

**Charakterisierung des
MAP2-mRNA-Bindungsproteins MARTA1
aus dem Gehirn
von *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769)**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Konstanze Wege

aus Weißenfels

Hamburg, 2003

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

Tag der Disputation: 18. Juli 2003

Hamburg, den 04. Juli 2003



Professor Dr. A. Frühwald
Dekan

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

1. Einleitung	1
1.1 RNA-Lokalisation in Neuronen	1
1.2 Die Beteiligung des Zytoskeletts am RNA-Transport	4
1.3 cis-agierende Elemente und trans-agierende Faktoren	4
1.4 MARTA1, ein potentieller trans-Faktor der MAP2-mRNA	8
2. Material und Methoden	11
2.1 Material	11
2.1.1 Antikörper.....	11
2.1.2 Bakterienstamm.....	12
2.1.3 Hefe.....	12
2.1.4 Chemikalien.....	12
2.1.5 Lösungen.....	12
2.1.6 Oligonukleotide.....	12
2.1.7 Plasmide.....	14
2.1.7.1 Kommerziell erhältliche Ausgangsvektoren.....	14
2.1.7.2 Konstruierte Plasmide.....	15
2.1.8 Tiere.....	17
2.1.9 Zelllinien.....	17
2.2 Methoden	18
2.2.1 DNA: Molekularbiologische Methoden.....	18
2.2.1.1 PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	18
2.2.1.2 Restriktionsverdau von DNA.....	19
2.2.1.3 DNA-Gelelektrophorese.....	19
2.2.1.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	19
2.2.1.5 Ligation von DNA-Fragmenten.....	19
2.2.1.6 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA.....	19
2.2.1.7 Plasmid-DNA-Isolierung aus Bakterien.....	20
2.2.2 RNA: Molekularbiologische Methoden.....	20
2.2.2.1 RNA-Präparation aus Gewebe und cDNA-Herstellung.....	20
2.2.2.2 5' RACE (<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>).....	20
2.2.2.3 RNA-Gelelektrophorese.....	20
2.2.2.4 <i>In vitro</i> RNA-Synthese für die UV-Quervernetzungs-Analysen.....	21
2.2.2.5 Herstellung Dig-markierter RNA-Sonden für in situ-Hybridisierung...	21
2.2.2.6 UV-Quervernetzungs-Analysen.....	21
2.2.2.7 <i>In situ</i> -Hybridisierung an primären Hippokampusneuronen.....	22
2.2.3 Protein: Molekularbiologische und biochemische Methoden und Immunchemie.....	23
2.2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (<i>SDS-PAGE</i>).....	23
2.2.3.2 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen und immunologische Detektion der Proteine (<i>Western Blot</i>).....	23
2.2.3.3 Koimmunpräzipitation von Proteinen.....	23
2.2.3.4 Immunzytochemie.....	24
2.2.4 Hefe: Zwei-Hybrid-System.....	24
2.2.4.1 Transfektion von Hefe-Zellen.....	24
2.2.4.2 Zwei-Hybrid-Screen.....	24
2.2.4.3 β -Galaktosidase-Filtertest.....	25
2.2.4.4 Cycloheximid-Selektion.....	25

2.2.4.5	Plasmidisolierung aus Hefe-Zellen.....	26
2.2.5	Zellkultur.....	26
2.2.5.1	Kultivierung der CHO-K1-Zellen.....	26
2.2.5.2	Kultivierung der HeLa-Zellen.....	26
2.2.5.3	Kultivierung der primären Hippokampusneurone.....	26
2.2.5.4	Transfektion der CHO-K1-Zellen.....	27
2.2.5.5	Transfektion der HeLa-Zellen.....	27
2.2.5.6	Transfektion primärer Hippokampusneurone.....	27
2.2.5.7	Herstellung von Gesamtzellextrakten kultivierter Zellen.....	28
2.2.5.8	Herstellung von Rohlysaten kultivierter Zellen.....	28
2.2.5.9	Fluoreszenzmikroskopie.....	28
2.3	Firmenverzeichnis.....	29
3.	Ergebnisse.....	30
3.1	Klonierung der MARTA1-cDNA-Sequenz.....	30
3.1.1	PCR-Klonierung der MARTA1-cDNA.....	30
3.1.2	Sequenzanalyse von MARTA1.....	32
3.2	Charakterisierung des RNA-Bindeproteins MARTA1.....	34
3.2.1	Die subzelluläre Verteilung von MARTA1.....	34
3.2.2	Die Interaktion zwischen MARTA1 mit dem MAP2-DTE.....	40
3.3	Die Beteiligung von MARTA1 am Transport der MAP2-mRNA.....	44
3.4	Identifizierung von MARTA1-Bindungspartnern.....	48
3.4.1	Hefe-Zwei-Hybrid-System.....	48
3.4.2	Hefe-Zwei-Hybrid-Screen.....	49
3.4.3	Interaktion zwischen MARTA1 und BERP.....	51
3.4.3.1	Untersuchungen zur Interaktion zwischen MARTA1 und BERP in HeLa-Zellen.....	51
3.4.3.2	Untersuchungen zur Interaktion zwischen MARTA1 und BERP in Hefe-Zellen.....	53
3.4.4	Interaktion zwischen MARTA1 und E1B-AP5.....	54
3.4.4.1	PCR-Klonierung der Ratten E1B-AP5-cDNA.....	54
3.4.4.2	Sequenzanalyse von rE1B-AP5.....	57
3.4.4.3	Untersuchungen zur Interaktion zwischen MARTA1 und rE1B-AP5 in HeLa-Zellen.....	58
3.4.4.4	Untersuchungen zur Interaktion zwischen KSRP und hE1B-AP5 in HeLa-Zellen.....	60
3.4.4.5	Untersuchungen zur Interaktion zwischen MARTA1 und rE1B-AP5 in Hefe-Zellen.....	63
3.4.5	Interaktion zwischen MARTA1 und SiahBP.....	65
3.4.5.1	Untersuchungen zur Interaktion zwischen MARTA1 und rSiahBP in HeLa-Zellen.....	65
3.4.5.2	Untersuchungen zur Interaktion zwischen KSRP und hSiahBP in HeLa-Zellen.....	68
3.4.5.3	Untersuchungen zur Interaktion zwischen MARTA1 und rSiahBP in Hefe-Zellen.....	70
4.	Diskussion.....	72
4.1	MARTA1, ein neues Mitglied der FBP-Familie.....	72
4.2	Die Interaktion von MARTA1 und dem MAP2-DTE.....	73
4.3	Der Funktionsort von MARTA1.....	74
4.4	MARTA1 und die Lokalisation der MAP2-mRNA.....	75
4.5	MARTA1 und seine Interaktionspartner.....	77
4.6	Resümee.....	80
5.	Literaturverzeichnis.....	83
6.	Zusammenfassung.....	94

Danksagung
wissenschaftlicher Werdegang

Abkürzungen

A	Adenin
Apo B	<u>A</u> polipoprotein <u>B</u>
α -CaMKII	α -Isoform der <u>Ca</u> ²⁺ / <u>Ca</u> lmodulin-abhängigen Proteink <u>in</u> ase <u>II</u>
APS	<u>A</u> moniumper <u>s</u> ulfat
arc/arg3.1	<u>a</u> ctivity- <u>r</u> egulated <u>c</u> ytoskelet-associated protein/ <u>a</u> ctivity - <u>r</u> egulated <u>g</u> ene <u>3.1</u>
ATP	<u>A</u> denosin-5'- <u>T</u> riphosphat
BC1-RNA	<u>B</u> rain <u>C</u> ytoplasmic <u>1</u> <u>R</u> NA
BC200-RNA	<u>B</u> rain <u>C</u> ytoplasmic <u>200</u> <u>R</u> NA
BERP	<u>B</u> rain <u>E</u> xpressed <u>R</u> ingfinger <u>P</u> rotein
β -Gal	β - <u>G</u> alaktosidase
bp	<u>B</u> asenpaare
BRD7	<u>B</u> romodomänen Protein <u>7</u>
BSA	<u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumine
C	Cytosin
cDNA	<u>c</u> omplementary <u>D</u> NA
CHO	<u>C</u> hinese <u>H</u> amster <u>O</u> vary
CPEB	<u>C</u> ytoplasmic <u>P</u> olyadenylation- <u>E</u> lement <u>B</u> inding Protein
CTP	<u>C</u> ytidin-5'- <u>T</u> riphosphat
Da	<u>D</u> alton
DEPC	<u>D</u> iethylpyro <u>c</u> arbonat
Dig	<u>D</u> igoxigenin
DLS	<u>D</u> endritische <u>L</u> okalisierungs <u>S</u> ignal
DMEM	Dulbecco's <u>M</u> inimal <u>E</u> ssential <u>M</u> edium
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid
DNase	<u>D</u> esoxyribonuklease
dNTP	2'- <u>D</u> esoxynukleosid-5'- <u>T</u> riphosphat
DTE	<u>D</u> endritisches <u>T</u> ransport <u>E</u> lement
DTT	<u>D</u> ithiothreitol
E1B-AP5	<u>A</u> denovirus <u>T</u> yp <u>5</u> <u>E</u> arly <u>1B</u> <u>A</u> ssociated <u>P</u> rotein <u>5</u>
ECL	<u>E</u> nhanced <u>C</u> hemiluminescence
EDTA	<u>E</u> thylendiamintetraessigsäure
EGFP	<u>E</u> nhanced <u>G</u> reen <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein
EJC	<u>E</u> xon- <u>E</u> xon- <u>J</u> unction <u>C</u> omplex
EYFP	<u>E</u> nhanced <u>Y</u> ellow <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein
ER	<u>E</u> ndoplasmatisches <u>R</u> etikulum
EST	<u>E</u> xpressed <u>S</u> equence <u>T</u> ag
et al.	und weitere
Fa.	Firma
FBP1	<u>F</u> USE <u>B</u> inding <u>P</u> rotein <u>1</u>
FBP2	<u>F</u> USE <u>B</u> inding <u>P</u> rotein <u>2</u>
FBP3	<u>F</u> USE <u>B</u> inding <u>P</u> rotein <u>3</u>
FCS	<u>F</u> etal <u>C</u> alf <u>S</u> erum
FIR	<u>F</u> BP <u>I</u> nteracting <u>R</u> epressor
FMRP	<u>F</u> ragile <u>X</u> <u>M</u> ental <u>R</u> etardation <u>P</u> rotein
FUSE	<u>F</u> ar <u>U</u> pstream <u>E</u> lement
g	Gramm
G	<u>G</u> uanin
GFP	<u>G</u> reen <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein

GTP	<u>G</u> uanosin-5'- <u>T</u> riphosphat
x g	Vielfaches des Erdbeschleunigung
h	Stunde
HBSS	<u>H</u> ank's <u>B</u> uffered <u>S</u> alin <u>S</u> olution
HeLa	<u>H</u> enrietta <u>L</u> acks
HEPES	4-(2- <u>H</u> ydroxyethyl)-1- <u>P</u> iperazinethansulfonsäure
His	<u>H</u> istidin
hn RNP	<u>h</u> eterogenes <u>n</u> ukleäres <u>R</u> ibonucleoprotein- <u>P</u> artikel
hrMT1L1	<u>h</u> umane <u>A</u> rginin <u>M</u> ethyl <u>T</u> ransferase <u>1L1</u>
HRP	<u>H</u> orseradish <u>P</u> eroxidase
kDa	<u>K</u> ilodalton
KH	<u>h</u> nRNP <u>K</u> - <u>h</u> omology
KSRP	<u>K</u> H-type <u>S</u> plicing <u>R</u> egulatory <u>P</u> rotein
l	Liter
LB	<u>L</u> uria <u>B</u> ertoni
M	<u>M</u> olar, Mol/Liter
MAP2	<u>M</u> icrotubules <u>A</u> ssociated <u>P</u> rotein <u>2</u>
MARTA1	<u>M</u> AP2- <u>m</u> RNA <u>T</u> ransport <u>A</u> ssociated <u>P</u> rotein <u>1</u>
MARTA2	<u>M</u> AP2- <u>m</u> RNA <u>T</u> ransport <u>A</u> ssociated <u>P</u> rotein <u>2</u>
MBP	<u>M</u> yelin <u>B</u> asic <u>P</u> rotein
min	<u>M</u> inute(n)
mRNA	<u>m</u> essenger <u>R</u> NA
NES	<u>N</u> ukleäres <u>E</u> xport-Signal
NGF	<u>N</u> eural <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
NLS	<u>N</u> ukleäres <u>L</u> okalisierungs-Signal
NMDA	<u>N</u> - <u>M</u> ethyl- <u>D</u> - <u>A</u> spartat
PABP	<u>P</u> oly <u>A</u> <u>B</u> inding <u>P</u> rotein
PAGE	<u>P</u> olyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	<u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline
PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
PSD	<u>P</u> ostsynaptic <u>D</u> ensity
PUF60	<u>P</u> oly <u>U</u> <u>F</u> actor <u>60</u> kDa
PVDF	<u>P</u> olyvinylidinfuorid
RACE	<u>R</u> apid <u>A</u> mplification of <u>c</u> DNA- <u>E</u> nds
RBD	<u>R</u> NA <u>B</u> inding <u>D</u> omain
RGG	<u>A</u> rginin- <u>G</u> lycin- <u>G</u> lycin
RNase	<u>R</u> ibonuklease
RNP	<u>R</u> ibonucleoprotein <u>P</u> article
rpm	<u>r</u> ounds <u>p</u> er <u>m</u> inute
RRM	<u>R</u> NA <u>R</u> ecognition <u>M</u> otiv
RT	<u>R</u> aumtemperatur
s	<u>S</u> ekunde
SCG	<u>S</u> uperior <u>C</u> ervical <u>G</u> anglion
SDS	<u>S</u> odiumdodecylsulfate
SFC	<u>S</u> plicing <u>F</u> actor <u>C</u> ompartment
SiahBP	<u>S</u> even in <u>a</u> bsentia <u>h</u> omolog <u>B</u> inding <u>P</u> rotein
SSC	<u>S</u> aline <u>S</u> odiumcitrat
T	<u>T</u> hymine
TAE	<u>T</u> ris-(hydroxymethyl)- <u>a</u> minomethan
TAP	<u>T</u> ransport <u>A</u> dapter <u>P</u> rotein
TBS	<u>T</u> ris <u>B</u> uffered <u>S</u> aline
TFIIH	<u>T</u> ranskriptions- <u>F</u> aktor <u>IIH</u>
TGFβ	<u>T</u> umor <u>G</u> rowth <u>F</u> actor <u>β</u>
Tris-HCL	<u>T</u> ris-(Hydroxymethyl)- <u>A</u> minomethan-Hydrochlorid
tRNA	<u>t</u> ransfer <u>R</u> NA
U	<u>U</u> nits

UTP	<u>U</u> ridin- <u>T</u> riphosphat
ü.N.	ü <u>ber</u> <u>N</u> acht
UTR	<u>U</u> n <u>t</u> ranslated <u>R</u> egion
V	<u>V</u> olt
Vg1	<u>V</u> egetal <u>R</u> NA <u>1</u>
Vg1-RBP	<u>V</u> egetal <u>R</u> NA <u>1</u> <u>B</u> inding <u>P</u> rotein
VgRBP71	<u>V</u> egetal <u>R</u> NA <u>1</u> <u>B</u> inding <u>P</u> rotein <u>71</u>
VLE	<u>V</u> egetal <u>L</u> ocalization <u>E</u> lement
VTE	<u>V</u> g1 <u>T</u> ranslational <u>E</u> lement
v/v	<u>V</u> olumen pro <u>V</u> olumen
w/v	Gewicht pro <u>V</u> olumen
ZBP1	<u>Z</u> ipcode <u>B</u> inding <u>P</u> rotein <u>1</u>
ZBP2	<u>Z</u> ipcode <u>B</u> inding <u>P</u> rotein <u>2</u>

1. Einleitung

Eukaryotische Zellen zeichnen sich durch ein hohes Maß an Spezialisierung aus. Der Mensch besteht zum Beispiel aus mehr als 200 verschiedenen Zellarten, die unterschiedliche Funktionen wahrnehmen. Die hohe Spezifität der jeweiligen Zelllinie ist das Ergebnis einer streng kontrollierten Genexpression. Zusätzlich erfordert die Fähigkeit der Zellen, auf intra- und extrazelluläre Reize zu reagieren, vielfältige Regulationsmechanismen auf der Ebene der Genprodukte. Die Genexpression wird nicht nur durch Transkriptionsfaktoren, sondern auch auf RNA- und auf Proteinebene kontrolliert. Die posttranskriptionale Regulation ermöglicht eine gezieltere und schnellere Reizantwort der Zelle als eine *de novo* Transkription (Siomi und Dreyfuss, 1997). Lange Zeit wurden die verschiedenen Phasen der Genexpression von der Transkription über die RNA-Prozessierung bis hin zur Proteinsynthese als unabhängig voneinander ablaufende Vorgänge betrachtet. In den letzten Jahren haben sich jedoch immer mehr Hinweise ergeben, daß regulatorische Faktoren, die zunächst nur bestimmten Schritten zugeordnet worden waren, die einzelnen Abschnitte des RNA-Metabolismus funktionell koppeln (Orphanides und Reinberg, 2002).

Die subzelluläre RNA-Lokalisation in Verbindung mit einer lokalen Proteinsynthese ist eine wichtige Form der postranskriptionalen Regulation. Sie stellt in eukaryotischen Zellen neben dem gezielten Transport neusynthetisierter Proteine in verschiedene subzelluläre Kompartimente eine alternative Form der differentiellen Proteinlokalisierung dar. Die subzelluläre RNA-Lokalisation ermöglicht eine lokale Regulation der Proteinsynthese. Dadurch kann unter anderem die unerwünschte Synthese eines Proteins in bestimmten Zellregionen verhindert und die Ausbildung von Zellpolaritäten ermöglicht werden (St Johnston, 1995).

1.1 RNA-Lokalisation in Neuronen

In den vergangenen Jahren wurden in einer Reihe somatischer polarer Zelltypen, wie Fibroblasten, Myoblasten, Oligodendrozyten, Epithelzellen und Neuronen, RNA-Moleküle in speziellen Teilbereichen des Zytoplasmas nachgewiesen (Bassel *et al.*, 1999). Die zelluläre Polarität ist unter der Vielzahl eukaryotischer Zelltypen besonders stark bei Neuronen ausgeprägt. Sie besitzen verschiedene Arten von Zellfortsätzen, die sich in Morphologie und molekularer Zusammensetzung voneinander unterscheiden (Vale *et al.*, 1992, Kandel *et al.*,

2000). Die Dendriten reifer Neurone dienen der Signalaufnahme, die Axone der Signalweiterleitung. Ihre Enden liegen zum Teil weit vom Zellkörper entfernt. Die neuronalen Zellausläufer zeichnen sich durch Strukturen aus, die den Kontakt zu anderen Nervenzellen herstellen. Diese sogenannten Synapsen übernehmen die Aufgabe der Signalübertragung und -verarbeitung und besitzen ein für sie charakteristisches Repertoire von Proteinen (Kim und Huganir, 1999).

Bereits 1982 wiesen Steward und Levy Polyribosomen in Dendriten, speziell an der Basis von dendritischen Dornen (*dendritic spines*), Auswüchse des Dendriten mit synaptischen Kontakten, in Körnerzellen des *Gyrus Dentatus* nach (Steward und Levy, 1982). Später wurden weitere Komponenten der Translationsmaschinerie, zum Beispiel t-RNAs und Elongationsfaktoren (Steward *et al.*, 1996) sowie neu synthetisierte Proteine (Torre und Steward, 1992, Crino und Eberwine, 1996) in Dendriten nachgewiesen. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß innerhalb der Dendriten eine lokale Proteinsynthese stattfinden kann (Crino und Eberwine, 1996, Kindler *et al.*, 1997, Kuhl und Skehel, 1998, Tiedke *et al.*, 1999, Steward und Schuman, 2001).

Die erste mRNA, die in Dendriten ausdifferenzierter Neurone nachgewiesen wurde, war die MAP2-mRNA, die das Mikrotubulus-assoziierte Protein 2 kodiert (Garner *et al.*, 1988). Mittels *in situ*-Hybridisierung wurde dieses Transkript sowohl in Zellkörpern als auch in Dendriten hippokampaler- und kortikaler Neurone der Ratte nachgewiesen (Tucker *et al.*, 1989). MAP2 und dessen mRNA zeigen eine somatodendritische Verteilung (Mandelkow und Mandelkow, 1995). Das Protein interagiert mit dem neuronalen Zytoskelett und reguliert in Abhängigkeit von seinem Phosphorylierungsstatus die Stabilität dendritischer Mikrotubuli (Brugg und Matus, 1991, Itoh *et al.*, 1997, Sanchez *et al.*, 2000). Die Konzentration von MAP2 in der molekularen Schicht des *Gyrus Dentatus* wird durch synaptische Aktivität beeinflusst (Steward und Halpain, 1999). Demnach könnte die lokale MAP2-Translation zur synaptischen Plastizität (lang anhaltende Veränderung der Synapsenstruktur und -aktivität im Zusammenhang mit Lernvorgängen) beitragen.

Transkripte, die die α -Untereinheit der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Protein-Kinase II (α -CaMKII) kodieren, wurden ebenfalls in Dendriten des Rattengehirns nachgewiesen. Die α -CaMKII kommt in großer Menge in der postsynaptischen Dichte (*PostSynaptic Density*, PSD) vor, einem proteinreichen Bereich unterhalb der postsynaptischen Membran (Kennedy, 2000, Walikonis *et al.*, 2000). Sie scheint maßgeblich an der Regulation der synaptischen Plastizität beteiligt zu sein (Mayford *et al.*, 1995, Lisman *et al.*, 1997).

Die *arc/arg3.1*-mRNA (*activity-regulated cytoskeleton-associated protein / activity-regulated gene*), die für ein α -Spektrin-ähnliches Protein kodiert, wird nach synaptischer Aktivierung von NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) -Rezeptoren in großer Menge synthetisiert und

in die Dendriten der Hippokampusneurone transportiert (Link *et al.*, 1995, Lyford *et al.*, 1995, Steward *et al.*, 1998).

Außerdem wurden die Transkripte der Neuropeptide Vasopressin und Oxytocin in Dendriten magnozellularer hippocampaler Neurone nachgewiesen (Bloch *et al.*, 1990, Mohr *et al.*, 1995).

Einige mRNAs, die Membranrezeptoren kodieren, werden ebenfalls in dendritische Ausläufer verschiedener Neurone transportiert. Dazu gehören die mRNAs, die die α -Untereinheit des Glycin-Rezeptors (Racca *et al.*, 1997), Untereinheiten von Glutamatrezeptoren (Miyashiro *et al.*, 1994) sowie den Inositol-1,4,5-Triphosphat-Rezeptor Typ 1 (Furuichi *et al.*, 1993) kodieren. Eine lokale Synthese dieser Proteine könnte zu funktionellen Veränderungen aktiver Synapsen beitragen. Im Unterschied zu Transkripten, die zytoplasmatische Proteine kodieren, werden integrale Membranproteine nicht an freien Polyribosomen synthetisiert, sondern an Ribosomen, die mit dem rauen endoplasmatischen Retikulum assoziiert sind. Diese Struktur ermöglicht die korrekte Insertion der Proteine in die Membran und verschiedene posttranslationale Modifikationen. Die Sortierung membranständiger und sezernierter Proteine findet normalerweise im Golgi-Apparat statt. Es wurden bereits Hinweise auf die Anwesenheit Golgi-artiger Strukturen in Dendriten gefunden (Tiedge und Brosius, 1996, Torre und Steward, 1996, Gardiol *et al.*, 1999, Pierce *et al.*, 2000).

Außer den genannten RNA-Molekülen gibt es noch eine Reihe weiterer lokalisierter Transkripte. Anhand der genannten Beispiele ist zu erkennen, daß Proteine mit bekannter Funktion, die von lokalisierten Transkripten kodiert werden, primär an der Umstrukturierung aktiver Synapsen beteiligt sind. Dies betrifft sowohl den Einbau neuer Rezeptoren und Signaltransduktionsmoleküle als auch die Reorganisation des Zytoskeletts. Eine Neusynthese der entsprechenden Proteine könnte demnach in unmittelbarer Nähe des Reizeinganges erfolgen. Eine ähnliche Situation findet sich in den Wachstumskegeln primärer Neurone aus dem Kortex embryonaler Ratten. Hier wird die β -Aktin-mRNA in die Ausläufer transportiert und lokal translatiert (Bassel *et al.*, 1998, Zhang *et al.*, 1999, Zhang *et al.*, 2001).

Neben mRNA-Molekülen wurden auch nicht kodierende RNA-Moleküle in Dendriten nachgewiesen. Die BC1- (Tiedge *et al.*, 1991) und die BC200-RNA (Tiedge *et al.*, 1993) sind Transkripte der RNA-Polymerase III. Ihre Funktion liegt möglicherweise in der Translationskontrolle bei der lokalen Proteinsynthese (Wang *et al.*, 2002, Muddashetty *et al.*, 2002)

Die subzelluläre Lokalisation eines Transkriptes kann zwischen verschiedenen neuronalen Zelltypen variieren. Beispielsweise werden die mRNAs für die α -Untereinheit des Glycin-Rezeptors (Racca *et al.*, 1998) bzw. die α CaMKII (Burgin *et al.*, 1990) nur in

bestimmten Neuronen des Rattengehirns dendritisch lokalisiert. Demnach scheint ein aufwendiges Sortierungs- und Transport-System für die Lokalisierung verschiedener RNA-Moleküle in Neuronen verantwortlich zu sein.

1.2 Die Beteiligung des Zytoskeletts am RNA-Transport

Für den zytoplasmatischen Transport der RNA-Moleküle spielt das Zytoskelett eine wichtige Rolle. Der Einsatz Mikrotubuli-destabilisierender Substanzen führt bei *Drosophila*- und *Xenopus*-Oozyten zu einer Fehllokalisierung mehrerer maternaler mRNAs (Johnston *et al.*, 1995). In Oligodendrozyten wird der Transport der MBP (*Myelin Basic Protein*)-mRNA in die Zellausläufer vermindert (Carson *et al.*, 1997). In Neuronen führt die Zerstörung der Mikrotubuli zu einer Inhibierung der RNA-Lokalisation (Knowles *et al.*, 1996). Der Transport der β -Aktin-mRNA in Fibroblasten ist dagegen von einem intakten Aktin-Zytoskelett abhängig (Ross *et al.*, 1997).

Für viele lokalisierte Transkripte wurde gezeigt, daß sie in Ribonukleoprotein (RNP) - Partikeln organisiert sind. Beispielsweise führt die Bindung des Proteins Staufen an die zum anterioren Pol der *Drosophila*-Oozyte transportierte bicoid-RNA zur Bildung von RNP-Partikeln, die entlang von Mikrotubuli transportiert werden (Ferrandon *et al.*, 1994). In Neuronen wird die β -Aktin-mRNA Mikrotubuli-abhängig in Form von Transportpartikeln lokalisiert (Zhang *et al.*, 2001). Die MAP2-mRNA zeigt in primären Hippokampusneuronen ebenfalls ein granuläres Verteilungsmuster (Blichenberg *et al.*, 1999). Generell geht man davon aus, daß an der RNA-Lokalisation mehrere Faktoren beteiligt sind, die bei der Erkennung der entsprechenden Transkripte, dem Export aus dem Zellkern, der Assoziation mit dem Zytoskelett, dem energieabhängigen Transport und der regulierten Translation am Bestimmungsort mitwirken (Jansen, 1999, Snee *et al.*, 2002).

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

Aus nichtneuronalen Systemen wurden Modellvorstellungen entwickelt, wie der RNA-Transport ablaufen könnte (St Johnston, 1995, Olenikov und Singer, 1998). Es gibt Hinweise darauf, daß ein ähnlicher Mechanismus auch in Neuronen existiert. Offenbar liegen die Signale, die die dendritische Lokalisierung bestimmter RNAs bewirken, auf den Transkripten selbst. Diese Sequenzelemente können identifiziert werden, indem die entsprechenden Zellen mit Expressionsvektoren für chimäre Reportertranskripte transfiziert werden. Die Lokalisation dieser Transkripte, die aus einer normalerweise nicht transportierten RNA und bestimmten Sequenzabschnitten der transportierten RNA bestehen, kann mittels *in situ*-Hybridisierung untersucht werden. So läßt sich der für die Lokalisation notwendige

Sequenzabschnitt eingegangen (Blichenberg *et al.*, 1999). Diese sogenannten *cis*-agierenden Sequenzelemente befinden sich in den meisten Fällen innerhalb der 3'UTR (*Untranslated Region*) der RNA-Moleküle (Johnston, 1995, Oleynikov und Singer, 1998). *Cis*-Elemente können ihre Funktion nur im Komplex mit spezifischen Proteinen erfüllen. Diese Proteine bezeichnet man als *trans*-Faktoren.

In den letzten Jahren konnten in Neuronen verschiedene für die Lokalisation notwendige *cis*-Elemente in transportierten RNAs und daran bindende Proteine identifiziert werden. Beispielsweise wurden für die Vasopressin-mRNA zwei Bereiche innerhalb der kodierenden Region bzw. der 3'UTR identifiziert, die für ihre dendritische Lokalisation verantwortlich sind (Prakash *et al.*, 1997). Ein möglicher *trans*-Faktor ist hier das multifunktionelle Poly(A)-Bindeprotein (PABP), dessen spezifische Interaktion mit dem dendritischen Lokalisierungssgignal (DLS) entweder durch Gehirn-spezifische Modifikationen des PABP oder durch Assoziation mit weiteren neuronalen Proteinen zustande kommt (Mohr *et al.*, 2001, Kindler und Monshausen, 2002).

Für die α -CaMKII-mRNA wurde von Blichenberg *et al.* ein 1200 Nukleotide umfassender Bereich innerhalb der 3'UTR identifiziert, der sowohl notwendig als auch ausreichend für den Transport in die Dendriten primärer Hippokampusneurone der Ratte ist (Blichenberg *et al.*, 2001). Nach Mori *et al.* ist dagegen ein 94 Nukleotide umfassender Bereich am 5'-Ende der 3'UTR ausreichend für den dendritischen Transport des α -CaMKII-Transkripts, unter der Voraussetzung, daß durch neuronale Aktivität die inhibitorische Wirkung eines zweiten Sequenzbereiches aufgehoben wird (Mori *et al.*, 2000). Diese beiden *cis*-agierenden Elemente überlappen nicht mit dem von Blichenberg *et al.* identifizierten Lokalisierungselement. Das Protein CPEB (*Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding Protein*) interagiert mit der α -CaMKII-mRNA und ist am dendritischen Transport und der postsynaptischen Translationsregulation dieses Transkriptes beteiligt (Huang *et al.*, 2003).

Die MAP2-mRNA besitzt ein 640 Nukleotide umfassendes *cis*-Element (DTE, *Dendritic Targeting Element*) innerhalb der 3'UTR. Es ermöglicht den Transport chimärer Transkripte in die Dendriten primärer Hippokampusneurone der Ratte (Blichenberg *et al.*, 1999). Durch einen Hefe-Drei-Hybrid-Screen wurde das Protein Staufen aus dem Rattengehirn als DTE-bindendes Protein identifiziert (Monshausen *et al.*, 2001). Bei *Drosophila melanogaster* ist Staufen am Transport der bicoid- und oskar-mRNA zum anterioren bzw. posterioren Pol der Oozyte (St Johnston *et al.*, 1991, Ferrandon *et al.*, 1994) und am Transport der prospero-mRNA in Neuroblasten (Li *et al.*, 1997) beteiligt. Außerdem bewirkt es eine translationale Repression der oskar-mRNA am posterioren Pol (Micklem *et al.*, 2000). Inzwischen wurden dem Staufen homologe Proteine beim Menschen und bei der Maus identifiziert (Kiebler *et al.*, 1999, Marion *et al.*, 1999, Wickham *et al.*, 1999). In Rattenneuronen ist Staufen somatodendritisch in makromolekularen Partikeln lokalisiert, die mit

Mikrotubuli assoziieren (Köhrmann *et al.*, 1999). Es besitzt Domänen, die an doppelsträngige RNA binden können. Diese Bindung erfolgt *in vitro* in sequenzunabhängiger Weise (Kiebler *et al.*, 1999, Monshausen *et al.*, 2001). Staufen wurde zusammen mit Transkripten der α -CaMKII sowie der BC1-RNA in dendritisch lokalisierten Partikeln nachgewiesen (Mallardo *et al.*, 2003). Inzwischen wurde ein weiteres zum Drosophila-Staufen homologes Protein, Staufen2, aus Ratte, Mensch und Maus identifiziert (Tang *et al.*, 2001, Duchaine *et al.*, 2002). In Ratten-Neuronen bewirkt die Überexpression einer am Carboxy-Terminus verkürzten, jedoch alle RNA-Bindedomänen enthaltenden Staufen2-Variante eine Verminderung der nachweisbaren mRNAs in den Dendriten (Tang *et al.*, 2001). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die zum Drosophila-Staufen homologen Säuger-Proteine eine wichtige Funktion bei der Lokalisierung verschiedener RNA-Moleküle wahrnehmen. Als alternativer Versuchsansatz zum Hefe-Drei-Hybrid-Screen wurden zur Identifizierung weiterer potentieller *trans*-Faktoren der MAP2-mRNA UV-Quervernetzungs-Analysen durchgeführt. Dabei wurden die ca. 90 kDa bzw. 65 kDa großen Proteine MARTA1 und MARTA2 (*MAP2-RNA trans-acting protein 1* bzw. *2*) des Rattengehirns gefunden, die spezifisch mit dem *cis*-Element der MAP2-mRNA interagieren (Rehbein *et al.*, 2000). Beide Proteine binden innerhalb der 200 Nukleotide, die den 5'-Bereich des MAP2-DTE bilden, mit hoher Affinität an die RNA. Ohne diesen Teil des *cis*-Elements wird die MAP2-mRNA nicht mehr somatodendritisch lokalisiert. MARTA1 kommt in zytoplasmatischen und nukleären Fraktionen vor und könnte demnach bereits im Kern an die MAP2-mRNA binden. MARTA2 ist dagegen vorwiegend mit Polysomen assoziiert, was auf eine Beteiligung an der Regulierung der Proteinsynthese hinweisen könnte (Rehbein *et al.*, 2000).

Anhand der genannten Beispiele ist zu erkennen, daß die für die Lokalisation der RNA-Moleküle notwendigen Sequenzelemente oft relativ groß sind. Sie können komplexe dreidimensionale Strukturen bilden. Bisher konnten keine signifikanten Gemeinsamkeiten hinsichtlich ihrer Sequenzen nachgewiesen werden. Eventuell treten jedoch Ähnlichkeiten in den Sekundär- oder Tertiär-Strukturen auf, die für die Erkennung durch bestimmte RNA-Bindeproteine von Bedeutung sein könnten (Kuhl und Skehel, 1998). Für einige *cis*-Elemente wurden bereits mehrere interagierende Proteine beschrieben. Zum Beispiel binden an den sogenannten *Zipcode* der β -Aktin-mRNA des Huhns mindestens fünf, an das VLE (*Vegetal Localisation Element*) der *Xenopus* Vg1-mRNA mindestens sechs Proteine (Gu *et al.*, 2002, Kroll *et al.*, 2002). Einige an *cis*-Elemente bindende Proteine scheinen multifunktionelle Eigenschaften zu besitzen. Zum Beispiel sind das mit der α -CaMKII-mRNA interagierende Protein CPEB oder das mit verschiedenen lokalisierten RNA-Molekülen der Drosophila-Oozyte assoziierte Staufen sowohl am Transport der Transkripte als auch an der lokalen Regulation der Translation beteiligt (Huang *et al.*, 2003, Micklem *et al.*, 2000). Gleiches trifft

auch auf das mit dem Lokalisierungselement der Xenopus-Vg1-mRNA interagierende VgRBP71 zu (Kolev *et al.*, 2003). Andere *trans*-Faktoren besitzen sowohl Kernlokalisierungs (NLS)- als auch Kernexport (NES) -Signale, was darauf hindeutet, daß diese Proteine sowohl eine Rolle bei der Regulation des nukleären Exports als auch bei der zytoplasmatischen Lokalisierung spielen. Dies gilt für das mit der β -Aktin-mRNA interagierende *Zipcode Binding Protein 1* (ZBP1) sowie das dazu homologe Xenopus-Protein Vg1RBP, welches an die Vg1-mRNA bindet. Das Protein hnRNPA2 (*heterogenes nukleäres Ribonucleoprotein-Partikel-Protein A2*) interagiert spezifisch mit dem Transportelement der MBP (*Myelin Basic Protein*) -mRNA. Es ist, wie auch die MBP-mRNA, in den distalen Ausläufern von Oligodendrozyten nachweisbar (Hoek *et al.*, 1998). hnRNPA2 kann sich zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma hin und her bewegen. Im Zellkern interagiert es mit prä-mRNA-Molekülen und ist am Spleißen beteiligt (Krecic und Swanson, 1999).

An RNA-Lokalisierungselemente bindende Proteine können also an unterschiedlichen Schritten der posttranskriptionalen Regulation beteiligt sein. Die Funktion der für die Lokalisation notwendigen *cis*-Elemente beschränkt sich demnach nicht nur auf die Markierung der Transkripte als zu transportierende Moleküle. Vielmehr weist ihre teilweise beträchtliche Größe und die Vielfalt der an sie bindenden Proteine darauf hin, daß sie mehrere Informationen bezüglich der posttranskriptionalen Regulation beinhalten. Die Bindung nukleärer Proteine an die Transportelemente deutet darauf hin, daß das Schicksal der transportierten RNA-Moleküle bereits im Kern während der RNA-Prozessierung festgelegt wird.

Die essentielle Bedeutung der *trans*-Faktoren wird besonders offensichtlich, wenn durch eine Mutation ihre Interaktion mit der RNA verhindert wird. Der Austausch einer Aminosäure in einer KH-Domäne des RNA-Bindeproteins FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*) führt neben anderen Ursachen zum Fragilen X Syndrom, einer vererbaren mentalen Degeneration (Darnell *et al.*, 2001). Durch den Aminosäureaustausch wird die Struktur des für die RNA-Bindung essentiellen Motivs zerstört und die Interaktion zwischen FMRP und der RNA verhindert (Musco *et al.*, 1996, Siomi und Deyfuss, 1997). FMRP ist in Synapsen an der Repression der Translation bestimmter RNAs beteiligt (Steward und Worley 2001, Zalfa *et al.*, 2003). Es interagiert außerdem mit der BC1-RNA, die ebenfalls mit den von FMRP regulierten mRNAs interagieren kann und so eventuell die Spezifität der FMRP-Regulation kontrolliert (Zalfa *et al.*, 2003).

1.4 MARTA1, ein potentieller *trans*-Faktor der MAP2-mRNA

Das DTE (*Dendritic Targeting Element*)-bindende Protein MARTA1 (*MAP2-RNA trans-acting protein 1*) wurde aus dem Rattengehirn isoliert. Seine Bindung an das dendritische Transportelement der MAP2-mRNA scheint unabhängig von MARTA2 zu sein. Bisher ist unklar, ob diese Bindung sequenzspezifisch oder in Abhängigkeit von einer speziellen dreidimensionalen RNA-Struktur stattfindet. MARTA1 interagiert weder mit den ebenfalls dendritisch lokalisierten α CaMKII-, arg 3.1- oder Vasopressin-Transkripten, noch mit der somatisch lokalisierten α -Tubulin-mRNA (Rehbein *et al.*, 2000). Die Sequenzierung verschiedener Peptide des aufgereinigten MARTA1 ergab, daß es sich hierbei um das Ratten-Ortholog des humanen Proteins KSRP (*KH-type Splicing Regulatory Protein*) handelt (Rehbein *et al.*, 2002).

KSRP wurde als Bestandteil eines Multi-Proteinkomplexes identifiziert, der am für Neuronen spezifischen Spleißen des c-src-Transkripts beteiligt ist. Während dieses Vorgangs ist es für die Rekrutierung der Proteinbestandteile verantwortlich (Min *et al.*, 1997). Das Ratten-Ortholog von KSRP wurde innerhalb eines Proteinkomplexes nachgewiesen, der das für die Leber spezifische Editing der apoB-RNA bewirkt (Lellek *et al.*, 2000). KSRP bindet dabei mit hoher Affinität an die RNA. Wenngleich das Editing der apoB-RNA auch ohne rKSRP/MARTA1 stattfindet, so wird doch die Effizienz dieses Prozesses durch seine Anwesenheit bedeutend gesteigert (Lellek *et al.*, 2002).

