

**Charakterisierung von
Staufen1-enthaltenden Ribonukleoprotein Partikeln
in Säugern**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Cornelia Brendel

aus Wolfsburg

Hamburg 2005

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

Tag der Disputation: 05. November 2004

Hamburg, den 22. Oktober 2004



Professor Dr. Arno Frühwald
Dekan

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	11
2.1 Plasmide und Oligonukleotide	11
2.1.1 Grundvektoren	11
2.1.2 Konstruierte Plasmide.....	12
2.1.3 Oligonukleotide	13
2.2 Antikörper und Immunreagenzien	15
2.3 Bakterienstämme, Zelllinien und Tiere	16
2.4 DNA: Molekularbiologische Methoden	17
2.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR, <i>polymerase chain reaction</i>).....	17
2.4.2 DNA-Gelelektrophorese.....	17
2.4.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	18
2.4.4 Restriktion von DNA mit Endonukleasen.....	18
2.4.5 Ligation von DNA-Fragmenten	18
2.4.6 Transformation.....	18
2.4.7 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	19
2.4.8 DNA-Sequenzierung.....	19
2.5 RNA: Molekularbiologische Methoden	19
2.5.1 Präparation von RNA aus Gewebe und Zellen.....	19
2.6 Proteine: Molekularbiologische und biochemische Methoden, Immuncytochemie	20
2.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	20
2.6.2 Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen	20
2.6.3 Transfer und immunologische Detektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen (<i>Western Blot</i>)	20
2.6.4 Affinitätsreinigung von PDZ-Fusionsproteinen.....	21
2.6.5 Expression und Aufreinigung von Fusionsproteinen.....	22
2.6.6 GST- <i>Pulldown Assay</i>	23
2.6.7 Koimmunpräzipitation aus transient transfizierten HEK293-Zellen.....	24
2.6.8 Zellfraktionierung und Salzextraktion.....	24
2.6.9 Sucrosedichtegradienten Zentrifugation	25
2.6.9.1 Sucrosedichtegradienten Zentrifugation mit HEK293-Zellextrakt... 25	

2.6.9.2 Sucroседichtegradienten Zentrifugation mit Polysomen	26
2.6.10 Massenspektrometrie	26
2.7 <i>In vitro</i> Translations-Assay in Retikulocytenlysat aus Kaninchen.....	27
2.8 Zellkultur: Molekularbiologische und Biochemische Methoden	28
2.8.1 Kultivierung und Transfektion von HEK293-Zellen	28
2.8.2 Kultivierung und Transfektion von primären Hippocampus-Neuronen	28
2.8.3 Herstellung von Proteinextrakten aus kultivierten HEK293-Zellen	29
2.8.4 Immuncytochemie und Mikroskopie.....	29
2.9 Firmenverzeichnis	31
3 Ergebnisse	32
3.1 Subzelluläre Verteilung von Stau1 und Stau2	32
3.1.1 Erzeugung eines Anti-rStau2 Antikörpers.....	32
3.1.2 Untersuchung der subzellulären Lokalisierung von Stau1 und Stau2	33
3.1.3 Verteilung von Stau1 und Stau2 in subzellulären Fraktionen	37
3.2 Charakterisierung von Stau1-Ribonukleoprotein-Partikeln.....	40
3.2.1 Affinitätsreinigung nativer Proteinkomplexe über GKAP-Sepharose	40
3.2.2 Stau1-Ribonukleoprotein-Komplexe	41
3.2.3 Überprüfung der identifizierten Komponenten von Stau1-RNP-Komplexen	47
3.3 <i>In vivo</i> Interaktion von Stau1 und Nucleolin in HEK293-Zellen	50
3.4 Stau1-RNP-Komplexe enthalten intakte Ribosomen	53
3.5 Stau1 kofraktioniert mit intakten Ribosomen und Polysomen	53
3.6 Stau1 interagiert mit dem ribosomalen Protein P0	59
3.6.1 Koexpression von Stau1 und P0 in HEK293-Zellen und Hippocampus-Neuronen	61
3.6.2 Assoziation von rStau1 und rP0 in transfizierten HEK293-Zellen.....	63
3.7 Wirkung von Stau1 auf die Translation.....	64
4 Diskussion	67
5 Literaturverzeichnis	77
6 Zusammenfassung.....	87

Abkürzungen

Acc.	Zugangsnummer der GenBank
α-CaMKII	α -Isoform der Ca^{2+} / Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II
Ak	Antikörper
AraC	Cytosin- β -D-Arabinofuranosid
Arc	<i>activity-regulated cytoskeleton-associated protein</i>
BLE	<i>bicoid localization element</i>
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHO	<i>chinese hamster ovary cells</i>
CPE	cytoplasmatisches Polyadenylierungs-Element
CPEB	CPE-Bindeprotein
CREB	CRE-Bindeprotein
dsRBD	Doppelstrang-RNA-Bindedomäne
DMEM	<i>Dulbecco's Minimal Essential Medium</i>
DTE	Dendritisches Transportelement
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EJC	<i>Exon-Exon-Junction Complex</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fötale Kälberserum
FMRP	<i>Fragile X Mental Retardation Protein</i>
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GKAP	<i>guanylat-kinase associated protein</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HBSS	<i>Hank's Buffered Salin Solution</i>
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
His	Histidin
hnRNP	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i>
HRP	<i>Horsradish Peroxidase</i>
IPTG	Isopropyl β -D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Bertoni
LTP	Langzeitpotenzierung
M	Molar, Mol/Liter

MAP2	Mikrotubulus assoziiertes Protein 2
min	Minute
mRNA	<i>messenger</i> RNA
NES	Nukleäres Exportsignal
NHS	<i>N</i> -Hydroxy-Succinimidyl
NLS	Nukleäres Lokalisierungssignal
NMDA	<i>N</i> -Methyl-D-Aspartat
nt	Nukleotide
OD₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PABP	Poly (A)-Bindeprotein
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDZ	<i>PSD-95/Dlg/ZO-1</i>
PSD	postsynaptische Dichte
RGG	Arginin-Glycin-Glycin
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoprotein
RRM	<i>RNA Recognition Motif</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
Sam68	<i>Src-associated in mitosis protein of 68 kDa</i>
SCG	<i>Superior Cervical Ganglia</i> (obere Cervicalganglien)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Salz-Natriumcitrat-Lösung
TAE	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCL	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrochlorid
tRNA	Transfer-RNA
u	Enzymeinheiten (units)
UTR	Untranslatierte Region
Vera	<i>Vg1-RNA binding ER-association</i>
Vg1	Vegetative RNA 1
Vg1-RBP	Vg1-RNA Bindeprotein
VLE	vegetatives Lokalisierungselement
Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
ZBP-1	Zipcode Binding Protein 1

1 Einleitung

Eukaryotische Zellen verfügen über ein breites Spektrum an Mechanismen zur Regulation der Genexpression. Neben der Kontrolle durch Transkriptionsfaktoren, wird die Genexpression auch auf posttranskriptionaler Ebene reguliert. Ein Mechanismus der posttranskriptionalen Regulation ist die intrazelluläre Lokalisierung von RNA-Molekülen, die dazu dient, die Entstehung eines Genprodukts in bestimmten Regionen innerhalb der Zelle zu ermöglichen. Subzellulärer Transport und lokale Translation von RNA-Molekülen sind für die unterschiedliche Proteinzusammensetzung in bestimmten Zellkompartimenten von Bedeutung und spielen eine wichtige Rolle bei verschiedenen biologischen Prozessen, wie beispielsweise beim Paarungstypwechsel (*mating-type switch*) in *Saccharomyces cerevisiae* (Long *et al.*, 1997; Takizawa *et al.*, 1997), bei der Bewegung von Fibroblasten, bei synaptischer Plastizität in Neuronen (Bassell & Singer, 2001; Bassell *et al.* 1999) und bei der Embryogenese von *Drosophila melanogaster* und *Xenopus laevis* (Bashirullah *et al.* 1998; Lipshitz & Smibert, 2000). Eine fehlerhafte Proteinzusammensetzung einzelner subzellulärer Regionen kann beispielsweise in *Drosophila* zu schwerwiegenden Entwicklungsschäden und in Neuronen zu neurologischen Erkrankungen sowie zu einer Beeinträchtigung des Lernverhaltens führen.

In unterschiedlichen Zellsystemen wurde der molekulare Mechanismus der cytoplasmatischen RNA-Lokalisierung in den vergangenen Jahren genauer beschrieben. Die Lokalisierung kann bereits im Kern initiiert werden und basiert auf einer Interaktion *trans*-agierender RNA-Bindeproteine mit so genannten *cis*-agierenden Sequenzelementen innerhalb zu transportierender RNA-Moleküle. Die gebildeten Ribonukleoprotein (RNP)-Komplexe vermitteln nach dem Verlassen des Zellkerns den cytoplasmatischen Transport der Transkripte an ihren Bestimmungsort (Ainger *et al.*, 1993; Ferrandon *et al.*, 1994; St Johnston, 1995; Oleynikov & Singer, 1998; Knowles *et al.*, 1996). *Trans*-Faktoren können als Bestandteile der RNP-Komplexe bei verschiedenen Schritten der RNA-Lokalisierung, wie der RNA-Prozessierung im Kern, dem Export der RNA aus dem Zellkern, dem Transport entlang des Cytoskeletts, der Verankerung am

Bestimmungsort sowie der RNA-Stabilisierung und Translationsregulation eine Rolle spielen (Kloc *et al.*, 2002).

Während der Entwicklung von *Drosophila* und *Xenopus* wird durch regulierte Lokalisierung maternaler Transkripte eine Polarität in der Oocyte hergestellt, die für die Ausbildung von Entwicklungsmustern und die Festlegung der Körperachsen im Embryo essentiell ist. In *Drosophila* ist die RNA-Lokalisierung häufig mit einer lokal begrenzten Translation gekoppelt. So wird die *bicoid*-mRNA während der Oogenese zum anterioren Pol der Oocyte transportiert und dort verankert. Nach der Befruchtung wird die mRNA translatiert und es entsteht ein morphogenetischer Bicoid-Gradient, der für die Ausbildung von Kopf und Thorax im späteren Embryo essentiell ist (St Johnston & Nüsslein-Volhard, 1992). Ebenso werden die *oskar*- und *prospero*-Transkripte während der *Drosophila*-Entwicklung lokalisiert und lokal translatiert (Berleth *et al.*, 1988; Ephrussi *et al.*, 1991; Johnstone & Lasko, 2001). Das Doppelstrang-RNA-Bindeprotein Staufen ist an allen drei Lokalisierungsvorgängen beteiligt (St Johnston, 1995). Staufen spielt sowohl bei der Lokalisierung als auch bei der Verankerung und Translation der *oskar*-mRNA am posterioren Pol der Eizelle eine wichtige Rolle. Für die korrekte Lokalisierung der *oskar*-mRNA ist die Bildung eines RNP-Komplexes notwendig, der neben Staufen auch die RNA-Bindeproteine Mago nashi, Y14 und Barentsz enthält (Hachet & Ephrussi, 2001; Mohr *et al.*, 2001; van Eeden *et al.*, 2001). Im weiteren Verlauf der Entwicklung ist Staufen an der Verankerung der *bicoid*-mRNA am anterioren Pol der Oocyte beteiligt. Staufen interagiert direkt mit dem *bicoid*-Lokalisierungselement (BLE) innerhalb der 3'-UTR des Transkripts. Das BLE bildet eine komplexe Sekundärstruktur, die für die Staufen-abhängige anteriore Lokalisierung und Verankerung essentiell ist (St Johnston *et al.*, 1991; Ferrandon *et al.*, 1994; Ferrandon *et al.*, 1997; Micklem *et al.*, 2000). Die Injektion *in vitro* transkribierter *bicoid*-mRNA in Embryonen rekrutiert Staufen in RNP-Partikel, welche entlang von Mikrotubuli transportiert werden (Ferrandon *et al.*, 1994). Bei der asymmetrischen Teilung embryonaler Neuroblasten assoziiert Staufen mit der *prospero*-mRNA und ist am Transport des Transkripts von der apikalen zur basalen Seite beteiligt (Li *et al.*, 1997; Broadus *et al.*, 1998).

Den multifunktionalen Wirkmechanismus von Staufen vermitteln fünf Doppelstrang-RNA-Bindedomänen (dsRBD) (Micklem *et al.*, 2000). Die dritte

dsRBD (dsRBD3) ist für die *in vivo* Bindung von *oskar*-, *bicoid*- und *prospero*-Transkripten notwendig (Micklem *et al.*, 2000; St Johnston *et al.*, 1992; Ramos *et al.*, 2000). Die dsRBD2 reguliert die Mikrotubuli-abhängige posteriore Translokation der *oskar*-mRNA, während die dsRBD5 für die Translationsinitiation am posterioren Pol essentiell ist (Micklem *et al.*, 2000). Zudem vermittelt die dsRBD5 durch eine Interaktion mit dem Protein Miranda die Actin-abhängige Lokalisierung der *prospero*-mRNA in Neuroblasten (Li *et al.*, 1997; Schuldt *et al.*, 1998; Micklem *et al.*, 2000). Somit haben die dsRNA-Bindedomänen von Staufen unterschiedliche Funktionen und vermitteln, auch durch Assoziation mit anderen *trans*-Faktoren, den Mikrotubuli- bzw. Actin-abhängigen Transport sowie die Verankerung und Translation verschiedener Transkripte (Micklem *et al.*, 2000).

Während der *Xenopus*-Oogenese ist Staufen als Komponente eines RNP-Komplexes an der Lokalisierung der *Vg1* mRNA zum vegetativen Pol der Oocyte beteiligt (Yoon & Mowry, 2004). Innerhalb des Transportkomplexes ist die *Vg1* mRNA über das vegetative Lokalisierungs-Element (VLE) innerhalb der 3'UTR (Mowry & Melton, 1992) mit verschiedenen *trans*-agierenden Faktoren assoziiert. Neben Staufen wurden die RNA-Bindeproteine Vg1RBP/Vera (*Vg1 RNA binding protein /Vg1 RNA binding and ER association*) (Schwart *et al.*, 1992; Deshler *et al.*, 1998; Havin *et al.*, 1998), hnRNPI (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein I*) (Cote *et al.*, 1999) und Prrp (*prolin-rich RNA-binding protein*) (Zhao *et al.*, 2001) als Komplex-Bestandteile identifiziert. Vg1RBP/Vera und hnRNPI assoziieren bereits im Kern mit der *Vg1* mRNA. Beide Proteine sind auch in anderen Zelltypen an nukleären Vorgängen beteiligt. Das humane hnRNPI ist an Prozessen der RNA-Biogenese wie Spleißen und intranukleärem Transport beteiligt (Valcarcel & Gebauer, 1997) und in der Lage, sich zwischen Kern und Cytoplasma hin und her zu bewegen (Li & Yen, 2002; Xie *et al.*, 2003). Vg1RBP/Vera ist ein Ortholog des *Zipcode Binding Protein 1* (ZBP-1), das in Fibroblasten des Huhns an der cytoplasmatischen Lokalisierung von β -Actin mRNA beteiligt ist (Ross *et al.*, 1997) und ebenfalls bereits im Kern mit dem Transkript kolokalisiert (Oleynikov & Singer, 2003). Diese Befunde deuten darauf hin, dass die Entstehung von cytoplasmatischen mRNA-Transportkomplexen bereits im Zellkern beginnt. Diese Annahme wird durch die Beobachtung unterstützt, dass das Spleißen der *oskar* prä-mRNA an der ersten Exon-Exon-

Verbindung für die korrekte Lokalisierung des Transkripts zum posterioren Pol der *Drosophila*-Oocyte notwendig ist (Hachet & Ephrussi, 2004). Die nukleären Proteine Mago nashi und Y14 binden als Komponenten des EJC (*exon-exon-junction complex*), der nach Spleißvorgängen an den Exon-Exon-Verbindungen der mRNA entsteht und zusammen mit weiteren nukleären Proteinen den Kernexport vermittelt, bereits im Kern der Ammenzellen an die *oskar*-mRNA. Nach dem Verlassen des Zellkerns bleiben beide Proteine mit der RNA assoziiert und sind zusammen mit anderen cytoplasmatischen *trans*-Faktoren, wie Barentsz und Staufen, an der posterioren *oskar*-Lokalisierung beteiligt (Davis, 2004; van Eeden *et al.*, 2001). Die RNA-Biogenese im Kern führt demnach zur Bildung von RNP-Komplexen, deren Proteinkomponenten zum Teil für eine cytoplasmatische RNA-Lokalisierung notwendig sind.

Das Cytoskelett spielt bei der RNA-Lokalisierung eine entscheidende Rolle (Bassell & Singer 1997; Bashirullah *et al.*; 1998; Jansen, 2001; Palacios & Johnston, 2002). Actin-Mikrofilamente scheinen präferentiell an Transportvorgängen über kurze Distanzen in kleineren somatischen Zelltypen wie Fibroblasten, Myoblasten und Neuroblasten beteiligt zu sein. Mikrotubuli dagegen vermitteln in Oligodendrocyten, Oocyten und Neuronen Transporte über längere Strecken (Jansen, 1999). Während die Motorproteine Kinesin und Dynein den direkten Mikrotubuli-abhängigen Transport vermitteln, werden Myosin-ähnliche Motoren für den Transport entlang von Actin-Filamenten benötigt.

Das Motorprotein Kinesin spielt sowohl beim posterioren Transport der *oskar*-mRNA/Staufen-Komplexe in *Drosophila*-Oocyten als auch bei der Translokation der Staufen-assoziierten *Vg1* mRNA in *Xenopus*-Oocyten eine Rolle (Brendza *et al.*, 2000; Yoon & Mowry, 2004). Am Mikrotubuli-abhängigen Transport der *bicoid*-mRNA ist Staufen hingegen nicht beteiligt. Für den Transport interagiert die leichte Kette des Motorproteins Dynein mit dem Protein Swallow, welches möglicherweise als spezifischer Adaptor zwischen der *bicoid*-mRNA und dem Motorprotein fungiert (Schnorrer *et al.*, 2000).

Actin-abhängiger Transport ist am besten im Fall der Translokation der *Ash1* mRNA in die Knospenspitze sich teilender Hefezellen untersucht. Das RNA-Bindeprotein She2p bindet an das *cis*-agierende Lokalisierungselement der *Ash1* mRNA, und assoziiert über das Adaptorprotein She3p mit dem

Myosin-Motorprotein Myo4p (Bohl *et al.*, 2000; Takizawa & Vale, 2000). Der Transport der *prospero*-mRNA in sich asymmetrisch teilenden *Drosophila*-Neuroblasten erfolgt ebenfalls über das Actin-Cytoskelett (Micklem *et al.*, 2000; Roegiers & Jan, 2000; Bassell & Singer, 2001). Neben ihrer Funktion als Transportschiene werden Actin-Filamente auch zur Verankerung von Transkripten genutzt (Kloc *et al.*, 2001).

Die spezifische RNA-Lokalisierung in bestimmte Zellkompartimente ist nicht ausschließlich eine Eigenschaft von Keimzellen oder in der Embryonalentwicklung von Bedeutung. In verschiedenen somatischen Zelltypen wie Fibroblasten, Myoblasten, Epithelzellen, Oligodendrocyten und Neuronen wurden ebenfalls lokalisierte Transkripte als Bestandteil von RNP-Komplexen nachgewiesen (Bassell *et al.*, 1999; Bloom & Beach, 1999).

Bei Neuronen ist die zelluläre Polarität im Vergleich zu anderen eukaryotischen Zelltypen besonders ausgeprägt. Sie zeigen eine deutliche Aufteilung in verschiedene subzelluläre Bereiche, die sich in Form, Funktion und molekularer Zusammensetzung unterscheiden (Vale *et al.* 1992). Differenzierte Neurone bestehen aus einem Zellkörper und zwei Arten von Ausläufern, den stark verzweigten Dendriten und den Axonen (Craig & Banker, 1994). Entlang dieser Zellfortsätze befinden sich spezielle Strukturen, die Synapsen, welche Kontakt zu anderen Neuronen aufnehmen. Die Synapsen dienen der Signalaufnahme und -verarbeitung und zeichnen sich durch eine charakteristische Proteinzusammensetzung aus (Vale *et al.* 1992; Kim & Huganir, 1999).

Steward und Levy wiesen 1982 in Dendriten von Körnerzellen des *Gyrus dentatus*, speziell an der Basis dendritischer Dornen (Auswüchse des Dendriten mit synaptischen Kontakten), Polyribosomen nach (Peters *et al.*, 1970; Steward & Levy, 1982) und lieferten damit den ersten Hinweis auf lokale Translation in Dendriten. Später wurden neben weiteren Komponenten der Translations-Maschinerie, wie Initiations- und Elongationsfaktoren und tRNAs (Steward *et al.*, 1996; Tiedge & Brosius, 1996), das für die Synthese intergraler Membranproteine notwendige rauhe endoplasmatische Retikulum (rER) sowie Golgi-ähnliche Strukturen detektiert (Job & Eberwine, 2001). Die Anwesenheit von Komponenten für die Translation und posttranslationale Modifikation, sowie der Nachweis neu synthetisierter Proteine in Dendriten bzw. dendritischen Wachstumskegeln

unterstützt die Annahme einer lokal stattfindenden Proteinsynthese (Crino & Eberwine, 1996; Kindler *et al.*, 1997; Kuhl & Skehel, 1998; Steward & Schuman, 2001; Torre & Steward, 1992; Crino & Eberwine, 1996).

In Neuronen der Säugetiere werden spezifische mRNA-Moleküle aus dem Zellkern nicht nur ins Soma, sondern auch in die Dendriten transportiert, wobei der gerichtete Transport von etwa 400 verschiedenen Transkripten vermutet wird (Eberwine *et al.*, 2002). Bereits identifizierte lokalisierte Transkripte kodieren für verschiedene Klassen von Proteinen wie zum Beispiel membranintegrierte Rezeptoren (Glycin-Rezeptor, Glutamat-Rezeptor), Transkriptionsfaktoren (CREB), Neurotransmitter/Neuromodulatoren (Vasopressin), Strukturproteine (MAP2, Arc) und Enzyme (α CaMKII) (Übersicht: Kiebler & DesGroseillers, 2000). Zu den ersten Transkripten, die in Dendriten des Rattengehirns identifiziert wurden, gehören die MAP2 (Mikrotubulus-assoziierte Protein 2) und die α CaMKII (α -Untereinheit der Ca²⁺/Calmodulin-abhängigen Protein-Kinase II) kodierenden mRNA-Moleküle (Burgin *et al.*, 1990; Garner *et al.*, 1988). Die von der MAP2-mRNA kodierten Proteinmoleküle sind in Neuronen somatodendritisch verteilt. MAP2 liegt in Assoziation mit dem Cytoskelett vor und reguliert in Abhängigkeit seines Phosphorylierungsstatus die Mikrotubulistabilität (Brugg & Matus, 1991; Itoh *et al.*, 1997; Sanchez *et al.*, 2000). Möglicherweise ist MAP2 an der Regulation der Morphologie und Funktion synaptischer Dornen beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass synaptische Aktivität die MAP2-Konzentration in der molekularen Schicht des *Gyrus dentatus* beeinflusst (Steward & Halpain, 1999). Alpha-CaMKII ist hoch konzentriert in der postsynaptischen Dichte (PSD), einer elektronendichten Struktur an der postsynaptische Plasmamembran exzitatorischer Synapsen, zu finden (Harris & Stevens, 1989; Walikonis *et al.*, 2000; Kennedy, 2000). Sie ist an plastischen Veränderungen von Synapsen während einer Langzeitpotenzierung (LTP) oder bei Lernvorgängen beteiligt. Nach Induktion einer LTP in Gewebeschnitten des Hippocampus ist ein schneller Anstieg der α CaMKII in den Dendriten zu beobachten, was für eine lokale Proteinsynthese spricht (Mayford *et al.*, 1995).

Synapsen können durch die Einwirkung von Signalen lang anhaltende Veränderungen in ihrer Struktur und Aktivität vollziehen (synaptische Plastizität), die in Zusammenhang mit Lernvorgängen und Gedächtnis stehen (Steward &

Schuman, 2001). Zur Ausbildung dieser Strukturveränderungen wird die Translation spezifischer lokalisierter mRNA-Moleküle in Abhängigkeit der synaptischen Aktivität reguliert (Crino & Eberwine, 1996; Kindler *et al.*, 1997; Kuhl & Skehel, 1998; Steward & Schuman, 2001). Untersuchungen der dendritisch lokalisierten α CaMKII-mRNA lieferten wichtige Informationen über translationsregulatorische Mechanismen in Neuronen. Die 3'-UTR der α CaMKII-mRNA beinhaltet zwei cytoplasmatische Polyadenylierungs-Elemente (CPE), welche die Translation der mRNA in Abhängigkeit von synaptischer Aktivität durch Verlängerung des Poly(A)-Schwanzes fördern (Huang *et al.*, 2003). An das CPE bindet Sequenz-spezifisch das für die cytoplasmatische Polyadenylierung essentielle RNA-Bindeprotein CPEB. Die Polyadenylierungs-Aktivität von CPEB ist abhängig von seiner Phosphorylierung durch die Kinase Aurora A (Mendez *et al.*, 2000). In Dendriten sind CPEB und α CaMKII-mRNA zusammen mit dem Protein Maskin Bestandteile von RNP-Komplexen, die entlang von Mikrotubuli transportiert werden (Huang *et al.*, 2003). Innerhalb dieser Komplexe reprimiert Maskin die Translation von α CaMKII-mRNA, indem es sowohl an das CPE-gebundene CPEB als auch an den Initiationsfaktor eIF4E bindet (Stebbins-Boaz *et al.*, 1999). Dadurch wird die für eine Translationsinitiation notwendige Interaktion zwischen eIF4E und eIF4G verhindert. An Synapsen aktiviert die Stimulation von NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptoren die Kinase Aurora A. Die darauf folgende CPEB-vermittelte Polyadenylierung löst die Maskin-eIF4E-Assoziation und ermöglicht durch eIF4G/eIF4E-Interaktion die Initiation der Translation (Cao & Richter, 2002). Die Polyadenylierungs-abhängige Translationsregulation wird durch die Beteiligung des CAP-Bindeproteins eIF4E zu den CAP-abhängigen Mechanismen gezählt und stellt nur eine Möglichkeit zur Regulation dar. Untersuchungen verschiedener dendritisch lokalisierter mRNA-Moleküle zeigten die Beteiligung CAP-unabhängiger Komponenten an der Translationsregulation. In diesen Transkripten, darunter auch α CaMKII, wurden interne Ribosomeneintrittsstellen (*internal ribosome entry sites*, IRESs) identifiziert (Pinkstaff *et al.*, 2001), die eine CAP-unabhängige Translationsinitiation erlauben.

Die Lokalisierung spezifischer RNA-Moleküle in Neuronen basiert wie in anderen Zellsystemen auf der Assoziation von *trans*-agierenden RNA-Bindeproteinen mit *cis*-agierenden Sequenzelementen zu RNP-Komplexen. In Neuronen befinden

sich die *cis*-agierenden dendritischen Transportelemente (*dendritic targeting element*, DTE) innerhalb der 3'-UTR der Transkripte und spielen bei der richtigen Verteilung eine entscheidende Rolle. Für dendritisch lokalisierte RNA-Moleküle sind bisher erst wenige *cis*-agierende Elemente bekannt. Mit Experimenten in kultivierten Hippocampus-Neuronen wurde innerhalb der 3'-UTR der α CaMKII-mRNA ein 1200 Nukleotide umfassender Sequenzabschnitt identifiziert (Blichenberg *et al.*, 2001), welcher für den Transport in die Dendriten notwendig ist. Miller *et al.* (2002) beobachteten anhand transgener Mäuse, dass die α CaMKII-mRNA durch die Deletion der 3'-UTR ausschließlich im Soma verbleibt. Der Verlust dendritisch lokalisierter α CaMKII-mRNA führt zu einer drastischen Reduktion der Kinase in der postsynaptischen Dichte, was eine reduzierte Langzeitpotenzierung und eine Beeinträchtigung des Gedächtnisses zur Folge hat. In der 3'-UTR der MAP2-mRNA vermittelt ein aus 640 Nukleotiden bestehendes dendritisches Transportelement in hippocampalen und SCG-Neuronen die dendritische Lokalisierung von Reportertranskripten, die normalerweise den Zellkörper nicht verlassen (Blichenberg *et al.*, 1999). Die bislang identifizierten *cis*-Sequenzen zeigen keine auffallenden Übereinstimmungen in ihrer Primärsequenz. Von ihnen ausgebildete komplexe dreidimensionale Strukturen könnten allerdings ähnliche Sekundärstrukturen besitzen, die für die Interaktion mit *trans*-agierenden RNA-Bindeproteinen von Bedeutung sind (Kuhl & Skehel, 1998).

Ein putatives *trans*-agierendes RNA-Bindeprotein bei der RNA-Lokalisierung in Neuronen ist das Säuger-Ortholog des *Drosophila*-Staufen. In Ratte, Maus und Mensch wurden zwei Staufen-Varianten - Staufen1 (Stau1) und Staufen2 (Stau2) - identifiziert, die von unabhängigen Genen kodiert werden. Durch alternatives Spleißen der prä-mRNA existieren in Säugern zwei Stau1- und drei Stau2-Isoformen (Kiebler *et al.*, 1999; Marion *et al.*, 1999; Wickham *et al.*, 1999; Duchaine *et al.*, 2000; Monshausen *et al.*, 2001). Beide Säuger-Varianten beinhalten vier dsRNA-Bindedomänen (dsRBD1 bis dsRBD4) sowie eine Region mit Ähnlichkeit zur Mikrotubulus-Bindedomäne von MAP1B (Mikrotubulus-assoziiertes Protein1B), über die *in vitro* eine Bindung an Tubulin möglich ist (Wickham *et al.* 1999; Duchaine *et al.*, 2002). Die konservierte Reihenfolge der dsRBDs in allen Staufen-Homologen impliziert, dass die verschiedenen Domänen

eines Proteins unterschiedliche Funktionen haben, die während der Evolution erhalten wurden (Micklem *et al.*, 2000). In allen Stau-Homologen ist die der dsRBD3 in *Drosophila* entsprechende Domäne essentiell für die *in vivo* Bindung an dsRNA. In Säugern wird Stau2 im Unterschied zum ubiquitär verteilten Stau1 überwiegend neuronal exprimiert. Beide Proteine sind in kultivierten Hippocampus-Neuronen somatodendritisch lokalisiert und nicht in Axonen zu finden (Kiebler *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2001; Duchaine *et al.*, 2002). Sowohl Stau1 als auch Stau2 kolokalisieren in Dendriten mit RNA-enthaltenden Partikeln (Kiebler *et al.*, 1999; Krichevsky & Kosik, 2001; Tang *et al.*, 2001), so dass sie am Transport und/oder an der Verankerung von RNA-Molekülen in Neuronen beteiligt sein könnten. Die somatodendritische Verteilung der Stau-enthaltenden RNP-Komplexe ist von einem intakten Mikrotubuli-Cytoskelett abhängig, wobei die bidirektionale Bewegung in Dendriten auf die Beteiligung von Motorproteinen hindeutet (Kiebler *et al.*, 1999; Köhrmann *et al.*, 1999; Monshausen *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2001; Duchaine *et al.*, 2002). Obwohl Stau1 und Stau2 jeweils mit RNA-enthaltenden Partikeln kolokalisieren, zeigte eine parallele immunologische Detektion beider Stau-Proteine in Neuronen, dass sie Komponenten unterschiedlicher Komplexe sind und hier möglicherweise voneinander getrennte Funktionen ausüben (Duchaine *et al.*, 2002). Auf eine aktive Rolle von Stau2 beim dendritischen RNA-Transport weisen Experimente mit einer am C-Terminus verkürzten, jedoch alle RNA-Bindedomänen enthaltenden Stau2-Variante der Ratte, deren Überexpression eine Reduktion dendritisch lokalisierter mRNA bewirkte (Tang *et al.*, 2001). Stau1 dagegen bindet im Lebenszyklus des Humanen Immunschwäche Virus Typ 1 (HIV-1) als Teil eines RNP-Komplexes an die genomische RNA und ist an ihrem Transport zu den entstehenden Viruspartikeln beteiligt (Chatel-Chaix *et al.*, 2004).

