

Lokale Proteinbiosynthese von Shank1 in
neuronalen Dendriten der Ratte
(*Rattus norvegicus*, Berkenhout 1769)

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades im Department Biologie der Fakultät für
Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg

vorgelegt von

Katrin Falley

Hamburg 2007

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Priv.-Doz. Dr. H.-J. KREIENKAMP
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. K. WIESE
Tag der Disputation: 14. Dezember 2007

Hamburg, den 30. November 2007




Professor Dr. Reinhard Lieberei
Leiter des Departments Biologie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Dendritischer mRNA-Transport in Neuronen	2
1.2 Regulation der Translation	4
1.3 Shank1 – Gerüstprotein der postsynaptischen Dichte	9
1.4 Ziel der Arbeit	12
2. Material und Methoden	13
2.1 Material	13
2.1.1 Chemikalien	13
2.1.2 Bakterienstämme, Zelllinien und Tiere	13
2.1.3 DNA-Vektoren	13
2.1.4 Oligonukleotide	14
2.1.5 Antikörper	14
2.2 Molekularbiologische Methoden	15
2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	15
2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten	16
2.2.3 Restriktionsverdau und Ligation von DNA-Fragmenten	16
2.2.4 Herstellung von Deletionskonstrukten und Einführung von Punktmutationen	17
2.2.5 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien	17
2.2.6 Mini- und Midipräparation von Plasmid-DNA	18
2.2.7 DNA-Sequenzierung	18
2.2.8 <i>In-vitro</i> -Transkription und Translation	19
2.2.9 <i>In-vitro</i> -Transkription von DIG-markierten Sonden	19
2.3 Biochemische Methoden	20
2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	20
2.3.2 Proteinnachweis im Western Blot	20

2.3.3 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen, Proteinbestimmung und Coomassie-Färbung	21
2.3.4 Aufreinigung von Proteinen durch GKAP-Sepharose und Proteinsequenzierung	22
2.3.5 Aufreinigung polyklonaler Antikörper aus Serum	22
2.3.6 <i>Dual-Luciferase</i> -Bestimmungen	23
2.4 Zellbiologische Methoden	23
2.4.1 Kultivierung und Transfektion von HEK-Zellen	23
2.4.2 Kultivierung und Transfektion primärer Neurone	23
2.4.3 Stimulierung von Zellkulturen und Herstellung von Zelllysaten	25
2.4.4 Fixierung, Permeabilisierung und immuncytochemische Färbung von Zellen	26
2.4.5 Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung kultivierter Neurone mit spezifischen RNA-Sonden und damit kombinierte Immuncytochemie (FISH/ICC)	26
2.4.6 Mikroskopie, <i>Time-lapse</i> -Analysen und statistische Auswertung	27
3. Ergebnisse	28
3.1 Untersuchungen zur dendritischen Lokalisation der Shank1 mRNA in kultivierten Hippokampus-Neuronen	28
3.1.1 Nachweis der dendritischen Lokalisation der endogenen Shank1 mRNA und Einfluss der 3'UTR	28
3.1.2 Darstellung des dendritischen Shank1 mRNA-Transport in lebenden Neuronen	31
3.1.2.1 Die Methode: Das GFP-MS2-System	31
3.1.2.2 Visualisierung und Kinetik des Shank1 mRNA-Transports	34
3.1.3 Regulation der dendritischen Shank1 mRNA-Lokalisation durch interagierende Faktoren	36
3.1.3.1 Der Shank1 mRNA-Transport in Dendriten erfolgt Mikrotubuli-abhängig	36
3.1.3.2 Der Einfluss RNA-bindender <i>trans</i> -agierender Faktoren auf den Shank1 mRNA-Transport	40

3.2 Regulation der Translation der Shank1 mRNA	47
3.2.1 Inhibition der Translation durch die 5'UTR	47
3.2.2 Mechanismus der 5'UTR-vermittelten Translationsinhibition	49
3.2.2.1 Einfluss der Sekundärstruktur und <i>trans</i> -agierender Faktoren	50
3.2.2.2 Einfluss der Shank1 <i>upstream Open Reading Frames</i>	53
3.2.3 Regulation der Translation der Shank1 mRNA durch einen <i>non-AUG</i> <i>upstream Open Reading Frame</i>	57
3.2.3.1 Nachweis des uORFs durch Proteinsequenzierung	57
3.2.3.2 Nachweis des uORF-Peptids in transfizierten Zellen	59
3.2.3.3 Charakterisierung möglicher Translationsstartpunkte mit Hilfe spezifischer Antikörper	60
3.2.3.4 Einfluss der 3'UTR auf die Translation des uORFs und die Shank1-Isoformen	61
3.2.3.5 Einfluss des ACG-uORFs auf die Translation der Shank1 mRNA	62
4. Diskussion	65
5. Zusammenfassung	81
6. Literaturverzeichnis	82
7. Anhang	93
7.1 Zusammensetzung der Puffer und Medien	93
7.2 Verwendete Oligonukleotide	95
7.3 Verwendete Expressionskonstrukte	96

Danksagung

Wissenschaftlicher Werdegang

Erklärung

Abkürzungsverzeichnis

Abb./Tab.	Abbildung/Tabelle
Abp1	<i>actin binding protein</i>
AMPA	<i>amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid</i>
A-Position	Akzeptor-Position
AraC	Cytosin- β -D-Arabinofuranosid
Arc	aktivitätsreguliertes Cytoskelett-assoziiertes Protein
ATCC	American Type Culture Collection
ATF4	<i>Activating Transcription Factor</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
CaMKII	<i>Calcium/Calmodulin dependent protein kinase II</i>
C°	Grad Celcius
C-	Carboxy-/C-Terminus
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CIAP	<i>Calf Intestine Alkaline Phosphatase</i>
CPE/CPEB	cytoplasmatisches Polyadenylierungs-Element/ CPE-Bindeprotein
dsRBD	Doppelstrang-RNA-Bindedomäne
DIG	Digoxigenin
<i>div</i>	<i>days in-vitro</i>
DMEM/MEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium/ minimum essential medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
dn	dominant-negativ
dNTP	deoxyribonucleoside 5'-triphosphate
DTE	<i>dendritic targeting element</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF/EF	eukaryotischer Initiationsfaktor/Elongationsfaktor
EST	<i>expressed sequence tag</i>
F-Aktin	filamentöses Aktin
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
GCN4	<i>General Control Non-inducible</i> (Transkriptionsfaktor)

GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GKAP	<i>guanylate-kinase associated protein</i>
GST	Glutathion S-Transferase
GTP	Guaninnukleotid-Triphosphat
h	Stunde
HBSS	<i>Hanks' balanced salt solution</i>
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
hnRNP	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
ICC	Immuncytochemie
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropylindolyl-thiogalactosid
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
kDa	Kilodalton
KH	hnRNP- <u>K</u> <i>Homology</i>
KHC	<i>kinesin heavy chain</i>
KIF	<u>K</u> inesin- <u>F</u> amilie
KLC	<i>kinesin light chain</i>
l	Liter
LB	Luria Bertoni
M	Molar, Mol/Liter
MARTA	MAP2 RNA <i>transacting factor</i>
MAP2	<i>microtubule associated protein</i>
Met	Methionin
mGluR	metabotroper Glutamat-Rezeptor
min	Minute
mRFP	<i>monomeric Red Fluorescent Protein</i>
mRNA/tRNA	<i>messenger Ribonucleic acid</i> / Transfer-RNA
MT	Mikrotubuli
mTOR	<i>mammalian Target Of Rapamycin</i>
N-/NT	Amino-/N-Terminus
NLS	Nukleäres Lokalisierungssignal
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nt	Nukleotide

OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600nm
PABP	Poly(A)-Bindepotein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCBP	Poly-C-bindende Proteine
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDZ	<i>PSD-95/Discs-large/ZO-1</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoff-Protonen-Konzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
P-Position	Peptidyl-Position
PSD/PSD-95	postsynaptische Dichte/ PSD protei von 95 kDa
RRM	<i>RNA recognition element</i>
RNP	<i>ribonucleoprotein</i>
s	Sekunde
SAM	<i>sterile alpha motif</i>
SAPAP	<i>synapse-associated protein 90/postsynaptic density-95-associated protein</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SH3	<i>Src homology 3 domain</i>
Shank/SSTRIP	<i>SH3/ankyrin repeat / Somatostatin-receptor-interacting protein</i>
SSC	Salz-Natriumcitrat-Lösung
TAE	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TBD	Tubulin-Bindedomäne
TBS-T	Tris- <i>buffered saline</i> mit Tween
5'TOP	<i>5'terminal oligopyrimidine tract</i>
TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-isothiocyanat
u.a.	unter anderem
uORF	<i>upstream Open Reading Frame</i>
UTR	untranslatierte Region
v.a.	vor allem
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
wt	Wildtyp
z.B./z.T.	zum Beispiel/zum Teil
ZBP-1	<i>Zipcode Binding Protein 1</i>

1. Einleitung

Die eukaryotische Genexpression kann schon auf der Ebene von Transkription und mRNA-Prozessierung vielfältig beeinflusst werden. Vor allem in polarisierten Zellen ermöglicht die zusätzliche Regulation von mRNA-Lokalisation und -Stabilität sowie der Translation die räumliche und zeitliche Kontrolle der Proteinexpression. Diese Mechanismen sind in Nervenzellen von besonderer Bedeutung, da sie asymmetrisch aufgebaut sind und lange, verzweigte Zellfortsätze besitzen. Dabei sind die Axone auf die Weiterleitung der elektrischen Erregung und die Dendriten auf den Empfang der Signale anderer Neurone spezialisiert. Die Kontakte zwischen Axon und Dendrit sind hochspezialisierte Strukturen, welche als Synapsen bezeichnet werden.

Es wird angenommen, dass die lokale Modifikation der Proteinexpression an Synapsen essentiell für langanhaltende, plastische Veränderungen dieser Kontakte ist (Sutton und Schuman, 2006). Um nur aktivierte Synapsen in Struktur und Zusammensetzung zu verändern, muss eine sogenannte *Input*-Spezifität vorhanden sein. Dabei könnten im Soma synthetisierte Proteine selektiv an bestimmte, markierte Synapsen transportiert werden (Frey und Morris, 1997). Andererseits würde eine gezielte Veränderung der Plastizität einzelner Kontakte auch durch die Lokalisation und Translation spezifischer mRNAs im aktivierten Bereich erreicht werden (Jiang und Schuman, 2002; Abb. 1.1). Dieser Mechanismus könnte einen schnelleren und direkten Umbau der Synapsen ermöglichen. Die für diesen Prozess notwendigen Polyribosomen wurden erstmals 1982 von Steward und Levy an der Basis der dendritischen Dornen gefunden. Einige Jahre später konnten auch mRNAs in distalen Dendriten kultivierter Neurone nachgewiesen werden (Davis et al., 1987). Außerdem wurde gezeigt, dass Polyribosomen nach synaptischer Aktivierung in die vergrößerten dendritischen Dornen (*Spines*) transportiert werden, auf denen die exzitatorischen Synapsen lokalisiert sind (Ostroff et al., 2002; Abb. 1.1). In den letzten Jahren wurde für einige wichtige synaptische Proteine eine dendritische Lokalisation der kodierenden mRNAs gezeigt (Martin und Zukin, 2006). Außerdem wurde deutlich, dass die lokale Proteinsynthese tatsächlich essentiell für die synaptische Plastizität und langfristige Lernvorgänge ist (Sutton und Schuman, 2005). Dabei sind die Lokalisation der mRNA und die Kontrolle der Translation über RNA-bindende Faktoren eng miteinander gekoppelt.

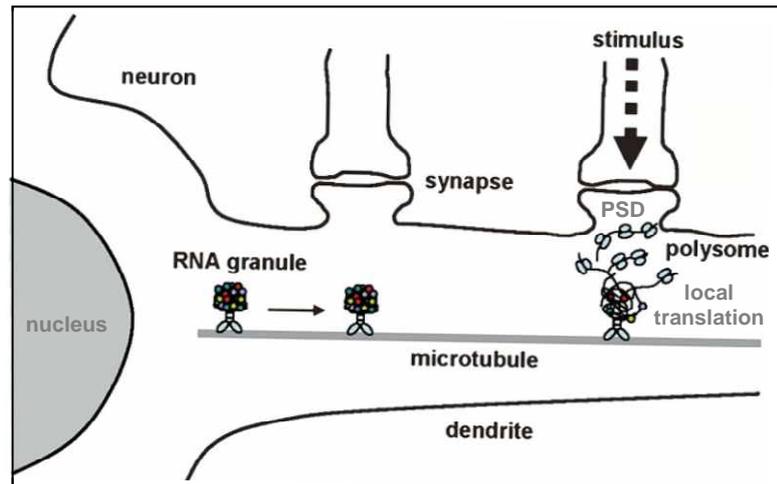


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des dendritischen mRNA-Transports und der lokalen Translation im Bereich aktivierter Synapsen. (modifiziert aus Miki et al., 2005)

1.1 Dendritischer mRNA-Transport in Neuronen

Die Anzahl der dendritisch lokalisierten mRNAs wurde auf Grundlage molekularbiologischer Methoden auf mehrere Hundert geschätzt, wovon mehr als 30 näher charakterisiert werden konnten (Miyashiro et al., 1994). Studien zeigten die Präsenz dendritischer mRNAs, die für cytosolische, Cytoskelett-, Membran- oder synaptische Proteine kodieren, wobei nur ein Teil der gefundenen Transkripte auch *in-vivo* in Gehirnschnitten eine dendritische Lokalisation aufwies (Steward und Schuman, 2003). Als erstes konnte die mRNA des Mikrotubuli-assoziierten Proteins MAP2 in Dendriten nachgewiesen werden (Garner et al., 1988). Weitere wichtige Beispiele sind die α -Untereinheit der Calcium/Calmodulin-abhängigen Kinase II (CamKII; Burgin et al., 1990), das aktivitätsregulierte Cytoskelett-assoziierte Protein (Arc/Arg3.1; Link et al., 1995) oder die kurze, untranslatierte BC1-RNA (Muslimov et al., 1997). Häufig findet man entwicklungs- oder aktivitätsabhängige mRNA-Lokalisationen (Crino und Eberwine, 1996; Link et al., 1995). Synaptische Stimulation *in-vivo* führt z.B. nicht nur zur verstärkten Transkription, sondern auch zur dendritischen Translokation der Arc/Arg3.1 mRNA (Steward und Worley, 2001) und KCl-Depolarisation in kultivierten Neuronen erhöht den CamKII α mRNA-Transport in distale Dendriten (Rook et al., 2000).

Gezeigt wurde, dass die Transkripte in großen Granula transportiert werden (mRNPs = *messenger ribonucleoprotein*), die außerdem RNA-bindende Proteine, Ribosomen, Translationsfaktoren und Motorproteine enthalten und mit Geschwindigkeiten von bis zu 0,1 $\mu\text{m/s}$ Mikrotubuli-abhängig bewegt werden (Knowles et al., 1996; Kanai et al., 2004; Hirokawa, 2006).

Als Motorprotein konnte dabei KIF5 identifiziert werden, welches zur Kinesin 1 - Familie (*conventional kinesin*) gehört und *Cargo*-Moleküle zum Plus-Ende der Mikrotubuli transportiert (Hirokawa und Takemura, 2005). Da zumindest in proximalen Dendriten die Mikrotubuli in gemischter Polarität vorliegen, könnte KIF5 sowohl antero- als auch retrograden Transport vermitteln (Baas et al., 1988). Außerdem scheint auch das Motorprotein KIF3C, ein Mitglied der Kinesin II - Familie, am dendritischen Transport von mRNPs beteiligt zu sein (Davidovic et al., 2007).

Die Regulation des dendritischen Transports wurde erst für einige Beispiele genauer untersucht. Dabei liegen die *cis*-agierenden Sequenzen meist in der 3' untranslatierten Region (3'UTR) der transportierten mRNA und werden als *dendritic targeting elements* (DTEs) bezeichnet. Diese Sequenzen sind häufig wenig homolog, so dass für die Bindung interagierender Faktoren von einem größeren Einfluss der Sekundärstruktur ausgegangen wird (Huang et al., 2003). Die CamKII α mRNA enthält z.B. zwei distinkte DTEs (Mori et al., 2000; Blichenberg et al., 2001) und zwei Kopien des Hexanukleotid-Motivs CPE, welches die dendritische Lokalisation über das RNA-bindende Protein CPEB vermitteln kann (*cytoplasmatic polyadenylation element binding*, Huang et al., 2003). Die große Bedeutung der durch die 3'UTR vermittelten exakten Lokalisation und somit lokalen Translation der CamKII α mRNA zeigen Untersuchungen einer transgenen Maus, der diese Region fehlt. Die Tiere wiesen erhebliche Defizite in der Langzeitpotenzierung und der Gedächtnisleistung auf (Miller et al., 2002). Auch der dendritische Transport der MAP2 mRNA wird durch ein DTE in der 3'UTR vermittelt (Blichenberg et al., 1999). Die Proteine MARTA1 und MARTA2 (MAP2 RNA *transacting factor*) interagieren mit diesem Element (Rehbein et al., 2000). Die Translokation der MAP2 mRNA in die Dendriten ist von Motorproteinen der Kinesin 1 - Familie abhängig und wird durch dominant-negative MARTA2-Konstrukte inhibiert (Zivraj, Dissertation 2005). Ein weiteres, gut charakterisiertes DTE liegt in der 3'UTR der β -Aktin-mRNA. Diese sogenannte *zipcode*-Sequenz besteht aus 54 Nukleotiden und wird von ZBP1 gebunden (*zipcode binding protein*; Zhang et al., 1999). Interessant ist hierbei, dass die β -Aktin mRNA schon während der Transkription im Zellkern mit ZBP1 assoziiert ist (Oleynikov und Singer, 2003) und in Neuronen der dendritische Transport von mRNA und ZBP1 aktivitätsabhängig reguliert wird (Tiruchinapalli et al., 2003).

Ein anderes wichtiges RNA-bindendes Protein in dendritischen Granula ist Staufen. Es wurde ursprünglich als Bindepartner der *bicoid*- und *oskar*-mRNA im Drosophila-Embryo identifiziert (St Johnston et al., 1991). Die Säuger-Homologe Staufen1 und Staufen2 enthalten mehrere dsRBDs (*double-stranded RNA-binding domains*) und binden RNA *in-vitro* Sequenzunabhängig (Monshausen et al., 2001). Beide Proteine sind in distinkten mRNA-Granula lokalisiert (Duchaine et al., 2002), spielen eine wichtige Rolle für den dendritischen mRNA-Transport (Kanai et al., 2004; Tang et al., 2001) und scheinen auch an der Regulation der Translation beteiligt zu sein (Dugre-Brisson et al., 2005). Häufig sind RNA-bindende Proteine, welche den Transport vermitteln, auch direkt an der Regulation der Translation beteiligt, indem sie wie Staufen mit Faktoren der Translationsmaschinerie interagieren und die Proteinsynthese reprimieren oder aktivieren (Wells, 2006). Auch die Poly-C-bindenden Proteine wie hnRNP-K oder hnRNP-E binden RNA über ihre hnRNP-K-*Homology*-Domänen (KH) und erfüllen vielfältige Aufgaben (Makeyev und Liebhaber, 2002). HnRNP-K beeinflusst neben dem mRNA-Export, -Transport und der -Stabilität auch die Translation spezifischer mRNAs (Bomsztyk et al., 2004). Ein weiteres Beispiel ist das Poly-A-bindende Protein PABP, welches ebenfalls in dendritischen Transportkomplexen vorhanden ist und die mRNA-Stabilität sowie die Translation reguliert (Khanam et al., 2006).

Die große Vielfalt *cis*-agierender Sequenzelemente und *trans*-agierender Faktoren weist auf die mögliche Bedeutung lokaler Translation spezifisch regulierter Transkripte in Neuronen hin. Während des Transports entlang des Cytoskeletts wird die Translation der mRNAs reprimiert. Diese Inhibition der Proteinsynthese kann dann am Bestimmungsort z.B. den dendritischen Dornen während der Entwicklung oder den Synapsen nach Aktivierung durch verschiedene Regulationsmechanismen aufgehoben werden.

1.2 Regulation der Translation

Die eukaryotische Translation läuft in vier Schritten ab: Initiation, Elongation, Termination und Recycling. Das Ribosom erkennt das Initiationskodon mit der Methionyl-Initiator-tRNA an seiner sogenannten Peptidyl(P)-Position. Während der Elongation gelangen Aminoacyl-tRNAs an die Akzeptor(A)-Position und dekodieren das nächste Triplet. Nach Bildung der Peptid-Bindung kommt es zur Translokation und das folgende Kodon rückt an die A-Position. Am Ende der kodierenden Sequenz wird das Stoppkodon erkannt und das synthetisierte Protein vom Ribosom freigegeben. Danach kommt es zur Dissoziation der Ribosomen-Untereinheiten und Freigabe der mRNA sowie der deacylierten tRNAs (Kapp und Lorsch, 2004).

Vielfältige Regulationsmechanismen ermöglichen die Beeinflussung der Translation bei allen beschriebenen Schritten. Die Kontrolle der Initiation ist dabei besonders effizient (Gingras et al., 1999; Jiang und Schuman, 2002) und erfolgt unter anderem über regulative Proteine, die sowohl an 5' als auch 3' untranslatierte Regionen (UTRs) binden. Da dies im besonderen Interesse dieser Arbeit liegt, werden im Folgenden nur die Initiation der Translation und Regulationen durch die 5'UTR näher erläutert.

Der erste Schritt der Initiation ist die Bildung des ternären eIF2-GTP-Met-tRNA Komplexes (eIF = eukaryotischer Initiationsfaktor), wobei der Austausch von GDP nach GTP durch eIF2B vermittelt wird. Der eIF2-Komplex bildet dann zusammen mit den Faktoren eIF1, 1A, 3 und 5 sowie der gebundenen 40S Ribosomen-Untereinheit den sogenannten 43S Prä-Initiations-Komplex (Abb. 1.2). Dieser wird während der *cap*-abhängigen Translation nun an das 5'-Ende der mRNA rekrutiert. Dies geschieht mit Hilfe des eIF4F-Komplexes, der aus eIF4E (bindet das m⁷GpppG *cap*), eIF4A (ATPase-abhängige RNA-Helicase) und eIF4G (bindet eIF3) besteht. Die Bindung zwischen 43S-Komplex und mRNA wird außerdem von den RNA-bindenden Proteinen PABP und eIF4B bzw. eIF4H unterstützt. Der Komplex bewegt sich dann in 5'-3' Richtung entlang der mRNA, bis ein Startkodon in gutem Sequenzumfeld (optimal: ACCAUGG; Kozak, 1986) von der Initiator-tRNA erkannt wird (48S-Komplex). Das GTPase-aktivierende Protein eIF5 ermöglicht die GTP-Hydrolyse durch eIF2 und somit die Positionierung der Met-tRNA an die P-Position des Ribosoms. Nach Dissoziation aller anderen Faktoren sowie GTP-Hydrolyse bindet eIF5B-GTP und rekrutiert die 60S Ribosomen-Untereinheit an den Met-tRNA-mRNA-Komplex (Kapp und Lorsch, 2004).

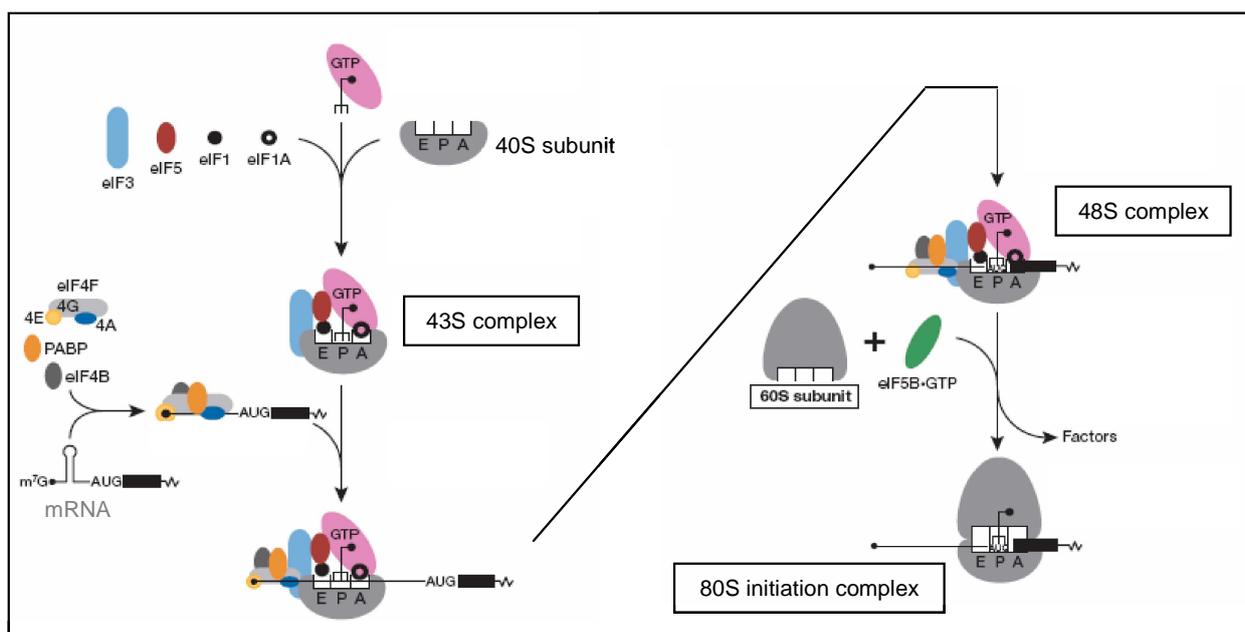


Abb. 1.2: Ablauf der eukaryotischen *cap*-abhängigen Initiation der Translation. (modifiziert aus Holcik und Pestova, 2007)

Die Initiation der Translation läuft bei den meisten mRNAs wie beschrieben *cap*-abhängig ab. Ein alternativer Mechanismus ist die zuerst in Viren beschriebene *internal ribosomal entry site* (IRES; Pelletier und Sonenberg, 1988). Das Ribosom erkennt hierbei nicht das äußerste 5'Ende der mRNA, sondern bindet an komplexe Sekundärstruktur-Motive innerhalb der 5'UTR. IRES-Elemente weisen dabei häufig keine Homologien in Primärsequenz und Struktur auf (Baird et al., 2006). Diese Form der Initiation wurde auch für dendritische mRNAs wie Arc/Arg3.1 oder MAP2 beschrieben und könnte die selektive Regulation der lokalen Translation für diese Transkripte ermöglichen (Pinkstaff et al., 2001). Der genaue Initiationsmechanismus durch IRES-Elemente ist jedoch nur für einige Viren aufgeklärt, wobei sich dafür notwendige Initiationsfaktoren und Regulationen jeweils stark unterscheiden (Jackson, 2005).

Die durchschnittliche 5'UTR der mRNAs in Säugetieren enthält 150-200 Nukleotide und weist einen GC-Gehalt von 50-60% auf. Das Vorhandensein einer untranslatierten Region vor der kodierenden Sequenz ermöglicht die vielfältige Regulation der Genexpression auf Ebene der Translation. Mit steigender Länge und GC-Gehalt der 5'UTR erhöht sich auch der Einfluss auf die Initiation der Translation. In 10-45% der Fälle sind außerdem sogenannte *upstream Open Reading Frames* = uORFs vorhanden (Iacono et al., 2005; Hughes, 2006). Da diese uORFs translatiert werden können, sollte korrekterweise nicht von untranslatierten Regionen gesprochen werden (Morris und Geballe, 2000). Dennoch wird zur Vereinfachung in dieser Arbeit die allgemein gebrauchte Bezeichnung 5'UTR beibehalten. In Abbildung 1.3 sind alle im Folgenden beschriebenen Möglichkeiten der Regulation während der Initiation schematisch zusammengefasst.

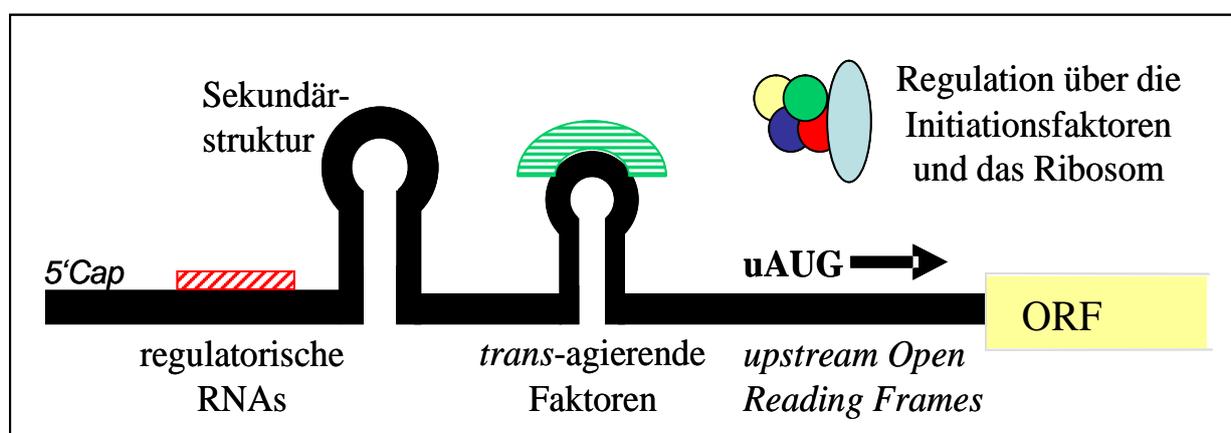


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Regulationsmöglichkeiten durch Strukturelemente und interagierende Faktoren innerhalb der 5'UTR.

Besonders bei stark regulierten Proteinen wie z.B. den Zellzyklus-Faktoren findet man häufig lange, stark strukturierte 5'UTRs. Die Länge und Stabilität der 5'UTR sowie ihre Sekundärstruktur beeinflusst die Effizienz der Translation erheblich (Kozak, 1991). Besonders nahe dem 5'cap-Ende gelegene Haarnadel-Strukturen verhindern die Bewegung des 43S-Komplexes auf der mRNA. Neben der Wirkung als physikalische Barrieren können Sekundärstruktur-Elemente aber auch als Bindestelle für interagierende Faktoren dienen. So blockiert z.B. die Bindung des *iron regulatory protein* an das *iron-responsive element* (IRE) in der Nähe des m7GpppG-cap der Ferritin mRNA die Rekrutierung des Prä-Initiations-Komplexes (Gray und Hentze, 1994; Paraskeva et al., 1999).

Die Translation spezifischer mRNAs wird auch direkt durch Modifikation der Initiationsfaktoren beeinflusst. So ist eIF4E ein Ziel der Regulierung durch mTOR (*mammalian target of Rapamycin*). Die Funktion von eIF4E während der Initiation wird durch Bindung von 4E-BP1 blockiert. 4E-BP1 kann jedoch nach Phosphorylierung nicht mehr an eIF4E binden, so dass die Translation verstärkt wird (Averous und Proud, 2006). mTOR ist eine Kinase, die verschiedene Signalwege in der Zelle beeinflusst und nach Aktivierung den Faktor 4E-BP1 phosphoryliert. Dadurch können z.B. betroffene synaptische mRNAs vermehrt translatiert werden. Unter anderem konnte die Beteiligung von mTOR an der Ausbildung der Langzeitpotenzierung im Hippokampus nachgewiesen werden (Tang et al., 2002). mTOR aktiviert außerdem die p70 S6-Kinase und vermittelt somit die Translation der sogenannten 5'TOP-mRNAs (*5'terminal oligopyrimidine tract*) die für PABP und andere an der Translation beteiligte Faktoren kodieren (Jiang und Schuman, 2002).

Die Initiation der Translation kann außerdem durch uORFs vielfältig beeinflusst werden (Meijer und Thomas, 2002). Besonders wenn der abgelesene uORF mit dem eigentlichen Leserahmen überlappt oder der uORF weit vor dem nächsten AUG stoppt, kann die Translation der mRNA völlig inhibiert sein. Andererseits ermöglicht die Initiation an uORFs in stark strukturierten 5'UTRs oft erst Re-Initiationen an dahinter gelegenen Startpunkten, da das Ribosom ohne Erkennung des uAUGs vor Haarnadelstrukturen häufiger von der mRNA abfallen würde (Morris und Geballe, 2000). Zur Re-Initiation bleibt die 40S-Ribosomen-Untereinheit nach Ablesen des uORFs mit der mRNA assoziiert, bindet an einen neuen ternären Komplex und kann somit das nachfolgende Startkodon erkennen (Hinnebusch, 2005). Nicht alle AUGs in gutem Kozak-Kontext werden vom Ribosom erkannt, so dass sie mit Hilfe des *leaky-scannings* überlesen und das nächste Startkodon abgelesen werden kann. Dies ermöglicht u.a. die Entstehung N-terminal verkürzter Protein-Isoformen, da ein Teil der Ribosomen nicht das erste, sondern dahinter liegende AUGs nutzen kann (Kochetov, 2005).

Besonders gut untersucht ist die Regulation der Translation durch uORFs für den Hefe-Transkriptionsfaktor GCN4 (*General Control Non-inducible*; Hinnebusch, 2005) und das entsprechende homologe Protein ATF4 in Säugetieren (*Activating Transcription Factor*; Lu et al., 2004). Die mRNA des Transkriptionsaktivators GCN4 enthält vier kurze uORFs, welche die Translation des eigentlichen ORFs stark inhibieren. Während Hungerphasen, in denen der Hefe nicht ausreichend Aminosäuren zur Verfügung stehen, wird der uORF1 zum positiven Regulator der Translation. Erst nach der Initiation an diesem uAUG1 kann GCN4 durch Re-Initiation abgelesen werden. Die Regulation erfolgt hierbei über den Initiationsfaktor eIF2, da dessen α -Untereinheit während Aminosäuremangel verstärkt phosphoryliert wird. Durch die Phosphorylierung sinkt der Anteil von eIF2-GTP und die verfügbare Menge des ternären Met-tRNA-Komplexes in der Zelle. Die 40S Ribosomen-Untereinheiten werden somit nach Ablesen des uORF1 länger ohne gebundenen ternären Komplex entlang der mRNA bewegt und überlesen damit häufiger die sonst inhibierend wirkenden uORFs 2-4. Somit wird die Initiation der Translation am GCN4 Startkodon verstärkt (Hinnebusch, 2005). Eine ähnliche Regulation findet sich bei ATF4. Auch hier wirkt der 1.uORF als positiver Regulator, da in gestressten Zellen bei hohem Anteil von phosphoryliertem eIF2 α ein inhibierender 2.uORF überlesen werden kann (Vattem und Wek, 2004). In einigen Fällen wie z.B. dem AdoMetDC-Transkript (S-Adenosylmethionin-Decarboxylase) kann auch das abgelesene uORF-Peptid selbst durch Interaktion mit der Translationsmaschinerie weitere Initiationen beeinflussen. Dabei kann das Peptid mit 23S rRNA-Komponenten interagieren, das Ribosom in seiner Bewegung blockieren oder mit anderen zellulären Faktoren wie den tRNA-Komplexen assoziiert sein (Lovett und Rogers, 1996).

Obwohl AUG das universelle Startkodon ist und in der Mehrheit der Fälle ausschließlich dieses Tripletts als Initiationskodon von der Met-tRNA erkannt wird, wurden in den letzten Jahren immer mehr Beispiele der Initiation an *non-AUG* Startkodons gefunden. Schon 1966 wurde biochemisch gezeigt, dass die Met-tRNA auch andere Tripletts wie GUG binden kann (Kellogg et al., 1966). Erste Beispiele der Nutzung alternativer Startpunkte konnten in Bakterien, Viren und Pilzen nachgewiesen werden (Becerra et al., 1985; Chalut und Egly, 1995; Zitomer et al., 1984), wobei diese in einigen Fällen sogar das einzige Startkodon darstellen (Xiao et al., 1991; Sugihara et al., 1990). Interessanterweise werden aber auch in immer mehr Säugetier-Genen *non-AUGs* gefunden, welche meist als uORF-Startpunkte wichtige regulatorische Funktionen erfüllen. Häufig sind dabei Proteine betroffen, welche hochgradig in ihrer Expression kontrolliert werden, wie Proto-Onkogene, Transkriptionsfaktoren, Kinasen oder Wachstumsfaktoren (Hann, 1994).

Auch kleine RNAs von 21-23 nt Länge (miRNAs) und *small modulatory* (sm) RNAs wie BC1 (Ratte) oder BC200 (human) können gebunden an UTR-Sequenzen die Proteinsynthese beeinflussen. Die Regulation durch miRNAs wurde ursprünglich in *C.elegans* entdeckt, wobei die Mechanismen der Repression weitgehend unbekannt sind (Gebauer und Hentze, 2004). BC1 und BC200 bilden trotz unterschiedlichem evolutionärem Ursprung dieselbe Sekundärstruktur aus. Beide binden PABP sowie möglicherweise weitere Initiationsfaktoren und blockieren so die Translation (Cao et al., 2006).

1.3 Shank1 – Gerüstprotein der postsynaptischen Dichte

Die postsynaptisch lokalisierten Shank-Proteine (*SH3 domain and Ankyrin repeat containing protein*) wurden unabhängig voneinander in mehreren Studien als Interaktionspartner für Membran- und cytoplasmatische Proteine identifiziert. Mitglieder der Shank-Proteinfamilie (Naisbitt et al., 1999) wurden von den verschiedenen Gruppen auch als Somatostatin-Rezeptor interagierendes Protein (SSTRIP; Zitzer et al., 1999), Prolin-reiches Synapsen-assoziiertes Protein (ProSAP; Böckers et al., 1999), Cortactin-bindendes Protein (Du et al., 1998) oder Synamon (Yao et al., 1999) bezeichnet. Die Domänenstruktur von Shank1 und die Position innerhalb der postsynaptischen Dichte (PSD) ist in Abbildung 1.4a schematisch dargestellt.

Shank interagiert indirekt oder direkt mit NMDA- (über GKAP und PSD-95; Böckers et al., 1999; Naisbitt et al., 1999) und AMPA-Rezeptoren (durch direkte Bindung an die Shank PDZ-Domäne, Uchino et al., 2006) und direkt mit dem Calcium-unabhängigen Rezeptor für α -Latrotoxin (Kreienkamp et al., 2000; Tobaben et al., 2000). Shank-Proteine sind außerdem durch die Bindung von Homer mit metabotropen Glutamat-Rezeptoren assoziiert (Tu et al., 1999). Die Interaktion mit GKAP über die PDZ-Domäne (Abb. 1.4a) scheint zumindest für Shank1 essentiell für eine synaptische Lokalisation zu sein (Sala et al., 2001). Die postsynaptische Lokalisation von Shank2 und 3 wird hingegen durch Motive am C-Terminus vermittelt (Böckers et al., 2005). Die C-terminale SAM-Domäne von Shank3 bindet über Interaktion mit Zink-Ionen an die SAM-Domänen anderer Shank3-Moleküle. Das so gebildete Netzwerk könnte somit die Plattform für die Organisation der PSD bilden (Baron et al., 2006). Die Interaktionen von Shank-Proteinen mit dem Aktin-assoziierten Cortactin (Du et al., 1998), Abp1 (Qualmann et al., 2004) oder α -Fodrin (Böckers et al., 2001) sprechen außerdem für eine Rolle als Gerüstprotein zwischen Membran-ständigen Rezeptoren und dem Aktin-Cytoskelett.

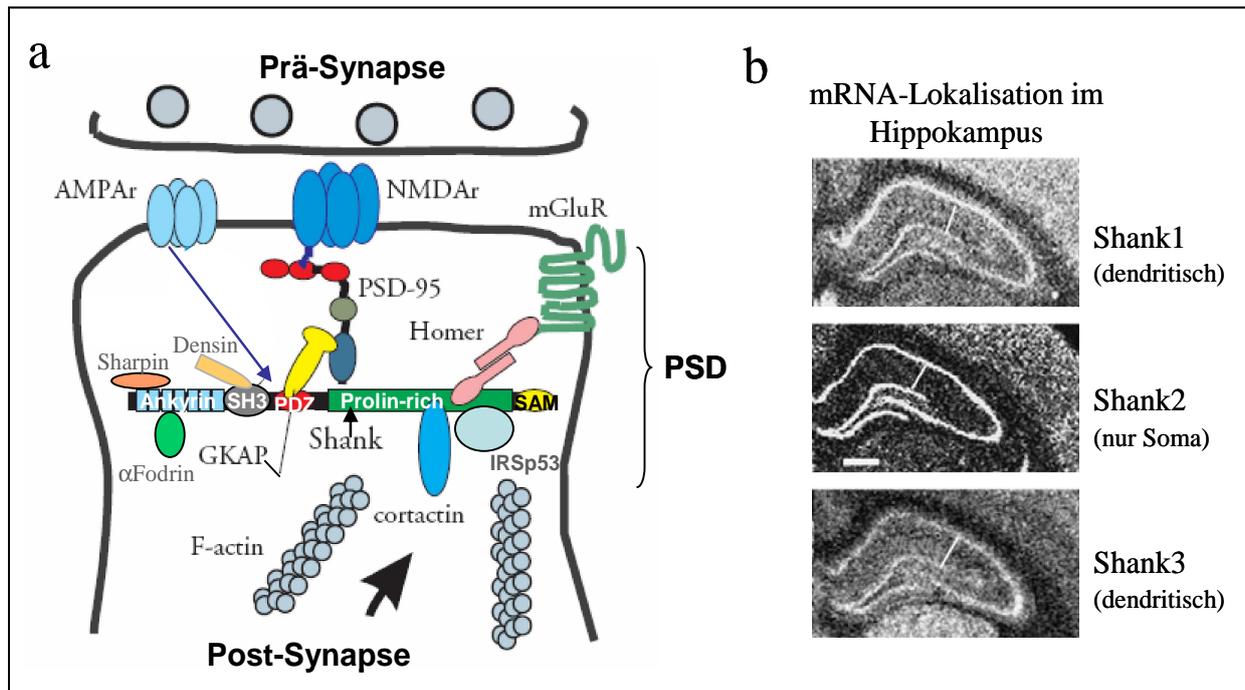


Abb. 1.4: Shank befindet sich als Gerüstprotein in der postsynaptischen Dichte (PSD) exzitatorischer Synapsen. Die Shank1 und 3 mRNAs sind im Hippokampus dendritisch lokalisiert.

a: Schematischer Aufbau der postsynaptischen Dichte mit Shank als zentralem Gerüstprotein. Zur Vereinfachung sind nicht alle Interaktionspartner in der PSD aufgeführt. Gezeigt ist außerdem die Domänenstruktur von Shank1, mit den N-terminalen Ankyrin-Motiven, der SH3-Domäne (*src homology*), der PDZ-Domäne (*PSD-95/discs-large/zona-occludens-1*) und dem C-terminalen Prolin-reichen Motiv sowie der SAM-Domäne (*sterile alpha motif*). (modifiziert aus Sheng und Kim, 2000)

b: *In-situ*-Hybridisierungen von Hippokampus-Schnitten des Rattengehirns zeigen eine dendritische Lokalisation der Shank1 und 3 mRNAs. Der weiße Strich (schräg) markiert die Molekularschicht zwischen den Zellkörpern. (Balken = 1mm; modifiziert aus Böckers et al., 2004)

Die Shank-Proteine sind mit etwa 200 kDa relativ groß und weisen eine Vielzahl unterschiedlicher Spleißvarianten auf, bei denen Domänen fehlen oder alternative Start- und Stoppkodons genutzt werden (Sheng and Kim, 2000). Die Spleißvarianten scheinen teilweise auch entwicklungsabhängig reguliert zu sein (Lim et al., 1999). Shank1 wird vor allem im Gehirn exprimiert (Zitzer et al., 1999), Shank2 ist sowohl stark im Gehirn, als auch in Niere und Leber vorhanden (Du et al., 1998) und Shank3 wird vor allem in Herz, Gehirn, Niere und Leber gefunden (Lim et al., 1999). Die Überexpression von Shank1 führt in hippocampalen Neuronen zu einer veränderten Morphologie dendritischer Dornen. Diese sind Ausstülpungen der dendritischen Membran auf denen sich exzitatorische Synapsen befinden. Shank1 vermittelt die Vergrößerung und Reifung der Köpfe dendritischer Dornen (Sala et al., 2001).

Interessanterweise wurden Mutationen im Shank3-Gen mit Symptomen des 22q13.3 Mikrodeletionssyndrom in Verbindung gebracht. Dieses Syndrom ist eines der häufigsten Ursachen für kognitive Defizite, Autismus, verzögerte Entwicklung und neonatale Hypotonie (Manning et al., 2004). Die genomische Deletion der C-terminalen SAM-Domäne (Abb. 1.4a) und der 3'UTR sowie andere Mutationen von Shank3 führen in betroffenen Patienten zur mentalen Retardierung und Sprachstörungen (Durand et al., 2006; Bonaglia et al., 2001 und 2006). Dabei handelt es sich in allen bekannten Fällen um heterozygote Mutationen. Da also noch eine intakte Kopie des Shank3-Gens vorhanden ist, scheint es sich um einen sogenannten *gene dosage* Effekt zu handeln. Dies zeigt, dass die genau eingestellte Menge der Shank-Proteine im Gehirn wichtig für die Entwicklung von Sprache und Kommunikation ist. Ähnliche Symptome und autistische Verhaltensweisen wie bei der Shank3-Haploinsuffizienz wurden auch in Patienten mit Mutationen der Neuroligine gefunden, welche an verschiedene Proteine mit PDZ-Domänen wie Shank1 und 3 oder PSD-95 binden können (Meyer et al., 2004). Die postsynaptischen Neuroligine interagieren mit Neurexinen in der Prä-Synapse und sind essentiell für die Ausbildung synaptischer Kontakte (Brose, 1999). Möglicherweise ist also der Proteinkomplex der Neuroligin und Shank-Proteine enthält an der Bildung spezialisierter postsynaptischer Strukturen beteiligt, die kognitive Fähigkeiten sowie Sprachkommunikation vermitteln.