Auf cDNA-Ebene wurde KSRP bereits zu einem früheren Zeitpunkt unter dem Namen FBP2 (*FUSE Binding Protein 2*) als Mitglied der FBP (*FUSE-Binding Protein*)-Familie bekannt (Davis-Smyth *et al.*, 1996). Die drei Mitglieder dieser Familie sind grundsätzlich gleich aufgebaut. Sie besitzen in ihrem zentralen Bereich jeweils vier KH (*K-Homology*)-Domänen. Diese wurden ursprünglich im Protein hnRNPK (*heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein-Particle-Protein K*) als RNA-bindende Domänen identifiziert (Siomi *et al.*, 1993), können aber auch an einzelsträngige DNA-Moleküle binden. Das erste identifizierte Mitglied dieser Familie, FBP1 (*FUSE Binding Protein 1*), bindet an das *Far Upstream Element* (FUSE) im Promotor des c-myc-Gens (Davis-Smyth *et al.*, 1996). Im Unterschied zu FBP2/KSRP und FBP3 wird FBP1, ebenso wie c-Myc, nur in proliferierenden Zellen exprimiert. Es bindet nur dann an den Promotor des c-myc-Gens, wenn die FUSE-Sequenz einzelsträngig vorliegt, was nur im aktivierten Gen der Fall ist. Über die Rekrutierung des Proteins FIR (*FBP Interacting Repressor*) kann FBP daher eine schnelle Regulation des Proto-Onkogens c-myc bewirken (He *et al.*, 2000).

Kürzlich wurden zwei KSRP-Orthologe aus Huhn und *Xenopus* identifiziert, für die eine Beteiligung am zytoplasmatischen mRNA-Transport postuliert wird. In embryonalen Hühner-Fibroblasten ist die β -Aktin-mRNA besonders stark in den Lamellipodien angereichert (Lawrence und Singer, 1986). Diese Zellausläufer breiten sich aus, wenn sich Fibroblasten

auf chemotaktische Reize zu- oder von ihnen wegbewegen. Dabei spielt die Aktin-Polymerisierung eine wichtige Rolle (Carlier 1991, Cooper, 1991). Es wird angenommen, daß die lokale Aktin-Synthese innerhalb des sogenannten *leading edge*, der Peripherie der Lamellipodien, zum Erhalt der Zellpolarität beiträgt und damit eine gerichtete Bewegung ermöglicht (Singer, 1992). In embryonalen Neuronen des Huhns ermöglicht der mRNA-Transport eine lokale Synthese des β -Aktins in den Wachstumskegeln (*growth cones*) und damit ein Reifen der Neuriten (Bassel *et al.*, 1998, Zhang *et al.*, 1999, Zhang *et al.*, 2001). Als *cis*-Element der β -Aktin-mRNA konnte ein 54 Nukleotide langer Bereich innerhalb der 3'UTR eingegrenzt werden (Singer, 1993). An diesen sogenannten *Zipcode* binden verschiedene *trans*-agierende Proteine (Snee *et al.*, 2002). Unter diesen Faktoren konnte das Protein ZBP2 (*Zipcode Binding Protein 2*) als KSRP-Ortholog identifiziert werden (Gu *et al.*, 2002). ZBP2 ist prinzipiell genau so aufgebaut wie KSRP, besitzt aber vor der ersten KH-Domäne ein zusätzliches Segment aus 47 Aminosäuren. Es ist vorwiegend im Kern lokalisiert, kommt aber auch im *leading edge* der Fibroblasten und in den Ausläufern von Neuronen vor. Experimente mit einem dominant negativen Konstrukt zeigen, daß der zytoplasmatische Transport der β -Aktin-mRNA durch ZBP2 beeinflusst wird (Gu *et al.*, 2002).

In Xenopus-Oozyten wird der Transport der Vg1-mRNA durch das 340 Nukleotide lange *Vg1-Localization Element* (VLE) vermittelt (Mowry und Melton, 1992). An dieses *cis*-agierende Element bindet neben anderen *trans*-Faktoren das KSRP-Ortholog VgRBP71 (*Vg1-RNA Binding Protein 71*, Kroll *et al.*, 2002). Wie ZBP2 weist auch VgRBP71 einen Unterschied zu KSRP innerhalb der aminoterminalen Domäne auf. Ab Aminosäure neun fehlen hier im Vergleich zu KSRP 58 Reste. Es ist hauptsächlich im Zellkern und weniger im Zytoplasma lokalisiert. VgRBP71 interagiert auch mit anderen vegetal oder animal lokalisierten Transkripten der Xenopus-Oozyte (Kroll *et al.*, 2002), was für einen allgemeinen Mechanismus der RNA-Lokalisation und eine generelle Beteiligung von VgRBP71 bei diesem Prozeß spricht. Kürzlich wurde festgestellt, daß VgRBP71 maßgeblich an der Translationskontrolle der lokalisierten Vg1-mRNA beteiligt ist (Kolev *et al.*, 2003). Dabei ist VgRBP71 durch seine RNA-Helikase-Aktivität wahrscheinlich an der räumlichen Umstrukturierung des RNP-Komplexes aus der Vg1-mRNA und den daran gebundenen Proteinen verantwortlich. Dadurch wird die Abspaltung des *cis*-agierenden Repressorelements VTE (*Vg1 Translational Element*) an einer Polyadenylierungs-Sequenz innerhalb der Vg1-mRNA-3'UTR stimuliert, was zu einer Translationsaktivierung führt (Kolev *et al.*, 2003).

In jüngster Zeit wurden also drei zum humanen KSRP orthologe Proteine aus Ratte, Huhn und Xenopus identifiziert. Während KSRP an der nukleären RNA-Prozessierung beteiligt ist, zeigen MARTA1, ZBP2 und VgRBP71 hohe Bindungsaffinitäten gegenüber lokalisierten RNA-Molekülen. Zusammen mit der Beobachtung, daß VgRBP71 auch mit anderen lokalisierten Transkripten interagiert, ist dies ein Hinweis auf eine generelle Bedeutung dieser Proteine für den zytoplasmatischen mRNA-Transport. Die nukleäre Lokalisation der Proteine, die Beteiligung an verschiedenen postranskriptionalen Regulationsmechanismen in- und außerhalb des Zellkerns weisen außerdem auf eine funktionelle Verknüpfung der RNA-Prozessierung, des Kernexports, der subzellulären Lokalisation und der Translationskontrolle durch die Mitglieder dieser Proteinfamilie hin.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, anhand einer funktionellen Charakterisierung von MARTA1 die Bedeutung dieser Proteinfamilie für postranskriptionale Regulationsschritte besser beurteilen zu können. Dabei sollte geklärt werden, ob MARTA1 die dendritische Lokalisation der MAP2-mRNA beeinflusst. Es wurde die subzelluläre Verteilung von MARTA1 in verschiedenen Zellsystemen untersucht sowie seine Interaktion mit dem MAP2-DTE näher charakterisiert. Durch die Identifizierung von Interaktionspartnern ergaben sich weitere Hinweise hinsichtlich der Funktion von MARTA1.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

Antikörper	Herkunft / Katalognummer	eingesetzte Verdünnungen
α -E1B-AP5(hum), monoklonal, aus Ratte	Dr. T. Dobner, Institut für Mikrobiologie, Universität Regensburg	Western Blot: 1 : 10 Co-Immunpräzipitation: 1 : 10 Immunzytochemie: 1 : 10
α -FIR(hum), polyklonal, aus Kaninchen	Dr. D. Levens, National Cancer Institute, Oklahoma	Western Blot: 1 : 2000 Co-Immunpräzipitation: 5 μ g Immunzytochemie: 1 : 1000
α -KSRP(hum), polyklonal, aus Kaninchen	Dr. M. Rehbein, Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie, Hamburg	Western Blot: 1 : 5000 Co-Immunpräzipitation: 5 μ g Immunzytochemie: 1 : 2000
α -AV-Peptide, polyklonal, aus Kaninchen	Clontech, 8367-2	Western Blot : 1 : 100
α -DIG-AP Fab Fragm., polyklonal, aus Schaf	Enzo/Roche, 1993274	<i>in situ</i> -Hybridisierung: 1 : 500
α -DsRed Living Colors D.S. Peptide, polyklonal, aus Kaninchen	Clontech, 8370-2	Western Blot : 1 : 2000
α -FLAG M2, monoklonal, aus Maus	Stratagene, 200472-21	Western Blot: 1 : 2000 Immunzytochemie: 1 : 1000
α -GFP, polyklonal, aus Kaninchen	abcam, ab 6556	Immunzytochemie: 1 : 2000
α -Kaninchen, HRP-gekoppelt, aus Ziege	Amersham Pharmacia, NA934V	Western Blot: 1 : 2000
α -Ratte, HRP-gekoppelt, aus Ziege	Amersham Pharmacia, NA9350	Western Blot: 1 : 2000
α -Kaninchen, ALEXA Fluor® 488-gekoppelt, aus Ziege	Molecular Probes, A-11008	Immunzytochemie: 1 : 2000
α -Kaninchen, ALEXA Fluor® 546-gekoppelt, aus Ziege	Molecular Probes, A-11010	Immunzytochemie: 1 : 2000
α -Maus, ALEXA Fluor® 546-gekoppelt, aus Ziege	Molecular Probes, A-11003	Immunzytochemie: 1 : 2000
α -Ratte, ALEXA Fluor® 546-gekoppelt aus Ziege	Molecular Probes, A-1100	Immunzytochemie: 1 : 2000
α -Schaf, biotinyliert, aus Esel	Dianova, 713-065-003	<i>in situ</i> -Hybridisierung: 1 : 500

Tab.1: Liste der eingesetzten Antikörper

Es sind die Bezeichnungen der Antikörper, deren Herkunft und die eingesetzten Verdünnungen angegeben.

2.1.2 Bakterienstamm

Es wurde mit *E.coli* XL1blue (Genotyp: RecA1, endA1, gyrA96, Tho-1, hsdR17, supE44, relA1, lac (F'proAB lac^qZΔM15Tn10 (Tet^r)) der Firma Stratagene gearbeitet.

2.1.3 Hefe

Für den Hefe-Zwei-Hybrid-Screen wurden Hefe-Zellen des Stammes CG 1945 der Firma Clontech verwendet.

2.1.4 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad p.A. und wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

2.1.5 Lösungen

Wenn nicht näher beschrieben, wurden die verwendeten Lösungen nach Asubel et al. (1991) und Sambrook et al. (1989) angesetzt.

2.1.6 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden vom Service-Labor des Instituts für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie (Universitäts-Krankenhaus Eppendorf, Hamburg) mittels eines DNA/RNA-Synthesizers (Applied Biosystems) hergestellt, mit Hilfe von *MicroSpin* G-25-Säulen nach Herstellerangaben (Amersham Pharmacia) aufgereinigt und auf eine Konzentration von 10 pmol/μl in H₂O eingestellt.

Bezeichnung	5'-3'-Sequenz/ Vorlagesequenz, GenBank-Zugriffsnummer	Schnittstellen	Verwendungszweck	
MR10r	GGAAAAAATATTTTCACAGATGAAG Ratten-EST-Sequenz, (EST291720)		Identifizierung der MARTA1-cDNA-Sequenz der Ratte	
MR1f	CGAGTGGCAACCACCTGC Ratten-EST-Sequenz, (EST291720)			
H3deg.f	AAGGACGCTTTCGCCGACGCXGTXCA hum KSRP-cDNA-Sequenz, (U94832)			
M1r	GAACTTTGCAGCCTGAGTCCT genomische Maus-Sequenz, (AF094696)			
R1f	GCATGGTGGGCTTGATCATTGG MARTA1-cDNA, (AF308818)			
MR6r	GGGCAGGTGGTTGCCACTCG Ratten-EST-Sequenz, (EST291720)			
R8r	CTCTTCTGTCATTGAGGTCCTG MARTA1-cDNA, (AF308818)			
R9r	GAAATCAGGAGTGTGTTATTCAC MARTA1-cDNA, (AF308818)			
BamHlf	TTGGATCCATGTCCGACTACAGCAG MARTA1-cDNA, (AF308818)	BamHI	Klonierung des gesamten ORF der MARTA1-cDNA in den pet28a- Vektor	
Pstlr2	TTCTGCAGCTGCTTGATGGTCTCTCC MARTA1-cDNA, (AF308818)	PstI		
Pstlf3	TTCTGCAGGAGCGGGCTGGGGTGAAG MARTA1-cDNA, (AF308818)	PstI		
Pstlr4	TTCTGCAGCTTTGTTGGGTCATGAG MARTA1-cDNA, (AF308818)	PstI		
Pstlf5	TTCTGCAGCAGCAGCTACAGACCCTAATG MARTA1-cDNA, (AF308818)	PstI		
EcoRlr	TTGAATTCACAGATGAAGTTCATATCC MARTA1-cDNA, (AF308818)	EcoRI		
Narlf	TTGGCGCCTTTGTGGAAATATCTCG MARTA1-cDNA, (AF308818)	NarI		
Narlr	TTGGCGCCCAGGCTGCTGGGGCTGC MARTA1-cDNA, (AF308818)	NarI		
Pf	TTGAATTC CCG CCATGGACTACAGCACGGG GGTCCCCCG / MARTA1-cDNA, (AF308818)	EcoRI		Klonierung der MARTA1-Deletionsmutanten in den pDsRed1-N1-Vektor
Pr	TTGGATCCCTGGGGGGAGGATGGATGG MARTA1-cDNA, (AF308818)	BamHI		
KHf	TTGAATTC CCG CCATGGCCTCAATGACAGA AGAGTATAGG / MARTA1-cDNA, (AF308818)	EcoRI		
KHr+	TTGGATCCCAGGCAGCATTAGGGTCTGTAG MARTA1-cDNA, (AF308818)	BamHI		
Rf	TTGAATTC CCG CCATGGAGGGTCCCCTCTG CCCAGTTGGA / MARTA1-cDNA, (AF308818)	EcoRI I		
Rr	TTGGATCCAGATGAAGTTCATATCCATTTCC MARTA1-cDNA, (AF308818)	BamHI		
Pf,pAS2	ATGCCATATGTCGGACTACAGCACGGGAG GTCCCCCG MARTA1-cDNA, (AF308818)	NdeI	Klonierung der MARTA1-Deletionsmutanten in den pAS2-Vektor	
KHf,pAS2	ATGCCATATGTCATGACAGAAGAGTATAG G MARTA1-cDNA, (AF308818)	NdeI		
NLS-KHf,pAS2	TAGCCATATGACTCCTGATTTTCGGTTTTGG MARTA1-cDNA, (AF308818)	NdeI		

mausAP5 Start forw.	<i>ATGGATGTGCGTCGCCTG</i> Maus-E1B-AP5-Sequenz (BI688516)		Identifizierung der Ratten E1B-AP5- Sequenz
ratAP5- Start-KSV	<i>ATGGACAATATTACCAGACAG</i> Ratten-E1B-AP5-Teilsequenz		Klonierung der Ratten-E1B-AP5- Sequenzen 1 – 1453 und 1435 – 1809 in TOPO blunt II- Vektoren
ratAP5 Seq.3rev.	<i>CTGGAGCTCAATGAACAGAAC</i> Ratten-E1B-AP5-Teilsequenz	SstI	
ratAP5 Seq.3	<i>CTGTTCAATTGAGCTCC</i> Ratten-E1B-AP5-Teilsequenz	SstI	
ratAP5 Stop rev.	<i>CTACTGTGTGCTTGTGCC</i> Ratten-E1B-AP5-Teilsequenz		
BERP+ NcoI forw.	TTCCATGG <i>CAAAGAGGGAGGACAGCCCTG</i> G BERP-cDNA (AF036255)	NcoI	Klonierung der BERP-cDNA in den pACT2-Vektor
BERP rev.	TTGGATCC <i>TGGAGGTATCGATAGGCCTTAA</i> AGC BERP-cDNA (AF036255)	BamHI	
BERP forw. 2	TTGTCGAC <i>GCCCCGCCATGGCAAAGAGGGA</i> GGACAGCC BERP-cDNA (AF036255)	Sall	Klonierung der BERP-cDNA in den pCMV-T2C-Vektor
SiahBPf pACT2	TTGAATTCTCCAGGTCAATGGCCAACAAGG Siah-BP-cDNA (AF165892)	EcoRI	Klonierung der SiahBP-cDNA in den pACT2-Vektor
SiahBPr pACT2	TTCTCGAGAGAGGTCGCTGTTATCAAACG Siah-BP-cDNA (AF165892)	XhoI	

Tab.2: Liste der eingesetzten Oligonukleotide

Es sind die Namen, Sequenzen, Schnittstellen und Verwendungszwecke der Oligonukleotide angegeben. Die Schnittstellen sind fett hervorgehoben, Sequenzen aus kodierenden cDNA-Bereichen, die als Vorlage für die Synthese dienen, sind kursiv gedruckt, die KOZAK-Sequenz ist unterstrichen.

2.1.7 Plasmide

2.1.7.1 Kommerziell erhältliche Ausgangsvektoren

Bezeichnung	Herkunft/Katalognummer	Verwendungszweck
pACT2	Clontech, K1604-A	„Köder“-Plasmid im Hefe-Zwei-Hybrid-System
pAS2	Clontech, K1604-B	„Bank“-Plasmid im Hefe-Zwei-Hybrid-System
pCMV-Tag 2C	Stratagene, 211172	Expression von Fusionsproteinen mit einem N-terminalen FLAG-Peptid (Aminosäuresequenz: MDYKDDDDK) in eukaryotischen Zellen
pEGFP-SK- C3	Clontech, modifiziert durch Dr. S.Kindler	Expression von EGFP (<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>)-Fusionsproteinen in eukaryotischen Zellen (das fluoreszierende Protein stellt den N-Terminus des Fusionsproteins dar)
pET28a	Novagen, 69864-3	Klonierung des gesamten Leserahmens der MARTA1-cDNA

pDsRed1-N1	Clontech, 6921-1	Expression von RFP (<i>Red Fluorescent Protein</i>)-Fusionsproteinen in eukaryotischen Zellen (das fluoreszierende Protein stellt den C -Terminus des Fusionsproteins dar)
pGEM Teasy	Promega, A1360	Klonierung von PCR-Produkten mit A-Überhängen
TOPO-blunt II	Invitrogen Life Technologies, 45-0245	Klonierung von PCR-Produkten ohne überhängende Enden

Tab.3: Liste der eingesetzten Ausgangsvektoren

Es sind die verwendeten Ausgangsvektoren, deren Herkunft und Verwendungszweck aufgelistet.

2.1.7.2 Konstruierte Plasmide

Bezeichnung	Sequenzbereich der Insertion, Schnittstellen, GenBank-Zugriffsnummer	eingesetzte Primer	Verwendungszweck
pDsRed1-N1 /MARTA1	6 - 2163, EcoRI/BamHI (AF308818)	Pf Rr	Lokalisierung von MARTA1 bzw. den MARTA1-Deletionsmutanten in CHO-K1- Zellen, in primären Hippokampusneuronen und in HELA-Zellen und Eingrenzung der RNA-Bindedomänen in den UV-Quervernetzungsanalysen
pDsRed1-N1/P	6 - 429, EcoRI/BamHI (AF308818)	Pf Pr	
pDsRed1-N1/PKH	6 - 1731, EcoRI/BamHI (AF308818)	Pf KHr+	
pDsRed1-N1/KH	433 - 1731, EcoRI/BamHI (AF308818)	KHf KHr+	
pDsRed1-N1/KHR	433 - 2163, EcoRI/BamHI (AF308818)	KHf Rr	
pDsRed1-N1/R	1489 - 2163, EcoRI/BamHI (AF308818)	Rf Rr	
pEYFP-C3/P	6 - 429, EcoRI/BamHI (AF308818)	mit EcoRI und BamHI aus dem jeweiligen pDsRed1-N1-Vektor geschnitten	
pEYFP-C3/PKH	6 - 1731, EcoRI/BamHI (AF308818)		
pEYFP-C3/KH	433 - 1731, EcoRI/BamHI (AF308818)		
pEYFP-C3/KHR	433 - 2163, EcoRI/BamHI (AF308818)		
pEYFP-C3/R	1489 - 2163, EcoRI/BamHI (AF308818)		
pEYFP-C3/MARTA1	6 - 2163, EcoRI/BamHI (AF308818)		
pet28a/MARTA1	1 - 2166 BamHI/EcoRI		

pBS-SKII(-)/MAP2-DTE	2432 - 3071 NotI/XbaI (U30938)	hergestellt von Dr.A.Bli- chenberg	Vorlage für die Sonden- synthesen für die UV- Crosslinking-Assays und für die Sondensynthese für die <i>in situ</i> Hybridisie- rung
pBS-SKII(-)/uA (DTE+)	1586 - 3274 NotI/XbaI (U30938)		
pBS-SKII(-)/ (cod. Region)	1537 - 2850 NotI/XbaI (X51842)		
pBS-SKII(-)/Tubulin	1 - 1617 NotI/XbaI (V01227)		
pAS2/MARTA1	1 – 2166 NdeI/SalI (AF308818)	mit NdeI und SalI aus pet28a/ MARTA1 geschnitten	Ködervektor im Hefe- Zwei-Hybrid-Screen
pAS2/P	1 - 429, NdeI/BamHI (AF308818)	Pf, pAS2 Pr	Eingrenzung der MARTA1-Binde- domänen im Hefe- Zwei-Hybrid-Screen
pAS2/PKH	1 – 1542 NdeI/NcoI (AF308818)	mit NdeI und NcoI aus pet28a/ MARTA1 geschnitten	
pAS2/NLS-KH	326 –1731, NdeI/BamHI (AF308818)	NLS-KHf KHr+	
pAS2/KH	433 - 1731, NdeI/BamHI (AF308818)	KHf, pAS2 KHr+	
pAS2/KHR	433 - 2163, NdeI/BamHI (AF308818)	KHf, pAS2 Rr	
pAS2/R	1542 - 2166 NcoI/SalI (AF308818)	mit NcoI und SalI aus pet28a/ MARTA1 geschnitten	
TOPOblunt-II/rE1B- AP5 (vorn)	1 - 1439 Ratten-E1B-AP5	ratAP5-Start- KSV ratAP5 Seq.3 rev.	Ausgangsvektoren für die Klonierung des Ratten-E1B-AP5 in den pCMV-Tag2C- und den pACT2-Vektor
TOPOblunt-II/ RattenE1B- AP5 (hinten)	1435 - 1809 Ratten-E1B-AP5	ratAP5 Seq.3 ratAP5 Stop rev.	
pCMV-Tag2C/rE1B- AP5	1 - 1809 Ratten-E1B-AP5		Expression von rE1B- AP5 in HeLa-Zellen
pACT2/rE1B-AP5	1 - 1809 BamHI/XhoI Ratten E1B-AP5	mit BamHI und XhoI aus pCMV- Tag2C/rat E1B-AP5 geschnitten	Expression von rE1B- AP5 in Hefe-Zellen

pcDNA3/BERP	1 - 2785 (AF036255)	herge-stellt von Dr.S.R. Vincent	Vorlage für die Klonierungen von BERP
pACT2/BERP	1 - 2785 NcoI/BamHI (AF036255)	BERP NcoIforw. BERPrev.	Expression von BERP in Hefe-Zellen
pCVMV-Tag2C/BERP	221 - 2452 Sall/BamHI (AF036255)	BERP forw.2 BERP rev.	Expression von BERP in HELA-Zellen
pAD-Gal4/rSiah-BP	1 - 1868 (AF165892)	herge-stellt von Dr.A. Poleev	Vorlage für die Klonierungen von SiahBP
pACT2/rSiahBP	74 - 1698 EcoRI/XhoI (AF165892)	SiahBPf,pAC T2 SiahBPr, pACT2	Expression von rSiahBP in Hefe-Zellen
pCMVTag2C/rSiahBP	74 - 1698 EcoRI/XhoI (AF165892)	mit EcoRI und XhoI aus pACT2/rSiah BP geschnit- ten	Expression von rSiahBP in HeLa- Zellen

Tab.4: Liste der eingesetzten konstruierten Plasmide

Es sind die Bezeichnungen der konstruierten Plasmide und die Sequenzbereiche und Genbank-Zugriffsnummern der inserierten Sequenzen angegeben. Außerdem wurden die für die Amplifikation der inserierten Sequenzen notwendigen Primer bzw. die zum Schneiden der Sequenzen notwendigen Restriktionsenzyme und der Verwendungszweck der Plasmide angegeben.

2.1.8 Tiere

Rattus norvegicus: Wistar-Ratten aus der Tierzucht des Universitäts-Krankenhauses Hamburg-Eppendorf

2.1.9 Zelllinien

Bezeichnung	DMSZ-Nr.	Verwendungszweck
CHO-K1 (<i>Chinese Hamster Ovary</i>)	ACC 110	Immunzytochemische Analyse der subzellulären Verteilung von MARTA1 und den MARTA1-Deletionsmutanten
HeLa (<i>Henrietta Lacks</i>)	ACC 57	Lokalisierung von MARTA1 bzw. den MARTA1-Deletionsmutanten und Co-Immunpräzipitationen von MARTA1 und seinen Interaktionspartnern

Tab.5: Liste der verwendeten Zelllinien

Es sind die verwendeten Zelllinien, deren Herkunft und Verwendungszweck angegeben.

2.2 Methoden

Wenn nicht genauer beschrieben, wurden die Methoden nach Asubel et al. (1991) und Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

2.2.1 DNA: Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Der Standardansatz einer Reaktion (50 μ l) enthielt 50 - 200 ng cDNA-Matrize, 30 pmol je *Primer*, 200 μ M je dNTP, 5 μ l 10 x Puffer (siehe Herstellerangaben für Taq- bzw. Pfu-Polymerase, Promega), 2,5 – 3,5 mM MgCl₂, 2 – 5 U Taq- bzw. Pfu-Polymerase, 3 – 5 % DMSO und H₂O ad 50 μ l. Die Ansätze wurden auf Eis zusammenpipettiert und erst bei einer erreichten Temperatur von 94°C in die PCR-Maschine (Gene Amp PCR System 2400, Perkin Elmer) gestellt.

Reaktion	Temperatur	Dauer	Anzahl der Schritte
Prä-Denaturierung	94°C	5 min	1
Denaturierung	94°C	30 sec	25 - 35
Primer-Hybridisierung	55°C - 63°C	30 sec	
Polymerase-Reaktion	72°C	1 min – 3 min	
abschließende Polymerase-Reaktion	72°C	7 min	1

Tab.6: Standardprogramm für PCR

Die zur Primerhybridisierung und Einzelstrangsynthese verwendeten Temperaturen hingen von der Schmelztemperatur der eingesetzten Oligonukleotide und der Länge der PCR-Produkte ab.

Die PCR-Produkte wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt, danach aus der Gelmatrix isoliert und entweder direkt in den pGEMTeasy (Promega)- oder in den TOPO-blunt II (Stratagene)-Vektor kloniert und anschließend sequenziert. Nach Verdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen wurden die amplifizierten DNA-Stücke mit entsprechend linearisierten Plasmiden ligiert. Die resultierenden Klone wurden mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft.

2.2.1.2 Restriktionsverdau von DNA

Der Verdau von Plasmiden und DNA-Fragmenten mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (Invitrogen Life Technologies, MBI Fermentas, New England Biolabs, Roche) erfolgte nach Angaben der Hersteller. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von DNA-Ladepuffer (15 % Ficoll, 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylenyanol) gestoppt und das Ergebnis auf einem Agarosegel analysiert.

2.2.1.3 DNA-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der durch DNA-Präparationen, Restriktionsverdau oder PCR erzeugten DNA-Gemische erfolgte elektrophoretisch in 0,5 - 1,5 %igen (w/v), horizontalen Agarosegelen. Dafür wurde die Agarose (Invitrogen Life Technologies) in 1 x TAE-Puffer, der auch als Laufpuffer diente, gelöst und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (Sigma) versetzt. Die DNA wurde mittels einer 356 nm-UV-Leuchtplatte (UVT 28-M, Herolab) sichtbar gemacht. Zur Abschätzung der Fragmentgrößen wurden DNA-Größenstandards (MBI) aufgetragen.

2.2.1.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der Auftrennung der DNA-Fragmente in Agarosegelen wurden die entsprechenden Gelstücke unter UV-Licht ausgeschnitten und die DNA anschließend mit dem *Qiaex II Gel Extraction System* (Qiagen) aus dem Gel isoliert.

2.2.1.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von 100 – 200 ng verdautem Vektor mit der dreifachen molaren Menge an entsprechend verdauter Fragment-DNA erfolgte mit Hilfe von 1 U T4-DNA-Ligase (Invitrogen Life Technologies) entweder 3 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 12°C. PCR-Produkte mit 3'-Poly(A)-Überhängen wurden mit dem *pGEM T-System II* (Promega) nach Herstellerangaben mit dem pGEM-Teasy-Vektor ligiert.

2.2.1.6 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

2 µl Ligationsansatz bzw. 50 ng Plasmid-DNA wurden zu 20 µl kompetenten *Escherichia coli XL1-blue Subcloning Grade-Zellen* (Stratagene) pipettiert. Nach einer 30minütigen Inkubation auf Eis erfolgte ein 45-Sekunden-Hitzeschock bei 42°C. Nach Zugabe von 900 µl LB-Medium wurden die Zellen für 30 – 60 min bei 37°C geschüttelt. Nach einer zwei-minütigen Zentrifugation (4000 g) wurden die Bakterien in einem geeigneten Volumen LB-Medium auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.7 Plasmid-DNA-Isolierung aus Bakterien

Für eine Minipräparation wurde eine Bakterienkolonie in 4 ml Antibiotika enthaltendem LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Von der Bakteriensuspension wurden 1 – 2 ml zentrifugiert (15800 g, 1 min). Aus den Bakterien wurde mittels „Alkalischer Lyse“ (Sambrook *et al.*, 1989) die Plasmid-DNA isoliert. Sollte die Plasmid-DNA sequenziert werden, erfolgte die Isolierung mit dem *Mini-Prep Kit II* (PeqLab). Größere DNA-Mengen wurden mit dem *Nucleobond AX 100* bzw. *AX 500*-Kit (Machery & Nagel) gewonnen. Für die Transfektion primärer Hippokampusneurone wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des *Endofree-Maxi-Prep-Kits* (Qiagen) isoliert.

2.2.2 RNA: Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 RNA-Präparation aus Gewebe und cDNA-Herstellung

Gehirne adulter Ratten wurden in 100 ml/mg *Trizol* (Invitrogen Life Technologies) homogenisiert. Nach der Isolation der RNA nach Herstellerangaben wurde diese in 300 µl H₂O aufgenommen und die Konzentration durch spektralphotometrische Analyse (GeneQuant, Pharmacia) bestimmt. Die gewonnene Gesamt-RNA wurde direkt für eine Reverse Transkription eingesetzt. Die cDNA wurde mit der *Superscript II*-Reversen Transkriptase (Invitrogen Life Technologies) nach Angaben des Herstellers synthetisiert. Die auf diese Weise gewonnene cDNA diente als Ausgangsmaterial für verschiedene PCRs.

2.2.2.2 5' RACE (Rapid Amplification of cDNA-Ends)

Das 5'-Ende der MARTA1-cDNA wurde mittels 5'RACE identifiziert, die mit dem *SMARTTM RACE cDNA Amplification-Kit* (Clontech) nach Angaben des Herstellers durchgeführt wurde.

2.2.2.3 RNA-Gelelektrophorese

Die Überprüfung der *in vitro*-transkribierten RNA-Sonden erfolgte in einem etwa 8 cm x 5 cm x 0,5 cm großen, horizontalen Formaldehyd-Agarose-Gel (1 % (w/v) Agarose in 20 mM MOPS, 4 mM Natriumacetat, 0,5 mM EDTA, 3,7 % Formaldehyd). Es wurde je 1 fmol pro Sonde in Probenpuffer (51 % deionisiertes Formamid, 2,4 % Formaldehyd, 20 mM MOPS, 4 mM Natriumacetat, 6,5 mM EDTA, 14 % Sucrose, 0,005 % Bromphenolblau, 0,005 % Xylenxyanol) verdünnt, auf das Gel aufgetragen und bei 150 V ca. 20 min in 1 x MOPS aufgetrennt. Als Größenmarker dienten die Farbstoffe Bromphenolblau (200 nt) und Xylenxyanol (2000 nt).

2.2.2.4 *In vitro* RNA-Synthese für die UV-Quervernetzungs-Analysen

Die Transkriptionsvektoren wurden durch Restriktionsverdau linearisiert. Die *in vitro*-Transkription der Sonden erfolgte in Ansätzen mit je 250 ng des entsprechenden linearisierten Vektors, je 500 μ M ATP, CTP und GTP, 10 μ M UTP, 0,015 M DTT, 10 U *RNasin* (Amersham Pharmacia) und 50 μ Ci (12,5 μ M; 800 Ci/mmol) α -³²P-UTP (Amersham Pharmacia) mit Hilfe der T3- oder T7-RNA-Polymerase (Promega, MBI Fermentas) bei 4°C. Danach wurden die *Templates* mit je 3 U RNase-freier DNase (Promega) verdaut. Nicht eingebaute Nukleotide wurden mit Hilfe von *MicroSpin G25*-Säulen (Amersham Pharmacia) nach Angaben des Herstellers entfernt. Anschließend wurden die Sonden auf einem Formaldehydgel analysiert. Unmarkierte Kompetitor-RNA für die UV-Quervernetzungs-Analysen wurden mit Hilfe des *Ribo-Max-T3*-Kits (Promega) nach Herstellerangaben hergestellt.

2.2.2.5 Herstellung Dig-markierter RNA-Sonden für die *in situ*-Hybridisierung

Für die *in vitro*-Transkription wurde eine Mischung (Endvolumen 20 μ l) aus 1 μ g der linearisierten Transkriptionsvektoren, 1 x Transkriptionspuffer (MBI), 40 U RNase-Out, je 2 mM ATP, GTP und CTP, 1,3 mM UTP, 0,7 mM Digoxigenin-gekoppeltes UTP (Enzo/Roche) und 0,7 μ l T3- bzw. T7-Polymerase (MBI) 2 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde das *Template* mit RNase-freier DNase (Promega) verdaut. Diese Reaktion wurde nach 15minütiger Inkubationszeit bei 37°C mit 2 μ l 0,5 M EDTA, pH 8,0, gestoppt. Anschließend folgte eine alkalische Hydrolyse der RNA mit 40 mM NaHCO₃ und 60 mM Na₂CO₃ bei 60°C in einem Endvolumen von 200 μ l. Diese wurde mit 1,3 μ l Eisessig und 6,6 μ l 3M Natriumacetat, pH 5,2, gestoppt. Die Sonden wurden danach durch eine Ethanol-fällung präzipitiert und in 100 μ l H₂O aufgenommen. Nicht eingebaute Nukleotide wurden mittels *MicroSpin G25*-Säulen (Amersham Pharmacia) nach Herstellerangaben entfernt. Die Bestimmung der Sondenkonzentration erfolgte mit Hilfe eines *Dot Blots* (Handbuch: *Nucleic Acid Isolation and Purification*, Boehringer Mannheim).

2.2.2.6 UV-Quervernetzungs-Analysen

Es wurden jeweils 10 μ g Rohlysat transfizierter bzw. untransfizierter HeLa-Zellen mit 5 fmol radioaktiv markierter RNA-Sonde in einem Gesamtvolumen von 20 μ l Bindungspuffer (10 mM HEPES, pH 7,6, 3 mM MgCl₂, 40 mM KCl, 5 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 10 μ g/ μ l Heparin) für 20 min inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend mit UV-Licht (254 nm, 1 Joule/cm²) im UV-Stratalinker (Stratagene) bestrahlt. Nach einem 15minütigen Verdau mit RNaseA *TypXIIA* (Sigma) wurden jeweils 5 μ l 5 x Laemmli-Probenpuffer zugegeben, bevor eine Auftrennung der Ansätze auf 10%igen SDS-Polyacrylamid-Gelen

erfolgte. Danach wurden die Gele bei 80°C unter Vakuum mittels eines Geltrockners (483 / SLAB Dryer, BioRad) getrocknet. Radioaktiv markierte Proteine wurden durch Autoradiographie auf *BioMax*-Filmen (Kodak) detektiert.

2.2.2.7 *In situ*-Hybridisierung an primären Hippokampusneuronen

Für die *in situ*-Hybridisierungen wurden auf Deckgläsern gewachsene Hippokampusneurone 1 x mit PBS + 4 % (w/v) Sucrose gewaschen und für 15 min in 4 % (w/v) Paraformaldehyd, 4 % (w/v) Sucrose, 5 mM EGTA, 2 mM MgCl₂ in PBS fixiert. Anschließend wurden die Zellen 3 x mit 4 % (w/v) Sucrose in PBS gewaschen und mit UV-Licht („Crosslink-Funktion“ des UV-Stratalinkers, Stratagene) bestrahlt. Die Zytoplasmamembran wurde für 3 min in 0,1 % (v/v) Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Nach 3maligem Waschen mit 2 mM MgCl₂ in PBS wurden die Deckgläser bei RT getrocknet und entweder sofort prähybridisiert oder bis zur Verwendung bei –80°C gelagert.

Die Prähybridisierung dauerte 2 h bei 55°C mit 50 % (v/v) Formamid, 5 x SSC, 5 x Denhardt-Lösung, 0,2 % SDS, 50 µg/ml Heparin und je 250 µg/ml denaturierte Lachssperm-DNA und Hefe-tRNA in einer mit 50 % Formamid gesättigten Kammer. Die Hybridisierung mit der Dig-markierten Sonde (50 pg/ml) in Prähybridisierungslösung (jetzt mit 100 µg/ml Heparin) fand ebenfalls bei 55°C über Nacht statt. Danach wurde 2 x 10 min mit 0,1 % (w/v) SDS in 1 x SSC bei RT und anschließend 1 x 10 min und 1 x 30 min mit 0,1 % (w/v) SDS in 0,2 x SSC bei 50°C gewaschen und zuletzt 15 min mit TNT (TBS + 0,05 % (v/v) TWEEN-20) equilibriert. Nachdem 2 h mit TNB-1 (TBS + 1 % *Blocking Reagents* (Perkin Elmer)) blockiert worden war, erfolgte die zweistündige Inkubation mit dem Schaf-anti-Dig-Antikörper (1 : 500 in TNB-1). Dann wurden die Zellen 3 x 20 min mit TNT gewaschen und über Nacht mit dem biotinylierten Esel-anti-Schaf-Antikörper (1 : 500 in TNB-1) inkubiert. Nachdem die Zellen erneut, wie oben beschrieben, gewaschen worden waren, erfolgte die Signalverstärkung mit dem TSA (*Tyramide Signal Amplification-Indirect*) -System (Perkin Elmer) nach den Angaben des Herstellers. Zum Schluß wurden die Deckgläser mit *Permafluor*-Lösung (Immunotech) auf Objektträger gebracht und anschließend am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Parallel zur *in situ*-Hybridisierung erfolgte ein Proteinnachweis durch Immunzytochemie.

2.2.3 Protein: Molekularbiologische und biochemische Methoden und Immunchemie

2.2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Pro Spur wurden 10 – 20 µg Protein auf 10 - 12%ige SDS-Polyacrylamidgele (Sambrook et al., 1989) aufgetragen und bei 200 Volt für ca.1 h in SDS-Laufpuffer (25 mM Tris-Base, 19,2 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) aufgetrennt. Die Größen aufgetrennter Proteine wurden anhand vorgefärbter Protein-Größenstandards (*Full Range Rainbow-Marker*, Amersham Pharmacia, *Benchmark-Marker*, Invitrogen Life Technologies) bestimmt.

2.2.3.2 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen und immunologische Detektion der Proteine (*Western Blot*)

Von den SDS-Gelen wurden die Proteine auf eine PVDF- (*Polyvinylidene Fluoride*, Millipore) Membran, übertragen, um sie für eine immunologische Detektion zugänglich zu machen. Der Transfer erfolgte nach den Herstellerangaben für die Membran und die Blot-Apparatur (BioRad) in Blotpuffer (38 mM Glycin, 47 mM Tris-Base, 0,03 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Methanol) für 1 h bei 100 V und 4°C. Nach dem Proteintransfer wurde der *Western Blot* 1 h mit Blockierlösung (5 % (w/v) Magermilchpulver in PBS) behandelt. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper (entsprechende Verdünnung in Blockierlösung) erfolgte für 1 –2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Danach wurde der Blot 3 x 10 min mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die 1 – 2stündige Inkubation mit einem HRP (*horseradish peroxidase*) -gekoppeltem sekundären Antikörper bei RT. Nach erneutem Waschen wurden die markierten Proteine mit dem ECL-Reagenz (*Enhanced Chemiluminescence*, Amersham Pharmacia) auf einem Röntgenfilm (*Cronex Medical X-Ray-Film*, Sterling Biodiagnostic Imaging) detektiert.

