Expression der Luziferasen quantifiziert. Die gegenüber der Transfektionseffizienz normalisierte Expression der *Renilla*-Luziferase ergibt sich aus dem Quotienten *Renilla*-: *Photinus*-Luziferaseaktivität. Bei dem arc 5'UTR Konstrukt wurde die interne Initiation durch eine ~ 2,5 fachen Induktion der *Renilla*-Luziferase Translation nachgewiesen. Mit den shank 5'UTR Konstrukten wurde eine deutliche Reduktion der *Renilla*-Aktivität auf ~ 10 % (*out of frame* uAUG) bzw. ~ 25 % (*in frame* uAUG) der Kontrolle beobachtet (Abb. 3.29 B). Im Gegensatz zu einer internen Initiation wurde somit lediglich eine Inhibition der basalen Translation durch die shank1-5'UTR nachgewiesen, wobei das *out of frame* uAUG zu einer weiteren Verstärkung der Repression führte, wie bei *cap*-abhängiger Translation anzunehmen ist. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die ausgeprägte Sekundärstruktur der shank1-5'UTR nicht durch IRES-Elemente übergangen werden kann und shank1 nicht zu der Gruppe dendritisch lokalisierter mRNAs gehört, deren Translation intern initiiert werden kann.

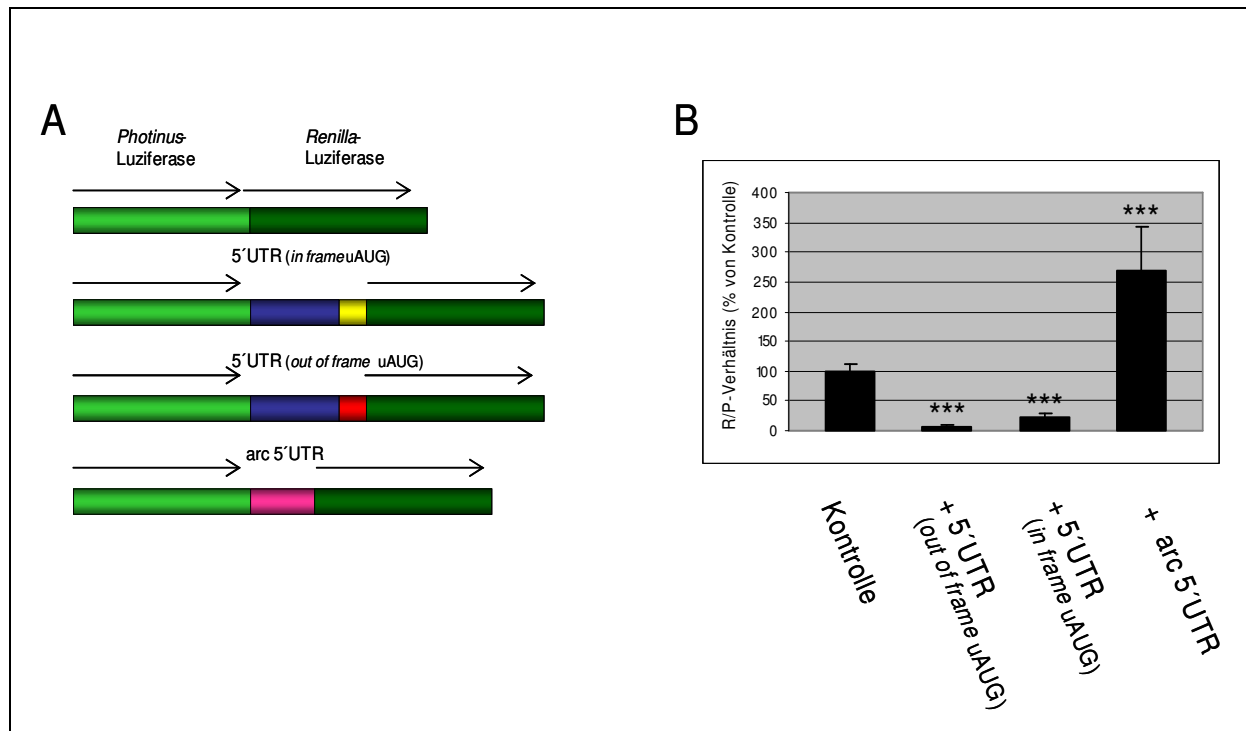


Abbildung 3.29 Untersuchung der shank1-5'UTR auf interne Translationsinitiation: **A)** schematische Darstellung der eingesetzten dicistronischen Konstrukte **B)** Embryonale Cortex-Neurone wurden nach 7 Tagen in Kultur mit den dicistronischen Luziferase-Konstrukten transfiziert und 24 h später lysiert. Die Expression der Luziferasen wurde quantifiziert, das Verhältnis der Aktivität von *Renilla*- zu *Photinus*-Luziferase berechnet und ins Verhältnis zur Kontrolle gesetzt (n=4).

3.6 Beeinflussung der neuronalen Translation durch exogene Stimuli

In den letzten 5 Jahren konnte in einer Vielzahl von Arbeiten gezeigt werden, daß die lokale Translation von dendritischen mRNAs von externer Stimulation beeinflusst wird. Krichevsky und Kosik (2001) wiesen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen die Deassemblierung von mRNP-Partikel nach Depolarisation von Neuronen mit Kaliumchlorid nach. Ein rapider und selektiver Anstieg der Translation dendritischer CaMKII-mRNA nach kurzer Aktivierung von N-methyl-D-aspartat (NMDA)-Rezeptoren wurde von Scheetz et al. (2000) beschrieben. Neben synaptischer Aktivität spielen neurotrophe Signale eine essentielle Rolle in der Regulation lokaler dendritischer Translation, wobei ein synergistischer Zusammenhang postuliert wird, in dem sich beide Mechanismen gegenseitig beeinflussen (Steward und Schuman, 2001; Sutton und Schuman, 2005). Daher wurde untersucht ob mit verschiedenen Stimulationsprotokollen, die nach Literaturangaben einen Einfluß auf die Translationseffizienz in Neuronen haben, eine Veränderung in der Translation der *Photinus*-Luziferase der dicistronischen Reporterkonstrukte ausgelöst werden kann.

3.6.1 Wirkung von BDNF auf die Translation der shank UTR Reporterkonstrukte

Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) gehört zu der Familie der neurotrophen Wachstumsfaktoren. Dies 28 kD Protein ist der Ligand der Tyrosinrezeptor-Kinase B (TrkB) und von wesentlicher Bedeutung für das Wachstum und Überleben von Neuronen (Barbacid, 1994; Lessmann et al., 2003). Hauptsächlich ist BDNF in Regionen aktiv, die in höhere Hirnfunktionen wie Lernen, Gedächtnis und Kognition involviert sind; hierzu zählen insb. Cortex, Hippocampus und basales Vorderhirn (McKay et al., 1999). Beispielsweise zeigten McAllister et al. 1997 daß, die Applikation von BDNF zur verstärkten Bildung von dendritischen Fortsätzen in Hippocampus-Neuronen führt. In den letzten Jahren ist aufgrund mehrerer Studien ein starkes Interesse an BDNF als Regulator synaptischer Plastizität aufgekommen (Tyler und Pozzo-Miller, 2003; Kang und Schuman, 1996; Zhang und Poo, 2002, Huber et al., 2000). Yin et al. (2001) wiesen die selektive Stimulation der Translation des *activity-regulated gene* durch BDNF in präparierten Synaptoneurosomen nach. Die lokale dendritische Translation eines GFP-Reporterkonstruktes mit der 3'UTR der CaMKII als *cis*-agierendes Transportelement, wurde durch Applikation von BDNF gesteigert (Aakalu et al., 1999). Des weiteren wurde in einer Studie von Jourdi et al. (2003) die spezifische Induktion von Proteinen der PSD, unter anderem dem *synapse associated protein-97* (SAP-97) und *glutamate receptor interacting protein 1* (GRIP1), durch BDNF belegt. Vor diesem Hintergrund ergab sich die Frage, ob die shank1-mRNA ebenfalls einer Regulation durch BDNF unterliegt und diese durch Veränderungen in der Expression der dicistronischen Reporterkonstrukte aufgezeigt werden kann. Nach 7 Tagen Kulturdauer wurden cortikale Neuronen mit diesen Konstrukten transfiziert, 24 h später mit 50 ng/ml BDNF (Strathmann) für 2 h stimuliert und direkt im Anschluß lysiert. In der Kontrollreaktion und auch bei Einsatz des 5'UTR Konstruktes bewirkte diese Behandlung eine leichte, aber nicht signifikante Steigerung der *Photinus*-Luziferaseaktivität um 5–10 %. Eine signifikante Induktion durch die Applikation von BDNF konnte hingegen bei dem 3'UTR Konstrukt beobachtet werden. Die Expression der *Photinus*-Luziferase wurde von ca. 80 % des Kontrollwertes auf etwas über 100 % gesteigert und die zuvor *in vivo* beobachtete Translationsrepression durch die 3'UTR somit aufgehoben (Abb. 3.30 A). Im Vergleich wurde die Wirkung einer längerfristigen Applikation von BDNF auf die Menge der endogenen shank Proteine durch *Western Blot* Analysen untersucht. Zu diesem Zweck wurden Kulturen cortikaler Neuronen für 48 h mit 50 ng/ml BDNF stimuliert und in RIPA-Puffer lysiert. Anschließend wurden die shank Proteine mit einem gegen die PDZ-Domäne gerichteten Antikörper detektiert. Zur internen Kontrolle der geladenen Gesamtproteinmenge wurde auf derselben Membran α -Tubulin

immunologisch nachgewiesen. Es wurde hierbei eine deutliche Zunahme der shank-Proteinmenge beobachtet (Abb. 3.30 B), die allerdings nicht zwingend auf eine gesteigerte Translation schließen läßt. Diese Experimente deuten auf eine Regulation der shank-Proteine durch BDNF hin, die offenbar eine durch die 3'UTR-vermittelte Stimulation der Translation umfaßt.

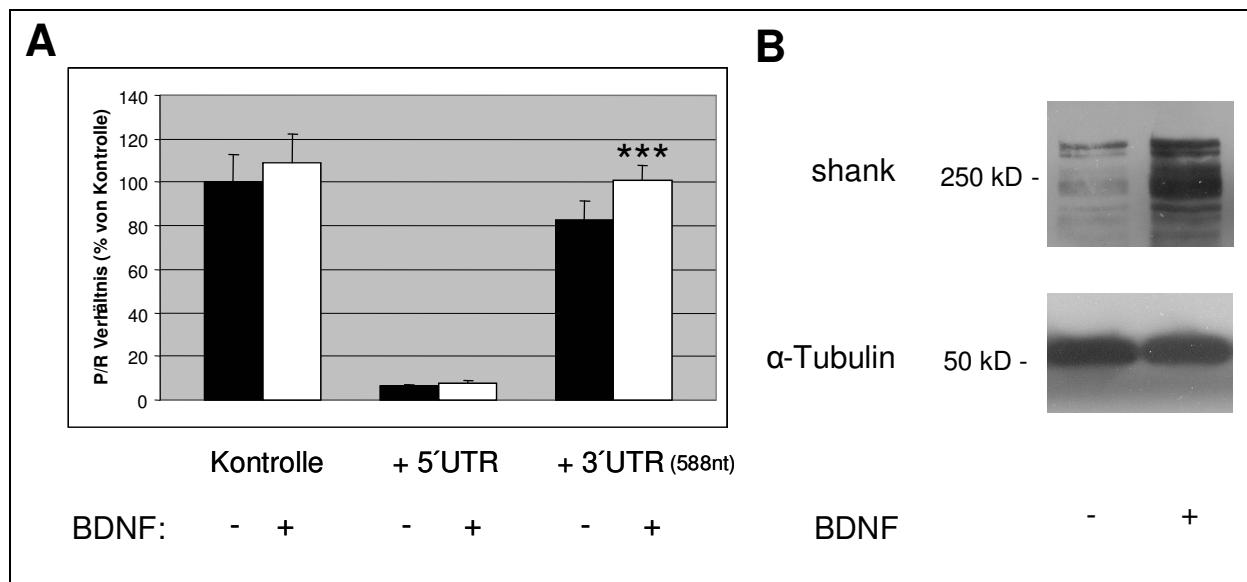


Abbildung 3.30 Einfluß von BDNF auf die Translation der dicistronischen Luziferasekonstrukte **A**) Embryonale Cortex-Neurone wurden nach 7 Tagen in Kultur mit den dicistronischen Luziferase-Konstrukten transfiziert und nach 24 h für 2 h mit 50 ng/ml BDNF stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Luziferase-Aktivität quantifiziert. Das Verhältnis der Aktivität von *Renilla*- zu *Photinus*-Luziferase wurde berechnet und ins Verhältnis zur Kontrolle gesetzt ($n=6$; $p>0,05$ für die Kontrolle und das 5'UTR-Konstrukt, $p<0,001$ für das 3'UTR-Konstrukt). **B**) Embryonale Cortex-Neurone wurden nach 7 Tagen in Kultur für 48 h mit 50 ng/ml BDNF inkubiert und anschließend lysiert. Mit dem Zelllysate wurden Western Blot Analysen mit einem polyklonalen Antikörper aus Kaninchen gegen die PDZ-Domäne der shank-Proteine durchgeführt. Als interne Kontrolle wurde α -Tubulin mit einem monoklonalen murinen Antikörper nachgewiesen.

3.6.2 Unabhängigkeit der BDNF-induzierten Translationsstimulation von mTOR

Takei et al. fanden 2001 mehrere Signaltransduktionswege, mittels derer BDNF eine verstärkte Translation in Neuronen initiieren kann. Hierbei wurde die durch BDNF-induzierte verstärkte Inkorporation radioaktiv markierter Aminosäuren durch spezifische Kinase-Inhibitoren unterdrückt. Insbesondere die Blockade von *Phosphatidylinositol-3-Kinase* (PI3K), *Mitogen-activated protein Kinase* (MAPK) oder *mammalian target of rapamycin* (mTOR) zeigten dort starke Auswirkungen (siehe auch Righi et al., 2000). mTOR, eine evolutionär konservierte Proteinkinase, integriert die Signale von Nahrungsstoffen sowie, bei höheren Eukaryoten, Wachstumsfaktoren und stimuliert die Translation spezifischer mRNAs. Über diesen Weg wird u.a. eine Regulation des Zellwachstum und -zyklus ausgeübt (Gingras et al., 2001; Fingar und Blenis, 2004). Der Beitrag dieses Signaltansduktionsweges für die

Ausbildung langanhaltender synaptischer Plastizität konnte in mehreren Studien belegt werden (Tang et al., 2001; Cammalleri et al., 2003; Takei et al., 2004). Mittels *Array*-Analysen belegten Schratt et al. (2004) die verstärkte Translation spezifischer mRNAs in kortikalen Neuronen nach Applikation von BDNF. Von ca. 3500 nachweisbaren Transkripten wurden 162 durch Stimulation mit BDNF induziert. Bei 79 dieser Gene blieb diese Induktion nach vorheriger Behandlung der Neuronen mit Rapamycin, einem spezifischem Inhibitor von mTOR, vollständig aus. Es wurde daher untersucht werden, ob die zuvor beobachtete Stimulation der *cap*-abhängigen Translation von mRNA mit der shank1-3'UTR durch BDNF von der Funktionalität der mTOR Kinase abhängig ist. Zu diesem Zweck wurden cortikale Neuronen wie beschrieben transfiziert und mit BDNF stimuliert. Zusätzlich wurden einige der Kulturen vor der Zugabe von BDNF eine Stunde lang mit 20 ng/ml Rapamycin präinkubiert. Während die Applikation von BDNF wieder zu einem signifikanten Anstieg der *Photinus*-Luziferase Translation bei dem 3'UTR-Konstrukt führte, wurden keine Auswirkung von Rapamycin auf diese Induktion festgestellt (Abb. 3.31 A).

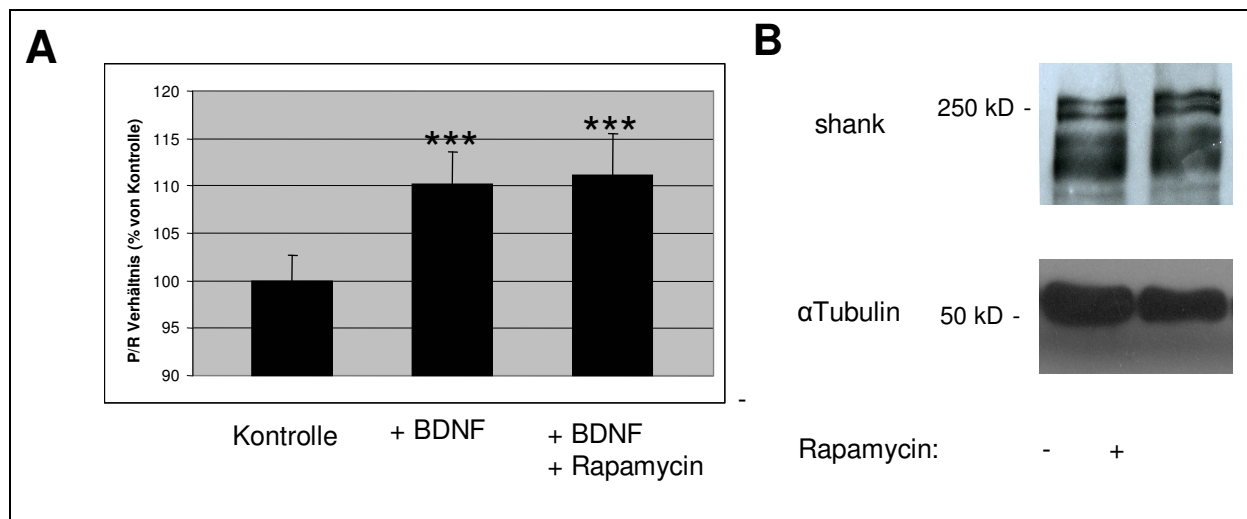


Abbildung 3.31 Unabhängigkeit der BDNF-induzierten Translationsstimulation der shank1-3'UTR-Reporter-mRNA von Rapamycin (bzw. mTOR): **A**) Embryonale Cortex-Neuronen wurden nach 7 Tagen in Kultur dem dicistronischen 3'UTR-Luziferasekonstrukt transfiziert; 23 h später wurde $\frac{1}{3}$ der Kulturen mit 20 ng/ml Rapamycin inkubiert und nach 1 h $\frac{2}{3}$ der Kulturen mit 50 ng/ml BDNF für 2 h stimuliert. Die Zellen wurden anschließend lysiert und die Expression der Luziferasen quantifiziert. Das Verhältnis der Aktivität von *Photinus*- zu *Renilla*-Luziferase wurde berechnet und ins Verhältnis zur Kontrolle gesetzt (n=6; p<0,001 für die Kontrolle und + BDNF; p>0,05 für + BDNF und +BDNF/+Rapamycin) **B**) Embryonale Cortex-Neurone wurden nach 7 Tagen in Kultur für 48 h mit 20 ng/ml Rapamycin inkubiert und anschließend lysiert. Mit den Lysaten wurden *Western Blot* Analysen mit einem polyklonalen Antikörper aus Kaninchen gegen die PDZ-Domäne der shank-Proteine durchgeführt. Als interne Kontrolle wurde α -Tubulin mit einem monoklonalen murinen Antikörper nachgewiesen.

Zur Untersuchung einer langfristigen Beeinflussung der endogenen shank-Proteinmenge wurden *Western Blot* Analysen von Neuronenkulturen nach 48 h Inkubation mit 20 ng/ml Rapamycin durchgeführt. Hierbei waren ebenfalls keine Veränderungen der Signale zu beobachten (Abb. 3.31 B). Die Abhängigkeit der BDNF-induzierten Stimulation der Translation von shank1-mRNA von mTOR konnte somit nicht nachgewiesen werden.

