

**Identifizierung und Charakterisierung
fötaler RNA-Bindeproteine aus dem Gehirn von
Rattus norvegicus (BERKENHOUT, 1769)**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Marina Walden

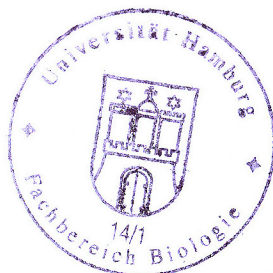
aus Bremen

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. D. RICHTER

Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. H. Bretting

Tag der Disputation: 12. Juli 2002

Hamburg, den 28. Juni 2002



Udo Wienand

Professor Dr. U. Wienand
Dekan

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

1 Einleitung	1
1.1 RNA-Lokalisierung während der Entwicklung.....	2
1.2. Lokalisierte Transkripte in Neuronen.....	2
1.3 <i>cis</i> -agierende Elemente und <i>trans</i> -agierende Faktoren.....	5
1.4 Beteiligung des Zytoskeletts am RNA-Transport.....	9
2 Material und Methoden	10
2.1 Plasmide und Oligonukleotide	10
2.1.1 Zur Verfügung gestellte Plasmide.....	10
2.1.2 Konstruierte Plasmide.....	11
2.1.3 Oligonukleotide.....	12
2.2 Antikörper	15
2.3 Bakterienstämme und Zelllinien	16
2.4 DNA: Molekularbiologische Methoden	16
2.4.1 Restriktion von DNA mit Endonukleasen.....	16
2.4.2 DNA-Gelelektrophorese.....	17
2.4.3 Isolierung von cDNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	17
2.4.4 Ligation von DNA-Fragmenten.....	17
2.4.5 Transformation von Bakterien.....	17
2.4.6 Plasmid-DNA-Isolierung aus Bakterien.....	17
2.4.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	18
2.4.8 Radioaktive Markierung von cDNA-Fragmenten.....	19
2.5 RNA: Molekularbiologische Methoden	19
2.5.1 Präparation von RNA aus Gewebe.....	19
2.5.2 RNA-Gelelektrophorese und RNA-Transfer (Northern Blot).....	19
2.5.3 Northern Blot-Hybridisierung.....	19
2.5.4 RT-PCR.....	20

2.5.5 Herstellung von radioaktiv markierten RNA-Sonden mittels <i>in vitro</i> Transkription.....	20
2.5.6 Präparation von Rattenembryonen und Herstellung von Gewebeschnitten.....	20
2.5.7 <i>In situ</i> -Hybridisierung an Rattenembryonen-Dünnschnitten.....	21
2.5.8 UV-Quervernetzungs-Analysen.....	21
2.6 Protein: Molekularbiologische und biochemische Methoden,	
Immunchemie.....	22
2.6.1 Herstellung von Proteinextrakten aus Gewebe.....	22
2.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	22
2.6.3 Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen.....	22
2.6.4 Elektrottransfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blot).....	23
2.6.5 Immunologische Detektion von Proteinen auf einer PVDF-Membran.....	23
2.6.6 Expression und Aufreinigung von Fusionsproteinen.....	23
2.6.7 Immunpräzipitation von Proteinen.....	24
2.6.8 Sucrose-Dichtegradienten Zentrifugation.....	24
2.7 Hefe: Methoden des Zwei-Hybrid-Systems.....	25
2.7.1 Transformation von Hefe-Zellen.....	25
2.7.2 Zwei-Hybrid-Screen.....	26
2.7.3 β -Galaktosidase-Filtertest.....	26
2.7.4 Cycloheximid-Selektion.....	27
2.7.5 Plasmidisolierung aus Hefe-Zellen.....	27
2.8 Zellkultur: Molekularbiologische und biochemische Methoden.....	27
2.8.1 Kultivierung von CHO-K1-Zellen.....	27
2.8.2 Transfektion von CHO-K1-Zellen mit LIPOFECTAMINE [®]	28
2.8.3 Herstellung von Proteinextrakten aus CHO-K1-Zellen.....	28
2.8.4 Fixierung von CHO-K1-Zellen.....	28
2.8.5 Immuncytochemie.....	29
2.9 Firmenverzeichnis.....	30
3 Ergebnisse.....	31
3.1 Identifizierung neuer RNA-Bindeproteine des Rattengehirns.....	31
3.1.1 Identifizierung zweier RNA-Bindeproteine der Ratte.....	31

3.1.2 Sequenzanalyse von FeRB1 und FeRB2.....	35
3.2 Charakterisierung der neu identifizierten RNA-Bindeproteine der Ratte.....	40
3.2.1 Northern Blot-Analyse.....	40
3.2.2 Untersuchung zur RNA-Bindefähigkeit von FeRB1.....	41
3.2.3 Untersuchung zur subzellulären Verteilung von FeRB1 und FeRB2.....	44
3.2.4 Export der RNA-Bindeproteine aus dem Zellkern.....	47
3.2.5 Reinigung von GST-Fusionsproteinen zur Antikörper-Produktion gegen FeRB1 und FeRB2.....	49
3.2.6 Assoziation von FeRB1 mit Polysomen.....	51
3.3 Identifizierung eines FeRB1-Bindungspartners.....	53
3.3.1 Hefe-Zwei-Hybrid-System.....	54
3.3.2 Hefe-Zwei-Hybrid-Screen.....	54
3.3.3 Sequenzanalyse von rLMO1.....	57
3.3.4 Identifizierung der für die FeRB1-rLMO1-Interaktion verantwortlichen Sequenzbereiche.....	58
3.3.5 Interaktion von FeRB1 und rLMO1 in CHO-K1-Zellen.....	60
3.3.6 Spezifität der Bindung.....	62
3.4 Verteilung von FeRB1, FeRB2 und rLMO1 in Rattenembryonen.....	63
3.4.1 Northern Blot-Analyse von rLMO1.....	63
3.4.2 <i>In situ</i> -Hybridisierung an Gewebe-Dünnschnitten.....	64
3.5 Coexpression von rLMO1 und FeRB1 mit Clim2 im Zellkultursystem.....	67
4 Diskussion.....	69
5 Literaturverzeichnis.....	78
6 Zusammenfassung.....	91

Abkürzungen

α -CaMKII	α -Isoform der Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II
Ak	Antikörper
arc/arg3.1	Aktivitäts reguliertes Cytoskelett-assoziiertes Protein/Aktivitäts-reguliertes Gen 3.1
BC1	<i>brain cytoplasmic RNA</i>
β -Gal	β -Galaktosidase
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHO	<i>chinese hamster ovary cells</i>
Clim	<i>lim homeobox protein cofactor</i>
CPEB	cytoplasmatisches Polyadenylierungselement Bindeprotein
CRD	<i>coding region instability determinant element</i>
CRD-BP	CRD-Bindeprotein
CTP	Cytosin-Triphosphat
DLS	dendritisches Lokalisierungssignal
DMP	Dimethylaminopimelidat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTE	dendritisches Transportelement
DTT	Dithiothreitol
ECFP	<i>enhanced cyan fluorescent protein</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
FCS	fötales Kälberserum
FeRB	<i>Fetal Rat RNA Binding Protein</i>
FMRP	<i>Fragile X Mental Retardation Protein</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
HC	Hippocampus
His	Histidin
IGFII	<i>Insulin like Growth Factor II</i>
IMP	IGFII-mRNA Bindeprotein
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KH	hnRNP K-homology
KOC1	<i>K-Homology Protein Overexpressed in Cancer</i>
Leu	Leucin
LMB	Leptomycin B
LMO	<i>Lim-only protein</i>
LTP	Langzeitpotenzierung
MAP2	Mikrotubulus assoziiertes Protein 2
MARTA	MAP2-mRNA Transport assoziiertes Protein
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
NES	Nukleäres Exportsignal
NLS	Nukleäres Lokalisierungssignal
NMDA	N-methyl-D-Aspartat
nt	Nukleotide
PABP	Poly (A)-Bindeprotein

PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PSF	<i>Polypyrimidin tract binding protein associated splicing factor</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RACE	<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>
RBD	<i>RNA binding domain</i>
REV	RRE-Bindeprotein aus dem HIV 1
RNP	Ribonucleoprotein
RRM	<i>RNA recognition motif</i>
RT	Raumtemperatur
Sam68	<i>Src-associated in mitosis protein of 68 kDa</i>
SCG	<i>superior cervical ganglia</i> (obere Cervicalganglien)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Salz-Natriumcitrat-Lösung
TGFβ	<i>Transforming Growth Factor β</i>
Tris-HCl	Tris-(Hydroxymethyl-)Aminomethan-Hydrochlorid
tRNA	<i>transfer-RNA</i>
Trp	Tryptophan
U	Enzymeinheiten (<i>units</i>)
ü.N.	über Nacht
UTP	Uridin-Triphosphat
UTR	untranslatierte Region
Vera	<i>Vg1-RNA binding ER-association</i>
Vg1	vegetale RNA 1
Vg1-RBP	Vg1-RNA Bindeprotein
VLE	vegetales Lokalisierungselement
Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
ZBP-1	<i>Zipcode Binding Protein 1</i>

1 Einleitung

Eukaryotische Zellen verfügen über ein breites Spektrum an Regulationsmechanismen der Genexpression. Im Laufe der letzten Jahre ist die Vorstellung, die Aktivität der Gene sei hauptsächlich durch die Funktion spezifischer Transkriptionsfaktoren kontrolliert, durch zahlreiche Hinweise der Regulation auf posttranskriptionaler sowie auf Proteinebene abgelöst worden. Somit ist eukaryotischen Zellen eine präzise abgestimmte Regulierung während der Entwicklung ermöglicht (Siomi & Dreyfuss, 1997). Die Regulation auf posttranskriptionaler Ebene anstelle einer *de novo* Transkription ermöglicht der Zelle eine gezieltere Reaktion sowohl auf intra-, als auch auf extrazelluläre Reize. Viele wichtige Vorgänge während der Entwicklung, wie z.B. Festlegung von Entwicklungsmustern oder Differenzierung werden durch kontrollierte RNA-Stabilität, -Lokalisierung und -Translation reguliert (St. Johnston, 1995; Curtis *et al.*, 1995; Wickens *et al.*, 1996). Während dieser Vorgänge spielen RNA-Bindeproteine eine zentrale Rolle. Wichtige physiologische Funktionen von RNA-Bindeproteinen werden beispielsweise durch Mutationen deutlich, die zu Fehlfunktionen führen, aus denen Krankheiten resultieren. Beispiele hierfür sind Y-chromosomale Deletionen in Genen, die für die RNA-Bindeproteine DAZ und RMB1 kodieren und zu einer Fehlfunktion in der Spermatogenese führen (Reijo *et al.*, 1995; Eberhart *et al.*, 1996, Delbridge *et al.*, 1997). Ein weiteres Beispiel sind Mutationen im *FMRI*-Gen, die zum Fragilen X-Syndrom führen, einer häufigen Form von vererbbarer mentaler Degeneration (Darnell *et al.*, 2001). FMRP ist ein RNA-Bindeprotein, das möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Regulation der Translation von mRNAs an Synapsen spielt, da in Neuronen ein Großteil des Proteins mit Polyribosomen assoziiert vorliegt (Darnell *et al.*, 2001, Steward & Worley 2001). Neben anderen Ursachen, die zu dem Fragilen X Syndrom führen, bewirkt eine Mutation in einer RNA-Bindedomäne von FMRP eine schwere Form der Degeneration. In der zweiten KH-Domäne des Proteins wurde ein Aminosäureaustausch von einem Isoleucin zu einem Asparagin an Position 304 entdeckt. Es konnte gezeigt werden, daß durch diese Punktmutation die Sekundärstruktur des RNA-Bindemotivs, die für die Bindung an RNA essentiell ist, zerstört wird (Musco *et al.*, 1996; Siomi & Dreyfuss, 1997).

Ein wichtiger posttranskriptionaler Regulationsmechanismus ist die zytoplasmatische RNA-Lokalisierung. Die asymmetrische Verteilung von RNA führt häufig zu lokal begrenzter Proteinsynthese und somit zur Bildung und Aufrechterhaltung der Polarität

einer Zelle. Es konnte gezeigt werden, daß der Transport von RNA ein weit verbreiteter Mechanismus in den unterschiedlichsten Zelltypen und Spezies ist (Bashirulla *et al.*, 1998; Jansen, 2001; Palacios & St. Johnston, 2001; Lipshitz & Smibert, 2000; Seydoux & Schedl, 2001; Kloc *et al.*, 2001).

1.1 RNA-Lokalisierung während der Entwicklung

Besonders während der Entwicklung von *Drosophila melanogaster*- sowie *Xenopus leavis*-Oozyten wird durch eine regulierte Lokalisierung von mRNA eine Polarität der Oozyte hergestellt. Diese ist essentiell für die Ausbildung von sogenannten Entwicklungsmustern, die für die Festlegung der Körperachsen des Embryos entscheidend sind. In der *Xenopus*-Oozyte gibt es zwei hauptsächliche Wege, über die mRNA-Transport vom Kern zum vegetalen Cortex in unterschiedlichen Stadien der Oogenese erfolgt (Kloc *et al.*, 2001; King *et al.*, 1999). Beispielsweise wird die Vg1-mRNA in den Entwicklungsstadien III-V an den vegetalen Pol der *Xenopus*-Oozyte transportiert (Mowry & Cote, 1999). Vg1 kodiert einen TGF β -ähnlichen Wachstumsfaktor, der sowohl an der Entwicklung des Endoderms als auch an der Mesoderm-Induktion beteiligt ist (Weeks & Melton, 1987; Thomsen & Melton, 1993; Joseph & Melton, 1998). Ebenso wird in der *Drosophila*-Oozyte die Polarität durch lokalisierte RNAs bewirkt. Dies ist häufig mit einer lokal begrenzten Translation maternaler Transkripte gekoppelt, so daß über eine regulierte Translation die Entwicklung während der frühen Stadien der Embryogenese gesteuert werden kann. Beispielsweise wird die bicoid-mRNA in entwicklungspezifischer Weise an den anterioren Pol der Oozyte transportiert und lokal translatiert. Dieser Gradient an Bicoid bewirkt eine Ausbildung von Kopf- und Thorax-Strukturen im späteren Embryo (St. Johnston & Nüsslein-Vollhard, 1992). Weitere maternale mRNAs, die in der *Drosophila*-Oozyte transportiert und lokal translatiert werden, sind nanos- und oskar-mRNA (Berleth *et al.*, 1988; Ephrussi *et al.*, 1991; Johnstone & Lasko, 2001).

1.2 Lokalisierte Transkripte in Neuronen

Zytoplasmatische RNA-Lokalisierung ist ein genereller posttranskriptionaler Regulationsmechanismus zur Aufrechterhaltung einer räumlich begrenzten Proteinsynthese die somit zu einer Polarisierung unterschiedlicher Zelltypen führt (St. Johnston, 1995; Bassell *et al.*, 1999; Schnapp, 1999). In den letzten Jahren konnten lokalisierte Transkripte

in spezialisierten Zellkompartimenten innerhalb verschiedener somatischer Zelltypen wie Fibroblasten, Neuronen, Oligodendrocyten und Epithelzellen nachgewiesen werden (Bassell *et al.*, 1999). Innerhalb eukaryotischer Zelltypen ist die Polarisierung von Neuronen besonders ausgeprägt. Sie weisen eine deutliche Aufteilung in verschiedene subzelluläre Bereiche auf, die sich voneinander in Form, Funktion und ihrer molekularen Zusammensetzung unterscheiden (Vale *et al.*, 1992). Reife Neurone besitzen zwei Arten von Zellfortsätzen, Dendriten und Axone, die zur Signalaufnahme und -weiterleitung dienen. Entlang dieser Fortsätze gibt es spezielle Kontaktstellen zu anderen Neuronen, die Synapsen, die sich durch eine charakteristische Proteinzusammensetzung auszeichnen (Vale *et al.*, 1992; Kim & Huganir, 1999). Synapsen können langanhaltende Änderungen in der Struktur und Aktivität vollziehen, die in Zusammenhang mit Lernvorgängen und Gedächtnis stehen (Steward & Schuman, 2001). Es gibt Hinweise darauf, daß die Translation dendritischer mRNAs in Neuronen in Abhängigkeit der synaptischen Aktivität reguliert werden kann (Kindler *et al.*, 1997; Kuhl & Skehel, 1998; Crino & Eberwine, 1996; Steward & Schuman, 2001). Diese Hypothese wurde erstmals aufgestellt, als in den Körnerzellen des *Gyrus Dentatus* an der Basis von dendritischen Dornen (*dendritic spines*, Fortsätze des Dendriten mit synaptischen Kontakten) Polyribosomen detektiert wurden (Peters *et al.*, 1970; Steward & Levy, 1982). Weiterhin konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, daß sich Komponenten der Translations-Maschinerie wie tRNAs und Elongationsfaktoren (Steward *et al.*, 1996) sowie neu synthetisierte Proteine in den Dendriten befinden (Torre & Steward, 1992; Crino & Eberwine, 1996).

Die erste lokalisierte RNA, die in dendritischen Ausläufern von Neuronen nachgewiesen werden konnte, ist die MAP2-mRNA, die das Mikrotubulus-assoziierte Protein 2 kodiert. Garner *et al.* (1988) und Tucker *et al.* (1989) konnten mittels *in situ*-Hybridisierungen zeigen, daß dieses Transkript im Hippocampus und Cortex der Ratte sowohl in Zellkörpern als auch in Dendriten vorkommt. Übereinstimmend mit der subzellulären Verteilung seiner mRNA zeigt auch MAP2 eine somatodendritische Lokalisierung. MAP2 reguliert abhängig von seinem Phosphorylierungsstatus die Stabilität dendritischer Mikrotubuli (Brugg & Matus, 1991; Illenberger *et al.*, 1996; Quinlan & Halpain, 1996; Itoh *et al.*, 1997; Sanchez *et al.*, 2000). Möglicherweise ist MAP2 auch an der Regulation der Morphologie und Funktion synaptischer Dornen beteiligt. Es konnte gezeigt werden, daß synaptische Aktivität die MAP2-Konzentration in den molekularen Schichten des *Gyrus Dentatus* im Rattengehirn beeinflussen kann (Steward & Halpain, 1999). Ein weiteres Transkript, das in großen Mengen in den Dendriten im Rattengehirn nachgewiesen werden konnte, ist die

mRNA der α -Isoform der Ca^{2+} / Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (α -CaMKII, Burgin *et al.*, 1990). Dieses Protein ist stark in der postsynaptischen Dichte (proteinreicher Bereich, der im Elektronenmikroskop unterhalb der postsynaptischen Membran zu erkennen ist) angereichert (Kennedy, 2000; Walikonis *et al.*, 2000), und scheint eine wichtige Rolle bei der Regulation von plastischen Veränderungen an Synapsen während Lernvorgängen zu spielen (Mayford *et al.*, 1995; Lisman *et al.*, 1997). Weitere dendritisch lokalisierte Transkripte kodieren für das durch synaptische Aktivität regulierte unmittelbar frühe Gen (*immediate early gene*) *arc/arg3.1*, das möglicherweise mit dem Zytoskelett assoziiert vorliegt (Link *et al.*, 1995; Lyford *et al.*, 1995). Die Expression der *arc/arg3.1*-mRNA kann durch Wachstumsfaktoren induziert werden und nach einer synaptischen Aktivierung durch NMDA Rezeptoren in die molekularen Schichten des Hippocampus transportiert werden (Link *et al.*, 1995; Lyford *et al.*, 1995; Steward *et al.*, 1998). Des Weiteren wurden lokalisierte Transkripte der Neuropeptide Vasopressin und Oxytocin in magnozellulären Neuronen des Hypothalamus detektiert (Mohr *et al.*, 1995). Ebenso werden mRNAs, die für verschiedene Membranrezeptoren kodieren, in Dendriten unterschiedlicher Neuronenpopulationen lokalisiert. Dazu gehört die mRNA für die α -Untereinheit des Glycin-Rezeptors, die in proximalen Bereichen der Dendriten von Motoneuronen nachgewiesen wurde (Racca *et al.*, 1997), die mRNA für Glutamatrezeptoren (Miyashiro *et al.*, 1994) sowie für den Inositol-1,4,5-Triphosphat-Rezeptor InsP3 (Furuichi *et al.*, 1993). Für die bereits erwähnten lokalisierten Transkripte werden unterschiedliche Translationsmechanismen postuliert. Während die Transkripte, die zytoplasmatische Proteine kodieren, präferentiell an freien Polyribosomen translatiert werden, werden für integrale Membranproteine membranassoziierte Ribosomen (rauhes endoplasmatisches Retikulum) sowie der Golgi-Apparat benötigt. Hinweise auf die Anwesenheit sowohl von endoplasmatischem Retikulum als auch des Golgi-Apparates konnten in Dendriten gefunden werden (Tiedge & Brosius, 1996; Torre & Steward, 1996; Gardiol *et al.*, 1999; Pierce *et al.*, 2000). Außerdem wurden dendritisch lokalisierte Transkripte gefunden, die Proteine kodieren, über deren Funktion noch nichts bekannt ist. Dazu gehören die L7-mRNA, die in Fortsätzen von Purkinje Zellen lokalisiert ist (Bian *et al.*, 1996) sowie die Dendrin-mRNA, die in Dendriten des Hippocampus, des *Gyrus Dentatus* sowie des cerebralen Cortex detektiert werden kann (Herb *et al.*, 1997). In den letzten Jahren traten immer mehr Hinweise auf eine lokale Translation von Proteinen des Zytoskeletts auf, die besonders beim Auswachsen der Neuriten an den so genannten Wachstumskegeln benötigt werden (Crino & Eberwine, 1997; Bassell *et al.*, 1998; Zhang

et al., 1999). Die lokalisierten mRNAs würden direkt nach ihrer Translation für die Zusammensetzung von strukturellen Komponenten zur Verfügung stehen. Axonale Präparationen von sympathischen Neuronen der Ratte wiesen auf einen selektiven Transportmechanismus für β -Aktin-mRNA hin (Olink-Coux & Hollenbeck, 1996). Ebenso konnte gezeigt werden, daß β -Aktin-mRNA in die Ausläufer und Wachstumskegel von embryonalen kortikalen Neuronen der Ratte transportiert wird (Bassell *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2001).

1.3 *cis*-agierende Elemente und *trans*-agierende Faktoren

Trotz der immer größer werdenden Zahl an bekannten lokalisierten Transkripten in unterschiedlichen Zelltypen ist immer noch sehr wenig über den generellen Mechanismus dieser Transportvorgänge bekannt. Man geht davon aus, daß so genannte *cis*-agierende Elemente in der Sequenz der RNA an diesen Vorgängen beteiligt sind. An diese *cis*-agierenden Elementen binden *trans*-agierende Faktoren. Diese wurden in den meisten Fällen als RNA-Bindeproteine identifiziert, die sowohl am Export der RNA aus dem Nukleus, an kontrolliertem Transport entlang des Zytoskeletts, an der Stabilisierung oder translationaler Repression von Transkripten sowie an der Verankerung der RNA an subzellulären Bereichen eine Rolle spielen könnten.

In embryonalen Fibroblasten des Huhns ist die β -Aktin-mRNA besonders stark in den Lamellipodien angereichert (Lawrence & Singer, 1986). Fibroblasten reagieren auf chemotaktische Reize und können sich auf diese zu oder von ihnen weg bewegen. Dabei spielt die Aktin-Polymerisierung eine wichtige Rolle bei der Ausbreitung des *leading edge*, der Peripherie der Lamellipodien (Carlier, 1991; Cooper, 1991; Wang, 1985). Es wird angenommen, daß die Lokalisierung von β -Aktin-mRNA durch eine lokale Aktin-Synthese an diesen spezialisierten Bereichen des Zytoplasmas zu einer Aufrechterhaltung der Zellpolarität beiträgt und gerichtete Bewegung der Zelle ermöglicht (Singer, 1992; Shuster & Herman, 1995). Weitere asymmetrische Zelltypen, an denen eine Lokalisierung der β -Aktin-mRNA an die Lamellipodien erfolgt, sind 3T3-Fibroblasten (Hill *et al.*, 1994), Endothelzellen (Hooek *et al.*, 1991) und C2 Myoblasten (Hill & Gunning, 1993). Innerhalb der β -Aktin-mRNA gibt es einen *cis*-agierenden Bereich, den "*zipcode*", der für die Lokalisierung der mRNA notwendig ist. Dieser umfaßt 54 Nukleotide (nt) der 3'-untranslatierten Region (UTR) der mRNA (Kislauskis *et al.*, 1993; Singer, 1993). In UV-Quervernetzungs-Analysen konnte ein RNA-Bindeprotein identifiziert werden, das an den

zipcode bindet und deswegen *Zipcode Binding Protein 1* (ZBP-1) genannt wird (Ross *et al.*, 1997). Die *in vitro*-Bindung dieses RNA-Bindeproteins korreliert mit der Lokalisierung der β -Aktin-mRNA *in vivo*, so daß eine direkte Beteiligung des ZBP-1 am Transport des Transkriptes angenommen wird (Ross *et al.*, 1997). Auffällig ist die Domänenstruktur dieses Proteins. Es besteht aus 6 RNA-Bindedomänen, die stark konserviert sind und gut 80% des gesamten Proteins ausmachen. Im N-terminalen Bereich des Proteins finden sich zwei RRM-Domänen (*RNA recognition motifs*), die auch als RNP-Motive oder RBD (*RNA binding domains*) bezeichnet werden. Im C-terminalen Bereich des Proteins befinden sich vier KH-Domänen (*hnRNP K-homology domain*), die zuerst in dem nukleären pre-RNA-Bindeprotein hnRNP K identifiziert wurden (Siomi *et al.*, 1993). Beide Typen von RNA-Bindedomänen kommen in einer Vielzahl von RNA-Bindeproteinen mit unterschiedlichen Funktionen vor.

Ein Homolog von ZBP-1 ist möglicherweise am Transport der Vg1-mRNA an den vegetalen Pol der *Xenopus*-Oozyte beteiligt. Das Vg1-RBP (Vg1-mRNA Bindeprotein) bindet mit hoher Affinität an ein in der 3'-UTR der Vg1-mRNA lokalisiertes *cis*-agierendes Sequenzelement (Mowry & Melton, 1992; Schwartz *et al.*, 1992). Es konnte gezeigt werden, daß Vg1-RBP mit Mikrotubuli (MT) assoziiert ist (Elisha *et al.*, 1995). Deshler *et al.* (1997) identifizierten ein mit der Vg1-mRNA interagierendes Protein, Vera, das mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER) assoziiert vorliegt. Klonierungen dieser Proteine zeigten eine 100% Sequenzidentität (Deshler *et al.*, 1998; Havin *et al.*, 1998). Vg1-RBP/Vera weist dieselbe charakteristische Domänenstruktur von RRM- und KH-Domänen wie ZBP-1 auf. Unklar ist, welche Domänen die MT/ER-Assoziation vermitteln, wobei aber bekannt ist, daß sowohl RRM-, als auch KH-Domänen Protein-Protein-Interaktionen vermitteln können (Chen *et al.*, 1997; Samuels *et al.*, 1998). Außerdem ist in der Sequenz von Vg1-RBP/Vera wie auch in der des ZBP-1 sowohl ein putatives Kern-Lokalisierungs-Signal (NLS) als auch ein Kern-Export-Signal (NES) zu finden. Dies deutet darauf hin, daß die Proteine sowohl eine Rolle bei der Regulation des nukleären Exportes als auch der zytoplasmatischen Lokalisierung spielen (Rand & Yisraeli, 2001). Ein ebenfalls in der *Xenopus*-Oozyte identifiziertes Protein, daß zu 97% identisch mit Vg1-RBP/Vera ist, entspricht dem Faktor B3. Dieser bindet im Zellkern an den TFIIIA Promotor und ist an transkriptionaler Aktivierung in frühen *Xenopus*-Oozyten beteiligt (Pfaff & Taylor, 1992).

In neueren Untersuchungen konnten weitere homologe Proteine zu Vg1-RBP/Vera und ZBP-1 im Menschen und in der Maus identifiziert werden. Mitglieder einer Familie von

humanen RNA-Bindeproteinen binden an die IGFII-mRNA und werden als IMP1-3 (IGFII-mRNA-Bindeprotein 1-3) bezeichnet (Nielsen *et al.*, 1999). IGFII ist ein fötaler Wachstumsfaktor, der zu unterschiedlichen Zeitpunkten in verschiedenen Geweben exprimiert wird. Vom *IGFII*-Gen werden mehrere Transkripte abgelesen, die sich nur in der 5'-UTR unterscheiden und differentiell translatiert werden (Sussenbach *et al.*, 1989). Beispielsweise wird die 4,8 kb *leader-4*-mRNA konstitutiv translatiert, während die 6,0 kb *leader-3*-mRNA zunächst translational reprimiert wird und nur in wachsenden Zellen translatiert wird (Nielsen *et al.*, 1999). Die RNA-Bindeproteine IMP 1-3 binden an Sequenzbereiche in der 5'-UTR der *leader-3*-mRNA und werden in Mäusen nur während der Embryonalentwicklung an den Tagen E11,5-E15,5 exprimiert. Das Ortholog zu IMP-1 wurde in Mäusen identifiziert und wird als CRD-BP bezeichnet. CRD-BP bindet an ein *cis*-agierendes Element in der kodierenden Region der *c-myc*-mRNA. Regulierte Expression von *c-myc* erfolgt während der Zellteilung und der Embryonalentwicklung, was eine wichtige Rolle des RNA-Bindeproteins CRD-BP in posttranskriptionaler Regulation vermuten läßt. Die Bindung von CRD-BP an die *c-myc*-mRNA bewirkt eine erhöhte Stabilität des Transkriptes (Leeds *et al.*, 1997). Die Möglichkeit einer Beteiligung dieser RNA-Bindeproteine an neoplastischer Transformation entstand durch die Identifizierung eines Mitglieds dieser Proteinfamilie in pankreatischem Tumorgewebe (Müller-Pillasch *et al.*, 1997). Klonierungen ergaben, daß KOC-1 (*KH-domain containing protein overexpressed in cancer*) identisch zu IMP-3 ist. Ebenso konnte eine Expression von IMP-1/CRD-BP in einer Reihe von Tumorzelllinien sowie in primären Tumoren gezeigt werden (Ioannidis *et al.*, 2001).

Eine Beteiligung der Mitglieder dieser Familie von RNA-Bindeproteinen an posttranskriptionalen Regulationsmechanismen konnte somit in unterschiedlichen Zelltypen und Spezies gezeigt werden. Dies läßt einen konservierten Mechanismus bei der Lokalisierung und Stabilisierung von Transkripten sowie der Translation zur Steuerung von Differenzierungsvorgängen vermuten.

Weitere *trans*-Faktoren konnten in den letzten Jahren identifiziert werden. Das zytoplasmatische RNA-Bindeprotein Staufen ist an der Lokalisierung der maternalen bicoid- und oskar-Transkripte an gegenüberliegenden Polen der *Drosophila*-Oozyte beteiligt. Außerdem bewirkt es eine translationale Repression der oskar-mRNA am posterioren Pol (St. Johnston *et al.*, 1991; Ferrandon *et al.*, 1994; Micklem *et al.*, 2000). Staufen enthält 5 doppelsträngige RNA-Bindedomänen, denen jeweils unterschiedliche Funktionen zugeordnet werden können (St. Johnston *et al.*, 1992). Staufen Orthologe

konnten in verschiedenen Säugern wie Maus, Ratte und Mensch identifiziert werden (Kiebler *et al.*, 1999; Marion *et al.*, 1999; Wickham *et al.*, 1999; Monshausen *et al.*, 2001). In Neuronen wird Staufen in makromolekularen Partikeln somatodendritisch lokalisiert, die mit Mikrotubuli assoziiert scheinen. Außerdem interagiert Staufen *in vitro* in Sequenz-unabhängiger Weise mit unterschiedlichen doppelsträngigen RNAs (Kiebler *et al.*, 1999; Monshausen *et al.*, 2001; Köhrmann *et al.*, 1999).

Ein multifunktionelles Poly (A)-Bindepotein (PABP) wurde als *trans*-Faktor für die somatodendritisch lokalisierten Vasopression-Transkripte identifiziert (Mohr *et al.*, 2001). Die spezifische Interaktion zwischen dem in vielen Geweben vorkommenden PABP und dem dendritischen Lokalisierungssignal (DLS) in der Vasopression-mRNA scheint durch Gehirn-spezifische Modifikationen des PABP oder durch die Assoziation mit weiteren neuronalen Proteinen bestimmt zu sein (Mohr *et al.*, 2001; Görlach *et al.*, 1994; Kindler & Monshausen 2002).

Die somatodendritisch lokalisierte MAP2-mRNA besitzt in der 3'-UTR ein 640 nt umfassendes dendritisches Transportelement, das für die Lokalisierung eines chimären Transkriptes in kultivierten Hippocampusneuronen der Ratte notwendig und ausreichend ist (Blichenberg *et al.*, 1999). In UV-Quervernetzungs-Analysen binden zwei RNA-Bindeproteine spezifisch an dieses *cis*-agierende Sequenzelement, MARTA1 und MARTA2 (Rehbein *et al.*, 2000). Während MARTA1 sowohl in zytoplasmatischen als auch nukleären Extrakten vorhanden ist, ist MARTA2 präferentiell mit Polysomen assoziiert. Für beide RNA-Bindeproteine wird eine Rolle im nukleären Export der mRNA, dendritischer Lokalisierung oder Translation vermutet.

Im Gehirn der Maus liegt das Protein Translin zusammen mit der BC1-RNA in Ribonukleoproteinpartikeln vor (Kobayashi *et al.*, 1998). Wie die BC1-RNA ist Translin in Purkinje-Zellen des Cerebellums und in Hippocampus-Neuronen somatodendritisch verteilt (Finkenstadt *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 1998). Das zytoplasmatische CPEB (*cytoplasmic polyadenylation element binding protein*) scheint an der Translation von α -CaMKII-Transkripten an postsynaptischen Membranen beteiligt zu sein (Wu *et al.*, 1998).

1.4 Beteiligung des Zytoskeletts am RNA-Transport

Es hat sich herausgestellt, daß das Zytoskelett eine wichtige Rolle beim RNA-Transport spielt. Mehrere maternale mRNAs konnten nicht korrekt lokalisiert werden, wenn in *Drosophila* und *Xenopus*-Oozyten Mikrotubuli-destabilisierende Agenzien wie Nocodazol oder Colchizin eingesetzt wurden (St. Johnston, 1995; Yisraeli, *et al.*, 1990). In Oligodendrocyten wurde durch ähnliche Experimente die Lokalisierung der MBP-mRNA in die peripheren Ausläufer verhindert (Carson *et al.*, 1997). Die Mitglieder der ZBP-1-Familie scheinen mit beiden Filamentgruppen wie Mikrotubuli und Aktin interagieren zu können. Während für das Vg1-RBP/Vera eine Assoziation mit Mikrotubuli gezeigt wurde (Elisha *et al.*, 1995; Havin *et al.*, 1998), wird für den Transport der β -Aktin-mRNA durch ZBP-1 in Fibroblasten ein intaktes Aktin-Zytoskelett benötigt (Ross *et al.*, 1997; Sundell *et al.*, 1991). Neuere Untersuchungen an Neuronen zeigen, daß in diesem Zellsystem die β -Aktin-mRNA und ZBP-1 in Transportpartikeln entlang der Neuriten und Axone in einem Mikrotubuli-abhängigen Mechanismus lokalisiert werden (Zhang *et al.*, 2001). Generell geht man davon aus, daß die posttranskriptionale Regulation von RNA-Transkripten vom Zusammenspiel mehrerer Faktoren bestimmt ist. Dies können Faktoren sein, die für den Export der RNA aus dem Nukleus sowie für die Translokation im Zytoplasma und die spätere Translation wichtig sind. In Neuronen liegen die meisten lokalisierten RNAs in größeren Ribonukleoprotein (RNP)-Komplexen vor.