In verschiedenen Gehirnregionen konnte für die Shank-mRNA außerdem eine Lokalisation in Dendriten nachgewiesen werden (Böckers et al., 2004). Die Shank1 und 2 mRNAs wurden dabei in Purkinje-Zellen im Cerebellum, die Shank1 und 3 mRNAs im Hippokampus in distalen Dendriten gefunden (Abb. 1.4b). Für Shank1 konnte innerhalb der 3'UTR ein 200 Nukleotide umfassendes DTE identifiziert werden (*dendritic targeting element*; Böckers et al., 2004). Dieses Element weist keine Ähnlichkeit mit bekannten DTEs anderer dendritischer mRNAs auf. Auch Shank2 und 3 enthalten keine homologe Sequenz innerhalb der 3'UTR. Möglicherweise ist also nicht die Primärsequenz, sondern eine bestimmte Sekundärstruktur von besonderer Bedeutung für die Bindung interagierender Faktoren und damit den Transport in die Dendriten. Die Regulation des Shank1 mRNA-Transports könnte sich andererseits auch von den bekannten Mechanismen anderer dendritischer mRNAs unterscheiden. Poly-C-bindende Proteine (PCBPs) wie z.B. hnRNP-E und hnRNP-K, sowie das Poly-A-bindende Protein (PABP) konnten als *trans*-agierende Faktoren für das Shank1-DTE identifiziert werden (Iglauer, Dissertation 2005). In derselben Arbeit wurde gezeigt, dass die 5'UTR von Shank1 die Translation von Reporter-Transkripten stark inhibiert.

Möglicherweise wird die Translation der Shank1 mRNA während des Transports und der Lokalisation im Bereich der dendritischen Dornen also zunächst inhibiert. Entwicklungs- oder aktivitätsabhängig könnte diese Inhibition der Shank1-Synthese dann lokal aufgehoben werden. Da Shank eines der wichtigsten Gerüstproteine der postsynaptischen Dichte ist, würde die dendritische mRNA-Lokalisation z.B. eine lokale Steuerung der Synapsenbildung ermöglichen. Die Shank-Synthese im Bereich der Synapsen könnte außerdem von Bedeutung für die Plastizität und dem damit zusammenhängenden Umbau der PSD sein. Die Shank-Proteine in der PSD bilden durch Interaktion der SAM-Domänen untereinander kompakte Netzwerke. Diese Aggregatbildung könnte den Transport im Soma synthetisierter Shank-Proteine erschweren. Auch hier wäre die lokale Translation von Vorteil, da die Shank-Aggregate direkt nach der Synthese in die PSD eingebaut werden könnten.

1.4 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es die Bedeutung der 5' und 3'untranslatierten Bereiche der Shank1 mRNA für die Expression dieses wichtigen PSD-Proteins in Neuronen zu untersuchen.

Zunächst sollte der 3'UTR-abhängige Shank1 mRNA-Transport in lebenden Neuronen mit Hilfe von *Time-lapse*-Aufnahmen visualisiert werden. Außerdem sollte der Einfluss der bekannten 3'UTR-bindenden Proteine wie hnRNP-K und PABP auf die dendritische Lokalisation der Shank mRNA untersucht werden. Ein weiteres Ziel war die Charakterisierung anderer in den mRNA-Granula vorhandenen interagierenden Faktoren, sowie die Untersuchung der Rolle des Cytoskeletts für den dendritischen Transport.

Ein weiterer Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Untersuchung der lokalen Translation der Shank1 mRNA. Ziel war es zunächst den Mechanismus der 5'UTR-abhängigen Inhibition der Translation mit Hilfe verschiedener Reporter-Systeme aufzuklären. Außerdem sollte gezeigt werden, wie diese Regulationsmechanismen die Proteinsynthese und Verteilung von Shank1 in der postsynaptischen Dichte beeinflussen können.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die Zusammensetzung aller Puffer und Medien ist im Anhang aufgeführt (Abschnitt 7.1). Alle Chemikalien und Zellkulturreagenzien wurden soweit nicht anders vermerkt von den Firmen Merck, Roth, Sigma-Aldrich, Invitrogen/Gibco oder PAA in reinst Qualität (p.A.) bezogen. Verwendete Enzyme stammten von NEB, Fermentas, Roche oder Promega.

2.1.2 Bakterienstämme, Zelllinien und Tiere

Für alle Klonierungen wurden *Escherichia coli* Bakterien vom Stamm TOP10F' (Invitrogen) und zur Expression von rekombinanten Proteinen vom Stamm BL21-*CodonPlus* (Stratagene) genutzt. Für die eukaryotische Zellkultur wurden die Zelllinie HEK293 (*Human Embryonic Kidney*, ATCC) und primäre Neurone aus *Rattus norvegicus* (Stamm: Wistar; Tierhaltung UKE, Hamburg) verwendet.

2.1.3 DNA-Vektoren

Tab. 2.1: Für Klonierungen verwendete DNA-Vektoren.

Vektor	Beschreibung/Resistenz	Hersteller
pEGFP	Eukaryotische Expression, <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i> , Kanamycin	BD-Biosciences Clontech
pmRFP	Eukaryotische Expression, <i>Monomeric Red Fluorescent Protein</i> , Kanamycin, basierend auf den pEGFP	Katrin Falley (mRFP-Sequenz von Roger Tsien, San Diego)
pCMV - Tag 2	Eukaryotische Expression, N-terminaler <i>Flag-Tag</i> , Kanamycin	Stratagene
pcDNA3.1	Eukaryotische Expression, ohne <i>Tag</i> , Ampicillin	Invitrogen
pBlaulicht	Für <i>in-vitro</i> -Transkription, <i>Photinus-Luciferase</i> -Vektor, basiert auf pBluescript, Ampicillin	Hans-Jürgen Kreienkamp, Hamburg

Vektor	Beschreibung/Resistenz	Hersteller
pBicFire	Eukaryotische Expression, Bicistronischer Vektor mit <i>Photinus</i> - und <i>Renilla</i> -Luciferase, Ampicillin	Jan Christiansen, Kopenhagen
pGEX-4T-2	Prokaryotische Expression, Glutathion-S-Transferase, Ampicillin	Amersham Pharmacia
pBluescript II SK+	Für <i>in-vitro</i> -Transkription, Ampicillin	Stratagene
pCRII-TOPO	Für die Klonierung von PCR-Produkten, Ampicillin und Kanamycin	Invitrogen

Die in Tabelle 2.1 aufgelisteten Plasmide dienen als Ausgangsvektoren für alle Klonierungen. Die damit hergestellten Expressionskonstrukte sind im Anhang aufgeführt (Abschnitt 7.3).

2.1.4 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide für PCR und Sequenzierungen wurden bei Sigma-Aldrich bestellt, mit tridestilliertem Wasser gelöst und auf 10 pmol/μl eingestellt. Eine Liste aller verwendeten Primer befindet sich im Anhang (Abschnitt 7.2).

2.1.5 Antikörper

In den Tabellen sind alle verwendeten Primär- (Tab. 2.2) und Sekundär-Antikörper (Tab. 2.3) aufgeführt. Zum Nachweis von Aktin-Filamenten wurde TRITC-gekoppeltes Phalloidin verwendet (Verdünnung: 1:40, Molecular Probes).

Tab. 2.2: Übersicht der eingesetzten Primär-Antikörper.

m = *mouse* (Maus); rb = *rabbit* (Kaninchen)

Primär-Antikörper	Hersteller	Verdünnung	
		Western Blot	Immuncytochemie
rb-Anti-ACGuORF	Auftragsimmunisierung (Biogenes)	1:500	
m-Anti-DIG-Cy3	Abcam		1:100
m-Anti-EGFP	Covance		1:1.000
rb-Anti-EGFP	Abcam		1:2.000
m-Anti-eIF2α	Abcam	1:1.000	
rb-Anti-eIF2αPhospho	Abcam	1:500	
m-Anti-Flag	Sigma-Aldrich	1:10.000	
rb-Anti-Flag	Sigma-Aldrich		1:100
rb-Anti-KIF5C	ABR		1:200
rb-Anti-MAP2 (Serum)	S. Kindler, Hamburg		1:5.000
rb-Anti-Neomycin-Phosphotransferase II	Upstate	1:1.000	
m-Anti-PSD-95	Upstate	1:1.000	

Primär-Antikörper	Hersteller	Western Blot	Immuncytochemie
rb-Anti-mRFP (Serum)	Auftragsimmunisierung (Biogenes)	1:2.000	1:1.000
rb-Anti-Shank1-C-Term.	Neuromics	1:1.000	
rb-Anti-ShankNT (Serum)	H.-J. Kreienkamp, Hamburg	1:2.000	
rb-Anti-ShankPDZ (Serum)	H.-J. Kreienkamp, Hamburg	1:2.000	
rb-Anti-Staufen1 (Serum)	S. Kindler, Hamburg		1:100
m-Anti-Tubulin	Abcam	1:10.000	1:1.000
rb-Anti-Tubulin	Abcam		1:500

Tab. 2.3: Übersicht der eingesetzten Sekundär-Antikörper und Verdünnungen.

Sekundär-Antikörper	Hersteller	Verdünnung	
		Western Blot	Immuncytochemie
Cy3-Anti-Maus IgG	Dianova		1:400
Cy3-Anti-Kaninchen IgG	Dianova		1:400
Cy5-Anti-Maus IgG	Dianova		1:500
Cy5-Anti-Kaninchen-IgG	Dianova		1:500
Alexa-Fluor488-Anti-Maus IgG	Molecular Probes		1:300
Alexa-Fluor488-Anti-Kaninchen IgG	Molecular Probes		1:300
HRP-Anti-Maus IgG	Amersham	1:2.500	
HRP-Anti-Kaninchen IgG	Amersham	1:2.500	

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur gezielten Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Polymerase-Kettenreaktion genutzt. Der Gesamtansatz betrug dabei 50µl. Es wurden 10-100ng Plasmid-DNA als Matrize, 10-50pmol Primer und je 100µmol Desoxyribonukleotide eingesetzt. Für Klonierungen der 5'UTR von Shank1 wurde aufgrund des hohen GC-Gehalts auch 10% Glycerol zugegeben. Andere Komponenten der Reaktion wurden dann gemäß den Empfehlungen des Herstellers zur PCR mit der *AmpliTaq*-Polymerase (Perkin Elmer) oder der *Pfu-Turbo*-Polymerase (Stratagene) eingesetzt. Zunächst wurde die DNA 2-5 Minuten bei 94°C denaturiert, es folgten 30-35 Zyklen aus 30 Sekunden 94°C, 55-65°C Primer-Anlagerung (5°C unter der von Sigma-Aldrich berechneten Temperatur) und 72°C Elongation für 1 Minute/1.000 Nukleotide.

Im Anschluss erfolgte ein abschließender Verlängerungsschritt bei 72°C für 10 Minuten, wobei im Falle der *Pfu*-PCR auch noch *Taq*-Polymerase zugegeben wurde um überhängende A-Enden zu erhalten. Dies ermöglichte nach Agarose-Gelelektrophorese und Aufreinigung der PCR-Produkte die Klonierung in den pCRII-TOPO-Vektor (Invitrogen, Durchführung nach Herstellerangaben). Zur weiteren Klonierung der Fragmente waren diese entweder schon durch die verwendeten Primer mit Restriktionsschnittstellen versehen oder es wurden Schnittstellen des TOPO-Vektors genutzt.

2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten

Je nach Größe der Fragmente wurden 0,8 - 2%ige Gele für horizontale nicht-denaturierende Elektrophoresen hergestellt. Hierfür wurde Agarose in 1x TAE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlen mit 0,2µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die Plasmide, Restriktionsansätze oder PCRs wurden mit 5x DNA-Ladepuffer versetzt, in die Geltaschen aufgetragen und mit 1x TAE-Laufpuffer bei 100V elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenmarker wurden der λ - und *Gene Ruler 100bp* - Standard von Fermentas verwendet. Die Dokumentation erfolgte unter UV-Licht, wobei gewünschte Fragmente ausgeschnitten und durch Bindung an Glasmilch aus der Agarose isoliert werden konnten (*Qiaex II* von Qiagen).

2.2.3 Restriktionsverdau und Ligation von DNA-Fragmenten

Plasmid-DNA wurde für Klonierungen mit Restriktionsenzymen in 20-40µl Ansätzen verdaut. Dabei wurde 1µg DNA für Vektoren und 5µg für die Isolierung von Fragmenten eingesetzt. Der Verdau erfolgte mit je 5U Enzym und entsprechendem Puffer für 2 Stunden bei 37°C. Wenn in einer Klonierung nur ein Enzym verwendet wurde, musste der Vektor um Religationen zu verhindern noch mit CIAP (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*) für 30 Minuten bei 37°C dephosphoryliert werden (Inaktivierung des Enzyms bei 85°C für 15 min). Falls glatte Enden erwünscht waren, wurden, je nach verwendetem Enzym, überhängende Enden noch durch Zugabe von dNTPs und der T4 DNA-Polymerase aufgefüllt. Anschließend wurde der Restriktionsansatz auf ein Agarose-Gel aufgetragen, die gewünschten Fragmente isoliert und für DNA-Ligationen genutzt. Die linearisierte Vektor-DNA wurde hierbei mit dem 3-10fachen molaren Überschuss an entsprechend geschnittenem DNA-Fragment in 10-20µl Ansätzen zusammengegeben. Die Ligation erfolgte mit der T4 DNA-Ligase und entsprechendem Puffer für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4-16°C.

2.2.4 Herstellung von Deletionskonstrukten und Einführung von Punktmutationen

Die Shank1-5'UTR Deletionskonstrukte wurden z.T mit Hilfe vorhandener Restriktionsschnittstellen hergestellt. Aufgrund des hohen GC-Gehalts der 5'UTR kam es außerdem bei PCR-Reaktionen immer wieder zur zufälligen Synthese deletierter 5'UTR-Fragmente, wobei meist innerhalb der Sequenz mehrere Hundert Nukleotide fehlten. Diese Fragmente wurden aus dem Gel isoliert, in TOPO-Vektoren kloniert sowie sequenziert und konnten dann ebenfalls als Deletionskonstrukte verwendet werden. Um Punktmutationen in die 5'UTR einzuführen mussten mehrere PCRs kombiniert werden. Hierzu wurde eine 1.PCR mit einem *forward* Primer (ermöglicht glattes 5'Ende), der die Punktmutation enthielt, und dem 5'UTR-Wildtyp *revers* Primer (enthält eine EcoRI-Schnittstelle) durchgeführt. Eine 2.PCR enthielt den 5'UTR-Wildtyp *forward* Primer (ebenfalls mit EcoRI-Schnittstelle) und einen *revers* Primer (ermöglicht glattes 3'Ende), der in der Sequenz genau an den mutierten *forward* Primer der 1.PCR angrenzte. Beide Produkte wurden isoliert, mit EcoRI verdaut und dann gleichzeitig in einen mit EcoRI linearisierten, dephosphorylierten Vektor ligiert. Dabei ist durch Ligation der beiden glatten Enden der PCR-Produkte 1 und 2 wieder die vollständige 5'UTR entstanden, die nun aber die gewünschte Punktmutation enthielt und in die gewünschten Vektoren kloniert werden konnte. Nur für die Mutation des 3.uAUGs in der 5'UTR war diese Methode leider nicht erfolgreich. Daher wurden hier eingeführte Restriktionsschnittstellen genutzt. Der mutierte *forward* Primer der 1.PCR enthielt eine BamHI-, der *revers* Primer der 2.PCR eine BglII-Schnittstelle. Diese erzeugten bei der Restriktion gleiche überhängende Enden und konnten ligiert werden. Durch diese Art der Klonierung musste jedoch zusätzlich zur gewünschten eine 2.Punktmutation eingeführt werden (siehe auch Abb. 3.23).

2.2.5 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurde aus einer Einzelkolonie (Stamm: TOP10F') eine 5ml Vorkultur gestartet (LB-Medium mit 15µg/ml Tetrazyklin) und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Damit wurde eine 500ml Kultur in LB-Medium ohne Zusätze angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,6 bei 37°C inkubiert. Die Kultur konnte anschließend auf Eis vorgekühlt und bei 1000g/4°C für 15 Minuten zentrifugiert werden.

Das Pellet wurde in 50ml eiskaltem TSB resuspendiert, für 15 Minuten auf Eis inkubiert, in vorgekühlte Gefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Zur Transformation wurden die Bakterien auf Eis aufgetaut und pro Ansatz 100µl kompetente Zellen zu 20µl 5x KCM-Puffer, 5µl Ligationsansatz oder 1µg Plasmid-DNA sowie 75µl tridestilliertem Wasser gegeben. Nach 20 Minuten Inkubation auf Eis und Hitzeschock bei 37°C für 5 Minuten wurde der Ansatz mit 1ml LB-Medium versetzt und 1-2 Stunden bei 37°C geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde auf LB-Agarplatten (je nach Vektor mit 100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.6 Mini- und Midipräparation von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde mittels alkalischer Lyse (Sambrook et al., 1989) aus Bakterienkulturen aufgereinigt. Zur Herstellung von bis zu 20µg DNA wurden die Puffer P1-3 und das entsprechende Protokoll der Firma Qiagen verwendet (= Minipräparation). Für die Aufreinigung von Plasmid-DNA in größerem Maßstab und von höherer Reinheit wurde der *NucleoBond-XtraMidi-Kit* genutzt (Macherey&Nagel; = Midi- bzw. Maxipräparation). Die DNA-Konzentration wurde mit einem Spektrophotometer durch Messung der Absorption bei 260nm bestimmt.

2.2.7 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurden nach der Didesoxy-Methode (Sanger et al., 1977) mit dem *Abi Prism Big Dye Terminator Kit* (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Mini-DNA wurde zunächst noch einmal gefällt und mit Ethanol gewaschen. Midi-DNA konnte direkt eingesetzt werden. Es wurden dann 0,4-1µg DNA, 2µl *PreMix Big Dye*, 1µl Primer auf 10µl mit tridestilliertem Wasser aufgefüllt und eine PCR durchgeführt (96°C 1 min; 25x 96°C 20 s, 50°C 5 s, 60°C 4 min). Die Reaktion wurde auf 20µl aufgefüllt und nach Zusatz von 2µl 3M NaAc, sowie 55µl 100% Ethanol bei 13.000g 30 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und bis zur Sequenzierung bei -20°C eingefroren.

2.2.8 *In-vitro*-Transkription und Translation

Für die Untersuchung der Translation mit dem Luciferase-Reporter-System musste zunächst RNA (*Photinus* Luciferase mit oder ohne Shank1-5'UTR) hergestellt werden. Hierfür wurde die *in-vitro*-Transkription nach Herstellerangaben mit dem *mMessage-mMachine-cappedRNA-Kit* (T7-Promotor, Ambion) durchgeführt. Die Konzentration der RNA wurde im Spektrophotometer durch Messung der Absorption bei 260nm bestimmt und 100ng RNA wurden anschließend im *in-vitro* Ansatz in Kaninchen Retikulozyten-Lysat nach dem Protokoll des Herstellers translatiert (*Flexi Rabbit Retikuloocyte Lysate System*, Promega). Die Effizienz der Translation wurde durch Messung der Luciferase-Lumineszenz bestimmt (*Luciferase Assay System*, Promega).

2.2.9 *In-vitro*-Transkription von DIG-markierten Sonden

Um in Neuronen mRNA nachzuweisen, wurden für die jeweilige mRNA spezifische Digoxigenin(DIG)-markierte Sonden hergestellt. Alle Lösungen wurden RNase-frei und in DEPC-Wasser angesetzt. Zunächst wurden 20µg Plasmid-DNA am 5'Ende (für die *Sense*-Sonde) oder am 3'Ende (für die *Antisense*-Sonde) der gewünschten Sequenz linearisiert (Verdau in 100µl mit 20U Enzym), im Agarose-Gel analysiert und mittels Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt. Für diese Extraktion wurden zum Verdau zunächst 2µl 0,5M EDTA, pH 8.0 und 11µl 3M NaAc, pH 7.0 und 110µl Phenol/Chloroform gegeben und nach gründlichem Mischen für 5 Minuten bei 13.000g zentrifugiert. Der wäßrige Überstand wurde abgenommen, die Extraktion wiederholt und anschließend einmal mit Chloroform präzipitiert. Die DNA wurde dann mit 100% Ethanol gefällt, gewaschen und das Pellet in 30µl DEPC-Wasser gelöst. Die so behandelte DNA diente nun als Matrize zur Synthese der DIG-markierten Sonden. Hierzu wurde ein Nukleotid-Mix aus 1µl ATP, 0,65µl UTP, 1µl GTP, 1µl CTP (alle 100mM) sowie 3µl DIG-UTP (10mM) und 3,35µl DEPC-Wasser angesetzt. Davon wurden 2µl zu 2µl DNA, 4µl 5x Puffer, 1µl RNase-Inhibitor, 10,3µl DEPC-Wasser und 0,7µl T7 oder T3-Polymerase (Roche) gegeben. Die *in-vitro*-Transkription wurde 2 Stunden bei 37°C inkubiert, anschließend auf 100µl aufgefüllt und die noch enthaltene DNA mit 2µl DNase verdaut (15 min, 37°C, Promega). Die RNA-Sonden wurden dann bei 70°C denaturiert und im Agarose-Gel (TBE-Puffer) analysiert. Die Hydrolyse der Sonden in 200-300 Nukleotid-lange Fragmente erfolgte durch Zugabe von 60µl DEPC-Wasser und je 20µl 0,4M NaHCO₃ und 0,6M Na₂HCO₃ bei 60°C im Wasserbad.

Die Dauer der Inkubation richtete sich nach der Länge der Sonden:

$t \text{ (min)} = \frac{L_0 - L_f}{k \times L_0 \times L_f}$	$k = 0,11 \text{ Schnitte pro Kilobase (kb) pro Minute}$ $L_0 = \text{Länge der Sonde in kb;}$ $L_f = \text{gewünschte Länge der Fragmente (200-300 nt)}$
---	---

Danach wurden 1,3µl Essigsäure, 6,6µl 3M NaAc, pH 5.2 und 2µl Hefe-tRNA (Sigma) zugegeben, mit 100% Ethanol präzipitiert (über Nacht bei -20°C, dann zentrifugieren), gewaschen und das Pellet in 100µl DEPC-Wasser aufgenommen. Um die freien Nukleotide zu entfernen wurden die Sonden anschließend in *G25 MicroSpin*-Säulen (Amersham) gereinigt und im Gel analysiert.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient zur Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts. Die Gele wurden im *Mini-Protean II oder III* – System (Biorad) gegossen, wobei die Trenngele 6-15% Polyacrylamid (Sambrook et al., 1989) enthielten. Die Proben wurden mit 5x Laemmli-Puffer versetzt, bei 95°C für 5 Minuten denaturiert und bei einer Spannung von 120-180 Volt im Gel aufgetrennt. Als Marker dienten der *Full Range Rainbow Marker* (Amersham) bzw. der *Precision Plus Protein Standard* (Biorad). Um sehr kleine Proteine (5-15kDa) nachzuweisen, wurden spezielle Tricin-Gele hergestellt (Schägger und Jagow, 1987).

2.3.2 Proteinnachweis im Western Blot

In der SDS-PAGE aufgetrennte Proteine können zum Nachweis mit spezifischen Antikörpern im Western Blot auf Nitrocellulose-Membranen (*Protan*, Schleicher und Schuell) transferiert werden. Hierzu wurden Gele, Membranen und *Whatman*-Papiere (Schleicher und Schuell) kurz im Transfer-Puffer äquilibriert und nach Herstellerangaben zusammengesetzt (*Mini-Trans-Blot* Apparat, *Wet Blot*, Biorad). Der Transfer erfolgte dann bei 100 Volt im Transfer-Puffer für eine Stunde. Danach wurde die Membran in 5% Milchpulver (Töpfer) in TBS-T für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C geblockt. Die Inkubation mit dem Primär-Antikörper erfolgte ebenfalls in dieser Blockier-Lösung für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C.

Danach wurde die Membran mindestens dreimal mit TBS-T gewaschen (je 5-15 min) und für eine Stunde mit dem HRP-gekoppelten (*Horse Radish Peroxidase*) Sekundär-Antikörper in TBS-T inkubiert. Nach dreimaligem Waschen konnte der Western Blot dann mit Hilfe des ECL-Reagenz (*Enhanced Chemiluminescence*, Amersham) nach Herstellerangaben entwickelt werden, wobei die Detektion durch Belichtung von Röntgenfilmen erfolgte (*Cronex5 Medical X-Ray*, Agfa).

2.3.3 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen, Proteinbestimmung und Coomassie-Färbung

Um polyklonale Antikörper gegen mRFP und das ACG-uORF-Peptid in Kaninchen herzustellen (Firma Biogenes) musste die gewünschte Sequenz als Glutathion-S-Transferase(GST)-Fusionsprotein aus transformierten Bakterien aufgereinigt werden. Hierzu wurde aus einer 5ml Vorkultur (37°C, über Nacht) eine 200ml Kultur angeimpft (jeweils LB + 100µg/ml Ampicillin) und diese bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 37°C wachsen gelassen. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG für 2 Stunden bei 37°C. Die Kultur wurde anschließend zentrifugiert (5.000rpm, GSA Sorvall A6.14, 15 min, 4°C), das Pellet in 10ml kaltem STE aufgenommen, nochmals zentrifugiert und wieder in 10ml STE resuspendiert. Nach Zugabe von 100µl Lysozym (10 mg/ml) und Protease-Inhibitoren (10 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin, 100 µM PMSF) wurde 20 Minuten auf Eis inkubiert, über Nacht bei -20°C eingefroren und nach dem Auftauen gegebenenfalls 5x 5 Sekunden mit Ultraschall behandelt. Danach wurde die Lösung mit 2 ml Triton X-100 (aus 10% in PBS) versetzt, 20 Minuten auf Eis inkubiert und zentrifugiert (16.000rpm, Corex Sorvall A8.24, 25 min, 4°C). Der Überstand wurde dann zu 1-2ml Glutathion-Sepharose (vorher 2x mit STE waschen, 500g, 5 min) gegeben und für 30 Minuten oder über Nacht bei 4°C auf dem Rotator inkubiert. Die Sepharose konnte nach 3-5 Waschschritten (mit je 10ml STE, 500g, 5 min) auf eine Säule gegeben und das GST-Fusionsprotein mit 4x 0,5ml Elutionspuffer von der Sepharose gelöst werden.

Die Proteinkonzentration wurde dann durch den Bradford-Test bestimmt. Als Vergleich diente eine BSA-Standardreihe von 0,5-8µg/20µl Wasser. Die Probe selbst wurde ebenfalls in 20µl Wasser verdünnt und wie der Standard mit 180µl Bradford-Reagenz versetzt. Nach 5 Minuten erfolgte die Extinktionsmessung bei 620nm im *ELISA-Reader* und die Auswertung anhand der Standardkurve im Programm Excel (Microsoft).

Die Größe des Proteins wurde in der SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung überprüft. Hierzu wurde das Gel zunächst 20 Minuten in Coomassie-Lösung gefärbt und dann mit Entfärbelösung gewaschen.

2.3.4 Aufreinigung von Proteinen durch GKAP-Sepharose und Proteinsequenzierung

Um ein durch einen *upstream Open Reading Frame* der Shank1 5'UTR kodiertes Protein mittels Proteinsequenzierung analysieren zu können, wurde diese Sequenz in einen Vektor kloniert, der für die Shank1 PDZ-Domäne kodiert. Diese Domäne bindet spezifisch an ein Peptid der letzten 10 Aminosäuren des PSD-Proteins GKAP/SAPAP1 aus der Ratte (Sequenz: IYIPEAQTRL; Brendel et al., 2004). Dieses Peptid (3mg in NHS-Kopplungspuffer) wurde kovalent nach Angaben des Herstellers an 1 ml aktivierte NHS-Sepharose (*4 Fast Flow*, Amersham) gebunden. Mit dem PDZ-Konstrukt transfizierte HEK-Zellen (zehn 10cm-Schalen) wurden in je 1ml RIPA-Puffer (+ Protease-Inhibitoren) geerntet und 5 Minuten bei 14.000g zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt und auf 50-150µl GKAP-Sepharose gegeben und 2 Stunden oder über Nacht bei 4°C auf dem Rotator inkubiert. Danach wurde 3-5 mal mit RIPA gewaschen, 5x Laemmli-Puffer zugegeben und bei 95°C gekocht um das PDZ-Protein von der GKAP-Sepharose zu lösen. Nach Zentrifugation (13.000g, 5 min) wurde der Überstand dann vollständig auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die gewünschte Bande konnte nach der Coomassie-Färbung ausgeschnitten, eingefroren und zur Sequenzierung in ein Service-Labor gegeben werden (Friedrich Buck, UKE Hamburg). Hierbei wurde die Probe im Gel mit Trypsin verdaut (Shevchenko et al., 1996) und extrahierte Peptide über *ZipTip*-Säulen (Millipore) gereinigt, aufkonzentriert und mit dem *ESI-Qtof2*-Massenspektrometer (Micromass) analysiert.

2.3.5 Aufreinigung polyklonaler Antikörper aus Serum

Etwa 500µg des für die Antikörper-Herstellung verwendeten GST-Fusionsproteins wurde unter Verwendung einer durchgehenden Geltasche mittels SDS-PAGE und Western Blot auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert.

Die Membran wurde mittels Ponceau S (0,2% in 3% Trichloressigsäure / 3% Sulfosalicylsäure) gefärbt, die GST-Fusionsprotein-Bande ausgeschnitten und mit Wasser entfärbt. Nach dem Blocken der Membran mit 3% BSA in PBS für eine Stunde, wurde 1ml des hitzeinaktivierten Antiserums in 10ml 3% BSA in PBS verdünnt und die Membran damit für 2 Stunden oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Es folgten 2 Waschschriffe mit 150 mM NaCl für 10 Minuten, sowie dreimaliges Waschen mit PBS für 5 Minuten. Die gereinigten Antikörper konnten dann mit 1ml Elutionspuffer in 10 Minuten von der Membran gelöst werden, wobei der Elutionspuffer dann sofort mit 0,2ml 2 M Tris/HCl, pH 8.0 neutralisiert wurde. Die Antikörper wurden anschließend mittels Dialyse in PBS umgepuffert.

2.3.6 *Dual-Luciferase*-Bestimmungen

Die *Dual-Luciferase*-Konstrukte wurden in HEK-Zellen oder Neuronen transfiziert und 24 Stunden exprimiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Lumineszenz der *Photinus*- und *Renilla*-Luciferase bestimmt. Alle Puffer und Reagenzien stammten dabei aus dem *Dual Luciferase Assay System* (Promega) und wurden den Herstellerangaben entsprechend verwendet.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Kultivierung und Transfektion von HEK-Zellen

Die humane, embryonale Nierenzelllinie HEK293 wurde in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Lonza) und 10% FCS (fötales Kälberserum, PAA) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen mit Versene-Puffer gewaschen und nach Zugabe von 0,5ml/10cm Schale Trypsin (0,25% in Versene) 5 Minuten im Inkubator von der Schale abgelöst. Das Trypsin wurde durch Zugabe von 10ml DMEM inaktiviert, die Zellen resuspendiert und je nach Anwendung 1:4 - 1:10 verdünnt wieder ausplattiert. Die Zellen wurden so alle 3-4 Tage passagiert. Die transiente Transfektion der HEK-Zellen erfolgte mit FuGENE 6 oder FuGENE-HD (Roche) nach Herstellerangaben.

2.4.2 Kultivierung und Transfektion primärer Neurone

Hippokampus- und Cortex-Neurone wurden aus 18-20 Tage alten Rattenembryonen präpariert. Dabei wurden zunächst die Hippokampi aus den kortikalen Hemisphären isoliert. Diese wurden dann in 1x HBSS/100µg/ml Penicillin-Streptomycin (*Hanks Balanced Salt Solution*, Gibco) gesammelt, ebenso wie die sauber präparierten Cortex-Hälften (ohne Häute). Alle Angaben gelten für 12 Gehirne, also 24 Hippokampi und Cortices.

Hippokampus: Zu 4,5ml HBSS mit den Hippokampi wurden 0,5ml Trypsin (2,5%) gegeben und 15 Minuten bei 37°C im dicht verschlossenen Gefäß leicht schwenkend inkubiert. Danach wurde dreimal je 5 Minuten mit insgesamt 50ml Ausplattier-Medium: MEM mit 10% Pferdeserum (PAA) und 0,6% Glucose gewaschen, wobei die zusammenhängenden Hippokampi jeweils abgesaugt und in ein neues Gefäß überführt wurden. Danach erfolgte die Trituration in 3ml Medium mit einer normalen und anschließend einer verengten feuerpolierten, gestopften Glaspasteurpipette (je 15mal pipettieren). Nach dem Auffüllen auf 14ml Ausplattiermedium wurden die Neuronen gezählt (Neubauer-Zählkammer) und in einer Dichte von $1,5 - 2 \times 10^6$ Zellen pro ml ausplattiert. Dafür wurden 18mm Deckgläschen (Assistent, 2x in 100% Ethanol gewaschen, 1x in tridestilliertem Wasser und 4 Stunden bei 180°C gebacken) verwendet. Diese Deckgläschen wurden vor dem Ausplattieren mit Poly-L-Lysin (1 mg/ml in Borat-Puffer) beschichtet und dreimal mit tridestilliertem Wasser gewaschen.

Cortex: Die Cortex-Hälften wurden zerkleinert und 30 Minuten mit 0,25% Trypsin in 25ml HBSS bei 37°C geschüttelt. Danach wurde dreimal 5 Minuten mit je 50ml Ausplattier-Medium gewaschen, das Gewebe dann in 20ml Medium mit der 10ml-Pipette grob zerkleinert und anschließend in 5ml-Aliquots, wie oben beschrieben, trituiert. Die Lösung wurde dann vorsichtig durch eine Nylongaze gefiltert (*Cellstrainer*, 40µm, Falcon) und die Zellzahl bestimmt. Etwa $3 - 10 \times 10^6$ Neurone pro ml wurden auf Poly-L-Lysin beschichtete Platten gegeben.

Nach dem Absetzen der Neurone (2-4 Stunden) wurde das Ausplattiermedium gegen Neurobasal-Medium ausgetauscht. Dies enthielt 1x B-27 *Supplement* (Gibco), 0,5 mM L-Glutamin und 25 µM Glutamat. Der erste Mediumwechsel erfolgte 3-4 Tage nach der Präparation, dabei wurde die Hälfte des Neurobasal-Mediums ausgetauscht. Dieses enthielt B-27, L-Glutamin und 7µM AraC (Sigma), welches Wachstum, Zellteilung und somit die Ausbreitung von Fibroblasten hemmt. Ein weiterer Mediumwechsel mit Neurobasal/B-27/L-Glutamin erfolgte mit der Transfektion an Tag 7 oder bei nicht transfizierten Kulturen an Tag 9.

Transfektion: Die Transfektion der Neurone erfolgte an Tag 7 in Kultur mittels Calciumphosphat-Präzipitation. Zur Transfektion von 2 *wells* (12 *well* – Platte, Nunc) wurden 0,5-5µg Plasmid-DNA mit tridestilliertem Wasser auf 90µl aufgefüllt und dann 10µl 2,5 M CaCl₂ zugegeben. Anschließend wurden 100µl 2x BBS (pH 6,96) unter ständigem Mischen (Vortex) langsam zugetropft. Nach 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden je 100µl Präzipitat auf die Zellen getropft und das Neurobasal-Medium nach 3 Stunden und drei Waschschritten mit 1x HBSS, gewechselt.

2.4.3 Stimulierung von Zellkulturen und Herstellung von Zelllysaten

Tabelle 2.4 zeigt alle genutzten Zellgifte und stimulierenden oder inhibierenden Reagenzien, sowie die eingesetzten Mengen und Inkubationszeiten. Alle Chemikalien waren dabei in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst.

Tab. 2.4: Übersicht verwendeter Zellgifte und stimulierender/inhibierender Reagenzien.

Name der Reagenz	Konzentration	Inkubationszeit
Colcemid	10 µg/ml	30 Minuten
CytochalasinD	5 µg/ml	2-4 Stunden
Natrium-Arsenit	50 µM	Über Nacht
Nocodazol	6 µg/ml	4 Stunden
Thapsigargin	1 µM	Über Nacht
Vinblastin	5 µM	3 Stunden
Vincristin	3 µM	5 Stunden

Für mikroskopische Untersuchungen wurden die Zellen anschließend fixiert und immunocytochemisch gefärbt (siehe 2.4.4 und 2.4.5).

Für biochemische Analysen erfolgte nach dem Waschen mit PBS die Lyse der Zellen auf Eis mit RIPA-Puffer (+ Protease-Inhibitoren; 100µl für ein *well* einer 12*well*-Schale, 1ml für eine 10cm-Schale) für 15 Minuten. Das Zelllysate wurde für 10 Minuten bei 13.000g und 4°C zentrifugiert und der Überstand mit 5x Laemmli-Puffer versetzt, bei 95°C gekocht sowie in SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

2.4.4 Fixierung, Permeabilisierung und immunocytochemische Färbung von kultivierten Neuronen

Zum mikroskopischen Nachweis von Proteinen in Neuronen wurden diese zunächst mit PBS gewaschen und mit 4% Paraformaldehyd in PBS (w/v) für 20 Minuten fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit 0,2% Triton X-100 in PBS (v/v) für 2 Minuten. Anschließend wurden die Neurone mit PBS gründlich gewaschen und mit 2% Pferdeserum/PBS 2 Stunden blockiert. Die Inkubation mit dem Primär-Antikörper erfolgte ebenfalls verdünnt in 2% Pferdeserum / PBS für 2-4 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Nach dem Waschen mit PBS (3x 10 Minuten) wurde der Sekundär-Antikörper in 2% Pferdeserum/PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur zugegeben, erneut gewaschen und die Deckgläschen dann in Permafluor (Beckman Coulter) eingebettet.

2.4.5 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung kultivierter Neurone mit spezifischen RNA-Sonden und damit kombinierte Immunocytochemie (FISH/ICC)

Alle Lösungen wurden RNase-frei und in DEPC-Wasser angesetzt. Für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung wurden die Neurone zunächst mit PBS/4% Saccharose gewaschen, dann für 20 Minuten fixiert (4% PFA, 4% Saccharose, 5 mM EGTA, 2 mM MgCl₂ in PBS), wieder gewaschen und mit 0,2% Triton in PBS 2 Minuten permeabilisiert. Danach wurden die Neurone dreimal mit 2 mM MgCl₂ in PBS gewaschen, getrocknet (etwa 30 Minuten auf Zellstoff) und bei -80°C bis zu ihrer Verwendung eingefroren.

Tab. 2.5: Zusammensetzung der Prähybridisierungs- und Hybridisierungslösung

Lösung	Stock	Endkonzentration	Menge für ein Deckglas (Prä- + Hybridisierungslsg)
Formamid(deionisiert)	100%	50%	50µl
SSC	20x	5x	25µl
Denhardt's Lösung	100x	5x	5µl
SDS	10%	0,2%	2µl
Heparin	50 µg/µl	50 µg/ml	0,1µl
tRNA (Hefe)	10 µg/µl	250 µg/ml	2,5µl

Die Prä-/Hybridisierungslösung wurde wie in Tabelle 2.5 dargestellt angesetzt. Die Lösung wurde dann in zwei Gefäße verteilt (je 42,3µl).

Für die Prähybridisierung wurden zuvor 5,2µl DEPC-Wasser mit 2,5µl Hering-Sperma DNA (5 µg/µl, Sigma) für 5 Minuten aufgekocht, gleich auf Eis abgekühlt und in das erste Gefäß gegeben (insgesamt dann 50µl pro 18mm Deckglas). In der gleichen Weise wurden DEPC-Wasser, Hering-Sperma DNA und die Digoxigenin-markierte RNA-Sonde (siehe auch 2.2.9, 200-400 ng/ml bzw. 1:200 verdünnt, die genaue Menge musste für jede Sonde empirisch bestimmt werden) aufgekocht, auf Eis gelagert und später für die Hybridisierung in das zweite Gefäß gegeben. Die Prähybridisierung erfolgte für 2 Stunden bei 50°C in einer feuchten Kammer (50% Formamid), wobei die Deckgläschen umgedreht in einen Tropfen (50µl) der Lösung auf mit Parafilm beschichteten Objektträgern (Marienfeld) gelegt wurden. Auf die gleiche Weise wurden die Deckgläschen dann in die Hybridisierungslösung mit der spezifischen Sonde gegeben und über Nacht bei 50°C inkubiert. Danach erfolgten je 2 Waschschritte mit 1x SSC/0,1% SDS (je 5 min); 0,2x SSC/0,1% SDS (je 10 min bei 50°C) und 100 mM Tris, pH 7.5/150 mM NaCl (= Puffer 1, je 5 min). Anschließend wurden die Deckgläschen 1-2 Stunden mit 1% Blockier-Reagenz (Roche, in Puffer 1) inkubiert. Die Inkubation mit den Primär-Antikörpern (Anti-DIG-Cy3, kombiniert mit weiteren gewünschten Antikörpern) erfolgte ebenfalls in Blockier-Reagenz für 4 Stunden bei Raumtemperatur. Nach dem Waschen mit Puffer 1 wurden auch die Sekundär-Antikörper in Blockier-Reagenz verdünnt, für eine Stunde zugegeben, wiederum mit Puffer 1 gewaschen und in Permafluor eingebettet.

2.4.6 Mikroskopie, *Time-lapse*-Analysen und statistische Auswertung

Die Analyse der immuncytochemisch gefärbten Zellen erfolgte am *Axiocvert135* – Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss) mit dem Programm *OpenLab 2.2.5* (Improvision). Für konfokale Aufnahmen wurde ein *Laserscan*-Mikroskop (Leica, ZMNH, Hamburg) und das Programm *LSM 3.96* verwendet. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte mit *PaintShopPro* (Corel).

Die *Time-lapse*-Aufnahmen wurden mit dem *Axiocvert200* (Zeiss) und dem Programm *MetaVue 6.2r6* (Universal Imaging) durchgeführt. Die Neuronen wurden hierfür auf spezielle Schalen mit eingelassenem Deckglas (MatTek, Ashland USA) plattiert und das Medium für die Aufnahmen durch vorgewärmten, physiologischen HEPES-Puffer ersetzt. Filme wurden durch Bearbeitung der Einzelbilder im Programm *iMovie* (Apple) erhalten.

Für statistische Auswertungen wurden in dieser Arbeit Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte nach dem *Student's t-test* mit Excel (Microsoft) berechnet.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur dendritischen Lokalisation der Shank1 mRNA in kultivierten Hippokampus-Neuronen

3.1.1 Nachweis der dendritischen Lokalisation der endogenen Shank1 mRNA und Einfluss der 3'UTR

Ein Ziel dieser Arbeit war es die Lokalisation von Shank1 mRNA-Granula und die Regulation ihres Transports in kultivierten Neuronen zu untersuchen. Dabei wurde sowohl ein System für die Untersuchung des mRNA-Transports in lebenden Zellen etabliert, als auch Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen fixierter Hippokampus-Neurone durchgeführt. Außerdem wurde der Einfluss möglicher interagierender Proteine auf die mRNA-Lokalisation betrachtet.

Eine dendritische Lokalisation der Shank1 mRNA konnte erstmals mit Hilfe von *in-situ*-Hybridisierungen an Gehirnschnitten aus *Rattus norvegicus* nachgewiesen werden. Diese dendritische mRNA-Lokalisation wird von der Shank1 3'UTR vermittelt (Böckers et al., 2004). Die 3'UTR in *Rattus norvegicus* umfasst 2350 Nukleotide (nt) und weist innerhalb der ersten 200 und der letzten 488 nt eine hohe Übereinstimmung mit der humanen Sequenz auf. Die dazwischen liegenden Nukleotide sind in der humanen Sequenz wenig konserviert und können als Intron herausgespleißt werden. Transfektion verschiedener Reporter-mRNAs und anschließende *in-situ*-Hybridisierung in kultivierten Neuronen führte zur Identifizierung eines *dendritic targeting elements* = DTE innerhalb der ersten 200 nt der Shank1-3'UTR (Segger-Junius, Dissertation 2003).

Die dendritische Lokalisation der endogenen Shank1 mRNA wurde bisher nur in Hirnschnitten gezeigt und zur weiteren Betrachtung mit transfizierten Reporter-Konstrukten gearbeitet. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst untersucht, ob die mRNA in kultivierten Hippokampus-Neuronen auch endogen dendritisch lokalisiert ist. Hierzu wurde ein Gemisch DIG-markierter RNA-Sonden hergestellt, die alle Bereiche der Shank1 mRNA überlappend abdecken.

