

# **Isolierung und Charakterisierung von Staufen- und Barentsz- enthaltenden Ribonukleopro- teinpartikeln aus Rattenhirn**

**der Fakultät für Biologie  
der EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften**

**von**

**Daniela Karra  
aus Stuttgart**

**vorgelegte**

**D i s s e r t a t i o n**

**2008**

Tag der mündlichen Prüfung:

06.05.2008

Dekan:

Prof. Dr. H. Mallot

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dr. h.c. N. Blin

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. M. Kiebler

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen und Worterklärungen .....</b>	<b>IV</b>
<b>Summary .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Zusammenfassung.....</b>	<b>2</b>
<b>2. Einleitung .....</b>	<b>3</b>
2.1 Lokalisation von mRNAs in polarisierten Neuronen .....	4
2.2 Assemblierung von Ribonukleoprotein-Komplexen (RNPs) .....	5
2.2.1 <i>trans</i> -agierende Faktoren der Transportmaschinerie.....	6
2.3 Stufen und Barentsz .....	8
2.4 Ziele dieser Arbeit.....	10
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>11</b>
3.1 Antikörper .....	11
3.1.1 Primärantikörper aus eigener Herstellung.....	11
3.1.2. weitere Primärantikörper .....	13
3.1.3 Sekundärantikörper .....	14
3.2 Plasmide .....	15
3.3 Enzyme und Oligonukleotide (Primer) .....	16
3.3.1 Primer zur Klonierung der Barentsz-Konstrukte.....	16
3.3.2 Primer zur Herstellung der shRNA Plasmide (pSUPERIOR).....	16
3.3.3 Primer für die Polymerase-Ketten Reaktion (PCR).....	17
3.4 Geräte.....	18
3.5 Tiere.....	19
3.6 Säugerzellen.....	19
3.7 Puffer und Lösungen .....	19
3.7.1 Expression und Reinigung von Proteinen .....	19
3.7.2 Affinitätsreinigung polyklonaler Antikörper .....	21
3.7.3 Analyse von Proteinen.....	22
3.7.4 Gewebeextraktion und Dichtegradient .....	23
3.7.5 GST-Pulldown und Immunpräzipitation (IP).....	25
3.7.6 Immunfluoreszenz .....	26
3.8 Methoden.....	27
3.8.1 Herstellung von bakteriell exprimierten Antigenen.....	27
3.8.1.1 Herstellung chemokompetenter <i>E.coli</i> (CaCl <sub>2</sub> Methode).....	27
3.8.1.2 Transformation von <i>E.coli</i> .....	27
3.8.1.3 Bakterielle Expression von Fusionsproteinen .....	28
3.8.1.4 Reinigung von Polyhistidin-Fusionsproteinen .....	28
3.8.1.5 Immunisierung von Hasen.....	29
3.8.1.6 Reinigung von Glutathion-S-Transferase (GST) -Fusionsproteinen .....	29
3.8.2 Affinitätsreinigung von Antikörpern.....	30
3.8.2.1 Herstellung der Antigen-Säule .....	30

3.8.2.2 Affinitätsreinigung der Antikörper .....	31
3.8.3 Proteinanalytik .....	32
3.8.3.1 Denaturierende Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure/DOC .....	32
3.8.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	32
3.8.3.3 Färbung von Proteingelen .....	32
3.8.3.4 Western Blot .....	32
3.8.4 Gewebeextraktion und Dichtegradientenzentrifugation .....	33
3.8.4.1 Herstellung von Zellextrakten.....	33
3.8.4.2 Herstellung von zytoplasmatischen und nuklearen Gewebeextrakten .....	33
3.8.4.3 Dichtegradientenzentrifugation.....	34
3.8.5 Isolierung von Barentsz- und Staufen- enthaltenden Komplexen.....	35
3.8.5.1 GST-Pulldown aus Rattenhirnextrakt.....	35
3.8.5.2 Immunpräzipitation (IP) .....	36
3.8.6 Proteinidentifizierung über Massenspektrometrie .....	37
3.8.7 Identifizierung von RNAs aus Barentsz- und Staufen- enthaltenden Komplexen.....	39
3.8.7.1 RNA-Isolierung aus Immunpräzipitationen.....	39
3.8.7.2 Reverse Transkriptase (RT) Reaktion und semiquantitative Amplifizierung von RNAs mittels PCR.....	39
3.8.8 Immunfluoreszenz und Transfektionen .....	40
3.8.8.1 Immunfluoreszenz .....	40
3.8.8.2 Markierung von Primärantikörpern .....	41
3.8.8.3 Transiente Transfektion von Säugerzellen.....	41
3.8.9 Regulierung der Genexpression durch Vektor-basierende Expression von shRNA.....	42
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>
4.1 Gewinnung und Charakterisierung von spezifischen anti-Btz, anti-Stau1 und anti-Stau2 Antikörpern .....	43
4.1.1 Herstellung von bakteriell exprimierten Antigenen zur Erzeugung polyklonaler Antikörper	43
4.1.2 Affinitätsreinigung der Antiseren aus Hasen .....	48
4.1.2.1 Antiseren .....	48
4.1.2.2 Affinitätsreinigung der Antiseren .....	49
4.2 Identifizierung von Interaktionspartnern für Btz, Stau1 und Stau2 durch <i>in vitro</i> GST-Pulldown Experimente .....	53
4.3 Isolierung und Identifizierung von endogenen Barentsz- bzw. Staufen- enthaltenden Komplexen.....	57
4.3.1 Anreicherung von neuronalen RNPs mittels Optiprep <sup>TM</sup> Dichtegradientenzentrifugation....	57
4.3.2 Immunpräzipitation von endogenen RNPs.....	59
4.3.2.1 Optimierung der Immunpräzipitation nativer RNPs.....	59
4.3.2.2 Identifizierung der RNP-Komponenten mittels Massenspektrometrie .....	65
4.4 Validierung spezifischer Interaktionspartner von Stau1, Stau2 und Btz im Rattenhirn.	77
4.4.1 Validierung spezifischer Interaktionspartner aus <i>in vitro</i> GST-Pulldown Experimenten mittels Western Blot-Analysen .....	77

