Funktionelle Analyse dendritischer mRNA-Bindeproteine und ihre Bedeutung für die postsynaptische Dichte exzitatorischer Synapsen

Dissertation

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

vorgelegt von

Margarete Bamann

aus Bremen

Hamburg 2013

Genehmigt vom Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg auf Antrag von Priv.-Doz. Dr. H.-J. KREIENKAMP Weiterer Gutachter der Dissertation: Professor Dr. T. BURMESTER Tag der Disputation: 29. November 2013

Hamburg, den 14. November 2013

Professor Dr. C. Lohr Vorsitzender des Fach-Promotionsausschusses Biologie

INHALT

1	EINL	EITUNG	6		
1.1	Synaptische Plastizität und die postsynaptische Dichte exzitatorischer Synapsen				
1.2	Dendritischer mRNA-Transport				
1.3	Dendr	itisch lokalisierte mRNA-Bindeproteine	13		
1.5	Ziel de	er Arbeit	15		
2	МАТ	ERIAL UND METHODEN	16		
2.1	Materi	al	16		
	2.1.1	Chemikalien, Medien, Enzyme	16		
	2.1.2	Zusammensetzung von Puffern, Lösungen und Medien	16		
	2.1.3	Bakterienstämme, Zelllinien und Tiere	18		
	2.1.4	Vektoren	19		
	2.1.5	Oligonukleotide	21		
	2.1.6	Antikörper	23		
2.2	Molek	ularbiologische Methoden	24		
	2.2.1	Polymerase Ketten Reaktion (polymerase chain reaction, PCR)	24		
	2.2.2	Restriktionsverdau und Ligation von DNA Fragmenten	25		
	2.2.3	Agarosegelelektrophorese und DNA-Isolation aus dem Gel	25		
	2.2.4	Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien	26		
	2.2.5	Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienkultur	26		
	2.2.6	DNA-Sequenzierung	27		
	2.2.7	RNA-Isolation	27		
	2.2.8	Reverse Transkriptase quantitative <i>real-time</i> PCR	27		
2.3	Zellbiologische Methoden				
	2.3.1	Kultivierung, Transfektion und Lyse von HEK293T-Zellen	28		
	2.3.2	Produktion und Aufreinigung lentiviraler Vektoren	29		
	2.3.3	Bestimmung des Titers lentiviraler Vektoren	30		
	2.3.4	Kultivierung primärer Neuronen	30		
	2.3.5	Transfektion und Transduktion von primären Neuronen	31		
	2.3.6	Immunzytochemische Färbungen primärer Neuronen (IZC)	32		
	2.3.7	Mikroskopie	32		

2.4	Proteinbiochemische Methoden				
	2.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Westernblot	33		
	2.4.2	Immunpräzipitation von RFP-Fusionsproteinen und assoziierter			
		mRNA aus primären Neuronen	34		
	2.4.3	Immunpräzipitation von DDX1 und assoziierter mRNA aus Mausgehirn	35		
3	ERG	EBNISSE	36		
3.1	Weiter	e Charakterisierung des KIF5c-assoziierten Ribonukleopartikels	36		
	3.1.1	RFP-Immunpräzipitation dendritischer mRNA-Bindeproteine	36		
	3.1.2	Immunpräzipitation dendritischer mRNA-Bindeproteine aus Mausgehirn	39		
3.2	Etablie	erung eines lentiviralen Knockdown von Proteinen			
	in hipp	oocampalen Neuronen	41		
	3.2.1	Mit dem Transfervektor pGIPZ produzierte Lentiviren transduzieren			
		keine hippocampalen Neuronen der Ratte	41		
	3.2.2	Einführung des pLVTHM Transfervektors zur Produktion von Lentiviren	42		
	3.2.3	Knockdown von Staufen2 in primären Neuronen der Ratte	46		
3.3	Analyse dendritischer mRNA-Bindeproteine mittels lentiviralem Knockdown				
	in hipp	oocampalen Neuronen der Ratte	48		
	3.3.1	Einfluss des Knockdown von DDX1 und Staufen2 auf Komponenten			
		des KIF5c-mRNP	48		
	3.3.2	Einfluss des Knockdown von DDX1 auf Proteine der postsynaptischen			
		Dichte exzitatorischer Synapsen	51		
	3.3.3	Einfluss des Knockdown von DDX1 auf die Expression der mRNAs			
		postsynaptischer Proteine	53		
	3.3.4	Einfluss des Knockdown von Staufen2 auf Proteine der			
		postsynaptischen Dichte	54		
	3.3.5	Einfluss des Knockdown von Staufen2 auf die Expression			
		der mRNAs postsynaptischer Proteine	56		
3.4	Funkti	onelle Analyse von Mutationen im N-terminalen Bereich von Shank3,			
	die bei Patienten mit Autismus gefunden wurden				
	3.4.1	Auswirkungen der Punktmutationen im N-terminalen Bereich			
		von Shank3 auf die postsynaptische Lokalisation des rekombinanten Proteins	57		
	3.4.2	Einfluss der Punktmutationen im N-terminalen Bereich von Shank3 auf			
		die Bildung von dendritischen Dornen in hippocampalen Neuronen	58		

4	DISKUSSION UND AUSBLICK	61
5	ZUSAMMENFASSUNG	71
6	SUMMARY	73
7	LITERATURVERZEICHNIS	75
AB	KÜRZUNGSVERZEICHNIS	86
PO	STER UND VERÖFFENTLICHUNGEN	89
DA	NKSAGUNG	90
ER	KLÄRUNG	91

1 EINLEITUNG

Ein Organismus muss die Möglichkeit haben, sich den Bedingungen seiner Umgebung anzupassen. Ein wichtiger Aspekt ist dabei die Kontrolle der Expression seiner Gene. Bei Eukaryoten kann dies auf verschiedenen Ebenen stattfinden. Die Transkription, mRNA-Prozessierung, der Transport einer mRNA aus dem Zellkern und die Translation bis hin zur Degradation einer mRNA sind Vorgänge, die kontrolliert werden können. Gerade bei asymmetrischen Zellen stellt auch der Transport einer mRNA in bestimmte Kompartimente und die lokale Translation eine Möglichkeit dar, die Proteinzusammensetzung in diesen Kompartimenten zu steuern.

Ein Beispiel für eine stark asymmetrische Zelle ist das Neuron. Aufgebaut aus einem Zellkörper (Soma), den weitverzweigten Dendriten, die bis zu 10000 Synapsen tragen können, dem Axonhügel und dem Axon, weisen diese Zellen viele verschiedene Kompartimente auf (Abb. 1-1). Diese können zum einen sehr weit entfernt vom Zellsoma liegen und benötigen zum anderen eine spezifische Zusammensetzung von Proteinen. Synapsen sind die Verbindungsstellen zwischen zwei Neuronen. Die schnelle Anpassung von Struktur und Funktion einer Synapse als Antwort auf ein Signal ist eine Grundlage von Lernvorgängen und Gedächtnisbildung. Dieses Phänomen wird synaptische Plastizität genannt (Martin *et al.,* 2000). Um einen schnellen Umbau zu ermöglichen, muss die Zelle in der Lage sein, die Proteinausstattung einzelner Synapsen selektiv zu verändern. Die lokale Translation von dendritisch lokalisierten mRNAs bietet eine Möglichkeit für die räumlich begrenzte und schnelle Bereitstellung von Proteinen (Sutton und Schuman, 2006).

Reguliert werden der Transport von Transkripten und deren lokale Translation unter anderem von mRNA-Bindeproteinen (RBPs) (Doyle und Kiebler, 2011). Eine Vielzahl von dendritischen RBPs, die in die Lokalisation von mRNAs und die lokale Translation in Neuronen involviert sind, wurden schon identifiziert, doch ist deren konkrete Funktion meist unklar.

1.1 Synaptische Plastizität und die postsynaptische Dichte exzitatorischer Synapsen

Chemische Synapsen stellen die Verbindung zwischen dem Axon und dem Dendrit zweier Neurone dar und dienen der Reizweiterleitung im zentralen Nervensystem. Sie bestehen aus einer präsynaptischen und einer postsynaptischen Membran. Getrennt werden die Membranen durch einen 10–20 nm breiten synaptischen Spalt (Bear *et al.*, 2012, Abb. 1-1). Gray klassifizierte 1959 die Synapsen in zwei Gruppen. Die Gruppe I weist an der postsynaptischen Membran eine Verdickung auf, die später als postsynaptische Dichte (PSD) bezeichnet wurde (Akert *et al.*, 1969). Die Gruppe II zeigt eine

weniger stark ausgeprägte Verdickung an der postsynaptischen Membran. Spätere Studien zeigten, dass es sich bei der Gruppe I um exzitatorische Synapsen handelt, die den Transmitter Glutamat nutzen, bei der Gruppe II um inhibitorische Synapsen, die GABA (γ-Aminobuttersäure) und Glycin als Transmitter nutzen (Peters *et al.*, 1991). Demnach ist die PSD ein Bestandteil von exzitatorischen Synapsen. Die Mehrheit dieser Synapsen liegt bei pyramidalen Neuronen des Hippocampus an Ausstülpungen der Dendriten, den dendritischen Dornen (Harris und Stevens, 1989, Abb. 1-1).



Abb. 1-1 Schematische Darstellung eines Neuron Vergrößert dargestellt ist eine exzitatorische Synapse, die an dendritischen Dornen liegt. Unter der postsynaptischen Membran ist die postsynaptische Dichte (PSD) angedeutet.

Die PSD ist ein Netzwerk aus bis zu mehreren 100 Proteinen, die den unterschiedlichsten Proteinklassen angehören. Neben membranständigen Rezeptoren und Kanälen sowie Zelladhäsionsproteinen liegen direkt unter der Membran Adaptor- und Gerüstproteine, die über verschiedene Proteinbindedomänen untereinander ein Netzwerk aufbauen und so eine Plattform für die Integration weiterer Proteine in die PSD bilden (Abb. 1-2). So sind auch kleine G-Proteine und Signalmoleküle wie Kinasen und Phosphatasen in der PSD zu finden. Im unteren Bereich des dendritischen Dorn befinden sich Proteine des Zytoskeletts (Klauck and Scott, 1995; Ziff, 1997; Kennedy, 2000; Husi *et al.*, 2000; Sheng, 2001).

In der postsynaptischen Membran sind sowohl ionotrope als auch metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluR) zu finden. Die ionotropen Glutamatrezeptoren werden hinsichtlich ihrer Antagonisten bzw. Agonisten in die Gruppen der NMDA- (*N-methyl-D*- aspartic acid), AMPA- (*a-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*) und Kainat-Rezeptoren unterteilt, die sich in Aufbau, Funktion und Ionendurchlässigkeit unterscheiden. Dabei kommen NMDA- und AMPA-Rezeptoren am häufigsten vor (Nakanishi *et al.*, 1992; Hollmann und Heinemann, 1994). Durch die Transmitterbindung an die Rezeptoren erfolgt die Öffnung eines Ionenkanals und damit der direkte Einstrom von Kationen, wodurch die Membran depolarisiert wird (exzitatorisches postsynaptisches Potential, EPSP). Die Summierung aller exzitatorischen und inhibitorischen postsynaptischen Potentiale erfolgt am Axonhügel, an dem bei der Überschreitung eines Schwellenwerts ein Aktionspotential ausgelöst werden kann. Dies führt zur Signalweiterleitung an andere neuronale Zellen (Kandel *et al.*, 2000).

Synapsen sind extrem dynamische Strukturen und können je nach ihrer Aktivität langfristige Veränderungen der Effizienz der Reizweiterleitung vornehmen. Dieses Phänomen wird synaptische Plastizität genannt und ist wahrscheinlich die Grundlage von Lernvorgängen und Gedächtnisbildung in Säugern (Martin *et al.,* 2000). Die am meisten untersuchten Modelle der synaptischen Plastizität sind die Mechanismen der LTP (*Long-term-potentiation*) und der LTD (*Long-term-depression*). Die LTP führt dabei zu einer Verstärkung der synaptischen Effizienz, die LTD dagegen zu einer Verminderung oder zum Verlust (Bear und Abraham, 1996; Malenka und Nicoll, 1999). Auf der postsynaptischen Seite kann bei diesen Prozessen die Veränderung der PSD eine Rolle spielen.

Die NMDA-Rezeptoren sind sowohl in den Prozess der LTP als auch in den der LTD in pyramidalen Neuronen des Hippocampus involviert. Eine niedrig frequentierte Stimulation der NMDA-Rezeptoren über einen längeren Zeitraum führt zur LTD (NMDAR-LTD), während eine erhöhte Stimulationsfrequenz in einem kürzeren Zeitraum zur LTP (NMDAR-LTP) führt (Malenka, 1994). In beiden Fällen hat der Mechanismus Einfluss auf die Menge der AMPA-Rezeptoren in der postsynaptischen Membran. Dabei sorgt die NMDAR-LTP für einen vermehrten Einbau von AMPA-Rezeptoren und die NMDAR-LTD führt zu verstärkter Endozytose der AMPA-Rezeptoren (Collingridge et al., 2004; Derkach et al., 2007). AMPA-Rezeptoren sind Tetramere bestehend aus vier Untereinheiten (GluR1-GluR4). Die Zusammensetzung im Hippocampus umfasst die GluR2 Untereinheit und entweder GluR1 oder GluR3 Untereinheiten. Obwohl die Untereinheiten homolog sind, beeinflusst die Zusammensetzung die Funktionen und den Transport der AMPA-Rezeptoren (Malinow und Malenka, 2002; Collingridge et al., 2004). Auch die metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR) haben Einfluss auf die synaptische Plastizität, indem sie eine vom NMDA-Rezeptor unabhängige LTD auslösen können. Die mGluR sind G-Proteingekoppelte Rezeptoren und entsprechend ihrer Ligandenspezifität und nachgeschalteten Signalkaskade in drei Gruppen unterteilt (Nieswender et al., 2010). Sie leiten über verschiedene Signalkaskaden das einkommende Signal in die Zelle weiter, was letztendlich die Ausschüttung von

second messenger zur Folge hat und die synaptische Reizweiterleitung modulieren kann (Kim *et al.*, 2008; Gladding *et al.*, 2009). Die mGluR Gruppe I, zu der mGluR1 und mGluR5 gehören, sind an das G-Protein G_q gekoppelt und aktivieren auf eine Stimulation hin die Phospholipase C (PLC) (Ferraguti *et al.*, 2008). Darüber können mehrere Signalkaskaden aktiviert werden, darunter die der MAP-Kinasen und der CaM-Kinase, was letztendlich die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie CREB und NF-k-B zur Folge hat. Die dadurch hochregulierten Zielgene kodieren für Proteine, die wiederum in die Regulation der LTD involviert sind (Wang und Zhuo, 2012).



Abb. 1-2: Schematische Darstellung von Proteinen der postsynaptischen Dichte Dargestellt ist das Netzwerk der Proteine der PSD nach Sheng und Hoogenraad (2007). Für PSD-95 sind die Domänen aufgeführt. H: Homer; RTKs: Rezeptor-Tyrosin Kinasen

Die Morphologie der dendritischen Dornen wird durch die Gerüstproteine der PSD gewährleistet. Das Ausschalten oder die Überexpression von Gerüstproteinen kann die Morphologie der dendritischen Dornen und damit auch die Übertragungseffizienz der Synapsen verändern (Fortin *et al.*, 2012; Steiner *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2008). Eines der meistuntersuchten Gerüstproteine der PSD ist PSD95 (*postsynaptic density protein* 95, auch SAP90, *synapse-associated protein* 90, genannt). Es gehört zur Fami-

lie der Sap/MaGuk (Membranassoziierte Guanylatkinasen)-Proteine. Es handelt sich um ein Multidomänenprotein und weist neben der Guk (Guanylatkinase)-Domäne drei PDZ (PSD-95/Dlg/Zo-1)-Domänen und eine SH3 (Scr homolgy 3)-Domäne auf, über die es eine Vielzahl von Proteinen binden kann (Abb. 1-2). Mit zwei der PDZ-Domänen bindet es unter anderem die NR2-Untereinheiten des NMDA-Rezeptors (Kornau et al., 1995) und über Stargazin indirekt die AMPA-Rezeptoren (Keith und El-Husseini, 2008). Mit der SH3- und der GuK-Domäne werden vor allem weitere Gerüst- und Signalproteine gebunden. Über die Proteine der Sapap/Gkap-Familie (SAP90-associated protein, Sapap1-4/Guanylate-kinase-associated protein) ist PSD95 mit den Hauptgerüstproteinen der PSD, den Shank-Proteinen verbunden (Shank1-3, Boeckers et al., 1999b; Sheng und Kim, 2000). Diese stehen im Zusammenhang mit verschiedenen neurologischen Erkrankungen beim Menschen wie Schizophrenie, Autismus und Alzheimer (Grabrucker et al., 2011; Grant, 2012). Alle drei Shank-Proteine werden in zum Teil überlappenden Bereichen des Gehirns von Säugern exprimiert (Boeckers et al., 2004). Shank-Proteine sind wie PSD95 Multidomänenproteine, die eine N-terminale ARR (ankyrin repeat region), eine SH3-Domäne, eine PDZ-Domäne, eine prolinreiche Region und eine C-terminale SAM (sterile alpha motif)-Domäne aufweisen. Über diese Domänen interagieren die Shank-Proteine sowohl mit anderen Proteinen als auch mit sich selbst und bilden so ein großes Netzwerk (Boeckers et al., 1999a; Baron et al., 2006). Die Interaktion mit dem Protein Homer verbindet die Shank-Proteine mit den mGluR. Das Protein IRSp53 (Insulinrezeptor-Substrat von 53 kDa) ist auch ein Gerüstprotein und bindet an die prolinreiche Region der Shank-Proteine. Dadurch werden diese sowohl mit dem kleinen G-Protein cdc42 als auch mit PSD95 verbunden (Bockmann, 2002; Soltau et al., 2002; Soltau et al., 2004). Mäusen, denen IRSp53 fehlt, weisen Defizite bei Lernvorgängen auf, was darauf hindeutet, dass das Protein essentiell für diesen Vorgang ist (Sawallisch et al., 2009; Kim et al., 2009).

Die PSD sorgt für die Verankerung der membranständigen Rezeptoren und gewährleistet durch die Ausbildung des Proteinnetzwerks die Weiterleitung von eingehenden Signalen. Die hier vorgestellten Gerüstproteine bilden dabei eine dynamische Plattform, die je nach Aktivierung der Synapse verändert werden kann und somit einen wichtigen Bestandteil der synaptischen Plastizität darstellt (Renner *et al.,* 2008). Die reizabhängige Veränderung der PSD-Zusammensetzung benötigt die Bereitstellung von Proteinkomponenten. Unter anderem wird das über die dendritische Lokalisation von Transkripten und deren lokale Translation gewährleistet (Sutton und Schuman, 2006).

1.2 Dendritischer mRNA-Transport

Die Entdeckung von dendritisch lokalisierten Polyribosomen war der erste Hinweis darauf, dass die Translation von Proteinen auch außerhalb des Somas von Neuronen stattfinden kann (Steward und Levy, 1982). Unterstützt wurde diese These dadurch, dass mehrere Transkripte nicht nur im Zellkörper, sondern auch in Dendriten lokalisiert sind. Dies ließ die Vermutung zu, dass an Synapsen die Translation von Transkripten reizabhängig erfolgen kann und dass dies einen Mechanismus der synaptischen Plastizität darstellt (Sutton und Schuman, 2006). Für den dendritischen Transport von Transkripten sind neben Elementen in der mRNA selbst (*cis*-Elemente), auch Proteine nötig, die an diese Elemente binden können und so den Transport vermitteln. Nach der mRNA-Synthese wird sie mit Hilfe von Exportproteinen aus dem Zellkern transportiert, wo weitere mRNA-Bindeproteinen (RBPs) assoziieren können. Es entstehen Komplexe aus verschiedenen mRNAs und den unterschiedlichsten RBPs, sogenannte *messenger* Ribonukleopartikel (mRNPs). Diese mRNPs können mit Motorproteinen assoziieren, die den Transport über das Zytoskelett vermitteln (Abb. 1-3).



Abb. 1-3: Modell des dendritischen mRNA-Transports und der lokalen Translation Darstellung nach Bramham und Wells (2007). Der Transport wird von mRNA-Bindeproteinen vermittelt. Motorproteine transportieren die verpackten mRNAs entlang des Zytoskeletts zur Synapse, an der die Translation nach synaptischer Aktivität initiiert werden kann. RER: Rauhes endoplasmatisches Reticulum. ^{7m}G: *cap*-Struktur eines reifen Transkripts. PSD: Postsynaptische Dichte

Einleitung

Mit molekularbiologischen Methoden (PCR) konnten *in vitro* mehrere hundert Transkripte in Dendriten detektiert werden, doch wurde dies *in vivo* nur für etwa 30 davon mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungen an Gehirnschnitten für den Hippocampus oder das Cerebellum von Nagetieren bestätigt (Eberwine und Crino, 2001; Steward und Schuman, 2003). Dazu gehören unter anderem die für MAP2 (*Microtubuli associated protein* 2), die α-Untereinheit der CaMKII (Ca²⁺/Calmodulinabhängige Kinase II), Arg3.1/Arc (aktivitätsreguliertes Gen), die drei Shank-Proteine, SAPAP3, Dendrin und Jacob kodierenden mRNAs (Boeckers *et al.*, 2004; Burgin *et al.*, 1990; Garner *et al.*, 1988; Herb *et al.*, 1997; Kindler *et al.*, 2004, 2009; Link *et al.*, 1995; Lyford *et al.*, 1995; Cajigas *et al.*, 2012).

MBP (*myelin basic protein*) ist ein Protein, welches spezifisch für Oligodendrozyten, eine Population von Gliazellen im Gehirn, ist. In der 3'-UTR (untranslated region, untranslatierte Region) der MBP-mRNA wurde ein kurzes cis-Element identifiziert. Die mRNA wird in diesen Zellen nur in bestimmte Bereiche, an denen Myelisierung stattfindet, transportiert (Ainger et al., 1993). Da die Sequenz des cis-Elements von dem Protein hnRNPA2 (heterogenous nuclear ribonucleoprotein A2) gebunden wird, wurde es als hnRNPA2 response element (A2RE) bezeichnet. In einer Studie von Gao et al. (2008) wurden verschiedene in Neuronen dendritisch lokalisierte Transkripte in einem Transportpartikel nachgewiesen, welches auch das Protein hnRNPA2 enthielt. Dazu gehören die für aCamKII, Arg3.1/Arc und neurogranin kodierenden mRNAs. Diese Transkripte weisen alle ein A2RE auf und werden abhängig von diesem Element transportiert (Gao et al., 2008). Das lässt vermuten, dass der dendritische Transport von mRNAs, die das gleiche *cis*-Element aufweisen, von einer konservierten Gruppe von RBPs vermittelt wird. Es konnte auch gezeigt werden, dass der Transport einer Reporter-mRNA, welche die 3'UTR der Shank1-mRNA trägt, abhängig ist von einer 200 Basen langen Region hinter dem Stoppkodon (Boeckers et al., 2004).

mRNPs sind dynamische Strukturen, die in Zusammensetzung und Größe variieren können (Bramham und Wells, 2007). Die mRNA von MAP2 z.B. ist in Partikeln lokalisiert, die sich von denen der α CamKII unterscheiden (Tübing *et al.*, 2010). Es müssen also innerhalb eines Neurons mehrere Transportmechanismen für verschiedene mRNAs existieren. Der Transport der mRNAs kann je nach Stoffwechselweg in verschiedenen mRNPs erfolgen (Mikl *et al.*, 2011). Mit Hilfe einer Affinitätsaufreinigung über das Mikrotubuli-assoziierte Motorprotein KIF5c konnte ein mRNP isoliert und charakterisiert werden (Kanai *et al.*, 2004). Kanai *et al.* wiesen die Transkripte der α CamKII und von Arc/Arg3.1 und 42 Proteine aus den unterschiedlichsten Klassen in dem mRNP nach, darunter die Pur-Proteine (Pura/ β), die Staufen-Proteine (Stau1/2), die RNA-Helikasen DDX1, DDX3 und DDX5 und FMRP. Später konnte gezeigt werden, dass auch die Shank1-mRNA mit diesen mRNPs assoziiert ist (Falley *et al.*, 2009).

1.3 Dendritisch lokalisierte mRNA-Bindeproteine

Die mRNA-Bindeproteine, die in dem KIF5c-assoziierten mRNP (KIF5c-mRNP) identifiziert wurden, sind dendritisch lokalisiert und könnten dadurch auch Einfluss auf die Zusammensetzung der PSD und auch auf die synaptische Plastizität haben. Im Folgenden werden einige der mit dem KIF5c-mRNP assoziierten RBPs vorgestellt.

FMRP wird hauptsächlich im Gehirn exprimiert. Mutationen im für FMRP kodierenden Gen *fmr1* führen zum Verlust des Proteins und zur häufigsten Form von vererbter mentaler Retardierung beim Menschen, dem Fragilen-X-Syndrom (Bhakar *et al.*, 2012; Bassel und Warren, 2008). Die Interaktion mit mRNAs erfolgt über zwei KH-Domänen und eine RGG-Box (Darnell *et al.*, 2005). Da FMRP auch mit Polyribosomen assoziiert ist, geht man davon aus, dass es Einfluss auf die Translation der Ziel-mRNAs hat (Stefani *et al.*, 2004). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass es die Translation von Reporter-mRNAs unterdrückt. Der vermutete Mechanismus konnte erst kürzlich identifiziert werden. Demnach blockiert FMRP die Bewegung der Ribosomen während der Elongation an der mRNA und verhindert so die Translation (Darnell *et al.*, 2011). In der Arbeit von Darnell *et al.* konnten 842 Ziel-mRNAs *in vivo* nachgewiesen werden, die sowohl für Proteine der Prä- als auch der Postsynapse kodieren.

Auch Pura wurde in den KIF5c-mRNPs nachgewiesen und ist ein hochkonserviertes DNA- und mRNA-Bindeprotein, für das Funktionen in DNA-Replikation, Transkription und Translation beschrieben sind (Gallia et al., 2000; Johnson et al., 2006). Mäuse, denen Pura fehlt, entwickeln nach zwei Wochen einen starken Tremor, durch den die Tiere schnell an Gewicht verlieren. Sie weisen zudem Defizite in der Gehirnentwicklung und eine Megalenzephalie auf (Hokkanen et al., 2012). Außerdem wird die neurodegenerative Erkrankung des FXTAS (Fragiles-X-Tremor-Ataxie-Syndrom) mit Pura in Verbindung gebracht. Pura bindet an CGG (Cytosin-Guanin-Guanin)-Tripletts der fmr1-mRNA. Normalerweise sind 6-50 Wiederholungen des CGG-Tripletts in der mRNA enthalten. Die Expansion dieser CGG-Tripletts auf 50-200 wird als Prämutation bezeichnet. Die Vermehrung auf über 200 CGG-Wiederholungen führt dazu, dass die mRNA nicht mehr translatiert wird. Dies ist kausal für die Ausprägung des Fragilen-X-Syndroms (Bhakar et al., 2012). Durch die übermäßige Bindung der CGG-Tripletts könnte Pura an anderen Stellen in der Zelle fehlen und dadurch zu dem Krankheitsbild beitragen. In Drosophila melanogaster kann die Überexpression von Pura den FXTAS-Phänotypen in Fliegen aufheben (Jin et al., 2007). Außerdem konnten Aumiller et al. (2012) zeigen, dass Pura über die Bindung von CGG-Wiederholungen in mRNAs für den Transport eines mRNP aus dem Kern von Oozyten in D. melanogaster verantwortlich ist. Pura und FMRP können in kultivierten Rattenneuronen gleichzeitig die mRNA des dendritischen Proteins MAP2 binden (Johnson et al., 2006). Pura bindet außerdem die nichtkodierende RNA BC1, die selbst die Translation von mRNA reguliert, was die Vermutung zulässt, dass Pura über diese Interaktion die Translation an der Synapse beeinflussen könnte (Wang *et al.,* 2005).