3.6.3 Einfluß einer Depolarisation mit Kaliumchlorid auf die neuronale Translation

Die Wirkung erhöhter neuronaler Aktivität durch Applikation von Glutamat oder Depolarisation mit Kaliumchlorid auf die Translation in Nervenzellen wurde in einigen Studien untersucht, wobei zunächst widersprüchliche Resultate erzielt wurden. Einerseits wurde demonstriert, daß die Applikation von Glutamat bei Hirnschnitten und Neuronenkulturen den Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren stark inhibiert (Orrego und Lipman, 1967; Vornov und Coyle, 1991; Marin et al., 1997). Ebenso konnten auch entgegengesetzte Effekte beobachtet werden. Krichevsky und Kosik (2001) sowie Schratt et al. (2004) zeigten, daß die Depolarisation von kortikalen Neuronen durch Kaliumchlorid (KCl) eine verstärkte Assoziation von mRNAs mit Polysomen zur Folge hat. Des weiteren wird offenbar sowohl die Transportgeschwindigkeit der dendritischen mRNPs, als auch deren lokale Translation durch Depolarisation gesteigert (Rook et al., 2000; Krichevsky und Kosik, 2001; Tiruchinapalli et al., 2003; Grigstone et al. 2005).

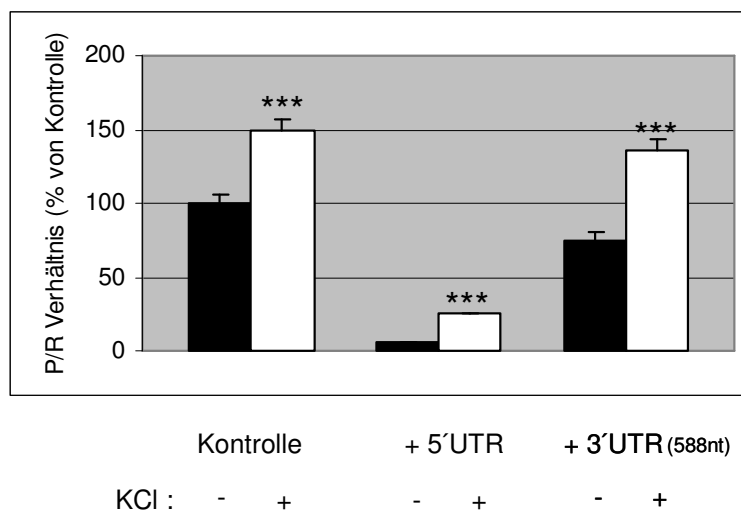


Abbildung 3.32 Einfluß von KCl-vermittelter Depolarisation auf die Expression der dicistronischen Luziferasekonstrukte: 7 Tage nach der Präparation wurden embryonale Cortex-Neuronen mit den Konstrukten transfiziert, nach 24 h für 2h mit 30 mM KCl depolarisiert und für weitere 3h in normalem Medium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Expression der Luziferasen quantifiziert. Das Verhältnis der Aktivität von *Photinus*-Luziferase zu *Renilla*-Luziferase wurde berechnet und ins Verhältnis zur Kontrolle gesetzt (n=4, p<0,001 für alle Messungen).

Daher wurde ein möglicher Effekt der Depolarisation von Neuronenkulturen mit KCl auf die Expression der dicistronischen Luziferasekonstrukte untersucht. Hierzu wurden cortikale Neuronen für 2 h mit einer Konzentration von 30 mM KCl behandelt und nach Wechsel des Mediums für weitere 3 h kultiviert. In der Kontrollreaktion konnte ein Anstieg der *Photinus*-Luziferase Expression um ~ 50 % beobachtet werden. Bei dem 3'UTR Konstrukt erhöhte sich der Wert von ~ 80 % auf ~140 % der Kontrolle; dies entspricht einer Induktion um das 1,5- bzw. 1,75-fache. Bei der 5'UTR-Luziferase-mRNA ergab sich eine Steigerung von ~ 5 % auf ~ 25 % der Kontrolle (Abb. 3.32) und somit eine 5-fache Induktion.

3.6.4 Aktivitätsabhängiger Umbau der postsynaptischen Dichte

In einer Studie von Ehlers (2003) konnten langanhaltende Veränderungen in der Zusammensetzung der PSD unter der Kontrolle synaptischer Aktivität aufgezeigt werden. Diese Remodellierung ging einher mit einer abgeänderten *turn-over* Rate synaptischer Proteine und einer Veränderung des Ubiquitin-vermittelten Abbaus durch das 26 S Proteasom. Im Falle von shank führte eine Blockade der Aktionspotentiale mit Hilfe von Tetrodotoxin (TTX) zu einer geringfügigen Zunahme der Proteinmenge. Bei einer Steigerung der neuronalen Aktivität durch 48-stündige Inkubation mit dem GABA-Rezeptor Antagonisten Bicucullin ließ sich der entgegengesetzte Effekt, eine Verringerung der shank-Proteinmenge, erzielen. Zugleich wurde eine verminderte bzw. verstärkte Ubiquitinylierung von shank und folglich ein erhöhter Abbau über das 26 S Proteasom bei gesteigerter neuronaler Aktivität nachgewiesen. Hierbei war von Interesse, ob es im Zuge der Remodellierung der PSD ausschließlich zu einem aktivitätsregulierten Abbau der shank Proteine kommt oder dieser von Veränderungen in der Translationseffizienz begleitet ist. Zu diesem Zweck wurden die dicistronischen shank1-UTR Konstrukte in cortikale Neuronen transfiziert, die am nächsten Tag für 9,5 h mit 2 µM TTX (*Tocris*) inkubiert wurden. Bei der folgenden Quantifizierung der Luziferase-Aktivität war ein leichter, nicht signifikanter Anstieg der Translation der *Photinus*-Luziferase in allen Ansätzen zu verzeichnen (Abb. 3.33 A). Des weiteren wurden cortikale Neuronen für 48 h mit 15 bzw. 20 µM TTX im Zellmedium kultiviert und die endogenen shank-Proteine mittels *Western Blot* nachgewiesen; als interne Kontrolle diente α -Tubulin. Eindeutige Veränderungen der shank-Proteinmenge konnten hierbei nicht gezeigt werden (Abb. 3.33 B, siehe auch Ehlers, 2003). Im Gegensatz dazu wurde nach Inkubation der Neuronen mit 40, 100 oder 200 µM Bicucullin (*Tocris*) für 48 h in einer anschließenden *Western Blot* Analyse eine konzentrationsabhängige Reduktion der shank-Proteinmenge

nachgewiesen (Abb. 3.33 D). Um kurzfristige Auswirkungen einer, durch Blockade von GABA-Rezeptoren ausgelösten, gesteigerten neuronalen Aktivität auf die Translation der Luziferasekonstrukte zu untersuchen, wurden cortikale Neuronenkulturen für 2 h mit 40 μ M Bicucullin stimuliert. Hierbei war zwar ein allgemeiner Anstieg der *Photinus*-Luziferase Translation, jedoch keine spezifische Auswirkung auf die Expression der shank1-UTR-Konstrukte nachzuweisen (Abb. 3.33 C). Die Induktion war bei den Kontrollmessungen und Einsatz des 5'UTR-Konstruktes signifikant und lag beim 3'UTR-Konstrukt knapp unterhalb der Signifikanzgrenze ($p = 0,08$). Unter den Stimulationsbedingungen, die zu einer Beeinflussung des Proteasom-abhängigen Abbaus von PSD Proteinen führen, wurden somit keine spezifischen Veränderungen in der der Translation von shank1 nachgewiesen.

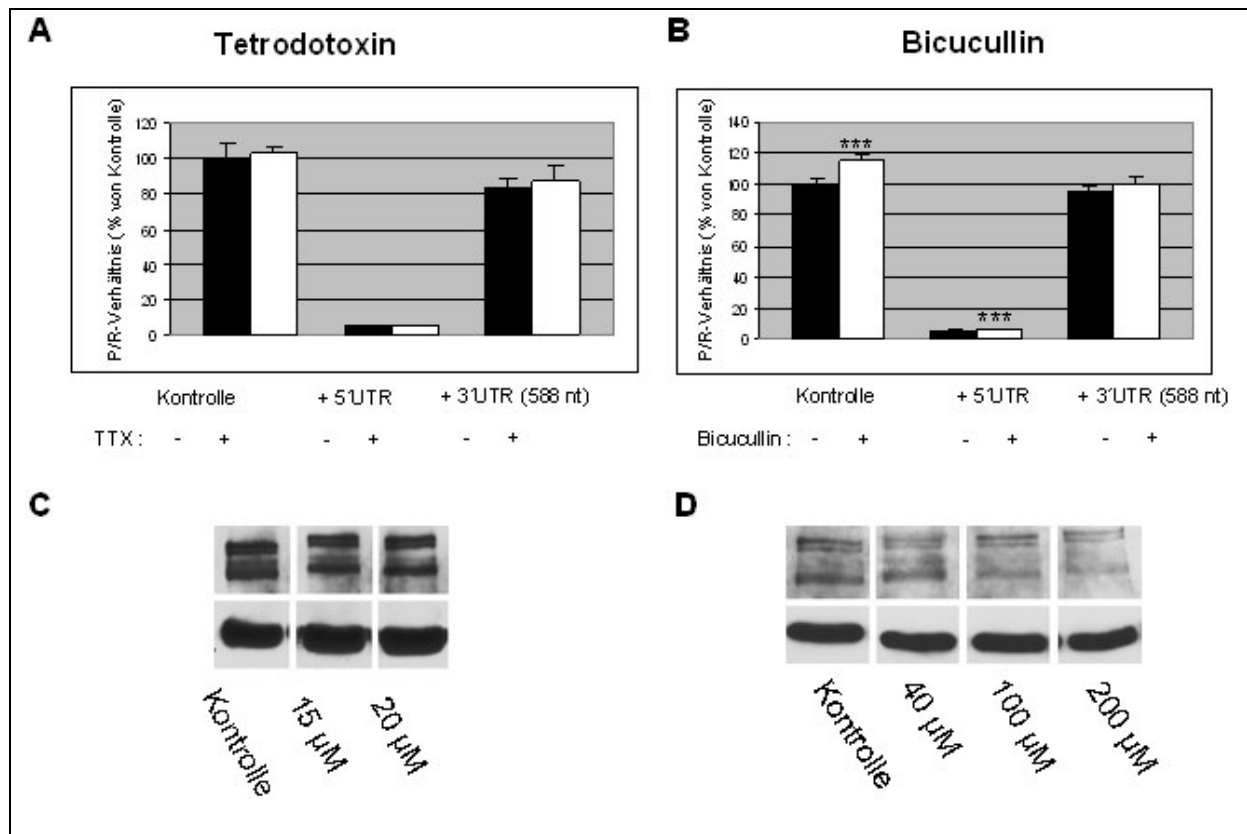


Abbildung 3.33 Auswirkungen einer durch spezifische Inhibitoren modifizierten neuronalen Aktivität auf die Expression der dicistronischen Reporterkonstrukte und die Gesamtproteinmenge von shank: **A-B**) Embryonale Hippocampus-Neuronen wurden 7 Tage nach der Präparation mit den dicistronischen Konstrukten transfiziert und nach 13,5 h für 9,5 h mit 2 μ M Tetrodotoxin (A) bzw. nach 24 h für 2 h mit 40 μ M Bicucullin (B) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend lysiert und die Expression der Luziferasen quantifiziert. Das Verhältnis der Aktivität von *Photinus*- zu *Renilla*-Luziferase wurde berechnet und ins Verhältnis zur Kontrolle gesetzt (TTX: $n=8$, $p>0,05$ für alle Messungen; Bicucullin: $N=6$, $p<0,001$ für die Kontrolle und das 5'UTR Konstrukt, $p>0,05$ für das 3'UTR Konstrukt) **C-D**) Embryonale Cortex-Neurone wurden nach 7 Tagen in Kultur für 48 h mit 15-20 μ M Tetrodotoxin bzw. 40-200 μ M Bicucullin inkubiert und direkt im Anschluß lysiert. Mit den Zelllysaten wurden Western Blot Analysen mit einem polyklonalen Antikörper aus Kaninchen gegen die PDZ-Domäne der shank Proteine durchgeführt. Als interne Kontrolle wurde α -Tubulin mit einem monoklonalen murinen Antikörper nachgewiesen.

3.6.5 Translationsinhibition durch *miniature excitatory postsynaptic currents*

Durch Tetrodotoxin können Aktionspotentiale in neuronalen Kulturen unterdrückt werden, keinen Einfluß hat es hingegen auf die spontane Freisetzung von Neurotransmittern aus der präsynaptischen Endigung. Die so verursachte Ausschüttung von geringen Mengen an Neurotransmittern ist, dem Alles-oder-Nichts Prinzip folgend, nicht in der Lage ein Aktionspotential im postsynaptischen Neuron auszulösen. Die Bindung von Glutamat an ionotrope Rezeptoren führt durch Einstrom von Natrium- und Calcium-Ionen allerdings zu geringfügigen Depolarisationen der Membran, die als *miniature excitatory postsynaptic currents* (mEPSCs oder “minis”) bezeichnet werden (Fatt und Katz, 1952; Verstreken und Bellen, 2002). Sutton et al.(2004) wiesen eine inhibitorische Wirkung dieser Ströme auf die dendritische Translation einer chimären RNA aus GFP und der 3'UTR der CaMKII nach. Durch Blockade der mEPSCs wurde eine schnelle und rapide Steigerung des GFP-Signals in distalen Dendriten ausgelöst. Zusätzliche Experimente derselben Arbeit deuten darauf hin, daß es sich hierbei nicht um die Induktion spezieller mRNAs in dendritischen Kompartimenten handelt, sondern um einen globalen Effekt der ebenfalls im Zellsoma zu beobachten war. Es wurde überprüft ob bei einer vollständigen Blockade der neuronalen Aktivität Veränderungen der Translationseffizienz von shank1-mRNA mit dem etablierten System aufgezeigt werden können. Hierzu wurden kortikalen Neuronen mit den dicistronischen shank1-UTR Konstrukten transfiziert und am nächsten Tag für 9,5 h mit 2 µM TTX behandelt; anschließend wurden Kainat- und AMPA-Rezeptoren mit 40 µM 6-cyano-7-nitroquinoxalin-2,3-dion (CNQX, *Tocris*) sowie NMDA-Rezeptoren mit 20 µM D-(-)-2-amino-5-phosphonovalerinsäure (APV, *Tocris*) für 2,5 h blockiert und die Zellen direkt lysiert. In der Kontrolle und dem 3'UTR-Konstrukt wurde eine signifikante Zunahme der *Photinus*-Luziferase Expression um ~ 13 % nachgewiesen. Der Anstieg des Wertes lag beim 5'UTR Konstrukt lag knapp unterhalb der Signifikanzgrenze ($p=0,055$; Abb. 3.34). Die von Sutton et al. (2004) beschriebene Stimulation der Translation durch die gleichzeitige Blockade von Aktionspotentialen und mEPSCs konnte somit nachvollzogen werden. Dieser hierbei künstlich in der gesamten Zelle ausgelöste Effekt scheint auch nach den hier erzielten Ergebnissen weder auf bestimmte RNAs noch dendritische Kompartimente beschränkt zu sein.

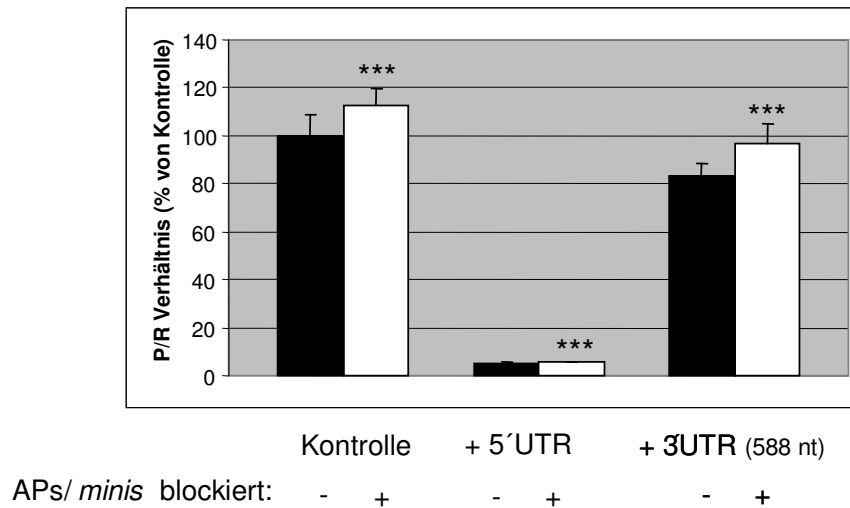


Abbildung 3.34 Auswirkungen der vollständigen Blockade neuronaler Aktivität auf die Expression der dicistronischen Luziferasekonstrukte: Embryonale Hippocampus-Neuronen wurden nach 7 Tagen in Kultur mit den dicistronischen Konstrukten transfiziert und nach 13,5 h für 9,5 h mit 2 μ M Tetrodotoxin inkubiert. Anschließend wurden dem Medium 40 μ M 6-cyano-7-nitroquinoxalin-2,3-dion (CNQX) und 20 μ M D-(-)-2-amino-5-phosphonovalerinsäure (APV) hinzugefügt. Die Zellen wurden 2 h später lysiert und die Expression der Luziferasen quantifiziert. Das Verhältnis der Aktivität von Photinus- zu Renilla-Luziferase wurde berechnet und ins Verhältnis zur Kontrolle gesetzt (n=6 für die Kontrollen; n=10 für die Blockade von mEPSCs; $p < 0,001$ für die Kontrolle und das 3'UTR Konstrukt; $p > 0,05$ für das 5'UTR Konstrukt).

4 Diskussion

Ein Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung *trans*-agierender Faktoren des shank1-DTE. Durch Affinitätschromatographien mit dem *Tobra-Tag* System und anschließende massenspektroskopische Analysen konnten mehrere interagierende Proteine isoliert und identifiziert werden. Darunter befanden sich die Poly-rC-bindenden Proteine PCBP 1-3 sowie hnRNP K. Seit der ursprünglichen Entdeckung der Poly-rC-bindenden Proteine aufgrund ihrer Affinität zu Homo-rC-Polymeren (Swanson und Dreyfuss, 1988) konnte in einer Anzahl von Studien die enorme funktionale Vielseitigkeit dieser Proteine im DNA/RNA Metabolismus belegt werden (Matunis et al., 1992; Weiß und Liebhaber, 1995; Makeyev und Liebhaber, 2002). Im humanen und murinen Genom existieren 5 strukturell verwandte Gene für PCBP (PCBP 1-4 und hnRNP K). Die Geneloci stehen in einer engen evolutionären Beziehung und sind durch mehrere Genduplikationen sowie eine Retrotransposition entstanden (Tommerup und Leffers, 1996; Makeyev und Liebhaber, 2000). Die Proteine besitzen eine gemeinsame Struktur von zwei N-terminalen und einer C-terminalen KH-Domäne. Die größte Divergenz innerhalb der Isoformen ist zwischen der zweiten und dritten KH-Domäne zu finden.

Bei hnRNP K liegt hier die prolinreiche interaktive Domäne, in welcher die meisten Bindungsstellen für interagierende Proteine lokalisiert sind (Gibson et al., 1993; Siomi et al., 1993; Bomsztyk et al., 2004). Zwei häufig vorkommende verkürzte Spleißvarianten der PCBP sind PCBP2 KL (Funke et al., 1996; Chkheidze et al., 1999) und PCBP4 A (Makeyev und Liebhaber, 2000). Sämtliche PCBP-Varianten werden ubiquitär in allen Geweben von Mensch und Maus exprimiert (Leffers et al., 2002; Makeyev et al., 1999). Bei Untersuchungen der cytoplasmatischen Lokalisation konnten Makeyev und Liebhaber 2002 ein Pendeln (*shuttling*) der PCBP zwischen Kern und Zellsoma beobachten.