---

4.4.2 Validierung bestimmter Interaktionspartner in endogenen Stau2- und Btz-RNPs mittels Co-Immunpräzipitationen .....	79
4.4.3 Identifizierung von Casein Kinase II (CKII) als möglichen Interaktionspartner von Barentsz im Rattenhirn .....	81
4.4.4 RNA-abhängige Interaktion zwischen dem RNA-Bindeprotein ZBP1 und Stau2 .....	83
4.4.5 Co-Lokalisierung von ZBP1 und Stau2 in Wachstumskegeln von differenzierenden hippokampalen Neuronen .....	85
4.5 Identifizierung von RNAs aus endogenen Btz- und Stau2-RNPs .....	86
4.5.1 Kandidaten Untersuchung mittels semi-quantitativer RT-PCR .....	86
4.5.2 Identifizierung von mRNAs mittels Genchip Analyse .....	87
4.6 <i>Nuclear priming</i> im Zellkern .....	88
4.7 Funktionelle Analyse ausgewählter Btz-Interaktionspartner .....	89
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>92</b>
5.1 Identifizierung der Komponenten neuronaler Stau1-, Stau2- und Btz- entaltender RNPs aus Rattenhirn .....	92
5.1.1 Identifizierung der Proteinkomponenten.....	92
5.1.2 GST-Pulldown, Immunpräzipitation und Massenspektrometrie .....	97
5.1.3 Identifizierung der RNAs in endogenen Stau2-und Btz-RNPs .....	98
5.1.4 Die Rolle von Btz und Stau2 beim <i>nuclear priming</i> im Zellkern .....	100
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>102</b>
Internetreferenzen .....	111
Fachliteratur.....	111
<b>Anhang .....</b>	<b>113</b>
<b>Danke.....</b>	<b>143</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>144</b>

## Abkürzungen und Worterklärungen

APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arc	<i>activity regulated cytoskeleton associated gene</i>
BC1	<i>brain cytoplasmic 1</i>
BSA	Rinderserum-Albumin
Btz	Barentsz
CaMKII $\alpha$	$\alpha$ -Untereinheit der Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II
CKII	Casein Kinase 2
DDX	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp )-Box
DOC	Desoxycholat
dsRBD	Doppelstrang-RNA-Bindedomäne
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF	eukaryontischer Translationsinitiationsfaktor
EJC	<i>exon-exon-junction complex</i>
FL	<i>full length</i> (Gesamtlänge des jeweiligen Proteins)
FMRP	fragiles X mentales Retardationsprotein
GST	Glutathion-S-Transferase
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
hnRNP	heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranosid
KHC	schwere Kette von Kinesin ( <i>kinesin heavy chain</i> )
KIF	<i>kinesin family protein</i> , Mitglied der Kinesinfamilie
LB	Luria Bertani
MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2
NCBP80	Nukleäres <i>cap</i> -Bindeprotein 80kDa
NMD	<i>nonsense-mediated mRNA Decay</i>
NPM1	Nucleophosmin 1
P100	Pellet nach Zentrifugation mit 100000 x g
PABP1	poly(A)-bindendes Protein 1
PACT	<i>protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent activator</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Poly(rC)BP1	Poly(rC) bindendes Protein 1
PIS	Präimmunserum

---

PTC	<i>premature termination codon</i>
Pur- $\alpha$	<i>purine rich single-stranded DNA binding protein alpha</i>
RBD	RNA-Bindedomäne
RBPs	RNA-Bindeproteine
RBM	<i>RNA binding motif protein</i>
RNP	Ribonucleoproteinpartikel
S20	Überstand nach Zentrifugation mit 20000 x g
SDS	Natriumdodecylsulfat
SELOR	<i>speckle localizer and RNA binding module domain</i>
Stau	Staufen
tag	Anhänger
shRNA	Small hairpin RNA, Kurze Haarnadel RNA
siRNA	Small interfering RNA
TCR	T-Zell Rezeptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNAs	transfer-RNA
Rpm	<i>Rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
Upf1	<i>Up-frameshift suppressor 1</i> Homolog
(RENT1)	(Synonym: <i>Regulator of nonsense transcripts 1</i> )
UTR	untranslatierte Region
ZBP	<i>zipcode</i> Bindeprotein, <i>zipcode</i> engl. Postleitzahl