Die molekulare Zusammensetzung Stau-enthaltender RNP-Komplexe in Säugerzellen war zu Beginn dieser Arbeit weitgehend unklar. Die Isolierung dieser Komplexe und die Identifizierung der Komponenten könnte neue Erkenntnisse über den RNA-Transportmechanismus liefern. Den bisher einzigen direkten Interaktionspartner für Stau1 aus der Ratte identifizierten Monshausen *et al.* (2002) mit der α -Untereinheit der Protein-Phosphatase 1 (PP1). Die zelluläre Funktion dieser Interaktion ist bislang noch unbekannt. Allerdings könnte Stau1 durch Rekrutierung der somatisch synthetisierten Protein-Phosphatase 1 in

RNP-Komplexe die dendritische Lokalisierung der Phosphatase vermitteln. Um neue Anhaltspunkte über den zellulären Wirkmechanismus von Säuger-Staufen zu erhalten, war das Ziel der vorliegenden Arbeit, weitere Staufen Interaktionspartner in Säugerzellen zu identifizieren und funktionell zu charakterisieren. Hierzu wurden Staufen-enthaltende Komplexe gereinigt und unbekannte Komponenten mittels Massenspektrometrie identifiziert. Die Isolierung der Komplexe erfolgte über eine neue Methode zur Affinitätsreinigung. Mit weiterführenden Untersuchungen wurden die gefundenen Interaktionen verifiziert.

2 Material und Methoden

2.1 Plasmide und Oligonukleotide

2.1.1 Grundvektoren

Im Folgenden sind kommerziell erhältliche Grundvektoren aufgeführt, die in dieser Arbeit für die Herstellung neuer Konstrukte eingesetzt wurden. Plasmide, die von anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt wurden, sind ebenfalls aufgelistet.

Tabelle 1: Kommerziell erhältliche Vektoren und zur Verfügung gestellte Plasmide

Bezeichnung	Herkunft	Verwendungszweck
pGEX2T	Amersham Pharmacia	Herstellung von Glutathion-S-Transferase (GST) Fusionsproteinen in Bakterien
pEGFP-N1, -N3 pEGFP-C3	Clontech	Expression von Fusionsproteinen mit dem C-terminalen (-N1/-N3) oder N-terminalen (-C3) Grün-fluoreszierenden Protein (EGFP, <i>enhanced green fluorescent protein</i>) in eukaryotischen Zellen
pCMVtag2B	Stratagene	Expression von Proteinen in eukaryotischen Zellen, an die N-terminal ein Peptid aus den Aminosäuren MDYKDDDDK, dem sogenannten FLAG-Epitop, fusioniert ist.
pGEM [®] -T Easy Vector	Promega	Klonierung von PCR-Produkten
pEGFP-C1-387	Dr. H.-J. Kreienkamp (Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie (IZKN), Hamburg)	Amplifikation der Shank1-cDNA die für die PDZ-Domäne kodiert (Acc. AF163302).
pSharp-PDZ	Dr. H.-J. Kreienkamp (IZKN, Hamburg)	Zur Expression eines Fusionsproteins in eukaryotischen Zellen. Das Fusionsprotein besteht aus Sharpin (Acc. AF203906), das C-terminal mit der PDZ-Domäne aus Shank1 fusioniert ist.

phnRNPK-PDZ	John Chua (Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie, Hamburg)	Zur Expression eines Fusionsproteins in eukaryotischen Zellen. Es besteht aus hnRNPK (Acc. NM002140), das C-terminal mit der PDZ-Domäne aus Shank1 fusioniert ist.
pCMV-hnRNPK	John Chua (Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie, Hamburg)	Eukaryotischer Vektor zur Expression eines Fusionsproteins aus hnRNPK und FLAG-Epitop..

2.1.2 Konstruierte Plasmide

In der folgenden Tabelle sind eukaryotische und bakterielle Expressionsplasmide aufgeführt, die während der Doktorarbeit hergestellt und verwendet wurden.

Tabelle 2: Konstruierte Plasmide

Aufgelistet sind die Bezeichnung, der enthaltene Sequenzbereich sowie die GenBank-Zugriffsnummer (Accession) der inserierten Sequenzen (Biotechnology Server NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov).

1) Eukaryotische Expressionsvektoren:

Bezeichnung	„Accession“ Nummer und cDNA-Bereich	Oligonukleotide
pEGFP-rStau1	AF290989 nt 1-1470	ECFPStauF ECFPStauR
pCMV-rStau1	AF290989 nt 1-1470	
pEGFP-RBD2/3	AF290989 nt 286-802	ECFP-RBD2F RBD2/3 rev.
pCMV-RBD2/3	AF290989 nt 286-802	CMV-RBD2/3 forw. CMV-RBD2/3 rev.
pPDZ-N1	NM_031751	PDZ forw. PDZ rev.
prStau1-PDZ	AF290989 nt 1-1470	ECFPStauF ECFPStauR
pEGFP-C3-rpP0	NM_022402 nt 1-954	rpP0 forw. rpP0 rev.
pCMV-rNuc	AH002217 nt 1-2142	Nuc-FLAG forw. Nuc-FALG rev.
pEGFP-rNuc₁₋₃₁₀	AH002217 nt 1-930	Nuc forw. 2 Nuc/N-term rev.
pEGFP-rNuc₃₀₉₋₇₁₄	AH002217 nt 927-2142	Nuc/C-term. forw. Nuc rev. 2

pEGFP-rStau2	NM_134466 nt 1-1539	rStau2F2 rStau2R2
pCMV-rStau2	NM_134466 nt 1-1539	CMV-rStau2F CMV-rStau2R

2) Prokaryotische Expressionsvektoren:

Bezeichnung	„Accession“ Nummer und cDNA-Bereich	Oligonukleotide
pGEX2T-rStau1-I6₁₋₄₉₀	AF290989 nt 1-1470	Monshausen <i>et al.</i> , 2001
pGEX2T-rStau1₁₋₂₆₅	AF290989 nt 1-795	GEX-StauF2 CMV-RBD3 rev.
pGEX2T-rStau1₁₋₁₆₃	AF290989 nt 1-489	GEX-StauF2 CMV-RBD2 rev.
pGEX2T-rStau1₉₅₋₂₆₅	AF290989 nt 286-795	CMV-RBD2 forw. CMV-RBD3 rev.
pGEX2T-rStau1₁₉₇₋₄₉₀	AF290989 nt 591-1470	CMV-RBD3 forw. GEX-StauR
pGEX2T-rStau1₂₅₈₋₄₉₆	AF227220 nt 982-1696	Monshausen <i>et al.</i> , 2001
pGEX2T-rPP1₁₋₃₃₁	S78215 nt 1-993	Monshausen <i>et al.</i> , 2001
pGEX2T-rpP0₁₋₃₁₈	NM_022402 nt 1-954	GST-rpP0 forw. GST-rpP0 rev.
pGEX2T-rStau2-336	NM_134466 nt 1-336	GEX-rStau2F1 GEX-rStau2R2
pET28-Stau1	AF290989 nt 1-1470	Monshausen <i>et al.</i> , 2001

2.1.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden vom Service-Labor des Instituts für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie (Universitäts-Klinikum Hamburg-Eppendorf) mit einem *DNA/RNA Synthesizer* (Applied Biosystems) synthetisiert. Vor ihrer Verwendung wurden die Oligonukleotide nach Herstellerangaben über MICROSPIN G-25 Säulen (Amersham Pharmacia Biotech) aufgereinigt.

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide

Die enthaltenen Restriktionsschnittstellen der Oligonukleotide sind hellgrau unterlegt. Start- und Stopcodons sind unterstrichen.

Bezeichnung	Sequenz	Schnittstelle
ACTStauF	CTCGGATCCCTGATGTATAAGCCCGTGTG	<i>Bam</i> HI
ACTStauR	ATAACTCGAGTCAGCACCTCCCGC	<i>Xho</i> I
AS2StauFEco	CCTGAATTCATGTATAAGCCCGTGGAC	<i>Eco</i> RI
AS2StauR	ACAGGATCCTCAGCACCTCCCGC	<i>Bam</i> HI
ECFPStauF	ATAGAATTC CCGCAGCCACTCCGTCTCTTC	<i>Eco</i> RI
ECFPStauR	ATAGGATCCTTGCACCTCCCGCACGCTGAAAC	<i>Bam</i> HI
PDZ forw.	TTTGGATCC TGGCTCTACGACAGC	<i>Bam</i> HI
PDZ rev.	TTTGC GGCCGTTACACTGCCTCATCC	<i>Not</i> I
Nuc-FALG forw.	CTCGGATCCATGGTGAAGCTCGCGAAGG	<i>Bam</i> HI
Nuc-FLAG rev.	ATAGAATTCCTATTCAAAC TTCGTCTTC	<i>Eco</i> RI
Nuc forw. 2	ATAGAATTCATGGTGA AACTCGCAAAGGCC	<i>Eco</i> RI
Nuc rev. 2	ATAGGATCCAATTCAAAC TTCGTCTTC	<i>Bam</i> HI
Nuc/C-term.forw.	ATAGAATTCACCA TGCCTTTCAACCTGTTCAATTGG	<i>Eco</i> RI
Nuc/N-term rev.	ATAGGATCCAGGTGTAGTTGGTTCTGAGCC	<i>Bam</i> HI
rpP0 EYFP forw.	ATACTCGAGATGCCAGGGAAGACAGGGC	<i>Xho</i> I
rpP0 EYFP rev.	ATAGGATCC TTAGTCGAAGAGACCGAATCC	<i>Bam</i> HI
GEX-StauF2	AATGGATCCATGTATAAGCCCGTGGACCC CCAC	<i>Bam</i> HI
CMV-RBD3 forw.	ATAGGATCCAATCCTATTAGCAGACTGGCACAG	<i>Bam</i> HI
CMV-RBD3 rev.	ATAGAATTC TTACCCAGGATTCTCAGCATG	<i>Eco</i> RI
CMV-RBD2 forw.	ATAGGATCCTCAGAAATAAGCCAAGTGT TTGAG	<i>Bam</i> HI
CMV-RBD2 rev.	ATAGAATTC TTACCTCCTTAGCTGCTCCAG	<i>Eco</i> RI
ECFP-RBD2F	ATAGAATTCACCA TGTGAGAAATAAGCCAAGTGTTTGAG	<i>Eco</i> RI
RBD2/3 rev.	GGTGGATCCACTTTAGACCC CAGGATCTCC	<i>Bam</i> HI
CMV-RBD2/3 forw.	GGCGGATCCCTCAGAAATAAGCCAAGTG	<i>Bam</i> HI
CMV-RBD2/3 rev.	ATAAGCTT TTAACTTTGAACCCAGG	<i>Hind</i> III
GST-rpP0 forw.	TATGGATCCATGCCAGGGAAGACAGGGCG	<i>Bam</i> HI
GST-rpP0 rev.	ATAGAATTC TTAGTCGAAGAGACCGAATCCCA	<i>Eco</i> RI
rStau2F2	CGGCTCGAGAAAATGGCAAATCC CAAA	<i>Xho</i> I
rStau2R2	ATAGGATCCGCTGCTAGGATGACCGACTTTGAT TTTC	<i>Bam</i> HI
CMV-rStau2F	CTCGGATCCACATGGCAAATCC CAAAG	<i>Bam</i> HI
CMV-rStau2R	TACTCGAGGCTAGATGACCGACTTG	<i>Xho</i> I
GEX-rStau2F1	ATGGATCCAAAATGGCAAATCC CAAAGAG	<i>Bam</i> HI
GEX-rStau2R2	TTGCGGCCGCGATGGCAGGCTCTCC CT	<i>Not</i> I

2.2 Antikörper und Immunreagenzien

Die folgenden primären und sekundären Antikörper sowie die Immunreagenzien wurden in dieser Arbeit verwendet.

Tabelle 4: Übersicht über die eingesetzten Antikörper

Angegeben sind die Bezeichnungen, der Verwendungszweck mit eingesetzter Verdünnung und die Herkunft der Antikörper einschließlich Referenz bzw. Bestellnummer.

Antikörper	Verwendung (eing. Verdünnung)	Herkunft
α -EGFP-Peptid-AK, polyklonal	Immunpräzipitation (1:50)	Clontech (# 8372-1)
α -GFP-Antikörper, polyklonal	Western Blot (1:10000)	Abcam Limited (# ab6556)
α -FLAG-M2-Antikörper, monoklonal	Western Blot (1:1000)	Stratagene (# 200472)
α -FLAG-M2 Affinity Gel Protein A-Agarose	Immunpräzipitation	Sigma (# F-2426)
α -Staufen 1-3326 polyklonal	Western Blot (1:500) Immuncytochemie (1:100)	Monshausen <i>et al.</i> , 2002
α -C23 (Nucleolin)	Western Blot (1:500)	Santa Cruz Biotechnology (# sc-8031)
α -ribosomale P- Proteine, monospezifisches Antiserum (Human)	Western Blot (1:1000)	Dr. Morris Reichlin (Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City, USA)
α -FMRP, monoklonal	Western Blot (1:2000)	Euromedex
α -L7 SPA, Maus polyklonal	Western Blot (1:2000)	Abcam Limited (# ab474)
α -S6, polyklonal	Western Blot (1:1000)	Cell Signaling Technology Inc. (# 2212)
α -EF-1 α , monoclonal	Western Blot (1:1000)	Upstate (# 05-235)
α -Kinesin MC44, polyklonal	Western Blot (1:1000)	Dr. Mark McNiven (Center for Basic Research in Digestive Diseases, Rochester, MN, USA)
α -Dynein (<i>intermediate chain</i>), monoklonal	Western Blot (1:2000)	Sigma (# D 5167)
α -Tubulin, monoklonal	Western Blot (1:1000)	Sigma (# T 9026)
α -PP1, monoklonal	Western Blot (1:1000)	Transduction Laboratories P35220

α -eIF4E, polyklonal α -eIF4G, polyklonal	Western Blot (1:1000)	Tasneem Khanam Zentrum für Molekularbiologie der Entzündung, Universität Münster
α -PDZ _{Shank} , polyklonal	Western Blot (1:2000)	Dr. H.-J. Kreienkamp (IZKN, Hamburg)
Esel α -Human IgG	Western Blot (1:10000)	Jackson ImmunoResearch laboratories (# 709-035-149)
α -Kaninchen- Antikörper, HRP-gekoppelt	Western Blot (1:10000)	Jackson ImmunoResearch laboratories (# 111-035-144)
α -Maus-Antikörper, HRP-gekoppelt	Western Blot (1:10000)	Amersham Pharmacia (# NIF825)
α -MAP2-Antikörper	Immuncytochemie (1:1000)	Sigma (# M 4403)
α -Kaninchen- Alexa Fluor [®] 488	Immuncytochemie (1:500)	Molecular Probes (# A-11008)
α -Maus- Alexa Fluor [®] 546	Immuncytochemie (1:500)	Molecular Probes (# A-11003)

2.3 Bakterienstämme, Zelllinien und Tiere

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme, Zelllinien und Tiere. DMSZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.

	Name	Herkunft
Bakterienstämme	<i>E. coli</i> XL1 blue	Stratagene
	<i>E. coli</i> BL21 codon plus	Stratagene
Zelllinien	HEK293 (<u>H</u> uman <u>E</u> mbryonic <u>K</u> idney)	DMSZ Nr.: ACC 305
	CHO-K1 (<u>C</u> hinese <u>H</u> amster <u>O</u> vary)	DMSZ Nr.: ACC 110
Tiere	<i>Rattus norvegicus</i> (Wistar-Ratten)	Tierzucht des Universitäts-Klinikum Hamburg-Eppendorf

2.4 DNA: Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*)

Polymerase-Kettenreaktionen wurden mit thermostabiler *Taq*- oder *Pfu*-Polymerase (Promega) in GeneAmpTM-Reaktionsgefäßen (Eppendorf) durchgeführt. Für einen Standardansatz wurden jeweils 20 pmol der Oligonukleotide und 10-200 ng DNA als Matrize in 50 µl Reaktionspuffer entsprechend der Angaben des Herstellers verwendet. Die PCR wurde mit dem GENEAMP PCR SYSTEM 2400 THERMOCYCLER (Perkin Elmer) durchgeführt. Vor Zugabe der Polymerase wurden die Ansätze für 5 min bei 94°C denaturiert. Jeder der 25-30 Amplifikationszyklen umfasste folgende Schritte:

Hitzenaturierung	bei 94°C	für 30 sec
Primer-Anlagerung	bei 55-60°C	für 30 sec
Polymerase-Reaktion	bei 72°C	für 1 min – 3 min

Die PCR-Zyklen wurden durch einen finalen Syntheseschritt von 7 min bei 72°C abgeschlossen und die Reaktion wurde durch Abkühlen auf 4°C gestoppt. Die PCR-Produkte wurden in einem präparativen Agarosegel aufgetrennt, aus dem Gel isoliert (2.4.3), in pGEM[®]-T (Promega) kloniert, sequenziert und nach entsprechender Analyse mit Restriktionsenzymen (2.4.4) in geeignete Vektoren subkloniert. Die resultierenden Klone wurden mittels Restriktionsanalyse (2.4.4) und Sequenzierung (2.4.8) auf ihre Richtigkeit überprüft.

2.4.2 DNA-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden in horizontalen 1%igen Agarosegelen aufgetrennt. Die Agarose (Invitrogen Life Technologies) wurde in 1x TAE-Puffer (100 mM Tris/Acetat; 5 mM EDTA, pH 8.0), der auch als Laufpuffer diente, gelöst und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (Sigma) versetzt. Die Gelanalyse erfolgte mit Hilfe eines 356 nm UV-Leuchttisches (UVT-28M, Herolab) und einem Videokamera-gesteuerten Drucker (Mitsubishi). Für die Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurden die *Gene RulerTM 100 bp DNA Ladder* und der *λ DNA / EcoRI + HindIII Marker* (beide MBI Fermentas) verwendet.

2.4.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach Auftrennung der DNA in Agarosegelen (2.4.2) wurden die gewünschten cDNA-Fragmente unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten. Mit dem QIAEX GEL EXTRACTION SYSTEM (Qiagen) oder dem QIAQUICK PURIFICATION SYSTEM (Qiagen) erfolgte die Isolierung der DNA aus der Agarose entsprechend der Vorschrift des Herstellers.

2.4.4 Restriktion von DNA mit Endonukleasen

Plasmid-DNA und PCR-Produkte wurden mit Restriktionsenzymen (Invitrogen Life Technologies, MBI Fermentas, New England Biolabs, Roche) nach Herstellerangaben verdaut. Die Enzymreaktionen wurden durch Zugabe von 1/10 Volumen DNA-Ladepuffer (50% Glycerin; 0.1 M EDTA; 1% SDS; 0.25% Bromphenolblau; 0.25% Xylenykanol) gestoppt.

2.4.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Linearisierte Vektoren wurden mit dem dreifachen molaren Überschuss eines entsprechend geschnittenen DNA-Fragments und 1u T4-DNA-Ligase (Invitrogen Life Technologies) nach Herstellerangaben über Nacht bei 16°C ligiert. PCR-Produkte mit A-Überhängen wurden mit dem pGEM[®]-T-SYSTEM II (Promega) nach Herstellerangaben in den pGEM[®]-T- oder den pGEM[®]-Teasy-Vektor kloniert.

2.4.6 Transformation

Zwanzig Mikroliter kompetente *E. coli* XL1-Blue SUBCLONING GRADE oder SUPERCOMPETENT (Stratagene) wurden mit 1 – 2 µl eines Ligationsansatzes (2.4.5) oder mit 50 ng Plasmid-DNA gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 45 sec einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und nach Zugabe von 600 µl LB-Medium für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die transformierten Zellen wurden auf LB-Selektions-Platten (10 g/l Bacto-Pepton; 10 g/l NaCl; 5 g/l Hefe-Extrakt; 15 g/l Bacto-Agar; 100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.4.7 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Für eine Minipräparation von Plasmid-DNA wurden 5 ml LB-Medium, dem das entsprechende Antibiotikum zugegeben wurde, mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Aus der Bakteriensuspension wurde nach der Methode der Alkalischen Lyse (Sambrook *et al.*, 1989) die Plasmid-DNA isoliert. Plasmide für die Sequenzierung, die Transformation von Bakterien und die Transfektion von eukaryotischen Zellen wurden mit dem PEQLAB MINI-PREP KIT II (PeqLab) oder dem NUCLEOBOND AX 100 KIT (Machery & Nagel) aufgereinigt. Zur Transfektion von primären Hippocampus-Neuronen wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des ENDOFREE-MAXI-PREP-KIT (Qiagen) isoliert. Mit dem Spektrophotometer GENEQUANT (Amersham Biosciences) wurde die Konzentration von Nukleinsäuren durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt.

2.4.8 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen erfolgten im Servicelabor des Instituts für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie (Universitäts-Klinikum Hamburg-Eppendorf) nach der Didesoxy-Methode (Sanger *et al.*, 1977). Für die Sequenzierungsreaktion wurden 500 ng DNA mit Hilfe des ABI PrismPRISM[®] BIGDYE[™] TERMINATOR CYCLE SEQUENCING READY REACTION KIT (Applied Biosystems) aufgearbeitet. Die Analyse der fluoreszenzmarkierten Fragmente erfolgte durch den ABI PRISM 377 DNA SEQUENZER (Applied Biosystems).

2.5 RNA: Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Präparation von RNA aus Gewebe und Zellen

Gehirne adulter Ratten wurden in 100 ml/mg Trizol (Invitrogen Life Technologies) homogenisiert. Die RNA wurde nach Herstellerangaben isoliert, in 300 µl H₂O aufgenommen und die Konzentration spektralphotometrisch (GeneQuant, Pharmacia) bestimmt. Die Kontrolle der RNA-Qualität erfolgte durch Auftrennung in einem horizontalen 1,2%igen Agarosegel. Die Agarose (Invitrogen Life Technologies) wurde in 1x TBE-Puffer (89 mM Tris-Base; 89 mM Borsäure; 2 mM EDTA, pH 8.0), der auch als Laufpuffer diente, gelöst und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (Sigma) versetzt. Die Gelanalyse erfolgte mit Hilfe eines 356 nm UV-Leuchttisches (UVT-28M, Herolab) und einem Videokamera-gesteuerten Drucker (Mitsubishi). Die gewonnene Gesamt-RNA wurde direkt für eine reverse

Transkription eingesetzt. Die cDNA wurde mit der SUPERScript II reversen Transkriptase (Invitrogen Life Technologies) nach Angaben des Herstellers synthetisiert und diente als Ausgangsmaterial für PCR.

2.6 Proteine: Molekularbiologische und biochemische Methoden, Immuncytochemie

2.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Je nach Proteingröße wurden 10-15%ige SDS-Polyacrylamidgele (Sambrook *et al.*, 1989) zur Auftrennung von Proteinen eingesetzt. Pro Gelspur wurden 10-40 µg Protein geladen und bei 200 V in 1x SDS Laufpuffer (25 mM Tris-Base; 19,2 mM Glycin; 0,1% [w/v] SDS) aufgetrennt. Die Proben wurden dazu mit ¼ Volumen 5x Laemmli-Puffer (Laemmli *et al.*, 1970) versetzt und vor dem Auftragen zur Denaturierung und Spaltung von Disulfidbrücken für 5 min gekocht. Ein vorgefärbter Protein-Molekulargewichtsstandard (FULL RANGE RAINBOW Marker, Amersham Pharmacia) wurden zur Bestimmung der Proteingrößen benutzt.

2.6.2 Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Zur direkten Protein-Detektion wurden die SDS-Gele nach dem Lauf in Coomassie-Lösung (0,25% [w/v] Coomassie Brilliant Blue R 250; 0,05% [w/v] Coomassie Brilliant Blue G 250; 50% [v/v] Methanol; 10% [v/v] Eisessig) inkubiert und anschließend in einer Lösung aus 50% [v/v] Methanol und 10% [v/v] Eisessig entfärbt. Abschließend wurden die Gele in H₂O gewaschen und getrocknet (GELAIR DRYER, BioRad).

2.6.3 Transfer und immunologische Detektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen (*Western Blot*)

Zur immunologischen Detektion von Proteinen wurden diese nach der Auftrennung in SDS-Gelen (2.6.1) elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran (PROTAN, Schleicher&Schuell) übertragen. Der Transfer erfolgte nach Angaben der Hersteller von Membran und Blot-Apparatur (SEMIDRY, BioRad) in Transferpuffer (38 mM Glycin; 47 mM Tris-Base; 0,03% [v/w] SDS; 20% Methanol) für etwa 1 h bei 10-15V. Nach der Übertragung wurde die

Membran für 1 h bei RT mit Blockierlösung (5% [w/v] Magermilchpulver in PBS-T; PBS: 137 mM NaCl; 8,8 mM Na₂HPO₄; 2,7 mM KCl; 0,7 mM KH₂PO₄, pH 7.4; PBS-T: PBS + 0,1% Tween-20) inkubiert. Die Reaktion mit dem primären Antikörper, der entsprechend in Blockierlösung verdünnt wurde (Tab. 3), erfolgte für 1 - 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Nach drei fünfminütigen Waschschritten mit PBS-T folgte die Inkubation mit dem entsprechenden HRP (*horseradish peroxidase*)-gekoppelten sekundären Antikörper (Tab. 3) für 1 h bei RT. Im Anschluss an drei weitere Waschschrritte erfolgte die Detektion der Antikörper-markierten Proteine mit dem ECL-Reagenz (*Enhanced Chemiluminescence*; LUMI-LIGHT WESTERN BLOTTING SUBSTRATE, Roche Diagnostics) nach Vorschrift des Herstellers auf Röntgenfilmen (CRONEX MEDICAL X-RAY Film, Sterling Biodiagnostic Imaging).

2.6.4 Affinitätsreinigung von PDZ-Fusionsproteinen

Zur Affinitätsreinigung wurde ein synthetisches Peptid hergestellt (Genemed Synthesis Inc., San Francisco, CA, USA), das den letzten zehn Aminosäuren des C-Terminus von GKAP/SAPAP1 aus der Ratte (Sequenz: IYIPEAQTRL, *Accession*: U67987) (Takeuchi *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1997) entspricht. Es wurden 3 mg Peptid in 1 ml NHS-Kopplungspuffer (0,1 M NaHCO₃; 0,5 M NaCl, pH 7,5) gelöst und nach Angaben des Herstellers kovalent an 1 ml aktivierte NHS-SEPHAROSETM 4 FAST FLOW (Amersham Pharmacia Biotech) gekoppelt. Diese Matrix wurde im Folgenden zur Präzipitation von rekombinanten PDZ-Fusionsproteinen und deren Interaktionspartnern aus HEK293-Zelllysaten verwendet. Zu diesem Zweck wurden HEK293-Zellen transient transfiziert (2.8.1). Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und mit 1 ml RIPA-Puffer (150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 5 mM EDTA, pH 8.0; 0,5% [w/v] Na-Deoxycholat; 1% [v/v] NP-40; 0,1% [w/v] SDS; Protease-Inhibitor Cocktail: COMPLETETM, nach Herstellerangaben, Roche) pro 10 cm Kulturschale für 15 min bei 4°C lysiert. In einigen Experimenten wurde dem Lysispuffer 50 µg/ml RNaseA zugesetzt. Nach dem Transfer in neue Reaktionsgefäße wurde das Lysat zum Abtrennen unlöslicher Bestandteile für 10 min bei 15.800 x g und 4°C zentrifugiert und die Überstände wurden anschließend vereinigt. PDZ-Fusionsproteine und daran bindende Proteine wurden nach Zugabe von 80 µl GKAP-Sepharose, welche zuvor mit 1 ml

Lysispuffer gewaschen wurde, für 2 h bei 4°C auf einem Rotator präzipitiert. Die GKAP-Sepharose mit den daran gebundenen Proteinkomplexen wurde anschließend fünfmal mit 1 ml RIPA-Puffer gewaschen und in 60 µl 2x Laemmli-Puffer aufgeköcht. Alternativ zum RIPA-Puffer, der hohe Konzentrationen an Detergenzien enthält, wurde die Zellyse mit dem weniger stringenten IP-Puffer (120 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0; 0,5% [v/v] NP-40; Protease-Inhibitor Cocktail: COMPLETE™, nach Herstellerangaben, Roche) durchgeführt. Die aufgereinigten Proteinkomplexe wurden mittels SDS-PAGE (2.6.1) aufgetrennt und die Proteinbanden mit Coomassie-Färbung (2.6.2) sichtbar gemacht. Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert (2.6.10).

2.6.5 Expression und Aufreinigung von Fusionsproteinen

Für die Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen wurde das GST GENE FUSION EXPRESSION SYSTEM (Amersham Pharmacia Biotech) verwendet. Mit entsprechenden prokaryotischen Expressionsvektoren transformierte *E.coli* BL21-Zellen (Stratagene) wurden in 5 ml Selektionsmedium über Nacht im 37°C Schüttler inkubiert. Diese Vorkultur wurde am nächsten Morgen mit 200 ml desselben Mediums verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Expression der Fusionsproteine wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG (Isopropyl β-D-Thiogalactopyranosid, Roth) induziert. Nach 2 h wurden die Bakterien sedimentiert (5000 x g, 10 Min, 4°C), in 10 ml eiskaltem STE-Puffer (150 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA) gewaschen, und das Zellsediment mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Zur Zellyse wurden die Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 10 ml STE-Puffer resuspendiert, dem Protease-Inhibitor Cocktail (nach Herstellerangaben, COMPLETE™, Roche), 10 µl PMSF (0,1 M) und 100 µl Lysozym (10 mg/ml) zugesetzt wurde. Nach einer 20minütigen Inkubation auf Eis wurde die Zellsuspension über Nacht bei -20°C eingefroren. Zur Verbesserung der Lyse wurde die Suspension nach dem Auftauen mit 2 ml 10% Triton X-100 versetzt und nochmals 20 min auf Eis inkubiert. Nach einer Ultraschallbehandlung (fünfmal jeweils 10 sec auf Eis, Stufe 3, SONIFIER B-12) wurde das Lysat 30 Min bei 4°C und 14.460 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 15 ml Falcon überführt, mit 500 µl GLUTATHION SEPHAROSE 4B (Amersham Pharmacia Biotech) versetzt und 2 h bei 4°C auf einem

Rotator inkubiert. Die Matrix mit dem gebundenen Protein wurde fünfmal mit STE-Puffer gewaschen und anschließend in einem Volumen STE-Puffer mit 10 µl PMSF (0,1 M) bei 4°C gelagert. GST-Fusionsproteine die der Herstellung von Antikörpern dienen, wurden nach dem Binden an die Gluthation-Sepharose und den Waschschritten viermal mit 1 ml Elutionspuffer (10 mM Gluthation; 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) eluiert. Die Proteinlösung wurde über Nacht gegen 5 l 1 x PBS dialysiert (Sambrook *et al.*, 1989). Qualität und Quantität der Aufreinigung wurde durch SDS-PAGE (2.6.1) und anschließender Coomassie-Färbung (2.6.2) überprüft. Die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe des Bradford-Reagenz (Protein Assay, BioRad) durch eine Eichkurve mit BSA (*bovine serum albumin*, Sigma, 1 mg/ml) bestimmt.

Für die Herstellung von His-Fusionsproteinen wurde der prokaryotische Expressionsvektor pET28 verwendet. Nach der Expression in Bakterien erfolgte die Aufreinigung der rekombinanten Proteine über Ni-NTA Agarose (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers.