Diese Sonden wurden anschließend von Cy3-gekoppelten Antikörpern erkannt und gefärbt. Ab dem 8. Tag nach dem Ausplattieren der Zellen (*div8 = days in vitro*) konnten mRNA-Granula in distalen Dendriten gefunden werden. Die Anzahl der cytoplasmatisch und dendritisch lokalisierten Shank1 mRNA-Granula nimmt bis *div21* stark zu. In Abbildung 3.1 sind exemplarisch Neuronen nach 5, 8, 14 oder 21 Tagen in Kultur dargestellt. Als Marker für Dendriten wurde das Mikrotubuli-assoziierte Protein MAP2 verwendet, welches in kombinierten Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen und Immuncytochemie-Experimenten (FISH/ICC) mit der Shank1 mRNA gleichzeitig gefärbt werden konnte. Im Gegensatz zur Kontrolle (*Sense*-Sonde, Abb. 3.1, Bild E) zeigte nur die spezifische Shank1-Sonde (Abb. 3.1, Bild A-D) Transportkomplexe in Cytoplasma und Dendriten.

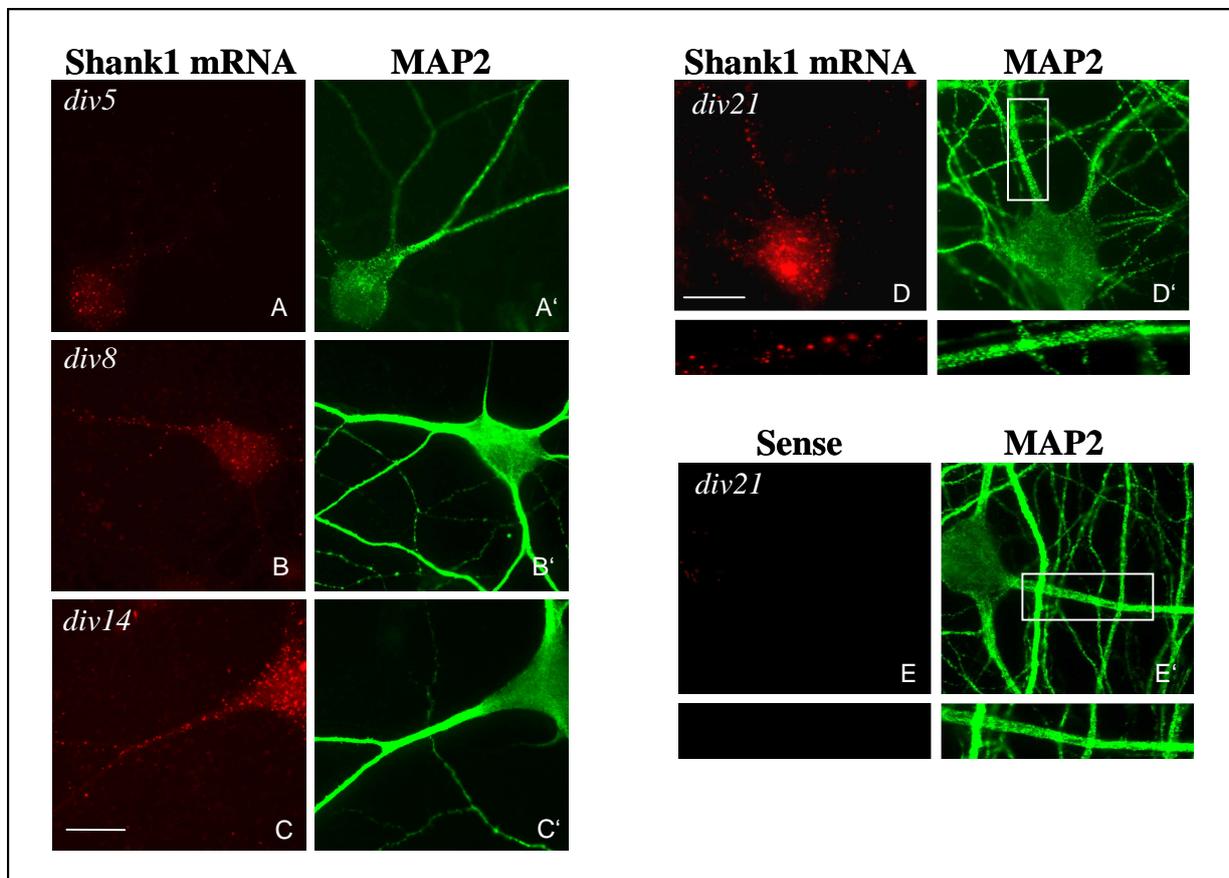


Abb. 3.1: Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen (FISH) zeigen, dass die endogene Shank1 mRNA in kultivierten Neuronen dendritisch lokalisiert ist.

Gezeigt sind fixierte hippocampale Neurone an *div5, 8, 14* und *21* (*div = days in vitro*) nach Färbung mit kombinierter FISH/ICC. Eine Shank1-spezifische DIG-markierte RNA-Sonde wurde zum Nachweis der endogenen mRNA verwendet (FISH, Bild A-D; rot). Die *Sense*-Sonde diente als Kontrolle und zeigte keine unspezifischen Signale in Dendriten (E). Die Sonden wurden mittels Cy3-gekoppeltem DIG-Antikörper gefärbt (Bild A-E; rot). Als dendritischer Marker wurde außerdem MAP2 immuncytochemisch nachgewiesen (ICC, A'-E'; grün). Deutlich wird, dass erst ab *div8* Granula in distalen Dendriten nachgewiesen werden können, wobei deren Zahl bis *div21* stark zunimmt. (Balken = 20µm).

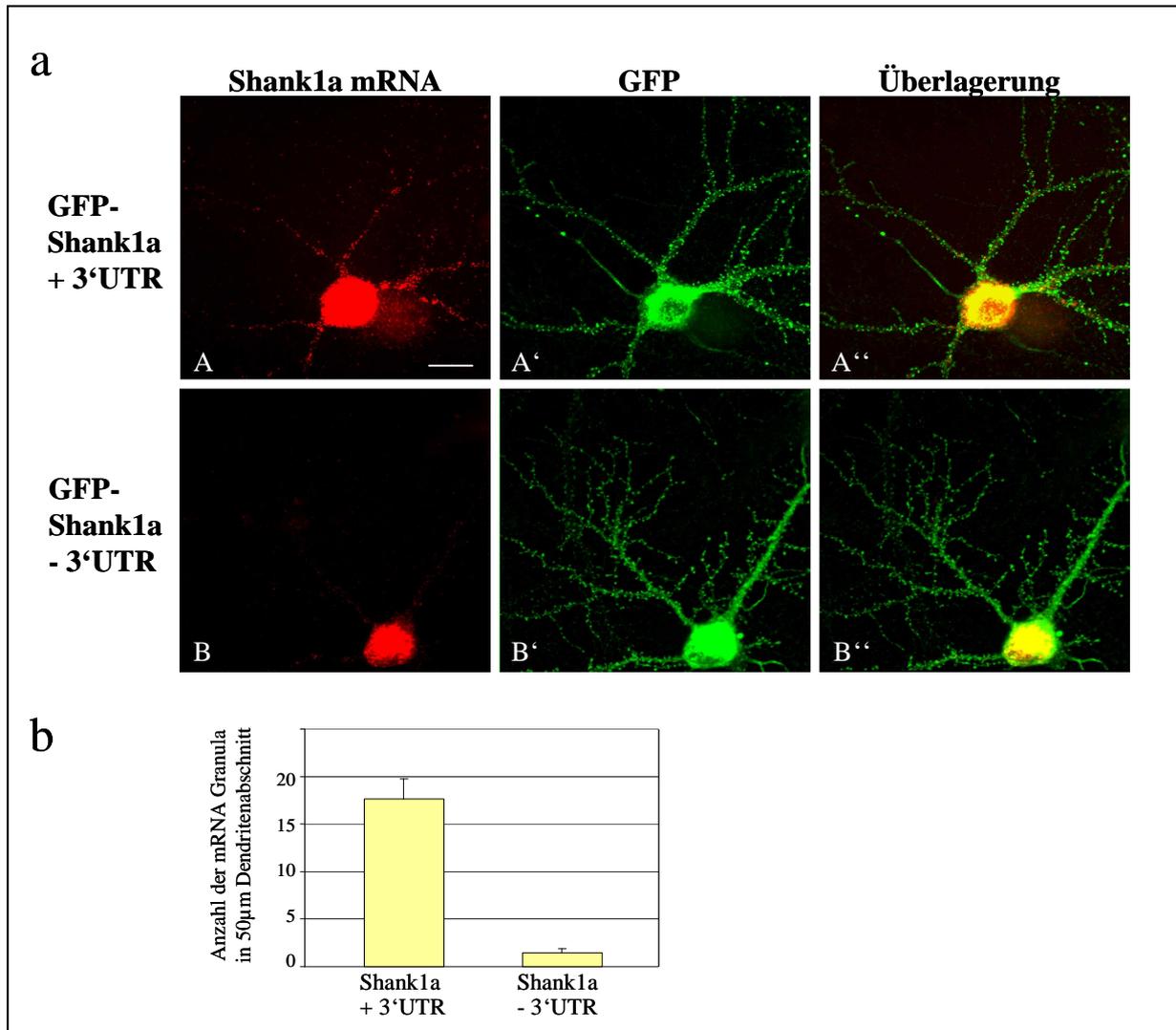


Abb. 3.2: Die Shank1-3'UTR vermittelt die dendritische Lokalisation der Shank1 mRNA.

a: Kultivierte Hippokampus-Neurone wurden mit GFP-Shank1a-Konstrukten (mit 3'UTR = Bild A-A'' oder ohne 3'UTR = Bild B-B'') transfiziert, an *div14* fixiert und mittels kombinierter FISH/ICC gefärbt. Dabei wurden DIG-markierte GFP-spezifische Sonden verwendet (A,B; rot) und gleichzeitig das GFP-Protein gefärbt (A',B'; grün). (Balken = 20µm) **b:** Statistische Auswertung der mRNA-Transporteffizienz: Es wurden 30 Neurone aus mindestens 3 Experimenten fotografiert und die Anzahl der mRNA-Granula in einem distalen 50µm-Abschnitt des Dendriten bestimmt (distal = mindestens einen Zellkörperdurchmesser vom Soma entfernt). Bei vorhandener 3'UTR gibt es durchschnittlich 17, ohne 3'UTR nur 2 mRNA-Granula im 50µm Dendritenabschnitt ($p < 0,002$).

Abbildung 3.2 zeigt den Einfluss der Shank1-3'UTR auf den dendritischen Transport einer für GFP-Shank1a kodierenden mRNA. Die Proteine Shank1a und b sind Spleißvarianten, welche sich im C-Terminus unterscheiden. Shank1a enthält im Gegensatz zu Shank1b die komplette SAM-Domäne. Die Shank1a-Plasmide wurden von Carlo Sala (Institute of Neuroscience, Mailand) zur Verfügung gestellt, in Hippokampus-Neurone transfiziert und diese mittels kombinierter FISH/ICC gefärbt (spezifische DIG-Sonden für die GFP-mRNA in Kombination mit GFP-Antikörpern). Die GFP-Shank1a mRNA kann nur dann in distalen Bereichen der Dendriten nachgewiesen werden, wenn die 3'UTR vorhanden ist (Abb. 3.2a; Bild A).

In Abbildung 3.2b ist die statistische Auswertung zur mRNA-Transporteffizienz mit und ohne 3'UTR graphisch dargestellt (je 30 Neurone aus 3 Experimenten, Anzahl der mRNA-Granula in einem distalen 50µm umfassenden Dendritenabschnitt). Im Gegensatz zur unterschiedlichen Lokalisation der Transkripte (Abb. 3.2a, Bild A und B) scheint die synaptische Lokalisation und somatodendritische Verteilung des GFP-Shank1a-Proteins (Bild A' und B') in den Neuronen jedoch nicht verändert.

Für die nachfolgenden Untersuchungen des mRNA-Transports wurden, trotz der Möglichkeit die endogene Shank1 mRNA zu färben, meist Reporter-Konstrukte mit der Shank1 3'UTR verwendet. Grund hierfür ist die vergleichsweise schwache Färbung der endogenen mRNA in Dendriten, die sehr schnell ausbleicht und bei gleichzeitiger Überexpression anderer Proteine (siehe Abschnitt 3.1.3) mittels *in-situ*-Hybridisierung kaum noch sichtbar ist. Außerdem ermöglichten diese Reporter-Konstrukte im Gegensatz zur endogenen Färbung auch die Visualisierung des mRNA-Transports in lebenden Neuronen (Abschnitt 3.1.2).

3.1.2 Darstellung des Shank1 mRNA-Transports in lebenden Neuronen

3.1.2.1 Die Methode: Das GFP-MS2-System

Die Visualisierung von mRNA in Zellen mittels *in-situ*-Hybridisierung erlaubt nur die Untersuchung der Lokalisation nicht aber der Dynamik des mRNA-Transports. Daher wurde für die Betrachtung der Shank1 mRNA-Granula in lebenden Neuronen das sogenannte GFP-MS2/Bakteriophagen-System etabliert (Abb. 3.3). Dieses wurde erstmals in Hefen verwendet (Bertrand et al., 1998) und zum Beispiel auch zur Darstellung des 3'UTR-abhängigen Transports der CaMKII α mRNA in Neuronen genutzt (Rook et al., 2000).

Ein aus dem MS2-Bakteriophagen stammendes Strukturprotein wurde in diesem System so manipuliert, dass keine Phagen-*Capsid*-Struktur mehr gebildet werden kann. Es bindet mit hoher Affinität an die ebenfalls aus diesem Phagen stammenden MS2-RNA-Loops. An das MS2-Protein wurde zur Detektion N-terminal GFP fusioniert und außerdem am C-Terminus eine starke Kernlokalisationssequenz angefügt, so dass nicht an die RNA gebundenes GFP-MS2-Protein im Zellkern zurückgehalten wird. Dieses und ein für die MS2-RNA-*Loops* kodierendes Plasmid wurden von Kenneth S. Kosik (Harvard Medical School, Boston) bzw. Robert H. Singer (Albert Einstein College, NY) zur Verfügung gestellt. Jeder von einem GFP-MS2-Protein-Dimer mit hoher Affinität gebundener RNA-*Loop* besteht aus 19 Nukleotiden.

Zur Signalverstärkung wurden 8 Wiederholungen dieser MS2-Bindestelle an das Reporter-gen mRFP (monomeres rot fluoreszierendes Protein) kloniert. Stromabwärts wurde die Shank1-3'UTR eingefügt, so dass eine indirekt von GFP erkannte Fusions-mRNA entsteht, die entlang der Dendriten transportiert wird.

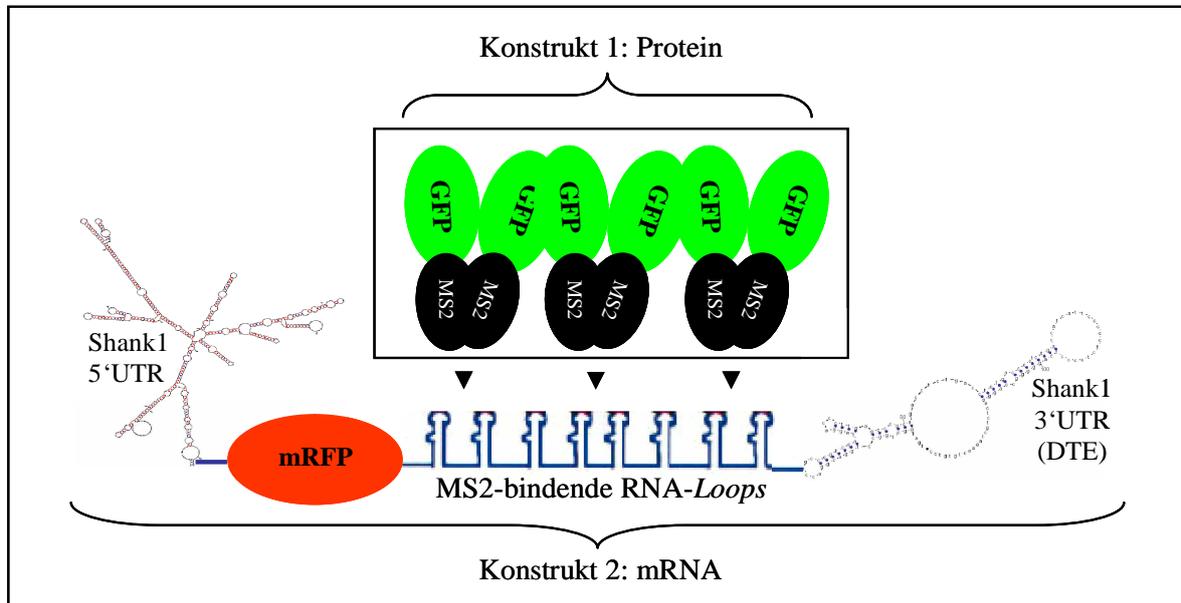


Abb. 3.3: Schematische Darstellung des GFP-MS2-Systems zur Visualisierung des mRNA-Transports in lebenden Zellen.

In diesem *Live-Imaging*-System wird eine Fusions-Reporter-mRNA von einem fluoreszierenden Fusions-Protein erkannt. Das mRNA-Konstrukt besteht aus der kodierenden Region für mRFP, den MS2-RNA-Loops und der Shank1 3'UTR. Die MS2-RNA-Loops werden spezifisch vom MS2-Protein gebunden, welches an GFP fusioniert ist, so dass nach Kotransfektion beider Konstrukte die mRNA indirekt grün fluoreszierend beobachtet werden kann. Die Shank1-5'UTR ist an mRFP fusioniert um die Translation der Reporter-mRNA zu kontrollieren.

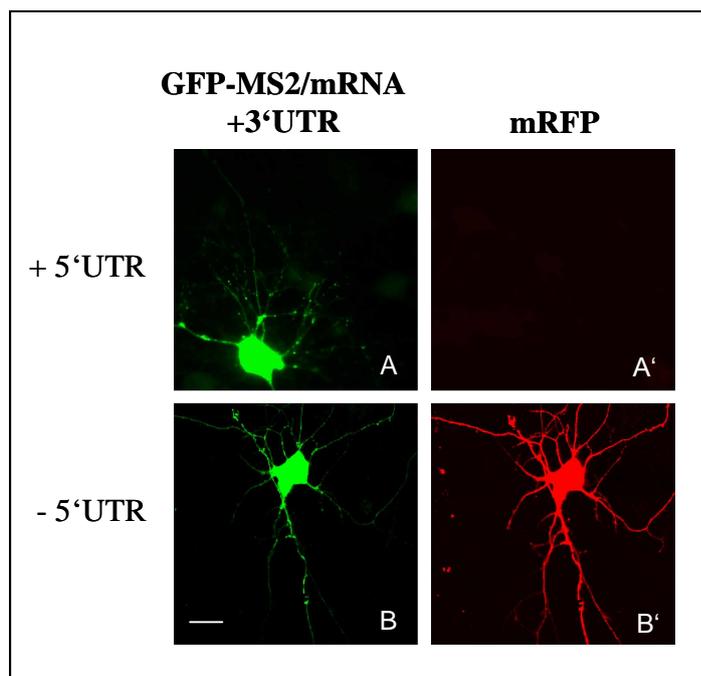


Abb. 3.4: Die Shank1-5'UTR inhibiert die mRFP - Expression vollständig ohne die Lokalisation der mRNA zu beeinflussen.

Das GFP-MS2- und die mRFP-MS2-RNA-Loop-3'UTR-Konstrukte wurden in *div7* Neurone kotransfiziert und 24h später fixiert. Deutlich wird, dass die Shank1 5'UTR die Translation der Reporter-mRNA vollständig inhibiert und keine rote Fluoreszenz mehr nachgewiesen werden kann (A'). Die Lokalisation der mRFP-mRNA konnte durch das gebundene GFP-MS2-Protein nachgewiesen werden (siehe auch Abb. 3.3). Die 5'UTR scheint dabei keinen Einfluss auf die durch die Shank1-3'UTR vermittelte mRNA-Lokalisation in distalen Dendriten zu haben (A,B). (Balken = 20µm)

Ursprünglich wurde mRFP als Reporter gewählt um auch die 5'UTR-abhängige lokale Translation (siehe auch Abschnitt 3.2) der Shank1 mRNA im *Live-Imaging* untersuchen zu können. Versuche hierzu waren aufgrund zu geringer Sensitivität und starkem Ausbleichen jedoch nicht erfolgreich. Abbildung 3.4 zeigt, dass die Shank1-5'UTR die Translation der mRFP mRNA vollständig inhibiert und somit keine rote Fluoreszenz nachweisbar ist. Dies ermöglichte für nachfolgende Versuche die rote Färbung der Reporter-mRNA (5'UTR-mRFP-(MS2-Loops)-3'UTR) mit DIG-markierten Sonden und Cy3-gekoppelten DIG-Antikörpern in kombinierten FISH/ICC-Analysen.

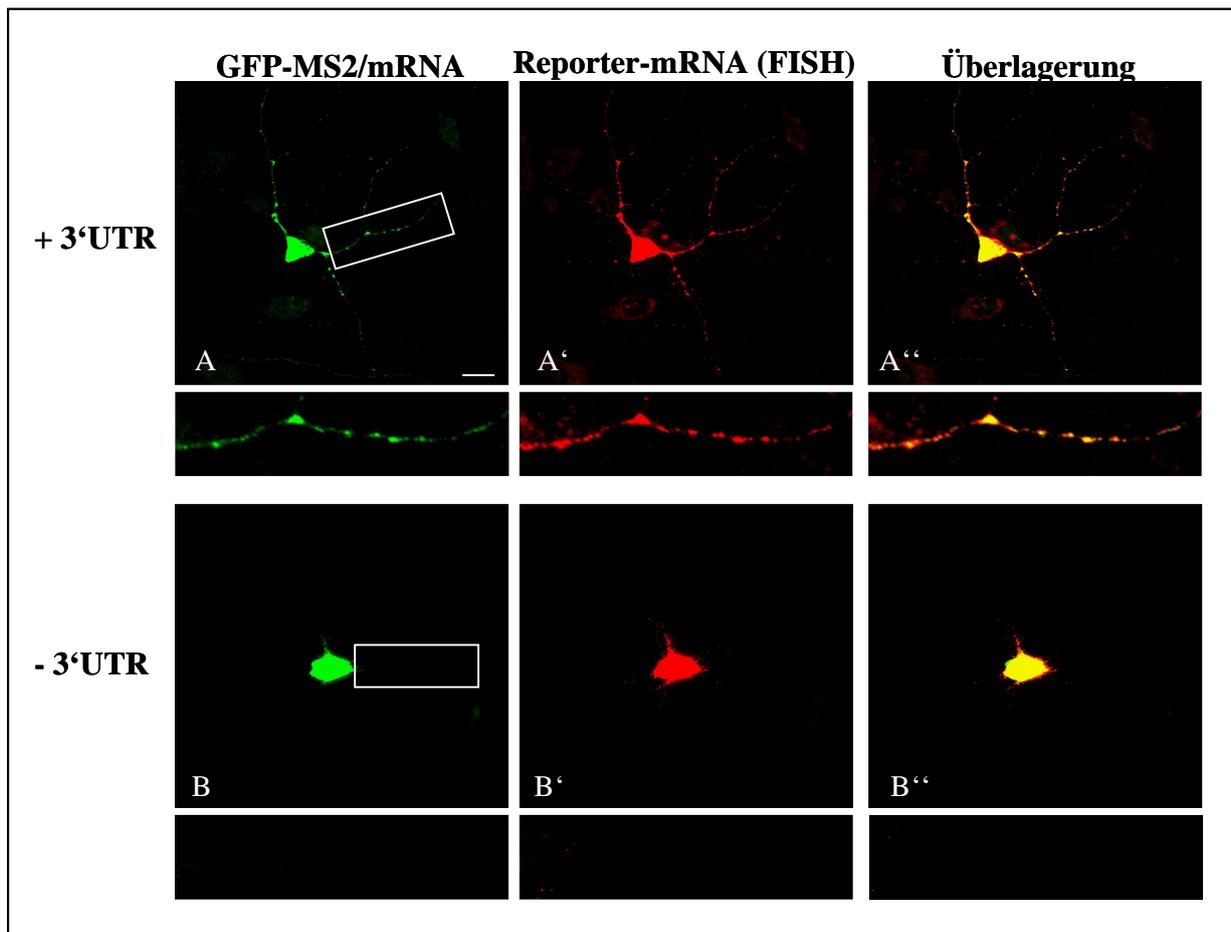


Abb. 3.5: Mit dem GFP-MS2-System und Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen werden dieselben Reporter-mRNA-Komplexe gefärbt.

Die Konstrukte (Abb. 3.3) wurden in Neurone transfiziert (*div7*) und 24h später fixiert. Die Reporter-mRNA wurde durch eine mRFP-spezifische DIG-markierte Sonde nachgewiesen, gefolgt von Cy3-gekoppelten DIG-Antikörpern (FISH; A',B'; rot). GFP-MS2 konnte mit GFP-Antikörpern nachgewiesen werden (ICC; A,B; grün). Die Überlagerung (A'',B'') zeigt, dass beide Methoden dieselben Strukturen erkennen, das GFP-MS2-Protein also die Reporter-mRNA spezifisch erkennt. Nur bei vorhandener 3'UTR erfolgt ein dendritischer mRNA-Transport (Bild A-A''). (Balken = 20µm)

Zunächst sollte verifiziert werden, dass GFP-MS2 tatsächlich die Reporter-mRNA spezifisch erkennt. Hierfür wurden, nach Transfektion beider Konstrukte und Fixierung der Zellen, *in-situ*-Hybridisierungen mit mRFP-spezifischen Sonden durchgeführt. Aus Abbildung 3.5 geht hervor, dass das GFP-MS2-Protein (Bild A,B) tatsächlich spezifisch die Fusions-mRNA erkennt, da Protein und mRNA exakt kolokalisiert vorliegen (Bild A'',B''). Außerdem gibt es mit beiden Methoden nur dann dendritisch lokalisierte Transportgranula, wenn die Shank1-3'UTR an die Reporter-mRNA fusioniert wurde (Vergleich Bild A,A' mit B,B').

Alle im Abschnitt 3.1 verwendeten Reporter-Konstrukte enthalten die Nukleotide 1-588 der Shank1-3'UTR aus *Rattus norvegicus*, da diese in vorherigen Versuchen die höchste Transporteffizienz aufwiesen (Böckers et al., 2004; Segger-Junius, Dissertation 2003). Zu Beginn dieser Arbeit lag die 3'UTR nur in Einzelfragmenten vor, die aus EST-Klonen (*Expressed Sequence Tags*) oder cDNA-basierten PCRs stammten. Diese Teilstücke wurden daher an überlappenden Stellen hybridisiert, mit PCR-Reaktionen verlängert oder durch vorhandene Restriktionsschnittstellen verbunden, so dass nun die 3'UTR zusammenhängend von Nukleotid 1-1980 vorhanden war. Alle Reporter-Konstrukte wurden daher auch mit dieser fast vollständigen 3'UTR fusioniert und verhielten sich im Vergleich zu den Konstrukten mit Nukleotid 1-588 in allen Experimenten identisch (Daten nicht gezeigt).

3.1.2.2 Visualisierung und Kinetik des Shank1 mRNA-Transports

Für die sogenannte *Time-lapse*-Videomikroskopie wurden hippokampale Neurone auf speziellen Schalen kultiviert, in deren Boden ein Deckglas eingelassen ist. 24h nach Kotransfektion der in Abbildung 3.3 dargestellten Konstrukte des GFP-MS2-Systems konnten an einem speziell dafür ausgerüsteten Mikroskop *Time-lapse*-Aufnahmen gemacht werden. Die Analyse erfolgte zunächst mit 2 Bildern pro Minute in einem Zeitraum von 10 Minuten. Bei Bewegung der Granula wurde derselbe Dendrit bis zu 30 Minuten fotografiert. Längere Aufnahmen erwiesen sich als nicht sinnvoll, da die Fluoreszenz stark ausbleicht. Auch die Vitalität der Neurone nimmt schnell ab, da zum Zeitpunkt der Versuche noch kein Mikroskop in einer 37°C und CO₂-regulierten Kammer zur Verfügung stand. In Abbildung 3.6a und b sind Beispiele für die Bewegung von mRNA-Granula in lebenden Zellen dargestellt. Die statistische Auswertung zeigte, dass auch im GFP-MS2-System nur dann mRNA-Granula in Dendriten lokalisiert sind, wenn die 3'UTR in der Reporter-mRNA vorhanden ist (Abb. 3.6c, entspricht den Ergebnissen der FISH-Analyse in Abb. 3.2).

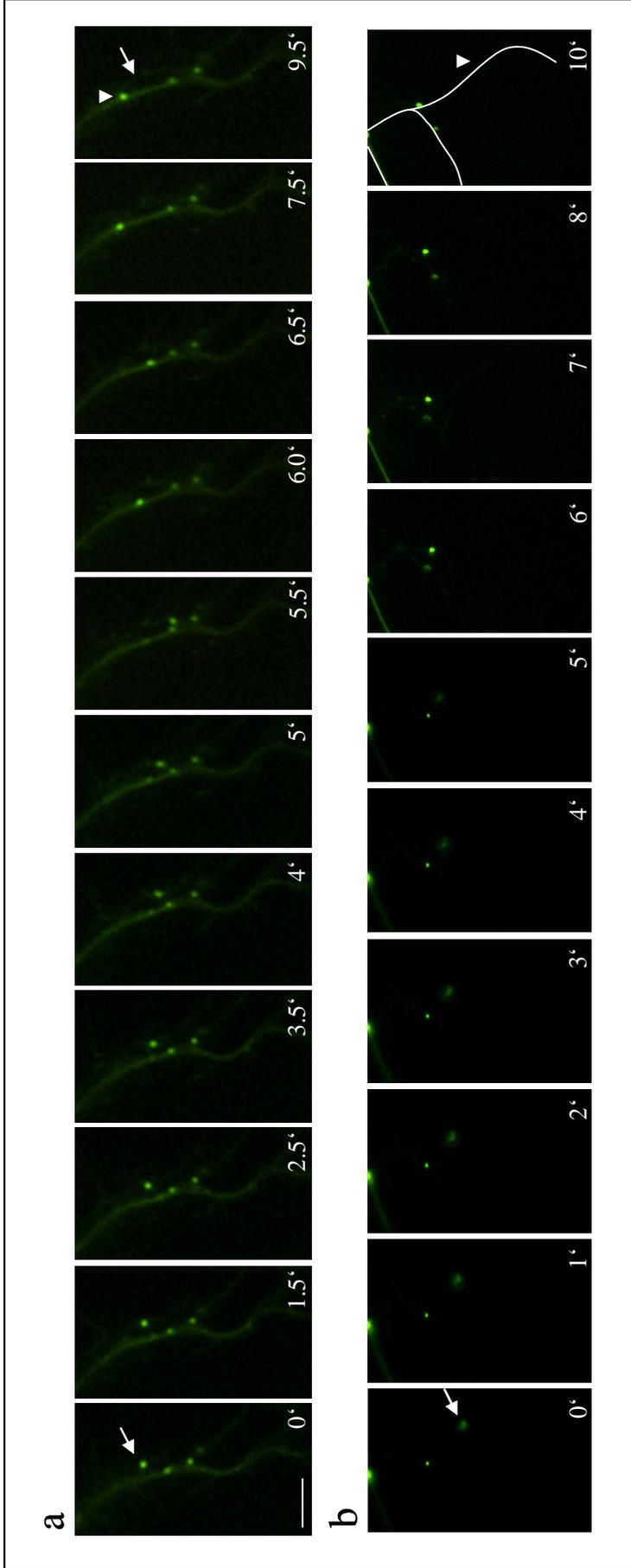
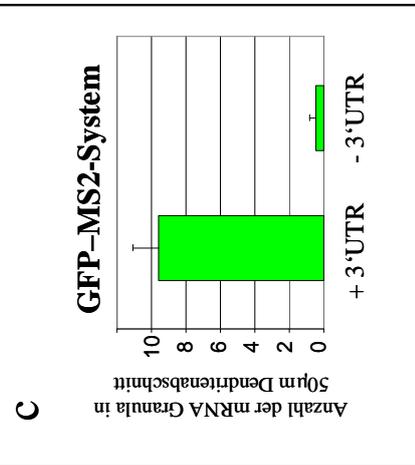


Abb. 3.6: Time-lapse Videomikroskopie: Visualisierung des Shank1-3'UTR-vermittelten mRNA-Transports in lebenden Neuronen.

24h-36h nach Kofransfektion der in Abb. 3.3 dargestellten Konstrukte wurden die Neurone im Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet und Filmsequenzen mit 2 Bildern pro Minute innerhalb eines Zeitraums von 10 Minuten aufgenommen. Der Pfeil zeigt den Ausgangspunkt des Komplexes in Bild 0', der Pfeilkopf im Vergleich dazu die Position im letzten Bild 9,5' bzw. 10'. (Balken = 20µm)

a: Der beobachtete mRNA-Komplex bewegt sich mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von 1,3µm pro Minute zunächst retrograd, ab der Dendritenverzweigung anterograd und zuletzt nur noch oszillatorisch. **b:** Der hier gezeigte Transportpartikel bewegt sich mit einer Geschwindigkeit von 2µm pro Minute in retrograder Richtung. **c:** Statistische Auswertung der Anzahl von GFP-MS2/mRNA-Komplexen mit oder ohne 3'UTR in einem 50µm Dendritenabschnitt (30 Neuronen, n = 3, p < 0,002).



Der beobachtete Transportkomplex in Abb. 3.6a bewegt sich zunächst in retrograder Richtung (zum Soma hin), ändert nach dem Passieren einer Verzweigung die Richtung hin zu anterograder (vom Soma weg, Bild 5,5' und 6.0') und zeigt zum Ende des Films nur noch oszillatorische (relativ kurze Strecke, abwechselnd retro-/anterograde) Bewegung. Die durchschnittliche Geschwindigkeit betrug dabei $1,3\mu\text{m}$ pro Minute (schrittweise: $5\mu\text{m}$ in 5 Minuten, $6\mu\text{m}$ in 30 Sekunden und $2\mu\text{m}$ in 30 Sekunden). Der in Abb. 3.6b gezeigte mRNA-Partikel bewegt sich mit relativ gleichmäßiger Geschwindigkeit von $2\mu\text{m}$ pro Minute in retrograder Richtung. Nach Auswertung von 22 Filmen (80 Granula) wurde deutlich, dass 80% der beweglichen mRNA-Komplexe nur oszillatorische oder saltatorische („springende“) Bewegung zeigen und Entfernungen unter $5\mu\text{m}$ zurücklegen. Tatsächlich bewegen sich insgesamt nur 1-5% der mRNA-Granula in einer Zelle innerhalb einer *Time-lapse*-Aufnahme von 10 Minuten. Die beobachteten Transportgeschwindigkeiten von $1-2\mu\text{m}$ (maximal $12\mu\text{m}$) pro Minute entsprechen den für andere dendritisch lokalisierte mRNAs (Knowles et al., 1996; Rook et al., 2000) und RNA-bindende Proteine (Tiruchinapalli et al., 2003) gezeigten Werten.

3.1.3 Regulation der dendritischen Shank1 mRNA-Lokalisation durch interagierende Faktoren

3.1.3.1 Der Shank1 mRNA-Transport in Dendriten erfolgt Mikrotubuli-abhängig

Der Transport und die Lokalisation der mRNA-transportierenden *Ribonucleoprotein*-Partikel (RNPs) in Neuronen wie auch in anderen Zellen ist vom Cytoskelett abhängig. Dabei werden fast alle RNPs von Mikrotubuli-basierenden Motorproteinen transportiert (Carson et al., 2001), weniger verbreitet ist eine Aktin-abhängige Lokalisation (Tekotte und Davis, 2002).

Um zu untersuchen, ob der Transport der Shank1 mRNA von den Mikrotubuli oder dem Aktin-Cytoskelett vermittelt wird, wurden Neurone nach der Transfektion der 5'UTR-Reporter-3'UTR- und GFP-MS2-Konstrukte (siehe auch Abb. 3.3) mit verschiedenen Zellgiften behandelt. Dabei führte das Mikrotubuli-depolymerisierende Reagenz Nocodazol zur fast vollständigen Inhibition des mRNA-Transports in distale Bereiche der Dendriten (Abb. 3.7a, Bild B; Abb. 3.7b). Die Ergebnisse konnten auch mit anderen Mikrotubuli-Giften wie Colcemid, Vincristin und Vinblastin bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Die Behandlung der Neurone mit Cytochalasin D, welches an das Plus-Ende der Aktin-Filamente bindet und deren Verlängerung verhindert, zeigte dagegen keinen Einfluss auf die dendritische Lokalisation der Reporter-Transkripte (Abb. 3.7a Bild C; Abb. 3.7b).

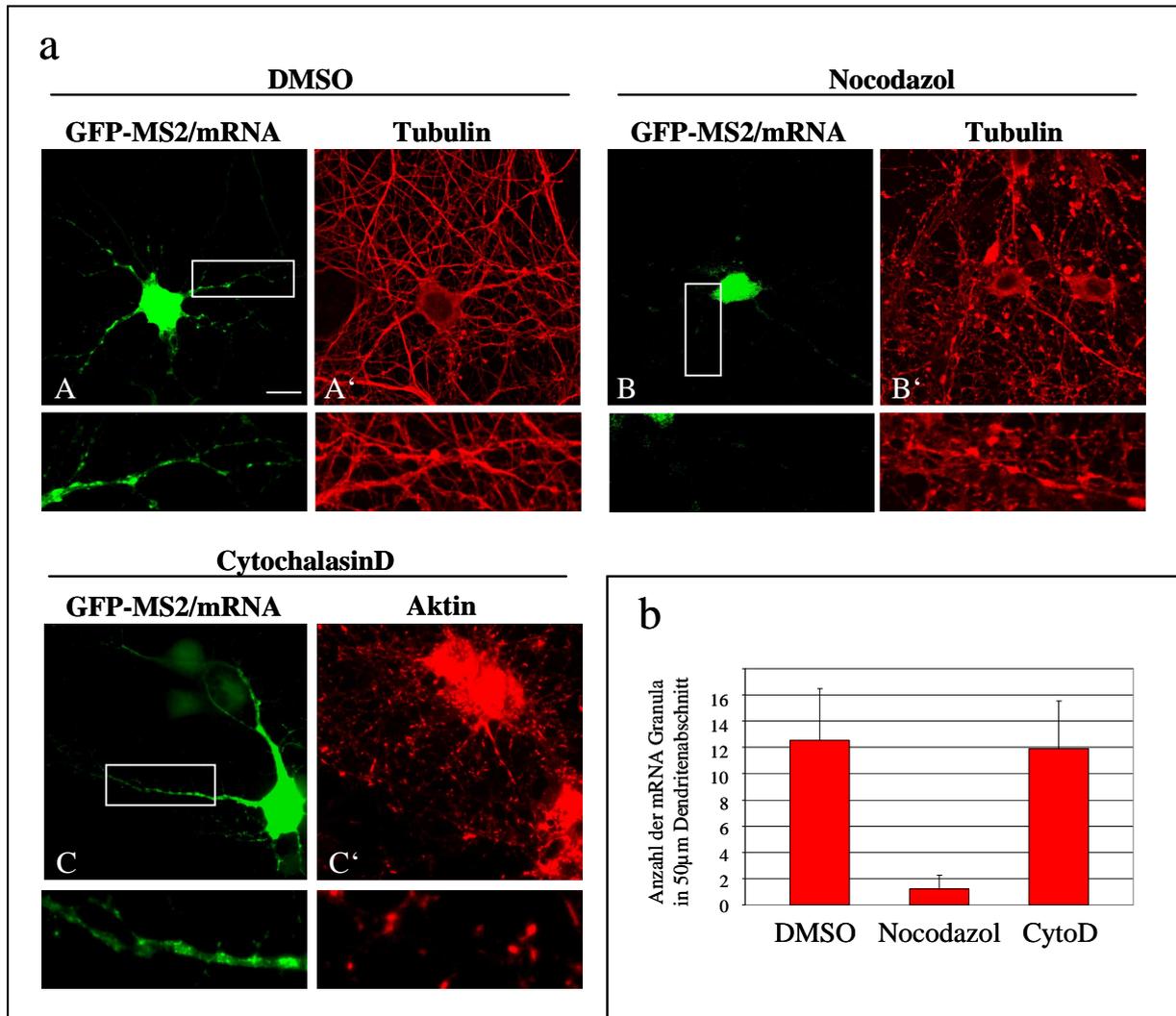


Abb. 3.7: Der durch die Shank1-3'UTR vermittelte mRNA-Transport ist Mikrotubuli-abhängig.

Neurone wurden an *div7* mit den Konstrukten aus Abb. 3.3 kotransfiziert, 20h weiterkultiviert und vor dem Fixieren 4h mit Reagenzien behandelt: DMSO als Kontrolle (A), 6 µg/ml Nocodazol (B), 5 µg/ml CytochalasinD (C). **a:** Zum Nachweis der GFP-MS2/Reporter-mRNA-Komplexe wurde ein GFP-Antikörper verwendet (Bild A, B und C; grün). Die Mikrotubuli wurden mit einem Tubulin-Antikörper (Bild A',B'; rot), Aktin-Filamente mittels TRITC-gekoppeltem Phalloidin (C'; rot) gefärbt. Die mRNA ist nur mit intakten Mikrotubuli dendritisch lokalisiert (A,C). (Balken = 20µm) **b:** Die statistische Auswertung der Experimente zeigt, dass die Anzahl der Granula mit DMSO und Cytochalasin D bei 12, mit Nocodazol nur bei 1 Partikel/50µm Dendrit liegt (30 Neurone, n=3, p<0,002).

Die Zerstörung der Mikrotubuli inhibierte auch in *Live-Imaging*-Experimenten die Motilität der wenigen verbliebenen Granula, so dass in *Time-lapse*-Aufnahmen keine Bewegung mehr nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Da der Shank1 mRNA-Transport entlang des Mikrotubuli-Cytoskeletts erfolgt, wurde im Folgenden der Einfluss der Mikrotubuli-Motorproteine Kinesin und Dynein untersucht. Der Transport zum Plus-Ende der Mikrotubuli hin erfolgt mit Hilfe von Kinesin, in Richtung Minus-Ende wird er durch Dynein vermittelt (Goldstein und Yang, 2000).

Die Organisation der Mikrotubuli in Dendriten ist komplex. Im Gegensatz zum Axon kommen Mikrotubuli hier in gemischter Polarität vor, so dass Kinesine und Dyneine jeweils sowohl den retrograden als auch den anterograden Transport vermitteln können (Baas et al., 1988). Für verschiedene dendritisch lokalisierte mRNAs wie z.B. der CamKII α und Arc/Arg3.1 (Hirokawa, 2006) oder MAP2 mRNA (Zivraj, Dissertation 2005) konnte ein KIF5-abhängiger Transport gezeigt werden. Die KIF5-Motorproteine gehören zur Kinesin1-Familie (= *conventional kinesin*) und transportieren neben mRNA/RNPs z.B. auch Mitochondrien, Lysosomen, Tubulin-Oligomere oder das AMPA-Rezeptor Adaptor-Protein GRIP (Hirokawa und Takemura, 2005). KIF5 besteht aus zwei dimerisierten *kinesin heavy chains* = KHC und zwei *kinesin light chains* = KLC. Die KHCs enthalten jeweils eine konservierte N-terminale Motordomäne, eine Dimerisierungs- und eine C-terminale Schwanzdomäne (Abb. 3.8c). Die jeweiligen *Cargo*-Komplexe werden im C-terminalen Bereich gebunden (Bindung an KLC für axonalen, an KHC für dendritischen Transport; Kanai et al., 2004).

Um zu untersuchen ob auch die dendritische Lokalisation der Shank1 mRNA KIF5-abhängig ist, wurde ein für KIF5 dominant-negativ (dn) wirkendes Konstrukt verwendet. Dieses ist N-terminal an GFP fusioniert und wurde von Antonino Schepis zur Verfügung gestellt (EMBL, Heidelberg). Es enthält nur die Motordomäne von KIF5C und wirkt dominant-negativ auf den Transport von Mitochondrien und Intermediärfilamenten, da es wahrscheinlich durch Bindung an den C-Terminus des endogenen KIF5 den Transport von *Cargo*-Komplexen verhindert (Schepis et al., 2007). Hierzu wurden Neurone mit den 5'UTR-mRFP-3'UTR Reporter-Konstrukten transfiziert und die mRNA-Lokalisation mittels FISH nachgewiesen. Das GFP-MS2-System konnte hierbei nicht verwendet werden, da das KIF5dn Konstrukt ebenfalls an GFP fusioniert war. Abbildung 3.8 zeigt, dass der dendritische Transport des Reporter-Transkripts tatsächlich durch Koexpression des KIF5Cdn Konstrukts fast vollständig inhibiert wird (Abb. 3.8a: Bild B', Abb. 3.8b). Dagegen führt weder die Kotransfektion des GFP-Leervektors (Bild A,A') noch eines Dynamitin-GFP-Konstrukts (zur Verfügung gestellt von Richard Vallee, Columbia University, NY; Bild C,C') zu einer Beeinträchtigung der dendritischen Lokalisation der mRNA. Dynamitin ist Bestandteil des Dynactin-Komplexes und wirkt bei Überexpression dominant-negativ auf den Dynein-abhängigen Transport (Burkhardt et al., 1997). Außerdem fällt auf, dass die Koexpression des KIF5Cdn Konstrukts auch zur Verringerung der nachgewiesenen mRNA-Menge im Soma führt. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die nicht von KIF5 gebundenen und transportierten mRNA-Komplexe instabilisiert und verstärkt abgebaut werden.