Ein wichtiger Aspekt posttranskriptionaler Kontrolle ist die Stabilität einer mRNA, welche für die korrekte Expression einer Vielzahl eukaryotischer Gene essentiell ist (Ross, 1995). Neben der Transkriptionsrate kann der Gehalt einer spezifischen mRNA in einer Zelle durch eine Veränderung ihrer Abbaurate reguliert werden. Die Halbwertszeit neu synthetisierter mRNAs liegt im Mittel bei 3-5 h, kann aber in Abhängigkeit von der Funktion des Genproduktes stark variieren. Für die mRNA von proto-Onkogenen und Cytokinen liegt dieser Wert bei wenigen Minuten, Globin-mRNA in Erythrocyten ist dagegen über mehrere Tage stabil (Ross und Sullivan, 1985; Beelman und Parker, 1995). Während der terminalen Ausreifung von Erythrocyten wird der Zellkern ausgeschleust und Globin-mRNA in der Zelle akkumuliert (bis zu 95 % aller mRNAs). Diese außerordentliche Stabilisierung wird bei der α -Globin-

mRNA durch die Bildung eines sogenannten α CP Komplexes an einem pyrimidinreichen Element in der 3'UTR unterstützt, der die mRNA vor einem Abbau durch Nucleasen schützt. Chkheidze et al. (1999) wiesen nach, daß jede der PCBP Isoformen mit Ausnahme von hnRNP K hinreichend zur Formation dieses Komplexes ist (PCBP 1-4 werden daher auch als α CP 1-4 bezeichnet; Wang et al., 1995; Kiledjian et al., 1997). Des weiteren interagieren α CPs mit der 3'UTR der Erythropoetin (Epo)-mRNA, ein Glykoprotein das die Bildung roter Blutkörperchen stimuliert (Czyzyk-Krzeska und Bendixen, 1999), sowie der 3'UTR von Kollagen 1A-mRNA (Stefanovic et al., 1997) und Tyrosinhydroxylase-mRNA (Czyzyk-Krzeska und Beresh, 1996). Mutationen, welche die Bildung des α CP Komplexes beeinträchtigen, führen aufgrund des niedrigen α -Globinspiegels zur *constant spring* Thalassämie (Clegg et al., 1971; Laig et al., 1990). PCBP1 und PCBP2 haben ebenso eine Funktion in der Kontrolle der Deadenylierungsrate von α -Globin-mRNA (Wang et al., 1999). Dies führt zu der Annahme das die Bindung von PCBPs an die 3'UTR von mRNAs einen generellen Mechanismus zur Stabilisierung langlebiger RNAs darstellt (Holcik und Liebhaber, 1997), der offenbar auch während der dendritischen Lokalisierung der shank1-mRNA eine Rolle spielt. Veränderungen des Zellwachstums oder extrazellulärer Signale können die Stabilität von mRNAs spezifisch beeinflussen (Atwater et al., 1990; Nielson und Shapiro, 1990). Hierbei ist von Interesse, daß durch Phosphorylierung die Affinität von PCBP1 und PCBP2 zu Homo-rC-Polymeren deutlich vermindert wird (Leffers et al., 1995). Es ist daher anzunehmen, daß die Stabilisierung von mRNAs mittels PCBP-Bindung durch posttranslationale Modifikationen reguliert werden kann.

Für die dendritische Lokalisierung von β -Aktin-mRNA ist ein als *zipcode* bezeichnetes Element von 54 nt in der 3'UTR essentiell (Oleynikov et al., 2003; Eom et al., 2003). Als *trans*-agierende Faktor des *zipcodes* wurde von Ross et al. (1997) ein Protein mit 4 KH-Domänen isoliert, das als *zipcode binding protein 1* (ZBP1) bezeichnet wurde. Weitere *zipcode*-bindende Proteine konnten von Gu et al. (2004) und Snee et al. (2002) identifiziert werden, darunter auch PCBP1 und PCBP2. Im Gegensatz zu ZBP1 wurde die funktionale Bedeutung dieser Interaktionen für den subzellulären Transport von β -Aktin-mRNA nicht analysiert (Zhang et al., 2001; Tiruchinapalli et al., 2003).

hnRNP K zählt zu den mehr als 20 Mitgliedern der Gruppe von heterogenen nuklearen Ribonucleoproteinen (hnRNPs). Ursprünglich als Proteine definiert, die heterogene nukleare RNA binden, sind die hnRNPs unter anderem in RNA-abhängige Prozesse wie Transkription, prä-mRNA Prozessierung und Export von mRNA in das Cytoplasma involviert (Pinol-Roma und Dreyfuss, 1993; Mattaj und Englmeier, 1998; Nakielnny und Dreyfuss, 1999). Neben einer

klassischen Kernlokalisierungssequenz verfügt hnRNP K über ein als *K nuclear shuttling domain* bezeichnetes Element, das erstmals bei diesem Protein beschrieben wurde. Dieses ermöglicht einen bidirektionalen Transport von hnRNP K zwischen Kern und Cytoplasma (Siomi et al., 1993; Michael et al., 1997). hnRNP K enthält mehrere Phosphorylierungsstellen für Tyrosin- (Weng et al., 1994) und Serin/Threonin Kinasen (Ostrowski et al., 1991; VanSeuning et al., 1995). Die Phosphorylierung von hnRNP K an den Serinresten in Position 284 und 353 durch die *Mitogen-activated protein Kinase/extracellular-signal related Kinase* (MAPK/ERK) führt durch Stimulation des Kernexportes zu einer Akkumulation des Proteins im Cytoplasma. Die RNA-Bindungseigenschaften sind von diesen Modifikation nicht beeinflusst (Habelhah et al., 2001).

hnRNP K ist in nahezu alle Stufen der Genregulation involviert. Im Kern interagiert das Protein mit einer Reihe von Transkriptionsaktivatoren und -repressoren und kann die Transkription einzelner Gene sowohl verstärken als auch abschwächen (Michelotti et al., 1995; Tomonaga et al., 1995; Denisenko et al., 1996; Miao et al., 1998). Als Bestandteil von hnRNP Partikeln ist von hnRNP K ebenfalls in die Prozessierung von prä-mRNA involviert (Matunis et al., 1992; Expert-Bezancon et al., 2002). Ein erster Hinweis auf eine Beteiligung von hnRNP K an Translationsprozessen war die von Bomszyk et al. 1997 beobachtete Interaktion mit dem eukaryotischen Elongationsfaktor 1 α . Evans et al. (2003) demonstrierten eine Stimulation der Rekrutierung von 40 S-Ribosomenuntereinheiten an eine *Internal Ribosomal Entry Site* in der 5'UTR der c-myc RNA durch hnRNP K in Kooperation mit PCBP1 und PCBP2. Am detailliertesten ist die Regulation der Translation der 15-Lipoxygenase (15-LOX)-mRNA durch hnRNP K und PCBP1 in Erythrocyten beschrieben. Dies Enzym degradiert Phospholipide und ist an dem Abbau innerer Zellmembranen während der terminalen Ausreifungsphase von roten Blutkörperchen beteiligt (Rapoport und Schewe, 1986). Nach der Globin-mRNA ist die 15-LOX-mRNA die häufigste mRNA in den Erythrocyten-Vorläuferzellen des Knochenmarks, deren Translation jedoch bis zu den letzten Schritten der Differenzierung unterdrückt wird (Thiele et al., 1981). Als ursächlich für diese Repression konnten Ostareck et al. (1994) ein pyrimidinreiches, repetitives Element in der 3'UTR ausmachen (*15-Lipoxygenase Differentiation Control Element*, LOX-DICE) und 1997 hnRNP K und PCBP1 als *trans*-agierende Faktoren identifizieren. Die Phosphorylierung mehrerer Tyrosinreste von hnRNP K durch die *proto-oncogene tyrosin kinase Src* (c-Src, *cellular-sarcoma*) inhibiert die Bindung an die DICE Elemente der 15-LOX-mRNA und ermöglicht eine spezifische und reversible Derepression (Ostareck-Lederer et al., 2002). Die zusätzliche Bindung von PCBP1 könnte weitere Wege zur Regulation der

Translationseffizienz in Reaktion auf spezifische intra- oder extrazelluläre Signale eröffnen, da dieses Protein im Gegensatz zu hnRNP K nur von sehr wenigen Kinasen phosphoryliert wird (Bomsztyk et al., 2004). Eine gemeinsame Interaktion von hnRNP K und PCBP1 wurde ebenfalls für die 3'UTRs der mRNAs für Renin (Skalweit et al., 2003) und das axonale Neurofilament M (Tyhagarajan, 2004) belegt. Interessanterweise ist ein hnRNP K-ähnliches Protein aus *Saccharomyces cerevisiae* (NCBI-Nr. NP 009251) für die korrekte Lokalisation der *ash1*-mRNA essentiell (Goffeau et al., 1996). Für hnRNP K wird eine Funktion als *docking-platform* postuliert, die verschiedene Signaltransduktionswege integriert und mit nucleinsäure-abhängigen Prozessen in Verbindung bringt (Bomsztyk et al., 2004). Auf einen Zusammenhang mit der dendritischen Lokalisierung von mRNA weist die direkte Bindung von hnRNP K an das shank1-DTE sowie die Lokalisation in distalen Dendriten in der charakteristischen granulären Struktur von mRNPs hin. Sofern hnRNP K bereits im Zellkern an das shank1-DTE bindet, besteht die Möglichkeit die Effizienz des dendritischen Transportes der mRNA bereits auf Ebene des Kernexportes zu regulieren (Habelhah et al., 2001). Weiterhin könnten hnRNP K und hnRNP E1 durch Bindung der shank1-3'UTR die Translation der mRNA während des Transportes in die Dendriten inhibieren; in der verwendeten Sequenz sind drei LOX-DICE Elemente enthalten (85-101 nt, 133-147 nt, 470-485 nt). Dementsprechend konnte in den Experimenten mit HEK293 Zellen und kortikalen Neuronen eine signifikante Reduktion der Expression des Reportergens durch die shank1-3'UTR um bis zu 30 % beobachtet werden. Mit der Phosphorylierung durch die c-Src Kinase ist ein Mechanismus beschrieben, der eine spezifische Derepression von hnRNP K/PCBP1-bindenden RNAs als Antwort auf extrazelluläre Stimulation ermöglicht. Im Gegensatz verursachte die Fusion der shank1-3'UTR bei den *in vitro* Versuchen mit Reticulocytenlysat eine deutliche Stimulation der Translation. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz ist die Präsenz unterschiedlicher regulatorischer Proteine in den verwendeten Systemen.

Als weiterer *trans*-agierender Faktor aus der hnRNP Proteinfamilie konnte eine hirnspezifische Isoform von PTB (hnRNP I), die als brPTB oder PTB2 bezeichnet wird, identifiziert werden. PTB gehört ebenfalls zu den hnRNPs die zwischen Kern und Cytoplasma pendeln (Kamath et al., 2001). Diese nucleo-cytoplasmatische Verteilung wird durch Phosphorylierung des Serinrestes in Position 16 durch die Proteinkinase A (PKA) in Abhängigkeit vom cAMP-Gehalt der Zelle moduliert (Xie et al., 2003). Bekannt geworden ist PTB als potenter, gewebespezifischer Spleißregulator in Muskeln und neuralem Gewebe (Valcarcel und Gebauer, 1997). Unter anderem wurde eine Rolle von PTB in der Prozessierung der prä-RNAs von Tropomyosin (Mulligan et al., 1992; Singh et al., 1995),

und α -Aktinin (Southby et al, 1999) belegt. Tillmar und Welsh (2004) demonstrierten eine Rapamycin-abhängige Bindung von PTB an die 3'UTR der Insulin-mRNA, die zu einer Stimulation der Insulinexpression führt (Fred und Welsh, 2005). PTB hat eine essentielle Funktion in der Lokalisierung von Vg1-mRNA an den vegetalen Pol von *Xenopus* Oocyten (Cote et al., 1999) und spielt eine Rolle in der internen Initiation der Translation viraler RNAs (Hunt und Jackson, 1999). Die von Polydorides et al. 2000 entdeckte gewebespezifische Isoform brPTB zeigt eine Homologie von 70 % auf Aminosäureebene und weist wie PTB eine Struktur mit vier konservierten RRM Motiven auf. Während PTB in einer Vielzahl von Geweben exprimiert wird ist die Expression von brPTB hauptsächlich auf Hirn und Testis beschränkt (Polydorides et al., 2000; Lilleväli et al., 2001). brPTB interagiert direkt mit dem ausschließlich neuronal exprimierten Protein NOVA1, das ebenfalls während der *Tobra-Tag* Affinitätschromatographie mit dem shank1-DTE isoliert wurde. NOVA1 ist das Antigen der Autoimmunerkrankung *paraneoplastic opsoclonus-myoclonus ataxia* (POMA), bei der die RNA-Bindungsaktivität der KH-Domänen durch spezifische Antikörper blockiert wird (Buckanovich et al., 1993; 1996). Es handelt es sich ebenfalls um einen neuronenspezifischen Spleißregulator, der die zusätzliche Verwendung alternativer Exons unterstützt; diese Funktion wird durch die Bindung von brPTB beeinträchtigt (Polydorides et al., 2000; Dredge und Darnell, 2003). Das Protein zeigt eine mit den PCBP's vergleichbare Anordnung von zwei C-terminalen und einer N-terminalen KH-Domäne. Trotz dieser konservierten Struktur weist NOVA1 keine Affinität zu pyrimidinreichen Sequenzen auf sondern hat eine Bindungspräferenz für ein spezielles Tetranucleotid (UCAPyr; Buckanovich und Darnell, 1997; Ule et al., 2003). Dieses Element ist in den ersten 588 nt viermal und einmal in den ersten 133 nt, die zur Bindung von NOVA1 hinreichend waren, vorhanden, eine direkte Bindung an das shank1-DTE konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Ursprünglich wurde angenommen, daß der subzelluläre Transport spezifischer mRNAs erst nach Export aus dem Kern durch die Bindung cytoplasmatischer Proteine eingeleitet wird (Wilhelm und Vale, 1993). Diese Ansicht hat sich mit der Entdeckung einer Anzahl von wichtigen, hauptsächlich kernlokalisierten, *trans*-agierenden Faktoren des mRNA-Transportes geändert (Munro et al., 1999; Gu et al., 2004; Kress et al., 2004). Insbesondere wurde ein direkter Zusammenhang zwischen dem Spleißen der *oskar* prä-mRNA und dem anschließenden Transport an den posterioren Pol der *Drosophila* Oocyte nachgewiesen. Nach jedem Herausspleißen eines Introns verbleibt in einer konservierten Position 20-24 nt aufwärts von der Exon-Exon Verbindung ein Komplex aus mehreren Proteinen (*Exon-Exon*

Junction Complex, EJC), der in die Regulation des Kernexportes involviert ist (LeHir et al., 2001). Die Proteine Y14 und Mago stellen Kernkomponenten des EJC dar, die auch nach Export in das Cytoplasma stabil mit der mRNA assoziiert bleiben und erst mit der Passage eines Ribosoms abgelöst werden (Dostie and Dreyfuss, 2002; Lejeune et al., 2002). Es wird vermutet, daß dies im Zusammenhang mit einer spezifischen Degradierung von mRNAs mit vorzeitigen Stop-Codons steht (*nonsense-mediated decay*; Schell et al., 2002; Fribourg et al., 2003). Y14 und Mago haben ebenfalls eine wichtige Funktion in der 3'UTR-abhängigen Lokalisierung der *oskar*-mRNA an den posterioren Pol der Oocyte (Micklem et al., 1997; Hachet und Ephrussi, 2001). 2004 zeigten Hachet und Ephrussi, daß die Entfernung des ersten der drei Introns der prä-mRNA und die Assemblierung eines EJC an dieser Stelle für einen effizienten Transport der mRNA notwendig ist. Dieser Befund deutet auf eine mechanistische Kopplung bestimmter Spleißvorgänge an die cytoplasmatische Lokalisation von mRNA hin. Monshausen et al. wiesen 2005 eine Assoziation von Stau2 mit dem EJC durch eine direkte Bindung von Y14 und Mago in *R. norvegicus* nach. Bei der Untersuchung der cytoplasmatischen Lokalisierung der Proteine in kortikalen Neuronen wurde deren somatodendritische Verteilung festgestellt. In *Xenopus* Oocyten binden PTB und Vg1-RBP bereits im Zellkern die Vg1-mRNA und stimulieren deren Export. Im Cytoplasma werden weitere Faktoren, in diesem Fall auch das *Xenopus* Ortholog von Stau2 (XStau), rekrutiert bevor transportkompetente mRNP-Partikel gebildet werden (Schwartz et al., 1992; Cote et al., 1999; Kress et al., 2004). Diese Ergebnisse zeigen, daß die cytoplasmatische Lokalisierung einer mRNA bereits im Kern durch die Assoziation mit *trans*-agierenden Faktoren initiiert wird und auch nach Export in das Cytoplasma einige Kernproteine bis zur lokalen Translation an die mRNA gebunden bleiben. Aufgrund der Lokalisation im Kern und dem granulären Verteilungsmuster in Dendriten von Hippocampus-Neuronen ist anzunehmen, daß es sich bei den PCBP1 und NOVA1 um Proteine handelt, die das shank1-DTE bereits im Kern binden und bis in die distalen Dendriten mit den mRNPs assoziiert bleiben. brPTB ist hauptsächlich im Zellkern und in wesentlich geringerer Menge im Soma und den proximalen Dendriten vorhanden. Dies deutet darauf hin, daß brPTB ebenfalls im Zellkern an das shank1-DTE bindet und während der cytoplasmatischen Remodellierung der mRNP-Komplexe, vor dem Transport in distale dendritische Kompartimente, von diesen dissoziiert. Gleichzeitig werden vermutlich zusätzliche cytoplasmatische Proteine in den mRNP Komplex rekrutiert.

Mit PABP1 konnte die direkte Interaktion eines ausschließlich cytoplasmatisch lokalisierten Proteins mit dem shank1-DTE nachgewiesen werden. PABP1 bindet im Zellsoma an den Poly-A-Schwanz von mRNAs und beeinflusst so deren Stabilität und Deadenylierungsrate (Sachs et al., 1987; Bernstein et al., 1989; Ford et al., 1997). Möglicherweise ist die effiziente Stabilisierung von mRNAs mit 3'UTR assoziierten PCBP-Proteinen zum Teil auf die direkte Bindung von PABP1 an PCBP1 und PCBP2 zurückzuführen (Wang et al., 1999).