Ziel dieser Arbeit war es, weitere *trans*-agierende Faktoren in Neuronen zu identifizieren, um die Möglichkeit eines generellen Mechanismus der posttranskriptionalen Regulation von RNA-Molekülen zu untersuchen. Da Mitglieder der ZBP-1-Familie von RNA-Bindeproteinen sowohl an der Lokalisierung, Stabilisierung als auch an der Translation von Transkripten in den unterschiedlichsten Zellsystemen beteiligt sind, stellten sie ein Modell dar, den Mechanismus posttranskriptioneller Regulation in Neuronen zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Plasmide und Oligonukleotide

2.1.1 Zur Verfügung gestellte Plasmide

Verwendete Plasmide anderer Arbeitsgruppen oder kommerziell erhältliche Plasmide, die für die Konstruktion neuer Vektoren eingesetzt wurden, sind im folgenden aufgelistet.

pAS2 und pACT2; pGBKT7:

Diese Vektoren von Clontech dienten als "Köder"- bzw. "Bank"-Plasmid im Hefe-Zwei-Hybrid-System. Dabei diente der Vektor pACT2 als Bank-Plasmid, während pAS2 und pGBKT7 als zwei alternative "Köder"-Plasmide eingesetzt wurden.

pCMV-2B

Der Vektor pCMV-2B (Stratagene) wurde zur Expression von Fusionsproteinen mit einem FLAG-Peptid (Aminosäuresquenz M D Y K D D D D K) in eukaryotischen Zellen eingesetzt.

pCS2-MT-LMO2, pCS2-MT-LMO4, pCS2-MT-Clim2:

Diese eukaryotischen Expressionsvektoren enthalten die gesamte cDNA-Sequenz von LMO2, LMO4 oder Clim2 fusioniert mit einer für das MYC-Peptid (Q V L L A D Q L L L) codierenden Sequenz und wurden von Dr. Ingolf Bach, ZMNH, zur Verfügung gestellt.

pEGFP-C1 und pECFP-N1:

Die Vektoren pEGFP-C1 und pECFP-N1 (Clontech) wurden zur Expression von EGFP (*enhanced green fluorescent protein*), bzw. ECFP (*enhanced cyan fluorescent protein*)-Fusionsproteinen in eukaryotischen Zellen eingesetzt. Die Bezeichnung -C1 und -N1 bezeichnet die Position des Polylinkers im Verhältnis zur EXFP-Sequenz des Vektors.

pGEM-4Z-r-Aktin

Der Vektor pGEM-4Z-r-Aktin wurde von Frau Christiansen, Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie, zur Verfügung gestellt. Er enthält einen Teilbereich der Ratten β -Aktin-cDNA (nt 1-567, GenBank-Nummer: NM031144). Dieser Vektor diente zur *in vitro*-Transkription von β -Aktin-RNA.

pGEM-T und pGEM-Teasy

Diese Vektoren von Promega dienen zur Klonierung von PCR-Produkten mit A-Überhängen und zur *in vitro*-Transkription von RNA-Sonden.

pGEX-2T

Dieser Vektor (Amersham Pharmacia) wurde zur Herstellung von GST (Gluthation-S-Transferase)-Fusionsproteinen in prokaryotischen Zellen verwendet.

pMOSBlue-IGFII

Dieser Vektor wurde von Dr. Jan Christiansen, *Institute of molecular biology, University of Copenhagen, Denmark*, zur Verfügung gestellt und enthält ein 121 bp-Insert aus der IGFII-cDNA (Nielsen *et al.*, 1999).

TOPO-bluntII

Der Vektor TOPO-bluntII (Invitrogen Life Technologies) diene ausschließlich als Klonierungsvektor von PCR-Produkten ohne Überhänge.

2.1.2 Konstruierte Plasmide

Die in dieser Arbeit konstruierten Plasmide sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Bezeichnung	Sequenzbereich der enthaltenen cDNA	Verwendungszweck
pEGFP-FeRB1	FeRB1 nt 1-1752 (Abb. 3)	Expression in eukaryotischen Zellen
pECFP-(N1)-FeRB1	FeRB1 nt 1-1752 (Abb. 3)	Expression in eukaryotischen Zellen
pEGFP-FeRB2	FeRB2 nt 1-1749 (Abb. 4)	Expression in eukaryotischen Zellen
pGEM-T-FeRB1	FeRB1 nt 1-497 (Abb. 3)	<i>in vitro</i> -Transkription
pGEM-Teasy-FeRB2-5'	FeRB2 nt -175 (5'-UTR)-699 (Abb. 4)	<i>in vitro</i> -Transkription
pGEM-Teasy-rat c-myc	c-myc nt 4882-4919; 8919-6481 (GB: Y00396)	<i>in vitro</i> -Transkription
pGEM-Teasy-rat actin (zipcode)	Aktin nt 2990-3558 (GB: V01217)	<i>in vitro</i> -Transkription
pAS-FeRB1	FeRB1 nt 1-1752 (Abb. 3)	Hefe-Zwei-Hybrid-System
pGBKT7-RRM	FeRB1 nt 1-594 (Abb. 3)	Hefe-Zwei-Hybrid-System
pGBKT7-KH	FeRB1 nt 600-1752 (Abb. 3)	Hefe-Zwei-Hybrid-System
pACT-FeRB1	FeRB1 nt 1-1752 (Abb. 3)	Hefe-Zwei-Hybrid-System

pACT-rLMO1	rLMO1 nt 1-463 (Abb. 12)	Hefe-Zwei-Hybrid-System
pACT-Lim1	rLMO1 nt 1-232 (Abb. 12)	Hefe-Zwei-Hybrid-System
pACT-Lim2	rLMO1 nt 230-425 (Abb. 12)	Hefe-Zwei-Hybrid-System
pGBKT7-rLMO1	rLMO1 nt 1-463 (Abb. 12)	Hefe-Zwei-Hybrid-System
pCMV-rLMO1	rLMO1 nt 1-463 (Abb. 12)	Expression in eukaryotischen Zellen

Tab. 1: Darstellung der konstruierten Plasmide.

Aufgelistet ist die Bezeichnung, der enthaltene Sequenzbereich sowie der Verwendungszweck.

2.1.3 Oligonukleotide

Die eingesetzten Oligonukleotide sind in Tabelle 2 aufgelistet. Die Synthese wurde vom Service-Labor des Instituts für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie (Universitäts-Krankenhaus Eppendorf) mit einem *DNA/RNA-Synthesizer* (Applied Biosystems) durchgeführt. Vor der Benutzung wurden sie mit Hilfe von MICROSPIN G25-Säulen nach Herstellerangaben (Amersham Pharmacia) gereinigt.

Bezeichnung	5'-3'-Sequenz, Verwendungszweck	Schnittstelle
SeqFeRB1-3'UTRas	CTGTGTTCCCTCCTGCTGATCT	
SeqFeRB1-asH	GCGGGGTCACCTCCTCCG	
SeqFeRB1-asM	TGGAGTCAGGTGTTTCTG	
SeqFeRB1-sH	CGCCATTGAGAACTGCTG	
SeqFeRB1-asV	TCCTTTGCCTCCTTGTGCATA	
SeqFeRB1-sM	CTGAGAATGGGCGTCGTG	
SeqFeRB1-sV	ACCATGAACAAGCTTTACATCGGC	
Seq897-917-s	GCCTGTAAGATGATCTTGGAG	
Sequenzierung FeRB1		
FeRB1SP1	CGAAGGCGTAGCCGGATT	
FeRB1SP2	CTGGCCGCTGTAGGAGAT	
FeRB1SP3	GCAAATACTTTCTCCAAG	
5'-RACE FeRB1		
FeRB1SP4	GAGCAACCTGGCCCAGGC	
3'-RACE FeRB1		
FeRB1-V-Bam+2	GCCAGGATCCCCATGAACAAGCTTTTAC	BamHI
Klonierung FeRB1 in pACT2		
FeRB1-H-Xho	CGATCTCGAGTCACTTCTCCGAGC	XhoI
Klonierung FeRB1 in pACT2		

FeRB2-V-Bam+2	AACCCCCGGATCCCAATGAACA Klonierung FeRB2 in pACT2	BamHI
FeRB2-H-Xho	TCTCCTCTCGAGTTACTTCCG Klonierung FeRB2 in pACT2	XhoI
FeRB1-Ak-V	AACCATGCCGCATGCGTTTCCTAC Klonierung eines FeRB1-Fragmentes (nt 1-619) in pGEX-2T	SphI
FeRB1-Ak-H	ACTGCGTGGGGTACCGGAGCCGG Klonierung eines FeRB1-Fragmentes (nt 1-619) in pGEX-2T	KpnI
FeRB1-V-Eco-Kozak	AAGGAATTCACCATGAACAAGCTT Klonierung FeRB1 in pECFP-N1	EcoRI
FeRB1-H-Bam	CGATGGATCCTCACTTCTCCGAGC Klonierung FeRB1 in pECFP-N1	BamHI
FeRB1-RRM-H	TGCTATCTGGGATCCAGGTATGTAG Klonierung der RRM-Domänen von FeRB1 in pGBKT7	BamHI
FeRB1-KH-V	CAGGTGGACGAATTCCTCCGGCTCC Klonieren der KH-Domänen in pGBKT7	EcoRI
FeRB1-NESmut	ATCTCCTCGGCCAGGATGCCACGGCCTATAACCC Mutagenese des NES in FeRB1	
rZIP-V	ATCATTGCTCCTCCTGAG Amplifizierung der Ratten-<i>zipcode</i>-Sequenz	
rZip-H	CACCTTCCCGGTGTGGAC Amplifizierung der Ratten-<i>zipcode</i>-Sequenz	
c-myc-V	GCATGAAGAGACACCGCC Amplifizierung der CRD-Sequenz aus der Ratten-c-myc-cDNA	
c-myc-H	CAGTTATGCACCAGAG Amplifizierung der CRD-Sequenz aus der Ratten-c-myc-cDNA	
LMO2-V-Bam+2	GAAGAGGACTGGATCCCAATGTCCTCG Klonierung LMO2 in pACT2	BamHI
LMO2-H-Xho	ATCCCACTCGAGTTGGTCCAC Klonierung LMO2 in pACT2	XhoI
LMO4-V-Bam+2	GAGAGCTGGATCCACCTCACC Klonierung LMO4 in pACT2	BamHI
LMO4-H-Xho	ACCTTCCTCGAGGGCAGTAGT Klonierung LMO4 in pACT2	XhoI
rLMO1-V-Bam+1	GAGCCGCTTGGATCCTATGGTTTTG Klonierung rLMO1 in pCMV-2B	BamHI
rLMO1-H-Eco	GAAGTTGGGAATTCAAGGTGC Klonierung rLMO1 in pCMV-2B	BamHI

rLMO1-V-Eco	AGCCGCTTGGGAATTCATGGTTTTG	EcoRI
	Klonierung rLMO1 in pGBKT7	
rLMO1-H-Bam	GATGTTGGGGGATCCTGAACTT	BamHI
	Klonierung rLMO1 in pGBKT7	
Lim1-V-Bam	CTAAGGGGAAGCGGATCCGCTGTGCAG	BamHI
	Klonierung der Lim1-Domäne von rLMO1 in pACT2	
Lim1-H-XhoI	TTTCCTTGTCTCGAGAAAAAGCCT	XhoI
	Klonierung der Lim1-Domäne von rLMO1 in pACT2	
Lim2-V-Bam	TGGCACCACGGATCCCTGTGCTGC	BamHI
	Klonierung der Lim2-Domäne von rLMO1 in pACT2	
Lim2-H-Xho	CCATTGAGAGAATTCCTCCTCATAG	XhoI
	Klonierung der Lim2-Domäne von rLMO1 in pACT2	
FeRB2-5'-s	GGAGGAAAAAGGACCCTG	
seqFeRB2-1	GCTAAGATCCCG	
SeqFeRB2-2	GAATGGATTCCAG	
SeqFeRB2-3	CAGTTAAAGGCAATGTTG	
SeqFeRB2-as1	GCATAGAAGTGGCCAGTATTTTGAC	
SeqFeRB2-H	TTACTTCCGCCTTGACTGAGG	
	Sequenzierung FeRB2	
FeRB2-Ak1-V	CAACCCCTCGCATGCATGAACAAAT	SphI
	Klonierung eines FeRB2-Fragmentes (nt 1-470) in pGEX-2T	
FeRB2-Ak-H	TGGGTGGGGGTACCCAGGCGCAG	KpnI
	Klonierung eines FeRB2-Fragmentes (nt 1-470) in pGEX-2T	
FeRB2-V-Eco+1	CCCCTGAATTCAATGAACAAATTG	EcoRI
	Klonierung FeRB2 in pEGFP-C1	
FeRB2-H-Bam	TCCTGGATCCTTACTTCCGTCTGAA	BamHI
	Klonierung FeRB2 in pEGFP-C1	
FeRB2-SP1	AGAGGTGCCTTCAGGGGT	
FeRB2-SP2	AATGGACTTCTCCGCGGCC	
FeRB2-SP3	CTTACGATGGACATCGAT	
	Amplifizierung von FeRB2-5'-gelegenen Teilstücken	
FeRB2-SP5	GCCCACCCAGTTTGTGG	
FeRB2-SP6	GTGCCGCCATTCGCAACATC	
	Amplifizierung von FeRB2-3'-gelegenen Teilstücken	

Tab. 2: Verwendete Oligonukleotide.

2.2 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten primären und sekundären Antikörper sind mit Angabe der Herkunft in Tabelle 3 angegeben.

Bezeichnung	Herkunft	Referenz/ Katalognummer
α -EGFP, polyklonal	Clontech	3867-1
α -Flag-M2, monoklonal	Stratagene	200472
α -Flag, polyklonal	ABR Affinity Bioreagents	PA1-984
α -c-Myc monoklonal	Invitrogen Life Technologies	46-0603
α -c-Myc, polyklonal	ABR Affinity Bioreagents	PA1-981
α -GST, monoklonal	Santa Cruz Biotechnology	sc-138
α -His, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology	sc-804
α -Kaninchen-HRP-gekoppelt	Amersham Pharmacia	NA934V
α -Maus-HRP-gekoppelt	Amersham Pharmacia	NIF825
α -Meerschwein-HRP-gekoppelt	Jackson Immuno Research	106-035-003
α -Kaninchen-Alexa Fluor $\text{\textcircled{R}}$ 488	Molecular Probes	A-11008
α -Kaninchen-Alexa Fluor $\text{\textcircled{R}}$ 546	Molecular Probes	A-11010
α -Kaninchen-Alexa Fluor $\text{\textcircled{R}}$ 633	Molecular Probes	A-21070
α -Maus-Alexa Fluor $\text{\textcircled{R}}$ 546	Molecular Probes	A-11003
α -LMO1-Antiserum	Dr. Terry Rabbits, Cambridge	Valge-Archer <i>et al.</i> , 1994
Protein A-Agarose	Santa Cruz Biotechnology	sc-2001
EZ-view Red α -FLAG M2 Affinity Gel	Sigma	F-2426

Tab. 3: Verwendete Antikörper.

Angegeben sind die Bezeichnungen, die Herkunft sowie die Referenz oder die Bestellnummer.

2.3 Bakterienstämme und Zelllinien

Verwendet wurden folgende Bakterienstämme:

Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>E. coli</i> XL1blue	<i>RecA1, endA1gyrA96, Tho-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F'proAB lacI^qZΔM15Tn10(Tet^r)]</i>	Stratagene
<i>E. coli</i> M15 pREP4	<i>Nal^S Str^R Fij^S Lac⁻ Ara⁻ Gal⁻ Mtl⁻ F⁻ RecA⁺ Uvr⁺</i>	Stratagene
<i>E. coli</i> XL10-Gold	TetR, Δ(mcrA)183, Δ(mcrCB-hsdSMRmrr)173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1 lac Hte [F' proAB laqlqZΔM15 tn10]	Stratagene

Tab. 4: Verwendete Bakterienstämme.

Angegeben sind die Bezeichnung des Stammes sowie der zugehörige Genotyp und die Bezugsquelle.

Verwendete Zelllinie:

CHO-K1 *Chinese Hamster Ovary*
Wildtyp-Zellen, DMSZ Nr.: ACC 110

2.4 DNA: Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Restriktion von DNA mit Endonukleasen

Plasmid-DNA oder PCR-Produkte wurden mit entsprechenden Enzymen (Invitrogen Life Technologies, MBI Fermentas, New England Biolabs, Roche) nach Herstellerangaben verdaut. Die Enzymreaktionen wurden durch Zugabe von DNA-Ladepuffer (15% Ficoll, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylenxyanol) gestoppt und auf einem Agarosegel (2.4.2.) analysiert.

2.4.2 DNA-Gelelektrophorese

Zur Analyse von DNA-Präparationen, Restriktionsansätzen, PCR-Produkten und zur Isolierung von cDNA-Fragmenten wurde die DNA in horizontalen 1%igen Agarosegelen aufgetrennt. Die Agarose (Invitrogen Life Technologies) wurde in 1 x TAE-Puffer (Ausubel *et al.*, 1999), der auch als Laufpuffer diente, gelöst und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (10 mg/ml Sigma) versetzt. Die Detektion der DNA-Banden erfolgte mit Hilfe eines 356 nm-UV-Leuchttisches (UVT 28-M, Herolab).

2.4.3 Isolierung von cDNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach Auftrennung der DNA in Agarosegelen wurden die cDNA-Fragmente unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit dem QIAEX GEL EXTRACTION SYSTEM (Qiagen) oder dem QIAQUICK PURIFICATION SYSTEM (Qiagen) aus dem Gel isoliert.

2.4.4 Ligation von DNA-Fragmenten

100-200 ng Vektor-DNA wurde mit mindestens dreifachem molarem Überschuß an Fragment-DNA mit Hilfe von 1 U T4-DNA-Ligase (Invitrogen Life Technologies) entweder 3 h bei RT oder ü.N. bei 16°C ligiert. PCR-Produkte mit A-Überhängen wurden mit dem pGEM-T-SYSTEM II (Promega) nach Herstellerangaben in den pGEM-T- oder den pGEM-Teasy-Vektor kloniert.

2.4.5 Transformation von Bakterien

Zu 20 µl kompetenten *Escherichia coli* XL1-blue SUBCLONING GRADE Zellen (Stratagene) wurden 2 µl eines Ligationsansatzes bzw. 50 ng eines Plasmides pipettiert. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 45 sec einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und in 750 µl LB-Medium (Ausubel *et al.*, 1999) aufgenommen. Die Zellen wurden für 30-60 min bei 37°C geschüttelt, abzentrifugiert (4000 x g, 2 min) und in einem geeignetem Volumen LB-Medium auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgte ü.N. bei 37°C.

2.4.6 Plasmid-DNA-Isolierung aus Bakterien

Für eine Minipräparation von Plasmid-DNA wurden 4 ml LB-Medium, dem das entsprechende Antibiotikum zugegeben wurde, mit einer Bakterienkolonie angeimpft und ü.N. bei 37°C geschüttelt. Davon wurden 1,5 ml abzentrifugiert (15800 x g, 1 min) und nach der Methode der alkalischen Lyse (Sambrook *et al.*, 1989) die Plasmid-DNA isoliert

und in 50 µl H₂O aufgenommen. Sollte die Plasmid-DNA sequenziert werden, wurde die Isolierung mit Hilfe des PEQLAB MINI-PREP KITS II (PeqLab) durchgeführt. Zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA wurde das NUCLEOBOND AX 100 oder AX 500-Kit (Macherey & Nagel) verwendet. DNA zur Transfektion von Primärneuronen wurde mit Hilfe des ENDOFREE-MAXI-PREP-KITS (Qiagen) isoliert oder über zwei Cäsiumchlorid-Gradienten aufgereinigt (Sambrook *et al.*, 1989).

2.4.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Alle PCR-Ansätze wurden auf Eis zusammenpipettiert und erst bei einer erreichten Temperatur von 94°C in die PCR-Maschine (GENEAMP PCR SYSTEM 2400, Perkin Elmer) gestellt. Ein Standardansatz sah wie folgt aus: 100-200 ng cDNA-Matrize, 20 pmol je Oligonukleotid, 200 µM je dNTP, 5 µl 10 x Puffer (entsprechend der Taq- / Pfu-Polymerase, Promega), 2,5-3,5 mM MgCl₂, 2-5 U Taq- oder Pfu-Polymerase (Promega) und H₂O ad 50 µl. Das PCR-Programm war abhängig von der Hybridisierungstemperatur der eingesetzten Oligonukleotide sowie von der Länge des erwarteten Produktes. Ein Standardprogramm ist hier wiedergegeben:

Reaktion	Temperatur	Dauer	Zyklen
Prä-Denaturierung	94°C	2 min	1
Denaturierung	94°C	30 sec	
Anlagerung der Oligonukleotide	57°C – 63°C	30 sec	30-35
Polymerase-Reaktion	72°C	1 min – 3 min	
Abschließende Polymerase-Reaktion	72°C	7 min	1

Die PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und aus dem Gel isoliert (2.4.3). Anschließend wurden sie direkt entweder in den *T/A-cloning*-Vektor pGEM-T (Promega) oder in den TOPO-PCR-Blunt-II-Vektor (Stratagene) kloniert und sequenziert. Nach entsprechendem Verdau mit Restriktionsendonukleasen (2.4.1) wurden sie in geeignete Vektoren eingebracht und zur Kontrolle über die Ligationstellen erneut sequenziert.

2.4.8 Radioaktive Markierung von cDNA-Fragmenten

Die Markierung von cDNA-Fragmenten für Northern Blot-Hybridisierungen erfolgte nach Angaben des Herstellers über das PRIME-IT-II-KIT (Stratagene) unter Verwendung von 5 µl [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP (3000 Ci/mmol, Amersham Pharmacia).

2.5 RNA: Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Präparation von RNA aus Gewebe

Rattenembryonen (2.5.6) oder Gehirne adulter Ratten wurden in 100 ml/mg Gewebe mit TRIZOL (Invitrogen Life Technologies) homogenisiert, die RNA wurde nach Herstellerangaben isoliert, in 300 µl H₂O aufgenommen und die Konzentration in einem Photometer (GENEQUANT, Pharmacia) bestimmt. Erhaltene Gesamt-RNA wurde entweder direkt für eine RT-PCR (2.4.7) eingesetzt oder zur Gewinnung von Poly (A)⁺-RNA mit Hilfe von DYNABEADS-OLIGO-dT (Dynal) nach Angaben des Herstellers genutzt.

2.5.2 RNA-Gelelektrophorese und RNA-Transfer (Northern Blot)

RNA-Proben wurden in einem denaturierendem Glyoxal-Gel aufgetrennt. Dazu wurde die hergestellte Poly (A)⁺-RNA (2.5.1) unter Vakuum lyophilisiert und anschließend in 10 µl Glyoxal/DMSO-Puffer (50% DMSO, 10 mM NaPO₄ pH 7.0, 1 M Glyoxal) resuspendiert. Nach einstündiger Inkubation bei 50°C wurde 2,5 µl Probenpuffer (45,5% Glycerin, 10 mM NaPO₄ pH 7.0, 0,3% Bromphenolblau) zugegeben und die RNA auf einem 1%igen Agarosegel in 10 mM NaPO₄ pH 7.0 aufgetrennt. Der Transfer der RNA erfolgte ü.N. durch Kapillarkraft in 20 x SSC auf eine Nylonmembran (HYBOND N, Amersham Pharmacia).

2.5.3 Northern Blot-Hybridisierung

Northern Blots wurden in 50 ml Kunststoffröhrchen (Falcon) mit 5 ml Hybridisierungslösung (ULTRAHYB, Ambion) 2 h bei 42°C prähybridisiert. Die Hybridisierung wurde in frischer Hybridisierungslösung mit 5 x 10⁶ cpm [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP markierter DNA-Sonde (2.4.8.)/ml ü.N. bei 42 °C durchgeführt. Unspezifisch gebundene Sonde wurde durch drei 15-minütige Waschschrte in Waschpuffer I (1 x SSC, 0,1% SDS)

und zwei 30-minütige Waschschriffe in Waschpuffer II (0,2 x SSC, 0,1% SDS) entfernt. Der Blot wurde in feuchtem Zustand in Plastikfolie eingewickelt und bei -70°C unter Verwendung von CRONEX MEDICAL X-RAY Filmen (Sterling Diagnostic Imaging) exponiert.

2.5.4 RT-PCR

Reverse Transkription von Gesamt-RNA aus Rattenembryonen unterschiedlicher Entwicklungszeitpunkte sowie aus dem Gehirn adulter Ratten wurde mit Hilfe der SUPERSCRIPT II reversen Transkriptase (Invitrogen Life Technologies) nach Herstellerangaben durchgeführt. Anschließende PCR erfolgte je nach Bedarf mit unterschiedlichen Oligonukleotiden wie unter 2.4.7 beschrieben.

2.5.5 Herstellung von radioaktiv markierten RNA-Sonden mittels *in vitro*-Transkription

Radioaktiv markierte RNA-Sonden wurden für *in situ*-Hybridisierungen sowie UV-Quervernetzungs-Analysen benötigt. Dazu wurde der entsprechende Transkriptionsvektor linearisiert und unter Zugabe von 2,5 μl [$\alpha^{35}\text{S}$]-UTP (1250 Ci/mmol, 12,5 mCi/ml, Amersham Pharmacia) bzw. [$\alpha^{32}\text{P}$]-UTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, Amersham Pharmacia) mit Hilfe von T3-, T7- oder SP6-RNA-Polymerase (Promega, MBI Fermentas) nach Herstellerangaben transkribiert. Für *in situ*-Hybridisierungen wurde der Ansatz mit 1 Volumen 100 mM NaCO_4 pH 10.3 für 20-40 min hydrolysiert, um Fragmentgrößen um 0,3 kb zu bekommen. Nach Neutralisierung mit 1 Volumen 0,2 M Natriumacetat pH 6.2 wurde die RNA unter Zusatz von 100 μg *E. coli* t-RNA mit 3-fachem Volumen eiskaltem absolutem Ethanol ü.N. bei -20°C gefällt.

2.5.6 Präparation von Rattenembryonen und Herstellung von Gewebeschnitten

Tragende Ratten, deren Embryonen zwischen 12 und 15 Tage alt waren, wurden mit CO_2 betäubt und dekaptiert. Die Embryonen wurden aus der Gebärmutter entfernt. Zur späteren Herstellung von Gesamt-RNA oder Proteinextrakten wurden die Embryonen in einem Kunststoffröhrchen (Falcon) in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -70°C gelagert. Zur Anfertigung von Gewebeschnitten wurden die Embryonen ü.N. in 4% Paraformaldehyd in PBS (*Phosphate Buffered Saline*, Ausubel *et al.*, 1999) fixiert, anschließend in 0,5 M Sucrose bis zum Absinken des Gewebes bei 4°C inkubiert und dann entweder tiefgefroren oder zum Schneiden auf Gelatine (OCT COMPOUND, Tissue Tek)

gefroren. 15-20 µm Schnitte wurden bei -20°C im Kryostaten (JUNG CM 3000, Leica) angefertigt, auf beschichtete Objektträger (SUPERFROST PLUS, Roth) aufgebracht und anschließend bei -70°C gelagert.

2.5.7 *In situ*-Hybridisierung an Rattenembryonen-Dünnschnitten

Gewebeschnitte von Rattenembryonen wurden 15 min in 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert, kurz in PBS sowie H₂O gewaschen und anschließend 20 min in 0,2 N HCl inkubiert. Vor der Entwässerung über eine aufsteigende Ethanolreihe (65%, 85%, 95%, 100%) wurden die Schnitte 30 min bei 70°C in 2 x SSC inkubiert. Die Prähybridisierung wurde mit 20 µl Hybridisierungslösung (50% deionisiertes Formamid, 0,3 M NaCl, 10 mM Tris, 10 mM NaPO₄ pH 6,8, 0,02% Denhardts, 10% Dextransulfat, 20 mM DTT) + 5 mg/ml *E. coli* t-RNA pro Schnitt 2 h bei 54°C in einer feuchten Kammer durchgeführt. Anschließend erfolgte erneutes Waschen in 2 x SSC sowie Entwässerung über eine aufsteigende Ethanolreihe. Währenddessen wurden die gefällten RNA-Sonden mit einer spez. Aktivität von 4×10^5 cpm in 50% Formamid gelöst und 1:5 in Hybridisierungslösung verdünnt. Nach einer 10-minütigen Denaturierung bei 80°C wurden 20 µl der verdünnten Sonde auf die Schnitte aufgebracht. Die Hybridisierung erfolgte ü.N bei 54°C in einer feuchten Kammer. Unspezifisch gebundene Sonde wurde mit folgenden Waschschritten entfernt: zweimal 1 h in Waschpuffer (50% Formamid, 5 x SSC, 10 mM DTT) bei 54°C, 15 min in TE-N (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 0,3 M NaCl) bei 37°C, 30 min in TE-N + 40 µg/ml RNaseA bei 37°C, 15 min in TE-N bei 37°C, 30 min in 2 x SSC bei 37°C mit mehrmaligem Pufferwechsel sowie 30 min in 0,2 x SSC bei 37°C ebenfalls mit einigen Pufferwechseln. Die Schnitte wurden erneut über eine aufsteigende Ethanolreihe entwässert und nach vollständigem Trocknen in einer Filmkassette bei RT mit KODAK BIO-MAX Filmen (Kodak) exponiert.

2.5.8 UV-Quervernetzungs-Analysen

UV-Quervernetzungsanalysen wurden mit Proteinextrakten aus transfizierten sowie untransfizierten CHO-K1-Zellen durchgeführt. Dazu wurden 5 fmol markierte RNA-Sonde (2.5.5) mit 10 µg des entsprechenden Proteinextraktes in einem Gesamtvolumen von 20 µl in Bindungspuffer 1 oder 2 (BP1: 5 mM Tris-HCl pH 7,6, 2,5 mM EDTA, 2 mM DTT, 5% Glycerin, 0,5 µg/µl t-RNA; BP2: 2,5 mM Hepes pH 7,6, 0,75 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1,25% Glycerin, 0,25 mM DTT, 0,5 µg/µl Heparin) für 20 min inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsansätze mit UV-Licht (254 nm, 1 Joule/cm²) bestrahlt. Es schloß sich

ein 15-minütiger RNase-Verdau mit RNase A Typ IIA (Sigma) an und die Reaktionsansätze wurden mit 5 µl 5 x Laemmli-Probenpuffer (Laemmli *et al.*, 1970) versetzt und auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt (2.6.2). Nach Trocknung des Gels unter Vakuum bei 80°C wurde ein Kodak BIOMAX-Film aufgelegt und dieser ü.N. bei -70°C exponiert.

2.6 Protein: Molekularbiologische und biochemische Methoden, Immunchemie

2.6.1 Herstellung von Proteinextrakten aus Gewebe

Rattenembryonen wurden wie unter 2.5.6. beschrieben präpariert und zur Herstellung von Proteinextrakten in 5-fachem Volumen Lysis-Puffer (10 mM Hepes pH 7.6, 3 mM MgCl₂, 40 mM KCl, 5% Glycerol, 1 mM DTT, 0,2% IGEPAL), der mit 40 µl/ml Protease-Inhibitor-Cocktail (COMPLETE™, Roche) versetzt wurde, homogenisiert. Das Homogenat wurde 10 min bei 4°C und 13000 x g zentrifugiert und die Überstände bei -20°C gelagert.

2.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

10-12%ige SDS-Polyacrylamidgele (Sambrook *et al.*, 1989) wurden mit 10-20 µg Protein pro Spur beladen und diese bei 200 V 1 h in 1 x SDS-Laufpuffer (25 mM Tris-Base, 19,2 mM Glycin, 0,1% w/v SDS) aufgetrennt. Dazu wurden 16 µl Proteinextrakt mit 4 µl 5 x Laemmli-Puffer (Laemmli *et al.*, 1970) versetzt und vor dem Beladen des Gels 5 min gekocht. Vorgefärbte Protein-Molekulargewichtsstandards (FULL RANGE RAINBOW Marker, Amersham Pharmacia, BENCHMARK Marker, Invitrogen Life Technologies) wurden zur Bestimmung der Proteingrößen benutzt.

2.6.3 Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Nach der SDS-PAGE wurden die Gele in Coomassie-Lösung (0,25% w/v Coomassie Brilliant Blue R 250, 0,05% w/v Coomassie Brilliant Blue G 250, 50% v/v Methanol, 10% v/v Eisessig) 20 min gefärbt und anschließend mit Entfärberlösung (50% v/v Methanol, 10% v/v Eisessig) entfärbt, in H₂O gewaschen und getrocknet (GELAIR DRYER, BioRad).

2.6.4 Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blot)

Nach Auftrennung mittels SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran (*polyvinylidene Fluoride*, Millipore) übertragen, um sie für eine immunologische Detektion zugänglich zu machen. Der Proteintransfer erfolgte nach Herstellerangaben der Membran sowie der Blot-Apparatur (BioRad) in Blotpuffer (38 mM Glycin, 47 mM Tris-Base, 0,03% v/w SDS, 20% Methanol abs.) 1 h bei 100 V und 4°C.

2.6.5 Immunologische Detektion von Proteinen auf einer PVDF-Membran

Der Western Blot wurde nach dem Proteintransfer kurz mit PBS-T (*Phosphate Buffered Saline* + 0,1% Tween-20) gewaschen und 1 h bei RT mit Blockierlösung (5% Magermilchpulver in PBS-T) blockiert. Die Inkubation mit erstem Antikörper, der in entsprechender Verdünnung (1:500–1:5000) in Blockierlösung vorlag, erfolgte 1 h bei RT oder ü.N. bei 4°C. Nach drei 10-minütigen Waschschritten in PBS-T wurde der Blot mit HRP (*horseradish peroxidase*)-gekoppeltem zweiten Antikörper 1 h bei RT inkubiert. Die Detektion der an die Proteine gebundenen Antikörper erfolgte nach erneutem Waschen (wie oben) mit dem ECL-Reagenz (*Enhanced Chemiluminescence*, Amersham Pharmacia) auf Röntgenfilmen (CRONEX MEDICAL X-RAY Film, Sterling Biodiagnostic Imaging).