## **Summary**

mRNA localisation is a highly conserved mechanism to regulate the expression of specific genes at a posttranscriptional level. It serves to control both spatial and temporal protein expression at various subcellular sites. The resulting local protein synthesis is known to be required for various processes during development, but is also important in mature polarised cells, including neurons and glia. In neurons it is believed to contribute to the activity-induced plasticity of individual synapses and thus to learning and memory. Localised mRNAs are recognised by RNA binding proteins in the nucleus and cytoplasm and are packaged into ribonucleoprotein particles (RNPs). After nuclear export RNPs are actively transported along the cytoskeleton to their final destination within the cell. Previous studies have revealed some components of the transport machinery but the underlying mechanism of mRNA localisation is still poorly understood.

To elucidate the composition of RNA particles, three protein components of the transport machinery, Barentsz (Btz), Staufen 1 (Stau1) and Staufen 2 (Stau2), were used as molecular handles to isolate RNA transport granules from rat neuronal extracts. A two step isolation procedure was established. First, endogenous neuronal RNPs were biochemically enriched via gradient fractionation. Second, the respective endogenous RNPs were immunoprecipitated using high affinity mono-specific antibodies. Protein components were analysed via mass spectrometry followed by a comprehensive Western blot analyses. In addition to a number of RNA-binding proteins, a complete motor protein complex (Kinesin-2) was identified. Furthermore a putative new protein-protein interaction between Btz and the casein kinase II, as well as a novel RNA-mediated interaction between Stau2 and the zipcode binding protein 1 were characterized. Moreover four localised mRNAs were specifically isolated from endogenous Btz- and Stau2-RNPs. Additionally, preliminary experiments have revealed clear differences between nuclear and cytoplasmic neuronal Btz-, Stau1- and Stau2-RNPs, respectively.

Using this biochemical purification method both proteins and RNAs were specifically isolated and identified from endogenous neuronal RNPs. This is a first and important step to elucidate the composition of the mRNA-transport machinery. Based on this data future functional studies will reveal further insight into the mechanism of mRNA localisation.

# 1. Zusammenfassung

Die Lokalisation von spezifischen mRNAs ist ein hochkonservierter Mechanismus, um die Expression bestimmter Gene posttranskriptional zu kontrollieren. Dadurch wird die räumlich und zeitlich regulierte Translation von Proteinen in subzellulären Kompartimenten ermöglicht. Die lokale Proteinsynthese ist essentiell für viele Vorgänge in der Entwicklung, spielt aber auch in reifen polarisierenden Zellen, einschließlich Neuronen und Gliazellen eine wichtige Rolle. Man nimmt an, dass die Lokalisierung bestimmter mRNAs in die Dendriten reifer Neurone und die anschließende lokale Proteinsynthese zu Veränderungen bei der synaptischen Plastizität führen und infolgedessen an Lern- und Gedächtnisvorgängen im Gehirn beteiligt sind.

Für den Transport werden die lokalisierten mRNAs zunächst im Zellkern in Ribonukleoproteinpartikeln (RNPs) verpackt, exportiert und aktiv entlang des Zytoskeletts an den Ort ihrer Bestimmung befördert. Obwohl schon einige Komponenten der Transportmaschinerie identifiziert wurden, ist der zugrundeliegende molekulare Mechanismus der mRNA Lokalisation noch weitgehend unverstanden.

In der vorliegenden Arbeit wurden anhand von drei etablierten Markerproteinen der mRNA Lokalisierung, Barentsz (Btz), Stau1 und Stau2, Transport-RNPs aus löslichem Rattenhirnextrakt isoliert und deren Zusammensetzung analysiert. Dabei wurde zunächst eine Methode etabliert, die es erlaubt, intakte, neuronale RNPs anzureichern und anschließend mit selbsthergestellten mono-spezifischen Antikörpern zu isolieren.

Die Proteine der entsprechenden Transport-RNPs wurden über Massenspektrometrie identifiziert und bestimmte Kandidaten in einer umfangreichen Western Blot-Analyse validiert. Neben einer Vielzahl von RNA-Bindeproteinen, die in verschiedene Gruppen eingeteilt wurden, konnte dabei ein vollständiger Motorproteinkomplex (Kinesin-2) identifiziert werden.

Außerdem wurde eine mögliche Protein-Protein Wechselwirkung zwischen Btz und der Casein Kinase II sowie eine RNA-abhängige Interaktion zwischen Stau2 und dem *zipcode*-Bindeprotein 1 charakterisiert. Zudem gelang der Nachweis von vier dendritisch lokalisierten mRNAs in den endogenen Btz- bzw. Stau2-RNPs mittels RT-PCR.

Darüberhinaus ergaben erste Isolierungen von nukleären RNPs deutliche Unterschiede im Vergleich zu den zytoplasmatischen Komplexen.