Die gleichzeitige Interaktion von PABP1 mit dem Poly-A-Schwanz und dem eukaryotischen Initiationsfaktor 4G (eIF4G), einem Bestandteil des *cap*-bindenden Komplexes (eIF4F), am 5'Ende führt zu einer Zirkularisierung der mRNA, die schon 1962 von Warner et al. in elektronenmikroskopischen Aufnahmen beobachtet wurde. Diese Konformation unterstützt eine effiziente Reinitiation von Ribosomen und erhöht auf diese Weise die Translationsrate (*closed loop model*; Abb. 4.1 A; Tarun und Sachs, 1996; Sachs et al., 1997; Kahvejian et al., 2001). Die Bindung von PABP1 an das shank1-DTE konnte auf die ersten 126 nt, in denen sich keine adenosinreichen Regionen befinden, eingegrenzt werden. Es handelt sich bei PABP1 um ein sehr abundantes Protein, das in HeLa Zellen im Vergleich zu den Poly-A-Bindungsstellen der mRNAs in dreifachem Überschuß vorhanden ist (Görlach et al., 1994) und dessen Bindung an nicht-Poly-A-Sequenzen mehrfach beschrieben wurde (Görlach et al., 1994; Hornstein et al., 1999; Mullin et al., 2004). Mohr et al. (2002) identifizierten PABP1 als *trans*-agierenden Faktor der dendritischen Lokalisierungssequenz (DLS) der Vasopressin-mRNA, welche die gesamte 3'UTR sowie Teile der codierenden Sequenz umfaßt. PABP1 interagiert ebenfalls mit dem MAP2-DTE (Chua und Kindler, *Tobra-Tag*, unveröffentlicht), womit die Unterdrückung des >75kD-Signals in den kompetitiven *UV-crosslink* Analysen zu erklären ist. Es wird angenommen, daß PABP, das an den Poly-A-Schwanz gebunden ist, homophil oder über zusätzliche gewebespezifische Faktoren mit DTE-gebundenem PABP interagiert. Eine effiziente Zirkularisierung der mRNA und die damit einhergehende Stimulation der Translation könnte auf diese Weise inhibiert werden (Abb. 4.1 B; Mohr et al., 2002). BC1 (bei Nagetieren) und BC 200 (bei Primaten) sind kleine, nicht-translatierte RNAs, die mit neuronalen mRNPs assoziiert sind und ebenfalls direkt an PABP1 binden. Durch BC1 wird die Initiationsphase der Translation effizient inhibiert. Es wird vermutet, daß durch die Bindung von BC1 an PABP1 dessen Affinität zu eIF4G unterdrückt wird (Abb. 4.1. C; Tiedge et al., 1991; Muslimov et al., 1997; Wang et al., 2001). Sofern diese Hypothesen zutreffend sind könnte die Bindung von PABP1 an das shank1-DTE neben einer Stabilisierung der mRNA in Kooperation mit den PCBP zur Kontrolle der lokalen dendritischen Translation dienen.

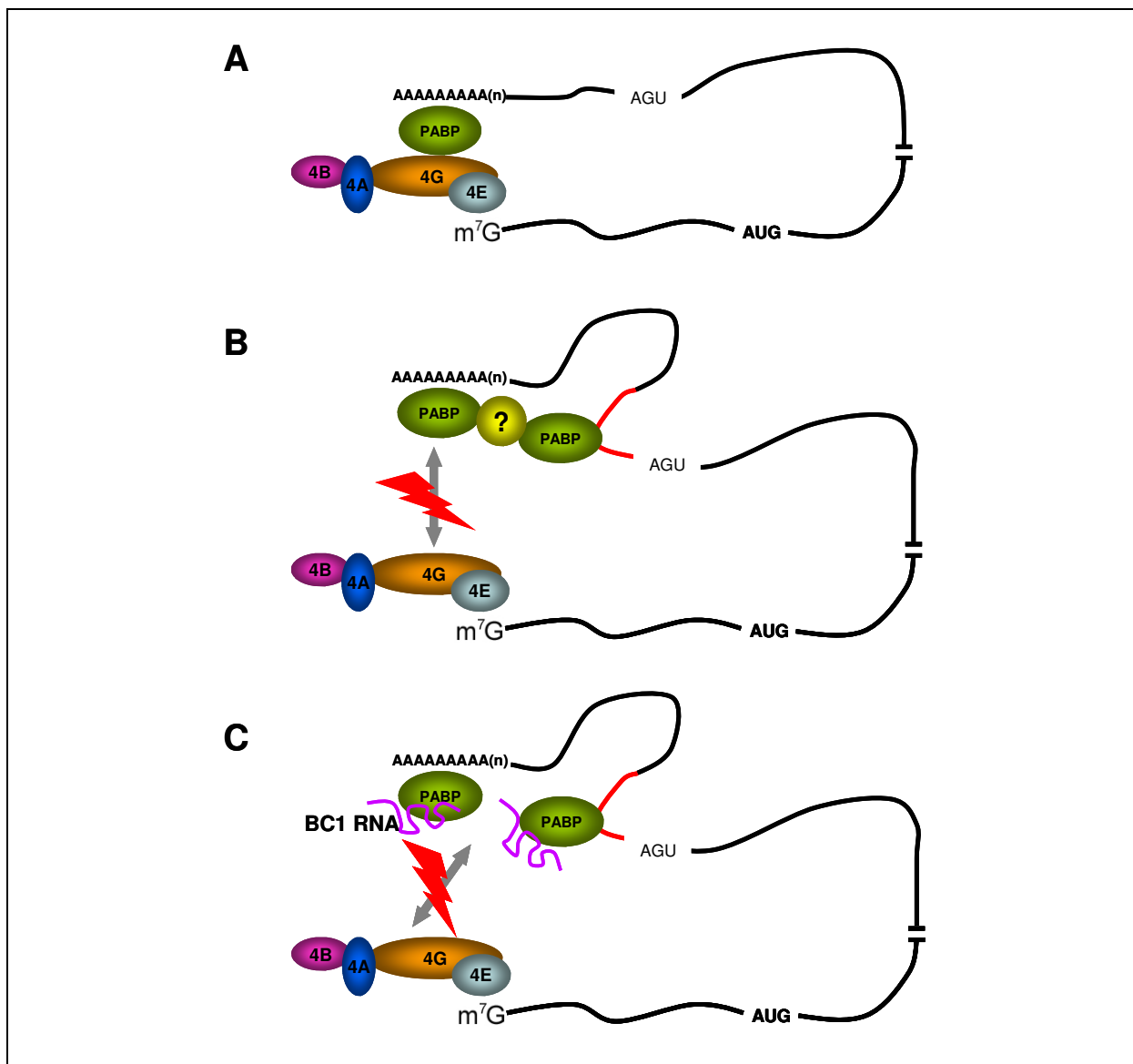


Abbildung 4.1 Funktionale Rolle von PABP in der Kontrolle Translation **A)** PABP, das an den Poly-A-Schwanz gebunden ist, stimuliert die Translation. PABP interagiert mit eIF4G, das zusammen mit eIF4E, dem *cap-binding* Protein und der RNA-Helikase eIF4A den trimeren Komplex eIF4F bildet, der die Bindung des 43S-Prä-Initiationskomplexes an die mRNA vermittelt. Die Bindung von PABP an eIF4G führt zu einer Zirkularisierung der mRNA, die die Reinitiation von Ribosomen, die nach erfolgter Translation am Stoppcodon freigesetzt werden, unterstützt. **B)** Die zusätzliche Bindung von PABP an eine dendritische Lokalisierungssequenz (Vasopressin, shank1) könnte zu einer Translationsinhibition führen, sofern eine Interaktion mit Poly-A-Schwanz-gebundenem PABP (direkt oder über zusätzliche Proteinfaktoren) die Zirkularisierung der RNA beeinträchtigt (nach Mohr et al., 2002). **C)** Die Bindung von BC1-RNA an PABP führt zu einem Verlust der Bindungsaffinität zu eIF4G und folglich zu einer Repression der Translation. Möglicherweise hat die zusätzliche Bindung von PABP am shank1-DTE eine Verstärkung der Translationsrepression durch BC1 zur Folge (AGT: Startcodon; TGA: Stoppcodon m⁷G: 7-Methylguanosin-cap).

Als einziger identifizierter *trans*-agierender Faktor des shank1-DTEs besitzt ARP P0 keine bekannten RNA-bindenden Motive und wurde daher wahrscheinlich indirekt über Protein-Protein Interaktionen aufgereinigt. Das Protein ist neben ARP P1 und ARP P2 Bestandteil der sogenannten *ribosomal stalk* Struktur, die seitlich aus der 60 S Ribosomenuntereinheit

herausragt und eine wichtige Funktion in der Regulation der Translationseffizienz hat (Gonzalo und Reboud, 2003; Krokowski et al., 2005). Brendel et al. (2004) zeigten die direkte RNA-unabhängige Bindung von ARP P0 an Stau1 und eine Colokalisation beider Proteine in dendritischen mRNP-Partikeln. Die Autoren vermuten, daß Stau1 durch die Assoziation mit P0 in Ribosomen-enhaltende mRNPs rekrutiert wird. Dies stellt möglicherweise einen Mechanismus dar, mittels dessen auch shank1-mRNA in derartige Partikel inkorporiert werden kann. In Dendriten sind verschiedene integrierte und assoziierte Komponenten der Translationsmaschinerie für eine lokale und vom Zellsoma unabhängige Translation vorhanden. Seitdem Steward und Levy 1982 Polyribosomen an der Basis dendritischer Dornen entdeckten, konnten zahlreiche weitere Bestandteile des Translationsapparates in dendritischen Kompartimenten aufgespürt werden. Hierzu gehören ribosomale Proteine, tRNAs, Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, RNA-Helikasen sowie diverse Initiations- und Elongationsfaktoren (Tiedge und Brosius, 1996; Gardiol et al., 1999; Kanai et al., 2004; Kim et al., 2005). Die BDNF-abhängige Rekrutierung des eukaryotischen Initiationsfaktors 4E (eIF4E) in neuronale mRNPs deutet darauf hin, daß es sich bei dem Transport von Komponenten des Translationsapparates nicht nur um eine Voraussetzung, sondern auch um einen Ansatzpunkt zur Regulation der lokalen Translation handelt (Smart et al., 2003).

Während die Längen von 3'UTRs verschiedener mRNAs sehr unterschiedlich sind, ist die Länge der 5'UTRs vergleichsweise einheitlich und beträgt im Durchschnitt ~ 130 nt bei Nagern und ~ 150 nt bei Menschen. Ungefähr 10 % der mRNAs besitzen eine außergewöhnlich lange und GC-reiche 5'UTR, die in der Lage ist stabile Sekundärstrukturen auszubilden (Pesole et al., 2002; Mignone et al. 2002). Zwei Drittel hiervon codieren für Wachstums- und Transkriptionsfaktoren oder proto-Onkogene, also Transkripte deren Expression einer strikten zeitlichen und räumlichen Kontrolle unterliegt (Clemens und Bommer 1999; Willis, 1999). Durch die ausgeprägten Sekundärstrukturen in der 5'UTR wird die Initiation der Translation inhibiert. Einerseits kann die Bindung des Prä-Initiationskomplexes an die mRNA durch die Ausbildung von Sekundärstrukturen in den ersten 50-60 nt der 5'UTR mit einer freien Energie von mindestens -30 kcal/mol stark beeinträchtigt werden (Kozak, 1989; Kozak 1991; Pickering und Willis 2005). Mit dem Programm *mfold* wurde bei optimaler Faltung der ersten 60 nt der shank1-5'UTR eine freiwerdende Energie von -14,8 kcal/mol berechnet, die klar unterhalb dieser Grenze liegt. Ebenso zeigt die Analyse der Translationsinitiation, daß dieser Schritt durch die 5'UTR von shank1 nicht beeinflusst wird. Andererseits wird der Prozeß des Abtastens durch die 40 S-

Ribosomenuntereinheit von Sekundärstrukturen, die weiter in 3' Richtung liegen und bei deren Faltung eine Energie von mehr als 50 kcal/ mol frei wird, beeinträchtigt (Kozak, 1987; Kozak, 1991). Die Sekundärstruktur der shank1-5'UTR entspricht mit einer freien Faltungsenergie von insgesamt -324,1 kcal/mol dieser Voraussetzung und auf diese Weise für die drastische Repression der Translation, die *in vitro* und *in vivo* zu beobachten war, ursächlich sein. Unterstützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, daß durch die Fusion der shank1-5'UTR an Luziferase-mRNA die Rekrutierung der 60 S-Ribosomenuntereinheit an das Startcodon und somit die Bildung translationskompetenter 80 S-Ribosomen blockiert wurde. Weitere *cis*-agierende Elemente mit einem Einfluß auf die Translationsrate wie uORFs, *out-of-frame* uAUGs oder IRES-Elemente sind auf der shank1-5'UTR nicht vorhanden; durch das *in-frame* uAUG (bzw. die 5' codierende Region) wird lediglich eine alternative Variante von shank1 mit verlängertem N-Terminus produziert. Unklar ist inwiefern die *trans*-agierenden Faktoren der shank1-5'UTR eine regulative Funktion in der Translationsinitiation übernehmen können.

Die beschriebenen Ergebnisse zeigen einen erheblichen Einfluß der UTRs auf die lokale dendritische Translation von shank1. Als wichtige Frage ergibt sich hieraus, inwiefern diese Regulation durch extrazelluläre Signale moduliert wird und somit zur Etablierung synaptischer Plastizität beitragen kann. Um eine mögliche Auswirkung erhöhter neuronaler Aktivität auf die, durch die shank1-UTRs ausgeübte, Translationskontrolle zu untersuchen wurden cortikale Neuronen mit KCl depolarisiert. Unter diesen Bedingungen konnte u.a. eine gesteigerte Mobilität von dendritischen mRNPs beobachtet werden, bei der die Partikel von einer oszillatorischen Bewegung zu einem anterograden Transport in distale Dendriten übergehen (Rook et al., 2000; Tiruchinapalli et al., 2003). Ebenfalls konnte die spezifisch gesteigerte Translation einiger neuronaler mRNAs nach Depolarisation in mehreren Studien nachgewiesen werden. Beispielsweise zeigten Grigstone et al. 2005, daß die dendritische Translation einer chimären mRNA mit dem α CaMKII-DTE (Mori et al., 2000) nach Applikation von Glutamat stark stimuliert wurde. Intensiv wurden die Effekte einer Depolarisation durch KCl auf die Translation neuronaler mRNPs von Krichevsky und Kosik (2001) analysiert. Nach wenigen Minuten war die Menge an 80 S-Ribosomen stark erhöht und im weiteren Verlauf konnte eine deutliche Akkumulation von Polysomen aufgezeigt werden (siehe auch Schratt et al., 2004). Diese Polysomen waren verstärkt mit mRNAs assoziiert, die zum Teil dendritisch lokalisiert sind und deren Proteinprodukte mit synaptischer Plastizität im Zusammenhang stehen, unter anderem α CaMKII, MAP2 und der

TrkB-Rezeptor. Die gesteigerte Translation dieser mRNAs ging dort einher mit einer leichten Reduktion in der allgemeinen Proteinsyntheserate. Bei den Experimenten mit dicistronischen Luziferasekonstrukten in cortikalen Neuronen kam es in allen Fällen zu einer erheblichen Steigerung der *cap*-abhängigen Translation nach Depolarisation durch KCl. Diese Beobachtung stimmt mit Ergebnissen von Kelleher et al. (2004) überein, die bei gesteigerter neuronaler Aktivität, eine Stimulation der Translationsinitiation einer Reporter-mRNA in Abhängigkeit von der MAPK/ERK-Kinase-Aktivität feststellten. Während es bei der Kontrolle und dem 3'UTR Konstrukt zu einer verhältnismäßig moderaten Steigerung der Translation um 50 bzw. 75 % kam, war diese bei Verwendung des 5'UTR Konstruktes mit ~ 500 % erheblich größer. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung kann u.a. aus der Studie von Scheetz et al. (2000) abgeleitet werden. Eine kurze Stimulation der NMDA-Rezeptoren präparierter Synaptoneurosomen führte dort zu einer deutlichen Zunahme in der Translationsrate von α CaMKII während paradoxerweise die Synthese der meisten anderen Proteine leicht zurückging. Die erhöhte Synthese von α CaMKII war mit einer gesteigerten Phosphorylierung des eukaryotischen Elongationsfaktors 2 (eEF2) korreliert (siehe auch Marin et al., 1997). eEF2, dessen Aktivität durch Phosphorylierung inhibiert wird, ist essentiell für die Translokation des Ribosoms entlang der mRNA. Dieser Elongationsfaktor ist das einzige bekannte Substrat für die CaMKIII dessen Funktion demnach von der lokalen Calcium-Konzentration abhängt (Nairn et al., 1987). Es wird angenommen, daß der Phosphorylierungsstatus von eEF2 eine generelle Strategie zur Kontrolle der Elongation darstellt (Sutton und Schuman, 2005). Bezeichnenderweise war es ebenfalls möglich durch Inhibition der Elongation mittels Cycloheximid die Expression von CaMKII zu stimulieren (Scheetz et al., 2000). Dies deutet auf einen direkten Zusammenhang zwischen einer generell verminderten Elongationsrate und der gesteigerten Translation spezifischer mRNAs hin. Postuliert werden folgende Ereignisse: nach Depolarisation der Neuronen kommt es zu einem Einstrom von Calcium-Ionen über NMDA-Rezeptoren, der über CaMKIII zu einer Phosphorylierung von eEF2 und folglich zu einer Reduktion der Elongationsrate führt. Unter diesen Konditionen ist nicht mehr die Effizienz der Initiation, die hierbei offenbar verstärkt wird, sondern die Elongation der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der dendritischen Proteinsynthese. Dies führt zu einer spezifischen Steigerung der Translation von mRNAs deren Initiation wie bei shank1 und α CaMKII generell reprimiert ist (Scheetz et al., 2000; Steward und Schuman, 2003; Sutton und Schuman, 2005). Ein derartiger Zusammenhang zwischen neuronaler Aktivität und der Regulation der shank1-mRNA Translation könnte einen Mechanismus zur spezifischen Expression des Proteins unter der Kontrolle individueller

Synapsen darstellen. Mit seiner essentiellen Funktion in der Assemblierung der PSD während der Ausreifung dendritischer Dornen (Sala et al., 2001), wird shank1 bei Stimulation der neuronalen Aktivität durch Depolarisation mit KCl offenbar verstärkt exprimiert; dies deutet auf eine Rolle der lokalen Translation von shank1-mRNA in der aktivitätsabhängigen Verstärkung synaptischer Kontakte hin. Der von Ostroff et al. (2002) beobachtete LTP-abhängige Transport von Polyribosomen in dendritische Dornen war mit einer deutlichen Ausdehnung der PSD korreliert, welche unter anderem auf die erhöhte Expression von shank1 zurückzuführen sein könnte (Sala et al., 2001).

Neben elektrischer Aktivität spielen durch Neurotrophine ausgelöste Signalkaskaden eine wichtige Rolle in der Modulation synaptischer Kontakte. Zu dieser Gruppe von Wachstumsfaktoren, die ursprünglich aufgrund ihrer unterstützenden Wirkung in der Differenzierung und dem Überleben von Neuronen charakterisiert wurden, gehören neben BDNF das Neurotrophin-3 (NT-3), *nerve growth factor* (NGF) sowie Neurotrophin-4 und -5 (NT-4/-5) (Levi-Montalcini, 1987; Snider, 1994; Reichard und Farinas, 1997). Eine weitere wichtige Funktion der Neurotrophine ist die Regulation synaptischer Plastizität (Balkowiec und Katz, 2000; Gooney und Lynch, 2001; Yavman et al., 2004, Aicardi, 2004). Ein direkter Zusammenhang zwischen der Sekretion von BDNF und der Stabilisierung synaptischer Kontakte wurde in mehreren Arbeiten dargestellt (McAllister und Katz, 1999; Thoenen, 2000; Lessmann et al., 2003). Es wird angenommen, daß erhöhte synaptische Aktivität die Sekretion von BDNF verstärkt und auch auf diese Weise Modifikationen in der PSD auslöst werden können, die zu einer langfristigen Verstärkung des synaptischen Kontaktes führen (Lessmann et al., 2003). Untermauert wird dies durch Experimente von Kang und Schuman (1996), in denen eine, durch BDNF ausgelöste, Langzeitpotenzierung in Hippocampus-Schnitten durch Proteinsynthese-Inhibitoren blockiert werden konnte. Nach längerer Inkubation von kortikalen Neuronen mit BDNF zeigten *Western Blot* Analysen eine deutliche Zunahme der Gesamtmenge der shank Proteine im Zelllysate. Dies deutet darauf hin, daß deren verstärkte Expression an der BDNF-induzierten Verstärkung synaptischer Kontakte beteiligt ist, wobei der Verankerung zusätzlicher Rezeptoren in der postsynaptischen Membran wahrscheinlich eine essentielle Funktion zukommt. Aus Studien von Aakalu et al., 1999 sowie Yin et al. 2001 geht hervor, daß die Translation spezifischer mRNAs durch BDNF sowohl im Soma als auch in distalen Dendriten stimuliert werden kann. Takei et al. zeigten 2001, daß die Bindung von BDNF an den TrkB Rezeptor simultan mehrere Signaltransduktionswege aktiviert, durch die eine verstärkte neuronale Translation ausgelöst wird. Durch die selektive Inhibition der

MAPK- oder PI3 K/mTOR Signalkaskaden wurde der BDNF-induzierte Einbau radioaktiver Aminosäuren stark vermindert.