Staufen ist ein mRNA-Bindeprotein, welches wie Pura in Oozyten von D. melanogaster regulatorisch wirkt. Es ist verantwortlich für die Lokalisation der oskar- und bicoid-mRNAs, deren örtliche Expression die Ausbildung der anterior-posterior-Achse in Embryonen von Fliegen festlegt (Broadus et al., 1998; Riechmann und Ephrussi, 2001). In Säugern gibt es zwei homologe Proteine, Staufen1 und Staufen2, die jeweils vier dsRBD (double-stranded RNA-binding domains) aufweisen und in den dendritischen Transport von mRNAs involviert sind (Tang et al., 2001). Das Einbringen einer dominant-negativen Variante des Proteins Staufen1 in kultivierte hippocampale Neuronen aus der Ratte führt dazu, dass eine Shank1-Reporter mRNA nicht mehr in Dendriten nachzuweisen ist (Falley et al., 2009). Es ist jedoch nicht bekannt, ob die dendritische Lokalisation über eine direkte Bindung der Shank1-mRNA vermittelt wird. Zudem stehen in vivo Untersuchungen aus. Erst kürzlich wurde für Staufen1 eine Rolle in der Kontrolle der mRNA-Stabilität nachgewiesen. Es ist verantwortlich für den sogenannten staufen1-mediated decay (SMD). Dabei vermittelt Staufen1 über die Bindung an Elemente in der 3'UTR von Ziel-mRNAs und die Interaktion mit der ATP-abhängigen RNA-Helikase UPF1 den Abbau der mRNAs (Kim et al., 2005). Staufen2 ist über die Bindung an sein Paralog Staufen1 und an UPF1 ebenso in diesen Prozess verwickelt (Park et al., 2013). Für Staufen2 konnte auch gezeigt werden, dass es aktiv in den Zellkern hinein und heraus transportiert wird, weshalb man vermutet, dass es schon im Zellkern seine Ziel-mRNAs bindet und für deren Verpacken in mRNPs zuständig ist (Miki et al., 2005). Zudem ist Staufen2 notwendig für die Ausbildung der dendritischen Dornen. Fehlt das Protein, sinkt die Zahl der dendritischen Dornen, deren Struktur zusätzlich verändert ist (Goetze et al., 2006).

Wie Pura und die Staufen-Proteine ist auch DDX1 in dem KIF5c-mRNP enthalten. Es gehört zu den DEAD-Box Proteinen, die durch das konservierte Aminosäuremotiv $Asp(\underline{D})$ -Glu(\underline{E})-Ala(\underline{A})-Asp(\underline{D}) charakterisiert sind. Proteine dieser Familie sind putative RNA-Helikasen, die ubiquitär exprimiert werden und in die unterschiedlichsten Prozesse innerhalb der Zelle, jedoch vor allem in den RNA-Metabolismus, involviert sind (Godbout und Squire, 1993; Rocak *et al.*, 2004). DDX1 wird in neuronalen Stammzellen von Säugern in mRNPs mit Staufen2 und den für β -actin und prospero (prox1) kodierenden mRNAs gefunden, die eine Rolle in der Differenzierung spielen (Vessey *et al.*, 2012). Außerdem hat das Protein eine Funktion bei der Replikation des HI-Virus, in dem es die RNA des viralen Proteins Rev bindet. Diese Bindung aktiviert die ATPase-Aktivität von DDX1 (Edgcomb *et al.*, 2012). Es konnte gezeigt werden, dass die DDX1-Menge in KIF5c-mRNPs in FMRP *knockout*-Mäusen im Vergleich mit Wildtyp Mäusen nur noch 60% beträgt. Die Assoziation von DDX1 in diesen mRNPs ist demnach abhängig von FMRP (Steffens, medizinische Doktorarbeit, in Vorbereitung).

Es lässt sich vermuten, dass DDX1 als RNA-Helikase direkt in die Translationskontrolle, die von FMRP an der Synapse ausgeführt wird, eingreifen kann.

Auch wenn die hier dargestellten dendritisch lokalisierten RBPs in dem KIF5c-mRNP identifiziert wurden und sie dadurch in den dendritischen Transport von mRNAs oder in die Regulation der dendritischen Translation involviert sein könnten, ist die konkrete Funktion dieser Proteine in Neuronen unklar.

1.5 Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten neuronale mRNA-Bindeproteine funktionell analysiert werden. Hierfür wurden ausschließlich dendritisch lokalisierte RBPs, die Bestandteil eines KIF5c-mRNPs sind, ausgewählt. Zunächst sollten die RBPs hinsichtlich ihrer Interaktionen mit dendritisch lokalisierten mRNAs charakterisiert werden. Im Mittelpunkt standen dabei die Transkripte der Shank-Proteine. Die weitere Charakterisierung der RBPs sollte mittels *Knockdown*-Experimenten erfolgen. Dafür wurde ein lentiviraler *Knockdown* für die mRNA-Bindeproteine DDX1 und Staufen2 in hippocampalen Neuronen etabliert. Mit den sich anschließenden *Knockdown*-Experimenten sollte dann die Bedeutung der untersuchten Proteine für die postsynaptische Dichte exzitatorischer Synapsen ermittelt werden. Im Vordergrund stand dabei der Einfluss des *Knockdown* auf Proteine der PSD und deren mRNAs.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Analyse von Punktmutationen im N-terminalen Bereich des Proteins Shank3. Die Mutationen wurden in Menschen mit Erkrankungen aus dem Autismusspektrum identifiziert und sollen hier hinsichtlich ihres Einflusses auf die Bildung von Synapsen in hippocampalen Neuronen untersucht werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Medien, Enzyme

Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen) in reinst Qualität bezogen. Zellkulturmedien wurden von den Firmen Gibco/LifeTechnologies (Carlsbad, USA) und PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich) genutzt. Die verwendeten Enzyme stammen von den Firmen Fermentas/Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA), Promega (Madison, USA) und Roche (Mannheim). Abweichungen sind angegeben.

2.1.2 Zusammensetzung von Puffern, Lösungen und Medien

Puffer	Zusammensetzung
Alkalische Lyse Lösung I Lösung II Lösung III	50 mM Tris-HCl, pH8 10 mM EDTA, 100 g/ml RNaseA 200 mM NaOH, 1 % SDS (w/v) 3 M Kaliumacetat, pH5,5
2xBBS	50 mM BES 280 mM NaCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ pH 6,96
Blockingpuffer (IZC)	2% Pferdeserum 1% BSA in 1xPBS
Boratpuffer	0,05 M Borsäure 0,2 M Na ₂ B ₄ O ₇ pH8,5
DNA-Ladepuffer	10mM Tris-HCl, pH7,6 60% Glyzerin (v/v) 0,25% Bromphenolblau
Fixierungspuffer (IZC)	4% (w/v) Paraformaldehyd in 1 x PBS
IP - Puffer	10 mM Hepes, pH7,4 200 mM NaCl 30 mM EDTA 0,5 % (v/v) Triton X-100
5xKCM	0,5 M KCl 0,15 M CaCl2 0,25 M MgCl2

Tab 2-1: Zusammensetzung von Puffern und Lösungen IZC: Immuzytochemie, IP: Immunpräzipitation, RIPA: Radioimmunopräzipitations Assay.

Puffer	Zusammensetzung
1 x TAE	100 mM Tris /Acetat, pH8,0 5 mM EDTA
5 x Lämmli	300 mM Tris-HCl, pH 6,8 50 % Glyzerin (v/v) 7,5 % SDS (w/v) 0,5 M DTT 0,01 % Bromphenolblau
Lysispuffer (RNA-Immunpräzipitation)	120 mM NaCl 50 mM Hepes, pH 7,5 5 mM EDTA 0,5 % Triton X-100
1 x PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄ pH7,4
Permeabilisierungspuffer (IZC)	0,2 % (v / v) Triton X-100 in 1 x PBS
Poly-L-Lysin	1 mg/mL Poly-L-Lysin in Boratpuffer
RIPA-Puffer	150 mM NaCl 50 mM Tris/HCl, pH8,0 5 mM EDTA 0,5% (w/v) Natriumdeoxycholat 1% (v/v) NP-40 0,1% (w/v) SDS
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris/HCl, pH8,3 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
1 x TBS-T	10 mM Tris-HCI, pH8,0 150 mM NaCl 0,05 % Tween 20
Transferpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % MeOH (v/v) 0,02 % SDS pH8,3
TSB	10% PEG 3350 (v/v) 5% DMSO (v/v) 10 mM MgSO ₄ 10 mM MgCl ₂ in LB-Medium, pH6,1
Universalpuffer	100 mM NaCl 50 mM Hepes, pH7,4
Versene	1 x PBS 0,5 mM EDTA

Medien	
DMEM	DMEM 10% FBS 100U/mL Penicillin 100µg/mL Streptomycin
Plattiermedium	MEM 10% (v/v) Pferdeserum 0,6% (v/v) Glucose
Neurobasalmedium	1 xB-27 (Gibco/Life Technology) 50μg/μL Primozin 25μM Glutamat (Sigma) 0,5 mM L-Glutamin (Gibco/Life Technology)
LB-Medium	10g/I Trypton 5g/I Hefeextrakt 5g/I NaCl pH7,5
Festmedien	+1,8% Agar-Agar

Tab 2-2: Zusammensetzung verwendeter Medien

2.1.3 Bakterienstämme, Zelllinien und Tiere

Es wurde der *Escherichia coli* Stamm Top10F´ (Invitrogen) für die Herstellung von kompetenten Bakterien verwendet und im weiteren für die Transformation genutzt.

Für die eukaryotische Zellkultur wurde die Zelllinie HEK293T (*Human Embryonic Kidney*, ATCC, Manassas, USA) verwendet.

Zur Gewinnung der primären Neuronen wurden Ratten (*Rattus norvegicus*) des Stammes Wistar genutzt, die Wildtyp Mäuse entstammten der Linie C57BI/6J_2010. Beide Linien wurden aus der Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf bezogen.

2.1.4 Vektoren

Mmu steht für *Mus musculus* (Hausmaus), Rn für *Rattus norvegicus* (Wanderratte), AS für Aminosäure.

Name des Vektors	Eigenschaften	Quelle
pmRFP-C1	CMV Promotor, <i>monomeric red</i> fluorescent protein, Kan ^R	AG Kreienkamp
pmRFP-C2	CMV Promotor, <i>monomeric red</i> fluorescent protein, Kan ^R	AG Kreienkamp
pmRFP-C3	CMV Promotor, <i>monomeric red</i> fluorescent protein, Kan ^R	AG Kreienkamp
pmRFP-N1	CMV Promotor, <i>monomeric red</i> fluorescent protein, Kan ^R	AG Kreienkamp
pSuper	H1-Promotor, f1(+) ori- gin, pUC Origin, Amp ^R	Stefan Kindler, UKE, Hamburg (ursprünglich: Brummelkamp <i>et al.</i> 2002)
pLVTHM	Eukaryotische Expression, <i>enhanced green fluorescent pro-</i> <i>tein</i> , EF1 a Promotor, Amp ^R	Didier Trono (Addgene Plasmid #86096)

Tab. 2-3: Grundvektoren zur Herstellung	g von	Konstrukten
---	-------	-------------

Tab. 2-4: Zur Verfügung gestellte Vektoren

Name des Vektors	Eigenschaften	Quelle
pmRFP-Pist	kodiert Pist, mmu, AS 1-455	AG Kreienkamp
peGFP-PABP-c1	CVM-Promotor, <i>enhanced</i> <i>green fluorscent protein</i> , kodiert PABP c1, Rn, AS 1-636	Evita Mohr, UKE, Hamburg
prStau1-eGFP	CMV-Promotor, <i>enhan-</i> <i>ced green fluorescent protein</i> , kodiert Staufen1, AS 1-495	Stefan Kindler, UKE, Hamburg
prStaufen2-eGFP	CMV-Promotor, <i>enhan-</i> <i>ced green fluorescent protein</i> , kodiert Staufen2, AS 1-571	Stefan Kindler, UKE, Hamburg
pcDNA3.1 myc/his Shank3-Wt	CMV Promotor, kodiert Shank3, Rn, AS 1-1815, myc-Anhang, Amp ^R	AG Kreienkamp
pcDNA3.1 myc/his Shank3-L68P	CMV Promotor, kodiert Shank3, Rn, AS 1-1815, AS Austausch an angege- bener Position, myc-Anhang, Amp ^R	AG Kreienkamp
pcDNA3.1 myc/his Shank3-R300C	CMV Promotor, kodiert Shank3, Rn, AS 1-1815, AS Austausch an angegebe- ner Position, mit myc-Anhang, Amp ^R	AG Kreienkamp
pcDNA3.1 myc/his Shank3-Q321R	CMV Promotor, kodiert Shank3, Rn, AS 1-1815, AS Austausch an angege- bener Position, myc-Anhang, Amp ^R	AG Kreienkamp

Name des Vektors	Eigenschaften	Quelle
pLVTHM shCtrl	Basiert auf pLVTHM, trägt shRNA gegen Luciferase-mRNA unter Kontrolle des H1 Promotors	Carlo Sala, Mailand, Italien
pSuper shStau2	shRNA gegen mRNA von Stau- fen2, Rn, ab Base 1345	Stefan Kindler, UKE, Hamburg
psPAX2	Lentivirale Verpackung, Amp ^R	Didier Trono (Addgene Plasmid #12260)
pMD2.G	kodiert für VSV.G, Amp ^R	Didier Trono (Addgene Plasmid #12259)
pGIPZ	CMV-Promotor, exprimiert für eine Kontroll-shRNA, <i>enhan-</i> <i>ced green fluorescent protein</i>	

Tab. 2-5: In dieser Arbeit generierte Vektoren

	Eigenschaften	generiert aus		
Expressionsvektoren				
pmRFP-PABP	kodiert für PABP-c1, Rn, AS 1-636	peGFP-PABP, Restriktion mit BamH1/EcoR1, ligiert in pmRFP-C2		
pmRFP-Pura	kodiert für Pura, isoform 1, Rn, AS 1-302	PCR an cDNA (s. Tab. 2-6) Restriktion BamH1/EcoR1/ Not1, ligiert in pmRFP-c1,		
pmRFP-Staufen2	kodiert für Staufen2, Rn, AS 1-571	peGFP-Staufen2, Restriktion mit Xho1/BamH1, ligiert in pmRFP-C3		
pmRFP-Staufen1	kodiert für Staufen1, Rn, AS 1-495	peGFP-Staufen1, Restriktion mit EcoR1/BamH1, ligiert in pmRFP-N1		
Vektoren zur Produ	uktion von Lentiviren			
pSuper-shDDX1 #1	shRNA gegen DDX1- mRNA, Rn, ab Base 42	Ligiert in pSuper über Bgl2/Hind3		
pSuper-shDDX1 #2	shRNA gegen DDX1- mRNA, Rn, ab Base 668	Ligiert in pSuper über Bgl2/Hind3		
pSuper-shDDX1 #3	shRNA gegen DDX1- mRNA, Rn, ab Base 1446	Ligiert in pSuper über Bgl2/Hind3		
pSuper-shDDX1 #4	shRNA gegen DDX1- mRNA, Rn, ab Base 1898	Ligiert in pSuper über Bgl2/Hind3		
pSuper-shDDX1 #5	shRNA gegen DDX1- mRNA, Rn, ab Base 1586	Ligiert in pSuper über Bgl2/Hind3		
pLVTHM shDDX1	shRNA gegen DDX1- mRNA (#5, Base 1586)	pSuper-shDDX1 #5, Restriktion mit EcoR1/Cla1, ligiert in pLVTHM		
pLVTHM shStau2	shRNA gegen Staufen2-mRNA, Rn, ab Base 1345	pSuper-shStau2, Restriktion mit EcoR1/Cla1, ligiert in pLVTHM		

2.1.5 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich synthetisiert und sind in 5´-3´Richtung aufgelistet. Für PCR-Analysen und Sequenzierungsreaktionen wurden die Oligonukleotide mit sterilem und didestilliertem Wasser auf eine Konzentration von 100μ M eingestellt (Tab. 2-6 und 2-7). Die Oligonukleotide zur Herstellung von shRNAs wurden auf eine Konzentration von $3\mu g/\mu L$ eingestellt. Farbig dargestellt sind eingefügte Restriktionsschnittstellen oder Überhänge von Restriktionsschnittstellen (Tab. 2-6 und 2-8). Die für die reverse Transkription quantitative *real-time* PCR (RT-qPCR) eingesetzten QuantiTect Primer Assays (Qiagen) wurden in RNase-freiem Wasser nach Angaben des Herstellers gelöst (Tab. 2-9).

Tab. 2-6: Oligonukleotide zur Klonierung von Pura

Name	
pura-CDS-fwd-2	TACGAATCCCATCATGGCGGACCGAGAC
pura-CDS-488-rev	GTTGACTGTCTGGCGGATGC
pura-CDS-rev-2	GGCGGATCCTCAATCTTCTTCCCCTTCTTC
pura-CDS-fwd3	AATGAATTCACTCTCCATGTCTGTGGCC

Tab. 2-7: Oligonukleotide für Sequenzierungen

Name	
pmRFP fwd	CCTACAAGACCGACATCAAG
SVPA2 rev	ATTCATTTTATGTTTCAGGTTCAG
M13-fwd-kurz	GTTTTCCCAGTCACGAC
GFP-n-fwd	AATGTCGTAACAACTC
pmRFP rev	GTCACCTTCAGCTTGGCG
SP6-rev	GATTTAGGTGACACTATAG

Tab. 2-8. Oligonukleotide zur Hybridisierung und Herstellung von shRNAs

Name	
shRNA DDX1-fwd 1	GATCCCCCAAGCCGTGGAGGAGATGGTTCAA GAGACCATCTCCTCCACGGCTTGTTTTTA
shRNA DDX1-rev 1	AGCTTAAAAACAAGCCGTGGAGGAGATGGTCTCTTG AACCATCTCCTCCACGGCTTGGGG
shRNA DDX1-fwd 2	GATCCCCAAACCAAGCCCTCTTCCCTTTCAA GAGAAGGGAAGAGGGCTTGGTTTTTTTTA
shRNA DDX1-rev 2	AGCTTAAAAAAAACCAAGCCCTCTTCCCTTCTCTG AAAGGGAAGAGGGCTTGGTTTGGG
shRNA DDX1-fwd 3	GATCCCCGAGATGTGGTCTGAAGCTATTCAA GAGATAGCTTCAGACCACATCTCTTTTA

Name	
shRNA DDX1-rev 3	AGCTTAAAAAGAGATGTGGTCTGAAGC TATCTCTTGAATAGCTTCAGACCACATCTCGGG
shRNA DDX1-fwd 4	GATCCCCCGTGGGAAGGGATGCTATTTCAA GAGAATAGCATCCCTTCCCACGGTTTTTA
shRNA DDX1-rev 4	AGCTTAAAAACCGTGGGAAGGGATGCTATTCTCTTG AAATAGCATCCCTTCCCACGGGGG
shRNA DDX1-fwd 5	GATCCCCAGGAGGAGGACCTGATAAATTCAA GAGATTTATCAGGTCCTCCTCCTTTTTTA
shRNA DDX1-rev 5	AGCTTAAAAAAGGAGGAGGACCTGATAAATCTCTTG AATTTATCAGGTCCTCCTCGGG

Tab. 2-9: Oligonukleotide für RT-qPCR

Name	Sequenz/Referenznummer	Quelle	Spezies
DDX1	QuantiTect Primer Assay QT01567986	Qiagen	Rattus norvegicus
GluR1	QuantiTect Primer Assay QT01084559	Qiagen	Rattus norvegicus
HPRT	QuantiTect Primer Assay QT00365722	Qiagen	Rattus norvegicus
IRSp53	QuantiTect Primer Assay QT00194355	Qiagen	Rattus norvegicus
IRSp53	QuantiTect Primer Assay QT01061431	Qiagen	Mus musculus
mGluR5	QuantiTect PrimerAssay QT02375471	Qiagen	Rattus norvegicus
PSD95	QuantiTect Primer Assay QT00183414	Qiagen	Rattus norvegicus
PSD95 fwd PSD95 rev	GGCACCGACTACCCCACAG AACACCATTGACCGACAGGA	Janin Ölschläger-Schütt, UKE, Hamburg	Mus musculus
SAPAP3-fwd SAPAP3-rev	ACTATTTGCAGGTGCCGCAAG GGGCTACCATCTGAGTCTCC	Janin Ölschläger-Schütt, UKE, Hamburg	Mus musculus
Shank1	QuantiTect Primer Assay QT00183351	Qiagen	Rattus norvegicus
Shank1 fwd Shank1 rev	AGCCTGCAGCAGTGCCCAGCA ATGCGAGGCCGCCAGGCCCA	Janin Ölschläger-Schütt, UKE, Hamburg	Mus musculus
Shank2	QuantiTect Primer Assay QT00199171	Qiagen	Rattus norvegicus
Shank3	QuantiTect Primer Assay QT01568812	Qiagen	Rattus norvegicus
Staufen2	QuantiTect Primer Assay QT02446542	Qiagen	Rattus norvegicus
β-III-Tubulin	QuantiTect Primer Assay QT00188815	Qiagen	Rattus norvegicus

2.1.6 Antikörper

Antigen	Hergestellt	Quelle	Verdünnung		Immunprä-
	in		WB	IZC	zipitation
β-Actin	Maus	Abcam	1:1000		
DDX1	Kaninchen	Novus Biologicals, #348			х
DDX1	Kaninchen	Sigma, Prestige	1:1000		
ERK	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000		
FMRP	Kaninchen	Janin Ölschläger- Schütt, UKE, Hamburg	1:50		
FMRP	Kaninchen	Santa Cruz Technology			x
GAPDH	Maus	Abcam	1:3000		
GluR1	Kaninchen	Millipore	1:100		
lgG	Kaninchen	Acris Antibodies			x
IRSp53	Kaninchen	Abcam	1:1000		
MAP2	Kaninchen	Stefan Kindler, UKE, Hamburg		1:5000	
mGluR5	Kaninchen	Milipore	1:1000		
тус	Maus	Sigma		1:1000	
NR1	Kaninchen	Millipore	1:500		
PABP	Kaninchen	Abcam			х
p-ERK	Kaninchen	Cell Signaling	1:1000		
PSD-95	Maus	Upstate	1:1000		
RFP	Ratte	Chromothek	1:2000		
Shank3	Kaninchen	Tobias Böckers,Ulm	1:1000		
Staufen2	Kaninchen	Stefan Kindler, UKE, Hamburg	1:2000		
β-III-Tubulin	Kaninchen	Sigma	1:1000		
vGlut1	Kaninchen	Synaptic Systems		1:1000	

Tab. 2-10: Primäre Antikörper. WB: Westernblot, IZC: Immunzytochemie

Sekundäre Antikörper	hergestellt in	Quelle	Verdünnung	
			WB	IZC
Maus-hrp	Ziege	BioRad	1:5000	
Kaninchen-hrp	Ziege	BioRad	1:5000	
Ratte-hrp	Ziege	Dianova, Hamburg	1:5000	
Kaninchen alexa-flour-488	Ziege	Invitrogen		1:400
Maus-Cy3	Ziege	Dianova, Hamburg		1:400
Kaninchen marina-blue	Ziege	Invitrogen		1:400

Tab. 2-11: Sekundäre Antikörper

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Polymerase Ketten Reaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Für alle PCR-Reaktionen wurde die *Taq*-DNA Polymerase (Qiagen) nach Empfehlung des Herstellers verwendet. Die Reaktion erfolgte in einem *Thermocycler* der Firma Biometra. Die Temperatur zur Anlagerung der Primer wurde der Schmelztemperatur der Primer und die Dauer des Verlängerungsschrittes der Länge des Amplifikats angepasst. Die Amplifikation von Pura zur Klonierung des pmRFP-Fusionskonstruktes erfolgte aus cDNA aus Rattengehirn. Um die komplette Sequenz von Pura zu erhalten, wurden zwei unabhängige Reaktionen, jeweils den 5´- bzw. 3´- Bereich umfassend, angesetzt. Die cDNA wurde in einem Reaktionsvolumen von $100 \,\mu$ L 1:40 verdünnt eingesetzt, sowohl die Primer als auch die dNTPs (Invitrogen/Life Technologies) in einer Endkonzentration von $0,2 \,\mu$ M. Bei der Amplifikation des 5´- Bereichs von Pura wurde zusätzlich 10% Glyzerin zugesetzt.

Die PCR-Reaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

```
2min 94 °C [1min 94 °C 1min 55 °C 45 sek 72 °C] x 30 10min 72 °C
```

Für die Sequenzierungs-PCR wurde in einem 10μ L Ansatz 0.5μ g Plasmid-DNA als Template eingesetzt, die Primer in einer Endkonzentration von 1μ M. Zusätzlich wurde 1μ L *PreMix BigDye* und 2μ L 5x Reaktionspuffer zur Reaktion pipettiert.

Die PCR erfolgte unter folgenden Bedingungen:

1 min 96 °C [20 sek 96 °C 5 sek 50 °C 4 min 60 °C] x 25

2.2.2 Restriktionsverdau und Ligation von DNA Fragmenten

Zur Klonierung von Konstrukten wurde Plasmid-DNA mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (Tab. 2-5) geschnitten. Verwendet wurden ausschließlich FastDigest-Enzyme in $10 \times buffer green$ (Fermentas/Thermo Fisher Scientific), der gleichzeitig als Ladepuffer für die Gelelektrophorese diente. In einem Ansatz von 50μ L wurde $1 \mu g$ DNA mit jeweils $1,5 \mu$ L Enzym für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der Auftrennung und Aufreinigung aus dem Agarosegel (Abschnitt 2.2.3), wurde die DNA für die Ligation eingesetzt. In einem 20μ L Ansatz wurde die Vektor- und Insert-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:4-6 zusammen mit 1 Weiss unit T4-Ligase in adäquatem Puffer (Fermentas/Thermo Fisher Scientific) inkubiert.

Für die Generierung der shRNA-pSuper-Konstrukte mussten zunächst die Oligonukleotide (Tab. 2-8) hybridisiert werden. Dafür wurden jeweils 3μ g des entsprechenden Vorwärts- und Rückwärtsoligonukleotid in 46μ L Universalpuffer für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt und dann für weitere 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Der Heizblock wurde nach den 10 Minuten ausgeschaltet und die Proben darin bis auf Raumtemperatur abgekühlt. Für die Ligation wurden anschließend 100 ng linearisierter pSuper-Vektor und 2μ L der hybridisierten Oligonukleotide in einem Volumen von 10μ L pipettiert. Die Ligationsreaktion erfolgte bei 16 °C über Nacht.