2.6.6 GST-Pulldown Assay

Für die GST-*pulldown* Experimente wurden unterschiedliche GST-Fusionsproteine in Bakterien exprimiert und aufgereinigt (2.6.5). Die an Gluthation-Sepharose gebundenen GST-Fusionsproteine wurden anschließend mit Gehirnextrakt inkubiert. Zur Herstellung des Gehirnextraktes wurde das Gehirn einer adulten Ratte in RIPA-Puffer, der Protease-Inhibitor Cocktail (nach Herstellerangaben, COMPLETE™, Roche) und RNaseOUT (40 u/ml, Invitrogen) enthielt, homogenisiert. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch eine Zentrifugation bei 15.800 x g und 4°C für 15 min abgetrennt und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Mit Bradford-Reagenz (BioRad) wurde die Proteinkonzentration des Gehirnextraktes bestimmt. Für den GST-*pulldown* wurden pro Ansatz 4 mg Protein eingesetzt und für 2 h bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Zur Entfernung unspezifisch adsorbierter Proteine wurde die Matrix fünfmal mit RIPA-Puffer gewaschen. Durch Zugabe von 60 µl 2x Laemmli und 5minütiges Kochen wurden die Proteine von der Gluthation-Sepharose eluiert und anschließend mittels SDS-PAGE (2.6.1) und Western Blot (2.6.3) analysiert.

2.6.7 Koimmunpräzipitation aus transient transfizierten HEK293-Zellen

Transfizierte HEK293-Zellen (2.8.1) wurden 36 – 48 h nach der Transfektion zweimal mit PBS gewaschen und anschließend durch eine 15minütige Inkubation mit 1 ml CoIP-Puffer (120 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl, pH8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0; 0,5% [v/v] NP-40) pro Platte (Ø 10 cm) lysiert. Zur Entfernung von DNA und unlöslichen Bestandteilen wurde das Lysat 15 min zentrifugiert (15.800 x g, 4°C) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für spätere Analysen wurden 80 µl des Überstandes entnommen und mit ¼ Volumen 5x Laemmli versetzt. Der verbleibende Überstand wurde mit 2 – 5 µg Antikörper für 2 h bei 4°C auf einem Rotator inkubiert und anschließend in ein neues Reaktionsgefäß mit 20 µl Protein A-Agarose überführt. Die Agarose wurde vor der Zugabe des Lysats einmal mit CoIP-Puffer gewaschen. Die Inkubation mit Agarose erfolgte für 4 – 6 h oder über Nacht bei 4°C auf einem Rotator. Danach wurde die Agarose dreimal mit CoIP-Puffer gewaschen und anschließend in 40 µl 2x Laemmli resuspendiert. Im Falle einer Immunpräzipitation mit dem anti-FLAG Antikörper wurden EZVIEW RED ANTI-FLAG M2-AGAROSE BEADS (Sigma) nach Angaben des Herstellers verwendet. Ausgangsmaterial und Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE (2.6.1) und Western Blot (2.6.3) analysiert.

2.6.8 Zellfraktionierung und Salzextraktion

Die Präparation unterschiedlicher Fraktionen aus Rattengehirnextrakt erfolgte nach Rehbein *et al.* (2000). Proben der einzelnen Fraktionierungsschritte wurden mittels SDS-PAGE (2.6.1) und Western Blot (2.6.3) analysiert. Die aus der Zellfraktionierung resultierende Polysomenfraktion wurde anschließend mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen behandelt. Dazu wurden 300 µl der Polysomen mit HKMD-Puffer (10 mM HEPES, pH 7,5; 1 mM K-Acetat; 1,5 mM Mg-Acetat; 2 mM DTT) auf 1 ml aufgefüllt und mit einem kleinen Glas-Douncer homogenisiert. Von der Suspension wurden 300 µl in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit jeweils 100 µl HKMD-Puffer versetzt, der unterschiedliche NaCl-Konzentrationen enthielt. Durch die Zugabe entstanden folgende Endkonzentrationen an NaCl: 300 mM, 600 mM und 1 M. Die Proben wurden nach der Salzzugabe 45 min auf Eis inkubiert und nachfolgend 45 min bei 100.000 x g und 4°C zentrifugiert (Ultrazentrifuge: Sorvall RC M120; Rotor: RP 100AT). Der Überstand wurde in ein separates Reaktionsgefäß überführt und das jeweilige

Sediment in 400 µl HKMD-Puffer resuspendiert. Das Ausgangsmaterial sowie Überstand und Sediment wurden mittels SDS-PAGE (2.6.1) und Western Blot (2.6.3) analysiert.

2.6.9 Sucroседichtegradienten Zentrifugation

2.6.9.1 Sucroседichtegradienten Zentrifugation mit HEK293-Zellextrakt

HEK293-Zellen von acht zu 70% konfluent bewachsenen Gewebekulturschalen (Ø 10 cm) wurden mit eiskaltem PBS von den Platten gespült und in einem 50 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Nach Zentrifugation (1000 x g, 5 min, 4°C) wurden die Zellen einmal mit eiskaltem PBS gewaschen, in 1 ml HKMD-Puffer (20 mM HEPES, pH 7.6; 100 mM KCl; 20 mM MgCl₂; 1 mM DTT; 0,5% [v/v] Triton X-100, Proteinase-Inhibitor Cocktail: COMPLETE™, Roche; 40 u/ml RNaseOUT: Invitrogen) resuspendiert und in einem Glas-Douncer homogenisiert. Das Homogenat wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und zweimal für 10 min bei 4°C zentrifugiert (erste Zentrifugation bei 720 x g, zweite Zentrifugation bei 15.800 x g). Anschließend wurde 1 ml des Überstands auf den Sucrosegredienten geladen. Zur Herstellung des Sucrosegredienten wurde HKM-Puffer (20 mM HEPES, pH 7.6; 100 mM KCl; 20 mM MgCl₂) mit unterschiedlichen Sucrosekonzentrationen verwendet. 800 µl einer 60%igen Sucroselösung wurden nacheinander mit jeweils 1,55 ml einer 5, 10, 15, 20, 25 und 30%igen Sucroselösung überschichtet. Der Gradient wurde über Nacht bei 4°C gelagert, so dass sich die Grenzen zwischen den einzelnen Sucrosekonzentrationen vermischen konnten. Nach einer Zentrifugation von 2 h bei 200.000 x g und 4°C in einer L7 Ultrazentrifuge (Beckmann; Rotor: TH 614, Sorvall) wurden von der Oberfläche des Gradienten Fraktionen von 570 µl gesammelt. Aus 200 µl jeder Fraktion wurde RNA isoliert. Aus der restlichen Fraktion wurden die Proteine mit 20% [v/v] Trichloressigsäure gefällt, mit 1,5 ml eiskaltem Aceton gewaschen, nach Trocknen an der Luft in 2x Laemmli-Puffer resuspendiert und mittels SDS-PAGE (2.6.1) und Western Blot (2.6.2) analysiert. Zur Trennung der ribosomalen Untereinheiten wurde das Zelllysate mit 25 mM EDTA versetzt und für 20 min auf Eis inkubiert. Die Auftrennung erfolgte in einem 5 – 30%igen Sucrosegredienten, der aus Sucroselösungen mit HKE-Puffer (20 mM HEPES, pH 7.6; 100 mM KCl; 25 mM EDTA) hergestellt wurde.

2.6.9.2 Sucroседichtegradienten Zentrifugation mit Polysomen

Zur Herstellung der Polysomenfraktion wurden HEK293-Zellen von fünf großen Platten (\varnothing 15 cm) mit jeweils 10 ml eiskaltem PBS von den Kulturschalen gespült und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden sedimentiert, mit eiskaltem PBS gewaschen, in 9 ml RSB-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 10 mM KCl; 1,5 mM Mg-Acetat) resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Durch die Zugabe von 1% Triton X-100 wurden die Zellen lysiert und die unlöslichen Bestandteile mit einer 5minütigen Zentrifugation bei 1000 x g und 4°C abgetrennt. Der Überstand wurde anschließend auf ein 3 ml Sucrosekissen geschichtet (2 M Sucrose in TKM-Puffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 25 mM KCl; 10 mM Mg-Acetat) und über Nacht bei 4°C und 145.000 x g zentrifugiert (Ultrazentrifuge: L565; Rotor: 50Ti; Beckmann). Überstände und Sucrosekissen wurden für spätere Analysen separat aufbewahrt. Das Proteinsediment wurde in 500 μ l RSB-Puffer resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert, mittels Glas-Douncer feiner suspendiert und anschließend mit 400 μ l RSB-Puffer verdünnt. Die Trennung der ribosomalen Untereinheiten erfolgte durch Inkubation der Polysomen mit 100 μ l Puromycin (8 mM Stocklösung) für 10 min bei 37 °C. Nach der Zugabe von 1 ml RSB-Puffer wurden 500 μ l der verdünnten Polysomensuspension auf einen 10 - 30% Sucrosegredienten geladen. Zur Herstellung des Sucrosegredienten wurden eine 10%ige und eine 30%ige Sucroselösung in TKM-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 500 mM KCl; 5 mM Mg-Acetat) verwendet, die in einem Gradientenmischer (H.Hölzel, 36 ml) miteinander gemischt und über eine Pumpe (Gilson minipuls 2) in das Gradientengefäß geleitet wurden. Nach Zentrifugation (2,5 h; 260.000 x g; 20°C; SW41 Rotor, Beckmann) wurde der Gradient von der Oberfläche mit einem Gradienten-Sauger (Densi-Flow lic, Bulcher Instruments) über ein UV-Durchflussphotometer (LKB 2238, Uvicord) zur Messung der optischen Dichte bei 260 nm abgesaugt und 700 μ l Fraktionen wurden gesammelt und wie beschrieben analysiert (2.6.9.1). Die Werte aus der OD-Messung wurde von einem LKB 2210-Schreiber aufgezeichnet.

2.6.10 Massenspektrometrie

Massenspektrometrische Untersuchungen wurden von dem Analytik-Labor des Instituts für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie (Universitäts-Klinikum Hamburg-Eppendorf) durchgeführt. Hierfür wurden die zu untersuchenden

Proteinbanden aus einem Coomassie-gefärbten Polyacrylamid-Gel (2.6.2) ausgeschnitten und intensiv gewässert, bevor sie im Gel nach der Methode von Shevchenko mit Trypsin verdaut wurden (Shevchenko *et al.*, 1996). Aus dem Gel extrahierte Peptide wurden über *ZipTip_{μ-C18}* Säulen (Millipore) gereinigt, aufkonzentriert und mit einem *ESI-Qtof2* Massenspektrometer (MicroMass, Manchester, UK) analysiert. Die hieraus resultierenden Daten wurden mit dem Programm *Mascot MS/MS Ion Search* (www.MatrixScience.com) ausgewertet.

2.7 *In vitro* Translations-Assay in Retikulozytenlysat aus Kaninchen

Für die Translationsreaktion wurden jeweils 300 ng Luciferase-mRNA eingesetzt und mit steigenden Konzentrationen von rekombinatem His-Stau1 versetzt. Die *in vitro* transkribierten Transkripte Luciferase+5'-CAP+Poly(A) und Luciferase+5'-3'-UTRShank1+5'-CAP+Poly(A) wurden von Dr. H.-J. Kreienkamp (Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie) zur Verfügung gestellt. Die RNA wurde nach folgendem Schema mit den für die Translation notwendigen Reagenzien (Promega) gemischt:

Tabelle 6: Pipettierschema der Translationsreaktionen

Aminosäuren, Minus Leucin (1mM) [μl]	Aminosäuren, Minus Methionin (1mM) [μl]	Ribonuklease Inhibitor (40u/μl) [μl]	Nuklease- freies H ₂ O [μl]	His ₆ -Stau [μg]	RRL [μl]
0,5	0,5	0,5	10	0	24
0,5	0,5	0,5	8	0,6	24
0,5	0,5	0,5	5	1,5	24
0,5	0,5	0,5	0	3	24

Die Translationsansätze wurden 90 min bei 30°C inkubiert. Nachfolgend wurden 10 μl der Translationsreaktion mit 90 μl Luciferase-Assay-Reagenz (Promega) versetzt. Mit dem im Reagenz enthaltenen Luciferase-Substrat Luciferin wird eine Enzymreaktion gestartet, wobei durch ATP-Hydrolyse Lichtenergie freigesetzt wird. Mit Hilfe eines Luminometers (Microumat) wurde die abgegebene Lichtenergie in rlu (*relative light units*) gemessen.

2.8 Zellkultur: Molekularbiologische und Biochemische Methoden

2.8.1 Kultivierung und Transfektion von HEK293-Zellen

Die Zellen der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293 wurden in DULBECCO'S MODIFIED EAGLE MEDIUM (DMEM, Life Technologies) mit 10% hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserum (FCS, Biother), 100 u/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Hefa) in Zellkulturschalen (Ø 10 cm) bei 37°C in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen einmal mit Versene-Puffer (137 mM NaCl; 8,8 mM Na₂HPO₄; 2,7 mM KCl; 0,7 mM KH₂PO₄; 1 mM EDTA, pH 7.4) gewaschen und nach Zugabe von 0,25% Trypsin in Versene-Puffer (Life Technologies) inkubiert, bis sich die Zellen von den Schalen ablösten. Die Zellsuspension wurde mit dem achtfachen Volumen an DMEM verdünnt und auf neue Kulturschalen überführt. Diese Prozedur wurde etwa alle drei Tage wiederholt.

Die Transfektion von HEK293-Zellen erfolgte nach Sambrook *et al.* (1989). Dazu wurden 500 µl 2x HBS (280 mM NaCl; 10 mM KCl; 1,5 mM Na₂PO₄; 12 mM Dextrose; 50 mM HEPES; pH 7,05) unter Einleitung steriler Luft mit 7,5-10 µg Plasmid-DNA in 500 µl 250 mM CaCl₂ gründlich vermischt. Während einer 20minütigen Inkubation bei RT bildeten sich Calciumphosphat-Präzipitate, die anschließend zu den etwa 50% konfluent gewachsenen Zellen tropfenweise hinzugefügt wurden (jeweils 500 µl pro Platte). Nach sechs bis acht Stunden wurde das Transfektionsmedium durch frisches Kulturmedium ersetzt. Rekombinante autofluoreszierende Proteine konnten bereits nach 24 Stunden mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops (Aristoplan, Leitz) detektiert werden.

2.8.2 Kultivierung und Transfektion von primären Hippocampus-Neuronen

Hippocampus-Neurone wurden nach der Methode von Banker *et al.* (1998) aus dem Gehirn von 18 - 20 Tage alten Rattenembryonen präpariert. Die zur Kultivierung der Zellen verwendeten Deckgläser (Ø 18 mm, Marienfeld) wurden zuvor 18 - 24 h mit rauchender Salpetersäure (Merck) und anschließend mindestens sechsmal mit H₂O gewaschen. Die getrockneten und sterilisierten Deckgläser wurden über Nacht mit Poly-L-Lysin (Sigma) in 0,1 M Borat-Puffer beschichtet und nachfolgend zweimal mit H₂O gewaschen. Pro Deckglas wurden circa 150.000 Zellen in MODIFIED EAGLE MEDIUM (MEM, Gibco) mit 10% [v/v]

Pferdeserum (Gibco) ausplattiert. Nach drei Stunden wurde das Plattierungsmedium durch Neurobasalmedium (NEUROBASAL MEDIUM, Gibco; 1x B27 Supplement, Gibco; 0,5 mM L-Glutamin ; 25 µM Glutamat) ausgetauscht. Nach vier Tagen wurde die Hälfte des Mediums durch frisches Medium ersetzt, das kein Glutamat, dafür aber 5 µM AraC (Cytosin-β-D-Arabinofuranosid, Sigma) enthielt. Die Zellen wurden danach alle drei Tage gefüttert, wobei jeweils nur die Hälfte des Mediums ersetzt wurde.

Für die Transfektion wurden sieben Tage alte Kulturen von Hippocampus-Neuronen verwendet. Es wurden H₂O, 10 µg Plasmid-DNA und 10 µl 2,5 M CaCl₂ (Gesamtvolumen 100 µl) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. Unter Luftzufuhr wurden 100 µl 2x BBS (50 mM BES; 280 mM NaCl; 1,5 mM Na₂HPO₄; pH 6,96) zu dem DNA-Calcium-Gemisch gegeben. Der Ansatz wurde 20 min bei RT inkubiert. Danach wurden je 100 µl des Ansatzes zu den auf Deckgläsern gewachsenen Neuronen gegeben, die in 1 ml Medium kultiviert wurden. Nach Zugabe des Transfektionsansatzes wurden die Zellen für vier Stunden in den Inkubator gestellt. Anschließend wurde das Präzipitat durch dreimaliges Waschen mit 1x HBSS (10x HBSS, Gibco BRL; 10 mM HEPES; 2 mM NaOH) von den Zellen entfernt. Die Neurone wurden in frischem Neurobasalmedium für weitere sieben Tage kultiviert.

2.8.3 Herstellung von Proteinextrakten aus kultivierten HEK293-Zellen

Das Medium einer mit HEK293-Zellen bewachsenen Kulturschale wurde abgesaugt, die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und in 1 ml 1x Laemmli-Puffer aufgenommen. Nach einer Inkubation für 15 min auf Eis wurde für 10 min bei 15.800 x g und 4°C zentrifugiert, um die unlöslichen Bestandteile abzutrennen. Vom Überstand wurden 20 µl mittels SDS-PAGE (2.6.1) und Western Blot (2.6.3) analysiert.

2.8.4 Immuncytochemie und Mikroskopie

Transient transfizierte HEK293-Zellen wurden auf Poly-D-Lysin-beschichtete (0,1 mg/ml, Sigma) Deckgläser in 12-Lochplatten ausgesät und für zwei Tage kultiviert. Zur Fixierung der Zellen wurde ein Volumen 4%iges Paraformaldehyd in PBS in das Kulturmedium gegeben. Nach fünfminütiger Einwirkung bei RT wurde diese Lösung durch 4%iges Paraformaldehyd in PBS ersetzt. Nach weiteren fünf

Minuten wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und für fünf Minuten mit 0,3% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden unspezifische Bindungsstellen auf den Zellen für eine Stunde bei RT mit 10% Ziegen Serum (Gibco) in PBS blockiert. Die Inkubation mit dem jeweiligen Erstantikörper (verdünnt in 10% Ziegen Serum in PBS) erfolgte für eine Stunde bei 37°C oder über Nacht bei 4°C. Die Deckgläser wurden dann dreimal mit PBS gewaschen und mit entsprechenden fluoreszierenden Sekundärantikörpern (verdünnt in 10% Ziegen Serum in PBS) bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Zuletzt wurden die Zellen dreimal mit PBS sowie einmal mit H₂O gewaschen und auf Objektträger in Glyceringelatine (PERMAFLUOR MOUNTING MEDIUM, Firma) eingebettet. Die Verdünnungen der verwendeten Antikörper sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Fluoreszenzsignale wurden mit einem Aristoplan-Fluoreszenzmikroskop (Leitz) in Kombination mit einer CCD C4742-95-12NRB Digital Kamera (Hamamatsu) und der *Openlab 2.2.5 Software* (Improvision) detektiert. Wurde für den Nachweis eines Proteins der Sekundärantikörper Alexa-546 Antikörper eingesetzt, so wurde dieser mit Hilfe eines N2.1-Filters (Leica; Anregung 515-560 nm, Emission 580 nm) visualisiert. Erfolgte der Nachweis eines Proteins über den Alexa-488 Antikörper oder über die Autofluoreszenz eines EGFP-Anteils, so wurde für deren Visualisierung ein L5-Filter (Leica, Anregung 480 nm, Emission 505 nm) verwendet. Die Aufnahmen wurden mit dem Programm *Adobe® Photoshop 4.0* (Adobe System Incorporated) weiterbearbeitet.

2.9 Firmenverzeichnis

Abcam Limited, Cambridgeshire, UK

Ambion Europe Ltd. Huntingdon, UK

Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Heidelberg

BioRad Laboratories GmbH, München

Biother GmbH, Kelkheim/Ts.

Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe

Clontech Laboratories GmbH, Heidelberg

Dianova GmbH, Hamburg

Dynal GmbH, Hamburg

Eppendorf GmbH, Hamburg

Hefa Pharma, Werne

Invitrogen Life Technologies (Invitrogen Corporation), Karlsruhe

Jackson Immuno Research, West Grove, USA, über Dianova GmbH, Hamburg

Marchery & Nagel GmbH & Co KG, Düren

MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth

Millipore GmbH, Eschborn

Molecular Probes Europe BV, Leiden, Niederlande

New England Biolabs GmbH, Schwalbach/Ts.

PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Promega GmbH, Mannheim

Qiagen GmbH, Hilden

Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

Santa Cruz Biotechnologie Inc, Heidelberg

Schleicher & Schuell GmbH, Dassel

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande

Upstate, Lake Placid, USA, über Biomol GmbH, Hamburg

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, durch Charakterisierung von Stau-fen-enthaltenden Ribonukleoprotein-Komplexen neue Erkenntnisse über die Funktion und den zellulären Wirkmechanismus beider Stau-fen-Varianten in eukaryotischen Zellen zu erhalten.

3.1 Subzelluläre Verteilung von Stau1 und Stau2

Zur Untersuchung der subzellulären Verteilung von Stau1 (Stau1) und Stau2 (Stau2) wurde zunächst ein spezifischer Antikörper gegen Stau2 hergestellt. Zur Erkennung von Stau1 lag zu Beginn dieser Arbeit bereits ein spezifischer Antikörper vor (Monshausen *et al.*, 2001).

3.1.1 Erzeugung eines Anti-rStau2 Antikörpers

Zur Herstellung eines polyklonalen Antiserums wurde der die Aminosäuren 1-112 kodierende Bereich der Stau2-cDNA mit einer Rattengehirn-cDNA als Matrize amplifiziert, in den prokaryotischen Expressionsvektor pGEX2T kloniert (pGEX2T-rStau2₁₋₁₁₂, r steht als Kennzeichnung für das Rattenprotein) und als GST-Fusionsprotein (GST-rStau2₁₋₁₁₂) exprimiert. Diese rStau2-Region weist nur eine sehr geringe Identität zu rStau1 auf und ist in allen drei bekannten rStau2-Isoformen (rStau2⁶², rStau2⁵⁹ und rStau2⁵²) vorhanden. Das gereinigte Fusionsprotein (1 mg/ml) wurde von der Firma Pineda zur Immunisierung eines Kaninchens eingesetzt. Im Western Blot erkennt das Antiserum rStau2#336 spezifisch die rekombinanten Proteine FLAG-rStau2 (62 kDa) und rStau2-EGFP (89 kDa) sowie einige Abbauprodukte (Abb. 1A). Aus einem Rattengehirnextrakt wurden alle drei Isoformen von rStau2 mit dem gereinigten Anti-rStau2-336 Antikörper immunpräzipitiert (Abb. 1B).

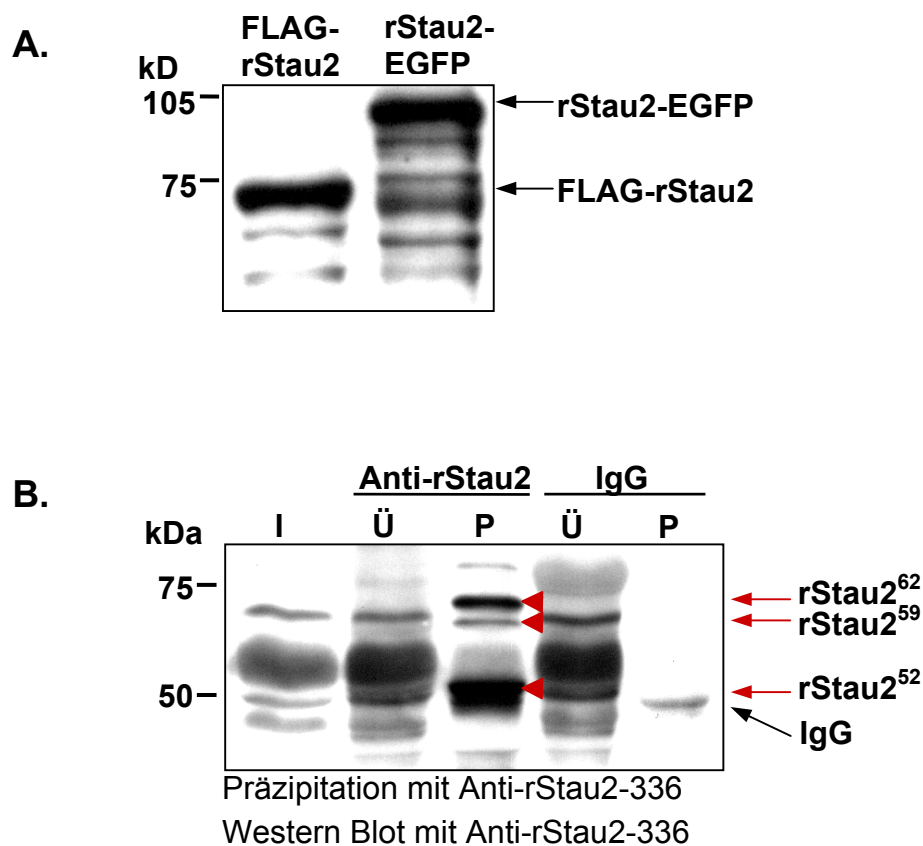


Abb. 1: Charakterisierung des Anti-rStau2 Antiserums

A. Der polyklonale Antikörper erkennt spezifisch die in HEK293-Zellen rekombinant exprimierten Proteine FLAG-rStau2 und rStau2-EGFP. Die Detektion der Fusionsproteine erfolgte mit dem ungereinigten Antiserum rStau2#336 (Verdünnung: 1:1000). Für die Analyse im Western Blot wurden jeweils 20 µg Protein eingesetzt. **B.** In einer Immunpräzipitation wurden rStau2-Isoformen mit dem affinitätsgereinigten Anti-rStau2-336 Antikörper aus Rattengehirnextrakt präzipitiert. Zur Kontrolle wurde an Stelle des Antikörpers Kaninchen-IgG eingesetzt. Der Extrakt (I), die Überstände (Ü) und die Präzipitate (P) wurden im Western Blot mit dem affinitätsgereinigten Anti-rStau2-336 Antikörper (Verdünnung: 1:1000) nachgewiesen.

3.1.2 Untersuchung der subzellulären Lokalisierung von Stau1 und Stau2

Die subzelluläre Lokalisierung der endogenen Proteine rStau1 und rStau2 wurde nach zwei Wochen Kulturdauer in primären Hippocampus-Neuronen der Ratte untersucht. Das neuronenspezifische Mikrotubulus-assoziierte Protein 2 (MAP2) wurde als Markerprotein für eine somatodendritische Lokalisierung parallel nachgewiesen (Abb. 2A, a & f). Die endogenen Stau-Proteine zeigen in Hippocampus-Neuronen ebenso wie MAP2 eine somatodendritische Verteilung (Abb. 2A, b & g), wobei keines der beiden Proteine im Kern lokalisiert ist

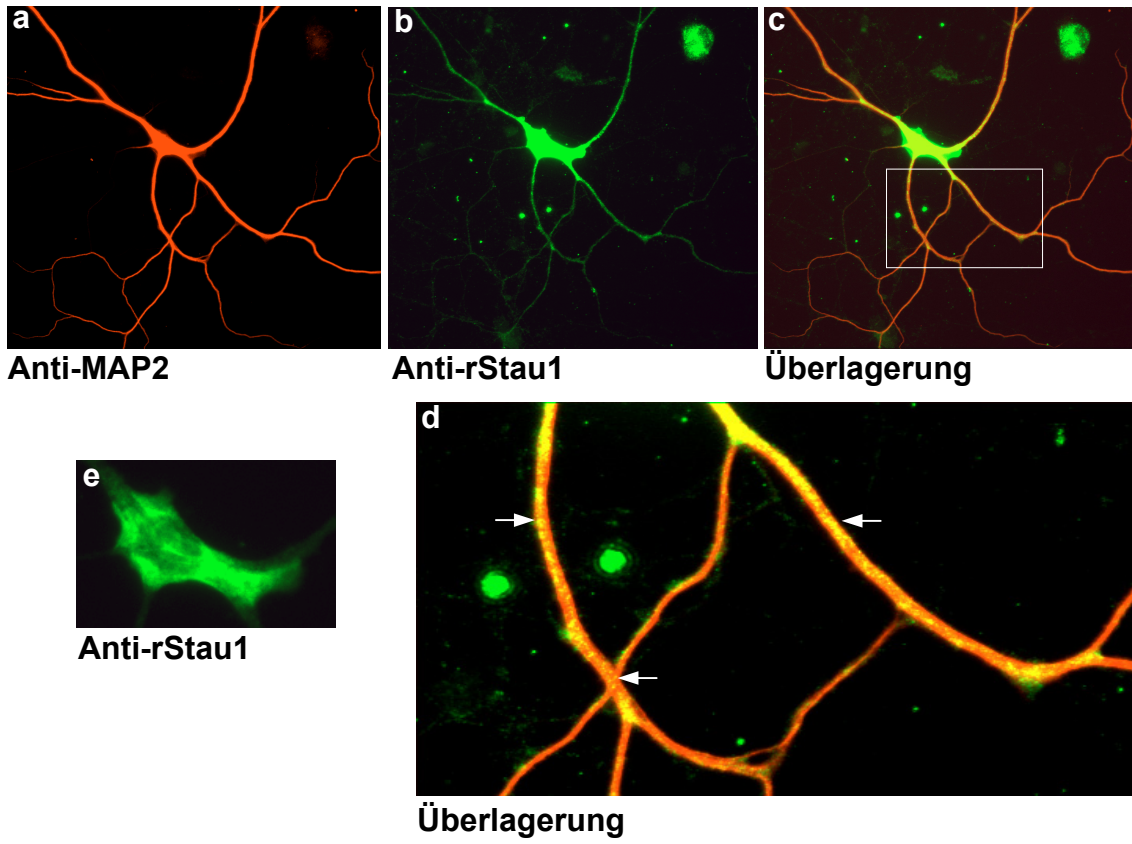
(Abb. 2A, e & k). Im Gegensatz zu der gleichmäßigen MAP2-Färbung ist bei stärkerer Vergrößerung eine granuläre Verteilung von rStau1 und rStau2 in den Dendriten erkennbar (Abb. 2A, d & i).

Die cytoplasmatische und granuläre Verteilung der Stau-Proteine in den Dendriten deuten darauf hin, dass rStau1 und rStau2 möglicherweise Bestandteile von cytoskelett-assoziierten Partikeln sind. Um eine mögliche Cytoskelettassoziation zu untersuchen, wurden EGFP-Fusionsproteine in CHO-K1-Zellen exprimiert. Sowohl rStau1-EGFP als auch rStau2-EGFP zeigen eine cytoplasmatische Lokalisierung (Abb. 2B). Ihre Konzentration nimmt von der perinukleären Region zur Peripherie der Zelle hin leicht ab. Aufgrund der starken Expression und der hohen Dichte der Partikel ist die ebenfalls granuläre Verteilung schwer zu erkennen. Im Unterschied zu den Stau-EGFP-Fusionsproteinen ist das vom Grundvektor pEGFP-N1 exprimierte EGFP gleichmäßig im Kern und im Cytoplasma verteilt. Zur Entfernung löslicher Zellbestandteile wurden die transfizierten CHO-K1-Zellen vor der Fixierung mit 0,3% Triton X-100 permeabilisiert. Während rStau1-EGFP und rStau2-EGFP nach der Triton-Behandlung noch im Cytoplasma der transfizierten Zellen nachweisbar waren, konnte EGFP nicht mehr detektiert werden. Dies zeigt, dass die Stau-Proteine mit unlöslichen Zellbestandteilen, wie dem Cytoskelett, assoziiert sind. Die Konzentrierung der Proteine um den Zellkern herum könnte auf einer Assoziation mit dem endoplasmatischen Retikulum beruhen.