2.2.3.3 Koimmunpräzipitation von Proteinen

Von den HeLa-Zellextrakten, aus denen die Proteine präzipitiert werden sollten, wurden zunächst jeweils 20 µl als Input-Kontrolle abgenommen. Danach wurden die Extrakte mit 20 µl Protein A-Agarose (Santa Cruz) 1 h bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Die Agarose wurde danach 3 min bei 500 g pelletiert, 2 x mit CoIP-Puffer (80 mM KCl, 20 mM Tris, pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 % Igepal) gewaschen und in 20 µl Laemmli-Puffer aufgenommen. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 2 – 5 µg Antikörper und 20 µl Protein A-Agarose versetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C auf dem Rotator. Anschließend wurde die Suspension wie oben zentrifugiert, vom Überstand wurden 20 µl als Kontrolle abgenommen, das Agarose-Pellet wurde wie oben gewaschen und anschließend in Laemmli-Puffer aufgenommen. Die Input-Kontrolle, die Protein A-Agarose-

Kontrolle, die Überstand-Kontrolle und das ColP-Pellet wurden mittels *SDS-PAGE* und *Western Blot* analysiert.

2.2.3.4 Immunzytochemie

Die auf Deckgläschen fixierten Zellen wurden durch eine 5minütige Inkubation mit 1 % Triton-X-100 in PBS permeabilisiert und für 1 h in Blockierlösung (0,5 % Rinderserumalbumin, 3 % Ziegenserum in PBS) inkubiert. Danach erfolgte die 1stündige Inkubation mit dem ersten Antikörper (entsprechende Verdünnung in 3 % Ziegenserum in PBS). Nach dreimaligem Waschen mit PBS für jeweils 5 min wurde der zweite Antikörper (entsprechende Verdünnung in 3 % Ziegenserum in PBS) auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen erneut 3 x mit PBS gewaschen und kurz in H₂O equilibriert, bevor sie mit *Permafluor*-Lösung (Becton Dickinson) auf Objektträger gebracht wurden.

2.2.4 Hefe: Zwei-Hybrid-System

Wenn nicht anders beschrieben, wurden diese Methoden nach den Protokollen der Fa. Clontech (*Matchmaker Gal4 Zwei-Hybrid User Manual, Yeast Protocols Handbook*) mit dem Hefestamm CG 1945 (Freilotter et al. 1994) durchgeführt.

2.2.4.1 Transfektion von Hefezellen

Es wurden 100 ml Vollmedium (YPD Broth, Bio 101) oder Selektionsmedium mit 50 µl einer Vorkultur von CG 1945-Hefezellen angeimpft und über Nacht bei 30°C geschüttelt. Die Kultur wurde danach 3 min bei 2000 g zentrifugiert, 1 x mit H₂O gewaschen und in 1 ml Lösung I (10 mM Tris, pH 7,0, 1 mM EDTA, 100 mM Lithiumacetat) resuspendiert. Von der Hefesuspension wurden 200 µl mit 20 µg denaturierter Lachssperm-DNA und 3 µg Plasmid-DNA sowie 1 ml Lösung II (10 mM Tris, pH 7,0, 100 mM Lithiumacetat, 40 % Polyethylenglycol 3350) vermischt und 30 min bei 30°C geschüttelt. Danach wurden die Zellen einem 15minütigen Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und anschließend kurz abzentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 200 µl H₂O resuspendiert, auf den entsprechenden Selektions-Agarplatten (*Select Agar*, Invitrogen Life Technologies) ausplattiert und 3 – 5 Tage bei 30°C inkubiert.

2.2.4.2 Zwei-Hybrid-Screen

Mit dem Köderplasmid transfizierte Hefezellen wurden in 100 ml ØTrp-Flüssigmedium (BIO 101) kultiviert und nach einem Tag in eine 250 ml-Kultur überführt. Nachdem die Zellsuspension eine optische Dichte von 0,8 erreicht hatte, wurden 250 ml YPAD-

Vollmedium (YPD (BIO 101), 10 mM Adenin-Sulfat) zugegeben und die Zellen weitere 4 h bei 30°C geschüttelt. Danach wurden die Hefezellen bei 2000 g zentrifugiert, mit TE-Puffer gewaschen, in 20 ml Lösung III (10 mM Tris, pH 8,0, 1 mM EDTA, 100 mM Lithiumacetat, 0,96 M Sorbitol) resuspendiert und erneut für 30 min geschüttelt. Die Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert und in 1,5 ml Lösung III aufgenommen. Diese Suspension wurde mit 13,1 ml Lösung II (10 mM Tris, pH 7,0, 1 mM EDTA, pH 8,0, 100 mM Lithiumacetat, 40 % Polyethylenglycol 3350) und der DNA-Mischung (500 µg Rattengehirn-cDNA-Bank, 500 µl Lachssperm-DNA, 150 µl Lithiumacetat, 150 µl TE-Puffer) vermischt und für 30 min leicht geschüttelt. Danach wurden 1,4 ml DMSO zugefügt und die Zellen einem 20minütigen Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Nach der Zugabe von 100 ml ØTrp, ØLeu, ØHis-Selektionsmedium wurden die Hefezellen für 2 h bei 30°C geschüttelt, danach pelletiert, mit TE-Puffer gewaschen und in 4 ml TE-Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden zu je 300 µl auf ØTrp, ØLeu, ØHis, +10 mM 3-Amino-1,2,4-triazol-Selektionsplatten ausplattiert. Um die Anzahl der transfizierten Zellen zu bestimmen, wurden 2, 5 und 10 µl der Suspension in je 300 µl TE-Puffer aufgenommen und auf ØTrp, ØLeu- Selektionsplatten ausgestrichen.

2.2.4.3 β-Galaktosidase-Filtertest

Die Hefekolonien, die nach dem *Screen* auf den Selektionsplatten gewachsen waren, wurden auf einem 125 mm-Filter (597 S&S Filterpapier, Schleicher & Schuell) ausgestrichen. Dieses Filter wurde mit den Kolonien nach oben in ein Bad mit flüssigem Stickstoff gelegt, um die Zellen aufzuschließen. Ein zweites Filter wurde in einer Petrischale mit β-Gal-Lösung (83,5 µl *BluoGal* (Invitrogen Life Technologies)), 20 mg/ml Dimethyl Fluorid, 13,5 µl β-Mercaptoethanol in 5 ml Z-Puffer (16,1 g/l Na₂HPO₄, 5,5 g/l NaH₂PO₄, 0,75 g/l KCl, 0,246 g/l MgSO₄, pH7,0) getränkt. Das erste Filter wurde kurz an der Luft getrocknet und luftblasenfrei auf das zweite Filter gelegt. Nach 1 – 8 h färbten sich die positiven Kolonien blau. Als Positiv-Kontrolle dienten CG 1945-Zellen, die das Gal4-Expressions-Plasmid C1-1 (Fields & Song, 1989) enthalten.

2.2.4.4 Cycloheximid-Selektion

Die Hefezellen, die im β-Galaktosidase-Filtertest positiv waren, wurden auf ØLeu, +Cycloheximid (1 mg/l, Sigma)- Selektionsplatten ausplattiert. Nach 4 – 5 Tagen wurden Kolonien mit einem Durchmesser von 1 – 2 mm sowohl auf ØTrp- als auch auf ØLeu-Selektionsplatten ausgestrichen. Die Kolonien, die nur noch das „Beute“-Plasmid enthielten, wuchsen nur auf ØLeu-Platten. Für die anderen Kolonien wurde die Prozedur wiederholt.

2.2.4.5 Plasmidisolierung aus Hefezellen

Positive Hefekolonien, die ihr „Köder“-Plasmid verloren hatten und nur noch das „Beute“-Plasmid enthielten, wurden in 4 ml \emptyset Leu-Selektionsmedium angeimpft und über Nacht bei 30°C geschüttelt. Von den Kulturen wurden 1,5 ml bei 15800 g 1 min lang abzentrifugiert und danach in 200 μ l Lyse-Puffer (2 % (v/v) Triton-X-100, 1 % (w/v) SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris, 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) wurden die Ansätze für 2 min kräftig geschüttelt und anschließend für 5 min bei 15800 g zentrifugiert. Die wässrigen Überstände enthielten die Plasmid-DNA, die durch Ethanol-fällung präzipitiert, in 20 μ l H₂O resuspendiert und anschließend sequenziert wurde.

2.2.5 Zellkultur

2.2.5.1 Kultivierung der CHO-K1-Zellen

Die Zelllinie aus Ovarzellen des chinesischen Hamsters (ACC 110) wurde in Ham's F12-Medium (Gibco/BRL) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS, Biother) in unbeschichteten Gewebekultur-Plastikschalen (Greiner) bei 37°C und 5 % CO₂ in einem Inkubator (Heraeus) kultiviert. Für das Umsetzen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 0,25 % Trypsin/PBS (Invitrogen Life Technologies) durch eine ca. 5minütige Inkubation bei 37°C von den Platten gelöst. Nachdem die Suspension 1:1 mit Kulturmedium verdünnt worden war, wurden die Zellen durch Zentrifugation (1 min, 170 g) geerntet, in frischem Medium aufgenommen und in neuen Gewebekulturschalen oder auf unbeschichteten Deckgläsern (Assistent) ausgesät.

2.2.5.2 Kultivierung der HeLa-Zellen

Die humane Cerwix-Karzinom-Zelllinie (ACC 57) wurde in Dulbecco's Modifiziertem Eagle-Medium (DMEM) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS, Biother) genau wie die CHO-K1-Zellen kultiviert.

2.2.5.3 Kultivierung der primären Hippokampusneurone

Hippokampusneurone wurden nach der Methode von Banker et al., 1998 aus dem Gehirn von 18 – 20 Tage alten Rattenembryonen präpariert. Die Deckgläser (Durchmesser: 18 mm, Assistent), auf denen die Zellen kultiviert wurden, wurden zuvor 18 – 24 h mit rauchender Salpetersäure und danach mindestens 6 x mit H₂O gewaschen. Anschließend wurden sie getrocknet, sterilisiert und über Nacht mit Poly-L-Lysin (Sigma) in 0,1 M Borat-Puffer beschichtet. Pro Deckglas wurden 100000 – 120000 Neurone in *Plating*-Medium (MEM

(Gibco) + 10 % (v/v) Pferdeserum (Gibco)) ausplattiert. Nach drei Stunden wurde das Medium durch Neurobasalmedium (Neurobasalmedium (Gibco), 1 x B27 (Gibco), 0,5 mM L-Glutamin, 25 µM Glutamat) ersetzt. Nach vier Tagen erfolgte ein erneuter Mediumwechsel, wobei das neue Neurobasalmedium kein Glutamat, dafür aber 5 µM AraC (Cytosin-β-D-Arabinofuranosid (Sigma)) enthielt. Die Zellen wurden alle drei Tage gefüttert, wobei jeweils nur die Hälfte des Mediums ersetzt wurde. Nach drei Tagen enthielt das Neurobasalmedium nur noch B27 und L-Glutamin.

2.2.5.4 Transfektion der CHO-K1-Zellen

Für die Transfektion einer zu 60 – 70 % konfluent bewachsenen Gewebekulturplatte mit einem Durchmesser von 12 cm wurden in einem sterilen 1,5 ml-Reaktionsgefäß 8 – 10 µg Plasmid-DNA zu 400 µl Optimem-Medium (Gibco/BRL) gegeben und gemischt. In einem 12 ml-Falcon-Gefäß wurden 10 µl *Lipofektamin* (Becton Dickinson) mit 400 µl Optimem gemischt. Die Inhalte beider Gefäße wurden in diesem Gefäß vereinigt, gemischt und 30 min bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden 3,2 ml Optimem zu dem Ansatz gegeben, gemischt und auf den vorher mit Optimem gewaschenen Zellen verteilt. Nach sechs Stunden Inkubation bei 37°C wurde der Transfektionsansatz durch mehrmaliges Waschen mit PBS von den Zellen genommen und durch Ham's F12-Medium ersetzt. Die Zellen wurden weitere 24 h inkubiert, bevor die rekombinanten Proteine nachgewiesen werden konnten.

2.2.5.5 Transfektion der HeLa-Zellen

In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 500 µl steriles 2 x HBS (280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, 12 mM Glukose, 50 mM Hepes, pH 7,05) vorgelegt. In einem zweiten Gefäß wurden 10 µg Plasmid-DNA mit 64 µl x 2M CaCl₂ gemischt und mit sterilem H₂O auf 500 µl aufgefüllt. Diese Mischung wurde unter Luftzufuhr tropfenweise zu dem 2 x HBS gegeben und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem den HeLa-Zellen einer Gewebekulturplatte (Durchmesser 12 cm, 60 – 80 % konfluent bewachsen) frisches DMEM gegeben worden war, wurde der Transfektionsansatz für 6 – 12 h zu den Zellen gegeben. Danach wurden die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen, mit neuem DMEM versetzt und weitere 24 h inkubiert, bevor der Nachweis der rekombinanten Proteine erfolgte.

2.2.5.6 Transfektion primärer Hippokampusneurone

Es wurden H₂O, 10 µg mit *Endofree* (Qiagen) gereinigte Plasmid-DNA und 10 µl x 2,5 M CaCl₂ (Gesamtvolumen 100 µl) in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß vorgelegt. Dazu wurden unter Luftzufuhr 100 µl 2 x BBS (50 mM BES, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, pH 6,96) gegeben. Der Ansatz wurde 20 min bei RT inkubiert. Danach wurden 100 µl des Ansatzes pro einem ml Medium zu den auf Deckgläsern gewachsenen Hippokampusneuronen

gegeben, für 3 – 4 h bei 37°C inkubiert, danach 3 x mit HBSS (1 x HBSS (Gibco BRL), 10 mM HEPES, 2 mM NaOH) gewaschen und für eine Woche kultiviert.

2.2.5.7 Herstellung von Gesamtzellextrakten kultivierter Zellen

Die Zellen einer Gewebekulturschale wurden in 1 ml Laemmli-Puffer aufgenommen, 15 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 15800 g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zum Nachweis der Proteine durch *Western Blot* bei –20°C gelagert.

2.2.5.8 Herstellung von Rohlysaten kultivierter Zellen

Die Zellen einer Gewebekulturschale wurden in PBS mit einem Zellschaber von der Schale gelöst und kurz zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen in 100 µl Extraktionspuffer (10 mM HEPES, pH 7,6, 3 mM MgCl₂, 40 mM KCl, 5 % Glycerol, 0,2 % NP40 (Sigma), 1 mM DTT, 4 % Protease-Inhibitor *Complete*, (Roche) aufgenommen und 7 min im Eiswasserbad mit Ultraschall (Transsonic T460, Eima) behandelt. Die Zelltrümmer wurden anschließend für 10 min bei 15800 g pelletiert. Der Überstand, das Rohlysat, wurde abgenommen, schockgefroren, bei –80°C gelagert und für UV-Quervernetzungs-Analysen verwendet. Sollten die Extrakte für Co-Immünpräzipitationen verwendet werden, wurden die geernteten Zellen sofort in 1 ml des jeweiligen Co-IP-Puffers aufgenommen und anschließend genau wie die Rohlysate behandelt. Diese Extrakte wurden allerdings nicht gelagert, sondern sofort verwendet.

2.2.5.9 Fluoreszenzmikroskopie

Um die Verteilung fluoreszierender Proteine in transfizierten CHO-K1 oder HeLa-Zellen zu untersuchen, wurden die auf Deckgläsern gewachsenen Zellen mit 4 % Paraformaldehyd /PBS (Merck) für ca. 10 min fixiert. Die Deckgläser wurden mit *Permafluor*-Lösung (Immunotech) auf Objektträger (Menzel) gebracht und am Fluoreszenzmikroskop (Leitz) mit der Software *Openlab* ausgewertet. Die Proteine wurden vorher durch Immunzytochemie sichtbar gemacht.

2.2 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
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
Qiagen 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

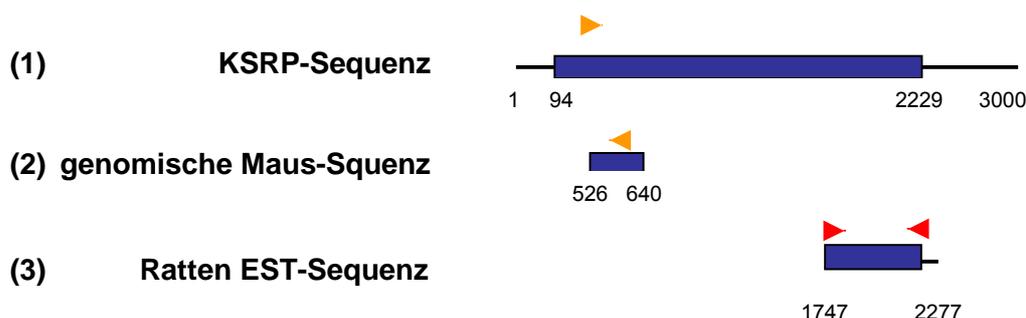
Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, das DTE (Dendritic Targeting Element) bindende Protein MARTA1 funktionell zu charakterisieren. Es wurde insbesondere der Frage nachgegangen, ob MARTA1 am zytoplasmatischen Transport der MAP2-mRNA beteiligt ist.

3.1 Klonierung und Analyse der MARTA1-cDNA

3.1.1 PCR-Klonierung der MARTA1-cDNA

In Abbildung 1 ist die PCR-Klonierung der MARTA1-cDNA schematisch dargestellt.

Datenbank-Sequenzen:



von der Rattengehirn-cDNA
amplifizierte Sequenzen:

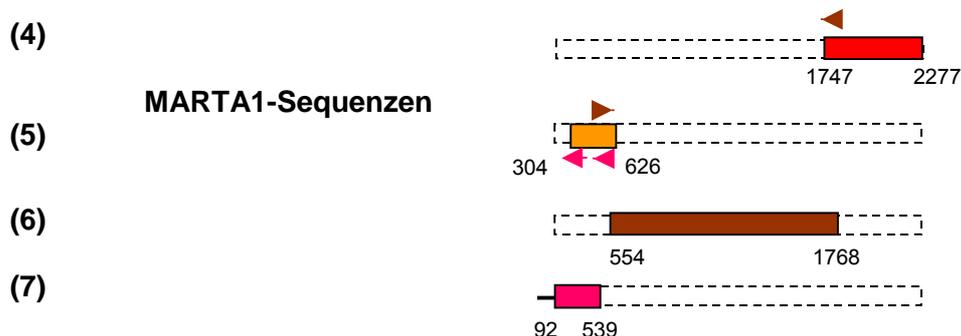


Abb. 1: PCR-Klonierung der MARTA1-cDNA

Mit verschiedenen maus-, ratten- und humanspezifischen Oligonukleotiden wurden verschiedene Bereiche der MARTA1-Sequenz aus cDNA von Gehirnen adulter Ratten amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden jeweils in der gleichen Farbe dargestellt wie die entsprechenden Oligonukleotide. Gestrichelte Boxen stellen die im entsprechenden Schritt nicht amplifizierten Bereiche dar. Linien bezeichnen 5'- bzw. 3'-UTRs (Untranslated Regions).

Das MAP2-mRNA-Bindeprotein MARTA1 (Rehbein *et al.*, 2000) ist das Ratten-Ortholog des humanen Proteins KSRP (*KH type Splicing Regulatory Protein*, Rehbein *et al.*, 2002). Deshalb wurde mit Hilfe des Programms *BLAST Search* vom *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) nach EST (*Expressed Sequence Tag*)-Sequenzen der Ratte gesucht, die Ähnlichkeiten zur KSRP-Sequenz (U94832, Abb.1, (1)) zeigen. Es wurde ein EST-Klon (EST291720, Abb.1, (3)) gefunden, der über eine Länge von 527 Nukleotiden eine 86 %ige Identität zu den Nukleotiden 1747 bis 2277 der KSRP-mRNA aufweist. Dieser Klon umfasst die Sequenz für die 176 carboxyterminalen Aminosäuren des Proteins KSRP und einen Teil der 3' UTR (*Untranslated Region*). In der Datenbank wurde zusätzlich eine genomische Maus-Sequenz (AF094696, Abb.1 (2)) gefunden, in der zwei zusammengesetzte Exons eine 87 %ige Identität zu den Nukleotiden 526 bis 640 der KSRP-mRNA aufweisen. Die MARTA1-cDNA wurde schrittweise amplifiziert und sequenziert und die verwendeten Primer von den zuerst amplifizierten Fragmenten hergeleitet. Die einzelnen Amplifikationsschritte sind in Abbildung 1 dargestellt.

Zunächst wurde mit den von der Ratten-EST-Sequenz abgeleiteten Oligonukleotiden MR1f und MR10r und RNA aus dem Gehirn adulter Ratten eine RT-PCR durchgeführt. So konnte der dem Ratten-EST-Klon entsprechende Bereich der MARTA1-cDNA-Sequenz amplifiziert werden (Abb.1, (4)). Danach wurde mit Hilfe der von der humanen KSRP-Sequenz bzw. der genomischen Maus-Sequenz abgeleiteten Oligonukleotide H3deg.f und M1r ein 324 Nukleotide umfassender Teil der MARTA1-Sequenz amplifiziert. Dieser Teil entspricht den Nukleotiden 304 bis 626 der KSRP-Sequenz (Abb.1, (5)). Mit den Oligonukleotiden R1f und MR6r (beide von der MARTA1-Sequenz abgeleitet) wurde ein 1214 Nukleotide großes Stück amplifiziert. Es entspricht den Nukleotiden 554 bis 1768 der KSRP-Sequenz (Abb.1, (6)). Der die aminoternale Region von MARTA1 kodierende Sequenzbereich wurde durch *5'-RACE* (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) identifiziert. Dafür wurden die von der MARTA1-Sequenz abgeleiteten Oligonukleotide R8r und R9r sowie der *PCR-anchor Primer*, der mit den bei der Erststrangsynthese am 5'-Ende spezifisch angehängten Nukleotiden hybridisiert, verwendet. So wurde ein 447 Nukleotide langer, das Start-Codon der MARTA1-cDNA enthaltender Bereich amplifiziert (Abb.1, (7)).

Die in Abbildung 2 dargestellte MARTA1-cDNA ist zu 87 % identisch zur KSRP-cDNA. Sie umfaßt 2182 Nukleotide, wovon die Nukleotide 1 – 2166 die kodierende Region darstellen. Dieser Bereich kodiert ein 721 Aminosäuren umfassendes, 74,2 kDa großes Protein. Das mittels UV-Quervernetzungsanalysen identifizierte, durch ein radioaktives Fragment des MAP2-DTE markierte MARTA1 läuft im SDS-Gel bei ca. 90 kDa (Rehbein *et al.*, 2000). KSRP aus HEK-Zellen zeigt in diesen Analysen eine ähnliche Bindungsspezifität für das MAP2-DTE. Es ist dabei auf einer Höhe von ca. 85 kDa nachweisbar (Rehbein *et al.*, 2002). Die errechnete Proteingröße für KSRP beträgt 73,2 kDa. Deshalb kann die Richtigkeit

des MARTA1-Start-Codons angenommen werden. Die PCR-Klonierung von MARTA1 ergab keine Hinweise auf die Existenz von Spleißvarianten. Die MARTA1-cDNA ist unter der Nummer AF308818 am *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) zugänglich.

3.1.2 Sequenzanalyse von MARTA1

```

1 ATGTCCGACTACAGCACGGGAGGTCCCCCGCCCGCCCGCCGCTCCCGCTGGCGGAGGAGGAGGAGCCGCGGGT
1 M S D Y S T G G P P P G P P P P A G G G G G A A G
76 CCGGGAGGAGCCCTCCCGGGCCCGGGTGGGAGACCGGGGGCGGGAGGCGCCGCGGGCCG
26 A G G G P P P G P P G A G D R G G G G P G G G P
151 GGTGGAGGAGCGCGTCCGGGGCCCTTCGCAGCCTCCGGTGGCGCGGTCCGGGATACGCAAGACGCCTTC
51 G G G A S G G P S Q P P G G G P G I R K D A F
226 GCCGACGCCGTGCAGCGGGCCCGCAGATTGCAGCCAAAATCGGAGGTGATGCTGCTACCACCGTGAATAACAAC
76 A D A V Q R A R Q I A A K I G G D A A T T V N N N
301 ACTCTGATTTCCGTTTGGGGCCAAAAGAGACAGTGGAGACCAGCCAGACAGCAAGAACTGGT
101 T P D F G F G Q K R Q L E D G D Q P D S K K L A
376 TCCAGGGAGATCAATTGGTTCTCAGCTGGGACCCATCCATCCTCCCCCAGGACCTCAATGACAGAAGATGAT
126 S Q G D S I G S Q L G P I H P P P R T S M T E E Y
451 AGGGTTCCGGACCGCATGGTGGGCTTGATCATTGGCAGAGGTGGTGGAGCAGATAAAACAAAATCCAGCAGGACTCA
151 R V P D G M V G L I I G R G G E Q I N K I Q Q D S
526 GGCTGCAAAGTTCAGATCTCACCAGATAGTGGCGGCCCTCCCTGAGCGCAGTGTGTCCCTGACTGGAGCACCAGAG
176 G C K V Q I S P D S G G L P E R S V S L T G A P E
601 TCTGTCCAAAAGGCAAAGATGATGCTGGATGACATTGTGTCTCGGGGCCGTGGAGGCCCCCCAGGACGTTCCAT
201 S V Q K A K M M L D D I V S R G R G G P P G Q F H
676 GACAACGCCAACGGGGTCCAGATGGCACAGTGCAGGAGATCATGATCCCTGCTGGCAAGGCTGGCCTGGTCATT
226 D N A N G G Q N B T V Q E I M I P A G K A G L V I
751 GGCAAGGGTGGAGAGACCATCAAGCAGCTGCAGGAGCGGGCTGGGGTGAAGATGATTTAATTCAGGACGGCTCC
251 G K G G E T I K Q L Q E R A G V K M I L I Q D G S
826 CAGAACACAAATGTGGACAAGCCGCTGCGGATTATTGGGGACCCATACAAAAGTACAGCAAGCCTGTGAGATGGT
276 Q N T N V D K P L R I I G D P Y K V Q Q A C E M V
901 TGGACATCTCGGAGAACGTGACCAGGTGGCTTTGGGGACCCGCAATGAATACGGATCTCGGTTGGCGGAGGC
301 M D I L R E R D Q G F G D R N E Y G S R V G G G
976 ATCGATGTGCCTGTACCCCGGCATTCCGTTGGTGTGGTTCATTGGCCGGAGTGGAGAGATGATCAAGAAGATCCAG
326 I D V P V P R H S V G V V I G R S G E M I K K I Q
1051 AATGATGCTGGTGTGCGCATCCAGTTCAGCAAGATGACGGGACCCGGCCCTGAGAAGATTGCTCACATCATGGG
351 N D A G V R I Q F K Q D D G T G P E K I A H I M G
1126 CCTCCAGATCGGTGTGAGCATGCAGCCGGATCATCAATGACCTCCTCCAGAGTCTTCGGAGTGGGCCCCAGGT
376 P P D R C E H A A R I I N D L L Q S L R S G P P G
1201 CCTCCAGGGCCCTGGCATGCCCCCTGGAGCCCGGGCGAGGCCAAGGCAACTGGGGCCCTCCCTGGA
401 P P G A P G M P P G G R G R G R G Q G N W G P P G
1276 GGGGAGATGACTTTTCCATTCTACCCATAAATGTGGGCTGGTTCATTGGCCGAGGTGGGGAGAACGTGAAGGCC
426 G E M T S I P T H K F G C G L V I G R G G E N V K A
1351 ATTAACAGCAGACAGGCGCCTTTGTGAAATATCTCGGCAGCTGCCGCCAATGGAGACCCCAATTTCAAGTTA
451 I N Q Q T G T A F V E I S R Q L P P N G D P N F K L
1426 TTTGTCCCGGGGCTCACCTCAGCAGATTGACCATGCAAAGCAGCTCATTGAGGAGAAGATAGAGGTTCCCTC
476 F V I R G S P Q Q I D H A K Q L I E E K I E P L
1501 TGCCAGTTGGACCAGGCCCTGGGGGACCAGGCCCTGCTGGACCCATGGGGCCTTTCCACCTGGACCTTCAAC
501 C P V G P G P G G P G P A G G P M G P F H P G P F N
1576 CAGGGCCCTCCAGGGCACCACACATGCTGGTGTCCCTCCTCACCAGTACCCGCTCAGGGCTGGGGCAAT
526 Q G P P G A P P H A G G P P P H Q Y P P Q G W G N
1651 AACTACCCCGAGTGGCAACCACCTGCCCTCATGACCCAAACAAAGTGCAGCAGCAGTACAGACCCATATGCT
551 T Y P E W Q P P A P H D P N K A A A A A T D P N A
1726 GCCTGGGCGCCTACTACTCCACTACTACAGCAACCCAGGCCCGCTGCCAGGCCCTGCCAGCCCTGCA
576 A W A A Y Y S H Y Y Q Q P P G P V P G P A P A P A
1801 GCCCCACCTGCGCAAGGGGAGCCCCCGCCTACTGCGCAATCAGACTATACCAGGGCTTGGGAAGAG
601 A P P A Q G E P P Q P P P T G Q S D Y T K A W E E
1876 TATTACAAAAAATTGGCCAGCAGCCAGCAGCTGAGGCGCCCCACAGCAGGATTACACCAAGGCCTGGGAG
626 Y Y K K I G Q Q P Q Q P G A P P Q Q D Y T K A W E
1951 GAGTACTACAAGAAGCAAGCACAAGTGGCCACTGGTGGGGTCTGGAGCACCCCTGGCTCCAGCCTGACTAC
651 E Y Y K K Q A Q V A T G G G P G A P P G S Q P D Y
2026 AGTGCCGCTGGGCTGAGTATTACAGACAGCAGGCTGCTACTACGGACAGCCCGAGGCCCTGGTGCCACAG
676 S A A W A E Y Y R Q Q A A Y Y G Q T P G P G G Q
2101 CCACCTTCCACCCAGGACAGCAGCAGGCAACTGAAGCAAATGGATATGAACCTCATCTGTGAAATTATTTTTC
701 P P S T Q Q G Q Q Q A T E A N G Y E L H L ...
2176 CCTTCAA

```

Abb.2: Die MARTA1-cDNA- und Aminosäuresequenz

Es sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenz (fett) von MARTA1 dargestellt. Start- und Stop-Codon erscheinen kursiv. Die KH-Domänen sind dunkelblau, die prolinreiche Sequenz in der aminoterminalen Domäne ist hellblau, das Kernlokalisierungssignal grün, die 25-Aminosäure-Repeats gelb und die Y-Motive orange dargestellt.

MARTA1 enthält in seinem zentralen Bereich 4 KH-Domänen (*K-homology domains*), die ursprünglich im Protein hnRNPK (*heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein-Partikel-Protein K*) als RNA-bindende Domänen identifiziert wurden (Siomi *et al.*, 1993). Die aminoterminal Domäne weist einen großen Anteil von Prolin- und Glycin-Resten auf (83 % im Bereich zwischen den Aminosäuren 7 bis 69). Sie enthält außerdem ein klassisches zweiteiliges Kernlokalisierungssignal (Lodish *et al.*, 1996) im Bereich der Aminosäuren 110 bis 123. Im carboxyterminalen Bereich befinden sich zwei Wiederholungen von jeweils 25 Aminosäuren, die eine 68 %ige Identität zueinander aufweisen. Ebenso konnten innerhalb dieses Bereiches vier sogenannte Y-Motive (AW(A/E)(A/E)YY) identifiziert werden. Sie nehmen bei dem zu MARTA1 ähnlichen Protein FBP1 (*FUSE Binding Protein*) transaktivierende Aufgaben wahr (Duncan *et al.*, 1996).

MARTA1 zeigt ein hohes Maß an Sequenzidentität zu den Mitgliedern der FBP (*FUSE Binding Proteins*) -Gruppe. In Abbildung 3 sind alle Mitglieder der FBP-Familie von RNA-Bindeproteinen dargestellt. Der phylogenetische Stammbaum zeigt, daß die Proteine in drei Gruppen eingeteilt werden können, wobei die Aminosäuresequenz von MARTA1 die höchste Übereinstimmung mit KSRP (98 %) und ZBP2 (90 %) aufweist.

Bezeichnung	Spezies	Referenz	Identität zu MARTA1
MARTA1 (<i>MAP2-RNA trans-acting Protein 1</i>)	Ratte	Rehbein <i>et al.</i> , 2002 (AF308818)	-
KSRP (<i>KH-type Splicing Regulatory Protein</i>) = FBP2	Mensch	Min <i>et al.</i> , 1997 (U94832)	98 %
ZBP2 (<i>Zipcode Binding Protein 2</i>)	Huhn	Gu <i>et al.</i> , 2002 (AF461020)	90 %
VgRBP71 (<i>Vg1-RNA Binding Protein 71</i>)	Xenopus	Kroll <i>et al.</i> , 2002 (AF533513)	83 %
FBP (<i>FUSE Binding Protein</i>)	Mensch	Duncan <i>et al.</i> , 1994 (U05040)	70 %
FBP3 (<i>FUSE Binding Protein 3</i>)	Maus	XM_130112 28484914	53 %
MARTA2 (<i>MAP2-RNA trans-acting Protein 2</i>)	Ratte	Rehbein <i>et al.</i> , in Vorbereitung	51 %

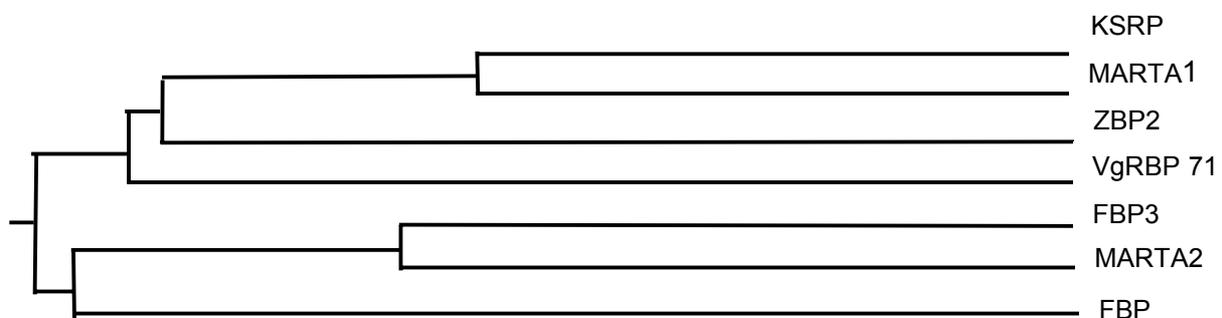


Abb.3: Die FBP-Proteinfamilie

In der Tabelle sind alle bisher bekannten Mitglieder dieser Proteinfamilie von RNA-Bindeproteinen dargestellt. Der phylogenetische Stammbaum zeigt die hohe Verwandtschaft der Proteine.

3.2 Charakterisierung des RNA-Bindeproteins MARTA1

3.2.1 Die subzelluläre Verteilung von MARTA1

MARTA1 verfügt über ein klassisches Kernlokalisierungssignal, was vermuten läßt, daß es eine Funktion im Zellkern hat. Die UV-Quervernetzungsanalysen, die zur Identifizierung des Proteins geführt haben (Rehbein *et al.*, 2000), ergaben, daß MARTA1 sowohl im Kern als auch im Zytoplasma vorhanden ist. Um diesen Sachverhalt näher zu untersuchen, wurden die subzelluläre Verteilung des rekombinanten MARTA1 und mehrerer MARTA1-Deletionsmutanten in verschiedenen Zellsystemen untersucht. Es wurden CHO-K1-Zellen mit Vektoren transfiziert, die zur Synthese von MARTA1-Varianten mit carboxyterminalem RFP (*Red Fluorescent Protein*) -Tag führten. In HeLa-Zellen wurden Vektoren verwendet, die zur Expression von EYFP (*Enhanced Yellow Fluorescent Protein*) -Fusionsproteinen führten. Zusätzlich wurden die jeweiligen Grundvektoren pDsRed1-N1 und pEYFP-C3 in den entsprechenden Zelllinien allein transfiziert. Die Proteine RFP und EYFP sind allein sowohl im Kern als auch im Zytoplasma der transfizierten Zellen verteilt. Die korrekte Synthese der Fusionsproteine wurde durch *Western Blots* mit Gesamtzellextrakten transfizierter Zellen überprüft. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Abbildung 5 und 6 dargestellt.

Abbildung 4 zeigt, welche Teilbereiche von MARTA1 in den einzelnen Varianten enthalten sind.