Ein signifikanter Anstieg der Reportergen-Aktivität nach Applikation von BDNF wurde ausschließlich bei Verwendung von Luziferase-mRNA, die mit den ersten 588 nt der shank 3'UTR fusioniert war, beobachtet. Diese Induktion konnte durch Rapamycin nicht reprimiert werden und ist demnach von dem mTOR-Signaltransduktionsweg unabhängig. Daher ist davon auszugehen, daß andere, durch BDNF ausgelöste Signalkaskaden für die 3'UTR-vermittelte spezifische Induktion der shank1-mRNA ursächlich sind. Die funktionale Relevanz mTOR-unabhängiger Signaltransduktion für die Stimulation der Translation spezifischer neuronaler mRNAs geht ebenfalls aus Array-Analysen von Polysomen-assoziiierter RNAs nach Stimulation durch BDNF hervor (Schratt et al., 2004). Obwohl die Studie ebenfalls auf die PI3K/mTOR Signaltransduktion fokussiert ist, wurde die spezifische und rapamycin-unabhängige Induktion mehrerer neuronaler mRNAs gezeigt. Ebenfalls wurde deutlich belegt werden, daß lediglich die Translation einer relativ kleinen Gruppe von mRNAs signifikant durch BDNF induziert wird. Es wird daher vermutet, daß neben bestimmten Polypyrimidinsequenzen in der 5'UTR (*5' tract of polypyrimidines*, 5'TOP; Stolovich et al., 2002) auch sequenzspezifisch gebundene *trans*-agierende Faktoren Ziele der durch BDNF ausgelösten multiplen Signalkaskaden darstellen (Schratt et al., 2004). Die Applikation von BDNF auf Neuronen, die shank1-3'UTR-fusionierte Luziferase-mRNA exprimierten, führte zu einer Aufhebung der zuvor beobachteten Repression und einem Anstieg der Expression in den Bereich des Kontrollwertes. Es ist zu vermuten, daß die Rolle von hnRNP K als *docking-platform* zur Transduktion extrazellulärer Signale auf nucleinsäure-abhängige Prozesse in diesem Zusammenhang eine wesentliche Rolle spielt. Von Ostareck et al. (2002) wurde eine vergleichbare Derepression der Translation von mRNA, mit einer LOX-DICE Elementen enthaltenden 3'UTR, nach Phosphorylierung von hnRNP K durch c-Src beobachtet. Dies führt zu der Hypothese, daß Phosphorylierung von hnRNP K, gegebenenfalls durch c-Src Kinase, eine regulative Funktion in der lokalen dendritischen Translation von shank1 einnehmen (Abb. 4.2 B). In diesem Zusammenhang könnte ebenfalls das RNA-bindende Protein *c-Src-associated in mitosis*, 68kD (Sam68), mit einer primären Funktion in der Prozessierung von prä-mRNA, von großem Interesse sein. Das Protein ist ein Substrat der c-Src Kinase, interagiert RNA-unabhängig mit hnRNP K (Yang et al., 2002) und wird aktivitätsabhängig, entlang von Mikrotubuli, in distale Dendriten transportiert (Grange et al., 2004; Fredj et al., 2004). Es wird vermutet, daß die Funktion beider Proteine in der Signaltransduktion durch die gegenseitige Bindung reguliert werden kann (Yang et al., 2002).

Sicherlich werden von Neuronen eine Vielzahl von Mechanismen zur Kontrolle der Translation einer dendritischen mRNA eingesetzt, durch die u.a. elektrisch oder neurotroph ausgelöste Signalkaskaden integriert werden. Die Entschlüsselung der vielfältigen Interaktionen, die eine zeitlich und räumlich regulierte Expression synaptischer Proteine ermöglichen, wird ein wesentlicher Baustein für das Verständnis höherer Gehirnfunktionen wie Kognition, Lernen und Gedächtnis sein.

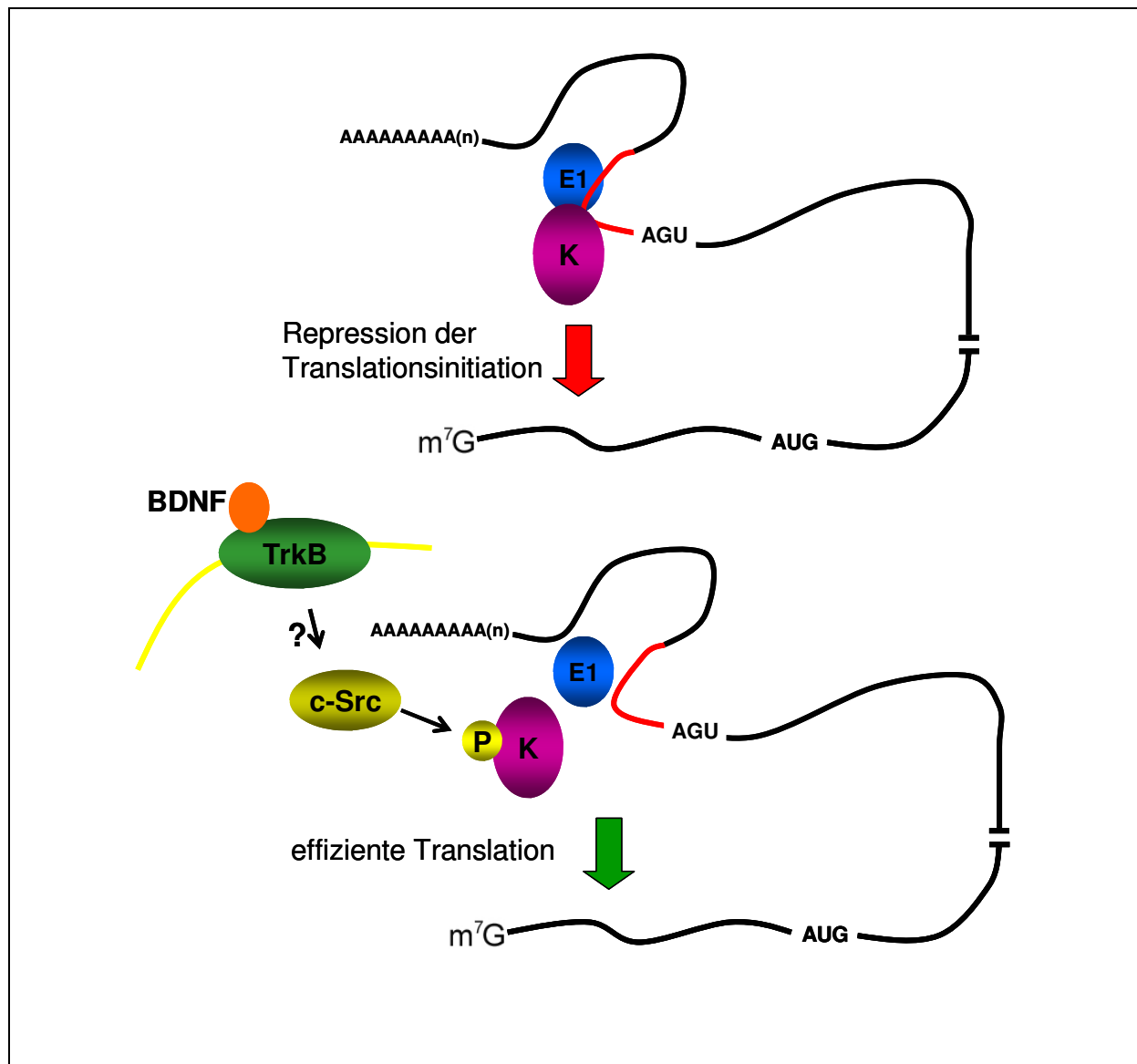


Abb. 4.2 Kontrolle der Translationsinitiation durch BDNF-induzierte Phosphorylierung von hnRNP K:
A) Die Bindung von hnRNP K und PBCP1 (hnRNP E1) an LOX-DICE Elemente in der 3'UTR einer mRNA blockiert die Rekrutierung von 60 S-Ribosomenuntereinheiten und inhibiert somit die Translationsinitiation
B) Die Phosphorylierung von hnRNP K durch c-Src Kinase führt zu einer Dissoziation der Proteine von der 3'UTR und somit zu einer Aufhebung der Translationsrepression. Falls diese Kinase in die multiplen Signalkaskaden, die durch die Bindung von BDNF an den TrkB-Rezeptor ausgelöst werden involviert ist, stellt dieser Mechanismus eine plausible Erklärung für die Translationsstimulation von mRNA mit fusioniertem shank1-DTE durch BDNF dar (ATG: Startcodon; TGA: Stopcodon; m^7G : 7-Methylguanotin-cap; P: Phosphatrest).

5 Literaturverzeichnis

Aakalu G., Smith W.B., Nguyen N., Jiang C., and Schuman E.M. (2001)

Dynamic visualization of local protein synthesis in hippocampal neurons
Neuron, Vol. 30, 489–502.

Adam G., Matus A. (1996)

Role of actin in the organisation of brain postsynaptic densities
Brain Res. Mol. Brain Res., Vol. 43(1-2), 246-250

Aicardi G., Emanuela Argilli E., Cappello S., Santi S., Riccio M., Thoenen H., Canossa H.M. (2004)

Induction of long-term potentiation and depression is reflected by corresponding changes in secretion of endogenous brain-derived neurotrophic factor
PNAS, Vol. 101(44), 15788–15792

Ainger K., Avossa D., Morgan F., Hill S.J., Barry C., Barbarese E., Carson J.H. (1993) Transport and localization of

exogenous myelin basic protein mRNA microinjected into oligodendrocytes
J. Cell. Biol., Vol. 123, 431–441

Atwater J. A., Wisdom R., Verma I.M. (1990)

Regulated mRNA stability
Annual Rev. Genet. 24:519–641

Bailey C.H., Bartsch D., Kandel E.R. (1996)

Toward a molecular definition of long-term memory storage
PNAS, Vol. 93, 13445-13452

Balkowiec A., Katz D.M. (2000)

Activity-dependent release of endogenous brain-derived neurotrophic factor from primary sensory neurons detected by ELISA *in situ*
J. Neurosci., Vol. 20(19), 7417-7423

Baneyx F. (1999)

Recombinant protein expression in *Escherichia coli*
Curr. Opin. Biotechnol., Vol. 10, 411-421

Barbacid M. (1994)

The Trk family of neurotrophin receptors
J. Neurobiol., Vol. 25, 1386– 1403

Barbarese E., Koppel D.E., Deutscher M.P., Smith C.L., Ainger K., Morgan F., Carson J.H. (1995)

Protein translation components are colocalized in granules in oligodendrocytes
J. Cell Sci., Vol. 108 (Pt 8), 2781-2790

Bashirullah A., Cooperstock R. L., Lipshitz H. D. (1998)

RNA localization in development
Annual Rev. Biochem., Vol. 67, 335-94

Beelman C. A., Parker R. (1995)

Degradation of mRNA in eukaryotes
Cell, Vol. 81, 179–183

Berleth T., Burri M., Thoma G., Bopp D., Richstein S., Frigerio G., Noll M., Nusslein-Volhard C (1988).

The role of localization of bicoid RNA in organizing the anterior pattern of the Drosophila embryo
EMBO J, Vol. 7(6), 1749-56

Bernstein P.L., Peltz S.W., Ross, J. (1989)

The poly(A)-binding protein complex is a major determinant of mRNA stability *in vitro*
Mol. Cell Biol., Vol. 9, 659–670

Bian F., Chu T., Schilling K., Oberdick J. (1996)

Differential mRNA transport and the regulation of protein synthesis: selective sensitivity of Purkinje cell dendritic mRNA to translational inhibition
Mol. Cell. Neurosci., Vol 7, 116–133

Blichenberg A., Schwanke B., Rehbein M., Garner C.C., Richter D., and Kindler S. (1999) Identification of a *cis*-acting dendritic targeting element in MAP2 mRNAs
J. Neurosci., Vol.19, 8818-29

Blichenberg A., Rehbein M., Müller R., Garner C.C., Richter D., Kindler S. (2001)
Identification of a *cis*-acting dendritic targeting element in the mRNA encoding the alpha subunit of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II
Eur. J. Neurosci., Vol. 13, 1881-1888

Bliss T.V., Lomo T. (1973)
Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path
J. Physiol., Vol. 232(2), 331-356

Boeckers T.M., Kreutz M.R., Winter C., Zuschratter W., Smalla K.H., Sanmarti-Vila L., Wex H., Langnaese K., Bockmann J., Garner C.C., Gundelfinger, E.D. (1999)
Proline-rich synapse-associated protein-1/cortactin binding protein 1 (ProSAP1/CortBP1) is a PDZ-domain protein highly enriched in the postsynaptic density
J. Neurosci., Vol.19, 6506– 6518

Boeckers T.M., Mameza M.G., Kreutz M.R., Bockmann J., Weise C., Buck, F., Richter, D., Gundelfinger, E.D., Kreienkamp, H.J.(2001)
Synaptic scaffolding proteins in rat brain. Ankyrin repeats of the multidomain Shank protein family interact with the cytoskeletal protein alpha-fodrin
J. Biol. Chem., Vol. 276, 40104– 40112

Böckers T.M., Segger-Junius M., Iglauder P., Bockmann J., Gundelfinger E.D., Kreutz M.R., Richter D., Kindler S., 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., Vol. 26, 182–190

Bomsztyk K., Van Seuningen I., Suzuki H., Denisenko O., Ostrowski J. (1997)
Diverse molecular interactions of the hnRNP K protein
FEBS Lett., Vol. 403(2), 113-115

Bomsztyk K. Denisenko O., Ostrowski J.(2004)
hnRNP K: One protein multiple processes
BioEssays, Vol. 26, 629–638

Bockmann J., Kreutz M.R., Gundelfinger E.D., Böckers T.M. (2002)
ProSAP/Shank postsynaptic density proteins interact with insulin receptor tyrosine kinase substrate IRSp53
J. Neurochem., Vol. 83, 1013–1017

Brendel C. (2004)
Charakterisierung von Staufen1-enthaltenden Ribonukleoprotein Partikeln in Säugern
Dissertation Universität Hamburg

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

Brewer G.J., Torricelli J.R., Evege E.K., Price P.J. (1993).
Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination
J. Neurosci. Res., Vol. 35(5), 567-576

Brewer G, Ross J. (1990)
Messenger RNA turnover in cell-free extracts
Methods Enzymol., Vol.181, 202-209

Broadwell R.D., Cataldo A.M. (1983)
The neuronal endoplasmic reticulum: its cytochemistry and contribution to the endomembrane system.I. Cell bodies and dendrites
J. Histochem. Cytochem. Vol.31, 1077–1088

Brugg B., Matus A. (1991)

Phosphorylation determines the binding of microtubule-associated protein 2 (MAP2) to microtubules in living cells
J. Cell. Biol., Vol. 114(4), 735-743

Burd CG, Dreyfuss G. (1994)

Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins
Science, Vol. 265, 615-621

Burgin K.E., Waxham M.N., Rickling S., Westgate S.A., Mobley W.C., Kelly P.T. (1990)

In situ hybridization histochemistry of Ca/calmodulin dependent protein kinase in developing rat brain.
J. Neurosci., Vol. 10, 1788-1789

Buckanovich R.J., Posner J.B, Darnell R.B. (1993)

Nova, the paraneoplastic Ri antigen, is homologous to an RNA-binding protein and is specifically expressed in the developing motor system
Neuron, Vol. 11, 657-672

Buckanovich R.J., Darnell, R.B. (1997)

The neuronal RNA binding protein Nova-1 recognizes specific RNA targets *in vitro* and *in vivo*
Mol. Cell. Biol., 17, 3194-3201

Buckanovich R.J., Yang Y.Y. and Darnell R.B. (1996)

The onconeural antigen Nova-1 is a neuron-specific RNA-binding protein, the activity of which is inhibited by paraneoplastic antibodies
J. Neurosci., Vol. 16, 1114-1122.

Caceres A., Banker G., Steward O., Binder L., Payne M. (1984)

MAP2 is localized to the dendrites of hippocampal neurons which develop in culture.
Brain Res., Vol. 315(2), 314-318

Cammalleri M., Lütjens R., Berton F., King A.R., Simpson C., Francesconi W., Sanna P.P. (2003)

Time-restricted role for dendritic activation of the mTOR-p70S6K pathway in the induction of late-phase long-term potentiation in the CA1
PNAS, Vol. 100, 14368-14373

Chen L., Chetkovich D.M., Petralia R.S., Sweeney N.T., Kawasaki Y., Wenthold R.J., Brecht D.S., Nicoll R.A. (2000)

Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms.
Nature, Vol. 408, 936-943

Chkheidze A.N., Lyakhov D.L., Makeyev A.V., Morales J., Kong J., Liebhaber S. (1999)

Assembly of the α -globin mRNA stability complex reflects binary interaction between the pyrimidine-rich 3'-untranslated region determinant and poly(C) binding protein α CP
Mol. Cell Biol., Vol. 19, 4572-4581

Clegg JB, Weatherall DJ, Milner PF. (1971)

Haemoglobin Constant Spring: a chain termination mutant?
Nature, Vol. 234, 337-340

Clemens MJ, Bommer U-A (1999)

Translational control: the cancer connection
Int. J. Biochem. Cell. Biol., Vol., 31:73-86

Cote C. A., Gautreau D., Denegre J.M., Kress T. L., Terry N.A. Mowry K.L. (1999)

A Xenopus protein related to hnRNP I has a role in cytoplasmic RNA localization.
Mol. Cell, Vol. 4, 431-437

Czyzyk-Krzeska M.F., Beresh J.E. (1996)

Characterization of the hypoxia-inducible protein binding site within the pyrimidine-rich tract in the 3'-untranslated region of the tyrosine hydroxylase mRNA.
J. Biol. Chem., Vol. 271(6), 3293-3299

Czyzyk-Krzeska M.F., Bendixen A.C. (1999)

Identification of the Poly(C) Binding Protein in the Complex Associated With the 3' Untranslated Region of Erythropoietin Messenger RNA
Blood, Vol. 93(6), 2111-2120

Ehrlich K.C. (1993)

Partial Purification of a pea seed DNA-binding Protein that specifically recognizes -methylcytosine
Prep. Biochem., Vol (23), 423-438

Evans J.R., Mitchell S.A., Spriggs K., Ostrowski J., Bomsztyk K. (2003)

Members of the poly (rC) binding protein family stimulate the activity of the c-myc internal ribosome entry segment *in vitro* and *in vivo*
Oncogene Vol. 22, 6068–6076

Davis H.P., Squire L.R. (1984)

Protein synthesis and memory: a review
Psychol. Bull., Vol. 96, 518–59

Denisenko O.N., O'Neill B., Ostrowski J., Van Seuning I., Bomsztyk K. (1996)

Zik, a transcriptional repressor that interacts with the heterogenous nuclear ribonuclear particle K protein
J- Biol- Chem., Vol 271, 27701–27706

Dobson T., Minic A., Nielsen K., Amiot E., Krushel L. (2005)

Internal initiation of translation of the TrkB mRNA is mediated by multiple regions within the 5' leader
Nucleic Acids Res., Vol. 33 (9), 2929–2941

Dredge B.K., Darnell R.B. (2003)

Nova regulates GABA(A) receptor gamma2 alternative splicing via a distal downstream UCAU-rich intronic splicing enhancer
Mol. Cell Biol., Vol. 23(13), 4687-700

Ehlers M.D. (2003)

Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome pathway
Nature Neurosci., Vol. 6(3), 231-242