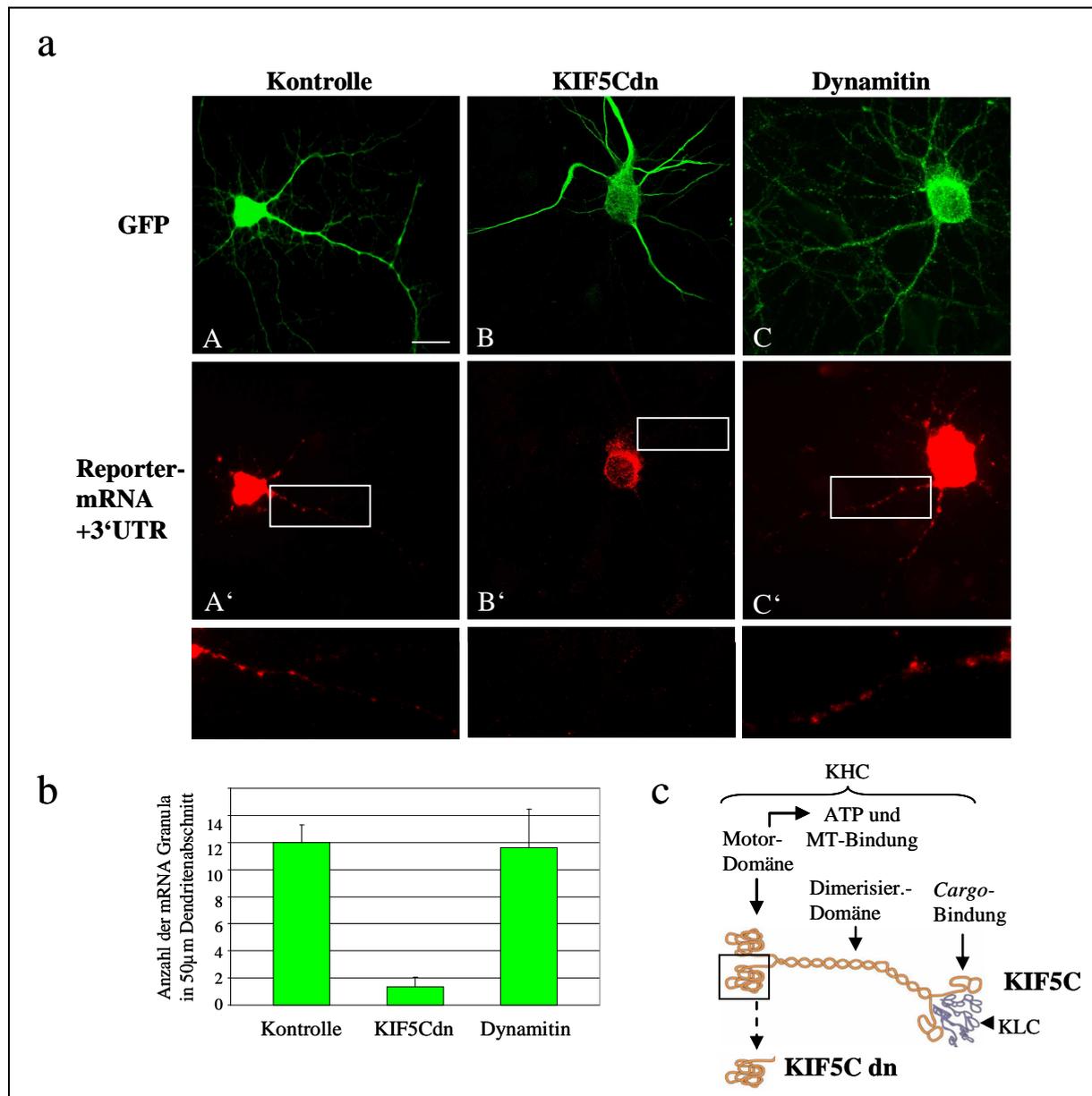


Abb. 3.8: Das Mikrotubuli-assoziierte Motorprotein KIF5C vermittelt den mRNA-Transport der Reporter-Konstrukte.

a: Neurone wurden an *div7* mit 5'UTR-mRFP-3'UTR Reporterplasmiden und rekombinanten GFP-Konstrukte kotransfiziert. 24h später wurden die Zellen fixiert und kombinierte FISH/ICC-Färbungen mit mRFP-spezifischen DIG-Sonden (Cy3-DIG-Antikörper; Bild A',B' und C'; rot) und GFP-Antikörpern (ICC; Bild A,B,C; grün) durchgeführt. Die Kotransfektion des KIF5Cdn-Konstrukts (Bild B) führt zur Inhibition des dendritischen mRNA-Transports (Bild B'). Der GFP-Leervektor (A,A') und Dynamitin (= Dynein dn Konstrukt; C,C') beeinflussen die dendritische Lokalisation der Reporter-mRNA hingegen nicht. (Balken = 20µm)

b: Statistische Auswertung der Experimente: In den Kontrollversuchen wurden durchschnittlich 12 Granula, mit dem KIF5dn Konstrukt jedoch nur weniger als 2 Granula in 50µm gezählt. (je 30 Neurone, n = 3, p<0,002) **c:** Schematische Darstellung von Kinesin1/KIF5, welches aus zwei dimerisierten *kinesin heavy chains* (KHC, braun) besteht, an die C-terminal zwei *kinesin light chains* (KLC, blau) gebunden sind (Abbildung modifiziert aus Hirokawa et al., 2005). Das eingesetzte dn KIF5C-Konstrukt enthält nur die N-terminale Motordomäne fusioniert an GFP.

Mittels eines KIF5C-spezifischen Antikörpers in Kombination mit Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen wurde anschließend untersucht, ob die endogene Shank1 mRNA mit KIF5C-Komplexen kolokalisiert vorliegt. Abbildung 3.9 zeigt, dass nur ein Teil der endogenen Shank1 mRNA-Transportgranula mit KIF5C kolokalisiert ist (quantitative Auswertung: 27% (+/-11) Kolokalisation, 50µM Dendrit in 10 Neuronen, n = 3). Die Motordomänen von KIF5A, B und C sind hochkonserviert, so dass das KIF5Cdn-Proteinfragment möglicherweise auch die anderen KIF5-Motorproteine blockiert. Die nicht mit KIF5C kolokalisierten Shank1 mRNA-Komplexe könnten also auch von KIF5A oder B transportiert werden. Vorstellbar ist auch, dass die nicht kolokalisierten mRNA-Granula ihren Bestimmungsort erreicht haben und daher nicht mehr mit dem Cytoskelett assoziiert vorliegen.

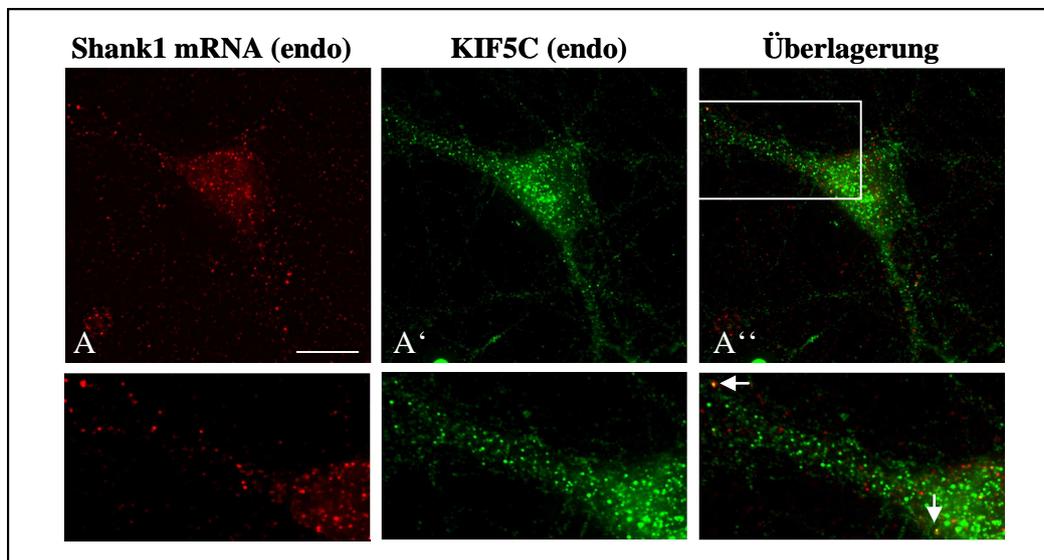


Abb. 3.9: Die endogene Shank1 mRNA kolokalisiert nur teilweise mit endogenem KIF5C. Dargestellt sind kombinierte FISH/ICC-Färbungen an *div14*-Neuronen mit Shank1-spezifischen DIG-gekoppelten Sonden (Cy3-DIG-Antikörper, Bild A; rot) und Färbung von endogenem KIF5C (A'; grün). Shank1 mRNA und KIF5C kolokalisieren nur partiell (Bild A'', weiße Pfeile). (Balken = 20µm)

3.1.3.2 Der Einfluss RNA-bindender *trans*-agierender Faktoren auf den Shank1 mRNA-Transport

Schon vor Beginn dieser Arbeit wurden einige mit der Shank1-3'UTR *trans*-agierende Faktoren wie z.B. PABP und hnRNP-K gefunden und charakterisiert (Iglauer, Dissertation 2005). Ihr Einfluss auf den Shank1 mRNA-Transport wurde daher mit Hilfe der vorliegenden Reporter-Konstrukte in *in-situ*-Hybridisierungs-Experimenten untersucht.

Das cytoplasmatische Poly-A-Bindeprotein (PABP) ist ein Bestandteil von somatodendritisch lokalisierten mRNP-Partikeln und mit translatierenden Polyribosomen assoziiert (Hensold et al., 1996; Mohr und Richter, 2004).

Das Protein besitzt vier N-terminale *RNA recognition motifs* (RRMs) und einen Prolin-reichen C-Terminus (Abb. 3.10a). Von Evita Mohr (UKE, Hamburg) wurden drei verschiedene dominant-negative PABP-Konstrukte zur Verfügung gestellt. Sie enthalten jeweils die RNA-bindenden Domänen: RRM1+2, RRM2+3 und RRM3+4 mit N-terminalem *Flag-Tag*. Die resultierenden verkürzten PABP-Proteine sind weniger stark dendritisch und nicht mehr in granulären Strukturen lokalisiert (Abb. 3.10b, Vergleich wt im Bild A' und RRM1+2dn in B').

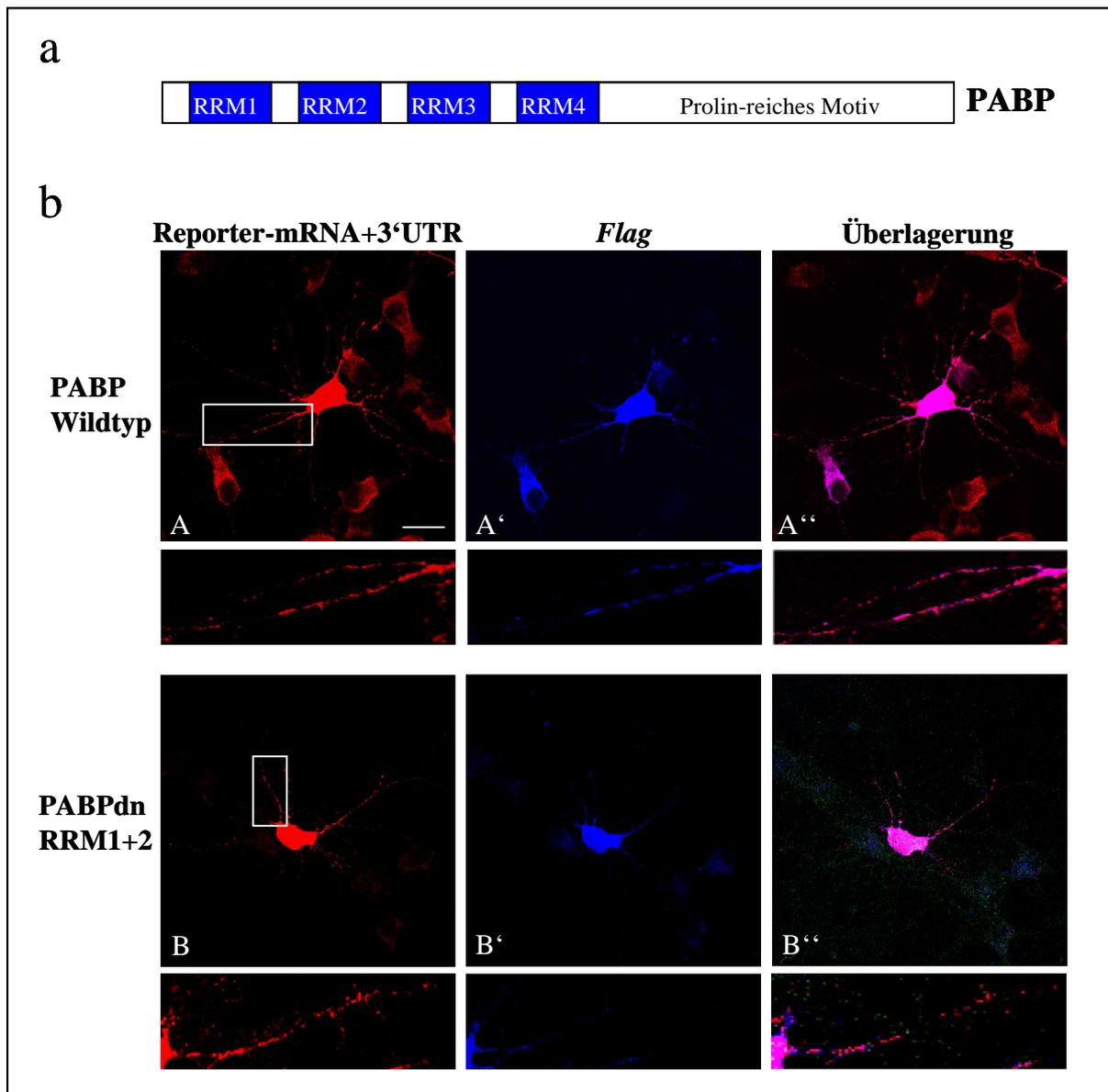


Abb. 3.10: PABPdn Konstrukte beeinflussen die Lokalisation der Reporter-mRNA nicht.
a: Schematische PABP-Darstellung: N-terminal besitzt das Protein 4 *RNA recognition motifs* (RRMs, blau) und C-terminal eine Prolin-reiche Domäne. **b:** Die Reporter-mRNA und *Flag-Tag*-markierte PABP-Konstrukte wurden in *div7* - Neuronen koexprimiert und nach 36h fixiert. Es folgten kombinierte FISH/ICC-Färbungen mit Reporter-spezifischen DIG-gekoppelten Sonden (Cy3-DIG-Antikörper, Bild A,B; rot) und *Flag*-Antikörpern (Bild A',B'; blau). Wildtyp-PABP liegt mit der Reporter-mRNA kolokalisiert vor (A''). Die dominant-negativen PABP-Konstrukte (exemplarisch gezeigt für RRM1+2) inhibieren den mRNA-Transport nicht (Bild B). (konfokale Aufnahmen, Balken = 20μm)

Die dominant-negativen PABP-Konstrukte wurden mit den 5'UTR-mRFP-3'UTR-Reporter-Konstrukten kotransfiziert um ihren Einfluss auf den mRNA-Transport zu untersuchen. Sowohl die Koexpression der einzelnen RRM's (in Abb. 3.10b nur für RRM1+2 exemplarisch gezeigt, Bild B) als auch aller RNA-Bindemotive gleichzeitig führte nicht zu einer Veränderung der mRNA-Transporteffizienz (quantitative Auswertung in Abb. 3.15). PABP ist zwar in denselben mRNPs lokalisiert (Abb. 3.10b, Bild A''), scheint jedoch kein essentieller Faktor für die dendritische Lokalisation der Shank1 mRNA zu sein.

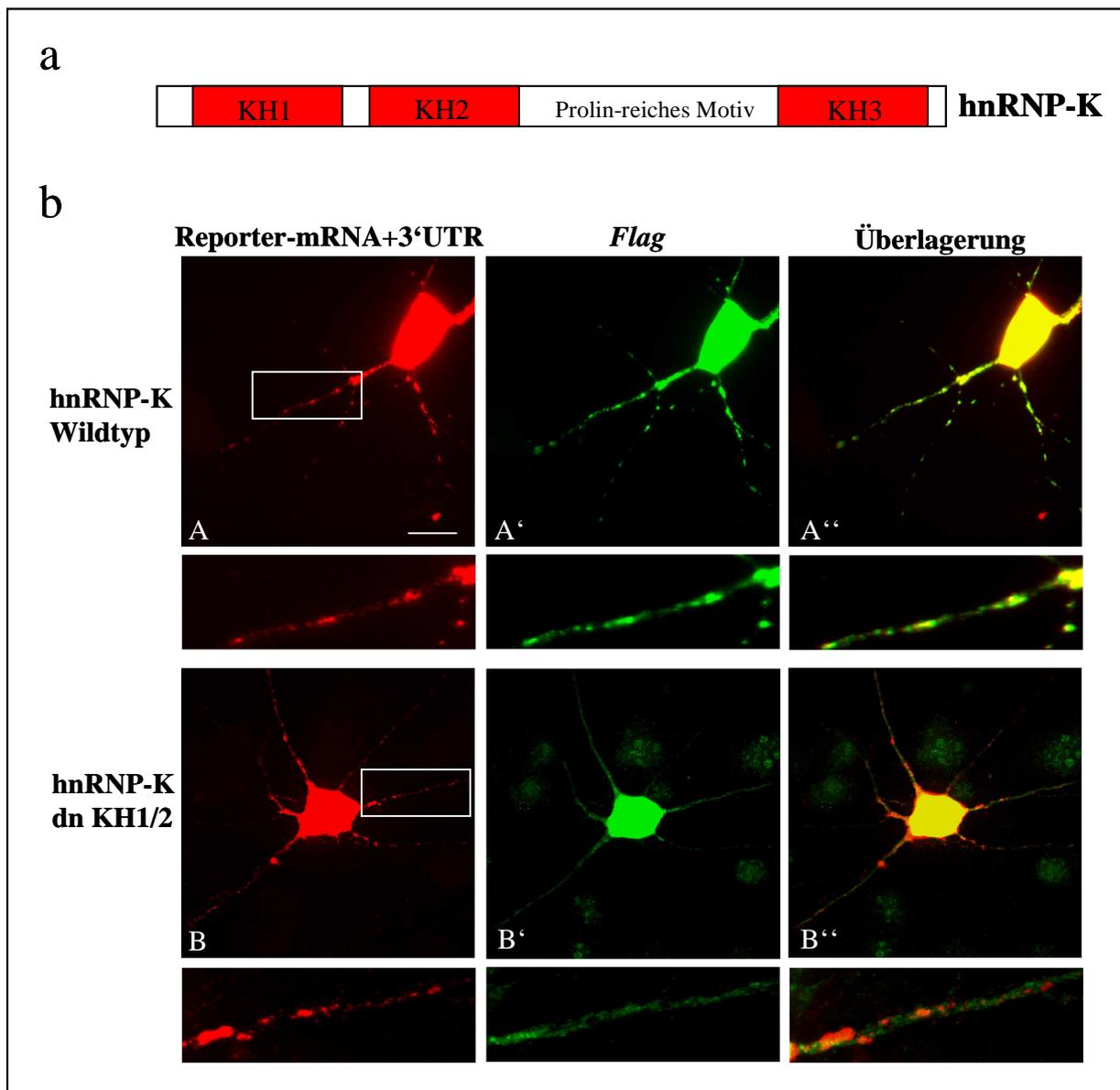


Abb. 3.11: hnRNP-Kdn Konstrukte beeinflussen die Reporter-mRNA-Lokalisation nicht.
a: Schematische hnRNP-K-Darstellung: das Protein besitzt zwei N-terminale hnRNP-K Homology-Domänen (KH) und eine KH-Domäne am äußersten C-Terminus (rot), dazwischen befindet sich ein Prolin-reiches Motiv. **b:** Die Durchführung erfolgte wie in Abb. 3.10b beschrieben (Cy3-DIG-Antikörper, Bild A,B; rot und Flag-Antikörper, Bild A',B'; grün). Wildtyp-hnRNP-K liegt mit der Reporter-mRNA kolokalisiert vor (A''). Das dn hnRNP-K-Konstrukt (enthält nur die KH-Domänen 1 und 2) inhibiert den mRNA-Transport nicht (Bild B). (Balken = 20μm)

Ein weiterer mit dem Shank1-3'UTR DTE interagierender Faktor ist hnRNP-K (*heterogenous nuclear ribonucleoprotein K*). Dieses Protein gehört zu den Poly-C-bindenden Proteinen und enthält zwei N-terminale und eine C-terminale KH-Domäne (hnRNP-K-Homology, Abb. 3.11a). HnRNP-K ist ein zwischen Kern und Cytoplasma wechselnd lokalisiertes Protein, welches am mRNA-Transport und der Regulation der Translation beteiligt ist (Ostareck-Lederer et al., 2002). Nach Überexpression in Neuronen sind hnRNP-K und die Reporter-mRNA in denselben dendritischen Transportpartikeln kolokalisiert (Abb. 3.11b, Bild A''). Es wurden dominant-negative Konstrukte hergestellt, die nur die RNA-bindenden Domänen KH1 und 2 bzw. nur KH3 mit N-terminalem *Flag-Tag* enthalten, wobei die RNA-Bindung fast ausschließlich von KH1 und 2 vermittelt wird (Paziewska et al., 2004). Koexpression von KH1+2 mit den 5'UTR-mRFP-3'UTR-Reporter-Konstrukten führte nicht zur Inhibition des mRNA-Transports (Abb. 3.11b, Bild B; quantitative Auswertung in Abb. 3.15), obwohl das hnRNP-Kdn Protein nur noch schwach und eher diffus in den Dendriten lokalisiert ist (Bild B'). Konstrukte, die nur die KH3-Domäne enthielten, konnten leider in transfizierten Neuronen nicht nachgewiesen werden, möglicherweise da sie aufgrund ihrer geringen Größe schnell abgebaut werden. Daher wurde die KH3-Domäne an die fluoreszierenden Reporterproteine GFP und RFP fusioniert. Die Expression dieser Konstrukte schädigte die Zellen jedoch so, dass keine Auswertung der mRNA-Transporteffizienz mehr möglich war.

Staufen1 ist ein RNA-bindendes Protein, welches u.a eine wichtige Rolle im dendritischen Transport der CaMKII α mRNA spielt und in KIF5-enthaltenden Granula vorkommt (Kanai et al., 2004; Kim et al., 2005). Daher wurde auch der Einfluss dieses Proteins auf den Shank1 mRNA-Transport untersucht. Staufen1 besitzt vier konservierte *double-stranded RNA binding domains* (dsRBDs, Abb. 3.12a) und eine Mikrotubuli-Bindedomäne (TBD). Im Rattenhirn kommt Staufen1 in zwei alternativen Spleißvarianten vor, die sich nur durch Insertion von 6 Aminosäuren am Beginn der dsRBD2 unterscheiden. Dabei wird die Variante mit dem Einschub als Staufen1+, ohne das Insert als Staufen1- bezeichnet. Staufen1+ weist in *in-vitro* Studien eine geringere RNA-Bindeaktivität auf als Staufen1- (Monshausen et al., 2001). Staufen1-Wildtyp und dominant-negative Konstrukte, die nur die 2. und 3. RNA-Bindedomäne enthalten, wurden von Stefan Kindler (UKE, Hamburg) zur Verfügung gestellt. In Abbildung 3.12 sind kombinierte FISH/ICC-Färbungen nach Kotransfektion der Reporter-mRNA- und Staufen1-Konstrukte dargestellt. Das überexprimierte Staufen1+-Protein und die Reporter-mRNA liegen kolokalisiert in denselben Transportpartikeln vor (Abb. 3.12b, Bild A''). Die Koexpression des dsRBD2/3- dn Konstrukts führte nur zu einer leichten Verringerung der mRNA-Transporteffizienz (Abb. 3.12b, Bild B).

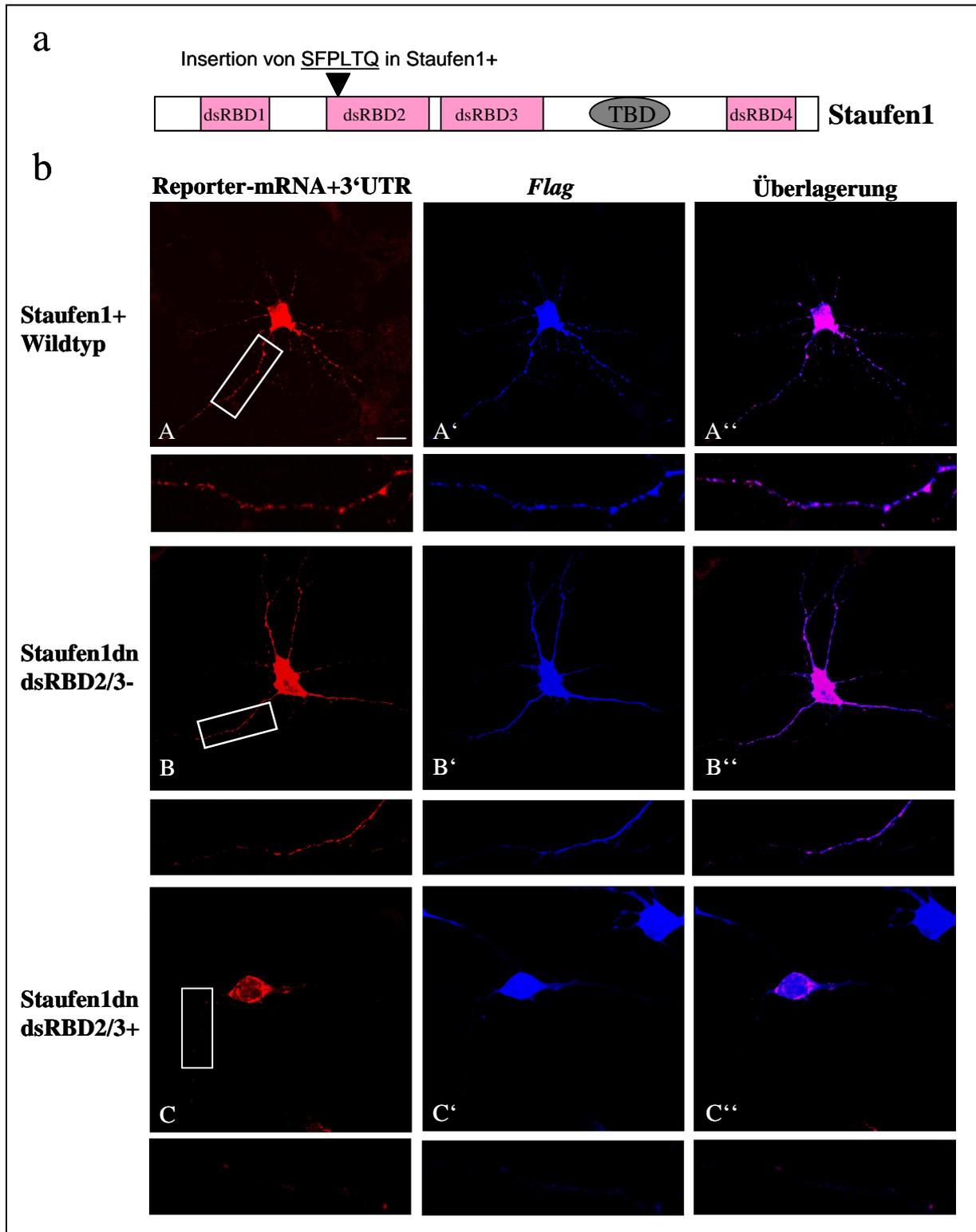


Abb. 3.12: Das Staufen1 dn Konstrukt dsRBD2/3+, nicht aber dsRBD2/3- inhibiert den dendritischen Transport der Reporter-mRNA.

a: Schematische Staufen1-Darstellung: Enthalten sind 4 N- und C-terminale dsRBDs (*double-stranded RNA binding domains*, rosa) und eine Mikrotubuli-bindende Domäne (TBD, grau). Markiert ist auch die Position der Insertion von 6 Aminosäuren am Beginn der dsRBD2 in den Staufen1+-Konstrukten.

b: Die Durchführung erfolgte wie in Abb. 3.10b beschrieben (Cy3-DIG-Antikörper, Bild A-C, rot und Flag-Antikörper, Bild A'-C', blau). Wildtyp-Staufen1+ liegt mit der Reporter-mRNA kolokalisiert vor (A''). Im Gegensatz zu RBD2/3- (B) inhibiert RBD2/3+ (+ 6 Aminosäure-Insertion) fast vollständig den Transport der Reporter-mRNA (C). (konfokale Aufnahmen, Balken = 20µm)

Die quantitative Auswertung in Abb. 3.15 gestaltete sich für die Versuche mit dsRBD2/3- relativ schwierig, da die mRNA häufig eher diffus als in distinkten Granula verteilt war. Auch das dsRBD2/3- -Protein selbst zeigt keine granuläre Verteilung mehr (Abb. 3.12b, Bild B') obwohl es im Gegensatz zu dsRBD2/3+ (Bild C') noch dendritisch lokalisiert ist. Interessanterweise kommt es nach Kotransfektion mit dsRBD2/3+ zur fast vollständigen Inhibition des Reporter-mRNA-Transports (Abb. 3.12b, Bild C; Abb. 3.15), obwohl sich dieses Konstrukt von dsRBD2/3- nur in der Insertion von 6 Aminosäuren am N-Terminus unterscheidet. Dieser Einschub scheint nicht nur für die Lokalisation von Staufen1 selbst, sondern auch für den Shank1-3'UTR-abhängigen mRNA-Transport von großer Bedeutung zu sein. Möglicherweise ist die Shank1 mRNA also nur mit der Staufen1+ - Spleißvariante assoziiert, wobei das Aminosäure-Insert auch Interaktionen mit anderen Bestandteilen der RNPs verändern könnte. Die Koexpression von Staufen1+ und Staufen1- in Neuronen zeigte jedoch, dass beide Isoformen in denselben RNP-Komplexen vorkommen (Abb. 3.13, Bild A''). Staufen2, ein weiteres Staufen-Homolog in Säugerzellen, ist in anderen mRNP-Populationen als Staufen1 in Dendriten lokalisiert (Duchaine et al., 2002). Staufen2dn Konstrukte zeigten daher wie erwartet keinen Einfluss auf den Shank1-3'UTR-abhängigen mRNA-Transport (Daten nicht gezeigt).

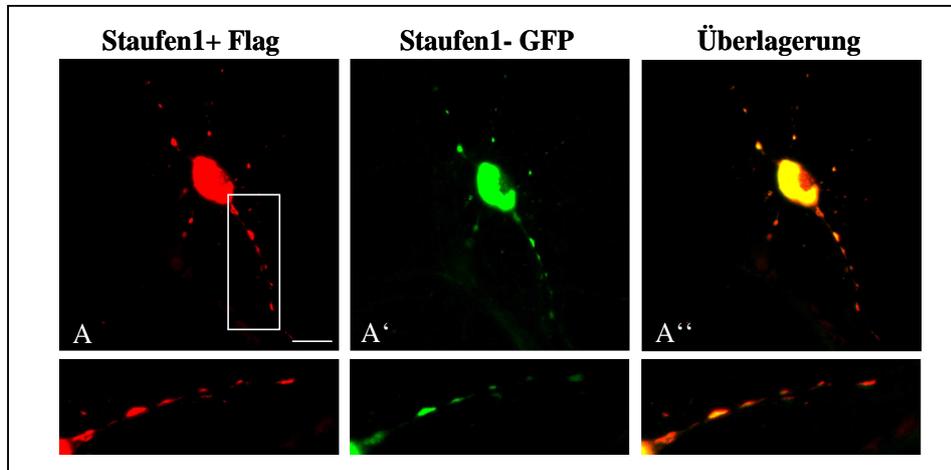


Abb. 3.13: Staufen1+ und Staufen1- sind in dendritischen Granula kolokalisiert.

Beide Staufen1-Isoformen wurden 24h in *div7*-Neuronen koexprimiert. Staufen1+ (+Insert) wurde mit dem *Flag-Tag* (Bild A, rot), Staufen1- an GFP fusioniert (A', grün) nachgewiesen. (Balken = 20µm)

Um zu untersuchen, ob auch die endogene Shank mRNA mit Staufen1-Partikeln assoziiert ist, wurden *in-situ*-Hybridisierungen mit Shank1-spezifischen Sonden (Abb. 3.14, Bild A) und Färbungen des endogenen Staufen1-Proteins (Bild A') durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass 28% (+/-10, 10 Neurone, n = 3) der Shank1 mRNA-Granula mit Staufen1-mRNPs kolokalisiert sind (Abb. 3.14, A''). Der Einfluss der untersuchten RNA-bindenden *trans*-agierenden Faktoren auf den Shank1 mRNA-Transport ist in Abbildung 3.15 zusammengefasst.

PABP und hnRNP-K kolokalisieren zwar mit den Reporter-Konstrukten, die statistische Auswertung zeigt jedoch, dass dominant-negative Konstrukte die mRNA-Transporteffizienz nicht verändern. Staufen1 ist ebenfalls mit den Reporter-Transkripten kolokalisiert. Dominant-negative Konstrukte verschiedener Staufen1-Spleißvarianten inhibieren die dendritische mRNA-Lokalisation interessanterweise unterschiedlich stark.

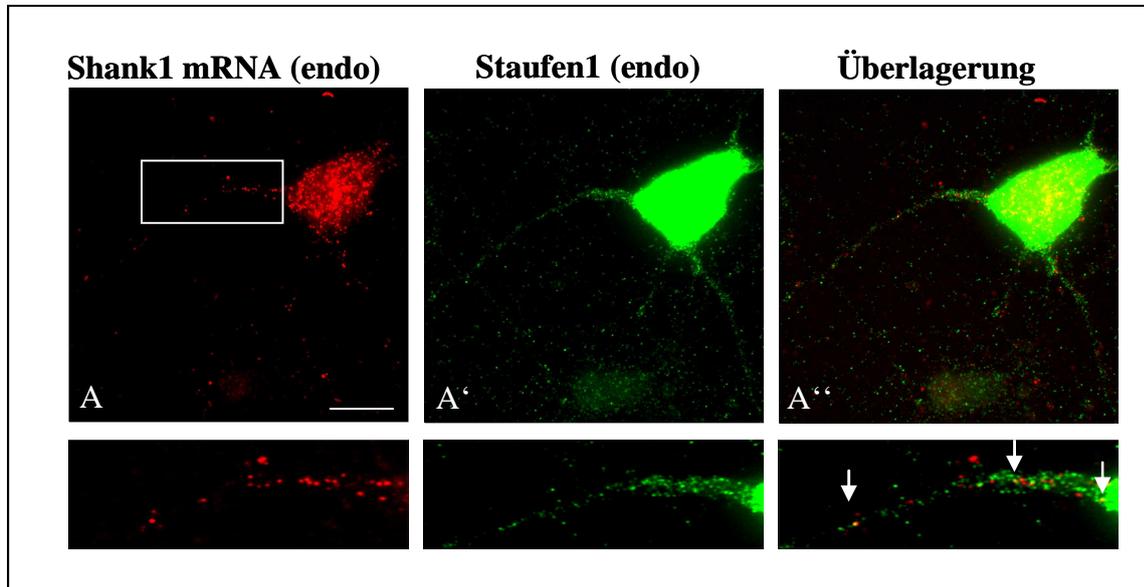


Abb. 3.14: Die endogene Shank1 mRNA und Staufen1 sind nur teilweise kolokalisiert.

Dargestellt sind kombinierte FISH/ICC-Färbungen an *div14*-Neuronen mit Shank1-spezifischen DIG-gekoppelten Sonden (Cy3-DIG-Antikörper, Bild A; rot) und Staufen1-Antikörper (A'; grün). Die Shank1 mRNA und Staufen1 kolokalisieren nur partiell (Bild A'', weiße Pfeile). (Balken = 20µm)

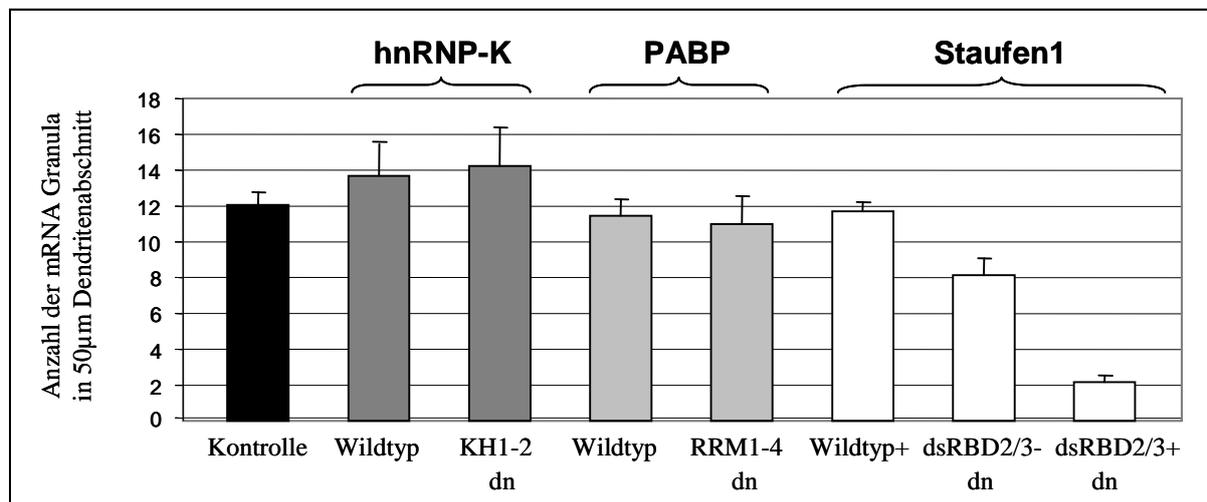


Abb. 3.15: Statistische Auswertung der Untersuchungen zum Einfluss dominant-negativer RNA-bindender Proteine auf den Shank1 mRNA-Transport.

Es wurde bei je 30 Neuronen aus mindestens drei verschiedenen Experimenten die Anzahl der mRNA-Granula in einem 50µm Abschnitt eines distalen Dendriten bestimmt. Kotransfektionen der Wt-Plasmide führten im Vergleich zur Kontrolle (= Leervektor, schwarz) nicht zu einer signifikanten Änderung des mRNA-Transports. Auch hnRNP-Kdn (dunkelgrau) oder PABPdn Konstrukte (hellgrau) veränderten die Lokalisation der Reporter-Transkripte nicht. Staufen1dn Konstrukte (weiß) zeigten jedoch einen Einfluss auf den mRNA-Transport: dsRBD2/3--Konstrukte verringern die Anzahl der Granula von 12 auf 8 ($p < 0,04$), dsRBD2/3+-Konstrukte sogar von 12 auf 2 Granula ($p < 0,002$).

3.2 Regulation der Translation der Shank1 mRNA

3.2.1 Inhibition der Translation der Shank1 mRNA durch die 5'UTR

Lokale Proteinsynthese in Dendriten ist ein wichtiger Mechanismus zur Ausbildung synaptischer Plastizität (Miller et al., 2002). Die direkte aktivitätsabhängige Regulation der Translation an der Synapse wird durch den Transport spezifischer mRNAs und die dendritisch lokalisierte Translationsmaschinerie ermöglicht (Wang und Tiedge, 2004).

Die Lokalisation der Shank1 mRNA in distalen Bereichen der Dendriten und ihre Assoziation mit Translations-regulierenden Proteinen (Staufen1, PABP und hnRNP-K) lässt auch für Shank1 eine gezielte Kontrolle lokaler Translation im Bereich der Synapsen vermuten. Mit Hilfe von Luciferase- (Iglauer, Dissertation 2005) und mRFP-Reporter-Konstrukten (Abb. 3.4) konnte gezeigt werden, dass die humane Shank1 5'UTR die Expression sehr stark inhibiert. Die Versuche im Abschnitt 3.1.2 verdeutlichen auch, dass die 5'UTR ausschließlich die Translation und nicht den 3'UTR-vermittelten dendritischen mRNA-Transport verhindert. Shank1 ist in der postsynaptischen Dichte eines der wichtigsten Gerüstproteine (Sheng und Kim, 2000). Möglicherweise erfolgt die Translationsinhibition nur während des mRNA-Transports sowie der Lokalisation im Bereich der dendritischen Dornen oder Synapsen und kann dann als Antwort auf spezifische Signale lokal aufgehoben werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, auf welche Weise die Shank1 5'UTR die Translation inhibiert und wie dieser Mechanismus in Neuronen reguliert wird.

Die Exon-Intron-Struktur im 5'-Bereich des Shank1-Gens stimmt zwischen Mensch und Ratte weitgehend überein. Die Basen 370-634 der 5'UTR weisen eine Übereinstimmung von 91% auf. Der 5' dazu liegende Bereich ist im Genom von *Rattus norvegicus* jedoch nur unvollständig sequenziert und konnte bisher nicht durch PCRs aus cDNA amplifiziert werden. Daher wurde in allen folgenden Versuchen die humane 5'UTR verwendet. Die Shank1-5'UTR ist sehr lang (634 Nukleotide) und weist einen außergewöhnlich hohen GC-Gehalt von fast 80% auf. Sie bildet daher vermutlich sehr stabile Sekundärstrukturen mit einer freien Energie von bis zu -324,1 kcal/mol aus (Berechnung mit dem Programm *mfold*: Zuker, 2003; Abb. 3.17). Außerdem befinden sich innerhalb der 5'UTR drei *upstream Open Reading Frames* (uORFs), die in Abbildung 3.16 schematisch dargestellt sind. Solche uORFs können die Expression eines Proteins auf verschiedene Weise beeinflussen, z.B. die Initiation an folgenden AUGs verhindern oder diese erst ermöglichen (Re-Initiation; Morris und Geballe, 2000).

Eine wahrscheinliche Faltungsvariante und die Lage der verschiedenen AUGs sind in Abbildung 3.17 dargestellt. Ob ein AUG-Kodon als Translationsstartpunkt genutzt werden kann, wurde mit dem Programm *Netstart* (Pedersen und Nielsen, 1997; Abb. 3.17) berechnet, wobei ein Index über 0,5 eine mögliche Nutzung als Startpunkt bedeutet. Das 1. und 2. *upstream* AUG (uAUG) kodieren für sehr kurze Peptide von nur 9 bzw. 2 Aminosäuren Länge. Dagegen kodiert der 3.uORF für 59 Aminosäuren und überlappt mit dem Leserahmen des 4.AUG (Abb. 3.16). Der Leserahmen des 4.AUG-Startkodons läuft *in-frame* in den ORF des 5.AUG, welches ursprünglich als Shank1-Startpunkt veröffentlicht wurde (Naisbitt et al., 1999; AF131951). Um zu überprüfen, ob auch das 4.AUG als alternatives Shank1 Startkodon in Neuronen genutzt werden kann, wurde ein spezifischer Antikörper hergestellt (= α ShankNT). Tatsächlich konnte die N-terminal um 72kDa längere alternative 4.AUG-Isoform mit diesem Antikörper in Maus- und Ratten-PSD-Präparationen nachgewiesen werden (PSD = postsynaptische Dichte; Kreienkamp unveröffentlicht). Der in dieser Arbeit zur Vereinfachung als 5.AUG bezeichnete Shank1-Startpunkt beschreibt drei mögliche, eng benachbarte Startkodons (in Abb. 3.16 und 17 als 5.1, 5.2 und 5.3 benannt).

Bisherige Versuche zeigten außerdem, dass die 5'UTR keine *internal ribosomal entry sites* enthält (IRES; Iglauer, Dissertation 2005). Im Gegensatz zur *Cap*-abhängigen Translation wird mit diesem Mechanismus ohne vorheriges Scannen der 5'UTR und auch bei stabilen Sekundärstrukturen die Translation effizient gestartet. Beispiele hierfür findet man interessanterweise vermehrt bei dendritisch lokalisierten mRNAs (Pinkstaff et al., 2001)

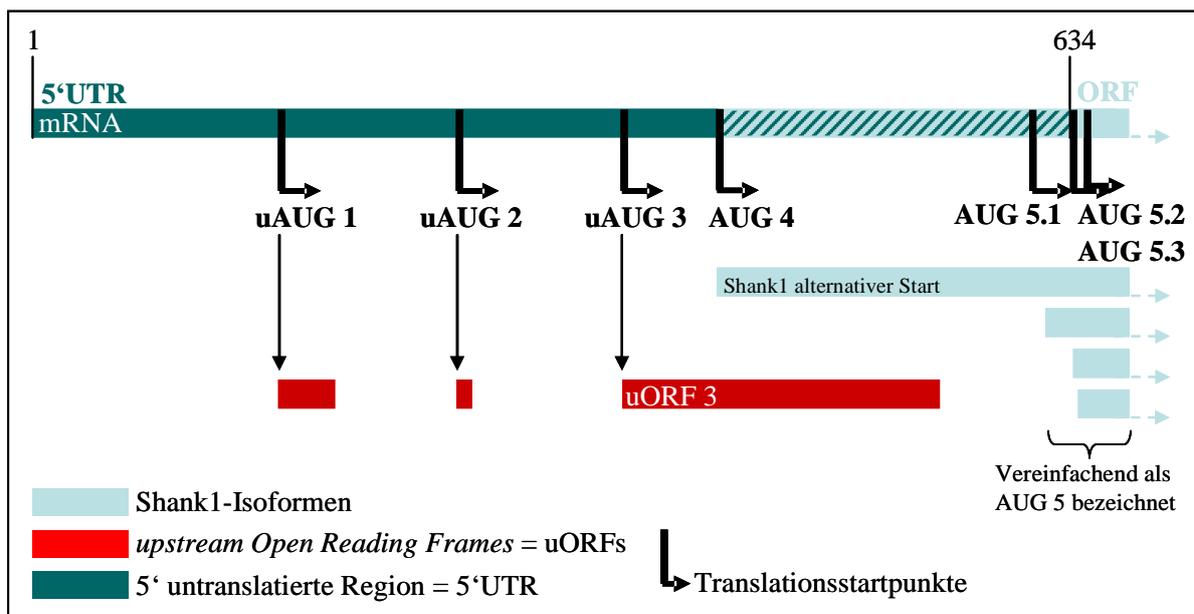


Abb. 3.16: Schematische Darstellung der Shank1-5'UTR.