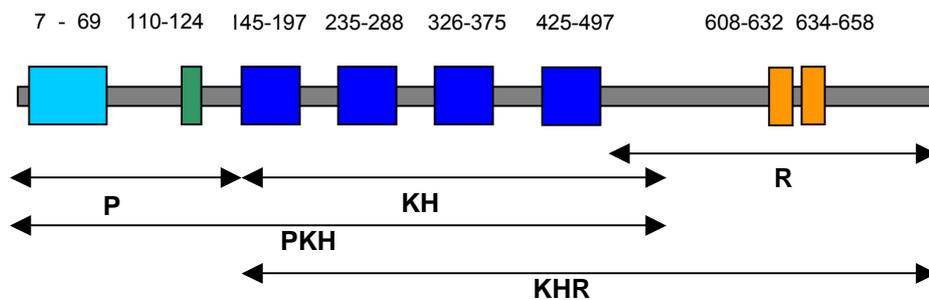
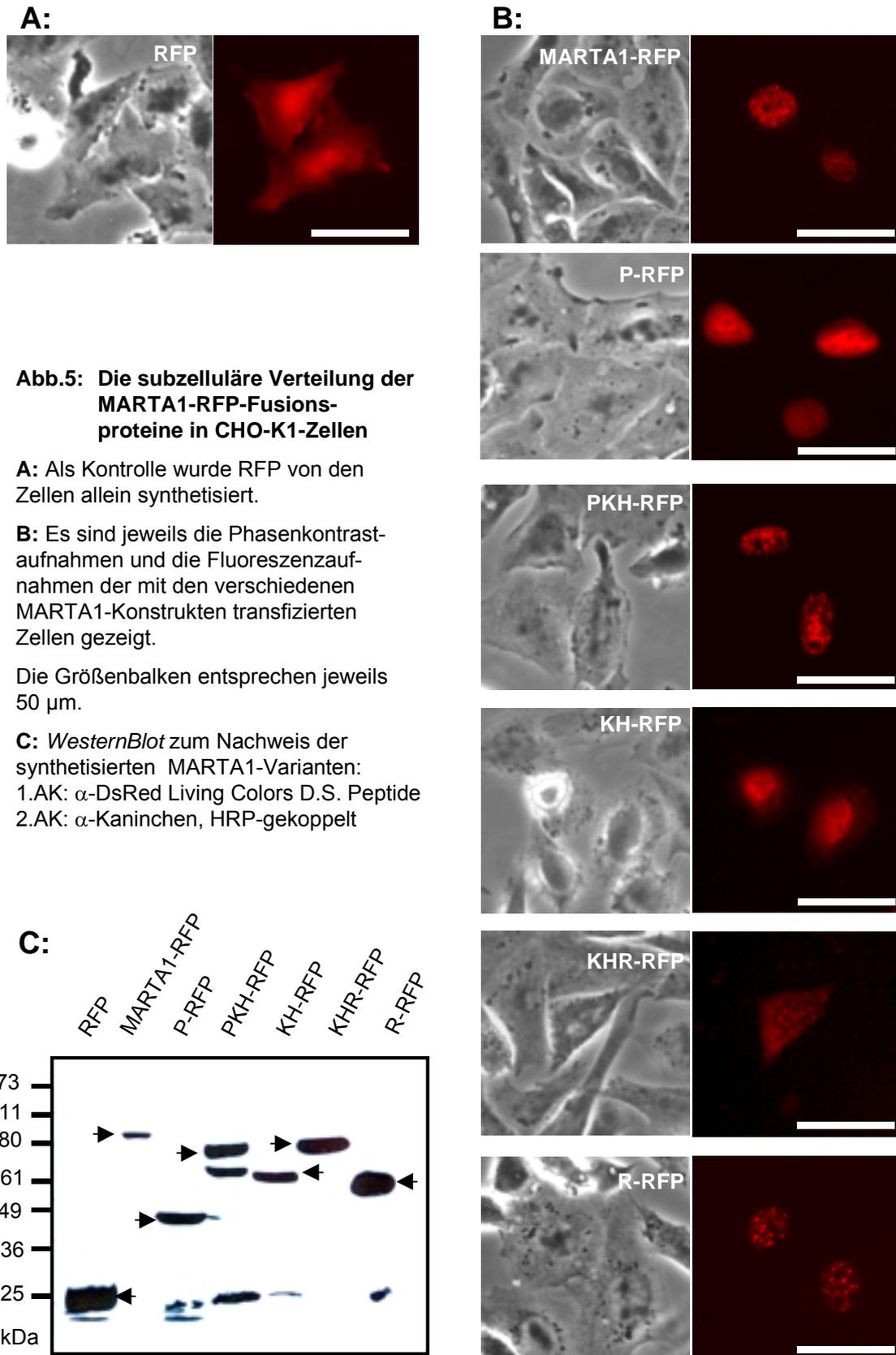
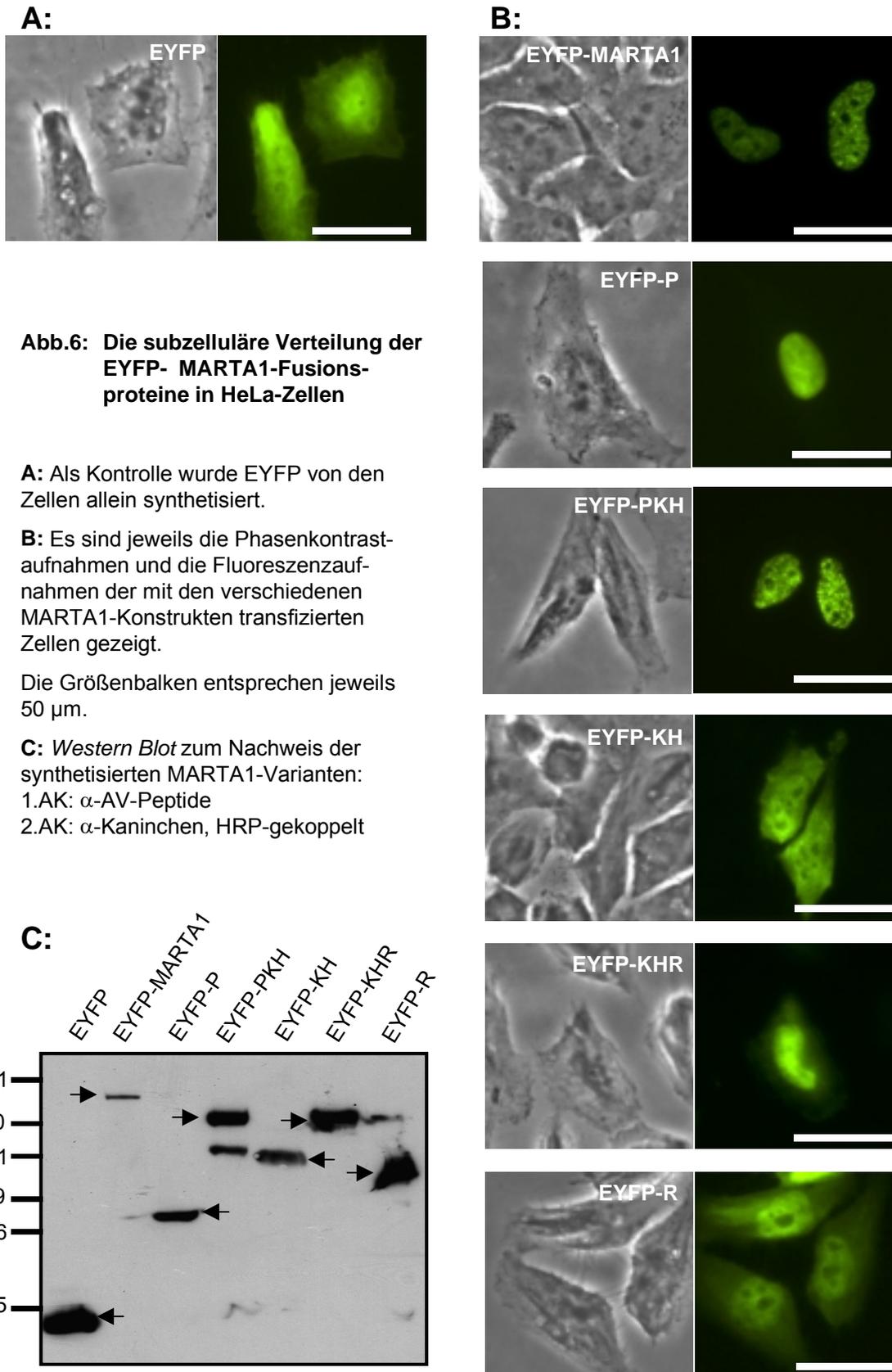


Abb. 4: Domänenstruktur von MARTA1 und Zuordnung der in den Varianten vorhandenen MARTA1-Teilstücke

Im Schema wurden die Prolinreiche Domäne, das Kernlokalisierungssignal, die KH-Domänen und die 25-AminosäureRepeats von MARTA1 in den gleichen Farben dargestellt wie in Abbildung 2. Die in den MARTA1-Varianten enthaltenen Teilbereiche sind durch Doppelpfeile gekennzeichnet. Benannt wurden die Varianten nach ihren typischen Domänen (P = prolinreich, KH = KH-Domänen, R = Repeat-Region)





Sowohl MARTA1-RFP als auch EYFP-MARTA1 sind in CHO-K1- bzw. HeLa-Zellen ausschließlich im Kern lokalisiert. Auffällig ist dabei die granuläre Verteilung der Proteine. Die Verteilungsmuster der mit EYFP bzw. RFP fusionierten Varianten P, PKH, KH und KHR sind in CHO-K1- und HeLa-Zellen ebenfalls ähnlich. Die das Kernlokalisierungssignal enthaltenden P-Fusionsproteine sind ausschließlich im Zellkern lokalisiert, sind aber im Gegensatz zu den vollständigen MARTA1-Fusionsproteinen homogen verteilt. Die Lokalisation der PKH-Varianten entspricht derjenigen der vollständigen Proteine. Das klassische Kernlokalisierungssignal in der aminoterminalen Domäne dirigiert das Protein demnach effektiv in den Zellkern. Die KH-Domänen könnten daran beteiligt sein, das durch das klassische Kernlokalisierungssignal in den Kern transportierte MARTA1 dort zum Ort seiner Funktion zu geleiten. Die KH- und KHR-Varianten sind sowohl im Kern als auch im Zytoplasma verteilt. Dies bedeutet, daß auch innerhalb der zentralen Domäne ein kernlokalisierendes Signal vorhanden ist.

Das RFP-fusionierte R-Protein ist in CHO-K1-Zellen ausschließlich im Kern nachzuweisen. Das granuläre Verteilungsmuster unterscheidet sich von dem des vollständigen MARTA1. Die Granulae sind kleiner als bei dem MARTA1-RFP-Fusionsprotein, und ihre Anzahl ist insgesamt geringer. In HeLa-Zellen ist die EYFP-R-Variante dagegen sowohl im Kern als auch im Zytoplasma verteilt. Die Verteilung ist homogen. Um zu untersuchen, ob diese unterschiedlichen Verteilungsmuster zelltypspezifisch oder auf die autofluoreszierenden Proteine RFP bzw. EYFP zurückzuführen sind, wurden beide Fusionsproteine sowohl in CHO-K1- als auch in HeLa-Zellen synthetisiert. In Abbildung 7 ist zu sehen, daß das RFP-fusionierte R-Protein sowohl in CHO-K1- als auch in HeLa-Zellen granulär verteilt ist. Die EYFP-fusionierte R-Variante zeigt dagegen in beiden Zelltypen eine homogene nukleäre und zytoplasmatische Verteilung. Demnach ist das fusionierte RFP für die granuläre Verteilung des Fusionsproteins im Kern verantwortlich. Die Firma Clontech, die den Ausgangsvektor pDsRed1-N1 vertreibt, beschreibt das Phänomen der Aggregation von RFP-Fusionsproteinen in Ihrem Katalog vom Jahr 2002. Die Granulae könnten also durch die Aggregatbildung der Fusionsproteine entstehen und so im Zellkern zurückgehalten werden. Aufgrund der ebenfalls nukleären Verteilung der EYFP-R-Variante verfügt aber auch der carboxyterminale Bereich der MARTA1-Sequenz über kernlokalisierende Sequenzen.

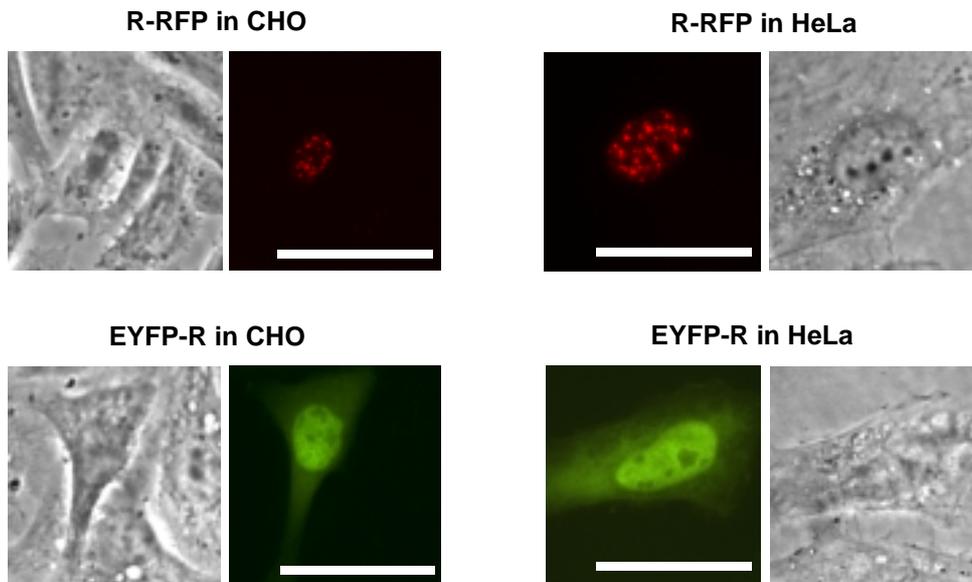
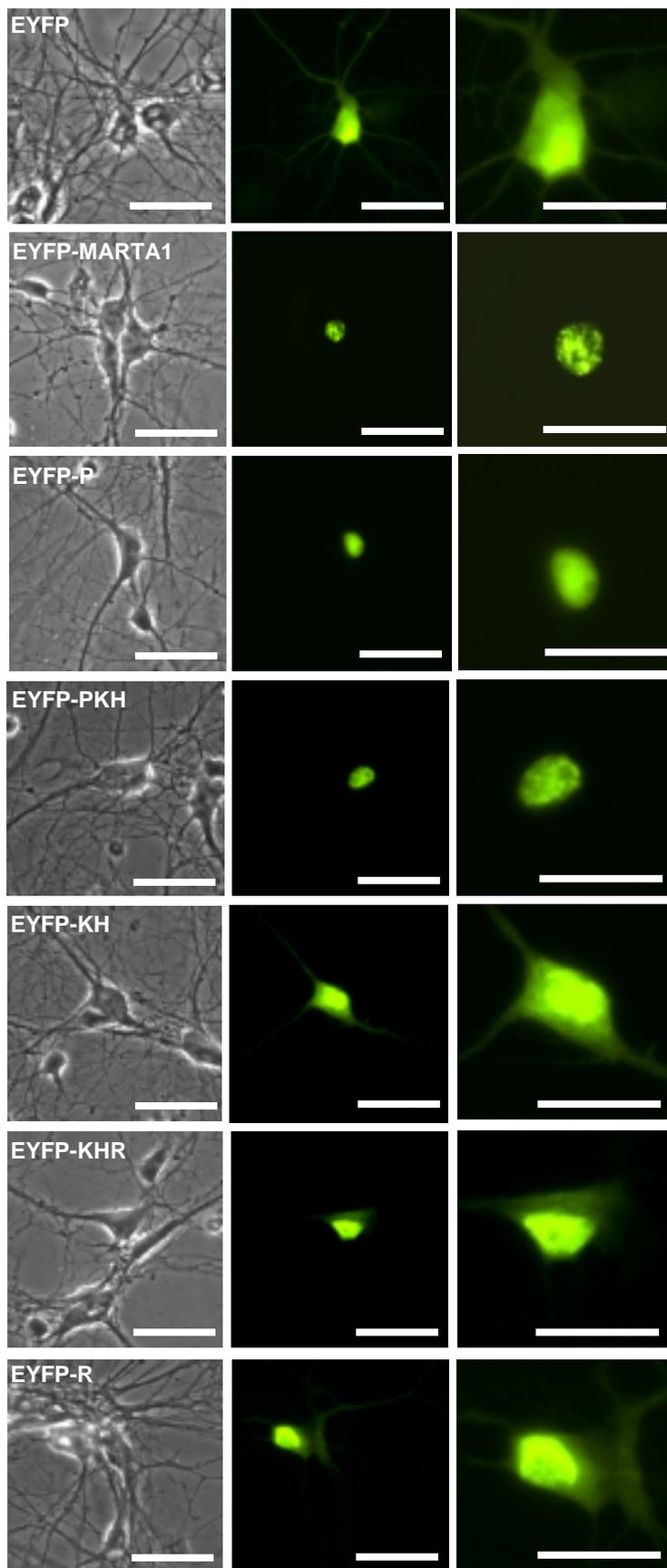


Abb. 7: Die subzelluläre Verteilung von R-RFP und EYFP-R in CHO-K1- und HeLa- Zellen
 Der mit RFP (*Red Fluorescent Protein*) oder EYFP (*Enhanced Yellow Fluorescent Protein*) fusionierte carboxyterminale Bereich von MARTA1 wurde in CHO-K1- bzw. HeLa-Zellen exprimiert. Es sind jeweils die Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen gezeigt. Die Größenbalken stellen jeweils 50 μm dar.

Die subzelluläre Lokalisation eines Proteins gibt Hinweise auf seinen Wirkungsort innerhalb der Zelle. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Funktion des Proteins MARTA1 im Rattengehirn zu untersuchen. Deshalb wurde die Verteilung von MARTA1 und den verschiedenen Teilstücken ebenfalls in primären Hippokampusneuronen der Ratte untersucht. Die vorangegangenen Lokalisationsstudien hatten gezeigt, daß der RFP-Tag möglicherweise zu einer Aggregatbildung des Fusionsproteins führen kann. Deshalb wurden in den primären Hippokampusneuronen die entsprechenden EYFP-Fusionsproteine exprimiert. Die Ergebnisse dieser Transfektionen sind in Abbildung 8 dargestellt.



A:

Abb. 8: Die subzelluläre Verteilung der EYFP-MARTA1-Fusionsproteine in primären Hippokampusneuronen der Ratte

A:

In Spalte 1 und 2 sind jeweils die Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen der mit den verschiedenen EYFP-MARTA1-Konstrukten transfizierten Zellen gezeigt. Spalte 3 zeigt die Fluoreszenzaufnahmen in einer stärkeren Vergrößerung.

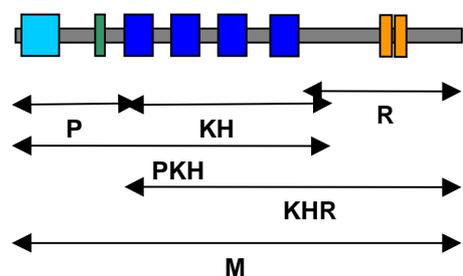
Als Kontrolle wurde EYFP allein von den Zellen synthetisiert. (oberste Reihe).

Die Größenbalken entsprechen 50 μm .

B:

Es sind noch einmal die synthetisierten MARTA1-Teilstücke dargestellt.

B:



Die Lokalisation des rekombinanten EYFP-MARTA1 bzw. seiner Deletionsmutanten in Neuronen entspricht im wesentlichen ihrer Verteilung in HeLa-Zellen. Demnach sind die Varianten EYFP-P und -PKH ausschließlich im Kern verteilt, während die Fusionsproteine EYFP-KH, -KHR und -R sowohl im Kern als auch somatodendritisch lokalisiert sind.

3.2.2 Die Interaktion zwischen MARTA1 und dem MAP2-DTE

Um die Beteiligung des Proteins MARTA1 am Transport der MAP2-mRNA in Dendriten von Rattenneuronen zu untersuchen, sollten in kultivierten Hippokampusneuronen EYFP-Fusionsproteine synthetisiert werden, die mit dem endogenen MARTA1 um die Bindung an die MAP2-mRNA konkurrieren. Dies erforderte die Identifizierung des MARTA1-Bereiches, der an das *Dendritic Targeting Element* (DTE) bindet. Dafür wurden HeLa-Zellen mit Konstrukten transfiziert, die zur Synthese der Fusionsproteine EYFP-MARTA1 bzw. der Varianten EYFP-P, -PKH, -KH, -KHR und -R (beschrieben in Abb.9 B) führten. Die Fusionsproteine wurden mittels *Western Blot* und nachfolgender Antikörper-Detektion nachgewiesen (siehe Abbildung 9 A, oben). Anschließend wurden UV-Quervernetzungs-Analysen mit Extrakten der transfizierten HeLa-Zellen und radioaktiv markierten RNA-Sonden durchgeführt. Als radioaktiv markierte RNA-Sonden dienten das 640 Nukleotide lange *cis*-element der MAP2-mRNA (DTE), ein 1,6 kb großer, das DTE enthaltende Bereich der MAP2-3'UTR (DTE+), ein 1,6 kb großer Bereich aus der kodierenden Region des MAP2-Transkriptes sowie ein ebenfalls 1,6 kb großer Teil der Tubulin-mRNA (dargestellt in Abb. 9 C). Alle Sonden wurden mit den Extrakten der transfizierten HeLa-Zellen und mit einem Extrakt untransfizierter HeLa-Zellen inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden mit den RNA-Sonden durch UV-Licht-Bestrahlung kovalent verknüpft und nach dem RNase-Verdau in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Nach dem Verdau ist noch ein sehr kleiner Teil der RNA kovalent mit den Proteinen verknüpft. Sie laufen im Gel entsprechend ihrer erwarteten Größe und können durch Autoradiographie detektiert werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 9 dargestellt.

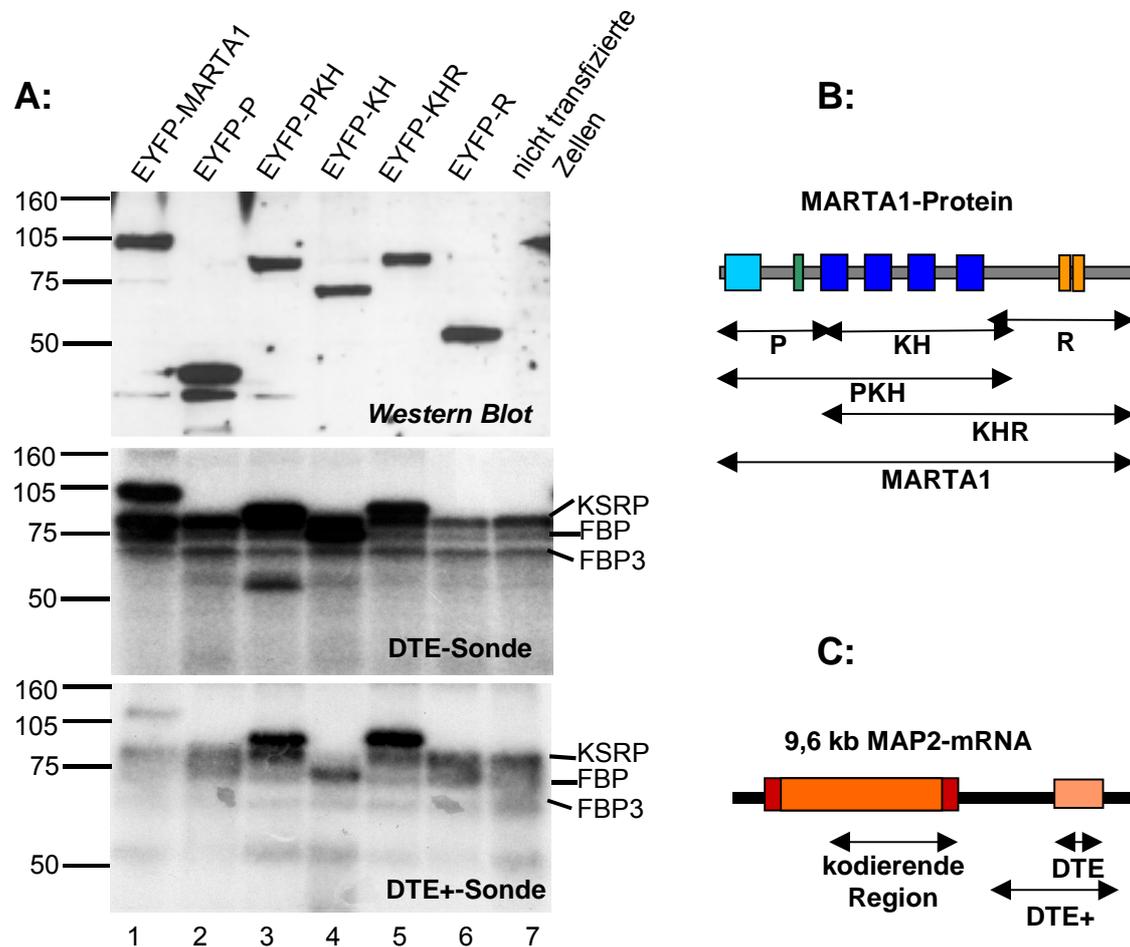


Abb. 9: Die UV-Quervernetzungs-Analysen zur Untersuchung der Bindung von MARTA1 an das MAP2-DTE

A: In der obersten Abbildung ist der *Western Blot* gezeigt, bei dem die rekombinanten Proteine, die in den HeLa-Zellen exprimiert worden waren, immunologisch nachgewiesen wurden.

(1.AK: α -AV-Peptide, 2.AK: α -Kaninchen-IgG, HRP-gekoppelt).

Die mittlere und untere Abbildung zeigen die Autoradiogramme der UV-Quervernetzungs-Analysen von den verschiedenen HeLa-Zellextrakten und der DTE- bzw. der DTE+-Sonde.

B: Die in den HeLa-Zellen synthetisierten Fusionsproteine sind schematisch dargestellt.

C: Die von der MAP2-mRNA abgeleiteten RNA-Sonden sind schematisch dargestellt.

In allen Spuren der gezeigten Autoradiogramme sind jeweils 3 Banden zwischen 60 und 80 kDa zu erkennen, die endogene, an die entsprechenden Sonden bindende Proteine darstellen. Die größte (80 kDa) stellt hierbei KSRP dar, für das bereits eine Interaktion mit dem *Dendritic Targeting Element* der MAP2-mRNA beschrieben wurde (Rehbein *et al.*, 2002). KSRP läuft im Protein-Gel normalerweise als Doppelbande (Black *et al.*, 1997), was entweder auf eine bisher noch nicht identifizierte Spleiß-Variante oder auf verschiedene posttranslationale Modifikationen zurückzuführen sein könnte. Die bei etwa 75 kDa laufende Bande stellt das zu KSRP eng verwandte Protein FBP dar, welches unter den hier verwendeten Pufferbedingungen ebenfalls an die Sonden bindet. Eine weitere schwächere Bande ist bei 65 kDa zu erkennen. Hierbei könnte es sich um FBP3 handeln, das im Bereich der RNA-bindenden Domänen ebenfalls sehr ähnlich zu KSRP ist.

Bei Betrachtung der von den HeLa-Zellen synthetisierten rekombinanten Proteine wird Folgendes deutlich: An die DTE- bzw. die DTE+-Sonde binden ausschließlich die den zentralen Bereich von MARTA1 mit den KH-Domänen enthaltenden Fusionsproteine (Spuren 1, 3, 4 und 5). Die Varianten EYFP-P und -R interagieren weder mit der DTE- noch mit der DTE+-Sonde (Spuren 2 und 6). EYFP-KH bindet dagegen an beide Sonden (Spur 4). Demnach sind weder amino- noch carboxyterminale Bereiche von MARTA1 für seine Bindung an das MAP2-DTE notwendig. Die KH-Domänen sind dagegen sowohl notwendig als auch ausreichend für diese Bindung. Außerdem wurden alle Zellextrakte mit einer Sonde, die einen Teil der kodierenden Region von MARTA1 darstellte, sowie einer Tubulin-Sonde inkubiert und mit UV-Licht bestrahlt. In keinem Fall war eine Proteinbindung an diese Transkripte zu beobachten (nicht gezeigt).

Mit Hilfe von Kompetitions-Analysen sollte die Bindungsspezifität der PKH-, KH- und KHR-Varianten für das MAP2-DTE noch eingehender untersucht werden. Hierbei wurden in UV-Quervernetzungs-Analysen die gleichen Mengen an jeweiligen Zellextrakten sowie radioaktiv markierter DTE-Sonde wie im vorangegangenen Experiment verwendet. Die Analysen wurden für jede Variante sowohl ohne Kompetitor als auch in Gegenwart von einem 20 bzw. 100 fachen Überschuss nicht markiertem Kompetitor durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abbildung 10 dargestellt.

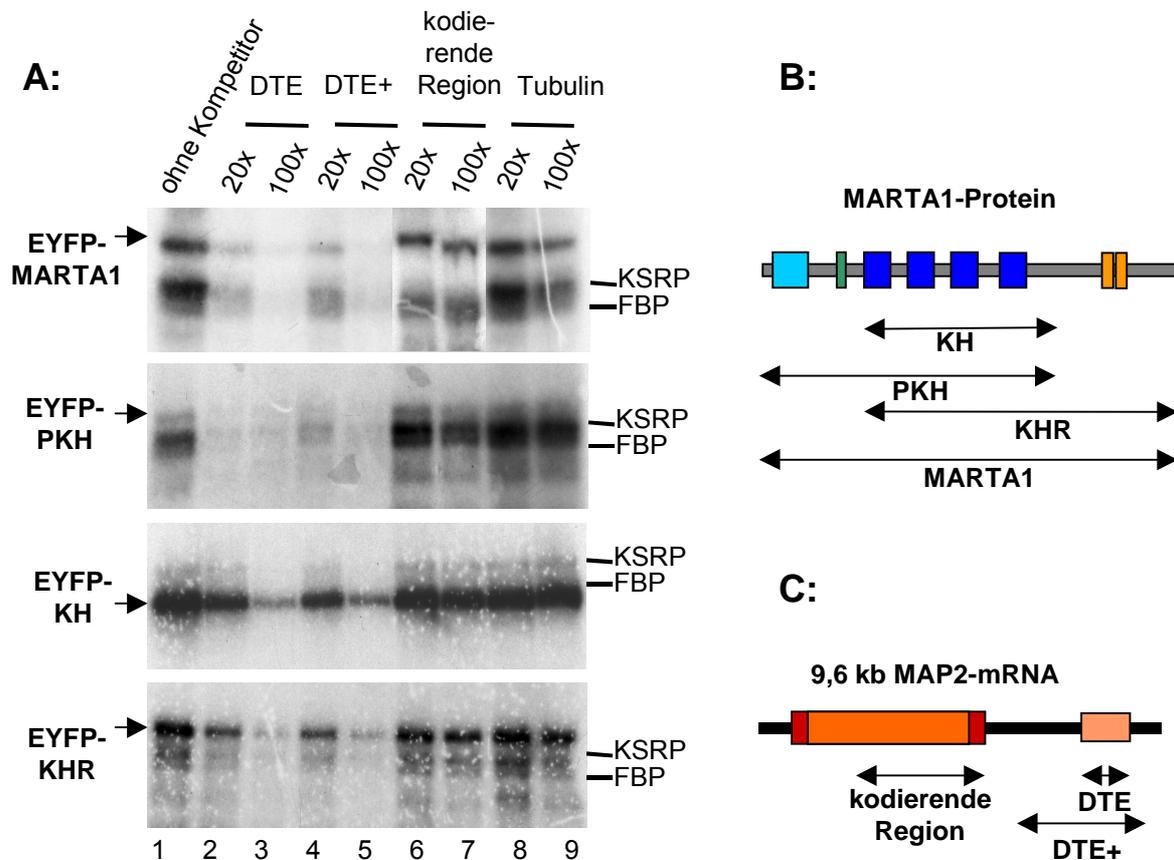


Abb.10: Die Kompetitions-Analysen zur Untersuchung der Spezifität der Bindung von MARTA1 an das MAP2-DTE

A: Es sind die Autoradiogramme der UV-Quervernetzungs-Analysen von den verschiedenen HeLa-Zell-extrakten mit der DTE-Sonde und den verschiedenen Kompetitoren in jeweils 20 fachen und 100 fachen Überschuss gezeigt.

B: Die in den HeLa-Zellen synthetisierten MARTA1-Varianten sind schematisch dargestellt.

C: Die von der MAP2-mRNA abgeleiteten RNA-Sonden sind schematisch dargestellt.

Die Kompetitions-Experimente zeigen folgendes Ergebnis: Die Bindung von EYFP-MARTA1 sowie der Varianten EYFP-PKH, -KH und -KHR an die MAP2-DTE-Sonde verringert sich deutlich bei Zugabe der Kompetitoren DTE und DTE+. Dies ist in allen Autoradiogrammen der Abbildung 10 A an der stark verminderten radioaktiven Markierung der entsprechenden Protein-Banden in den Spuren 2 bis 5 im Vergleich zur Spur 1 erkennbar. Ein 100 facher Überschuss der Kompetitoren im Vergleich zur radioaktiv markierten Sonde (Spuren 3 und 5) wirkt dabei jeweils sehr viel effektiver als ein 20 facher Überschuss des Kompetitors (Spuren

2 und 4). Die DTE-Sonde konkurriert mit den beiden Kompetitoren um die Bindung an die Varianten genau so wie um die Bindung des vollständigen MARTA1. Demnach besitzen alle MARTA1-Varianten, die die KH-Domänen enthalten, eine zum vollständigen MARTA1 vergleichbare Bindungsspezifität für das MAP2-DTE. Die unspezifischen Kompetitoren (kodierende Region der MAP2-mRNA bzw. Tubulin) unterdrücken die Interaktion zwischen den Proteinen und dem *Dendritic Targeting Element* weder in 20 fachem noch in 100 fachem Überschuß (Spuren 6 – 9). In allen Spuren der Autoradiogramme sind wieder die Banden der endogenen Proteine KSRP und FBP zu sehen. Deren Bindung an die Sonde wird ebenfalls durch die spezifischen Kompetitoren DTE und DTE+ vermindert. Die unspezifischen Kompetitoren zeigen hier ebenfalls keinen Effekt. MARTA1 bindet demnach über seine zentrale Region, die aus 4 KH-Domänen besteht, spezifisch an das *Dendritic Targeting Element* der MAP2-mRNA.

3.3 Die Beteiligung von MARTA1 am Transport der MAP2-mRNA

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin zu untersuchen, ob MARTA1 am dendritischen Transport der MAP2-mRNA in Neuronen beteiligt ist. Mit den vorangegangenen UV-Quervernetzungs-Analysen wurde gezeigt, daß die zentrale MARTA1-Region mit den vier KH-Domänen für die spezifische Interaktion mit dem MAP2-DTE ausreichend ist. In HeLa-Zellen interagiert die rekombinante EYFP-KH-Variante genau so mit dem MAP2-DTE wie das vollständige MARTA1. Demnach könnte diese Variante auch in primären Hippokampusneuronen mit dem endogen vorhandenen MARTA1 um die Bindung an die MAP2-mRNA konkurrieren. Im folgenden Experiment sollte deshalb die Auswirkung einer Überexpression der EYFP-KH-Variante auf die subzelluläre Verteilung der endogenen MAP2-mRNA untersucht werden. Dafür wurden primäre Hippokampusneurone mit dem Plasmid transfiziert, das zur Synthese dieser Variante führt. Nach einer Woche wurden die Zellen fixiert und die MAP2-mRNA mittels *in situ*-Hybridisierung sichtbar gemacht. Durch den Vergleich der MAP2-mRNA-Verteilung von transfizierten und untransfizierten Zellen sollten Hinweise auf die Bedeutung von MARTA1 bezüglich der RNA-Lokalisierung erbracht werden. Zur Kontrolle wurde die MAP2-mRNA-Verteilung ebenfalls in Hippokampusneuronen untersucht, die nur mit dem EYFP-Grundvektor transfiziert worden waren. Weil durch die UV-Licht-Bestrahlung während der Fixierung der Neurone und durch die Prozedur der *in situ*-Hybridisierung die Eigenfluoreszenz des EYFP verblasste, wurden die rekombinanten Proteine durch einen polyklonalen α -GFP- und einen α -Kaninchen, ALEXA 488-gekoppelten Antikörper grün fluoreszierend sichtbar gemacht. Die MAP2-mRNA erscheint rot. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 11 zu sehen.

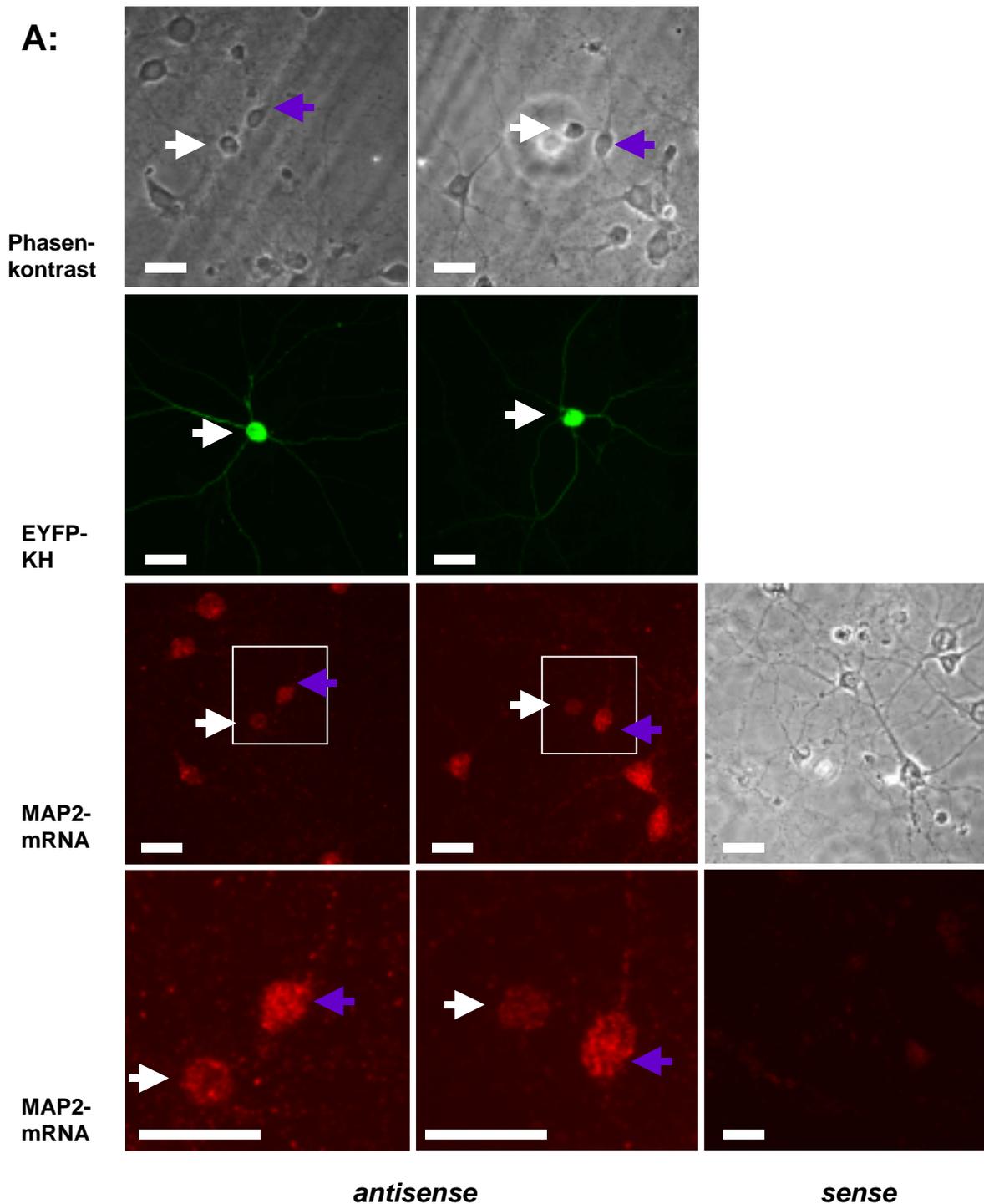


Abb. 11A: Nachweis der MAP2-mRNA in EYFP-KH synthetisierenden primären Hippokampusneuronen

In Hippokampusneuronen der Ratte wurde die MAP2-mRNA mit einer *antisense*- (Spalten 1 und 2) bzw. einer *sense*-Sonde (Spalte 3) hybridisiert. In der ersten Zeile jeder Spalte sind die Phasenkontrastaufnahmen der Neurone gezeigt. In der zweiten Zeile der Spalten 1 und 2 sind EYFP-KH-synthetisierende Zellen (weißer Pfeil) markiert. Zeile 3 zeigt die MAP2-mRNA in den transfizierten (weißer Pfeil) und untransfizierten Zellen (blauer Pfeil). In Zeile 4 sind diese Zellen in einer stärkeren Vergrößerung zu sehen. Die Größenbalken entsprechen 50µm.

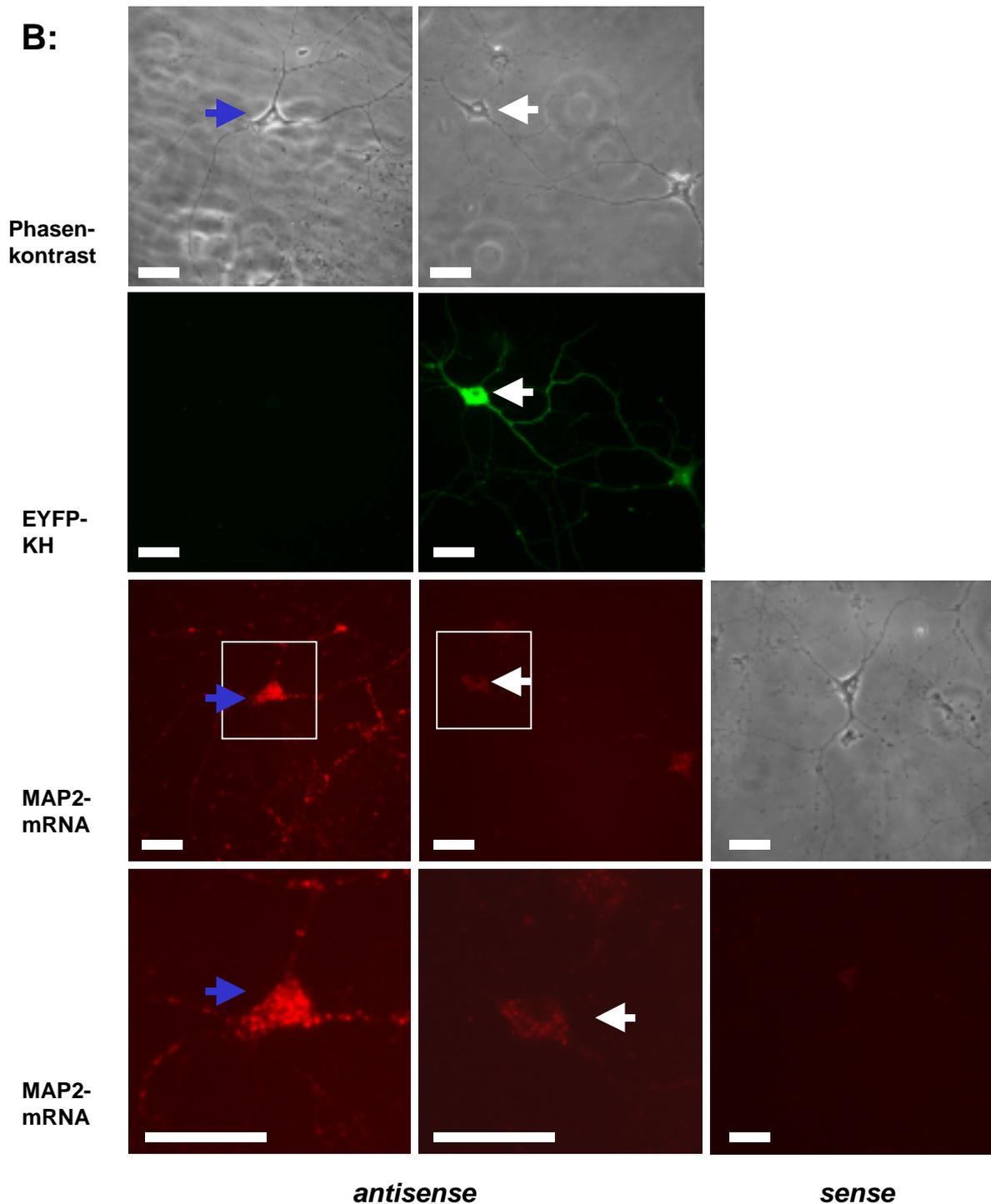


Abb. 11B: Nachweis der MAP2-mRNA in mit EYFP synthetisierenden primären Hippokampusneuronen

In Hippokampusneuronen der Ratte wurde die MAP2-mRNA mit einer *antisense*- (Spalten 1 und 2) bzw. einer *sense*-Sonde (Spalte 3) hybridisiert. In der ersten Zeile jeder Spalte sind die Phasenkontrastaufnahmen der Neurone gezeigt. In der zweiten Zeile der Spalte 2 ist eine EYFP-synthetisierende Zelle (weißer Pfeil) markiert. Zeile 3 zeigt die MAP2-mRNA in den transfizierten (Spalte 2) und untransfizierten Zellen (blauer Pfeil, Spalte 1). In Zeile 4 sind diese Zellen in einer stärkeren Vergrößerung zu sehen. Die Größenbalken entsprechen 50µm.