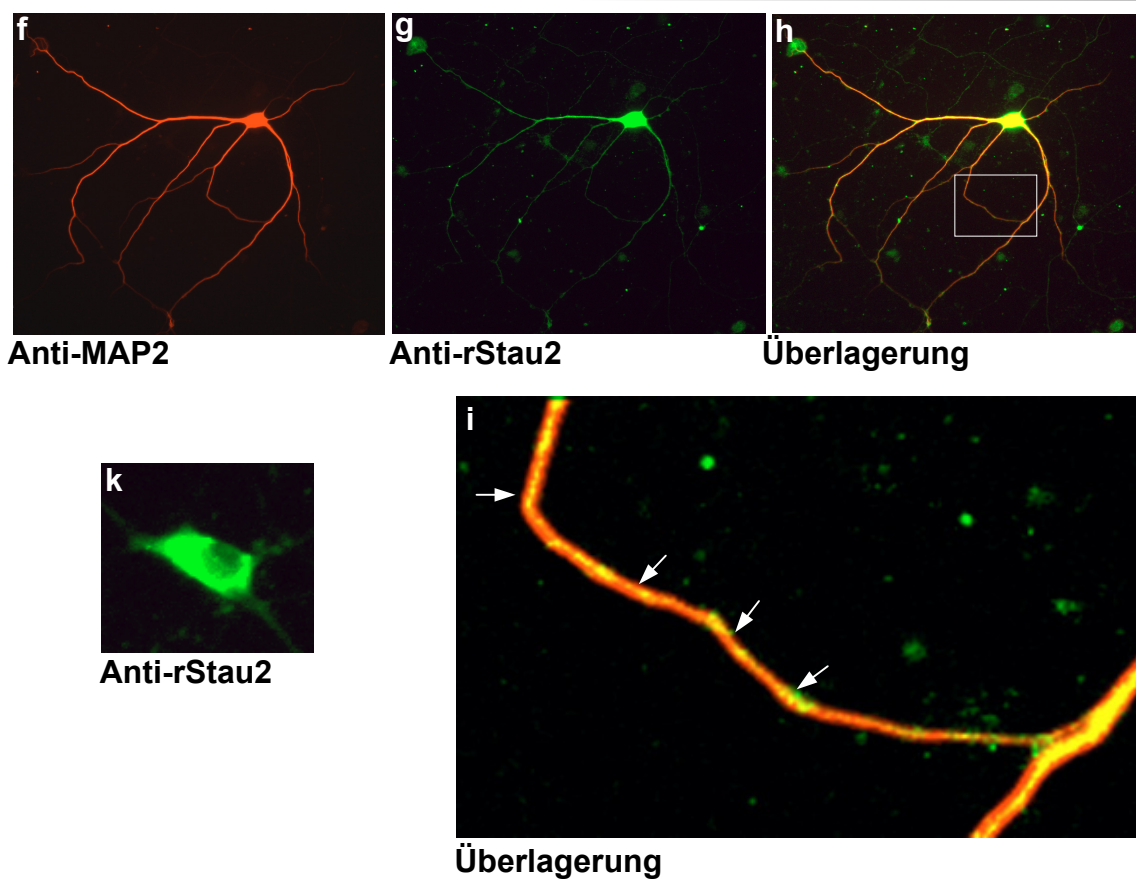
Die Stau-Proteine sind demnach cytoplasmatisch lokalisiert und scheinen nicht im Zellkern vorzuliegen. Beide Proteine binden an das Cytoskelett und zeigen in Dendriten von Hippocampus-Neuronen ein granuläres Verteilungsmuster.

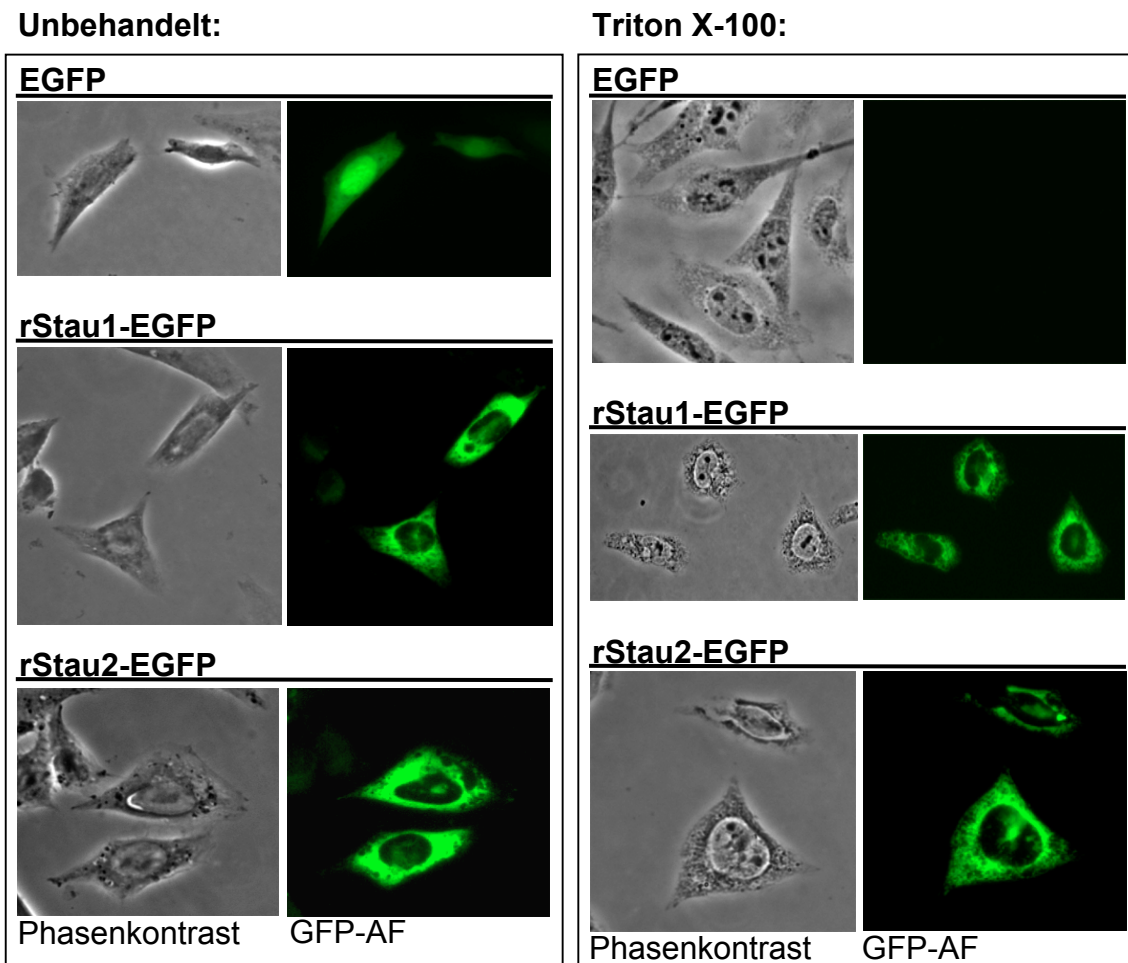
A. Hippocampus-Neurone:

endogenes rStau1



endogenes rStau2



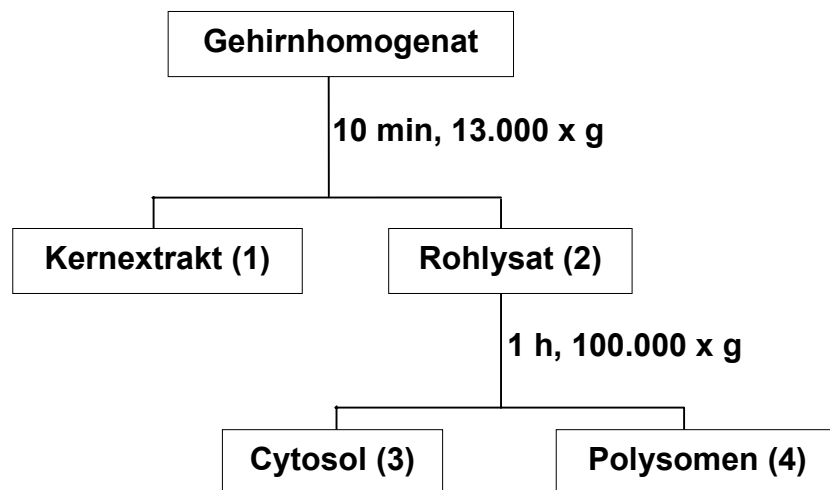
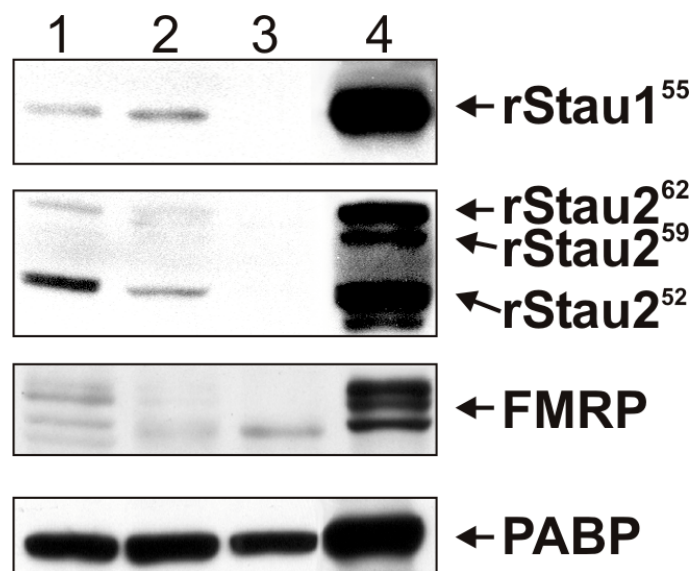
B. CHO-K1-Zellen:**Abb. 2: Verteilung von Stau-Proteinen in Hippocampus-Neuronen der Ratte sowie in CHO-K1-Zellen**

A. Primärkulturen von Ratten-Hippocampus-Neuronen wurden nach 14 Tagen in Kultur fixiert. **b & g:** Endogenes rStau1 und rStau2 wurden mit Hilfe spezifischer polyklonaler Antikörper detektiert (grün). **a & f:** MAP2 wurde mit einem monoklonalen Anti-MAP2 Antikörper nachgewiesen (rot). **c & h:** Die Überlagerung beider Kanäle wird durch die Gelbfärbung markiert. **e & k:** Eine Vergrößerung der Zellkörper, die kein rStau1 und rStau2 im Kern zeigen. **d & i:** Vergrößerte Bereiche aus c und h. Die Pfeile weisen auf dendritisch lokalisierte Partikel hin. **B.** EGFP, rStau1-EGFP und rStau2-EGFP wurden in transfizierten CHO-K1-Zellen rekombinant exprimiert. Die Zellen wurden entweder direkt fixiert (unbehandelt) oder vor der Fixierung mit 0,3% Triton X-100 behandelt. Es sind jeweils Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen transfizierter Zellen gezeigt. Die EGFP-Proteine wurden über die Autofluoreszenz (AF) der EGFP-Domäne nachgewiesen.

3.1.3 Verteilung von Stau1 und Stau2 in subzellulären Fraktionen

Die granuläre Verteilung der Stau-Proteine und ihre Assoziation mit Detergenz-resistenten Zellkomponenten deuten darauf hin, dass sie mögliche Bestandteile von größeren Cytoskelett-assoziierten RNP-Komplexen sind. Um diese Beobachtungen genauer zu analysieren, wurde das Vorkommen von rStau1 und rStau2 in verschiedenen subzellulären Fraktionen untersucht. Aus einem Gehirnhomogenat einer adulten Ratte wurden unterschiedliche Zellfraktionen gewonnen (Abb. 3A).

Während rStau1 und alle rStau2-Isoformen in Kernextrakt und Rohlysat nicht oder in nur sehr geringen Mengen nachweisbar waren, konnten sie in der Polysomenfraktion in hoher Konzentration detektiert werden. Ein ähnliches Verteilungsmuster wurde für das nukleocytoplasmatische RNA-Bindeprotein FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*) beobachtet, dass als Bestandteil von RNP-Komplexen in Assoziation mit Polysomen vorliegt (Siomi *et al.*, 1996). Im Unterschied zu Stau und FMRP ist PABP (*Poly(A) Binding Protein*) in allen Fraktionen deutlich nachzuweisen, wobei in der Polysomenfraktion eine leichte Anreicherung beobachtet wird.

A.**B.****Abb. 3: Proteinverteilung in subzellulären Fraktionen**

A. Schematische Darstellung der einzelnen Schritte der Zellfraktionierung. Ein adultes Rattengehirn wurde homogenisiert und mittels Zentrifugation in Kernsediment (**1**) und Rohlysat (**2**) fraktioniert. Das Rohlysat wurde anschließend bei 100.000 x g durch ein 30%iges Sucrosekissen zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand als cytosolische Fraktion (**3**) und das Sediment (**4**), die Polysomenfraktion, gewonnen. **B.** Aus jeder Fraktion wurden 20 µg Protein eingesetzt und im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen die Proteine rStau1, rStau2, FMRP und PABP analysiert.

Um die Assoziation von rStau1 und rStau2 mit RNP-Komplexen näher zu charakterisieren, wurden die Proteine aus einer Polysomenfraktion durch Behandlung mit steigenden Salzkonzentrationen freigesetzt. Nach der Salzbehandlung wurden gelöste Proteine durch Zentrifugation von den Polysomen getrennt. Die resultierenden Überstände und das Sediment wurden im Western Blot analysiert. Eine teilweise Freisetzung von rStau1 aus der Polysomenfraktion konnte bereits bei einer Salzkonzentration von 300 mM NaCl beobachtet werden. Dagegen wurden alle rStau2-Isoformen erst durch Zugabe von 600 mM NaCl aus den Komplexen gelöst. Die Staufr-Proteine sind demnach über Ionenbindungen oder andere schwache Wechselwirkungen mit Komplexen der Polysomenfraktion assoziiert. Im Unterschied zu rStau1 scheint rStau2 fester in den Komplexen gebunden zu sein. Die hohen Konzentrationen in der Polysomenfraktion lassen darauf schließen, dass die Staufr-Proteine, ebenso wie FMRP, Komponenten von Cytoskelett-assoziierten RNP-Komplexen sind, die möglicherweise ebenfalls Ribosomen enthalten.

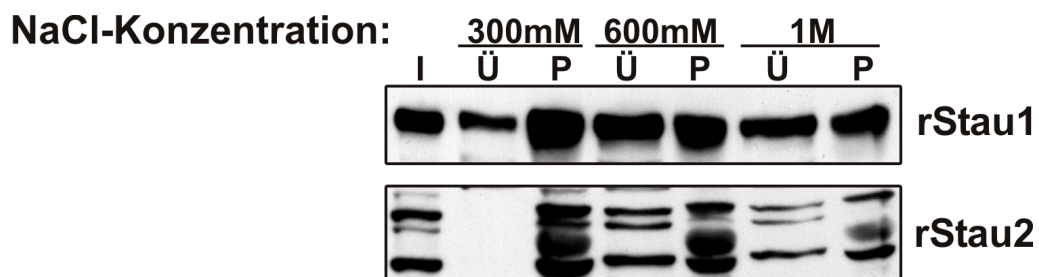


Abb. 4: Salzbehandlung einer Polysomenfraktion

Eine Polysomenfraktion aus Rattengehirn wurde mit steigenden Salzkonzentrationen von 300mM, 600mM und 1M NaCl behandelt. Nach einer Zentrifugation bei 100.000 x g wurden im Ausgangsmaterial (I), in den Überständen (Ü) und in den Sedimenten (P) die Proteine rStau1 und rStau2 mit spezifischen Antikörpern detektiert.

3.2 Charakterisierung von Stau1-Ribonukleoprotein-Partikeln

3.2.1 Affinitätsreinigung nativer Proteinkomplexe über GKAP-Sepharose

Viele RNA-Bindeproteine interagieren *in vivo* als Bestandteil größerer Ribonukleoprotein (RNP)-Komplexe mit RNA-Molekülen und regulieren unterschiedliche Schritte des RNA-Metabolismus. Um Aufschluss über die Zusammensetzung von Stau1-RNP-Komplexen zu erhalten, sollten native Komplexe aus Zelllysaten isoliert werden. Zu diesem Zweck wurde eine neue Methode eingesetzt, welche auf der hochaffinen und spezifischen Interaktion zweier Proteine der postsynaptischen Dichte (PSD) exzitatorischer Synapsen, Shank1 (*SH3 domain and ankyrin repeat containing protein 1*) und GKAP/SAPAP1 (*guanylate-kinase associated protein; SAP90/PSD95-associated protein 1*), basiert. In der PSD bindet das Gerüstprotein Shank1 mit seiner PDZ-Domäne an den C-Terminus des Adapterproteins GKAP/SAPAP1 (Kim *et al.*, 1997). Die letzten vier Aminosäuren von GKAP sind für diese Interaktion essentiell (Kreienkamp *et al.*, 2002).

Für die Affinitätsreinigung wird ein synthetisches Peptid, welches den letzten zehn Aminosäuren des GKAP der Ratte entspricht (YIPEAQTRL), kovalent an Sepharose gekoppelt. Zur Reinigung eines bestimmten Proteins wird dieses als ein mit der Shank1-PDZ-Domäne fusioniertes rekombinantes Protein in eukaryotischen Zellen exprimiert. Nach der Zellyse wird der Proteinextrakt mit der GKAP-Sepharose inkubiert. Die Bindung der PDZ-Domäne des Fusionsproteins an das Matrix-assoziierte Peptid GKAP ermöglicht die Reinigung des Zielproteins sowie seiner direkten und indirekten Interaktionspartner. Gereinigte Protein-Komplexe werden von der Matrix eluiert, und die einzelnen Komponenten in einer SDS-PAGE voneinander getrennt. Nach Coomassie-Färbung können Banden aus dem Gel isoliert und massenspektrometrisch identifiziert werden (Abb. 5).

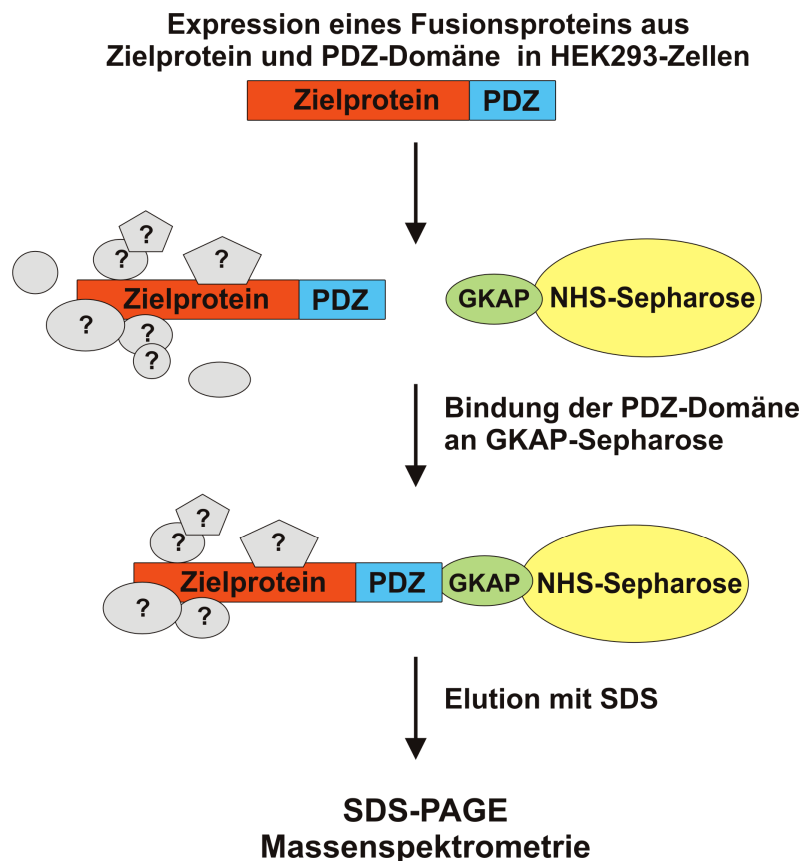


Abb. 5: Schematische Darstellung der Affinitätsreinigung

Das Zielprotein wird als PDZ-Fusionsprotein in HEK293-Zellen exprimiert und mit GKAP-Sepharose präzipitiert. Durch die Zugabe von SDS werden die gereinigten Proteinkomplexe von der Matrix eluiert. Im Anschluss an eine SDS-PAGE werden die aufgetrennten Proteine mit Coomassie gefärbt und einzelne Proteine mittels Massenspektrometrie identifiziert.

3.2.2 Stau1-Ribonukleoprotein-Komplexe

Zur Herstellung des Stau1-PDZ-Expressionsvektors wurde die Region der Shank1-cDNA amplifiziert, welche die PDZ-Domäne kodiert. Über die eingebauten Restriktionsschnittstellen *Bam*HI/*Not*I wurde das PDZ-cDNA-Fragment in den eukaryotischen Expressionsvektor pEGFP-N1 kloniert, wobei die im Vektor enthaltene EGFP-cDNA-Region durch die cDNA-Sequenz der PDZ-Domäne ersetzt wurde. In die multiple Klonierungsstelle des neuen Expressionsvektors pPDZ-N1 wurde über die Restriktionsschnittstellen *Eco*RI/*Bam*HI die gesamte kodierende Region der rStau1-cDNA (Acc.-Nr.: AF290989) eingesetzt

(pStau1-PDZ, Abb. 6A). Zur Überprüfung der Expression von Stau1-PDZ und der Bindung an GKAP-Sepharose wurden HEK293-Zellen mit dem Expressionsvektor pStau1-PDZ transient transfiziert und in RIPA-Puffer lysiert. Nach der Präzipitation mit GKAP-Sepharose wurden Lysat, Überstand und Präzipitat im Western Blot analysiert (Abb. 6B). In allen Fraktionen konnte Stau1-PDZ mit einem gegen die PDZ-Domäne gerichteten Antikörper detektiert werden.

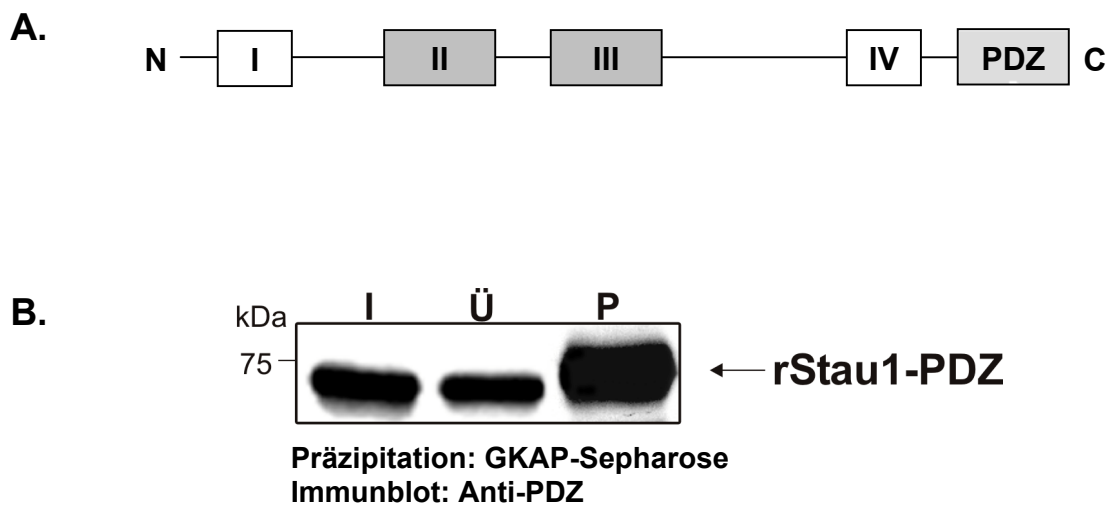


Abb. 6: Expression von Stau1-PDZ in HEK293-Zellen

A. Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Stau1-PDZ. Die Boxen symbolisieren die unterschiedlichen Domänen: verkürzte dsRBD (weiße Boxen, I und IV), vollständige dsRBD (graue Boxen, II und III) und die PDZ-Domäne (PDZ). **B.** In HEK293-Zellen exprimiertes Stau1-PDZ wurde mit GKAP-Sepharose präzipitiert. Lysat (I), Überstand (Ü) und Präzipitat (P) wurden im Western Blot analysiert. Die Detektion des Fusionsproteins erfolgte durch einen spezifischer Antikörper gegen die PDZ-Domäne (Verdünnung 1:2000).

Stau1 könnte mittels RNA indirekt mit anderen RNA-bindenden Proteinen assoziiert sein. Um derartige RNA-vermittelte Interaktionen von RNA-unabhängigen Assoziationen unterscheiden zu können, wurde die Affinitätsreinigung mit unbehandelten und RNaseA-behandelten HEK293-Zelllysaten durchgeführt (Abb. 7). Parallel dazu wurden zum Vergleich zwei andere PDZ-Fusionsproteine gereinigt. Dazu wurde zum einen das strukturell nicht verwandte RNA-Bindeprotein hnRNPK (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K*; Dreyfuss *et al.*, 2002) und zum anderen das neuronale Protein Sharpin (Lim *et al.*, 2001) verwendet.

In dem GKAP-Präzipitat nicht transfizierter HEK293-Zellen waren keine deutlichen Banden erkennbar. Das Präzipitat der Sharpin-PDZ-Reinigung enthielt neben dem gereinigten Fusionsprotein von 55 kDa ebenfalls keine weiteren deutlichen Proteinbanden. Im Unterschied dazu wurde mit hnRNPK-PDZ bzw. Stau1-PDZ jeweils eine große Anzahl an Proteinen aus dem Zelllysate isoliert, wobei die Fusionsproteine selbst die stärksten Banden bei 75 kDa (hnRNPK-PDZ) und 70 kDa (Stau1-PDZ) darstellten. Demgegenüber unterschied sich das Bandenmuster des Stau1-Präzipitats besonders im Bereich zwischen 40 und 20 kDa deutlich von dem der hnRNPK-Reinigung. Im Anschluss an die RNaseA-Behandlung wurde eine effizientere Aufreinigung von rStau1-PDZ erreicht, was möglicherweise auf eine bessere Zugänglichkeit der PDZ-Domäne im RNA-freien Komplex zurückzuführen ist. Stau1-spezifische Banden wurden mittels Massenspektrometrie analysiert.

Eine im Stau1-Präzipitat des unbehandelten Extrakts erkennbare etwa 105 kDa Bande war im RNaseA-behandelten Präzipitat nicht mehr zu erkennen. Diese Bande wurde als das RNA-Bindeprotein Nucleolin identifiziert (Ginisty *et al.*, 1999). Ansonsten sind die Bandenmuster RNaseA-behandelter und unbehandelter Zelllysate des jeweiligen Fusionsproteins im wesentlichen identisch. So wurden weitere Proteine identifiziert, die scheinbar RNA-unabhängig spezifisch mit Stau1 assoziiert sind. Es wurden eine Reihe von Banden untersucht, die aus dem Bereich von 18 - 35 kDa isoliert wurden und nicht im GKAP-Präzipitat von hnRNPK vorkamen. Diese konnten ausschließlich als Komponenten der kleinen und großen ribosomalen Untereinheit identifiziert werden. Hierbei handelte es sich um die ribosomalen Proteine L21, L10, L15, L14, S8, L7a, S3a, S6, S2, L6 und P0. Bei der Analyse von Proteinen die größer als 35 kDa waren, konnte eine

Bande bei etwa 50 kDa als β 4-Tubulin identifiziert werden. Weitere Banden, die aus diesem Bereich untersucht wurden, erwiesen sich dagegen als Abbauprodukte des rStau1-PDZ-Fusionsproteins. Neben dem RNA-Bindeprotein Nucleolin wurden weitere nukleäre RNA-Bindeproteine wie NFAR (*nuclear factor associated with double-stranded RNA*, 110 kDa; Saunders & Barber, 2003), hnRNPU (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U*, 120 kDa; Dreyfuss *et al.*, 2002) und die RNA-Helikase A (RHA, 150 kDa; Lee & Hurwitz, 1992) in der Massenspektrometrie identifiziert. Abgesehen von dem RNA-Bindeprotein hnRNPU, das ebenfalls im hnRNPK-Präzipitat gefunden wurde, konnte keines der beschriebenen Proteine aus den Lysaten untransfizierter oder Sharpin-PDZ bzw. hnRNPK-PDZ exprimierender HEK293-Zellen präzipitiert werden.

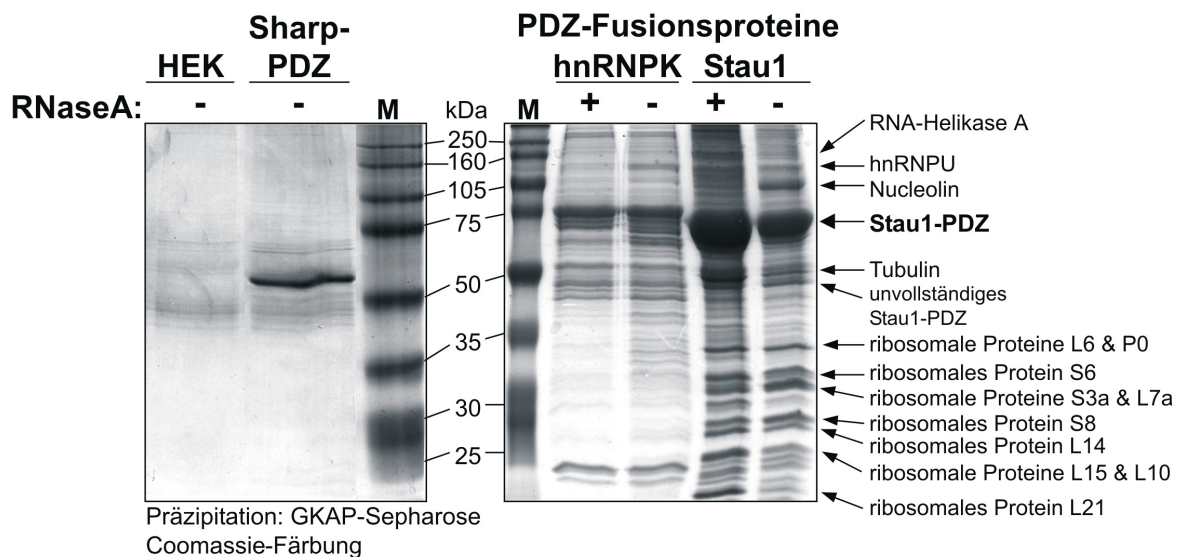


Abb. 7: Affinitätsreinigung nativer Proteinkomplexe

Die in HEK293-Zellen exprimierten Fusionsproteine Sharpin-PDZ, hnRNPK-PDZ und Stau1-PDZ wurden aus RNaseA-behandelten (+) und unbehandelten (-) Zelllysaten mit GKAP-Sepharose präzipitiert. Stau1-spezifische Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten (Pfeile) und massenspektrometrisch analysiert (Tab. 7). In der Mitte sind die Größen des Proteinmarkers (M) in kDa angegeben.

In einem weiteren Versuchsansatz wurden die Präzipitationen mit dem weniger Detergenzien enthaltenden IP-Puffer durchgeführt, in dem auch relativ schwache Protein-Protein-Interaktionen erhalten bleiben und Zellkerne nicht lysiert werden. Die Affinitätsreinigung erfolgte wiederum aus unbehandelten und RNaseA-behandelten HEK293-Zelllysaten. Beim Vergleich beider Reinigungen konnte ein identisches Bandenmuster beobachtet werden. Wie bereits für die Präzipitation mit RIPA-Puffer beschrieben, wurde mit IP-Puffer nach RNaseA-Verdau ebenso eine effizientere Stau1-PDZ-Präzipitation erzielt (Abb. 8).