Durch die in dieser Arbeit etablierte Methode gelang der spezifische Nachweis von sowohl Proteinen, als auch von RNAs der RNPs. Somit ist ein erster wichtiger Schritt in Richtung der Entschlüsselung der Transportmaschinerie erfolgt. Diese Daten bilden die Grundlage für zahlreiche zukünftige Studien, die zu einem besseren Verständnis des Mechanismus der mRNA Lokalisation beitragen werden.

## 2. Einleitung

Unterschiedliche Zelltypen im Körper entstehen während der Entwicklung, indem bestimmte Gene differentiell exprimiert werden. Auf ähnliche Weise kann eine Zelle auch in verschiedene funktionelle Bereiche unterteilt werden. Hier kommt es jedoch nicht nur darauf an, welche Gene von einer Zelle prinzipiell exprimiert werden, sondern vielmehr, wo in der Zelle welche Proteine hergestellt werden. Wenn eine Zelle die Synthese bestimmter Proteine auf einen Bereich begrenzt, kann sie diesem Bereich spezielle Funktionen geben.

Diese lokale Proteinsynthese spielt bei vielen biologischen Vorgängen eine essentielle Rolle. So beruht beispielsweise die Festlegung der Körperachsen im frühen *Drosophila melanogaster* Embryo auf mRNAs, die asymmetrisch in der Eizelle lokalisiert werden und während der Embryogenese durch Protein-Gradienten die Expression von Genen steuern, die Bereiche des Fliegenembryos festlegen (St Johnston 2005).

Auch in Säugetieren gibt es etliche Beispiele, wie die Lokalisierung von mRNAs und die lokale Synthese der Proteine, die von diesen mRNAs kodiert werden, dazu führt, dass bestimmte Bereiche dieser Zellen spezielle Eigenschaften erhalten. Ein gut untersuchter Vorgang ist beispielsweise die Wanderung von Zellen. Zellen, die gerichtet wandern, stellen an ihrer vorderen Spitze das zytoskeletale Protein Aktin her, das dann lokal zu Aktin-Filamenten assembliert und die Zelle an dieser Stelle nach vorne treibt (Czaplinski & Singer 2006). Ähnliches gilt auch für das Auswachsen von Neuriten, den Vorläufern von Axonen und Dendriten, wenn Neurone differenzieren. Auch hier exprimieren die Wachstumskegel an der Spitze der Neuriten große Mengen an Aktin (Huttelmaier et al. 2005). Die lokale Synthese von Aktin im Wachstumskegel ist für ein gerichtetes Auswachsen des Neurites entscheidend (Hengst & Jaffrey 2007, Zhang et al. 2001). Eine räumliche Kontrolle der lokalen Aktin-Synthese ist also nicht nur für die Morphologie der Neurone essentiell, sondern sie entscheidet auch mit darüber, wie sich ein Nervensystem während der Entwicklung verschaltet.

Die Lokalisierung von mRNAs und die lokale Synthese der entsprechenden Proteine spielt aber auch in reifen, bereits polarisierten Neuronen eine wichtige Rolle. Eine entscheidende Voraussetzung für ein funktionierendes Nervensystem ist, dass einzelne Synapsen zwischen Neuronen spezifisch verändert werden können. Diese Veränderungen liegen Phänomenen wie dem Lernen und der Speicherung von Gedächtnisinhalten zugrunde. Wenn ein Nervensystem etwas lernt, d.h. zwei vorher als unabhängig voneinander wahrgenommene Reize als miteinander gekoppelt wahrnimmt, müssen Synapsen zwischen den Nervenzellen, die an der Wahrnehmung der Reize beteiligt sind, verstärkt werden. Für ein Neuron bedeutet das aber, dass es spezifisch eine oder wenige von bis zu 10.000 Synapsen verändern muss. Dies wirft unmittelbar das Problem auf, wie Proteine, die zentral im Soma synthetisiert werden, nur zu individuellen Synapsen transportiert und dort eingebaut werden können. Ein eleganter Weg, dieses Problem zu umgehen, ist es, die entsprechenden mRNAs in Dendriten

zu lokalisieren und bei Bedarf zu aktivierten Synapsen zu rekrutieren, wo dann die Proteine lokal hergestellt werden.