2.6.6 Expression und Aufreinigung von Fusionsproteinen

E. coli M15-Zellen, die entsprechende Expressionsvektoren trugen, wurden in 50 ml Selektionsmedium bei 37°C unter Schütteln ü.N. kultiviert. Mit Hilfe dieser Vorkultur wurden 500 ml Selektionsmedium auf eine $OD_{600} = 0,1$ angeimpft und bis zur logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,8$) der Zellen schüttelnd bei 37°C inkubiert. Die Expression der Fusionsproteine wurde daraufhin mit 1 mM IPTG (*Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranoside*, Roth) induziert. Nach zweistündigem Wachstum wurden die Zellen abzentrifugiert (5000 x g, 10 min, 4°C), in STE-Puffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) gewaschen und eingefroren. Zur Aufreinigung der Proteine wurde das Bakterienpellet in 10 ml STE-Puffer + Protease-Inhibitor Cocktail (COMPLETE™, Roche) auf Eis resuspendiert, mit 100 μ g Lysozym versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer Ultraschall-Behandlung (7 x 10 sec) wurde die Suspension 20 min bei 4°C und 13000 x g zentrifugiert und der Überstand auf eine Gluthation-Sepharose-Säule (POLY-PREP CHROMATOGRAPHY COLUMN, BioRad, Gluthation-Sepharose, Amersham Pharmacia) gegeben. Nach zweimaligem Waschen mit 10-fachem Volumen der Säulen-Matrix an STE-Puffer wurden die Fusionsproteine viermal mit 1 ml Elutionspuffer

(10 mM Gluthation, 50 mM Tris-HCl pH 8.0) eluiert und die Fraktionen in Mikroreaktionsgefäßen gesammelt. Zur Analyse der Aufreinigung wurde ein Polyacrylamidgel mit 16 µl Probe (siehe 2.6.2) aus verschiedenen Reinigungsschritten durchgeführt und das Gel mit Coomassie angefärbt. Die Proteinkonzentrationen in den Elutionsfraktionen wurden mit Hilfe des Bradford-Reagenz (Protein-Assay, BioRad) durch eine Eichkurve mit BSA (*bovine serum albumin*, Sigma, 1 mg/ml) bestimmt.

2.6.7 Immunpräzipitation von Proteinen

CHO-K1-Zellextrakte (2.8.3) wurden mit 20 µl Protein A-Agarose (Santa Cruz) 2 h bei 4°C auf einem Rotator vorinkubiert. Nach einer Zentrifugation (500 x g, 3 min, 4°C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet zweimal mit Co-IP-Puffer (120 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 0,5% v/v IGEPAL) gewaschen und in 20 µl 1 x Laemmli-Puffer (Laemmli *et al.*, 1970) aufgenommen. Der Überstand wurde mit 20 µl Protein A-Agarose, die mit 2-5 µg des entsprechenden Antikörpers 2 h bis ü.N. inkubiert wurde, versetzt und wiederum 4 h oder ü.N. bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Sollte der Antikörper kovalent an die Protein A-Agarose gekoppelt werden, schloß sich an die Vorinkubation der Protein A-Agarose mit dem Antikörper eine 30 minütige Inkubation mit 20 mM DMP (Dimethylpimelimidate, Sigma) in 0,1 M Borsäure an. Nach zweimaligem Waschen mit 0,1 M Tris-HCl pH 8.0 wurde der Proteinextrakt zugegeben. Anschließend wurde wie oben beschrieben zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Kontrolle behalten und das Protein A-Agarose-Proteinkomplex-Pellet wurde wie oben gewaschen und in 20 µl 1 x Laemmli-Puffer aufgenommen. Alle Protein A-Agarose-Laemmli-Gemische wurden kurz gekocht, abzentrifugiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

Sollte die Immunpräzipitation mit einem anti-FLAG-Antikörper durchgeführt werden, wurden EZVIEW RED ANTI-FLAG M2-Agarose Beads (Sigma) verwendet und die Immunpräzipitation nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.6.8 Sucrose-Dichtegradienten Zentrifugation

Dreizehn Tage alte Rattenembryonen wurden wie unter 2.5.6 beschrieben präpariert und jeweils sieben Embryonen in 1,5 ml HKM-Puffer (10 mM Hepes pH 7.6, 100 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 3 mM β-Mercaptoethanol) homogenisiert. Für einen Kontroll-Gradienten wurde 10 µg/µl RNase A zugegeben, für einen "normalen" Gradienten 10 µg/µl RNasin RNase Inhibitor. Nach 10-minütigen Zentrifugation bei 15.800 x g und 4°C wurde 1 ml

des Proteinextraktes auf einen Sucrosegradienten geladen. Dieser wurde in einem 2117 MULTIPHOR 2 Gradientenmischer (LKB Brommer) mit 15- und 45%iger Sucroselösung in HKM-Puffer ohne β -Mercaptoethanol hergestellt. Nach einer 105-minütigen Zentrifugation bei 150000 x g in einer L7 Ultrazentrifuge (Beckmann, Rotor TH 614, Sorvall) wurden 500 μ l-Fractionen gesammelt. Die Absorption bei 260 nm wurde in einem BIOPHOTOMETER (Eppendorf) gemessen und mit Hilfe des Programmes SIGMAPLOT (SPSS Inc.) ausgewertet. Für eine Analyse der Proteine wurden 50 μ l jeder Fraktion mit 12 μ l 5 x Laemmli-Puffer (Laemmli *et al.*, 1970) versetzt und wie unter 2.6.4 beschrieben aufgetrennt. Aus 400 μ l jeder Fraktion wurde durch Phenol/Choloroform-Extraktion die RNA isoliert (Ausubel *et al.*, 1999) und diese auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt.

2.7 Hefe: Methoden des Zwei-Hybrid-Systems

Die Durchführung des Hefe Zwei-Hybrid-Screens erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, nach Clontech Protokollen (MATCHMAKER *GAL4* Zwei-Hybrid *User Manual*, *Yeast Protocols Handbook*). Benutzt wurde der Hefestamm CG1945 (Freilotter *et al.*, 1994).

2.7.1 Transformation von Hefe-Zellen

100 ml Hefe-Vollmedium (YPD Broth, BIO101) oder Selektionsmedium (BIO101) wurde mit 50 μ l einer Vorkultur von CG1945-Hefezellen angeimpft und ü.N. bei 30°C schüttelnd inkubiert. Die Hefezellen wurden anschließend bei 2000 x g 3 min bei RT abzentrifugiert, mit H₂O gewaschen und in 1 ml Lösung I (10 mM Tris-HCl pH 7.0, 1 mM EDTA, 100 mM Lithiumacetat) resuspendiert. Drei μ g des entsprechenden Plasmides wurden zusammen mit 20 μ g denaturierter Lachssperm-DNA, 200 μ l der Hefesuspension und 1 ml Lösung II (10 mM Tris-HCl pH 7.0, 100 mM Lithiumacetat, 40% Polyethylenglycol 3350) vermischt und 30 min schüttelnd bei 30°C inkubiert. Nach einem 15-minütigem Hitzeschock bei 42°C wurden die Hefezellen kurz abzentrifugiert, in 200 μ l H₂O resuspendiert und auf entsprechenden Agarplatten (SELECT AGAR, Invitrogen Life Technologies) ausplattiert. Diese wurden mehrere Tage bei 30°C inkubiert.

2.7.2 Zwei-Hybrid-Screen

Eine Vorkultur CG1945, die das „Köder“-Plasmid pAS-FeRB1 enthielt, wurde zwei Tage vor dem *Screen* in 100 ml –Trp-Flüssigmedium (BIO101) angezogen und anschließend in eine 250 ml-Kultur überführt. Bei einer $OD_{600} = 0,8$ wurden 250 ml YPAD-Vollmedium (YPD, BIO 101, 10 mM Adenin-Sulfat) zugegeben und weitere 4 h inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 2000 x g wurden die Hefezellen in 20 ml Lösung III (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM ECTA, 100 mM LiAc, 0,96 M Sorbitol) resuspendiert und erneut 30 min leicht schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden sie erneut zentrifugiert, in 1,5 ml Lösung III aufgenommen und mit 1,5 ml DNA-Mix (500 µg Rattengehirn-cDNA-Bank, 500 µl Lachsspermien-DNA, 150 µl 1 M LiAc, 150 µl TE-Puffer) und 13,1 ml Lösung II (10 mM Tris-HCl pH 7,0, 1 mM EDTA pH 8,0, 100 mM LiAc, 40% Polyethylenglycol 3350) vermischt und 30 min bei 30°C inkubiert. Nach Zugabe von 1,4 ml DMSO wurden die Zellen 20 min einem Hitzschock bei 42°C ausgesetzt und anschließend 100 ml –Trp, –Leu, –His-Selektionsmedium zugegeben. Nach 2-sündiger Inkubation wurden die Hefezellen wie oben beschrieben zentrifugiert, mit TE-Puffer gewaschen und anschließend in 4 ml TE aufgenommen. Zur Bestimmung der Anzahl der Transformanten wurden 2, 5 und 10 µl der Suspension in 300 µl TE aufgenommen und auf –Trp, –Leu, –His-Selektionsmedium ausplattiert. Der Rest wurde zu je 300 µl auf –Trp, –Leu, –His-Selektionplatten, die zusätzlich 10 mM 3-Amino-1,2,4-triazol enthielten, ausplattiert.

2.7.3 β-Galaktosidase-Filtertest

Mehrere frisch gewachsene Hefekolonien wurden mit Hilfe eine Pipettenspitze auf einem 125 mm-Filter (597 S&S Filterpapier, Schleicher & Schuell) ausgestrichen. Dieser wurde zum Aufschluß der Zellen in ein Bad mit flüssigem Stickstoff gelegt. Währenddessen wurde ein weiterer Filter in einer Petrischale mit β-Gal-Lösung (83,5 µl BLUOGAL, (Invitrogen Life Technologies), 20 mg/ml Dimethylfluorid, 13,5 µl β-Mercaptoethanol in 5 ml Z-Puffer (16,1 g/l Na_2HPO_4 , 5,5 g/l NaH_2PO_4 , 0,75 g/l KCl, 0,246 g/l $MgSO_4$, pH 7.0)) getränkt. Der Filter mit den Hefezellen wurde kurz an der Luft getrocknet und luftblasenfrei über den zweiten Filter gelegt. Nach 1-8 h Inkubation bei RT färbten sich positive Kolonien blau. Als Kontrolle dienten CG1945-Zellen, die das Plasmid CI-1 (Fields & Song, 1989) trugen, auf dem die gesamte Wildtyp-Sequenz des GAL4-Gens vorliegt.

2.7.4 Cycloheximid-Selektion

Hefezellen, die sowohl „Köder“ (pAS-FeRB1), als auch „Beute“ (Rattengehirn-cDNA-Bank pACTII)-Plasmide enthielten, wurden auf –Leu+Cycloheximid (1 mg/l, Sigma)-Selektionsplatten ausgestrichen. Nach 4-5 Tagen wurden Kolonien, die einen Durchmesser von 1-2 mm erreicht hatten, sowohl auf –Trp- als auch –Leu-Selektionsplatten ausgestrichen. Kolonien, die hierbei nur noch auf –Leu wuchsen, enthielten nur noch das „Beute“-Plasmid und wurden einem weiteren β -Galactosidase-Filtertest unterzogen.

2.7.5 Plasmidisolierung aus Hefe-Zellen

Eine entsprechende Hefekolonie wurde in 4 ml –Leu-Flüssigmedium ü.N bei 30°C angezogen. Davon wurden 1,5 ml abzentrifugiert (15800 x g, 1 min) und das Pellet in 200 μ l Lyse-Puffer (2% v/v Triton-X-100, 1% w/v SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 μ l Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und 300 mg Glasperlen (425-600 μ m, Sigma) wurde 2 min kräftig geschüttelt. Nach 5-minütiger Zentrifugation wurde der wässrige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte durch Ethanolfällung und Resuspendierung in 20 μ l H₂O. Anschließend wurde die DNA sequenziert.

2.8 Zellkultur: Molekularbiologische und biochemische Methoden

2.8.1 Kultivierung von CHO-K1-Zellen

Für Expressionsexperimente wurde die Säuger-Zelllinie CHO-K1 (*Chinese Hamster Ovary*, DSMZ) verwendet. Die Kultivierung erfolgte in Ham-F12-Medium (Invitrogen Life Technologies) mit 10% fötalem Kälberserum (FCS, Biother) und 100 μ g/ml Penicillin/Streptomycin (Hefa) in 10 mm-Zellkulturschalen bei 37°C und 5% CO₂. Zum Umsetzen konfluenter Zellen wurde diese in 4 ml 0,25% (v/v) Trypsin (Invitrogen Life Technologies) in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Sigma) für einige Minuten inkubiert. Nach leichtem Schütteln wurden die Zellen von der Kulturplatte abgelöst und die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 8 ml Medium gestoppt. Anschließend wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Um ein möglichst

gleichmäßiges Wachstum der CHO-K1-Zellen zu gewährleisten, wurden diese in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen auf neue 10 mm-Zellkulturschalen umgesetzt.

2.8.2 Transfektion von CHO-K1-Zellen mit LIPOFECTAMINE®

Am Tag vor der Transfektion wurden die CHO-K1-Zellen in eine 12-Kavitäten-Platte in einer Dichte von 5×10^4 Zellen pro Kavität überführt. Vorher wurden Deckgläser für die Immunfluoreszenzanalyse in die Kavitäten eingebracht. Für jeden Transfektionsansatz wurden 1-4 μg DNA und 2-5 μl LipofectAMINE® (Invitrogen Life Technologies) jeweils mit 100 μl OPTI-MEM I (37°C, Invitrogen Life Technologies) verdünnt. Beide Lösungen wurden vereinigt, vorsichtig gemischt und 30 min bei RT inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde mit 800 μl OPTI-MEM verdünnt und jeweils 500 μl auf die zuvor mit OPTI-MEM gewaschenen CHO-K1-Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 6 h unter Standardbedingungen (2.8.1) wurde die Transfektionslösung durch 1 ml Kultivierungsmedium ersetzt. Die Zellen wurden weitere 1-2 Tage kultiviert. Um zur Herstellung von Proteinextrakten größere Mengen an Zellen zu transfizieren, wurden die CHO-K1-Zellen einen Tag vor der Transfektion in einer Dichte von 5×10^5 Zellen auf 10 mm-Zellkulturschalen ausgesät und mit der 4-fachen Menge des Transfektionsansatzes transfiziert.

Sollte die Inhibierung des nukleären Exportes untersucht werden, wurde entweder direkt oder 12 Stunden nach der Transfektion 5-20 ng/ml Leptomycin B (Sigma) zum Medium der Zellen gegeben und diese nach weiteren 1-6 Stunden fixiert (2.8.4).

2.8.3 Herstellung von Proteinextrakten aus CHO-K1-Zellen

Zur immunologischen Detektion von Proteinen aus CHO-K1-Zellen wurde das Medium aus der Kulturschale abgesaugt, die Zellen in 1 ml 1x Laemmli-Puffer aufgenommen, 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 15 min bei 4°C und 15800 x g zentrifugiert. Die DNA konnte anschließend mit Hilfe einer Impföse entfernt werden. 20 μl des Überstandes wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, die Proteine aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen (siehe 2.6.2 und 2.6.4).

Für die Immunpräzipitation von Proteinen aus CHO-K1-Zellen sowie für die Herstellung der Proteinextrakte für die UV-Quervernetzungs-Analysen wurden die Zellen in PBS mit einem Gummischaber von der Platte abgelöst, 3 min bei 1000 x g abzentrifugiert und in geeignetem Volumen Co-IP-Puffer (120 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,5% v/v IGEPAL, pH 8.0) beziehungsweise Bindungspuffer (2.5.8) aufgenommen. Nach

erneuter Zentrifugation bei 15800 x g wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration mit dem Bradford-Reagenz (BioRad) bei 595 nm gegen eine Eichkurve mit BSA bestimmt.

2.8.4 Fixierung von CHO-K1-Zellen

Auf Deckgläsern gewachsene CHO-K1-Zellen wurden nach Abnahme des Mediums 5 min bei 37°C mit Mikrotubuli-stabilisierendem Puffer (MTSP, 80 mM Na-PIPES pH 6.9, 1 mM MgCl₂, 1 mM Na-EGTA, 4% v/v Polyethylenglycol 6000) inkubiert. Fixierung erfolgte durch 20-minütige Inkubation mit 4% Paraformaldehyd in MTSP bei RT.

2.8.5 Immuncytochemie

Nach der Fixierung wurden Zellmembranen 10 min bei 37°C mit 1% Triton-X-100 in PBS permeabilisiert. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden, wurden die Deckgläser 1 h bei 37°C mit Blockierlösung (0,5% Rinderserumalbumin, 3% Ziegen Serum) inkubiert. Daran schloß sich eine 1-stündige Inkubation bei 37°C mit entsprechendem erstem Antikörper in 1:1000-Verdünnung in 3% Ziegen Serum an. Nach drei 5-minütigen Waschschritten in PBS erfolgte eine 1-stündige Inkubation mit jeweiligem Alexa-Fluorophor-gekoppeltem zweiten Antikörper in entsprechender Verdünnung in 3% Ziegen Serum. Die Zellen wurden erneut drei mal 5 min in PBS gewaschen und das überschüssige Salz mit bidestilliertem H₂O entfernt. Die Deckgläser wurden in PERMAFLUOR (Becton Dickinson) eingebettet und ü.N bei 4°C getrocknet. Die Auswertung erfolgte mit einem Leica-Fluoreszenzmikroskop sowie der Software OPENLAB oder mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop (*Leica confocal System*) mit der Software LEICA TCS.

2.9 Firmenverzeichnis

ABR Affinity Reagents, Golden, USA, über Dianova GmbH, Hamburg
Ambion Europe Ltd. Huntingdon, UK
Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Heidelberg
Bio 101 über Oncor Appligene, Heidelberg
BioRad Laboratories GmbH, München
Biother GmbH, Kelkheim/Ts.
Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Clontech Laboratories GmbH, Heidelberg
Dynal GmbH, Hamburg
Eppendorf GmbH, Hamburg
Hefa Pharma, Werne
Invitrogen Life Technologies (Invitrogen Corporation), Karlsruhe
Jackson Immuno Research, West Grove, USA, über Dianova GmbH, Hamburg
Macherey & Nagel GmbH & Co KG, Düren
MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
Millipore GmbH, Eschborn
Molecular Probes Europe BV, Leiden, Niederlande
New England Biolabs GmbH, Schwalbach/Ts.
PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Promega GmbH, Mannheim
Quiagen GmbH, Hilden
Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Santa Cruz Biotechnologies Inc, Heidelberg
Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande

3 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war Mitglieder der ZBP-1-Familie von RNA-Bindeproteinen in der Ratte zu identifizieren und deren Funktion im Rattengehirn zu untersuchen. Speziell wurde der Frage nachgegangen, ob die Ratten-RNA-Bindeproteine wie die anderen Mitglieder dieser Familie an posttranskriptionalen Regulationsmechanismen, wie z.B. dem zytoplasmatischen RNA-Transport beteiligt sein könnten.

3.1 Identifizierung neuer RNA-Bindeproteine des Rattengehirns

3.1.1 Identifizierung zweier RNA-Bindeproteine aus der Ratte

Mit Hilfe des Programmes *BLAST Search* vom *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) wurde nach cDNA-Sequenzen aus Säugern gesucht, die Ähnlichkeiten zur ZBP-1 Sequenz des Huhns (*Zipcode Binding Protein* GenBank-Nummer (GB): AF026527) aufweisen. Dabei wurde ein EST-Klon der Maus gefunden (*Expressed Sequence Tag*, GB: L35599), der eine 78%ige Identität zum ZBP-1 aufwies. Außerdem wurde eine weitere Sequenz aus der Maus angegeben, die für das CRD-BP (*Coding Region Determinant Binding Protein*) codiert, welches eine 92%ige Identität zum ZBP-1 aus dem Huhn aufweist. Des weiteren wurde eine humane Sequenz gefunden, die für das KOC1 (*K-Homology Protein Overexpressed in Cancer*) codiert. Dieses Protein wurde aufgrund einer Überexpression in pankreatischem Tumorgewebe identifiziert und wegen der Ähnlichkeit zum ZBP-1 (89%) als RNA-Bindeprotein eingeordnet (Müller-Pillasch *et al.*, 1997). Die zur Zeit der Datenbanksuche verfügbaren Sequenzinformationen von homologen RNA-Bindeproteinen aus Säugetieren sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Spezies	Bezeichnung	GenBank- Nummer
Mensch	KOC1 (<i>K-Homology Protein Overexpressed in Cancer</i>)	U76705
Maus	CRD-BP (<i>Coding Region Determinant Binding Protein</i>)	AF061569
Maus	<i>Expressed Sequence Tag</i>	L35599

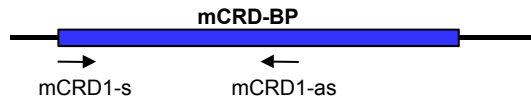
Tabelle 5: In der Datenbank verfügbare cDNA-Sequenzen von ZBP-1-Homologen aus Säugetieren mit GenBank-Zugriffsnummer

Zur Identifizierung verwandter RNA-Bindeproteine aus der Ratte wurde eine RT-PCR mit RNA aus dem Gehirn fünf Tage alter Ratten durchgeführt. Dazu wurden die Oligonukleotide mCRD1-s und mCRD1-as, verwendet (Abb. 1), die von der Sequenz des in der Maus vorkommenden *Coding Region Determinant Binding Protein* (CRD-BP) abgeleitet wurden. Amplifiziert wurde ein Sequenzbereich von 1300 Nukleotiden (nt) entsprechend nt 1-1300 des CRD-BP (GB: AF061569). Das resultierende PCR-Produkt wurde subkloniert und sequenziert. Die cDNA Sequenz entsprach zu 82% der des murinen CRD-BP. Um weitere Bereiche der codierenden Sequenz aus der Ratte zu amplifizieren, wurde in einer weiteren PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden FeRB1-2s und mCRD-H (siehe Abb. 1) ein 534 nt langes Fragment der Rattensequenz amplifiziert, von dem 100 nt mit der vorher amplifizierten Teilsequenz überlappten. Somit war der komplette codierende Bereich einer cDNA aus der Ratte amplifiziert. Das resultierende Protein wird im folgenden FeRB1 (*Fetal Rat RNA-Binding Protein*) genannt.

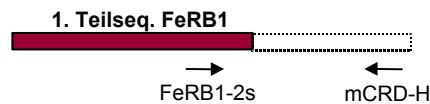
Um die 5'- bzw. 3'-untranslatierten Bereiche (5'- bzw. 3'-UTR) von FeRB1 zu identifizieren, wurde eine RACE (*rapid amplification of cDNA ends*)-Reaktion durchgeführt. Die Amplifikation der 5'-UTR erfolgte mit den genspezifischen Oligonukleotiden FeRB1-SP1 und -SP2 sowie einem *PCR-anchor primer*, der mit den bei der Erststrangsynthese am 5'-Ende spezifisch angehängten Nukleotiden hybridisiert. Dabei wurde ein 131 nt langer stromaufwärts vom Startcodon gelegener Bereich amplifiziert, in dem ein im Leseraster liegendes Stopcodon identifiziert werden konnte. Die 3'-untranslatierte Region wurde durch die genspezifischen Oligonukleotide FeRB1-SP3 und -SP4 sowie einem *Oligo-dT primer* amplifiziert.

Amplifikation von FeRB1

1. Oligonukleotid-Synthese:



2. Amplifikation aus P5 cDNA:



3. Amplifikation aus P5 cDNA:



4. 5'-/3'-RACE:

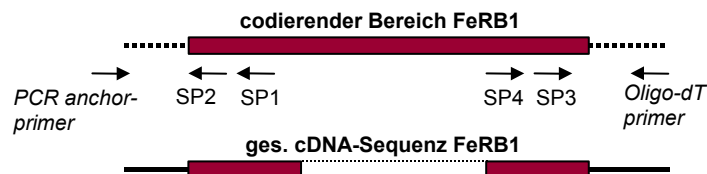


Abb. 1: Schematische Darstellung der PCR-Reaktionen zur Amplifikation von FeRB1

Mit verschiedenen maus- und rattenspezifischen Oligonukleotiden wurden Amplifikationen mit cDNA aus 5 Tage alten Ratten durchgeführt. Striche entsprechen der 3'-, bzw. 5'-UTR, gestrichelte Linien oder Boxen stellen fehlende Sequenzen dar, die in dem angegebenen Schritt nicht amplifiziert wurden. Farbige Boxen stellen codierende Bereiche der cDNA dar (blau: CRD-BP aus der Maus, rot: FeRB1). Nicht maßstabsgetreu.

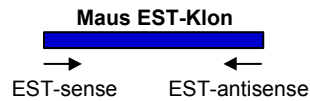
Die gesamte amplifizierte cDNA Sequenz von FeRB1 (Abbildung 3) ist zu 85% mit der des murinen CRD-BP identisch. Sie umfaßt 2044 nt, wovon 131 nt zur 5'-UTR und 179 nt zur 3'-UTR gehören. Innerhalb der 5'-UTR konnte ein im Leseraster liegendes Stopcodon (nt 97-99) stromaufwärts vom Start-ATG identifiziert werden. Dadurch wurde die Richtigkeit des angenommenen Startcodons bestätigt. Die codierende Region besteht aus 1734 nt, beginnt mit einem ATG-Startcodon (nt 132-134) und endet mit einem TGA-Stopcodon (nt 1862-1864).

Weitere PCR-Reaktionen wurden mit den Oligonukleotiden EST-sense und EST-antisense durchgeführt, die vom 5'- bzw. 3'-Ende des Maus-EST-Klones abgeleitet wurden. Es konnte ein 1000 nt umfassender Bereich amplifiziert werden (Abb. 2), der Ähnlichkeiten zur humanen KOC1-cDNA Sequenz aufwies und in diesem Teilbereich zu 77% identisch

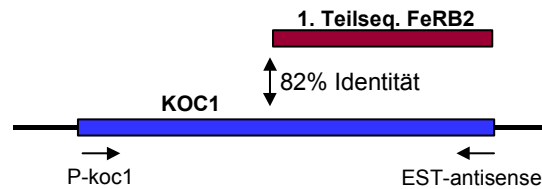
mit der amplifizierten FeRB1-Sequenz war. Es handelte sich demnach um eine zweite, im Rattengehirn vorkommende cDNA-Sequenz. Daraufhin wurden weiter stromaufwärts vom bisher amplifizierten Bereich gelegene Sequenzen mit Hilfe der Oligonukleotide P-koc1, dessen Sequenz von der humanen KOC1-cDNA abgeleitet wurde, und EST-antisense amplifiziert. Die so erhaltene rattenspezifische Sequenz umfaßte den gesamten codierenden Bereich eines zweiten RNA-Bindeproteins, das als FeRB2 bezeichnet wurde. Durch RACE-Reaktionen konnte mit den Oligonukleotiden SP1 und SP2 sowie einem *PCR anchor primer* eine 5'-UTR von 177 nt identifiziert werden. 3'-untranslatierte Bereiche sollten mit dem genspezifischen Oligonukleotid SP3 und einem *oligodT-anchor primer* amplifiziert werden. PCR-Produkte waren jedoch in keinem Fall mit dem 3'-gelegenen codierenden Bereich von FeRB2 identisch, so daß keine 3'-UTR eindeutig identifiziert werden konnte. Insgesamt umfaßt die Nukleotidsequenz von FeRB2 1908 nt, wovon 1731 nt der codierenden Region zugeordnet werden können und 171 nt der 5'-UTR. Innerhalb der 5'-UTR konnte ein im Leseraster liegendes Stopcodon stromaufwärts vom Startcodon identifiziert werden (nt 157-159, Abb. 4). Die codierende Region beginnt mit einem ATG-Startcodon (nt 172-174) und endet mit einem TGA-Stopcodon (nt 1729-1731). Eine schematische Darstellung der PCR-Reaktionen, die zur Identifizierung von FeRB2 führten, ist in Abbildung 2 dargestellt.

Amplifikation von FeRB2

1. Oligonukleotid-Synthese:



2. Amplifikation aus P5 cDNA:



3. Amplifikation aus P5 cDNA:



4. 5'-RACE:

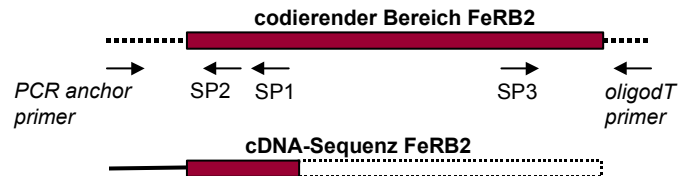


Abb. 2: Darstellung der PCR-Reaktionen zur Amplifikation von FeRB2

Ausgehend von der Sequenz des EST-Klones (GB: L35599) wurden PCR-Reaktionen mit cDNA aus 5 Tage alten Ratten durchgeführt, die zur Amplifikation von FeRB2 führten. Gestrichelte Linien und Boxen stellen in den angegebenen Schritten nicht amplifizierte Bereiche der cDNA dar. Farbige Boxen verdeutlichen kodierende Bereiche (dunkelblau: EST-Klon, blau: KOC1, rot: FeRB2), Striche stellen untranslatierte Bereiche dar. Nicht maßstabsgetreu.

3.1.2 Sequenzanalyse von FeRB1 und FeRB2

Die cDNA sowie Aminosäuresequenzen von FeRB1 und FeRB2 sind in Abbildung 3 und 4 dargestellt. Die FeRB1 weist eine 98%ige Identität zu dem in der Maus vorkommenden CRD-BP, sowie zu dem im Laufe dieser Arbeit im Menschen identifiziertem IMP-1 (*IGFII-mRNA Binding Protein 1*) auf. Neben IMP-1 konnten Nielsen *et al.* (1999) zwei weitere humane Mitglieder dieser Familie von RNA-Bindeproteinen identifizieren, IMP-2 und IMP-3. Das in der Ratte identifizierte FeRB2 weist eine 91%ige Identität zu IMP-3/KOC1 auf sowie eine 78%ige Identität zum in *Xenopus* Oozyten vorkommenden Vg1-RBP/Vera.

1 GGGTGGGGTGGGTAGAAAGTTTGC GGCTCCCGCCCGCGTATCCACGCCTATCGGCATAGGAGGATATC
 70 CGCCCCGCCCGCCCGGATCGGCATTGAATGGAACAGTGTCTTGGCCCGCCACCGCCACC ATGAACAA
 1 M N K
 139 GCTTTACATCGGCAACCTCAACGAGAGCGTGACCCCGCAGACTTGGAGAAAGTATTTGCGGAGCACAA
 4 L Y I G N L N E S V T P A D L E K V F A E H K
 208 GATCTCTACAGCGGCCAGTTCTTGGTCAAATCCGGCTACGCCTTCGTGGACTGCCCGCAGAGCACTG
 27 I S Y S G Q F L V K S G Y A F V D C P D E H W
 277 GGCGATGAAGGCCATCGAAACTTTCTCGGGGAAAGTAGAATTGCAAGGAAAACGCCTAGAGATTGAACA
 50 A M K A I E T F S G K V E L Q G K R L E I E H
 346 CTCGGTACCAAAAAACAAGGAGTCGGAAAATACAGATCCGGAATATTCACCTCAGTCCGATGGGA
 73 S V P K K Q R S R L I Q I R N I P P Q L R W E
 415 AGTGTGGATAGCCTTCTGGCCAGTACGGCACAGTGGAGAAGTGTGAGCAAGTGAACACCGAGAGTGA
 96 V L D S L L A Q Y G T V E N C E Q V N T E S E
 484 GACGGCGGTGGTCAACGTCACCTACTCTAACCGGGAGCAGACCAGGCAAGCCATCATGAAGCTAAATGG
 119 T A V V N V T Y S N R E Q T R Q A I M K L N G
 553 CCATCAACTGGAGAACCATGCCCTGAAGGTTTCCTACATACCTGATGAGCAGATAGCACAAGTCCCTGA
 142 H Q L E N H A L K V S Y I P D E Q I A Q G P E
 622 GAATGGCGCCGTGGAGCTTTGGTCTCGAGCCAGCCACGCAGGGGTACCCGGTAGCAGCAGGGCC
 165 N G R R G G F G S R G Q P T O G S P V A A G A
 691 GCCAGCAAGCAGCAGAGGTGGACATCCCTCTCCGGTCTCTGGTGCCACGCAGTATGTAGGCGCCAT
 188 P A K Q Q Q V D I P L R L L V P T Q Y V G A I
 760 CATTGGCAAGGAGGGTGCCACCATCCGAAACATCAGAAAACAGACTCAGTCCAAGATAGACGTGCACAG
 211 I G K E G A T T I R N I T K Q T Q S K I D V H R
 829 GAAGGAGAAGCGGGGGCTGCGGAGAAGGCCATCAGTGTGCACTCGACCCCTGAAGGCTCTCCTCGCG
 234 K E N A G A A E K A I S V H S T P E G C S S A
 898 CTGTAAGATGATCTTGGAGATTATGCACAAGGAGGCAAAGGACACCAAGACGGCAGACGAAGTCCCT
 257 C K M I L E I M H K E A K D T K T A D E V P L
 967 GAAGATCCTGGCTCATAATAACTTCGTGGGGCGACTCATTGGAAGGAAGGGCGGAACTTGAAGAAAGT
 280 K I L A H N N F V G R L I G K E G R N L K K V
 1036 GGAGCAGGATACAGAGACTAAGATCACCATCTCCTCGCTCAGGATCTCAGCTCTATAACCTGAAG
 303 E Q D T E T K I T I S S L O D L T L Y N P E R
 1105 GACCATAACTGTGAAGGGGGCCATTGAGAACTGCTGCAGGGCTGAGCAGGAGATCATGAAGAAAAGTTCC
 326 T I T V K G A I E N C C R A E Q E I M K K V R
 1174 AGAGGCTTACGAGAATGACGTGGCTGCCATGAGCTTGCACTCACCTCATCCCTGGTCTCAACCTGGC
 349 E A Y E N D V A A M S L Q S H L I P G L N L A
 1243 TGCTGTCCGTCTTCCAGCTTCTTAGTACCCTCCGCTCCTCCAGCAGCGTCACTGGGGCTGC
 372 A V G L F P A S S S C V P P P P S V A P
 1312 TCCCTATGGCTCCTTCATGCAGGCTCCGGAGCAGGAGATGGTACAGGTGTTTCATCCCCGCCAGGCTGT
 395 P Y G S F M Q A P E Q E M V Q V F I P A Q A V
 1381 GGGCGCCATCATCGGCAAGAAGGGCCAGCACATCAAACAGCTCTCCCGGTTGCCAGCGCCTCCATCAA
 418 G A I I G K K G Q H I K Q L S R F A S A S I K
 1450 GATTGCTCCACCAGAAACACCTGACTCCAAAGTTGCAATGGTTGTCATCACTGGACCCACAGAGGCTCA
 441 I A P P E T P D S K V R M V V I T G P P P E A Q
 1519 GTTCAAGGCTCAGGGAAGAATCTATGGCAAACATAAAGAAGAGAATTTCTTGGTCCCAAGGAGGAAGT
 464 F K A Q G R I Y G K L K E E N F F G P K E E V
 1588 AAAGCTGGAGACCCACATCCGGGTCCAGCTTCCAGCAGCTGGCCGGGTTCATTGGCAAAGGTGGCAAAC
 487 K L E T H I R V P A S A A G R V I G K G G K T
 1657 GGTGAATGAGCTGCAGAACTTGACCGTAGCCGAGGTGGTCTGTCGGAGAGACCAGACCCAGACGAGAA
 510 V N E L Q N L T V A E V V V P R D Q T P D E N
 1726 CGACCAAGTCATTGTTAAGATCATCGGACATTTCTATGCCAGCCAGATGGCCAGCGGAAGATCCAAGG
 533 D Q V I V K I I G H F Y A S Q M A Q R K I Q G
 1795 CATCCTGGCTCAAGTTAAGCAGCAGCACCAGAAGGGACAGAGCAACCAGGCCAGGCACGGAGGAAG TG
 556 I L A Q V K Q Q H Q K G Q S N Q A Q A R R K ••
 1864 ACCCCGCCCTCCTGTCCCATGGCTCCAAGATCAGCAGGAGGAACACAGAACTGGAGGGGCGGGTGG
 •
 1933 AGGGCCGGTGTGTTTTTCCAGCAGGCCTGAGAATGAGTGGGAATCAGGGCATTTGGGCCTGGCTGGAG
 2002 ATCAGGTTTGCACTGTATTGAGAACAATGTTCAGTGAGGA

Abb. 3: FeRB1-cDNA und Aminosäuresequenz

Durchnummerierte Nukleotid- und Aminosäuresequenz (fett gedruckt) von FeRB1. Start- und Stopcodon: kursiv. Zwei RRM-Domänen (helleres rot) befinden sich im aminoterminalen Bereich, RNP-Motive sind unterstrichen. Die RGG-Box ist doppelt unterstrichen. Vier KH-Domänen (dunkles rot) befinden sich im carboxyterminalen Bereich. Weiterhin befinden sich ein Kernlokalisierungssignal (gelb) und ein Kernexportsignal (grün) in der Sequenz. Der Stop in der Aminosäuresequenz ist durch drei Punkte verdeutlicht.