Die Shank1-5'UTR besteht aus 634 Nukleotiden (türkis) und besitzt 3 *upstream* AUGs, welche mögliche Startpunkte für kurze uORFs (rot) sind. Die Translation des Shank1-ORFs (blau) kann alternativ vom 4. oder 5.AUG (5.1, 5.2, 5.3) beginnen.

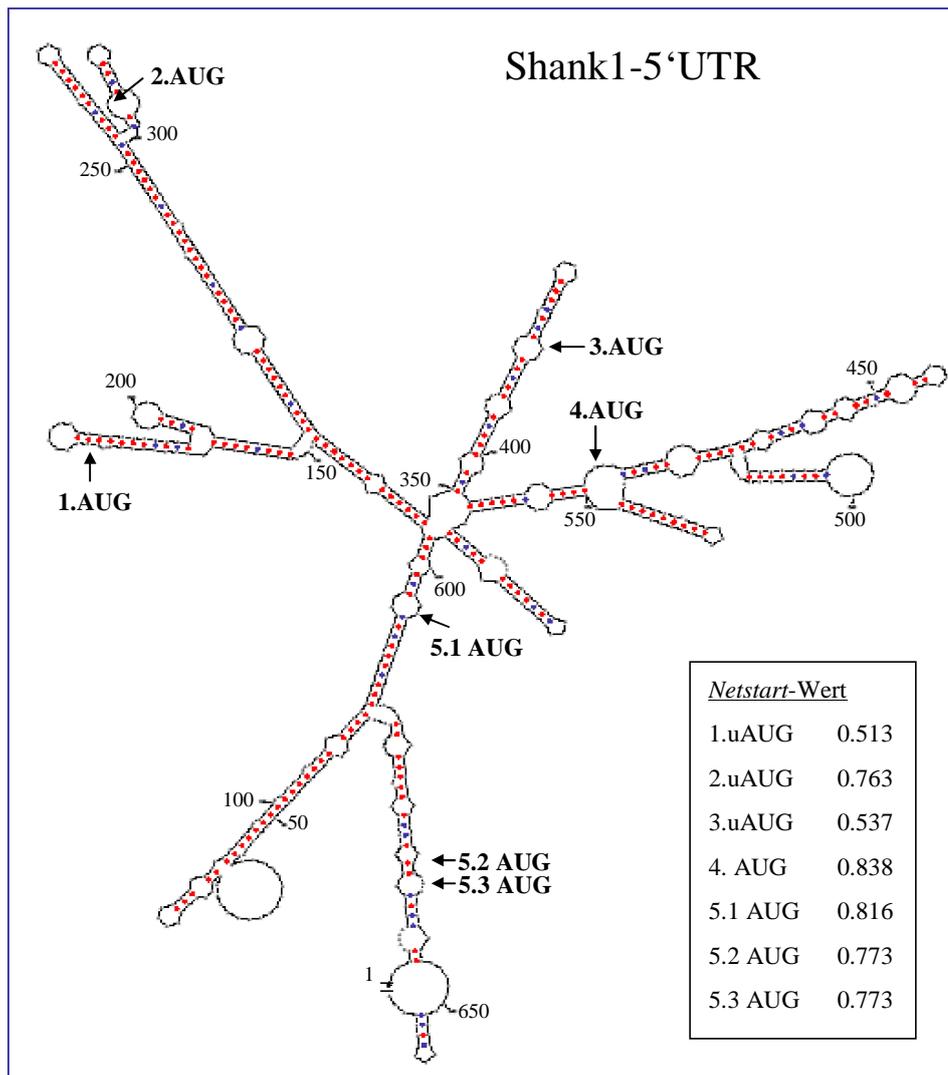


Abb. 3.17: Mögliche Sekundärstruktur der Shank1-5'UTR.

Dargestellt ist die mit dem Program *mfold* (Zuker, 2003) berechnete stabilste Sekundärstruktur der 5'UTR. Die Lage der einzelnen uAUGs und AUGs innerhalb der Haarnadelstrukturen ist durch schwarze Pfeile gekennzeichnet. Außerdem gezeigt sind die *Netstart*-Werte (Pedersen und Nielsen, 1997; schwarzer Kasten) für alle möglichen Startpunkte. Ein Wert über 0,5 bedeutet dabei die wahrscheinliche Nutzung als Startkodon.

3.2.2 Mechanismus der 5'UTR-vermittelten Translationsinhibition

Die starke Beeinflussung der Translationseffizienz durch die Shank1-5'UTR kann verschiedene Ursachen haben: komplexe und stabile Sekundärstrukturen, mögliche regulierende *trans*-agierende Faktoren oder die Translation von *upstream Open Reading Frames* (Meijer und Thomas, 2002). Mit Hilfe von Luciferase-Reporter-mRNAs wurde daher zunächst untersucht, welcher dieser Mechanismen die Shank1-Expression reguliert. Dabei konnten die jeweiligen Translationseffizienzen durch Messungen am Luminometer bestimmt werden.

3.2.2.1 Einfluss der Sekundärstruktur und *trans*-agierender Faktoren

Zunächst wurde der Einfluss der ausgedehnten Sekundärstruktur der 5'UTR untersucht (Abb. 3.18-3.20). In den dabei verwendeten Konstrukten sind jeweils ein oder mehrere der stabilen Haarnadelstrukturen der 5'UTR deletiert (Vergleich mit Abb. 3.17). Mit Hilfe von PCRs und durch die Nutzung vorhandener Restriktionsschnittstellen wurden verschiedene Deletionskonstrukte der Shank1 5'UTR hergestellt (Abb. 18) und als 5'UTR vor die *Photinus*-Luciferase kloniert (Abb. 3.19a, 20a). Nicht alle gewünschten Deletionen konnten hierbei erhalten werden, da PCRs wegen des hohen GC-Gehalts der 5'UTR nur beschränkt möglich sind und häufig ungewollte Mutationen verursachen.

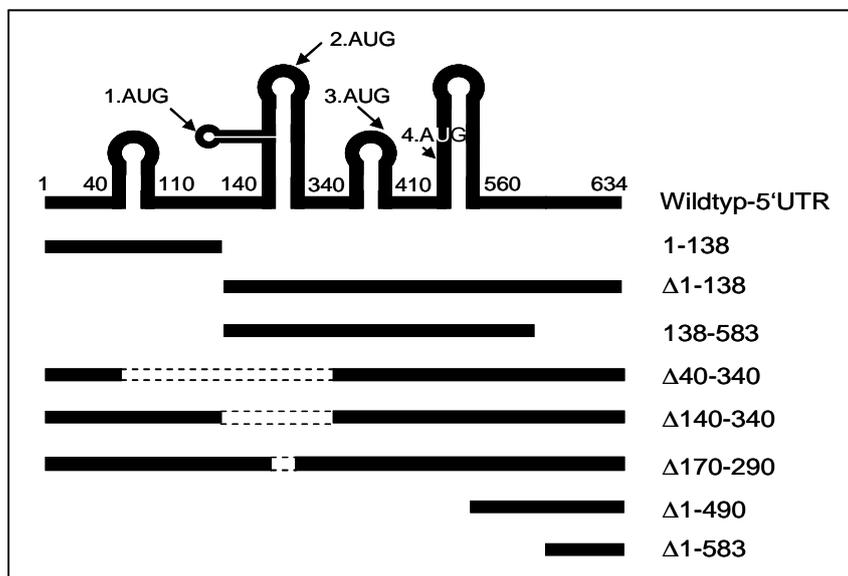


Abb. 3.18: Schematische Darstellung der verwendeten 5'UTR-Deletionskonstrukte.

Zur Veranschaulichung der deletierten Bereiche der Sekundärstruktur, sind die Haarnadelschleifen aus Abb. 3.17 vereinfacht dargestellt (Wildtyp-5'UTR). Die Positionen der uAUGs/Nukleotide sind nur im Wildtyp-Konstrukt markiert. Im Konstrukt $\Delta 170-290$ fehlt nur ein Teil der 2. Haarnadelschleife.

Für die Untersuchungen im zellfreien System wurden die Luciferase-Konstrukte zunächst *in-vitro* transkribiert und die erhaltene RNA dann in Retikulozyten-Lysaten translatiert. Diese Lysate enthalten alle notwendigen eukaryotischen Translationsfaktoren und Ribosomen, jedoch keine DNA oder RNA. Aus Abbildung 3.19 geht hervor, dass die Shank1 5'UTR die Translation der Luciferase mRNA im *in-vitro*-System sehr stark inhibiert. Auch die Deletion größerer Sekundärstruktur-Bereiche im vorderen Teil der 5'UTR führte nicht zur deutlichen Verbesserung der Translationseffizienz (Abb. 3.19 z.B. $\Delta 40-340$). Interessant ist aber, dass eine starke Sekundärstruktur allein schon das Ablesen des Transkripts verhindern kann, denn für das Konstrukt 138-583rev wurde dieser Teil der 5'UTR revers vor die Luciferase kloniert, so dass sequenzabhängige Regulationen verhindert bzw. verändert werden.

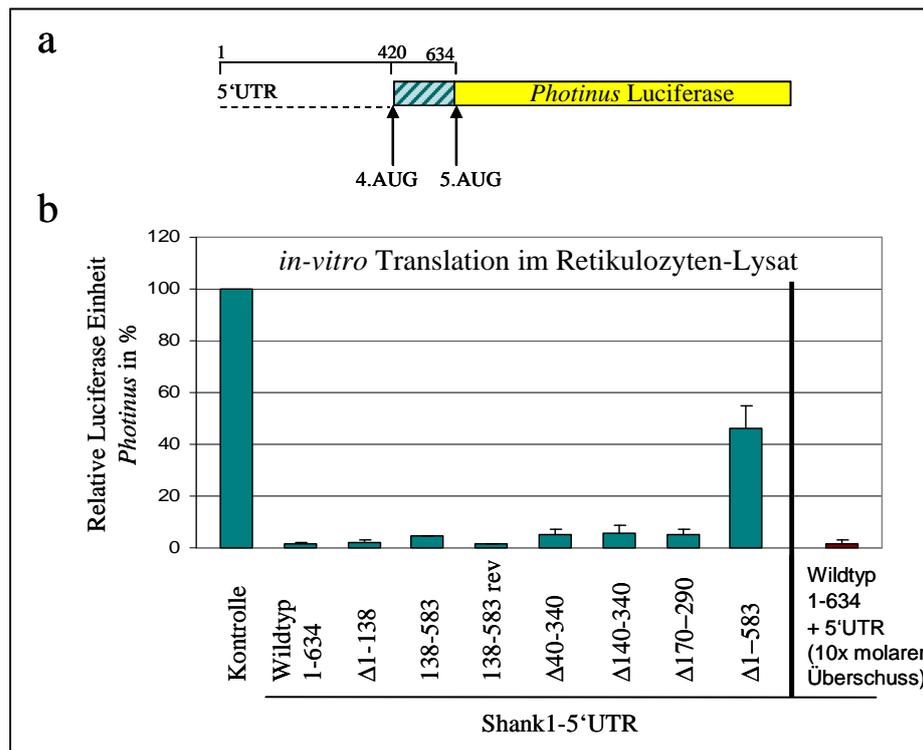


Abb. 3.19: Einfluss der 5'UTR-Sekundärstruktur auf die Translation *in-vitro*.

a: Schematische Darstellung des *in-vitro* transkribierten Luciferase-Konstrukts (gelb), der alternative ORF des 4.AUG (gestreift) liegt *in-frame* mit dem Luciferase-ORF. **b:** *In-vitro* transkribierte Luciferase-mRNA wurde in Retikulozyten-Lysaten translatiert. Die Lumineszenz wurde ins Verhältnis zur Kontrolle (Luciferase ohne 5'UTR) gesetzt und in % angegeben (grün, n=5). Deutlich wird, dass auch die Entfernung großer Sekundärstruktur-Bereiche die Translation nicht stark verbessert. Gezeigt ist auch, dass die Zugabe von 5'UTR-RNA im Überschuss (zur Konkurrenz um mögliche interagierende Faktoren) die Translation nicht signifikant erhöht (rot, n=3).

Abbildung 3.19 verdeutlicht außerdem, dass im Retikulozyten-Lysat schon die letzten 50 Nukleotide der 5'UTR die Translationsrate um 50% verringern ($\Delta 1-583$).

Ähnliche Deletionskonstrukte wurden auch in transfizierten HEK-Zellen und Neuronen untersucht. Hierbei wurden bicistronische Vektoren verwendet, bei denen die 5'UTR die Translation der *Photinus*-Luciferase mRNA reguliert (*Cap*-abhängig). Die auf demselben Transkript 3' dazu liegende Sequenz für die *Renilla*-Luciferase wird unabhängig davon mit Hilfe der EMCV-IRES (Encephalomyocarditis Virus - *internal ribosomal entry site*) translatiert. Die Lumineszenz der *Renilla*-Luciferase korreliert somit direkt mit der in der Zelle vorhandenen mRNA-Menge des transfizierten Konstrukts und kann zur Normalisierung dienen (Pedersen et al., 2002; Abb. 3.20a, Ausgangsvektor zur Verfügung gestellt von Jan Christiansen, Kopenhagen). Zur Auswertung wurden die Lichtintensitäten von *Photinus*- und *Renilla*-Luciferase ins Verhältnis gesetzt und die Werte für die einzelnen 5'UTR-Konstrukte als Prozentzahl im Bezug auf die Kontrolle ohne 5'UTR angegeben. Generell war zu beobachten, dass die Inhibition der Translation bei den *in-vitro*-Versuchen (Abb. 3.19) viel stärker war als in HEK-Zellen oder auch Neuronen (Abb. 3.20).

Dies lässt auf den Einfluss interagierender Faktoren schließen, welche in Zellen nicht aber im Retikulozyten-Lysat vorhanden sind. Abbildung 3.20 verdeutlicht, dass die Sekundärstruktur bei der Translation in kultivierten HEK-Zellen und Neuronen eher überwunden werden kann. So steigt die Translationsrate bei Deletion der ersten 490 Nukleotide von 10% auf 70%, bei Entfernung der ersten 583 Nukleotide sogar auf über 100% im Gegensatz zu 50% im *in-vitro*-Versuch (Abb. 3.19). Die Inhibition der Translation durch die 5'UTR ist in Neuronen für alle Konstrukte etwas stärker als in HEK-Zellen, dennoch ergaben sich für die Deletionskonstrukte in allen Fällen vergleichbare Luciferase-Werte. Besonders interessant ist, dass das Konstrukt 1-138 allein schon die Translation stark inhibiert, bei Deletion der Nukleotide 1-138 von der Gesamt-5'UTR aber eine weitere Reduktion der Luciferase-Aktivität zu verzeichnen ist. Dieses Phänomen wird im Punkt 3.2.3 näher erläutert.

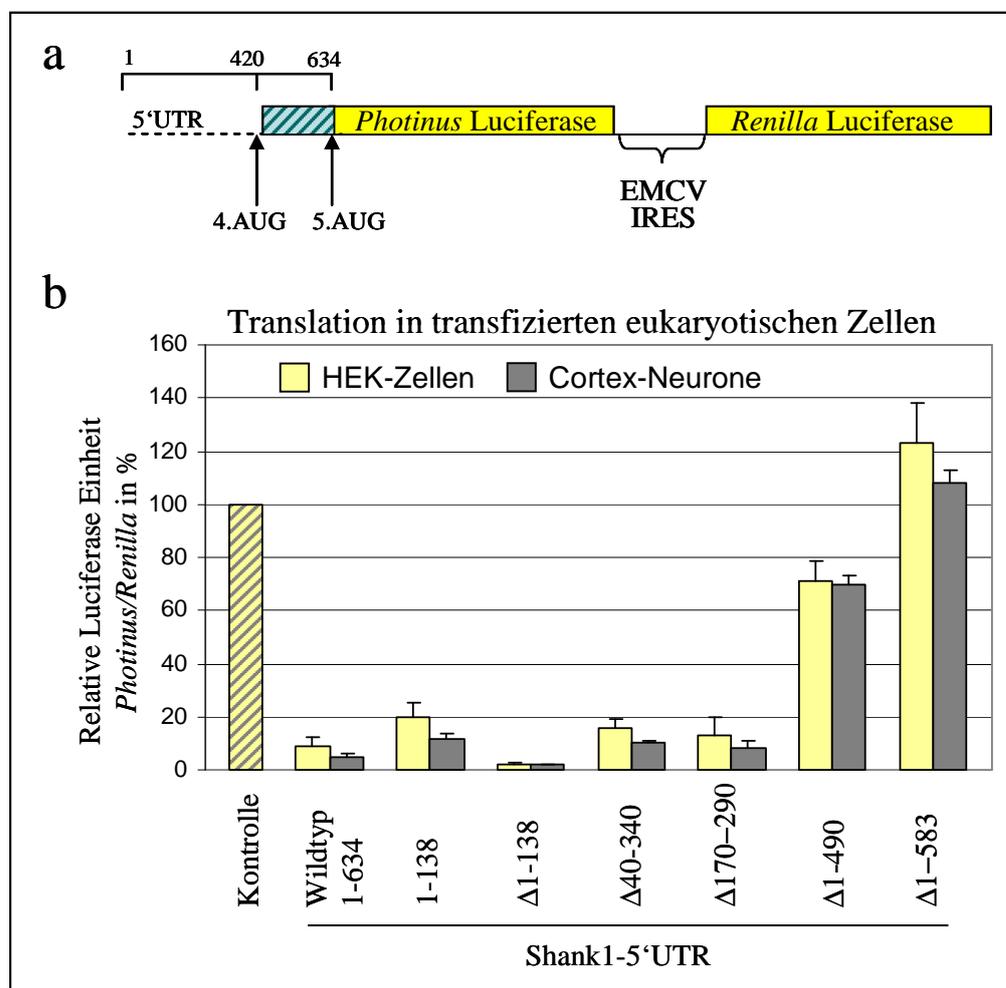


Abb. 3.20: Einfluss der Sekundärstruktur auf die Translation in kultivierten Zellen.

a: Schematische Darstellung der bicistronischen Luciferase-Konstrukte (gelb), der alternative 4.AUG-ORF (gestreift) liegt *in-frame* mit dem Luciferase-ORF. **b:** Bicistronische Luciferase-Konstrukte wurden 24h in HEK-Zellen (gelb) oder Neuronen (grau) exprimiert. Die Aktivität der *Photinus* wurde gegen die *Renilla*-Luciferase (=Transfektionskontrolle) normalisiert und die Werte der 5'UTR-Konstrukte dann im prozentualen Verhältnis zur Kontrolle ohne 5'UTR angegeben (n=5). Der Einfluss der Sekundärstruktur auf die Translation in Zellkulturen hängt stark vom jeweils deletierten Bereich ab.

Wenn nur die Faltung und Struktur der 5'UTR allein eine effektive Translation verhindern würden, hätte die Entfernung der stabilen Haarnadelschleifen die Translationseffizienz kontinuierlich verbessern müssen. Die Ergebnisse der Deletionsversuche zeigen, dass die unterschiedlichen Sekundärstruktur-Bereiche der 5'UTR (Abb. 3.17 und 18) die Translation in Luciferase-Reportersystemen jedoch unterschiedlich stark beeinflussen. Dies lässt auf zusätzliche Regulationsmechanismen schließen. Um zu untersuchen ob *trans*-agierende Faktoren die Translation verhindern, wurde im *in-vitro*-Versuch zu einem Retikulozyten-Lysat zusätzlich zum 5'UTR-Luciferase-Transkript die 5'UTR-RNA im zehnfachen Überschuss zugesetzt, so dass eventuell interagierende Faktoren von dieser kompetitiv gebunden werden. Dies führte allerdings nicht zum Anstieg der Translation des Reporter-Transkripts (Abb. 3.19). Entweder hängt die Inhibition also nicht von *trans*-agierenden Faktoren ab oder mögliche regulative Proteine oder *microRNAs* sind im Retikulozyten-Lysat nicht vorhanden.

3.2.2.2 Einfluss der Shank1 *upstream Open Reading Frames*

Um die Bedeutung der drei uORFs und des alternativen 4.AUG-ORF (Abb. 3.16) für die Shank1-Expression zu untersuchen, wurden diese vier AUGs mutiert. Dadurch könnte neben dem Verlust des Startpunktes selbst, auch durch den Verlust des kodierten Peptids oder eine geänderte RNA-Konformation die Translation beeinflusst werden (Pentecost et al., 2005). Eine Berechnung mit dem Programm: *mfold* (Zuker, 2003) zeigte, dass die Sekundärstruktur bei allen Punktmutationen nahezu unverändert ist (Daten nicht gezeigt).

Die Expression von Luciferase-Reporter-Konstrukten wurde dann, wie schon in Punkt 3.2.2.1 beschrieben, sowohl *in-vitro* (Abb. 3.21) als auch in transfizierten HEK-Zellen und Neuronen (Abb. 3.22) betrachtet. Die gemessenen Werte in HEK-Zellen und Neuronen waren für alle Konstrukte vergleichbar. Wie schon für die Sekundärstruktur-Konstrukte beobachtet, zeigten sich auch für die AUG-Mutationen *in-vitro* und in Zellkultur unterschiedliche Ergebnisse. Nur die Mutation des 1.uAUG führt in beiden Systemen nicht zu einer veränderten Translation (Abb. 3.21 und 3.22). Wenn das 2.uAUG mutiert ist, verstärkt sich interessanterweise die Inhibition der Luciferase-Expression in transfizierten Zellen (Abb. 3.22). Dies könnte z.B. bedeuten, dass die Erkennung des 2.uAUGs in der Wildtyp-5'UTR verhindert, dass ein Großteil der Ribosomen während des Scannens wegen starker Sekundärstrukturen von der mRNA abfällt. Dieser Mechanismus entspricht bekannten Beispielen, wobei uORFs die Re-Initiation an dahinter gelegenen Startpunkten ermöglichen (Krummheuer et al., 2007).

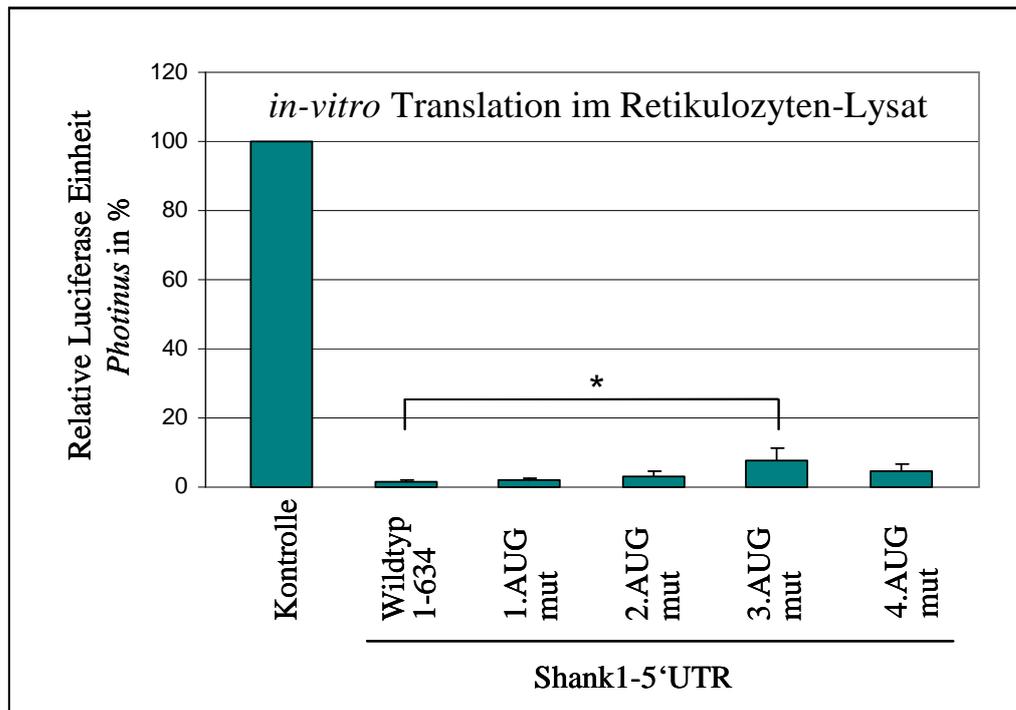


Abb. 3.21: Einfluss der *upstream Open Reading Frames* auf die Translation *in-vitro*.

Schematische Darstellung des *in-vitro* transkribierten Luciferase-Konstrukts und Durchführung: siehe Abb. 3.19. Nur die Mutation des 3.uAUGs führt zum leichten Anstieg der Translation (* $p < 0,05$).

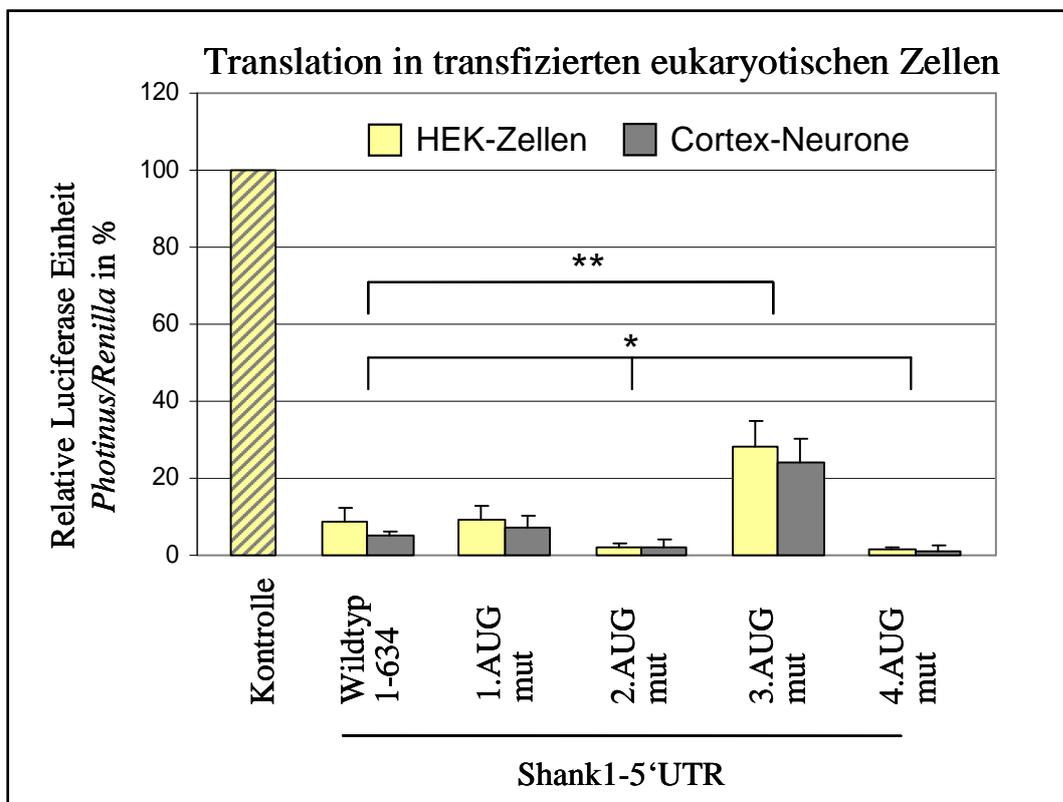


Abb. 3.22: Einfluss der uORFs auf die Translation in kultivierten Zellen.

Schematische Darstellung der bicistronischen Luciferase-Konstrukte und Durchführung: siehe Abb. 3.20. Die Mutationen des 2.uAUG und 4.AUG verringern die Translation im Vergleich zur Wildtyp-5'UTR sogar noch (* $p < 0,002$), die Mutation des 3.uAUGs erhöht die Luciferase-Expression dagegen um das 3fache (** $p < 0,002$).

Die Mutation des alternativen 4.AUG-Startpunktes verringert in HEK-Zellen und Neuronen ebenfalls die Luciferase-Aktivität enorm. Da es sich bei der gemessenen Lumineszenz der Wildtyp-5'UTR-Konstrukte vermutlich um einen aus der 4.AUG- und 5.AUG-Isoform addierten Wert handelt (siehe auch Abb. 3.20a), war ein geringerer Wert nach Mutation des 4.AUG auch zu erwarten.

Die Mutation des 3.uAUGs führt hingegen zur dreifachen Erhöhung der Translationseffizienz, sowohl *in-vitro* als auch in transfizierten Zellen. Die verbesserte Translation nach Mutation des 3.uAUGs ist besonders interessant, da der 3.AUG-uORF vor dem 4.AUG (längere alternative Isoform) startet, mit diesem überlappt und erst kurz vor dem 5.AUG (kürzere Isoform) stoppt (Abb. 3.16). Vorstellbar wäre also folgendes Modell der Translationsregulation der Shank1-Isoformen: Falls das 3.uAUG vom Ribosom erkannt und abgelesen wird, kann das 4.AUG nicht mehr genutzt werden, so dass nur die kürzere 5.AUG-Isoform durch Re-Initiation entsteht. Wird das 3.uAUG aber überlesen, so kommt es zur Initiation der Translation am 4.AUG und damit nur zur Entstehung der längeren Isoform.

Um zu untersuchen, ob dieses Modell tatsächlich für die Translation der Shank1 mRNA zutrifft, wurden cDNA-Konstrukte genutzt, welche die 5'UTR und einen großen Teil der Shank1-Sequenz enthalten (Abb. 3.23c). Aus Abbildung 3.23a geht hervor, dass vom transfizierten Wildtyp- Shank1-Transkript beide Isoformen ungefähr gleich stark abgelesen werden (ShankPDZ-Antikörper) und es sich bei der größeren Isoform tatsächlich um den 4.AUG-Startpunkt handelt (ShankNT-Antikörper = alternativer N-Terminus). Nach dem schon beschriebenen Modell der Regulation durch den 3.uORF wird also möglicherweise in einem Teil der Transkripte das 3.uAUG erkannt und somit die kurze Isoform abgelesen. Bei der anderen Hälfte der mRNA wird das 3.uAUG nicht abgelesen und daher kann die längere Shank1-Isoform entstehen. Daher würde man erwarten, dass nach Mutation des 3.uAUG nur noch die längere Shank1-Isoform entsteht. Wie in Abbildung 3.23a deutlich wird, änderte sich durch diese Mutation am Verhältnis der vom 4. und 5.AUG ausgehenden Isoformen jedoch nichts. Interessanterweise kam es aber zu einer dritten, noch etwa 12 kDa größeren distinkten Bande. Diese wurde sowohl vom PDZ- als auch vom N-Terminus-Antikörper erkannt (Pfeile in Abb. 3.23a und c). Um Klonierungsartefakte auszuschließen, wurden die Konstrukte noch einmal sequenziert und mit verschiedenen Restriktionsschnittstellen sowie in andere Vektoren kloniert. Mit diesen Kontrollen und in anderen Reportersystemen (siehe auch Abb. 3.24 und 3.28) wurde dennoch immer wieder die relativ stark exprimierte größere Bande im Western Blot erhalten.

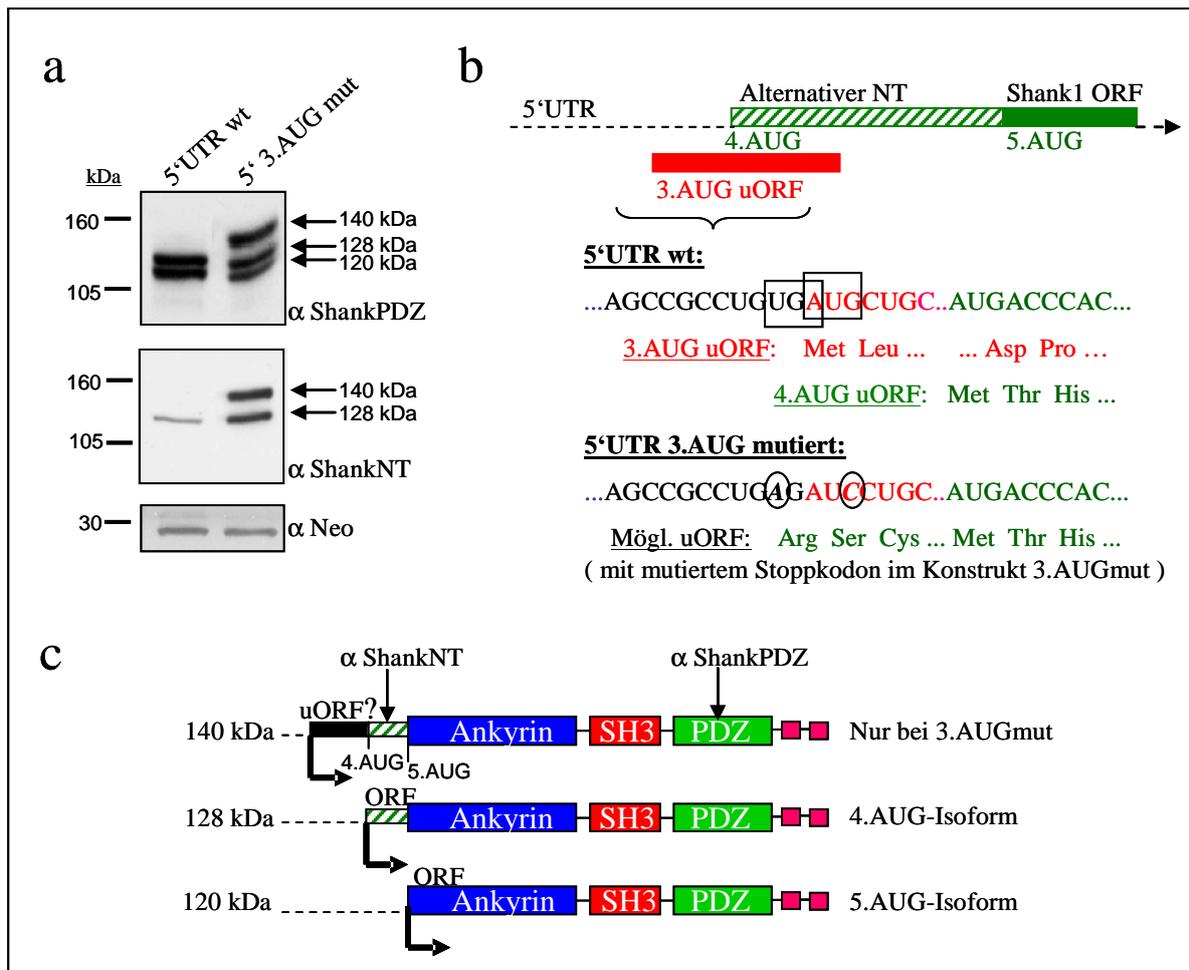


Abb. 3.23: Das 5'UTR-Wt-Transkript führt zur Expression beider Shank1-Isoformen und nach Mutation des 3. uORFs entsteht zusätzlich eine dritte, größere Isoform.

a: In HEK-Zellen wurden die Shank1-Konstrukte 24h exprimiert, die Zellen lysiert und im 6%igen SDS-Gel aufgetrennt. Mit ShankPDZ-Antikörpern erhält man für die Wildtyp-5'UTR zwei Banden (4.AUG-128kDa und 5.AUG-120kDa-Isoform). Der 4.AUG-Start wurde mit dem αShank1 N-Terminus(NT)-Antikörper bestätigt. Wenn der 3.uORF mutiert ist, erhält man eine zusätzliche distinkte Bande (140kDa). (Transfektionskontrolle=Neomycin-Phosphotransferase; kDa=Kilodalton).

b: Schematisch dargestellt ist der von der Mutation des 3.uORFs (rot) betroffene Bereich der 5'UTR sowie verursachte Sequenz-/Leserahmenänderungen. Die Überlappung des 3.uAUGs mit dem möglichen Stoppkodon eines unbekanntes uORFs ist umrahmt, mutierte Basen sind kursiv (Kreis) dargestellt. **c:** Schematische Darstellung der im Blot erkannten Isoformen. Die längste Form entsteht nur nach Mutation des 3.AUG und könnte an unbekannter Stelle stromaufwärts beginnen.

In quantitativen *Real-Time*-PCRs wurde außerdem nachgewiesen, dass auch die mRNA-Menge durch die Mutation nicht verändert ist (Daten nicht gezeigt). Das Entstehen der größeren Bande nach Transfektion des 3.AUGmut-Konstrukts muss also in der Struktur der 5'UTR selbst begründet sein. Zum besseren Verständnis der 3.uAUG-Mutation ist daher in Abbildung 3.23b die exakte Sequenz dargestellt. Das AUG wurde zu einem AUC mutiert. Es mussten hierbei neue Restriktionsschnittstellen eingefügt werden; daher ist auch ein 2 Nukleotide vor dem AUG liegendes U zu einem A verändert. Interessanterweise wird hierbei ein mit dem 3.uAUG überlappendes mögliches UGA-Stoppkodon zu AGA mutiert (Abb. 3.23b, schwarze Kästen).

Ein möglicherweise zu diesem Stoppkodon gehörender uORF (Abb. 3.23c) läuft durch die Mutation zufällig *in-frame* in den 4. und 5.AUG-Leserahmen. Das resultierende Protein könnte daher von den Shank-Antikörpern tatsächlich erkannt werden. Ein zu diesem möglichen uORF gehörendes AUG konnte in der 5'UTR jedoch nicht gefunden werden.

Außerdem wurde auch die Isoformenverteilung nach Mutation der anderen uAUGs betrachtet. Hierbei wurden Konstrukte aus 5'UTR und der Shank1-PDZ-Domäne verwendet, da diese nur etwa 15kDa groß ist und somit die Isoformen anhand ihrer Größe besser aufgetrennt werden können. Abbildung 3.24 zeigt, dass nur nach Mutation des 3.uAUGs die zusätzliche größere Bande auftritt. Das in Abb. 3.24b dargestellte PDZ-Konstrukt wurde im Folgenden auch für die Proteinsequenzierung dieser Bande eingesetzt (Abschnitt 3.2.3.1).

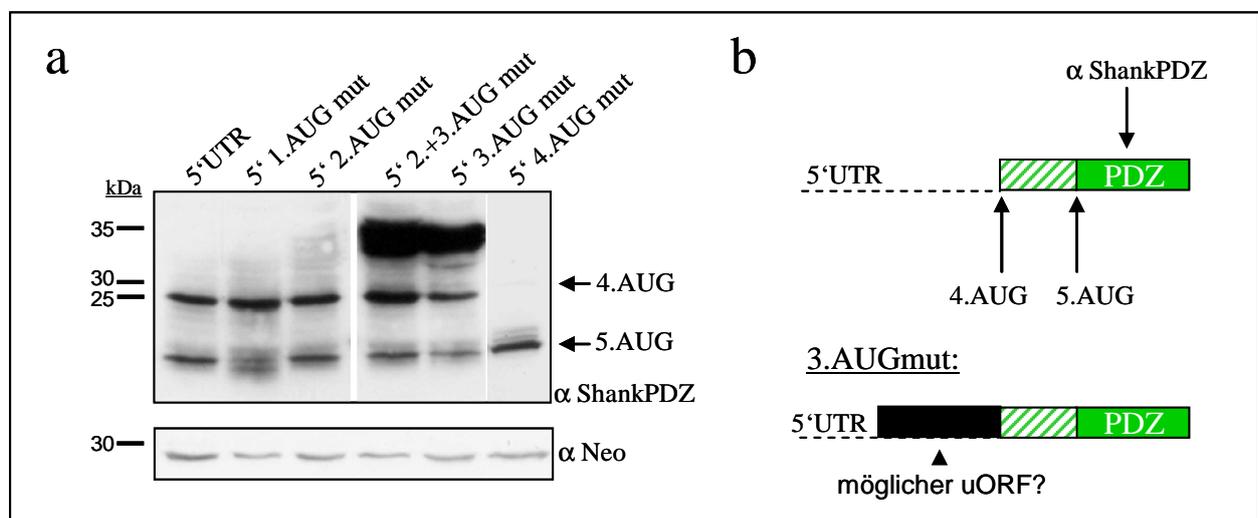


Abb. 3.24: Nur die Mutation des 3.uAUGs führt zu einer 3.Bande im Western Blot.

a: Die 5'UTR-PDZ-Konstrukte wurden 24h in HEK-Zellen exprimiert, diese dann lysiert und im 15%-SDS-Gel aufgetrennt. Im Western Blot mit dem Shank-PDZ-Antikörper zeigte sich, dass die höhere Bande nur bei den beiden 3.AUGmut-Konstrukten auftritt. Bei Mutation des 4.AUG entfällt wie erwartet die alternative größere Isoform. (Neo=Transfektionskontrolle, kDa=Kilodalton)

b: Schematische Darstellung des verwendeten Reporter-Konstrukts und mögliche Erklärung für die größere Bande bei 3.AUGmut.

3.2.3 Regulation der Translation der Shank1 mRNA durch einen *non-AUG upstream Open Reading Frame*

3.2.3.1 Nachweis des uORFs durch Proteinsequenzierung

Zunächst wurde untersucht, ob es sich bei der zusätzlichen Bande im Konstrukt 3.AUGmut tatsächlich um ein von einem unbekanntem uORF ausgehendes Protein handelt. Hierfür wurde das PDZ-Konstrukt (Abb.3.24b) in HEK-Zellen exprimiert und die erhaltenen drei Isoformen über GKAP-Sepharose aufgereinigt.

Daher konnte leider nicht gezeigt werden, ob die erste Aminosäure dem herkömmlichen Methionin oder dem von ACG tatsächlich kodierten Threonin entspricht (Bsp. für Übersetzung eines CUG-Startkodons in Leucin: Nemeth et al., 2007). Abbildung 3.26 stellt noch einmal den aus Abbildung 3.16 bekannten Aufbau der 5'UTR dar (nt und Peptidsequenzen siehe Anhang Abb. 7.1). Zusätzlich ist hier die Position des ACG-uORFs dargestellt, der interessanterweise mit dem 3.uAUG überlappt und somit dessen Translation verhindern könnte.

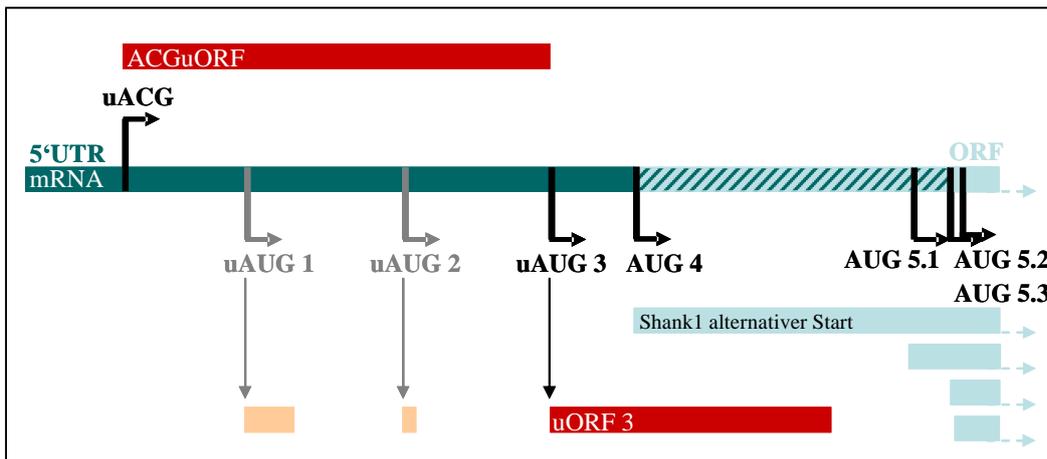


Abb. 3.26: Schematische Darstellung der Shank1-5'UTR.

Zusätzlich zu dem in Abb. 3.16 erklärten Aufbau der 5'UTR ist hier die Position des *non-AUG*-uORFs mit einem ACG-Startkodon gekennzeichnet, dessen Stoppkodon mit dem 3.uAUG überlappt (rot).

3.2.3.2 Nachweis des uORF-Peptids in transfizierten Zellen

Die aus uORFs synthetisierten Peptide werden nach ihrer Translation häufig gleich abgebaut. Sie können aber auch regulatorisch wirken z.B. durch Interaktion mit Komponenten der Translationsmaschinerie, wobei auch die Peptidsequenz selbst von Bedeutung sein kann (Lovett und Rogers, 1996). Abbildung 3.27 zeigt, dass ACG tatsächlich als Startkodon fungiert und das davon gestartete uORF-Peptid in transfizierten HEK-Zellen stabil ist. Hierfür wurde nur der 12kDa große uORF-Bereich C-terminal mit dem *Flag-Tag* fusioniert.