In Abbildung 11A ist zu erkennen, daß die MAP2-mRNA in untransfizierten Hippokampusneuronen (blauer Pfeil) im Bereich des Zellkörpers sowie in den proximalen Dendriten der Zellen nachweisbar ist. Sie zeigt dabei ein granuläres Verteilungsmuster. In EYFP-KH exprimierenden Neuronen (weißer Pfeil) ist das Signal für die MAP2-mRNA insgesamt deutlich weniger intensiv als in untransfizierten Neuronen. In den Dendriten ist es kaum, im Bereich des Zellkörpers nur schwach detektierbar. Die offenbare Abschwächung des MAP2-mRNA-Signals in transfizierten Zellen könnte auf eine verminderte Synthese oder einen vermehrten Abbau der MAP2-mRNA infolge eines dominant negativen Effekts der überexprimierten EYFP-KH-Variante hindeuten. Allerdings ist in Hippokampusneuronen, die EYFP allein überexprimieren (Abbildung 11B), das selbe Phänomen zu beobachten. In den transfizierten Zellen (weißer Pfeil) ist im Vergleich zu den untransfizierten Zellen (blauer Pfeil) deutlich weniger MAP2-mRNA nachweisbar. Demnach kann aus dem Ergebnis dieses Experiments keine Schlußfolgerung hinsichtlich einer Beteiligung von MARTA1 am MAP2-mRNA-Transport gezogen werden.

3.4 Identifizierung von MARTA1-Bindungspartnern

Bindungspartner von Proteinen geben oft Aufschluß über deren Funktion. Es ist bekannt, daß RNA-Bindeproteine innerhalb größerer Proteinkomplexe (RNPs) an die RNA binden. Beispielsweise interagieren die zu MARTA1 orthologen Proteine ZBP2 und VgRBP71 gemeinsam mit anderen Proteinen mit den Lokalisierungselementen der β -Aktin- bzw. Vg1-mRNA (Gu *et al.*, 2002, Kroll *et al.*, 2002). Das MARTA1-orthologe Protein KSRP nimmt seine Aufgaben beim alternativen Spleißen in Neuronen ebenfalls innerhalb eines Multi-Protein-Komplexes wahr (Min *et al.*, 1997). Um die Funktion von MARTA1 hinsichtlich des Transportes der MAP2-mRNA zu untersuchen, sollten deshalb Bindungspartner von MARTA1 identifiziert werden.

3.4.1 Hefe-Zwei-Hybrid-System

Mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems wurde nach Proteinen gesucht, die mit MARTA1 interagieren. Dabei wurde die Aktivierung von Reportergenen durch den GAL-4-Transkriptionsaktivator ausgenutzt. Dieser besteht aus einer DNA-Bindedomäne und einer Aktivierungsdomäne (BD bzw. AD, Johnston *et al.*, 1986). In Hefezellen wurde ein Fusionsprotein aus der GAL-4-Bindedomäne und MARTA1 (BD-MARTA1) synthetisiert. Die GAL-4-Aktivierungsdomäne wurde als Fusionsprotein mit variablen Proteinen oder Proteinfragmenten aus dem adulten Rattengehirn (AD-X) in den gleichen Hefezellen wie BD-MARTA1 exprimiert. Im Falle einer Interaktion zwischen MARTA1 und einem Protein (X) des Rattengehirns, sollte die räumliche Nähe der GAL-4-Binde- und Aktivierungsdomäne am GAL-4-Promotor die Aktivierung der Reportergene HIS3 und LacZ bewirken. Das HIS3-Gen kodiert ein Enzym, welches an der Histidin-Synthese beteiligt ist. Dadurch wird das Wachstum der Hefezellen auf histidinfreien Selektionsplatten ermöglicht. Die Aktivierung des LacZ-Gens führt zur Synthese von β -Galaktosidase, die mittels einer Farbreaktion nachgewiesen werden kann. Abbildung 12 zeigt schematisch die Funktion des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems.

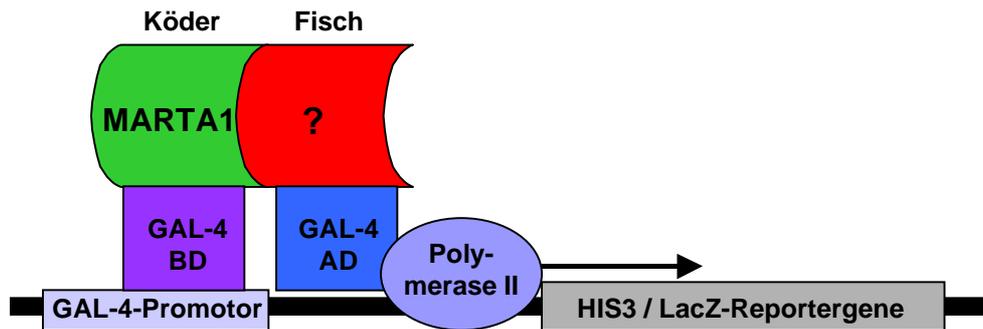


Abb. 12: Schematische Darstellung des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems

Der „Köder“ besteht aus einem GAL-4-Bindedomänen-MARTA1-Fusionsprotein. Er interagiert mit einem Hybridmolekül aus der GAL-4-Aktivierungsdomäne und einem variablen Protein des Rattengehirns (?). Die Interaktion von „Köder“ und „Fisch“ führt zu einer Bindung an den GAL-4-Promotor und damit zu einer Aktivierung der Reportergene HIS3 und LacZ.

3.4.2 Hefe-Zwei-Hybrid-Screen

Die kodierende Region der MARTA1-Sequenz wurde in den pAS2-Vektor kloniert. Die Transfektion von Hefezellen des Stammes CG1945 mit diesem Plasmid führte zur Expression von MARTA1 als Fusionsprotein mit der GAL-4-Bindedomäne. Außerdem ermöglichte es dieser Vektor den Hefezellen, Tryptophan herzustellen, wodurch diese auf tryptophanfreiem Selektionsmedium wachsen konnten. Mit pAS2/MARTA1 transfizierte Hefen wuchsen hingegen nicht auf tryptophan-histidinfreiem Medium. So konnte eine Selbstaktivierung des GAL-4-Promotors ausgeschlossen werden. Die Transfektion mit dem „Fisch-Vektor“ pACT2 ermöglichte den Hefezellen die Leucin-Synthese und damit ein Wachstum auf leucinfreiem Selektionsmedium. Eine direkte Interaktion der GAL-4-Bindedomäne mit der GAL-4-Aktivierungsdomäne wurde dadurch ausgeschlossen, daß Hefezellen, die mit dem „Köder-Vektor“ pAS2/MARTA1 und dem „Fisch-Vektor“ pACT2/Staufen kotransfiziert worden waren, nicht in der Lage waren, auf tryptophan-histidin-leucinfreiem Medium zu wachsen.

Für die Suche nach MARTA1-Interaktionspartnern (*Screen*) wurden die Hefezellen mit pAS2/MARTA1 und der Ratten-cDNA-Bank RBL, die im pACT2-Vektor kloniert vorlag, kotransfiziert. Die Anzahl der kotransfizierten Hefezellen wurde auf tryptophan-leucinfreiem Selektionsmedium bestimmt. Von den 18 Millionen durchmusterten Klonen wuchsen 144 auf Selektionsplatten, die weder Tryptophan, noch Leucin, noch Histidin enthielten. Im β -Galaktosidase-Test färbten sich 142 Klone blau. Demnach waren diese Klone in der Lage, auch das Reportergen für β -Galaktosidase zu aktivieren. Anschließend wurden diese Klone

auf leucinfreiem Medium mit Cycloheximid ausgestrichen. Der in diesen Klone vorhandene „Köder-Vektor“ pAS2 enthält ein Gen, welches die Zellen sensitiv gegenüber Cycloheximid, einem Hemmstoff der eukaryotischen Protein-Biosynthese, macht. Hefezellen können auf Cycloheximid-Platten überleben, wenn sie den „Köder-Vektor“ verlieren. Es wuchsen 125 Klone auf diesen Platten. Hiervon wuchsen noch 48 Klone auf leucinfreiem, dafür aber nicht auf tryptophan-leucinfreiem Medium. Demnach hatten diese Klone den pAS2-Vektor verloren. Ein neuer β -Galaktosidase-Test stellte sicher, daß 47 dieser Klone nicht mehr in der Lage waren, β -Galaktosidase zu produzieren. Aus fünf dieser Klone wurde die Plasmid-DNA isoliert, in *E.coli*-XL1-blue-Zellen transformiert, erneut isoliert und anschließend sequenziert. Weitere sechs Klone wurden durch direkte Sequenzierung von PCR- (*Polymerase Chain Reaction*) Produkten identifiziert, wobei die aus den Hefe-Zellen isolierte Plasmid-DNA als Vorlage diente. In Tabelle 7 sind die Ergebnisse des Hefe-Zwei-Hybrid-Screens dargestellt.

Hefe-Zwei-Hybrid-Screen mit pAS2/MARTA1 und pACT2/RBL

Anzahl durchgemusterter Klone	1,8 x 10 ⁷
Anzahl Histidin-positiver Klone	144
Anzahl β -Galaktosidase-positiver Klone	142
Anzahl der Klone, die nach der Cycloheximid-Selektion negativ im β -Galaktosidase-Test waren.	48
Anzahl der sequenzierten Klone	11
Anzahl der Klone ohne Leseraster	4
Anzahl der Klone mit BERP-cDNA	1
Anzahl der Klone mit E1B-AP5-cDNA	2
Anzahl der Klone mit SiahBP-cDNA	4

Tab. 7: Ergebnisse des Hefe-Zwei-Hybrid-Screens

Es sind die Selektionsschritte des Screens und die daraus resultierenden Klone aufgeführt.

Vier der sequenzierten Klone enthalten Sequenzen, die kein offenes Leseraster haben. Ein Klon umfasst 2302 Nukleotide der cDNA-Sequenz des Rattenproteins BERP (*Brain Expressed RING finger Protein*, El-Husseini und Vincent, 1999). Die im Vektor enthaltene Sequenz beginnt bei Nukleotid 557 der BERP-cDNA (AF036255), was der Aminosäure 113 entspricht. Außerdem enthält die Sequenz das Stop-Codon sowie einen Teil der 3'UTR. BERP ist ein zytoplasmatisches Protein, was vorwiegend im Gehirn exprimiert wird und mit Myosin interagieren kann. Eine Funktion beim Transport von Organellen wird für dieses Protein postuliert.

In zwei Hefe-Klonen wurde eine identische cDNA-Region identifiziert, die eine sehr hohe Identität zur cDNA-Sequenz des humanen Proteins E1B-AP5 (*Adenovirus type 5 Early 1B Associated Protein 5*, Gabler *et al.*, 1998) aufweist. Die Sequenz beginnt bei den Nukleotiden, die in der humanen Sequenz (AJ007509) Aminosäure 514 kodieren und endet hinter dem Stop-Codon innerhalb der 3'UTR. E1B-AP5 ist ein nukleäres Protein, welches am Transport reifer RNA-Moleküle aus dem Zellkern beteiligt ist.

Vier weitere Klone enthalten für das Rattenprotein SiahBP (*Siah Binding Protein*, Poleev *et al.*, 2000) kodierende cDNA-Sequenzen. Zwei der Klone weisen die identische Sequenz auf, die bei Nukleotid 379 der SiahBP-cDNA (AF165892) beginnt. Die Sequenzen der anderen Klone beginnen bei Nukleotid 417 bzw. 39 der veröffentlichten SiahBP-Sequenz. Alle Sequenzen reichen bis in die 3'UTR hinein. SiahBP wurde als ein Protein identifiziert, welches an das *cis*-agierende Element der APP (*Amyloid Precursor Protein*) - mRNA bindet und dort das für Neuronen spezifische Spleißen reguliert.

Alle drei im Hefe-Screen gefundenen Proteine weisen Eigenschaften auf, die ihre Interaktion mit MARTA1 sinnvoll erscheinen lassen. Aufgrund der bisher beschriebenen Funktionen für MARTA1-orthologe Proteine ist zu erwarten, daß Bindungspartner für die Beteiligung von MARTA1 an RNA-Prozessierungs- und Transportvorgängen existieren. Deshalb wurden die Interaktionen zwischen MARTA1 und allen drei putativen Bindungspartnern näher charakterisiert.

3.4.3 Interaktion zwischen MARTA1 und BERP

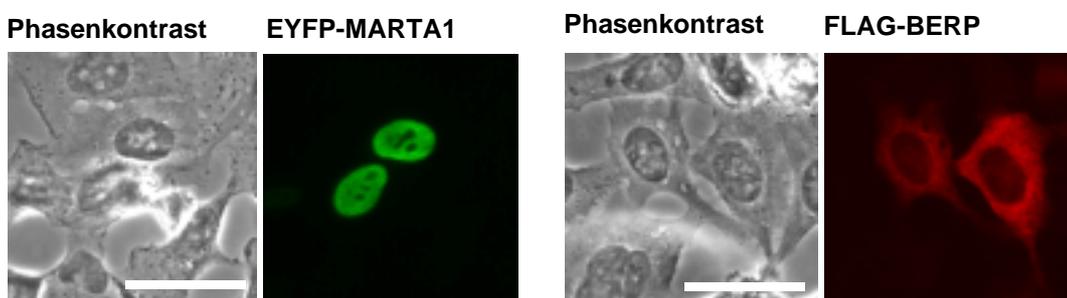
Das Protein BERP (*Brain Expressed RING Finger Protein*) gehört zur Gruppe der RBCC (*RING-B-box-Coiled-Coil*) -Proteine (El-Husseini and Vincent, 1999). Die aminoterminalen RING-Domäne bildet zusammen mit der darauf folgenden B-Box ein Zink-Bindungs-Motiv, gefolgt von einer Leucin-Coiled-Coil-Region. RBCC-Proteine spielen Schlüsselrollen bei der Regulation der Genexpression und Zellproliferation. Die carboxyterminale BERP-Domäne interagiert mit Klasse V-Myosinen, die am Aktin-abhängigen Transport der Organellen beteiligt sind. In PC12-Zellen scheint die Interaktion zwischen BERP und Klasse V-Myosinen für die NGF (*Neural Growth Factor*) induzierte Differenzierung zu sein.

3.4.3.1 Untersuchungen zur Interaktion zwischen MARTA1 und BERP in HeLa-Zellen

Um die Interaktion von MARTA1 und BERP in heterologen Zellen zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mit den Expressionsvektoren pEYFP-C3/MARTA1 und pcDNA3/Flag-BERP transfiziert. Damit die rekombinanten Proteine im Fluoreszenzmikroskop eindeutig

voneinander unterschieden werden konnten, wurde das autofluoreszierende Fusionsprotein EYFP (*Enhanced Yellow Fluorescent Protein*)-MARTA1 zunächst durch eine kurze Bestrahlung mit UV-Licht gebleicht und anschließend mit einem primären α -GFP- und einem sekundären, grün fluoreszierenden ALEXA 488-Antikörper sichtbar gemacht. Der FLAG-BERP-Nachweis erfolgte mit einem primären α -FLAG-Antikörper und einem rot fluoreszierenden ALEXA-546-Sekundär-Antikörper. EYFP-MARTA1 und FLAG-BERP wurden jeweils einzeln und zusammen von HeLa-Zellen synthetisiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 13 dargestellt.

A:



B:

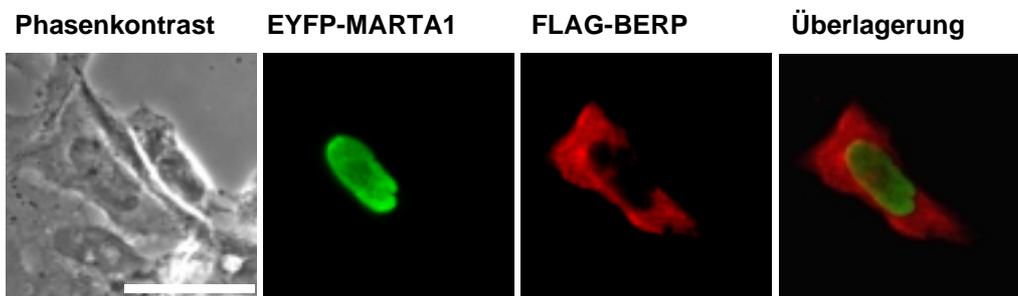


Abb. 13: Lokalisation von EYFP-MARTA1 und FLAG-BERP in HeLa-Zellen

A: Es sind die Phasenkontrast- bzw. die Fluoreszenzaufnahmen der HeLa-Zellen gezeigt, die das rekombinante Fusionsprotein EYFP-MARTA1 (links) bzw. FLAG-BERP (rechts) synthetisieren.
 B: Diese HeLa-Zellen synthetisieren gleichzeitig EYFP-MARTA1 und FLAG-BERP. Von links nach rechts sind die Phasenkontrastaufnahme und die Fluoreszenzaufnahmen von EYFP-MARTA1 und FLAG-BERP sowie eine Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen gezeigt.
 EYFP-MARTA1-Nachweis: 1.AK: α GFP, 2.AK: α Kaninchen ALEXA 488
 FLAG-BERP-Nachweis: 1.AK: α FLAG M2, 2.AK: α Maus ALEXA 546
 Die Größenbalken entsprechen jeweils 50 μ m.

EYFP-MARTA1 ist sowohl in einzeln transfizierten Zellen als auch in kotransfizierten Zellen ausschließlich im Zellkern lokalisiert. Es ist weniger deutlich punktförmig verteilt als in den Lokalisations-Untersuchungen zu Beginn dieser Arbeit (siehe Abbildung 6). Da in beiden

Experimenten das gleiche Konstrukt für die Transfektion und das gleiche Zellsystem verwendet wurde, ist dies wahrscheinlich auf den veränderten Nachweis des Proteins zurückzuführen. Während in Abbildung 6 das autofluoreszierende EYFP-MARTA1 zu sehen ist, wurde EYFP-MARTA1 für die Ko-Lokalisation mit FLAG-BERP mit einem GFP-Antikörper nachgewiesen. FLAG-BERP ist jeweils punktförmig im Zytoplasma lokalisiert, was den Beobachtungen von El-Husseini *et al.* in PC12-Zellen entspricht (El-Husseini *et al.*, 1999). Die Proteine zeigen in der Überlagerung der Bilder keine Kolo-kalisation, was gegen eine Interaktion von MARTA1 und BERP spricht.

3.4.3.2 Untersuchungen zur Interaktion zwischen MARTA1 und BERP in Hefe-Zellen

Mit dem folgenden Experiment wurde untersucht, ob MARTA1 und BERP in Hefe-Zellen miteinander interagieren. Dafür wurden Hefe-Zellen gleichzeitig mit den Vektoren pAS2/MARTA1 und pACT2/BERP transfiziert und auf tryptophan-leucin-histidinfreien Platten ausgestrichen. Gleichzeitig wurde auch das im Hefe-Screen identifizierte BERP-Konstrukt gemeinsam mit pAS2/MARTA1 transfiziert. Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse der Interaktionstests.

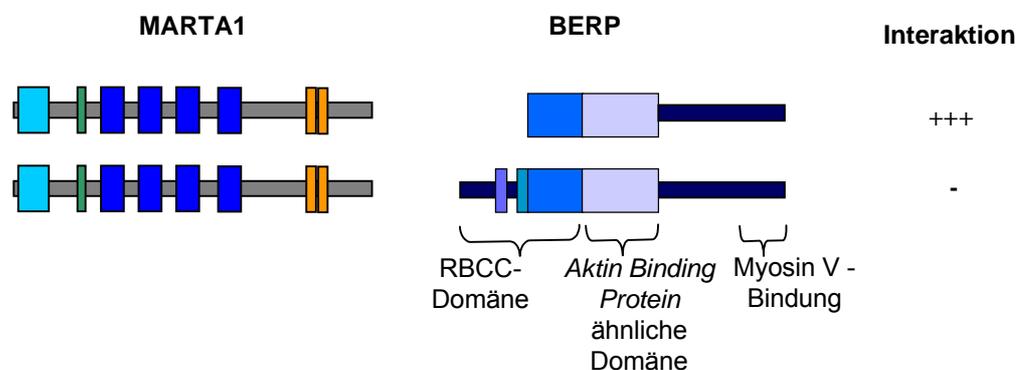


Abb.14 Interaktion zwischen MARTA1 und BERP in Hefe-Zellen

Dargestellt sind die Proteine bzw. Proteinregionen, die zusammen in Hefe-Zellen exprimiert wurden. In der letzten Spalte ist ihre Fähigkeit zur Interaktion gezeigt. Dabei stehen +++ für eine starke Interaktion und – für keine Interaktion. Außerdem wurden die einzelnen BERP-Domänen näher bezeichnet. Das obere BERP-Konstrukt stellt das im Hefe-Screen identifizierte Teilstück dar.

Das im Hefe-Screen identifizierte BERP-Teilstück interagiert nach der Transfektion in Hefe-Zellen stark mit MARTA1. Zellen, die MARTA1 und das vollständige BERP exprimieren, wachsen nicht auf dem Selektionsmedium. Dies bedeutet, daß diese Proteine nicht miteinander interagieren. Die Ergebnisse der Lokalisierungsexperimente in HeLa-Zellen und

der Interaktionstests in Hefe-Zellen führen zu dem Schluß, daß MARTA1 und BERP keine Bindungspartner sind. Möglicherweise nimmt das im Hefe-Screen als potentieller MARTA1-Bindepartner identifizierte BERP-Konstrukt eine Konformation ein, die zufällig mit MARTA1 interagieren kann. Da diesem BERP-Konstrukt 112 aminoternale Reste fehlen, scheint eine veränderte Konformation im Vergleich zum vollständigen BERP wahrscheinlich.

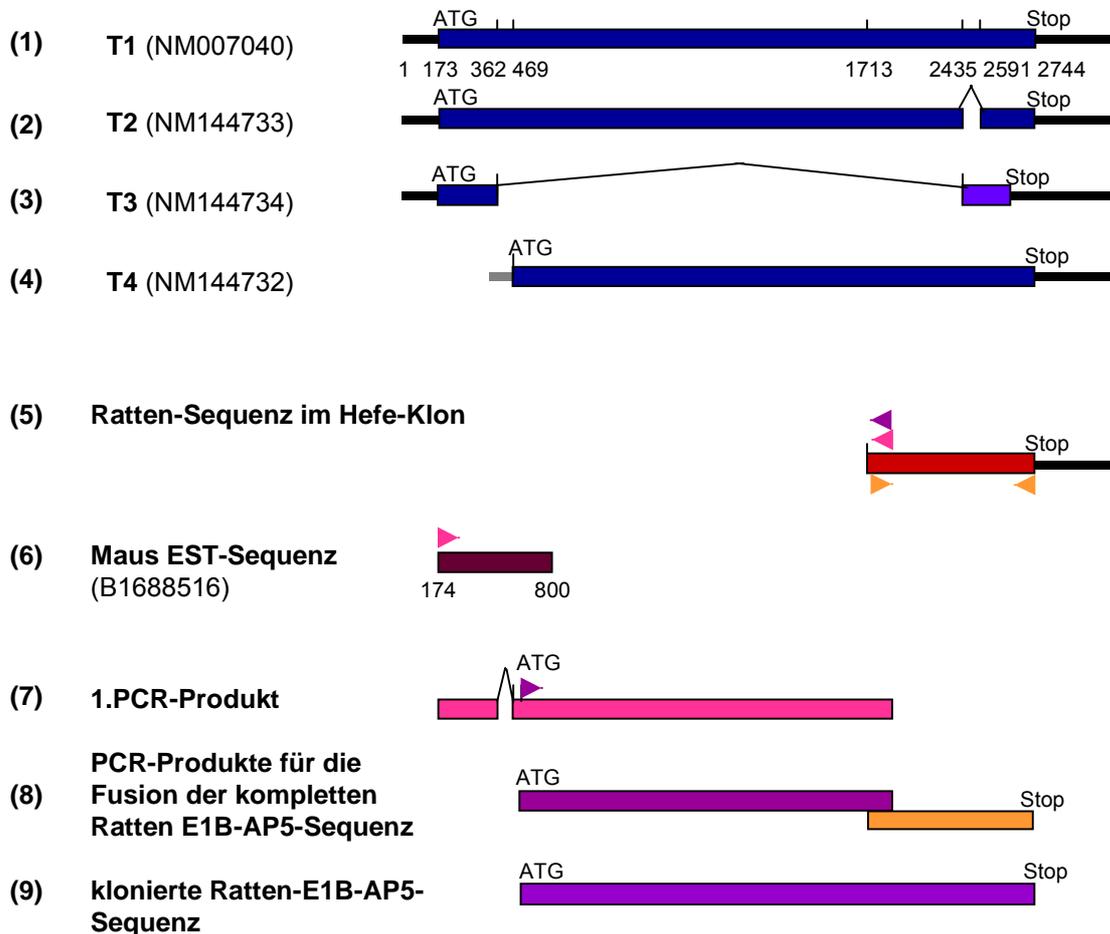
3.4.4 Interaktion zwischen MARTA1 und E1B-AP5

E1B-AP5 (*Adenovirus Typ 5 Early 1B Associated Protein 5*) ist ein Protein, das zur Gruppe der hnRNP-Proteine (*heterogeneous nuclear Ribo-Nucleoprotein-Particle-Proteins*) gehört. Es wurde als nukleärer Faktor identifiziert, der mit dem adenoviralen Proteinkomplex E1B-E4 (*Early 1B-55-E4 orf6*, Gabler *et al.*, 1998) interagiert. Während der späten Phase adenoviraler Infektionen bindet dieser Komplex nukleäre RNA-Prozessierungs- und Transport-Proteine. Damit wird der Export der Wirtszell-RNA aus dem Zellkern gestoppt, während virale RNA aus dem Kern exportiert werden kann.

3.4.4.1 PCR-Klonierung der vollständigen Ratten-E1B-AP5-cDNA

Im Hefe-Zwei-Hybrid-Screen wurde als potentieller MARTA1-Bindungspartner ein Rattenprotein identifiziert, dessen cDNA-Sequenz eine große Ähnlichkeit zur Sequenz des humanen E1B-AP5 aufweist. Die vollständige E1B-AP5-cDNA-Sequenz der Ratte wurde schrittweise amplifiziert und sequenziert. Die verwendeten *Primer* wurden von der im Hefe-Screen gefundenen Sequenz bzw. von den jeweils zuerst amplifizierten Fragmenten hergeleitet. Die einzelnen Amplifikationsschritte sind in Abbildung 15 dargestellt.

Humane E1B-AP5-Transkripte

**Abb. 15: Schematische Darstellung der PCR-Klonierung der Ratten E1B-AP5-cDNA**

Mit verschiedenen maus- und rattenspezifischen *Primern* wurden einzelne Bereiche der Ratten E1B-AP5-cDNA amplifiziert. Gleiche Farben stehen für identische Sequenzen. Die PCR-Produkte wurden jeweils in der gleichen Farbe dargestellt wie die dafür verwendeten *Primer* (Pfeile). Linien bezeichnen 5'- bzw. 3'-UTRs (Untranslated Regions).

Es gibt vier verschiedene Transkripte der humanen E1B-AP5-DNA (Abbildung 15, (1) – (4)). Die Ratten-Sequenz in den Hefe-Klonen entspricht dem humanen T1- bzw. T4-Transkript ab dem Nukleotid 1713 bzw. 1313. Die humanen T2- und T3-Transkripte unterscheiden sich von der in den Hefe-Klonen vorhandenen Ratten-Sequenz. Um die vollständige Ratten-E1B-AP5-Sequenz zu identifizieren, wurde mit Hilfe des Programms *BLAST Search* (*National*

Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) nach Ratten-EST (*Expressed Sequence Tag*)- bzw. Maus-EST Sequenzen gesucht, die Ähnlichkeiten zur humanen E1B-AP5-Sequenz aufweisen. Dabei wurde ein EST-Klon der Maus gefunden, der im Bereich der Nukleotide 174 bis 800 eine 88 %ige Identität zu den humanen T1- bzw. T2-Transkripten zeigt (Abb.15, (6)). Mittels der von der Maus-EST-Sequenz bzw. Ratten-E1B-AP5-Sequenz abgeleiteten *Primer* MausAP5-Start forw. und ratAP5-Seq.3 rev. wurde eine RT-PCR mit RNA aus dem Gehirn adulter Ratten durchgeführt. Das PCR-Produkt (Abb.15, (7)) zeigt eine sehr hohe Ähnlichkeit zur humanen Sequenz. Allerdings fehlt der in den humanen T1- und T2-Transkripten (Abb.15, (1) und (2)) den Nukleotiden 363 bis 468 entsprechende Bereich. Dadurch kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters. Die humanen T3- und T4-Transkripte (Abb.15, (3) und (4)) sind Spleiß-Varianten der E1B-AP5-RNA, die sich ebenfalls in diesem Bereich von den T1- und T2-Transkripten unterscheiden. Das T4-Transkript beginnt mit einem alternativen Start-Codon, das im gleichen Leseraster liegt wie das den Nukleotiden 474 bis 476 entsprechende ATG-Triplett der T1 und T2 Transkripte. Dieses ATG-Codon ist auch in der Ratten-Sequenz (Abb.15, (7)) zu finden, was vermuten läßt, daß es als Start-Codon fungiert. Deshalb wurde ein *Primer* (ratAP5-Start-KSV) abgeleitet, der zusammen mit dem *Primer* ratAP5-Seq.3 rev. die Synthese des fehlenden Bereiches aus adulter Ratten-Gehirn-RNA (Abb.15, (8)) ermöglichte. Dieses Stück wurde mit der 3'-Region der Ratten-E1B-AP5-cDNA ligiert, die mittels der *Primer* ratAP5-Seq.3 und ratAP5-Stop rev. amplifiziert worden war (Abb.15, (8)). Die so erhaltene Ratten-E1B-AP5-Sequenz (Abb.15, (9)) wurde für die Expression in HeLa-Zellen in den pCMV-Tag2C-Vektor und für die Expression in Hefe-Zellen in den pACT2-Vektor kloniert.

3.4.4.2 Sequenzanalyse von rE1B-AP5

In Abbildung 16 ist die cDNA-Sequenz und die abgeleitete Aminosäuresequenz des E1B-AP5 der Ratte dargestellt.

```

1  ATGGACAATTATTACAGACAGAACCAATTCTACGAGACACCGGTATCAAGCAAGAAAATGAGTCTGTCTATGATAGGAGACCACTAGAC
1  M D N I T R Q N Q F Y E T P V I K Q E N E S V Y D R R P L D
96  ATGGAGCCACCACAGCAGCATATCGCCCCAGAAGTGAAGACAGAAACGAAGCAGGAAGCCACCAGCTTCTCCCCCTGAAGCCTCG
31  M E P P Q Q A Y R P E L K T E T K Q E A P P S F L P P E A S
191  CAGCTCAAGACAGACAGGCCACAGTTCAGAATCGAAAGAGGCCCTTTTGGAGAAATCGAGGCCGTGGGTACTTCGAGCAGCCGAGAGGAC
61  Q L K T D R P Q F Q N R K R P F E E N R G R G Y F E H R E D
286  CGAAGGGCCGTTCTCCTCAGCCTCTGCTGAAGAGGATGAAGATGACTTTGATGACACCCTTGTGTATTGACACATATAACTGTGAC
91  R R G R S P Q P P A E E D E D D F D D T L V A I D T Y N C D
381  CTGCACTCAAAGTGGCCGAGACCGGAGTAGTGGCTATCCATTGACAATCGAGGGCTTTCATACCTATGGTCAGGACCCCGTCCGACG
121  L H F K V A R D R S S G Y P L T I E G F A Y L W S G A R A S
476  TATGGAGTCAGAAGGGGGCAGTGTGTTTTGAAATGAAGATCAATGAGGAAATCTCCGTGAAGCACCTTCCATCTACAGAGCCTGACCC
151  Y G V R R G R V C F E M K I N E E I S V K H L P S T E P D P
571  CACGTTGTCGTTGCTGCTGGCTTGGACTCTTGCAGCACTCAGCTAGGTGAAGAGCCTTTTCTATGGTTATGGAGGCACAGGGAAG
181  H V V R I G W S L D S C S T Q L G E E P F S Y G Y G G T G K
686  AAGTCTACCAATAGCCGCTTTGAAAATACGGAGACAAATTTGCAGAGAACGATGTGATTGGCTGCTTTCGGGACTTCGAATGTGGGAAT
211  K S T N S R F E N Y G D K F A E N D V I G C F A D F E C G N
761  GATGTGGAGCTTTTACCAAGAATGGCAAGTGGATGGGCATTGCCTCCGAATCCAGAAGAAGCTTTAGGGGGTCCAGCCCTCTAC
241  D V E L S F T K N G K W M G I A F R I Q K E A L G G Q A L Y
856  CCTCAGCTCCTGGTGAAGAATTGTGCTGTGGAATTTACTTTGGCGAGAGCAGAGCCCTACTGTTCTATTCCTCCAGGGTTCACATTC
271  P H V L V K N C A V E F N F G Q R A E P Y C S I L P C T F
951  ATCCAGCACCTTCCCTCAGTGAGCGGATACGGGGCACCATTGGACCAAGAGCAAAGCAGAGTGTGAGATTCTGATGATGGTAGGCTG
301  I Q H L P L S E R I R G T I G P K S K A E C E I L M M V G L
1046  CCTGCTGCCGGCAAGACCACATGGGCCATCAAGCAGCAGCCTCCAACCTTCCAAGAAGTACAACATTCTGGGTACCAATGCCATCATG
331  P A A G K T T W A I K H A A S N P S K K Y N I L G T N A I M
1141  GATAAGATGCGGGTAATGGGCGCTCGCTCGGCAGCGGAATGCTGGCCGCTGGGATGTCCTGATCCAGCAGGCCACTCAGTGCCTCAAC
361  D K M R V M G L R R Q R N Y A G R W D V L I Q Q A T Q C L N
2136  CGTCTTATCAGATCGCTGCCCGCAAGAAACGGAATATCTAGATCAGACAAATGTTTATGGGTCCAGCCAGAGCCGGGAAAATGAGA
391  R L I Q I A A R K K R N Y I L D Q T N V Y G S A Q R R K M R
2231  CCATTTGAAGGCTTCCAGAGGAAAGCTATTGTGATCTGTCCCACTGATGAGGACCTAAAAGACCGCACCATAAAGCTAAAGCTAAAGAA
421  P F E G F Q R K A I V I C P T D E D L K D R T I K L T D E E
2326  GGAAAAGATGCCGGATCATGCAGTCTAGAAATGAAAGCTAACTTTTGCCTGATGTTGGAGACTTCTGGATGAGTTCTGTTC
451  G K D V P D H A V L E M K A N F T L P D V G D F L D E V L F
2421  ATTGAGCTCCAGCAGAGGAAGCAGACAAGCTGGTGAGGCAGTATAACGAGGAAGGCCGGAAGGCCCGCCACCCCTGAAAAGCGCTTT
481  I E L Q R E E A D K L V R Q Y N E E G R K A G P P P E K R F
2516  GACAACAGAGGTGGTGGCTTCGAGGCCGTGGGGTGGCGGAGTTCCAGCGTTATGACAACCGAGGCCCTCTGGAGGCAACCGAGGAA
511  D N R G G G G F R G R G G G G S F Q R Y D N R G P P G G N R G
2611  GGCTTCCAGAACCGCGAGGTGGTGGTGGCAGTGGTGGCGGAGGAGGCAACTACCGAGGAGGTTTCAACCGCAGCGGAGGTGGTGGCTAC
541  G F Q N R G G G G G S G G G G G N Y R G G F N R S G G G G Y
2706  AACCGAACCCGCTGGGGTAAACAACCCGGGATAACAACAACCTCAACAACCGAGGCAGCTATAACCGGGCTCTCAGCAACAGCCACCA
571  N Q N R W G N N N R D N N N S N R G S Y N R A P Q Q P
2801  CCACAACAGCCACCCACCCACAGCCACCCCTCAACAACCCAGCCACCCACTAGCTATAGCCCTGCTCGGAACCCCTCCGGGAGCCAGC
601  P Q Q P P P P P Q P P P Q Q P P P P P S Y S P A R N P P G A S
2896  AGCTACAACAAAAACAGCAACATCCCTGGCTCCAGCGCAATACCAGCACCCCTACAGTGAGCAGCTACAGCCCTCCACAGCCGAGTTAC
631  S Y N K N S N I P G S S A N T S T P T V S S Y S P P Q P S Y
2991  AGCCAGCCGCCCTACAACCAAGGAGATACCCAGGCTACACAGCCAGCCACCCACTCCACTCCACCCAGCCAGCTGCTACAACCTATGGG
661  S Q P P P Y N Q G G Y T Q G Y T A P P P P P P P P P A Y N Y G
3086  AGCTATGGCCCTACAATCTGCCCTTATACCCACCCACCCACTGCCCAGACCTACCCCTCAGCCAGCTATAACCAAGTATCAG
691  S Y G P Y N P A P Y T P P P P T A Q T Y P Q P S Y Q
3181  CAGTATGCCAGCAGTGGAGCCAGTACTATCAGAACCAGAGCCAGTGGCCACCTTACTACGGGAACCTACGACTACGGAGGCTACTCGGGC
621  Q Y A Q Q W S Q Y Q N Q S Q W P P Y Y G N Y D Y G G Y S G
3276  AGCACGCAGGGGGGCAAGCACACAGTAGCAGGTGCTGGAGCCTCCAGAGGCTCATGCTGGTCTTCCACTAGCACCTGCCTTGGCC
651  S T Q G G T S T Q ...
3371  CTTTCCCCTCTG

```

Abb. 16: rE1B-AP5-cDNA-Sequenz und Aminosäuresequenz.

Es sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenz (fett) von rE1b-AP5 dargestellt. Start- und Stop-Codon erscheinen kursiv. Die RGG-Box ist grün, die Prolin-reichen Domänen sind gelb dargestellt.

Die Ratten-E1B-AP5-cDNA zeigt eine 89 %ige Identität zur kodierenden Region des humanen T4-Transkriptes. Die entsprechenden Proteine sind zu 96 % identisch. rE1B-AP5 enthält im carboxyterminalen Bereich eine RGG-Box. Dieser Arginin- und Glycin-reiche Bereich kann mit RNA-Molekülen interagieren. Außerdem besitzt rE1B-AP5 zwei sehr Prolin-reiche Sequenzabschnitte innerhalb des carboxyterminalen Bereiches.