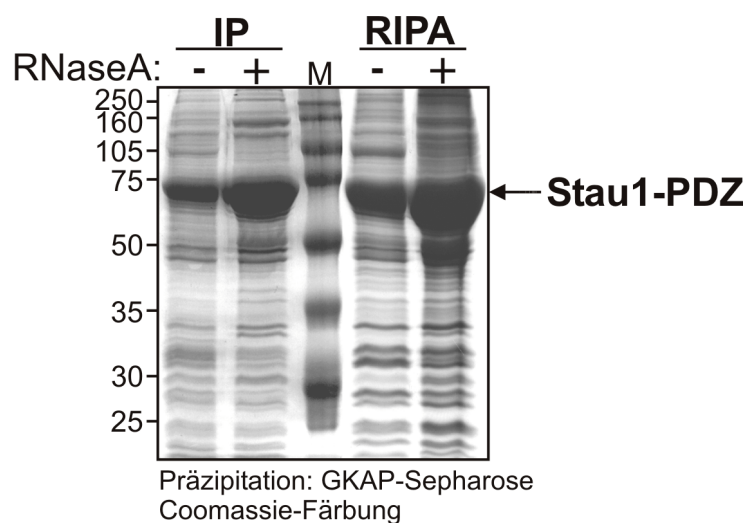


Abb. 8: Affinitätsreinigung mit unterschiedlichen Lysispuffern

HEK293-Zellen wurden transient mit pStau1-PDZ transfiziert. Die Zellen wurden mit IP-bzw. RIPA-Puffer mit (+) und ohne (-) RNaseA lysiert und die PDZ-Fusionsproteine mit GKAP-Sepharose präzipitiert. Durch Auftrennung in einer SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung wurden die unterschiedlichen Präzipitate gegenübergestellt, wobei ein im wesentlichen identisches Bandenmuster beobachtet wurde. Links sind die Größen des Proteinmarkers (M) in kDa angegeben.

Tabelle 7: Identifizierte Bestandteile von Stau1-RNP-Komplexen

Die Tabelle zeigt alle Proteine, die in Stau1-Komplexen mittels Massenspektrometrie und/oder Western Blot Analysen identifiziert wurden. Zusätzlich wurden die Größen der isolierten Banden in kDa und die Zugriffsnummern der Proteine in der GenBank angegeben. Proteine, die nicht im Western Blot überprüft wurden, sind mit n.g. (nicht getestet) gekennzeichnet.

Protein	GenBank Zugriffs- nummer	Massen- spektrometrie	Western Blot	Bande in kDa
RNA Helikase A	NP_076950	+	n.g.	150
hnRNP U (SAF A)	NP_114032	+	+	120
NFAR (<i>nuclear factor associated with dsRNA</i>)	Q12906	+	n.g.	110
Kinesin (schwere Ketten)	A41919	-	+	110
Nucleolin	NP_005372	+	+	105
Poly (A) Bindeprotein	P11940	-	+	75
FMRP1	Q06787	-	+	75
Dynein (intermediäre Ketten)	O14576	-	+	70
β4-Tubulin	Q13509	+	n.g.	50
α-Tubulin	P05209	-	+	50
Elongations Faktor 1α	CAA34756	-	-	50
Ribosomales Protein P0	NP_000993	+	+	34
Ribosomales Protein L6	AAH20679	+	n.g.	34
Ribosomales Protein S2	NP_002943	+	n.g.	32
Ribosomales Protein S6	P10660	+	+	32
Ribosomales Protein S3a	L13802	+	n.g.	30
Ribosomales Protein L7a	NP_000963	+	+	30
Ribosomales Protein S8	S11415	+	n.g.	28
Ribosomales Protein L14	P50914	+	n.g.	27
Ribosomales Protein L10	S34425	+	n.g.	26
Ribosomales Protein L15	P61313	+	n.g.	26
Ribosomales Protein L21	S55913	+	n.g.	20

3.2.3 Überprüfung der identifizierten Komponenten von Stau1-RNP-Komplexen

Um die Assoziation von Stau1 mit den massenspektrometrisch identifizierten Proteinen zu verifizieren, wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Die immunologische Untersuchung erfolgte aufgrund der limitierten Verfügbarkeit spezifischer Antikörper nur für einen Teil der identifizierten Proteine.

Stau1-PDZ und hnRNPK-PDZ wurden aus unbehandelten und RNaseA-behandelten HEK293-Zelllysaten affinitätsgereinigt. Vor der GKAP-Präzipitation wurde jeweils aus etwa 3% des gesamten Lysats RNA isoliert. Die Analyse im Agarosegel zeigte den vollständigen Abbau der ribosomalen RNA-Moleküle 18S und 28S (Abb. 9).

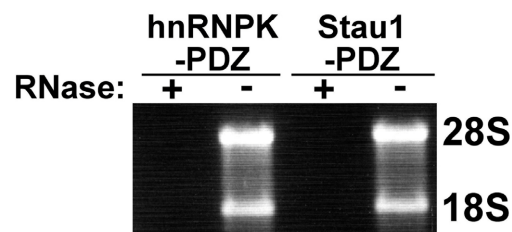


Abb. 9: Überprüfung des RNA-Abbaus

Aus dem RNaseA-behandelten (+) und unbehandelten (-) Lysat wurde vor der Präzipitation RNA isoliert. Die RNA wurde durch Auftrennung in einem 1,2%igen Agarosegel analysiert. Sichtbar sind die Banden der 28S und 18S ribosomalen RNA.

Wie die Western Blot Analysen in Abbildung 10 zeigen, wurden die ribosomalen Proteine P0 und L7a in den RNaseA-behandelten und unbehandelten Stau1-Präzipitaten detektiert. Im Unterschied dazu wurde das RNA-Bindeprotein Nucleolin nur aus dem unbehandelten Extrakt kopräzipitiert. Bereits in einer früheren Arbeit wurde die Protein-Phosphatase 1 (PP1) als direkter Interaktionspartner für rStau1 identifiziert (Monshausen *et al.*, 2001). In Übereinstimmung mit diesen Befunden konnte PP1 ebenfalls als eine Komponente des Stau1-RNP-Komplexes in HEK293-Zellen detektiert werden. Diese Assoziation war wie erwartet RNA-unabhängig.

Weder P0 noch L7a, Nucleolin oder PP1 wurden mit hnRNPK-PDZ kopräzipitiert, was für eine spezifische Assoziation dieser Proteine mit Stau1-Komplexen spricht und die Spezifität der Reinigungsmethode belegt. Ferner wurde der in eukaryotischen Zellen abundant exprimierte Elongationsfaktor EF1 α ausschließlich in den Überständen gefunden. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die hohe Spezifität der Affinitätsreinigung mit GKAP-Sepharose.

In früheren Studien wurden weitere putative Stau1-Interaktionspartner beschrieben, darunter Tubulin (Wickham *et al.* 1999), FMRP, MyosinVa, Kinesin und Pur α (Ohashi *et al.*, 2002). Das Poly(A)-Bindeprotein (PABP) wäre ebenfalls als Bestandteil von Stau1-RNP-Komplexen denkbar, da es an der Stabilisierung von RNA-Molekülen beteiligt ist. Im Western Blot wurde α -Tubulin überwiegend im RNaseA-behandelten Stau1-Präzipitat nachgewiesen. Möglicherweise ist die Tubulin-Bindungsdomäne von Stau1 erst im RNA-freien Komplex für Tubulin zugänglich. Im unbehandelten Stau1-PDZ-Präzipitat und im RNaseA-behandelten hnRNPK-Präzipitat waren lediglich Spuren von α -Tubulin erkennbar. Die Proteine FMRP und PABP wurden ausschließlich im unbehandelten Präzipitat identifiziert und assoziieren somit RNA-vermittelt mit dem Stau1-RNP-Komplex. Im Gegensatz zu FMRP wurde PABP allerdings ebenfalls im unbehandelten Präzipitat von hnRNPK nachgewiesen. Das Motorprotein Kinesin ist eine RNA-unabhängige Komponente des Stau1-RNP Komplexes, während Dynein in den verschiedenen Präzipitaten nicht detektiert wurde.

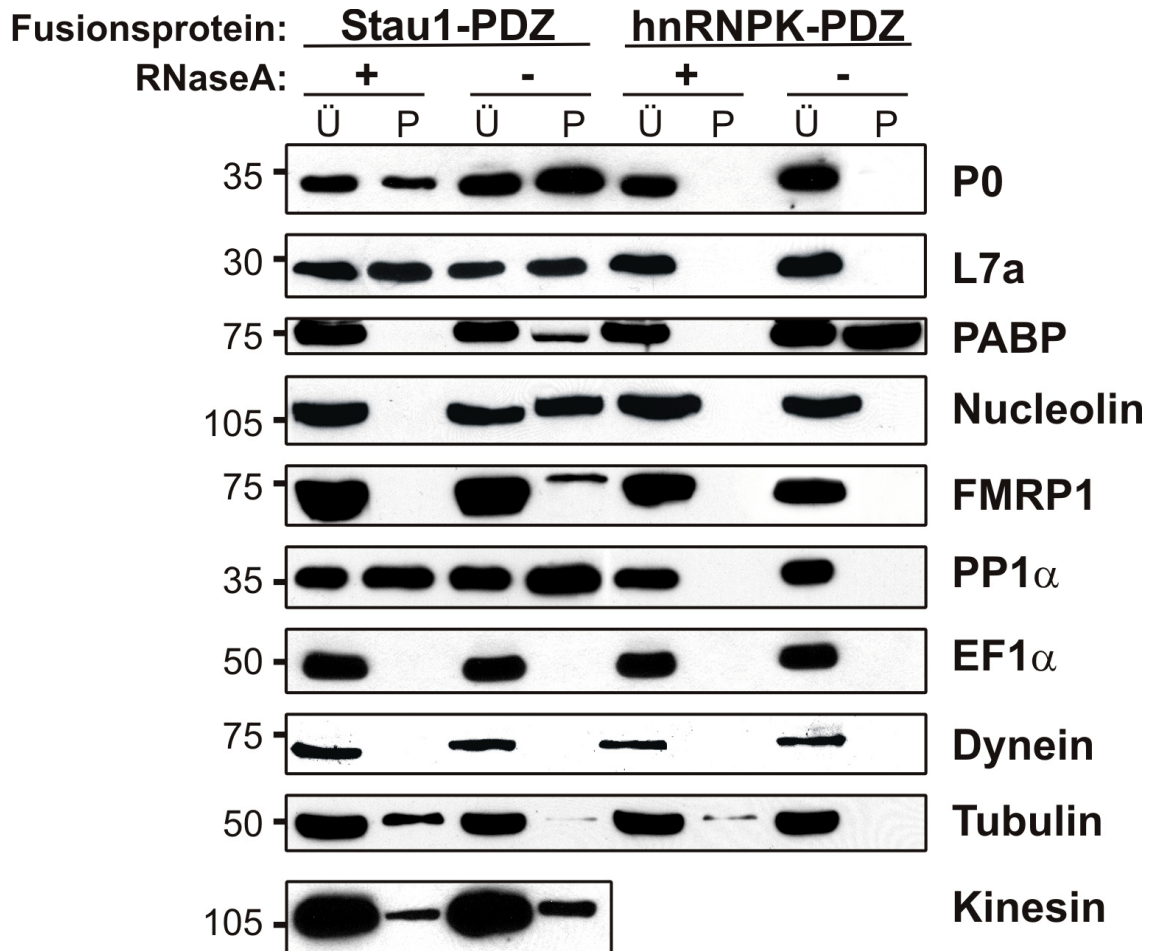


Abb. 10: Komponenten des Stau1-Ribonukleoprotein-Komplexes

In HEK293-Zellen wurden Stau1-PDZ und hnRNPK-PDZ rekombinant exprimiert. Die Zellyse erfolgte in RIPA-Puffer mit (+) und ohne (-) RNaseA und die rekombinanten Proteine wurde mit GKAP-Sepharose präzipitiert. Überstände (Ü) und Präzipitate (P) wurden mit den angegebenen Antikörpern im Western Blot analysiert.

3.3 *In vivo* Interaktion von Stau1 und Nucleolin in HEK293-Zellen

Die Affinitätsreinigung von Stau1-RNP-Komplexen aus HEK293-Zellen zeigte eine RNA-abhängige Assoziation von Stau1-PDZ mit Nucleolin. Im Folgenden wurden Analysen zur weiteren Charakterisierung der Interaktion zwischen Stau1 und Nucleolin durchgeführt. Das RNA-Bindeprotein Nucleolin besitzt ein Kernlokalisierungssignal (NLS), vier zentrale RNA-Bindedomänen (RRM, *RNA recognition motif*) und eine C-terminale RGG-Domäne, die sowohl RNA als auch andere Proteine bindet (Abb. 11).

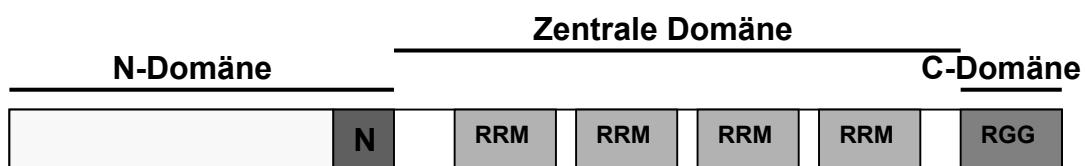


Abb. 11: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Nucleolin

Graue Boxen symbolisieren Kernlokalisierungssignal (N), sowie RNA-Bindedomänen des RRM- und RGG-Typs.

Die gesamte kodierende Region von Nucleolin wurde mit einer Rattengehirn-cDNA als Matrize amplifiziert und in den Expressionsvektor pCMV-Tag2B (pCMV-rNuc) kloniert. Der resultierende Vektor kodiert ein mit einem FLAG-Epitop markiertes rekombinantes Nucleolin (FLAG-rNuc). HEK293-Zellen wurden mit den Konstrukten pCMV-rNuc und pEGFP-rStau1 transient kotransfiziert. Nach der Zellyse in ColP-Puffer folgte eine Immunpräzipitation mit Anti-FLAG-Agarose, die im Western Blot analysiert wurde. Abbildung 12B zeigt, dass rStau1-EGFP zusammen mit FLAG-rNuc präzipitiert wurde. Um zu überprüfen, ob die Proteine auch ohne spezifischen Antikörper präzipitiert werden und beispielsweise mit der Matrix interagieren, wurde an Stelle des FLAG-Antikörpers Kaninchen-IgG eingesetzt. Dabei konnte keines der beiden Proteine im Präzipitat nachgewiesen werden (Abb. 12B). Dieses Ergebnis zeigt, dass die rekombinant exprimierten Proteine rStau1-EGFP und FLAG-rNuc im Cytoplasma transfizierter HEK293-Zellen miteinander assoziieren.

Um den Bereich der Assoziation einzugrenzen, wurden zwei EGFP-Expressionsvektoren hergestellt, die unterschiedliche Bereiche von Nucleolin kodieren (Abb. 12A). Während das Fusionsprotein rNuc₁₋₃₁₀-EGFP den N-terminalen Teil einschließlich des Kernlokalisierungssignals (NLS) umfasst, enthält das Fusionsprotein rNuc₃₀₉₋₇₁₃-EGFP die RRM-Domänen und die C-terminale RGG-Box. Jedes der beiden EGFP-Fusionsproteine wurde zusammen mit FLAG-rStau1 in HEK293-Zellen koexprimiert, und es wurde eine Immunpräzipitation mit Anti-FLAG Antikörper durchgeführt. Während FLAG-rStau1 und rNuc₃₀₉₋₇₁₃-EGFP im Präzipitat detektiert wurden (Abb. 12D), war rNuc₁₋₃₁₀-EGFP im Präzipitat nicht nachweisbar (Abb. 12C). In Kontrollansätzen mit Kaninchen-IgG wurde keines der Proteine präzipitiert. Demnach sind die vier RRM-Domänen und die RGG-Domäne von Nucleolin für die Assoziation mit rStau1 ausreichend. Der isolierte N-Terminus von Nucleolin, der keine RNA-Bindedomänen enthält, bindet nicht an rStau1.

Um zu klären, welcher Bereich von rStau1 für die Assoziation mit Nucleolin benötigt wird, wurde ein Expressionsvektor verwendet, der eine verkürzte rStau1-Variante kodiert, die ausschließlich den Bereich von dsRBD2 bis einschließlich dsRBD3 beinhaltet (pCMV-RBD2/3). Mit diesem Vektor transfizierte Zellen exprimieren ein entsprechendes FLAG-Fusionsprotein. Die in kotransfizierten HEK293-Zellen exprimierten Proteine FLAG-RBD2/3 und Nuc₃₀₉₋₇₁₃-EGFP konnten mit Anti-FLAG-Agarose kopräzipitiert werden (Abb. 12E). Demnach sind die RNA-Bindedomänen beider Proteine an ihrer cytoplasmatischen Assoziation in HEK293-Zellen beteiligt.

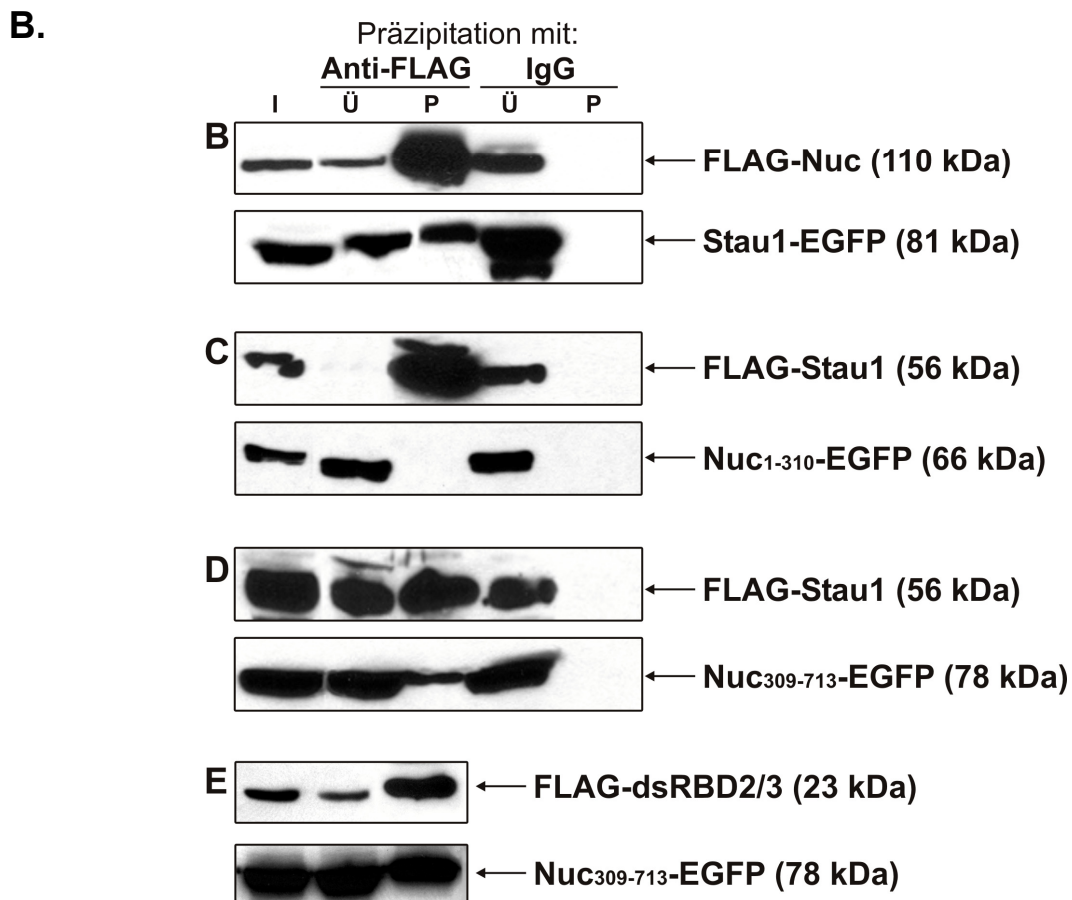
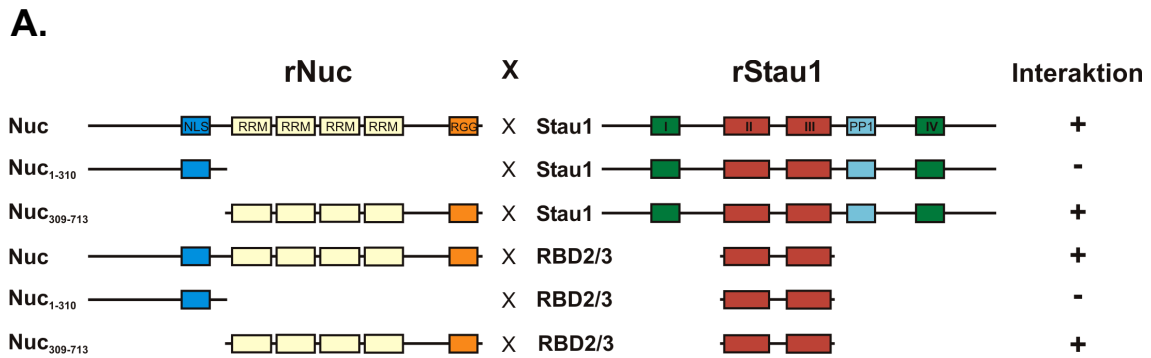


Abb. 12: Immunpräzipitation von rStau1 und rNucleolin aus transfizierten HEK293-Zellen

A. Schematische Darstellung verwendeter Nucleolin- und Stau1-Varianten. Die Tabelle gibt an, welche Nucleolin-Formen mit dem vollständigen rStau1 oder mit dsRBD2/3 kopräzipitiert wurden (+). **B-E.** Die aufgeführten Proteine wurden in HEK293-Zellen exprimiert und mit Anti-FLAG Antikörper präzipitiert. Lysate (I), Überstände (Ü) und Präzipitate (P) wurden mittels Western Blot analysiert. Die Detektion der Fusionsproteine erfolgte durch Verwendung spezifischer Antikörper gegen EGFP (Anti-GFP) und das FLAG-Epitop (Anti-FLAG).

3.4 Stau1-RNP-Komplexe enthalten intakte Ribosomen

Der Nachweis ribosomaler Komponenten, sowohl der kleinen als auch der großen Untereinheit, in gereinigten rStau1-PDZ-Komplexen, deutet auf eine Assoziation von rStau1 mit intakten Ribosomen hin. Um diese Annahme zu untermauern, wurde aus dem Ausgangsmaterial und dem Präzipitat einer rStau1-PDZ-Affinitätsreinigung RNA isoliert und in einem Agarosegel analysiert (Abb. 13). Sowohl im Ausgangsmaterial als auch in gereinigten rStau1-PDZ-Komplexen sind die ribosomalen RNA-Moleküle von 28S und 18S erkennbar. Zusammengenommen deutet die Kopräzipitation von ribosomalen Proteinen und ribosomalen RNA-Molekülen darauf hin, dass Stau1-Komplexe intakte Ribosomen beinhalten.

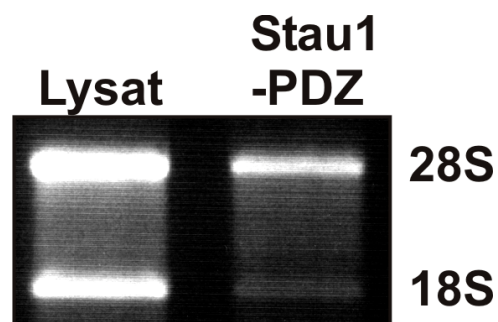


Abb. 13: Kopräzipitation ribosomaler RNA

In HEK293-Zellen wurden rStau1-PDZ rekombinant exprimiert. Nach Lyse in RIPA-Puffer wurde mit GKAP-Sepharose präzipitiert und RNA aus dem Präzipitat sowie dem Lysat isoliert. Die RNA wurde in einem 1,2%igen Agarosegel aufgetrennt und durch die Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Zu sehen sind die Banden der 28S und 18S ribosomalen RNA-Moleküle.

3.5 Stau1 kofraktioniert mit intakten Ribosomen und Polysomen

Für eine weiterführende Charakterisierung von Stau1-RNP-Komplexen wurde die Proteinverteilung in einem Sucroседichtegradienten untersucht. Durch Zentrifugation in einem Sucrosegradienten können Zellbestandteile unterschiedlicher Massen und Dichte aufgetrennt werden. Isoliert vorliegende Proteine verbleiben in Regionen geringer Sucroседichte, während sich größere Komplexe aus Proteinen und Nukleinsäuren in Bereiche höherer Dichte bewegen.

Ein aus HEK293-Zellen hergestelltes Rohlysat wurde in einem 5-30%igen Sucrosegradienten aufgetrennt. Nach Ultrazentrifugation wurden Fraktionen des Gradienten gesammelt. Aus jeder Fraktion wurde RNA isoliert, um anhand der ribosomalen RNA-Moleküle die Verteilung von isolierten ribosomalen Untereinheiten sowie intakter Ribosomen und Polysomen zu ermitteln. Wie in Abbildung 14 ersichtlich ist, wurde in den oberen fünf Fraktionen keine ribosomale RNA detektiert. In den Fraktionen 6 bis 9 konnte nur die ribosomale RNA der kleinen 40S Untereinheit nachgewiesen werden. Ab Fraktion 11 wurden beide ribosomalen RNA-Moleküle detektiert, was auf das Vorliegen intakter Ribosomen und Polysomen hindeutet. Diese Beobachtungen konnten mit Western Blot Analysen bestätigt werden. Übereinstimmend mit den Befunden aus dem RNA-Profil konnte S6 als Protein der kleinen ribosomalen Untereinheit in den Fraktionen 6 bis 22 nachgewiesen werden. Das ribosomale Protein P0 wurde zunächst in den ersten fünf Fraktionen detektiert, in denen lösliche cytosolische Proteine fraktionieren. Diese Beobachtung stimmt mit früheren Untersuchungen überein, nach denen das Protein P0 nicht nur als Ribosomen-gebundenes Protein existiert, sondern auch frei im Cytoplasma vorkommt (Tsurugi & Ogata, 1985). Weiterhin wurde P0 zusammen mit L7a und S6 in den Fraktionen 11 bis 22 detektiert, was auf das Vorliegen von intakten Ribosomen und Polysomen hindeutet. Stau1 wurde fast ausschließlich in den Fraktionen 11 bis 22 detektiert und war in den ersten zehn Fraktionen nur in Spuren nachzuweisen. Die Verteilung ribosomaler Proteine und RNA zeigt, dass Ribosomen in den Fraktionen 11 bis 14 sowie 20 bis 22 in besonders hoher Konzentration vorkommen, während sie in den Fraktionen 15 bis 20 in geringerer Anzahl vorliegen. Im Unterschied dazu liegt Stau1 in den Fraktionen 11 bis 22 in etwa gleichbleibender Konzentration vor. Zusammengefasst zeigen die Daten, dass Stau1 in größeren Komplexen gebunden ist und nicht als freies cytosolisches Protein vorkommt. Dabei kofraktioniert Stau1 nur mit intakten Ribosomen und nicht mit isolierten Untereinheiten. Weiterhin scheint Stau1 eine Komponente von mindestens zwei Komplexen zu sein, wovon eine Komplexart signifikante Mengen an intakten Ribosomen und Polysomen beinhaltet.

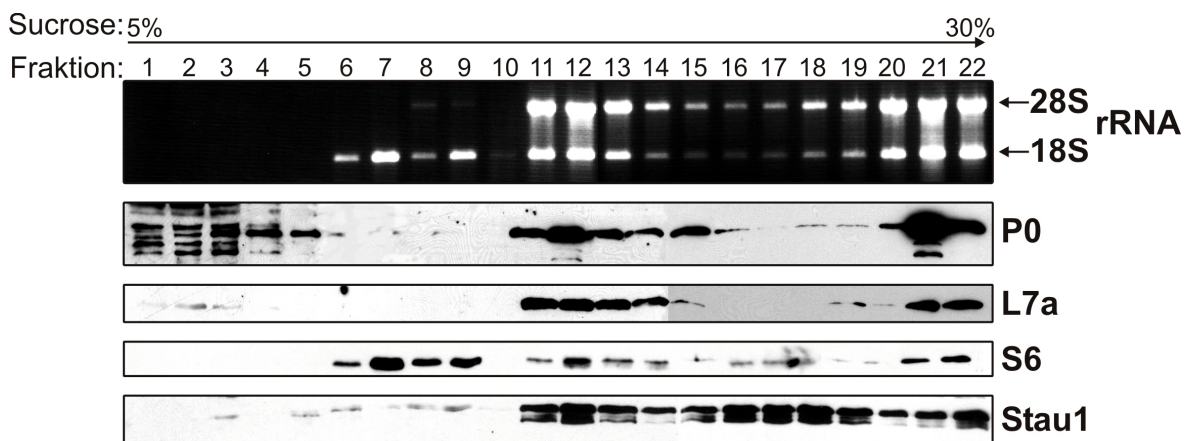


Abb. 14: Verteilung von Stau1 im 5-30%igen Sucrosegradienten

Aus den einzelnen Fraktionen isolierte RNA wurde in einem 1,2%igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Zu sehen sind die ribosomalen RNA-Moleküle von 28S und 18S. In Western Blot Analysen wurden die ribosomalen Proteine P0, L7a, S6 und Stau1 mit spezifischen Antikörpern detektiert. Die Ultrazentrifugation wurde bei 200.000 x g für 2h durchgeführt.

Um zu überprüfen, ob die Kofraktionierung von Stau1 mit Ribosomen tatsächlich auf eine Assoziation hindeutet, wurde in einem Kontrollexperiment HEK293-Rohlysat mit EDTA behandelt, was die Dissoziation der ribosomalen Untereinheiten bewirkt. Nach der Auftrennung des EDTA-behandelten Rohlyrats in einem 5-30%igen Sucrosegradienten wurden die Fraktionen gesammelt und wie bereits beschrieben analysiert. Anhand der Verteilung der ribosomalen RNA-Moleküle ist zu erkennen, dass die Ribosomen durch die EDTA-Behandlung in ihre Untereinheiten zerfallen sind. Auch die schweren Ribosomen-enthaltenden Komplexe am Boden des Gradienten waren nicht mehr nachzuweisen (Abb. 15). Während in den oberen sechs Fraktionen keine ribosomale RNA erkennbar ist, enthalten die Fraktionen 7 bis 11 ausschließlich die kleine ribosomale Untereinheit und die Fraktionen 12 bis 17 die große Untereinheit. In den unteren vier Fraktionen konnten nur noch sehr geringe Mengen an 28S rRNA detektiert werden. Western Blot Analysen zeigen, dass Stau1 in sehr hoher Konzentration mit den ribosomalen Proteinen P0 und L7a kofraktioniert. Im Unterschied zu L7a wurden Stau1 und P0 ebenfalls in geringeren Konzentrationen in den unteren vier Fraktionen nachgewiesen. Die hohe Konzentration der Proteine am Boden des

Gradienten ist nach der EDTA-Behandlung nicht mehr erkennbar. Des weiteren scheint durch EDTA ein Stau1-Komplex entstanden zu sein, der mit der kleinen Untereinheit und P0 in den Fraktionen 7 bis 11 kofraktioniert. Dabei ist die Konzentration von Stau1 und P0 in den Fraktionen 8 und 9 am höchsten.

Die Ergebnisse zeigen den teilweisen Zerfall der großen Ribosomen-enthaltenden Komplexe, der gleichzeitig eine Verschiebung von Stau1 aus Fraktionen hoher Sucrosekonzentration in Fraktionen geringerer Dichte bewirkt. Dies deutet darauf hin, dass Stau1 mit Ribosomen-enthaltenden RNP-Komplexen assoziiert ist.