2.2.3 Agarosegelelektrophorese und DNA-Isolation aus dem Gel

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte durch Agarosegelelektrophorese. Je nach Fragmentgröße wurde 1-1,5 % Agarose (Invitrogen/Life Technologies) in 1 x TAE aufgekocht, 1 μ L/50mL Ethidiumbromid zugesetzt und ein Agarosegel gegossen.

PCR-Reaktionen wurden mit 5xDNA-Ladepuffer versetzt, Restriktionsansätze wurde direkt in mit Ladepuffer versetztem Reaktionspuffer durchgeführt (10x*buffer green*, Fermentas/Thermo Fisher Scientific).

Um die Größe und Menge der DNA Fragmente bestimmen zu können wurde ein DNA-Standard (Gene Ruler, 1 kb, Fermentas/Thermo Fisher Scientific) mit auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 100 V mit 1 x TAE als Laufpuffer.

Die Analyse und das Präparieren von DNA-Fragmenten erfolgte unter UV-Licht. Die Fragmente wurden über das *GeneJet Purification Kit* (Fermentas/Thermo Fisher Scientific) nach Angaben des Herstellers aus der Agarose aufgereinigt.

2.2.4 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien

500 mL LB-Medium wurden mit 5 ml einer Vorkultur des *E. coli* TOP10F´-Stammes angeimpft und bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3–0,6 angezogen. Anschließend wurden die Zellen für 15 Minuten auf Eis gekühlt und bei 4 °C und 5000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 ml eiskaltem TSB resuspendiert und weitere 10–15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden in vorgekühlte 1,5 mL Reaktionsgefäße aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Für die Transformation von Ligationsansätzen in die kompetenten Zellen wurden die Ansätze zunächst bei 65 °C für 10 Minuten inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen langsam auf Eis aufgetaut. 10μ L des Ligationsansatzes wurden mit 20μ L 5xKCM und 70μ L sterilem Wasser vermischt und nach der Zugabe von 100μ L Zellsuspension für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Zwischendurch wurde der Ansatz mehrfach vorsichtig gemischt. Daraufhin folgte für 5 Minuten eine Inkubation bei 37 °C. Zu dem Ansatz wurde dann 1 mL vorgewärmtes LB-Medium ohne Zusätze zugegeben und für weitere 2h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurde auf LB-Agar-Platten, je nach Resistenzmarker mit Ampizillin (Ratiopharm) oder Kanamyzin (Carl Roth) versetzt, ausplattiert. Das Wachstum erfolgte über Nacht bei 37 °C.

2.2.5 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienkultur

Die Präparation von Plasmid-DNA aus 3mL Übernachtkultur erfolgte mittels alkalischer Lyse. Dafür wurden 1,5mL Zellsuspension durch Zentrifugation pelletiert und das Pellet mit 100 μ L Puffer I resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 100 μ L Puffer II. Nach der Zugabe von 100 μ L Puffer III wurde der Ansatz für 20 Minuten bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurde 290 μ L des wässrigen Überstandes mit 0,7 Vol (210 μ L) Isopropanol und einer anschließenden Zentrifugation für 20 Minuten und 13.000 rpm gefällt. Das Pellet wurde dann mit 500 μ I 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 μ L sterilem Wasser aufgenommen.

Die Aufreinigung von DNA aus 100 mL Übernachtkultur wurde mit dem *NucleoBond Xtra Midi Kit* (Macherey und Nagel) oder dem *Endofree Plasmid Maxi Kit* (Qiagen) nach Angaben der Hersteller durchgeführt.

Die Messung der Nukleinsäurekonzentrationen erfolgte am Spectrophotometer ND-1000 der Firma NanoDrop Technologies (Wilmington, DE, USA, Vertrieb durch Biorad) bei 260 nm.

2.2.6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach Sanger *et al.* (1977) mit dem *Abi Prism BigDye Terminator Kit* (Applied Biosystems/Life Technologies). Die PCR-Reaktion (Abschnitt 2.2.1) wurde mit Wasser auf 100μ L aufgefüllt und durch die Zugabe von 10μ L 3M NaAc und 250μ L 96–100% Ethanol und nachfolgender Zentrifugation bei 13.000 rpm für 30 Minuten gefällt. Das Pellet wurde einmal mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und bis zur Sequenzierung bei -20°C gelagert.

2.2.7 RNA-Isolation

Die Isolation von Gesamt-RNA, sowohl von ko-Immunpräzipitationen als auch aus kultivierten hippocampalen Neuronen, erfolgte mit dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Eluiert wurde die RNA mit $30-40 \mu$ L nukleasefreiem Wasser.

2.2.8 Reverse Transkriptase quantitative real-time PCR

Zur relativen Quantifizierung von mRNA wurde eine reverse Transkription mit anschließender quantitativer *real-time* PCR (RT-qPCR) durchgeführt. Verwendet wurde das *QuantiTect SYBR Green PCR Kit* (Qiagen) und der Rotorgene 3000 *Cycler* (Corbett/Qiagen). In einem Reaktionsvolumen von 20μ L wurden zur Analyse von relativen mRNA-Expressionen nach lentiviralem *Knockdown* in primären Ratteneuronen pro Ansatz 10 ng Gesamt-RNA eingesetzt. Bei ko-Immunpräzipitationen wurden pro Ansatz die gleichen Volumina als Template eingesetzt. In beiden Fällen wurden Duplikate analysiert. Zu den jeweilgen Ansätzen wurde $0,2\mu$ L RT-Mix, 10μ L *SYBR Green MasterMix*, 1μ L je Primer bzw. 2μ L QuantiTect Primer zugegeben und mit nukleasefreiem Wasser auf 20μ L Endvolumen aufgefüllt. Die reverse Transkription und die anschließende PCR-Reaktion erfolgte nach folgenden Bedingungen:

30 min 50 °C 15 min 95 °C [15 sek 94 °C 30 sek 56-58 °C 30 sek 72 °C] x 40

Die Bestimmung der Schmelzkurven erfolgte von 72°C–95°C für 5 Sekunden pro Grad. Ausgewertet wurde die PCR mit der Software RotorGene 6. Über den gesamten Zeitraum der PCR-Reaktion wird die Zunahme der Fluoreszenz von *SYBR Green* gemessen, das bei jedem PCR-Zyklus in das neusynthetisierte DNA-Produkt eingebaut wird. Die Fluoreszenz wird gegen die Zykluszahl logarithmisch aufgetragen und anhand dieser Kurven pro Ansatz für jedes Primerpaar die Ct (*Cycle Threshold*)-Werte bestimmt. Dafür wurde manuell ein Schwellenwert festgelegt, der über der Hintergrundfluoreszenz lag. Der Ct-Wert ist nun der Zyklus, an dem die Fluoreszenzkurve den festgelegten Schwellenwert schneidet. Die so ermittelten Werte wurden dann mit dem Programm REST2009 (Pfaffl *et al.*, 2002) ausgewertet. Zur Bestimmung von relativen mRNA-Expressionen wurden die Werte auf β-III-Tubulin normalisiert. Die relative Anreicherung der verschiedenen Transkripte nach der Durchführung RNase-freier RFP-Immunpräzipitationen (Abschnitt 2.4.2) wurden ermittelt, indem die Ct-Werte der RFP-Fusionsproteine auf den Kontrollansatz (nur RFP) normalisiert wurden.

Die Auswertung der RNase-freien Immunpräzipitation von DDX1 aus Mausgehirn (Abschnitt 2.4.3) erfolgte, indem die Ct-Werte der zu vergleichenden Proben, z.B. DDX1 und IgG, für jedes Primerpaar bestimmt wurden und dann die Differenz zwischen diesen Werten gebildet wurde. Dieser Wert wurde durch den Faktor 0,333 dividiert um die relative Anreicherung zu erhalten.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung, Transfektion und Lyse von HEK293T-Zellen

Die Kultivierung von HEK293T-Zellen erfolgte in DMEM (*Dulbecco's modified eagle medium*, Gibco/Life Technologies) mit den entsprechenden Zusätzen. Waren die Zellen ca. 90 % konfluent wurden sie passagiert. Dafür wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zwei mal mit Versene gewaschen. Die Zellverbindungen wurden durch die Inkubation für 3 Minuten bei Raumtemperatur mit 1 mL 1 x Trypsin (Gibco/Life Technologies) gelöst. Danach erfolgte die Resuspension in 10 mL frischem DMEM und die Zellen wurden in der gewünschten Verdünnung ausplattiert. Zum Erhalt wurden sie mit einer 1:10 Verdünnung umgesetzt und für eine Transfektion mit einer 1:5–1:6 Verdünnung, so dass die Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion etwa 60 % konfluent waren.

Die transiente Transfektion wurde mit TurboFect (Fermentas/Thermo Fisher Scientific) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Herstellung von Zelllysaten wurden die Zellen 48 h nach der transienten Transfektion einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und dann für 20 Minuten mit 200 μ L (6-*well*-Schale) vorgekühltem RIPA-Puffer auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zelllysate in Reaktionsgefäße überführt und für 20 Minuten bei 20000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 5 x Lämmli-Puffer versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C weggefroren.

Für die Transfektion zur Produktion von lentiviralen Vektoren wurden die Zellen am Vortag mit einer 1:6 Verdünnung auf 15 cm-Zellkulturschalen umgesetzt. Die Transfektion erfolgte mittels $Ca_3(PO_4)_2$ -Präzipitation. Dafür wurden pro Platte 7µg pMD2.G, 14µg psPAX2 und 21µg des entsprechenden Transfervektors (pGIPZ bzw. pLVTHM) mit 1065µl sterilem Wasser in einem 1,5mL Reaktionsgefäß vorgelegt. Unter ständigem mischen wurde tropfenweise 156µL 2M CaCl₂ zu der DNA-Wasser-Mischung pipettiert und auf die gleiche Weise $1250 \mu L 2 \times BBS$ zugegeben. Nach einer Inkubation von 10–15 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Suspension auf die Zellen getropft. Ein Wechsel des Mediums erfolgte nach 6 h.

2.3.2 Produktion und Aufreinigung lentiviraler Vektoren

Die lentivirale Transduktion bietet eine gute Alternative zur Transfektion, mit der auch in Neuronen die Genexpression dauerhaft verändert werden kann. Die Entdeckung, dass 21 Nukleotide lange RNAs (*short interference* RNAs, siRNAs) zur sequenzspezifischen Stilllegung von Genen in Säugerzellen führt, ermöglicht die funktionelle Analyse von genetischen Faktoren auch in Neuronen (Janas *et al.*, 2006). Mit Hilfe der lentiviralen Vektoren können nun shRNAs (*short hairpin* RNAs) in hippocampale Neuronen eingebracht werden, die dort dauerhaft exprimiert werden und so den RNA *interference* (RNAi)-Weg für die Ziel-mRNA auslösen, was letztendlich zum Abbau der mRNA und zur Stilllegung des Gens führt (Scherr *et al.*, 2003). Die shRNA-Kassette integriert sich in das Wirtsgenom und wird, nachdem die shRNA ins Zytoplasma transportiert wurde, von der RNA-Nuklease Dicer zu einer siRNA abgebaut (21–22 Nukleotide lang, jeweils mit 2 Nukleotiden Überhang). Diese wiederum wird dann vom RISC (*RNA-induced silencing complex*) erkannt. Mit Hilfe des Proteins Ago2 wird die siRNA entwunden und bindet dann die Ziel-mRNA, woraufhin diese vom RISC abgebaut wird (Singh *et al.*, 2011).

Die Produktion von lentiviralen Vektoren erfolgte in HEK293T-Zellen. Alle Arbeiten mit den lentiviralen Vektoren erfolgten gemäß den Sicherheitsvorkehrungen der Stufe 2. Die HEK293T-Zellen wurden transfiziert (Abschnitt 2.3.1) und das Medium 24 und 48 h nach der Transfektion geerntet. Nach der ersten Abnahme wurden 20mL frisches DMEM zu den Zellen gegeben. Die Überstände der beiden Zeitpunkte wurden mittels CME (Cellulosemischester)-Filter (0,45 μ m, Carl Roth) sterilfiltriert, entweder bei 4°C gelagert (erste Abnahme) oder mit dem ersten Überstand vereint. 37,5mL Überstand wurden in Zentrifugengefäße (Beckmann) gefüllt, auf 0,01 g austariert und die Viruspartikel mittels Ultrazentrifugation (L7-65 Ultracentrifuge, Beckmann, Rotor SW28) für 2 h bei 25.000 x g und 4 °C pelletiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 100 μ L PBS aufgenommen. Die Virussuspension wurde in den Zentrifugengefäßen für 2 h bei 4 °C resuspendiert, indem alle 20 Minuten die Gefäße vorsichtig geschüttelt wurden. Die Suspension wurde in Aliquots á 20 μ L bei -80 °C weggefroren.

2.3.3 Bestimmung des Titers lentiviraler Vektoren

Der Titer der aufkonzentrierten Virussuspension wurde mittels Titration in HEK293T-Zellen mit anschließender Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*, FACS) bestimmt. Bei diesem Verfahren werden die Zellen nach ihrer Größe und Granularität sortiert und gleichzeitig die Anzahl der in diesem Fall GFP positiven Zellen ermittelt, indem die Zellen mittels Laser angeregt werden.

Für die Analyse wurden in einer 24-*well*-Platte 5×10^4 HEK293T-Zellen ausplattiert und am nächsten Tag verschiedene Mengen der Virussuspension zugegeben. Die Suspension wurde dafür zunächst mit $1 \times PBS$ 1:100 verdünnt und dann jeweils in doppelter Ausführung 5, 10 und 40μ L dieser Verdünnung zu den Zellen gegeben. Die Kultivierung erfolgte für 48 h bei 37 °C und 5% CO₂.

Das Medium wurde verworfen und die Zellen zweimal mit 1 x PBS gewaschen. Durch die Zugabe von 300μ L 1 x Trypsin mit anschließender 5 minütiger Inkubation bei 37 °C, wurden die Zellen vereinzelt. Um die Zellen nach der Inkubation wieder zu pelletieren, wurden sie für 10 Minuten bei 1000g zentrifugiert, dann in 500μ L 1 x PBS resuspendiert und für die FACS-Analyse in 5 mL FACS-Röhren (Sarstedt) überführt. Eingesetzt wurde der FACS Canto II (BD Bioscience). Die Auswertung erfolgte mit dem Programm FACSDiva.

Mit folgender Formel konnte dann der Titer der Virussuspension bestimmt werden:

TU/mL=(FxNxDx1000)/V

TU: Transduktionseinheiten (*transduction units*) F: % GFP positive Zellen N: Anzahl der HEK293T-Zellen D: x-fache Verdünnung V: Volumen mit dem transduziert wurde

2.3.4 Kultivierung primärer Neuronen

Die primären Neuronen wurden aus E18–E20 (18–20 Tage nach erfolgreicher Verpaarung) embryonalen Ratten gewonnen. Die Gehirne wurden aus dem Schädel präpariert, die beiden Hemisphären voneinander und dem Stammhirn getrennt und die Hirnhaut entfernt. Danach erfolgte die Präparation der Hippocampi, die in einer Kulturschale gesammelt wurden. Die nachfolgenden Mengenangaben beziehen sich auf 24 Hippocampi bzw. 12 Gehirne.

Die Hippocampi wurden in 4,5 mL HBSS (Lonza) mit Pen/Strep aufgenommen, in ein 15 mL Greiner-Gefäß überführt und nach der Zugabe von 500μ L 10 x Trypsin für 15 Minuten bei 37 °C schüttelnd im Wasserbad inkubiert. Es folgten 5 Waschschritte mit jeweils 10 mL Plattiermedium und die Vereinzelung der Zellen. Dafür wurden sterile Glas-

pipetten mit Hilfe einer Flamme auf zwei Größen verengt und die Zellen jeweils etwa 10–20 mal herauf und herunter pipettiert. Die Anzahl der Zellen wurde mittels Neubauer Zählkammer pro mL Medium ermittelt und dann die Zellsuspension so verdünnt, dass eine Konzentration von etwa 1,2 x 10⁵ Zellen/mL Medium entstand. Die Zellen wurden dann auf 12-*well*- bzw. 24-*well*-Platten (1 mL bzw. 0,5 mL pro *well*) ausplattiert. Je nach Experiment waren in den Schalen sterile Deckgläser vorgelegt. Zur Vorbereitung der Platten und Deckgläser wurden diese über Nacht mit PLL (Poly-L-Lysin, 1 mg/mL, Sigma) beschichtet und dann 5–6 mal mit jeweils 1 mL Wasser gewaschen.

Zur Aufbereitung von Neuronen des Cortex wurden die Cortices zunächst mit einer Schere zerkleinert, in 36 mL HBSS mit Pen/Strep aufgenommen und in ein 50 mL Greiner-Gefäß überführt. Dann wurden 4 mL 10x Trypsin zugegeben und das Gewebe für 30 Minuten bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Auch hier folgte nun 5 maliges Waschen mit Plattiermedium. Das Gewebe wurde daraufhin mit einer 10 mL Pipette grob vereinzelt, in 3–4 mL Aliquots in 15 mL Greiner-Gefäße überführt, wie oben die Zellen vereinzelt und in einer Konzentration von 1 x 10⁶/mL Medium auf 10 cm Schalen, die vorher mit PLL beschichtet und gewaschen wurden, ausplattiert.

3h nach dem Ausplattieren wurde das Medium abgesaugt und durch Neurobasalmedium mit den entsprechenden Zusätzen ersetzt.

Die Kultivierung von primären Neuronen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂.

2.3.5 Transfektion und Transduktion von primären Neuronen

Die Transfektion von Neuronen für immunzytochemische Färbungen wurden mit Lipofectamine2000® (Invitrogen/Life Technologies) durchgeführt. Die Mengenangaben beziehen sich auf ein 12-well. 200 µL Neurobasalmedium ohne Zusätze wurden mit 3µL Lipofectamine2000[®] gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 0,5-1µg DNA wurde in einem 1,5mL Reaktionsgefäß vorgelegt. Nach der 5 minütigen Inkubation wurden die 200 µL Neurobasalmedium mit Lipofectamin2000[®] zu der DNA pipettiert. Dieser Ansatz wurde für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde von den Zellen die Hälfte des Mediums als konditioniertes Medium abgenommen, der Rest verworfen und die Zellen zweimal mit Neurobasalmedium ohne Zusätze gewaschen. Dann wurden 800 µL Medium / well zu den Zellen gegeben und die 200 μ L DNA-Lipofectamin2000[®]-Medium Mischung zu den Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubation für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Danach wurde das Medium von den Zellen genommen und abermals zweimal mit Neurobasalmedium, diesmal mit B-27 und L-Glutamin versetzt, gewaschen. Nach diesen Waschschritten wurde zu den Zellen in einem Verhältnis von 1:1 frisches und konditioniertes Medium zu den Zellen gegeben.

Für die Durchführung der Immunpräzipitationen von RFP-Fusionsproteinen und asso-

ziierter mRNA (Abschnitt 2.4.2) wurden die Cortex-Neuronen nach 7 *div* (*days in vitro*, Tagen in Kultur) mit RFP-Fusionskonstrukten (Tab. 2-3, 2-4, 2-5) über Ca₃(PO₄)₂-Präzipitation transfiziert. Pro Ansatz wurde eine 10 cm Schale transfiziert. Es wurden 60 μ g des jeweiligen RFP-Konstrukts mit Wasser auf ein Volumen von 540 μ L aufgefüllt. Dann wurden 60 μ L 2M CaCl₂ tropfenweise in den Ansatz pipettiert, während dieser leicht gemischt wurde. Auf die gleiche Weise wurden 600 μ L 2x BBS pH6,96 dazu gegeben. Nach einer Inkubation von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde der Ansatz zu den Zellen getropft und es folgte eine Inkubation von 3–4h bei 37 °C und 5 % CO₂. Danach wurden die Zellen 5 mal mit vorgewärmtem HBSS gewaschen, anschließend frisches Neurobasalmedium mit B-27 und L-Glutamin zugegeben und die Zellen bis zur weiteren Bearbeitung für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Die Transduktion der Hippocampus-Neuronen erfolgte nach 7 *div*. Es wurde pro *well* ein so großes Volumen der Virussuspension zu den Zellen pipettiert, dass eine *multiplicity of infection* (MOI) von 100 enstand. Das heißt es sind 100 mal mehr Viruspartikel wie ausplattierte Zellen in dem Ansatz enthalten. Um die MOI zu berechnen wurde die in Abschnitt 2.3.3 ermittelte Konzentration der Virussuspension und die Zahl der ausplattierten Neuronen verwendet.

2.3.6 Immunzytochemische Färbungen primärer Neuronen (IZC)

Der spezifische Nachweis von Proteinen in Neuronen des Hippocampus erfolgte mittels Immunzytochemie (IZC). Dafür wurden die Zellen fünf Tage nach der Transfektion oder sieben Tage nach der Transduktion (Abschnitt 2.3.5) einmal mit 1 x PBS gewaschen und danach 15 Minuten mit Fixierungspuffer fixiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, für 3–5 Minuten mit Permeabilisierungspuffer permeabilisiert und abermals dreimal mit 1 x PBS gewaschen. Die Möglichkeit der unspezifischen Bindung von Antikörpern an das Präparat wurde durch Blockierung mit Blockingpuffer (IZC) für mindestens 2h bei Raumtemperatur verhindert. Primäre Antikörper wurden in Blockingpuffer verdünnt und die Zellen damit über Nacht bei 4 °C oder 2h bei 37 °C inkubiert. Zur Entfernung von überschüssigen Antikörpern wurden die Zellen dreimal für 10 Minuten mit 1 x PBS gewaschen. Die fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörper wurden auch in Blockingpuffer verdünnt und für 45 Minuten mit den Zellen inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit 1 x PBS, wurden die Deckgläser mit Permaflour (Thermo Fisher Scientific) auf Objektträgern (Assistent) eingebettet.

2.3.7 Mikroskopie

Die Aufnahmen der immunzytochemischen Färbungen erfolgte entweder mit dem Mikroskop IX81 von Olympus oder am konfokalen Mikroskop DM IRE2 von Leica. Die Analyse der mit Lentiviren transduzierten Neuronen erfolgte am Mikroskop IX81 von Olympus.

Die Studien zu den funktionellen Analysen von Mutationen im N-terminalen Bereich von Shank3, bei denen es sich zum Teil um ko-Lokalisationsstudien handelte, erfolgten mit dem konfokalen DM IRE2 Mikroskop von Leica. Pro transfiziertem Konstrukt wurden neun Zellen aufgenommen. Quantitative Auswertungen wurden mit dem Programm ImageJ durchgeführt. Von jeder Zelle wurden drei distale (150–200 μ m Entfernung vom Zellsoma) Abschnitte von 10 μ m analysiert. Zur statistischen Analyse wurde mit dem Programm SPSS eine einfaktorielle ANOVA mit einer Fisher LSD (*least significant difference)-post hoc* Analyse gerechnet.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Westernblot

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte über eine SDS-Gelelektrophorese nach Lämmli (1970). Mit Lämmli-Puffer versetzte Proteinproben wurden für 5 Minuten bei 95 °C gekocht und auf ein diskontinuierliches SDS-Acrylamidgel aufgetragen. Der Acrylamidgehalt des Trenngels richtete sich nach der Größe der aufzutrennenden Proteine (10%: 40–100 kDa, 8%: 100–250 kDa, Pipettierschema siehe Tabelle 2-12). Die Gelelektrophorese erfolgte bei 130–180 V, bis die gewünschte Trennung der Proteine erreicht war. Als Größenmarker diente der *PageRuler Plus Prestained Protein* (Fermentas/Thermo Fisher Scientific).

Zum Nachweis von spezifischen Proteinen wurden diese dann auf eine Membran transferiert und mittels spezifischem Antikörper detektiert. Der Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran (0,45µm, Whatman) erfolgte in Transferpuffer bei 4°C für 60–90 Minuten bei 400mA. Die Membran wurde dann für 30–90 Minuten in TBST je nach Antikörper mit 5% Milchpulver oder 5% BSA geblockt. Für die Hybridisierung wurde der primäre Antikörper in dem jeweiligen Blockingpuffer verdünnt und die Membran damit 1–2h oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Membran 3 mal 10 Minuten in TBST gewaschen und für 45–60 Minuten mit dem entsprechenden HRP (*horse raddish peroxidase*)-gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert. Nach 3 mal 10 minütigem Waschen mit TBST wurden die Signale mittels ECL *pierce[®] western blotting substrate* (Thermo Fisher Scientific) nach Angaben des Herstellers auf Röntgenfilmen (*Cronex5 Medical X-Ray Film*, Agfa) oder für quantita-

tive Analysen über das Geldokumentationssystem ChemiDoc XRS (Biorad) detektiert. Die weitere quantitative Auswertung erfolgte mit der Software Image Lab (Biorad). Die Werte der detektierten Proteine wurden auf die Werte von Referenzproteinen normalisiert, meist Proteine des Zytoskeletts (β -Actin/ β -III-Tubulin) oder Haushaltsproteine (GAPDH). Die statistische Auswertung von Westernblot-Analysen erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism. Es wurde ein gepaarter t-Test mit einem Signifikanzniveau von α =0,05 gerechnet.

	10 % Trenngel	8% Trenngel	Sammel- gel
Wasser	7,9 mL	9,3 mL	2,7 mL
30% Acrylamid (Carl Roth)	6,7mL	5,3 mL	0,67 mL
1 M Tris/HCl, pH6,8			0,5 mL
1,5 M Tris/HCl, pH8,8	5 mL	5mL	
10% SDS	200 <i>µ</i> L	200 <i>µ</i> L	40 <i>µ</i> L
TEMED (Sigma)	8 <i>µ</i> L	12 <i>µ</i> L	4µL
APS (Sigma)	200 <i>µ</i> L	200 <i>µ</i> L	40 <i>µ</i> L

Tab. 2-12: Pipettierschema für SDS-Polyacrylamid-Gele. Angaben sind für 2 Gele

2.4.2 Immunpräzipitation von RFP-Fusionsproteinen und assoziierter mRNA aus primären Neuronen

Die Präzipitation von RFP-Fusionsproteinen und daran assoziierter mRNA-Moleküle wurde mit Hilfe von an Agarose gekoppelten RFP-Bindeproteinen (RFP-Trap[®], Chromotek) unter RNase freien Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden alle Puffer in DEPC-behandeltem Wasser angesetzt.

Die transfizierten Cortex-Neuronen (Abschnitt 2.3.6) wurden nach 24 h zweimal mit HBSS ohne Phenolrot gewaschen, pro 10 cm Schale 450 μ L Lysispuffer (mit 1 μ L/ml RNasin plus (Promega) und *cOmplete Protease Inhibitor* ohne *EDTA* (Roche)) zugegeben und nach 15 Minuten Inkubation auf Eis die Lysate in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt. Es folgte eine Zentrifugation für 20 Minuten bei 13000 xg und 4 °C. Die Lysate wurden in neue 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt, 80 μ L als Inputprobe entnommen und der Rest angepasst auf 200 mM NaCl. 30 μ L des RFP-Traps[®] wurden parallel dazu 5 mal mit Lysispuffer (á 500 μ L, 1 Minute, 1000 xg, 4 °C) gewaschen und dann die Lysate über Nacht mit der Matrix bei 4 °C rotierend inkubiert. Die Matrix wurde mittels Zentrifugation (s. o.) präzipitiert und der Überstand verworfen. Nicht gebundene Proteine und mRNA-Moleküle wurden durch 6 maliges Waschen mit Lysispuffer entfernt. Beim letzten Waschschritt wurden 10% der Matrix als präzipitierte Proteinprobe abgenommen. Die Matrix wurde dafür in 40μ L 1 x Lämmli-Puffer aufgenommen.