3.4.4.3 Untersuchungen zur Interaktion zwischen MARTA1 und rE1B-AP5 in HeLa-Zellen

Mit dem folgenden Experiment wurde untersucht, ob die rekombinanten Proteine MARTA1 und rE1B-AP5 in HeLa-Zellen kolokalisieren. Dazu wurden HeLa-Zellen mit den Expressionsvektoren pEYFP-C3/MARTA1 und pCMV-Tag2C/rE1B-AP5 transfiziert. Das autofluoreszierende EYFP-MARTA1 wurde durch UV-Licht-Bestrahlung gebleicht und mit einem polyklonalen α -GFP- und einem α -Kaninchen, ALEXA 488-gekoppeltem Antikörper grün fluoreszierend sichtbar gemacht. Das FLAG-gekoppelte rE1B-AP5 wurde mit einem monoklonalen α -FLAG- und einem α -Maus, ALEXA 546-gekoppeltem Antikörper rot fluoreszierend sichtbar gemacht. Beide Proteine wurden jeweils einzeln und zusammen in den HeLa-Zellen exprimiert. Die Resultate sind in Abbildung 17 dargestellt.

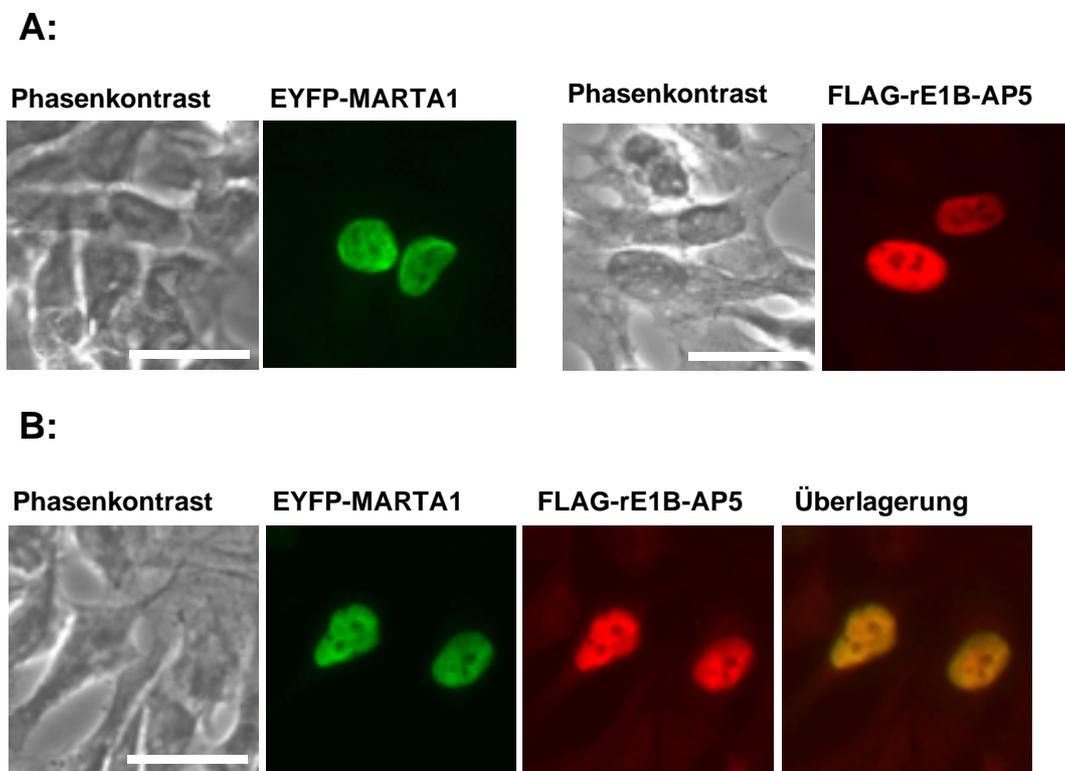


Abb. 17: Die Lokalisierung von EYFP-MARTA1 und FLAG-rE1B-AP5 in HeLa-Zellen

A: Es sind die Phasenkontrast- bzw. die Fluoreszenzaufnahmen der HeLa-Zellen gezeigt, die rekombinante Fusionsprotein EYFP-MARTA1 (links) bzw. FLAG-rE1B-AP5 (rechts) exprimieren.
B: Diese HeLa-Zellen synthetisieren gleichzeitig EYFP-MARTA1 und FLAG-rE1B-AP5. Von links nach rechts sind die Phasenkontrastaufnahme, die Fluoreszenzaufnahme von EYFP-MARTA1- und FLAG-rE1B-AP5 sowie eine Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen gezeigt.
 EYFP-MARTA1-Nachweis: 1.AK: α GFP, 2.AK: α Kaninchen ALEXA 488
 FLAG-rE1B-AP5-Nachweis: 1.AK: α FLAG M2, 2.AK: α Maus ALEXA 546
 Die Größenbalken entsprechen 50 μ m.

Beide Proteine sind in den Zellen, in denen sie jeweils einzeln exprimiert wurden, im Zellkern lokalisiert. Während EYFP-MARTA1 ausschließlich im Kern erkennbar ist, zeigt sich für FLAG-rE1B-AP5 auch eine leichte zytoplasmatische Färbung. Bei den mit beiden Expressionsvektoren transfizierten Zellen ist deutlich zu erkennen, daß beide rekombinanten Proteine im Kern der HeLa-Zellen kolokalisieren.

Die Interaktion zwischen EYFP-MARTA1 und FLAG-rE1B-AP5 wurde außerdem mit Hilfe von Koimmunpräzitations-Experimenten untersucht. Dafür wurden die Extrakte von sowohl EYFP-MARTA1 als auch FLAG-rE1B-AP5 synthetisierenden Zellen entweder mit einem an Protein A-Agaroseperlen gekoppelten α -KSRP- oder α -FLAG-Antikörper inkubiert. Diese Perlen wurden gemeinsam mit den daran gebundenen Proteinkomplexen abzentrifugiert und letztere mittels *Western Blot* analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 gezeigt.

Präzitation mit:

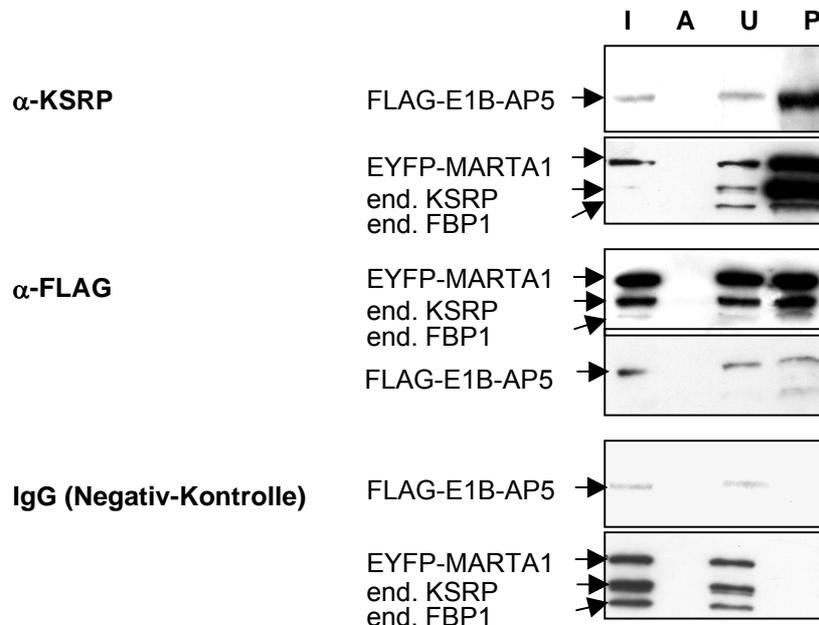


Abb. 18: Koimmunpräzitation von EYFP-MARTA1 und FLAG-rE1B-AP5

Die erste Spur (I = Input) zeigt jeweils die rekombinanten Proteine EYFP-MARTA1 und FLAG-rE1B-AP5 im HeLa-Zellextrakt. In der zweiten Spur (A) wurden jeweils die Eluate der Protein A-Agaroseperlen aufgetragen, die ohne Antikörper mit den jeweiligen Zellextrakten inkubiert worden waren. Der Überstand der Koimmunpräzitation wurde in der dritten Spur (U = ungebundene Proteinfraction) und das Eluat des Präzipitats (P) in der vierten Spur aufgetragen.

EYFP-MARTA1-Nachweis: 1.AK: α -KSRP, polyklonal, 2.AK: α -Kaninchen, HRP-gekoppelt
 FLAG-hE1B-AP5-Nachweis: 1.AK: α -E1B-AP5, monoklonal, 2.AK: α -Ratte, HRP-gekoppelt

Die rekombinanten Proteine sind in den Zellextrakten (I) jeweils gut nachweisbar. Sie interagieren nicht direkt mit der Protein A-Agarose, was dadurch ausgeschlossen wurde, daß die Zellextrakte mit Protein A-Agaroseperlen inkubiert wurden, an die keine Antikörper gekoppelt. Die Eluate der Agaroseperlen sind unter (A) aufgetragen. Unabhängig davon, ob für die Präzipitationen der α -KSRP-Antikörper oder der α -FLAG-Antikörper verwendet wurde, sind EYFP-MARTA1 und FLAG-E1B-AP5 sowohl im Überstand (U) als auch im Präzipitat der Koimmunpräzipitationen (P) nachweisbar. Neben EYFP-MARTA1 erkennt der α -KSRP-Antikörper auch das endogene KSRP der HeLa-Zellen, was als Doppelbande bei ca. 70 kDa erscheint, sowie das bei etwa 60 kDa nachweisbare FBP. Diese Proteine binden ebenfalls an FLAG-rE1B-AP5, da sie auch im Pellet der Koimmunpräzipitationen erscheinen. Der Nachweis der untersuchten Proteine im Überstand der präzipitierten Agaroseperlen bedeutet, daß mit den α -KSRP- bzw. den α -E1B-AP5-Antikörpern die entsprechenden Proteine nicht vollständig präzipitiert werden. Da für die Präzipitationen große Mengen der Antikörper (5 μ g) eingesetzt wurden, scheint es unwahrscheinlich, daß die unvollständige Präzipitation auf eine zu geringe Antikörper-Konzentration zurückzuführen ist. Der Nachweis der Proteine im Überstand könnte demnach bedeuten, daß weitere Bindungspartner existieren. Während ein Teil der Proteine jeweils aneinander gebunden vorliegt, interagiert ein weiterer Teil mit anderen Bindungspartnern, was ihn unzugänglich für die Antikörper und damit nicht präzipitierbar machen könnte. Die IgG-Negativ-Kontrolle zeigt, daß eine Präzipitation der Proteine nur mit spezifischen Antikörpern möglich ist, da sowohl EYFP-MARTA1 als auch FLAG-rE1B-AP5 nur im Überstand nachweisbar sind.

3.4.4.4 Untersuchungen zur Interaktion zwischen KSRP und hE1B-AP5 in HeLa-Zellen

Das humane KSRP zeigt eine 98 %ige Identität zum Rattenprotein MARTA1, während das humane- und das Ratten-E1B-AP5 zu 96 % identisch sind. Aufgrund dieser großen Ähnlichkeiten wurde die Interaktion von KSRP und hE1B-AP5, die beide endogen in HeLa-Zellen vorkommen, ebenfalls durch Ko-Lokalisationsstudien und Koimmunpräzipitationen untersucht. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 19 und 20 dargestellt.

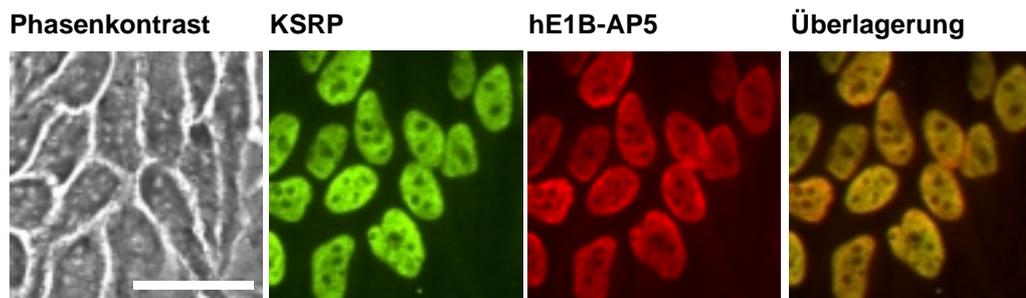


Abb. 19: Kolokalisation von KSRP und hE1B-AP5 in HeLa-Zellen

Von links nach rechts sind die Phasenkontrast- und Fluorezenzaufnahmen der endogenen Proteine KSRP und hE1B-AP5 sowie eine Überlagerung der Bilder gezeigt.

KSRP-Nachweis: 1.AK: α KSRP, 2.AK: α Kaninchen ALEXA 488

hE1B-AP5-Nachweis: 1.AK: α hE1B-AP5, 2.AK: α Ratte ALEXA 546

Präzipitation mit:

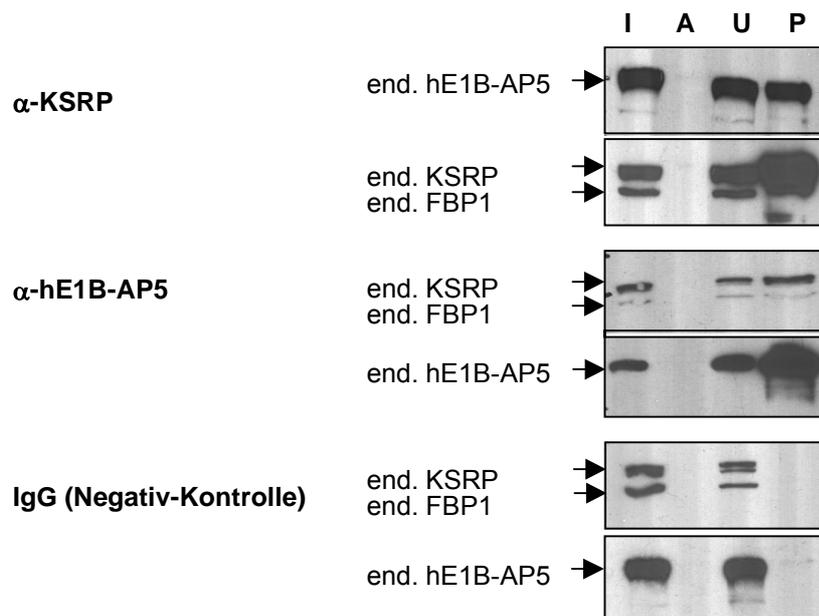


Abb. 20: Die Koimmunpräzipitationen von KSRP und hE1B-AP5

Die erste Spur (I = Input) zeigt jeweils die endogenen Proteine KSRP und hE1B-AP5 im HeLa-Zellextrakt. In der zweiten Spur wurden die Eluate der Agaroseperlen (A) aufgetragen, die ohne Antikörper mit den jeweiligen Zellextrakten inkubiert worden waren. Der Überstand der Koimmunpräzipitation wurde in der dritten Spur (U = ungebundene Proteinfraction) und das Eluat des Präzipitats (P) in der vierten Spur aufgetragen.

KSRP-Nachweis: 1.AK: α -KSRP, polykonal, 2.AK: α -Kaninchen, HRP-gekoppelt

hE1B-AP5-Nachweis: 1.AK: α -E1B-AP5, monoklonal, 2.AK: α -Ratte, HRP-gekoppelt

Die endogenen Proteine KSRP und hE1B-AP5 sind beide im Zellkern lokalisiert. Die Überlagerung der Bilder zeigt eine Kolo-kalisation der Proteine. Die Koimmunpräzipitationen zeigen, daß sowohl mit dem α -KSRP- als auch mit dem α -E1B-AP5-Antikörper jeweils beide Proteine präzipitiert werden. Daraus kann geschlossen werden, daß auch die endogenen Proteine KSRP und E1B-AP5 in HeLa-Zellen miteinander interagieren. Bei diesen Präzipitationen wurde ebenfalls wieder FBP1 kopräzipitiert, was demnach auch mit hE1B-AP5 interagiert.

MARTA1, KSRP und E1B-AP5 besitzen RNA bindende Domänen. MARTA1 bindet an das *dendritic targeting element* der MAP2-mRNA (Rehbein *et al.*, 2000), KSRP ist Bestandteil eines Spleißkomplexes (Black *et al.*, 1997), und E1B-AP5 ist wahrscheinlich an der Prozessierung und am Kernexport verschiedener RNAs (Dobner *et al.*, 1998) beteiligt. Demnach wäre eine indirekte Interaktion dieser Proteine über eine gebundene RNA möglich. Um dies näher zu untersuchen, wurden erneut Koimmunpräzipitationen durchgeführt. Dafür wurden mit dem α -E1B-AP5-Antikörper die endogenen Proteine parallel aus unbehandelten sowie aus mit RNase behandelten HeLa-Zellextrakten präzipitiert. Der Verdau der RNase wurde kontrolliert, indem aus den Zellextrakten isolierte RNA auf einem Agarose-Gel aufgetrennt wurde. Abbildung 21 zeigt das Ergebnis der Untersuchung.

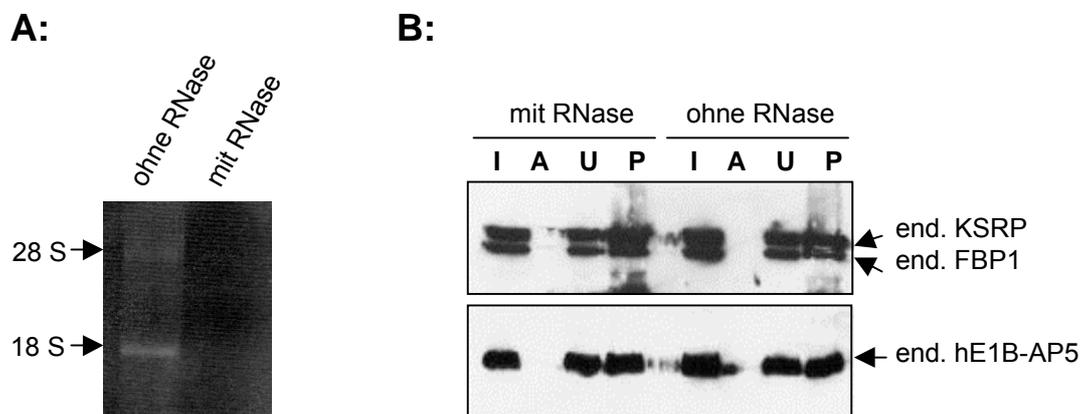


Abb. 21: Die Interaktion zwischen KSRP und hE1B-AP5 in HeLa-Zellen nach RNase-Verdau

A: Es ist die aus unbehandelten (links) und aus mit RNase behandelten (rechts) HeLa-Zellextrakten isolierte RNA gezeigt.

B: Die Input-Spur (I) zeigt jeweils die endogenen Proteine KSRP und hE1B-AP5 in den unbehandelten (rechts) und mit RNase behandelten (links) HeLa-Zellextrakten. In der Protein A-Agarose-Spur (A) wurden jeweils die Eluate der Antikörper-freien mit den jeweiligen Zellextrakten inkubierten Agaroseperlen aufgetragen. Außerdem wurden der Überstand (U = ungebundene Proteinfraktion) und das Eluat des Pellets (P) der Koimmunpräzipitationen aufgetragen.

KSRP-Nachweis: 1.AK: α -KSRP, polyklonal, 2.AK: α -Kaninchen, HRP-gekoppelt

hE1B-AP5-Nachweis: 1.AK: α -E1B-AP5, monoklonal, 2.AK: α -Ratte, HRP-gekoppelt

Mit dem α -E1B-AP5-Antikörper wird KSRP aus dem Zellextrakt, in dem die RNA vollständig verdaut worden war, genau so kopräzipitiert wie aus dem Extrakt der unbehandelten Zellen. Demnach wird die Interaktion zwischen den Proteinen nicht über eine RNA vermittelt. Das heißt, KSRP und hE1B-AP5 binden entweder direkt oder in einem Komplex mit weiteren Proteinen aneinander.

3.4.4.5 Untersuchungen zur Interaktion zwischen MARTA1 und rE1B-AP5 in Hefe-Zellen

Um die Interaktion zwischen MARTA1 und dem vollständigen rE1B-AP5 in Hefe-Zellen zu untersuchen, wurden diese gleichzeitig mit den Vektoren pAS2/MARTA1 und pACT2/rE1B-AP5 transfiziert und auf tryptophan-leucin-histidinfreien Selektionsplatten ausgestrichen. Außerdem sollte durch die Kotransfektion des pACT2/rE1B-AP5-Vektors mit den Vektoren pAS2/P, pAS2/PKH, pAS2/KH, pAS2/NLS+KH, pAS2/KHR und pAS2/R die jeweils zur Expression der unter 3.2.1 beschriebenen MARTA1-Teilstücke führten, untersucht werden, mit welcher MARTA1-Domäne rE1B-AP5 interagiert. Als Kontrolle wurde der im Hefe-Screen identifizierte Klon zusammen mit pAS2/MARTA1 transfiziert. Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse der Experimente.

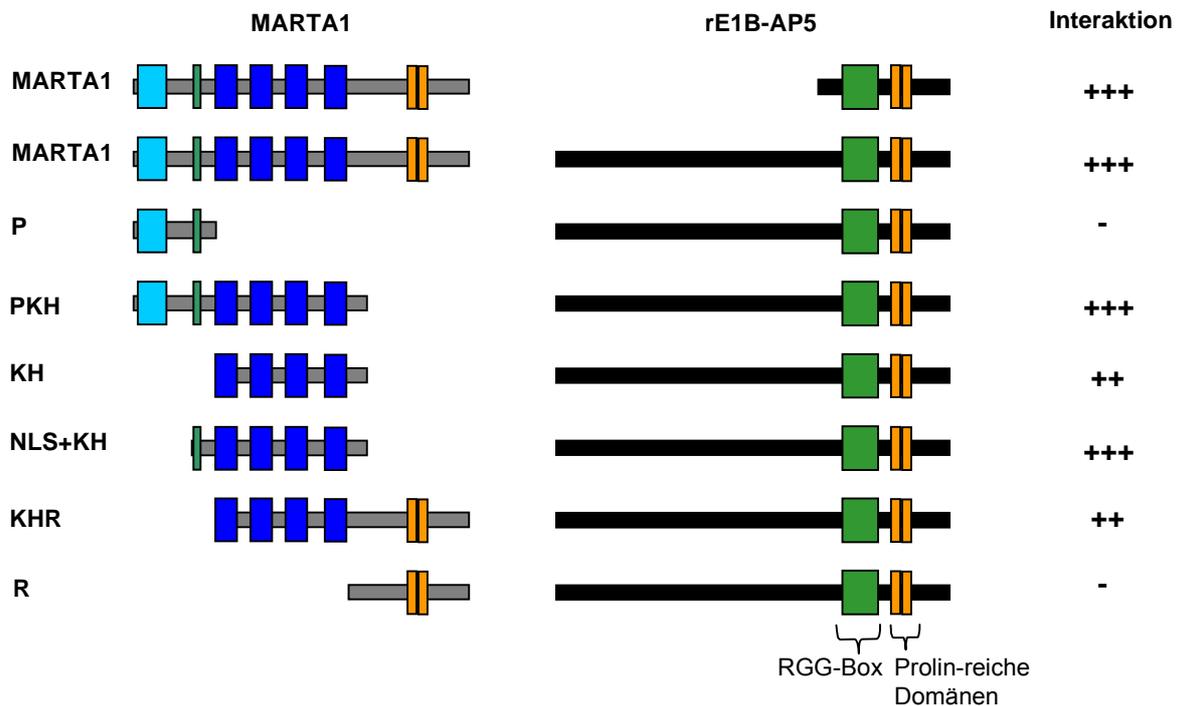


Abb. 22: Die Interaktion zwischen MARTA1 und rE1B-AP5 in Hefe-Zellen

Dargestellt sind die Proteine bzw. Proteinregionen, die zusammen in Hefe-Zellen exprimiert wurden. In der letzten Spalte ist ihre Fähigkeit zur Interaktion gezeigt. Dabei stehen +++ für eine starke Interaktion, ++ für eine schwache Interaktion und – für keine Interaktion.

Außerdem wurden die einzelnen rE1B-AP5-Domänen näher bezeichnet, wobei die gleichen Farben wie in Abbildung 16 verwendet wurden. Das oberste rE1B-AP5-Konstrukt stellt das im Hefe-Screen identifizierte Teilstück dar.

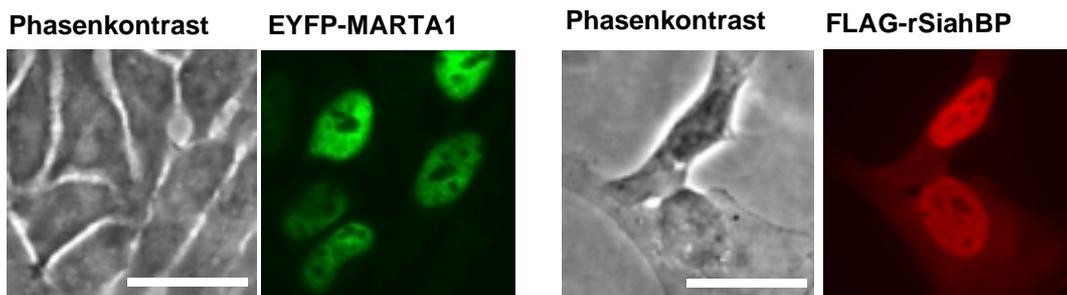
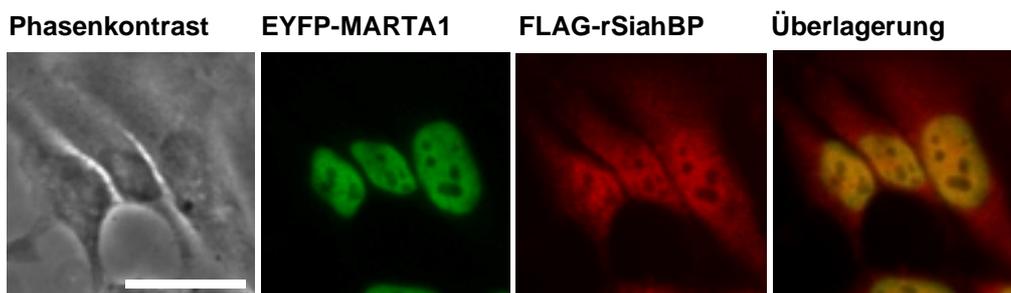
Das im Hefe-Screen gefundene rE1B-AP5-Teilstück interagiert nach der Transfektion sehr gut mit MARTA1. Das vollständige rE1B-AP5 bindet ebenfalls sehr gut an MARTA1 sowie an das PKH-Konstrukt und an das NLS-KH-Konstrukt, welches das Kernlokalisierungssignal und die KH-Domänen enthält. Die KH-Domänen alleine und das KHR-Konstrukt werden weniger stark von rE1B-AP5 gebunden. rE1B-AP5 interagiert nicht mit der aminoterminalen bzw. der carboxyterminalen Domäne von MARTA1. Die Proteine interagieren demnach innerhalb der zentralen Domäne von MARTA1 und dem carboxyterminalen Bereich von rE1B-AP5 aneinander. Die KH-Domänen sind ausreichend für die rE1B-AP5-Bindung, allerdings wird diese durch das Kernlokalisierungssignal von MARTA1 begünstigt.

3.4.5 Die Interaktion zwischen MARTA1 und SiahBP

Das Rattenprotein SiahBP (*Siah Binding Protein*, Poleev *et al.*, 2000) wurde als ein Protein identifiziert, das an eine *splicing enhancer*-Sequenz der APP (*Amyloid Precursor Protein*)-RNA bindet. Es ist das Ortholog des humanen Proteins SiahBP, welches ursprünglich als Bindungspartner des Transkriptionsfaktors Siah (*Seven in absentia homolog*, Hu *et al.*, 1997) identifiziert wurde. Das humane SiahBP ist auch als Spleißfaktor PUF60 (Page-McCaw *et al.*, 1999) bzw. unter dem Namen FIR (*FBP Interacting Repressor*, Liu *et al.*, 2000 und 2001) bekannt. FIR bindet an die KH-Domänen des Transkriptionsfaktors FBP (*FUSE Binding Protein*). Es verhindert damit eine Interaktion von FBP mit dem FUSE-Element im Promoter des c-myc-Gens und unterdrückt so die Expression des c-myc-Gens.

3.4.5.1 Untersuchungen zur Interaktion zwischen MARTA1 und rSiahBP in HeLa-Zellen

Um festzustellen, ob EYFP-MARTA1 und FLAG-SiahBP in HeLa-Zellen kolokalisieren, wurden die Zellen mit dem pEYFP/MARTA1 und dem pCMV-Tag2C/rSiahBP-Vektor jeweils einzeln und in Kombination transfiziert. Der Nachweis der rekombinanten Proteine erfolgte mit α -GFP- bzw. α -FLAG-Antikörpern. In Abbildung 23 ist das Ergebnis des Experiments dargestellt.

A:**B:****Abb. 23: Die Lokalisation von EYFP-MARTA1 und FLAG-rSiahBP in HeLa-Zellen**

A: Es sind die Phasenkontrast- bzw. die Fluoreszenzaufnahmen der HeLa-Zellen gezeigt, die jeweils nur das rekombinante Fusionsprotein EYFP-MARTA1 (links) oder FLAG-rSiahBP (rechts) exprimieren.

B: Diese HeLa-Zellen exprimieren gleichzeitig EYFP-MARTA1 und FLAG-rSiahBP. Von links nach rechts sind die Phasenkontrastaufnahme sowie die Fluoreszenzaufnahme von EYFP-MARTA1- und FLAG-rSiahBP sowie eine Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen gezeigt.

EYFP-MARTA1-Nachweis: 1.AK: α GFP, 2.AK: α Kaninchen ALEXA 488

FLAG-rSiahBP -Nachweis: 1.AK: α FLAG M2, 2.AK: α Maus ALEXA 546

Die Größenbalken entsprechen jeweils 50 μ m.

Die Ergebnisse der Transfektionen zeigen, daß die Lokalisierung von EYFP-MARTA1 und FLAG-rSiahBP nicht davon abhängt, ob die Proteine einzeln oder gemeinsam exprimiert werden. FLAG-rSiahBP ist im Zellkern und im Zytoplasma verteilt, während EYFP-MARTA1 ausschließlich im Zellkern vorkommt. Dort kolokalisieren die Proteine.

Mittels Koimmunpräzipitationen wurde eine mögliche Interaktion zwischen den Proteinen untersucht. Hierbei wurden Zellextrakte, die sowohl EYFP-MARTA1 als auch FLAG-rSiahBP enthielten, mit an Agaroseperlen gekoppelten α -KSRP- bzw. FLAG-Antikörpern inkubiert. Die präzipitierten Proteinkomplexe wurden mittels Westernblot analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 dargestellt.

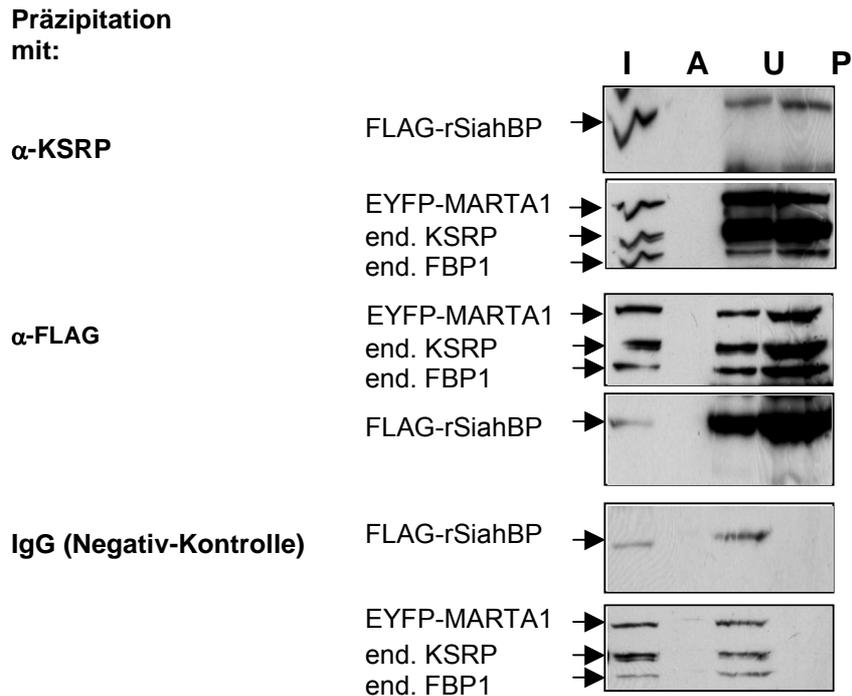


Abb. 24: Koimmunpräzipitation von EYFP-MARTA1 und FLAG-rSiahBP

Die erste Spur (I = Input) zeigt jeweils die rekombinanten Proteine EYFP-MARTA1 und FLAG-rSiahBP im HeLa-Zellextrakt. In der zweiten Spur wurden jeweils die Eluate der Agaroseperlen (A) aufgetragen, die ohne Antikörper mit den jeweiligen Zellextrakten inkubiert worden waren. Der Überstand der Koimmunpräzipitation (U = ungebundene Proteinfraction) wurde in der dritten Spur und das Eluat des Präzipitates (P) in der vierten Spur aufgetragen.

EYFP-MARTA1-Nachweis: 1.AK: α -KSRP, polyklonal, 2.AK: α -Kaninchen, HRP-gekoppelt

FLAG-rSiahBP-Nachweis: 1.AK: α -FLAG, monoklonal, 2.AK: α -Maus, HRP-gekoppelt

Die rekombinanten Proteine EYFP-MARTA1 und FLAG-rSiahBP werden, unabhängig davon, ob der α -KSRP- oder der α -FLAG-Antikörper verwendet wurde, immer gemeinsam präzipitiert. Beide Proteine sind in diesen Ansätzen im Eluat des Präzipitates nachweisbar. Ein Teil der Proteine ist im Überstand der Koimmunpräzipitation zu finden. Dies bedeutet, daß die Proteine weder mit dem α -KSRP- noch mit dem α -FLAG-Antikörper vollständig präzipitiert werden. Wie schon bei den Koimmunpräzipitationen von MARTA1 und rE1B-AP5, ist dies ein Hinweis auf das Vorhandensein weiterer Interaktionspartner sowohl für MARTA1 als auch für SiahBP. EYFP-MARTA1 und FLAG-rSiahBP binden nicht direkt an die Agaroseperlen und lassen sich nicht durch unspezifische Antikörper präzipitieren. Neben EYFP-MARTA1 werden auch das endogene KSRP (Doppelbande bei ca. 70 kDa) sowie FBP1 präzipitiert (Bande bei ca. 60 kDa), die demnach ebenfalls mit FLAG-rSiahBP interagieren.

3.4.5.2 Untersuchungen zur Interaktion zwischen KSRP und hSiahBP in HeLa-Zellen

Die große Ähnlichkeit zwischen MARTA1 und KSRP (98 %) sowie dem SiahBP der Ratte und des Menschen (98 %) ließ vermuten, daß auch die endogenen Proteine KSRP und hSiahBP in HeLa-Zellen miteinander interagieren. Der immunzytochemische Nachweis beider Proteine ergab, daß sie in HeLa-Zellen eine ähnliche subzelluläre Verteilung zeigen. Das Ergebnis ist in Abbildung 25 zu sehen.

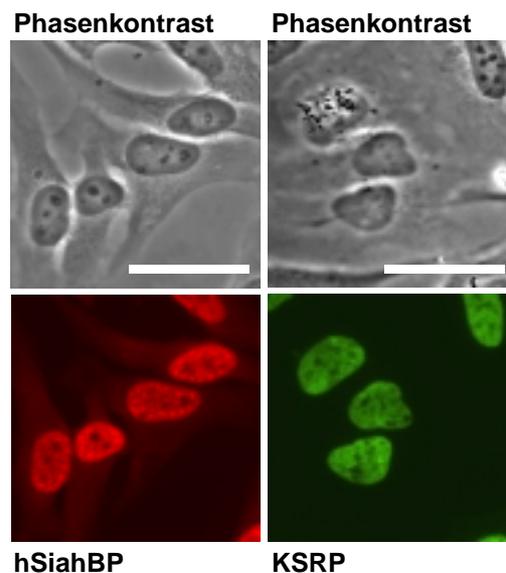


Abb. 25: Die Kolokalisierung von KSRP und hSiahBP in HeLa-Zellen

Es sind jeweils die Phasenkontrast- und die Fluoreszenzaufnahmen der HeLa-Zellen abgebildet, in denen das endogene KSRP bzw. hSiahBP nachgewiesen wurde.

KSRP-Nachweis: 1.AK: α -KSRP, 2.AK: α -Kaninchen ALEXA 488

hSiahBP-Nachweis: 1.AK: α -FIR, 2. AK: α -Kaninchen ALEXA 546

Die Größenbalken entsprechen 50 μ m.

Da für den Nachweis des KSRP sowie des endogenen hSiahBP jeweils polyklonale Antikörper verwendet wurden, war eine Doppelfärbung in den HeLa-Zellen nicht möglich. Die Einzelfärbungen zeigen, daß beide Proteine im Zellkern lokalisiert sind. Demnach kolokalisieren KSRP und hSiahBP in diesem Kompartiment. hSiahBP zeigt neben der Kernfärbung auch eine leichte zytoplasmatische Färbung.

Die Interaktion der endogenen Proteine wurde weiterhin durch Koimmunpräzipitationen untersucht, wobei KSRP und hSiahBP mittels des α -KSRP- bzw. des α -FIR-Antikörpers aus dem Extrakt untransfizierter HeLa-Zellen präzipitiert wurden. Abbildung 26 zeigt das Ergebnis der Präzipitationen.

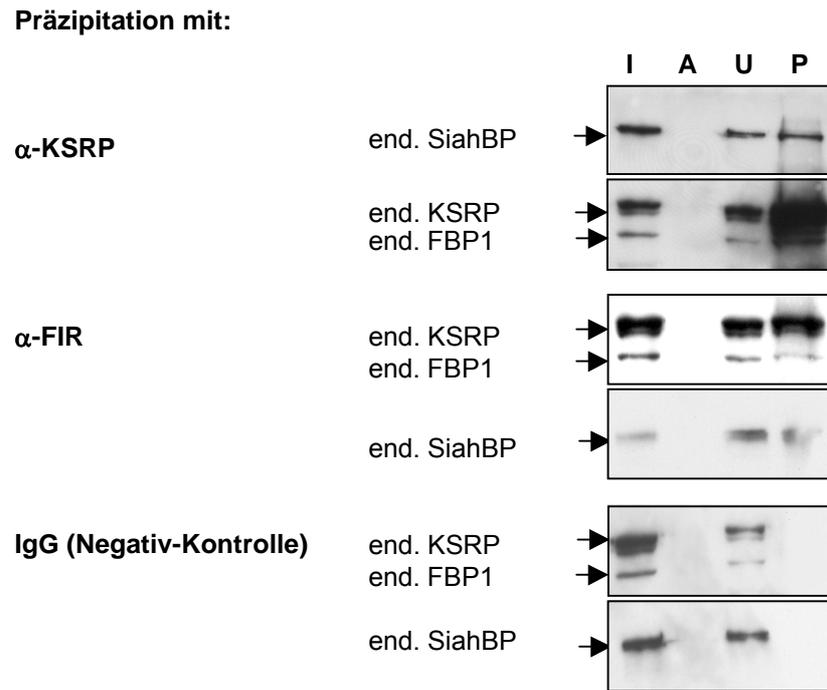


Abb. 26: Die Koimmunpräzipitationen von KSRP und hSiahBP

Die erste Spur (I = Input) zeigt jeweils die endogenen Proteine KSRP und hSiahBP im HeLa-Zell-extrakt. In der zweiten Spur wurden jeweils die Eluate der Agaroseperlen (A) aufgetragen, die ohne Antikörper mit den jeweiligen Zell-extrakten inkubiert worden waren. Der Überstand der Koimmunpräzipitation (U = ungebundene Proteinfraction) wurde in der dritten Spur und das Eluat des Präzipitats (P) in der vierten Spur aufgetragen.