Beide in der Ratte identifizierte Proteine bestehen aus insgesamt 7 RNA-Bindedomänen. Im aminoterminalen Bereich finden sich 2 RRM-Domänen (*RNA recognition motif*), die jeweils aus zwei konservierten RNP-Motiven bestehen. Des Weiteren befinden sich 4 KH-Domänen (*hnRNP K-homology domains*) im carboxyterminalen Bereich des Proteins. Zwischen den RRM- und KH-Domänen liegt eine RGG-Box, die ebenfalls RNA-Interaktion vermitteln kann. Die RGG-Domänen bestehen aus einer Abfolge von Arginin-(R) und Glycinresten (G), die im Vergleich mit entsprechenden Motiven anderer Proteine häufig keine hohen Sequenzidentitäten aufweist. Die genannten RNA-Bindemotive kommen bei allen Mitgliedern der Proteinfamilie vor und besonders die RRM- und KH-Domänen sind in ihrer Sequenz stark konserviert. Eine Datenbanksuche nach weiteren Domänen in FeRB1 und FeRB2 mit Hilfe des *ProfileScan-Servers* (<http://www.isrec.isb.ch/cgi-bin/PFSCAN>) ergab, daß außer den bekannten RNA-Bindedomänen auch ein putatives Kernlokalisierungssignal (NLS, Aminosäuren 75-83), sowie ein klassisches Kernexportsignal (NES, Aminosäuren 312-320) in der Sequenz zu finden sind.


```

1 GAAGAGGAAAAAGGACCTGGGATCTGGTTTTTCGCCGCCGCTCCCGTGCTTGGGTACTGTGTGTGGG
70 TTTGAAAGGCGAGGGGAGAGGGACAAAATCCACCGGCTCCATCCTCCGCGTGGGTGCTTTTTAATTTA
139 GCATTTTTCTCGGGTTTTAAACAACCCCTCTTACA ATGAACAAATGTACATCGGGAACCTCAGC
1 M N K L Y I G N L S
208 GACCACGCCGCCCCGCGGACCTGGAAAGTGTCTTCAAGGGCGCTAAGATCCCGGTGGCCGCCCCCTC
11 D H A G P A D L E S V F K G A K I P V A G P F
277 CTGGTGAAGACGGGCTACGCGTTCTGGACTGCCCGGACGAGGGCTGGGCCCTCAAGGCCATCGAGGCG
34 L V K T G Y A F V D C P D E G W A L K A I E A
346 CTTTCAGGTAAAATGGAACCTACATGGGAAACCGATGGAAGTTGAGCACTCGGTCCCCAACGGCAGAGG
57 L S G K M E L H G K P M E V E H S V P K R Q R
415 ATTCGAAACTTCAGATACGAAATATCCACCCACTTACAATGGGAGGTGCTGGATAGTTTACTAGTC
80 I R K L Q I R N I P P H L Q W E V L D S L L V
484 CAGTATGGAGTGGTGGAGAGCTGTGAGCAAGTGAACACGGACTCGGAAACAGCAGTTGTAATGTAACC
103 Q Y G V V E S C E Q V N T D S E T A V V N V T
553 TATTCCAGTAAGGACCAAGCTAGACAAGCCTTAGACAACCTGAATGGATTCCAGTTAGAGAACTTCACC
126 Y S S K D Q A R Q A L D K L N G F Q L E N F T
622 TTGAAGTTGCCTACATCCAGATGAACTGTGCCAGCAAAGCCCTCACCTCAGTCCGAGGGGCGC
149 L K V A Y I P D E T A A Q S P S P Q L R G R
691 CGGGGCCAGGGCAGCGGGGCTCATCCAGGCAGACGTCTCCAGGATCCGTGTTCCAAGCAGAAGCCCTGT
172 R G P G O R G S S R O T S P G S V S K Q K P C
760 GACCTGCCGCTGCCCTGCTGGTGCCACCCAGTTTGTGGAGCCATTATAGGAAAAGAAGGTGCCGCC
195 D L V P T Q F V G A I I G K E G A A K E G A A
829 ATTCGCAACATCACCAAAACAGCCCACTTAAGATCGATGTCCATCGTAAGGAGAATACAGGGGCCCGG
218 I R N I T K Q T Q S K I D V H R K E A T G A A
898 GAGAAGTCCATTACTATCCTCTCTACCCTGAAGGCCTTCTGCAGCTTGTAAGTCTATCTGGAGATT
241 E K S I T I L S T P E G T S A A C K S I L E I
967 ATGCATAAGGAAGCGCAAGATATAAAATTCACAGAGGAGATCCCCTTGAAGATTTTAGCTCACAATAAC
264 M H K E A Q D I K F T E E I P L K I L A H N N
1036 TTTGTAGGCCGTCTCATTTGGTAAAGAAGGAAGGAACCTTAAAAAATTGAGCAAGACACGGACACTAAA
287 F V G R L I G K E G R N L K K I E Q D T D T K
1105 ATCAGATATCTCCATTGCAAGAAGTACGTTGTACAATCCGGAGCGTACCATTACAGTTAAAGGCCAAT
310 I T I S P L O E L T L Y N P E R T I T V K G N
1174 GTTGAGACGTGTGCCAAGGCTGAGGAGGAAATAATGAAGAAGATCAGGGAGTCTATGAAAATGACATT
333 V E T C A K A E E E I M K K I R E S Y E N D I
1243 GCTTCCATGAATCTTCAAGCACATTTAATCCCTGGATTAATCTGAATGCCTTGGGTCTGTTCCACCC
356 A S M N L Q A H L I P G L N L N A L G L F P P
1312 ACTTCAGGGATGCCACCTCCCACCTCAGGGCCCCCTCAGCCATGACTCCTCCCTACCTCAATTTGAG
379 T S G M P P P T S G P P S A M T P P Y P Q F E
1381 CAATCAGAGACGGAGACCGTGCACCTGTTTCATCCCCGCCCTGTCCGGTCCGTGCCATCATTGGCAAGCAG
402 Q S E T E T V H L F I P A L S V G A I I G K Q
1450 GGTCAACACATCAACAGCTTTCTCGTTTTGCAGGAGCTTCGATTAAGATCGCGCCAGCCGAAAGCACCA
425 G Q H I K Q L S R F A G A S I K I A P A E A P
1519 GATGCTAAAAGTGGATGGTGTATCCTACTGGACCACCAGAGGCTCAGTTCAAGGCTCAGGGAGAATT
448 D A K V R M V I I T G G P P E A Q F K A Q G R I
1588 TATGGAAAAATTAAGAAGAAAACCTTTGTGAGTCCTAAGGAAGAGGTGAAACTGAAAGCTCAGATCAGA
471 Y G K I K E E N F V S P K E E V K L E A H I R
1657 GTCCGTCCTTTGCTGCTGGCAGAGTCATTGGGAAAGGAGGCAAAACGGTGAATGAACTCCAGAATTTA
494 V P S F A A G R V I G K G G K T V N E L Q N L
1726 TCAAGTGTGAGGTTGTGTCCCCCGTGACCAGACACCTGATGAGAATGATCAAGTCCCGTTGTCAAAAT
517 S S A E V V V P R D Q T P D E N D Q I V Q I I
1795 GGCCATTTCTACTCACAATGGCCAGAGAAAGATCAGAGAGATTTTATCACAAGTAAAGAAGCAA
540 G H F Y S S Q M A Q R K I R E I L S Q V K K Q
1864 CATCAAAAGGGCCAAAACAACCTAGCCCAAGCCCGCCGCAAG TGA
563 H Q K G Q N N L A Q A R R K ***

```

Abb. 4: FeRB2-cDNA- und Aminosäuresequenz

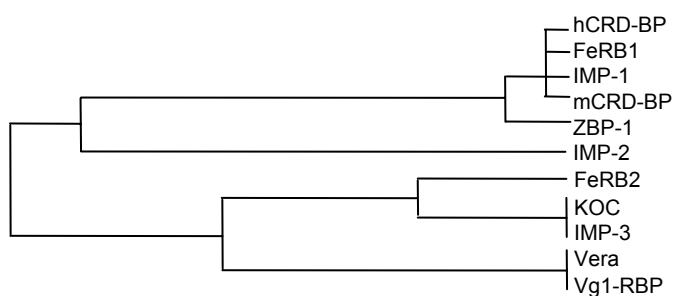
Nukleotid- und Aminosäuresequenz (fett gedruckt) von FeRB2. Start- und Stopcodon: kursiv. Zwei RRM-Domänen (helles rot) liegen im aminoterminalen Bereich des Proteins, die RNP-Motive darin sind unterstrichen. Die RGG-Box ist doppelt unterstrichen. Vier KH-Domänen (dunkles rot) befinden sich im carboxyterminalen Bereich. Kernlokalisierungssignal (NLS, gelb) sowie Kernexportsignal (NES, grün) befinden sich ebenfalls in der Sequenz. Der Stop in der Aminosäuresequenz ist durch Punkte hervorgehoben.

In Abbildung 5 sind alle Mitglieder der ZBP-1-Familie von RNA-Bindeproteinen zusammengestellt. Wie der phylogenetische Stammbaum zeigt, können die Proteine in drei Gruppen eingeteilt werden. FeRB1 kann in eine Gruppe mit CRD-BP, IMP-1 und ZBP-1 eingeordnet werden, FeRB2 in eine Gruppe mit KOC1/IMP-3 und Vg1-RBP/Vera. Das an die IGFII-mRNA bindende IMP-2 bildet eine eigene Gruppe. Abbildung 5C verdeutlicht die hohen Identitäten der Proteine zueinander sowie zu FeRB1 bzw. FeRB2. Diese liegen im Bereich von 68 bis 98%. Dabei weisen die RNA-Bindedomänen die größte Ähnlichkeit zueinander auf.

A Mitglieder der ZBP-1-Familie von RNA-Bindeproteinen

Spezies	Bezeichnung	Referenz
Huhn	ZBP-1 (<i>Zipcode Binding Protein</i>)	Ross <i>et al.</i> , 1997
Maus	CRD-BP (<i>Coding Region Determinant Binding Protein</i>)	Doyle <i>et al.</i> , 1998
Mensch	IMP (<i>IGF II-mRNA Binding Protein</i>) IMP-1/CDR-BP; IMP-2; IMP-3/KOC1)	Nielsen <i>et al.</i> , 1999
<i>Xenopus</i>	Vg1-RBP/Vera (<i>Vg1-mRNA Binding Protein</i>)	Schwartz <i>et al.</i> , 1992 Deshler <i>et al.</i> , 1997
Ratte	FeRB1, FeRB2	diese Arbeit

B



C

	FeRB1
mCRD-BP	98%
hCRD-BP	98%
ZBP-1	94%
IMP1	98%
FeRB2	78%

	FeRB2
IMP3/KOC	91%
Vg1-RBP/Vera	80%
FeRB1	78%

Abb. 5: ZBP-1 Proteinfamilie

Dargestellt sind alle bisher bekannten Mitglieder dieser Proteinfamilie von RNA-Bindeproteinen (A). In B ist die phylogenetische Verwandtschaft der Proteine untereinander in einem Dendrogramm dargestellt. C zeigt die Identitäten der Mitglieder jeweils zu FeRB1 bzw. FeRB2.

3.2 Charakterisierung der neu identifizierten RNA-Bindeproteine der Ratte

3.2.1 Northern Blot-Analyse

Um zu untersuchen, in welchen Entwicklungsstadien der Ratte die FeRB1- und FeRB2-Gene exprimiert werden, wurde Poly (A)⁺-RNA aus Rattenembryonen unterschiedlicher Entwicklungsstufen sowie aus dem Gehirn adulter Ratten elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran übertragen. Die Hybridisierung erfolgte mit radioaktiv markierter FeRB1- bzw. FeRB2-cDNA. Zur Kontrolle wurde eine Aktin-Sonde verwendet.

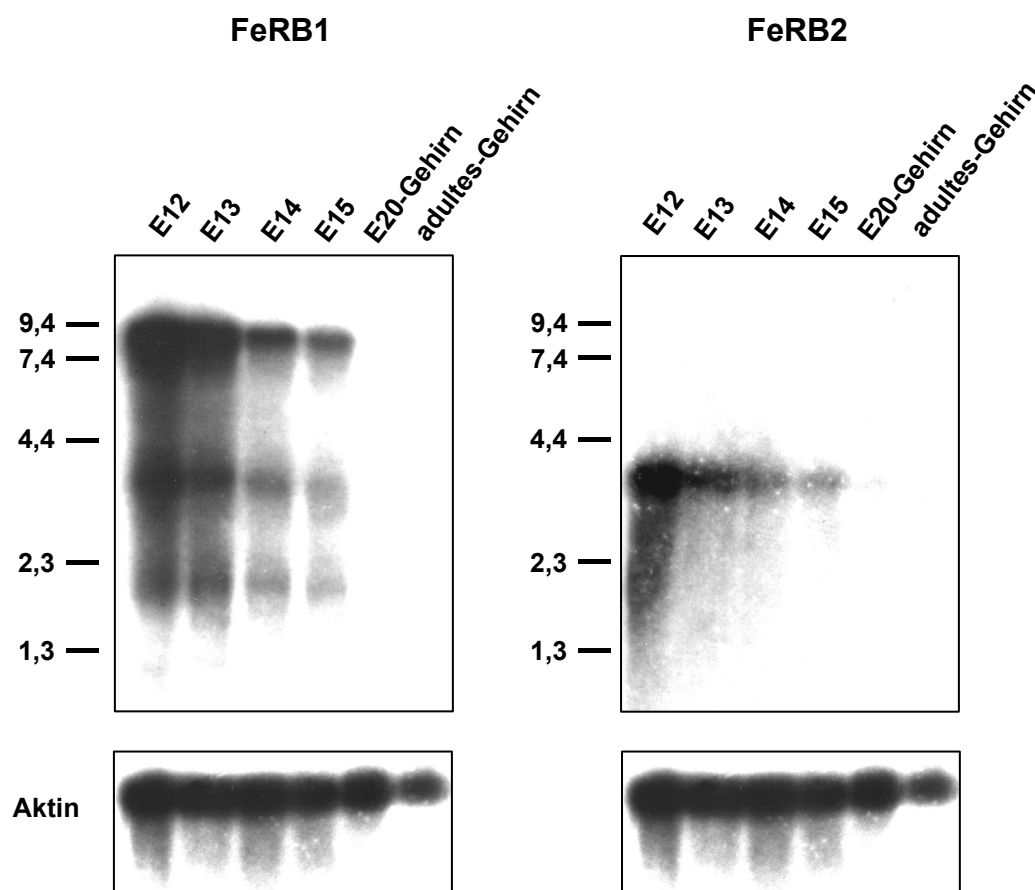


Abb. 6: Expression der FeRB1- und FeRB2-Gene zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung.

Northern Blot mit Poly (A)⁺-RNA aus Rattenembryonen sowie embryonalem und adultem Rattengehirn. Hybridisiert wurde mit radioaktiver FeRB1-, FeRB2- sowie zur Kontrolle mit Aktin-DNA. Größenstandards sind am linken Rand angegeben. E12-E20: Embryonaler Tag 12-20.

Die Hybridisierung mit der FeRB1-Sonde führte zu drei deutlichen Signalen auf Höhe von ca. 9,0 kb, 4,3 kb sowie 2,4 kb. Die FeRB2-mRNA kommt dagegen in nur einer Form von ca. 4,2 kb vor. Wie in Abbildung 6 zu erkennen ist, erfolgt die Expression beider Gene ausschließlich zu frühen Zeitpunkten der Entwicklung. Die stärkste Expression in den untersuchten Stadien konnte zum Zeitpunkt E12 der Embryonalentwicklung detektiert werden, während bei fortschreitender Entwicklung die mRNA-Konzentration stark abnimmt. In adultem Gehirn konnte weder FeRB1- noch FeRB2-mRNA detektiert werden. Die Kontrolle mit Aktin zeigte eine gleichmäßige Verteilung der β -Aktin-mRNA in allen Embryonalstadien. Das Signal in adultem Rattengehirn war etwas schwächer, was darauf hindeutete, daß hier geringere Mengen an RNA geladen wurden. Aufgrund der hier beschriebenen präferentiellen embryonalen Expression beider Gene wurden die entsprechenden Proteine FeRB (*fetal (rat) RNA binding protein*) genannt.

3.2.2 Untersuchung zur RNA-Bindungsfähigkeit von FeRB1

Hinweise auf die Funktion neu identifizierter Proteine ergeben sich häufig aufgrund von Sequenzähnlichkeiten zu anderen, bereits bekannten Proteinen. Für einzelne Mitglieder der ZBP-1-Proteinfamilie sind bestimmte mRNA-Interaktionspartner beschrieben worden. ZBP-1 aus dem Huhn bindet das *cis*-agierende Element in der β -Aktin-mRNA, den sogenannten *zipcode* (Ross *et al.*, 1997). Für Vg1-RBP/Vera konnte eine Interaktion mit dem VLE (*Vg1 localization element*) in der Vg1-mRNA in *Xenopus laevis* Oocyten nachgewiesen werden (Havin *et al.*, 1998, Deshler *et al.*, 1998). Unterschiedliche Sequenzelemente in der IGFII-mRNA werden von den RNA-Bindeproteinen IMP-1-3 gebunden (Nielsen *et al.*, 1999) und in der c-myc mRNA befindet sich ein sogenanntes *coding region determinant instability element* (CRD), an das das CRD-BP der Maus bindet und so die Stabilität des Transkriptes erhöht (Leeds *et al.*, 1997, Doyle *et al.*, 1998). Da FeRB1 eine hohe Sequenzidentität zu diesen Proteinen aufweist, sollte in den nachfolgenden Experimenten untersucht werden, ob eine Bindung mit den genannten Transkripten nachgewiesen werden kann. Dazu wurden UV-Quervernetzungs-Analysen durchgeführt, wobei die *cis*-agierenden Elemente aus den verschiedenen Transkripten radioaktiv markiert und mit rekombinantem FeRB1 inkubiert wurden. Für die Durchführung des RNA-Bindungstests wurde zunächst FeRB1 rekombinant in CHO-K1-

Zellen exprimiert. Dazu wurde die codierende Region mit dem Stopcodon in die Vektoren pECFP-N1 und pEGFP-C1 kloniert. In CHO-K1-Zellen konnte mit diesen Vektoren sowohl ein EGFP-FerB1-Fusionsprotein als auch unmarkiertes FerB1 rekombinant hergestellt werden. In Abbildung 7A wurden Proteinextrakte transfizierter Zellen auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und ein Western Blot mit nachfolgender Antikörper-Detektion durchgeführt. Das FerB1-Antiserum (siehe 3.2.5) detektierte das rekombinante FerB1 auf einer Höhe von ca. 70 kDa, sowie das EGFP-FerB1 auf einer Höhe von 98 kDa. Im Proteinextrakt von untransfizierten CHO-K1-Zellen wurde kein Protein detektiert. Für die Herstellung der radioaktiv markierten RNA wurden zunächst die gewünschten cDNA-Bereiche durch PCR amplifiziert und in den Transkriptionsvektor pGEM-T kloniert. Verwendet wurde das Sequenzelement *CRD* aus der Ratten-c-myc-cDNA (nt 6231-6481, GB:Y00396), der *zipcode* der Aktin-cDNA aus der Ratte (nt 2990-3558, GB: V01217), sowie das *cis*-agierende Element aus der IGF II-cDNA (C-Fragment, Nielsen *et al.*, 1999). Außerdem wurde das MAP2-DTE (dendritisches Transporteelement, Blichenberg *et al.*, 1999) sowie das Lokalisierungssignal aus der Vg1-cDNA (Schwartz *et al.*, 1992) verwendet. Die DNA wurde transkribiert und mit radioaktivem ^{32}P -UTP markiert. Diese 5 Sonden wurden jeweils mit unterschiedlichen Proteinextrakten inkubiert. Eingesetzt wurden Extrakte aus CHO-K1-Zellen, die rekombinant FerB1 sowie EGFP-FerB1 exprimierten sowie Proteinextrakt untransfizierter Zellen. Durch eine Bestrahlung mit UV-Licht (245 nm; 1 Joule/cm²) wurden assoziierte RNA und Protein kovalent verknüpft. RNA, die nicht durch eine Interaktion mit Proteinen geschützt war, wurde anschließend durch einen RNase-Verdau entfernt. Nach einer Auftrennung in einem Polyacrylamidgel und anschließendem Autoradiogramm konnten markierte Proteine detektiert werden. Abbildung 7B zeigt die Resultate der Analyse. Bei einer Inkubation von untransfizierten Zellen mit der Kontroll-DTE-RNA (Spur 1) wurde eine Bande auf Höhe von 95 kDa sichtbar, was dem endogenen KSRP (*K-homology splicing regulatory protein*) entsprach, für das bereits eine Interaktion mit der MAP2-mRNA nachgewiesen wurde (Rehbein *et al.*, 2000). Diese Inkubation diente der Kontrolle und wurde in einem hierfür optimierten Puffer (Rehbein *et al.*, 2000) durchgeführt. Die anderen Reaktionen wurden unter anderen Pufferbedingungen wie in Nielsen *et al.* (1999) beschrieben durchgeführt (siehe 2.5.8).

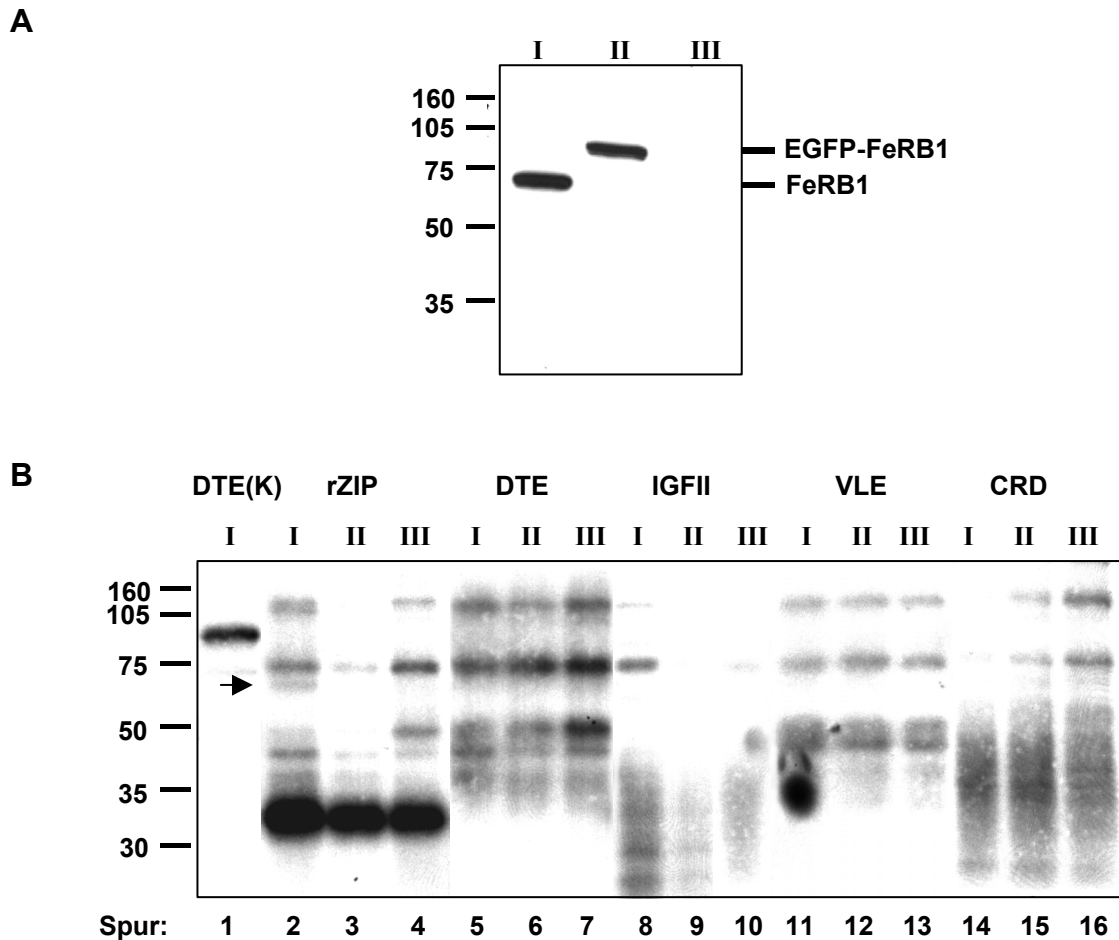


Abb. 7: UV-Quervernetzungsanalysen zur RNA-Bindfähigkeit von FeRB1

A zeigt einen Western Blot mit Proteinextrakten aus CHO-K1-Zellen mit rekombinantem FeRB1 (I), EGFP-FeRB1 (II) sowie von untransfizierten Zellen (III). Die Proteine wurden mit anti-FeRB1-Antiserum in einer 1:2000-Verdünnung detektiert. **B** zeigt das Autoradiogramm der UV-Quervernetzungs-Analyse. Numerierung der Proteinextrakte wie in **A**. Als Sonden wurden das DTE (Spur 1: Kontrolle, Spuren 5-7), die Rattensequenz des *zipcodes* (Spuren 2-4), das C-Fragment der IGFII-mRNA (Spuren 8-10), das VLE (Spuren 11-13) sowie das CRD (Spuren 14-16) verwendet. Beschreibung der Sonden siehe Text. Protein-Molekulargewichtsstandards sind am linken Rand angegeben.

In Spur 2, in der mit der *zipcode*-RNA inkubierter FeRB1-Proteinextrakt aufgetrennt wurde, konnte eine Bande auf einer Höhe von etwa 70 kDa detektiert werden (mit einem Pfeil markiert). Im untransfizierten Zellextrakt, der in Spur 4 getestet wurde, zeigte sich diese Bande nicht. In Spur 3 dagegen wird deutlich, daß das EGFP-FeRB1-Fusionsprotein nicht mit der *zipcode*-Sonde interagiert. Dies deutet darauf hin, daß die zusätzliche Sequenz die Bindungseigenschaften des RNA-Bindeproteins beeinflussen kann. Im Vergleich mit der Stärke der Signale der DTE-Kontrolle (Spur 1) war die putative

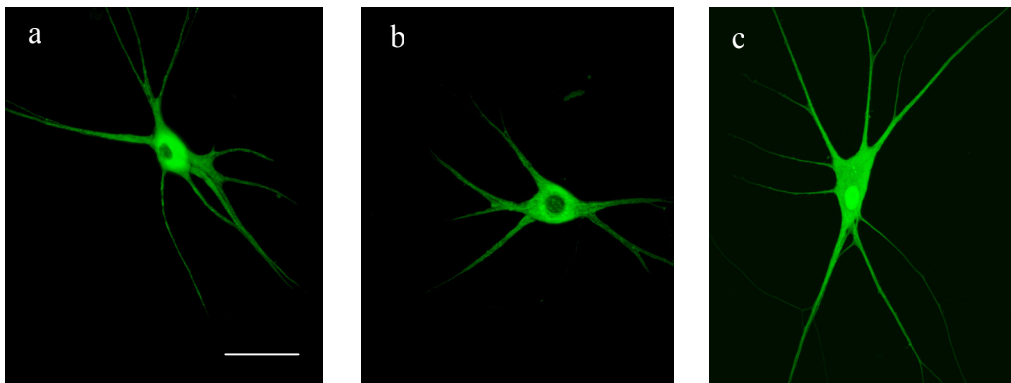
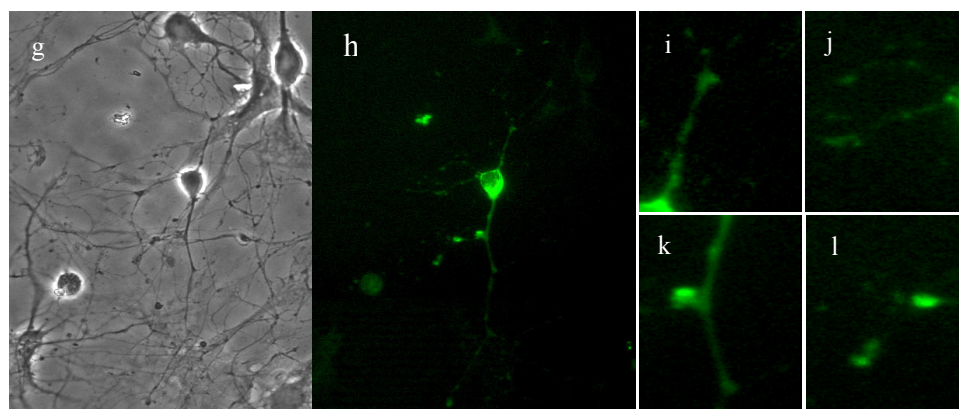
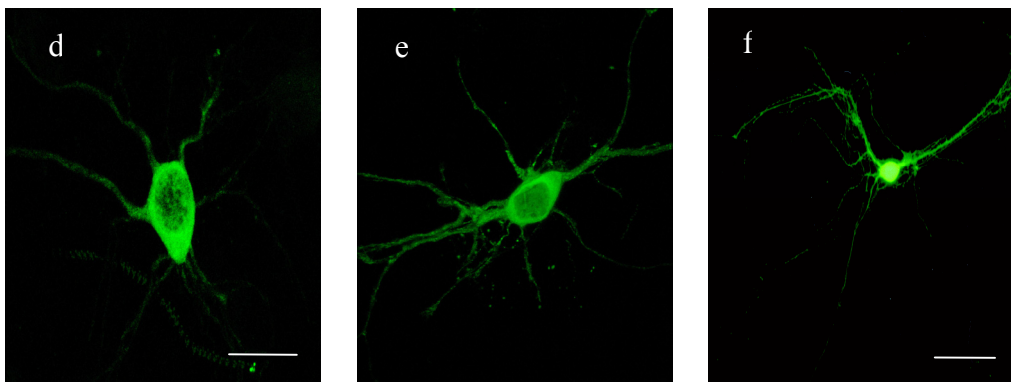
Interaktion von FeRB1 mit dem *zipcode* nur sehr schwach. Andere Transkripte interagierten unter den getesteten Bedingungen nicht mit FeRB1 (Spuren 5-16).

Weiterhin wurde deutlich, daß zahlreiche unbekannte Proteine aus dem CHO-K1-Extrakt unter den getesteten Bedingungen an unterschiedliche Transkripte binden konnten. Bei einer Inkubation mit dem DTE (Spur 1-3), dem *zipcode* (Spur 4-6), dem VLE (Spur 10-12) sowie dem CRD (Spur 14-16) wurden Proteinbanden auf Höhe von 105 kDa, 75 kDa sowie 53 kDa detektiert. Diese Interaktionen scheinen sequenzunabhängig zu sein, da sie bei der Inkubation mit verschiedenen radioaktiv markierten Transkripten auftraten.

Von den getesteten putativen RNA-Interaktionspartnern bindet FeRB1 unter den genannten Bedingungen nur an den *zipcode* der Ratten- β -Aktin-mRNA.

3.2.3 Untersuchung zur subzellulären Verteilung von FeRB1 und FeRB2

Während der Sequenzanalyse von FeRB1 und FeRB2 wurde deutlich, daß beide Proteine sowohl über ein Kernlokalisierungssignal als auch über ein Kernexportsignal verfügen. Dies könnte darauf hindeuten, daß die Proteine zwischen dem Nukleus und dem Zytoplasma hin und her transportiert werden. Um dies zu untersuchen wurde zunächst die subzelluläre Verteilung von EGFP-FeRB1- und EGFP-FeRB2-Fusionsproteinen untersucht. In Primärkulturen von Hippocampusneuronen und Neuronen der oberen Cervicalganglien der Ratte wurde eine somatodendritische Verteilung der Fusionsproteine deutlich (siehe Abb. 8). Bei einer stärkeren Vergrößerung der Hippocampusneurone erkennt man ein granuläres Verteilungsmuster in den Dendriten (Abb. 8 h-l). In der Säuger-Zelllinie CHO-K1 führte die Expression beider Fusionsproteine zu einer überwiegend zytoplasmatischen Lokalisierung. Zusätzlich zu den Expressionsvektoren, die Fusionsproteine kodierten, wurde das Kontrollplasmid pEGFP-C1 verwendet. EGFP ohne Fusion ist sowohl im Kern als auch im Zytoplasma gleichmäßig verteilt (Abb. 8 c). FeRB1 und FeRB2 sind demnach vorwiegend zytoplasmatisch verteilt und konnten nicht im Zellkern detektiert werden.

A SCG-Neurone:**B HC-Neurone:**

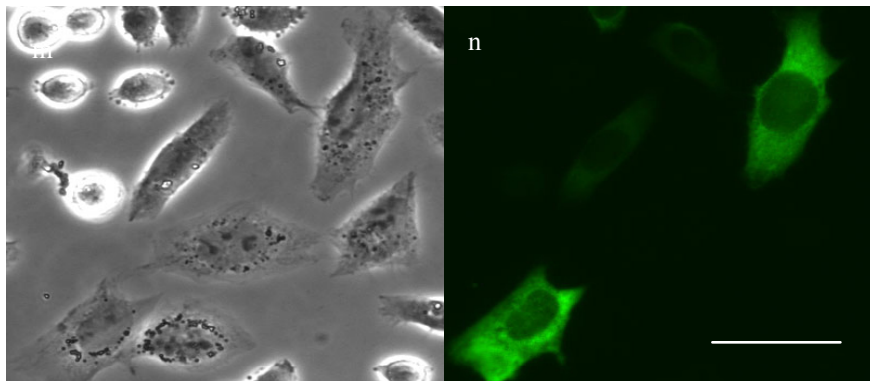
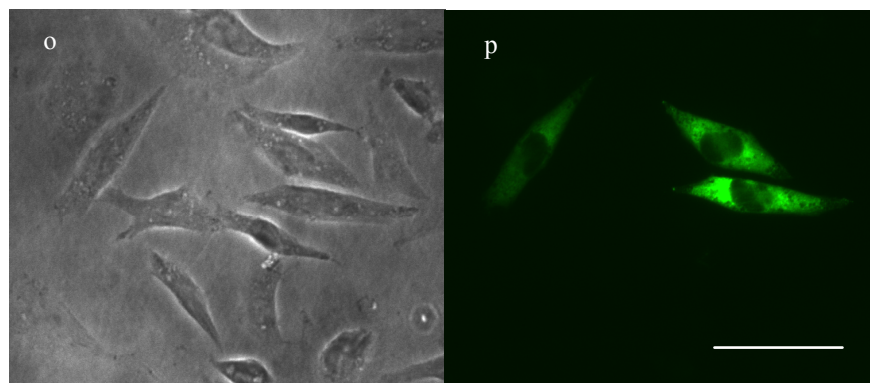
C CHO-K1-Zellen:**EGFP-FeRB1****EGFP-FeRB2**

Abb. 8: Verteilung von rekombinantem FeRB1 und FeRB2 in SCG-Neuronen und hippocampalen Neuronen (HC-Neurone) der Ratte sowie in CHO-K1-Zellen.