Die RNA wurde eluiert, indem zur restlichen pelletierten Matrix 100μ L Elutionspuffer gegeben wurde und der Ansatz für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert wurde. Die Aufreinigung der mRNA erfolgte nach Abschnitt 2.2.7, von der dann für eine RT-qPCR von den zu vergleichenden Proben die selben Volumina eingesetzt wurden. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism. Es wurde eine mehrfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit einer *Bonferroni posthoc* Test und einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0.05$ gerechnet.

2.4.3 Immunpräzipitation von DDX1 und assoziierter mRNA aus Mausgehirn

Die Aufreinigung von DDX1 und daran assoziierter mRNA-Moleküle erfolgte mit spezifischen Antikörpern unter RNase-freien Bedingungen aus Mausgehirn. Von drei Mäusen wurden die Gehirne aus dem Schädel präpariert und in IP-Puffer (mit 1 μ L/ml RNasin (Promega) und *cOmplete Protease Inhibitor* (Roche)) mittels Glaspotter aufgeschlossen. Das Lysat wurde zunächst um grobe Gewebereste zu entfernen für 10 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert, dann zur weiteren Aufreinigung für 30 Minuten bei 13.000 rpm. Nach dieser Zentrifugation wurde die Konzentration von NaCl auf 400 mM eingestellt. Das Gehirnlysat wurde für 30 Minuten durch die Zugabe von Protein A/G Sepharose (Santa Cruz Biotechnology) vorgereinigt, die zuvor für 30 Minuten mit jeweils 0,1 μ g/mL BSA, Hefe-tRNA und Glycogen (Sigma) blockiert wurde. Von diesem gereinigten Lysat wurde die Rohlysatprobe entnommen. Dann wurde das Lysat in entsprechende Volumina aufgeteilt und jeweils 5 μ g des entsprechenden Antikörpers über Nacht zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 4°C.

Die Antikörper wurden dann durch die Zugabe von 90 μ L Protein A/G Agarose pro Ansatz und anschließender Inkubation für 90 Minuten bei 4°C an die Matrix gekoppelt. Nachfolgende Zentrifugation bei 1500xg ermöglichte das Pelletieren der Agarose. Der Überstand wurde verworfen und nicht gebundenen Proteine und mRNA-Moleküle durch 6 maliges Waschen mit IP-Puffer entfernt. Die Agarose wurde zuletzt in 100 μ L nukleasefreiem Wasser aufgenommen und 20 μ L für die Proteinanalyse entnommen. Zu dem Rest wurden 7 μ L ProteinaseK (20 mg/mL, Invitrogen) zugegeben und 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Von dem Überstand wurde dann die Gesamt-RNA nach Abschnitt 2.2.7 isoliert.

3 ERGEBNISSE

3.1 Weitere Charakterisierung des KIF5c-assoziierten Ribonukleopartikels

Der Mechanismus, der dem dendritischen Transport von bestimmten mRNAs hin zur Synapse zu Grunde liegt, ist im Detail noch nicht aufgeklärt. Die Identifizierung eines KIF5c-assoziierten *messenger* Ribonukleopartikels (mRNPs), im Weiteren mit KIF5c-mRNP abgekürzt, trug zum weiteren Verständnis bei (Kanai *et al.,* 2004).

Die mRNAs der drei Gerüstproteine Shank1, Shank2 und Shank3 sind alle im Cortex von Mausgehirnen exprimiert. Neben der Shank1-mRNA ist auch die für Shank3 kodierende mRNA im Hippocampus dendritisch lokalisiert (Boeckers *et al.,* 2004). Für die Shank1-mRNA konnte gezeigt werden, dass sie mit dem KIF5c-mRNP assoziiert ist, weshalb man davon ausgeht, dass der Transport innerhalb dieser Partikel stattfindet (Falley *et al.,* 2009). Es konnte jedoch noch nicht gezeigt werden, welches Protein aus dem Transportpartikel die Assoziation der Shank1-mRNA vermittelt. Die Shank3-mRNA konnte bis jetzt nicht in dem KIF5c-mRNP nachgewiesen werden. Deshalb sollte untersucht werden, ob die Shank3-mRNA mit Proteinen aus dem mRNP angereichert werden kann. Die Shank2-mRNA ist im Hippocampus nicht dendritisch lokalisiert, jedoch im Cerebellum in den Dendriten der Purkinje Zellen zu detektieren (Boeckers *et al.,* 2004), weshalb auch in diesem Fall mRNA-Bindeproteine identifiziert werden sollten, die mit diesem Transkript interagieren könnten.

Daher wurden im Folgenden die Interaktionen von bekannten dendritischen mRNA-Bindeproteinen, die auch in dem KIF5c-mRNP nachgewiesen werden konnten, mit den mRNAs der Shank-Proteine untersucht.

3.1.1 RFP-Immunpräzipitation dendritischer mRNA-Bindeproteine

Die Untersuchung von Protein-RNA Interaktionen erfolgte mittels RNase-freier RFP-Immunpräzipitation in kultivierten Neuronen des Cortex (*R. norvegicus*). Zunächst wurden die Proteine Pura, Staufen1 und Staufen2 in den Mittelpunkt der Untersuchung gestellt. Diese Proteine wurden in KIF5c-mRNPs nachgewiesen und sind mRNA-Bindeproteine, denen eine Rolle im dendritischen mRNA-Transport zugeschrieben wird (Kanai *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2001). Neben dem jeweiligen Protein von Interesse wurden außerdem die Proteine PABP und Pist untersucht. PABP bindet Poly-(A)-Schwänze von reifen Transkripten und dient somit als Positivkontrolle. Hingegen kann Pist keine mRNAs binden und ist deshalb als Negativkontrolle geeignet.

Um die Assoziation mit mRNAs analysieren zu können, wurden RFP-Fusionsproteine in primären corticalen Neuronen aus der Ratte nach 7 *div* (*days in vitro*, Tage in Kultur)
exprimiert. Nach 24h wurde die Expression der Fusionsproteine anhand der RFP-Fluoreszenz am Mikroskop überprüft und die Zellen lysiert. Von diesem Zelllysat wurden Proben für die Protein- und RNA-Analysen entnommen, die als Rohlysat bezeichnet werden, um daran die Expression überprüfen zu können. Über RFP-Bindeproteine, die an eine Agarosematrix gekoppelt sind (RFP-Trap[®]), wurden dann aus den Rohlysaten die jeweiligen Fusionsproteine und daran assoziierte mRNA-Moleküle aufgereinigt (Abschnitt 2.3.5 und 2.4.2). Die erfolgreiche Präzipitation aller Fusionsproteine wurde über eine Westernblot-Analyse und die angereicherte mRNA über RT-qPCR (Reverse Transkriptase quantitative *real time* PCR) nachgewiesen. In den drei Analysen für die verschiedenen Proteine wurden die mRNAs der Gerüstproteine Shank1, Shank2 und Shank3 sowie von HPRT und β-III-Tubulin analysiert. Die beiden letzten mRNAs dienten als Kontrollen, da dies Transkipte sind, die nicht dendritisch lokalisiert sind.

Um zu klären, ob die Expression der untersuchten mRNAs in allen Ansätzen gleich war, wurde zunächst die mRNA der Rohlysate analysiert. Dafür wurde aus diesen Proben die Gesamt-RNA isoliert und anschließend pro Ansatz das gleiche Volumen für eine RT-qPCR eingesetzt. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes *SYBR green*; die Ct-Werte wurden wie in Abschnitt 2.2.8 beschrieben bestimmt. Mit dem Programm REST2009 und den ermittelten Ct-Werten konnten dann die relative Menge eines Transkriptes bezogen auf den Ansatz RFP bestimmt werden. Die Auswertung von jeweils drei unabhängigen Experimenten ist in Abbildung 3-1 dargestellt. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in den Mengen der Transkripte bei den verschiedenen Ansätzen festgestellt. Die Expression der RFP-Fusionsproteine führten also nicht zu einer verstärkten Expression oder einem verstärkten Abbau der untersuchten mRNAs.



Abb. 3-1: Ergebnis der RT-qPCR Analyse von Gesamt-RNA der Rohlysate Dargestellt sind die relativen Mengen der jeweiligen Transkripte bezogen auf das Zelllysat der mit dem RFP-Leervektor transfizierten Zellen (RFP=1, nicht gezeigt). Die Auswertung erfolgte mit dem Programm REST2009. Für die statistische Analyse wurde mit dem Programm GraphPad Prism eine mehrfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit einem Signifikanzniveau α =0,05 gerechnet. Fehlerbalken: Standardfehler.





A, **C**, **E** Dargestellt sind die Proteinlysate aus primären corticalen Neuronen, die die jeweils angezeigten RFP-Fusionsproteine bzw. nur RFP exprimierten. Die Fusionproteine wurden mittels RFP-Trap präzipitiert und anschließend mit einem spezifischen RFP-Antikörper im Westernblot analysiert. **B**, **D**, **F** Ergebnis der RT-qPCR Analyse an den Präzipitaten aufgereinigter mRNAs. Gezeigt sind die relativen mRNA-Anreicherungen der jeweiligen Transkripte bezogen auf RFP. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm REST2009, die statistische Analyse mit dem Programm GraphPad Prism. Mehrfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA), *Dunnett´s multiple comparison*, Vergleich mit RFP. **B** p<0,0001 (PABP: Shank1, Shank2, Shank3, β-III-Tubulin), p=0,0003 (PABP: HPRT), p= 0,0467 (Pura: Shank2) **D** p<0,0001 (PABP: Shank1, Shank2, Shank3, HPRT, β-III-Tubulin) **F** p<0,0001 (PABP: HPRT, β-III-Tubulin) p=0,0012 (PABP: Shank2) p=0,0015 (PABP: Shank3) Fehlerbalken: Standardfehler

In der Abbildung 3-2 sind die Ergebnisse der Immunpräzipitationen der Proteine Pura, Staufen1 und Staufen2 dargestellt. Die Westernblot-Analysen (Abb. 3-2 A, C, E) zeigen, dass alle Proteine in den primären corticalen Neuronen exprimiert wurden (Rohlysate) und mittels RFP-Trap[®] aufgereinigt werden konnten (Präzipitate). Für die Analyse der ko-präzipitierten mRNA-Moleküle wurde die Gesamt-RNA der Präzipitatproben aufgereinigt und auf die gleiche Weise wie die Rohlysatproben analysiert.

Die statistische Auswertung dreier unabhängiger Experimente ist jeweils neben der Westernblot-Analyse als Balkendiagramm dargestellt (Abb. 3-2 B, D, F). Wie erwartet konnten mit dem PABP-Fusionsprotein alle getesteten Transkripte signifikant angereichert werden. Im Gegensatz dazu war dies mit RFP-Pist nicht möglich. Die Shank1-mRNA wurde von keinem der Proteine signifikant angereichert. Jedoch zeigten sowohl Staufen1 als auch Staufen2 für die Shank1-mRNA eine leichte Assoziation, die nicht signifikant war (Abb. 3-2 D und F). Auch das Transkript von Shank3 konnte mit keinem der Proteine angereichert werden. Es konnte mit diesem Assay aber gezeigt werden, dass die mRNA von Shank2 mit dem Protein Pura signifikant angereichert wurde (Abb. 3-2 B). Staufen1 und Staufen2 zeigten auch für diese mRNA eine leichte Anreicherung, die nicht signifikant war (Abb. 3-2 D und F). Die Anreicherung der Shank2-mRNA mit Pura ist ein Hinweis, dass diese mRNA in dem KIF5c-mRNP enthalten ist.

3.1.2 Immunpräzipitation dendritischer mRNA-Bindeproteine aus Mausgehirn

Das Protein DDX1 gehört zur Familie der RNA-Helikasen und ist in KIF5c-mRNPs vertreten (Kanai et al., 2004; Falley et al., 2009). Neben DDX1 ist auch FMRP in dem KIF5c-mRNP zu finden. FMRP reprimiert die Translation mehrerer dendritisch lokalisierter Transkripte an der Synapse und da es ein Bestandteil des KIF5c-mRNP ist, wahrscheinlich auch während des Transports vom Soma in die Dendriten. Erst auf einen Stimulus hin wird die reprimierende Wirkung aufgehoben und das entsprechende Protein kann synthetisiert werden. Für FMRP wurden schon Ziel-mRNAs identifiziert, zu denen die für Sapap1-3, PSD95 und Shank1 kodierenden mRNAs zählen (Schütt et al., 2009; Darnell et al., 2011). Um zu untersuchen, ob DDX1 die gleichen Transkripte wie FMRP bindet, wurden die Interaktionen dieser Proteine mit dendritisch lokalisierten mRNAs mittels Immunpräzipitation aus Mausgehirn analysiert. Dafür wurde sowohl das endogene DDX1 als auch FMRP aus Mausgehirn mit spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert (Abschnitt 2.4.3). Als Negativkontrolle diente der unspezifische Immunglobulin G Antikörper (IgG). Als Positivkontrolle diente das mRNA-Bindeprotein PABP. Um zu überprüfen, ob die Präzipitation der Proteine erfolgreich war, wurde eine Westernblot-Analyse durchgeführt (Abb. 3-3 A). Sowohl DDX1 als auch FMRP und PABP waren in den Rohlysaten nachzuweisen

und konnten präzipitiert werden, wobei DDX1 deutlich schlechter präzipitiert wurde als FMRP oder PABP. Mit der Negativkontrolle IgG wurde keines der untersuchten Proteine präzipitiert.

Für die Analyse der ko-präzipitierten Transkripte wurde von allen Präzipitatproben die Gesamt-RNA isoliert und gleiche Volumina in einer RT-qPCR eingesetzt. Die relative mRNA-Anreicherung wurde auf die Negativkontrolle IgG normalisiert und in einem Balkendiagramm dargestellt (Abb. 3-3 B). Mit DDX1 konnte keines der getesteten Transkripte ko-präzipitiert werden. Eine Aussage aus diesem Experiment, das zudem nur einmal durchgeführt wurde, ist jedoch schwer möglich, da die Präzipitation von DDX1 aus dem Rohlysat sehr schwach war. Mit FMRP konnten dagegen die mRNAs von Shank1, PSD95 und Sapap3 ko-präzipitiert werden, aber nicht die von IRSp53. Mit PABP wurden wie erwartet alle analysierten Transkripte angereichert.



Abb. 3-3: Immunpräzipitation dendritischer mRNA-Bindeproteine aus Mausgehirn A Westernblot der Rohlysate (RL) und der jeweiligen Präzipitate. Nachweis der Präzipitation mittels spezifischer Antikörper, die rechts neben dem Westernblot angezeigt sind. DDX1, FMRP und PABP konnten präzipitiert werden. Mit IgG wurden keine Proteine präzipitiert. B RT-qPCR von aufgereinigter mRNA der Präzipitate. Dargestellt sind die relativen mRNA-Anreicherungen der angegebenen Transkripte, bezogen auf die Negativkontrolle IgG.

3.2 Etablierung eines lentiviralen *Knockdown* von Proteinen in hippocampalen Neuronen

Der Abbau einer mRNA über den RNAi-Weg stellt eine Möglichkeit dar, die Expression von Genen in Zellen gezielt zu verändern, indem sogenannte siRNAs in die Zellen eingebracht werden. Während viele Zelltypen mit spezifischen siRNAs transfiziert werden können, lassen sich Neuronen häufig schlecht transfizieren. Der Einsatz von lentiviralen Vektoren, die auch postmitotische Zellen transduzieren, stellt daher eine Möglichkeit dar auch in Neuronen den RNAi-Weg für den spezifischen *Knockdown* von Proteinen zu nutzen. Mit Hilfe der Lentiviren werden shRNAs in den Neuronen zur Expression gebracht, die dann zu siRNAs prozessiert werden. Dies führt dazu, dass das Zielprotein dauerhaft ausgeschaltet wird (Abschnitt 2.3.2). In diesem Abschnitt der Arbeit wird die Etablierung eines lentiviralen *Knockdown* für die Proteine DDX1 und Staufen2 in hippocampalen Rattenneuronen dokumentiert.

3.2.1 Mit dem Transfervektor pGIPZ produzierte Lentiviren transduzieren keine hippocampalen Neuronen der Ratte

Lentivirale Vektoren werden in HEK293T-Zellen produziert, indem drei Plasmide in die Zellen transfiziert werden (Tab. 2-4, 2-5 und Abschnitt 2.3.1). Auf dem Plasmid psPAX2 liegen Gene für die Replikation sowie für das Verpacken der Lentiviren. Das Plasmid pMD2.G kodiert für das Oberflächenprotein VSV.G (vesicular stomatitis virus *G glycoprotein*), das an Phospholipide der Membran von Zielzellen bindet und so die Transduktion vermittelt. Der dritte Vektor, der für die Produktion benötigt wird, ist ein Transfervektor. Er trägt die genetische Information, die in den Lentivirus verpackt wird, in diesem Fall eine Expressionskassette mit der shRNA, die eine Länge von 19 Nukleotiden hat, und ein Gen für GFP. Diese Kassette wird mit in die Lentiviren verpackt und somit über die Transduktion in die Zielzelle gebracht. Nach der Transfektion, wurde das Medium der HEK293T-Zellen nach 24 und 48h geerntet, die lentiviralen Partikel mittels Ultrazentrifugation aufkonzentriert und diese dann für die Transduktion genutzt. Transduzierte Zellen können über das Protein GFP mikroskopisch identifiziert werden. Für die Produktion von Lentiviren existieren verschiedene Transfervektoren, welche die shRNA-Kassette tragen. In dieser Arbeit wurde zunächst der Transfervektor pGIPZ der Firma Open Biosystems/Thermo Fisher Scientific genutzt. Pro Zielprotein wird ein Set von Vektoren zur Verfügung gestellt, bei dem jedes Plasmid eine shRNA trägt, die zu einer anderen Sequenz der Ziel-mRNA komplementär ist. Um nun zu testen, ob mit dem pGIPZ produzierte Lentiviren in der Lage sind, auch hippocampale Neuronen aus der Ratte zu transduzieren, wurden an transduzierten Neuronen immunzytochemische Färbungen durchgeführt. Dafür wurden Zellen nach 7 div mit Lentiviren transduziert,

Ergebnisse

die eine Kontroll-shRNA exprimierten. Die Seguenz der Kontroll-shRNA weist keine Homologien zu bekannten Genen von Säugern auf. Nach weiteren sieben Tagen in Kultur, wurden die Neuronen fixiert und das neuronale Protein MAP2 mit Hilfe von fluoreszenzgekoppelten Antikörpern detektiert. Die Aufnahmen der Zellen erfolgten am Mikroskop IX81 von Olympus. In den Präparaten waren viele Zellen GFP-positiv, jedoch entsprachen sie von der Morphologie eher Gliazellen als Neuronen. Die Gegenfärbung mit dem neuronalen Protein MAP2 zeigte dann, dass die GFP-positiven Zellen kein MAP2-Signal aufwiesen. In Abbildung 3-4 ist expemplarische eine Aufnahme der immunzytochemischen Färbung dargestellt. Das in der Aufnahme gezeigte Neuron (MAP2-positiv, blau) wies kein GFP-Signal auf und war demnach nicht transduziert. Daher lässt sich schlussfolgern, dass die mit dem pGIPZ-Vektor produzierten lentiviralen Vektoren hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Transduktion von Zellen funktional sind. Jedoch sind sie nicht in der Lage speziell Neuronen in Kultur zu transduzieren oder die shRNA-Kassette, die auch für das GFP kodiert, zu exprimieren. Das pGIPZ-System konnte daher zum Ausschalten von Proteinen in primären hippocampalen Neuronen hier nicht angewendet werden.



Abb. 3-4: Immunzytochemische Färbung von transduzierten primären hippocampalen Neuronen

Nach sieben Tagen in Kultur wurden die Zellen mit dem pGIPZ-Kontroll-Lentivirus transduziert und nach weiteren sieben Tagen fixiert. Mittels immunzytochemischer Färbung wurde das neuronale Protein MAP2 detektiert (blau). GFP ist der Marker für mit dem Lentivirus transduzierte Zellen (grün). Der Stern zeigt eine solche Zelle an. Der Pfeil zeigt ein Neuron. *merge*: Überlagerung. Balken=20µm

3.2.2 Einführung des pLVTHM Transfervektors zur Produktion von Lentiviren

Ein weiteres System zur Produktion von lentiviralen Vektoren, die shRNAs exprimieren, basiert auf dem Plasmid pSuper und dem Transfervektor pLVTHM (Brummelkamp *et al.,* 2002; Wiznerowicz *et al.,* 2003). Dieser Transfervektor wurde schon erfolgreich für die Produktion von Lentiviren, die shRNAs in hippocampalen Neuronen exprimieren,

Ergebnisse

genutzt (Verpelli *et al.*, 2011). Bei diesem System werden die shRNAs gegen die ZielmRNA nach festgelegten Parametern mit dem Programm Oligoengine entworfen. Diese Sequenzen werden dann mit Überhängen für die Klonierung als Oligonukleotide synthetisiert und in den Vektor pSuper kloniert. Mit dem so generierten Plasmid kann die Effizienz des *Knockdown* auf die Ziel-mRNA bzw. das Zielprotein getestet werden. Eine effiziente shRNA wird dann aus dem pSuper in den Transfervektor pLVTHM gebracht, mit dem die Produktion der Lentiviren vorgenommen wird.

Zunächst wurde mit immunzytochemischen Färbungen untersucht, ob die mit dem Transfervektor pLVTHM produzierten Lentiviren in der Lage sind primäre hippocampale Neuronen zu transduzieren. Dafür wurden die Neuronen nach 7 div mit einem Lentivirus, der eine Kontroll-shRNA exprimierte, transduziert und nach weiteren sieben Tagen in Kultur fixiert. Die Kontroll-shRNA ist komplementär zur mRNA von Luciferase und weist damit keine Homologien zu bekannten Säugergenen auf. Der pLVTHM mit der Kontroll-shRNA wurde für diese Arbeit zur Verfügung gestellt (Carlo Sala, Mailand, Italien). Im Gegensatz zu den mit den pGIPZ-Lentiviren transduzierten Kulturen, waren in dieser Analyse vorwiegend Zellen transduziert, die von der Morphologie neuronalen Zellen entsprachen. Mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern wurde wieder das neuronale Protein MAP2 detektiert und die Zellen mikroskopisch analysiert. Die MAP2-Färbung zeigte dann, dass es sich bei den transduzierten Zellen um Neuronen handelte. Exemplarisch für die transduzierten Kulturen ist in Abbildung 3-5 ein immunzytochemisch gefärbtes Neuron dargestellt. Der weiße Pfeil weist auf eine transduzierte und MAP2 positive Zelle. Die mit dem Transfervektor pLVTHM produzierten Lentiviren eignen sich demnach für die Transduktion von hippocampalen Neuronen und wurden für den Knockdown der Proteine DDX1 und Staufen2 verwendet.



Abb. 3-5: Transduktion von primären hippocampalen Neuronen mit dem pLVTHM-Kontroll-Lentivirus.

Nach sieben Tagen in Kultur wurden die Zellen mit dem pLVTHM-Kontroll-Lentivirus transduziert und nach weiteren sieben Tage Zellen fixiert. Mittels Immunzytochemie wurde das neuronale Protein MAP2 detektiert (blau). GFP ist ein Marker für transduzierte Zellen (grün). *merge*: Überlagerung. Balken=20µm

In Abschnitt 3.1.2 wurde mit Immunpräzipitationen schon untersucht, ob DDX1 mit dendritischen mRNAs assoziiert ist. Jetzt sollte das pSuper/pLVTHM-System genutzt werden, um einen *Knockdown* von DDX1 in primären Neuronen zu etablieren. Es wurden fünf unterschiedliche shRNAs, die über das gesamte Transkript von *ddx1* verteilt liegen, ausgewählt und in den pSuper kloniert. Die entworfenen Oligonukleotide sind in Tabelle 2-8 aufgeführt. Die *Knockdown*-Effizienz wurde in HEK293T-Zellen ermittelt. Dazu wurden die Zellen mit einem Vektor, der ein RFP-DDX1 Fusionsprotein kodiert und jeweils einem der pSuper-shRNA Plasmide transient ko-transfiziert. Als Kontrolle diente pSuper mit einer Staufen2-shRNA. Nach 48 h Kultivierung wurde die Expression des Fusionsproteins anhand der RFP-Fluoreszenz am Mikroskop überprüft und die Zellen lysiert. In einer Westernblot-Analyse wurde das Fusionsprotein mit einem RFP-Anti-körper detektiert (Abb. 3-5 A) und die Menge in Abhängigkeit der Expression der unterschiedlichen shRNAs bestimmt (Abb. 3-5 B). Die Werte des RFP-Fusionsproteins wurden auf GAPDH normalisiert und auf einen Ansatz, der das RFP-DDX1 Fusionsprotein allein exprimierte, bezogen.

Das Diagramm zeigt, dass die shRNA 5 die Menge des Fusionsproteins im Durchschnitt auf 30% reduzierte. Daher wurde diese shRNA in den Transfervektor pLVTHM kloniert und für die Produktion der lentiviralen Vektoren genutzt.



Abb. 3-5 Validierung der *Knockdown*-Effizienz verschiedener DDX1-shRNAs in HEK293T Zellen

A Die Zellen wurden mit einem RFP-DDX1 Fusionskonstrukt und verschiedenen pSuper-Vektoren transient ko-transfiziert. Leer: Ansatz, bei dem keine DNA transfiziert wurde. Striche (- - - -): kein pSuper wurde ko-transfiziert. 48h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und das Fusionsprotein mit einem RFP Antikörper im Westernblot detektiert. GAPDH dient als Ladekontrolle. B Quantitative Auswertung von drei unabhängigen Experimenten. Die Menge des Fusionsproteins wurde auf die von GAPDH abgeglichen und alle Ansätze auf den Kontrollansatz (RFP-Leervektor) bezogen. Gepaarter t-Test p=0,0035 (shRNA 2) p=0,0028 (shRNA 5) Fehlerbalken: Standardabweichung

Die mit dem shDDX1-pLVTHM produzierten Lentiviren wurden nun hinsichtlich ihrer Fähigkeit auch das endogene DDX1-Protein in primären Neuronen zu reduzieren untersucht. Dafür wurden zunächst Neuronen des Cortex aus der Ratte nach 7 *div* mit diesem Lentivirus transduziert. Als Kontrolle diente in diesem Experiment ein Ansatz, bei dem die Zellen nicht transduziert worden sind, demnach also keine shRNA exprimierten. Nach weiteren sieben Tagen in Kultur wurden die Zellen lysiert und die Menge des Proteins DDX1 mittels Westernblot analysiert (Abb. 3-7). Das Protein β -III-Tubulin (ein für Neuronen spezifisches Protein) diente als Ladekontrolle. Abbildung 3-7 A zeigt, dass die Menge von DDX1 stark reduziert war, wenn die Neuronen mit dem Lentivirus transduziert wurden. Die ermittelten Proteinmengen von DDX1 aus zwei unabhängigen Experimenten wurden jeweils auf β -III-Tubulin normalisiert und mit dem Kontrollansatz verglichen (Abb. 3-7 B). Die Quantifizierung zeigt, dass die Menge von DDX1 auf ungefähr 35 % reduziert war.