Expert-Bezancon A., Le Caer J.P., Marie J. (2002)

hnRNP K is a component of an intronic splicing enhancer complex that activates the splicing of the alternative exon 6A from chicken-beta-tropomyosin pre-mRNA
J. Biol. Chem., Vol. 277, 16614–16623

Ford L.P., Bagga P.S., Wilusz J. (1997)

The poly(A) tail inhibits the assembly of a 3'-to-5' exonuclease in an *in vitro* RNA stability system
Mol. Cell Biol., Vol. 17, 398–406

Dreyfuss G., Kim V. N., Kataoka N. (2002)

Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry
Nat. Rev. Mol. Cell Biol., Vol. 3, 195–205

Ephrussi, A., Dickinson, L. K., Lehmann, R. (1991)

Oskar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant nanos
Cell, Vol. 66(1), 37-50

Eom T., Antar L.N., Singer R.H., Bassell G.J.. (2003)

Localization of a beta-actin messenger ribonucleoprotein complex with zipcode-binding protein modulates the density of dendritic filopodia and filopodial synapses
J. Neurosci., Vol 23, 10433–44

Fatt P., Katz B. (1952)

Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings
J. Physiol., Vol. 117(1), 109-128

Ferrandon, D., Koch, I., Westhof, E., Nusslein-Volhard, C (1997)

RNA-RNA interaction is required for the formation of specific bicoid mRNA 3' UTR-Staufen ribonucleoprotein particles
EMBO J. , Vol. 16(7), 1751-8

Gooney, M. & Lynch, M. A. (2001)

Long-term potentiation in the dentate gyrus of the rat hippocampus is accompanied by brain-derived neurotrophic factor-induced activation of TrkB
J. Neurochem., Vol. 77, 1198–1207

Fingar F., Blenis J. (2004)

Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression
Oncogene, Vol. 23, 3151–3171

Francke F., Richter D., Bachner D. (2005)

Immunohistochemical distribution of MIZIP and its co-expression with the Melanin-concentrating hormone receptor 1 in the adult rodent brain.
Brain Res. Mol. Brain Res. (Jun 8; in press)

Frey U., Krug M., Reymann K.G., Matthies H. (1988)

Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, blocks late phases of LTP phenomena in the hippocampal CA1 region *in vitro*.
Brain Res. 452:57–65

Frey U., Morris R.G.M. (1997)

Synaptic tagging and long-term potentiation
Nature, Vol. 385, 533–536

Fredj N.B., Julien Grange J., Rémy Sadoul R., Richard S., Goldberg Y., Boyer V. (2004)

Depolarization-induced translocation of the RNA-binding protein Sam68 to the dendrites of hippocampal neurons
J. Cell Sci., Vol. 117, 1079–1090

Fribourg S., Gatfield D., Izaurrealde E., Conti E. (2003)

A novel mode of RBD-protein recognition in the Y14-Mago complex
Nat. Struct. Biol., Vol. 10, 433–439

Funke B., Zuleger B., Benavente R., Schuster T., Goller M., Stevenin J., Horak I. (1996)

The mouse poly(C)-binding protein exists in multiple isoforms and interacts with several RNA-binding proteins
Nucleic Acids Res., Vol. 24, 3821–3828

Garcia EP, Mehta S, Blair LA, Wells DG, Shang J, Fukushima T, Fallon JR, Garner CC, Marshall J. (1998)

SAP90 binds and clusters kainate receptors causing incomplete desensitization.
Neuron, Vol. 21(4), 727–739

Gardioli A., Racca C., Triller A. (2001)

RNA transport and local protein synthesis in the dendritic compartment
Results Probl. Cell. Differ., Vol. 34, 105–128

Garner C.C., Tucker R.P., Matus A. (1988)

Selective localization of messengerRNA for cytoskeletal protein MAP2 in dendrites
Nature, Vol. 336, 674–7

Gazzaley A.H., Benson D.L., Huntley G.W., Morrison J.H. (1997)

Differential subcellular regulation of NMDAR1 protein and mRNA in dendrites of dentate gyrus granule cells after perforant path transection
J. Neurosci., Vol. 17(6), 2006–2017

Gebauer F., Hentze W.M. (2004)

Molecular mechanisms of translational control
Nature Rev., Vol. 5, 827–834

Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. (1999)

eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation
Annual Rev. Biochem., Vol. 68, 913–963

Gingras A., Raught B., Sonenberg N. (2001)

Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR
Gen. Dev., Vol. 15, 807–826

Goelet P., Castellucci V.F., Schacher S., Kandel E.R. (1986)

The long and the short of long-term memory - a molecular framework
Nature, Vol. 322, 419–22

Goffeau A., Barrell H., Bussey H., Davis R.W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J.D., Jacq C., Johnston M., Louis E.J., Mewes H.W., Murakami Y., Philippse P., Tettelin H., Oliver S.G. (1996)

Life with 6000 Genes
Science, Vol. 274, 546–567

Gonzalo P., Reboud J. P. (2003)

The puzzling lateral flexible stalk of the ribosome
Biol. Cell, Vol. 95, 179–293

Gooney M., Lynch M.A.

Long-term potentiation in the dentate gyrus of the rat hippocampus is accompanied by brain-derived neurotrophic factor-induced activation of TrkB
J. Neurochem., Vol.77(5), 1198-1207

Görlach M., Burd C. G., Dreyfuss G. (1994)

The mRNA Poly-A-Binding Protein: Localizatin, Abundance and RNA-binding Specificity
Exp. Cell Res., Vol.211, 400–407

Goslin K, Asmussen H, Banker G (1998)

Rat hippocampal neurons in lowdensityculture
Culturing nerve cells, 2nd Ed (Banker G, Goslin K,eds), 339–371. Cambridge, MA. MIT

Grabowski, P. J. (1998)

Splicing regulation in neurons: tinkering with cell-specific control.
Cell, Vol. 92(6),709-712

Grange J., Boyer V., Fabian-Fine R., Fredj N.B., Sadoul R., Goldberg Y. (2004)

Somatodendritic localization and mRNA association of the splicing regulatory protein Sam68 in the hippocampus and cortex
J. Neurosci. Res., Vol. 75(5), 654-666

Gray N., Hentze M. (1994)

Iron regulatory protein prevents binding of the 43S translation pre-initiation complex to ferritin and eALAS mRNAs
EMBO J., Vol. 13(16), 3882-3891

Gibson T.J., Thompson J.D., Heringa J. (1993)

The KH domain occurs in a diverse set of RNA-binding proteins that include the antiterminator NusA and is probably involved in binding to nucleic acid
FEBS Lett., Vol. 324, 361–366

Grigstone j.G., VanDongen H.M.A., McNamara I.I., VanDongen A.M.J. (2005)

Translation of an integral membrane protein in distal dendrites of hippocampal neurons
European Journal of Neuroscience, Vol. 21, 1457–1468

Gu W., Pan F., Zhang H., Bassell G.J., Singer R.H. (2002)

A predominantly nuclear protein affecting cytoplasmic localization of β -actin mRNA in fibroblasts and neurons
J. Cell. Biol., Vol 156(1),41-51

Haraguchi K., Satoh K., Yanai H., Hamada F., Kawabuchi M., Akiyama T. (2000)

The hDLG-associated protein DAP interacts with dynein light chain and neuronal nitric oxide synthase
Genes Cells, Vol. 5, 905–911

Habelhah H., Shah K., Huang L., Ostareck-Lederer A., Burlingame A.(2001).

ERK phosphorylation drives cytoplasmic accumulation of hnRNPKand inhibition of mRNA translation
Nature Cell Biol., Vol. 3, 325–330

Hachet O., Ephrussi, A. (2001)

Drosophila Y14 shuttles to the posterior of the oocyte and is required for oskar mRNA transport
Curr. Biol., Vol. 11(21), 1666-1674

Hachet O., Ephrussi, A. (2004)

Splicing of oskar RNA in the nucleus is coupled to its cytoplasmic localization
Nature Vol. 428(6986):959-63

Harris K. M., Stevens J. K. (1989)

Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics
J Neurosci.,Vol 9(8), 2982-97

Hartmuth K., Urlaub H., Vornlocher H.P., Will C.L., Gentzel M., Wilm M., Luhrmann R. (2002)

Protein composition of human prespliceosomes isolated by a tobramycin affinity-selection method.
PNAS, Vol. 99(26),16719-16724

Hartmuth K., Vornlocher H.P., Luhrmann R. (2004)

Tobramycin affinity tag purification of spliceosomes
Methods Mol. Biol., Vol. 257, 47-64

Herb A., Wisden W., Catania M.V., Marechal D., Dresse A., Seeburg P.H. (1997)

Prominent dendritic localization in forebrain neurons of a novel mRNA and its product, dendrin
Mol. Cell Neurosci., Vol. 8(5), 367-374

Holcik M., Liebhaber S.A. (1997)

Four highly stable eukaryotic mRNAs assemble 3' untranslated region RNA-protein complexes sharing cis and trans components.
PNAS, Vol. 94(6), 2410-2414

Hornstein E., Harel H., Levy G., Meyuhas O. (1999)

Overexpression of poly(A)-binding protein down-regulates the translation or the abundance of its own mRNA
FEBS Lett., Vol. 457(2):209-213

Hornstein E., Tang H., Meyuhas O. (2001)

Mitogenic and nutritional signals are transduced into translational efficiency of TOP mRNAs
Cold Spring Harb Symp Quant Biol., Vol. 66, 477-484

Hebb D. (1950)

Animal and physiological psychology
Annual Rev. Psychol. Vol. 1, 173-188

Hensold J.O., Barth-Baus D., Stratton C.A. (1996)

Inducers of erythroleukemic differentiation cause messenger RNAs that lack poly(A)-binding protein to accumulate in translationally inactive salt-labile 80S ribosomal complexes.
J. Biol. Chem., Vol. 271, 23246-23254

Hering, H., and M. Sheng (2001)

Dendritic spines: structure, dynamics and regulation
Nature Rev. Neurosci., Vol. 2, 880-888

Holmes, D.S., and M. Quigley (1981)

A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids
Annual Biochem., Vol. 114, 193-7

Huber K.M., Kayser M.S., Bear M.F. (2000)

Role for rapid dendritic protein synthesis in hippocampal mGluR-dependent long-term depression
Science Vol. 288 (5469), 1254-1257

Hunt R., Jackson R.J.

Polypyrimidine-tract binding protein (PTB) is necessary, but not sufficient, for efficient internal initiation of translation of human rhinovirus-2 RNA
RNA, Vol. 5, 344-359

Iacono M., Mignone F., Pesole G. (2005)

uAUG and uORFs in human and rodent 5'untranslated mRNAs
Gene., Vol. 349, 97-105

Itoh, T. J., Hisanaga, S., Hosoi, T., Kishimoto, T., Hotani, H. (1997)

Phosphorylation states of microtubule-associated protein 2 (MAP2) determine the regulatory role of MAP2 in microtubule dynamics
Biochemistry, Vol. 36(41), 12574-12582

Jansen, R. P. (2001)

mRNA localization: message on the move
Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., Vol. 2(4), 247-256

Jiang C., Schuman E. (2002)

Regulation and function of local protein synthesis in neuronal dendrites
Trends Biochem. Sci., Vol. 27(10), 506-513

Johnstone O., Lasko P. (2001)

Translational regulation and RNA localization in *Drosophila* oocytes and embryos
Annu. Rev. Genet. Vol. 35, 365-406.

- Jourdi M., Iwakura Y., Narisawa-Saito M., Ibaraki K., Xiong H., Wanatabe M., Hayashi Y., Takei N., Nawa K. (2003)**
Brain-derived neurotrophic factor signal enhances and maintains the expression of AMPA receptor-associated PDZ proteins in developing cortical neurons
Dev. Biol., Vol., 263; 216-230
- Ju W., Morishita W., Tsui J., Gaietta G., Deerinck T.J. (2004)**
Activity-dependent regulation of dendritic synthesis and trafficking of AMPA receptors
Nature Neurosci., Vol. 7, 244–53
- Kamath R.V., Leary D.J., Huang S. (2001)**
Nucleocytoplasmic shuttling of polypyrimidine tract-binding protein is uncoupled from RNA export
Mol. Biol. Cell., Vol. 12, 3808–3820
- Kanai Y., Dohmae N., Hirokawa N. (2004)**
Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule
Neuron, Vol. 43, 513–25
- Kahvejian A., Roy G., Sonenberg N. (2001)**
The mRNA closed-loop model: the function of PABP1 and PABP1-interacting proteins in mRNA translation
Cold Spring Harb. Symp. Quant. Bio., Vol. 66, 293-300
- Kandel, E.R. (2001)**
The molecular biology of memory storage: a plastic dialogue between genes and synapses
Science 294, 1030–1038.
- Kang H., Schuman E.M. (1996)**
A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced synaptic plasticity
Science, Vol. 273, 1402–1406
- Kikuchi T., Ichikawa M., Tateiwa H., Fu L., Higuchi K., Yosimura N. (2000)**
Molecular Cloning and Characterization of a new Neuron-Specific Homologue of Rat Polypyrimidine Tract binding Protein
J. Biochem., Vol. 128, 811-821
- Kiledjian M., DeMaria C.T., Brewer G., Novick K. (1997)**
Identification of AUF1/hnRNP-D as a component of the α -globin mRNA stability complex
Mol. Cell. Biol., Vol. 17(8), 4870-4876
- Kim H.K., Kim Y., Kim E., Schuman E.**
Measurement of dendritic mRNA transport using ribosomal markers
Biochem. Biophys. Res. Com., Vol 328 (2005) 895-900
- Kindler S., Rehbein M., Classen B., Richter D., Böckers T. (2004)**
Distinct spatiotemporal expression of SAPAP transcripts in the developing rat brain: a novel dendritically localized mRNA
Mol. Brain Res., Vol. 126, 14–21
- Kindler S., Wang H., Richter D., Tiedge H. (2005)**
RNA Transport and Local Control of Translation
ARI, Vol. 22, 2
- Kislauskis E.H., Zhu X., Singer R.H. (1994)**
Sequences responsible for intracellular localization of beta-actin messenger RNA also affect cell phenotype
J. Cell Biol., Vol. 127, 441–451
- Knowles R.B., Sabry J.H., Martone M.E., Deerinck T.J., Ellisman M.H. (1996)**
Translocation of RNA granules in living neurons
J. Neurosci., Vol. 16, 7812–7820
- Kohrmann M., Luo M., Kaether C., DesGroseillers L., Dotti C.G., Kiebler M.A. (1999)**
Microtubule-dependent recruitment of Staufen-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons.
Mol. Biol. Cell., Vol. 10, 2945–2953
- Kolodziej S.J., Hudmon A., Waxham M.N., Stoops J.K. (2000)**
Three-dimensional reconstructions of calcium/calmodulin-dependent (CaM) kinase II α and truncated CaM kinase II α reveal a unique organization for its structural core and functional domains.
J. Biol. Chem., Vol. 275(19), 14354-14359

Kornau H.C., Schenker L. T., Kennedy M.B. Seeburg P.H. (1995)

Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95
Science, Vol. 269, 1737-1740

Kozak M. (1986)

Influences of mRNA secondary structure on initiation by eukaryotic ribosomes
PNAS, Vol. 83(9), 2850-2854

Kozak M. (1987)

An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs
Nucleic Acids Res., Vol. 15, 8125-48

Kozak M. (1989)

Context effects and inefficient initiation at non-AUG codons in eucaryotic cell-free translation systems
Mol. Cell Biol., Vol. 9(11), 5073-5080

Kozak M. (1991)

Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation
J. Biol. Chem., Vol. 266(30), 19867-19870

Kozak M. (2004)

How strong is the case for regulation of the initiation step of translation by elements at the 3' end of eukaryotic mRNAs?
Gene, Vol. 343(1), 41-54

Kreienkamp H.J., Zitzer H., Gundelfinger E.D., Richter D., Bockers T.M. (2000)

The calcium-independent receptor for alpha-latrotoxin from human and rodent brains interacts with members of the ProSAP/SSTRIP/Shank family of multidomain proteins
J Biol. Chem., Vol.275(42), 32387-32390

Kress T.L., Yoon Y.J., Mowry K.L. (2004)

Nuclear RNP complex assembly initiates cytoplasmic RNA localization
J. Cell Biol., Vol. 165, 203-211

Krichevsky A., Kosik K. S. (2001)

Neuronal RNA Granules: A Link between RNA Localization and Stimulation-Dependent Translation
Neuron, Vol. 32, 683-696

Krokowski D., Tchorzewski M., Boguszewska A., Grankowski N. (2005)

Acquisition of a stable structure by yeast ribosomal P0 protein requires binding of P1A-P2B complex: In vitro formation of the stalk structure
Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 1724, 59 – 70

Kwon S., Barbarese E., Carson J.H. (1999)

The cis-acting RNA trafficking signal from myelin basic protein mRNA and its cognate trans-acting ligand hnRNP A2 enhance cap-dependent translation
J Cell Biol., Vol. 147(2), 247-256

Laemmli U.K. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4
Nature, Vol. 227, 680-685

Laig M., Pape M., Hundrieser J., Flatz G., Sanguansermsri T., Das B.M., Deka R, Yongvanit P, Mularlee N. (1990)

The distribution of the Hb Constant Spring gene in Southeast Asian populations
Hum. Genet., Vol. 84, 188-190

Lavorgna G., Dahary D., Lehner B., Sorek R., Sanderson C..M., Casari G. (2004)

In search of antisense
Trends Biochem. Sci., Vol. 29, 88-94

Lawrence J.B., Singer R.H (1986)

Intracellular localization of messenger RNA for cytoskeletal proteins
Cell, Vol. 45, 407-415

Leffers H., Dejgaard K., Celis J.E. (1995)

Characterisation of two major cellular poly(rC)-binding human proteins, each containing three K-homologous (KH) domains
Eur. J. Biochem., Vol. 230, 447-453

Lessmann V., Gottmann K., Malcangio M. (2003)

Neurotrophic secretion: current facts and future prospects
Prog. Neurobiol., Vol. 69(5), 341-374

Le Hir H., Izaurralde E., Maquat L. E., and Moore M.J. (2000)

The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon
Junctions
EMBO J., Vol. 19, 6860-6869

Levi-Montacini R. (1987)

The nerve growth factor 35 years later
Science, Vol 237, 1154-1162

Lim S., Naisbitt S., Yoon J., Hwang J.I., Suh P.G., Sheng M., Kim E. (1999).