A: Injizierte SCG-Neurone. **a:** EGFP-FeRB1, **b:** EGFP-FeRB2, **c:** EGFP **B:** Transfizierte Hippocampusneurone. **d:** EGFP-FeRB1, **e:** EGFP-FeRB2, **f:** EGFP, **g:** Phasenkontrastaufnahme zu **h**, **h:** mit EGFP-FeRB1 transfiziertes HC-Neuron, **i-l:** Vergrößerte Bereiche aus **h**, **C:** CHO-K1-Zellen. **m:** Phasenkontrastaufnahme zu **n**, **n:** EGFP-FeRB1, **o:** Phasenkontrastaufnahme zu **p:** EGFP-FeRB2. Die Aufnahmen wurden in einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Dargestellt sind überlagerte Bilder. Größenbalken entsprechen bei a-c und i-l 20 µm, sonst 50 µm.

3.2.4 Export der RNA-Bindeproteine aus dem Zellkern

Aufgrund der überwiegend zytoplasmatischen Verteilung von FeRB1 und FeRB2 wurde die Funktion des Kernexportsignals (NES) in FeRB1 und FeRB2 näher untersucht. Die Sequenz zeigt Ähnlichkeiten zum NES des Rev-Proteins aus dem HI-Virus. Von diesem ist bekannt, daß es den Export der Proteine aus dem Nukleus über den CRM1-Rezeptor, der auch als Exportin1 bezeichnet wird, vermittelt (Pollard *et al.*, 1998). Eine Möglichkeit diesen Weg zu inhibieren, bietet die Substanz Leptomycin B (LMB), die kovalent an Cystein-Reste in der Kernregion des CRM1-Rezeptors bindet und so den Export von Proteinen verhindert (Kudo *et al.*, 1999). Wenn FeRB1 im Zellkern vorhanden ist und über den CRM1-vermittelten Exportweg ins Zytoplasma transportiert werden kann, sollte LMB eine Akkumulierung von FeRB1 bzw. FeRB2 im Nukleus bewirken. Abbildung 9 zeigt den Effekt von LMB auf transfizierte CHO-K1-Zellen, die die Fusionsproteine EGFP-FeRB1 sowie EGFP-FeRB2 exprimierten. Nach einer vierstündigen Inkubation mit LMB akkumulierten 30% der mit pEGFP-FeRB1 transfizierten Zellen das Fusionsprotein im Zellkern. Bei den restlichen 70% war keine eindeutige Kernlokalisierung zu verzeichnen. Bei Zellen, die das Fusionsprotein EGFP-FeRB2 exprimierten, hatte die Inkubation mit LMB einen weniger deutlichen Effekt. Auszählungen ergaben, daß der Export von EGFP-FeRB2 nur bei etwa 15% der transfizierten Zellen durch LMB verhindert wurde.

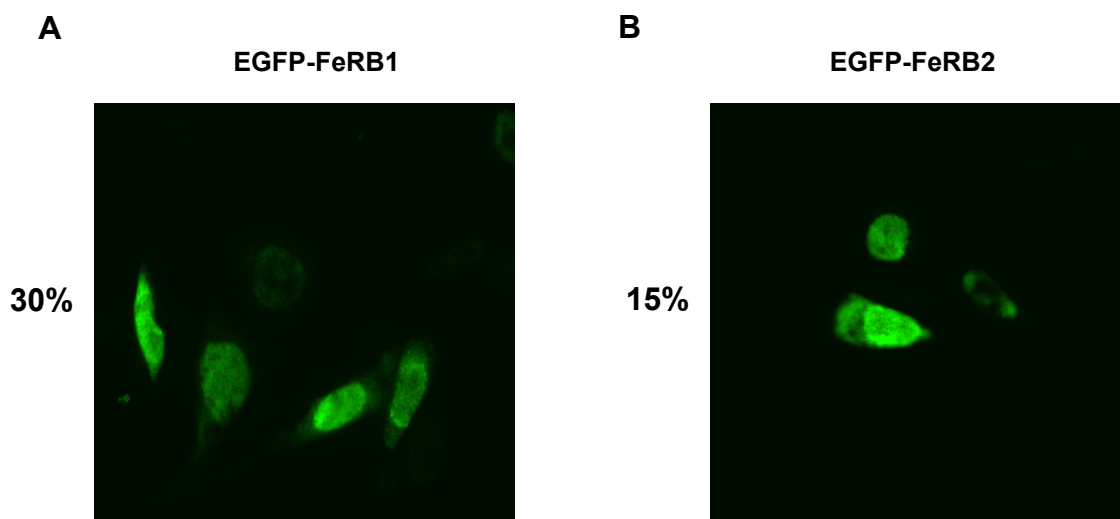


Abb. 9: Effekt von LMB auf EGFP-FeRB1 / -FeRB2 exprimierende CHO-K1-Zellen.

Dargestellt sind CHO-K1-Zellen, die mit dem Expressionsvektor pEGFP-FeRB1 (A) sowie mit pEGFP-FeRB2 (B) transfiziert wurden. Vier Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 20 ng LMB behandelt und nach weiteren 4 Stunden fixiert. Aufgenommen wurden die Zellen in einem Fluoreszenzmikroskop.

Die Bedeutung des putativen NES wurde zudem durch Mutagenese analysiert, indem drei Leucine innerhalb dieser Region gegen Alanine ausgetauscht wurden. CHO-K1-Zellen wurden mit EGFP-FeRB1 bzw. -FeRB2 Vektoren transfiziert, die zur Synthese mutierter Fusionsproteine führten. Abbildung 10 stellt den Vergleich der NES-Sequenzen der beiden RNA-Bindeproteine mit dem des HIV Rev-Proteins dar und verdeutlicht die Positionen der Mutationen in FeRB1 und FeRB2.

Nukleäres Exportsignal

Rev:	L	Q	L	P	P	L	E	R	L	T	L	D
FeRB1:	I	T	I	S	S	L	Q	D	L	T	L	T
FeRB2:	T	I	S	P	L	Q	E	L	T	L	T	
Austausch FeRB1/FeRB2:												
						A	A	A				

Abb. 10: NES-Sequenzen von FeRB1 und FeRB2

Vergleich der NES-Sequenzen von FeRB1 und -2 mit dem des Rev-Proteins. In der Sequenz sind die konservierten Leucine rot markiert. Die letzten drei Leucine in FeRB1 und FeRB2 wurden durch Alanine ausgetauscht.

Die Fluoreszenzaufnahmen transfizierter CHO-K1-Zellen in Abbildung 11 zeigen eine Akkumulierung beider mutierter Fusionsproteine im Nukleus. Auszählungen ergaben eine nukleäre Lokalisierung von EGFP-FeRB1-Mut in 50% aller transfizierter Zellen, während das mutierte EGFP-FeRB2 nur bei 30% der Zellen im Kern verblieb. Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, daß innerhalb von 4 Stunden nur bei einem Teil der Zellen die Fusionsproteine im Nukleus akkumuliert werden. Das könnte daran liegen, daß ein Transport der FeRBs zwischen dem Kern und dem Zytoplasma nur unter bestimmten physiologischen Bedingungen vollzogen wird.

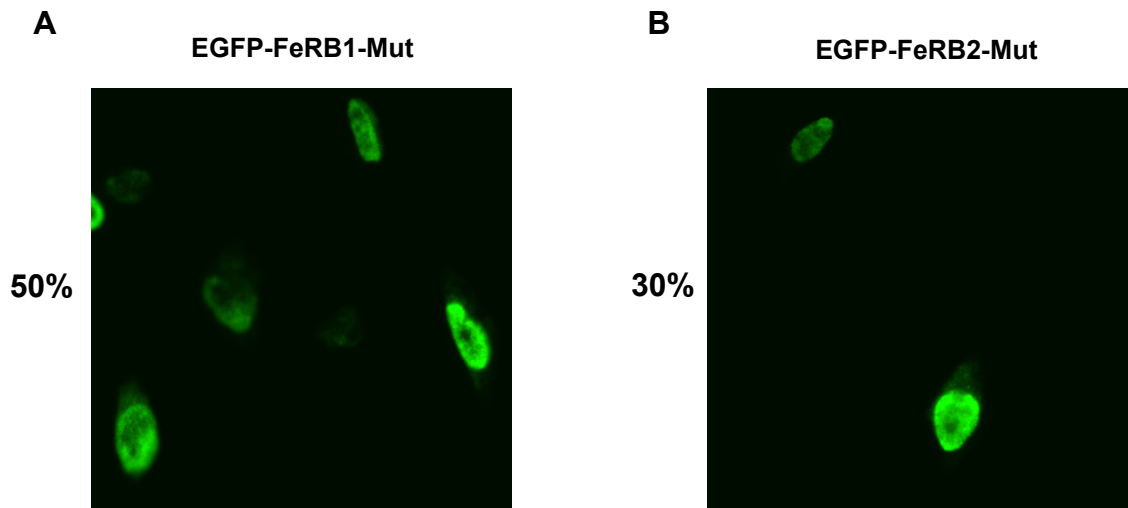


Abb. 11: Effekt der Mutation des NES von FeRB1 und FeRB2 auf die subzelluläre Verteilung der EGFP-Fusionsproteine in CHO-K1-Zellen.

Lokalisierung des mutierten Fusionsproteins EGFP-FeRB1-Mut (links) und EGFP-FeRB2-Mut (rechts) in CHO-K1-Zellen. 12 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und die Lokalisierung der Fusionsproteine in einem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen.

3.2.5 Reinigung von GST-Fusionsproteinen zur Antikörper-Produktion gegen FeRB1 und FeRB2

Zur weiteren Analyse der RNA-Bindeproteine FeRB1 und FeRB2 war es notwendig Antikörper herstellen zu lassen. Dazu wurden GST-Fusionsproteine von beiden Proteinen exprimiert und aufgereinigt. Sequenzen aus der codierenden Region, die beide RRM-Domänen enthielten, wurden aufgrund der geringsten relativen Identität zwischen beiden Proteinen ausgewählt. Diese wurden über BamHI und EcoRI-Schnittstellen an den flankierenden Enden in den prokaryotischen Expressionsvektor pGEX-2T kloniert. Mit dem fertigen Plasmid wurden kompetente *E. coli*-XL1blue-Zellen transformiert. Durch eine Induktion mit IPTG kam es zu einer Expression der GST-Fusionsproteine, die anschließend über eine Gluthation-Säule isoliert und gereinigt werden konnten. GST-FeRB1 und GST-FeRB2 hatten eine Größe von ca. 50 kDa und wurden zur Antikörperproduktion durch die Firma Pineda in Berlin in einer Konzentration von 1 mg/ml eingesetzt. In Abbildung 12A wird deutlich, daß das anti-FeRB1-Antiserum das endogene Protein in den Embryonalextrakten der Ratte in den Entwicklungsstadien E12 und E14 auf Höhe von etwa 70 kDa detektierte (Spur 2+3). Das errechnete

Molekulargewicht von FeRB1 liegt bei 74 kDa. In CHO-K1-Zellen wird rekombinant synthetisiertes FeRB1 deutlich erkannt (Spur 1). Zusätzlich wurden die GST-Fusionsproteine (Spur 4+5) getestet, wobei deutlich wurde, daß das FeRB1-Antiserum ebenso den GST-Anteil detektierte, da beide Proteine in gleicher Intensität detektiert werden konnten. In Abbildung 12B wurden weitere Stadien der Embryonalentwicklung auf Expression des FeRB1-Proteins getestet. Das anti-FeRB1-Antiserum detektierte Proteine auf Höhe von 70 kDa zu den Zeitpunkten E12, E15, E20 (Spuren 6-8). Im adulten Gehirnextrakt wurde kein Protein erkannt (Spur 9). Zusammenfassend wird deutlich, daß das hergestellte FeRB1-Antiserum mit hoher Spezifität endogenes Protein erkennt und somit für weitere Untersuchungen eingesetzt werden konnte.

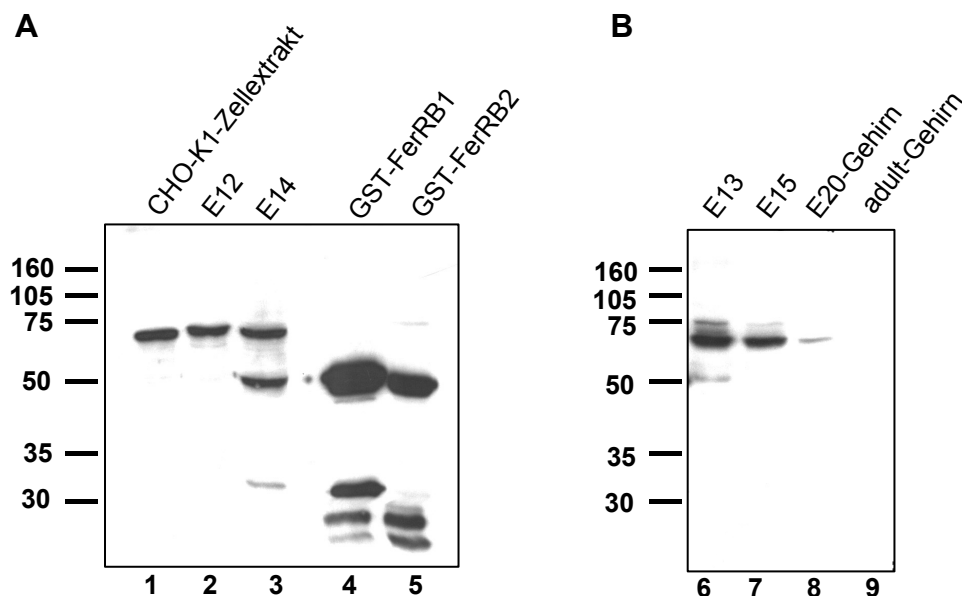


Abb. 12: Test des FeRB1- Antiserums

Beide Blots wurden mit anti-FeRB1-Antiserum in einer Verdünnung von 1:1000 behandelt. **A:** 1: Extrakt aus CHO-K1-Zellen, die mit FeRB1 transfiziert wurden, 2 + 3: Extrakt aus E12 bzw. E14 Rattenembryonen, 4: GST-FeRB1-Fusionsprotein, 5: GST-FeRB2-Fusionsprotein. **B:** 1 + 2: Extrakt aus E13 bzw. E15 Rattenembryonen, 3: Gehirnextrakt aus E20-Rattenembryonen, 4: Gehirnextrakt aus adulten Ratten.

In Abbildung 13 ist ein Western Blot dargestellt, der mit anti-FeRB2-Antiserum behandelt wurde. In den Embryonalextrakten E12 und E14 wurden Proteinbanden auf Höhe von etwa 70 kDa (Spuren 5+6) durch das anti-FeRB2-Antiserum detektiert. Das errechnete Molekulargewicht von FeRB2 liegt bei 73 kDa. Im Gehirnextrakt 20 Tage alter

Embryonen (Spur 7) sowie aus adulten Ratten (Spur 8) konnten nur sehr schwache Banden detektiert werden. In den Spuren 2 und 3 wird deutlich, daß das getestete Antiserum mit gleicher Intensität sowohl FeRB1 wie auch FeRB2 detektieren kann. Aufgetragen wurden CHO-K1-Zellextrakte, die jeweils eines der beiden EGFP-Fusionsproteine exprimierten. Das FeRB2-Antiserum detektiert demnach mit gleicher Spezifität beide RNA-Bindeproteine der Ratte. Zusammenfassend können durch die erhaltenen Antiseren spezifische Proteinbanden ohne Kreuzreaktivität mit anderen Protein detektiert werden, die es jedoch nicht ermöglichen zwischen den beiden Ratten-RNA-Bindeproteinen zu unterscheiden.

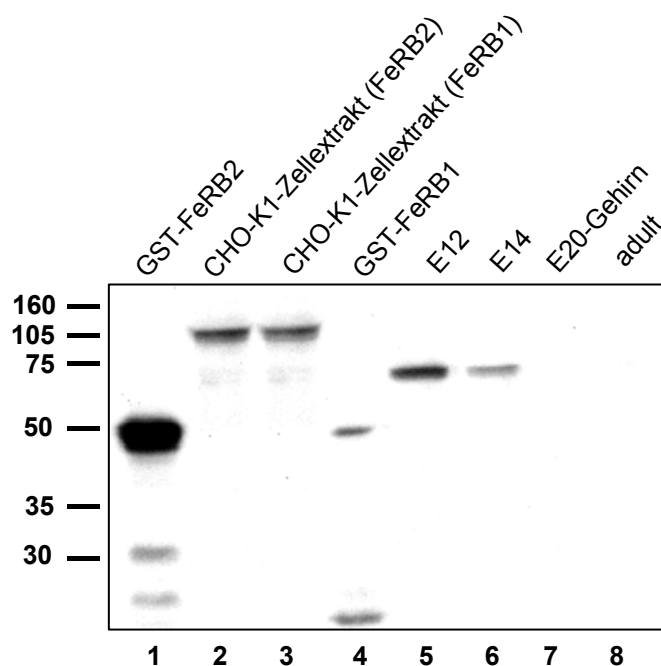


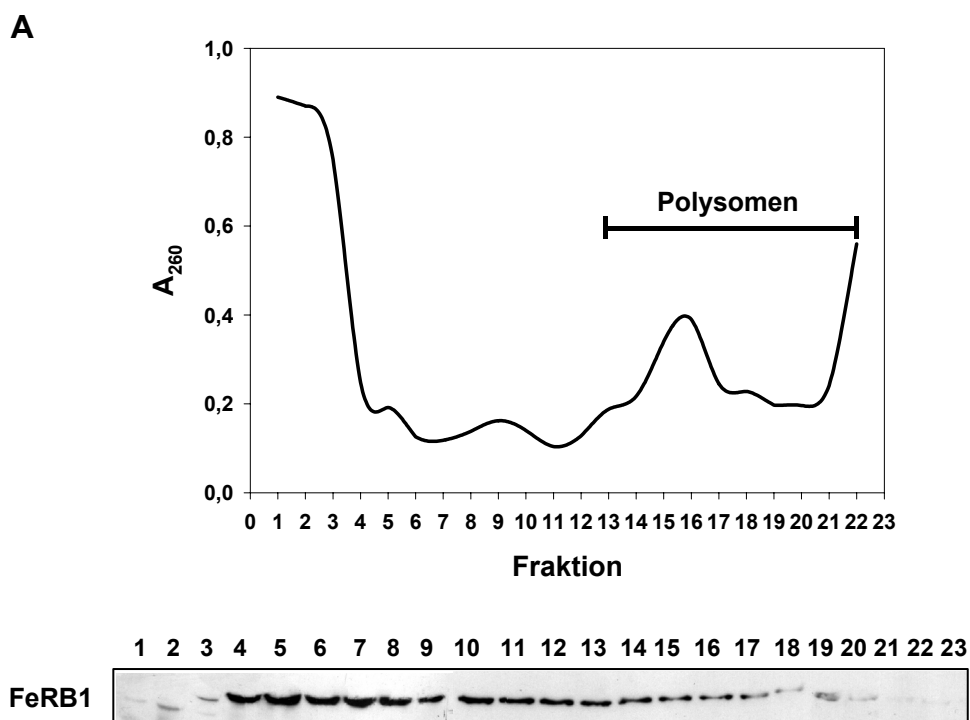
Abb. 13: Test des FeRB2-Antiserums

Der Western Blot wurde mit anti-FeRB2-Antiserum in einer Verdünnung von 1:1000 behandelt. Aufgetragen sind in den Spuren: **1:** GST-FeRB2-Fusionsprotein, **2:** CHO-K1-Zellextrakt mit EGFP-FeRB2, **3:** CHO-K1-Zellextrakt mit EGFP-FeRB1, **4:** GST-FeRB2, **5:** E12-Embryonalextrakt, **6:** E14-Embryonalextrakt, **7:** Gehirnextrakt von E20 Embryonen, **8:** Gehirnextrakt adulter Ratten. Größenstandards sind am linken Rand angegeben.

3.2.6 Assoziation von FeRB1 mit Polysomen

Eine Analyse der Verteilung von FeRB1 in einem Sucrosedichtegradienten soll Aufschluß über die Assoziation des Proteins mit Ribosomen geben. Dazu wurden solubilisierte 13

Tage alte Rattenembryonen auf einen Sucrosegradienten aufgebracht, der in einem Bereich entsprechend der Masse von 15-45% Sucrose fraktionierte. Nach einer Ultrazentrifugation wurden Fraktionen des Gradienten gesammelt und auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. In einem Western Blot mit anschließender Antikörper-Behandlung wurde die Verteilung der Proteine untersucht. Wie in Abbildung 14A ersichtlich ist, konnte FeRB1 in den Fraktionen 4 bis 17 mit deutlichen Signalen detektiert werden. Die größte Menge des Proteins lag assoziiert mit freien Ribosomen vor, die in den Fraktionen 5 bis 9 vorhanden sind (siehe Absorptionsspektrum). Weitere Anstiege der Absorption in den Fraktionen 13 bis 23 verdeutlicht die Fraktionierung von Polysomen. Auch hier konnte FeRB1 detektiert werden, allerdings nahm die Menge des Proteins mit ansteigender Fraktion ab. In einer Kontrollreaktion bewirkte eine RNase-Behandlung des Embryonenhomogenats eine Dissoziation von Ribosomen und sollte somit die Verteilung von FeRB1 in den Fraktionen verändern. Abbildung 14B verdeutlicht, daß FeRB1 nach RNase-Behandlung des Proteinextraktes nur noch in den Fraktionen 8-12 detektiert werden kann.



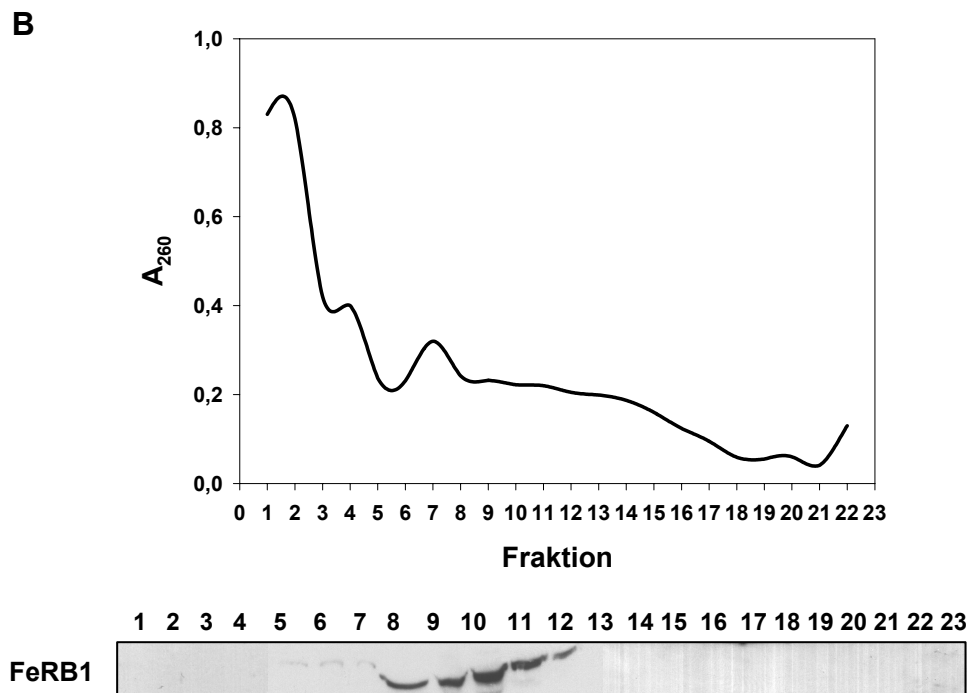


Abb. 14: Sucrose-Dichtgradient mit E13 Embryonenhomogenaten

A zeigt die Absorption der einzelnen Fraktionen bei 260 nm sowie durch das anti-FeRB1-Antiserum detektierten Proteinbanden. In **B** wurde das Embryonenhomogenat vor der Gradientenzentrifugation mit RNase behandelt. Darstellung wie in **A**.

3.3 Identifizierung eines FeRB1-Bindungspartners

Viele RNA-Bindeproteine interagieren *in vivo* als Bestandteil größerer Ribonukleoprotein-Komplexe (RNPs) mit der Ziel-RNA, so daß möglicherweise eine Interaktion ohne zusätzliche Faktoren *in vitro* nicht zur Identifizierung eines RNA-Bindungspartners führt. Um putative FeRB1-Protein-Interaktionspartner zu identifizieren, wurde ein Hefe-Zwei-Hybrid-Screen durchgeführt, in dem FeRB1 als Köder und die Ratten-cDNA-Bank pACTIIRBL eingesetzt wurde.

3.3.1 Hefe-Zwei-Hybrid-System

Im Hefe-Zwei-Hybrid-System werden zwei Hybrid-Proteine exprimiert. Kommt es zu einer Interaktion der beiden Komponenten, wird die Synthese von Histidin und β -Galaktosidase in den Hefezellen ermöglicht, so daß diese auf Selektionsmedium wachsen können. Der GAL4-Transkriptionsaktivator, der zur Aktivierung der Reporter gene eingesetzt wird, besteht aus einer DNA-Binde- und einer DNA-Aktivierungsdomäne (BD, AD; Johnston *et al.*, 1986). Im Zwei-Hybrid-System ist die DNA-BD mit FeRB1 fusioniert, wohingegen die GAL4-AD mit variablen Proteinen oder Proteinfragmenten des Rattengehirns exprimiert wird. Bei einer Interaktion eines variablen Proteinanteils mit FeRB1 werden die beiden GAL4-Domänen zusammen an den GAL4-Promotor gebracht und die Reportergene aktiviert. Das HIS3-Reportergen codiert für ein an der Histidinsynthese beteiligtes Enzym, welches das Wachstum der Hefezellen auf Selektionsmedium ohne Histidin ermöglicht. Das andere Reportergen codiert die β -Galaktosidase, mit der eine Farbselektion möglich wird.

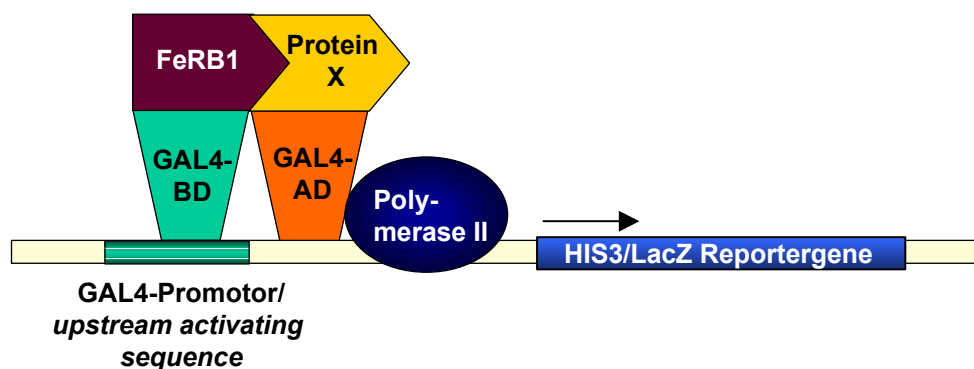


Abb. 15: Schematische Darstellung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems

Das erste Hybridprotein besteht aus der GAL4-Bindedomäne fusioniert an FeRB1, das zweite Hybridprotein ist eine Fusion aus der GAL4-Aktivierungsdomäne und einem variablen Proteinanteil. Eine Interaktion der beiden Komponenten ergibt einen funktionellen Transkriptionsaktivator, der zur Expression der Reportergene HIS3 und LacZ führt.

3.3.2 Hefe-Zwei-Hybrid-Screen

Für den Zwei-Hybrid-Screen wurde der Hefestamm CG1945 mit den Plasmiden pAS-FeRB1 und pACTIIRBL cotransformiert. Von $1,5 \times 10^7$ durchmusterten Klonen wuchsen

96 auf Selektionsmedium ohne Histidin. Zur Kontrolle wurde mit diesen Klonen zunächst ein β -Galaktosidase-Test durchgeführt, in dem sich 54 Klone blau färbten. Um auszuschließen, daß das variable Protein direkt mit der GAL4-AD interagiert, wurde eine Cycloheximid-Selektion durchgeführt, die zum Verlust der Köder-Plasmide führte. Bei einem erneuten β -Galaktosidase-Test färbten sich 49 Klone nicht blau und wurden weiter analysiert. *E. coli*-XL1blue-Zellen konnten mit 42 aus den Hefezellen isolierten Plasmiden transformiert werden. Nach erneuter Isolierung wurde in Hefezellen eine Retransformation durchgeführt, bei der 35 Klone erneut mit FeRB1 interagierten. Die Plasmidinserts von 24 dieser Klone wurden sequenziert und die erhaltenden Sequenzen mit Einträgen in der Datenbank verglichen.

Zwei-Hybrid-Screen mit pAS-FeRB1 und pACTIIRBL (Anzahl der Transformanten: $1,5 \times 10^7$)	
Anzahl Histidin-positiver Klone	96
Anzahl β -Gal-positiver Klone	49
Klone nach Cycloheximid-Selektion	42
Retransformierte positive Klone	35
Isolierte und sequenzierte Klone	35

Tabelle 2: Ergebnis des Zwei-Hybrid-Screens

In der linken Spalte sind die Schritte des Screens aufgeführt, in der rechten Spalte die daraus resultierenden positiven Klone.

Elf Klone enthielten acht unterschiedliche, überlappende cDNA-Inserts, die jeweils hohe Identitäten zum menschlichen *Lim only protein 1* (Boehm *et al.*, 1988) aufwiesen. Die gesamte identifizierte LMO1-cDNA-Sequenz umfaßt 879 nt, wovon 468 nt zum codierenden Bereich, sowie 174 nt zur 5'-UTR und 237 nt zur 3'-UTR gehören. In Abbildung 16 sind die Sequenzbereiche der identifizierten Klone im Verhältnis zur menschlichen LMO1-Sequenz schematisch dargestellt.

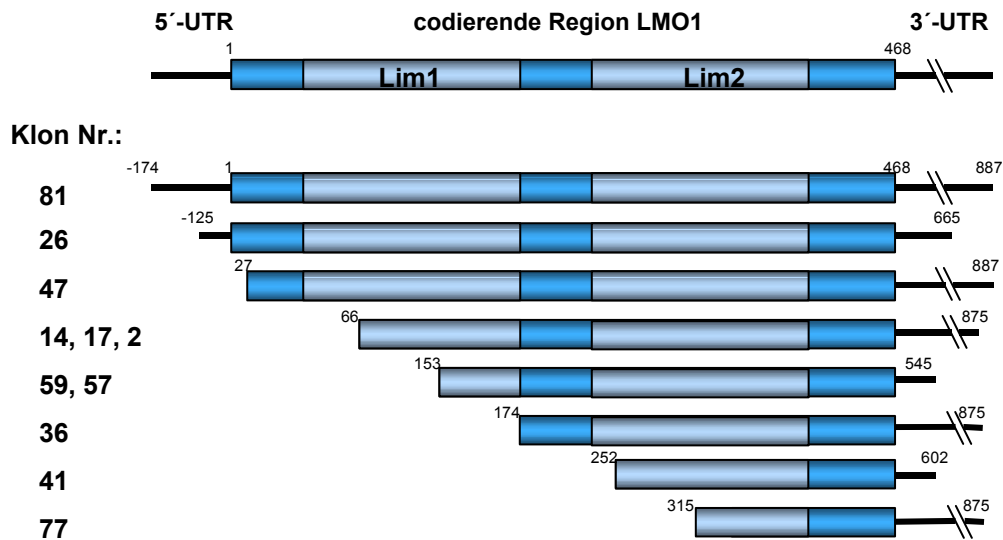


Abb. 16: Schematische Darstellung der im Zwei-Hybrid-Screen identifizierten LMO1-Klone
Gezeigt ist die menschliche LMO1-Sequenz (GB: NM002315) und entsprechend dazu die identifizierten Sequenzbereiche aus der Ratte. Die Nukleotidpositionen sind angegeben. Die blauen Boxen verdeutlichen den codierenden Bereich der jeweiligen cDNA, hellblaue Boxen stellen die beiden Lim-Domänen dar.

Drei weitere Plasmide enthielten überlappende cDNA-Inserts, die insgesamt 515 nt einer codierenden Region umfaßten. 234 nt sind identisch zur Sequenz eines putativen Exons auf Chromosom 11p13, das einen Teil eines LMO1-verwandten, als Rhombotin 3 bezeichneten Proteins codiert (Boehm *et al.*, 1991). Aufgrund einer starken Expression in Rhombomeren wurde LMO1 früher auch als Rhombotin 1 bezeichnet.

Fünf Klone wiesen Ähnlichkeiten zu cDNA-Sequenzen auf, die für das menschliche Trp4 (*transient receptor potential*)-assoziierte Protein 1 (TAP1) codieren. Trp4 ist ein Calmodulin-bindender Ca^{2+} -Kanal. Weiterhin wurde ein Asparaginase verwandtes Spermien-Autoantigen identifiziert, sowie ein RIKEN-Klon, der Ähnlichkeit zum Protocadherin 20 der Maus aufweist. Vier weitere Sequenzen entsprachen unterschiedlichen EST-Klonen der Maus. Außerdem enthielten zwei weitere Klone Sequenzen aus 3'-untranslatierten Bereichen.

Klon Nr.	Name	Sequenzbereich (nt) (cds 1-468)	Genbank-Nr.
siehe Abb. 14	<i>Lim only protein 1</i> - LMO1	-174-875	NM 002315
19, 24, 71	Rhombotin 3	ges. 515 nt	M64358
52, 55, 63	Trp4 assoziiertes Protein 1 – TAP1	222-789	AF130458
57, 78	Trp4 assoziiertes Protein 1 – TAP1	831-1245	AF130458
15, 23	<i>Asparaginase-like sperm autoantigen</i>	66-443	AF329099
64	RIKEN, ähnlich Protocadherin20	15387-15413	BB871338

Tabelle 3: Im Zwei-Hybrid-Screen gefundene Interaktionspartner von FeRB1.