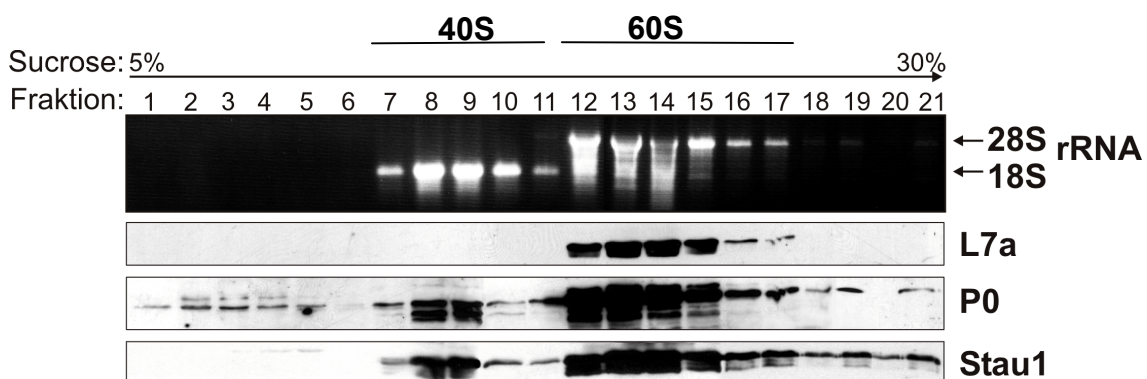
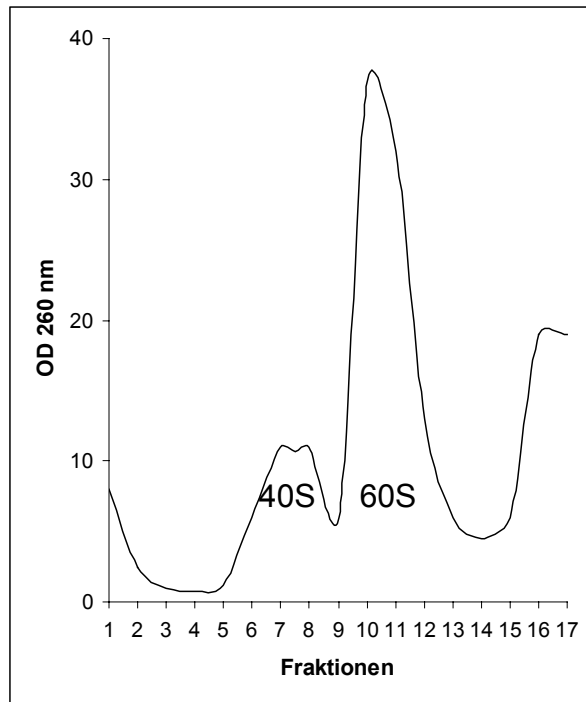


Abb. 15: Freisetzung von Stau1 aus Ribosomen-enthaltenden RNP-Komplexen

Komponenten eines EDTA-behandelten HEK293-Extrakts wurden in einem 5-30%igen Sucrosegradienten aufgetrennt. Aus den einzelnen Fraktionen isolierte RNA wurde in einem 1,2%igen Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. In Western Blot Analysen wurden die ribosomalen Proteine P0 und L7a sowie Stau1 mit spezifischen Antikörpern detektiert. Zur besseren Trennung der dissoziierten Untereinheiten, wurde der Gradient 4h bei 200.000 x g zentrifugiert.

Salzkonzentration alleine schon eine Dissoziation von Stau1 und FMRP von intakten Ribosomen oder deren isolierten Untereinheiten.

A.



B.

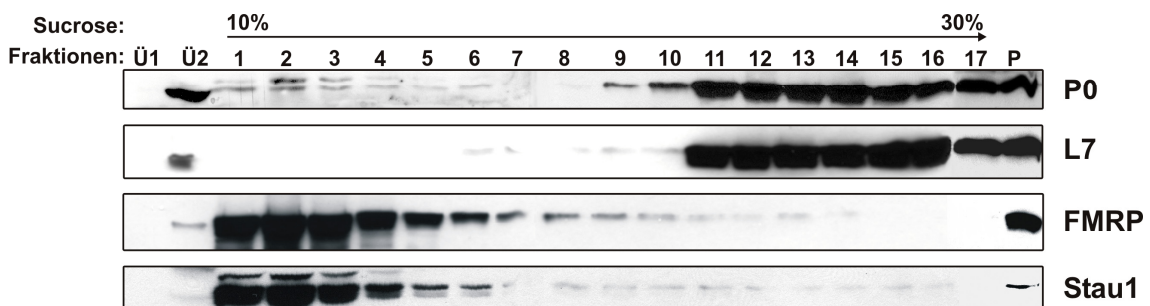


Abb. 16: Sucrosegradient Puromycin-behandelter Polysomen

A. Das Absorptionsspektrum wurde mit einem Durchflussphotometer bei 260 nm gemessen. Die Fraktionen wurden mit einem Fraktionssammler in gleichmäßigen Zeitabständen gesammelt. **B.** Western Blot mit spezifischen Antikörpern zur immunologischen Detektion der Proteine P0, L7a, FMRP und Stau1 in den Überständen der Zentrifugation zur Herstellung der Polysomenfraktion (Ü1 und Ü2), den Fraktionen des linearen Sucrosegradienten 1 bis 17 und dem Sediment am Boden des Gradienten (P).

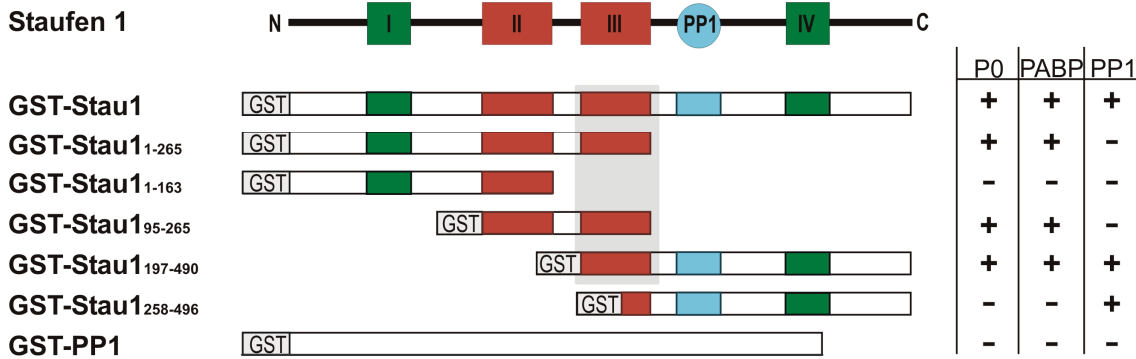
Um zu analysieren, ob Stau1 mit den isolierten ribosomalen Untereinheiten assoziiert ist, wurde ein Puromycin-behandelter Zellextrakt in einem Sucrosegradienten untersucht. Das Antibiotikum Puromycin ist ein Analogon der endständigen Aminoacyladenosingruppe einer tRNA. Es bindet an die A-Stelle des Ribosoms, blockiert den Eintritt der Aminoacyl-tRNA und hemmt die ribosomale Proteinsynthese durch vorzeitige Freisetzung unvollständiger Polypeptidketten. Die Folge ist eine Dissoziation der beiden ribosomalen Untereinheiten. Eine aus HEK293-Zellen hergestellte Polysomen-Fraktion wurde mit Puromycin behandelt und anschließend in einem 10-30%igen Sucrosegradienten aufgetrennt. Nach der Ultrazentrifugation wurden die Fraktionen mit Hilfe eines Gradienten-Saugers gesammelt. Dabei zeigte eine kontinuierliche Messung der optischen Dichte bei 260 nm, dass die kleine ribosomale Untereinheit in den Fraktionen 5 bis 9 vorliegt, während die große ribosomale Untereinheit in den Fraktionen 9 bis 14 zu finden ist. In Fraktion 16 und 17 ist ein erneuter Anstieg zu beobachten, der durch die Sedimentation nicht-ribosomaler RNP-Komplexe zu erklären ist (Abb. 16A). In Western Blot Analysen wurde die Verteilung der ribosomalen Proteine P0 und L7a, sowie die von Stau1 und FMRP untersucht (Abb. 16B). Das RNA-Bindeprotein FMRP assoziiert über die 60S Untereinheit mit Ribosomen und diente in diesem Experiment als Kontrollprotein (Siomi *et al.*, 1996). Die ribosomalen Proteine P0 und L7a waren in den Fraktionen 11 bis 17, sowie im Sediment am Boden des Gradienten sehr stark angereichert. P0 ist außerdem im Überstand der Polysomen-Fraktion erkennbar, was das frei im Cytoplasma vorkommende Protein widerspiegelt. Die Proteine Stau1 und FMRP wurden in hoher Konzentration in den oberen sechs Fraktionen nachgewiesen. Im Unterschied zu den Fraktionen 7 bis 17, in denen nur noch Spuren der beiden Proteine detektiert wurden, war im Sediment wieder eine höhere Konzentration beider Proteine erkennbar. Demnach werden Stau1 und FMRP bei Trennung der ribosomalen Untereinheiten aus Ribosomen-enthaltenden Komplexen freigesetzt. Diese Verteilung von FMRP widerspricht den Befunden früherer Untersuchungen, nach denen das Protein an die große ribosomale Untereinheit bindet (Siomi *et al.*, 1996). Allerdings wurde in dem hier durchgeführten Gradienten eine hohe Salzkonzentration von 500 mM NaCl verwendet, um eine Reassoziierung der ribosomalen Untereinheiten nach der Puromycin-Behandlung zu verhindern. Möglicherweise bewirkt die hohe

3.6 Stau1 interagiert mit dem ribosomalen Protein P0

Die Ergebnisse der Affinitätsreinigung und der Sucrosegradienten sprechen für eine Assoziation von Stau1 mit intakten Ribosomen. In diesem Zusammenhang war die Identifizierung des ribosomalen Proteins P0 von besonderem Interesse. Das Phosphoprotein P0 ist neben P1 und P2 Bestandteil des sogenannten ribosomalen Stiels (*ribosomal stalk*), der seitlich aus der großen Untereinheit herausragt. Die Proteine des Stiels binden erst am Ende der Ribosomenreifung im Cytoplasma an das Ribosom und kommen sowohl Ribosomen-assoziiert als auch frei im Cytoplasma vor. Zudem spielt der Stiel unter anderem durch die Interaktion mit Elongationsfaktoren eine wichtige Rolle bei der Translation.

Um eine mögliche Interaktion zwischen Stau1 und dem ribosomalen Protein P0 zu untersuchen, wurden *GST-pulldown* Experimente durchgeführt. Zur Herstellung der GST-Fusionsproteine wurden unterschiedliche Stau1-cDNA-Fragmente in den Vektor pGEX2T kloniert. Die einzelnen Stau1-Varianten enthalten unterschiedliche Abschnitte des Proteins, in denen die dsRNA-Bindedomänen mit dsRBD1 bis dsRBD4 bezeichnet werden (Abb. 17A). Die gereinigten und an Gluthation-Sepharose gekoppelten rekombinanten GST-Stau1-Fusionsproteine wurden für den *pulldown* mit Proteinextrakt inkubiert, der aus einem adulten Rattengehirn hergestellt wurde. Nachfolgend wurde die Bindung von P0, PABP, PP1 α und EF1 α im Western Blot analysiert (Abb. 17B). P0 und PABP assoziierten mit dem vollständigen Stau1 (GST-Stau1) und den Varianten mit dsRBD1 bis 3 (GST-Stau1₁₋₂₆₅), dsRBD2 und 3 (GST-Stau1₉₅₋₂₆₅) sowie dsRBD3 und 4 (GST-Stau1₁₉₇₋₄₉₀). Dagegen waren der N-Terminus von Stau1 bis einschließlich dsRBD2 (GST-Stau1₁₋₁₆₃) und der C-Terminus mit unvollständiger dsRBD3 (GST-Stau1₂₅₈₋₄₉₆) nicht in der Lage, P0 und PABP zu binden. Die Protein-Phosphatase 1 interagiert nur mit den Fusionsproteinen, in denen die in einer früheren Untersuchung identifizierte PP1-Bindesequenz an Position 299-303 (Monshausen *et al.*, 2001) enthalten war (GST-Stau1, GST-Stau1₁₉₇₋₄₉₀ und GST-Stau1₂₅₈₋₄₉₆). Weder das ribosomale Protein P0 noch PABP oder PP1 wurden von GST allein oder als Fusionsprotein mit PP1 aus dem Gehirnextrakt präzipitiert. Außerdem interagiert keines der verwendeten GST-Fusionsproteine mit dem Elongationsfaktor EF1 α . Demnach scheint die dsRBD3 essentiell an einer Interaktion zwischen Stau1 und P0 beteiligt zu sein.

A.



B.

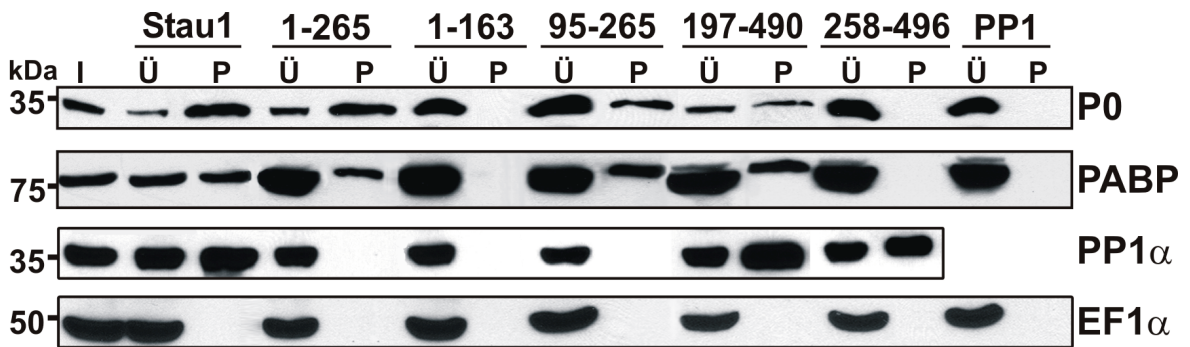


Abb. 17: GST-pulldown Experimente

A. Schematische Darstellung verwendeter GST-Fusionsproteine. Die Tabelle gibt an, welche Staufen-Fragmente die Proteine P0, PABP und PP1 gebunden haben (+). **B.** Das Ausgangsmaterial (I) sowie Überstände (Ü) und Präzipitate (P) wurden im Western Blot analysiert und P0, PABP, PP1 α und EF1 α wurden mit spezifischen Antikörpern detektiert.

3.6.1 Koexpression von Stau1 und P0 in HEK293-Zellen und Hippocampus-Neuronen

Um die Assoziation von Stau1 und P0 näher untersuchen zu können, wurden HEK293-Zellen und Hippocampus-Neurone mit zwei Expressionsvektoren transfiziert. Der eine dient der Expression von FLAG-rStau1, und der andere führt in eukaryotischen Zellen zur Bildung eines EGFP-rP0-Fusionsproteins. Die subzelluläre Verteilung beider Proteine wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. In HEK293-Zellen wurden die Proteine sowohl in Kombination (Abb. 18) als auch unabhängig voneinander in den Zellen exprimiert (ohne Abbildung). In beiden Fällen konnte für FLAG-rStau1 und EGFP-rP0 eine cytoplasmatische Lokalisierung beobachtet werden. Die Überlagerung zeigt eine weitestgehende Kolo-kalisierung der Proteine.

EGFP-rP0 + FLAG-rStau1

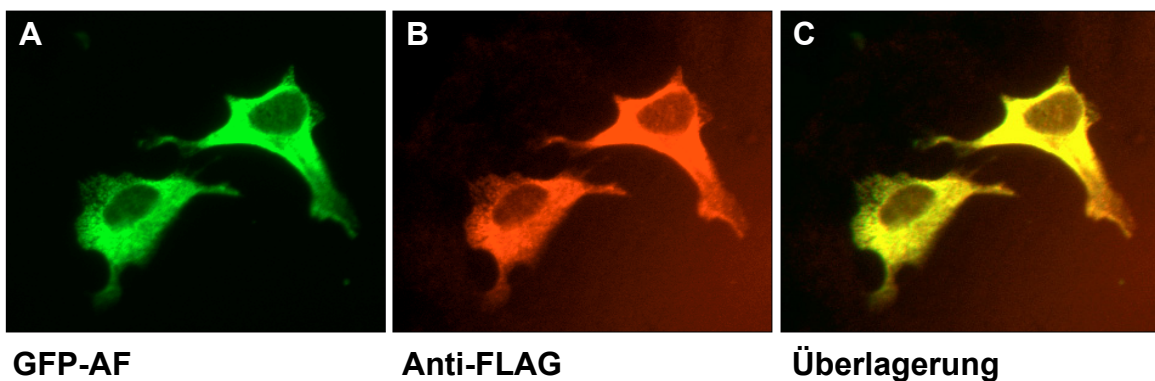


Abb. 18: Lokalisierung von EGFP-rP0 und FLAG-rStau1 in HEK293-Zellen

In HEK293-Zellen wurden FLAG-rStau1 und EGFP-P0 koexprimiert. Von links nach rechts ist die Verteilung von EGFP-rP0 (A), FLAG-rStau1 (B) und eine Überlagerung (C) der beiden Aufnahmen abgebildet. Die Detektion von FLAG-rStau1 erfolgte über einen primären Antikörper gegen das FLAG-Epitop und einem entsprechenden rot-fluoreszierenden Sekundärantikörper (Alexa[®]546, rot). EGFP-rP0 wurde über die Autofluoreszenz der EGFP-Domäne nachgewiesen (GFP-AF, grün).

In kotransfizierten Hippocampus-Neuronen konnte eine somatodendritische Lokalisierung beider Proteine beobachtet werden (Abb. 19 A-C). Die stärkere Vergrößerung der Dendriten zeigt eine granuläre Verteilung beider Proteine (Abb. 19 C.I-III), wobei die Stau1-Konzentration in distalen Bereichen geringer wird. Bei einer Überlagerung der Aufnahmen erkennt man, dass beide Proteine

teilweise kolokalisieren (Abb. 19 C.III). Stau1 und P0 sind demnach überwiegend cytoplasmatisch lokalisiert und kommen gemeinsam in Partikeln in Dendriten vor.

EGFP-rP0 + FLAG-rStau1

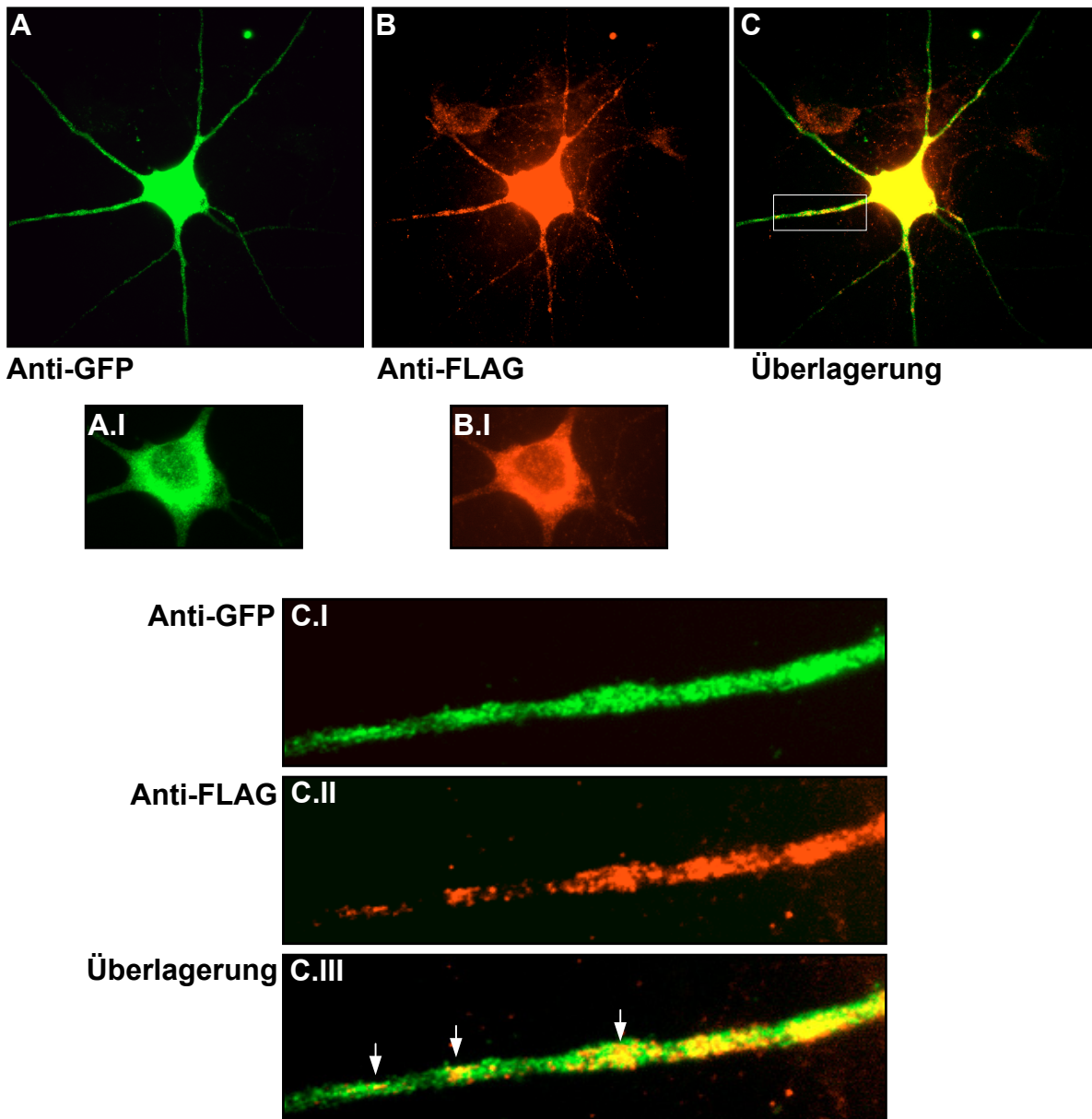


Abb. 19: Kolokalisierung von EGFP-rP0 und FLAG-rStau1 in Hippocampus-Neuronen

Kultivierte Ratten-Hippocampus-Neurone wurden am siebten Tag nach der Präparation mit den entsprechenden Expressionsvektoren transfiziert und weitere sieben Tage später fixiert. EGFP-rP0 (A, A.I, C.I) wurde mit Hilfe eines Anti-GFP Antikörpers und einem grün-fluoreszierenden Anti-Kaninchen Sekundärantikörper (Alexa[®]488, grün) detektiert. Die Detektion von Flag-rStau1 (B, B.I, C.II) erfolgte unter Verwendung eines Anti-FLAG Antikörpers und eines Anti-Maus Sekundärantikörpers (Alexa[®]546, rot). Die Pfeile markieren dendritisch lokalisierte Partikel, in denen die Proteine kolokalisieren (C und C.III; gelb).

3.6.2 Assoziation von rStau1 und rP0 in transfizierten HEK293-Zellen

Um die bisherigen Befunde über eine mögliche *in vivo* Interaktion von Stau1 und P0 zu untermauern, wurden Koimmunopräzipitationen mit Extrakten transfizierter HEK293-Zellen durchgeführt. Zelllysat, welches die rekombinanten Fusionsproteine FLAG-rStau1 und EGFP-rP0 enthielt, wurde mit einem Anti-FLAG-Antikörper inkubiert, und die Präzipitation im Western Blot analysiert. Abbildung 19 zeigt, dass EGFP-rP0 zusammen mit FLAG-rStau1 präzipitiert werden konnte. Zur Kontrolle der Interaktionsspezifität zwischen EGFP-rP0 und FLAG-rStau1 wurde zusätzlich untersucht, ob EGFP-rP0 mit FLAG-hnRNPK interagiert. Während das rekombinante FLAG-hnRNPK mit dem Anti-Flag-Antikörper präzipitiert wurde, verblieb EGFP-rP0 im Überstand. Diese Ergebnisse zeigen, dass das ribosomale Protein P0 im Cytoplasma transfizierter HEK293-Zellen spezifisch mit Stau1 assoziiert.

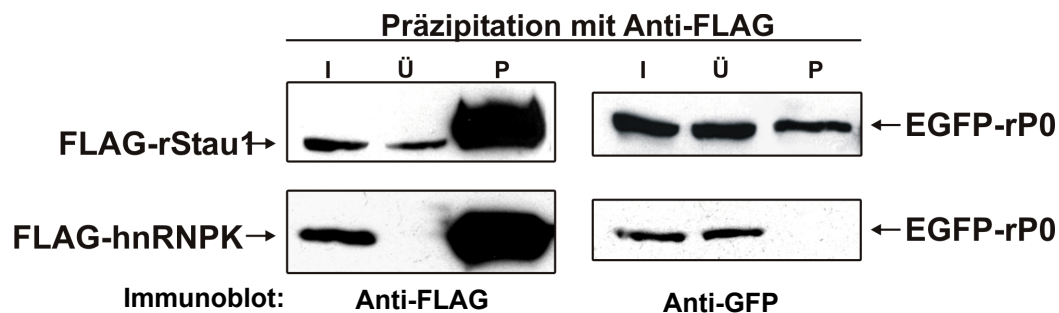


Abb. 20: Koimmunopräzipitation von EGFP-rP0 und FLAG-rStau1 aus transfizierten HEK293-Zellen

Die Proteine EGFP-rP0, FLAG-rStau1 und FLAG-hnRNPK wurden in den aufgeführten Kombinationen in HEK293-Zellen exprimiert. Nach der Lyse der Zellen mit IP-Puffer wurde eine Präzipitation mit Anti-FLAG-Agarose durchgeführt. Lysate (I), Überstände (Ü) und Präzipitate (P) wurden im Western Blot analysiert. Zur Detektion der FLAG-Fusionsproteine wurde ein Anti-FLAG Antikörper eingesetzt. Der Nachweis des EGFP-rP0 erfolgte mit einem Anti-GFP Antikörper.

3.7 Wirkung von Stau1 auf die Translation

Die Assoziation von Stau1 mit intakten Ribosomen und die mögliche Interaktion mit P0, deuten auf eine translationsregulatorische Funktion von Stau1 hin. In der *Drosophila*-Oocyte zeigten Micklem *et al.* (2000), dass Stau1 für die Translation der *oskar*-mRNA essentiell ist. Die dsRBD5 von Stau1 wird benötigt, damit die während des Transports reprimierte *oskar*-mRNA translatiert werden kann, wenn sie am posterioren Pol lokalisiert ist.

Zur Überprüfung der translationalen Kompetenz von Stau1-enthaltenden Komplexen wurde zunächst die Anwesenheit von eIF4E und eIF4G in Stau1-PDZ-Präzipitaten untersucht. Die beiden eukaryotischen Initiationsfaktoren sind essentiell für eine CAP-abhängige Translationsinitiation und stellen Schlüsselpunkte zur Translationsregulation dar (Sonenberg & Gingras, 1998). Stau1-PDZ und hnRNP-K-PDZ wurden aus unbehandelten und RNaseA-behandelten HEK293-Zelllysaten affinitätsgereinigt und eIF4E und eIF4G wurden im Western Blot mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen (Abb. 21). Beide Proteine waren ausschließlich in den Überständen erkennbar und wurden weder mit Stau1- noch mit hnRNP-K-PDZ präzipitiert. Die Abwesenheit der Initiationsfaktoren deutet darauf hin, dass die Stau1-Komplexe translational nicht aktiv sind.

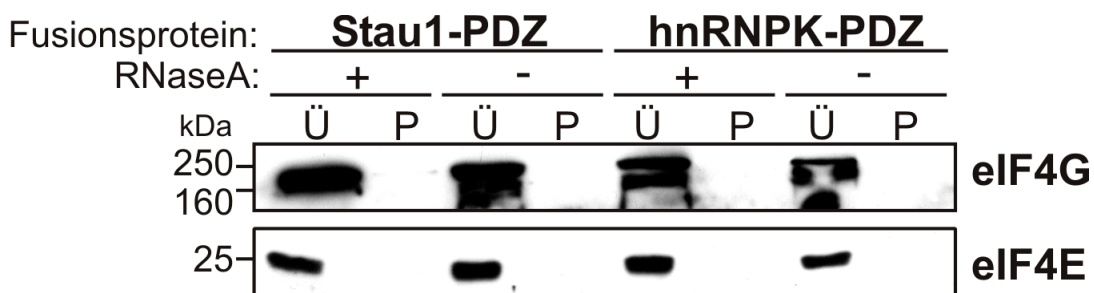


Abb. 21: Überprüfung der translationalen Kompetenz von Stau1-Komplexen

In HEK293-Zellen wurden Stau1-PDZ und hnRNP-K-PDZ exprimiert. Die Zellyse erfolgte in RIPA-Puffer mit (+) und ohne (-) RNaseA, die rekombinanten Proteine wurden mit GKAP-Sepharose präzipitiert. Überstände (Ü) und Präzipitate (P) wurden mit spezifischen Antikörpern gegen die eukaryotische Initiationsfaktoren eIF4E und eIF4G im Western Blot analysiert.

Um die Rolle von Stau1 in der Translationsregulation genauer zu untersuchen, wurden *in vitro* Translations-Reaktionen mit steigenden His-rStau1-Konzentrationen und konstanten mRNA-Mengen in Retikulocytenlysat aus Kaninchen durchgeführt. Da die endogenen Ziel-Transkripte von rStau1 noch nicht bekannt sind, wurden zwei unterschiedliche Luciferase-Transkripte als Reporter-mRNA-Moleküle eingesetzt. Beide beinhalten neben der kodierenden Region der Luciferase eine 5'-CAP-Struktur und einen Poly(A)-Schwanz, die für die Bindung von Translations-Initiationsfaktoren und zur Stabilisierung der mRNA benötigt werden. In einem Transkript wird die kodierende Region zusätzlich von der 5'- und 3'-UTR der Shank1-mRNA flankiert. Im Anschluss an die Reaktion wurde der Translationsertrag durch eine Luciferase-vermittelte Enzymreaktion ermittelt.

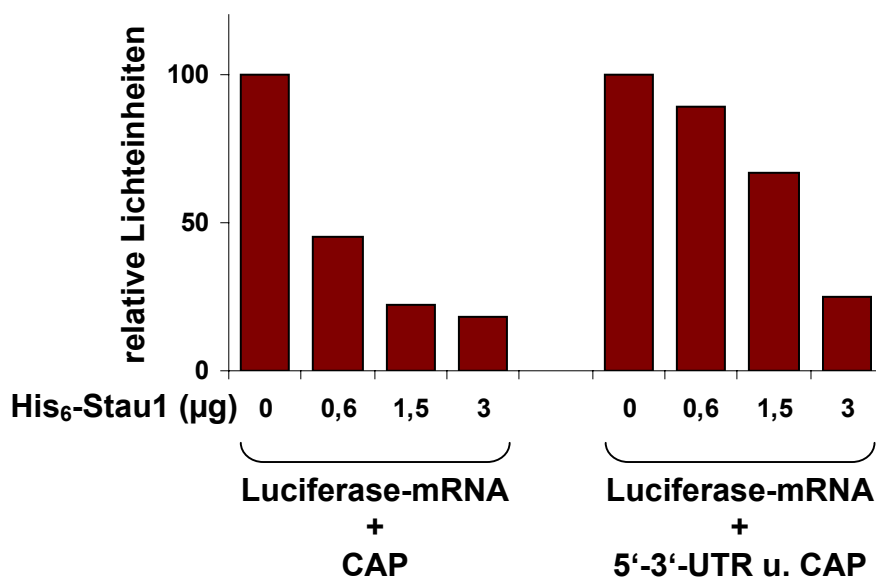


Abb. 22: Translations-Assay in Kaninchen-Retikulocytenlysat

In jeder Reaktion wurden 300 ng mRNA eingesetzt, die in Anwesenheit steigender His-Stau1-Konzentrationen in Retikulocytenlysat aus Kaninchen translatiert wurden. Die relative Lichtintensität [in %] jeder Reaktion wurde zu der Probe ohne Stau1 ins Verhältnis gesetzt.