Characterization of the Shank family of synaptic proteins. Multiple genes, alternative
splicing, and differential expression in brain and development
J. Biol. Chem., Vol, 274(41) 29510-29518

Ling J., Morley S.J., Pain V.M., Marzluff W.F., Gallie D.R.(2002)

The histone 3'-terminal stem-loop-binding protein enhances translation through a functional and physical interaction with
eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) and eIF3
Mol. Cell. Biol., Vol. 22(22), 7853-7867

Long R. M., Gu W., Lorimer E., Singer R. H. Chartrand P. (2000)

She2p is a novel RNA-binding protein that recruits the Myo4p/She3p complex to *ASH1* mRNA
EMBO J., Vol. 19, 6592-6601

Stolovich M., Tang H., Hornstein E., Levy G., Cohen R., Bae S.S., Birnbaum M.J., Meyuhas O. (2002)

Transduction of growth or mitogenic signals into translational activation of TOP mRNAs is fully reliant on the
phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathway but requires neither S6K1 nor rpS6 phosphorylation
Mol. Cell. Biol., Vol. 22(23), 8101-8113

Makeyev A.V., Chkheidze A.N., Liebhaber S.A. (1999)

A Set of Highly Conserved RNA-binding Proteins, aCP-1 and aCP-2, Implicated in mRNA Stabilization, Are Coexpressed
from an Intronless Gene and Its Intron-containing Paralog
J. Biol. Chem., Vol. 274(35), 24849-24857

Makeyev A.V., Liebhaber S.A. (2002)

The poly(C)-binding proteins: a multiplicity of functions and a search for mechanisms
RNA, Vol. 8, 265-278

Makeyev A.V., Liebhaber S.A. (2000)

Identification of two novel mammalian genes establishes a subfamily of KH-domain RNA-binding proteins
Genomics, Vol. 67, 301-316

Malinow R., Schulman H., Tsien R.W. (1989)

Inhibition of postsynaptic PKC or CaMKII blocks induction but not expression of LTP
Science Vol. 245(4920), 862-6

Marin P. Nastiuk K.L., Daniel N., Girault J., Czernik A. J., Glowinski J. Nairn A.C. Premont J. (1997)

Glutamate-Dependent Phosphorylation of Elongation Factor-2 and Inhibition of Protein Synthesis in Neurons
J. Neurosci, Vol. 17(10), 3445-3454

Martin K.C., Kosik K,S, (2002)

Synaptic tagging – who's it?
Nat. Rev. Neurosci., Vol. 3(10), 813-20

Markovtsov V., Nikolic J.M., Goldman J.A., Turck C.W., Chou M. Black D.L.(2000)

Cooperative Assembly of an hnRNP Complex Induced by a Tissue-Specific Homolog of Polypyrimidine Tract Binding
Protein
Mol. Cell. Biol., Vol. 20(20), 7463-7479

Mandel M, Higa A. (1970)

Calcium-dependent bacteriophage DNA infection
J. Mol. Biol., Vol. 53(1),159-162

Mangus D.A., Evans M.C., Jacobson, A. (2003)

Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the posttranscriptional control of gene expression
Genome Biol., Vol 4, 223

Martin K.C., Casadio A., Zhu H., Yaping E., Rose J., Chen M., Craig H. Bailey, Kandel E.R. (1997)

Synapse-Specific, Long-Term Facilitation of Aplysia Sensory to Motor Synapses: A Function for Local Protein Synthesis in Memory Storage
Cell, Vol. 91, 927-938

Mathews D.H., Sabina J., Zuker M., Turner D.H. (1999)

Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure
J. Mol. Biol., Vol. 288, 911-940

Mathews M.B., Sonenberg N., Hershey J.W.B. (2000)

Origins and principles of translational control. In Translational Control of Gene Expression
Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Press, 1-31

Mattaj J. W., Englmeier L. (1998)

Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase
Annu. Rev. Biochem., Vol. 67, 265-306

Matunis M.J., Michael W.M. and Dreyfuss G. (1992)

Characterization and primary structure of the poly(C)-binding heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex K protein
Mol. Cell. Biol., Vol. 12, 164-171

Mayford M., Wang J., Kandel E.R., O'Dell T.J. (1995)

CaMKII regulates the frequency-response function of hippocampal synapses for the production of both LTD and LTP
Cell, Vol. 81(6), 891-904

Mazumder B., Seshadri V., Fox P.L. (2003)

Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means
TRENDS in Biochem. Sci., Vol. 28(2), 91-98

McAllister A.K., Katz L.C., Lo D.C. (1997)

Opposing roles for endogenous BDNF and NT-3 in regulating cortical dendritic growth
Neuron, Vol. 18(5), 767-778

McAllister A.K., Katz L.C., Lo D.C. (1999)

Neurotrophins and synaptic plasticity
Annual Rev. Neurosci., Vol. 22, 295-318

McKay S.E., Purcell A.L., Carew T.J. (1999)

Regulation of synaptic function by neurotrophic factors in vertebrates and invertebrates: implications for development and learning.
Learn Mem., Vol. 6(3), 193-215

Meyuhas O. (2000)

Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level
Eur. J. Biochem., Vol. 267, 6321-6330

Miau L.H., Chang C.J., Shen B.J., Tsai W.H., Lee S.C. (1998)

Identification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) as a repressor of C/EBP β -mediated gene activation
J. Biol. Chem., Vol. 273(17), 10784-10791

Michael W.M. Eder S., Dreyfuss G 1997.

The K nuclear shuttling domain: a novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein
EMBO, Vol. 16(12), 3587-3598

Michelotti E.F., Michelotti G.A., Aronsohn A.I., Levens D. (1996)

Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is a transcription factor
Mol. Cell. Biol., Vol. 16, 2350-2360

Micklem D. R., Adams J., Grunert S., Johnston D. (2000)

Distinct roles of two conserved Staufen domains in oskar mRNA localization and translation.
EMBO, Vol. 19, 1366-1377

Micklem D. R., Dasgupta R., Elliott H., et al. (1997)

The mago nashi gene is required for the polarisation of the oocyte and the formation of perpendicular axes in *Drosophila*
Curr. Biol., Vol. 7, 468-478

Mignone F., Gissi C., Liuni S., Pesole G. (2002)

Untranslated regions of mRNAs
Genome Biol., Vol. 3(3)

Miller S., Yasuda M., Coats J.K., Martone M.E., Mayford M. (2002)

Disruption of Dendritic Translation of CaMKII α Impairs Stabilization of Synaptic Plasticity and Memory Consolidation
Neuron, Vol. 36, 507–519

Miyashiro K., Dichter M., Eberwine J. (1994)

On the nature and differential distribution of mRNAs in hippocampal neurites: implications for neuronal functioning
PNAS, Vol. 91, 10800–10804

Mohr E., Prakash N., Vieluf K., Fuhrmann C., Friedrich Buck F., Richter D. (2001)

Vasopressin mRNA localization in nerve cells: Characterization of cis-acting elements and trans-acting factors
PNAS, Vol. 98 (13). 7072–7079

Mohr E., Kachele I., Mullin C., Richter D. (2002)

Rat vasopressin mRNA: a model system to characterize cis-acting elements and trans-acting factors involved in dendritic mRNA sorting
Prog. Brain Res. 139:211–24

Mohr E., Richter D. (2004)

Subcellular Vasopressin mRNA Trafficking and Local Translation
J. Neuroendocrin., Vol. 16, 333–339

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
J. Neurochem., Vol (76), 155–165

Mori Y., Imaizumi K., Katayama T., Yoneda T., Tohyama M. (2000)

Two cis-acting elements in the 3' untranslated region of α -CaMKII regulate its dendritic targeting
Nat. Neurosci., Vol.3, 1079–1084

Mowry K.L., Meltin D.A. (1992)

Vegetal messenger RNA localization directed by a 340-nt RNA sequence element in *Xenopus* oocytes
Science, Vol. 255, 991–994

Mowry K.L. (1996)

Complex formation between stage-specific oocyte factors and a *Xenopus* mRNA localization element
PNAS, Vol. 93, 14608–14613

Mulligan G., Guo W., Wormsley S., Helfman D. (1992)

Polypyrimidine tract-binding protein interacts with sequences involved in alternative splicing of b-tropomyosin pre-mRNA
J. Biol. Chem. Vol. 267, 25480–25487

Munro T.P., Nagee J.R., Kidd G.J., Carson J.H., Barbarese E., Smith L.M., Smith R. (1999)

Mutational Analysis of a Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A2 Response Element for RNA Trafficking
J. Biol. Chem., Vol. 274(48), 34389–34395

Muslimov I.A., Santi E., Homel P., Perini S., Higgins D., Tiedge H. (1997)

RNA transport in dendrites: a cis-acting targeting element is contained within neuronal BC1 RNA
J. Neurosci., Vol. 17, 4722–4733

Muslimov IA, Nimmrich V, Hernandez AI, Tcherepanov A, Sacktor TC, Tiedge H. (2004) Dendritic transport and localization of protein kinase M ζ mRNA: implications for molecular memory consolidation

J. Biol. Chem., Vol. 279, 52613–52622

Myers S.J., Huang Y., Genetta T., Dingledine R. (2004)

Inhibition of glutamate receptor 2 translation by a polymorphic repeat sequence in the 5' untranslated leaders
J. Neurosci., Vol. 24(14), 3489–3499

Nadershahi A., Fahrenkrug S.C., Ellis L.B.M.

Comparison of computational methods for identifying translation initiation sites in EST data
BMC Bioinformatics, Vol. 5, 14

Nairn A.C., Palfrey H.C. (1987)

Identification of the major Mr 100,000 substrate for calmodulin-dependent protein kinase III in mammalian cells as elongation factor-2.
J. Biol. Chem., Vol. 262, 17299–17303

Naisbitt, S., Kim E., Weinberg R.J., Rao A., Yang F.C., Craig A.M., Sheng M. (1997)

Characterization of guanylate kinase-associated protein, a postsynaptic density protein at excitatory synapses that interacts directly with postsynaptic density-95/synapse-associated protein 90
J Neurosci. Vol. 17, 5687-96.

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, Vol.23, 569-82

Nakielnny S., Dreyfuss G. (1999)

Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus
Cell, Vol. 99, 677–690

Nguyen P.V., Abel T., Kandel E.R. (1994)

Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP
Science 265:1104–1107.

Nielsen J., Christiansen J., Lykke-Andersen J., Johnsen A.H. (1999)

A Family of Insulin-Like Growth Factor II mRNA-Binding Proteins Represses Translation in Late Development
Mol. Cell. Biol. Vol. 19 (2), 1262-1270

Nielson D. A., Shapiro D.J. (1990)

Insights into hormonal control of messenger RNA stability
Mol. Endocrinol., Vol. 4, 953–957

Oleynikov Y., Singer R.H. 2003

Real-time visualization of ZBP1 association with beta-actin mRNA during transcription and localization
Curr. Biol.,Vol. 13(3),199-207

Ostareck-Lederer A., Ostareck D.H., Standart N., Thiele B.J. (1994)

Translation of 15-lipoxygenase mRNA is inhibited by a protein that binds to a repeated sequence in the 3' untranslated region
EMBO J., Vol.,13, 1476–1481

Ostareck D.H., Ostareck-Lederer A., Wilm M., Thiele B.J., Mann M. (1997)

mRNA silencing in erythroid differentiation: hnRNP K and hnRNP E1 regulate 15-lipoxygenase translation from the 3' end
Cell, Vol. 89, 597–606

Ostareck-Lederer A., Ostareck D., Cans C., Neubauer G., Bomsztyk K., Superti-Furga G., Hentze M.W. (2002)

c-Src-Mediated Phosphorylation of hnRNP K Drives Translational Activation of Specifically Silenced mRNAs
Mol. Cel. Biol., Vol. 22(13), 4535-4543

Ostroff L., Fiala C. F., Allwardt A, Harris K.M. (2002)

Polyribosomes Redistribute from Dendritic Shafts into Spines with Enlarged Synapses during LTP in Developing Rat Hippocampal Slices
Neuron, Vol. 35, 535–545

Ostrowski J., Sims J.E., Sibley C.H., Valentine M.A., Dower S.K., Meier K.E., Bomsztyk K. (1991)

A serine/threonine kinase activity is closely associated with a 65-kDa phosphoprotein specifically recognized by the kappa B enhancer element
J. Biol. Chem., Vol (266), 12722–12733

Ostrowski J., Kawata Y., Schullery D.S., Denisenko O.N., Bomsztyk K. (2003)

Transient recruitment of the hnRNP K protein to inducibly transcribed gene loci
Nucleic Acids Res., Vol. 31, 3954–3962.

Orrego F., Lipmann F. (1967)

Protein synthesis in brain slices. Effects of electrical stimulation and acidic amino acids.
J Biol. Chem., Vol. 242(4), 665-671

Pesole G., Liuni S., Grillo G., Licciculli F., Mignone F., Gissi C., Saccone C. (2002)

UTRdb and UTRsite: specialized databases of sequences and functional elements of 5' and 3' untranslated regions of eukaryotic mRNAs
Nucleic Acids Res., Vol. 30, 335–340

Pesole und Liuni, (1999)

Internet resources for the functional analysis of 5' and 3' untranslated regions of eukaryotic mRNAs
TIG, Vol. 15(9), 378

Pickering B.M., Willis A.E. (2005)

The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease
Semin. Cell Dev Biol., Vol 16(1), 39–47

Pinkstaff J.K., Chappell S.A., Mauro V., Edelman G.M., Krushel A. (2001)

Internal initiation of translation of five dendritically localized neuronal mRNAs
PNAS, Vol 98 (5), 2770–2775

Pinol-Roma und Dreyfuss, G. 1993

hnRNP Proteines: localization and transport between the nucleus and the cytoplasm
Trends Biochem. Sci 3, 151–155

Polydorides A.D., Okano H.J., Yang Y.Y., Stefani G., Darnell R.B. (2000)

A brain-enriched polypyrimidine tract-binding protein antagonizes the ability of Nova to regulate neuron-specific alternative splicing
PNAS, Vol 97(12), 6350–6355

Quitsch A., Berhörster K., Liew C. W., Richter D. und Kreienkamp H.-J. (2005)

Postsynaptic Shank Antagonizes Dendrite Branching Induced by the Leucine-Rich Repeat Protein Densin-180
J. Neurosci., Vol. 25(2), 479–487

Ramón y Cajal, S. (1888)

Estructura de los centros nerviosos de las aves
Rev. Trim. Histol. Norm. Pat. 1:1–10.

Ramón y Cajal, S. (1891)

Significación fisiológica de las expansiones protoplásmicas y nerviosas de la sustancia gris
Revista de Ciencias Médicas de Barcelona. 22.

Rapoport S.M., Schewe T. (1986)

The maturational breakdown of mitochondria in reticulocytes
Biochem. Biophys. Acta, Vol. 864, 471–495

Reichard L.F., Farinas I. (1997)

Neurotrophic factors and their receptors. Roles in neuronal development and function.
Molecular and cellular Approaches to Neuronal Development
Oxford University Press, New York, pp220–263

Rehbein M., Wege K., Buck F., Schweizer M., Richter D., Kindler S. (2002)

Molecular characterization of MARTA1, a protein interacting with the dendritic targeting element of MAP2 mRNAs
J. Neurochem., Vol (82), 1039–1046

Rehbein M. Kindler S., Horke S., Richter D. (2000)

Two trans-acting rat-brain proteins MARTA1 and MARTA2, interact specifically with the dendritic targeting element in MAP2 mRNA
Mol. Brain. Res., Vol., 79, 192–201

Righi M., Tongiorgi E., Cattaneo A. (2000)

Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Induces Dendritic Targeting of BDNF and Tyrosine Kinase B mRNAs in Hippocampal Neurons through a Phosphatidylinositol-3 Kinase-Dependent Pathway
J. Neurosci., 20(9):3165–3174

Rogozin I.B., Kochetov A.V., Kondrashov F.A., Koonin E.V., Milanesi L. (2001)

Presence of ATG triplets in 5' untranslated regions of eukaryotic cDNAs correlates with a 'weak' context of the start codon
Bioinformatics, Vol. 17(10), 890–900

Rook S.M., Lu M., Kosik K.S. (2000)

CaMK II 3' untranslated region directed mRNA translocation in living neurons: visualization by GFP linkage
J. Neurosci., Vol. 20, 6385–6393

Ross J., Sullivan T.D. (1985)

Half-lives of beta and gamma globin messenger RNAs and of protein synthetic capacity in cultured human reticulocytes
Blood, Vol. 66, 1149–1154

Ross, J. (1995)

mRNA stability in mammalian cells
Microbiol. Rev., Vol. 59, 423–450

Ross A. F., Oleynikov Y., Kislauskis E. H., Taneja K. L., Singer R. H. (1997)

Characterization of a β -actin mRNA zipcode-binding protein
Mol. Cell. Biol. 17, 2158–2165

Sachs A.B., Davis R.W., Kornberg, R.D. (1987)

A single domain of yeast poly(A)-binding protein is necessary and sufficient for RNA binding and cell viability
Mol. Cell Biol. 7: 3268–3276

Sachs A.B., Sarnow P. and Hentze M.W. (1997)

Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes
Cell, Vol. 89, 831–838

Sala C. (2001)

Molecular Regulation of Dendritic Spine Shape and Function
Neurosignals, Vol. 11, 213–223

Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. (1989)

Molecular Cloning - A Laboratory Manual.
Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977)

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors
PNAS, Vol. 74, :5463–5467

Scheetz AJ, Nairn AC, Constantine-Paton M. (2000)

NMDA receptor-mediated control of protein synthesis at developing synapses
Nat. Neurosci., Vol. 3, 211–216

Sheng M., Kim E. (2000)

The Shank family of scaffold proteins
J. Cell Sci., Vol 113, 1851–1856

Singh R., Valcarcel J., Green, M.R. (1995)

Distinct binding specificities and functions of higher eukaryotic polypyrimidine tract-binding
Proteins
Science, Vol. 268, 1173–1176

Schell T., Kulozik A.E., Hentze M.W. (2002)

Integration of splicing, transport and translation to achieve mRNA quality control by the nonsense-mediated decay pathway
Genome Biology, Vol. 3(3):reviews1006.1–1006.6

Schratt G.M., Nigh E.A., Chen W.G., Hu L., Greenberg M.E. (2004)

BDNF regulates the translation of a select group of mRNAs by a mammalian target of rapamycin-phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway during neuronal development
J. Neurosci., Vol. 24, 7366–7377

Segger-Junius M.

Charakterisierung der dendritischen Lokalisierung der shank1-mRNA
2003 Dissertation, Universität Oldenburg

Shan J, Munro TP, Barbarese E, Carson JH, Smith R. (2003)

A molecular mechanism for mRNA trafficking in neuronal dendrites.
J. Neurosci. 23:8859–66

Sherrington C. (1906)

The Integrative Action of the Nervous System
Charles Scribner's Sons, New York

Siomi H., Matunis M.J., Michael W.M., Dreyfuss G. (1993)

The pre-mRNA binding protein contains a novel evolutionary conserved motif
Nucleic Acids Res., Vol. 21, 1193–1198

Skalweit A., Doller A., Huth A., Kahne T., Persson P.B., (2003)

Posttranscriptional control of renin synthesis: identification of proteins interacting with renin mRNA 30-untranslated region
Circ. Res., Vol. 92, 419–427

Smart F.M., Edelman G.M., Vanderklisch P.W. (2003)

BDNF induces translocation of initiation factor 4E to mRNA granules: evidence for a role of synaptic microfilaments and integrins
PNAS, Vol. 100(24), 14403-14408

Smith R. (2004)

Moving molecules: mRNA trafficking in mammalian oligodendrocytes and neurons
Neuroscientist, Vol. 10, 495–500

Snee M., Grahame J., Kidd K., Trent J., Munro P., Smith R. (2002)

RNA trafficking and stabilization elements associate with multiple brain proteins
J. Cell. Sci., Vol. 115, 4661-4669

Snider W.D. (1994)

Function of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us
Cell Vol.77, 627-638

Soltau M.,Berhörster K., Kindler S., Buck F.,Richter D., (2004)

Insulin receptor substrate of 53 kDa links postsynaptic shankto PSD-95
J. Neurochem.,Vol.90, 659–665

Southby J., Gooding C. and Smith C.W. (1999)

Polypyrimidine tract binding protein functions as a repressor to regulate alternative splicing of alpha-actinin mutually exclusive exons
Mol. Cell. Biol., Vol. 19, 2699-2711

Stefanovic B., Hellerbrand C., Holcik M., Briendl M., Aliebbhaber S., Brenner D.A. (1997)

Posttranscriptional regulation of collagen alpha1(I) mRNA in hepatic stellate cells
Mol. Cell Biol., Vol.17(9), 5201-5029

Steward O, Levy WB. (1982)

Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus
J. Neurosci., Vol. 2, 284–291

Steward O., Schuman E.M. (2001)

Protein synthesis at synaptic sites on dendrites
Annu. Rev. Neurosci., Vol. 24, 299–325

Steward O, Schuman EM. 2003.