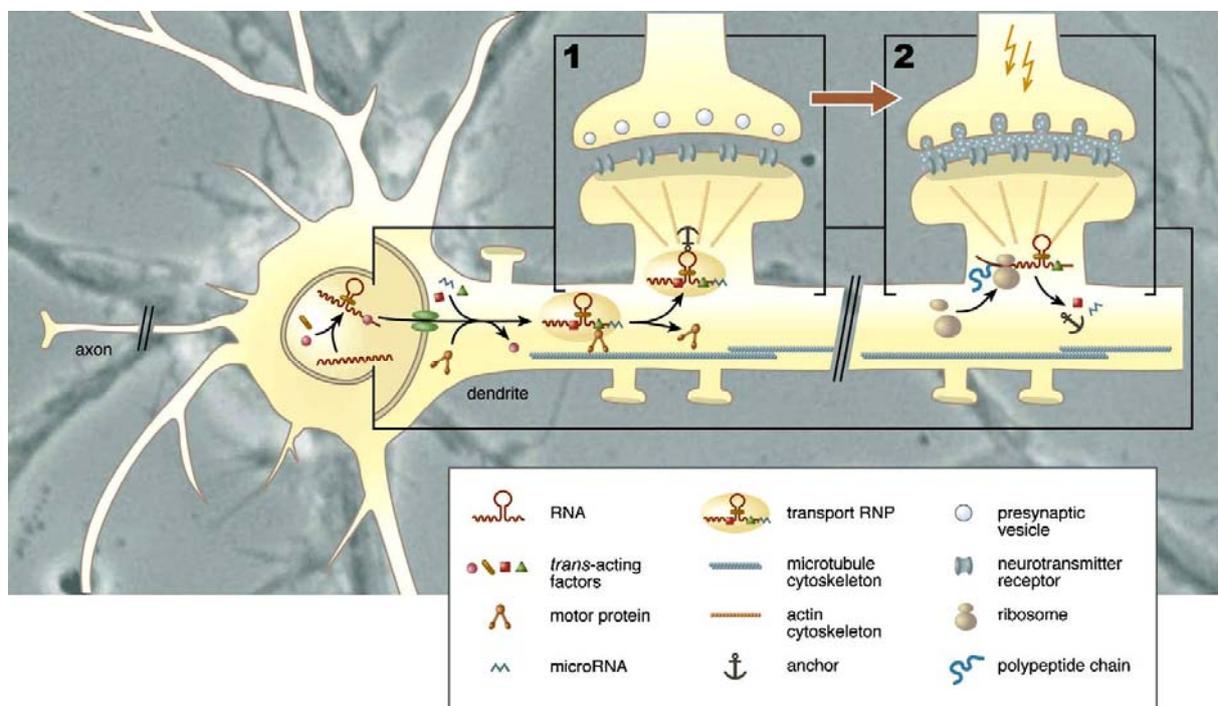
## **2.1 Lokalisation von mRNAs in polarisierten Neuronen**

Lange Zeit nahm man an, dass die Synthese neuer Proteine ausschließlich im Soma von Nervenzellen stattfindet. Ein Umdenken begann mit der Entdeckung, dass Polyribosomen (Steward & Levy 1982) und bestimmte mRNAs in distalen Dendriten von Nervenzellen vorkommen. Seither sind weitere lokalisierte mRNAs identifiziert worden, die häufig zusammen mit Ribosomen und weiteren Komponenten der Translationsmaschinerie in der Nähe von postsynaptischen Dornenfortsätzen (*spines*) detektiert werden können (Tiedge & Brosius 1996, Torre & Steward 1996, Knowles et al. 1996). Sie kodieren unter anderem für Cytoskelett-assoziierte Proteine, wie z.B. *activity regulated cytoskeleton-associated protein* (Arc) (Link et al. 1995, Lyford et al. 1995),  $\beta$ -Aktin (Ross et al. 1997) und MAP2 (Garner et al. 1988), oder für regulatorische Proteine, wie z.B. die  $\alpha$ -Untereinheit der *Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II* (CaMKII $\alpha$ ) (Blichenberg et al. 2001). Des Weiteren fand man eine nicht-kodierende RNA, *brain cytoplasmic 1* (BC1) (Tiedge et al. 1991), in Dendriten polarisierter Nervenzellen. Neuere Daten legen nahe, dass BC1 die Translationsinitiation von mRNAs durch Interaktion mit dem PolyA-Bindeprotein 1 und dem eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor eIF4A inhibiert (Wang et al. 2005). Unlängst wurde auch gezeigt, dass microRNAs in RNPs in Dendriten vorkommen und dort die Translation von lokalisierten mRNAs, wie der Lim Kinase, hemmen können (Schratt et al. 2006).

Möglicherweise lokalisieren bis zu 400 mRNAs in Säugern in Dendriten (Eberwine et al. 2001). Der zugrundeliegende molekulare Mechanismus der mRNA Lokalisation ist jedoch noch weitgehend unverstanden. Die zu transportierenden RNAs enthalten - ähnlich wie bei der Sortierung von Proteinen - sog. *cis*-agierende Lokalisierungselemente. Diese befinden sich in den meisten Fällen in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR), können aber auch in der 5'-UTR oder der kodierenden Region der Transkripte enthalten sein (Kuhl & Skehel 1998, Bashirullah et al. 1998, St Johnston 2005). Im Gegensatz zu den Sortiersignalen der Proteine, die meistens aus einer bestimmten Aminosäureabfolge bestehen, scheint es bei den Lokalisierungselementen der RNAs bisher kaum Gemeinsamkeiten zu geben. Es wurden sowohl Primärsequenzmotive wie z.B. in der  $\beta$ -Aktin-mRNA als auch Sekundär- bzw. Tertiärstruktur-Motive aufgedeckt (Kislauskis & Singer 1992, Bullock 2007). Diese Vielfalt an Lokalisierungselementen erschwert die Identifizierung bisher unbekannter lokalisierter RNAs und deren möglicher Interaktionspartner.