Abb. 3-7: Lentiviraler *Knockdown* von DDX1 in primären corticalen Neuronen

A Die Zellen wurden nach 7 *div* transduziert. LV: Lentivirus, Striche (- - -): kein LV, DDX1: LV mit DDX1-shRNA. Nach weiteren sieben Tagen erfolgte die Lyse. Mit einem spezifischen DDX1 Antikörper wurde im Westernblot das Protein DDX1 detektiert. Als Ladekontrolle diente β -III-Tubulin. **B** Quantitative Auswertung von zwei unabhängigen Experimenten. Die Werte von DDX1 wurden auf β -III-Tubulin abgeglichen. Das Diagramm zeigt die relative DDX1-Menge bezogen auf den untransduzierten Ansatz. Gepaarter t-Test Vergleich mit (---): p=0,0003 (DDX1). Fehlerbalken=Standardabweichung

Des Weiteren wurde dieses Experiment auch an hippocampalen Neuronen durchgeführt. Als zusätzliche Kontrolle diente ein Ansatz, bei dem die Neuronen mit dem Kontrollvirus transduziert wurden. Die Westernblot-Analyse ist in Abbildung 3-8 A gezeigt. Es ist zu erkennen, dass die Menge an DDX1 stark reduziert war, wenn der Lentivirus die DDX1-shRNA trug. Im Vergleich zu nicht transduzierten Zellen veränderte sich die Menge nicht, wenn der Kontrollvirus eingesetzt wurde. In Abbildung 3-8 B ist die quantitative Auswertung von vier Experimenten dargestellt. Nach der Normalisierung der Werte von DDX1 auf β -III-Tubulin, wurden sie im Bezug auf den Ansatz ohne Lentivirus in einem Diagramm zusammengefasst. Die Auswertung zeigt, dass die Menge von DDX1 nach der Expression der DDX1-shRNA auf etwa 9% vermindert war. DDX1 konnte also mit Hilfe von lentiviralen Vektoren, die eine spezifische shRNA gegen die DDX1-mRNA trugen, sowohl in primären Neuronen des Cortex als auch des Hippocampus herunterreguliert werden.





A Die Zellen wurden nach 7 div transduziert. LV: Lentivirus, Striche (- - -): kein LV, Ctrl: LV mit Kontroll-shRNA, DDX1: LV mit DDX1-shRNA. Nach weiteren sieben Tagen erfolgte die Lyse. Mit einem spezifischen DDX1 Antikörper wurde im Westernblot das Protein DDX1 detektiert. Als Ladekontrolle diente β-III-Tubulin. B Quantitative Auswertung von vier unabhängigen Experimenten. Die Werte von DDX1 wurden auf β-III-Tubulin abgeglichen. Das Diagramm zeigt die relative DDX1-Menge bezogen auf den untransduzierten Ansatz. Gepaarter t-Test, Vergleich mit untransduziertem Ansatz: p<0,0001 (DDX1). Fehlerbalken=Standardabweichung

3.2.3 Knockdown von Staufen2 in primären Neuronen der Ratte

Das Protein Staufen2 ist ein mRNA-Bindeprotein, das Bestandteil des KIF5c-mRNP ist und eine Rolle im dendritischen Transport von mRNAs spielt (Kanai et al., 2004; Miki et al., 2005). In Abschnitt 3.1.1 wurde das Protein bereits hinsichtlich seiner Fähigkeit mRNAs von Interesse zu binden untersucht. Ein pSuper-Plasmid, das eine Staufen2-shRNA trug, wurde für diese Arbeit zur Verfügung gestellt (Stefan Kindler, UKE, Hamburg). Nach dem Einbringen der shRNA-Kassette in den Transfervektor pLVTHM, wurden lentivirale Vektoren produziert und anschließend untersucht, ob Staufen2 über lentiviralen Knockdown in hippocampalen Neuronen ausgeschaltet werden konnte. Die Durchführung erfolgte wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben. Die Westernblot-Analyse ist in Abbildung 3-9 A gezeigt. Staufen2 liegt in vier Isoformen vor, die jeweils eine Größe zwischen 52 und 62 kDa aufweisen. Im Westernblot ist zu erkennen, dass die Mengen aller Isoformen durch die shRNA deutlich reduziert waren, nachdem die Neuronen die entsprechende shRNA exprimierten. Die Transduktion mit dem Kontrollvirus änderte die Menge des Proteins im Vergleich zu dem untransduzierten Ansatz nicht. Die guantitative Auswertung von vier Experimenten ist in Abbildung 3-9 B dargestellt. Die Werte von Staufen2 wurden auf β-III-Tubulin normalisiert und im Bezug auf den nicht transduzierten Ansatz in dem Diagramm dargestellt. In die Auswertung wurden alle Isoformen mit einbezogen. Das Diagramm zeigt die Reduktion von Staufen2 auf ungefähr 29% im Vergleich zum Kontrollansatz.

Es konnte also auch für das Protein Staufen2 ein erfolgreicher lentiviraler *Knockdown* etabliert werden.



Abb. 3-9: Lentiviraler *Knockdown* von Staufen2 in primären hippocampalen Neuronen

A Die Zellen wurden nach 7 div mit dem angezeigten Lentivirus transduziert. LV: Lentivirus, Striche (- - -): kein LV, Ctrl: LV mit Kontroll-shRNA, Stau2: LV mit Staufen2-shRNA. Die Lyse erfolgte nach weiteren sieben Tagen. Mittels Westernblot und spezifischem Antikörper wurde das Protein Staufen2 detektiert. Als Ladekontrolle diente β-III-Tubulin. B Quantitative Auswertung von vier unabhängigen Experimenten. Die Werte von Staufen2 wurden auf β-III-Tubulin abgeglichen. Das Diagramm zeigt die relative Staufen2-Menge bezogen auf den untransduzierten Ansatz. Gepaarter t-Test, Vergleich mit untransduziertem Ansatz: p=0,0014 (Stau2). Fehlerbalken=Standardabweichung

3.3 Analyse dendritischer mRNA-Bindeproteine mittels lentiviralem *Knockdown* in hippocampalen Neuronen der Ratte

Im Zentrum dieser Arbeit steht die funktionelle Charakterisierung dendritischer mRNA-Bindeproteine, die auch Bestandteil des KIF5c-mRNP sind, um deren Funktion in Neuronen besser verstehen zu können. Im ersten Teil der Arbeit wurden zunächst Interaktionen von Proteinen mit dendritischen mRNAs untersucht. Die Proteine DDX1 und Staufen2 sollten nun mit Hilfe des lentiviralen *Knockdown* in Neuronen ausgeschaltet werden, um sie funktionell näher analysieren zu können. Im Vordergrund stand dabei der Einfluss der beiden Proteine auf Komponenten des KIF5c-mRNP und auf Proteine der postsynaptischen Dichte exzitatorischer Synapsen.

3.3.1 Einfluss des *Knockdown* von DDX1 und Staufen2 auf Komponenten des KIF5c-mRNP

Der etablierte lentivirale *Knockdown* (Abschnitt 3.2) wurde sowohl für DDX1 als auch für Staufen2 in primären Neuronen angewendet, um zu untersuchen welchen Effekt das Ausschalten eines der beiden Proteine auf Komponenten des KIF5c-RNP hat. Als Kontrolle diente der Lentivirus, der die Kontroll-shRNA trug. Die Neuronen wurden nach 7 *div* mit den entsprechenden Lentiviren transduziert und nach weiteren sieben Tagen in Kultur lysiert. Die Zelllysate wurden mittels Westernblot analysiert und die Proteine DDX1, FMRP und Staufen2 detektiert. Als Ladekontrollen dienten β -III-Tubulin und β -Actin.

In Abbildung 3-10 A ist die Westernblot-Analyse nach dem *Knockdown* von DDX1 in hippocampalen Neuronen dargestellt. DDX1 war nach der Transduktion mit dem DDX1-shRNA Lentivirus stark reduziert (wie schon in Abbschnitt 3.2.2 gezeigt). FMRP war in seiner Konzentration nicht verändert, obwohl auf der andere Seite die Menge von DDX1 im KIF5c-mRNP abhängig ist von FMRP (Steffens, medizinische Doktorarbeit, in Vorbereitung). Staufen2 zeigt eine geringeres Signal im Westernblot, verglichen mit dem Kontrollansatz. Die quantitative Auswertung von acht unabhängigen Experimenten ist in Abbildung 3-10 B dargestellt. Nach der Normalisierung der Mengen von DDX1, FMRP und Staufen2 auf die der entsprechenden Kontrollproteine, wurden sie im Bezug auf den Kontrollansatz in einem Diagramm zusammengefasst. Die Mengen von DDX1 und Staufen2 waren signifikant reduziert. Die DDX1-Menge war auf 30% vermindert, die von Staufen2 war um 50% reduziert. Der *Knockdown* von DDX1 hatte dementsprechend einen negativen Einfluss auf die Menge des Proteins Staufen2. FMRP wies keine signifikante Veränderung auf, jedoch zeigt der durchschnittliche Wert eine Tendenz zur Verminderung.

Ergebnisse

Die Westernblot-Analyse nach dem *Knockdown* von Staufen2 ist in Abbildung 3-11 A dargestellt. Auch in dieser Analyse konnte die Verminderung des Zielproteins nach der Transduktion mit dem Lentivirus, der die Staufen2-shRNA exprimierte, gezeigt werden. Das Signal für Staufen2 ist deutlich schwächer im Vergleich mit dem Kontrollansatz (wie in Abschnitt 3.2.2 gezeigt). Auch der exemplarische Westernblot für FMRP zeigt, dass das Signal verringert ist, wenn Staufen2 herunterreguliert war. Das Signal für DDX1 ist dahingegen stärker. Die quantitative Auswertung von sieben unabhängigen Experimenten ist in Abbildung 3-11 B dargestellt. Die Werte der Proteine Staufen2, FMRP und DDX1 wurden auf β -Actin bzw. β -III-Tubulin normalisiert und im Bezug auf den Kontrollansatz gezeigt. Die Menge von Staufen2 war signifikant auf 25% reduziert. Der Mittelwert der FMRP-Menge wies eine Verringerung um 50% auf. Die Menge von DDX1 war wiederum auf 180% erhöht. Das Ausschalten von Staufen2 beeinflusste also auch die Menge des Proteins DDX1. Aber im Gegensatz zum *Knockdown* von DDX1, bei dem das Protein Staufen2 veringert war, erhöhte der Staufen2-*Knockdown* die Menge von DDX1 und auch die Menge des Proteins FMRP war beeinflusst.



Abb. 3-10: Einfluss des lentiviralen *Knockdown* von DDX1 auf Komponenten des Kif5c-mRNP in hippocampalen Neuronen

A Die Zellen wurden nach 7 div mit dem angezeigten Lentivirus (LV) transduziert. Ctrl: LV mit Kontroll-shRNA, DDX1: LV mit DDX1shRNA. Nach weiteren sieben Tagen wurden die Zellen lysiert und mit spezifischen Antikörpern die angezeigten Proteine detektiert. Als Ladekontrolle dienten die Proteine β-III-Tubulin bzw. β-Actin. B Quantitative Auswertung von acht unabhängigen Experimenten. Die Werte von DDX1 und FMRP wurden auf β-III-Tubulin abgeglichen, Das Diagramm zeigt die relative Proteinmenge im Verhältnis zum Kontrollansatz. Gepaarter t-Test, Vergleich mit Ctrl: p<0,0001 (DDX1 und Stau2). Fehlerbalken=Standardfehler





Abb. 3-11: Einfluss des lentiviralen Knockdown von Staufen2 auf Komponenten des Kif5c-mRNP in hippocampalen Neuronen

A Die Zellen wurden nach 7 div mit dem angezeigten Lentivirus transduziert. LV: Lentivirus, Ctrl: LV mit Kontroll-shRNA, Stau2: LV mit Staufen2-shRNA. Nach weiteren sieben Tage wurden die Zellen lysiert und mit spezifischen Antikörpern die Proteine Staufen2, FMRP und DDX1 detektiert. Als Ladekontrolle dienten die Proteine β-Actin und β-III-Tubulin. B Quantitative Auswertung von sieben unabhängigen Experimenten. Die Werte von Staufen2 wurden auf β-Actin abgeglichen, die von DDX1 und FMRP auf β-III-Tubulin. Das Diagramm zeigt die relativen Proteinmengen im Verhältnis zum Kontrollansatz. Gepaarter t-Test, Vergleich mit Ctrl: p<0,0001 (Stau2), p=0,0262 (Fmrp), p=0,0177 (DDX1) Fehlerbalken=Standardfehler

Um zu untersuchen, ob die veränderten Proteinmengen von Staufen2 und DDX1 nach dem DDX1 bzw. Staufen2-*Knockdown* auf eine veränderte Expression der jeweiligen mRNAs zurückzuführen ist, wurden diese quantifiziert. Es wurden dafür wieder hippocampale Neuronen nach 7 *div* mit den jeweiligen Lentiviren transduziert und nach weiteren sieben Tagen in Kultur ein Zelllysat hergestellt. Als Kontrolle dient der Lentivirus, der die Kontroll-shRNA trug. Von den Zelllysaten wurde die Gesamt-RNA isoliert und mittels spezifischer Primer die Transkripte von DDX1, Staufen2 in einer RT-qPCR analysiert. Die Ct-Werte wurden wie in Abschnitt 2.2.8 beschrieben bestimmt und auf die von β-III-Tubulin normalisiert. Die quantitative Auswertung von drei unabhängigen Experimenten für jeweils den *Knockdown* von DDX1 und Staufen2 ist in Abbildung 3-12 zusammengefasst. Abbildung 3-12 A zeigt, dass die Menge der DDX1 mRNA nach der Expression der DDX1-shRNA auf 30% reduziert war. Die Menge der Staufen2 mRNA änderte sich dagegen nicht.

Abbildung 3-12 B zeigt das Experiment für den *Knockdown* von Staufen2. Die Menge der Staufen2-mRNA war auf 30 % reduziert, während die Menge der DDX1-mRNA um den Faktor 7,4 erhöht war. Wie zu erwarten war, konnte in beiden Analysen gezeigt werden, dass dem lentiviralen *Knockdown* des jeweiligen Proteins eine Verminderung der mRNA zu Grunde lag. Im Falle des DDX1-*Knockdown* änderte sich zwar die

Menge des Proteins Staufen2, dessen mRNA-Menge bleibt jedoch unverändert. Dies spricht dafür, dass DDX1 entweder Einfluss auf die Translation der Staufen2-mRNA hat oder das Protein Staufen2 durch das Fehlen von DDX1 vermehrt abgebaut wird. Das Ausschalten von Staufen2 beeinträchtigte dagegen sowohl die Menge des Proteins DDX1 als auch die Expression der DDX1-mRNA. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Proteine DDX1 und Staufen2 von einander abhängig sind, denn der *Knockdown* beeinflusste jeweils die Menge des anderen Proteins und im Fall des Staufen2-*Knock-down* auch die Menge der DDX1-mRNA.



Abb. 3-12: Einfluss des lentiviralen *Knockdown* auf die DDX1- und Staufen2-mRNA Expression in primären hippocampalen Neuronen

A *Knockdown* von DDX1. Ergebnis der RT-qPCR. Die Auswertung von drei unabhängigen Experimenten erfolgte mit dem Programm REST2009. Normalisiert wurden die Werte auf β -III-Tubulin. gepaarter t-Test, Vergleich mit β -III-Tubulin: p=0,0003 (DDX1). Fehlerbalken: Standardfehler **B** *Knockdown* von Staufen2. Die Transkripte wurden auf die gleiche Weise wie in A anlysiert. Gepaarter t-Test, Vergleich mit β -III-Tubulin: p<0,0001 (Stau2), p=0,0118 (DDX1), Fehlerbalken: Standardfehler

3.3.2 Einfluss des *Knockdown* von DDX1 auf Proteine der postsynaptischen Dichte exzitatorischer Synapsen

Um zu untersuchen, welchen Einfluss das Ausschalten von DDX1 nun auf Proteine der postsynaptischen Dichte von exzitatorischen Synapsen hat, wurden hippocampale Neuronen nach 7 *div* mit dem DDX1-shRNA Lentivirus transduziert. Als Kontrolle diente der Lentivirus, der die Kontroll-shRNA trug. Nach weiteren sieben Tagen wurden die Zellen lysiert und Westernblot-Analysen durchgeführt, in denen Proteine der postsynaptischen Dichte aus unterschiedlichen Proteinklassen detektiert wurden. Abbildung 3-13 A zeigt exemplarische Westernblots für die verschiedenen Proteine. Die Mengen der Proteine aus neun unabhängigen Experimenten wurden durch Normalisierung auf Proteine des Zytoskeletts (β -III-Tubulin oder β -Actin) quantifiziert und mit dem Kontrollansatz verglichen (Abb. 3-13 B).

Es wurden zunächst Gerüstproteine, die für den Aufbau der Synapse wichtig sind, auf eine Veränderung der Proteinmenge hin untersucht. Die beiden Proteine PSD95 und IRSp53 schienen durch den *Knockdown* von DDX1 in ihrer Menge nicht verändert zu sein. Die Proteine Shank1 und Shank3 waren dagegen beide signifikant verringert.



Abb. 3-13: Einfluss des *Knockdown* von DDX1 auf Proteine der postsynaptischen Dichte in primären hippocampalen Neuronen

A Die Zellen wurden nach 7 *div* mit dem angezeigten Lentivirus (LV) transduziert. Ctrl: Kontroll-shRNA, DDX1: DDX1-shRNA. Nach weiteren sieben Tagen wurden die Zellen lysiert und mit spezifischen Antikörpern die gezeigten Proteine im Westernblot detektiert. Als Ladekontrolle dienten die Proteine β -Actin und β -III-Tubulin (unten). **B** Quantitative Auswertung von neun unabhängigen Experimenten. Abgeglichen wurden die Werte entweder auf β -III-Tubulin oder auf β -Actin (je nach Größe des Proteins). Das Diagramm zeigt die relativen Proteinmengen im Verhältnis zum Kontrollansatz. Gepaarter t-Test, Vergleich mit Ctrl: p<0,0001 (NR1, mGluR5, GluR1); p=0,0008 (Shank3); p=0,0025 (Shank1). Fehlerbalken=Standardfehler

Außerdem wurde in diesem Experiment untersucht, welchen Einfluss der *Knockdown* von DDX1 auf die Menge sowohl der metabotropen als auch der ionotropen Glutamatrezeptoren der exzitatorischen Synapse hatte. Dafür wurden in der Westernblot-Analyse die Proteine mGluR5, NR1 (Untereinheit des NMDA-Rezeptors) und GluR1 (Untereinheit des AMPA-Rezeptors) detektiert. Alle drei Proteine waren im Vergleich zum Kontrollansatz deutlich verringert (Abb. 3-13 A). Die statistische Analyse bestätigte die Verringerung der Rezeptoruntereinheiten. Die drei Proteine waren signifikant auf etwa 50% reduziert. Es stellte sich jetzt die Frage, welche Signalwege in der Zelle durch die gezeigte Veränderung gestört sein könnten. Die mGluR aktivieren unter anderem den MAP-Kinase Weg. Ein Protein dieser Kaskade ist ERK, welches über Phosphorylierung aktiviert wird und weitere Proteine phosphoryliert. Die Menge von phosophoryliertem ERK (p-ERK) ist also ein Maß für die Aktivierung der Kaskade. Die Mengen sowohl von ERK als auch von p-ERK änderten sich jedoch nicht signifikant nach dem Ausschalten von DDX1. Zusammenfassend kann man sagen, dass der *Knockdown* von DDX1 vor allem Einfluss auf die Mengen von Rezeptorproteinen und von den Proteinen der Shank-Familie hat.

3.3.3 Einfluss des *Knockdown* von DDX1 auf die Expression der mRNAs postsynaptischer Proteine

Um zu untersuchen, ob den in Abschnitt 3.3.2 gezeigten Veränderungen der Proteinmengen eine veränderte mRNA-Expression zu Grunde lag, wurde eine Untersuchung der mRNA-Expression von einigen in Abschnitt 3.3.2 analysierten Proteinen durchgeführt. Nach der Transduktion der Neuronen zum einen mit dem shDDX1-Lentivirus und zum anderen mit dem Kontroll-Lentivirus nach 7 *div* und weiteren sieben Tagen in Kultur wurden die Zellen lysiert und daraus die Gesamt-RNA isoliert. Von dieser wurden dann pro Ansatz die gleichen Mengen in einer RT-qPCR eingesetzt. Die Ct-Werte der Transkripte wurden wie beschrieben bestimmt und die relative mRNA-Expression ermittelt, indem die Werte mit dem Programm REST2009 auf β -III-Tubulin normalisiert und mit dem Kontrollansatz verglichen wurden. In Abbildung 3-14 ist die Auswertung von drei unabhängigen Experimenten dargestellt.



Abb. 3-14: Einfluss des *Knockdown* von DDX1 auf die Expression ausgewählter mRNAs in hippocampalen Neuronen Ergebnis der RT-qPCR. Hippocampale Neuronen wurden nach 7 *div* mit dem shDDX1-Lentivirus bzw. dem Kontroll-Lentivirus transduziert und nach weiteren 7 *div* analysiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm REST2009. Normalisiert wurden die Werte auf β -III-Tubulin. Gepaarter t-Test, Vergleich mit Ctrl: p=0,0004 (IRSp53), p=0,0013 (GluR1), p=0,0175 (mGluR5), p=0,0206 (PSD95), p=0,0389 (Shank1). Fehlerbalken: Standardfehler.

Das Diagramm zeigt, dass die Transkripte von Shank2 und Shank3 nicht verändert waren. Die Transkripte von GluR1, mGluR5, Shank1 und PSD95 schwankten um den Wert 1 und zeigten jeweils nur leichte Veränderungen in der Menge auf. mGluR5 war leicht signifikant verringert, Shank1 und PSD95 waren leicht signifikant erhöht und GluR1 war signifikant erhöht. Der Verminderung der Proteine mGluR5, GluR1, Shank1,

und Shank3 auf 50% (Abb. 3-13) lag demnach keine Erniedrigung der Transkriptmengen im gleichen Maße zu Grunde. Auch bei diesen mRNAs könnte DDX1 einen positiven Einfluss auf die Translation haben oder aber für die Stabilität dieser Proteine nötig sein. Im Gegensatz zu den übrigen Transkripten zeigte die Menge der IRSp53-mRNA eine starke Erhöhung um den Faktor 3,8. Dahingegen blieb die Menge des Proteins durch den DDX1-*Knockdown* unverändert (Abb. 3-13). DDX1 könnte daher entweder die Transkription dieser mRNA hemmen oder deren Abbau steigern.

3.3.4 Einfluss des *Knockdown* von Staufen2 auf Proteine der postsynaptischen Dichte

Um auch den Einfluss des Staufen2-*Knockdown* auf Proteine der postsynaptischen Dichte exzitatorischer Synapsen näher zu untersuchen, wurde die gleiche Analyse wie in Abschnitt 3.3.2 durchgeführt. Nachdem die hippocampalen Neuronen nach 7 *div* entweder mit dem Lentivirus mit der Staufen2-shRNA oder mit dem Kontrollvirus transduziert wurden, erfolgte nach weiteren sieben Tagen in Kultur die Lyse der Zellen. Die sich anschließende Westernblot-Analyse ist in Abbildung 3-15 A dargestellt. Abbildung 3-15 B zeigt die quantitative Auswertung von sieben unabhängigen Experimenten. Die Proteine des Zytoskeletts (β -III-Tubulin und β -Actin) dienten in dieser Analyse als Referenzproteine, auf die die anderen Proteine bei der quantitativen Auswertung abgeglichen wurden.

Es wurde zunächst untersucht, welchen Einfluss der Knockdown von Staufen2 auf die Menge von Gerüstproteinen hatte. PSD95 war im exemplarischen Westernblot in seiner Konzentration nicht verändert. Auch die guantitative Auswertung zeigte, dass der Mittelwert sich nicht von der Kontrollgruppe unterschied. Das Protein IRSp53 wies dagegen in der Westernblot-Analyse ein stärkeres Signal auf, wenn Staufen2 herunterreguliert war, was durch die statistische Auswertung bestätigt wurde. Das Protein war etwa um den Faktor zwei signifikant erhöht. Shank3 wies in dieser Analyse keine Veränderung auf. Shank1 war in der Darstellung des Westernblots deutlich verringert. Die statistische Analyse ergab, dass Shank1 um 50% signifikant reduziert war. Um den Einfluss auf die Glutamatrezeptoren zu untersuchen, wurden wieder die Proteine mGluR5, NR1 und GluR1 im Westernblot detektiert. Er zeigt, dass GluR1 und NR1 in der Konzentration verringert waren. Auch diese Proteine waren um 50% signifikant verringert. Die Menge von mGluR5 war durch das Fehlen von Staufen2 nicht beeinträchtigt, was sowohl im Westernblot als auch in der statistischen Auswertung gezeigt wurde. Die Betrachtung der Proteine, die in den MAP-Kinase Weg involviert sind, ergab, dass sowohl ERK als auch p-ERK eine leichte Verminderung zeigten, für p-ERK war die Veränderung leicht signifikant.

Auch im Falle des Staufen2 *Knockdown* waren vor allem Gerüstproteine und Rezeptoruntereinheiten verringert. Im Gegensatz zum *Knockdown* von DDX1 zeigte nach dem Herunterregulieren von Staufen2 das Gerüstprotein IRSp53 jedoch eine signifikante Veränderung und mGluR5 wies keine Erniedrigung im Proteinlevel auf.