KSRP-Nachweis: 1.AK: α -KSRP, polyklonal, 2.AK: α -Kaninchen, HRP-gekoppelt

hSiahBP-Nachweis: 1.AK: α -FIR, polyklonal, 2.AK: α -Kaninchen, HRP-gekoppelt

Sowohl mit dem α -KSRP als auch mit dem α -FIR-Antikörper werden beide endogenen Proteine gemeinsam präzipitiert. Dies bedeutet, daß auch das endogene KSRP mit dem endogenen hSiahBP der HeLa-Zellen interagiert. Ein Teil der Proteine ist auch hier im Überstand der Koimmunpräzipitationen nachweisbar, was für eine unvollständige Präzipitation der Proteine spricht. Dies bestätigt auch die Beobachtung, daß SiahBP im Zytoplasma nachweisbar ist, wo keine Kolokalisation mit KSRP stattfindet. Neben KSRP wird außerdem wieder FBP1 präzipitiert. Die Interaktion zwischen hSiahBP/FIR und FBP1, die bereits von Liu *et al.*, (2001) beschrieben wurde, wird hiermit bestätigt.

SiahBP besitzt drei RRM-Domänen, die für ihre RNA-Bindung bekannt sind (Shamoo *et al.*, 1995). Deshalb wäre auch zwischen MARTA1 und rSiahBP bzw. zwischen KSRP und hSiahBP eine indirekte Bindung über eine gebundene RNA möglich. Um dies näher zu untersuchen wurden die endogenen Proteine mit dem α -FIR-Antikörper aus unbehandelten sowie mit RNase behandelten HeLa-Zellen erneut präzipitiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 27 gezeigt.

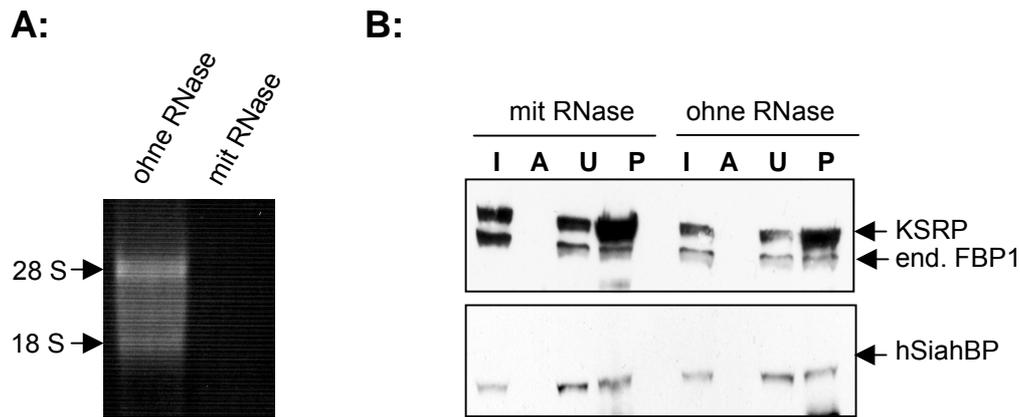


Abb. 27: Die Interaktion zwischen KSRP und hSiahBP in HeLa-Zellen nach RNase-Verdau

A: Es ist die aus unbehandelten (links) und aus RNase-behandelten (rechts) HeLa-Zellextrakten isolierte RNA gezeigt.

B: Die Input-Spur (I) zeigt jeweils die endogenen Proteine KSRP und hSiahBP in den unbehandelten (rechts) und RNase-behandelten (links) HeLa-Zellextrakten. In der Protein A-Agarose-Spur (A) wurden jeweils Eluate der Agaroseperlen aufgetragen, die ohne Antikörper mit den jeweiligen Zellextrakten inkubiert worden waren. Außerdem wurden der Überstand (U = ungebundene Proteinfraction) und das Eluat des Präzipitats (P) der Koimmunpräzipitationen aufgetragen. KSRP-Nachweis: 1.AK: α -KSRP, polyklonal, 2.AK: α -Kaninchen, HRP-gekoppelt
hE1B-AP5-Nachweis: 1.AK: α -E1B-AP5, monoklonal, 2.AK: α -Ratte, HRP-gekoppelt

KSRP wird mit dem α -FIR-Antikörper aus dem RNase behandelten HeLa-Zellextrakt genau so präzipitiert wie aus dem unbehandelten HeLa-Extrakt. Demnach handelt es sich um eine direkte Interaktion von KSRP und hSiahBP, die nicht durch eine von beiden Proteinen gebundene RNA vermittelt wird.

3.4.5.3 Untersuchung der Interaktion zwischen MARTA1 und rSiahBP in Hefe-Zellen

Für die Eingrenzung der rSiahBP-Bindungsdomäne von MARTA1 wurden Hefe-Zellen jeweils mit pACT2/rSiahBP und den bereits unter 3.4.4.5 beschriebenen pAS2-Vektoren, die zur Synthese verschiedener MARTA1-Teilstücke führen, kotransfiziert. Als Kontrolle wurde erneut der im Hefe-Screen isolierte bei Nukleotid 379 beginnende Klon zusammen mit dem pAS2/MARTA1-Vektor in Hefe-Zellen transfiziert. Abbildung 28 zeigt die Ergebnisse.

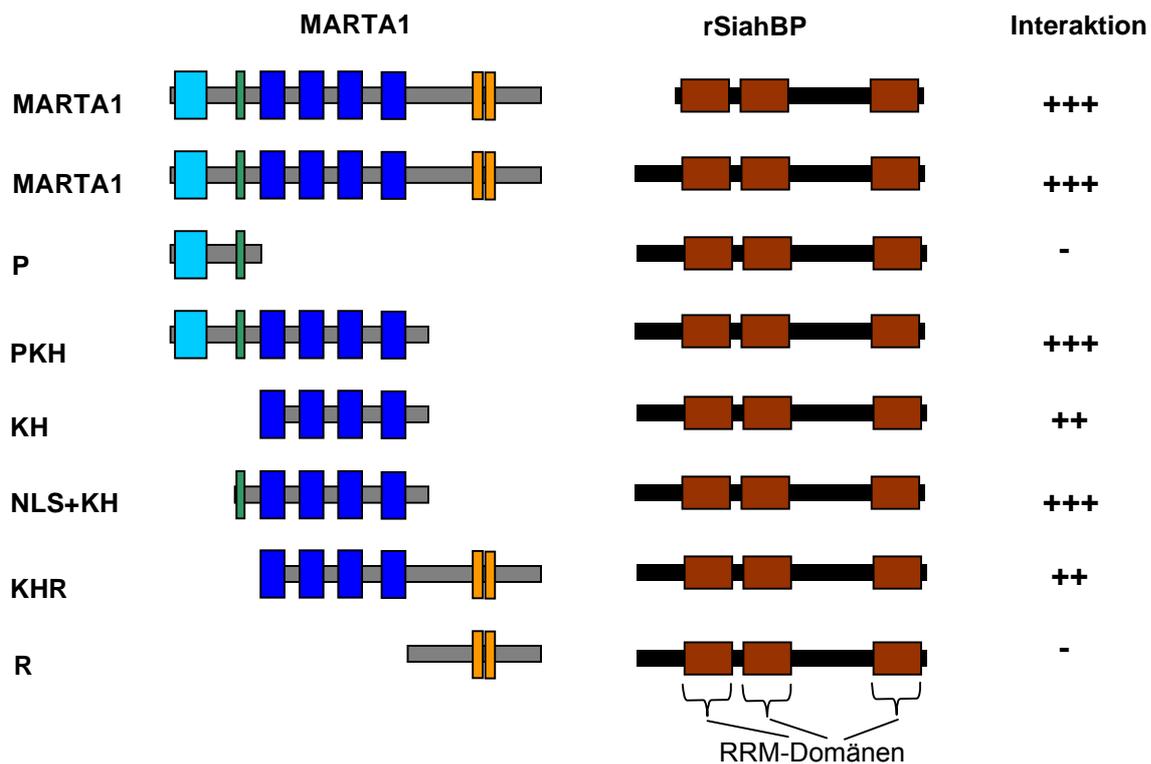


Abb. 28: Die Interaktionstests von MARTA1 und rSiahBP in Hefe-Zellen

Dargestellt sind die Proteine bzw. Proteinteilstücke, die zusammen in Hefe-Zellen exprimiert wurden, und ihre Fähigkeit zur Interaktion. Dabei stehen +++ für eine starke Interaktion, ++ für eine schwache und – für keine Interaktion.

Außerdem wurden die RRM-Domänen von rSiahBP näher bezeichnet. Das oberste Konstrukt stellt das im Hefe-Screen identifizierte Teilstück dar.

Das vollständige Ratten-SiahBP interagiert in Hefe-Zellen genau so gut mit MARTA1 wie das im Hefe-Screen gefundene rSiahBP-Teilstück. rSiahBP bindet ebenfalls sehr gut an das PKH-Konstrukt sowie an das NLS-KH-Konstrukt, welches das Kernlokalisierungssignal und die KH-Domänen enthält. Weniger stark ist die Bindung zwischen rSiahBP und den KH-Domänen sowie zwischen rSiahBP und dem KHR-Konstrukt. Es findet keine Interaktion zwischen rSiahBP und dem amino- bzw. dem carboxyterminalen Bereich von MARTA1 (Konstrukte P und R) statt. MARTA1 interagiert also innerhalb der zentralen, die KH-Domänen enthaltenden Region mit rSiahBP. rSiahBP verhält sich in seinen Bindungseigenschaften zu MARTA1 demnach genau so wie rE1B-A.

4. Diskussion

Der subzelluläre Transport und die lokale Translation von RNA-Molekülen sind für die unterschiedliche Proteinzusammensetzung in bestimmten Zellkompartimenten von großer Bedeutung. Bei Neuronen scheint die lokale Proteinsynthese zur synaptischen Plastizität beizutragen (Kindler *et al.*, 1997, Wells *et al.*, 2000, Krichevsky und Kosik, 2001, Steward und Schuman, 2001). In den letzten Jahren wurden für einige in Neuronen lokalisierte Transkripte *cis*-agierende Sequenzelemente nachgewiesen, darunter auch das 640 Nukleotide lange *Dendritic Targeting Element* (DTE) der MAP2-mRNA (Blichenberg *et al.*, 1999). Man geht davon aus, daß an diese Elemente bindende *trans*-Faktoren für die Lokalisation der Transkripte sowie die Regulation der RNA-Stabilität und der lokalen Translation verantwortlich sind. Es wurden bereits einige solcher RNA-Bindeproteine identifiziert, die gemeinsam mit den lokalisierten RNA-Molekülen Ribonukleoprotein-Partikel (RNPs) bilden (Ferrandon *et al.*, 1994 Zhang *et al.*, 2001). Dabei fällt auf, daß mehrere Proteine an ein und dasselbe *cis*-Element binden (Snee *et al.*, 2002). Demnach nehmen diese Sequenzabschnitte wahrscheinlich vielfältige Funktionen wahr. Andererseits binden einige *trans*-Faktoren in unterschiedlichen Zelltypen und Spezies an verschiedene *cis*-Elemente und erfüllen unterschiedliche Aufgaben (Gu *et al.*, 2002, Kroll *et al.*, 2002, Snee *et al.*, 2002). Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion des MAP2-DTE interagierenden Proteins MARTA1 näher zu charakterisieren und damit einen Beitrag zur Aufklärung der posttranskriptionalen Regulation zu leisten.

4.1 MARTA1, ein neues Mitglied der FBP-Familie

MARTA1 zeigt ein hohes Maß an Sequenzidentität zu den Mitgliedern der FBP (*FUSE Binding Proteins*) -Gruppe. Es kann daher als neues Mitglied dieser Familie angesehen werden.

Die Proteine der FBP-Familie sind an verschiedenen Schritten des RNA-Metabolismus beteiligt. FBP1 fungiert als Transkriptionsfaktor des *c-myc*-Gens (He *et al.*, 2000). FBP2/KSRP ist als Bestandteil eines Multi-Proteinkomplexes am Neuronen-spezifischen Spleißen des *c-src*-Transkriptes (Min *et al.*, 1997) bzw. am *Editing* der apoB-RNA in der Ratten-Leber beteiligt (Lellek *et al.*, 2000 und 2002). ZBP2 und VgRBP71 interagieren mit den *cis*-Elementen der β -Aktin- bzw. der Vg1-mRNA (Gu *et al.*, 2002, Kroll *et al.*, 2002). Für ZBP2 wurde bereits eine Beteiligung am Transport der β -Aktin-mRNA nachgewiesen (Gu *et*

al., 2002). Die Funktionen der Familienmitglieder FBP3 und MARTA2 sind bisher unbekannt. MARTA2 könnte als MAP2-DTE-interagierendes Protein aber ebenfalls am dendritischen mRNA-Transport beteiligt sein (Rehbein *et al.*, 2000).

Die Proteine der FBP-Familie nehmen also verschiedene Funktionen im RNA-Metabolismus wahr. MARTA1 scheint dabei an mehreren Vorgängen mitzuwirken. Die Beteiligung an der RNA-Prozessierung (Lellek *et al.*, 2000) spricht für eine nukleäre Funktion von MARTA1, die spezifische Interaktion mit dem MAP2-DTE (Rehbein *et al.*, 2002) dagegen für eine Beteiligung am dendritischen mRNA-Transport. Die zu MARTA1 orthologen Proteine ZBP2 und VgRBP71 sind vorwiegend nukleär lokalisiert. ZBP2 ist aber auch in den Wachstumskegeln von Neuronen und im *leading edge* von Fibroblasten des Huhns nachweisbar (Gu *et al.*, 2002). VgRBP71 wird während der unterschiedlichen Stadien der Oogenese in verschiedenen zytoplasmatischen Bereichen der *Xenopus*-Oozyte nachgewiesen (Kroll *et al.*, 2002). Es ist an der Translationsaktivierung der Vg1-mRNA maßgeblich beteiligt (Kolev *et al.*, 2003). Demnach erstrecken sich die Funktionen dieser Proteine auf verschiedene Zellkompartimente und die von ihnen gebundenen RNA-Moleküle könnten bereits im Kern als zu lokalisierende Transkripte erkannt werden. Proteine der FBP-Familie sind also an verschiedenen postranskriptionalen Regulationsmechanismen innerhalb und außerhalb des Zellkerns beteiligt.

4.2 Die Interaktion von MARTA1 mit dem MAP2-DTE

Die Identifizierung der MARTA1-cDNA und die anschließende Analyse der Aminosäuresequenz ergab, daß MARTA1 in drei Bereiche unterteilt werden kann. Seine zentrale Region besteht aus vier KH-Domänen (*hnRNP K-Homology domains*). Diese Domänen sind dafür bekannt, mit RNA (Siomi *et al.*, 1993 und 1994) bzw. einzelsträngiger DNA (Duncan *et al.*, 1994) interagieren zu können. Eine charakteristische Abfolge von drei α -Helices und drei β -Faltblättern ($\beta\alpha\alpha\beta\beta\alpha$) kennzeichnet ihre Struktur (Musco *et al.*, 1996). Mittels UV-Quervernetzungs-Analysen wurde im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen, daß die KH-Domänen von MARTA1 die spezifische Interaktion mit dem MAP2-DTE vermitteln. Es sind bereits mehrere KH-Domänen enthaltende Proteine bekannt, die an Lokalisierungselemente von mRNA-Molekülen binden. Beispielsweise besitzen die mit dem *Vegetal Localization Element* (VLE) der Vg1-mRNA interagierenden Proteine Vg1RBP (Deshler *et al.*, 1997, Havin *et al.*, 1998) und VgRBP71 (Kroll *et al.*, 2002) sowie die an den *Zip-Code* der β -Aktin-mRNA bindenden Proteine ZBP1 (Oleynikov and Singer 1998, Bassel *et al.*, 1999) und ZBP2 (Gu *et al.*, 2002) ebenfalls jeweils vier dieser Domänen. Das Vorkommen mehrerer Bindungsdomänen ist ein typisches Merkmal von RNA-interagierenden Proteinen (Siomi und Dreyfuss, 1997). Bei Proteinen mit mehreren hintereinander geschalteten KH-Domänen wird

angenommen, daß sich die Bindungseigenschaften der einzelnen Domänen unterscheiden. Damit wird die RNA-Affinität der multiplen Domäne regulierbar (Musco *et al.*, 1996). Außerdem kann durch die multiple Interaktion der Proteine mit der RNA die Spezifität der Bindung erhöht werden (Siomi und Dreyfuss, 1997) Jede der KH-Domänen von MARTA1 könnte mit einem speziellen Sequenzabschnitt des MAP2-DTE interagieren. Innerhalb des VLE der Vg1-mRNA wurden repetitive Sequenzen identifiziert, die für die Proteinbindung von Bedeutung sein könnten (Gautreau *et al.*, 1997).

4.3 Der Funktionsort von MARTA1

Die Kernlokalisierung des rekombinanten EYFP- bzw. RFP- fusionierten MARTA1 deutet auf eine nukleäre Funktion des Proteins hin. Innerhalb der aminoterminalen Domäne wurde ein klassisches zweiteiliges Kernlokalisierungssignal identifiziert. Mittels der Lokalisationsstudien der einzelnen MARTA1-Domänen wurde gezeigt, daß dieses Signal für die nukleäre Lokalisation des Proteins verantwortlich ist. Außerdem deuten die nukleären Verteilungsmuster der zentralen- sowie der carboxyterminalen Region darauf hin, daß auch innerhalb dieser Domänen kernlokalisierende Signale vorkommen. Entsprechende Beobachtungen wurden auch für das zu MARTA1 sehr ähnliche Protein FBP1 gemacht (He *et al.*, 2000). Die zentrale FBP1-Domäne ist zu 72 % identisch zu den vier KH-Domänen von MARTA1. Sie ist als GFP-Fusionsprotein in HeLa-Zellen sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch lokalisiert. Eine 20 Aminosäuren lange α -helikale Struktur zwischen der dritten und vierten KH-Domäne von FBP1 konnte als unkonventionelles Kernlokalisierungssignal eingeeignet werden (He *et al.*, 2000). Ein ähnliches Strukturelement ist an dieser Stelle auch bei MARTA1 vorhanden und könnte ebenfalls als Kernlokalisierungssignal dienen. Auch die carboxyterminale Domäne von FBP1 wird in den Kern transportiert. Dafür sind die drei sogenannten Y-Motive innerhalb dieser Region verantwortlich (He *et al.*, 2000). Die drei Wiederholungen von jeweils sechs Aminosäuren (AW(A/E)(A/E)YY) stellen die für die Transkriptionsaktivierung des c-myc-Gens notwendigen Domänen dar (Duncan *et al.*, 1996). MARTA1 besitzt in seiner carboxyterminalen Region vier Y-Motive. Zwei der drei sowohl bei MARTA1 als auch bei FBP1 vorkommenden Y-Motive sind zu 100 % identisch. Das dritte in beiden Proteinen vorkommende Motiv zeigt bei FBP1 eine Abweichung von der Konsensussequenz. MARTA1 besitzt ein weiteres vollständiges Y-Motiv, welches bei FBP1 nicht vorkommt. Die Y-Motive könnten demnach auch bei MARTA1 für die nukleäre Lokalisation der carboxyterminalen Domäne verantwortlich sein.

Das rekombinante MARTA1 zeigt in HeLa- und CHO-Zellen sowie in primären Hippokampusneuronen jeweils ein granuläres Verteilungsmuster im Zellkern. Es sind

verschiedene Arten von nukleären Strukturen bekannt, die sich in ihrer charakteristischen Zusammensetzung von Proteinen und Nukleinsäuren unterscheiden (Dundr und Misteli, 2001). Eine Form von nukleären Granulae, die sogenannten *Splicing-Factor Compartments* (SFCs, Misteli *et al.*, 2000), dienen der Aufbewahrung und Zusammensetzung von Komponenten der Spleiß-Maschinerie. In ihrer Umgebung sind die meisten aktiven Gene nachweisbar (Xing *et al.*, 1995). Die MARTA1-Granulae im Zellkern ähneln in ihrem Aussehen den SFCs. Das zu MARTA1 orthologe Protein KSRP ist Bestandteil eines Spleiß-Komplexes. Die mögliche Lokalisation von MARTA1 innerhalb der SFCs ist ein Hinweis auf eine funktionelle Beteiligung an Transkriptions- und Spleiß-Prozessen im Zellkern.

Das Verteilungsmuster der PKH-Variante ist identisch zu dem von MARTA1. Die P-Variante zeigt dagegen eine homogene Verteilung im Zellkern. Demnach scheint der KH-Domänen enthaltende zentrale Bereich von MARTA1 und damit die Interaktion mit der MAP2-mRNA für die genaue Lokalisation des Proteins im Zellkern von Bedeutung zu sein. Rehbein *et al.* wiesen MARTA1 auch in den Dendriten von kortikalen und hippocampalen Neuronen der Ratte nach (Rehbein *et al.*, 2002). Zusammengenommen sprechen die Untersuchungen zur Lokalisation von MARTA1 somit für eine Beteiligung des Proteins an verschiedenen postranskriptionalen Regulationsmechanismen innerhalb und außerhalb des Zellkerns.

4.4 MARTA1 und die Lokalisation der MAP2-mRNA

Um die Bedeutung von MARTA1 für die Lokalisation der MAP2-mRNA näher zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit primäre Hippokampusneurone mit einem Plasmid transfiziert, welches zu einer Überexpression der zentralen, KH-Domänen enthaltenden MARTA1-Region führte. Durch UV-Quervernetzungs-Analysen wurde zuvor bestätigt, daß dieser Bereich für die spezifische Interaktion mit der MAP2-mRNA ausreichend ist. Demnach könnte der rekombinante zentrale MARTA1-Bereich mit dem endogenen MARTA1 der Neurone um die Bindung an die MAP2-mRNA konkurrieren. Die Auswirkungen auf die MAP2-mRNA-Lokalisation wurden untersucht, indem diese mit einer spezifischen Sonde mittels *in situ*-Hybridisierung sichtbar gemacht wurde. Für den Fall einer dominant negativen Wirkung der rekombinanten MARTA1-Variante sollte eine Veränderung der Lokalisation der endogenen MAP2-mRNA im Vergleich zu untransfizierten Zellen erkennbar sein.

Ähnliche Experimente wurden bereits von Tang *et al.* für die Untersuchung der Beteiligung von Staufen2 am mRNA-Transport durchgeführt (Tang *et al.*, 2001). Dabei wurde in Hippokampusneuronen eine am Carboxyterminus verkürzte, jedoch alle vier RNA-Bindedomänen (RBD, *RNA Binding Domains*) enthaltende Staufen2-GFP (*Green*

Fluorescent Protein) -Variante synthetisiert. Mittels einer gegen den Poly(A)-Schwanz gerichteten Poly(T)-*antisense*-Sonde wurde die Gesamt-mRNA in den Dendriten sowie im Soma der Neurone sichtbar gemacht. Dabei zeigte die verkürzte Staufen2-GFP-Variante einen dominant negativen Effekt hinsichtlich der dendritischen mRNA-Lokalisation. Bei der Überexpression dieser Variante war in den Dendriten der Neurone deutlich weniger, im Soma dagegen deutlich mehr mRNA nachweisbar als in nur mit einem GFP-Vektor transfizierten Neuronen (Tang *et al.*, 2001). Kontrollexperimente, bei denen ein Fusionsprotein aus GFP und den KH-Domänen des ebenfalls dendritisch lokalisierten FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*) synthetisiert wurde, zeigten keine Verminderung des dendritischen mRNA-Transportes. Offenbar sind die KH-Domänen von FMRP also nicht der Lokalisation der von diesem Protein gebundenen RNA-Moleküle beteiligt (Tang *et al.*, 2001).

Inzwischen ist aber bekannt, daß auch KH-Domänen enthaltende Proteine bei der RNA-Lokalisation von Bedeutung sind. Um die Beteiligung des MARTA1-orthologen Proteins ZBP2 am Transport der β -Aktin-mRNA zu untersuchen, transfizierten Gu *et al.* embryonale Hühner-Fibroblasten mit einem Plasmid, das zur Synthese einer verkürzten ZBP2-Variante führte (Gu *et al.*, 2002). Diese Variante umfasste die 47 Reste im aminoterminalen Bereich, die im Vergleich zu MARTA1 bei ZBP2 zusätzlich vorhanden sind, sowie die vier KH-Domänen des zentralen Bereiches. In Zellen, die diese verkürzte Variante synthetisierten, war mittels *in situ*-Hybridisierung deutlich weniger lokalisierte β -Aktin-mRNA nachweisbar. Dies ist ein starker Hinweis auf die Beteiligung von ZBP2 am Transport der β -Aktin-mRNA (Gu *et al.*, 2002).

Die in der vorliegenden Arbeit von den primären Hippokampusneuronen synthetisierte verkürzte EYFP-MARTA1-Variante ist im Zellkern und im Zytoplasma verteilt. In Neuronen, die diese Variante synthetisieren, ist im Vergleich zu untransfizierten Zellen sowohl im Soma als auch in den Dendriten deutlich weniger MAP2-mRNA nachweisbar. Dies läßt zunächst auf einen allgemeinen Rückgang der RNA-Stabilität infolge eines dominant negativen Effekts der überexprimierten EYFP-KH-Variante schließen. Allerdings ist in nur EYFP synthetisierenden Kontrollneuronen ebenfalls deutlich weniger MAP2-mRNA nachweisbar als in untransfizierten Neuronen. Für EYFP ist bisher kein Effekt hinsichtlich der Beeinflussung des RNA-Metabolismus bekannt. Der Grund für diese Beobachtung könnte dennoch in einem toxischen Effekt dieses Proteins in Bezug auf die RNA-Stabilität oder den Nachweis der MAP2-mRNA liegen. Aus diesem Grund kann aus dem durchgeführten Experiment keine Schlußfolgerung hinsichtlich der Beteiligung von MARTA1 am MAP2-mRNA-Transport gezogen werden.

Als alternative Möglichkeit zur Untersuchung der MARTA1-Funktion bei der dendritischen Lokalisation des MAP2-Transkriptes, wäre ein indirekter Nachweis in Form einer veränderten Lokalisation einer Reporter-RNA in Anwesenheit einer dominant negativ

wirkenden MARTA1-Variante denkbar. In Hippokampusneuronen würde dabei ein chimäres Transkript aus einer nichttransportierten RNA und dem MAP2-DTE parallel mit der verkürzten MARTA1-Variante exprimiert werden. Der Anteil der Zellen mit lokalisierten Transkripten könnte anschließend zwischen den einzeln sowie kotransfizierten Zellen verglichen und statistisch ausgewertet werden. Eine zweite alternative Methode wäre die Transfektion von Hippokampusneuronen mit Vektoren, die als Vorlage für die Synthese spezifischer si (*small interference*)-RNAs dienen (Tuschl *et al.*, 2002). Diese Moleküle könnten die Degradation der MARTA1-mRNA bewirken womit die Synthese des Proteins reduziert wird. Anschließend könnte die Lokalisation der MAP2-mRNA in den Zellen untersucht werden, in denen das endogene MARTA1 nicht länger vorhanden ist.

4.5 MARTA1 und seine Interaktionspartner

Weitere Hinweise auf die Funktion eines Proteins ergeben sich häufig über die Identifizierung weiterer Interaktionspartner. Mittels des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst drei potentielle Bindungspartner von MARTA1 identifiziert.

Die Interaktion zwischen dem bei der Durchmusterung der Ratten-Gehirn-cDNA-Bank gefundenem Protein BERP (*Brain Expressed Ring Finger Protein*, El-Husseini und Vincent, 1999) und MARTA1 konnte in weiterführenden Untersuchungen hinsichtlich der Kolokalisation in HeLa-Zellen bzw. der Interaktion in Hefen nicht bestätigt werden. Die Interaktion von MARTA1 mit dem im Hefe-Zwei-Hybrid-Screen gefundenen BERP-Fragment könnte durch eine nicht korrekte Faltung des von dem entsprechenden Klon kodierten BERP-Teilstückes ermöglicht worden sein. Aufgrund der bisher gemachten Beobachtungen ist eine Beteiligung des Proteins am dendritischen mRNA-Transport jedoch nicht auszuschließen. So weist BERP in NGF (*Neural Growth Factor*)-induzierten PC12-Zellen ein granuläres Verteilungsmuster im Soma, den Neuriten und den Wachstumskegeln auf (El-Husseini und Vincent, 1999) auf. Diese Granulae könnten Ribonukleoprotein-Partikel (RNPs) darstellen, innerhalb derer mRNA-Moleküle transportiert werden. Als Myosin V-interagierendes Protein könnte BERP am Aktin-abhängigen Transport beteiligt sein. Aufgrund seiner genannten Eigenschaften wäre die Untersuchung einer möglichen Interaktion zwischen BERP und anderen zu MARTA1 ähnlichen Proteinen von hohem Interesse. Beispielsweise könnte untersucht werden, ob BERP an das ebenfalls mit dem MAP2-DTE interagierende, Ribosomen assoziierte Protein MARTA2 bindet.

Neben BERP wurden mittels des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems die Proteine E1B-AP5 (*Adenovirus Typ 5 Early 1B-Associated Protein 5*) und SiahBP (*Siah Binding Protein*) als potentielle MARTA1-Bindungspartner identifiziert. Ihre Interaktion mit MARTA1 konnte mittels Kolokalisationen und Koimmunpräzipitationen aus HeLa-Zellextrakten sowie

Interaktionstests in Hefe-Zellen bestätigt werden. Im Hefe-System wurde gezeigt, daß sowohl die Bindung von MARTA1 an E1B-AP5 als auch an SiahBP über den zentralen, die vier KH-Domänen enthaltenden Bereich erfolgt. Es ist bekannt, daß KH-Domänen sowohl an Nukleinsäuren binden als auch mit Proteinen interagieren können (Chen *et al.*, 1997, Samuels *et al.*, 1998). Da sowohl E1B-AP5 als auch SiahBP RNA-Bindedomänen besitzen, war für beide Proteine eine indirekte Interaktion mit MARTA1 über eine gemeinsame, gebundene RNA nicht auszuschließen. In beiden Fällen konnten die Bindungspartner jedoch auch dann kopräzipitiert werden, wenn die Zellextrakte vor der Immunfällung mit RNase behandelt worden waren. Bei allen durchgeführten Immunpräzipitationen konnte trotz großer Mengen eingesetzter Antikörper keines der Proteine vollständig präzipitiert werden. Dies ist ein Hinweis darauf, daß für MARTA1, E1B-AP5 und SiahBP weitere Bindungspartner existieren. Tatsächlich sind bereits weitere Interaktionspartner von E1B-AP5 und SiahBP bekannt.

E1B-AP5 wurde als zellulärer Bindungspartner des adenoviralen Proteins E1B-55 kDa (*Adenovirus Typ 5 Early 1B-55 kDa*) identifiziert (Gabler *et al.*, 1998). Dieses Protein rekrutiert im Komplex mit einem weiteren viralen Protein (E4 orf 6) zelluläre, an der RNA-Prozessierung sowie am nukleären Export beteiligte Faktoren. Die Synthese und der Kernexport viraler RNAs wird so gewährleistet (Leppard und Shenk, 1989). Die Überexpression von E1B-AP5 führt zu einem verstärkten Export viraler RNAs und gleichzeitig zu einem verminderten Export zellulärer RNA-Moleküle. E1B-AP5 ist vorwiegend im Zellkern lokalisiert, ist aber auch in geringen Mengen im Zytoplasma detektierbar. Es zeigt große Sequenzidentitäten zu den hnRNP-Proteinen. Man nimmt an, daß die zelluläre Funktion von E1B-AP5 in einer Beteiligung am nukleären Export neusynthetisierter und prozessierter RNA-Moleküle liegt (Gabler *et al.*, 1998). Diese Vermutung wird durch den Nachweis der Interaktion zwischen E1B-AP5 und TAP unterstützt (Bachi *et al.*, 2000). TAP vermittelt durch seine Interaktion mit dem Kernporenkomplex den Export von mRNA-Molekülen. Außerdem fungiert E1B-AP5 als Transkriptionsregulator (Kzhyshkowska *et al.*, 2002). An mehreren getesteten Promotoren wirkt es reprimierend hinsichtlich der Genexpression. Für diese Wirkung ist der aminoternale Bereich des Proteins ausreichend. Im Unterschied dazu wird der Glukokortikoid abhängige MMTV-Promotor durch E1B-AP5 aktiviert. Dafür ist die Interaktion von E1B-AP5 mit dem Bromodomänen enthaltenden Protein BRD7 notwendig. BRD7 bindet an aktivierte Gene sowie an hyperphosphorylierte RNA-Polymerase II-Moleküle (Kzhyshkowska *et al.*, 2002). Die Transkriptionsaktivierung wird über die zentrale E1B-AP5-Region vermittelt. Für die Bindung an MARTA1 ist aber der carboxyterminale, RGG- und prolinreiche Domänen enthaltende Bereich von E1B-AP5 verantwortlich. Man geht davon aus, daß RGG (Arginin-Gycin-Glycin) -Boxen die Bindungsaffinität für RNA in einer Sequenz-unabhängigen Weise erhöhen, indem sie RNA-

Sekundärstrukturen auflösen und damit die RNA für andere RNA-Interaktionsdomänen zugänglich machen (Ghisolfi *et al.*, 1992). RGG-Boxen kommen oft in Kombination mit anderen RNA-Interaktionsdomänen vor (Kiledjian und Dreyfuss, 1992). Dies ist bei E1B-AP5 allerdings nicht der Fall. Möglicherweise interagiert E1B-AP5 also nicht direkt mit RNA-Molekülen, steigert aber die Bindungsaffinität anderer RNA-Bindeproteine. Demnach könnte die Interaktion von MARTA1 mit RNA-Molekülen eventuell durch E1B-AP5 reguliert werden. Weiterhin interagiert E1B-AP5 mit der humanen Arginin (R) Methyl-Transferase 1L1 (HRMT1L1, Kzhyshkowska *et al.*, 2001). Sie ist für die Methylierung der Arginin-Reste in der RGG-Box verantwortlich, wobei es sich um eine typische posttranslationale Modifikation von hnRNP-Proteinen handelt. Außerdem wirkt die HRMT1L1 wahrscheinlich als Koaktivator der Transkription (Kzhyshkowska *et al.*, 2001). Anhand der bisher bekannten Funktionen von E1B-AP5 kann angenommen werden, daß dieses Protein eine funktionelle Verbindung zwischen der Synthese (Transkription) und dem Kernexport der RNA darstellt. Zwischen diesen beiden Prozessen findet aber noch die Reifung der RNA-Moleküle (Spleißen, Polyadenylierung, *5' Capping*) statt. Eine regulatorische Verbindung mit diesen Prozessen könnte über die Interaktion mit MARTA1 stattfinden.

Weitere Hinweise hinsichtlich der Funktion von MARTA1 als ein an verschiedenen Schritten des RNA-Metabolismus beteiligtes Protein ergaben sich in dieser Arbeit durch den Nachweis der Interaktion von MARTA1 und SiahBP. SiahBP steht für Seven in absentia homolog Binding Protein. Sein Bindungspartner Siah ist das zum Drosophila-Protein Sina (Seven in absentia) orthologe Protein. Sina ist als Kotranskriptionsfaktor an der Entstehung der Photorezeptorzelle R7 beteiligt (Dickson, 1998). Das SiahBP der Ratte wurde mittels eines Hefe-Drei-Hybrid-Screens als ein Protein identifiziert, welches an eine Spleiß-Verstärkungs-Sequenz innerhalb eines Introns der APP (Amyloid Precursor Protein)-RNA bindet (Poleev *et al.*, 2000). Das dazu orthologe humane Protein SiahBP/PUF60 (Poly U Factor 60 kDa) ist an der Assoziation des Spleiß-Faktors U2 snRNP (small nuclear Ribonucleoprotein-Particle) mit der prä-mRNA beteiligt (Page-McCaw *et al.*, 1999). Demnach ist SiahBP, ähnlich wie das MARTA1- orthologe Protein KSRP, an Spleiß-Prozessen beteiligt. Das humane SiahBP ist auch unter dem Namen FIR (FBP Interacting Repressor) als FBP1-interagierendes Protein bekannt (He *et al.*, 2000). FBP1 gehört zur gleichen Proteinfamilie wie MARTA1. Es interagiert über seine KH-Domänen mit der einzelsträngigen FUSE (Far Upstream Element)-Sequenz innerhalb des Promotors der c-myc-DNA. Damit FBP1 mit FUSE interagieren kann, muß dieser DNA-Abschnitt zunächst durch den Transkriptions-Faktor IIIH (TFIIH), welcher eine Helikase-Aktivität besitzt, entwunden werden. FBP1 interagiert mit TFIIH und steigert dessen Helikase-Aktivität, wodurch die Transkription beschleunigt wird (Liu *et al.*, 2001). Für die Aktivierung des c-myc-Gens durch FBP1 ist eins der drei im carboxyterminalen Bereich vorkommenden Y-Motive (AW(A/E)(A/E)YY)

ausreichend (Duncan *et al.*, 1996). Diese Motive stellen gleichzeitig ein unkonventionelles Kernlokalisierungssignal dar (He *et al.*, 2000). MARTA1 besitzt vier Y-Motive in seiner carboxyterminalen Region. Das Vorkommen dieser Motive mit Transaktivierungspotential spricht dafür, daß MARTA1 möglicherweise ebenfalls als Transkriptionsfaktor fungieren kann. SiahBP/FIR interagiert mit den KH-Domänen von FBP1. Die aktivierte Transkription des c-myc-Gens wird dadurch inhibiert (Liu *et al.*, 2000). SiahBP interagiert ebenfalls mit den KH-Domänen von MARTA1. Möglicherweise wirkt SiahBP also auch als Modulator eines durch MARTA1 aktivierten Transkriptionsprozesses. Zusammengenommen spricht die Interaktion von MARTA1 und SiahBP also ebenfalls für multifunktionelle Eigenschaften von MARTA1 im RNA-Metabolismus.

4.6 Resümee

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, daß MARTA1 ein multifunktionelles, an verschiedenen Schritten des RNA-Metabolismus beteiligtes Protein ist. Das Vorkommen von Sequenz-Motiven mit Transaktivierungspotential, die Interaktion mit E1B-AP5 und SiahBP/FIR sprechen für eine Beteiligung an Transkriptionsprozessen. MARTA1 scheint außerdem bei verschiedenen Schritten der posttranskriptionalen RNA-Prozessierung mitzuwirken. Dafür sprechen folgende Beobachtungen: Das zu MARTA1 orthologe KSRP ist notwendig für die Formierung eines Proteinkomplexes beim für Neuronen spezifischen Spleißen des c-src-Transkriptes (Min *et al.*, 1997). Der MARTA1-Interaktionspartner SiahBP bindet ebenfalls an eine Spleiß-Verstärkungs-Sequenz innerhalb der APP-prä-RNA (Poleev *et al.*, 2000). Gleizeitig ist das humane SiahBP/PUF60 gemeinsam mit p54 an der Rekrutierung von U2 snRNP bei Spleiß-Prozessen beteiligt (Page-McCaw *et al.*, 1999). MARTA1 selbst wurde innerhalb eines Protein-Komplexes nachgewiesen, der das Leber-spezifische *Editing* der ApoB-RNA bewirkt. Hier nimmt es wahrscheinlich eine regulierende Aufgabe wahr (Lellek *et al.*, 2000 und 2002). Die mögliche Lokalisation von MARTA1 in den nukleären SFC-Strukturen spricht ebenfalls für die Funktion bei posttranskriptionalen Modifikationen. Außerdem gibt es Hinweise bezüglich einer Beteiligung des Proteins an der zytoplasmatischen RNA-Lokalisation. MARTA1 bindet spezifisch an das Lokalisierungselement (DTE) der MAP2-mRNA (Rehbein *et al.*, 2000). Die orthologen Proteine ZBP2 und VgRBP71 interagieren mit den Lokalisierungselementen der β -Aktin-mRNA (Zip-Code) bzw. der Vg1-mRNA (VLE) aus Huhn und *Xenopus* (Gu *et al.*, 2002, Kroll *et al.*, 2002). Für ZBP2 konnte bereits eine Beteiligung am Transport der β -Aktin-mRNA nachgewiesen werden (Gu *et al.*, 2002). Weiterhin interagiert der MARTA1-Bindungspartner E1B-AP5 mit TAP, welches eine wichtige Funktion beim RNA-Export aus dem Zellkern spielt (Bachi *et al.*, 2000). Neuesten Erkenntnissen zufolge ist das orthologe Protein VgRBP71 als regulierender Faktor

an der Translationsaktivierung der Vg1-mRNA beteiligt (Kolev *et al.*, 2003). In Abbildung 29 sind die Interaktionspartner von MARTA1 bzw. den orthologen Proteinen und den daraus hergeleiteten Hinweisen bezüglich der Funktion schematisch dargestellt.