## 2.2 Assemblierung von Ribonukleoprotein-Komplexen (RNPs)

Nach einem erstmals von Wilhelm und Vale aufgestellten Model werden lokalisierte mRNAs im Zytoplasma in Ribonukleoprotein-Komplexen (RNPs) verpackt, über Motorproteine und das Zytoskelett an ihren Bestimmungsort transportiert, verankert und nach einem spezifischen Stimulus lokal translatiert (Wilhelm & Vale 1993). Dieses Model wird heute um einen Schritt erweitert, da man davon ausgeht, dass die Assemblierung der RNPs bereits im Zellkern (*nuclear priming*) eine entscheidende Rolle für die spätere zytoplasmatische Lokalisierung spielt (Kress et al. 2004, Czaplinski & Singer 2006). In Abbildung 2.1 sind die einzelnen Schritte des mRNA Transports im Dendriten einer Nervenzelle schematisch dargestellt (aus (Dahm et al. 2007)).



**Abbildung 2.1: mRNA Lokalisation in Säuger-Nervenzellen**

Die zu transportierende RNA wird im Zellkern von RNA-Bindeproteinen (*trans-acting factors*) erkannt und, in einem Ribonukleoprotein-Partikel (RNP) verpackt, ins Zytoplasma exportiert. Dort stoßen weitere Komponenten hinzu und der Transport-RNP wird mit Hilfe von Motorproteinen (Kinesin und Dynein) entlang von Mikrotubuli in die Dendriten befördert. Die Transport-RNPs werden meist an der Basis der postsynaptischen Dornfortsätze (*spines*) verankert (1). Während des Transports wird die Translation der mRNA z.B. durch Translationsrepressoren wie auch durch microRNAs inhibiert. Nach einem spezifischen synaptischen Stimulus erfolgt die lokale Proteinsynthese (2) (aus (Dahm et al. 2007)).

Zunächst werden die *cis*-agierenden Lokalisierungselemente der prozessierten mRNAs im Zellkern von RNA-Bindeproteinen (sog. *trans*-agierenden Faktoren) erkannt und gebunden. Der RNA-Protein-Komplex wird durch die Kernporen in das Zytoplasma der Zelle exportiert. Man vermutet, dass nach dem Export aus dem Zellkern eine Umstrukturierung der RNPs stattfindet und weitere *trans*-agierende Faktoren, die für den Transport benötigt werden, mit dem RNP assoziieren (Kress et al. 2004, St Johnston 2005). Mit der Hilfe von Motorproteinen (Kinesin und Dynein) werden diese Transport-RNPs aktiv entlang von Mikrotubuli in die Dendriten transportiert und in der Nähe der postsynaptischen Dornfortsätze (*spines*) verankert. Der genaue Mechanismus der Verankerung ist jedoch nicht bekannt. Durch einen spezifischen synaptischen Stimulus wird die lokale Proteinsynthese aktiviert. Man nimmt an, dass dies zu einer Veränderung der synaptischen Plastizität führt und infolgedessen an Lern- und Gedächtnisvorgängen im Gehirn beteiligt ist (Kiebler & DesGroseillers 2000, Steward & Schuman 2001, Klann & Dever 2004).

### **2.2.1 trans-agierende Faktoren der Transportmaschinerie**

Die meisten Sortiervorgänge innerhalb einer Zelle werden mit Hilfe von makromolekularen Komplexen bewerkstelligt. Das trifft auch auf die mRNA Lokalisation zu. In den letzten Jahren konnten einige der *trans*-agierenden Faktoren der RNA Transportmaschinerie identifiziert werden. Diese Proteine lassen sich dabei zumindest in drei große Klassen einteilen (Schnapp 1999): heterogene, nukleäre Ribonukleoproteine (hnRNPs), *zipcode*-bindende Proteine (ZBPs) und Doppelstrang-RNA-Bindeproteine (dsRBPs).

hnRNPs sind an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt. Sie üben unter anderem eine wichtige Funktion beim Prozessieren von RNAs im Zellkern aus (Dreyfuss et al. 1993). Des Weiteren pendeln sie zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma und sind an der Lokalisation von RNAs beteiligt (Kress et al. 2004). In Dendriten von kultivierten hippocampalen Neuronen wurden bislang hnRNP A2, hnRNP Q (Syncrip) und hnRNP U mit mRNA Transport in Verbindung gebracht, wo sie in RNPs, die bei der mikroskopischen Analyse als distinkte, granuläre Partikel erscheinen, vorkommen (Shan et al. 2003, Kanai et al. 2004, Bannai et al. 2004).

Ein gut untersuchtes Beispiel für die Lokalisierung von mRNAs ist der Transport der  $\beta$ -Aktin mRNA. Die 3'-UTR der  $\beta$ -Aktin mRNA enthält ein 54 bp langes *cis*-agierendes Element, das als *zipcode* bezeichnet wird. Das *zipcode*-Bindeprotein 1 (ZBP1) bindet an dieses Element und ist an der Lokalisation der  $\beta$ -Aktin mRNA in die Wachstumskegel auswachsender Neurite beteiligt (Ross et al. 1997, Zhang et al. 2001). Darüberhinaus reguliert ZBP1 die Translation während des und vor allem nach erfolgtem Transport (Huttelmaier et al. 2005).  $\beta$ -Aktin mRNA enthaltende RNPs wurden auch in den Dendriten reifer Neurone nachgewiesen (Tiruchinapalli et al. 2003, Goetze et al. 2006).