Compartmentalized synthesis and degradation of proteins in neurons
Neuron, Vol. 40, 347–59

Sutton M.A., Schuman E.M. (2005)

Local translational control in dendrites and its role in long-term synaptic plasticity
J. Neurobiol., Vol. 64(1), 116-31

Sutton M.A., Wall N.R. Aakalu G., Schuman E.M. (2004)

Regulation of Dendritic Protein Synthesis by Miniature Synaptic Events
Science, Vol. 304, 1979-1983

Suzuki Y., Ishihara D., Sasaki M., Nakagawa H., Hata H., Tsunoda T. Watanabe,M. Komatsu,T., Ota,T., Isogai,T., Suyama,A. and Sugano,S. (2000)

Statistical analysis of the 5' untranslated region of human mRNA using "oligo-capped" cDNA libraries
Genomics, Vol. 64, 286-297

Swanson M.S., Dreyfuss G. (1988)

Classification and purification of proteins of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles by RNA-binding specificities
Mol. Cell Biol., Vol. 8(5), 2237-2241

Takei N., Kawamura M., Hara K.,Yonezawa K., Nawa H. (2001)

Brain-derived neurotrophic factor enhances neuronal translation by activating multiple initiation processes: comparison with the effects of insulin
J. Biol. Chem., Vol. 276, 42818–25

Takei N., Inamura N., Kawamura M., Namba H., Hara K. (2004)

Brain-derived neurotrophic factor induces mammalian target of rapamycin-dependent local activation of translation machinery and protein synthesis in neuronal dendrites
J. Neurosci., Vol. 24, 9760–69

Takizawa, P. A., DeRisi, J. L., Wilhelm, J. E., Vale, R. D. (2000)

Plasma membrane compartmentalization in yeast by messenger RNA transport and a septin diffusion barrier.
Science, Vol. 290, 341–344

Tarun, S.Z. and Sachs, A.B. (1996)

Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G
EMBO J. Vol.15, 7168–7177

Thisted T., Lyakhov D.L. and Liebhaber S.A. (2001)

Optimized RNA targets of two closely related triple KH domain proteins, heterogeneous nuclear ribonucleoproteinK and alphaCP-2KL, suggest distinct modes of RNA recognition
J. Biol. Chem. Vol. 276, 17484–17496

Thiele B.J., Andree H., Hohne M., Rapoport S.M. (1981)

Regulation of the synthesis of lipooxygenase in erythroid cells
Acta. Biol. Med. Ger., Vol 40(4-5), 597-602

Thoenen H. (2000)

Neurotrophins and activity-dependent plasticity
Prog. Brain Res., Vol.128, 183-191

Tiedge H., Freneau R.T. Jr., Weinstock P.H., Arancio O., Brosius J. (1991)

Dendritic location of neural BC1 RNA.
PNAS, Vol.88(6), 2093-7

Tiruchinapalli D.M., Oleynikov Y., Kelic S., Shenoy S.M., Hartley A. (2003)

Activity-dependent trafficking and dynamic localization of zipcode binding protein 1 and beta-actin mRNA in dendrites and spines of hippocampal neurons
J. Neurosci., Vol. 23.3251–61

Tobaben S., Sudhof T.C., Stahl B. (2000)

The G protein-coupled receptor CL1 interacts directly with proteins of the Shank family.
J Biol. Chem., Vol. 275(46), 36204-36210

Tommerup N., Leffers H. (1996)

Assignment of human KH-box-containing genes by in situ hybridization: hnRNPK maps to 9q21.32-q21.33, PCBP1 to 2p12-p13, and PCBP2 to 12q13.12-q13.13, distal to FRA12A
Genomics Vol. 32:297–298

Tomonaga T., Levens D. (1995)

Heterogeneous nuclear ribonucleoproteinK is a DNA-binding transactivator
J Biol Chem Vol. 270:4875–4881

Tongiorgi E., Righi M., Cattaneo A. (1997)

Activity-Dependent Dendritic Targeting of BDNF and TrkB mRNAs in Hippocampal Neurons
J. Neurosci., Vol.17(24):9492–9505

Tsurugi, K., Ogata, K. (1985)

Evidence for the exchangeability of acidic ribosomal proteins on cytoplasmic ribosomes in regenerating rat liver
J Biochem. (Tokyo), Vol. 98(6), 1427-1431

Twyman R.E., Green R.M., MacDonald R.L. (1992)

Kinetics of open channel block by penicillin of single GABA_A-receptor channels from mouse spinal cord neurons in culture
J. Physiol., Vol. 445, 97-127

Tyler W.J., Pozzo-Miller L. (2003)

Miniature synaptic transmission and BDNF modulate dendritic spine growth and form in rat CA1 neurones
J. Physiol., Vol. 553(Pt 2), 497-509

Ule J., Jensen K.B., Ruggui M., Mele A., Ule A., Darnell R.B. (2003)

CLIP Identifies Nova-Regulated RNA Networks in the Brain
Science, Vol 302, 1212-1215

Valcárcel J., Gebauer F. (1997)

Post-transcriptional regulation: The dawn of PTB
Current Biol., Vol 7(11), 705-708

Valtschanoff J.G., Weinberg R.J. (2001)

Laminar organization of the NMDA receptor complex within the postsynaptic density
J Neurosci., Vol. 21:1211-7

VanDongen A.M.J., VanDongen H.M.A. (2004)

Effects of mRNA Untranslated Regions on Translational Efficiency of NMDA Receptor Subunits
Neurosignals, Vol. 13, 194-206

VanSeuning I., Ostrowski J., Bomsztyk K. (1995)

Description of an IL-1-responsive kinase that phosphorylates the K protein. Enhancement of phosphorylation by selective DNA and RNA motifs
Biochemistry, Vol. 34(16), 5644-5650

Verstreken P., Bellen H. J. (2002)

Meaningless minis? Mechanisms of neurotransmitter-receptor clustering
Trends in Neurosci., Vol. 25 (8) 383-385

Vornov J.J., Coyle J.T. (1991)

Glutamate neurotoxicity and the inhibition of protein synthesis in the hippocampal slice
J Neurochem., Vol. 56(3), 996-1006

Wang Z., Day N., Trifillis P., Kiledjian M. (1999)

An mRNA stability complex functions with poly(A)-binding protein to stabilize mRNA in vitro
Mol. Cell Biol., Vol. 19, 4552-4560

Wang H., Iacoangeli A., Popp S., Muslimov I.A., Imataka H., Sonenberg N., Lomakin I.B., Tiedge H. (2001)

Dendritic BC1 RNA: Functional Role in Regulation of Translation Initiation
J. Neurosci., Vol. 22(23), 10232-10241

Wang X., Rothnagel J.A. (2004)

5'-Untranslated regions with multiple upstream AUG codons can support low-level translation via leaky scanning and reinitiation
Nucleic Acid. Res., Vol. 32(4), 1382-1391

Warner J.R., Knopf P.M., Rich A. (1962)

Electron microscope studies of ribosomal clusters synthesizing hemoglobin
Science 138, 1399-1403

Webster P.J., Liang L., Berg C.A., Lasko P., Macdonald P.M. (1997)

Translational repressor Bruno plays multiple roles in development and is widely conserved.
Genes Dev., Vol 11, 2510-2521

Weiss I. M., Liebhaber S.A. (1995)

Erythroid cell-specific mRNA stability elements in the $\alpha 2$ -globin 3' nontranslated region
Mol. Cell. Biol., Vol. (15), 2457-2465

Welch J.M., Wand D., Feng G. (2004)

Differential mRNA Expression and Protein Localization of the SAP90/PSD-95-Associated Proteins (SAPAPs) in the Nervous System of the Mouse
J. comparative neurology, Vol. 472:24-39

Weng Z., Thomas S.M., Rickles R.J., Taylor J.A., Brauer A.W., Seidel-Dugan C., Michael**W.M., Dreyfuss G., Brugge J.S. (1994)**

Identification of Src, Fyn, and Lyn SH3-binding proteins: implications for a function of SH3 domains
Mol. Cell Biol., Vol. 14(7), 4509-4521

Westrum L.E., Jones D.H., Gray E.G., Barron J. (1980)

Microtubules, dendritic spines and spine apparatuses.
Cell Tissue Res., Vol. 208, 171-181

Wilhelm J. E., Vale, R. D. (1993)

RNA on the move: the mRNA localization pathway
J. Cell Biol., Vol.123, 269-274

Willis AE. (1999)

Translational control of growth factor and proto-oncogene expression
Int. J. Biochem Cell Biol, Vol. 31, 73-86

Willis D., Li K.W., Zheng J., Chang J.H., Smit A., Kelly T., Merianda T. T., Sylvester J., van Minnen J., Twiss J.L.. (2005)

Differential Transport and Local Translation of Cytoskeletal, Injury-Response, and Neurodegeneration Protein mRNAs in Axons
J. Neurosci., Vol. 25(4), 778 –791

Wilson G. M., Brewer G. (1999)

Identification and Characterisation of Proteins Binding A+U-Rich Elements
Methods, Vol. 17, 74-83

Wood M., Van Dongen H.M.A. Van Dongen .M.J. (1996)

The 5'-Untranslated Region of the N-Methyl-D-aspartate Receptor NR2A Subunit Controls Efficiency of Translation
J. Biol. Chem., Vol. 271(14), 8115–8120

Wu H., Montone K.T. (1998)

Cortactin localization in actin-containing adult and fetal tissues
J. Histochem Cytochem., Vol. 46(10), 1189-1191

Xie J., Lee J., Kress T.L., Mowry K.M., and Black D.L. (2003)

Protein kinase A phosphorylation modulates transport of the polypyrimidine tract-binding Protein
PNAS. Vol. 100, 8776–8781

Yang J.P., Reddy T.R., Truong K.T., Suhasini M., Wong-Staal F. (2002)

Functional interaction of Sam68 and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
Oncogene, Vol. 21(47), 7187-94

Yao L., Hata Y., Hirao K., Deguchi M., Ide N., Takeuchi M., Takai Y. (1999)

Synamon, a novel neuronal protein interacting with synapse-associated protein 90/postsynaptic density-95-associated protein
J. Biol. Chem., Vol. 274(39), 27463-27466

Yin Y., Edelman G.M., Vanderklish P.W. (2002)

The brain-derived neurotrophic factor enhances synthesis of Arc in synaptoneurosomes
PNAS, Vol. 99 (4), 2368-2373

Yoon Y. J., Mowry K.L. (2004)

Xenopus Staufen is a component of a ribonucleoprotein complex containing Vg1 RNA and kinesin
Development, Vol. 131, 3035-3045

Yuste R., Bonhoeffer T. (2001)

Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity
Annu. Rev. Neurosci., Vol. 24, 1071–89

Ziff E.B. (1997)

Enlightening the postsynaptic density.
Neuron, Vol. 19:1163–1174

Zitzer H., Hönck H. H., Bächner D., Richter D. and Kreienkamp H. J. (1999)

Somatostatin receptor interacting protein defines a novel family of multidomain proteins present in human and rodent brain
J. Biol. Chem., Vol. 274, 32997-33001

Zhang H.L., Singer R.H., Bassell G.J. (1999)

Neurotrophin regulation of beta-actin mRNA and protein localization within growth cones.
J. Cell Biol., Vol. 147(1), 59-70

Zhang H.L., Eom T., Oleynikov Y., Shenoy S.M., Liebelt D.A., Dichtenberg J.B., Singer R.H., Bassell G.J. (2001)

Neurotrophin-induced transport of a beta-actin mRNP complex increases beta-actin levels and stimulates growth cone motility
Neuron, Vol. 31, 261–275

Zhang X., Poo M.M. (2002)

Localized synaptic potentiation by BDNF requires local protein synthesis in the developing axon
Neuron, Vol. 36(4), 675-88

Zheng J., Kelly T, Chang B., Ryazantsev S., Rajasekaran A., Martin K., Twiss J.L. (2001)

A functional role for intra-axonal protein synthesis during axonal regeneration from adult sensory neurons
J. Neurosci., Vol. 21 (23),9291-9303

Zhuang H., Chuang S.S., Das H.K. (1992)

Transcriptional regulation of the apolipoprotein B100 gene: Purification and characterization of trans-acting factor BRF-2
Mol. Cell. Biol., Vol 12, 3183-3191

Zuker,M. (2003)

Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction
Nucleic Acids Res.,Vol.31, 3406–3415.

6 Anhang

6.1 Firmenverzeichnis

Abcam Limited, Cambridgeshire, UK
Adobe Systems Inc., Hamburg
Agfa, Köln
Ambion Europe Ltd. Huntington, UK
Amersham Biosciences Europe GmbH, Heidelberg
Berthold Technologies, Bad Wildbach
BioRad Laboratories GmbH, München
Branson Sonic Power Company, Danbury, USA
Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Eppendorf GmbH, Hamburg
Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
Fluka, Buchs, Schweiz
Hofer Scientific Instruments, San Fransisco, USA
Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Immuquest, Ingleby Banks, USA
Improvision, Coventry UK
Macherey & Nagel GmbH & Co KG, Düren
Microcal Software Inc., Northhampton USA
Millipore GmbH, Eschborn
New England Biolabs GmbH, Schwalbach/Taunus
PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pierce Science, Bonn
Promega GmbH, Mannheim
Qiagen GmbH, Hilden
Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Santa Cruz Biotechnologie Inc., Heidelberg
Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande
Strathmann, Hamburg
Tocris Bioscience, Avonmouth UK

6.2 Bakterienstämme, Zelllinien und Tiere

<i>E. coli</i> TOP 10F	<i>Invitrogen</i>
<i>E. coli</i> BL 21 (DE3)	<i>Stratagene</i>
<i>E. coli</i> M15	<i>Novagen</i>
<i>E. coli</i> XL1 blue	<i>Stratagene</i>
HEK293	<i>ATCC</i>
<i>Rattus norvegicus</i> (Wistar)	Tierzucht Universitätskrankenhaus Eppendorf

6.3 Antikörper

α -FLAG-TAG/M2 monoklonal	1:1000 Western Blot	<i>Stratagene</i>
α -L7 SPA, polyklonal	1:2000 Western Blot	<i>Abcam Limited</i>
α -S6, polyklonal Cell	1:1000 Western Blot	<i>Upstate</i>
α -Tubulin, monoklonal	1:5000 Western Blot	<i>Abcam Limited</i>
α -shank PDZ polyklonal	1:2000 Western	Kreienkamp H-J., Hamburg
α -hnRNP K polyklonal	1: 2000 Western Blot 1:1000 Immuncytochemie	<i>Santa Cruz Biotechnologies</i>
α -PABP1 polyklonal	1:2000 Western Blot 1:1000 Immuncytochemie	Mohr E., Hamburg
α -NOVA polyklonal	1:2500 Western Blot	Darnell R.B., New York
α -brPTB/PTB polyklonal	1:2000 Western Blot	<i>Santa Cruz Biotechnologies</i>
α -rStaufen polyklonal	1:1000 Western Blot	Kindler S., Hamburg
α -Neurochondrin polyklonal	1:2000 Western Blot	Francke F., Hamburg

6.4 Vektoren

hnRNP K	Beckmann K., Heidelberg	pET 16b (<i>Novagen</i>)
PCBP1	Beckmann K., Heidelberg	pET 16b (<i>Novagen</i>)
PCBP2	Oligonucleotide: PCBP2 for PBCP2 rev	pQE32 (<i>Quiagen</i>) pCMV Flag Tag 2B (<i>Stratagene</i>)
PCBP 2 KL	Oligonucleotide: PCBP2 for PBCP2 rev	pQE32 (<i>Quiagen</i>) pCMV Flag Tag 2B (<i>Stratagene</i>)
PCBP3	Oligonucleotide: PCBP3 for PBCP3 rev	pQE32 (<i>Quiagen</i>) pCMV Flag Tag 2B (<i>Stratagene</i>)
PABP1	Mohr E., Hamburg	pQE30 (<i>Quiagen</i>) pCMV Flag Tag 2B (<i>Stratagene</i>)
ARP	Oligonucleotide: ARP P0 for ARP P0 rev	pQE32 (<i>Quiagen</i>) pCMV Flag Tag 2B (<i>Stratagene</i>)
brPTB	Oligonucleotide: brPTB for brPTB rev	pQE32 (<i>Quiagen</i>) pCMV Flag Tag 2B (<i>Stratagene</i>)
NOVA1	Chua, John	pQE30 (<i>Quiagen</i>) pCMV Flag Tag 2B (
Arg 3.1	Kuhl D., Berlin	pCDNA (<i>Invitrogen</i>)
shank 3'UTR (1-588 nt)	Hönck H.H., Hamburg	pCR®II-TOPO® (<i>Invitrogen</i>)
shank 3'UTR „trace“	Oligonucleotide: A1 for; trace 670 rev	pCR®II-TOPO® <i>Invitrogen</i>)
shank 3'UTR „Lücke“	Oligonucleotide: Lücke for; Lücke rev	pCR®II-TOPO® (<i>Invitrogen</i>)
shank 3'UTR „BF 416156“	<i>Invitrogen</i>	T3T/ (<i>Invitrogen</i>)
shank 3'UTR „xt2“	Oligonucleotide: EF2 for; Hugo 8 kb Poly-A	pCR®II-TOPO® (<i>Invitrogen</i>)
Tobra-Tag 133 nt	Hönck H.H., Hamburg	pGEM®-T Easy (<i>Promega</i>)
Tobra-Tag 588 nt	Hönck H.H., Hamburg	pGEM®-T Easy (<i>Promega</i>)
Tobra-Tag 588 nt (antisense)	Hönck H.H., Hamburg	pGEM®-T Easy (<i>Promega</i>)
„Blaulich“	Hönck H.H., Hamburg	
„Bicfire“ (<i>Photinus</i> - und <i>Renilla</i> - Luziferase	Hönck H.H., Hamburg	
pCR®II-TOPO®	<i>Invitrogen</i>	
pGEM®-T Easy®	<i>Promega</i>	

pCMV-Tag-2C®	<i>Stratagene</i>	
pOE30®	<i>Quiagen</i>	
pQE32®	<i>Quiagen</i>	

6.5 Oligonucleotide

brPTB for	GAGACCCGGGATGGACGGAATTGTCACTGAGGTTG
brPTB rev	GAGAGTCGACTTAAATTGTTGATTTGGAGAAAGAC
ARP P0 for	GAGACCCGGGATGCCCAGGGAAGACAGGGCGACCT
ARP P0 rev	GAGAGTCGACTTAGTCGAAGAGACCGAATCCCATG
PCBP 2 for	GAG ACCCGGGATGGACACCGGTGTGACTGAAGGTG
PCBP 2 rev	GAGAGTCGA CTTAGCTGCTCCCCGTGCCACCTGTC
PCBP 3 forward	GAG ACC CGG GATGGGGGAAGACGCCATCTGGGCCCCA
PCBP 3 rev	GAG AAAGCTTTTAGAGCGCACCCATCCCAGTGACC
3'UTR <i>Poly-A</i> revers	TTT GTG TGT TCT AGG G G/T T TTT
3'UTR <i>EF1</i> forward	GGG GTT GGG GAG GGT GTA GGG
3'UTR <i>EF2</i> forward	AGG GGG GAG GGG TGG TGA GGG CTG GA
3'UTR Trace 500 revers	ACATTTGGAAGAGAGTTCAGG
3'UTR Trace 670 revers	CTCACGCCTTTTCTCCCCAGAC
3'UTR Trace 1101 revers	GGG GGA TCT TTC GTG CAA TAT G
3'UTR Trace 1030 revers	GCATGCGCAGGGTCTCCTCTC
3'UTR A1 forward	GAC CCT TGA GCC CGC TGA CCT C
3'UTR A1 neu forward	TGT GCC CTC CGA TTC CAT CAT TTG C
3'UTR A2 forward	TCT CCT TGG CTC ACT CAG CTG C
3'UTR A3 forward	GGCTGTCTTGCACACCTCCGGC
3'UTR A4 forward	ACACGCTGCATTCGGTTTTTTG
Lücke forward	AAA GGG TCT CTC TGT GTA ACC CTA G
Lücke revers	AAA GGG TTG GGG GAG GAG GGG GGA
Hugo 8kB Poly-A	TTT GTG TGT TCT AGG G G/T T TTT