Aufgeführt sind alle sequenzierten Klone, der Name des in der Datenbank gefundenen Proteins (Homologe aus Mensch bzw. Maus), sowie die dazugehörige Genbank-Zugriffsnummer. Die gefundenen Sequenzbereiche sind in Nukleotiden (nt) angegeben und beziehen sich auf die gefundene Rattensequenz.

Aufgrund der relativ hohen Anzahl der in diesem *Screen* identifizierten LMO1 cDNA-Klone wurde die FeRB1-LMO1-Interaktion näher charakterisiert. In der weiteren Arbeit wird das Rattenhomolog zu LMO1 mit rLMO1 bezeichnet.

3.3.3 Sequenzanalyse von rLMO1

rLMO1 weist eine 98%ige Identität zum menschlichen LMO1 auf. In Abbildung 16 ist die aus den verschiedenen im Hefe-Zwei-Hybrid-System gefundenen Klonen zusammengesetzte cDNA-Sequenz sowie die abgeleitete Aminosäuresequenz dargestellt. rLMO1 gehört zur Familie der *Lim only*-Proteine, die als primär nukleäre Adaptermoleküle beschrieben werden und denen wichtige biologische Funktionen während der Entwicklung zugeschrieben werden (Bach, 2000; Rabbitts, 1998). *Lim only*-Proteine bestehen aus zwei cysteinreichen LIM-Domänen, deren Konsensus-Sequenz $CX_2CX_{17-19}HX_2CX_2CX_2CX_{7-11}(C)X_8C$ ist, wobei C für Cysteine, H für Histidine und X für beliebige Aminosäuren steht. Lim-Domänen sind für Protein-Protein-Interaktionen verantwortlich. In Abbildung 17 sind die für die Lim-Domänen charakteristischen Cystein- und Histidinreste farbig markiert.

```

1 CTCGCCCCGGCGGCTGCGCTCCGGGGCGCCGCTCGGTCCGCCCTCGTCCGGCGCCGGGGCGCGGAGCC
70 CACGCGCACCAGCAGAAAGCAGCGCAGACGCCCTTTGGCGACAGTCCGAGTCCGAGTCCCTCAGCAT
140 CCTCCGCCAGCACCCGGCTGGAGCCGCTTGAATACT ATGGTTTTGGACCAAGAGGACGGTGTCCGATG
1 M V L D Q E D G V P M
210 CTCTCCGTCCAACCTAAGGGGAAGCAGGGCTGTGAAGCAGGCTGCAACCGAAAGATCAAGGACCCGTAC
12 L S V Q P K G K Q K G C A G C N R K I K D R Y
280 CTGCTGAAGGCCCTGGACAAGTACTGGCATGAGGACTGCCTCAAGTGTGCCTGCTGTGACTGTGCGCTG
35 L L K A L D K Y W H E D C L K C A C C D C R L
350 GGCGAGGTGGGCTCCACTCTCTACACCAAGGCTAACCTCATCTGTGCGGGCGCGACTACCTGAGGCTT
58 G E V G S T L Y T K A N L I L C R R D Y L R L
420 TTTGGCACCACAGGAAACTGTGCTGCCTGCAGCAAGCTGATCCCAGCTTTCGAGATGGTATGCGGGCC
81 F G T T G N C A A C S K L I P A F E M V M R A
490 CGGGACAACGTCTATCACCTTGACTGCTTCGCCTGCCAAGCTGCAATCAGAGATTTTTCGCTGGGAGAC
104 R D N V Y H L D C F A C Q L C N Q R F C V G D
560 AAATTCCTCCTGAAGAACAACATGATCTGTGCCAGATGGACTATGAGGAGGGGCATCTCAATGGCACC
127 K F F L K N N M I L C Q M D Y E E G H L N G T
630 TTTGAATCCCAAGTTCAGTAACGCCCAACATCTGGCCTCCAGGTCCATCTGTCCGTCTGCCACCTGAC
150 F E S Q V Q ...
700 CATCTGCCTGGCAGGCCGGCCGGCCAGCCACTCTGCCTGCGCGGGCTGGCCAGCCGCTGTCTACAAGT
770 TAGAACTTCATCCTCAACGTGAAGGTGGTTTTTCTCCACCACCGCCGCCATTTCCGTGGGACCCTCCT
840 GGGGCCAGGCTCGGCCTGTACAGTCTGTCTTCTGTATATAAATGGGAA

```

Abb. 17: cDNA- und Aminosäuresequenz von rLMO1

Durchnummerierte cDNA und Aminosäuresequenz (fett gedruckt) von rLMO1. Blau hinterlegt sind die Lim-Domänen, konservierte Cystein- und Histidinreste in den Domänen sind gelb hervorgehoben. Start- und Stopcodon kursiv.

3.3.4 Identifizierung der für die FeRB1-rLMO1-Interaktion verantwortlichen

Sequenzbereiche

Um die Sequenzbereiche einzugrenzen, die für die Interaktion von FeRB1 mit rLMO1 verantwortlich sind, wurden unterschiedliche Proteinfragmente hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften im Hefesystem getestet. Charakteristisch für rLMO1 ist das Vorhandensein von nur zwei Lim-Domänen. Zunächst wurden cDNA-Konstrukte beider Domänen (Lim1: nt 67-244 und Lim2: nt 261-443) in den Hefe-Vektor pACT2 kloniert. Die entsprechenden Fusionsproteine wurden im Hefe-Zwei-Hybrid-System auf ihre Fähigkeit zur Interaktion mit FeRB1 getestet. Nur die zweite Lim-Domäne interagierte mit FeRB1, wobei die Stärke der Interaktion gemessen an der Anzahl der gewachsenen Hefekolonien nicht der des vollständigen Proteins entsprach. Zusätzlich wurden zwei cDNA-Konstrukte von FeRB1 hergestellt, die die RRM-Domänen (RRM: nt 1-638) sowie die KH-Domänen (KH: nt 760-1912) codierten. Die beiden RRM-Domänen von FeRB1, nicht jedoch die isolierten KH-Domänen, sind ausreichend für eine Interaktion mit der zweiten Lim-Domäne von rLMO1. Allerdings war auch in diesen Fall eine Interaktion mit

dem gesamten codierenden Bereich von rLMO1 stärker. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß flankierende Bereiche der zweiten Lim-Domäne eine Interaktion mit FeRB1 verstärken. Ein Fusionsprotein, welches die letzten 20 Aminosäuren von Lim2 sowie die folgenden 12 C-terminalen Aminosäuren enthält, interagiert mit den beiden RRM-Domänen von FeRB1 ebensostark wie die vollständigen Proteine. Demnach konnte die Interaktionsdomäne von FeRB1 und rLMO1 auf die beiden RRM-Domänen von FeRB1 sowie den C-terminalen Bereich der 2. Lim-Domäne mit flankierender Region eingegrenzt werden. Abbildung 18 faßt schematisch die Ergebnisse der Interaktions-Tests zusammen und gibt einen Überblick über die konstruierten Proteinfragmente.

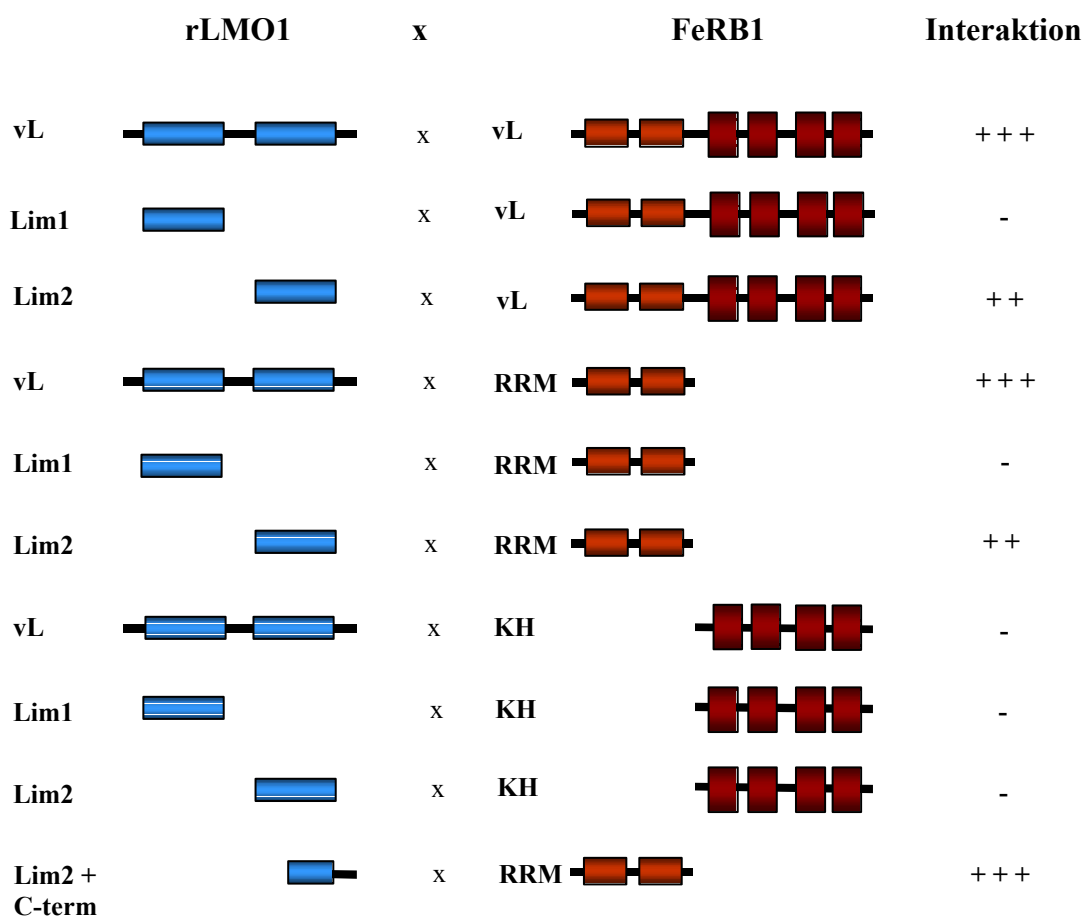


Abb. 18: Schematische Darstellung der Eingrenzung der Interaktionsdomänen von rLMO1 und FeRB1 mit dem Zwei-Hybrid-System

Dargestellt sind die verschiedenen rLMO1 und FeRB1-Teilstücke sowie ihre Fähigkeit zur Interaktion im Zwei-Hybrid-System. Farbige Boxen stellen die Domänen innerhalb der Proteine dar. Blau: Lim-Domänen; hollrot: RRM-Domänen, dunkelrot: KH-Domänen. vL: volle Länge Protein, Lim1: erste Lim-Domäne von rLMO1, Lim2: zweite Lim-Domäne von rLMO1, Lim2 + C-term: zweite Lim-Domäne ab AS 123 sowie N-terminus von rLMO1 bis AS 156; - keine, + schwache, +++ starke Interaktion.

3.3.5 Interaktion von FeRB1 und rLMO1 in CHO-K1-Zellen

Um die Interaktion von FeRB1 und rLMO1 in heterologen Zellen zu untersuchen, wurden rekombinante Proteine in CHO-K1-Zellen exprimiert. Dazu wurde zusätzlich zum Vektor pEGFP-FeRB1 der Expressionsvektor pCMV-rLMO1 konstruiert, der in eukaryotischen Zellen zur Bildung eines FLAG-rLMO1-Fusionsproteins führt. Die Lokalisierung der Proteine wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie (Abbildung 19) untersucht. Erfolgte die Expression der Proteine unabhängig voneinander, war EGFP-FeRB1 präferentiell zytoplasmatisch lokalisiert, während FLAG-rLMO1 in der gesamten Zellen zu detektieren war. Nach einer Coexpression der Proteine änderte sich Expressionsmuster von FLAG-rLMO1, so daß beide Proteine hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert waren.

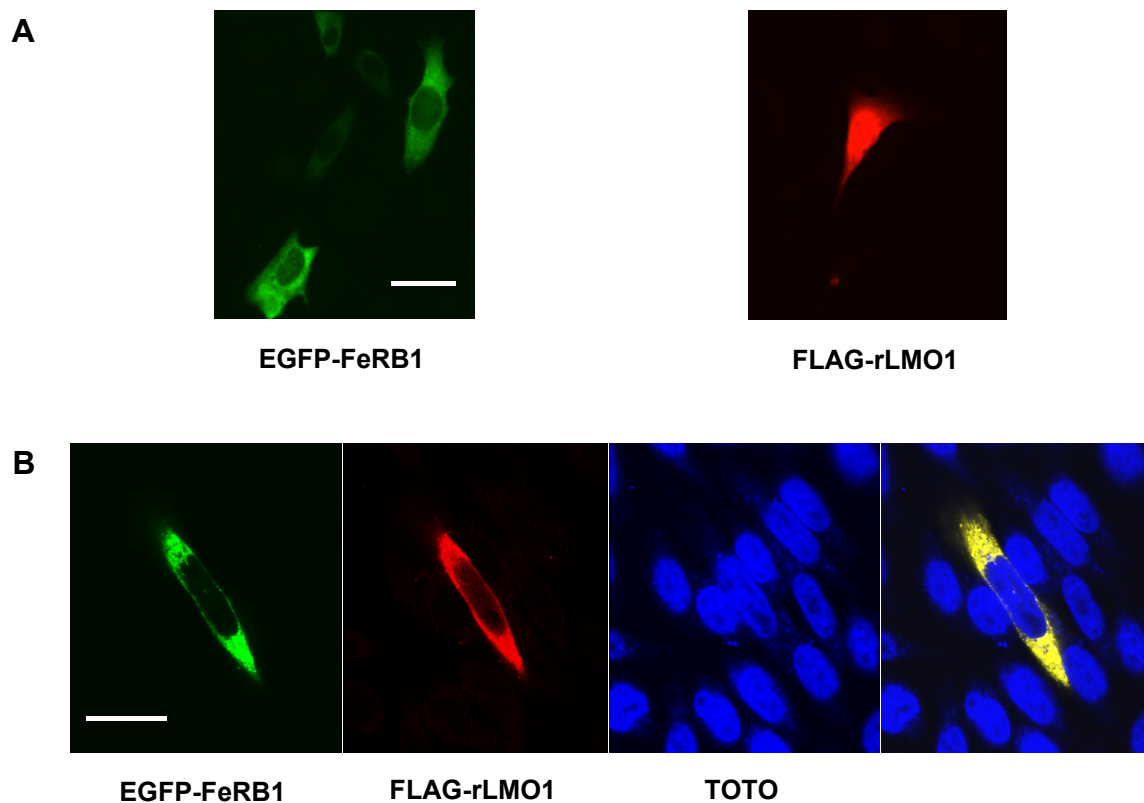


Abbildung 19: Lokalisierung von EGFP-FeRB1 und rLMO1 in CHO-K1-Zellen.

In **A** sind transfizierte CHO-K1-Zellen gezeigt, die jeweils nur ein Fusionsprotein exprimieren. Links ist die Expression von EGFP-FeRB1 gezeigt, rechts sind FLAG-rLMO1 exprimierende Zellen dargestellt. In **B** wurden CHO-K1-Zellen mit beiden Konstrukten cotransfiziert. Von links nach rechts ist die Expression von EGFP-FeRB1, von FLAG-rLMO1, eine Kernfärbung mit dem Farbstoff TOTO sowie eine Überlagerung der drei Aufnahmen gezeigt. Die Aufnahmen wurden in einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop gemacht. Die Größenbalken entsprechen 50 μm .

Für Co-Immünpräzipitationen wurden Zellextrakte, die beide Fusionsproteine enthielten, mit einem anti-FLAG-Antikörper gekoppelt an Agarosebeads inkubiert. Die präzipitierten Proteinkomplexe wurden in einem Western Blot analysiert. Dieser wurde zunächst mit einem anti-EGFP-Antikörper und anschließend mit einem anti-FLAG-Antikörper behandelt. Abbildung 20 zeigt deutlich, daß EGFP-FerB1 zusammen mit FLAG-rLMO1 präzipitiert werden konnte (Spur 3).

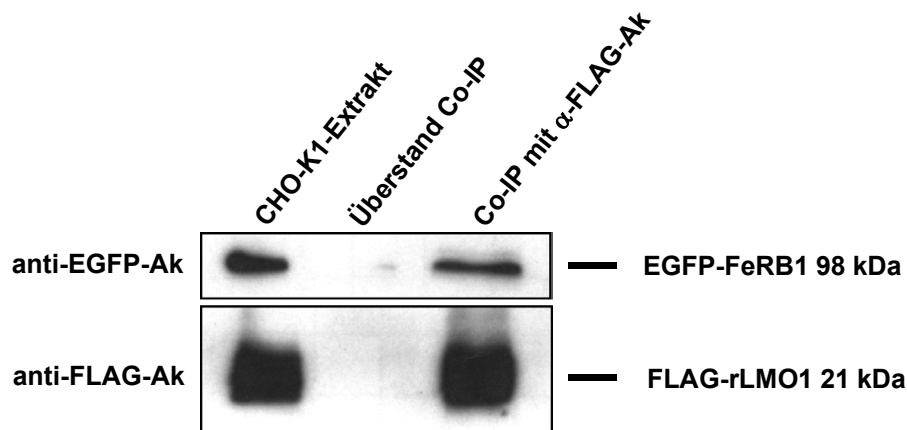


Abb. 20: Co-Immünpräzipitation von EGFP-FerB1 und FLAG-rLMO1 aus CHO-K1-Zellextrakt

Die rekombinanten Proteine EGFP-FerB1 und FLAG-rLMO1 sind in Spur 1 im CHO-K1-Zellextrakt gezeigt. Präzipitiert wurde mit einem anti-FLAG-Antikörper, der kovalent an Protein A-Agarose gekoppelt war (Spur 3). Der Überstand des Präzipitationsansatzes wurde in Spur 2 aufgetragen. Im oberen Teil wurden die Proteine mit dem anti-EGFP-Antikörper detektiert, im unteren Teil mit dem anti-FLAG-Antikörper.

Zur Kontrolle der Spezifität der Interaktion zwischen EGFP-FerB1 und FLAG-rLMO1 wurde zusätzlich getestet, ob FLAG-rLMO1 mit ECFP (*enhanced cyan fluorescent protein*)-rStaufen interagiert. rStaufen ist ein RNA-Bindeprotein aus der Ratte, welches eine andere Domänenstruktur als FerB1 aufweist. Proteinextrakt aus CHO-K1-Zellen, die beide Proteine exprimierten, wurde mit Protein A-Agarose und kovalent daran gebundenem anti-FLAG-Antikörper inkubiert. Abbildung 21 zeigt in Spur 1 beide Proteine im Extrakt. rLMO1 wurde durch den anti-FLAG-Antikörper präzipitiert (Spur 3), nicht jedoch ECFP-rStaufen, das im Überstand der Reaktion verblieb (Spur 2). Damit wurde

gezeigt, daß rLMO1 und FeRB1 direkt miteinander interagieren, und rLMO1 nicht unspezifisch an den EGFP-, bzw. ECFP-Anteil des Fusionsproteins bindet.

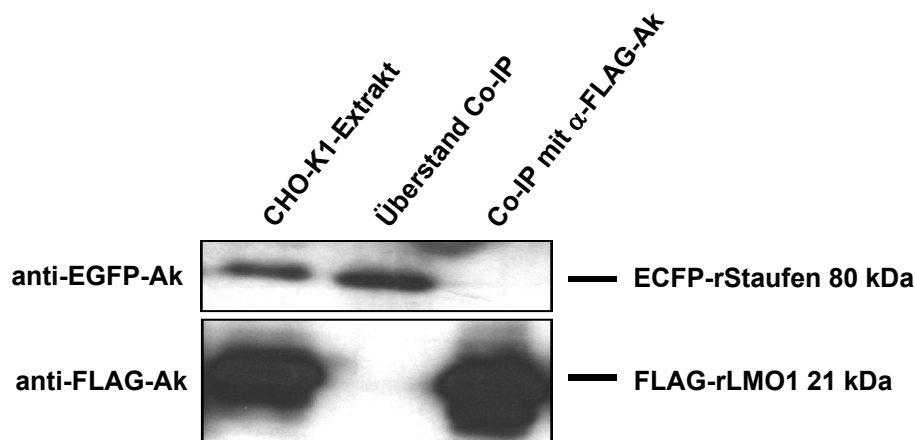


Abb. 21: Immunpräzipitation von FLAG-rLMO1, das nicht mit ECFP-rStaufen interagiert
 Spur 1 zeigt beide Proteine im CHO-K1-Zellextrakt, Spur 2 den Überstand des Präzipitationsansatzes, Spur 3 die Präzipitation von FLAG-rLMO1 durch den anti-FLAG-Antikörper. Im oberen Teil wurden die Proteine mit dem anti-EGFP-Antikörper detektiert, im unteren Teil mit dem anti-FLAG-Antikörper.

3.3.6 Spezifität der Bindung

Zur Familie der *lim only*-Proteine gehören noch weitere Mitglieder wie LMO2, -3 und -4, die besonders im Bereich der Lim-Domänen eine hohe Identität zu rLMO1 aufweisen. Im Hefe-Zwei-Hybrid-Screen wurde als Interaktionspartner von FeRB1 außer rLMO1 kein weiteres Mitglied der Proteinfamilie identifiziert. Um die Spezifität der Interaktion von FeRB1 und rLMO1 zu überprüfen, wurden Bindungstests mit LMO2 und FeRB1 sowie LMO4 und FeRB1 im Hefe-System durchgeführt. Dazu wurde zunächst die cDNA von LMO2 und LMO4 in den Hefe-Köder-Vektor pACT2 kloniert. Anschließend wurden die Hefezellen mit jeweils dem Köder-Vektor und pAS-FeRB1 cotransformiert. Dabei erfolgte bei keinem der getesteten Proteine eine Interaktion mit FeRB1 (Abbildung 22). Zur positiven Kontrolle wurde erneut die Bindung von rLMO1 an FeRB1 herangezogen.

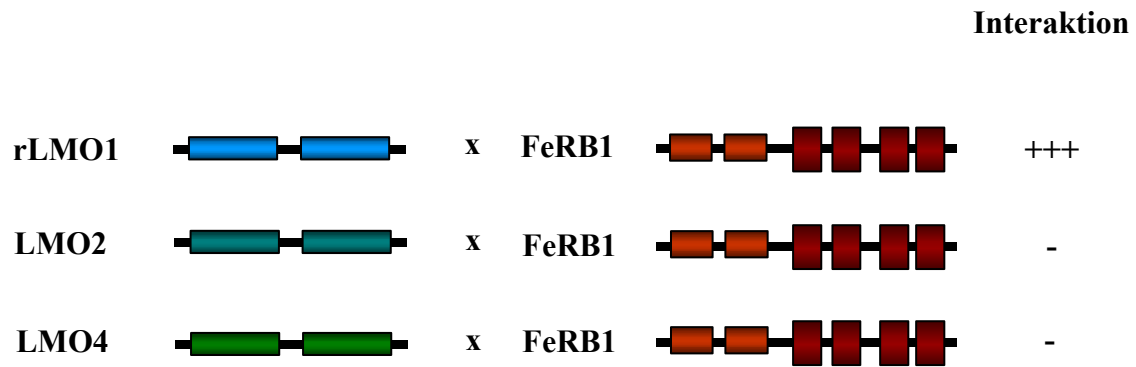


Abb. 22: Schematische Darstellung der Bindungstests von rLMO1, LMO2 und LMO4 mit FeRB1

Eingesetzt wurde jeweils das vollständige Protein und auf die Fähigkeit zur Interaktion mit FeRB1 getestet. + keine Interaktion, +++ starke Interaktion.

3.4 Verteilung von FeRB1, FeRB2 und rLMO1 in Rattenembryonen

3.4.1 Northern Blot-Analyse von rLMO1

Um das Expressionsmuster von rLMO1 mit dem von FeRB1 zu vergleichen, wurde der Northern Blot (siehe 3.2.3) mit einer rLMO1-Sonde inkubiert. Das rLMO1-Gen wird ebenso wie FeRB1 und FeRB2 in frühen Entwicklungsstadien der Ratte exprimiert. Allerdings war im Unterschied zu FeRB1 und FeRB2 keine Abnahme in der Stärke der Expression ab Embryonaltag 12 zu verzeichnen. Von E12 bis E15 konnten gleiche Mengen an rLMO1-mRNA detektiert werden, während sie am Tag 20 im Gehirngewebe nochmals anstieg. Im adulten Rattengehirn war dagegen keine rLMO1-mRNA zu detektieren. Das Transkript kommt in zwei Isoformen vor, die auf Höhe von 1,2 und 1,4 kb auf dem Blot zu erkennen sind. Die Kontrolle mit Aktin zeigt in allen Spuren vergleichbare RNA Mengen an (Abbildung 23).

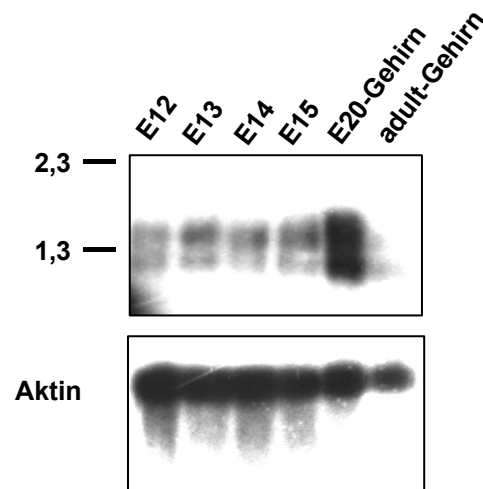
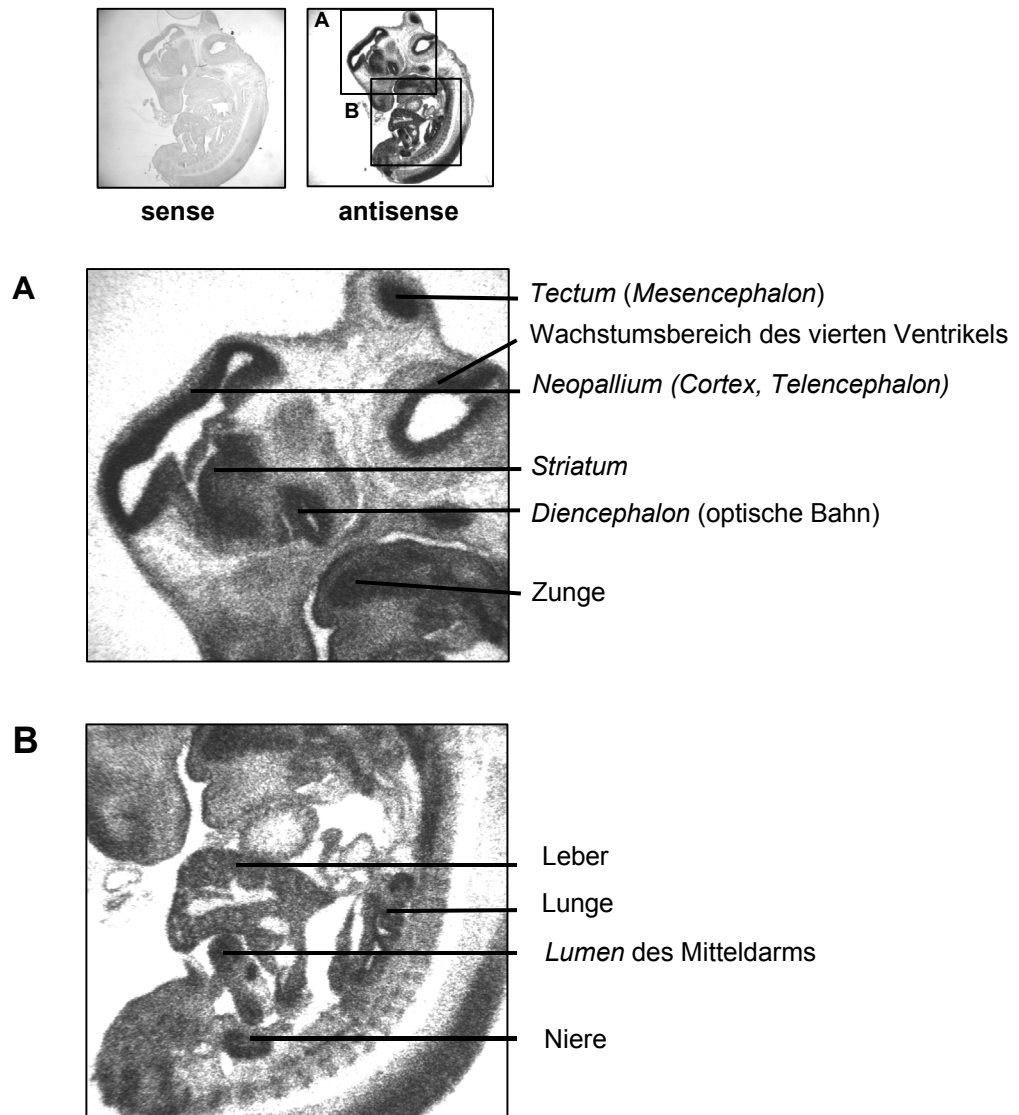


Abbildung 23: Expression des rLMO1-Gens zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entwicklung

E12-E15: Poly (A)⁺-RNA aus Rattenembryonen zum Zeitpunkt E12-E15. E20-Gehirn: Poly (A)⁺-RNA aus dem Gehirn 20 Tage alter Rattenembryonen, adult-Gehirn: Poly (A)⁺-RNA aus dem Gehirn adulter Ratten. Größenstandards sind am linken Rand angegeben. Im oberen Blot erfolgte die Hybridisierung mit rLMO1-DNA, im unteren mit Aktin-DNA.

3.4.2 *In situ*-Hybridisierung an Gewebe-Dünnschnitten

Einen weiteren Hinweis auf eine *in vivo* Interaktion von FeRB1 und rLMO1 ist eine Expression in identischen Gewebearealen. Dazu wurden Gewebe-Dünnschnitte von Rattenembryonen angefertigt und die Expression der mRNA von rLMO1 und FeRB1 untersucht. Um radioaktiv markierte Sonden für die Hybridisierung der Gewebeschnitte herzustellen, wurden zunächst Transkriptionsvektoren konstruiert, die Bereiche der cDNA von FeRB1 (nt 1-1864), FeRB2 (nt 1-680) sowie rLMO1 (nt 1-468) enthielten. Mit Hilfe dieser Vektoren wurde die RNA *in vitro* transkribiert und durch eingebautes ³⁵S-UTP markiert. Mit diesen Sonden wurden die Gewebeschnitte inkubiert, so daß anschließend in einem Autoradiogramm die Expression der endogenen mRNAs deutlich wurde. Abbildung 24 zeigt die Expression von FeRB1 in 14 Tage alten Rattenembryonen.

FeRB1:**Abb. 24: Expression von FeRB1 in E14 Rattenembryonen**

Rattenembryonen-Dünnschnitte wurden mit einer sense- und einer antisense-Sonde hybridisiert (kleine Aufnahmen). **A** und **B** sind Vergrößerungen des antisense-Schnittes. Oben Gehirnbereich, unten Körperbereich des E14 Embryos.

Im Gehirn konnten deutliche Signale in Bereichen von epitheliale, stark differenzierendem Gewebe um die Ventrikel detektiert werden. Besonders im Neopallium (späterer cerebraler Cortex), im Tectum, im Striatum sowie im Diencephalon waren starke Signale erkennbar. Außerhalb des Gehirns wird FeRB1 besonders im Zungenepithel, in der Lunge und in der Niere exprimiert. In der Leber sowie im Gewebe um das Lumen des Mitteldarms konnte nur eine schwächere Expression verzeichnet werden.

Zum Vergleich wurden E14 Embryonen-Dünnschnitte mit radioaktiv markierter rLMO1-RNA hybridisiert. Wie in Abbildung 25 deutlich wird, erfolgte eine Expression von rLMO1 hauptsächlich in neuronalem Gewebe. Hierbei erfolgte eine Coexpression mit FeRB1 im Mesencephalon, Striatum sowie im Wachstumsbereich des vierten Ventrikels.

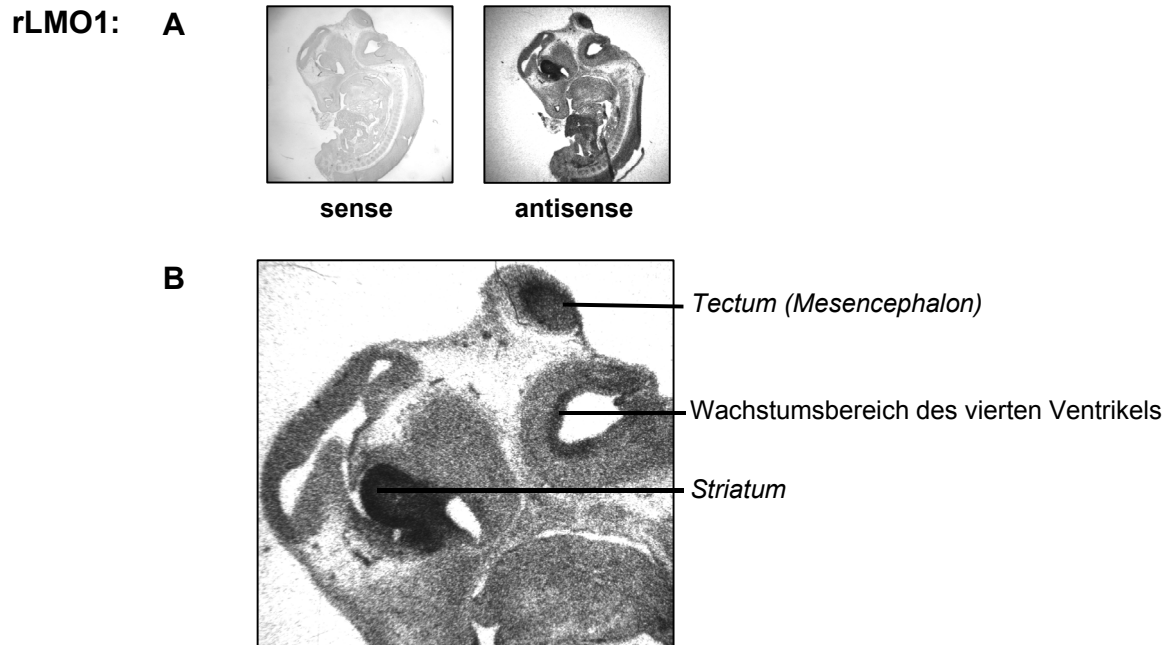


Abb. 25: Expression von rLMO1 in E14 Rattenembryonen

A: sense- und antisense-Hybridisierungen. B: Vergrößerung des Gehirnbereichs des antisense-behandelten Schnittes.

Da die Hybridisierung von E14 Embryonen-Dünnschnitten mit der FeRB2-Sonde geringere Signalintensitäten ergab, wurden Schnitte unterschiedlicher Entwicklungsstadien hybridisiert, um mögliche Unterschiede in der Expressionsstärke untersuchen zu können. Wie in Abbildung 26 exemplarisch an zwei Entwicklungsstadien (E13 und E14) dargestellt ist, wird die FeRB2-mRNA in sehr frühen Stadien exprimiert und nimmt mit fortschreitender Entwicklung ab. Zum Zeitpunkt E13 konnten schwache Signale in den Bereichen um die Ventrikel detektiert werden. Dazu gehörten wie auch schon bei FeRB1 und rLMO1 das Neopallium sowie die Bereiche stark differenzierenden Gewebes um den vierten Ventrikel. Die Expression der FeRB2-mRNA konnte bereits einen Tag später nur noch schwach detektiert werden (Abb. 26B). Dabei konnte eine Expression des FeRB2-Genes in den Bereichen um die Ventrikel sowie in der Leber detektiert werden.