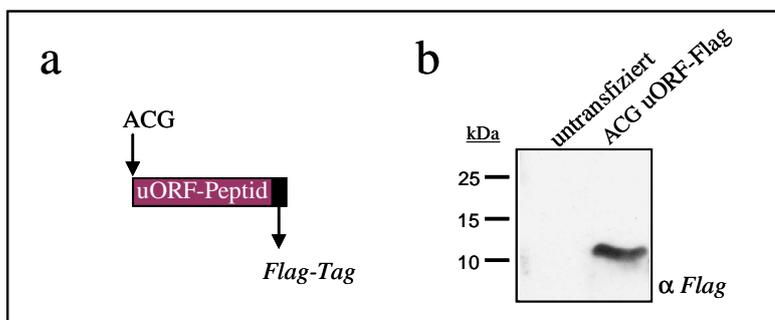


Abb. 3.27: Das ACG-uORF-Peptid wird in HEK-Zellen stabil exprimiert.

a: Schematische Darstellung des verwendeten ACG-uORF-Konstrukts mit C-terminalem *Flag-Tag*.

b: Dieses wurde 24h in HEK-Zellen exprimiert. In speziellen Tricin-Gelen für kleine Proteine wurde nachgewiesen, dass das entstehende 12kDa-Peptid in diesen Zellen stabil ist. (kDa = Kilodalton)

3.2.3.3 Charakterisierung möglicher Translationsstartpunkte mit Hilfe spezifischer Antikörper

Zur weiteren Charakterisierung des ACG-uORFs wurden die Wildtyp-5'UTR bzw. das Konstrukt mit der Mutation des 3.AUG (gleichzeitig ACG-Stoppkodon-Mutation) in mRFP-Vektoren kloniert. Zunächst sollten die, nach Transfektion des mutierten Konstrukts in HEK-Zellen, erhaltenen Western Blot-Banden mittels verschiedener Antikörper identifiziert werden. Ein mRFP-Antikörper erkennt dabei alle erwarteten Banden des ACG-, 4.AUG- und 5.1 AUG- bzw. 5.2/5.3 AUG-Startpunkts (Abb. 3.28b; siehe auch Abb. 3.26). Der gegen den alternativen Shank1 N-Terminus gerichtete Antikörper markiert hingegen wie erwartet nur die ACG- und 4.AUG-Bande (Abb. 3.28c). Außerdem wurde ein für das ACG-uORF-Peptid spezifischer Antikörper hergestellt (Abb. 3.28d). Dieser beweist zusätzlich die Identität der erhaltenen dritten Bande für das Konstrukt 3.AUGmut (Abb. 3.28a).

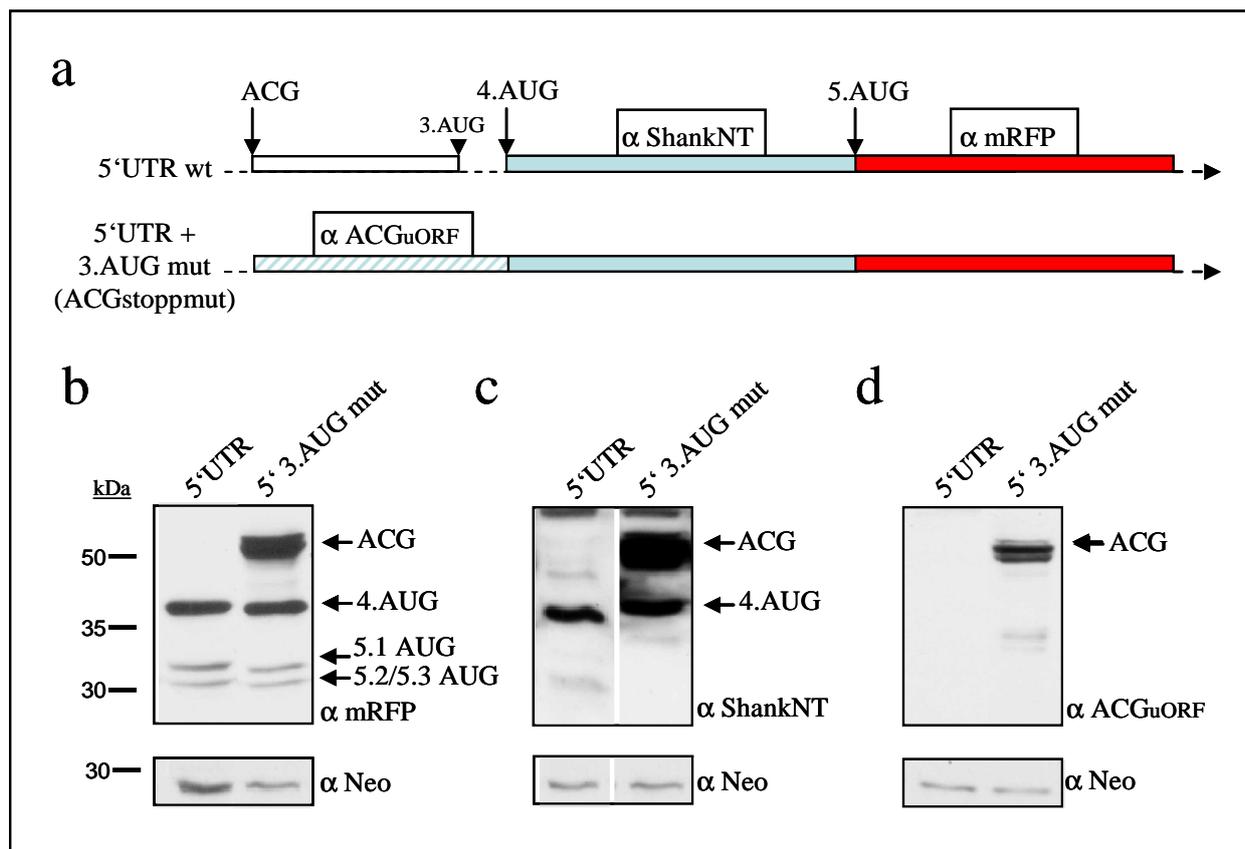


Abb. 3.28: Nachweis der Identität der einzelnen Isoformen mit spezifischen Antikörpern. Die mRFP-Konstrukte (Wildtyp-5'UTR und 3.AUGmut) wurden 24h in HEK-Zellen exprimiert, die Zellen lysiert und im 10%-SDS-Gel analysiert. (Neo = Transfektionskontrolle, kDa = Kilodalton)

a: Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte: mRFP ist rot, der alternative N-Terminus blau und der ACG-uORF weiß bzw. gestreift dargestellt. **b:** Western Blot mit einem mRFP-Antikörper. **c:** Western Blot mit Antikörper gegen den alternativen Shank1-N-Terminus. **d:** Western Blot mit ACG-uORF-Antikörper, der die Existenz dieses *non-AUG*-uORFs bestätigt.

Der ACG-uORF-Antikörper wurde gegen das humane Peptid gerichtet, da die entsprechende Sequenz für Maus und Ratte unbekannt ist. Sowohl in Maus- als auch in Ratten-Hirnlysate konnte keine uORF-Bande nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise gibt es hier keinen solchen uORF oder er unterscheidet sich zu stark in der Peptidsequenz. Humane Hirn- oder Neuronenlysate standen leider nicht zur Verfügung um die Existenz des uORF-Peptids endogen in Hirngewebe nachzuweisen.

3.2.3.4 Einfluss der 3'UTR auf die Translation des ACG-uORFs und der Shank1-Isoformen

Bei der Regulation der Translation spielt in vielen Fällen auch die 3'UTR eine Rolle. Diese kann über interagierende Faktoren wie PABP oder hnRNP-K mit der 5'UTR räumlich assoziiert sein (Komarova et al., 2006), weshalb auch der Einfluss der Shank1-3'UTR auf die Translation und Verteilung der Shank1-Isoformen betrachtet wurde. Hierzu konnte die 3'UTR (Nukleotide 1-588) stromabwärts der vorhandenen mRFP-Konstrukte kloniert werden. Abbildung 3.29 zeigt, dass die 3'UTR die Translation nur wenig beeinflusst. Auch das Verhältnis der translatierten Isoformen ändert sich bei den 5'UTR-Konstrukten nicht.

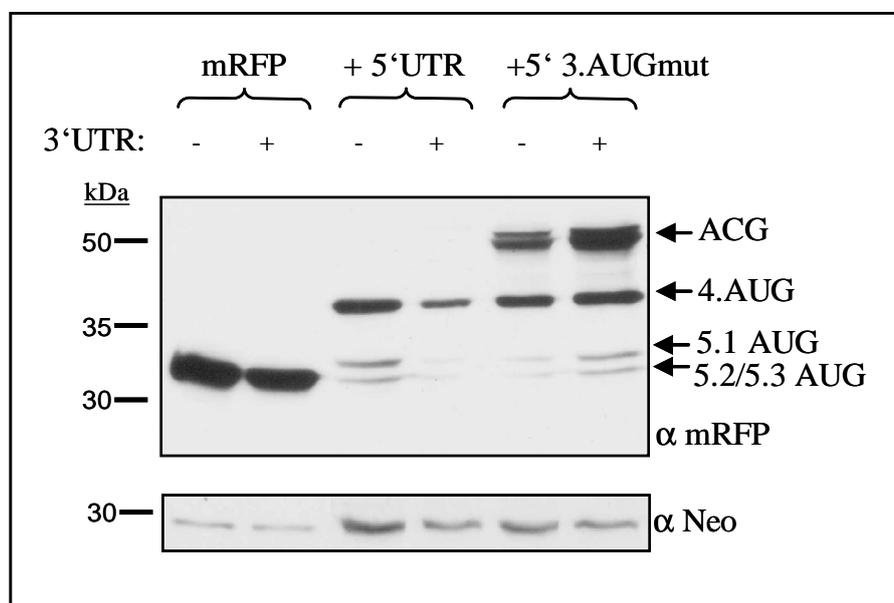


Abb. 3.29: Die Verteilung der Shank1-Isoformen und des ACG-uORF wird von der 3'UTR nicht beeinflusst.

Die mRFP-Konstrukte (Wildtyp 5'UTR und 3.AUGmut jeweils ohne oder mit 3'UTR) wurden 24h in HEK-Zellen exprimiert, die Zellen lysiert und im 10%-SDS-Gel analysiert. Der Western Blot mit mRFP-Antikörper zeigt, dass die Shank1-3'UTR die Translation der Isoformen insgesamt nur wenig beeinflusst. (Neo = Transfektionskontrolle, kDa = Kilodalton)

3.2.3.5 Einfluss des ACG-uORFs auf die Translation der Shank1 mRNA

Um zu untersuchen welchen Einfluss der ACG-uORF auf die Expression und das Verhältnis der 4.AUG/5.AUG Isoformen zueinander hat, wurden deletierte und ACG-mutierte Konstrukte hergestellt. Diese wurden sowohl im mRFP- als auch im Luciferase-Reportersystem analysiert.

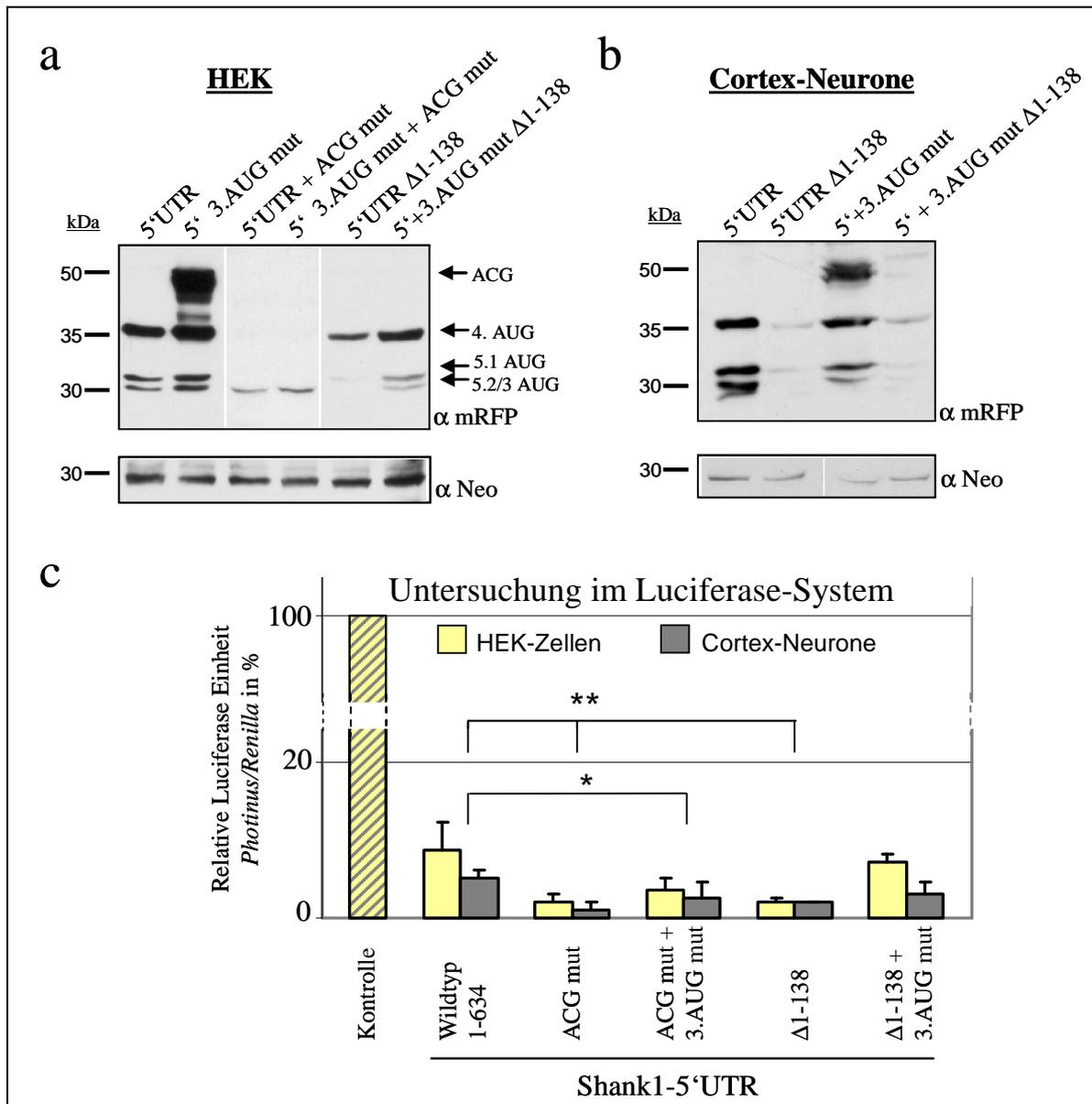


Abb. 3.30: Die Deletion oder Mutation des *upstream* ACGs verändert die Shank1-Translationseffizienz und die Nutzung des 4. und 5.AUG.

a: Durchführung wie in Abb. 3.28. Deletion und Mutation des ACGs verringern stark die Translations-effizienz und verhindern wie erwartet die zusätzliche Bande bei 3.AUGmut (= ACGstoppmut). Nach ACG-Mutation wird nur noch die 5.AUG-Isoform exprimiert. **b:** Cortex-Neurone wurden an *div7* transfiziert und 2Tage später lysiert. Auch hier reduziert die Deletion des ACGs die Translation *div7* mRNA deutlich. (Neo=Transfektionskontrolle, kDa=Kilodalton) **c:** Die Expression bicistronischer Luciferase-Konstrukte in HEK-Zellen erfolgte wie in Abb. 3.20 beschrieben. Deletion und besonders auch die Mutation des ACGs führte zu geringeren Luciferase-Werten im Vergleich zur Wildtyp-5'UTR (*p<0,05; **p<0,002).

Die Deletion der Nukleotide 1-138 und damit des ACG-Startpunktes (nt 84-86) führte interessanterweise zur deutlichen Verringerung der ohnehin schon durch die 5'UTR inhibierten Translation (Abb. 3.30a, b und c; siehe auch Abschnitt 3.2.2.1 Abb. 3.20). Wenn das ACG nicht deletiert, sondern durch Punktmutation zu AAG verändert wurde, so nahm die Translationseffizienz überraschenderweise sogar noch stärker ab und das Verhältnis der Isoformen des 4. und 5.AUG-Startpunktes verschob sich deutlich (Abb. 3.30a und c). Im Western Blot kann im Gegensatz zum Deletionskonstrukt nur noch die 5.2/5.3 AUG-Bande nachgewiesen werden (Abb. 3.30a; siehe auch Abbildung 3.26). Für die ACG-mutierten Konstrukte konnte in Cortex-Neuronen leider gar keine Proteinexpression mehr nachgewiesen werden, da die Transfektionseffizienz im Vergleich zu HEK-Zellen zu gering war. Die Ergebnisse zeigen, dass der ACG-uORF die Translation in der Wildtyp-5'UTR erst ermöglicht und damit eine wichtige Rolle für die Shank1-Expression spielt. Außerdem beeinflusst der *non-AUG*-Startpunkt auch die Nutzung der stromabwärts gelegenen Shank1-Startkodons.

Die Initiation an *non-AUG* Startpunkten wird nicht nur von stabilen Sekundärstrukturen gefördert (Kozak, 1990), sondern kann auch vom Phosphorylierungsstatus des Initiationsfaktors eIF2 α abhängen (Schwab et al., 2004). Dieser ist Bestandteil des ternären Komplexes mit GTP und der Initiator-Methionyl-t-RNA und lädt diese auf die 40S-Ribosomen-Untereinheit. Die eIF2 α -Phosphorylierung inhibiert die Translation der meisten Transkripte. Einige wenige mRNAs werden aber auch in ihrer Translation gefördert, dazu gehören Transkriptionsfaktoren wie ATF4 oder GCN4 (Harding et al., 2000; Hinnebusch, 2005). Die Regulation erfolgt hierbei über eine veränderte Expression von uORFs, wobei die Phosphorylierung des eIF2 α die Re-Initiation an stromabwärts liegenden Startkodons erleichtert. Daher wurde auch der Einfluss dieses Initiationsfaktors auf die Translation der Shank1 mRNA untersucht. Verwendet wurden die Zellgifte Thapsigargin und Natrium-Arsenit, die auf verschiedenen Signalwegen die Phosphorylierung von eIF2 α induzieren. Abbildung 3.31 zeigt, dass diese Behandlungen weder die Menge noch Isoformenverteilung der transfizierten mRFP-Reporter-Proteine (siehe auch Abb.3.28a) in HEK-Zellen und Cortex-Neuronen verändern. Dies zeigt, dass die ACG-uORF-Erkennung und damit die Translation des 4.- und 5.AUG-ORFs nicht von diesem Initiationsfaktor reguliert werden. Andererseits verringert sich die mRFP-Expression auch nicht deutlich, obwohl die Phosphorylierung von eIF2 α allgemein die Translation der meisten Transkripte hemmt. Mögliche Effekte könnten jedoch durch die starke Überexpression oder hohe Stabilität der transfizierten mRFP-Konstrukte überdeckt sein.

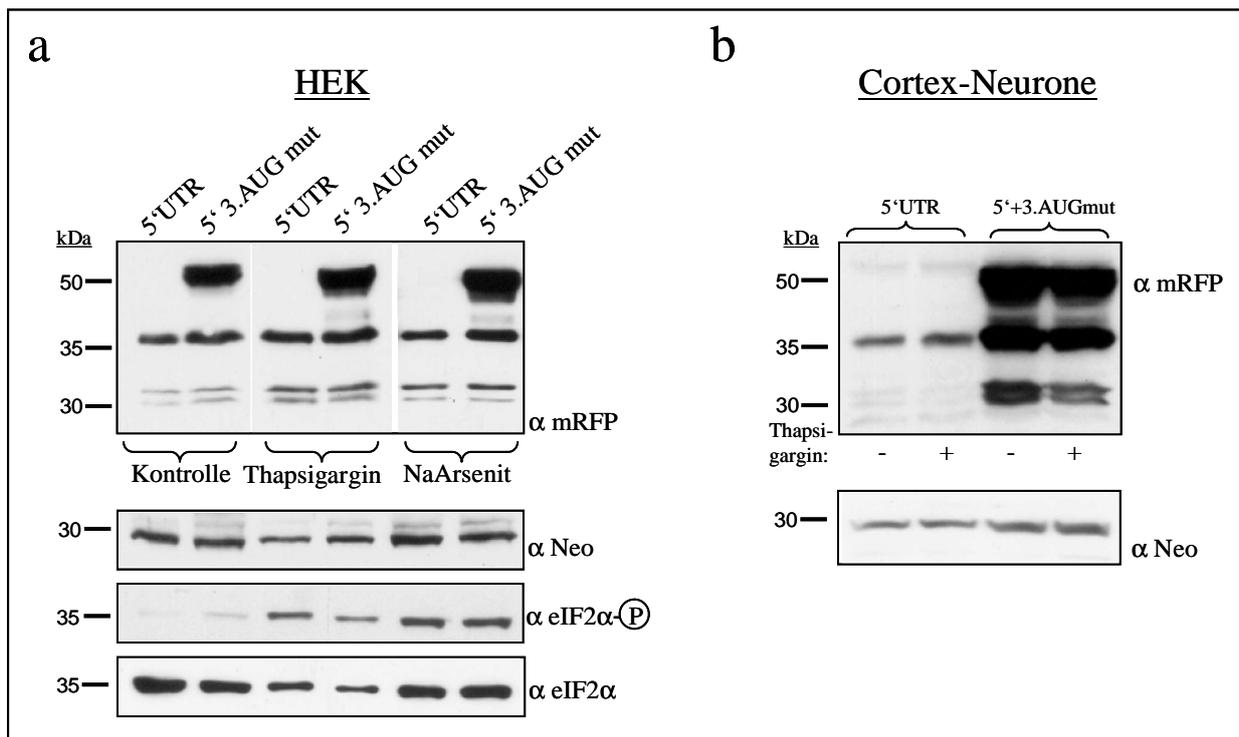


Abb. 3.31: Der Phosphorylierungsstatus des Initiationsfaktors eIF2 α hat keinen Einfluss auf die Nutzung des Shank1 ACG-uORFs oder des 4. und 5. Startkodons.

a: mRFP-Konstrukte wurden 24h in HEK-Zellen exprimiert, diese dann über Nacht mit DMSO (Kontrolle), Thapsigargin (1 μ M) oder Natrium-Arsenit (50 μ M) behandelt, lysiert und im 10%-SDS-Gel aufgetrennt. Mit einem Antikörper gegen die phosphorylierte Form von eIF2 α wurde die Wirkung der eingesetzten Gifte nachgewiesen. Der Phosphorylierungsstatus des eIF2 α hat jedoch keinen Einfluss auf die Regulation der Translation der Shank1 mRNA. **b:** Cortex-Neurone wurden an *div 7* transfiziert, wie in **a** behandelt und 2 Tage später lysiert. Auch hier ergab sich kein Unterschied in der Isoformen-Verteilung. (Neo = Transfektionskontrolle, kDa = Kilodalton)

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Translation der Shank1 mRNA durch eine Kombination verschiedener Regulationsmechanismen gesteuert wird. Von besonderer Bedeutung sind dabei die *upstream Open Reading Frames*, insbesondere ein neu entdeckter *non-AUG*-uORF am Beginn der 5'UTR.

4. Diskussion

Um nach synaptischer Aktivierung oder während der Entwicklung die Struktur von Synapsen zu verändern, könnten Proteine vom Soma selektiv zum betroffenen Kontakt transportiert werden (Frey und Morris, 1997). Eine weitere sowie schnellere Veränderung z.B. der Zusammensetzung der postsynaptischen Dichte (PSD) kann durch gezielten Proteinabbau (Ehlers, 2003) oder die Translation dendritisch lokalisierter mRNAs vermittelt werden (Jiang und Schuman, 2002). Die mRNA des PSD-Gerüstproteins Shank1 ist in verschiedenen Gehirnregionen dendritisch lokalisiert. In kultivierten Neuronen konnte gezeigt werden, dass diese Lokalisation von einem *dendritic targeting element* (DTE) in der 3'UTR vermittelt wird (Böckers et al., 2004). Die außergewöhnlich lange und GC-reiche 5'UTR von Shank1 weist außerdem auf eine komplexe Regulation der Translationsinitiation hin. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der Einfluß der untranslatierten Regionen auf den Shank1 mRNA-Transport und die Translation genauer untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die endogene Shank1 mRNA in kultivierten Hippokampus-Neuronen ab dem 8.Tag der Differenzierung dendritisch lokalisiert ist. Der dendritische mRNA-Transport und die lokale Shank1-Proteinsynthese könnten also schon während der Entwicklung des Gehirns und der Reifung synaptischer Kontakte von Bedeutung sein. Die Anzahl der Shank1 mRNA-Granula nimmt vom 8. bis zum 21.Tag in Kultur sowohl im Soma, als auch in den Dendriten stark zu, nicht aber in Axonen. Auch die Expression des Shank1 Proteins steigt im Gehirn vom 7.-14.Tag postnatal stark an (Lim et al., 1999). Die Reifung dendritischer Dornen und vermehrte Synaptogenese wird in kultivierten Neuronen im gleichen Zeitraum beobachtet (Verderio et al., 1999; Huang et al., 2006). Dass die mRNA nicht nur in einem bestimmten Entwicklungszeitraum, sondern auch in ausdifferenzierten Neuronen in die Dendriten transportiert wird, könnte bedeuten, dass Shank1 an der Synapse für den Umbau der PSD nach synaptischer Aktivierung lokal synthetisiert werden muss.

Der dendritische Transport überexprimierter GFP-Shank1 mRNAs hängt von der 3'UTR ab. Die synaptische Lokalisation des GFP-Shank1 Proteins wird von der 3'UTR jedoch nicht beeinflusst. Dies deutet darauf hin, dass Shank1 auch im Soma synthetisiert und zur Synapse transportiert werden kann. Untersuchungen von Gerrow et al. (2006) zeigten, dass vorgeformte Komplexe der postsynaptischen Proteine PSD-95, GKAP/SAPAP1 und Shank Aktin-abhängig entlang der Dendriten bewegt werden können.

Vorstellbar wäre, dass Shank1 zum Aufbau neuer PSDs und Synapsen im Soma translatiert und in die Dendriten transportiert wird. Die lokale Translation der Shank1 mRNA könnte dann für die synaptische Plastizität z.B. bei der Langzeitpotentierung (LTP) von Bedeutung sein. Dabei könnte ein synaptisches Signal entweder generell die Proteinsynthese im Bereich der aktivierten Synapse oder nur die Translation spezifisch regulierter mRNAs verändern (Schuman et al., 2006).

Um den Shank1 mRNA-Transport in lebenden Neuronen zu visualisieren, wurde das GFP-MS2-System verwendet. Eine transfizierte Reporter-mRNA mit den MS2-RNA-*Loops* und dem Shank1-DTE wurde dabei vom GFP-MS2-Protein gebunden, so dass die Bewegung der mRNA-Partikel durch die GFP-Fluoreszenz beobachtet werden konnte. *In-situ*-Hybridisierungen zeigten, dass alle dendritischen, GFP-MS2-positiven Granula tatsächlich die Reporter-mRNA enthielten. In *Time-lapse*-Analysen konnte somit spezifisch die Dynamik des mRNA-Transports analysiert werden. Die in dieser Arbeit ermittelten durchschnittlichen Transportgeschwindigkeiten von 1-2 $\mu\text{m}/\text{min}$ (maximal 12 $\mu\text{m}/\text{min}$) entsprechen den Werten anderer RNA-Partikel und RNA-bindender Proteine. So werden GFP-MS2/Reporter-mRNA-Partikel vermittelt durch die CamKII α -3'UTR mit 3-6 $\mu\text{m}/\text{min}$ entlang der Dendriten bewegt (Rook et al., 2000). Von Knowles et al. (1996) wurde die Geschwindigkeit aller beweglichen RNA-Granula nach Färbung mit SYTO14 (Membran-permeable Nukleinsäure-Färbung) mit bis zu 60 $\mu\text{m}/\text{min}$ angegeben. Auch für die in den RNPs (*ribonucleoprotein*) enthaltenen RNA-bindenden Proteine Staufen1 (Köhrmann et al., 1999), Pur α (Kanai et al., 2004) und ZBP1 (Tiruchinapalli et al., 2003) wurden entsprechende Werte von durchschnittlich 6,4 $\mu\text{m}/\text{min}$, 1,2 $\mu\text{m}/\text{min}$ bzw. bis zu 60 $\mu\text{m}/\text{min}$ gemessen. Die Daten der zitierten Veröffentlichungen stimmen auch im Bezug auf die Art und Richtung der Bewegungen mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein. So ist immer nur ein kleiner Teil von 1-5% der mRNA-Granula im gewählten Zeitraum beweglich, wobei etwa 80% dieser Partikel nur kleine Strecken zurücklegen und häufig die Richtung wechseln. Dies könnte auch die große Streuung der ermittelten Transportgeschwindigkeiten von 1-60 $\mu\text{m}/\text{min}$ erklären. Außerdem wurden in den zitierten Studien verschiedene Fluoreszenzsysteme verwendet und sie differierten in Länge und Anzahl der ausgewerten Filme.

Versuche mit Cytoskelett-Inhibitoren zeigten, dass der Shank1 mRNA-Transport von intakten Mikrotubuli abhängt. *Cargo*-Moleküle werden entlang der Mikrotubuli durch die Motorproteine Kinesin (zum Plus-Ende) und Dynein (zum Minus-Ende) transportiert. Im Gegensatz zum Axon und distalen Dendriten liegen die Mikrotubuli in proximalen Dendriten in gemischter Polarität vor.

Die besondere Organisation der Mikrotubuli in Dendriten ermöglicht, dass sowohl der anterograde (zur Synapse hin) als auch der retrograde Transport (zum Soma hin) von Kinesin- oder Dynein-Motorproteinen vermittelt werden kann (Goldstein und Yang, 2000). Der unterschiedliche Aufbau des Cytoskeletts könnte so z.B. auch den spezifischen Transport von mRNPs nur in die Dendriten oder Vesikeln nur in das Axon ermöglichen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Shank1 mRNA-Transport von Motorproteinen der Kinesin 1 - Familie vermittelt wird, Dynein scheint auf die dendritische Lokalisation keinen Einfluss zu haben. Das verwendete dominant-negative Kinesin 1 - Konstrukt enthielt nur die N-terminale Motordomäne von KIF5C. Im inaktiven Stadium ist die KIF5-Motordomäne an den C-Terminus gebunden. Erst nach Aktivierung ändert sich diese Konformation, so dass *Cargo*-Moleküle an den C-Terminus binden können. Die Expression des dominant-negativen (dn) Konstrukts führt vermutlich zur Besetzung aller *Cargo*-Bindestellen (Schepis et al., 2007). Aufgrund der hohen Sequenzhomologie zwischen KIF5A, B und C im Bereich der Motordomäne könnte durch das verwendete Konstrukt nicht nur der KIF5C-, sondern auch der KIF5A- oder KIF5B-abhängige Transport inhibiert sein. Dies würde erklären, dass nicht alle endogenen Shank1 mRNA-Granula mit KIF5C kolokalisiert sind. Ein Teil der Partikel könnte also von anderen KIF5-Familienmitgliedern oder anderen KIFs transportiert werden. Generell konnte aber auch für andere mRNAs und RNA-bindende Proteine wie z.B. CPEB nie eine Kolokalisation von mehr als 50% der Granula mit Motorproteinen nachgewiesen werden (Huang et al., 2003; Tiruchinapalli et al., 2003). Eine mögliche Erklärung ist, dass ein Teil der mRNA nicht in RNPs, sondern in Stressgranula, welche besonders in kultivierten Zellen vorkommen, oder in *processing bodies* lokalisiert ist, die dem mRNA-Abbau dienen (Bramham und Wells, 2007). Dass nur etwa 27% endogener Shank1 mRNA mit KIF5C assoziiert ist, könnte auch erklären warum nur ein kleinerer Teil der im *Live-Imaging* beobachteten Granula beweglich ist. KIF5A und C werden vorwiegend im Gehirn, KIF5B wird ubiquitär exprimiert (Kanai et al., 2000). Von Kanai et al. (2004) konnten Bestandteile eines von KIF5-transportierten RNA-Partikels in Neuronen identifiziert werden. Neben RNA-bindenden Proteinen wie z.B. Staufen1, FMRP, Pur α/β ; Komponenten der Translationsmaschinerie wie eIF2 α oder EF-1 α sowie ribosomalen Proteinen und RNA-Helicasen, wurden auch die mRNAs für CaMKII α und Arc/Arg3.1 nachgewiesen. Beide sind bekannte Beispiele für eine dendritische mRNA-Lokalisation, welche u.a. durch synaptische Aktivität reguliert werden kann (Rook et al., 2000; Link et al., 1995). Interessant wäre es mit Hilfe ähnlicher Experimente die KIF5-Granula auf eine mögliche Anreicherung der Shank1 mRNA hin zu untersuchen.

In den Experimenten zum Shank1 mRNA-Transport wurde deutlich, dass nach Kotransfektion der KIF5dn Konstrukte nicht nur die dendritische mRNA-Lokalisation verhindert wurde, sondern auch insgesamt weniger Reporter-mRNA nachweisbar war. Möglicherweise führt die Inhibition der mRNP-Bindung an das Motorprotein zur Instabilisierung der Komplexe und damit zum verstärkten Abbau der mRNA. Wie die Shank1 mRNA in KIF5C-gebundenen RNP-Komplexen entlang der Dendriten transportiert werden könnte, ist in Abbildung 4.1 schematisch dargestellt.

Als direkte Interaktionspartner der Shank1-3'UTR konnten u.a. die RNA-bindenden Proteine PABP und hnRNP-K identifiziert werden (Iglauer, Dissertation 2005). Beide Faktoren sind mit den verwendeten 3'UTR-Reporter-mRNAs kolokalisiert. Dominant-negative Formen zeigten jedoch keinen Einfluss auf den mRNA-Transport. Die Interaktion der mRNA mit PABP und hnRNP-K könnte aber z.B. die RNA-Stabilität, das Spleißen oder über gleichzeitige Assoziation mit der 5'UTR auch die Translation der Shank1 mRNA beeinflussen. PABP interagiert nach Bindung des Poly-A-Schwanzes der mRNA mit dem Initiationsfaktor eIF4G, so dass sich eine sogenannte *closed-loop*-Struktur bildet. Dadurch können mRNA-Abbau sowie Initiation/Termination der Translation reguliert werden (Mangus et al., 2003). hnRNP-K bindet an den Elongationsfaktor-1 α (EF-1 α ; Bomsztyk et al., 1997) und inhibiert so zusammen mit hnRNP-E1 z.B. die Translation der 15-Lipoxygenase mRNA durch Bindung an ein Element in der 3'UTR (Ostareck et al., 1997). Interessanterweise gehört auch hnRNP-E1 zu den von Peter Iglauer identifizierten Bindungspartnern der Shank1-3'UTR (Dissertation, 2005). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Shank1 mRNA-Transport vom RNA-bindenden Protein Staufen1 abhängt. Dieses Protein wurde ursprünglich in *Drosophila* als maternaler Faktor zur Bildung der anteroposterioren Achse im Embryo identifiziert (St Johnston et al., 1991). Staufen vermittelt hier die Lokalisation der *oskar* und *bicoid* mRNA. Das Säugetierhomolog Staufen1 ist wie die Shank1 mRNA in distalen Dendriten in RNP-Partikeln lokalisiert, wird Mikrotubuli-abhängig transportiert und in KIF5-Granula gefunden (Köhrmann et al., 1999; Kanai et al., 2004). Nach Verlust von Staufen1 in Neuronen durch RNA-Interferenz können außerdem CaMKII α -3'UTR enthaltende mRNAs nicht mehr dendritisch lokalisiert werden (Kanai et al., 2004). Staufen1 enthält eine Tubulin-Bindedomäne sowie vier dsRBDs (*double-stranded RNA binding domains*), wobei die 2.dsRBD die stärkste und die 3. eine schwache RNA-Bindeaktivität aufweist (Wickham et al., 1999). Dominant-negative Formen, die nur die vier dsRBDs enthalten, zeigten keine dendritische Lokalisation und inhibierten den Transport Ribosomen-enthaltender RNP-Komplexe und Ethidiumbromid-gefärbter mRNA (Tang et al., 2001; Kim und Kim, 2005).

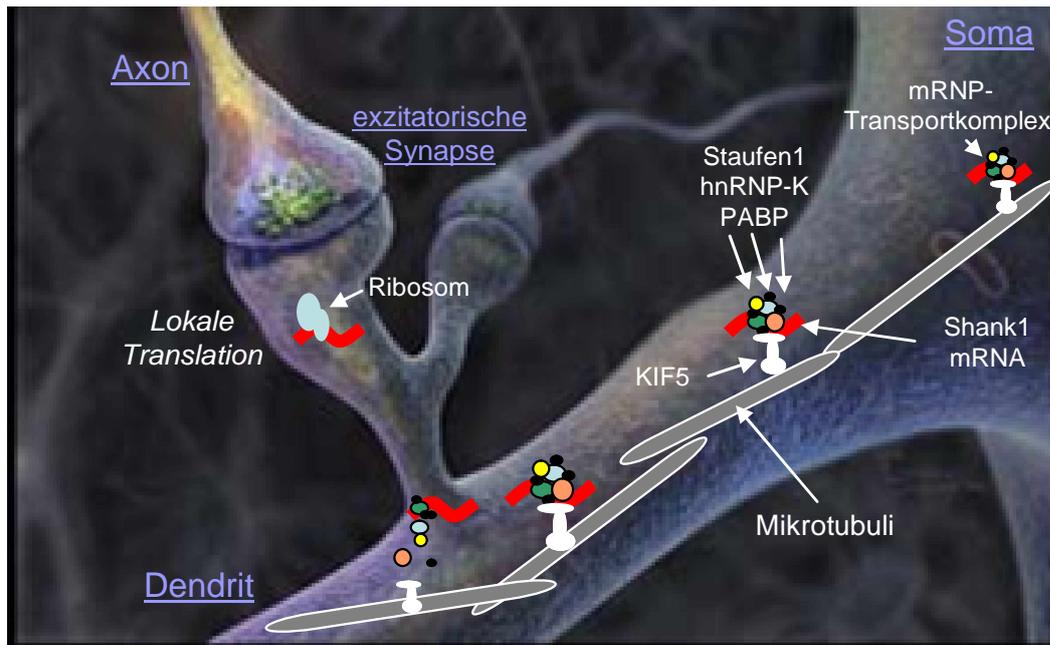


Abb. 4.1: Schematische Darstellung des dendritischen Shank1 mRNA-Transports.

Vereinfacht dargestellt ist ein Neuron mit Dendrit, dendritischem Dorn und synaptischen Kontakten zu Axonen. Die Shank1 mRNA (rot) wird in mRNP-Partikeln mit RNA-bindenden Proteinen wie hnRNP-K, PABP und Staufen1 (farbig) und wahrscheinlich weiteren unbekanntenen Faktoren (schwarz) durch das Motorprotein KIF5 (Kinesin1, weiß) entlang der Mikrotubuli (grau) transportiert. Im Bereich dendritischer Dornen/Synapsen dissoziieren vermutlich einige der interagierenden Proteine, die mRNA ist nicht mehr mit den Mikrotubuli assoziiert und kann an der Basis oder innerhalb der Dornen z.B. entwicklungs- oder aktivitätsabhängig lokal translatiert werden (Ribosom, hellblau). (Hintergrundbild modifiziert aus: www.stchristopherspru.co.uk)

Im Rattengehirn wird Staufen1 in zwei alternativen Spleißvarianten exprimiert, welche sich durch einen Einschub von 6 Aminosäuren am Beginn der 2.dsRBD unterscheiden (Staufen1+ mit, Staufen1- ohne das Insert). Dieses Insert verringerte die RNA-Bindeaktivität in *in-vitro* Studien deutlich (Monshausen et al., 2001). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das überexprimierte Staufen1+-Wildtypprotein mit der Shank1-3'UTR-Reporter-mRNA kolokalisiert ist. Die Verwendung der dn-Formen, bestehend aus dsRBD 2 und 3 ohne Insert (dsRBD2/3-), inhibierte den dendritischen Transport der Reporter-mRNAs um etwa 30%. Interessanterweise verringerte sich die dendritische Lokalisation der mRNA-Granula nach Koexpression des gleichen Konstrukts mit Insert (dsRBD2/3+, reduzierte RNA-Bindeaktivität) um mehr als 80%. Der Aminosäure-Einschub selbst kann diese Ergebnisse nicht erklären, da das Wildtyp-Konstrukt trotz Insert keinen dn-Effekt auf den mRNA-Transport hatte. Die Koexpression von Staufen1+ und Staufen1- zeigte außerdem, dass beide Spleißvarianten in den gleichen Granula lokalisiert sind. Die Expression der RNA-bindenden Domänen *trans*-agierender Faktoren wirkt meist dominant-negativ, da sie nach Überexpression die entsprechenden mRNAs binden, diese aber aufgrund fehlender Protein-Protein-Interaktionen oder Assoziation mit dem Cytoskelett nicht mehr transportieren bzw. regulieren können.

Daher erscheint es zunächst erstaunlich, dass gerade das Staufen1-Konstrukt, welches wenig oder keine RNA mehr binden kann, zu einer so deutlichen Inhibierung des Shank1 mRNA-Transports führt. Wahrscheinlich ist, dass beide Staufen1-Spleißvarianten über unterschiedliche Mechanismen in die Dendriten gelangen. Dafür spricht, dass das dn-Protein dsRBD2/3⁻ noch diffus, dsRBD2/3⁺ jedoch gar nicht mehr dendritisch lokalisiert ist. Die Effizienz der RNA-Bindung scheint also für die Lokalisation der dn-Proteine essentiell zu sein. Vorstellbar wäre, dass Staufen1 z.B. auch über RNAs mit dem Cytoskelett assoziiert sein kann. Ein möglicher Kandidat ist die untranslatierte RNA BC1, welche in Staufen1-RNPs nachgewiesen wurde (Mallardo et al., 2003). Interessanterweise ist z.B. die Interaktion von Staufen mit dem Protein Barentz RNA-abhängig, welches im *Drosophila* Embryo die mRNA-Lokalisation reguliert und zusammen mit Staufen1 in dendritischen mRNPs hippokampaler Neurone transportiert wird. Hier wurde die BC1-RNA ebenfalls als möglicher Kandidat diskutiert (Macchi et al., 2003). Die dendritische Lokalisation des Staufen1⁺-Wildtypproteins und die Organisation in granulären Strukturen könnte andererseits von Interaktionen (über Domänen die im dsRBD2/3 fehlen) mit weiteren Bestandteilen der RNPs vermittelt sein. Für dieses Modell spricht, dass die Reporter-mRNA nach Koexpression der dsRBD2/3⁻-Konstrukte trotz dendritischer Lokalisation nicht mehr in klaren granulären Strukturen organisiert war. Die Betrachtung der endogenen Shank1 mRNA und endogen gefärbter Staufen1-Komplexe ergab, dass nur etwa 28% der mRNA-Granula mit Staufen1 kolokalisiert vorliegen. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Shank1 mRNA nur während des Transports mit Staufen1 in denselben RNPs transportiert wird und dann im Bereich der Synapsen mit anderen Interaktionspartnern assoziiert ist oder dort direkt translatiert wird (Abb. 4.1). Untersuchungen anderer RNA-bindender Proteine erbrachten ähnliche Ergebnisse, so sind z.B. nur 30-50% der β -Aktin mRNA-Partikel mit ZBP kolokalisiert (Tiruchinapalli et al., 2003). Andererseits könnten Kolokalisationen auch aufgrund praktischer Beschränkungen der FISH/ICC-Methode unerkannt bleiben, wenn die mRNA z.B. von den Sonden aufgrund kompakter Faltung der RNA nicht gebunden werden kann.

Bisher konnten noch keine spezifischen, dendritisch lokalisierten *cargo* RNAs für Staufen in Neuronen identifiziert werden. Im Trihybrid-System wurde zwar das DTE der MAP2 mRNA als Bindungspartner gefunden (Monshausen et al., 2001), Staufen bindet in *in-vitro* Studien jedoch jede doppelsträngige RNA sequenzunabhängig (Macchi et al., 2003). Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass Staufen1 die Shank1 mRNA-Lokalisation nicht durch direkte Bindung der 3'UTR beeinflusst, sondern eher den Transport der mRNP-Komplexe entlang der Mikrotubuli über verschiedene Mechanismen regulieren kann.

Bekannt ist, dass Staufen1 auch den *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD; Kim et al., 2005) und die Translation bestimmter Transkripte regulieren kann (Dugre-Brison et al., 2005). Verschiedene RNA-bindende Proteine, welche den mRNA-Transport vermitteln, wie z.B. FMRP (Davidovic et al., 2007), CPEB (Wells, 2006) oder ZBP (Hüttelmaier et al., 2005), sind auch an der Regulation der Translation entsprechender Transkripte beteiligt. Dies erfolgt meist durch vorübergehende Repression der Translation durch Interaktion mit Initiationsfaktoren, die mit der 5'UTR assoziiert sind. Die Synthese des Proteins kann somit über das entsprechende RNA-bindende Protein reguliert werden. So beeinflusst die aktivitätsabhängige CPEB-Phosphorylierung in Neuronen beispielsweise die Translation im Bereich betroffener Synapsen (McEvoy et al., 2007).