Der Ansatz, in dem die Luciferase ohne Stau1-Zugabe translatiert wurde, diente dabei als Basiswert (100%). Wie Abbildung 22 zeigt, kam es in Anwesenheit von 0,6 µg rekombinantem Stau1 bereits zu einer über 50%igen Reduktion der

Luciferase-Translation. Im weiteren Verlauf ist zu erkennen, dass der inhibitorische Effekt mit steigender Stau1-Konzentration zunimmt. In Anwesenheit von 3 µg His-Stau1 wurden nur noch 18% translatiert. Die Translation des Luciferase-Transkripts mit 5'- und 3'-UTR von Shank1 wurde durch Stau1-Zugabe ebenfalls gehemmt. Der Effekt war im Vergleich zum ersten Transkript allerdings nicht so drastisch. Erst bei der höchsten His-rStau1-Konzentration wurde im Vergleich zum unbehandelten Ansatz eine 25%ige Reduktion beobachtet. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass das Einsetzen der 5'- und 3'-UTR von Shank1 in Abwesenheit von Stau1 bereits eine 90%ige Reduktion der Translation gegenüber dem kürzeren Transkript bewirkt. Der inhibitorische Effekt von Stau1 auf die Translation beider Reporter-Transkripte deutet auf eine translationsreprimierende Wirkung von Stau1 hin.

4 Diskussion

Sowohl bei der Differenzierung als auch bei der Anpassung differenzierter Zellen an Milieuveränderungen spielt RNA-Transport in Verbindung mit einer signalgesteuerten lokalen Translation eine wichtige Rolle bei der Bildung und Aufrechterhaltung von Zellpolaritäten. An der RNA-Lokalisierung sind zahlreiche *trans*-agierende RNA-Bindeproteine als Bestandteile von Ribonukleoprotein-Komplexen beteiligt. In *Drosophila* spielt das Doppelstrang-RNA-Bindeprotein Staufen als Bestandteil von RNP-Komplexen an der cytoplasmatischen Lokalisierung verschiedener Transkripte eine zentrale Rolle (St Johnston, 1995; Li *et al.*, 1997; Broadus *et al.*, 1998). Die zwei Säuger-Orthologe Stau1 und Stau2 sind in Neuronen somatodendritisch lokalisiert und scheinen als Bestandteil großer RNP-Komplexe am dendritischen RNA-Transport entlang von Mikrotubuli beteiligt zu sein (Köhrmann *et al.*, 1999; Krichevsky & Kosik, 2001; Tang *et al.*, 2001; Duchaine *et al.*, 2002; Mallardo *et al.*, 2003). Diese Befunde lassen vermuten, dass Mitglieder der Staufen-Familie gemeinsame evolutionär konservierte Funktionen haben. Die molekulare Zusammensetzung Staufen-enthaltender RNP-Komplexe war zu Beginn der vorliegenden Arbeit weitgehend unbekannt. Ziel dieser Arbeit war es daher, durch die Identifizierung individueller Komponenten von Stau1-enthaltenden RNP-Komplexen neue Erkenntnisse über den zellulären Wirkmechanismus von Säuger-Staufen bei der RNA-Lokalisierung zu erhalten.

Die endogenen Rattenproteine Stau1 und Stau2 sind in Hippocampus-Neuronen sowohl im Soma als auch in Dendriten lokalisiert und weisen in den Dendriten eine granuläre Verteilung auf. Beide Staufen-Varianten könnten demnach präferentiell im Cytoplasma verschiedene Schritte des RNA-Metabolismus regulieren. Zudem deutet die partikuläre Verteilung von Stau1 und Stau2 auf eine Assoziation mit größeren zellulären Komplexen hin. Parallel zu dieser Arbeit zeigten Duchaine *et al.* (2002), dass Stau1 und Stau2 in Dendriten Komponenten unterschiedlicher Komplexe sind, was darauf hindeutet, dass die beiden Staufen-Varianten im dendritischen RNA-Transport getrennte Funktionen haben.

Übereinstimmend mit der immunocytochemischen Beobachtung großer Stau1-Partikel entlang der Dendriten kultivierter Neurone zeigen Zellfraktionierungsexperimente, dass beide Stau1-Varianten im Rattengehirn fast ausschließlich in der Polysomenfraktion vorliegen. Eine Salzbehandlung der Polysomenfraktion macht deutlich, dass Moleküle beider Stau1-Varianten unterschiedlich stark mit RNP-Komplexen assoziiert sind. Übereinstimmend mit den cytochemischen Befunden von Duchaine *et al.* (2002) deutet diese Beobachtung darauf hin, dass Stau1 und Stau2 Komponenten unterschiedlicher Komplexe sind. Demnach könnten die Stau1-Varianten in unterschiedlichen RNP-Komplexen getrennte Funktionen ausüben und unabhängig voneinander wirken.

Hinweise auf die Funktion von Stau1 innerhalb von RNP-Komplexen könnten sich über die Identifizierung von individuellen Bindungspartnern ergeben. Im Rahmen dieser Arbeit wurden unter Verwendung einer neuen Methode Stau1-enhaltende Komplexe aus HEK293-Zellextrakt isoliert und die darin enthaltenen Proteine mittels Massenspektrometrie und Western Blot Analysen identifiziert. Die Bedingungen der Komplex-Reinigung wurden dabei so gewählt, dass zwischen RNA-vermittelten und RNA-unabhängigen Interaktionen unterschieden werden konnte.

Als ein RNA-vermittelter Interaktionspartner wurde das RNA-Bindeprotein Nucleolin sowohl massenspektrometrisch als auch immunologisch im Western Blot als Komponente Stau1-enhaltender Komplexe identifiziert. Für die RNA-abhängige Assoziation von Nucleolin mit Stau1-RNP-Komplexen sind RNA-Bindedomänen beider Proteine notwendig. Nucleolin ist überwiegend im Nukleolus lokalisiert und an verschiedenen Schritten der Biogenese von Ribosomen, einschließlich ihres nukleocytoplasmatischen Transports beteiligt (Ginisty *et al.*, 1999). Als Bestandteil cytoplasmatischer RNP-Komplexe (Borer *et al.*, 1989; Yurkova & Murray 1997; Ueno *et al.*, 2004) spielt Nucleolin bei unterschiedlichen Schritten des RNA-Metabolismus, wie RNA-Stabilisierung (Zaidi & Malter, 1995) und Translationsrepression (Yurkova & Murray, 1997), eine Rolle. Am cytoplasmatischen Transport retroviraler RNA von HIV-1 sind RNP-Komplexe beteiligt, in denen unabhängig voneinander sowohl Stau1 als auch Nucleolin als Bestandteile identifiziert wurden (Ueno *et al.*, 2004; Chatel-Chaix *et al.*, 2004).

Stau1 und Nucleolin könnten demnach durch die unabhängige Bindung eines gemeinsamen RNA-Moleküls in cytoplasmatische RNP-Komplexe rekrutiert werden, um den RNA-Transport und die Translation zu regulieren. Im Gegensatz zu der hier gezeigten RNA-vermittelten Assoziation mit Stau1 wurde Nucleolin als direkter Interaktionspartner des RNA-Bindeproteins FMRP identifiziert (Ceman *et al.*, 1999). Ohashi *et al.* (2002) zeigten, dass Stau1 zusammen mit FMRP, Pur α und dem Motorprotein Myosin Va in RNP-Komplexen des Mäusegehirns vorliegt. Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen wurde FMRP in dieser Arbeit in Western Blot Analysen als Bestandteil von Stau1-Komplexen nachgewiesen, wobei die Assoziation RNA-vermittelt ist. FMRP ist ebenso wie Nucleolin ein nukleocytoplasmatisches RNA-Bindeprotein (Ashley *et al.*, 1993; Siomi *et al.*, 1993) und kommt als Komponente von RNP-Komplexen im Cytoplasma verschiedener Zelltypen, einschließlich somatodendritischer Bereiche von Neuronen, vor. Innerhalb der RNP-Komplexe ist FMRP mit Polysomen assoziiert und an der Translationsregulation beteiligt (Eberhart *et al.*, 1996; Tamanini *et al.*, 1996; Darnell *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001; Schaeffer *et al.*, 2003). Als Bestandteil cytoplasmatischer Stau1-Komplexe könnte FMRP ebenso wie Nucleolin am Transport sowie der Translationsregulation gemeinsam gebundener Transkripte beteiligt sein. FMRP könnte aber auch über eine direkte Interaktion mit Nucleolin in den Stau1-Komplex rekrutiert werden und andere Transkripte binden als Nucleolin und Stau1.

Im Unterschied zu Nucleolin und FMRP wurde das nukleäre Protein NFAR (*nuclear factor associated with dsRNA*) massenspektrometrisch als RNA-unabhängige Komponente von Stau1-Komplexen identifiziert. Ebenso wie Stau1 ist NFAR ein dsRNA-Bindeprotein, das in vielen Zelltypen und Geweben exprimiert wird (Saunders & Barber 2003). Das überwiegend im Kern lokalisierte NFAR scheint an mehreren Schritten des RNA-Metabolismus wie Spleißen und Translation beteiligt zu sein (Saunders *et al.*, 2001).

Eine weitere nukleäre Stau1-RNP-Komponente ist das dsRNA-Bindeprotein RNA-Helikase A (RHA), das zur Familie der DEAD-Box Helikasen gehört (Lee & Hurwitz, 1992), die durch ihre katalytische Aktivität dsRNA entwinden und Sekundärstrukturen auflösen können (Zhang & Grosse, 1997). Als Bestandteil von Stau1-Komplexen könnte RHA durch Veränderung von Sekundärstrukturen an der Umgestaltung von RNP-Komplexen beteiligt sein (Krichevsky & Kosik, 2001).

Zudem besitzt die RNA-Helikase A eine Funktion beim nukleocytoplasmatischen RNA-Transport. RHA exportiert zusammen mit den zellulären Proteinen Sam68 und TAP (*Tip-associated protein*) retrovirale RNA aus dem Kern (Reddy *et al.*, 2000), wobei RHA und TAP an das *cis*-Element CTE (*constitutive transport element*) innerhalb der genomischen RNA binden (Tang *et al.*, 1997). Stau1 ist als cytoplasmatische RNP-Komponente am Transport retroviraler RNA von HIV-1 in die sich bildenden Viruspartikel beteiligt (Rongo *et al.*, 1995; Mouland *et al.*, 2000; Chatel-Chaix *et al.*, 2004). Entsprechend könnte die Assoziation der RHA mit Stau1-Komplexen eine mögliche Funktion der RNA-Helikase im cytoplasmatischen RNA-Transport widerspiegeln. Die DEAD-Box-Helikasen Me31B und Vasa regulieren in *Drosophila* zusammen mit Stau1 die Translation der *oskar*-mRNA (Rongo *et al.*, 1995; Webster *et al.*, 1997), was auf eine mögliche Beteiligung von RHA an translationsregulatorischen Mechanismen hindeutet.

Zusammengenommen spricht die Identifizierung mehrerer nukleocytoplasmatischer RNA-Bindeproteine wie Nucleolin, FMRP, NFAR und RHA in cytoplasmatischen Stau1-RNP-Komplexen für eine Initiation der RNA-Lokalisierung im Kern. In *Xenopus* binden die nukleären RNA-Bindeproteine hnRNPI (Cote *et al.*, 1999) und Vg1RBP/Vera (Schwartz *et al.*, 1992; Deshler *et al.*, 1997; Deshler *et al.*, 1998; Havin *et al.*, 1998) im Kern an die *Vg1* mRNA und bilden einen RNP-Komplex, der unter anderem den Kernexport ermöglicht. Nach dem Verlassen des Zellkerns bleiben sie als Bestandteile eines cytoplasmatischen *Vg1*-RNP-Komplexes in Assoziation mit Proteinen wie Stau1 und Kinesin an der weiteren Lokalisierung beteiligt (Kress *et al.*, 2004). Zudem können bereits einzelne Schritte der nukleären RNA-Prozessierung für eine korrekte cytoplasmatische Translokation entscheidend sein. Das Spleißen der *oskar* prä-mRNA an der ersten Exon-Exon-Verbindung ist für die posteriore Lokalisierung des Transkripts in der *Drosophila*-Oocyte notwendig (Hachet & Ephrussi 2004). Als Bestandteile des EJC (*exon-exon-junction complex*) binden die nukleären RNA-Bindeproteine Mago nashi und Y14 nach der Entfernung des Introns an die Exon-Exon-Verbindungen der *oskar*-RNA und vermitteln mit weiteren nukleären Proteinen den Kernexport. Nach dem Verlassen des Zellkerns bleiben beide Proteine mit der RNA assoziiert und sind zusammen mit Stau1 an der posterioren Lokalisierung beteiligt (Davis, 2004; van Eeden *et al.*, 2001).

Im Anschluss an den Kernexport werden cytoplasmatische *trans*-Faktoren rekrutiert, die unter anderem den aktiven intrazellulären Transport der RNP-Komplexe vermitteln. Die Assoziation der Staufen-Proteine mit dem Cytoskelett und die Identifizierung von Tubulin als Bestandteil cytoplasmatischer Stau1-Komplexe deuten auf eine Interaktion mit Mikrotubuli hin. Übereinstimmend mit diesen Befunden wurde in elektronenmikroskopischen Untersuchungen eine Anreicherung von Staufen in Dendriten entlang von Mikrotubuli beobachtet (Kiebler *et al.*, 1999; Monshausen *et al.*, 2001). Sowohl Stau1 als auch Stau2 kofraktionierten in Gelfiltrations-Experimenten mit Tubulin (Mallardo *et al.*, 2003). Die Säuger-Proteine beinhalten im Unterschied zu dem *Drosophila*-Protein eine Region mit Ähnlichkeit zur Mikrotubulus-Bindedomäne von MAP1B (Mikrotubulus-assoziiertes Protein 1B) (Zauner *et al.*, 1992), über die humanes Stau1 *in vitro* an Tubulin bindet (Wickham *et al.*, 1999). Demnach könnte Stau1 durch die Interaktion mit Tubulin RNP-Komplexe am Cytoskelett verankern. Zudem deutet die Präsenz des Motorproteins Kinesin in Stau1-Komplexen auf einen aktiven Transport zum Plus-Ende von Mikrotubuli. Demgegenüber wurde das zum Minus-Ende wandernde Motorprotein Dynein nicht als Bestandteil von Stau1-Komplexen identifiziert. Sowohl in Neuronen als auch in *Drosophila* spielen Mikrotubuli bei der Lokalisierung von Staufen-enthaltenden RNP-Komplexen eine wichtige Rolle. Die Hemmung des Mikrotubuli-Cytoskeletts blockiert die dendritische Lokalisierung rekombinant exprimierter Staufen-Proteine in Hippocampus-Neuronen (Kiebler *et al.*, 1999; Köhrmann *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2001) sowie die antero-posteriore Verteilung von *Drosophila*-Staufen (Ferrandon *et al.*, 1997). Übereinstimmend mit dem Befund einer Kinesin-Assoziation kofraktionieren 670 kDa große Stau1-enthaltende Komplexe aus Rattengehirnextrakt in Gelfiltrations-Experimenten mit Kinesin (Mallardo *et al.*, 2003). In *Drosophila*-Kinesin-Mutanten wird der Transport von *oskar*-mRNA und Staufen zum posterioren Pol der Oocyte blockiert (Brendza *et al.*, 2000), was auf einen Kinesin-abhängigen Transport entlang von Mikrotubuli hindeutet. Zudem wurde Kinesin in *Xenopus* als Komponente von Stau-enthaltenden RNP-Komplexen identifiziert, welche die *Vg1* mRNA zum vegetativen Pol der Froschoocyte transportieren (Yoon & Mowry, 2004). Diese übereinstimmenden Befunde aus unterschiedlichen Organismen deuten darauf hin, dass die Assoziation zwischen Stau-enthaltenden Komplexen und Kinesin ein konservierter

Mechanismus der cytoplasmatischen mRNA-Lokalisierung ist. Die zentrale Bedeutung von Kinesin für den Transport Stau1-enthaltender RNP-Komplexe in Neuronen wurde kürzlich durch eine Untersuchung von Kanai *et al.* (2004) deutlich. Sie identifizierten Stau1 als eine Komponente Kinesin-assoziiierter RNP-Komplexe, die aus murinem Gehirnextrakt isoliert wurden. Neben Stau1 enthielten diese Kinesin-RNP-Komplexe viele Proteine, die auch im rStau1-PDZ-Komplex identifiziert wurden, darunter Nucleolin, FMRP und DEAD-Box RNA-Helikasen. Die übereinstimmenden Befunde der unterschiedlichen Reinigungen und Zellsysteme sprechen für eine allgemeine regulatorische Funktion von Stau1 im cytoplasmatischen RNA-Transport. Entsprechend unterdrückt eine fehlende Stau1-Expression die dendritische Lokalisierung der 3'-UTR der α CaMKII-mRNA, was auf eine aktive Rolle von Stau1 beim RNA-Transport in Dendriten hindeutet (Kanai *et al.*, 2004).

Im Unterschied zu den murinen Kinesin-assoziierten RNP-Komplexen enthielten die hier aus humanen Zellen isolierten Stau1-Komplexe verschiedene ribosomale Proteine der kleinen und großen ribosomalen Untereinheit sowie die ribosomalen RNA-Moleküle 28S und 18S, was auf eine Assoziation mit intakten Ribosomen hindeutet. Übereinstimmend mit diesen Befunden kofraktionierte endogenes Stau1 in Sucrosegradienten mit Ribosomen. Dass Stau1 mit intakten Ribosomen und nicht mit den isolierten ribosomalen Untereinheiten assoziiert, wurde durch seine veränderten Fraktionierungseigenschaften bestätigt, die nach der *in vitro* Dissoziation von Ribosomen mit EDTA und Puromycin beobachtet wurden. Ein entsprechendes Fraktionierungsverhalten von Stau1 zeigten Luo *et al.* (2002) in Gradienten mit Extrakt aus COS-Zellen. Zusammen deuten die Befunde der PDZ-Reinigung und der Sucrosegradienten auf eine Assoziation zwischen Stau1 und intakten Ribosomen in cytoplasmatischen RNP-Komplexen hin. Entsprechendes zeigten Krichevsky und Kosik, die Stau1 und Ribosomen zusammen als Bestandteile großer RNP-Komplexe in Neuronen der Ratte identifizierten (Krichevsky & Kosik, 2001). An der Assoziation mit dem Ribosom ist die dsRBD3 von Stau1 beteiligt, die in GST-*pull-down* Experimenten für die Bindung des ribosomalen Proteins P0 essentiell ist. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung demonstrierten Luo *et al.* in Sucrosegradienten, dass die entsprechende dsRBD des humanen Stau1 für eine RNA-unabhängige

Ribosomen-Bindung benötigt wird (Luo *et al.*, 2002). Zudem sprechen die RNA-unabhängige Kopräzipitation in der PDZ-Reinigung und Koimmunpräzipitationen mit rekombinanten Proteinen für eine direkte Assoziation zwischen Stau1 und P0.

Das ribosomale Protein P0 ist Bestandteil eines Komplexes, der als flexibler Stiel seitlich aus der großen ribosomalen Untereinheit herausragt. Dieser ribosomale Stiel besteht aus P0 und den Proteinen P1 und P2. Letztere bilden zunächst ein Heterodimer, bevor sie über die Bindung an den C-Terminus von P0 mit dem Ribosom assoziieren. P0 selber interagiert mit dem ribosomalen Protein L12 und dem GTPase-Zentrum der 28S ribosomalen RNA (Egebjerg *et al.*, 1990; Gonzalo & Reboud, 2003). Der ribosomale Stiel interagiert direkt mit Elongationsfaktoren und ist essentiell für die Translationsaktivität des Ribosoms (Bargis-Surgey *et al.*, 1999). Im Unterschied zu den P-Proteinen assoziieren die anderen ribosomalen Proteine bereits im Nukleolus mit der ribosomalen RNA und gelangen anschließend in das Cytoplasma (Tschochner & Hurt, 2003). Die P-Proteine lagern sich erst im letzten Schritt der Ribosomen-Reifung, ein Prozess der im Cytoplasma stattfindet, an die große Untereinheit an (Boguszewska *et al.*, 2002). Sowohl P0 als auch P1 und P2 liegen als freie und Ribosomen-assoziierte Proteine im Cytoplasma vor (Tsurugi & Ogata, 1985; Gonzalo & Reboud, 2003). Es könnte demnach spekuliert werden, dass Stau1 im Cytoplasma an die P-Proteine bindet und zusammen mit ihnen mit dem Ribosom assoziiert. Zudem deutet die Assoziation von Stau1 mit P0 innerhalb eines cytoplasmatischen RNP-Komplexes auf eine mögliche translationsregulatorische Funktion von Stau1 hin.

Ein Mechanismus, der auf die Bildung des ribosomalen Stiels und damit auch auf die Translationsaktivität des Ribosoms Einfluss hat, ist die Regulation der Phosphorylierung. Eine Vielzahl ribosomaler Proteine, einschließlich der P-Proteine, werden *in vivo* phosphoryliert (Nusspaumer *et al.*, 2000). Die Bildung des ribosomalen Stiels am Ribosom wird über die Phosphorylierung der P-Proteine reguliert (Tchorzewski *et al.*, 2000). In diesem Zusammenhang sind Befunde einer früheren Untersuchung interessant, nach der rStau1 im Rattengehirn direkt mit der Protein-Phosphatase 1 (PP1) interagiert (Monshausen *et al.*, 2002). Entsprechend wurde PP1 auch in dieser Arbeit als Bestandteil der gereinigten Stau1-RNP-Komplexe identifiziert. Stau1 hat keinen regulatorischen

Einfluss auf die Aktivität von PP1 (Monshausen *et al.*, 2002), und bislang ist unklar, ob Stau1 selbst phosphoryliert wird und somit als Substrat für PP1 dienen könnte. Es könnte aber als ein cytoplasmatischer Faktor wirken, der PP1 in einzelne RNP-Komplexe rekrutiert, wodurch die Phosphatase mit spezifischen Substraten zusammengebracht wird (Ceulemans & Bollen, 2004). Demnach wäre es denkbar, dass die Rekrutierung von Stau1, PP1 und P0 in einen gemeinsamen Komplex, es PP1 ermöglicht, die Phosphorylierung der P-Proteine und somit die Bildung des ribosomalen Stiels sowie die Translationsaktivität des Ribosoms zu regulieren.

Neben der Ribosomen-Assoziation deutet die Anwesenheit des Poly(A)-Bindepoteins PABP (Kahvejian *et al.*, 2001; Mohr *et al.*, 2001) in Stau1-RNP-Komplexen auf eine Beteiligung an der Proteinsynthese oder die Bereitschaft zur Expression der im Komplex enthaltenen RNA-Moleküle hin. Für die Assoziation mit PABP ist die dsRBD3 von Stau1 essentiell. PABP ist ein multifunktionelles Proteine, dass bei der Regulation der RNA-Stabilität, des Transports und der Translation eine wichtige Rolle spielt (Dreyfuss *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu PABP wurden die für eine CAP-abhängige Translationsinitiation essentiellen eukaryotischen Initiationsfaktoren eIF4E und eIF4G nicht als Bestandteile von Stau1-RNP-Komplexen detektiert. Übereinstimmend mit diesen Befunden lagen die Initiationsfaktoren ebenfalls nicht in den von Krichevsky und Kosik biochemisch isolierten Stau1-enthaltenden RNP-Komplexen aus Cortex-Neuronen der Ratte vor (Krichevsky & Kosik, 2001). Die Abwesenheit der Initiationsfaktoren deutet darauf hin, dass Stau1-enthaltende Partikel als reine Transport- und Aufbewahrungskomplexe dienen könnten, die als Antwort auf intra- oder extrazelluläre Reize Transkripte und Ribosomen für eine lokale Translation freisetzen. Einige mRNA-Moleküle beinhalten eine interne Ribosomeneintrittsstelle (*internal ribosomal entry sites*; IRESs), durch die eine CAP-unabhängige Translationsinitiation stattfinden kann (Pinkstaff *et al.*, 2001). In diesem Fall wird die Translation der Transkripte während des Transports möglicherweise über andere Faktoren reprimiert. Hier konnte gezeigt werden, dass rekombinantes Stau1 *in vitro* eine translationsreprimierende Wirkung auf unterschiedliche Reportertranskripte hat. In *Drosophila*-Mutanten, denen die dsRBD5 von Stau1 fehlt, wird die *oskar*-mRNA zwar normal transportiert und posterior lokalisiert,

jedoch nicht translatiert (Micklethorn *et al.*, 2000). Da die dsRBD5 keine RNA bindet ist anzunehmen, dass ihre Funktion auf eine Protein-Protein-Interaktion zurückzuführen ist. Um die genaue Wirkungsweise einer Stau1-vermittelten Translationsregulation zu beschreiben, müssen allerdings weitere Experimente folgen. Möglicherweise ist wie in *Drosophila* die dsRBD5 von Staufen an der Regulation der Translation beteiligt.

Erst kürzlich veröffentlichten Villace *et al.* (2004) parallel zu dieser Arbeit eine Studie, in der sie hStau1-enhaltende RNP-Komplexe ebenfalls aus HEK293-Zellen isolierten und charakterisierten (Villace *et al.*, 2004). Sie identifizierten viele Proteine, die auch Bestandteile des rStau1-PDZ-Komplexes sind wie Nucleolin, RHA, hnRNPU, FMRP, PABP, Tubulin und Kinesin. Villace *et al.* benutzten die sogenannte TAP-Methode (Tandem Affinity Purification) mit zwei Reinigungsschritten. Stau1 wurde dafür mit einem Fusionsprotein aus zwei IgG-Bindedomänen des Protein A und einer Calmodulin-Bindedomäne fusioniert, die durch eine Erkennungssequenz der TEV-Protease verbunden sind. Im ersten Schritt bindet das Fusionsprotein über die IgG-Bindedomänen an IgG-Sepharose. Da diese starke Interaktion nur unter denaturierenden Bedingungen gelöst werden kann, wird der gebundene Komplex durch einen proteolytischen Verdau mit TEV-Protease eluiert. Im zweiten Schritt, der Bindung an Calmodulin-Sepharose, wird die TEV-Protease beseitigt und der Komplex durch EGTA-Zugabe nativ gelöst. Im Unterschied dazu benötigt die hier entwickelte Methode lediglich einen Reinigungsschritt und ist somit schneller und einfacher durchzuführen. Die hochaffine Interaktion zwischen PDZ-Domäne und GKAP-Peptid toleriert sogar Pufferbedingungen mit 1M NaCl. Zudem werden die hauptsächlich neuronalen Proteine Shank1 und GKAP, welche die Komponenten der Methode stellen, in HEK293-Zellen so gering exprimiert, dass die GKAP-Sepharose keine endogenen Proteine präzipitiert. Die hohe Spezifität der Reinigungsmethode mit GKAP-Sepharose zeigen zudem die in dieser Arbeit parallel gereinigten und analysierten Komplexe des strukturell nicht verwandten RNA-Bindeproteins hnRNPK und des neuronalen Proteins Sharpin. Die Reinigungen resultierten in individuellen Bandenmustern und belegen die hohe Spezifität der Methode. Im Allgemeinen stützen die übereinstimmenden Ergebnisse beider verwendeten

Reinigungsmethoden die mögliche generelle Funktion von Stau1 während des RNA-Transports und der Translationsregulation.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Bestandteile cytoplasmatischer Stau1-RNP-Komplexe identifiziert, darunter unterschiedliche nukleocytoplasmatische RNA-Bindeproteine (Nucleolin, FMRP, NFAR, RHA, PABP), die Cytoskelett-Komponente Tubulin, das Motorprotein Kinesin, verschiedene ribosomale Proteine und der bereits bekannte Stau1-Interaktionspartner PP1. Die Assoziation mit nukleocytoplasmatischen RNA-Bindeproteinen stützt die Hypothese, nach der die Bildung von RNP-Komplexen bereits im Kern beginnt. Die nukleären Proteine Nucleolin, NFAR und RHA könnten dabei an verschiedenen Schritten der nukleären RNA-Prozessierung sowie am nukleocytoplasmatischen Transport beteiligt sein. Sie bleiben nach dem Kernexport als Bestandteile des Komplexes erhalten und könnten demnach auch im Cytoplasma Funktionen haben, die der RNA-Stabilisierung, dem Transport und der Translationsregulation dienen. Im Cytoplasma vermittelt das RNA-Bindeprotein Stau1 möglicherweise in Verbindung mit Adaptorproteinen die Assoziation mit dem Motorprotein Kinesin, das den RNP-Komplex aktiv entlang von Mikrotubuli zum Bestimmungsort transportiert. Über eine Interaktion mit Tubulin könnten Stau1-Komplexe am Bestimmungsort verankert werden. Die in den Stau1-Komplexen enthaltenen intakten Ribosomen und die Anwesenheit der translationsregulierenden RNA-Bindeproteine PABP und FMRP lassen verschiedene Mechanismen der Translationskontrolle vermuten. Stau1 könnte über die Interaktion mit dem ribosomalen Protein P0 und der Rekrutierung der Protein-Phosphatase 1 eine translationsregulatorische Funktion ausüben.

Zum jetzigen Zeitpunkt sind verschiedene Komponenten Stau1-enthaltender RNP-Komplexe in Säugern bekannt. Genauere biochemische Analysen von Proteinen, die direkt mit Stau1 interagieren, könnten weitere Anhaltspunkte liefern, um den RNA-Transportmechanismus und die damit verbundene Funktion von Stau1 in Neuronen weiter aufzuklären. Die Identifizierung von in rStau1-RNP-Komplexen enthaltenen, dendritisch lokalisierten RNA-Molekülen wäre in diesem Zusammenhang ebenfalls von Interesse. Zudem könnte die Bedeutung von Stau1-vermitteltem RNA-Transport für die Gehirnfunktion anhand von Stau1 *knock out* Mäusen untersucht werden.

5 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(2):431-41.

Ashley, C. T., Jr., Wilkinson, K. D., Reines, D., Warren, S. T. (1993)."FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding." *Science* 262(5133):563-6.

Bargis-Surgey, P., Lavergne, J. P., Gonzalo, P., Vard, C., Filhol-Cochet, O., Reboud, J. P. (1999)."Interaction of elongation factor eEF-2 with ribosomal P proteins." *Eur J Biochem* 262(2):606-11.

Bashirullah, A., Cooperstock, R. L., Lipshitz, H. D. (1998)."RNA localization in development." *Annu Rev Biochem* 67:335-94.

Bassell, G. & Singer, R. H. (1997)."mRNA and cytoskeletal filaments." *Curr Opin Cell Biol* 9(1):109-15.

Bassell, G. J., Oleynikov, Y., Singer, R. H. (1999)."The travels of mRNAs through all cells large and small." *Faseb J* 13(3):447-54.

Bassell, G. J. & Singer, R. H. (2001)."Neuronal RNA localization and the cytoskeleton." *Results Probl Cell Differ* 34:41-56.

Berleth, T., Burri, M., Thoma, G., Bopp, D., Richstein, S., Frigerio, G., Noll, M., Nusslein-Volhard, C (1988)."The role of localization of bicoid RNA in organizing the anterior pattern of the Drosophila embryo." *Embo J* 7(6):1749-56.

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(10):1881-8.

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

Bloom, K. & Beach D. L., (1999)."mRNA localization: motile RNA, asymmetric anchors." *Curr Opin Microbiol* 2(6):604-9.

Boguszewska, A., Tchorzewski, M., Dukowski, P., Winiarczyk, S., Grankowski, N. (2002)."Subcellular distribution of the acidic ribosomal P-proteins from *Saccharomyces cerevisiae* in various environmental conditions." *Biol Cell* 94(3):139-46.

Borer, R. A., Lehner, C. F., Eppenberger, H. M., Nigg, E. A. (1989)."Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm." *Cell* 56(3):379-90.