Abb. 3-15: Einfluss des lentiviralen *Knockdown* von Staufen2 auf die Proteinmenge von ausgewählten Proteinen in primären hippocampalen Neuronen

A Die Zellen wurden nach 7 *div* mit dem angezeigten Lentivirus transduziert. LV: Lentivirus, Ctrl: LV mit Kontroll-shRNA, Stau2: LV mit Staufen2-shRNA. Nach weiteren sieben Tagen wurden die Zellen lysiert und mit spezifischen Antikörpern die rechts neben dem Blot aufgezeigten Proteine detektiert. Als Ladekontrolle dienten die Proteine β -Actin und β -III-Tubulin. **B** Quantitative Auswertung von sieben unabhängigen Experimenten. Abgeglichen wurden die Werte entweder auf β -III-Tubulin oder auf β -Actin (je nach Größe des Proteins). Das Diagramm zeigt die relative Proteinmenge im Verhältnis zum Kontrollansatz. Gepaarter t-Test, Vergleich mit Ctrl: p=0,007 (IRSp53), p=0,0035 (Shank1), p=0,0045 (NR1), p=0,0092 (GluR1), p=0,0076 (p-ERK). Fehlerbalken=Standardfehler

3.3.5 Einfluss des *Knockdown* von Staufen2 auf die Expression der mRNAs postsynaptischer Proteine

Es stellte sich auch nach dem *Knockdown* von Staufen2 die Frage, ob die Veränderungen der Proteinmengen, auf Grund einer veränderten Expression der jeweiligen mRNAs zustande kam. Daher wurden hippocampale Neuronen mit dem Stau2-shRNA oder dem Kontroll-shRNA Lentivirus nach sieben Tagen in Kultur transduziert, die Gesamt-RNA nach weiteren sieben Tagen isoliert und anschließend mittels RT-qPCR die verschiedenen Transkripte analysiert (Abb. 3-16). Obwohl das Protein GluR1 durch den *Knockdown* von Staufen2 verringert war, wies die mRNA von GluR1 keine Änderung auf. Die mRNA-Mengen der Proteine mGluR5, Shank1, Shank2 und Shank3 waren jeweils um etwa das doppelte erhöht, obwohl die Proteinmenge von mGluR5 und Shank3 unverändert blieben und die von Shank1 reduziert war. Der *Knockdown* von Staufen2 scheint demnach die Expression der erwähnten mRNAs zu regulieren. Die Erhöhung des Proteinlevels von IRSp53 wurde durch die Erhöhung des IRSp53mRNA Levels um den Faktor 5,8 bestätigt. Die PSD95-mRNA war signifikant etwa um den Faktor 3 erhöht. Die Menge des Proteins zeigte auch eine Tendenz zur Erhöhung, jedoch war diese nicht signifikant.

Der *Knockdown* von Staufen2 führte zur einer Erhöhung der mRNA-Level fast aller getesteten Transkripte. Die Zunahme der mRNA-Mengen könnte ein Hinweis darauf sein, dass Staufen2 den Abbau dieser mRNAs fördert oder aber auch deren Transkription hemmt.



Abb. 3-16: Einfluss des Knockdown von Staufen2 auf die Expression ausgewählter mRNAs in hippocampalen Neuronen Ergebnis der RT-qPCR. Hippocampale Neuronen wurden nach 7 div mit shD-DX1-Lentivirus bzw. Kontroll-Lentivirus (Ctrl) transduziert und nach weiteren 7 div analysiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm REST2009. Normalisiert wurden die Werte auf
ß-III-Tubulin. Mittelwert und Standardfehler ergeben sich aus drei unabhängigen Experimenten. Gepaarter t-Test, Vergleich mit Ctrl: p=0,0022 (Shank1), p=0,0039 (Shank2), p=0,0041 (IRSp53), p=0,0063 (PSD95), p=0,0136 (mGluR5),

3.4 Funktionelle Analyse von Mutationen im N-terminalen Bereich von Shank3, die bei Patienten mit Autismus gefunden wurden

In verschiedenen Studien wurden in allen drei Proteinen der Shank-Familie Mutationen identifiziert, die verantwortlich sind für eine vererbte Form von Autismuserkrankungen (Durand *et al.*, 2007; Sato *et al.*, 2012; Berkel *et al.*, 2010). In dieser Arbeit werden drei Punktmutationen im N-teminalen Bereich von Shank3 analysiert. Eine Übersicht über das Protein und die Lage der Mutationen sind in Abbildung 3-17 dargestellt. Shank3 wurde auf Grund seiner Rolle als eines der Hauptgerüstproteine der postsynaptischen Dichte in dieser Arbeit schon mehrfach untersucht. So konnte z. B. in Abschnitt 3.3.1 gezeigt werden, dass die Menge an Shank3-Protein in hippocampalen Neuronen verringert ist, wenn DDX1 reduziert ist. Das Ziel der durchgeführten Analysen ist es, den Einfluss der Mutationen auf die Bildung von Synapsen und die Lokalisation der mutierten Shank3-Proteine im Vergleich mit dem Wildtyp in hippocampalen Neuronen zu untersuchen.





3.4.1 Auswirkungen der Punktmutationen im N-terminalen Bereich von Shank3 auf die postsynaptische Lokalisation des rekombinanten Proteins

Für die Lokalisationsstudien in hippocampalen Neuronen wurden Konstrukte generiert, in denen die Versionen der jeweiligen Proteine (WT, L68P, R300C und Q321R) ein myc-*tag* trugen. Über Transfektion nach 8 *div* wurden die verschiedenen Proteine in Neuronen exprimiert. Nach weiteren fünf Tagen in Kultur wurden die Zellen fixiert und eine immunzytochemische Färbung durchgeführt. Über das an die Proteine angehängte myc-*tag* konnte die Lokalisation der Shank3-Proteine nachgewiesen werden. Neuronale Zellen wurden über das Protein MAP2 detektiert. Exemplarisch ist für jede Shank3-Variante eine immunzytochemische Färbung in Abbildung 3-18 A dargestellt. Zunächst war festzustellen, dass die mutierten Formen des Shank3 keinen Einfluss auf das Muster der Proteinverteilung haben. Da Shank3 eines der Hauptgerüstproteine der PSD ist und diese wiederum an dendritischen Dornen lokalisiert, ist die typische Verteilung des Shank3-Proteins punktuell entlang der Dendriten. Die Färbung der verschiedenen Shank3-Varianten zeigten dieses erwartete Muster der Proteincluster entlang der Dendriten.

Um die Frage zu klären, ob eine der Mutationen Einfluss auf den Einbau der Proteine in die postsynaptische Dichte hat, wurden die Intensitäten der Fluoreszenzen der dendritischen Dornen und dem darunterliegenden Dendriten mit dem Programm ImageJ quantifiziert und aus diesen Werten ein Quotient gebildet. Pro Konstrukt wurden an neun Zellen jeweils drei Abschnitte gemessen und daraus ein Mittelwert gebildet. Dies ist in Abbildung 3-18 B dargestellt. Es ist zu sehen, dass sich die Quotienten der mutierten Proteine nicht von dem des Wildtyps unterscheiden. Die Lokalisierung der verschiedenen Shank3-Versionen in den dendritischen Dornen und damit vermutlich auch der Einbau in die PSD, war demnach durch die Mutationen nicht beeinträchtigt.

3.4.2 Einfluss der Punktmutationen im N-terminalen Bereich von Shank3 auf die Bildung von dendritischen Dornen in hippocampalen Neuronen

Um zu klären, ob die untersuchten Shank3-Varianten Einfluss auf die Ausbildung von Synapsen haben, wurde eine durchschnittliche Anzahl von dendritischen Dornen pro μ m Dendrit des Wildtyps und der drei Mutanten bestimmt. Es wurden an neun Zellen jeweils drei Abschnitte gezählt und daraus ein Mittelwert gebildet. Die guantitative Auswertung ist in Abbildung 3-18 C gezeigt. Es konnten keine Unterschiede in der Anzahl der dendritischen Dornen im Vergleich mit der Wildtypvariante festgestellt werden. Unterstützt wurde diese Feststellung von einer weiteren Analyse, in der nach der Transfektion der Neuronen mit den verschiedenen Konstrukten und der Fixierung der Zellen neben den rekombinanten Proteinen das Proteine vGlut1 immunzytochemisch angefärbt wurde (Abb. 3-19 A). vGlut1 ist ein Marker für den präsynaptischen Bereich, mit dem gezeigt werden kann, dass es sich bei den Shank3-positiven Clustern tatsächlich um synaptische Kontakte handelt. In dieser Analyse wurde pro Dendrit ermittelt, wie viele von 10 Shank3-Clustern ein unmittelbar benachbartes vGlut1-Signal aufwiesen. Pro Konstrukt wurden an 10 Zellen jeweils drei Dendriten in die Auswertung mit einbezogen. Die Mittelwerte sind in Abbildung 3-19 B dargestellt. Die Abbildung zeigt, dass ungefähr 80% der Wildtyp Shank3-Custer postitiv für ein vGlut1-Signal waren. Die Mutanten wiesen einen annähernd gleichen Wert auf, was bedeutet, dass die Mutationen keinen Einfluss auf die Bildung der Synapsen hatten. Die autistischen Symptome der Patienten werden also nicht durch eine fehlerhafte synaptische Lokalisierung bzw. einem fehlerhaften Beitrag von Shank3 zu Synapsenbildung hervorgerufen.





Abb. 3-18: Mutationen im N-Terminus von Shank3 haben keinen Einfluss auf die synaptische Lokalisation in primären hippocampalen Neuronen

A Shank3-myc-Fusionsproteine wurden in primären hippocampalen Neuronen exprimiert. Nach fünf Tagen in Kultur wurden die Zellen fixiert und über immunzytochemische Färbung die verschiedenenen Shank3-Proteine mittels myc-Antikörper (rot) und das neuronale Protein Map2 (grün) detektiert. Die Aufnahmen erfolgten am konfokalen Mikroskop. Das weiße Rechteck zeigt den Bereich, der rechts vergrößert dargestellt ist. *merge*: Überlagerung, Balken=20μm **B** Quantitative Auswertung der Fluoreszenzintensitäten. Die Fluoreszenzen eines dendritischen Dorns und des darunter liegenden Dendriten wurden mit dem Programm ImageJ quantifiziert und das Verhältnis gebildet. Aus drei unabhängigen Experimenten wurden pro Shank3-Konstrukt an neun Zellen jeweils drei Abschnitte analysiert. **C** Quantifizierung der Anzahl der dendritischen Dornen. Aus drei unabhängigen Experimenten wurden pro Shank3-Konstrukt an neun Zellen in jeweils drei Bereichen die Menge der dendritischen Dornen bestimmt. Fehlerbalken=Standardfehler.







Abb. 3-19: Mutationen im N-Terminus von Shank3 haben keinen Einfluss auf den Einbau in die postsynaptische Dichte in primären hippocampalen Neuronen

A Shank3-myc-Fusionsproteine (WT und drei Mutanten) wurden nach 8 *div* in primären hippocampalen Neuronen exprimiert. Nach insgesamt 13 *div* wurden diese fixiert und mittels immunzytochemischer Färbung wurden sowohl die Varianten des rekombinanten Shank3 (rot, über einen myc Antikörper) als auch das präsynaptische Protein vGlut1 (grün) detektiert. Die Aufnahmen erfolgten am konfokalen Mikroskop. Das weiße Rechteck zeigt den Bereich, der rechts vergrößert dargestellt ist. Darin markieren die weißen Pfeile exemplarisch vGlut1 positive Shank3-Cluster. *merge*: Überlagerung, Balken=20µm **B** Quantitative Auswertung vGlut1 positiver Shank3 Cluster. Es wurde der prozentuale Anteil der Shank3-Cluster ermittelt, die ein direkt benachbartes vGlut1-Signal aufweisen. Aus drei unabhängigen Experimenten wurden pro Shank3-Konstrukt an 10 Zellen jeweils 30 Shank3-Cluster analysiert. Fehlerbalken=Standardfehler.

4 DISKUSSION UND AUSBLICK

Unter synaptischer Plastizität versteht man die Modulierung der synaptischen Übertragungseffizienz an exzitatorischen Synapsen unter anderem im Hippocampus. Sie ist die Grundlage für Lernvorgänge und Gedächtnisbildung von Säugern (Martin et al., 2000). Auf der postsynaptischen Seite wird die Modulierung der Reizweiterleitung vor allem durch den Umbau der postsynaptischen Dichte erreicht. Dafür müssen an einzelnen Synapsen spezifische Proteine zur Verfügung stehen. Zum einen werden diese Proteine im Zytoplasma synthetisiert und an die entsprechende Synapse transportiert. Zum anderen sind einige mRNAs von postsynaptischen Proteinen dendritisch lokalisiert, deren Translation dann lokal reguliert wird (Sutton und Schuman, 2006). Der Transport der Transkripte erfolgt in mRNPs entlang des Zytoskeletts. Das Verpacken der mRNAs, der Transport und die lokale Translation werden unter anderem durch mRNA-Bindeproteine (RBPs) kontrolliert. Mit der Isolierung eines KIF5c-mRNPs wurden mRNA-Bindeproteine identifiziert, die mit diesem mRNP assoziiert sind (Kanai et al., 2004). Für einige dieser Proteine, z.B. FMRP, ist deren Funktion schon näher aufgeklärt, jedoch sind die Funktionen vieler Proteine, die durch die Assoziation mit dem mRNP in den dendritischen Transport von mRNAs und damit in die Regulation der synaptischen Plastizität involviert sind, weitestgehend ungeklärt. Daher sollten einige der in dem KIF5c-mRNP identifizierten RBPs in dieser Arbeit funktionell analysiert werden. Dazu gehörten Pura, Staufen1, Staufen2 und DDX1. Einerseits wurden über Immunpräzipitationen aus kultivierten Cortex-Neuronen oder aus Mausgehirnen Interaktionen der Proteine mit dendritischen mRNAs untersucht. Andererseits wurde für die Proteine Staufen2 und DDX1 ein lentiviraler shRNA-Knockdown etabliert, um die Bedeutung dieser Proteine für Komponenten des KIF5c-mRNPs und für Proteine der postsynaptischen Dichte in hippocampalen Neuronen bestimmen zu können.

Die Methode des lentiviralen *Knockdown* mittels shRNA-Expression bietet die Möglichkeit ausgesuchte Gene gezielt und dauerhaft auch in Neuronen auszuschalten. So können auch Funktionen von Proteinen, von denen z.B. keine *Knockout*-Mauslinie existiert, in kultivierten Neuronen analysiert werden. In dieser Arbeit wurde für die Produktion von lentiviralen Partikeln zunächst der Transfervektor pGIPZ verwendet. Entgegen der Aussage des Herstellers konnte jedoch nicht gezeigt werden, dass die Transduktion mit den Lentiviren, die mit dem pGIPZ produziert wurden, zur Expression von GFP und damit wahrscheinlich auch der shRNA-Kassette in kultivierten Neuronen aus dem Hippocampus der Ratte führte. Deshalb wurde ein weiteres Vektorsystem für den lentiviralen *Knockdown* etabliert, welches zum einen aus dem pSuper-Vektor besteht, mit dem die Effizienzen der shRNAs validiert werden können, und zum anderen aus dem Transfervektor pLVTHM, mit dem die Produktion der Lentiviren erfolgt

(Brummelkamp et al., 2002; Wiznerowicz et al., 2003). Mit diesem System konnten erfolgreich primäre hippocampale Neuronen transduziert werden. Die Gründe für die nicht erfolgte Expression mit den pGIPZ-Lentiviren in Neuronen sind unklar. Da bei der Produktion der Lentiviren mit den beiden Transfervektoren die selben Helferplasmide (pMD2.G und psPAX2) genutzt wurden, ist es unwahrscheinlich, dass der Vorgang der Transduktion an sich mit den pGIPZ-Lentiviren nicht funktioniert hat. Die Lentiviren trugen in beiden Fällen das Oberflächenprotein VSV.G (vesicular stomatitis virus G glycoprotein). Über die Bindung an Phospholipide wie Phosphatidylcholin oder Phosphatidylserin ermöglicht VSV.G den Eintritt in die Zielzelle und stellt einen breiten Zelltropismus sicher (Verhoeven et al., 2004). Außerdem ist die Transduktion von anderen Säugerzellen mit den mit pGIPZ produzierten Lentiviren möglich (Shanmugarajan et al., 2012). Unterschiede gibt es dagegen im Aufbau der beiden Transfervektoren. Im pGIPZ stehen das für GFP kodierende Gen und die shRNA-Kassette unter der Kontrolle des CMV-Promotors, der von der Polymerase II erkannt wird. Der H1-Promotor, der im pLVTHM die Expression der shRNA kontrolliert, ist wiederum abhängig von der Polymerase III. Beide Promotoren sollten in Neuronen erkannt werden und auch die Expression der Gene, die sie kontrollieren, konstitutiv anschalten. In einer Studie von Li et al. (2010) wird jedoch gezeigt, dass Transgene, die mit Lentiviren in corticale Neuronen gebracht wurden, unter der Kontrolle des CMV-Promotors schlecht exprimiert werden. Deshalb ist es naheliegend, dass die Expression des GFP und damit wahrscheinlich auch der shRNA-Kassette in hippocampalen Neuronen, die mit den pGIPZ-Lentiviren transduziert wurden, nicht oder nur unzureichend erfolgt ist. Mit dem pLVTHM-System war es dagegen möglich Lentiviren herzustellen, die primäre Neuronen transduzieren und die Proteine DDX1 und Staufen2 in kultivierten Neuronen des Cortex und Hippocampus der Ratte ausschalten.

Im Fokus der Interaktionsstudien der untersuchten RBPs mit bekannten dendritisch lokalisierten mRNAs standen die Transkripte der drei Shank-Proteine, die zu den wichtigsten Gerüstproteinen der postsynaptischen Dichte von exzitatorischen Synapsen zählen (Sheng und Kim, 2000). Mutationen in den kodierenden Genen sind mit neurologischen Erkrankungen aus dem Autismusspektrum beim Menschen assoziiert (Durand *et al.*, 2007; Sato *et al.*, 2012; Berkel *et al.*, 2010), was die Bedeutung dieser Proteinfamilie für die PSD hervorhebt. Die Shank1-mRNA konnte in dem KIF5c-mRNP nachgewiesen werden und in der 3'UTR wurde eine 200 Basen große Region identifiziert, welche die dendritische Lokalisation einer Reporter-mRNA vermittelt (Falley *et al.*, 2009; Boeckers *et al.*, 2004). Deshalb könnte eines der Proteine aus dem KIF5c-mRNP und damit für die dendritische Lokalisation verantwortlich sein. Ob die für Shank2 und Shank3 kodierenden Transkripte in dem KIF5c-mRNP enthalten sind, ist dage-

gen nicht bekannt. Da zudem bis jetzt für keines der Shank-Transkripte RBPs identifiziert wurden, die über die Interaktion die dendritische Lokalisation oder den Einbau in mRNPs vermitteln, sollten direkte Interaktionen der hier untersuchten RBPs mit den Shank-mRNAs charakterisiert werden.

Die Shank3-mRNA konnte hier jedoch mit keinem der getesteten RBPs angereichert werden, was dafür spricht, dass sie von diesen Proteinen nicht gebunden wird. Da bekannt ist, dass die mRNA von Shank3 zumindest im Hippocampus von Mäusen dendritisch lokalisiert ist (Boeckers *et al.*, 2004), könnte ein weiteres RBP des KIF5c-mRNP die Shank3-mRNA binden und den Transport vermitteln. In Neuronen existieren außerdem verschiedene Transportpartikel mit unterschiedlicher Zusammensetzung (Tübing *et al.*, 2010; Mikl *et al.*, 2011), weshalb der Transport des Transkripts auch in einem anderenTransportpartikel stattfinden könnte.

Mit dem Protein Pura konnte die Shank2-mRNA signifikant angereichert werden. Pura ist verantwortlich für die Lokalisation der MAP1b-mRNA an Translationsorte in Neuronen und kann außerdem gleichzeitig mit der nichtkodierenden RNA BC1 die Map1b-mRNA binden (Johnson et al., 2006). BC1 ist involviert in das dendritische Proteinsynthese-System (Lin et al., 2001), weshalb vermutet wird, dass Pura selbst die Translation von dendritischen mRNAs reguliert (Johnson et al., 2013). Über die Bindung an CGG-Wiederholungen von mRNAs vermittelt Pura auch den Transport eines mRNPs aus dem Zellkern in Oocyten von D. melanogaster (Aumiller et al., 2012). Pura könnte daher über die Interaktion den Transport der Shank2-mRNA aus dem Zellkern und die Translation in den Dendriten regulieren. Da mit dem hier verwendeten Assay die Interaktion in den corticalen Neuronen nicht lokalisiert werden konnte, sind weiterführende Versuche nötig, um die Interaktion einerseits in vivo zu bestätigen und andererseits die Funktion näher zu charakterisieren. So könnten Immunpräzipitationen aus Gesamtgehirn von Wildtyp- und Pura-Knockout-Mäusen die Interaktion in vivo bestätigen. Des Weiteren bieten sich immunzytochemische Färbungen mit kombinierten in situ Hybridisierungen der Shank2-mRNA an, um festzustellen in welchem Kompartiment die Interaktion stattfindet.

Auch für das Protein Staufen1 wurde in dieser Arbeit eine Interaktion mit der Shank2mRNA nachgewiesen. Die Anreicherung der mRNA mit Staufen1 war jedoch nicht signifikant, da die Schwankungen in den drei einzelnen Experimenten zu groß waren. Ein Grund für die starken Schwankungen könnten die im Westernblot zusätzlich detektierten Proteinbanden sein, bei denen es sich wahrscheinlich um Abbauprodukte des Staufen1-Fusionsproteins handelt, was die Ergebnisse verfälscht haben könnte. Staufen1 kann zwischen dem Nukleus und dem Zytoplasma hin und her transportiert werden und dadurch Funktionen bei der Assemblierung von mRNPs oder deren Transport aus dem Zellkern haben (Martel *et al.,* 2006). Es sind aber auch Funktionen im Transport von Transkripten beschrieben, mit denen Staufen1 die korrekte Lokalisation dieser Transkripte gewährleistet. In D. melanogaster ist Staufen1 verantwortlich für den Transport und die Lokalisation der für bicoid, oscar und prospero kodierenden mRNAs und reguliert dadurch die Neuroblastenentwicklung von Embryonen der Fliege (Broadus et al., 1998; Riechmann und Ephrussi, 2001). In Neuronen von Nagetieren führt der Verlust von Staufen1 zu einer geringeren dendritischen Lokalisation von mRNPs (Vessey et al., 2008). Und auch die dendritische Lokalisation der für aCamKII und Shank1 kodierenden Transkripte in hippocampalen Neuronen ist abhängig von Staufen1 (Kanai et al., 2004; Falley et al., 2009). Außerdem reguliert Staufen1 die Stabilität von mRNAs (staufen1-mediated decay, SMD). Es vermittelt den Abbau von Transkripten über die Interaktion mit Motiven in der 3'UTR und der RNA-Helikase UPF1 in Säugerzellen. Dadurch wird die RNA-Helikase an die Transkripte rekrutiert und der Abbau vermittelt (Kim et al., 2005). Staufen1 bindet zudem zusammen mit Pura und FMRP an BC1 und weitere mRNAs (Johnson et al., 2006) oder interagiert direkt mit der 5'UTR von Reporter-mRNAs (Dugre-Brisson et al., 2005). Dadurch ist Staufen1 wahrscheinlich auch in die Regulation der Translation involviert. In dieser Arbeit konnte keine Interaktion von Staufen1 mit der Shank1-mRNA nachgewiesen werden, obwohl die dendritische Lokalisation der Shank1-mRNA abhängig von Staufen1 ist. Staufen1 vermittelt demnach die dendritische Lokalisation nicht durch eine direkte Interaktion mit dieser mRNA. Die hier gezeigte Interaktion von Staufen1 mit der Shank2-mRNA könnte den Transport der mRNA aus dem Zellkern oder in die Dendriten vermitteln. Aber auch eine Regulation der Stabilität oder der Translation des Transkripts wäre möglich. Es sind auch in diesem Fall weiterführende Experimente nötig um einerseits die Interaktion in vivo zu bestätigen und andererseits die Lokalisation der Interaktion zu untersuchen. So können Rückschlüsse auf die Funktion, die durch diese Interaktion vermittelt wird, gewonnen werden.

Die Staufen-Proteine sind einerseits in verschiedenen mRNPs in Dendriten nachgewiesen worden, andererseits sind beide Proteine auch Bestandteil des KIF5c-mRNP (Duchaine *et al.*, 2002; Kanai *et al.*, 2004). Staufen2 kann wie Staufen1 aus dem Kern transportiert werden und demnach für das Verpacken von Transkripten in die mRNPs oder für den Transport von mRNPs aus dem Zellkern verantwortlich sein (Macchi *et al.*, 2004; Miki *et al.*, 2005). Außerdem vermittelt auch Staufen2 die dendritische Lokalisation von mRNAs. Staufen2 ist mit dendritischen mRNAs ko-lokalisiert und der Verlust der Funktion des Proteins führt zu weniger stark dendritisch lokalisierten mRNAs. Die Überexpression führt zu einer verstärkten dendritischen Lokalisation der mRNAs (Tang *et al.*, 2001). Zudem ist die MAP1b-mRNA weniger stark dendritisch lokalisiert nach einem Staufen2-*Knockdown* und auch die Menge des Proteins MAP1b ist deutlich reduziert, was für eine Regulation der Translation spricht (Lebeau *et al.*, 2011). Erst kürzlich wurde für Staufen2 auch eine Funktion im SMD nachgewiesen. Es interagiert sowohl mit seinem Paralog Staufen1 als auch mit der RNA-Helikase UPF1 und ist mit diesen Interaktionen essentiell für den Abbau einer Reporter-mRNA in Säugerzellen (Park *et al.*, 2013; Park und Maquat, 2013). Durch die regulatorischen Funktionen in Lokalisation und Expression dendritischer mRNAs kann Staufen2 demnach in die synaptische Plastizität von Neuronen involviert sein. Lebeau *et al.* (2011) zeigten zudem, dass die von DHPG (S-(3,5)-Dihydroxyphenylglycin) ausgelöste mGluR-LTD in kultivierten Schnitten des Hippocampus von Mäusen von Staufen2 abhängig ist. Fehlt Staufen2, kann keine von DHPG induzierte LTD mehr ausgelöst werden. Auch ist die Bildung der dendritischen Dornen abhängig von Staufen2. Die Anzahl der dendritischen Dornen ist nach dem *Knockdown* von Staufen2 reduziert und die Form ist nicht mehr pilzförmig sondern filopodienartig (Goetze *et al.*, 2006). Die veränderte Form der dendritischen Dornen geht wahrscheinlich einher mit Änderungen der PSD-Zusammensetzung, was den von Lebeau *et al.* beobachteten Phänotyp erklären würde.