Die durchschnittliche 5'UTR in Säugertranskripten enthält 150-200 Nukleotide. Die Shank1-5'UTR ist mit 634 nt extrem lang und stark strukturiert. Sie inhibierte in Untersuchungen mit verschiedenen Reportern die Translation fast vollständig (Reduktion auf 1% *in-vitro* und 10-20% in transfizierten Zellen) auch unabhängig von der 3'UTR oder interagierenden Faktoren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher untersucht, auf welchen Mechanismen diese Inhibition beruht und wie die Shank1-Expression in den Zellen reguliert wird. Zunächst zeigte sich sowohl bei *in-vitro*-Analysen als auch in transfizierten Zellen, dass die kompakte Sekundärstruktur der 5'UTR allein die geringe Translation nicht erklären kann und verschiedene Regionen der 5'UTR trotz ähnlicher Faltung die Proteinsynthese unterschiedlich stark beeinflussen. Aus diesem Grund wurden im Folgenden die Startkodons von in der 5'UTR lokalisierten *upstream open reading frames* (uORFs) mutiert. Solche, die Translation stromabwärts gelegener Startpunkte regulierende uORFs findet man besonders häufig bei stark regulierten Faktoren wie z.B. Proto-Onkogenen mit längerer 5'UTR (Pickering und Willis, 2005). Die Expression dieser Proteine wird oft zunächst stark unterdrückt und erst als Antwort auf verschiedene Signale durch Beeinflussung der uORF-Translation angeschaltet. Da durch die Initiation an uAUGs die Ribosomen und Initiationsfaktoren ständig mit der 5'UTR assoziiert sind, kann dann die Translation der eigentlichen ORFs sehr schnell und flexibel gestartet werden (Hinnebusch, 2005). Möglicherweise wird auch die lokale Translation der dendritisch lokalisierten Shank1 mRNA als Antwort auf synaptische Signale auf diese Weise reguliert. Dafür spricht, dass Shank1 ein wichtiges Gerüstprotein der postsynaptischen Dichte ist. Eine veränderte Shank1-Expression führt z.B. zur Veränderung der Morphologie dendritischer Dornen (Sala et al., 2001). Mutationen im verwandten Shank3-Gen verursachen mentale Retardierung und Sprachstörungen bei betroffenen Patienten (Durand et al., 2006).

Die Shank Proteine könnten also eine Rolle beim dynamischen Umbau der Synapsen und damit bei Lern- und Gedächtnisvorgängen spielen. Innerhalb der Shank1-5'UTR gibt es drei uAUGs (1., 2., 3.uORF) gefolgt von zwei AUGs, welche beide als alternative Startpunkte genutzt werden können (4. und 5.AUG-Isoform). Der 1. und 2.uORF kodieren für sehr kurze Peptide, wohingegen der 3.uORF kurz vor dem 4.AUG beginnt, mit diesem überlappt und erst kurz vor dem 5.AUG stoppt (siehe auch Abb. 3.16). Vorstellbar wäre daher, dass die Nutzung des 3.uORFs die Expression der beiden Shank1-Isoformen zueinander reguliert. Wenn am 3.uAUG initiiert würde, könnte das 4.AUG nicht genutzt werden, aber eine Re-Initiation am 5.AUG stattfinden, so dass nur die kürzere Isoform entsteht (Abb. 4.2b). Wird das 3.uAUG aber z.B. durch *leaky scanning* in der Wildtyp-5'UTR überlesen oder wie in dieser Arbeit mutiert, könnte am 4.AUG gestartet werden und daher v.a. die N-terminal um 71 Aminosäuren verlängerte Isoform entstehen. Dieses Modell bestätigte sich anhand der durchgeführten Versuche jedoch nicht. Stattdessen zeigte sich im Western Blot nach Mutation des 3.uAUG neben der unveränderten Verteilung der beiden Shank1-Isoformen eine zusätzliche und größere 3.Bande. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Klonierung der Mutation des 3.uAUG auch ein damit überlappendes Stoppkodon eines zuvor unbekanntes uORFs mutiert wurde. Da dieser uORF *in-frame* mit den Shank1-ORFs verläuft, konnte er in diesen Versuchen mit den Shank1-Antikörpern zufällig auch nachgewiesen und seine Regulation durch Verwendung der mutierten Konstrukte untersucht werden. Besonders interessant ist dabei, dass es sich bei dem Startkodon des neuentdeckten uORFs um ein ACG-Kodon und nicht das herkömmliche AUG handelt (siehe auch Abb. 3.26). Die Existenz dieses ACG-uORFs wurde im Rahmen dieser Arbeit durch Proteinsequenzierung, Nachweis des Peptids in Zellen sowie mit einem für die uORF-Sequenz spezifischem Antikörper und durch Mutation des Startpunktes bewiesen.

In den zuvor durchgeführten *in-vitro*-Untersuchungen führte die Mutation des 3.uAUGs zum leichten, in transfizierten Zellen sogar zum dreifachen Anstieg der Translationseffizienz. Dies lässt sich nun anhand der Western Blots mit der starken Nutzung des ACGs im Vergleich zum 4. und 5.AUG erklären. Die Existenz des *non-AUG*-uORFs am Beginn der 5'UTR kann auch die Ergebnisse der Deletionskonstrukte in den Luciferase-Untersuchungen z.T. besser erklären. So wurde für das Konstrukt, welches nur die Nukleotide 1-138 enthält, eine ähnlich starke Inhibition der Translation wie für das Konstrukt mit der Wildtyp-5'UTR (1-634) beobachtet. Die Deletion der nt 1-138 führte jedoch zu einer noch verstärkten Reduktion der Luciferase-Expression. Erklärt werden können beide Phänomene mit der Lage des ACG-uORFs, dessen Startkodon sich an Position nt 84-86 befindet.

Im Konstrukt 1-138 erhält der ACG-uORF aufgrund der Klonierung ein vorzeitiges Stoppkodon kurz vor dem Startpunkt der Luciferase. Sehr wahrscheinlich können die Ribosomen nach Translation des ACG-uORF aufgrund des kurzen Abstands zwischen uORF-Stopp und Luciferase-AUG nicht re-initiieren, weshalb die Translation der Luciferase mRNA hier so stark inhibiert ist. Die Deletion des ACG-uORFs im Luciferase-Konstrukt ohne die nt 1-138 verhindert hingegen offensichtlich das Ablezen der 5'UTR.

Besonders interessant waren dann die Untersuchungen der Isoformen-Expression im Western Blot nach Deletion oder Mutation des ACG-Startpunktes. Hier führte die Mutation des ACGs nicht nur zum erwarteten Verlust der zusätzlichen Bande im Konstrukt mit der Mutation des 3.uAUGs (gleichzeitig Mutation des ACG-uORF-Stoppkodons), sondern auch zum Verlust der 4.AUG-Isoform und stark reduzierter Expression des 5.AUGs. Wie in Abbildung 4.2 schematisch dargestellt ist, könnten mehrere Mechanismen diesen positiven Effekt des ACG-uORFs auf die Translation der Shank1 mRNA im Wildtyp erklären. Die Ergebnisse zeigen, dass der ACG-uORF eine sehr wichtige Rolle für die Shank1-Expression spielt. Bei komplexen Sekundärstrukturen fallen Ribosomen während dem Ablezen der mRNA relativ schnell und häufig wieder vom Transkript ab. Der nahe dem 5'Cap gelegene ACG-uORF könnte die Translationsmaschinerie länger an der mRNA halten (Morris und Geballe, 2000). Mit Hilfe des sogenannten *Ribosomal Shuntings* würde dann auch das Überwinden kompakter Sekundärstrukturen erleichtert, so dass das Ribosom weiter stromabwärts scannen und folgende AUGs erkennen kann (Ryabova et al., 2002; Hemmings-Mieszczak et al., 2000; Abb. 4.2a). Untersuchungen zum Mechanismus des *Shuntings*, bei dem das Ribosom große Sekundärstruktur-Bereiche überspringen kann, wurden bisher v.a. an viralen Transkripten durchgeführt. Gezeigt wurde, dass die Translation eines uORFs vor diesem Bereich oft essentiell ist und besonders *non-AUGs* den Mechanismus fördern, da das Ribosom zur Erkennung dieser alternativen Startpunkte langsamer bewegt wird (Ryabova und Hohn, 2000; Touriol et al., 2003). Dies kann die Interaktion der mRNA mit ribosomaler RNA (18S-rRNA) fördern, welche wahrscheinlich den Sprung des Ribosoms an weiter stromabwärts gelegene Bereiche der 5'UTR vermittelt (Chappell et al., 2006). Die Translation von uORFs reguliert die Expression von Proteinen auch durch den Mechanismus der Re-Initiation. Hierbei dissoziiert die 40S-Ribosomen-Untereinheit nach der Termination des uORF nicht von der 5'UTR, sondern bindet einen weiteren ternären Komplex (eIF2-GTP-Met-tRNA) und kann an stromabwärts liegenden Startpunkten initiieren (Hinnebusch, 2005). Dafür müssen mindestens 30 Nukleotide zwischen uORF-Stopp- und ORF-Startpunkt liegen (Luukkonen et al., 1995).

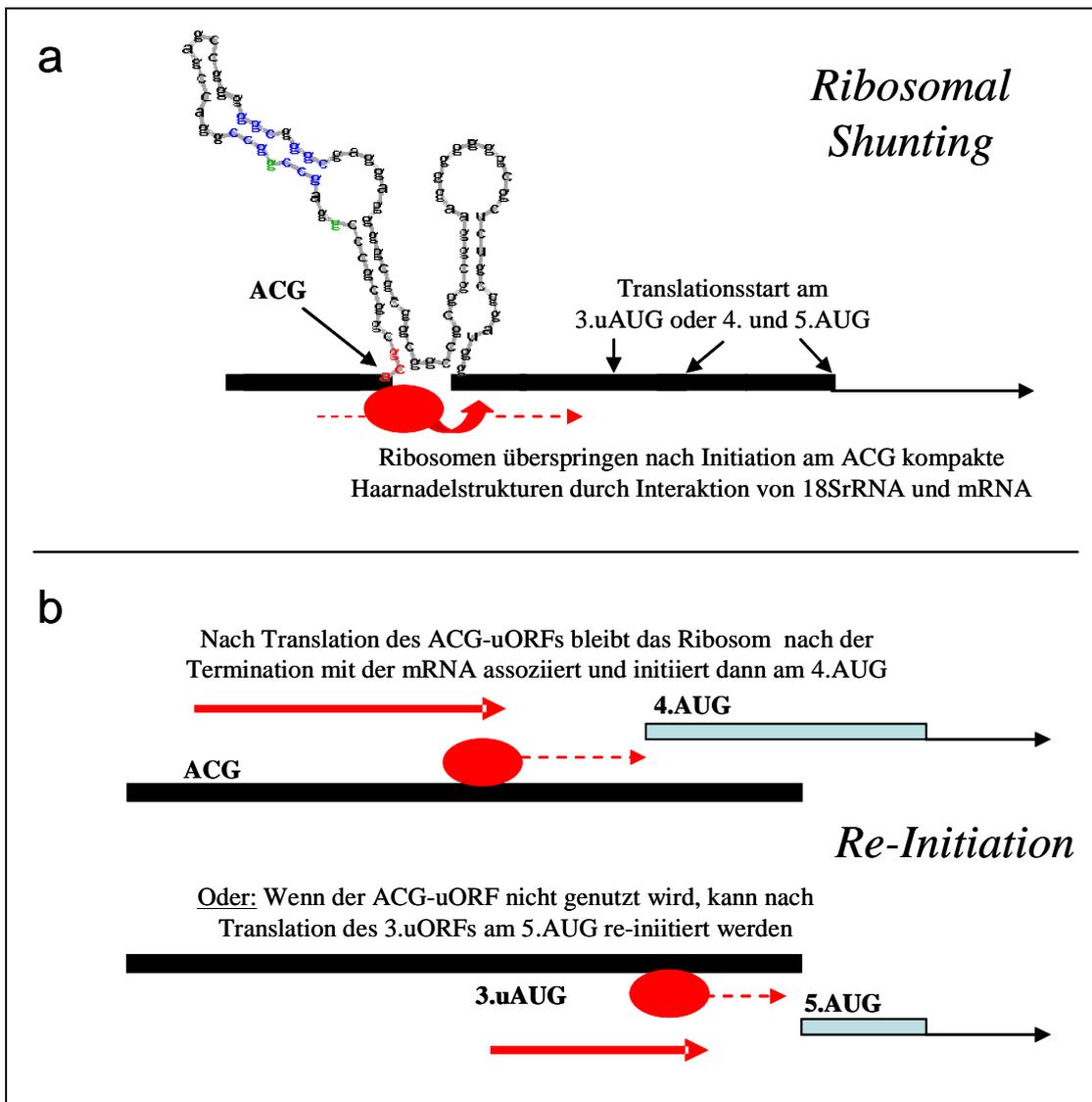


Abb. 4.2: Schematische Darstellung verschiedener möglicher Mechanismen der Shank1 Translationsregulation durch den ACG-uORF.

a: Dargestellt ist eine mögliche stabile Haarnadelstruktur hinter dem ACG-Startkodon, die das Ribosom (rot) verlangsamen und damit die *non-AUG*-Erkennung erleichtern und außerdem das *Ribosomal Shunting* vermitteln könnte. Diese Struktur wurde berechnet mit einem dafür von Kochetov et al. (2007) entwickelten Programm (http://gibk26.bse.kyutech.ac.jp/aug_hairpin/; freie Energie = -45,1 kcal/mol). Die Grenzen der kritischen Region sind in grün, die Stammregion der Haarnadel in blau und das Startkodon in rot dargestellt. **b:** Möglicherweise beeinflusst der ACG-uORF die Nutzung des 3.uAUG und damit die Entstehung der beiden Shank1-Isoformen.

In einigen Fällen spielt außerdem die Peptidsequenz des uORFs selbst eine Rolle für mögliche Re-Initiationen, z.B. durch Interaktion des uORF-Peptids mit Initiationsfaktoren (Geballe and Morris, 1994). Vermutlich können eher zufällig alle beschriebenen Möglichkeiten stattfinden, so dass nicht in jedem Transkript alle möglichen Startpunkte und uORFs erkannt werden. Dafür spricht, dass bei den Konstrukten mit mutiertem 3.uAUG und dadurch mutiertem ACG-uORF-Stoppkodon nicht nur die lange, vom ACG-gestartete Form vorliegt, sondern immer auch die 4.AUG und 5.AUG-Isoform anteilig hergestellt werden.

In der Wildtyp-5'UTR überlappt das ACG-uORF-Stoppkodon mit dem 3.uAUG-Startkodon. Wenn der ACG-uORF also vollständig abgelesen wird, dann könnte das 3.uAUG nicht mehr, dafür aber das 4.AUG durch Re-Initiation genutzt werden (Abb. 4.2b). Nach Mutation des ACGs kann nun das 3.uAUG abgelesen werden. Da das zugehörige Stoppkodon zwischen dem 4. und 5.AUG liegt, würde dann erst wieder am 5.AUG translatiert werden. Dieses Modell würde aber bedeuten, dass in den Transkripten mit mutiertem ACG-Startkodon, bei denen auch das 3.uAUG mutiert ist, die 4.AUG-Isoform entstehen müsste. Da sie hier aber ebenfalls fehlt, muss es weitere Regulationsmöglichkeiten geben. Erste Versuche zeigen, dass ein direkt im 3.uORF gelegenes CUG auch als Startpunkt genutzt werden kann (Daten nicht gezeigt).

Wie alternative Startpunkte vom Prä-Initiations-Komplex erkannt werden ist unklar. Je nach verwendeter Methode und Sequenzumgebung wurden stark variierende Effizienzen der Erkennung (3-30%) von den häufigsten *non-AUG*-Kodons GUG, CUG und ACG im Vergleich mit AUG-Startpunkten gezeigt (Mehdi et al., 1990; Kozak, 1989). Deutlich wurde auch, dass bei der Erkennung dieser alternativen Kodons die Sequenzumgebung eine noch wichtigere Rolle als für herkömmliche AUG-Initiationen spielt. Die meisten Transkripte mit *non-AUG*-Startpunkten besitzen außerdem wie die hier untersuchte Shank1-5'UTR lange, GC-reiche 5' untranslatierte Regionen (Kozak, 1991). Die Effizienz ihrer Nutzung steigt interessanterweise an, wenn ausgedehnte Haarnadelstrukturen die Bewegung des Ribosoms verlangsamen. So werden möglicherweise nicht exakte Basenpaarungen mit der Met-tRNA erleichtert (Kozak, 1990). Eine solche stabile Struktur befindet sich in der Shank1-5'UTR hinter dem ACG-Kodon und könnte daher die Erkennung des alternativen Initiationskodons erleichtern (Abb. 4.2a; Kochetov et al., 2007).

Auch die Phosphorylierung vom Initiationsfaktor eIF2 α kann den Initiationsprozess verlangsamen und die Erkennung von *non-AUG*-Kodons verbessern (Hashimoto et al., 2002). Generell inhibiert diese Phosphorylierung die Translation der meisten Transkripte. Einige wenige mRNAs können aber durch veränderte uORF-Regulationen verstärkt translatiert werden (Wek et al., 2006). Da auch Vorgänge wie Lernen und Gedächtnis von der eIF2-Regulation beeinflusst werden (Costa-Mattioli und Sonenberg, 2006) und Shank als Gerüstprotein der postsynaptischen Dichte am Aufbau von Synapsen beteiligt ist, wurde der Einfluss dieses Initiationsfaktors auf die Translation der Shank1 mRNA untersucht. Die Versuche dieser Arbeit mit überexprimierten Reportern zeigten zunächst, dass der Phosphorylierungsstatus von eIF2 α keinen Einfluss auf das Verhältnis der Shank1-Isoformen oder die Nutzung des ACGs hat.

Erste Untersuchungen der endogenen Shank1-Menge in der PSD kultivierter Neurone nach verstärkter Phosphorylierung von eIF2 α verdeutlichten aber, dass beide Isoformen wie die meisten anderen Proteine der PSD reduziert waren (Daten nicht gezeigt). Das bedeutet, dass die Translation der einzelnen Shank1-Transkripte oder uORFs nicht spezifisch von eIF2 α reguliert wird, sondern anscheinend wie die allgemeine Proteinsynthese der Zelle durch eIF2-Phosphorylierung generell inhibiert ist. Interessanterweise gibt es Beispiele in denen alternative Startkodons nicht als Methionin, sondern als die vom Kodon tatsächlich verschlüsselten Aminosäuren wie z.B. Leucin oder Threonin übersetzt werden (Sasaki und Nakashima, 2000; Nemeth et al., 2007). Der Methionin-Start ist von eIF2 abhängig, die Initiation mit Leucin jedoch nicht (Schwab et al., 2004). Möglicherweise werden diese *non-AUG*-Startpunkte also über einen eIF2-GTP-Met-tRNA-unabhängigen, alternativen Weg initiiert. Das Protein FGF-2 (*fibroblast growth factor*) besitzt beispielsweise 3 CUG- und eine AUG-Isoform, welche jeweils über *internal ribosomal entry sites* translatiert werden können (IRES, Vagner et al., 1996). Die Shank1-5'UTR scheint allerdings keine IRES zu enthalten (Peter Iglauer, Dissertation 2005). Leider waren N-terminale Sequenzierungen zur Bestimmung der ersten Aminosäure des ACG-uORFs in dieser Arbeit nicht erfolgreich, vermutlich aufgrund der Blockierung des N-Terminus durch Acetylierung oder andere Modifikationen.

Wenn die Erkennung der *non-AUG*-Kodons über alternative Signalwege kontrolliert werden kann, ergibt sich für die Zelle trotz zunächst ineffizienterer Nutzung eine Vielzahl von Regulationsmöglichkeiten. Bestimmte Transkripte könnten so selektiv beeinflusst werden ohne die allgemeine Translation in der Zelle zu stören. Die alternativen Startpunkte könnten durch verstärktes *leaky-scanning* auch zur besseren Nutzung dahinter gelegener Initiationskodons führen und damit die Synthese mehrerer Isoformen vom selben Transkript erleichtern. Dies wurde für den Transkriptionsfaktor *c-myc* gezeigt, der durch *non-AUG*-Initiation in einer längeren Isoform hergestellt werden kann (Hann, 1994). Eine biologische Relevanz der *non-AUG*-initiierten Variante scheint hier in der Regulation des Zellwachstums zu liegen. Interessanterweise synthetisieren Tumor-Zelllinien diese Isoform nicht mehr (Hann et al., 1988). Andere Beispiele sind *basic FGF* und *int-2* (= FGF3). Auch hier sind die zusätzlich entstehenden Isoformen in verschiedenen Kompartimenten der Zelle lokalisiert und erfüllen jeweils unterschiedliche Funktionen (Bugler et al., 1991; Couderc et al., 1991; Acland et al., 1990).

Non-AUG-Kodons wurden besonders häufig in Viren beschrieben und werden auch in immer mehr eukaryotischen Transkripten gefunden. Dabei sind oft in ihrer Expression sehr stark regulierte Proteine wie Proto-Onkogene oder Transkriptionsfaktoren betroffen (Hann, 1994). Shank1 ist bisher das einzige Beispiel eines zentralen synaptischen Proteins mit einer durch ein *non-AUG* regulierten Translation. Der in dieser Arbeit entdeckte Regulationsmechanismus über einen ACG-uORF deutet darauf hin, dass die spezifische Kontrolle der Translation für Shank1 von großer Bedeutung sein muss. Das als Startkodon genutzte ACG wurde hier nur durch Zufall bei der Mutation anderer uORFs entdeckt. Die Möglichkeit der *non-AUG*-Initiation ist relativ unbekannt, weshalb die 5'UTRs anderer Proteine nicht systematisch auf diese uORFs hin untersucht wurden. Möglicherweise gibt es ähnliche Regulationen wie bei Shank1 also auch bei anderen synaptischen Proteinen. Die Suche nach *non-AUG*-Startpunkten durch Sequenzanalysen ist dabei nur bedingt hilfreich, da bisher zur Erkennung und Nutzung dieser Kodons sowie der Bedeutung der Sekundärstruktur oder zusätzlicher Faktoren zu wenig bekannt ist.

Die stark strukturierte 5'UTR inhibiert die Translation verschiedener Reporter-Transkripte, verhinderte aber nicht wie erwartet generell das Ablesen entlang der mRNA. Stattdessen erfolgt eine überraschend effektive Expression des ACG-uORFs am Beginn der 5'UTR. Möglicherweise erlauben die stabilen Haarnadelstrukturen innerhalb der Shank1-5'UTR erst die *non-AUG*-Erkennung, da das Ribosomen vor diesen langsamer liest und so auch weniger stabile Basenpaarungen entstehen können (Kozak, 1990). Die Expression des ACG-uORFs kann vermutlich zusätzlich durch andere Mechanismen beeinflusst als die bekannte AUG-Initiation. Dies könnte der Zelle ermöglichen im Bereich der Synapsen die Translation der Shank1-Isoformen nicht nur schnell, sondern auch spezifisch nur für dieses Transkript zu regulieren. Bisher konnte leider noch keine Form der Stimulation gefunden werden, die einen eindeutigen Einfluss auf die Translation der Shank1 mRNA oder die uORF-Expression hat (Daten nicht gezeigt). Um Veränderungen der Shank-Menge nach synaptischer Aktivierung oder Inhibierung zu deuten, müssten außerdem Möglichkeiten gefunden werden den Shank1-Abbau von der Neusynthese abzugrenzen (Ehlers, 2003; Steward und Schuman, 2003). Besonders interessant wären auch Versuche, die eine lokale Translation der Shank1 mRNA in Abhängigkeit der uORF-Regulierung betrachten.

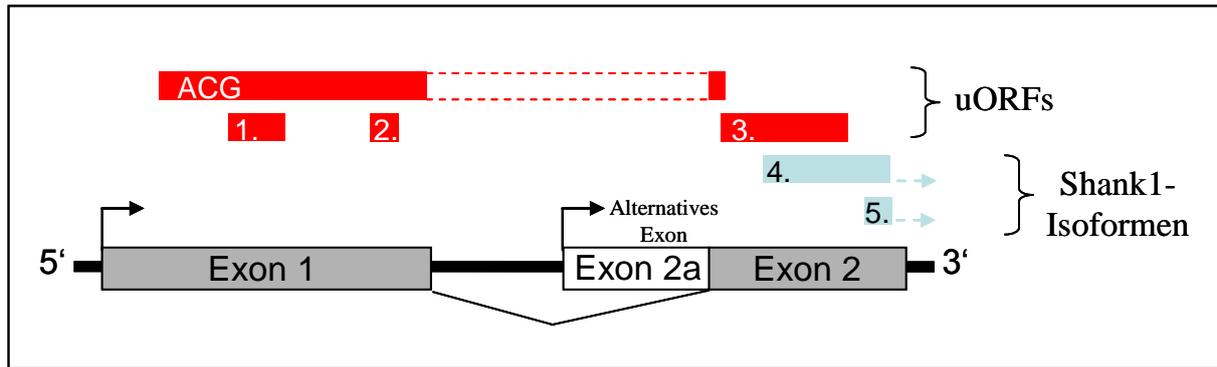


Abb. 4.3: Schematische Darstellung des Shank1-Gens im 5'-UTR-Bereich.

Die in dieser Arbeit charakterisierte Shank1-5'UTR wird von den Exons 1 und 2 (grau) kodiert. Im Intron zwischen diesen beiden Exons befindet sich ein alternativer Promotor, so dass ein alternatives Exon 2a und damit eine alternative 5'UTR entstehen kann. Der genaue Startpunkt dieses Exons ist jedoch unbekannt. Beide 5'UTR-Spleißvarianten enthalten den 3.uORF (rot) und das 4. und 5.AUG (ORF, blau).

In einigen Fällen können uORFs auch den mRNA-Abbau (*nonsense-mediated decay* = NMD) stimulieren, besonders wenn das zugehörige Stoppkodon kurz vor einem *Exon-Junction-Complex* (EJC) liegt (Schell et al., 2002). Bestandteile des EJC können mit der mRNA assoziiert bleiben bis sie vom ersten translatierenden Ribosom entfernt werden (Dostie und Dreyfuss, 2002). Wenn der EJC hinter dem uORF-Stoppkodon positioniert ist, werden die Bestandteile des Komplexes nicht vom Ribosom entfernt und werden von Komponenten der NMD-Maschinerie gebunden (Chang et al., 2007). Daher können solche mRNAs verstärkt abgebaut werden. Es wurde gezeigt, dass auf diese Weise synaptische Plastizität vom EJC-Faktor eIF4AIII reguliert werden kann (Giorgi et al., 2007). Wie aus Abbildung 4.3 hervorgeht ist dieser Mechanismus jedoch beim Shank1-Gen zumindest für den ACG-uORF unwahrscheinlich, da der EJC vor und nicht hinter dem zugehörigem Stoppkodon liegt.

Die in dieser Arbeit untersuchte 5'UTR entspricht dem längsten bisher bekannten 5'-Bereich der Shank1-Transkripte und wurde aus einem cDNA-Klon isoliert (Zitzer et al., 1999). Sie entsteht nach Kombination der Exons 1 und 2, wobei der ACG- sowie der 1. und 2. uORF im Exon 1, der 3.uORF und AUG 4 und 5 im Exon 2 liegen (Abb. 4.3). Von Lim et al. (1999) wurde in der Ratte die Existenz eines alternativen Exons (2a) nachgewiesen, so dass sich im Intron zwischen Exon 1 und 2 ein alternativer Promotor befinden muss. Beide Spleißvarianten werden sowohl in Cortex, als auch Cerebellum postnatal ab Tag 0 (*Rattus norvegicus*, RT-PCR, Lim et al., 1999) etwa gleich stark exprimiert. Die Nutzung eines alternativen Promotors führt hier zur Entstehung einer 5'UTR von unbekannter Länge, die den 3.uORF und das 4./5.AUG enthält. Erste Versuche zeigen, dass diese alternative 5'UTR auch sehr GC-reich ist und vermutlich ebenfalls aus mehreren Hundert Nukleotiden besteht (Daten nicht gezeigt).

Ähnlich wie bei der in dieser Arbeit untersuchten 5'UTR gibt es wahrscheinlich außerdem mehrere mögliche uORFs. Die bisher durchgeführten Experimente weisen für die alternative 5'UTR auf eine wichtigere Funktion des 3.uAUGs hin, da in Reporter-Analysen mit dem bekannten Teil dieser 5'UTR (Exon2a/2) nur die kürzere 5.AUG- und erst nach Mutation des 3.uAUG auch die 4.AUG-Isoform entstand (Daten nicht gezeigt). Dies ist besonders interessant, da in der in dieser Arbeit untersuchten 5'UTR (Exon1/2) trotz vorhandenem 3.uAUG immer beide Isoformen entstehen. Diese 5'UTR besitzt im Gegensatz zur alternativen 5'UTR den ACG-uORF, dessen Stoppkodon mit dem 3.uAUG überlappt. Wird also der ACG-uORF vollständig abgelesen, können die Ribosomen das 3.uAUG nicht erkennen und daher auch am 4.AUG initiieren. Bis jetzt gibt es allerdings keinen Hinweis auf eine mögliche funktionelle Bedeutung der beiden alternativen 5'UTRs oder der beiden Shank1-Isoformen. In dem verlängerten N-Terminus von 71 Aminosäuren befindet sich keine bekannte Domäne, die auf zusätzliche Funktionen hinweisen könnte. Aufgrund des hohen Gehalts an Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S) und Threonin (T) entspricht dieser Bereich allerdings einer sogenannten PEST-Region, welche den Proteinabbau vermitteln kann (Rechsteiner und Rogers, 1996). Interessant wäre also für zukünftige Experimente z.B. den Abbau beider Isoformen miteinander zu vergleichen. Beide Shank1-Startkodons sind in der humanen, Maus- und Rattensequenz konserviert. Auch der 3.uORF ist im Rattengenom vorhanden (Homologie beim Exon2 zwischen Ratte und Mensch = 91%). Da Ratten- und Mausgenom im Bereich des Exon1 leider nur unvollständig sequenziert sind, kann zum Vorhandensein des ACG-uORF bis jetzt leider keine eindeutige Aussage getroffen werden.

Interessanterweise gibt es bei Shank3 eine ähnliche Struktur der Transkripte mit zwei alternativen Startkodons im 5'-Bereich. Zur Länge der 5'UTR und Regulation der Expression dieses Proteins ist bisher jedoch nichts bekannt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der Shank1 mRNA-Transport in seiner Regulation durch die 3'UTR und der Abhängigkeit von Mikrotubuli-Motorproteinen anderen bekannten dendritischen mRNAs wie der CamKII α entspricht. Die dendritische Lokalisation der Shank1 mRNA in distalen Dendriten könnte außerdem eine lokale Expression dieses zentralen PSD-Proteins ermöglichen. Die gefundenen Mechanismen zur Regulierung der Translation der Shank1 mRNA durch das Zusammenspiel verschiedener uORFs und alternativer Startkodons in der 5'UTR konnten so jedoch bisher noch für kein anderes synaptisches Protein beschrieben werden.

Es wurde gezeigt, dass die Shank1-Synthese trotz inhibierender 5'UTR erst durch einen ACG-uORF ermöglicht wird. Diese basale Expression könnte während der neuronalen Entwicklung oder im Bereich aktivierter Synapsen gesteigert werden. Besonders interessant wäre in weiterführenden Versuchen die Betrachtung der Translationsregulation während der Neubildung synaptischer Kontakte. Diese Synaptogenese könnte in kultivierten Neuronen durch Zugabe von Neurexin induziert werden, welches durch Bindung an die postsynaptischen Neuroligine die Bildung von Synapsen induziert (Craig und Kang, 2007). Anhand dieser Experimente könnte die Bedeutung der Shank1-Expression und der verschiedenen Isoformen sowie uORFs während der Entwicklung synaptischer Kontakte untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Shank1 ist ein wichtiges Gerüstprotein der postsynaptischen Dichte in exzitatorischen Synapsen. Über vielfältige Interaktionspartner verbindet es hier Membran-ständige Rezeptoren mit dem Aktin-Cytoskelett. Die Shank1 mRNA ist u.a. im Hippokampus dendritisch lokalisiert. Ein *dendritic targeting element* wurde in der 3'untranslatierten Region (UTR) gefunden. Außerdem inhibierte die stark strukturierte 5'UTR die Translation von Reporter-Transkripten. Möglicherweise wird die Translation der Shank1 mRNA während des Transports in die Dendriten also zunächst inhibiert. Entwicklungs- oder aktivitätsabhängig könnte die Inhibition der Shank1-Synthese dann an dendritischen Dornen und Synapsen lokal aufgehoben werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Regulation des dendritischen mRNA-Transports durch die 3'UTR und der Translationsinhibition durch die 5'UTR untersucht.

Zunächst konnte mittels Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen gezeigt werden, dass die endogene Shank1 mRNA in Hippokampus-Neuronen ab dem 8. Tag in Kultur dendritisch lokalisiert ist. Außerdem wurde mit Hilfe von Reporter-Konstrukten und dem sogenannten GFP-MS2-System der 3'UTR-vermittelte mRNA-Transport in lebenden Neuronen visualisiert. Auch der Einfluss RNA-bindender Faktoren wurde untersucht. Dabei zeigte sich, dass der dendritische mRNA-Transport vom Mikrotubuli-assoziierten Motorprotein KIF5C und verschiedenen Spleißvarianten des RNA-bindenden Proteins Staufen1 abhängt. Beide Proteine sind partiell mit endogenen Shank1 mRNA-Granula kolokalisiert.

Untersuchungen zur Shank1-Translation im Luciferase-Reportersystem verdeutlichten, dass die stabile Sekundärstruktur der 5'UTR den inhibierenden Effekt auf die Proteinsynthese nur teilweise erklären kann. Die Mutation von *upstream Open Reading Frames* (uORFs) führte hingegen zur deutlichen Veränderung der Shank1-Expression. Besonders interessant ist, dass im Rahmen dieser Arbeit innerhalb der 5'UTR ein uORF identifiziert werden konnte, welcher nicht von einem AUG, sondern dem Kodon ACG gestartet wird. Die Mutation dieses *non-AUG*-Startpunktes führte zur weiteren Inhibition der Shank1-Translation. Außerdem konnte gezeigt werden, dass auch die Nutzung stromabwärts gelegener alternativer Shank1-Startpunkte vom ACG-uORF beeinflusst wird. Die Initiation der Translation für verschiedene Shank1-Isoformen könnte mittels dieses *non-AUG*-uORFs z.B. nach synaptischer Aktivierung unabhängig von anderen Transkripten reguliert werden.

Die dendritische Lokalisation der Shank1-Transkripte und die komplexe, außergewöhnliche Regulation der Translationsinitiation sprechen für eine wichtige Rolle der lokalen Shank1-Synthese an exzitatorischen Synapsen.

6. Literaturverzeichnis

Acland P, Dixon M, Peters G, Dickson C. (1990) Subcellular fate of the int-2 oncoprotein is determined by choice of initiation codon. *Nature*, 343(6259): 662-5.

Averous J, Proud CG. (2006) When translation meets transformation: the mTOR story. *Oncogene*, 25(48): 6423-35.

Baas PW, Deitch JS, Black MM, Banker GA. (1988) Polarity orientation of microtubules in hippocampal neurons: uniformity in the axon and nonuniformity in the dendrite. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(21): 8335-9.

Baird SD, Turcotte M, Korneluk RG, Holcik M. (2006) Searching for IRES. *RNA*, 12(10): 1755-85.

Baron MK, Boeckers TM, Vaida B, Faham S, Gingery M, Sawaya MR, Salyer D, Gundelfinger ED, Bowie JU. (2006) An architectural framework that may lie at the core of the postsynaptic density. *Science*, 311(5760): 531-5.

Becerra SP, Rose JA, Hardy M, Baroudy BM, Anderson CW. (1985) Direct mapping of adeno-associated virus capsid proteins B and C: a possible ACG initiation codon. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82(23): 7919-23.

Bertrand E, Chartrand P, Schaefer M, Shenoy SM, Singer RH, Long RM. (1998) Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast. *Mol Cell*, 2(4): 437-45.

Blichenberg A, Schwanke B, Rehbein M, Garner CC, Richter D, Kindler S. (1999) Identification of a cis-acting dendritic targeting element in MAP2 mRNAs. *J Neurosci*, 19(20): 8818-29.

Blichenberg A, Rehbein M, Muller R, Garner CC, Richter D, Kindler S. (2000) 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*. 13(10): 1881-8.

Boeckers TM, Winter C, Smalla KH, Kreutz MR, Bockmann J, Seidenbecher C, Garner CC, Gundelfinger ED. (1999) Proline-rich synapse-associated proteins ProSAP1 and ProSAP2 interact with synaptic proteins of the SAPAP/GKAP family. *Biochem Biophys Res Commun*, 264(1): 247-52.

Boeckers TM, Kreutz MR, Winter C, Zuschratter W, Smalla KH, Sanmarti-Vila L, Wex H, Langaese K, Bockmann J, Garner CC, Gundelfinger ED. (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*, 19(15): 6506-18.

Boeckers TM, Kreutz MR, Winter C, Zuschratter W, Smalla KH, Sanmarti-Vila L, Wex H, Langaese K, Bockmann J, Garner CC, Gundelfinger ED. (2001) Proline-rich synapse-associated protein-1/cortactin binding protein 1 (ProSAP1/CortBP1) is a PDZ-domain protein highly enriched in the postsynaptic density. *Ann Anat*, 183(2): 101.

Bockers TM, Mameza MG, Kreutz MR, Bockmann J, Weise C, Buck F, Richter D, Gundelfinger ED, Kreienkamp HJ. (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*, 276(43): 40104-12.

- Bockers TM, Segger-Junius M, Iglauer P, Bockmann J, Gundelfinger ED, Kreutz MR, Richter D, Kindler S, Kreienkamp HJ.** (2004) Differential expression and dendritic transcript localization of Shank family members: identification of a dendritic targeting element in the 3' untranslated region of Shank1 mRNA. *Mol Cell Neurosci*, 26(1): 182-90.
- Boeckers TM, Liedtke T, Spilker C, Dresbach T, Bockmann J, Kreutz MR, Gundelfinger ED.** (2005) C-terminal synaptic targeting elements for postsynaptic density proteins ProSAP1/Shank2 and ProSAP2/Shank3. *J Neurochem*, 92(3): 519-24.
- Bomsztyk K, Denisenko O, Ostrowski J.** (2004) hnRNP K: one protein multiple processes. *Bioessays*, 26(6): 629-38.
- Bomsztyk K, Van Seuning I, Suzuki H, Denisenko O, Ostrowski J.** (1997) Diverse molecular interactions of the hnRNP K protein. *FEBS Lett*, 403(2): 113-5.
- Bonaglia MC, Giorda R, Borgatti R, Felisari G, Gagliardi C, Selicorni A, Zuffardi O.** (2001) Disruption of the ProSAP2 gene in a t(12;22)(q24.1;q13.3) is associated with the 22q13.3 deletion syndrome. *Am J Hum Genet*, 69(2): 261-8.
- Bonaglia MC, Giorda R, Mani E, Aceti G, Anderlid BM, Baroncini A, Pramparo T, Zuffardi O.** (2006) Identification of a recurrent breakpoint within the SHANK3 gene in the 22q13.3 deletion syndrome. *J Med Genet*, 43(10): 822-8.
- Bramham CR, Wells DG.** (2007) Dendritic mRNA: transport, translation and function. *Nat Rev Neurosci*, 8(10): 776-89.
- Brendel C, Rehbein M, Kreienkamp HJ, Buck F, Richter D, Kindler S.** (2004) Characterization of Stauf1 ribonucleoprotein complexes. *Biochem J*, 384(Pt 2): 239-46.
- Brose N.** (1999) Synaptic cell adhesion proteins and synaptogenesis in the mammalian central nervous system. *Naturwissenschaften*, 86(11): 516-24.
- Bugler B, Amalric F, Prats H.** (1991) Alternative initiation of translation determines cytoplasmic or nuclear localization of basic fibroblast growth factor. *Mol Cell Biol*, 11(1): 573-7.
- Burgin KE, Waxham MN, Rickling S, Westgate SA, Mobley WC, Kelly PT.** (1990) In situ hybridization histochemistry of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in developing rat brain. *J Neurosci*, 10(6): 1788-98.
- Burkhardt JK, Echeverri CJ, Nilsson T, Vallee RB.** (1997) Overexpression of the dynamitin (p50) subunit of the dynactin complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution. *J Cell Biol*, 139(2): 469-84.
- Cao X, Yeo G, Muotri AR, Kuwabara T, Gage FH.** (2006) Noncoding RNAs in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci*, 29: 77-103.
- Carson JH, Cui H, Krueger W, Schlepchenko B, Brumwell C, Barbarese E.** (2001) RNA trafficking in oligodendrocytes. *Results Probl Cell Differ*, 34: 69-81.
- Chalut C, Egly JM.** (1995) AUC is used as a start codon in Escherichia coli. *Gene*, 156(1): 43-5.
- Chang KJ, Lin G, Men LC, Wang CC.** (2006) Redundancy of non-AUG initiators. A clever mechanism to enhance the efficiency of translation in yeast. *J Biol Chem*, 281(12): 7775-83.
- Chang YF, Imam JS, Wilkinson MF.** (2007) The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu Rev Biochem*, 76: 51-74.

- Chappell SA, Dresios J, Edelman GM, Mauro VP.** (2006) Ribosomal shunting mediated by a translational enhancer element that base pairs to 18S rRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(25): 9488-93.
- Costa-Mattioli M, Sonenberg N.** (2006) Translational control of long-term synaptic plasticity and memory storage by eIF2alpha. *Crit Rev Neurobiol*, 18(1-2): 187-95.
- Couderc B, Prats H, Bayard F, Amalric F.** (1991) Potential oncogenic effects of basic fibroblast growth factor requires cooperation between CUG and AUG-initiated forms. *Cell Regul*, 2(9): 709-18.
- Craig AM, Kang Y.** (2007) Neurexin-neurologin signaling in synapse development. *Curr Opin Neurobiol*, 17(1): 43-52.
- Crino PB, Eberwine J.** (1996) Molecular characterization of the dendritic growth cone: regulated mRNA transport and local protein synthesis. *Neuron*, 17(6): 1173-87.
- Davidovic L, Jaglin XH, Lepagnol-Bestel AM, Tremblay S, Simonneau M, Bardoni B, Khandjian EW.** (2007) The Fragile X Mental Retardation Protein is a molecular adaptor between the neurospecific KIF3C kinesin and dendritic RNA granules. *Hum Mol Genet*, Sep 21 [Epub ahead of print]
- Davis L, Banker GA, Steward O.** (1987) Selective dendritic transport of RNA in hippocampal neurons in culture. *Nature*, 330(6147): 477-9.
- Dostie J, Dreyfuss G.** (2002) Translation is required to remove Y14 from mRNAs in the cytoplasm. *Curr Biol*, 12(13): 1060-7.
- Duchaine TF, Hemraj I, Furic L, Deitinghoff A, Kiebler MA, DesGroseillers L.** (2002) Staufen2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles. *J Cell Sci*, 115(16): 3285-95.
- Dugré-Brisson S, Elvira G, Boulay K, Chatel-Chaix L, Mouland AJ, DesGroseillers L.** (2005) Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic Acids Res*. 33(15):4797-812.
- Du Y, Weed SA, Xiong WC, Marshall TD, Parsons JT.** (1998) Identification of a novel cortactin SH3 domain-binding protein and its localization to growth cones of cultured neurons. *Mol Cell Biol*, 18(10): 5838-51.
- Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, Bockmann J, Chaste P, Fauchereau F, Nygren G, Rastam M, Gillberg IC, Anckarsater H, Sponheim E, Goubran-Botros H, Delorme R, Chabane N, Mouren-Simeoni MC, de Mas P, Bieth E, Roge B, Heron D, Burglen L, Gillberg C, Leboyer M, Bourgeron T.** (2007) Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat Genet*. 39(1): 25-7.
- Edman P.** (1950) *Acta Chem. Scand*, 4, 283.
- Ehlers MD.** (2003) Activity level controls postsynaptic composition and signaling via the ubiquitin-proteasome system. *Nat Neurosci*, 6(3): 231-42.
- Frey U, Morris RG.** (1997) Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature*, 385(6616): 533-6.
- Garner CC, Tucker RP, Matus A.** (1988) Selective localization of messenger RNA for cytoskeletal protein MAP2 in dendrites. *Nature*, 336(6200): 674-7.