- Brendza, R. P., Serbus, L. R., Duffy, J. B., Saxton, W. M (2000).**"A function for kinesin I in the posterior transport of oskar mRNA and Staufen protein." *Science* 289(5487):2120-2.
- Broadus, J., Fuerstenberg, S., Doe, C. Q. (1998).**"Staufen-dependent localization of prospero mRNA contributes to neuroblast daughter-cell fate." *Nature* 391(6669):792-5.
- Brugg, B. & Matus A. (1991).**"Phosphorylation determines the binding of microtubule-associated protein 2 (MAP2) to microtubules in living cells." *J Cell Biol* 114(4):735-43.
- Burgin, K. E., Waxham, M. N., Rickling, S., Westgate, S. A., Mobley, W. C., Kelly, P. T. (1990).**"In situ hybridization histochemistry of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in developing rat brain." *J Neurosci* 10(6):1788-98.
- Cao, Q. & Richter, J. D. (2002).**"Dissolution of the maskin-eIF4E complex by cytoplasmic polyadenylation and poly(A)-binding protein controls cyclin B1 mRNA translation and oocyte maturation." *Embo J* 21(14):3852-62.
- Ceman, S., Brown, V., Warren, S. T. (1999).**"Isolation of an FMRP-associated messenger ribonucleoprotein particle and identification of nucleolin and the fragile X-related proteins as components of the complex." *Mol Cell Biol* 19(12):7925-32.
- Ceulemans, H. & M. Bollen (2004).**"Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button." *Physiol Rev* 84(1):1-39.
- Chatel-Chaix, L., Clement, J. F., Martel, C., Beriault, V., Gagnon, A., DesGroseillers, L., Moulard, A. J. (2004).**"Identification of Staufen in the human immunodeficiency virus type 1 Gag ribonucleoprotein complex and a role in generating infectious viral particles." *Mol Cell Biol* 24(7):2637-48.
- Cote, C. A., Gautreau, D., Denegre, J. M., Kress, T. L., Terry, N. A., Mowry, K. L. (1999).**"A Xenopus protein related to hnRNP I has a role in cytoplasmic RNA localization." *Mol Cell* 4(3):431-7.
- Craig, A. M. & Banker, G. (1994).**"Neuronal polarity." *Annu Rev Neurosci* 17:267-310.
- Crino, P. B. & Eberwine, J. (1996).**"Molecular characterization of the dendritic growth cone: regulated mRNA transport and local protein synthesis." *Neuron* 17(6):1173-87.
- Darnell, J. C., Jensen, K. B., Jin, P., Brown, V., Warren, S. T., Darnell, R. B. (2001).**"Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function." *Cell* 107(4):489-99.
- Davis, I. (2004).**"A helicase that gets Oskar's message across." *Nat Cell Biol* 6(4):285-7.
- Deshler, J. O., Highett, M. I., Abramson, T., Schnapp, B. J. (1998).**"A highly conserved RNA-binding protein for cytoplasmic mRNA localization in vertebrates." *Curr Biol* 8(9):489-96.
- Deshler, J. O., Highett, M. I., Schnapp, B. J. (1997).**"Localization of Xenopus Vg1 mRNA by Vera protein and the endoplasmic reticulum." *Science* 276(5315):1128-31.

- Dreyfuss, G., Kim, V. N., Kataoka, N. (2002).**"Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry." *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(3):195-205.
- Duchaine, T., Wang, H. J., Luo, M., Steinberg, S. V., Nabi, I. R., DesGroseillers, L. (2000).**"A novel murine Staufen isoform modulates the RNA content of Staufen complexes." *Mol Cell Biol* 20(15):5592-601.
- Duchaine, T. F., Hemraj, I., Furic, L., Deitinghoff, A., Kiebler, M. A., DesGroseillers, L. (2002).**"Staufen2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles." *J Cell Sci* 115(Pt 16):3285-95.
- Eberhart, D. E., Malter, H. E., Feng, Y., Warren, S. T. (1996).**"The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals." *Hum Mol Genet* 5(8):1083-91.
- Eberwine, J., Belt, B., Kacharina, J. E., Miyashiro, K. (2002).**"Analysis of subcellularly localized mRNAs using in situ hybridization, mRNA amplification, and expression profiling." *Neurochem Res* 27(10):1065-77.
- Egebjerg, J., Douthwaite, S. R., Liljas, A., Garrett, R. A. (1990).**"Characterization of the binding sites of protein L11 and the L10.(L12)₄ pentameric complex in the GTPase domain of 23 S ribosomal RNA from Escherichia coli." *J Mol Biol* 213(2):275-88.
- Ephrussi, A., Dickinson, L. K., Lehmann, R. (1991).**"Oskar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant nanos." *Cell* 66(1):37-50.
- Ferrandon, D., Elphick, L., Nusslein-Volhard, C., St Johnston, D. (1994).**"Staufen protein associates with the 3'UTR of bicoid mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner." *Cell* 79(7):1221-32.
- Ferrandon, D., Koch, I., Westhof, E., Nusslein-Volhard, C (1997).**"RNA-RNA interaction is required for the formation of specific bicoid mRNA 3' UTR-STAU FEN ribonucleoprotein particles." *Embo J* 16(7):1751-8.
- Garner, C. C., Tucker, R. P., Matus, A. (1988).**"Selective localization of messenger RNA for cytoskeletal protein MAP2 in dendrites." *Nature* 336(6200):674-7.
- Ginisty, H., Sicard, H., Roger, B., Bouvet, P. (1999).**"Structure and functions of nucleolin." *J Cell Sci* 112 (Pt 6):761-72.
- Gonzalo, P. & Reboud, J. P. (2003).**"The puzzling lateral flexible stalk of the ribosome." *Biol Cell* 95(3-4):179-93.
- Hachet, O. & Ephrussi, A. (2001).**"Drosophila Y14 shuttles to the posterior of the oocyte and is required for oskar mRNA transport." *Curr Biol* 11(21):1666-74.
- Hachet, O. & Ephrussi, A. (2004).**"Splicing of oskar RNA in the nucleus is coupled to its cytoplasmic localization." *Nature* 428(6986):959-63.
- Harris, K. M. & Stevens, J. K. (1989).**"Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics." *J Neurosci* 9(8):2982-97.

- Havin, L., Git, A., Elisha, Z., Oberman, F., Yaniv, K., Schwartz, S. P., Standart, N., Yisraeli, J. K. (1998).**"RNA-binding protein conserved in both microtubule- and microfilament-based RNA localization." *Genes Dev* 12(11):1593-8.
- Huang, Y. S., Carson, J. H., Barbarese, E., Richter, J. D. (2003).**"Facilitation of dendritic mRNA transport by CPEB." *Genes Dev* 17(5):638-53.
- Itoh, T. J., Hisanaga, S., Hosoi, T., Kishimoto, T., Hotani, H. (1997).**"Phosphorylation states of microtubule-associated protein 2 (MAP2) determine the regulatory role of MAP2 in microtubule dynamics." *Biochemistry* 36(41):12574-82.
- Jansen, R. P. (1999).**"RNA-cytoskeletal associations." *Faseb J* 13(3):455-66.
- Jansen, R. P. (2001).**"mRNA localization: message on the move." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(4):247-56.
- Job, C. & Eberwine, J. (2001).**"Localization and translation of mRNA in dendrites and axons." *Nat Rev Neurosci* 2(12):889-98.
- Johnstone, O. & Lasko, P. (2001).**"Translational regulation and RNA localization in Drosophila oocytes and embryos." *Annu Rev Genet* 35:365-406.
- Kahvejian, A., Roy, G., Sonenberg, N (2001).**"The mRNA closed-loop model: the function of PABP and PABP-interacting proteins in mRNA translation." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 66:293-300.
- Kanai, Y., Dohmae, N., Hirokawa, N (2004).**"Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule." *Neuron* 43(4):513-25.
- Kiebler, M. A. & DesGroseillers, L. (2000).**"Molecular insights into mRNA transport and local translation in the mammalian nervous system." *Neuron* 25(1):19-28.
- Kiebler, M. A., Hemraj, I., Verkade, P., Kohrmann, M., Fortes, P., Marion, R. M., Ortin, J., Dotti, C. G. (1999).**"The mammalian stau protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport." *J Neurosci* 19(1):288-97.
- Kloc, M., Bilinski, S., Chan, A. P., Allen, L. H., Zearfoss, N. R., Etkin, L. D. (2001).**"RNA localization and germ cell determination in *Xenopus*." *Int Rev Cytol* 203:63-91.
- Kim, E., Naisbitt, S., Hsueh, Y. P., Rao, A., Rothschild, A., Craig, A. M., Sheng, M. (1997).**"GKAP, a novel synaptic protein that interacts with the guanylate kinase-like domain of the PSD-95/SAP90 family of channel clustering molecules." *J Cell Biol*.136: 669-78.
- Kim, J. H. & Huganir, R. L. (1999).**"Organization and regulation of proteins at synapses." *Curr Opin Cell Biol* 11(2):248-54.
- Kindler, S., Mohr, E., Richter, D. (1997).**"Quo vadis: extrasomatic targeting of neuronal mRNAs in mammals." *Mol Cell Endocrinol* 128(1-2):7-10.
- Kloc, M., Zearfoss, N. R., Etkin, L. D. (2002).**"Mechanisms of subcellular mRNA localization." *Cell* 108(4):533-44.

- Knowles, R. B., Sabry, J. H., Martone, M. E., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Bassell, G. J., Kosik, K. S. (1996).**"Translocation of RNA granules in living neurons." *J Neurosci* 16(24):7812-20.
- Kohrmann, M., Luo, M., Kaether, C., DesGroseillers, L., Dotti, C. G., Kiebler, M. A. (1999).**"Microtubule-dependent recruitment of Staufen-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons." *Mol Biol Cell* 10(9):2945-53.
- Kreienkamp, H. J., Soltau, M., Richter, D., Bockers, T. (2002).**"Interaction of G-protein-coupled receptors with synaptic scaffolding proteins." *Biochem Soc Trans* 30(4):464-8.
- Kress, T. L., Yoon, Y. J., Mowry, K. L. (2004).**"Nuclear RNP complex assembly initiates cytoplasmic RNA localization." *J Cell Biol* 165(2):203-11.
- Krichevsky, A. M. & Kosik, K. S. (2001).**"Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation-dependent translation." *Neuron* 32(4):683-96.
- Kuhl, D. & Skehel, P. (1998).**"Dendritic localization of mRNAs." *Curr Opin Neurobiol* 8(5):600-6.
- Laemmli, U. K. (1970).**"Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227:680-685
- Lee, C. G. & Hurwitz, J. (1992).**"A new RNA helicase isolated from HeLa cells that catalytically translocates in the 3' to 5' direction." *J Biol Chem* 267(7):4398-407.
- Li, B. & Yen, T. S. (2002).**"Characterization of the nuclear export signal of polypyrimidine tract-binding protein." *J Biol Chem* 277(12):10306-14.
- Li, P., Yang, X., Wasser, M., Cai, Y., Chia, W. (1997).**"Inscuteable and Staufen mediate asymmetric localization and segregation of prospero RNA during Drosophila neuroblast cell divisions." *Cell* 90(3):437-47.
- Li, Z., Zhang, Y., Ku, L., Wilkinson, K. D., Warren, S. T., Feng, Y. (2001).**"The fragile X mental retardation protein inhibits translation via interacting with mRNA." *Nucleic Acids Res* 29(11):2276-83.
- Lim, S., Sala, C., Yoon, J., Park, S., Kuroda, S., Sheng, M., Kim, E. (2001).**"Sharnpin, a novel postsynaptic density protein that directly interacts with the shank family of proteins." *Mol Cell Neurosci*. 17:385-97.
- Lipshitz, H. D. & Smibert, C. A. (2000).**"Mechanisms of RNA localization and translational regulation." *Curr Opin Genet Dev* 10(5):476-88.
- Long, R. M., Singer, R. H., Meng, X., Gonzalez, I., Nasmyth, K., Jansen, R. P. (1997).**"Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of ASH1 mRNA." *Science* 277(5324):383-7.
- Luo, M., Duchaine, T. F., DesGroseillers, L. (2002).**"Molecular mapping of the determinants involved in human Staufen-ribosome association." *Biochem J* 365(Pt 3):817-24.

- Mallardo, M., Deitinghoff, A., Muller, J., Goetze, B., Macchi, P., Peters, C., Kiebler, M. A. (2003).**"Isolation and characterization of Staufen-containing ribonucleoprotein particles from rat brain." *Proc Natl Acad Sci USA* 100(4):2100-5.
- Marion, R. M., Fortes, P., Beloso, A., Dotti, C., Ortin, J. (1999).**"A human sequence homologue of Staufen is an RNA-binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum." *Mol Cell Biol* 19(3):2212-9.
- Mayford, M., Wang, J., Kandel, E. R., O'Dell, T. J. (1995).**"CaMKII regulates the frequency-response function of hippocampal synapses for the production of both LTD and LTP." *Cell* 81(6):891-904.
- Mendez, R., Murthy, K. G., Ryan, K., Manley, J. L., Richter, J. D. (2000).**"Phosphorylation of CPEB by Eg2 mediates the recruitment of CPSF into an active cytoplasmic polyadenylation complex." *Mol Cell* 6(5):1253-9.
- Micklem, D. R., Adams, J., Grunert, S., St Johnston, D. (2000).**"Distinct roles of two conserved Staufen domains in oskar mRNA localization and translation." *Embo J* 19(6):1366-77.
- Miller, S., Yasuda, M., Coats, J. K., Jones, Y., Martone, M. E., Mayford, M., (2002).**"Disruption of dendritic translation of CaMKII α impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation." *Neuron* Vol. 36:507-519.
- Mohr, E., Fuhrmann, C., Richter, D. (2001).**"VP-RBP, a protein enriched in brain tissue, specifically interacts with the dendritic localizer sequence of rat vasopressin mRNA." *Eur J Neurosci* 13(6):1107-12.
- Mohr, S. E., Dillon, S. T., Boswell, R. E (2001).**"The RNA-binding protein Tsunagi interacts with Mago Nashi to establish polarity and localize oskar mRNA during Drosophila oogenesis." *Genes Dev* 15(21):2886-99.
- Monshausen, M., Putz, U., Rehbein, M., Schweizer, M., DesGroseillers, L., Kuhl, D., Richter, D., Kindler, S. (2001).**"Two rat brain staufen isoforms differentially bind RNA." *J Neurochem* 76(1):155-65.
- Monshausen, M., Rehbein, M., Richter, D., Kindler, S. (2002).**"The RNA-binding protein Staufen from rat brain interacts with protein phosphatase-1." *J Neurochem* 81(3):557-64.
- Mouland, A. J., Mercier, J., Luo, M., Bernier, L., DesGroseillers, L., Cohen, E. A. (2000).**"The double-stranded RNA-binding protein Staufen is incorporated in human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in genomic RNA encapsidation." *J Virol* 74(12):5441-51.
- Ohashi, S., Koike, K., Omori, A., Ichinose, S., Ohara, S., Kobayashi, S., Sato, T. A., Anzai, K. (2002).**"Identification of mRNA/protein (mRNP) complexes containing Puralpha, mStaufen, fragile X protein, and myosin Va and their association with rough endoplasmic reticulum equipped with a kinesin motor." *J Biol Chem* 277(40):37804-10.
- Oleynikov, Y. & Singer, R. H. (1998).**"RNA localization: different zipcodes, same postman?" *Trends Cell Biol* 8(10):381-3.

- Oleynikov, Y. & Singer, R. H. (2003).**"Real-time visualization of ZBP1 association with beta-actin mRNA during transcription and localization." *Curr Biol* 13(3):199-207.
- Palacios, I. M. & Johnston, D. S. (2002).**"Kinesin light chain-independent function of the Kinesin heavy chain in cytoplasmic streaming and posterior localisation in the *Drosophila* oocyte." *Development* 129(23):5473-85.
- Pinkstaff, J. K., Chappell, S. A., Mauro, V. P., Edelman, G. M., Krushel, L. A. (2001).**"Internal initiation of translation of five dendritically localized neuronal mRNAs." *Proc Natl Acad Sci USA* 98(5):2770-5.
- Ramos, A., Grunert, S., Adams, J., Micklem, D. R., Proctor, M. R., Freund, S., Bycroft, M., St Johnston, D., Varani, G. (2000).**"RNA recognition by a Staufen double-stranded RNA-binding domain." *Embo J* 19(5):997-1009.
- Reddy, T. R., Tang, H., Xu, W., Wong-Staal, F. (2000).**"Sam68, RNA helicase A and Tap cooperate in the post-transcriptional regulation of human immunodeficiency virus and type D retroviral mRNA." *Oncogene* 19(32):3570-5.
- Rehbein, M., Kindler, S., Horke, S., Richter, D. (2000).**"Two trans-acting rat-brain proteins, MARTA1 and MARTA2, interact specifically with the dendritic targeting element in MAP2 mRNAs." *Brain Res Mol Brain Res* 79(1-2):192-201.
- Peters, A., Palay, S. I., Webster, H. (1970).**"The fine structure of the nervous system: The cells and their processes. Harper & Roy, N.Y.
- Roegiers, F. & Jan, Y. N. (2000).**"Staufen: a common component of mRNA transport in oocytes and neurons?" *Trends Cell Biol* 10(6):220-4.
- Rongo, C., Gavis, E. R., Lehmann, R. (1995).**"Localization of oskar RNA regulates oskar translation and requires Oskar protein." *Development* 121(9):2737-46.
- Ross, A. F., Oleynikov, Y., Kislauskis, E. H., Taneja, K. L., Singer, R. H. (1997).**"Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein." *Mol Cell Biol* 17(4):2158-65.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989).**"Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
- Sanchez, C., Diaz-Nido, J., Avila, J. (2000).**"Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function." *Prog Neurobiol* 61(2):133-68.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977).**"DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-7.
- Saunders, L. R. & Barber, G. N. (2003).**"The dsRNA binding protein family: critical roles, diverse cellular functions." *Faseb J* 17(9):961-83.
- Saunders, L. R., Perkins, D. J., Balachandran, S., Michaels, R., Ford, R., Mayeda, A., Barber, G. N. (2001).**"Characterization of two evolutionarily conserved, alternatively spliced nuclear phosphoproteins, NFAR-1 and -2, that function in mRNA processing and interact with the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR." *J Biol Chem* 276(34):32300-12.

- Schaeffer, C., Beaulande, M., Ehresmann, C., Ehresmann, B., Moine, H. (2003).** "The RNA binding protein FMRP: new connections and missing links." *Biol Cell* 95(3-4):221-8.
- Schnorrer, F., Bohmann, K., Nusslein-Volhard, C (2000).** "The molecular motor dynein is involved in targeting swallow and bicoid RNA to the anterior pole of *Drosophila* oocytes." *Nat Cell Biol* 2(4):185-90.
- Schuldt, A. J., Adams, J. H., Davidson, C. M., Micklem, D. R., Haseloff, J., St Johnston, D., Brand, A. H. (1998).** "Miranda mediates asymmetric protein and RNA localization in the developing nervous system." *Genes Dev* 12(12):1847-57.
- Schwartz, S. P., Aisenthal, L., Elisha, Z., Oberman, F., Yisraeli, J. K. (1992).** "A 69-kDa RNA-binding protein from *Xenopus* oocytes recognizes a common motif in two vegetally localized maternal mRNAs." *Proc Natl Acad Sci USA* 89(24):11895-9.
- Siomi, H., Siomi, M. C., Nussbaum, R. L., Dreyfuss, G. (1993).** "The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein." *Cell* 74(2):291-8.
- Sonenberg, N. & Gingras, A. C. (1998).** "The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth." *Curr. Opin. Cell Biol.* 10:268-275
- St Johnston, D. (1995).** "The intracellular localization of messenger RNAs." *Cell* 81(2):161-70.
- St Johnston, D., Beuchle, D., Nusslein-Volhard, C (1991).** "Staufen, a gene required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg." *Cell* 66(1):51-63.
- St Johnston, D., Brown, N. H., Gall, J. G., Jantsch, M. (1992).** "A conserved double-stranded RNA-binding domain." *Proc Natl Acad Sci USA* 89(22):10979-83.
- St Johnston, D. & Nusslein-Volhard, C. (1992).** "The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo." *Cell* 68(2):201-19.
- Stebbins-Boaz, B., Cao, Q., de Moor, C. H., Mendez, R., Richter, J. D. (1999).** "Maskin is a CPEB-associated factor that transiently interacts with eIF-4E." *Mol Cell* 4(6): 1017-27.
- Steward, O., Falk, P. M., Torre, E. R. (1996).** "Ultrastructural basis for gene expression at the synapse: synapse-associated polyribosome complexes." *J Neurocytol* 25(12):717-34.
- Steward, O. & Halpain, S. (1999).** "Lamina-specific synaptic activation causes domain-specific alterations in dendritic immunostaining for MAP2 and CAM kinase II." *J Neurosci* 19(18):7834-45.
- Steward, O. & Levy, W. B. (1982).** "Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus." *J Neurosci* 2(3):284-91.
- Steward, O. & Schuman, E. M. (2001).** "Protein synthesis at synaptic sites on dendrites." *Annu Rev Neurosci* 24:299-325.

Takizawa, P. A., Sil, A., Swedlow, J. R., Herskowitz, I., Vale, R. D. (1997)."Actin-dependent localization of an RNA encoding a cell-fate determinant in yeast." *Nature* 389(6646):90-3.

Takizawa, P. A. & Vale, R. D. (2000)."The myosin motor, Myo4p, binds Ash1 mRNA via the adapter protein, She3p." *Proc Natl Acad Sci USA* 97(10):5273-8.

Tamanini, F., Meijer, N., Verheij, C., Willems, P. J., Galjaard, H., Oostra, B. A., Hoogeveen, A. T. (1996)."FMRP is associated to the ribosomes via RNA." *Hum Mol Genet* 5(6):809-13.

Tang, H., Gaietta, G. M., Fischer, W. H., Ellisman, M. H., Wong-Staal, F. (1997)."A cellular cofactor for the constitutive transport element of type D retrovirus." *Science* 276(5317):1412-5.

Tang, S. J., Meulemans, D., Vazquez, L., Colaco, N., Schuman, E (2001)."A role for a rat homolog of stauferin in the transport of RNA to neuronal dendrites." *Neuron* 32(3):463-75.

Tchorzewski, M., Boldyreff, B., Issinger, O., Grankowski, N. (2000)."Analysis of the protein-protein interactions between the human acidic ribosomal P-proteins: evaluation by the two hybrid system." *Int J Biochem Cell Biol* 32(7):737-46.

Tiedge, H. & Brosius, J. (1996)."Translational machinery in dendrites of hippocampal neurons in culture." *J Neurosci* 16(22):7171-81.

Torre, E. R. & Steward, O. (1992)."Demonstration of local protein synthesis within dendrites using a new cell culture system that permits the isolation of living axons and dendrites from their cell bodies." *J Neurosci* 12(3):762-72.

Tschochner, H. & Hurt, E. (2003)."Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm." *Trends Cell Biol* 13(5):255-63.

Tsurugi, K. & Ogata, K. (1985)."Evidence for the exchangeability of acidic ribosomal proteins on cytoplasmic ribosomes in regenerating rat liver." *J Biochem (Tokyo)* 98(6):1427-31.

Ueno, T., Tokunaga, K., Sawa, H., Maeda, M., Chiba, J., Kojima, A., Hasegawa, H., Shoya, Y., Sata, T., Kurata, T., Takahashi, H. (2004)."Nucleolin and the packaging signal, psi, promote the budding of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1)." *Microbiol Immunol* 48(2):111-8.

Valcarcel, J. & Gebauer, F. (1997)."Post-transcriptional regulation: the dawn of PTB." *Curr Biol* 7(11): R705-8.

van Eeden, F. J., Palacios, I. M., Petronczki, M., Weston, M. J., St Johnston, D. (2001)."Barentsz is essential for the posterior localization of oskar mRNA and colocalizes with it to the posterior pole." *J Cell Biol* 154:511-523

Villace, P., Marion, R. M., Ortin, J. (2004)."The composition of Staufen-containing RNA granules from human cells indicates their role in the regulated transport and translation of messenger RNAs." *Nucleic Acids Res* 32(8):2411-20.

Walikonis, R. S., Jensen, O. N., Mann, M., Provance, D. W., Jr., Mercer, J. A., Kennedy, M. B. (2000)."Identification of proteins in the postsynaptic density fraction by mass spectrometry." *J Neurosci* 20(11):4069-80.

Webster, P. J., Liang, L., Berg, C. A., Lasko, P., Macdonald, P. M. (1997)."Translational repressor bruno plays multiple roles in development and is widely conserved." *Genes Dev* 11(19):2510-21.

Wickham, L., Duchaine, T., Luo, M., Nabi, I. R., DesGroseillers, L. (1999)."Mammalian staufen is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum." *Mol Cell Biol* 19(3):2220-30.

Xie, J., Lee, J. A., Kress, T. L., Mowry, K. L., Black, D. L. (2003)."Protein kinase A phosphorylation modulates transport of the polypyrimidine tract-binding protein." *Proc Natl Acad Sci USA* 100(15):8776-81.

Yoon, Y. J. & Mowry, K. L. (2004)."Xenopus Staufen is a component of a ribonucleoprotein complex containing Vg1 RNA and kinesin." *Development* 131(13):3035-45.

Yurkova, M. S. & Murray, M. T. (1997)."A translation regulatory particle containing the Xenopus oocyte Y box protein mRNP3+4." *J Biol Chem* 272(16):10870-6.

Zaidi, S. H. & Malter, J. S. (1995)."Nucleolin and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C proteins specifically interact with the 3'-untranslated region of amyloid protein precursor mRNA." *J Biol Chem* 270(29):17292-8.

Zauner, W., Kratz, J., Staunton, J., Feick, P., Wiche, G. (1992)."Identification of two distinct microtubule binding domains on recombinant rat MAP 1B." *Eur J Cell Biol* 57(1):66-74.

Zhang, S. & Grosse, F. (1997)."Domain structure of human nuclear DNA helicase II (RNA helicase A)." *J Biol Chem* 272(17): 11487-94.

Bloom, K. and D. L. Beach (1999). "mRNA localization: motile RNA, asymmetric anchors." *Curr Opin Microbiol* 2(6):604-9.

Zhao, W. M., Jiang, C., Kroll, T. T., Huber, P. W. (2001)."A proline-rich protein binds to the localization element of Xenopus Vg1 mRNA and to ligands involved in actin polymerization." *Embo J* 20(9):2315-25.

6 Zusammenfassung

In vielen verschiedenen Zelltypen ist der cytoplasmatische RNA-Transport in Verbindung mit lokal regulierter Translation essentiell für die Bildung und Aufrechterhaltung von Zellpolaritäten. Bei der RNA-Lokalisierung spielen *trans*-agierende RNA-Bindeproteine als Bestandteile von Ribonukleoprotein (RNP)-Komplexen eine zentrale Rolle. In *Drosophila*-Oocyten und -Neuroblasten ist das dsRNA-Bindeprotein Stau1 als Komponente von RNP-Komplexen sowohl am cytoplasmatischen Transport als auch an der Verankerung und der Translationsregulation verschiedener Transkripte beteiligt. Die zwei Säuger-Orthologe Stau1 (Stau1) und Stau2 sind Bestandteile unterschiedlicher RNA-enthaltender Komplexe, welche mit Mikrotubuli und Ribosomen assoziieren. Bislang war relativ wenig über die molekulare Zusammensetzung Stau1-enthaltender RNP-Komplexe in Säugerzellen bekannt. In dieser Arbeit wurden mit einer neu entwickelten Methode Stau1-enthaltende Komplexe aus Säugerzellen isoliert und die darin enthaltenen Proteine sowohl massenspektrometrisch als auch immunologisch mit Western Blot Analysen identifiziert. Stau1-Komplexe beinhalten verschiedene nukleocytoplasmatische RNA-Bindeproteine, von denen Nucleolin und FMRP RNA-vermittelt und NFAR und RHA RNA-unabhängig mit den Stau1-RNP-Komplexen assoziieren. Weiterhin liegen die Protein-Phosphatase 1, das Mikrotubuli-abhängige Motorprotein Kinesin, Tubulin und verschiedene Proteine der großen und kleinen ribosomalen Untereinheit RNA-unabhängig in Stau1-Komplexen vor. Bis auf PABP kommt keines der Proteine im Komplex mit dem strukturell nicht verwandten RNA-Bindeprotein hnRNPK vor, was unter anderem die hohe Spezifität der Reinigungsmethode belegt. In Sucrosegradienten kofraktioniert Stau1 mit intakten Ribosomen und Polysomen, jedoch nicht mit den isolierten ribosomalen Untereinheiten. Unterschiedliche biochemische Befunde deuten auf eine direkte Interaktion zwischen Stau1 und dem ribosomalen Protein P0 hin. An dieser Assoziation scheint die Doppelstrang-RNA-Bindedomäne drei (dsRBD3) von Stau1 essentiell beteiligt zu sein. *In vitro* Translations-Experimente zeigen, dass Stau1 einen translationsreprimierende Wirkung besitzt.

Die Befunde dieser Arbeit deuten darauf hin, dass Stau1 im Cytoplasma von Säugerzellen durch eine Assoziation mit dem ribosomalen Protein P0 in

Ribosomen-enhaltende Komplexe rekrutiert wird, die ebenfalls nukleocytoplasmatische Proteine, PP1 und PABP enthalten und Kinesin-abhängig entlang von Mikrotubuli transportiert werden. Demnach könnte Stau1 als Bestandteil von RNP-Komplexen in Säugerzellen am aktiven RNA-Transport und an der Translationsregulation beteiligt sein.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. D. Richter danke ich für die Ermöglichung dieser Arbeit am Institut für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie des Universitäts-Klinikums Hamburg-Eppendorf.

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

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Stefan Kindler für die qualifizierte und freundschaftliche Betreuung dieser Arbeit. Ihm und Frau Dr. Monika Rehbein danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft und für anregende Diskussionen sowie die hilfreichen Hinweise bei der Durchsicht dieses Manuskripts.

Zudem bedanke ich mich bei Sönke Harder und Dr. Fritz Buck, die im Analytik-Labor des Institut für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie des Universitäts-Klinikums Hamburg-Eppendorf die massenspektrometrischen Analysen durchgeführt haben.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts bedanke ich mich für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre – dies gilt insbesondere für Birgit Schwanke und Christiane Schröder-Birkner.

Außerhalb der Wissenschaft danke ich ganz besonders meinen Eltern, die immer an mich glauben und ohne deren Unterstützung vieles nicht möglich gewesen wäre.

Meinem Freund Guido danke ich ganz besonders, dass er immer für mich da ist und mich besonders in der letzten Zeit immer unterstützt hat. Danke!

Wissenschaftlicher Werdegang

Cornelia Brendel

geboren 1975 in Wolfsburg

Schulbildung/Studium

- 1995 Abitur am Gymnasium Kreuzheide in Wolfsburg
- 09/1995-01/2001 Studium der Biologie an der Georg-August-Universität in
Göttingen mit den Schwerpunkten in Mikrobiologie, Biochemie
und Humangenetik
- 02/2000-01/2001 Diplomarbeit bei Prof. Dr. G. Braus am Institut für
Mikrobiologie und Genetik: „Regulation der Chromatinstruktur
des *HIS7*-Gens der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*“
- 01/2001-04/2001 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Mikrobiologie und
Genetik der Georg-August-Universität Göttingen
Abteilung für Molekulare Mikrobiologie und Genetik bei
Prof. Dr. G. Braus; Tätigkeit: Mitwirkung an aktuellen
Forschungsvorhaben

Promotion

- 04/2001-11/2004 Promotion bei Prof. Dr. D. Richter am Institut für Zellbiochemie
und Klinische Neurobiologie des Universitäts-Klinikums
Eppendorf in Hamburg
„Charakterisierung von Stufen1-enthaltenden
Ribonukleoprotein Komplexen in Säugern“