Der wahrscheinlich am besten untersuchte Vertreter der Doppelstrang-RNA-Bindeproteine ist das Staufen-Protein, welches später noch genauer beschrieben wird.

Eine weitere große Klasse der RNA-Bindeproteine stellen RNA-Helikasen dar, die an zahlreichen Schritten des RNA-Metabolismus beteiligt sind. Dazu gehört auch die Familie der DEAD-Box Proteine (DDX), die durch neun Proteinmotive charakterisiert ist. Eines dieser Motive enthält die Konsensussequenz D-E-A-D (Asp-Glu-Ala-Asp) und war namensgebend für die Familie (für eine Übersicht (Linder 2006)). DEAD-Box Proteine zeigen RNA-abhängige ATPase-Aktivität. Einige Mitglieder dieser Familie können RNA-Strukturen lösen oder auch RNA-Protein Komplexe umstrukturieren (Linder 2006). Sehr wahrscheinlich wird diese Fähigkeit durch die Bindung und Interaktion mit weiteren Proteinen aktiviert und reguliert (Cordin et al. 2006). Dies konnte vor kurzem für die RNA-Helikase DDX48 (eIF4A3) gezeigt werden. Die RNA-abhängige ATPase Aktivität wird durch eine Interaktion mit dem RNA-Bindeprotein Barentsz stimuliert (Noble & Song 2007). Im Gegensatz dazu wird die ATPase-Aktivität durch eine Interaktion mit dem Heterodimer Mago-Y14 inhibiert (Ballut et al. 2005). In hippokampalen Neuronen der Ratte ist eIF4A3 in somatodendritischen Regionen lokalisiert. Des Weiteren wurden in endogenen eIF4A3-enthaltenden RNPs dendritisch lokalisierte mRNAs wie z.B. *Arc*, nachgewiesen (Giorgi et al. 2007). Weiter Komponenten dendritischer RNPs sind die RNA-Helikasen DDX1, DDX3 und DDX5/DDX17 (Kanai et al. 2004).

RNA-Bindeproteine sind häufig multifunktionelle Proteine. Ein Beispiel dafür ist das Einzelstrang-bindende DNA- und RNA-Bindeproteine Pur alpha (Pur- $\alpha$ ), das als eine weitere Komponente von dendritischen RNPs identifiziert wurde (Ohashi et al. 2002, Kanai et al. 2004, Johnson et al. 2006). Zum einen bindet Pur- $\alpha$  die nichtkodierende RNA BC1 und ist möglicherweise an dessen Transport in die Dendriten von Neuronen beteiligt (Johnson et al. 2006, Ohashi et al. 2002). Zum anderen reguliert Pur- $\alpha$  aber auch die Transkription des *BC1* Gens (Kobayashi et al. 2000). Zusätzlich wird vermutet, dass Pur- $\alpha$  eine Funktion bei der Regulation der Translation ausüben kann (Gallia et al. 2000).

Die Repression der Translation ist ein wichtiges Kriterium der RNA Lokalisation, um eine verfrühte Proteinexpression zu verhindern (Dahm & Kiebler 2005). Neben den schon erwähnten RNA-Bindeproteinen können auch kleine, nichtkodierende RNAs (z.B. BC1) oder microRNAs (miRNAs) die Translation einer Ziel-mRNA kontrollieren. miRNAs sind ungefähr 21-23 Nukleotide (nt) lange RNAs, die sich an ihre Ziel-mRNA anlagern können. Diese in Säugern nicht ganz komplementäre Basenpaarung führt zur Translationsinaktivierung des Transkripts (Cao et al. 2006). Dieser Mechanismus zur Hemmung der Translation lokalisierter mRNAs ist jedoch in Säugern bisher noch wenig untersucht.

Zahlreiche Studien legen nahe, dass ein intaktes Zytoskelett essentiell für die Lokalisation von mRNAs ist (Jansen 2001, Matus 2005). Für diesen aktiven Transport entlang von Mikrotubuli werden Motorproteine (Kinesin und Dynein) benötigt. Trotz der Vielzahl an identifizierten Mitgliedern der Kinesin-Familie (KIF) wurden bislang nur wenige mit dem Transport von