- Geballe AP, Morris DR.** (1994) Initiation codons within 5'-leaders of mRNAs as regulators of translation. *Trends Biochem Sci*, 19(4): 159-64.
- Gebauer F, Hentze MW.** (2004) Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(10): 827-35.
- Gerrow K, Romorini S, Nabi SM, Colicos MA, Sala C, El-Husseini A.** (2006) A preformed complex of postsynaptic proteins is involved in excitatory synapse development. *Neuron*, 49(4): 547-62.
- Giorgi C, Yeo GW, Stone ME, Katz DB, Burge C, Turrigiano G, Moore MJ.** (2007) The EJC factor eIF4AIII modulates synaptic strength and neuronal protein expression. *Cell*, 130(1): 179-91.
- Gingras AC, Raught B, Sonenberg N.** (1999) eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem*, 68: 913-63.
- Goldstein LS, Yang Z.** (2000) Microtubule-based transport systems in neurons: the roles of kinesins and dyneins. *Annu Rev Neurosci*, 23: 39-71.
- Gray NK, Hentze MW.** (1994) Iron regulatory protein prevents binding of the 43S translation pre-initiation complex to ferritin and eALAS mRNAs. *EMBO J*, 13(16): 3882-91.
- Hann SR, King MW, Bentley DL, Anderson CW, Eisenman RN.** (1988) A non-AUG translational initiation in c-myc exon 1 generates an N-terminally distinct protein whose synthesis is disrupted in Burkitt's lymphomas. *Cell*. 52(2): 185-95.
- Hann SR.** (1994) Regulation and function of non-AUG-initiated proto-oncogenes. *Biochimie*, 76(9): 880-6.
- Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D.** (2000) Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell*, 6(5): 1099-108.
- Hashimoto NN, Carnevalli LS, Castilho BA.** (2002) Translation initiation at non-AUG codons mediated by weakened association of eukaryotic initiation factor (eIF) 2 subunits. *Biochem J*, 367(Pt 2): 359-68.
- Huang YS, Carson JH, Barbarese E, Richter JD.** (2003) Facilitation of dendritic mRNA transport by CPEB. *Genes Dev*, 17(5): 638-53.
- Hemmings-Mieszczak M, Hohn T, Preiss T.** (2000) Termination and peptide release at the upstream open reading frame are required for downstream translation on synthetic shunt-competent mRNA leaders. *Mol Cell Biol*, 20(17): 6212-23.
- Hensold JO, Barth-Baus D, Stratton CA.** (1996) Inducers of erythroleukemic differentiation cause messenger RNAs that lack poly(A)-binding protein to accumulate in translationally inactive, salt-labile 80 S ribosomal complexes. *J Biol Chem*, 271(38): 23246-54.
- Hershey JWB and Merrick WC.** (2000) The pathway and mechanism of initiation of protein synthesis. In: N. Sonenberg, *Translational Control of Gene Expression, Monographs* vol. 39, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 33-38.
- Hinnebusch AG.** (2005) Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu Rev Microbiol*, 59: 407-50.
- Hirokawa N.** (2006) mRNA transport in dendrites: RNA granules, motors, and tracks. *J Neurosci*, 26(27): 7139-42.

- Hirokawa N, Takemura R.** (2005) Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat Rev Neurosci*, 6(3): 201-14.
- Holcik M, Pestova TV.** (2007) Translation mechanism and regulation: old players, new concepts. Meeting on translational control and non-coding RNA. *EMBO Rep*, 8(7): 639-43.
- Huang ZH, Wu HJ, Yeh CC, Chou YC, Chang YC.** (2006) Dendritic spines of developing rat cortical neurons in culture. *Chin J Physiol*, 49(1): 39-45.
- Hughes TA.** (2006) Regulation of gene expression by alternative untranslated regions. *Trends Genet*, 22(3): 119-22.
- Huttelmaier S, Zenklusen D, Lederer M, Dichtenberg J, Lorenz M, Meng X, Bassell GJ, Condeelis J, Singer RH.** (2005) Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature*, 438(7067): 512-5.
- Iacono M, Mignone F, Pesole G.** (2005) uAUG and uORFs in human and rodent 5'untranslated mRNAs. *Gene*. 349: 97-105.
- Iglauer P.** (2005) Transport und Translation der dendritisch lokalisierten Shank1 mRNA in *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769). *Dissertation*, Universität Hamburg.
- Jackson RJ.** (2005) Alternative mechanisms of initiating translation of mammalian mRNAs. *Biochem Soc Trans*, 33(Pt 6): 1231-41.
- Jiang C, Schuman EM.** (2002) Regulation and function of local protein synthesis in neuronal dendrites. *Trends Biochem Sci*, 27(10): 506-13.
- Kanai Y, Dohmae N, Hirokawa N.** (2004) Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron*, 43(4): 513-25.
- Kanai Y, Okada Y, Tanaka Y, Harada A, Terada S, Hirokawa N.** (2000) KIF5C, a novel neuronal kinesin enriched in motor neurons. *J Neurosci*, 20(17): 6374-84.
- Kapp, L.D., Lorsch, J.R.** (2004) The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annu. Rev. Biochem.* 73: 657-704.
- Kellogg DA, Doctor BP, Loebel JE, Nirenberg MW.** (1966) RNA codons and protein synthesis. IX. Synonym codon recognition by multiple species of valine-, alanine-, and methionine-sRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 55(4): 912-9.
- Khanam T, Muddashetty RS, Kahvejian A, Sonenberg N, Brosius J.** (2006) Poly(A)-binding protein binds to A-rich sequences via RNA-binding domains 1+2 and 3+4. *RNA Biol.* 3(4): 170-7.
- Kim YK, Furic L, Desgroseillers L, Maquat LE.** (2005) Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell*, 120(2): 195-208.
- Kim HK, Kim YB, Kim EG, Schuman E.** (2005) Measurement of dendritic mRNA transport using ribosomal markers. *Biochem Biophys Res Commun*, 328(4): 895-900.
- Kim KC, Kim HK.** (2006) Role of Staufen in dendritic mRNA transport and its modulation. *Neurosci Lett*, 397(1-2): 48-52.
- Kochetov AV.** (2005) AUG codons at the beginning of protein coding sequences are frequent in eukaryotic mRNAs with a suboptimal start codon context. *Bioinformatics*, 21(7): 837-40.

- Kochetov AV, Palyanov A, Titov II, Grigorovich D, Sarai A, Kolchanov NA.** (2007) AUG_hairpin: prediction of a downstream secondary structure influencing the recognition of a translation start site. *BMC Bioinformatics*, 8: 318.
- Komarova AV, Brocard M, Kean KM.** (2006) The case for mRNA 5' and 3' end cross talk during translation in a eukaryotic cell. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 81: 331-67.
- Kozak M.** (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, 44(2): 283-92.
- Kozak M.** (1989) Context effects and inefficient initiation at non-AUG codons in eucaryotic cell-free translation systems. *Mol Cell Biol*, 9(11): 5073-80.
- Kozak M.** (1990) Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(21): 8301-5.
- Kozak M.** (1991) Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J Biol Chem*, 266(30): 19867-70.
- Kozak M.** (1991) Effects of long 5' leader sequences on initiation by eukaryotic ribosomes in vitro. *Gene Expr*, 1(2): 117-25.
- Knowles RB, Sabry JH, Martone ME, Deerinck TJ, Ellisman MH, Bassell GJ, Kosik KS.** (1996) Translocation of RNA granules in living neurons. *J Neurosci*, 16(24): 7812-20.
- Kohrmann M, Luo M, Kaether C, DesGroseillers L, Dotti CG, Kiebler MA.** (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*, 10(9): 2945-53.
- Kreienkamp HJ, Zitzer H, Gundelfinger ED, Richter D, Bockers TM.** (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*, 275(42): 32387-90.
- Kreienkamp HJ, Soltau M, Richter D, Bockers T.** (2002) Interaction of G-protein-coupled receptors with synaptic scaffolding proteins. *Biochem Soc Trans*, 30(4): 464-8.
- Krichevsky AM, Kosik KS.** (2001) Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation-dependent translation. *Neuron*, 32(4): 683-96.
- Krummheuer J, Johnson AT, Hauber I, Kammler S, Anderson JL, Hauber J, Purcell DF, Schaal H.** (2007) A minimal uORF within the HIV-1 vpu leader allows efficient translation initiation at the downstream env AUG. *Virology*, 363(2): 261-71.
- Lim S, Naisbitt S, Yoon J, Hwang JI, Suh PG, 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*, 274(41): 29510-8.
- Link W, Konietzko U, Kauselmann G, Krug M, Schwanke B, Frey U, Kuhl D.** (1995) Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(12): 5734-8.
- Lovett PS, Rogers EJ.** (1996) Ribosome regulation by the nascent peptide. *Microbiol Rev*, 60(2): 366-85.
- Lu PD, Harding HP, Ron D.** (2004) Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response. *J Cell Biol*, 167(1): 27-33.

- Luukkonen BG, Tan W, Schwartz S.** (1995) Efficiency of reinitiation of translation on human immunodeficiency virus type 1 mRNAs is determined by the length of the upstream open reading frame and by intercistronic distance. *J Virol*, 69(7): 4086-94.
- Macchi P, Kroening S, Palacios IM, Baldassa S, Grunewald B, Ambrosino C, Goetze B, Lupas A, St Johnston D, Kiebler M.** (2003) Barentsz, a new component of the Staufen-containing ribonucleoprotein particles in mammalian cells, interacts with Staufen in an RNA-dependent manner. *J Neurosci*, 23(13): 5778-88.
- Makeyev AV, Liebhaber SA.** (2002) The poly(C)-binding proteins: a multiplicity of functions and a search for mechanisms. *RNA*, 8(3):265-78.
- Mallardo M, Deitinghoff A, Muller J, Goetze B, Macchi P, Peters C, Kiebler MA.** (2003) Isolation and characterization of Staufen-containing ribonucleoprotein particles from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(4): 2100-5.
- Manning MA, Cassidy SB, Clericuzio C, Cherry AM, Schwartz S, Hudgins L, Enns GM, Hoyme HE.** (2004) 22q deletion syndrome: a newly recognized cause of speech and language disability in the autism spectrum. *Pediatrics*, 114(2): 451-7.
- Martin KC, Zukin RS.** (2006) RNA trafficking and local protein synthesis in dendrites: an overview. *J Neurosci*, 26(27): 7131-4.
- McEvoy M, Cao G, Llopis PM, Kundel M, Jones K, Hofler C, Shin C, Wells DG.** (2007) Cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1-mediated mRNA translation in Purkinje neurons is required for cerebellar long-term depression and motor coordination. *J Neurosci*, 27(24): 6400-11.
- Mehdi H, Ono E, Gupta KC.** (1990) Initiation of translation at CUG, GUG, and ACG codons in mammalian cells. *Gene*, 91(2): 173-8.
- Meijer HA, Thomas AA.** (2002) Control of eukaryotic protein synthesis by upstream open reading frames in the 5'-untranslated region of an mRNA. *Biochem J*, 367(1): 1-11.
- Meyer G, Varoqueaux F, Neeb A, Oeschli M, Brose N.** (2004) The complexity of PDZ domain-mediated interactions at glutamatergic synapses: a case study on neuroligin. *Neuropharmacology*, 47(5): 724-33.
- Miller S, Yasuda M, Coats JK, Jones Y, Martone ME, Mayford M.** (2002) Disruption of dendritic translation of CaMKIIalpha impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation. *Neuron*, 36(3):507-19.
- Miki T, Takano K, Yoneda Y.** (2005) The role of mammalian Staufen on mRNA traffic: a view from its nucleocytoplasmic shuttling function. *Cell Struct Funct*, 30(2): 51-6.
- Miyashiro K, Dichter M, Eberwine J.** (1994) On the nature and differential distribution of mRNAs in hippocampal neurites: implications for neuronal functioning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(23): 10800-4.
- Mohr E, Richter D.** (2004) Subcellular vasopressin mRNA trafficking and local translation in dendrites. *J Neuroendocrinol*, 16(4): 333-9.
- 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*, 76(1): 155-65.
- Monshausen M, Rehbein M, Richter D, Kindler S.** (2002) The RNA-binding protein Staufen from rat brain interacts with protein phosphatase-1. *J Neurochem*, 81(3): 557-64.

- Mori Y, Imaizumi K, Katayama T, Yoneda T, Tohyama M.** (2000) Two cis-acting elements in the 3' untranslated region of alpha-CaMKII regulate its dendritic targeting. *Nat Neurosci*, 3(11): 1079-84.
- Morris DR, Geballe AP.** (2000) Upstream open reading frames as regulators of mRNA translation. *Mol Cell Biol*, 20(23): 8635-42.
- Muslimov IA, 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*, 17(12): 4722-33.
- Naisbitt S, Kim E, Tu JC, Xiao B, Sala C, Valtschanoff J, Weinberg RJ, Worley PF, Sheng M.** (1999) Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron*, 23(3): 569-82.
- Nemeth AL, Medveczky P, Toth J, Siklodi E, Schlett K, Patthy A, Palkovits M, Ovadi J, Tokesi N, Nemeth P, Szilagy L, Graf L.** (2007) Unconventional translation initiation of human trypsinogen 4 at a CUG codon with an N-terminal leucine. A possible means to regulate gene expression. *FEBS J*, 274(6): 1610-20.
- Oleynikov Y, Singer RH.** (2003) Real-time visualization of ZBP1 association with beta-actin mRNA during transcription and localization. *Curr Biol*, 13(3): 199-207.
- Ostareck DH, Ostareck-Lederer A, Wilm M, Thiele BJ, Mann M, Hentze MW.** (1997) mRNA silencing in erythroid differentiation: hnRNP K and hnRNP E1 regulate 15-lipoxygenase translation from the 3' end. *Cell*, 89(4): 597-606.
- Ostareck-Lederer A, Ostareck DH, Cans C, Neubauer G, Bomsztyk K, Superti-Furga G, Hentze MW.** (2002) c-Src-mediated phosphorylation of hnRNP K drives translational activation of specifically silenced mRNAs. *Mol Cell Biol*, 22(13): 4535-43.
- Ostroff LE, Fiala JC, Allwardt B, Harris KM.** (2002) Polyribosomes redistribute from dendritic shafts into spines with enlarged synapses during LTP in developing rat hippocampal slices. *Neuron*, 35(3): 535-45.
- Paraskeva E, Gray NK, Schlager B, Wehr K, Hentze MW.** (1999) Ribosomal pausing and scanning arrest as mechanisms of translational regulation from cap-distal iron-responsive elements. *Mol Cell Biol*, 19(1): 807-16.
- Paziewska A, Wyrwicz LS, Bujnicki JM, Bomsztyk K, Ostrowski J.** (2004) Cooperative binding of the hnRNP K three KH domains to mRNA targets. *FEBS Lett*, 577(1-2): 134-40.
- Pedersen AG, Nielsen H.** (1997) Neural network prediction of translation initiation sites in eukaryotes: perspectives for EST and genome analysis. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*, 5: 226-33.
- Pentecost BT, Song R, Luo M, DePasquale JA, Fasco MJ.** (2005) Upstream regions of the estrogen receptor alpha proximal promoter transcript regulate ER protein expression through a translational mechanism. *Mol Cell Endocrinol*, 229(1-2): 83-94.
- Pelletier J, Sonenberg N.** (1988) Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature*, 334(6180): 320-5.
- Pickering BM, Willis AE.** (2005) The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease. *Semin Cell Dev Biol*, 16(1): 39-47.
- Pinkstaff JK, Chappell SA, Mauro VP, Edelman GM, Krushel LA.** (2001) Internal initiation of translation of five dendritically localized neuronal mRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(5): 2770-5.

Qualmann B, Boeckers TM, Jeromin M, Gundelfinger ED, Kessels MM. (2004) Linkage of the actin cytoskeleton to the postsynaptic density via direct interactions of Abp1 with the ProSAP/Shank family. *J Neurosci*, 24(10): 2481-95.

Rechsteiner M, Rogers SW. (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci*, 21(7): 267-71.

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 mRNAs. *Brain Res Mol Brain Res*, 79(1-2): 192-201.

Rogers GW Jr, Edelman GM, Mauro VP. (2004) Differential utilization of upstream AUGs in the beta-secretase mRNA suggests that a shunting mechanism regulates translation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(9): 2794-9.

Rook MS, Lu M, Kosik KS. (2000) CaMKIIalpha 3' untranslated region-directed mRNA translocation in living neurons: visualization by GFP linkage. *J Neurosci*, 20(17): 6385-93.

Ryabova LA, Hohn T. (2000) Ribosome shunting in the cauliflower mosaic virus 35S RNA leader is a special case of reinitiation of translation functioning in plant and animal systems. *Genes Dev*, 14(7): 817-29.

Ryabova LA, Pooggin MM, Hohn T. (2002) Viral strategies of translation initiation: ribosomal shunt and reinitiation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 72: 1-39.

Sala C, Piech V, Wilson NR, Passafaro M, Liu G, Sheng M. (2001) Regulation of dendritic spine morphology and synaptic function by Shank and Homer. *Neuron*, 31(1): 115-30.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, N.Y.

Sasaki J, Nakashima N. (2000) Methionine-independent initiation of translation in the capsid protein of an insect RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(4): 1512-5.

Schagger H, von Jagow G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, 166(2):368-79.

Schell T, Kulozik AE, Hentze MW. (2002) Integration of splicing, transport and translation to achieve mRNA quality control by the nonsense-mediated decay pathway. *Genome Biol*, 3(3): REVIEWS1006.

Schepis A, Stauber T, Krijnse Locker J. (2007) Kinesin-1 plays multiple roles during the vaccinia virus life cycle. *Cell Microbiol*, 9(8): 1960-73.

Schwab SR, Shugart JA, Horng T, Malarkannan S, Shastri N. (2004) Unanticipated antigens: translation initiation at CUG with leucine. *PLoS Biol*, 2(11): e366.

Segger-Junius M. (2003) Charakterisierung der dendritischen Lokalisierung der Shank1 mRNA. *Dissertation*, Universität Oldenburg.

Sheng M, Kim E. (2000) The Shank family of scaffold proteins. *J Cell Sci*, 113(11): 1851-6.

Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Jensen ON, Podtelejnikov AV, Neubauer G, Shevchenko A, Mortensen P, Mann M. (1996) A strategy for identifying gel-separated proteins in sequence databases by MS alone. *Biochem Soc Trans*, 24(3): 893-6.

- Schuman EM, Dynes JL, Steward O.** (2006) Synaptic regulation of translation of dendritic mRNAs. *J Neurosci*, 26(27): 7143-6.
- Steward O, Levy WB.** (1982) Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus. *J Neurosci*, 2(3): 284-91.
- Steward O, Schuman EM.** (2003) Compartmentalized synthesis and degradation of proteins in neurons. *Neuron*. 40(2): 347-59.
- Steward O, Worley PF.** (2001) A cellular mechanism for targeting newly synthesized mRNAs to synaptic sites on dendrites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(13): 7062-8.
- St Johnston D, Beuchle D, Nusslein-Volhard C.** (1991) *Staufen*, a gene required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg. *Cell*, 66(1): 51-63.
- Sugihara H, Andrisani V, Salvaterra PM.** (1990) *Drosophila* choline acetyltransferase uses a non-AUG initiation codon and full length RNA is inefficiently translated. *J Biol Chem*, 265(35): 21714-9.
- Sutton MA, Schuman EM.** (2006) Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory. *Cell*, 127(1): 49-58.
- Sutton MA, Schuman EM.** (2005) Local translational control in dendrites and its role in long-term synaptic plasticity. *J Neurobiol*, 64(1): 116-31.
- Tang SJ, Meulemans D, Vazquez L, Colaco N, Schuman E.** (2001) A role for a rat homolog of *staufen* in the transport of RNA to neuronal dendrites. *Neuron*, 32(3): 463-75.
- Tang SJ, Reis G, Kang H, Gingras AC, Sonenberg N, Schuman EM.** (2002) A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(1): 467-72.
- Tekotte H, Davis I.** (2002) Intracellular mRNA localization: motors move messages. *Trends Genet*, 18(12): 636-42.
- Tiedge H, Bloom FE, Richter D.** (1999) RNA, whither goest thou? *Science*, 283(5399): 186-7.
- Tiruchinapalli DM, Oleynikov Y, Kelic S, Shenoy SM, Hartley A, Stanton PK, Singer RH, Bassell GJ.** (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*, 23(8): 3251-61.
- Tobaben S, Sudhof TC, Stahl B.** (2000) The G protein-coupled receptor CL1 interacts directly with proteins of the Shank family. *J Biol Chem*, 275(46): 36204-10.
- Touriol C, Bornes S, Bonnal S, Audigier S, Prats H, Prats AC, Vagner S.** (2003) Generation of protein isoform diversity by alternative initiation of translation at non-AUG codons. *Biol Cell*, 95(3-4): 169-78.
- Tu JC, Xiao B, Naisbitt S, Yuan JP, Petralia RS, Brakeman P, Doan A, Aakalu VK, Lanahan AA, Sheng M, Worley PF.** (1999) Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins. *Neuron*, 23(3): 583-92.
- Uchino S, Wada H, Honda S, Nakamura Y, Ondo Y, Uchiyama T, Tsutsumi M, Suzuki E, Hirasawa T, Kohsaka S.** (2006) Direct interaction of post-synaptic density-95/Dlg/ZO-1 domain-containing synaptic molecule Shank3 with GluR1 alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor. *J Neurochem*, 97(4): 1203-14.

- Vagner S, Touriol C, Galy B, Audigier S, Gensac MC, Amalric F, Bayard F, Prats H, Prats AC.** (1996) Translation of CUG- but not AUG-initiated forms of human fibroblast growth factor 2 is activated in transformed and stressed cells. *J Cell Biol.* 135(5): 1391-402.
- Vattem KM, Wek RC.** (2004) Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(31): 11269-74.
- Verderio C, Coco S, Pravettoni E, Bacci A, Matteoli M.** (1999) Synaptogenesis in hippocampal cultures. *Cell Mol Life Sci*, 55(11): 1448-62.
- Wek RC, Jiang HY, Anthony TG.** (2006) Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc Trans*, 34(Pt 1): 7-11.
- Wells DG.** (2006) RNA-binding proteins: a lesson in repression. *J Neurosci*, 26(27): 7135-8.
- Wickham L, Duchaine T, Luo M, Nabi IR, DesGroseillers L.** (1999) Mammalian staufen is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol*, 19(3): 2220-30.
- Xiao JH, Davidson I, Matthes H, Garnier JM, Chambon P.** (1991) Cloning, expression, and transcriptional properties of the human enhancer factor TEF-1. *Cell*, 65(4): 551-68.
- Yao I, 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*, 274(39): 27463-6.
- Zhang HL, Singer RH, Bassell GJ.** (1999) Neurotrophin regulation of beta-actin mRNA and protein localization within growth cones. *J Cell Biol*, 147(1): 59-70.
- Zitomer RS, Walthall DA, Rymond BC, Hollenberg CP.** (1984) *Saccharomyces cerevisiae* ribosomes recognize non-AUG initiation codons. *Mol Cell Biol*, 4(7): 1191-7.
- Zitzer H, Honck HH, Bachner D, Richter D, Kreienkamp HJ.** (1999) Somatostatin receptor interacting protein defines a novel family of multidomain proteins present in human and rodent brain. *J Biol Chem*, 274(46): 32997-3001.
- Zivraj K.** (2005) Regulation of dendritic MAP2 mRNA targeting by MARTA2 in *Rattus norvegicus*. *Dissertation*, Universität Hamburg.
- Zuker M.** (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*, 31(13): 3406-15.

7. Anhang

7.1 Zusammensetzung der Puffer und Medien

2x BBS: 50 mM BES
280 mM NaCl
1,5 mM Na₂HPO₄ pH 6,94 - 6,98 *Steril filtrieren.*

Borat-Puffer: 0,05 M Borsäure
0,02 M Na₂B₄O₇ pH 8.5

Coomassie-Lösung: 40% (v/v) Methanol
10% (v/v) Essigsäure
0,1% (w/v) Coomassie G-250

Denhardt's Lösung (100x): 2% BSA
2% Ficoll 400
2% Polyvinylpyrrolidon

DEPC-Wasser: 100µl-1ml DEPC (DiethylenePyrocarbonate) in 1000ml tridestilliertes Wasser geben, kräftig schütteln, 24h bei 37°C inkubieren und 2-3x autoklavieren

5x DNA-Ladepuffer: 30% (v/v) Glycerin
40 mM Tris/HCl, pH 8.0
0,25% (w/v) Bromphenolblau

Elutionspuffer (Antikörper): 0,2 M Glycin
1 mM EGTA, pH 2.8

Elutionspuffer (GST): 50 mM Tris/HCl, pH 8.0
10 mM reduziertes Glutathion

Entfärbe-Lösung: 50% (v/v) Methanol
10% (v/v) Essigsäure

HEPES-Puffer: 119 mM NaCl
2,5 mM KCl
2 mM CaCl₂
2 mM MgCl₂
25 mM HEPES, pH 7.5
30 mM Glucose

5x KCM: 0,5 M KCl
0,15 M CaCl₂
0,25 M MgCl₂

5x Laemmli-Puffer: 50% (v/v) Glycerin
0,5 M DTT (Dithiothreitol)
7,5% (w/v) SDS
300 mM Tris/HCl, pH 6.8
Bromphenolblau

LB: 10 g/l Bacto-Pepton
10 g/l NaCl
10 g/l Hefe-Extrakt Für LB-Platten zusätzlich 15g/L Agar.

NHS-Kopplungspuffer: 0,1 M NaHCO₃
0,5 M NaCl pH 7.5

10x PBS: 80 g/l NaCl
2 g/l KCl
14,4 g/l Na₂HPO₄
2,4 g/l KH₂PO₄ pH 7,3

RIPA-Puffer: 150 mM NaCl
50 mM Tris/HCl, pH 8.0
5 mM EDTA
0,5% (w/v) Natriumdeoxycholat
1% (v/v) NP-40
0,1% (w/v) SDS

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

20x SSC: 3 M NaCl
0,3 M Tri-Natrium-Citrat x 2H₂O pH 7.0

STE-Puffer: 50 mM NaCl
10 mM Tris/HCl, pH 8.0
1 mM EDTA

1x TAE-Puffer: 100 mM Tris/Acetat, pH 8.0
5 mM EDTA

10x TBE: 108 g/l Tris
55 g/l Borsäure
7,45 g/l EDTA

TBS-T: 150 mM NaCl
50 mM Tris/HCl, pH 7.9
0,2% (w/v) Tween-20

Transfer-Puffer: 92 mM Glycerin
25 mM Tris/HCl
20% (v/v) Methanol
0,02% (w/v) Glycin

	<u>Für 50ml</u>	<u>Endkonzentration</u>
TSB:	10ml 5x LB, pH 6.1	1x
	10ml 50% PEG 3350	10%
	2,5ml DMSO	5%
	0,5ml 1 M MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,01 M
	0,5ml 1 M MgCl ₂ x 6H ₂ O	0,01 M
	<i>Steril filtrieren.</i>	

Versene-Puffer: 1x PBS mit 0,5 mM EDTA

7.2 Verwendete Oligonukleotide

Tab. 7.1: Liste der verwendeten Oligonukleotide

fwd, F = *forward*; rev, R = *revers*; Restriktionsschnittstellen sind *kursiv* und Mutationen unterstrichen dargestellt.

Name	Sequenz 5' - 3'
mRFP fwd	<i>GCTAGC</i> <i>TTTAAA</i> <i>TAAATTAACC</i> ATGGCCTCCTCCGAGGACGT
mRFP rev	<i>AGATCT</i> TTAGGCGCCGGTGGAGTGGCG
3'UTR fwd (1-588)	<i>GAGCTC</i> TGATGGCTGGCCTGGACGGAC
3'UTR rev (1-588)	<i>TGATCA</i> CCGAATGCAGCGTGTGGGAAG
3'UTR Trace670rev	CTCACGCCTTTTCTCCCCAGAC
Lücke fwd neu	GTTTCCTGAGAAAGGGTCTCTCTG
Lücke rev neu1	GTGTGGAGCCATGCTGTAAGAATG
Lücke rev neu2	CCTTCTTTGGCAGCTGAACATAGG
BF fwd neu	CCCTCCTCCCCAACCCCTTCTTC
BF rev neu	CTCACCACCCCTCCCCCTC
5'UTR Start SalI	<i>GTCGAC</i> GAGCGAGAAGG oder je nach Klonierung GCC <i>GTCGAC</i> GAGCGAGAAGG
5'UTR Ende HindIII	GCC <i>AAGCTT</i> TGCTGAAGTG
5'UTR Mut rev1	CCGGGCCTGGC <u>CT</u> CCG
5'UTR Mut fwd1	CCCGCGGGGGGGGTGAG
5'UTR Mut rev2	AGGC <u>CT</u> TGCCCCACCG
5'UTR Mut fwd2	GAGGGTCCCCGTCTCCG
5'UTR BglIIMut3rev	GGACGGCA <i>AGATCT</i> CAGGCGGCTGCCTG
5'UTR BamHIMut3fwd	CCGCCTG <i>GGATCC</i> TGCCGTCCCCGTC
5'UTR Mut rev4	GTCTTTGTGGGGCCACGG
5'UTR Mut fwd4	CCACAGCCCCGCGACAAG
hnKhuBamF	<i>GGATCC</i> ATGGAAACTGAACAG
hnKhuXhoR	<i>CTCGAG</i> TTAGAATCCTTCAAC
hnKKH2revXho	<i>CTCGAG</i> AAACATCATTGTAAAACC
hnKKH3huF	<i>GGATCC</i> GATCTTGGTGGACCTATTATTAC
PDZfwd	CTA <i>GTCGAC</i> GGT <i>AAGCTT</i> GG ATGATGGTCGATGGGATTGG CCCAGGGAGCGATTAC
PDZrev	CTGGTGACCATCACCACCTTC
Primer3fwd (RT-PCR)	CATCTGCGCCCTCTACAAC
Primer4rev (RT-PCR)	GGACTCCTGGAAGGGCAC
Neofwd (RT-PCR)	GGATTGCACGCAAGGTCTC
Neorev (RT-PCR)	CGTCCTGCAGTTCATTACAG

Name	Sequenz 5'– 3'
BigNeufwd (ACGuORF)	AAGCTT GAGGAAGAGCAGGCGGAGACG
BigNeurev (ACGuORF, Flag)	TCACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATC (<i>FlagTag</i>)... ...CAGGCGGCGGCTGCCTGGCGGG
MutACGNhefwd	GCTAGC GAGA <u>AG</u> C GCGGCCCGGAG
5'UTR Nhefwd	GCTAGC GAGCGAGAAGGGTGGC
5'UTR Nherev	GCTAGC AAGGCGTCGTCTGGGACGGAC

7.3 Verwendete Expressionskonstrukte

Tab. 7.2: Liste der verwendeten Expressionskonstrukte

3'UTR immer aus *Rattus norvegicus* (NM_031751), 5'UTR immer human (siehe Abb. 7.1)

Name	Anmerkungen
5'UTR-mRFP-8xMS2Loops-3'UTR (nt 1-588 oder 1-1980)	Für FISH/ICC und <i>Live-Imaging</i> mit dem Shank1 DTE/3'UTR
5'UTR-mRFP-8xMS2Loops	Kontrolle ohne 3'UTR
GFP-MS2-NLS	Für <i>Live-Imaging</i> (Robert Singer)
pEGFP-Shank1a-3'UTR	Shank1a <i>full length</i> (Carlo Sala)
pEGFP-Shank1a	Kontrolle ohne 3'UTR (Carlo Sala)
pBluescript-Shank1a (HindIII)	Zur Herstellung der RNA-Sonden, <i>Antisense</i> (T7) und <i>Sense</i> (T3)
pBluescript-mRFP	s.o.
pBluescript-GFP	s.o.
pCMV-Flag-Staufen1+	Spleißvariante mit Insertion, wt (AF227200)
pEGFP-Staufen1-	Spleißvariante ohne Insertion, wt (AF290989)
pCMV-Flag-Staufen1dsRBD2/3+	Spleißvariante mit Insertion, dn
pCMV-Flag-Staufen1dsRBD2/3-	Spleißvariante ohne Insertion, dn
pCMV-Flag-hnRNP-K	wt (NM_057141)
pCMV-Flag-hnRNP-K-KH1+2	dn, Aminosäure 31-240, bp 91-729
pCMV-Flag-PABP	Wt (Evita Mohr)
pCMV-Flag-PABP-RRM1+2	dn
pCMV-Flag-PABP-RRM2+3	dn
pCMV-Flag-PABP-RRM3+4	dn
KinesinI=KIF5Cdn-GFP	Aminosäure 1-330 (Antonino Schepis, NM_001107730)
Dynamitin-GFP	<i>Full length</i> (Richard Vallee, NM_006400)
pcDNA3-Shank1-Klon16	Aminosäuren 1-1135
pcDNA3-Shank1-Klon16-3.AUGmut	s.u.
5'UTR1.AUGmut-Shank1PDZ	1.uAUG zu AAG mutiert
5'UTR2.AUGmut-Shank1PDZ	2.uAUG zu AAG mutiert
5'UTR2.+3.AUGmut-Shank1PDZ	2.+3.uAUG mutiert
5'UTR3.AUGmut-Shank1PDZ	3.uAUG zu AUC mutiert, überlappendes ACG uORF Stoppkodon UGA zu AGA mutiert
5'UTR4.AUGmut-Shank1PDZ	4.AUG zu AAG mutiert
5'UTR3.AUGmut-mRFP-8xMS2Loops-3'UTR	s.o.
pBL-5'UTR-Luciferase	Blaulichvektor mit <i>Photinus</i> -Luciferase

Name	Anmerkungen
pBL-5'UTR1.AUGmut-Luciferase	s.o.
pBL-5'UTR2.AUGmut-Luciferase	s.o.
pBL-5'UTR3.AUGmut-Luciferase	s.o.
pBL-5'UTR4.AUGmut-Luciferase	s.o.
pBL-5'UTR Δ 1-138-Luciferase	Deletion der Nukleotide 1-138
pBL-5'UTR138-583-Luciferase	Nur Nukleotide 138-583
pBL-5'UTR138-583rev-Luciferase	Nukleotide 138-583 revers kloniert
pBL-5'UTR Δ 40-340-Luciferase	Deletion der Nukleotide 40-340
pBL-5'UTR Δ 140-340-Luciferase	Deletion der Nukleotide 140-340
pBL-5'UTR Δ 170-290-Luciferase	Deletion der Nukleotide 170-290
pBL-5'UTR Δ 1-583-Luciferase	Deletion der Nukleotide 1-583
pBF-5'UTR-Luciferase	BicFire-Vektor bicistronisch mit <i>Photinus</i> -Luciferase und EMCV-IRES/ <i>Renilla</i> -Luciferase
pBF-5'UTR1.AUGmut-Luciferase	s.o.
pBF-5'UTR2.AUGmut-Luciferase	s.o.
pBF-5'UTR3.AUGmut-Luciferase	s.o.
pBF-5'UTR4.AUGmut-Luciferase	s.o.
pBL-5'UTR1-138-Luciferase	s.o.
pBL-5'UTR Δ 40-340-Luciferase	s.o.
pBL-5'UTR Δ 1-490-Luciferase	Deletion der Nukleotide 1-490
pBL-5'UTR Δ 170-290-Luciferase	s.o.
pBL-5'UTR Δ 1-583-Luciferase	s.o.
pBF-5'UTR Δ 1-138	s.o. und s.u.
pBF- Δ 1-138/3.AUGmut	s.o. und s.u.
pBF-5'UTRuACGmut	s.o. und s.u.
pBF-5'UTRuACGmut/3.AUGmut	s.o. und s.u.
5'UTR Δ 1-138-mRFP-8xMS2Loops-3'UTR	Deletion der ersten 138 Nukleotide und damit dem ACG-Startpunkt der 5'UTR
5'UTR Δ 1-138/3.AUGmut-mRFP-8xMS2Loops-3'UTR	Zusätzliche Punktmutation des 3.uAUG
5'UTRuACGmut-mRFP-8xMS2Loops-3'UTR	Punktmutation des ACG-Startpunktes zu AAG
5'UTRuACGmut/3.AUGmut-mRFP-8xMS2Loops-3'UTR	Zusätzliche Punktmutation des 3.uAUG wie oben
pGEX-4T-2-mRFP	Zur Herstellung von GST-Fusionsproteinen
pGEX-4T-2-ACGuORF	Zur Herstellung von GST-Fusionsproteinen

Die Sequenz der humanen Shank1 5'UTR wurde aus einer cDNA-Bibliothek erhalten (Clontech, Zitzer et al., 1999). Da diese Sequenz bisher nicht veröffentlicht wurde, sind in Abbildung 7.1 die Nukleotidsequenz der 5'UTR und die Peptidsequenzen der bisher bekannten *upstream Open Reading Frames* dargestellt.

1	GAGCGAGAAGGGTGGCAGAGGAGGCGCGGAGCGGGCGGCGGGCGGGCGGGCCCGAGGAAGAGGA
	ACG-uORF
65	GGAGGAAGAGCAGGCGGAGACGCGGGCGCCCGGAGCCGGCCGGACCGAGCCGGGGGCGGGCGAGG
	ThrArgArgProGluProAlaGlyProSerArgGlyArgAlaArg
	1.uAUG
129	AGGGGCGCGGCGGCCGCGGCGGAAGGGGGGCGCTCTGCGGATGGCCAGGCCCCGGCCCCGCGGGG
	MetAlaArgProGlyProArgGI
	ArgGlyAlaAlaAlaAlaAlaGluGlyGlyAlaLeuCysGlyTrpProGlyProAlaArgGlyG
193	GGGGTGAGGTCTCGGCCCTCCCGCCCTCCCCCGGTCGCCCGCCCGCCCCCTCCCCGGGCCCG
	yGly•••
	lyGlyGluValLeuGlyProProAlaLeuProProGlyProArgProProProArgAlaAr
	2.uAUG
257	CTCGCCCTCCGGGGCGGTGGGGCATGGCCTGAGGGTCCCCCGTCTCCGGGGGGGTGGGGGGTGG
	MetAla•••
	gSerProSerGlyAlaValGlyHisGlyLeuArgValProArgLeuArgGlyGlyGlyGlyTrp
321	GGGGAGGGGGGAGGGGCCGCGGGCGCCGCGCCGACCGGGACTCAGCAGCCCCGCCAGGCAGCCGCC
	GlyGluGlyGlyGlyAlaAlaGlyAlaAlaAspArgAspSerAlaAlaProProGlySerArgL
	3.uAUG AUG 4
385	TGTGATGCTGCCGTCCCCGTCGCCCCGTGGCCCCACAATGACCCACAGCCCCGCGACAAGCGA
	MetThrHisSerProAlaThrSerGI
	MetLeuProSerProValAlaProTrpProHisAsnAspProGlnProArgAspLysArg
	eu•••
449	GGACGAGGAACGCCACAGTGCCAGCGAGTGTCCCGAGGGGGCTCAGAGTCCGACAGCTCCCCA
	uAspGluGluArgHisSerAlaSerGluCysProGluGlyGlySerGluSerAspSerSerPro
	GlyArgGlyThrProGlnCysGlnArgValSerArgGlyGlyLeuArgValArgGlnLeuProA
513	GACGGCCAGGTGAGGCCCGGGGACCCGGGGCCAGGGCAGTGGGGCACCTGGTAGCCTGG
	AspGlyProGlyArgGlyProArgGlyThrArgGlyGlnGlySerGlyAlaProGlySerLeuA
	rgArgAlaArgSerArgProProGlyAspProGlyProGlyGlnTrpGlyThrTrp•••
	AUG 5.1 AUG 5.2/5.3
577	CCTCTGTTAGAGCCTCCAGGGCCGCTCAATGTCCGTCCAGACGACGCCCACTTCAGCATGATG...
	laSerValArgGlyLeuGlnGlyArgSerMetSerValProAspAspAlaHisPheSerMetMet

Abb. 7.1: DNA-Sequenz und uORFs/ORFs der in dieser Arbeit charakterisierten humanen Shank1-5'UTR.

Die Basenabfolge der 5'UTR ist in schwarz, uORF-Peptidsequenzen sind in rot, ORF-Proteinsequenzen in blau und die neu entdeckte ACG-uORF-Peptidsequenz in grün dargestellt.

Danksagung

-Als erstes gilt mein Dank Prof.Andreas Gal und Prof.Dietmar Richter, da ich in ihren Instituten meine Doktoranden-Zeit verbringen durfte. Herr Gal, Ihnen gilt besonderer Dank, denn ohne Ihren Hinweis auf das Vorhandensein der *non-AUG*-Startpunkte hätten wir viel wertvolle Zeit mit Zweifeln und auf der Suche nach Erklärungen verbracht, Danke! Vielen Dank auch an die Gutachter Prof.Wiese und Prof.Renwrantz, alle Fragesteller und die Mitglieder und Ehemaligen der Institute für Zellbiochemie und Humangenetik.

-Als wichtigstes möchte ich mich bei PD Dr.Hans-Jürgen Kreienkamp für die Möglichkeit bedanken, in seiner Arbeitsgruppe und unter seiner Anleitung drei spannende Jahre in einem tollen Labor zu verbringen. Ich weiß zu schätzen, dass eine so nette, lustige und freundschaftliche Atmosphäre nicht überall zu finden ist.

-Als herzlichstes möchte ich mich bei meinem Laborpartner und (Ossi)verstehere Hinne bedanken, denn ohne dich hätte ich viel weniger gelacht und geschwätzt :-). Aber ohne dich hätte ich auch noch mehr arbeiten müssen und viele Fehler selbst machen, die du mir durch deine Erfahrung erspart hast, Danke! Auch den anderen Mitgliedern der AG Kreienkamp/Kindler gilt großer Dank, dass ihr seid wie ihr seid. Besonders sage ich Danke für eine sehr schöne Zeit vor allem an Corinna, Biene, Janin und Matthias sowie Tarja, Kerstin, Sandra, Joanna, Gwen, John, Peter, Birgit, Monika, Stefan, Inga, Evita, Hatmone, Christiane, Fritz, Sönke, Sabine, Nelly, Claudia und Arne. Besonders weil ihr immer so fein und viel mit mir gegessen habt. Ich werde euch wirklich sehr vermissen!

-Als besonderstes bedanke ich mich bei meiner lieben Familie, weil ihr euch nicht verstellt, immer gnadenlos ehrlich seid, stolz seid auch wenn ihr es nicht immer sagt, ich euch immer nerven kann und ihr mich auch, weil ihr seid wie ich, im Guten wie im Schlechten. Diese Arbeit ist meiner über alles geliebten Oma Christa gewidmet. Dir gilt der größte Dank, weil du mich zu dem Menschen gemacht hast der ich bin, du mich gerettet hast und ich dich unendlich vermisse. Ich habe auch Biologie studiert, weil du mir gezeigt hast die Natur zu bewundern. Ich weiß, dass du jetzt sehr stolz auf mich wärst. Am allermeisten danke ich Nelly und Rudi, der Mama, dem Danny, dem Papa, den Großeltern: Oma Gretel, Opa Walter und Opa Manfred. Natürlich auch Tina und Nicola, Jördis, Florinchen und Anne-Marie. Danke auch an Atti, Oli und Frank.

-Als meistes bedanke ich mich natürlich bei meinen tollsten Freunden auf der Welt: Liebe Caro, seit 25 Jahren beste Freunde, du weißt alles über mich, warst immer mit dabei. Danke für deine Unterstützung, in dieser Zeit hat sich für uns beide viel verändert. Aber uns haben wir immer behalten, Danke Süße. Nicole und Bianca, ihr ward mein Leben in Lüneburg, mit euch fühle ich mich zu Hause. Danke für Quatschen, Telefonieren, Tanzen und Sektchen, dass ihr in der schwersten Zeit einfach da ward. Euch werde ich sehr vermissen! Danke auch an die anderen Lüneburger: Sebastian, Bille, Horst, Axel und Jari. Und an Yvi, Uli, Poro, Rached, Arlett und Falk.

-Als letztes möchte ich mich bei Dani bedanken, der während meiner Doktorarbeit für mich da war und mit dem ich eine tolle Zeit in Lüneburg verbracht habe. Besonderer Dank gilt auch seiner Familie, die ich sehr ins Herz geschlossen habe. Danke an Chrissi, Jürgen, Bea, Julian, Michi, Oma Anne-Liese, Opa Rudi, Knolli und Familie, Oma Dorit, Silke, Axel und Josi.

Name: **Katrin Falley**
Geburtstag: 22.04.1981
Geburtsort: Nordhausen (Harz)
Schulbildung: Abitur 1999 in Nordhausen

Wissenschaftlicher Werdegang

Studium: 1999-2004 Biologie an der Carolo-Wilhelmina Universität in Braunschweig
Hauptfach: Zellbiologie, Nebenfächer: Genetik, Mikrobiologie, Zoologie
Diplomarbeit in der AG von Frau Prof. Dr. BM Jockusch: „Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation des *dual compartment* Proteins Raver1“

Auslandsaufenthalte: - 2002, 3 Monate Praktikum in Nordirland, Queens-University
Belfast, Untersuchungen zur Aquakultur und Fortpflanzung von Abalones
- 2003, 3 Monate Praktikum in der USA, Purdue-University
Westlafayette, Thematik: Maisgenetik

Doktorarbeit: 2004 – 2007 am Universitätsklinikum Eppendorf in Hamburg, Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie und Institut für Humangenetik in der AG von PD Dr. HJ Kreienkamp: „Lokale Proteinbiosynthese von Shank1 in neuronalen Dendriten der Ratte (*Rattus norvegicus*, Berkenhout 1769)“

Tagungen/Poster: 2005, German Society for Cell Biology, Braunschweig
2007, German Neuroscience Society, Göttingen
2007, Westerburg-Symposium: Molecular Dynamics of the Chemical Synapse, Dedeleben
Poster-Titel: Falley et al. „Imaging of mRNA in dendrites: transport and interacting factors of mRNA coding for the postsynaptic shank1 protein.“

Veröffentlichungen: Storch S, Pohl S, Quitsch A, Falley K, Braulke T. (2007) C-terminal prenylation of the CLN3 membrane glycoprotein is required for efficient endosomal sorting to lysosomes. *Traffic*, (4): 431-44.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen Hilfsmittel benutzt habe und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich mich zu keiner Zeit anderweitig um Erlangung des Doktorgrades beworben habe.

Hamburg, den

Katrin Falley