In den in dieser Arbeit durchgeführten Immunpräzipitationen von Staufen2 wurden die für Shank1, Shank2 und HPRT kodierenden Transkripte angereichert, dieser Effekt war aber nicht signifikant. Ein Problem bei der Immunpräzipitation des Staufen2-Fusionsproteins war dessen schlechtere Präzipitation im Vergleich mit den Kontrollproteinen innerhalb eines Versuchs. Dies könnte dazu geführt haben, dass signifikante Anreicherungen nicht adäquat detektiert wurden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Staufen2-Knockdown Experimente zeigten, dass einige der untersuchten postsynaptischen Proteine in ihrer Menge verändert waren. Die Analyse der entsprechenden mRNAs zeigte dagegen, dass die Expression fast aller getesteten Transkripte durch den Staufen2-Knockdown erhöht war. Das spricht für eine negative Kontrolle der mRNA-Expression von Staufen2, wahrscheinlich über den SMD. Ob dafür die hier gezeigten Interaktionen von Staufen2 mit den für Shank1 und Shank2 kodierenden Transkripten nötig ist, bleibt jedoch noch zu klären. Die erhöhte Konzentration der mRNAs nach Staufen2-Knockdown führte in den meisten Fällen nicht zu einer erhöhten Menge des kodierten Proteins. So waren die Mengen der Proteine Shank1, NR1, GluR1 signifikant verringert, die Proteine mGluR5, Shank3 und PSD95 blieben unverändert, obwohl die mRNA-Mengen im Durchschnitt etwa verdoppelt waren oder im Fall des mGluR5 unverändert blieb. Nur im Fall von IRSp53 war sowohl die Menge der mRNA als auch des Proteins erhöht. Die trotz erhöhter oder gleichbleibender Expression der Transkripte reduzierten Proteinmengen von Shank1, NR1, GluR1 wären mit einer zusätzlichen Funktion von Staufen2 bei der Translation dieser Proteine zu erklären. Oder aber die Transkripte sind durch den Knockdown von Staufen2 fehlerhaft lokalisiert und damit auch die synthetisierten Proteine, weshalb diese abgebaut werden. Für die Untereinheiten der ionotropen Glutamatrezeptoren ist es möglich, dass die Reduktion des Gerüstproteins Shank1 einen korrekten Einbau in die PSD verhindert und dies ebenfalls eine falsche Lokalisation und die Degradation

dieser Proteine zur Folge hätte. Die hier gezeigten Veränderungen der Mengen der Gerüstproteine nach dem Knockdown von Staufen2 erklären die von Goetze et al. (2006) gezeigte Veränderung der Morphologie der dendritischen Dornen. Die veränderten Mengen der PSD-Proteine könnten den Aufbau der PSD so beeinträchtigen, dass auch die Reizweiterleitung der Synapse beeinflusst ist. Die von Lebeau et al. (2011) gezeigte verschlechterte LTD deutet darauf hin, dass der Knockdown von Staufen2 die Signalkaskade beeinträchtigt, die den mGluR5 nachgeschaltet ist. Die reduzierte Menge des Gerüstproteins Shank1 könnte auch dazu führen, dass für die Signalkaskade nötige Proteine an der Synapse nicht verfügbar sind. In der hier durchgeführten Analyse des Einflusses des Staufen2-Knockdown auf Proteine der postsynaptischen Dichte wurden auch die Mengen der Proteine ERK und p-ERK bestimmt. Die Phosphorylierung von ERK ist ein wichtiger Schritt in der durch die Stimulation der mGluR aktivierten mGluR-LTD (Wang und Zhuo, 2012). Die Menge an p-ERK war signifikant verringert. Dies könnte dafür sprechen, dass die schlechtere LTD unter Staufen2-Knockdown-Bedingungen auf Grund einer verringerten Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade zustande kam.

Auch der Knockdown von DDX1 hatte Einfluss auf Proteine der PSD. DDX1 gehört zur Familie der DEAD-Box-Proteine, die ubiguitär exprimiert werden und in die unterschiedlichsten Prozesse innerhalb der Zelle involviert sind (Godbout und Squire, 1993; Rocak et al., 2004). Unter anderem können DEAD-Box-Proteine in der Assemblierung von mRNPs in Eukaryoten involviert sein (Pan und Russel, 2010; Ma et al., 2013). DDX1 ist zudem in humanen Zelllinien mit dem Faktor CstF-64 assoziiert, der die Prozessierung von prä-mRNAs am 3'-Ende reguliert (Bléoo et al., 2001). Die korrekte Prozessierung einer mRNA ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Translation. Außerdem ko-lokalisiert DDX1 mit sogenannten stress granules (SG) (Onoshi et al., 2008). SGs sind dynamische Komplexe, die auf zellulären Stress hin akkumulieren können. Sie beinhalten neben mRNAs auch Initiationsfaktoren der Translation und weitere modifizierende Enzyme. Die Translation der Transkripte, die in den SGs lokalisiert sind, wird unter Stressbedingungen inhibiert. Erst nach dem zellulären Stress lösen sich die SG-Partikel wieder auf und die Transkripte können translatiert werden (Kedersha und Anderson, 2009). In humanen Zelllinien interagiert DDX1 mit dem Protein PQBP1 (Polyglutamine-binding protein 1), das die Bildung von SGs reguliert und ein Bestandteil von mRNPs ist (Kunde et al. 2011). Zudem interagiert PQBP1 mit KSRP (K homology splicing regulatory protein) und auch DDX1 bindet in einer humanen Fibrosarkomzelllinie (HT1080-Zellen) dieses Protein. KSRP fördert den Abbau von mRNAs über Bindung von AU-reichen Sequenzen in der 3'-UTR der Transkripte (ARE-mediated decay, AMD) und ist Bestandteil der SGs (Gherzi et al., 2004; Rothé et al., 2006). DDX1 kompetiert mit dem Protein 14-3-3 um die Bindung von KSRP und reguliert dadurch den Transport von KSRP in und aus dem Zellkern. Der Verlust von DDX1 führt

zu einem vermehrten Abbau von mRNAs über den AMD (Chou *et al.*, 2013). RNA-Helikasen können aber auch die Translation beeinflussen; so ist DHX29 wie DDX1 eine RNA-Helikase, die aber zur Familie der DExH-Box-Proteinen gehört. DHX29 unterstützt das *scanning* der Ribosomen in 5´-UTRs mit starker Sekundärstruktur und ist notwendig für die Ausbildung des 48S-Komplexes. Auf diese Weise fördert DHX29 die Translation (Pisareva *et al.*, 2008).

In den hier durchgeführten Studien waren nach Knockdown von DDX1 die postsynaptischen Gerüstproteine Shank1 und Shank3 und die Untereinheiten der ionotropen Glutatmatrezeptoren NR1 und GluR1 sowie die Menge der mGluR5 signifikant verringert. Die mRNA-Level der Gerüstproteine Shank3 und Shank2 (letzteres wurde nicht auf Proteinebene analysiert) blieben unverändert, die Expression der Shank1-mRNA war leicht signifikant erhöht. Der Einfluss des DDX1-Knockdown erhöhte auch die Menge der GluR1-mRNA leicht, die für mGluR5 kodierende mRNA dagegen war leicht erniedrigt. Aber auch wenn der Knockdown von DDX1 zu leichten Veränderungen der Expression dieser mRNAs führte, so waren die Mengen jedoch nicht in dem Maße reduziert wie es sich auf Proteinebene zeigte. Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass DDX1 die Translation dieser Proteine fördert. Zu untersuchen bleibt jedoch inwiefern DDX1 die Translation reguliert und in welchen Mechanismus DDX1 eingreift. Möglich ist, dass DDX1 über die Interaktion mit PQBP1 die Bildung der stress granules reguliert oder wie DHX29 für die Bildung des Initiationskomplex der Translation notwendig ist. Insbesondere könnte DDX1 das scanning in stark strukturierten 5'-UTRs erleichtern wie sie z. B in der Shank1-mRNA gefunden werden (Falley et al., 2009).

Erst kürzlich wurde die Topoisomerase Top3ß in Transportpartikeln identifiziert, in denen auch FMRP enthalten ist, weshalb vermutet wird, dass Top3ß als RNA-Topoisomerase die Translation von mRNAs an der Synapse reguliert und damit wichtig für die neuronale Entwicklung beim Menschen ist (Stoll et al., 2013; Xu et al., 2013). Auch DDX1 und FMRP sind in dem gleichen mRNP zu finden (Kanai et al., 2004; Falley et al., 2009). Hinzu kommt, dass die für die Shank-Proteine oder die Untereinheiten der ionotropen Glutamatrezeptoren kodierenden Transkripte dendritisch lokalisiert sind (Boeckers et al., 2004; Grooms et al., 2006; Steward und Schuman, 2003; Cajigas et al., 2012). DDX1 könnte daher als RNA-Helikase in die durch FMRP vermittelte Regulation der Translation von mRNAs an der Synapse eingereifen. Oder aber FMRP und DDX1 agieren antagonistisch zu einander. FMRP unterdrückt die Translation, wohingegen DDX1 die Translation der postsynaptischen Proteine an der Synapse fördert. Ob für die Regulation der Translation durch DDX1 eine direkte Interaktion mit den Transkripten notwendig ist, bleibt noch zu untersuchen. Die in dieser Arbeit durchgeführte Immunpräzipitation von DDX1 konnte diese Frage nicht klären, da in diesem Experiment die Präzipitation von DDX1 nur sehr schwach war. Der hier verwendete Antikörper für die Immunpräzipitation eignet sich demnach nicht für eine ausreichende

Präzipitation von DDX1. Um Ziel-mRNAs für DDX1 zu identifizieren, müssten daher noch weitere Immunpräzipitationen mit verschiedenen Antikörpern durchgeführt werden. Mit FMRP wurden mit diesem Experiment dagegen die schon als Ziel-RNAs identifizierten für Shank1, PSD95 und Sapap3 kodierenden Transkripte aufgereinigt. Die IRSp53-mRNA konnte wie erwartet nicht mit FMRP aufgereinigt werden.

Es wäre auch möglich, dass die Verminderung der Untereinheiten der ionotropen Glutamatrezeptoren und von mGluR5 ein Effekt ist, der auf die reduzierten Konzentrationen der Gerüstproteine Shank1 und Shank3 zurückgeführt werden kann. In einer Arbeit von Verpelli *et al.* (2011) führte der *Knockdown* von Shank3 auch zu einer verminderten Expression von mGluR5. Die Autoren vermuteten, dass die verminderte Menge der mGluR5 auf Grund der fehlenden Verankerung von Shank3 in der PSD zustande gekommen sein könnte, da die Menge von Shank3 in mGluR5-*Knockout*-Mäusen nicht verändert ist (Verpelli und Sala, unveröffentliche Daten). Es könnte daher sein, dass die durch den DDX1-*Knockdown* reduzierten Gerüstproteine Shank1 und Shank3 dazu führen, dass sowohl die ionotropen als auch die metabotropen Glutamatrezeptoren nicht mehr korrekt in der PSD eingebaut werden können und deshalb abgebaut werden.

Sowohl der Knockdown von DDX1 als auch der von Staufen2 hatte Einfluss auf die Mengen postsynaptischer Proteine. Auch wenn die Änderungen der Proteinmengen nicht identisch waren, so war doch in beiden Fällen eine Verminderung von Gerüstproteinen und von Untereinheiten der ionotropen Glutamatrezeptoren festzustellen. Auch die Menge der IRSp53-mRNA war nach dem Knockdown der beiden Proteine gleichermaßen gesteigert. Untersuchungen eines mRNPs in neuronalen Stammzellen, in dem auch die Proteine Staufen2 und DDX1 enthalten sind, ergab, dass der Knockdown jeweils eines der Proteine zu falsch lokalisierter prox1-mRNA führte (Vessey et al., 2012). Eine Erklärung des gleichen Phänotyps könnte sein, dass durch den Knockdown nur eines der beiden Proteine die Struktur des mRNP-Komplexes aufgelöst wird. In dieser Arbeit wurde auch der Einfluss des Knockdown von DDX1 und Staufen2 auf Komponenten des KIF5c-mRNPs untersucht. Der Knockdown von DDX1 verminderte die Proteinmenge von Staufen2 signifikant um 50%, dahingegen blieb die Expression der Staufen2-mRNA unverändert. Das Protein FMRP blieb in der Menge unverändert. Der Knockdown von Staufen2 reduzierte die Menge des Proteins FMRP signifikant um 50%. Die Proteinmenge von DDX1 dagegen war signifikant erhöht und auch das Level der DDX1-mRNA war etwa verdoppelt. In aufgereinigten KIF5c-mRNPs aus FMRP-Knockout-Mäusen ist zudem die Menge von DDX1 auf 60% reduziert (Steffens, medizinische Doktorarbeit, in Vorbereitung). Es könnte also sein, dass sowohl der Knockdown von Staufen2 oder DDX1 als auch der

Verlust von FMRP die Struktur des KIF5c-mRNPs verändert oder auflöst. Dies wäre eine Erklärung für den ähnlichen Effekt auf postsynaptische Proteine.

Mit den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen der RBPs Staufen2 und DDX1 konnte gezeigt werden, dass sowohl Staufen2 als auch DDX1 die Proteine der PSD beeinträchtigen. In beiden Fällen führte der *Knockdown* zu verringerten Mengen von Gerüstproteinen und von Untereinheiten der ionotropen Glutamatrezeptoren. Auch der Einfluss des jeweiligen *Knockdown* auf Komponenten des KIF5c-mRNPs zeigte, dass beide Proteine die Zusammensetzung des mRNPs veränderte, was den ähnlichen Effekt auf die PSD-Proteine erklären könnte. Die Analyse der für die PSD-Proteine kodierenden Transkripte zeigte jedoch, dass die beiden RBPs in unterschiedliche Prozesse der Zellen involviert sein müssen. Zusammenfassend zeigen diese Befunde, dass die Kontrolle von Translation, Stabilität und eventuell auch Lokalisation der für die synaptischen Proteine kodierenden mRNAs durch mRNPs eine zentrale Bedeutung für die korrekte Bildung der postsynaptischen Dichte hat.

In weiterführenden Experimenten sollte der Einfluss der beiden Proteine nicht nur am Gesamtzelllysat sondern auch an postsynaptischen Proteinfraktionen analysiert werden, um den Einfluss der mRNPs auf die lokale Verteilung der synaptischen Proteine weiter zu charakterisieren.

Patienten, die vom Phelan-McDermid-Syndrom betroffen sind, zeigen Symptome aus dem Autismusspektrum wie verspätete Sprachentwicklung. Defizite in Sozialverhalten und Stereotypien. Zwei Arbeitsgruppen haben unabhängig voneinander beschrieben, dass das Fehlen einer Kopie des SHANK3-Gens für dieses Krankheitsbild ursächlich ist (Luciani et al., 2003; Wilson et al., 2003). Des Weiteren wurden Mutationen in diesem Gen identifiziert, die für die Ausprägung von Autismuserkrankungen verantwortlich sind (Durand et al., 2007). Dazu gehören terminale Deletionen, frameshiftund Punktmutationen. Welcher zelluläre Mechanismus durch das Fehlen oder die Mutationen von Shank3 beeinträchtigt und daher für die Ausbildung der autistischen Symptome verantwortlich ist, bleibt bis heute unverstanden. Deshalb wurden in dieser Arbeit drei in Patienten identifizierte Punktmutationen im N-terminalen Bereich des Shank3-Proteins (L68P, R300C, Q321R) untersucht. Es wurde der Einfluss der Mutationen auf die Lokalisation des Proteins und auf die Ausbildung von Synapsen in hippocampalen Neuronen analysiert. Es konnten aber weder Unterschiede in Form und Anzahl der synaptischen Shank3-Cluster, noch in der Lokalisation der verschiedenen Shank3-Varianten festgestellt werden. Die Mutationen im N-terminalen Bereich von Shank3 haben demnach keinen Einfluss auf die Lokalisation des Proteins und auf die Ausbildung von exzitatorischen Synapsen. Die Symptome von betroffenen Patienten müssen also auf andere Weise zustande kommen.

Die hier analysierten Mutationen wurden in einer Arbeit von Mameza *et al.* (2013) näher charakterisiert. Es wurde untersucht, ob die Shank3-Varianten hinsichtlich ihrer Fähigkeit Liganden des N-terminalen Bereichs von Shank3 zu binden Unterschiede aufwiesen. Es wurde gezeigt, dass zum Beispiel die L68P-Mutation zu einer vermehrten Bindung der Liganden Sharpin und α -Fodrin führt. Sharpin hat eine Funktion als E3-Ubiquitin-Ligases im NFkB-Signalweg in Säugerzellen (Ikeda *et al.,* 2011; Tokunaga *et al.,* 2011). Die übermäßige Bindung des Zytoskelett regulierenden Proteins α -Fodrin könnte auch bei der L68P Mutation zu Fehlregulationen führen, wie es schon für die Mutationen R300C und Q321R gezeigt ist (Durand *et al.,* 2013). Die in dieser Arbeit analysierten Mutationen des *SHANK3*-Gens führen demnach nicht zum Verlust einer Funktion sondern über die vermehrte Interaktion mit den Liganden zu einer Zunahme einer Funktion. Dies wiederum könnte die postsynaptische Signaltransduktion stören.

5 ZUSAMMENFASSUNG

An exzitatorischen Synapsen kann die Reizweiterleitung moduliert werden. Diese Modulation ist wahrscheinlich die Grundlage von Lernprozessen und Gedächtnisbildung bei Säugern und wird synaptische Plastizität genannt. Der Umbau der postsynaptischen Dichte (PSD) auf einen einkommenden Reiz hin trägt wesentlich zur synaptischen Plastizität bei. Dafür werden an einzelnen Synapsen spezifische Proteine benötigt. Gewährleistet wird dies unter anderem durch dendritisch lokalisierte Transkripte, die an der Synapse reizabhängig translatiert werden können. So sind sowohl die Shank1als auch die Shank3-mRNA im Hippocampus dendritisch lokalisiert. Der Transport von mRNAs in die Dendriten erfolgt in *messenger* Ribonukleopartikeln (mRNPs), die mit Hilfe von Motorproteinen wie z. B. KIF5c entlang des Zytoskeletts in die Dendriten gelangen. In dieser Arbeit wurden die mRNA-Bindeproteine (RBPs) Pura, Staufen1, Staufen2 und DDX1, die in einem KIF5c-assoziierten mRNP (KIF5c-mRNP) identifiziert wurden, durch die Untersuchung von assoziierten mRNAs und durch lentivirale *Knockdown*-Experimente funktionell analysiert.

Zunächst wurden RFP-markierte Varianten der RBPs in Neuronen exprimiert und anschließend immunpräzipitiert. Eine nachfolgende Analyse der assoziierten mRNAs durch reverse Transkriptase quantitative *real-time* PCRs zeigte, dass insbesondere die Shank2-mRNA mit dem Protein Pura assoziiert war. Weiterhin waren mehrere der Shank-mRNAs, aber auch nicht dendritisch lokalisierte Kontroll-mRNAs mit den beiden Staufen-Proteinen assoziiert.

Ein effizienter lentiviraler *Knockdown* konnte sowohl für Staufen2 als auch für DDX1 in kultivierten Neuronen etabliert werden. Eine quantitative Analyse von Schlüsselproteinen der PSD zeigte sowohl nach *Knockdown* von Staufen2 als auch von DDX1 eine Verringerung dieser Proteine. Dies betraf sowohl die Untereinheiten der ionotropen Glutamatrezeptoren GluR1 und NR1 als auch das Gerüstprotein Shank1. Der *Knockdown* von Staufen2 verringerte zusätzlich die MAP-Kinase ERK1/2, erhöhte aber die Konzentration des Proteins IRSp53. Außerdem hatte der *Knockdown* von DDX1 zusätzlich negativen Einfluss auf die Mengen der Proteine Shank3 und mGluR5. Die Analyse der Expression von Transkripten, die für einige dieser Proteine kodieren, zeigte, dass die Mengen fast aller untersuchten mRNAs nach dem *Knockdown* von Staufen2 erhöht waren. Dies bestätigte eine Rolle der Staufen-Proteine beim Abbau von mRNAs im Rahmen des *staufen1-mediated decay*, ein Abbauweg für mRNAs. Der *Knockdown* von DDX1 führte zu leichten Veränderungen der mRNA-Mengen, die jedoch nicht in dem Maße reduziert waren wie die Proteinmengen. Beide RBPs werden demnach für eine effiziente Translation der mRNAs benötigt.

Der Knockdown von Staufen2 oder DDX1 führte außerdem zu Veränderungen von Komponenten des KIF5c-mRNPs. Der Knockdown von Staufen2 reduzierte die Pro-

teinmenge von FMRP und erhöhte die von DDX1. Die Expression der DDX1-mRNA war durch den Staufen2-*Knockdown* ebenso erhöht. Der *Knockdown* von DDX1 wiederum verringerte nur die Menge des Proteins Staufen2, wohingegen die Expression der entsprechenden mRNA unverändert blieb. Die Veränderungen der Proteine des KIF5c-mRNPs könnten die Struktur des mRNPs stören oder auflösen und den ähnlichen Effekt auf die PSD-Proteine durch den *Knockdown* von Staufen2 oder DDX1 erklären. Die Kontrolle der Translation, Stabilität und wahrscheinlich auch der Lokalisation der für die synaptischen Proteine kodierenden mRNAs durch mRNPs hat demnach eine zentrale Bedeutung für die korrekte Bildung der postsynaptischen Dichte.

Darüber hinaus wurden in dieser Arbeit drei Punktmutationen im *SHANK3*-Gen funktionell analysiert, die in von Autismus betroffenen Patienten identifiziert wurden. Nach Expression der Shank3-Varianten in kultivierten hippocampalen Neuronen zeigten diese im Vergleich mit dem Wildtyp keine Unterschiede in Anzahl und Form der dendritischen Dornen oder in der Lokalisation des Proteins. Die autistischen Symptome werden also nicht durch eine fehlerhafte synaptische Lokalisierung des Proteins an Synapsen oder durch fehlerhafte Ausbildung der neuronalen Morphologie hervorgerufen.
6 SUMMARY

Synaptic transmission at excitatory synapses can be modulated. Such modification which is called synaptic plasticity contributes substantially to learning processes and memory of mammals. The change of the protein-composition of the postsynaptic density (PSD) due to an incoming signal contributes to synaptic plasticity. The reorganization of the stucture of the PSD needs specific proteins at selected synapses. One mechanism to ensured this is the dendritic localization of mRNAs and local protein synthesis. The mRNA coding for Shank1 and Shank3 are localized in dendrites of hippocampal neurons. The transport of transcripts to dendrites is mediated by messenger ribonucleoparticles (mRNPs), which are associated with motor proteins, such as KIF5c, along the cytoskeleton. Here, the mRNA-binding proteins (RBPs) Pura, Staufen1, Staufen2 and DDX1, which were all identified in a KIF5c-associated mRNP (KIF5c-mRNP), were functionally analyzed by the examination of associated mRNAs and by lentiviral knockdown experiments.

Initially, RFP-tagged versions of the RBPs were expressed in neurons and immunoprecipitated afterwards. The subsequent analysis of associated mRNAs by reverse trancriptase quantitative real-time PCR revealed an interaction between Pura and the Shank2-mRNA. Furthermore, several Shank transcripts (but also not dendritic localized control-mRNAs) were associated with the two Staufen proteins.

An efficient lentiviral knockdown of Staufen2 and DDX1 could be established in primary neurons. A quantitative analysis of key proteins of the PSD showed a reduction of these proteins after knockdown of Staufen2 or DDX1. This affected the subunits of ionotropic glutamatereceptor GluR1 and NR1 as well as the scaffold protein Shank1. The knockdown of Staufen2 additionally decreased the MAP-kinase ERK1/2 but increased the concentration of IRSp53. Moreover, the DDX1-knockdown had a negative impact on Shank3 and mGluR5. The quantitative analysis of transcripts, which encode some of these proteins, revealed that after Staufen2-knockdown almost all examined mRNA-levels were increased. This confirms a role of Staufen-proteins in the Staufen1-mediated decay, a posttranscriptional regulatory mechanism that degrades mRNAs. Despite slight changes of mRNA-levels after DDX1-knockdown, these were not as strongly reduced as the encoded proteins. Therefore, both proteins are essential for efficient translation of these mRNAs.

Furthermore, the knockdown of Staufen2 or DDX1 entailed alterations of proteins, which are components of the KIF5c-mRNP. The knockdown of Staufen2 decreased the concentration of the protein FMRP and increased the DDX1 level. The expression of DDX1-mRNA was also increased due to the Staufen2-knockdown. In contrast, the knockdown of DDX1 reduced only the protein Staufen2, whereas the corresponding mRNA-level was unaltered. The changed concentrations of the analyzed proteins could result in

a defective or dissolved structure of the mRNP and could explain that knockdown of both proteins had similar effects on proteins of the PSD. Thus, the control of translation, stability and probably also of localization of mRNAs by mRNPs is the central importance for appropriate PSD-formation.

Moreover, in this thesis the functional relevance of three point mutations in the *SHANK3* gene were analyzed. All mutations are associated with autism spectrum disorders. However, neither the number or shape of spines nor the localization of the proteins were affected by one of the mutations after the expression of the different Shank3-versions in cultured hippocampal neurons. Therefore, the symptoms of the patients are not due to altered localization of the Shank3-protein at synapses or due to incorrect development of spines.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Ainger, K., Avossa, D., Morgan, F., Hill, S. J., Barry, C., Barbarese, E., Carson, J. H. (1993) Transport and localization of exogenous myelin basic protein mRNA microinjected into oligodendrocytes. *J. Cell. Biol.*, 123, 431–441.

Akert, K., Moor, H., Pfenninger, K., Sandri, C. (1969). Contributions of new impregnation methods and freeze etching to the problems of synaptic fine structure. *Prog. Brain Res.*, 31, 223–240.

Baron, M. K., Boeckers, T. M., Vaida, B., Faham, S., Gingery, M., Sawaya, M. R., Salyer, D., Gundelfinger, E. D., Bowie, J. U. (2006) An architectural framework that may lie at the core of the postsynaptic density. *Science*, 311, 531-5.

Bassell, G. J., and Warren, S. T. (2008). Fragile X syndrome: loss of local mRNA regulation alters synaptic development and function. *Neuron,* 60, 201–214.

Bear, M. F. and Abraham, W.C. (1996) Long-term depression in hippocampus. *Annu. Rev. Neurosci.*, 19, 437–462.

Bear, M., Paradiso, M., Connors, B. W. (2012) Neuroscience: Exploring the Brain. Lippincott Williams & Wilkins.

Berkel, S., Marshall, C. R., Weiss, B., Howe, J., Roeth, R., Moog, U., Endris, V., Roberts, W., Szatmari, P., Pinto, D., Bonin, M., Riess, A., Engels, H., Sprengel, R., Scherer, S. W., and Rappold, G. A. (2010) Mutations in the SHANK2 synaptic scaffolding gene in autism spectrum disorder and mental retardation. *Nat. Genet.*, 42, 489–491.

Bhakar, A. L., Dolen, G., Bear, M. F. (2012). The pathophysiology of fragile X (and what it teaches us about synapses). *Annu. Rev. Neurosci.*, 35, 417–443.

Bléoo, S., Sun, X., Hendzel, M. J., Rowe, J. M., Packer, M., Godbout, R. (2001) Association of human DEAD box protein DDX1 with a cleavage stimulation factor involved in 3'-end processing of pre-MRNA. *Mol. Biol. Cell*, 12, 3046–59.

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

Boeckers, T. M., Segger-Junius, M., Iglauer, P., Bockmann, J., Gundelfinger, E. D., Kreutz, M. R., Richter, D., Kindler, S., Kreienkamp, H.-J. (2004) Differential expression and dendritic transcript localization of Shank family members: identification of a dendritic targeting element in the 3' untranslated region of Shank1 mRNA. *Mol. Cell. Neurosci.*, 26, 182–90.

Boeckers, T. M., Kreutz, M. R., Winter, C. et al. (1999a) Proline-rich synapse-associated protein-1/cortactin binding protein 1 (ProSAP1/CortBP1) is a PDZ-domain protein highly enriched in the postsynaptic density. *J. Neurosci.*, 19, 6506–6518.

Boeckers, T. M., Winter, C., Smalla, K. H., Kreutz, M. R., Bockmann, J., Seidenbecher, C., Garner, C. C., Gundelfinger, E. D. (1999b) Proline-rich synapse-associated proteins ProSAP1 and ProSAP2 interact with synaptic proteins of the SAPAP/GKAP family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 264, 247–52.