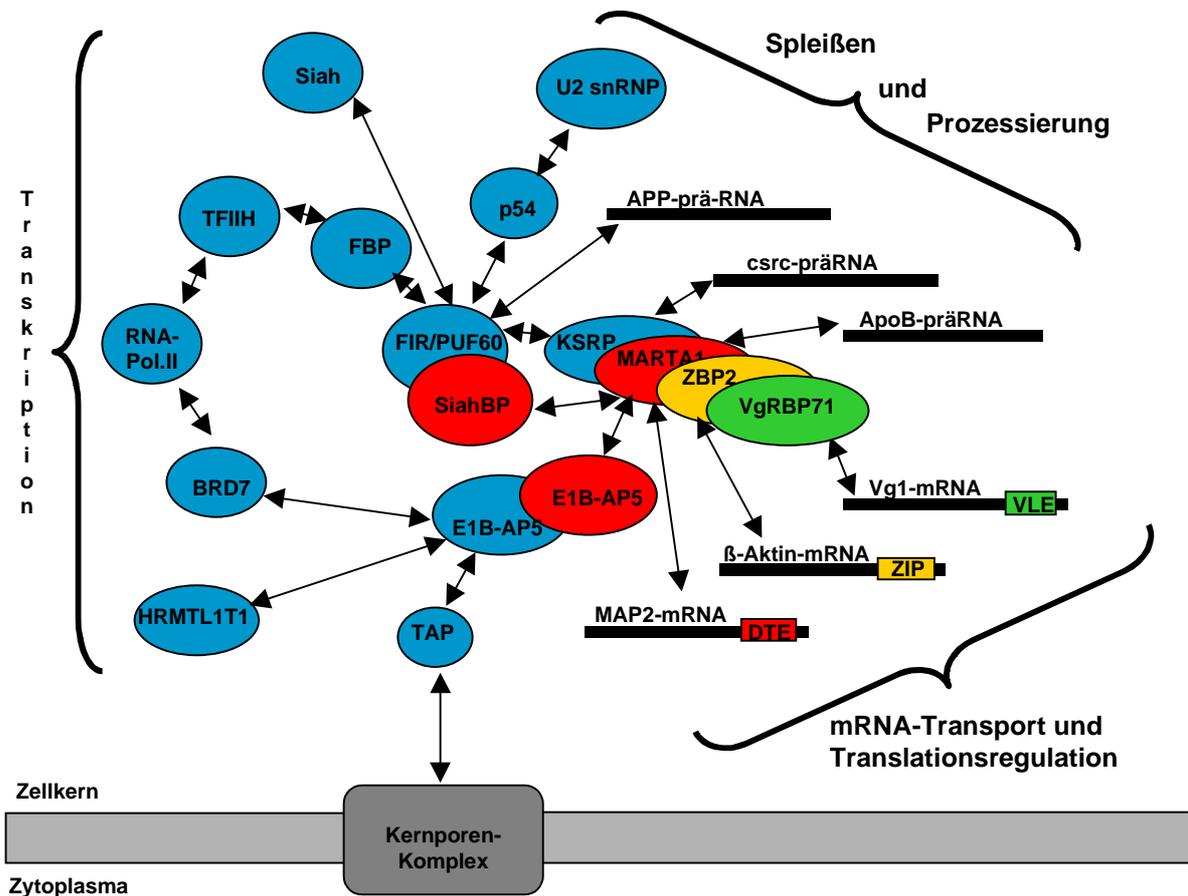


Abb.29: Die mögliche Funktion von MARTA1

Schematisch dargestellt sind MARTA1 und die dazu orthologen Proteine, sowie die identifizierten Bindungspartner. Orthologe Proteine sind jeweils überlappend hintereinander dargestellt. Humane Proteine erscheinen blau, Rattenproteine rot, Proteine des Huhns gelb und Xenopusproteine grün. Pfeile stellen nachgewiesene Interaktionen dar. Die sich daraus ergebenden möglichen MARTA1-Funktionen sind mit Klammern beschriftet.

Da MARTA1 offensichtlich an verschiedenen Schritten des RNA-Metabolismus beteiligt ist, könnte man sich das Protein als eine Art Mentor vorstellen, der die RNA während der verschiedenen Reifungsschritte von der Synthese bis zum Export aus dem Zellkern begleitet.

Grundsätzlich mehren sich die Hinweise darauf, daß die verschiedenen Schritte der RNA-Reifung nicht getrennt voneinander ablaufen, sondern über regulatorische, an mehreren Prozessierungsschritten beteiligte Faktoren miteinander verbunden sind (Orphanides und Reinberg, 2002). Beispielsweise wurde gezeigt, daß die carboxyterminale Domäne der RNA-Polymerase II verschiedene hnRNPs und Prozessierungsfaktoren rekrutiert (Hirose und Manley, 1998, Bentley, 1999). Dadurch wird eine effektive Koordination der Transkription, des Spleißens, des 5' *Cappings* und der Polyadenylierung der RNA ermöglicht (Barabino und Keller, 1999). Ebenso sind diese Prozessierungsschritte mit dem nukleären mRNA-Export verbunden. Dabei spielt der sogenannte EJC (Exon-Exon-Junction-Complex) eine zentrale Rolle. Dieser Proteinkomplex entsteht nach dem Spleißen an den Exon-Exon-Verbindungen der mRNA (Le *et al.*, 2000). Einige der Proteine dieses Komplexes bewegen sich zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma hin und her und scheinen die RNA aus dem Kern zu eskortieren (Kataoka *et al.*, 2000, Zhou *et al.*, 2000, Lykke-Andersen *et al.*, 2001). Ein Bestandteil dieses Komplexes, das Y14-Protein, interagiert im Zellkern mit TAP und scheint demnach direkt am mRNA-Export beteiligt zu sein. Y14 bleibt auch nach dem Kernexport an der mRNA gebunden (Kataoka *et al.*, 2000). Die EJC-Komponente Magoh (Mago homolog) interagiert sowohl mit Y14 als auch mit TAP (Kataoka *et al.*, 2001). Magoh ist damit ebenfalls direkt am mRNA-Export beteiligt. Gleichzeitig stellt es möglicherweise eine Verbindung zum zytoplasmatischen mRNA-Transport dar. Das zu Magoh orthologe Drosophila-Protein Mago nashi (japanisch für Enkelkind) wird für den Transport der oskar- und gurken-mRNA-Moleküle zum posterioren bzw. anterioren Pol der Oozyte benötigt (Micklem *et al.*, 1997, Newmark *et al.*, 1997). Eine mögliche Funktion von Y14 und Magoh könnte demnach in der Assoziation der lokalisierten mRNA-Moleküle mit dem Zytoskelett liegen.

Zum jetzigen Zeitpunkt sind verschiedene Proteine bekannt, die unterschiedliche Schritte des RNA-Metabolismus miteinander verbinden. Mit der vorliegenden Arbeit wurden neue Hinweise in Bezug auf die Funktion des MAP2-DTE-bindenden Proteins MARTA1 erbracht. Die offenbar multifunktionellen Eigenschaften des Proteins während der verschiedenen Schritte des RNA-Metabolismus weisen darauf hin, daß das Lokalisierungselement der MAP2-mRNA nicht nur die Information zur subzellulären Lokalisation des Transkripts enthält, sondern weitere Funktionen hinsichtlich der Bestimmung des RNA-Schicksals übernimmt. Inwieweit MARTA1 als zentraler Regulator an der funktionellen Verknüpfung sämtlicher RNA-Prozessierungsschritte von der Transkription im Zellkern bis zur lokalen Translation in der Zellperipherie beteiligt ist, bleibt aufzuklären.

5. Literaturverzeichnis

Asubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. and Struhl K., (1999)

Short protocols in molecular biology. Fourth Edition. *John Wiley and Sons Inc.*

Bachi A., Braun I.C., Rodrigues J.P., Pante N., Ribbek K., von Kobbe C., Kutay U., Wilm M., Gorlich D., Carmo-Fonseca M. and Izaurralde E. (2000)

The C-terminal domain of TAP interacts with the nuclear pore complex and promotes export of specific CTE-bearing RNA-substrates. *RNA*. 6, 136 – 158

Barbarino S.M. and Keller W. (1999)

Last but not least: regulated poly(A) tail formation. *Cell*. 99, 9 – 11

Bassel G.J., Oleynikov Y. and Singer R.H. (1999)

The travels of mRNAs through all cells large and small. *FASEB*. 13 (3), 447 – 454

Bassel G.J., Zhang H., Byrd A.L., Femino A.M., Singer R.H., Taneja K.L., Lifshitz L.M., Herman I.M. and Kosik K.S. (1998)

Sorting of beta-actin mRNA and protein to neurites and growth cones in culture.

1.1 *J Neuroscience*. 18 (1), 251 – 165

Bentley D. (1999)

Coupling RNA polymerase II transcription with pre-mRNA processing.

Curr Opin Cell Biol. 11, 347 – 351

Blichenberg A., Rehbein M., Müller R., Garner C.C., Richter D. and Kindler S. (2001)

Identification of a *cis*-acting dendritic targeting element in the mRNA encoding the alpha subunit of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Neurosci*. 13, 1881 – 1888

Blichenberg A., Schwanke B., Rehbein M., Garner C.C., Richter D. and Kindler S. (1999)

Identification of a *cis*-acting targeting element in MAP2 mRNAs.

J Neurosci. 19 (20), 8818 – 8829

Bloch B., Guitteny A.F., Normand E. and Chouham S. (1990)

Presence of neuropeptide messenger RNAs in neuronal Processes.

Neurosci Lett. 109, 259 – 264

Brugg B. and Matus A. (1991)

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

Carson J.H., Worboys K., Ainger K. and Barbarese E. (1997)

Translocation of myelin basic protein mRNA in oligodendrocytes requires microtubules and kinesin. *Cell Motil Cytoskeleton*. 38 (4), 318 – 328

Carlier M.F. (1991)

Actin: protein structure and filament dynamics. *J Biol Chemistry*. 266 (1), 1 – 4

Chen T., Damaj B.B., Herrera C., Lasko P. and Richard S. (1997)

Self-association of the single-KH-domain family members Sam68, GRP33, GLD-1 and Ok1: role of the KH domain. *Mol Cell Biol.* 17 (10), 5707 – 5718

Cooper J.A. (1991)

The role of actin polymerization in cell mobility. *Annu Rev Physiol.* 53, 585 – 605

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

A xenopus protein related to hnRNP I has a role in cytoplasmic RNA localization. *Mol Cell.* 4, 431 – 437

Crino P.B. and Eberwine J. (1996)

Molecular Characterization of the Dendritic Growth Cone: Regulated mRNA Transport and Local Protein Synthesis. *Neuron.* 17, 1173 – 1187

Davis-Smyth, Terri, Duncans Robert C., Zheng Tian, Michelotti Gregory and Levens David (1996)

The Far Upstream Element-binding Proteins Comprise an Ancient Family of Single-strand DNA-binding Transactivators. *JBC.* 271, 49, 31679 – 31687

Darnell J.C., Jensen K.B., Jin P., Brown V., Warren S.T. and Darnell R.B. (2001)

Fragile X Mental Retardation Protein Targets G Quartet mRNAs Important for Neuronal Function. *Cell.* 107, 489 – 499

Deshler J.O., Highett M.I. and Schnapp B.J. (1997)

Localization of Xenopus Vg1 mRNA by Vera protein and the endoplasmic reticulum. *Science.* 276, 1128 - 1131

Dickson B.J. (1998)

Photoreceptor development: Breaking down the barriers. *Curr Biol.* 8: R90 – R92

Duchaine T.F., Hemraj I., Furic L., Deitinghoff A., Kiebler M.A. and DesGroseillers L.(2002)

Staufen 2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles. *J Cell Science.* 115, 3285 – 3295

Duncan R., Bazar L., Michelotti G., Tomonaga T., Krutzsch H., Avigan M. and Levens D. (1994)

A sequence-specific, single strand binding protein activates the far upstream element of c-myc and defines a new DNA-binding motif. *Genes and Development.* 8, 465 – 480

Duncan R., Collins I., Tomonaga T., Zheng T. and Levens (1996)

A unique transactivation sequence motif is found in the carboxyterminal domain of the single-strand-binding protein FBP. *Mol. Cell Biol.* 16, 2274 - 2282

Dundr M. and Misteli T. (2001)

Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem J.* 356, 297 – 310

EI-Husseini A. E., and Vincent S.R. (1999)

Cloning and Characterization of a Novel RING Finger Protein That interacts with Class V Myosins. *JBC.* 274, 28, 19771 – 19777

Ferrandon D., Elphick L., Nüsslein-Volhard C. und St Johnston D. (1994)

Staufen protein associates with the 3'UTR of bicoid mRNA to form particles that move in microtubule-dependent manner. *Cell.* 79 (7), 1221 – 1232

Furuichi T., Simon-Chazottes D., Fujino I., Yamada N., Hasegawa M., Miyawaki A., Yoshikawa S., Guenet J.L. and Mikoshiba K., (1993)

Widespread expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type gene (Insp3r1) in the mouse central nervous system. *Receptors Channels*. 1 (1), 11 – 24

Gabler S., Schütt H., Groitl P., Wolf H., Shenk T. and Dobner T. (1998)

E1B 55-Kilodalton-Associated Protein: a Cellular Protein with RNA-Binding Activity Implicated in Nucleocytoplasmic Transport of Adenovirus and Cellular mRNAs. *Journal of Virology*. 72, 10, 7960 – 7971

Gardiol A., Racca C. and Triller A. (1999)

Dendritic and postsynaptic protein synthetic machinery. *J Neuroscience*. 19 (1), 168 – 179

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

Selective localization of messenger RNA for cytoskeletal protein MAP2 in dendrites. *Nature*. 336 (6200), 674 – 677

Gautreau D., Cote C.A. and Mowry K.L. (1997)

Two copies of a subelement from the Vg1 RNA localization sequence are sufficient to direct vegetal localization in *Xenopus* oocytes. *Development*. 124, 5013 – 5020

Ghisolfi L., Kharrat A., Joseph G., Amalric F. and 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.

1.2 *Eur J Biochem*. 209 (2), 541 – 548

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

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

Hachet O. and Ephrussi A. (2001)

Drosophila Y14 shuttles to the posterior of the oocyte and is required for oskar mRNA transport. *Curr. Biol*. 11, 1666 – 1674

He L., Liu J., Collins I., Sanford S., O'Connell B., Benham C.J. and Levens D. (2000)

Loss of FBP function arrests cellular proliferation and extinguishes c-myc expression. *EMBO*. 19 (5), 1034 – 1044

He L., Weber A., Levens D. (2000)

Nuclear targeting determinants of the far upstream element binding protein, a c-myc transcription factor. *Nucleic Acids Research*. Vol.28 No.22, 4558 – 4565

Hirose Y and Manley J.L. (1998)

RNA polymerase II is an essential mRNA polyadenylation factor. *Nature*. 395, 93 – 96

Hoek K.S., Kidd G.J., Carson J.H. and Smith R. (1998)

hnRNP A2 selectively binds the cytoplasmic transport sequence of myelin basic protein mRNA. *Biochemistry*. 37, 7021 – 7029

Hu G., Chung Y.L., Glover T., Valentine V., Look A.T. and Fearon E.R. (1997)

Characterization of human homologues of the *Drosophila* seven in absentia (sina) gene. *Genomics*. 15; 46(1), 103 – 111

Huang Y-S., Carson J.H., Barbarese E. and Richter J.D. (2003)

Facilitation of dendritic mRNA transport by CPEB. *Genes and Development*. 17, 638 – 653

- Itoh T.J., Hisanaga S., Hosoi T., Kishimoto T. and Hotani H. (1997)**
Phosphorylation states of microtubule-associated protein 2 (MAP2) determine the regulatory role of MAP2 in microtubule dynamics. *Biochemistry*. 36 (41), 12574 – 12582
- Jansen R. P. (1999)**
RNA-cytoskeletal associations. *FASEB*. 13 (3), 455 – 466
- Kataoka N., yong J., Kim V.N., Velazquez F., Perkinson R.A., Wang F. and Dreyfuss G. (2000)**
Pre-mRNA splicing imprints mRNA in the nucleus with a novel RNA-binding protein that persists in the cytoplasm. *Mol Cell*. 6, 673 – 682
- Kandel E.R. Schwartz J.H. and Jessel T.M. (2000)**
Principles of Neural Sciences, Fourth Edition *McGraw-Hill*
- Kennedy M.B. (2000)**
Signal-processing machines at the postsynaptic density. *Science*. 290 (5492), 750 – 754
- Kessler D.S. and Melton D.A. (1994)**
Vertebrate Embryonic Induction: Mesodermal and Neural Patterning. *Science*. 266, 596 – 604
- Kiebler M., Hemraj I., Verkade P., Kohrmann M., Fortes P., Marion R.M., Ortin J. and Dotti C.G. (1999)**
The mammalian stau1 protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport. *J Neuroscience*. 19 (1), 288 – 297
- Kliedjian M. and Dreyfuss G. (1992)**
Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding through RGG box. *EMBO*. 11 (7), 2655 – 2664
- Kim J.H. und Haganir R.I. (1999)**
Organization and regulation of proteins at synapses. *Curr Opin Cell Biol*. 11 (2), 248 – 254
- Kindler S., Mohr E. and Richter D. (1997)**
Quo vadis: extrasomatic targeting of neuronal mRNAs in mammals. *Mol Cell Endocrinol*. 128 (1 – 2), 7 – 10
- Kindler S. and Monshausen (2002)**
Candidate RNA-binding proteins regulating extrasomatic mRNA targeting and translation in mammalian neurons. *Mol Neurobiol*. 25 (2), 149 – 156
- Knowles R.B., Sabry J.H., Martone M.E., Deerinck T.J., Ellisman M.H., Bassel G.J. and Kosik K.S. (1996)**
Translocation of RNA granules in living neurons. *J Neuroscience*. 16 (24), 7812 – 7820
- Köhrmann M., Luo M., Kaether C., DesGroseillers L., Dotti C.G. and Kiebler M. (1999)**
Microtubule-dependent recruitment of Stau1-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons. *Mol Cell Biol*. 10 (9), 2945 – 2953
- Kolev N.G. and Huber P.W. (2003)**
VgRBP71 Stimulates Cleavage at a Polyadenylation Signal in Vg1 mRNA, Resulting in the Removal of a cis-Acting Element that Represses Translation. *Mol Cell*. 11, 745 – 755

Krecic A.M. and Swanson M.S. (1999)

hnRNP complexes: composition, structure, and function. *Curr Opin Biol.* 11, 363 – 371

Krichevsky A.M. and Kosik K.S. (2001)

Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation-dependent translation. *Neuron.* 32 (4), 683 – 696

Kroll Todd T., Zhao Wie-meng, Jiang Can and Huber Paul W. (2002)

A homolog of FBP2/KSRP binds to localized mRNAs in *Xenopus* oocytes. *Development.* 129, 5609 – 5619

Kuhl D. and Skehel P. (1998)

Dendritic localization of mRNAs. *Curr Opin Neurobiol.* 8 (5), 600 – 606

Kzhyshkowska J., Schütt H., Liss M., Kremmer E., Stauber R., Wolf H. and Dobner T. (2001)

Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1B-AP5 is methylated in its Arg-Gly-Gly (RGG)-Box and interacts with human arginine methyltransferase HRMT1L1. *Biochem J.* 358, 305 – 314

Kzhyshkowska J., Rusch A., Wolf H. and Dobner T. (2002)

Regulation of transcription by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1B-AP5 is mediated by complex formation with the novel bromodomain containing protein BRD7. *Biochem J.*

Lall S., Francis-Lang H., Flament A., Norvell A., Schupbach T. and Ish-Horowicz D. (1999)

Squid hnRNP protein promotes apical cytoplasmic transport and localization of *Drosophila* pair-rule transcripts. *Cell.* 98, 171 – 180

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

Intracellular localization of messenger RNAs for cytoskeletal proteins. *Cell.* 45 (3), 407 – 415

Le Hir H., Gatfield D., Braun I.C., Forler D. and Izaurralde E. (2001)

The protein Magoh provides a link between splicing and mRNA localization. *EMBO Rep.* 2, 1119 – 1124

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

Pre-mRNA splicing alters mRNA composition: evidence for stable association of proteins at exon-exon junctions. *Genes Dev.* 14, 1098 – 1108

Lellek H., Kirsten R., Diehl I., Apostel F., Buck F. and Greeve J. (2000)

Purification and Molecular Cloning of a Novel Essential Component of the Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme-Complex. *J Biol Chemistry.* 275 (26), 19848 – 19856

Lellek H., Welker S., Diehl I., Kirsten R. and Greeve J. (2002)

Reconstitution of mRNA Editing in Yeast Using a Gal4-ApoB-Gal80 Fusion Transcript as the Selectable Marker. *J Biol Chemistry.* 277 (26), 23638 – 23644

Leppard K.N. and Shenk T. (1989)

The adenovirus E1B 55 kd protein influences mRNA-Transport via an intranuclear effect on RNA metabolism. *EMBO.* 8, 2329 - 2336

Li P., Yang X., Wasser M., Cai Y. and Chia W. (1997)

Inscuteable and Staufen Mediate Asymmetric Localization and Segregation of *prospero* RNA during *Drosophila* Neuroblast Cell Divisions *Cell.* 90, 437 – 447

Link W., Konietzko U., Kauselmann G., Krug M., Schwanke B., Frey U. and Kuhl D. (1995)

Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92 (12), 5734 – 5738

Lisman J., Malenka R.C., Nicoll R.A. and Malinow R. (1997)

Learning mechanisms :the case for CaM-KII. *Science.* 276 (5321), 2001 – 2002

Liu J., Akoulitchev S., Weber A., Ge H., Chuikov S., Libutti D., Wang X.W., Conaway J.W., Harris C.C., Connaway R.C., Reinberg D. and Levens D. (2001)

Defective Interplay of Activators and Repressors with TFIIH in Xeroderma Pigmentosum. *Cell.* 104, 353 – 363

Liu J., He L., Collins I., Ge H., Libutti D., Li J., and Levens D. (2000)

The FBP interacting repressor targets TFIIH to inhibit activated transcription. *Mol.Cell.* 5, 331 – 341

Lodish H., Baltimore D., Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P. and Darnell J. (1996)

Molekulare Zellbiologie, 2. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin – New York

Lyford G.L., Yamagata K., Kaufmann W.E., Barens C.A., Sanders L.K., Copeland N.G., Gilbert D.J., Jenkins N.A., Lanahan A.A. and 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 – 445

Lykke-Andersen L., Shu M.D. and Steitz J.A. (2001)

Communication of the position of exon-exon junctions to the mRNA surveillance machinery by the protein RNPS1. *Science.*293, 1836 – 1839

Mallardo M., Deitinghoff A., Müller J., Goetze B., Macchi P., Peters C. and Kiebler M.A. (2003)

Isolation and characterization of Staufin-containing ribonucleoprotein particles from rat brain. *PNAS.* 100 (4), 2100 – 2105

Mandelkow E. and Mandelkow E.M. (1995)

Microtubules and Microtubules-associated proteins. *Curr. Opin Cell Biol.* 7: 72 – 81

Marion R.M., Fortes P., Beloso A., Dotti C. and Ortin J. (1999)

A human sequence homologue of Staufin is an RNA-binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum.

Mol Cell Biol. 19 (3), 2212 – 2219

Martinez J., Patkaniowska A., Urlaub H., Lührmann R and Tuschl T. (2002)

Single-stranded antisense si RNAs guide target RNA cleavage RNAi.

Cell. 110 (5), 563 – 574

Mayford M., Wang J., Kandel E.R. and 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., Dasgupta R., Ellioth H., Gergely F., Davidson C., Brand A., Gonzalez-Reyes A. and St Johnston D. (1997)

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

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

Distinct roles of two conserved Staufen domains in oskar mRNA Localization and translation. *EMBO*. 19 (6), 1366 – 1377

Min Hosung, Turck Christoph W., Nikolic Julia M. and Black Douglas L. (1997)

A new regulatory protein, KSRP, mediates exon inclusion through an intronic splicing enhancer. *Genes and Development*. 11, 1023 – 1036

Misreli T (2000)

Cell Biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function. *J. Cell. Science*. 113, 1841 - 1849

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

On the nature and differential distribution of mRNAs in hippocampal neurites: implications for neuronal functioning. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, (23), 10800 – 10804

Mohr E. and Richter D. (2001)

Messenger RNA on the move: implications for cell polarity. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 33, 669 – 679

Mohr E., Morris J.F. and Richter D. (1995)

Differential subcellular mRNA targeting: depletion of a single nucleotide prevents the transport to axons but not to dendrites of rat hypothalamic magnocellular neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 4377 – 4381

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

Vasopressin mRNA localization in nerve cells: Characterization of cis-acting elements and trans-acting factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 7072 – 7079

Monshausen M., Putz U., Rehbein M., Schweizer M., DesGoseillers L., Kuhl D., Richter D. and Kindler S. (2001)

Two rat brain Staufen isoforms differentially bind RNA. *J Neurochemistry*. 76, 155 – 165

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

Two cis-acting elements in the 3' untranslated region of α -CaMKII regulate its dendritic targeting. *Nature neuroscience*. 3 (11), 1079 – 1084

Mowry K.L. and Cote C.A. (1999)

RNA sorting in *Xenopus* oocytes and embryos. *FASEB*. 13, 435 – 445

Mowry K.L. and Melton D.A. (1992)

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

Muddashetty R., Khanam T., Kondrashov A., Bundman M., Iacoangeli A., Kremerskothen J., Duning K., Barnekow A., Huttenhofer A., Tiedge H., Brosius J. (2002)

Poly(A)-binding protein is associated with neuronal BC1 and BC200 ribonucleoprotein particles. *J Mol Biol.* 16, 321 (3), 433 – 445

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

Mutational analysis of a heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 response element for RNA trafficking. *J.Biol. Chem.* 274, 34389 – 34395

Musco G., Stier G., Joseph C., Antonietta M., Morelli C. Nilges M., Gibson T.J. and Pastore A. (1996)

Three-Dimensional Structure and Stability of the KH Domain: Molecular Insights into the Fragile X Syndrome. *Cell*. 85 (2), 237 – 245

Newmark P.A. and Broswell R.E. (1994)

The mago nashi locus encodes an essential product required for germ plasm assembly in *Drosophila*. *Development*. 120, 1303 – 1313

Oleynikov Y. and Singer R.H. (1998)

RNA localization: different zipcodes, same postman? *Trends Cell Biol.* 8 (10), 381 – 383

Orphanides G. and Reinberg D. (2002)

A Unified Theory of Gene Expression. *Cell*. 108, 439 – 451

Page-McCaw P.S., Amonlirdviman K. and Sharp P.A. (1999)

PUF60: a novel U2AF65-related splicing activity. *RNA*. 5 (12), 1548 – 1560

Poleev A., Hartmann A., and Stamm S. (2000)

A trans-acting factor, isolated by the three-hybrid system, that influences alternative splicing of the amyloid precursor protein minigene. *Eur. J. Biochem.* 267, 4002 – 4010

Prakash N., Fehr S., Mohr E. and Richter D. (1997)

Dendritic localization of rat vasopressin mRNA: ultrastructural analysis and mapping of targeting elements. *Eur. J. Neurosci.* 9 (3), 523 – 532

Racca C., Gardiol A. and Triller A. (1997)

Dendritic and postsynaptic localizations of glycine receptor alpha subunit mRNAs. *J Neuroscience*. 17, 1691 – 1700

Racca C., Gardiol A. and Triller A. (1998)

Cell-specific dendritic localization of glycine receptor alpha subunit mRNAs. *Neuroscienc.* 84, 997 – 1012

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

Two trans-acting rat brain proteins, MARTA1 and -2, interact specifically with the dendritic targeting element in MAP2 mRNAs. *Mol. Brain Res.* 79, 192 – 201

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

Molecular characterization of MARTA1, a protein interacting with the dendritic targeting element of MAP2 mRNAs. *Journal of Neurochemistry*. 82, 1039 – 1046

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

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

Shamoo Y., Abdul-Manan N. and Williams K.R. (1995)

Multiple RNA binding domains (RBDs) just don't add up. *Nucleic Acids Res.* 11; 23 (5), 725 – 728

Singer R.H. (1992)

The cytoskeleton and mRNA localization. *Curr Opin Cell Biol.* 4 (1), 15 – 19

Singer R.H. (1992)

RNA zipcodes for cytoplasmic addresses. *Curr Biol.* 3, 719 – 721

Siomi H., Choi M., Siomi M.C., Nussbaum R.L. and 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: 33 - 39

Siomi H. and Dreyfuss G. (1997)

RNA-binding proteins as regulators of gene expression. *Curr Opin Genet Dev*. 7 (3), 345 – 353

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

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

Snee M., Kidd G.J., Munro T.P. and Smith R. (2002)

RNA trafficking and stabilization elements associate with multiple brain proteins. *J Cell Science*. 115, 4661 – 4669

Steward O., Falk P.M. and Torre E.R. (1996)

Ultrastructural basis for the gene expression at the synapse: synapse associated polyribosome complexes. *J Neurocytol*. 25 (12), 717 – 734

Steward O. and Halpain S. (1999)

Lamina-specific synaptic activation causes domain-specific alterations in dendritic immunostaining for MAP2 and CAM kinase II. *J Neuroscience*. 19 (18), 7834 – 7845

Steward O. and Levy W.B. (1982)

Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus. *J Neuroscience*. 2 (3), 284 – 291

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

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

Steward O., Wallace C.S., Lyford G.L. and Worley P.F. (1998)

Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron*. 21 (4), 741 – 751

Steward O. and Worley P. (2001)

Localization of mRNAs at synaptic sites on dendrites. *Results Probl Cell Differ*. 34, 1 – 26

St Johnston D. (1995)

The Intracellular Localization of Messenger RNAs. *Cell*. 81: 161 – 170

St Johnston D., Beuchle D. and Nüsslein-Volhard C. (1991)

Staufen, a gene required to localize maternal RNAs in the Drosophila egg. *Cell*. 66 (1), 51 – 63

Tang S.J., Meulemans D., Vazquez L., Colaco N. and Schuman E. (2001)

A Role for Rat Homolog of Staufen in the Transport of RNA to Neuronal dendrites. *Neuron*. 32, 463 – 475

Thiede B., Dimmler C., Siejak F. and Rudel T. (2001)

Predominant Identification of RNA-binding Proteins in Fas-induced Apoptosis by Proteome Analysis. *J Biol Chemistry*. 276 (28), 26044 – 26050

Tiedge H., Bloom F.E. and Richter D. (1999)

RNA, Whither Goest Thou? *Science*. 283, 186 – 187

Tiedge H. and Brosius J. (1996)

Translational machinery in dendrites of hippocampal neurons in culture.
2.1 J Neuroscience. 16 (22), 7171 – 7181

Tiedge H., Chen W. and Brosius J. (1993)

Primary structure, neural-specific expression, and dendritic localization of human BC200 RNA. *J Neuroscience*. 13 (6), 2382 – 2390

Tiedge H., Fremeau R.T.Jr., Weinstock P.H., Aranico O. and Brosius J. (1991)

Dendritic localization of neural BC1 RNA. *Proc. Natl. Acad Sci*. 88 (6), 2093 – 2097

Torre E.R. and 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 Neuroscience. 12 (3), 762 – 772

Torre E.R. and Steward O. (1996)

Protein synthesis within dendrites: glycosylation of newly synthesized proteins in dendrites of hippocampal neurons in culture. *J Neuroscience*. 16 (19), 5967 – 5978

Tucker R.P., Garner C.C. and Matus A. (1989)

In situ localization of microtubule-associated protein mRNA in the developing and adult rat brain. *Neuron*. 2 (3), 1245 – 1256

Vale R.D., Banker G. and Hall Z.W. (1992)

Neuronal polarity and specialized domains. in: An introduction to molecular neurobiology.
Hall, Z.W (ed)., Sunderland, MA, Sinauer associates, 270 - 279

Walikonis R. S., Jensen O.N., Mann M., Provance D.W.Jr., Mercer J.A. and Kennedy M.B. (2000)

Identification of proteins in the postsynaptic density fraction by mass spectrometry.
J Neuroscience. 20 (11), 4069 – 4080

Wallace C.S., Lyford G.L., Worley P.F. and Steward O. (1998)

Differential intracellular sorting of immediate early gene mRNAs depends on signals in the mRNA sequence. *J Neurosci*. 18 (1), 26 – 35

Wang H., Iacoangeli A., Popp S., Muslimov I.A., Imataka H., Sonenberg N., Lomakin B. and Tiedke H. (2002)

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

Wells D.G., Richter J.D. and Fallon J.R. (2000)

Molecular mechanisms for activity-regulated protein synthesis in synapto-dendritic compartment. *Curr Opin Neurobiol*. 10, 132 – 137

Wickham L., Duchaine T., Luo M., Nabi I.R. and DesGroseillers L. (1999)

Mammalian stau1 is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol*. 19 (3), 2220 – 2230

Wie Gu, Feng Pan, Honglai Zhang, Gary J. Bassell and Robert H. Singer (2002)

A predominantly nuclear protein affecting cytoplasmic localization of β -Actin mRNA in fibroblasts and neurons *JBC*. 156, 1, 41 – 51

Xing Y., Johnson C.V., Moen P.T., McNeil J.A. and Lawrence J.B. (1995)

Nonrandom gene organization: Structural arrangements of specific pre-mRNA transcription and splicing with SC-35 domains. *J. Cell Biol.*, 131, 1635 - 1647

Zalfa F., Giorgi M., Primerano B., Moro A., Di Penta A., Reis S., Oostra B. and Bagni C. (2003)

The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses. *Cell*. 112 (3), 317 – 327

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

Neurotrophin-induced transport of beta-actin mRNP complex increases beta-actin levels and stimulates growth cone motility. *Neuron*. 31 (2), 261 – 275

Zhou Z., Luo M.J., Straesser K., Katahira J., Hurt E. and Reed R. (2000)

The protein Aly links pre-messenger-RNA splicing to nuclear export in metazoans.

6. Zusammenfassung

Die Synthese der für die einzelnen Zellen typischen Proteine wird nicht nur durch die Funktion spezifischer Transkriptionsfaktoren, sondern auch auf posttranskriptionaler Ebene reguliert. Eine wichtige Form der posttranskriptionalen Genregulation ist die subzelluläre RNA-Lokalisation in Verbindung mit einer lokalen Proteinsynthese. Während dieses Vorgangs spielen *cis*-agierende Sequenzelemente innerhalb der transportierten RNA-Moleküle sowie daran bindende *trans*-Faktoren eine zentrale Rolle. Das Protein MARTA1 wurde als möglicher *trans*-Faktor der in Neuronen somatodendritisch lokalisierten MAP2-mRNA aus dem Gehirn adulter Ratten isoliert. Es bindet dabei spezifisch an das Dendritic Targeting Element (DTE) der RNA. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, MARTA1 als MAP2-DTE interagierendes Protein funktionell zu charakterisieren und damit einen Beitrag zur Aufklärung der posttranskriptionalen Regulation zu leisten.

Durch RT-PCR wurde die MARTA1-cDNA-Sequenz aus dem Gehirn adulter Ratten amplifiziert, kloniert und analysiert. MARTA1 zeigt hohe Sequenzidentitäten zu den Mitgliedern der FBP-Familie. Diese Proteine sind an unterschiedlichen Schritten des RNA-Metabolismus, wie zum Beispiel Transkription, Prozessierung, subzellulärer Transport oder lokale Translationskontrolle, beteiligt. Alle Mitglieder der FBP-Familie besitzen in ihrer zentralen Region vier KH-Domänen. Durch UV-Quervernetzungs-Analysen wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, daß diese Domänen bei MARTA1 für die spezifische Interaktion mit dem MAP2-DTE verantwortlich sind. In verschiedenen Zellsystemen ist MARTA1 in granulärer Form im Zellkern verteilt. Es besitzt ein klassisches Kernlokalisierungssignal im aminoterminalen Bereich sowie je ein unkonventionelles Signal im zentralen und carboxyterminalen Bereich. Außerdem kommen in der MARTA1-Sequenz Motive mit Transkriptions-Aktivierungspotential vor.

Mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems wurden die MARTA1-Interaktionspartner E1B-AP5 und SiahBP identifiziert. Untersuchungen zur Kolo-kalisation der Interaktionspartner sowie Koimmunpräzipitationen rekombinanter und endogener Proteine bestätigten die Spezifität der Interaktionen. Mittels Untersuchungen in Hefe-Zellen wurde gezeigt, daß sowohl E1B-AP5 als auch SiahBP mit dem zentralen, die KH-Domänen enthaltenden MARTA1-Bereich interagieren. Beide Interaktionspartner sind im Zellkern an Transkriptionsprozessen beteiligt. SiahBP nimmt außerdem eine Funktion beim Spleißen wahr. E1B-AP5 scheint am Transport von RNA-Molekülen aus dem Zellkern beteiligt zu sein.

Zusammengenommen deuten die Ergebnisse dieser Arbeit auf multifunktionelle Eigenschaften von MARTA1 im RNA-Metabolismus hin. Vermutlich nimmt das Protein seine

Funktion hauptsächlich im Zellkern wahr. Eventuell begleitet MARTA1 RNA-Moleküle von ihrer Entstehung über die verschiedenen Prozessierungsschritte bis zu ihrem Export aus dem Zellkern und stellt damit eine funktionelle Verbindung verschiedener Schritte des RNA-Metabolismus dar.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. D. Richter danke ich für die Aufnahme als Doktorandin und für die Ermöglichung dieser Arbeit unter den sehr guten 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.

Besonders möchte ich mich bei Dr. S. Kindler und Dr. M. Rehbein für die sehr gute Betreuung, die vielen hilfreichen Anregungen und ihre stets offenen Ohren während der letzten drei Jahre bedanken.

Für die nette methodische Unterstützung danke ich Christiane Schröder-Birkner und Birgit Schwanke.

Dr. Marina Walden, Nicole Burhenne, Conny Brendel und allen anderen Labormitarbeitern danke ich ganz herzlich für das ausnahmslos sehr gute Arbeitsklima, die ständige Hilfsbereitschaft und besonders für unsere entspannenden „Mädchenabende“ und vieles andere innerhalb und außerhalb des Labors.

Außerdem danke ich allen Freunden aus Weißenfels, Stuttgart, Marburg, Bonn, Bratislava und Hamburg (Ihr wißt wer gemeint ist!) für die vielen aufmunternden Gespräche, Telefonate, Briefe und SMSs während der Endphase.

Christian, Dir danke ich für alles was Du für mich getan hast, besonders für Deine positive Einstellung und ständige Aufmunterung.

Mein liebstes Dankeschön gilt meinen Eltern, meinem Bruder Jojo und meinen Omas Elli und Erika, ohne deren Unterstützung während meines Studiums sowie der Promotion vieles nicht möglich gewesen wäre. Ihr habt mir immer den nötigen Rückhalt gegeben!

Wissenschaftlicher Werdegang

Konstanze Wege, geboren am 25.04.1976 in Weißenfels

07/1994	Abitur am Goethe-Gymnasium in Weißenfels
10/1994 – 12/1999	Studium der Humanbiologie an der Philipps-Universität in Marburg
10/1994 – 10/1996	Grundstudium
10/1996	Vordiplom in den Fächern Physik, Chemie, Zoologie, Anatomie/Histologie, Biochemie und Physiologie
10/1996 – 10/1998	Hauptstudium mit dem Hauptfach Zellbiologie und den Nebenfächern Molekularbiologie, Immunologie und Biochemie
11/1997 – 12/1997	Praktikum am Max-Planck-Institut für Zellphysiologie in Bad Nauheim
10/1998 – 08/1999	Diplomarbeit am Institut für Zytobiologie und Zytopathologie des Universitäts-Klinikums Marburg Betreuung durch Prof. Dr. H.-F. Kern Thema: „Charakterisierung des Zymogengranulaproteins Lithostatin des Rattenpankreas“
12/1999	Diplom mit den Prüfungsfächern Zellbiologie, Molekularbiologie und Biochemie
01/2000 – 07/2003	Promotion am Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie des Universitätskrankenhauses Eppendorf in Hamburg Betreuung durch Prof. Dr. D. Richter Thema: „Charakterisierung des MAP2-mRNA-Bindungsproteins MARTA1 aus dem Gehirn von <i>Rattus norvegicus</i> (Berkenhout, 1769)“