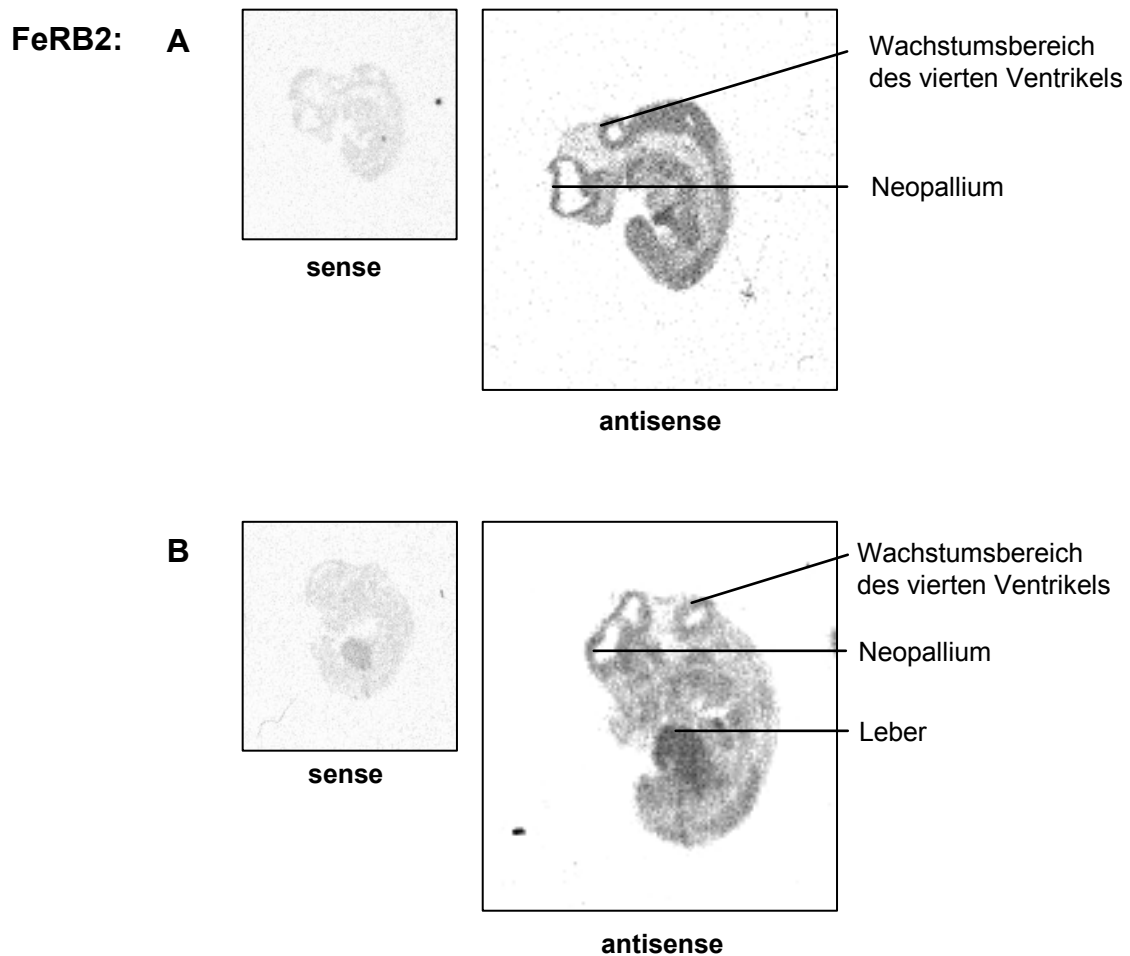


Abb. 26: Hybridisierung von Rattenembryonen-Dünnschnitten unterschiedlicher Entwicklungsstufen mit der FeRB2-RNA.

A: Zeitpunkt E13, links sense-Kontrolle, rechts Hybridisierung mit der antisense-Sonde. **B:** E14-Embryonalstadium. Wie A sense und antisense-Hybridisierungen.

3.5 Coexpression von rLMO1 und FeRB1 mit Clim2 im Zellkultursystem

In der Literatur wird LMO1 als primär nukleäres Protein beschrieben, das mit Cofaktoren wie Clim2 interagiert (Bach, 2000). Clim2 wiederum bindet an Transkriptionsfaktoren mit Lim-Homeodomänen. Es wird vermutet, daß LMO1 durch die Interaktion mit Clim2 Transkriptionsprozesse regulieren kann. Um zu untersuchen, ob eine Interaktion von FeRB1 mit der Bindung von rLMO1 an Clim2 kompetieren kann, wurde die Interaktion der rekombinanten Proteine im CHO-K1-Zellsystem untersucht. Ein Expressionsvektor, durch den Clim2 fusioniert an ein MYC-Peptid (QVLLADQLL) exprimiert werden kann,

wurde von Dr. Ingolf Bach, ZMNH, zur Verfügung gestellt. Abbildung 27 zeigt die Lokalisierung von EGFP-FerB1, FLAG-rLMO1 sowie MYC-Clim2 in unterschiedlicher Kombination in CHO-K1-Zellen. MYC-Clim2 ist ein ausschließlich im Nukleus lokalisiertes Protein (Abb. 27 a,g). Wird FLAG-rLMO1 mit MYC-Clim2 zusammen in einer Zelle exprimiert, so wird FLAG-rLMO1 ebenso in den Nukleus rekrutiert (Abb. 27 b). Im Gegensatz dazu ist FLAG-rLMO1, wenn mit EGFP-FerB1 coexprimiert wird, ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert (27 d-f). Erfolgt eine Expression aller drei Fusionsproteine in CHO-K1-Zellen, akkumulieren FLAG-rLMO1 und MYC-Clim2 im Kern, während EGFP-FerB1 im Zytoplasma verbleibt (Abb. 27 g-j). Diese Ergebnisse zeigen, daß sowohl FerB1 als auch Clim2 mit rLMO1 interagieren und so die subzelluläre Verteilung dieses Proteins regulieren.

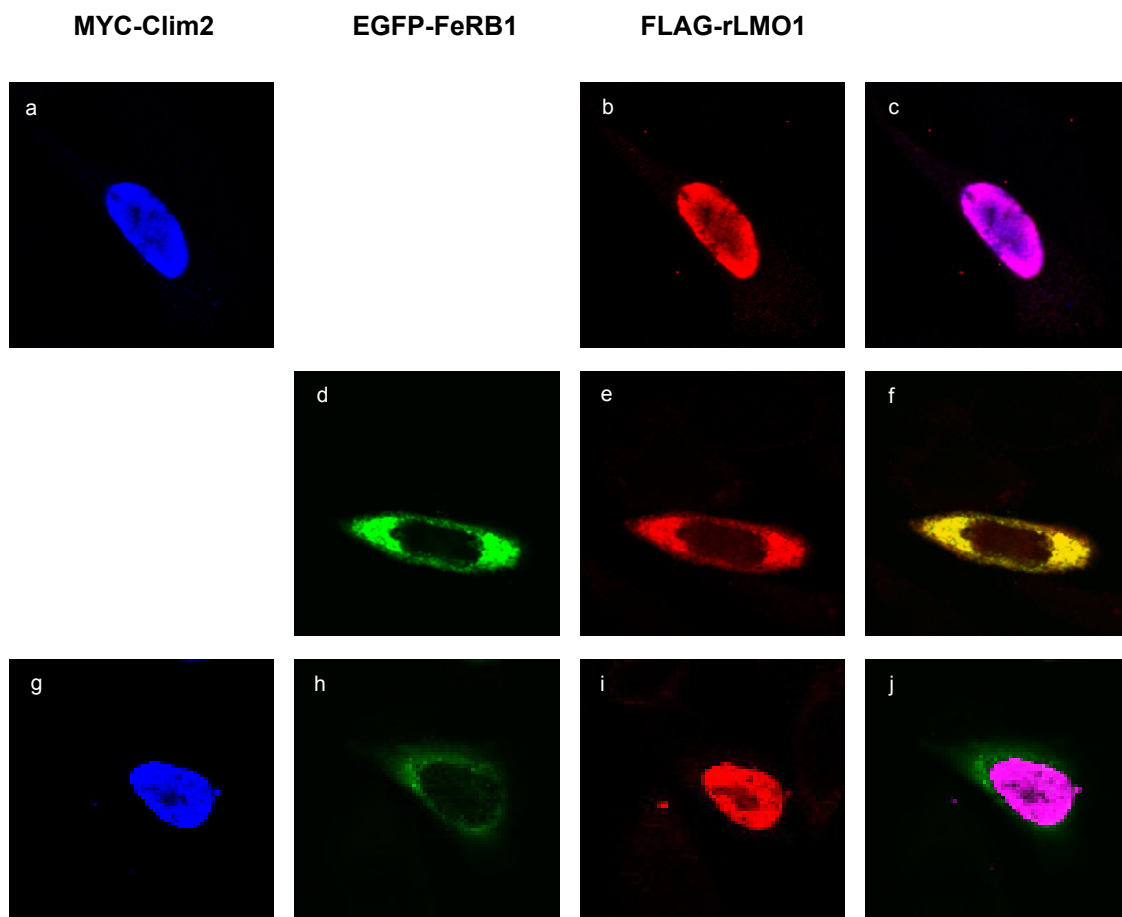


Abb. 27: Lokalisierung von EGFP-FerB1, FLAG-rLMO1, MYC-Clim2 in CHO-K1-Zellen. Die Expression der Fusionsproteine in CHO-K1-Zellen wurde immunocytochemisch analysiert und die Zellen in einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. **a-c:** Coexpression von MYC-Clim2 (**a**) und FLAG-rLMO1 (**b**); **d-f:** Coexpression von EGFP-FerB1 (**d**) sowie FLAG-rLMO1 (**e**); **g-j:** Trimäre Lokalisierung von MYC-Clim2 (**g**), EGFP-FerB1 (**h**) und FLAG-rLMO1 (**i**). **c, f, j** zeigen jeweils überlagerte Aufnahmen.

4 Diskussion

Posttranskriptionale Regulation ist in eukaryotischen Zellen ein wichtiger Mechanismus komplexe Vorgänge wie z.B. Differenzierung und Entwicklung zu steuern. Auf RNA-Ebene kann dies durch die Regulation der RNA-Stabilität, zytoplasmatische Lokalisierung oder gezielte Translation von Transkripten als Reaktion auf intra- oder extrazelluläre Reize geschehen. Innerhalb vieler so regulierter Transkripte wurden *cis*-agierende Sequenzelemente identifiziert, mit denen spezifische RNA-Bindeproteine interagieren. In Neuronen gibt es eine Reihe somatodendritisch lokalisierter Transkripte, während der Großteil der mRNAs auf das Soma beschränkt ist (Kuhl & Skehel, 1998). Es wird davon ausgegangen, daß der Vorgang der dendritischen Lokalisierung und extrasomatischen Proteinsynthese zur synaptischen Plastizität beiträgt (Kindler *et al.*, 1997; Wells *et al.*, 2000; Steward & Schuman 2001; Krichevsky & Kosik, 2001). In den letzten Jahren wurden viele *trans*-Faktoren identifiziert, wobei sich herausstellte, daß diese RNA-Bindeproteine Funktionen in vielen unterschiedlichen Zelltypen und Spezies übernehmen können (Bassell & Singer, 2001; Rand & Yisraeli, 2001; Monshausen *et al.*, 2001). Diese Ergebnisse deuten auf generelle Mechanismen der posttranskriptionalen Regulation von mRNA hin. Ziel dieser Arbeit war es, weitere RNA-Bindeproteine in neuronalem Gewebe der Ratte zu identifizieren, die an diesen Regulationsmechanismen beteiligt sein könnten.

Die in dieser Arbeit im Gehirn von 5 Tage alten Ratten identifizierten RNA-Bindeproteine, FeRB1 und FeRB2, weisen 7 Domänen auf, die Interaktionen mit RNA eingehen können und die nahezu das gesamte Protein ausmachen. Das Vorkommen mehrerer Interaktionsdomänen ist häufig ein Merkmal von RNA-Bindeproteinen. So können entweder mehrere Faktoren gebunden werden, oder durch multiple Interaktionen mit einer RNA die Spezifität erhöht werden (Siomi & Dreyfuss, 1997). Innerhalb der Sequenz von FeRB1 und FeRB2 gibt es zwei RRM-Domänen (*RNA recognition motif*), eine RGG-Box sowie vier KH-Domänen (*hnRNP K-homology domains*). RRM-Domänen sind innerhalb von RNA-Bindeproteinen häufig vorkommende RNA-Interaktionsdomänen, deren Konsensusmotiv zwei RNP-Motive sind. Am Beispiel der Bindung der U1 RNA mit dem RNA-Bindeprotein U1A konnte gezeigt werden, daß die RNP-Motive nebeneinander auf den beiden zentralen β -Faltblättern liegen, die die Struktur der RRM-Domänen ausmachen (Siomi & Dreyfuss, 1997). Innerhalb der

RRM-Domänen der Ratten-RNA-Bindeproteine FeRB1 und FeRB2 entsprechen die RNP-Motive dem Konsensusmotiv.

Eine RGG-Box befindet sich stromabwärts der RRM-Domänen in FeRB1 und FeRB2. Diese RNA-Interaktionsdomäne hat einen hohen Anteil an den Aminosäuren Arginin (R) und Glycin (G), deren spezifische Anordnung aber im phylogenetischen Vergleich nicht stark konserviert ist. RGG-Boxen finden sich in Proteinen, die an zahlreichen Schritten des RNA-Metabolismus beteiligt sind. Dazu gehören nukleäre Speißfaktoren und hnRNP-Proteine sowie viele zytoplasmatische Proteine. RGG-Boxen kommen häufig in Kombination mit anderen RNA-Interaktionsdomänen vor (Kiledjan & Dreyfuss, 1992; Steinert *et al.*, 1991). Man geht davon aus, daß RRG-Boxen die Bindungsaffinität für RNA in einer Sequenz-unabhängigen Weise erhöhen, indem sie RNA-Sekundärstrukturen auflösen und die RNA somit für andere RNA-Interaktionsdomänen zugänglich machen (Ghisolfi *et al.*, 1992; Kiledjian & Dreyfuss, 1992). Die RGG-Boxen in FeRB1 und FeRB2 haben Ähnlichkeiten mit der in Nucleolin (Genbank-Nr.: M60858) und FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*, Genbank-Nr.: X69962).

Ebenso wie RRM-Domänen sind KH-Domänen in vielen RNA-Bindeproteinen identifiziert worden. Das hnRNP K Protein, ein nukleäres pre-mRNA-Bindeprotein, besitzt drei solcher Domänen und war das erste Protein, in dem diese Domänen identifiziert wurden (Siomi *et al.*, 1993). KH-Domänen sind zumeist für RNA-Interaktionen verantwortlich, können aber wie auch RRM-Domänen Protein-Protein-Interaktionen vermitteln (Chen *et al.*, 1997, Samuels *et al.*, 1998).

FeRB1 und FeRB2 gehören zur ZBP-1-Familie von RNA-Bindeproteinen. Einzelne Familienmitglieder sind am Transport, der Stabilisierung und Translation von unterschiedlichen Transkripten in verschiedenen Zellsystemen beteiligt (Bassell & Singer, 2001; Rand & Yisraeli, 2001; Nielsen *et al.*, 1999). ZBP-1 ist sowohl in Fibroblasten als auch in embryonalen Neuronen des Huhns am Transport der β -Aktin-mRNA an die Zellperipherie beteiligt (Ross *et al.*, 1997; Bassell & Singer, 2001, Zhang *et al.*, 2001). Vg1-RBP/Vera bindet in *Xenopus laevis* Oozyten an die Vg1-mRNA, die in einer späten Phase der Oogenese an den vegetalen Pol der Oozyte transportiert wird (Rand & Yisraeli, 2001). Ein weiteres Homolog aus der Maus, das CRD-BP, bewirkt eine Stabilisierung der c-myc-mRNA, die einen wichtigen Wachstumsfaktor, der auch als Onkogen-Produkt beschrieben wird, kodiert (Doyle *et al.*, 1998). In den letzten Jahren wurden außerdem Mitglieder dieser Proteinfamilie

im Menschen identifiziert. Die IGFII-mRNA, die einen fötalen Wachstumsfaktor kodiert und differentiell translatiert wird, interagiert mit den RNA-Bindeproteinen IMP 1-3 (Nielsen *et al.*, 1999). Durch Bindung an die sogenannte *leader3*-IGFII-mRNA wird eine physiologische Regulierung der Translation während der Embryonalentwicklung bewirkt. Somit wird deutlich, daß Mitglieder dieser Familie von RNA-Bindeproteinen trotz hoher Sequenzidentitäten unterschiedliche Funktionen ausüben können. Es konnte außerdem gezeigt werden, daß diese Proteine in unterschiedlichen Zelltypen vorkommen und *in vitro* eine hohe Spezifität in Bezug auf einzelne RNA-Interaktionspartner aufweisen (Leeds *et al.*, 1997; Nielsen *et al.*, 1999).

FeRB1 und FeRB2 werden ausschließlich in embryonalem Gewebe exprimiert, deshalb kann eine Funktion der Proteine bei Differenzierungsvorgängen angenommen werden. Dazu passen die Beobachtungen, daß die Orthologe IMP-1 und CRD-BP ebenfalls präferentiell embryonal vorkommen und die Expression von wichtigen Wachstumsfaktoren und Transkriptionsfaktoren regulieren (Nielsen *et al.*, 1999; Doyle *et al.*, 1998). Coulis *et al.* (2000) konnten zeigen, daß eine Zerstörung der Bindung zwischen CRD-BP und der *c-myc*-mRNA zu einem geringeren *c-myc*-Spiegel in der Zelle und somit zu einer Inhibition des Zellwachstums führt. In mehreren Tumorgeweben und Krebszelllinien konnte eine Überexpression von CRD-BP und IMP-1 nachgewiesen werden (Ioannidis *et al.*, 2001). Die onkogene Wirkung dieser Proteine könnte somit in einer verstärkten Stabilisierung der *c-myc*-mRNA liegen, was in einem erhöhten Proteinlevel des Wachstumsfaktors resultiert. Diese Ergebnisse deuten auf fötale RNA-Bindeproteine mit onkogenen Eigenschaften hin, die auch für FeRB1 und FeRB2 angenommen werden können.

Möglicherweise sind die RNA-Bindeproteine der Ratte an mRNA-Transportprozessen beteiligt. GFP-FeRB1 und GFP-FeRB2 wiesen in Hippocampus-Neuronen der Ratte ein granuläres Verteilungsmuster in den Dendriten auf. Diese Granulae könnten Ribonukleoprotein (RNP)-Partikel darstellen, innerhalb derer bestimmte mRNAs in Dendriten transportiert werden. Man geht davon aus, daß in diesen multimolekularen Komplexen eine Vielzahl von Proteinen an unterschiedlichen Prozessen des Transports beteiligt sind. In Neuronen wurden bei verschiedenen lokalisierten Transkripten RNP-Partikel beobachtet. Beispielsweise führte die Expression von rekombinanter MAP2-mRNA in kultivierten Neuronen zu Partikeln, die mit dem Zytoskelett assoziiert zu sein scheinen (Blichenberg *et al.*, 1999). Ein putativer Interaktionspartner für die MAP2-mRNA ist das RNA-Bindeprotein rStaufen (Monshausen *et al.*, 2001). Köhrmann *et al.* (1999) zeigten, daß GFP-hStaufen

Partikel bildet, die sich in den Dendriten entlang der Mikrotubuli bidirektional bewegen. Ein weiteres neuronales RNA-Bindeprotein, FMRP, kommt im Zytoplasma in großen RNP-Komplexen vor, die mit translatierenden Polyribosomen assoziiert vorliegen (Eberhart *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 2001). In diesem Fall wurde eine Beteiligung von FMRP an der Translation möglicherweise unterschiedlicher neuronaler RNAs postuliert. Für embryonales FeRB1 konnte eine Assoziation sowohl mit freien Ribosomen als auch mit Polyribosomen gezeigt werden. Dies deutet ebenso auf eine mögliche Beteiligung der FeRB1 bzw. FeRB2-RNP-Partikel an translationaler Regulation hin. Das Vorkommen von RNP-Partikeln bei unterschiedlichen RNA-Bindeproteinen könnte auch auf einen konservierten Mechanismus zur Translokation von Transkripten hindeuten. Für Mitglieder der ZBP-1-Familie konnte bereits in zwei Fällen ein Vorkommen der Proteine in RNP-Partikeln gezeigt werden. Nielsen *et al.* (2002) zeigten in Fibroblasten, daß rekombinantes IMP-1 in 200-700 nm großen RNP-Partikeln entlang des Zytoskeletts zum sogenannten *leading edge* bewegt wird. In Neuriten und Wachstumskegeln des embryonalen Hühner-Vorderhirns konnte eine Co-Lokalisierung von ZBP-1 und β -Aktin-mRNA sowie eine lokale Synthese der zytoskeletalen Proteine beobachtet werden (Zhang *et al.*, 2001). Denkbar wäre ebenso eine Beteiligung von FeRB1 am Prozeß des Transportes von β -Aktin-Transkripten, da *in vitro* eine schwache Interaktion von FeRB1 mit der β -Aktin mRNA gezeigt werden konnte.

Es ist ebenso denkbar, daß FeRB1 und FeRB2 an weiteren Aspekten der posttranskriptionalen Regulation beteiligt sind. Innerhalb der Sequenz von FeRB1 und FeRB2 konnte sowohl ein Kern-Lokalisierung-Signal (NLS) als auch ein Kern-Export-Signal (NES) identifiziert werden. Experimente mit einem Inhibitor des nukleären Exports, Leptomycin B, zeigten eine Akkumulation sowohl von GFP-FeRB1 als auch von GFP-FeRB2 im Zellkern. Diese Beobachtungen konnten bestätigt werden, nachdem die NES-Sequenzen in beiden Proteinen mutiert wurden und so ebenfalls der Export aus dem Kern inhibiert werden konnte. Die Ergebnisse zeigen, daß FeRB1 und FeRB2 zwischen dem Kern und dem Zytoplasma hin und her transportiert werden können. Untersuchungen der letzten Jahre am Mechanismus des nukleären Exportes zeigten eine Beteiligung einer konservierten Familie von Transportrezeptoren, die als Karyopherine oder auch Importine/Exportine bekannt sind (Mattaj & Englmeier, 1998; Görlich & Kutay, 1999; Reed & Hurt, 2002). Der Exportrezeptor CRM 1 (Exportin 1) bindet direkt an NES-Sequenzen des zu transportierenden Proteins. Mitglieder der Karyopherin-Familie sind auch am Transport verschiedener Klassen von RNAs beteiligt, unter anderem rRNAs, tRNAs, und snRNAs (Nakielny & Dreyfuss, 1999). Es

ist also möglich, daß FeRB1 potentielle Ziel-mRNAs im Kern bindet, diese ins Zytoplasma transportiert und dort weiterhin innerhalb eines RNP-Komplexes mit diesen assoziiert bleibt. Ein weiteres neuronales RNA-Bindeprotein mit ähnlichem subzellulärem Verteilungsmuster wie FeRB1 und FeRB2 ist das FMRP, das an der häufig vorkommenden mentalen Degeneration "Fragiles X Syndrom" beteiligt ist. Es konnte gezeigt werden, daß dieses hauptsächlich im Zytoplasma vorkommende Protein ebenso über NES und NLS-Sequenzen verfügt und über den CRM 1 Rezeptor aus dem Kern ausgeschleust wird (Eberhart *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1997). Darnell *et al.*, 2001 stellen die Hypothese auf, daß sich FMRP vom Kern zu postsynaptischen Bereichen bewegt, wo mRNA-Moleküle in einer translational reprimierten Form gehalten werden, bis synaptische Aktivität die Funktion von FMRP verändert und so mRNA Translation erlaubt. Eine ähnliche Funktion könnte für FeRB1 und FeRB2 angenommen werden, da die genutzten Signalsequenzen und Exportwege identisch sind. Es ist noch unklar, welche Transkripte vom RNA-Bindeprotein FMRP gebunden werden, aber neuere Untersuchungen weisen auf eine Vielzahl potentieller RNA-Ziele hin (Brown *et al.*, 2001). In den meisten bisher identifizierten Protein-RNA-Interaktionen konnte ein *cis*-Element in der RNA identifiziert werden, das vom RNA-Bindeprotein erkannt und/oder gebunden wird. Brown *et al.* (2001) zeigten, daß in 67% der angenommenen RNA-Ziele ein strukturelles Element in der Form von G-Quartetts vorhanden ist. Möglicherweise erkennen FeRB1 und FeRB2 ähnliche Strukturen in ihren RNA-Zielen. Um weitere Aussagen über die Funktion von FeRB1 und FeRB2 machen zu können, wird es zukünftig notwendig sein, die RNA-Ziele zu identifizieren. Dies könnte über die Immunpräzipitation von RNA mit FeRB1-enthaltenen RNP-Partikeln geschehen und die folgende Untersuchung, wie diese Transkripte aus dem Kern ausgeschleust werden.

Weitere Hinweise auf die Funktion eines neu identifizierten Proteins ergeben sich häufig über die Untersuchung weiterer Interaktionspartner. In einem Hefe Zwei-Hybrid-System wurde in dieser Arbeit der spezifische Interaktionspartner rLMO1, das Rattenhomolog des *Lim-only*-Protein 1 (LMO1), identifiziert. LMO1 gehört zur Familie der *Lim-only*-Proteine, da sie ausschließlich aus zwei Lim-Domänen bestehen (Dawid *et al.*, 1998; Jurata & Gill, 1998). Diese Domänen sind cysteinreiche, Zink-bindende Motive, die ursprünglich neben Homeodomänen in den drei Transkriptionsfaktoren Lin-11, Isl-1 und Mec-3 identifiziert wurden (Freyd *et al.*, 1990; Karlsson *et al.*, 1990). Bislang wurden eine Vielzahl von Lim-Domänen enthaltenen Proteinen identifiziert, die wichtige Funktionen in vielen biologischen Prozessen übernehmen. Man geht davon aus, daß die Lim-Domänen Protein-Protein-

Interaktionen vermitteln und die Proteine somit häufig als wichtige Adapter-Moleküle in Multiproteinkomplexen wirken (Bach, 2000). Zur Familie der *Lim-only*-Proteine gehören bisher 4 Mitglieder: LMO1-4. LMO1 und LMO2 wurden als Onkogen-Produkte identifiziert und sind in Zelldifferenzierungsvorgängen sowie während der Entwicklung des ZNS aktiv (Hinks *et al.*, 1997). Die Gene wurden an Regionen starker Transkriptionsaktivität im Bereich von chromosomalen Translokationspunkten identifiziert, die mit T-Zell Leukämie assoziiert sind (McGuire *et al.*, 1989; Boehm *et al.*, 1991). Für *Lim-only*-Proteine vermutet man eine Rolle in Lim-Lim-Assoziationen (Rabbitts & Boehm, 1990) durch die indirekt die Transkription beeinflusst werden könnte. Dies geht aus ihrer Rolle als Regulatoren der Zelldifferenzierung und Tumorigenese hervor (Boehm *et al.*, 1991; Sanchez-Garcia *et al.*, 1993; Warren *et al.*, 1994). Das macht sie zu wichtigen Regulationsfaktoren, da weitere Lim-Proteine, mit denen putative Interaktionen eingegangen werden können, weit verbreitet sind. Allerdings konnte auch gezeigt werden, daß Lim-Domänen Interaktionen mit anderen Domänen vermitteln können. Dye & Patton (2001) zeigten eine Interaktion zwischen einer Lim-Domäne und der RRM-Domäne des RNA-Bindeproteins PSF (*Polypyrimidin tract binding protein-associated splicing factor*). Es war bereits bekannt, daß auch RRM-Domänen nicht nur für die Bindung mit RNA verantwortlich sind, sondern auch Protein-Protein-Interaktionen eingehen können (Chen *et al.*, 1997; Samuels *et al.*, 1998). Die Bindung an das RNA-Bindeprotein FeRB1 konnte auf einen Bereich der zweiten Lim-Domäne mit C-terminal flankierenden Bereichen sowie die Region der RRM-Domänen in FeRB1 eingegrenzt werden. Vermutlich vermittelt die Region außerhalb der 2. Lim-Domäne die Spezifität der Interaktion mit FeRB1. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß trotz der hohen Homologie der *Lim-only*-Proteine untereinander eine Bindung von FeRB1 ausschließlich an rLMO1 erfolgte. Diese Spezifität könnte funktionell wichtig sein. *Lim-only*-Proteine wurden häufig in Zusammenhang mit Cofaktoren der Transkription gebracht, da sie in einigen Fällen mit der Lim-Domäne von Lim-Homeobox-Transkriptionsfaktoren oder bHLH (*basic helix-loop-helix*)-Transkriptionsfaktoren interagieren können (Wadman *et al.*, 1994; Sugihara *et al.*, 1998). Wadman *et al.* (1994) zeigten, daß die Lim-bHLH-Interaktionen in Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie (T-ALL) hochspezifisch sind, da die Interaktion von LMO1 und LMO2 spezifisch mit TAL1-verwandten bHLH-Proteinen (Sanchez-Garcia *et al.*, 1993) interagieren und nicht mit anderen bHLH-Transkriptionsfaktoren. Weiterhin wurde ein *Lim-only*-Protein identifiziert, daß mit den Transkriptionsfaktoren CREM und CREB interagiert (Fimia *et al.*, 1999). In diesem Fall wurde gezeigt, daß das Lim-Protein ACT (*activator of CREM in testis*) intrinsische Aktivierungsfunktion besitzt, die die bisher

bekannte Aktivierung von CREM und CREB über Phosphorylierung und beteiligte *second-messenger*-Systeme umgeht (Fimia *et al.*, 1999). In dieser Arbeit wurde der Einfluß der Interaktion von FeRB1 und rLMO1 auf die Bindungsfähigkeit des *Lim-only*-Proteins mit Lim-Domänen enthaltenden Cofaktoren untersucht. Sugihara *et al.* (1998) zeigten eine Interaktion des Coregulators Clim2 mit LMO4 und dem DNA-Bindeprotein DEAF1. Alle Mitglieder der *Lim-only* Proteinfamilie können mit Clim2 interagieren. Möglich wäre also eine Konkurrenz von FeRB1 und Clim2 um die Interaktion mit rLMO1, was durch die Lokalisierung dieses trimären Komplexes im Zellkultursystem untersucht wurde. Eine Colokalisierung von FeRB1 und rLMO1 erfolgte ausschließlich im Zytoplasma, während Clim2 und rLMO1 im Zellkern interagierten. Erfolgte eine Expression aller drei Proteine, interagierte rLMO1 mit Clim2 im Zellkern. Diese Ergebnisse bestätigen eine Konkurrenz von Clim2 und FeRB1 um rLMO1. Möglicherweise hängt es von speziellen physiologischen Bedingungen ab, zu welchen Zeitpunkten rLMO1 eine Interaktion mit FeRB1 eingeht. Es wäre von großem Interesse, weitere Transkriptionswege auf die Mitwirkung von FeRB1 oder rLMO1 zu untersuchen. Ein zelluläres Analysesystem, bei dem die Wirkung von Cofaktoren auf bekannte Transkriptionsfaktoren untersucht werden kann, wäre hierbei sehr hilfreich. Außerdem wäre es interessant zu untersuchen, ob rLMO1 wie es für ACT und CREM/CREB in Testis gezeigt wurde, mit dem in Dendriten lokalisierten Transkriptionsfaktor CREB interagieren kann.

Durch *in situ*-Hybridisierungen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß rLMO1 hauptsächlich in neuronalem Gewebe vorkommt. Eine Expression des rLMO1-Gens erfolgt in Rattenembryonen besonders in Bereichen des cerebralen Cortex, des Mesencephalons sowie in Bereichen stark differenzierenden Gewebes um den vierten Ventrikel. Diese Beobachtungen werden gestützt durch Untersuchungen von Hincks *et al.* (1997), die zeigen konnten, daß LMO1 im Gehirn der Maus hauptsächlich im Hippocampus sowie im cerebralen Cortex exprimiert wird. Durch Northern Blot-Untersuchungen wurde in dieser Arbeit gezeigt, daß die Expression von rLMO1 ebenso wie die von FeRB1 und FeRB2 auf embryonales Gewebe beschränkt ist. Dies deutet wiederum auf eine entwicklungspezifische Regulation hin, die auch für die RNA-Bindeproteine der ZBP-1-Familie vermutet wird. Hincks *et al.* (1997) zeigten, daß die Expression von LMO1 in adulten Mäusen durch Kainat induzierte epileptische Anfälle in Pyramidenzellen des Hippocampus angeschaltet werden kann. Dies deutet auf eine differentielle Regulation durch neuronale Aktivität hin. Somit kann eine Beteiligung von FeRB1 und rLMO1 an posttranskriptionalen Regulationsmechanismen, die durch synaptische Aktivität beeinflußt sein können, angenommen werden. Um diese

Hypothese näher zu untersuchen wären in der Zukunft weitere Experimente hinsichtlich assoziierter Faktoren nötig, die in diesen Regulationsmechanismen eine weitere Rolle spielen. Dies könnte über eine weitere Identifizierung von Interaktionspartnern über das Hefe Zwei-Hybrid-System geschehen oder aber durch die Untersuchung FeRB1-enthaltenen RNP-Partikeln durch Immunpräzipitation. Dies könnte dazu beitragen, RNA- oder Protein-Interaktionspartner zu identifizieren, die weitere Aufschlüsse über die Funktion von FeRB1 und FeRB2 zuließen.

Zusammengenommen deuten die Ergebnisse dieser Arbeit auf eine Beteiligung von RNA-Bindeproteinen an einer Vielzahl von regulatorischen Aspekten des RNA-Metabolismus hin. Besonders während der Entwicklung vieler Organismen scheint eine Gruppe von RNA-Bindeproteinen wichtige Funktionen hinsichtlich posttranskriptionaler Regulation auszuüben. Rekombinantes FeRB1 und FeRB2 kann in Ribonukleoprotein-Partikeln in hippocampalen Neuronen der Ratte detektiert werden, was auf eine Beteiligung am Transport lokalisierter Transkripte hindeutet. Dafür spricht die präferentielle Lokalisierung im Zytoplasma. Zu gewissen Stadien können beide Proteine auch im Zellkern detektiert werden, wo eine Assoziation mit mRNA oder auch mit anderen nukleären Faktoren stattfinden könnte. FeRB1 interagiert mit einem Onkogenprodukt, dem *Lim-only*-Protein rLMO1. Durch die Interaktion mit rLMO1 ist eine Beteiligung an posttranskriptionalen wie auch -translationalen Regulationsmechanismen denkbar, die durch neuronale Aktivität gesteuert werden können. Diese Funktionen werden hauptsächlich während der Entwicklung bzw. Differenzierung ausgeübt, da sowohl die RNA-Bindeproteine als auch rLMO1 hauptsächlich während der Embryogenese vorhanden sind und onkogene Eigenschaften aufweisen.