Bramham, C. R., Wells, D. G. (2007) Dendritic mRNA: transport, translation and function. *Nat. Rev. Neurosci.*, 8, 776–789.

Broadus, J., Fuerstenberg, S., Doe, C. Q. (1998) Staufen-dependent localization of prospero mRNA contributes to neuroblast daughter-cell fate. *Nature*, 391, 792–795.

Brummelkamp, T. R., Bernards, R., Agami, R. (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 296, 550–553.

Burgin, K. E., Waxham, M. N., Rickling, S., Westgate, S. A., Mobley, W. C., & Kelly, P. T. (1990) In situ hybridization histochemistry of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase in developing rat brain. *The Journal of Neuroscience*, 6, 1788–1798.

Cajigas IJ, Tushev G, Will TJ, tom Dieck S, Fuerst N, Schuman E. M. (2012) The local transcriptome in the synaptic neuropil revealed by deep sequencing and high-resolution imaging. *Neuron*, 74, 453–466.

Collingridge, G. L., Isaac, J. T., Wang, Y. T. (2004) Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.*, 5, 952–962.

Darnell, J. C., Fraser, C. E., Mostovetsky, O., Stefani, G., Jones, T.A., Eddy, S. R., Darnell, R. B. (2005) Kissing complex RNAs mediate interaction between the Fragile-X mental retardation protein KH2 domain and brain polyribosomes. *Genes. Dev.*, 19, 903–918.

Derkach, V. A., Oh, M. C., Guire, E. S., Soderling, T.R. (2007) Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.*, 8, 101–113.

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

Dugre-Brisson, S,. Elvira, G., Boulay, K., Chatel-Chaix, L., Mouland, A. J., DesGroseillers, L. (2005) Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic Acids Res.*, 33, 4797–4812.

Durand, C. M., Betancur, C., Boeckers, T. M., Bockmann, J., Chaste, P., Fauchereau, F., Nygren, G., Rastam, M., Gillberg, I. C., Anckarsäter, H., Sponheim, E., Goubran-Botros, H., Delorme, R., Chabane, N., Mouren- Simeoni, M. C., de Mas, P., Bieth, E., Rogé, B., Héron, D., Burglen, L., Gillberg, C., Leboyer, M., and Bourgeron, T. (2007) Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat. Genet.*, 39, 25–27.

Eberwine, J., Crino, P. (2001). Analysis of mRNA populations from single live and fixed cells of the central nervous system. *Current Protocols in Neuroscience*, Unit 5.3.

Falley, K., Schütt, J., Iglauer, P., Menke, K., Maas, C., Kneussel, M., Kindler, S., Wouters, F. S., Richter, D., Kreienkamp, H.-J. (2009) Shank1 mRNA: dendritic transport by kinesin and translational control by the 5'untranslated region. *Traffic,* 10, 844–857.

Ferraguti, F., Crepaldi, L., Nicoletti, F. (2008) Metabotropic glutamate 1 receptor: current concepts and perspectives. *Pharmacol. Rev.*, 3, 536–581.

Gallia, G.L., Johnson, E.M. and Khalili, K. (2000) Puralpha: a multifunctional single-stranded DNA- and RNA-binding protein. *Nucleic Acids Res.*, 28, 3197–3205.

Gao, Y., Tatavarty, V., Korza, G., Levin, M. K., Carson, J. H. (2008) Multiplexed dendritic targeting of alpha calcium calmodulin- dependent protein kinase II, neurogranin, and activity-regulated cytoskeleton-associated protein RNAs by the A2 pathway. *Mol. Biol. Cell*, 19, 2311–2327.

Garner, C. C., Tucker, R. P., Matus, A. (1988). Selective localization of messenger RNA for cytoskeletal protein MAP2 in dendrites. *Nature*, 6200, 674–677.

Gherzi, R., Lee, K. Y., Briata, P., Wegmüller, D., Moroni, C., Karin, M., Chen, C. Y. (2004) A KH domain RNA binding protein, KSRP, promotes ARE-directed mRNA turnover by recruiting the degradation machinery. *Mol. Cell.*, 14, 571–583.

Gladding, C. M., Fitzjohn, S. M., Molnar, E. (2009). Metabotropic glutamate receptor-mediated long-term depression: molecular mechanisms. *Pharmacol. Rev.*, 61, 395–412.

Godbout, R., Squire, J. (1993) Amplification of a DEAD box protein gene in retinoblastoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., 90, 7578–7582.

Goetze, B., Tuebing, F., Xie, Y., Dorostkar, M. M., Thomas, S., Pehl, U., Boehm, S., Macchi, P., Kiebler, M. A. (2006) The brain-specific double-stranded RNA-binding protein Staufen2 is required for dendritic spine morphogenesis. *J. Cell Biol.*, 172, 221–231.

Grabrucker, A. M., Schmeisser, M. J., Schoen, M., Boeckers, T. M. (2011) Postsynaptic ProSAP/Shank scaffolds in the cross-hair of synaptopathies. *Trends in Cell Biology*, 21, 10.

Grant, S. G. (2012). Synaptopathies: diseases of the synaptome. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 22, 522–529.

Gray, E.G. (1959) Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *J. Anat.*, 93, 420–433.

Harris, K. M., Stevens, J. K. (1989) Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J. Neurosci.*, 9, 2982–2997.

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

Hokkanen, S., Feldmann, H. M., Ding, H., Jung, C. K. E., Bojarski, L., Renner-Müller, I., Schüller, U., Kretzschmar, H., Wolf, E., Herms, J. (2012) Lack of Pur-alpha alters postnatal brain development and causes megalencephaly. *Hum. Mol. Genet.*, 21, 473–484.

Hollmann, M., Heinemann, S. (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.*, 17, 31–108.

Husi, H., Ward, M. A., Choudhary, J. S., Blackstock, W. P., Grant, S. G. (2000) Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. *Nat. Neurosci.*, 3, 661–669.

Ikeda, F., Deribe, Y. L., Skånland, S. S., Stieglitz, B., Grabbe, C., Franz-Wachtel, M., van Wijk, S. J., Goswami, P., Nagy, V., Terzic, J., Tokunaga, F., Androulidaki, A., Naka-gawa, T., Pasparakis, M., Iwai, K., Sundberg, J. P., Schaefer, L., Rittinger, K., Macek, B., Dikic, I. (2011) SHARPIN forms a linear ubiquitin ligase complex regulating NF-κB activity and apoptosis. *Nature*, 471, 637–641.

Janas, J., Skowronski, J., Van Aelst, L. (2006). Lentiviral delivery of RNAi in hippocampal neurons. *Methods in Enzymology*, 406, 593–605.

Jin, P., Duan, R., Qurashi, A., Qin, Y., Tian, D., Rosser, T. C., Liu, H., Feng, Y., Warren, S. T. (2007). Pur alpha binds to rCGG repeats and modulates repeat-mediated neurodegeneration in a Drosophila model of fragile X tremor/ataxia syndrome. *Neuron*, 55 556–564.

Johnson, E. M., Daniel, D. C., Gordon, J. (2013) The Pur protein family: genetic and structural features in development and disease. *Journal of Cellular Physiology*, 228, 930–937.

Johnson, E. M., Kinoshita, Y., Weinreb, D. B., Wortman, M. J., Simon, R., Khalili, K., Winckler, B., Gordon, J. (2006) Role of Pur alpha in targeting mRNA to sites of translation in hippocampal neuronal dendrites. *J. Neurosci. Res.*, 83, 929–943.

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

Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, Th. (2000) Principles of Neural Science

Kedersha, N., Anderson, P. (2009). Regulation of translation by stress granules and processing bodies. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 90, 155–185.

Keith, D. and El-Husseini, A. (2008) Excitation control: balancing PSD-95 function at the synapse. *Front. Mol. Neurosci.*, 1, 4.

Kennedy, M. B. (2000) Signal-processing machines at the postsynaptic density. *Science*, 290, 750–754.

Kim, C. H., Lee, J., Lee, J. Y., Roche, K. W. (2008). Metabotropic glutamate receptors: phosphorylation and receptor signaling. *J. Neurosci. Res.*, 86, 1–10.

Kim, M. H., Choi, J., Yang, J., Chung, W., Kim, J. H., Paik, S. K., Kim, K., Han, S., Won, H., Bae, Y. S., et al. (2009). Enhanced NMDA receptor-mediated synaptic transmission, enhanced long-term potentiation, and impaired learning and memory in mice lacking IRSp53. *J. Neurosci.*, 29, 1586–1595.

Kim, Y. K., Furic, L., DesGroseillers, L., Maquat, L. E. (2005) Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell*, 120, 195–208.

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

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

Klauck, T. M., Scott, J. D. (1995) The postsynaptic density: a subcellular anchor for signal transduction enzymes. *Cell Signal*, 7, 747–757.

Kornau, H. C., Schenker, L. T., Kennedy, M. B. and Seeburg, P. H. (1995) Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science*, 269, 1737–1740.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–5.

Lebeau, G., Miller, L. C., Tartas, M., McAdam, R., Laplante, I., Badeaux, F., Desgroseillers, L., Sossin, W. S., Lacaille, J. C. (2011) Staufen 2 regulates mGluR long-term depression and Map1b mRNA distribution in hippocampal neurons. *Learn. Mem.*, 18, 314–326.

Lin, Y., Brosius, J., Tiedge, H.. Neuronal BC1 (2001) RNA: Ko-expression with growth-associated protein-43 messenger RNA. *Neuroscience*, 103, 465–79. **Link**, W., Konietzko, U., Kauselmann, G., Krug, M., Schwanke, B., Frey, U., Kuhl, D. (1995) Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 12, 5734–5738.

Lyford, G. L., Yamagata, K., Kaufmann, W. E., Barnes, C. A., Sanders, L. K., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Lanahan, A. A., Worley, P. F. (1995) Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron*, 2, 433–445.

Ma, W. K., Cloutier, S. C., Tran, E. J. (2013) The DEAD-box Protein Dbp2 Functions with the RNA-Binding Protein Yra1 to Promote mRNP Assembly. *J. Mol. Biol.*, in press.

Macchi, P., Brownawell, A. M., Grunewald, B., DesGroseillers, L., Macara, I. G., Kiebler, M. A. (2004) The brain-specific double-stranded RNA-binding protein Staufen2: nucleolar accumulation and isoform-specific exportin-5-dependent export. *J. Biol. Chem.*, 279, 31440–31444.

Malenka, R. C. (1994) Synaptic plasticity in the hippocampus: LTP and LTD. *Cell*, 79, 535–538.

Malenka, R.C. and Nicoll, R.A. (1999) Long-term potentiation—a decade of progress? *Science*, 285, 1870–1874.

Malinow, R., Malenka, R. C. (2002) AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. Annu. *Rev. Neurosci.*, 25, 103–126.

Mameza, M. G., Dvoretskova, E., Bamann, M., Hönck, H.-H., Güler, T., Boeckers, T. M., Schoen, M., Verpelli, C.,Sala, C., Barsukov, I., Dityatev, A., Kreienkamp, H.-J. (2013) SHANK3 Gene Mutations Associated with Autism Facilitate Ligand Binding to the Shank3 Ankyrin Repeat Region. *J. Biol. Chem.*, 13; 288(37), 26697–708.

Martel, C., Macchi, P., Furic, L., Kiebler, M. A., Desgroseillers, L. (2006). Staufen1 is imported into the nucleolus via a bipartite nuclear localization signal and several modulatory determinants. *Biochem. J.*, 393, 245–254.

Martin, S. J., Grimwood, P. D., Morris, R.G. (2000) Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. Annu. Rev. *Neurosci.*, 23, 649–711.

Miki, T., Takano, K., Yoneda, Y. (2005) The role of mammalian Staufen on mRNA traffic: a view from its nucleozytoplasmic shuttling function. *Cell Struct. Funct.*, 30, 51–6.

Mikl, M., Vendra, G., Kiebler, M. A. (2011) Independent localization of MAP2, CaMKIIa and b-actin RNAs in low copy numbers. *EMBO Rep.*, 12, 1077–84.

Nakanishi, S. (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science*, 258, 597–603.

Niswender, C. M. and Conn, P. J. (2010). Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 50, 295–322.

Onishi, H., Kino, Y., Morita, T., Futai, E., Sasagawa, N., Ishiura, S. (2008) MBNL1 associates with YB-1 in cytoplasmic stress granules. *J. Neurosci. Res.*, 86, 1994–2002.

Pan, C., Russell, R. (2010) Roles of DEAD-box proteins in RNA and RNP Folding. *RNA Biol.*, 7, 667–76.

Park, E., Maquat, L. E. (2013) Staufen-mediated mRNA decay. RNA, 4, 423–35.

Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L. (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic. Acids. Res.* 30, e36.

Renner, M., Specht, C. G., Triller, A. (2008) Molecular dynamics of postsynaptic receptors and scaffold proteins. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 18, 532–540.

Riechmann, V. and Ephrussi, A. (2001) Axis formation during Drosophila oogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 11, 374–383.

Rocak, S., Linder, P. (2004). DEAD-box proteins: The driving forces behind RNA metabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 5, 232–241.

Rothé, F., Gueydan, C., Bellefroid, E., Huez, G., Kruys, V. (2006) Identification of FUSE-binding proteins as interacting partners of TIA proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 343, 57–68.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 74: 5463–7.

Sato, D., Lionel, A. C., Leblond, C. S., Prasad, A., Pinto, D., Walker, S., O'Connor, I., Russell, C., Drmic, I. E., Hamdan, F. F., Michaud, J. L., Endris, V., Roeth, R., Delorme, R., Huguet, G., Leboyer, M., Rastam, M., Gillberg, C., Lathrop, M., Stavropoulos, D. J., Anagnostou, E., Weksberg, R., Fom- bonne, E., Zwaigenbaum, L., Fernandez, B. A., Roberts, W., Rappold, G. A., Marshall, C. R., Bourgeron, T., Szatmari, P., Scherer, S. W. (2012) SHANK1 deletions in males with autism spectrum disorder. *Am. J. Hum. Genet.,* 90, 879–887.

Sawallisch, C., Berhorster, K., Disanza, A., Mantoani, S., Kintscher, M., Stoenica, L., Dityatev, A., Sieber, S., Kindler, S., Morellini, F., Schweizer, M., Boeckers, T. M., Korte, M., Scita, G., Kreienkamp, H.-J. (2009). The insulin receptor substrate of 53 kDa (IRsP53) limits hippocampal synaptic plasticity. *J. Biol. Chem.*, 284, 9225–9236.

Scherr, M., Battmer, K., Ganser, A., Eder, M. (2003). Modulation of gene expression by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA. *Cell Cycle*, 2, 251–257.

Schütt, J., Falley, K., Richter, D., Kreienkamp, H.-J., Kindler, S. (2009) Fragile X mental retardation protein regulates the levels of scaffold proteins and glutamate receptors in postsynaptic densities. *J. Biol. Chem.*, 284, 25479–25487.

Shanmugarajan, S., Haycraft, C. J., Reddy, S. V., Ries, W. L. (2012) NIP45 negatively regulates RANK ligand induced osteoclast differentiation. *J. Cell Biochem.*, 113, 1274–1281.

Sheng, M. (2001) Molecular organization of the postsynaptic specialization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 19, 7058–7061.

Sheng, M., Hoogenraad, C. C. (2007). The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu. Rev. Biochem.*, 76, 823–847.

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

Soltau, M., Berhorster, K., Kindler, S., Buck, F., Richter, D., and Kreienkamp, H. J. (2004). Insulin receptor substrate of 53 kDa links postsynaptic shank to PSD-95. *J. Neurochem.*, 90, 659–665.

Soltau, M., Richter, D., Kreienkamp, H.-J. (2002) The insulin receptor substrate IRsP53 links postsynaptic shank1 to the small G-protein cdc42. *Mol. Cell Neurosci.*, 21, 575–83.

Stefani, G., Fraser, C. E., Darnell, J. C., Darnell, R. B. (2004) Fragile X mental retardation protein is associated with translating polyribosomes in neuronal cells. *Journal of Neuroscience*, 24, 7272–7276.

Steward, O., Levy, W. B. (1982) Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus. *J. Neurosci.*, 2, 284–291.

Steward, O., Schuman, E. M. (2003) Compartmentalized synthesis and degradation of proteins in neurons. *Neuron.*, 40, 347–59.

Stoll, G., Pietiläinen, O. P. H., Linder, B., Suvisaari, J., Brosi, C., Hennah, W., Leppä, V., Torniainen, M., Ripatti, S., Ala-Mello, S., Plöttner, O., Rehnström, K., Tuulio-Henriksson, A., Varilo, T., Tallila, J., Kristiansson, K., Isohanni, M., Kaprio, J., Eriksson, J. G., Raitakari, O. T., Lehtimäki, T.,Jarvelin, M.-R., Salomaa, V., Hurles, M., Stefansson, H., Peltonen, L., Sullivan, P. F., Paunio, T., Lönnqvist, J., Daly, M. J., Fischer, U., Freimer, N. B., Palotie, A. (2013) Deletion of TOP3b, a component of FMRP-containing mRNPs, contributes to neurodevelopmental disorders. *Nat. Neurosci.*, 16, 1228–37.

Tang, S. J., Meulemans, D., Vazquez, L., Colaco, N., Schuman, E. (2001) A role for a rat homolog of staufen in the transport of RNA to neuronal dendrites. *Neuron*, 32, 463–475.

Tokunaga, F., Nakagawa, T., Nakahara, M., Saeki, Y., Taniguchi, M., Sakata, S., Tanaka, K., Nakano, H., Iwai, K. (2011) SHARPIN is a component of the NF-κB-activating linear ubiquitin chain assembly complex. *Nature*, 471, 633–636.

Tübing, F., Vendra, G., Mikl, M., Macchi, P., Thomas, S., Kiebler, M. A. (2010) Dendritically localized transcripts are sorted into distinct ribonucleoprotein particles that display fast directional motility along dendrites of hippocampal neurons. *J. Neurosci.*, 30, 4160–4170. **Verhoeyen**, E., Cosset, F. L. (2004) Surface-engineering of lentiviral vectors. *J. Gene Med*, 6, Suppl 1, 83–94.

Verpelli, C., Dvoretskova, E., Vicidomini, C., Rossi, F., Chiappalone, M., Schoen, M., Di Stefano, B., Mantegazza, R., Broccoli, V., Böckers, T. M., Dityatev, A., Sala, C. (2011). Importance of Shank3 protein in regulating metabotropic glutamate receptor 5 (MGluR5) expression and signaling at synapses. *J. Biol. Chem.*, 286, 34839–34850.

Vessey, J. P., Amadei, G., Burns, S. E., Kiebler, M. A., Kaplan, D. R., Miller, F. D. (2012) An asymmetrically localized Staufen2-dependent RNA complex regulates maintenance of mammalian neural stem cells. *Cell Stem Cell.*, 11, 517–28.

Vessey, J. P., Macchi, P., Stein, J. M., Mikl, M., Hawker, K. N., Vogelsang, P., Wieczorek, K., Vendra, G., Riefler, J., Tübing, F., Aparicio, S. A., Abel, T., Kiebler, M. A. (2008) A loss of function allele for murine Staufen1 leads to impairment of dendritic Staufen1-RNP delivery and dendritic spine morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA,105, 16374–9.

Wang, H., Iacoangeli, A., Lin, D., Williams, K., Denman, R. B., Hellen, C. U., Tiedge, H. (2005) Dendritic BC1 RNA in translational control mechanisms. *J Cell Biol.*, 171, 811–821.

Wang, H., Zhuo, M. (2012). Group I metabotropic glutamate receptor-mediated gene transcription and implications for synaptic plasticity and diseases. *Front. Pharmacol.*, 3, 189.

Wiznerowicz, M., Trono, D. (2003) Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J Virol*, 77, 8957–8961.

Xu, D., Shen, W., Guo, R., Xue, Y., Peng, W., Sima, J., Yang, J., Sharov, A., Srikantan, S., Yang, J., Fox III, D., Qian, Y., Martindale, J. L., Piao, Y., Machamer, J., Joshi, S. R., Mohanty, S., Shaw, A. C., Lloyd, T. E., Brown, G. W., Ko, M. S. H., Gorospe, M., Zou, S., Wang, W. (2013) Top3β is an RNA topoisomerase that works with fragile X syndrome protein to promote synapse formation. *Nature Neuroscience*, 16,1238–1247.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ampere <i>AU-rich element mediated decay</i> Ampizillin <i>Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid</i> <i>Analysis of variance</i> Aktivitätsreguliertes Zytoskelett-assoziiertes Protein <i>Ankyrin-repeat-region</i> Aminosäure
AU-rich element mediated decay Ampizillin Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid Analysis of variance Aktivitätsreguliertes Zytoskelett-assoziiertes Protein Ankyrin-repeat-region Aminosäure
Ampizillin Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid Analysis of variance Aktivitätsreguliertes Zytoskelett-assoziiertes Protein Ankyrin-repeat-region Aminosäure
Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid Analysis of variance Aktivitätsreguliertes Zytoskelett-assoziiertes Protein Ankyrin-repeat-region Aminosäure
Analysis of variance Aktivitätsreguliertes Zytoskelett-assoziiertes Protein Ankyrin-repeat-region Aminosäure
Aktivitätsreguliertes Zytoskelett-assoziiertes Protein Ankyrin-repeat-region Aminosäure
A <i>nkyrin-repeat-region</i> Aminosäure
Aminosäure
Adenosin-tri-phosphat
Bovines serum albumin
Beziehungsweise
Calmodulin/ Ca2+-abhängige Kinase
Complementary DNA
Coding DNA sequence
Cytomegalievirus
Cycle threshold
Control, Kontrolle
Drosophila melanogaster
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase
Diethylpyrocarbonat
Asp-Glu-X-His
S-(3,5)-Dihydroxyphenylglycin
<i>Days in vitro</i> , Tage in Kultur
Dulbecco´s modified eagle medium
Desoxyribonucleidacid
Deoxyribonucleoside 5'-triphospate
Doppelstrang-RNA-Bindedomäne
Escherichia coli
Ethylendiamintetraessigsäure
Enhanced green fluorescent protein
Extracellular-signal Regulated Kinase
Fluorescence activated cell sorting
Fragile X Mental Retardation Protein
Forward
Fragiles-X-assoziiertes Tremor-/Ataxie-Syndrom
Gramm/Erdoravitation

GABA	γ-Aminobuttersäure
GAPDH	Glyzerinaldehyddehydrogenase
GluR1	AMPA-Rezeptoruntereinheit 1
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEK	Human embryonic kidney
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
lgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipzitation
IRES	Internal ribosomal entry site
IRSp53	Insulinrezeptor substrat von 53 kDa
IZC	Immunzytochemie
Kan	Kanamyzin
kb	Kilobase
kDa	Kilodaton
KH	hnRNP-K Homology
KIF	Kinesin-Familie
LB	Luria Bertoni
LTD	Long term depression, Langzeit Depression
LTP	Long term potentiation, Langzeit Potenzierung
LV	Lentivirus
Μ	Molar
MaGuK	Membranassoziierte Guanylatkinasen
MAP	Mitogen activated protein
MAP2	Microtubuli associated protein 2
MBP	Myelin basic protein
MEM	Minimum essential medium
mGluR	Metabotrope Glutamatrezeptoren
Min	Minute
MOI	Multiplicity of infection
mRFP	Monomeric Red Fluorescent Protein
mRNA	Messenger Ribonucleicacid
mRNP	Messenger Ribonukleopartikel
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OD	Optische Dichte
PABP	Poly-(A)-Bindendes Protein
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase Ketten Reaktion
PDZ	PSD-95/Discs-large/ZO-1
PKC	Proteinkinase C
PLL	Poly-L-Lysin

pro-rich	Prolin-rich-region
prox1	Prospero homeobox 1
PSD	Postsynaptische Dichte
PSD95	Postsynaptic density protein 95 kDa
Pura	Purine-rich element binding protein A
RBP	mRNA-Bindeprotein
RER	Rauhes endoplasmatisches Reticulum
rev	Reverse
RGG	Arginin-Glycin-Glycin-Wiederholungen
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RISC	RNA-induced silencing complex
RL	Rohlysat
RNAi	RNA interference
RNase	Ribonuklase
rpm	Revolutions per minute
RT-qPCR	Reverse Transkriptase quantitative real-time PCR
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinasen
SAM	Steril alpha motif
Sap	Synapse-associated protein
Sapap	Synapse-associated protein 90 associated protein
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sek	Sekunde
SH3	Src-homology 3
Shank	SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Small interference RNA
SMD	Staufen1 mediated decay, Staufen1 vermittelter RNA-Abbau
Stau2	Staufen2
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
vGlut1	Vesicular glutamate transporter 1
VSV.G	Vesicular stomatitis virus G glycoprotein
WB	Westernblot
WT	Wildtyp
z. B.	Zum Beispiel

POSTER UND VERÖFFENTLICHUNGEN

Posterpräsentationen

32nd Blankenese Conference: Neurodegeneration: From Multiple Sclerosis to Alzheimer Disease, Mai 2012

2nd International Symposium for PhD Students on Protein Trafficking in Health and Disease, September 2012

Titel: "The N-terminal region of Shank proteins contains a novel domain involved in intramolecular regulation of the ankyrin repeat region" Margarete Bamann, Marie-Germaine Mameza, Sabrina Sieber, Hans-Hinrich Hönck and Hans-Jürgen Kreienkamp

Veröffentlichungen

Mameza, M. G., Dvoretskova, E., Bamann, M., Hönck, H.-H., Güler, T., Boeckers, T. M., Schoen, M., Verpelli, C.,Sala, C., Barsukov, I., Dityatev, A., Kreienkamp, H.-J. (2013) SHANK3 Gene Mutations Associated with Autism Facilitate Ligand Binding to the Shank3 Ankyrin Repeat Region. *J. Biol. Chem.* 13;288(37):26697-708.

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt vor allem Prof. Dr. Andreas Gal und PD Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp, für die Möglichkeit diese Arbeit am Institut für Humangenetik anzufertigen. PD Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp danke ich besonders für die Anleitung und die fachliche Unterstützung, die maßgeblich zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Thorsten Burmester danke ich für die Übernahme der ko-Betreuung und des schriftlichen Gutachtens.

In diesem Rahmen möchte ich mich bei allen Mitgliedern und Ehemaligen des Instituts für Humangenetik, insbesondere den Arbeitsgruppen Kreienkamp und Kindler, für ein entspanntes Arbeitsklima und die stetige Unterstützung in fachlicher Hinsicht bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Katrin Studtmann und Dr. Janin Ölschläger-Schütt für die tatkräftige Unterstützung und das wissenschaftliche Know-how, dass sie gerne mit mir teilten.

Ich danke Hinne Hönck für fast drei Jahre tolle Zusammenarbeit und Beistand bei der Laborarbeit.

Den Core Facilities des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gilt meine Dank für Beratung und Betreuung

UKE Microscopic Imaging Facility (umif) FACS Sorting Core Unit Vektor Facility

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die moralische Unterstützung, für die Motivation und auch für eine gute Zeit. Ein großer Dank geht dabei an Jan Baumann, Juliane Thümmler, Franziska Wetzel und Sebastian Bamann für die Korrektur des Manuskripts.

Zu guter Letzt danke ich Bastian, dass Berlin-Hamburg funktioniert und er immer an meiner Seite ist.