Für zukünftige Untersuchungen wäre es interessant aufzuklären, welche Entwicklungsvorgänge durch diese RNA-Bindeproteine reguliert werden. Dies könnte durch Untersuchungen geschehen, in denen einzelne Bereiche der RNA-Bindeproteine deletiert werden. Denkbar wäre auch die Herstellung transgener Mäuse bzw. der *knock out* der Gene. Weiterhin ist es wichtig herauszufinden, welche spezifischen RNA-Interaktionen durch FeRB1 und FeRB2 eingegangen werden können. Eine Untersuchung der FeRB1- und FeRB2-enthaltenen RNP-Partikel könnte wichtige Erkenntnisse über die Regulationsmechanismen dieser Familie von RNA-Bindeproteinen liefern.

5 Literaturverzeichnis

- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. (1999).** Short protocols in molecular biology. Fourth Edition. John Wiley and Sons Inc.
- Bach, I. (2000).** The Lim domain: regulation by association. *Mech Dev* 91(1-2), 99-103.
- Bashirullah, A., Cooperstock, R. L. & Lipshitz, H. D. (1998).** RNA localization in development. *Annu Rev Biochem* 67, 335-94.
- Bassell, G. J., Zhang, H., Byrd, A. L., Femino, A. M., Singer, R. H., Taneja, K. L., Lifshitz, L. M., Herman, I. M. & Kosik, K. S. (1998).** Sorting of beta-actin mRNA and protein to neurites and growth cones in culture. *J Neurosci* 18(1), 251-65.
- Bassell, G. J., Oleynikov, Y. & Singer, R. H. (1999).** The travels of mRNAs through all cells large and small. *Faseb J* 13(3), 447-54.
- Bassell, G. J. & Singer, R. H. (2001).** Neuronal RNA localization and the cytoskeleton. *Res Probl Cell Differ* 34, 41-56. In: Cell Polarity an Subcellular RNA Localization, Richter, D. (ed), Springer-Verlag.
- Berleth, T., Burri, M., Thoma, G., Bopp, D., Richstein, S., Frigerio, G., Noll, M. & Nusslein-Volhard, C. (1988).** The role of localization of bicoid RNA in organizing the anterior pattern of the Drosophila embryo. *Embo J* 7(6), 1749-56.
- Bian, F., Chu, T., Schilling, K. & Oberdick, J. (1996).** Differential mRNA transport and the regulation of protein synthesis: selective sensitivity of Purkinje cell dendritic mRNAs to translational inhibition. *Mol Cell Neurosci* 7(2), 116-33.
- Blichenberg, A., Schwanke, B., Rehbein, M., Garner, C. C., Richter, D. & Kindler, S. (1999).** Identification of a cis-acting dendritic targeting element in MAP2 mRNAs. *J Neurosci* 19(20), 8818-29.
- Boehm, T., Baer, R., Lavenir, I., Forster, A., Waters, J. J., Nacheva, E. & Rabbitts, T. H. (1988).** The mechanism of chromosomal translocation t(11;14) involving the T-cell receptor C delta locus on human chromosome 11q14 and a transcribed region of chromosome 11p15. *EMBO J.* 7(2), 385-394.
- Boehm, T., Spilantini, M. G., Sofroniew, M. V, Surani, M. A. & Rabbitts, T. H. (1991).** Developmentally regulated and tissue specific expression of mRNAs encoding the two alternative forms of the lim domain oncogene rhombotin: evidence for thymus expression. *Oncogene* 6, 695-703.
- Brosius, J. & Tiedge, H. (1995).** Neural BC1 RNA: dendritic localization and transport. In: Lipshitz, H.D. (ed.): Localized RNAs. Landes, Austin, 289-300.
- Brosius, J. & Tiedge, H. (2001).** Neuronal BC1 RNA: intracellular transport and activity-dependent modulation. *Res Probl Cell Differ* 34 129-38, In: Cell Polarity and Subcellular

RNA Localization, Richter, D. (ed.), Springer-Verlag.

Brown, V., Jin, P., Ceman, S., Darnell, J., O'Donnell, W. T., Tenenbaum, S. A., Jin, X., Feng, Y., Wilkinson, K. D., Deene, J. D., Barnell, R. B. & Warren, S. T. (2001). Microarray Identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. *Cell* **107**, 477-87.

Brugg, B. & Matus, A. (1991). Phosphorylation determines the binding of microtubule-associated protein 2 (MAP2) to microtubules in living cells. *J Cell Biol* **114**(4), 735-43.

Burd, C. G. & Dreyfuss, G. (1994). Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* **265**(5172), 615-21.

Burgin, K. E., Waxham, M. N., Rickling, S., Westgate, S. A., Mobley, W. C. & Kelly, P. T. (1990). In situ hybridization histochemistry of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in developing rat brain. *J Neurosci* **10**(6), 1788-98.

Carlier, M. F. (1991). Actin: protein structure and filament dynamics. *J Biol Chem* **266**(1), 1-4.

Carson, J. H., Worboys, K., Ainger, K. & Barbarese, E. (1997). Translocation of myelin basic protein mRNA in oligodendrocytes requires microtubules and kinesin. *Cell Motil Cytoskeleton* **38**(4), 318-28.

Chen, T., Damaj, B. B., Herrera, C., Lasko, P. & Richard, S. (1997). Self-association of the single-KH-domain family members Sam68, GRP33, GLD-1, and Qk1: role of the KH domain. *Mol Cell Biol* **17**(10), 5707-18.

Cooper, J. A. (1991). The role of actin polymerization in cell motility. *Annu Rev Physiol* **53**, 585-605.

Coulis, C. M., Lee, C. & Nardone, V. (2000). Inhibition of c-myc expression in cells by targeting an RNA-protein interaction using oligonucleotides. *Mol Pharmacol* **57**, 485-94.

Crino, P. B. & Eberwine, J. (1996). Molecular characterization of the dendritic growth cone: regulated mRNA transport and local protein synthesis. *Neuron* **17**(6), 1173-87.

Crino, P. B. & Eberwine, J. (1997). Cellular and molecular basis of cerebral dysgenesis. *J Neurosci Res* **50**(6), 907-16.

Crino, P., Khodakhah, K., Becker, K., Ginsberg, S., Hemby, S. & Eberwine, J. (1998). Presence and phosphorylation of transcription factors in dendrites. *Proc Natl Acad Sci* **95**, 2313-8.

Curtis, D., Lehmann, R. & Zamore, P.D. (1995). Translational regulation in development. *Cell* **81**(1), 171-178.

Dawid, I. B., Toyama, R. & Taira, M. (1995). Lim domain proteins. *C R Acad Sci III* **318**(3), 295-306.

Dawid, I. B., Breen, J. J. & Toyama, R. (1998). Lim domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. *Trands Genet* **14**(4), 156-62.

- Darnell, J. C., Jensen, K. B., Jin, P., Brown, V., Warren, S. T. & Darnell, R. B. (2001).** Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. *Cell* **107**(4), 489-99.
- Delbridge, M. L., Harry, J. L., Toder, R., O'Neill, R. J., Ma, K., Chandley, A. C. & Graves, J. A. (1997).** A human candidate spermatogenesis gene, RBM1, is conserved and amplified on the marsupial Y chromosome. *Nat Genet* **15**(2), 131-6.
- Deshler, J. O., Highett, M. I. & Schnapp, B. (1997).** Localization of Xenopus Vg1 mRNA by VERA Protein and the endoplasmic reticulum. *Science* **279**, 1128-31.
- Deshler, J. O., Highett, M. I., Abramson, T. & Schnapp, B. J. (1998).** A highly conserved RNA-binding protein for cytoplasmic mRNA localization in vertebrates. *Curr Biol* **8**(9), 489-96.
- Doyle, G. A. R., Betz, N. A., Leeds, P. F., Fleisig, A. J., Prokipcak, R. D. & Ross, J. (1998).** The c-myc coding region determinant binding protein: a member of a family of KH domain RNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res* **26**(22), 5036-44.
- Dye, B. T. & Patton, J. G. (2001).** An RNA recognition motif (RRM) is required for the localization of PTB-associated splicing factor (PSF) to subnuclear speckles. *Exp Cell Res* **263**, 131-44.
- Eberhart, C. G., Maines, J. Z. & Wasserman, S. A. (1996).** Meiotic cell cycle requirement for a fly homologue of human deleted in Azoospermia. *Nature* **381**(6585), 783-5.
- Eberhart, D. E., Malter, H. E., Feng, Y. & Warren, S. T. (1996).** The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals. *Hum Mol Genet* **5**, 1083-91.
- Eberwine, J., Job, C., Eacharina, J. E., Miyashiro, K. & Therianos, S. (2001).** Transcription factors in dendrites: dendritic imprinting of the cellular nucleus. *Res Probl Cell Differ* **34**, 83-104. In: *Cell Polarity and Subcellular RNA Localization*, Richter, D. (ed.), Springer-Verlag.
- Elisha, Z., Havin, L., Ringel, I. & Yisraeli, J. K. (1995).** Vg1 RNA binding protein mediates the association of Vg1 RNA with microtubules in Xenopus oocytes. *Embo J* **14**(20), 5109-14.
- Ephrussi, A., Dickinson, L. K. & Lehmann, R. (1991).** Oskar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant nanos. *Cell* **66**(1), 37-50.
- Feng, Y., Gutekunst, C. A., Eberhart, D. E., Warren, S. T. & Hersch, S. M. (1997).** Fragile X mental retardation protein-nucleocytoplasmic shuttling and association with somatodendritic ribosomes. *J Neurosci* **17**(5), 1539-47
- Ferrandon, D., Elphick, L., Nusslein-Volhard, C. & St Johnston, D. (1994).** Staufen protein associates with the 3'-UTR of bicoid mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner. *Cell* **79**(7), 1221-32.

- Fimia, G. M., De Cesare, D. & Sassone-Corsi, P. (2000).** A family of LIM-only Transcriptional coactivators: tissue-specific expression and selective activation of CREB and CREM. *Mol Cell Biol* **20**(22), 8613-22
- Finkenstadt, P. M., Kang, W. S., Jeon, M., Taira, E., Tang, W. & Baraban, J. M. (2000).** Somatodendritic localization of Translin, a component of the Translin/Trax RNA binding complex. *J Neurochem* **75**(4), 1754-62.
- Freyd, G., Kim, S. K. & Horvitz, H. R. (1990).** Novel cystein-rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell lineage gene lin-II. *Nature* **344**(6269), 876-9.
- Furuichi, T., Simon-Chazottes, D., Fujino, I., Yamada, N., Hasegawa, M., Miyawaki, A., Yoshikawa, S., Guenet, J. L. & Mikoshiba, K. (1993).** Widespread expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 gene (Insp3r1) in the mouse central nervous system. *Receptors Channels* **1**(1), 11-24.
- Gardiol, A., Racca, C. & Triller, A. (1999).** Dendritic and postsynaptic protein synthetic machinery. *J Neurosci* **19**(1), 168-79.
- Garner, C. C., Tucker, R. P. & Matus, A. (1988).** Selective localization of messenger RNA for cytoskeletal protein MAP2 in dendrites. *Nature* **336**(6200), 674-7.
- Ghisolfi, L., Kharrat, A., Joseph, G., Amalric, F. & Erard, M. (1992).** Concerted activities of the RNA recognition and the glycine-rich C-terminal domains of nucleolin are required for efficient complex formation with pre-ribosomal RNA. *Eur J Biochem* **209**(2), 541-548.
- Görlich, D. & Kutay, U. (1999).** Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 607-60.
- Görlach, M., Burd, C. G. & Dreyfuss, G. (1994).** The mRNA poly(A)-binding protein: localization, abundance, and RNA-binding specificity. *Exp Cell Res* **211**(2), 400-7.
- Havin, L., Git, A., Elisha, Z., Oberman, F., Yaniv, K., Schwartz, S. P., Standart, N. & Yisraeli, J. K. (1998).** RNA-binding protein conserved in both microtubule- and microfilament-based RNA localization. *Genes Dev* **12**(11), 1593-8.
- Herb, A., Wisden, W., Catania, M. V., Marechal, D., Dresse, A. & Seeburg, P. H. (1997).** Prominent dendritic localization in forebrain neurons of a novel mRNA and its product, dendrin. *Mol Cell Neurosci* **8**(5), 367-74.
- Hill, M. A. & Gunning, P. (1993).** Beta and gamma actin mRNAs are differentially located within myoblasts. *J Cell Biol* **122**(4), 825-32.
- Hill, M. A., Schedlich, L. & Gunning, P. (1994).** Serum-induced signal transduction determines the peripheral location of beta-actin mRNA within the cell. *J Cell Biol* **126**(5), 1221-9.

- Hinks, G. L., Shah, B., French, S. J., Campos, L. S., Stately, K., Hughes, J. & Sofroniew, M. V. (1997).** Expression of LIM Protein Genes Lmo1, Lmo2 and Lmo3 in adult mouse hippocampus and other forebrain regions: differential regulation by seizure activity. *J Neurosci* **17**(14), 5549-59.
- Hoock, T. C., Newcomb, P. M. & Herman, I. M. (1991).** Beta actin and its mRNA are localized at the plasma membrane and the regions of moving cytoplasm during the cellular response to injury. *J Cell Biol* **112**(4), 653-64.
- Illenberger, S., Drewes, G., Trinczek, B., Biernat, J., Meyer, H. E., Olmsted, J. B., Mandelkow, E. M. & Mandelkow, E. (1996).** Phosphorylation of microtubule-associated proteins MAP2 and MAP4 by the protein kinase p110mark. Phosphorylation sites and regulation of microtubule dynamics. *J Biol Chem* **271**(18), 10834-43.
- Ioannidis, P., Trangas, T., Dimitriadis, E., Samiotaki, M., Kyriazoglou, I., Tsiapalis, C. M., Kittas, C., Agnantis, N., Nielsen, F. C., Nielsen, J., Christiansen, J. & Pandis, N. (2001).** C-MYC and IGF-II mRNA-binding protein (CRD-BP/IMP-1) in benign and malignant mesenchymal tumors. *Int J Cancer* **94**(4), 480-4.
- Itoh, T. J., Hisanaga, S., Hosoi, T., Kishimoto, T. & Hotani, H. (1997).** Phosphorylation states of microtubule-associated protein 2 (MAP2) determine the regulatory role of MAP2 in microtubule dynamics. *Biochemistry* **36**(41), 12574-82.
- Jansen, R. P. (2001).** mRNA localization: message on the move. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 247-56.
- Johnstone, O. & Lasko, P. (2001).** Translational regulation and RNA localization in *Drosophila* oocytes and embryos. *Annu Rev Genet* **35**, 365-406.
- Joseph, E. M. & Melton, D. A. (1998).** Mutant Vg1 ligands disrupt endoderm and mesoderm formation in *Xenopus* embryos. *Development* **125**(14), 2677-85.
- Jurata, L. W. & Gill, N. W. (1998).** Structure and function of Lim domains. *Curr Top Microbiol Immunol* **228**, 75-113.
- Karlsson, O., Thor, S., Norberg, T., Ohlsson, H. & Edlund, T. (1990).** Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeodomain and a Cys-His domain. *Nature* **344**(6269), 879-82.
- Kennedy, M. B. (2000).** Signal-processing machines at the postsynaptic density. *Science* **290**(5492), 750-4.
- Kiebler, M. A., Hemraj, I., Verkade, P., Kohrmann, M., Fortes, P., Marion, R. M., Ortin, J. & Dotti, C. G. (1999).** The mammalian staufer protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport. *J Neurosci* **19**(1), 288-97.
- Kiebler, M. A., Hemraj, I., Verkade, P., Kohrmann, M., Fortes, P., Marion, R. M., Ortin, J. & Dotti, C. G. (1999).** The mammalian staufer protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport. *J Neurosci* **19**(1), 288-97.

- Kiledjian, M. & Dreyfuss, G. (1992).** Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *EMBO J* **11**(7), 2655-64.
- Kim, J. H. & Huganir, R. L. (1999).** Organization and regulation of proteins at synapses. *Curr Opin Cell Biol* **11**(2), 248-54.
- Kindler, S., Mohr, E. & Richter, D. (1997).** Quo vadis: extrasomatic targeting of neuronal mRNAs in mammals. *Mol Cell Endocrinol* **128**(1-2), 7-10.
- Kindler, S., Mohr, E., Rehbein, M. & Richter, D. (2001).** Extrasomatic targeting of MAP2, Vasopressin and Oxytocin mRNAs in mammalian neurons. *Res Probl Cell Differ* **34**, 83-104. In: Cell Polarity and Subcellular RNA Localization, Richter, D. (ed.), Springer-Verlag.
- Kindler, S. & Monshausen, M. (2002).** Candidate RNA-binding proteins regulating extrasomatic mRNA targeting and translation in mammalian neurons. *Mol Neurobiol* **25**(2), 149-65.
- King, M. L., Zhou, Y. & Bubunencko, M. (1999).** Polarizing genetic information in the egg: RNA localization in the frog oocyte. *Bioessays* **21**(7), 546-57.
- Kislauskis, E. H., Li, Z., Singer, R. H. & Taneja, K. L. (1993).** Isoform-specific 3'-untranslated sequences sort alpha-cardiac and beta-cytoplasmic actin messenger RNAs to different cytoplasmic compartments. *J Cell Biol* **123**(1), 165-72.
- Kloc, M., Bilinski, S., Chan, A. P., Allen, L. H., Zearfoss, N. R. & Etkin, L. D. (2001).** RNA localization and germ cell determination in *Xenopus*. *Int Rev Cytol* **203**, 63-91.
- Knowles, R. B., Sabry, J. H., Martone, M. E., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Bassell, G. J. & Kosik, K. S. (1996).** Translocation of RNA granules in living neurons. *J Neurosci* **16**(24), 7812-20.
- Kobayashi, S., Takashima, A. & Anzai, K. (1998).** The dendritic translocation of translin protein in the form of BC1 RNA protein particles in developing rat hippocampal neurons in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* **253**(2), 448-53.
- Kohrmann, M., Luo, M., Kaether, C., DesGroseillers, L., Dotti, C. G. & Kiebler, M. A. (1999).** Microtubule-dependent recruitment of Staufen-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons. *Mol Biol Cell* **10**(9), 2945-53.
- Krichevsky, A. M. & Kosik, K. S. (2001).** Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation-dependent translation. *Neuron* **32**(4), 683-96.
- Kudo, N., Taoka, H., Yoshida, M. & Horinouchi, S. (1999).** Identification of a novel nuclear export signal sensitive to oxidative stress in yeast AP1-like transcription factor. *Ann NY Acad Sci* **886**, 204-7.
- Kuhl, D. & Skehel, P. (1998).** Dendritic localization of mRNAs. *Curr Opin Neurobiol*

8(5), 600-6.

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

Lawrence, J. B. & Singer, R. H. (1986). Intracellular localization of messenger RNAs for cytoskeletal proteins. *Cell* **45**(3), 407-15.

Leeds, P., Kren, B. T., Boylan, J. M., Betz, N. A., Steer, C. J., Gruppuso, P. A. & Ross, J. (1997). Developmental regulation of CRD-BP, an RNA-binding protein that stabilizes c-myc mRNA in vitro. *Oncogene* **14**(11), 1279-86.

Link, W., Konietzko, U., Kauselmann, G., Krug, M., Schwanke, B., Frey, U. & Kuhl, D. (1995). Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(12), 5734-8.

Lipshitz, H. D. & Smibert, C. A. (2000). Mechanisms of RNA localization and translational regulation. *Curr Opin Genet Dev* **10**(5), 476-88.

Lisman, J., Malenka, R. C., Nicoll, R. A. & Malinow, R. (1997). Learning mechanisms: the case for CaM-KII. *Science* **276**(5321), 2001-2.

Lyford, G. L., Yamagata, K., Kaufmann, W. E., Barnes, C. A., Sanders, L. K., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Lanahan, A. A. & Worley, P. F. (1995). Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* **14**(2), 433-45.

Marion, R. M., Fortes, P., Beloso, A., Dotti, C. & Ortin, J. (1999). A human sequence homologue of Staufen is an RNA-binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* **19**(3), 2212-9.

Mattaj, I. J. & Englmeier, L. (1998). Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu Rev Biochem.* **67**, 265-306

McGuire, E. A., Hickett, R. D., Pollock, K. M., Bartholdi, M. F., O'Brien, S. J. & Korsmeyer, S. J. (1989). The t(11;14)(p15;q11) in a T-cell acute lymphoblastic leukemia cell line activates multiple transcripts including Ttg-1, a gene encoding a potential zinc finger protein. *Mol Cell Biol* **9**(5), 2124-32.

Mayford, M., Wang, J., Kandel, E. R. & O'Dell, T. J. (1995). CaMKII regulates the frequency-response function of hippocampal synapses for the production of both LTD and LTP. *Cell* **81**(6), 891-904.

Micklem, D. R., Adams, J., Grunert, S. & St Johnston, D. (2000). Distinct roles of two conserved Staufen domains in oskar mRNA localization and translation. *Embo J* **19**(6), 1366-77.

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.

- Sanchez-Garcia, I., Osada, H., Forster, A. & Rabbitts, T. H. (1993).** The cystein-rich LIM domains inhibit DNA binding by the associated homeodomain in Isl-1. *EMBO J* **12**, 4243-50.
- Schnapp, B. J. (1999).** A glimpse of the machinery. *Curr Biol* **9**(19), R725-7.
- Schwartz, S. P., Aisenthal, L., Elisha, Z., Oberman, F. & Yisraeli, J. K. (1992).** A 69-kDa RNA-binding protein from *Xenopus* oocytes recognizes a common motif in two vegetally localized maternal mRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(24), 11895-9.
- Seydoux, G. & Schedl, T. (2001).** The germline in *C. elegans*: origins, proliferation, and silencing. *Int Rev Cytol* **203**, 139-85.
- Shuster, C.B. & Herman, I.M. (1995).** Indirect association of ezrin with F-actin: isoform-specificity and calcium sensitivity. *J Cell Biol* **128**, 837-48.
- Singer, R. H. (1992).** The cytoskeleton and mRNA localization. *Curr Opin Cell Biol* **4**(1), 15-9.
- Singer, R. H. (1993).** RNA zipcodes for cytoplasmic addresses. *Curr Biol* **3**, 719-721
- Siomi, H., Matunis, M. J., Michael, W. M. & Dreyfuss, G. (1993).** The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif. *Nucleic Acids Res* **21**(5), 1193-8.
- Siomi, H., Choi, M., Siomi, M. C., Nussbaum, R. L. & Dreyfuss, G. (1994).** Essential role for KH domains in RNA binding: impaired RNA binding by a mutation in the KH domain of FMR1 that causes fragile X syndrome. *Cell* **77**(1), 33-9.
- Siomi, H. & Dreyfuss, G. (1997).** RNA-binding proteins as regulators of gene expression. *Curr Opin Genet Dev* **7**(3), 345-53.
- 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.
- St Johnston & Nusslein-Volhard, C. (1992).** The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo *Cell* **68**(3), 201-19.
- St Johnston, D., Brown, N. H., Gall, J. G. & Jantsch, M. (1992).** A conserved double-stranded RNA-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(22), 10979-83.
- St Johnston, D. (1995).** The intracellular localization of messenger RNAs. *Cell* **81**(2), 161-70.
- Steinert, P. M., Mack, J. W., Korge, B. P., Gan, S. Q., Haynes, S. R. & Steven, A. C. (1991).** Glycine loops in proteins: their occurrence in certain intermediate filament chains, loricrins and single-stranded RNA binding proteins. *Int J Biol Macromol* **13**, 130-9.
- Steward, O. & Levy, W. B. (1982).** Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus. *J Neurosci* **2**(3), 284-91.

- Steward, O., Falk, P. M. & Torre, E. R. (1996).** Ultrastructural basis for gene expression at the synapse: synapse-associated polyribosome complexes. *J Neurocytol* **25**(12), 717-34.
- Steward, O. (1997).** mRNA localization in neurons: a multipurpose mechanism? *Neuron* **18**(1), 9-12.
- Steward, O., Wallace, C. S., Lyford, G. L. & Worley, P. F. (1998).** Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron* **21**(4), 741-51.
- Steward, O. & Halpain, S. (1999).** Lamina-specific synaptic activation causes domain-specific alterations in dendritic immunostaining for MAP2 and CAM kinase II. *J Neurosci* **19**(18), 7834-45.
- Steward, O. & Schuman, E. M. (2001).** Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annu Rev Neurosci* **24**, 299-325.
- Steward, O. & Worley, P. (2001).** Localization of mRNAs at synaptic sites on dendrites. *Results Probl Cell Differ* **34**, 1-26.
- Sugihara, T. M., Bach, I., Kioussi, C., Rosenfeld, M. G. & Andersen, B. (1998).** Mouse deformed epidermal autoregulatory factor 1 recruits a LIM domain factor, LMO4, and CLIM coregulators. *Proc Natl Acad Sci* **95**, 15418-23.
- Sundell, C. L. & Singer, R. H. (1991).** Requirement of microfilaments in sorting of actin messenger RNA. *Science* **253**(5025), 1275-7.
- Sussenbach, J. S. (1989).** The gene structure of the insulin-like growth factor family. *Prog Growth Factor Res* **1**(1), 33-48.
- Thomsen, G. H. & Melton, D. A. (1993).** Processed Vg1 protein is an axial mesoderm inducer in Xenopus. *Cell* **74**(3), 433-41.
- Tiedge, H. & Brosius, J. (1996).** Translational machinery in dendrites of hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* **16**(22), 7171-81.
- Torre, E. R. & Steward, O. (1992).** Demonstration of local protein synthesis within dendrites using a new cell culture system that permits the isolation of living axons and dendrites from their cell bodies. *J Neurosci* **12**(3), 762-72.
- Torre, E. R. & Steward, O. (1996).** Protein synthesis within dendrites: glycosylation of newly synthesized proteins in dendrites of hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* **16**(19), 5967-78.
- Tucker, R. P., Garner, C. C. & Matus, A. (1989).** In situ localization of microtubule-associated protein mRNA in the developing and adult rat brain. *Neuron* **2**(3), 1245-56.
- Vale, R. D., Banker, G. & Hall, Z. W. (1992).** Neuronal polarity and specialized domains. In: An introduction to molecular neurobiology. Hall, Z. W (ed), Sunderland, MA, Sinauer associates, 270-79

- Valge-Archer, V. E., Osada, H., Warren, A. J., Forster, A., Li, J., Bear, R. & Rabbitts, T. H. (1994).** The LIM protein RBTN2 and the basic helix loop helix protein TAL1 are present in a complex in erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci.* **21**(18): 8617-21
- Wadman, I., Li, J., Bash, R. O., Forster, A., Osada, H. & Rabbitts, T. H. (1994).** Specific in vivo interaction between the bHLH and LIM proteins implicated in human T cell leukemia. *EMBO J.* **13**, 4831-9.
- Walikonis, R. S., Jensen, O. N., Mann, M., Provance, D. W., Jr., Mercer, J. A. & Kennedy, M. B. (2000).** Identification of proteins in the postsynaptic density fraction by mass spectrometry. *J Neurosci* **20**(11), 4069-80.
- Wang, Y. L. (1985).** Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts: possible role of treadmilling. *J Cell Biol* **101**(2), 597-602.
- Warren, A. J., Colledge, W. H., Carlton, M. B. L., Evans, M. J., Smith, A. J. H. & Rabbitts, T. H. (1994).** The oncogenic cystein-rich LIM domain protein Rbtn2 is essential for erythroid development. *Cell* **78**, 45-57.
- Weeks, D. L. & Melton, D. A. (1987).** A maternal mRNA localized to the vegetal hemisphere in *Xenopus* eggs codes for a growth factor related to TGF-beta. *Cell* **51**(5), 861-7.
- Weeks, D. L. & Melton, D. A. (1987).** A maternal mRNA localized to the vegetal hemisphere in *Xenopus* eggs codes for a growth factor related to TGF-beta. *Cell* **51**(5), 861-7.
- Wells, D. G., Richter, J. D. & Fallon, J. R. (2000).** Molecular mechanisms for activity-regulated protein synthesis in the synapto-dendritic compartment. *Curr Opin Neurobiol* **10**, 132-7
- Wickens, M., Kimble, J. & Strickland, S. (1996).** Translational control of developmental decisions. In: *Translational control*. Hershey, J. W. B., Mathews, M. B., Sonenberg, N. (ed.), *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 411-50.
- Wickham, L., Duchaine, T., Luo, M., Nabi, I. R. & DesGroseillers, L. (1999).** Mammalian staufen is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* **19**(3), 2220-30.
- Wu, X. Q., Petrusz, P. & Hecht, N. B. (1999).** Testis-brain RNA-binding protein (Translin) is primarily expressed in neurons of the mouse brain. *Brain Res* **819**(1-2), 174-8.
- Yisraeli, J. K., Sokol, S. & Melton, D. A. (1990).** A two-step model for the localization of maternal mRNA in *Xenopus* oocytes: involvement of microtubules and microfilaments in the translocation and anchoring of Vg1 mRNA. *Development* **108**(2), 289-98.
- Zhang, H. L., Singer, R. H. & Bassell, G. J. (1999).** Neurotrophin regulation of beta-actin mRNA and protein localization within growth cones. *J Cell Biol* **147**(1), 59-70.
- Zhang, H. L., Eom, T., Olynykov, Y., Shenoy, S. M., Liebelt, D. A., Dichtenberg, J. B., Singer, R. H. & Bassell, G. J. (2001).** Neurotrophin-induced transport of a beta-actin

mRNP complex increases beta-actin levels and stimulates growth cone motility. *Neuron* **31**(2), 261-75.

6 Zusammenfassung

Neben einer Aktivierung der Transkription und direkter Neusynthese von Proteinen erfolgt die Steuerung komplexer biologischer Differenzierungsvorgänge häufig über posttranskriptionale Regulation auf RNA-Ebene. Diese Regulationsmechanismen betreffen diverse Schritte des RNA-Metabolismus, wie z.B. RNA-Stabilität, zytoplasmatische Lokalisierung oder lokale Translation von Transkripten. In vielen Entwicklungsschritten spielen RNA-bindende Proteine eine zentrale Rolle. Zytoplasmatische RNA-Lokalisierung ist ein wichtiger posttranskriptionaler Regulationsmechanismus, der über lokal begrenzte Proteinsynthese zur Bildung und Aufrechterhaltung von Zellpolaritäten führt. In dieser Arbeit sollten RNA-Bindeproteine der Ratte identifiziert werden, die an posttranskriptionalen Regulationsmechanismen beteiligt sein könnten. Durch RT-PCR wurden cDNA-Sequenzen identifiziert, die zwei verschiedene Proteine codieren, die zur ZBP-1-Familie von RNA-Bindeproteinen gehören. Mitglieder dieser Proteinfamilie weisen hohe Sequenzidentitäten auf und sind in unterschiedlichen Zellsystemen am Transport, der Stabilisierung und der Translation von mRNA-Transkripten beteiligt. Durch Northern Blot-Analysen wurde gezeigt, daß die RNA-Bindeproteine der Ratte, FeRB1 und FeRB2, ausschließlich während der Embryogenese vorkommen. FeRB1 ist in Embryonenextrakten der Ratte mit Polysomen assoziiert und scheint wie das ZBP-1 des Huhns mit der β -Aktin-mRNA interagieren zu können. In kultivierten Hippocampusneuronen weisen beide RNA-Bindeproteine somatodendritische Verteilungsmuster auf und scheinen in Form von Ribonukleoprotein-Partikeln in Dendriten vorzuliegen. Eine Inhibierung des nukleären Exportes durch den Inhibitor Leptomycin B sowie durch Mutation der nukleären Export-Sequenzen (NES) in FeRB1 und FeRB2 zeigte, daß beide Proteine zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma hin und her transportiert werden können.

Mittels des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems wurde das *Lim-only*-Protein rLMO1 als FeRB1-Interaktionspartner identifiziert. Immunpräzipitationen rekombinanter Proteine aus CHO-K1-Zellen sowie Colokalisierungsuntersuchungen bestätigten die Spezifität der Interaktion. Northern Blot-Analysen zeigten, daß rLMO1 wie FeRB1 und FeRB2 in verschiedenen embryonalen Geweben exprimiert wird. Wie *in situ*-Hybridisierungen zeigten, wird das rLMO1-Gen hauptsächlich neuronal exprimiert. In Gehirnarealen wie dem Mesencephalon und dem Striatum werden rLMO1 und FeRB1 coexprimiert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine Beteiligung der RNA-Bindeproteine FeRB1 und FeRB2 an posttranskriptionalen Regulationsmechanismen während der embryonalen Entwicklung des Gehirns und einiger anderer Gewebe hin. Vermutlich wird diese Funktion hauptsächlich im Zytoplasma ausgeübt.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. D. Richter danke ich für die Ermöglichung dieser Arbeit unter den hervorragenden Bedingungen des Instituts für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie in Hamburg.

Für die Begutachtung dieser Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. D. Richter sowie Herrn Prof. Dr. H. Bretting.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. S. Kindler für die qualifizierte und freundschaftliche Betreuung. Ihm und Frau Dr. M. Rehbein danke ich für die ständige Diskussionsbereitschaft sowie die vielen hilfreichen Anregungen in den Freitagsseminaren. Allen Mitarbeitern der AG Kindler danke ich ganz herzlich für das tolle Arbeitsklima, die ständige Hilfsbereitschaft und besonders die Freundschaft außerhalb des Labors! Besonderer Dank gilt Frau Birgit Schwanke für die nette Unterstützung während der "Endphase"!

Außerhalb der Wissenschaft danke ich ganz besonders meiner Mutter, ohne deren fortwährende Unterstützung vieles nicht möglich gewesen wäre! Sie, mein Bruder Michael und natürlich auch Uwe haben mir immer den nötigen Rückhalt gegeben. Meinem Freund Thomas danke ich ganz besonders dafür, daß er immer für mich da war und mit seiner positiven Einstellung immer für Aufmunterung gesorgt hat!

Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, keine anderen als die angegebenen 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, Juli 2002

Marina Walden

Wissenschaftlicher Werdegang

Marina Walden, 1972 in Bremen geboren

05/1992	Abitur am Kurt Schumacher Gymnasium in Bremen
10/1992 - 09/1994	Grundstudium der Biologie an der Georg-August Universität Göttingen, Abschluß: Vordiplom
10/1994 - 09/1998	Hauptstudium der Biologie an der Universität Osnabrück, Abschluß: Diplom
09/1996 – 11/1996	Projektstudie am Institut für Biophysik an der Universität Sao Paulo, Brasilien Finanziert durch den DAAD, Deutschland und IAESTE, Brasil
09/1997 – 09/1998	Diplomarbeit bei Prof. Dr. E. Bakker, Arbeitsgruppe Mikrobiologie, Universität Osnabrück Thema: „Überexpression der Membranoberflächenproteine TrkA und KtrB von <i>Escherichia coli</i> “.
Promotion:	
01/1999 – 07/2002	Am Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie, Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg Betreuung durch Prof. Dr. D. Richter Thema: „Identifizierung und Charakterisierung fötaler RNA- Bindeproteine aus dem Gehirn von <i>Rattus norvegicus</i> (BERKENHOUT, 1769)“