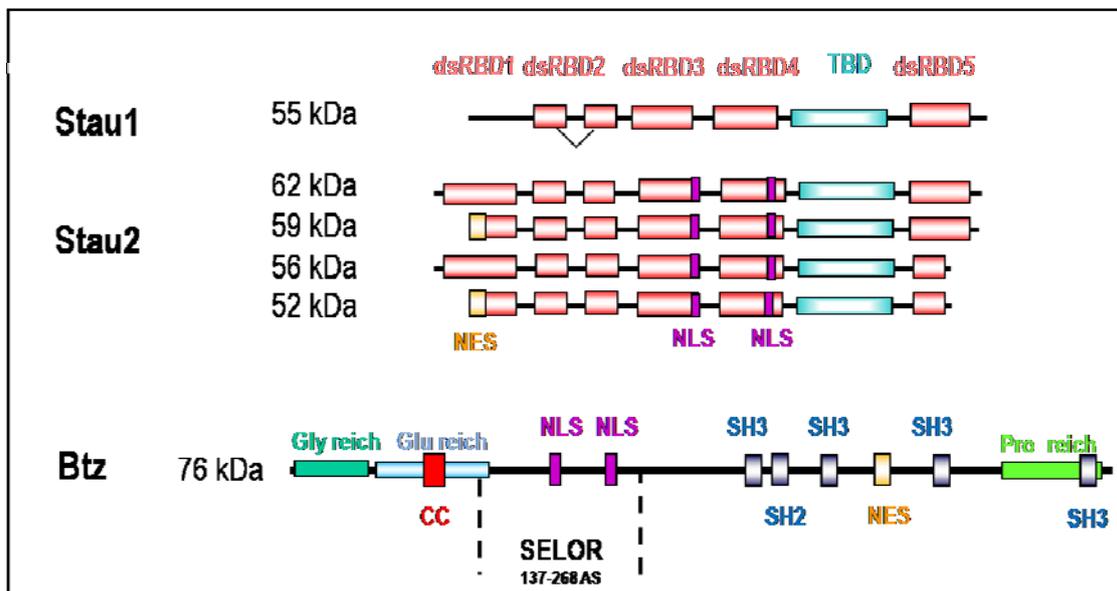
dendritischen RNPs in Verbindung gebracht. Die schwere Kette des Kinesin-1 Komplexes (*kinesin heavy chain*, KHC) bindet z.B. zahlreiche Markerproteine der Transport-RNPs, wie z.B. Staufen, Pur- $\alpha$ , identifiziert werden. Dieser Komplex enthielt auch die dendritisch lokalisierten mRNAs *CaMKII $\alpha$*  und *Arc* (Kanai et al. 2004). Vor kurzem wurde ein weiteres Motorprotein KIF3C, eine Untereinheit von Kinesin-2, in Zusammenhang mit dendritischen RNPs gebracht. KIF3C interagiert mit dem RNA-Bindeprotein FMRP (*fragile X mental retardation protein*), das möglicherweise ebenfalls eine Komponente von dendritischen RNPs darstellt. Es wird vermutet, dass FMRP als Adapter zwischen RNPs und Motorproteinen fungiert (Davidovic et al. 2007).

## **2.3 Staufen und Barentsz**

Das Doppelstrang-RNA-Bindeprotein Staufen wurde erstmals als *trans*-agierender Faktor bei genetischen Studien in *Drosophila melanogaster* identifiziert (St Johnston et al. 1991). Staufen ist während der Oogenese und Embryogenese entscheidend am Transport von *oskar*, *bicoid* und *prospero* mRNA beteiligt und co-lokalisiert mit diesen RNAs *in vivo* (Micklem et al. 2000, Li et al. 1997a, Ferrandon et al. 1994). Im Gegensatz zu *Drosophila melanogaster* besitzen Säuger zwei Gene, die für die Proteine Stau1 und Stau2 kodieren. Säuger-Staufen enthalten mehrere Doppelstrang-RNA-Bindedomänen (dsRBP) und eine potentielle Tubulin-Bindedomäne (TBD) (Abbildung 2.2). Beide Staufenproteine werden in hippokampalen Neuronen in RNPs in die Dendriten transportiert (Kohrmann et al. 1999, Tang et al. 2001, Duchaine et al. 2002, Goetze et al. 2006). Mit Hilfe der Zeitraffer-Videomikroskopie gelang der Nachweis von bidirektionalen Bewegungen der Stau1- bzw. Stau2-enthaltenden RNPs (markiert mit einem GFP-Stau-Fusionsprotein) in Dendriten (Kohrmann et al. 1999) (Zeitelhofer et al 2008 submitted). Staufen ist sowohl in der Fliege, in *Xenopus* Oozyten wie auch in Säugerzellen am RNA Transport beteiligt und kommt in dendritischen RNPs mit weiteren RNA-Bindeproteinen (z.B. Pur- $\alpha$ , hnRNP Q/Syncrip, DDX3) vor (Ohashi et al. 2002, Kanai et al. 2004, Johnson et al. 2006). Daher gilt Staufen mittlerweile als bester Marker für den RNA Transport. Zusätzlich spielt Stau1 eine Rolle bei einem vor kurzem aufgedeckten Stau1-abhängigen Mechanismus des mRNA-Abbaus (*Stau1-mediated mRNA Decay*, SMD) (Kim et al. 2005).

Im Gegensatz zu Stau1 kommt Stau2 überwiegend im Gehirn vor (Duchaine et al. 2002). Aufgrund von alternativem Spleißen lassen sich im Gehirn der Ratte mindestens drei Stau2-Isoformen nachweisen. In hippokampalen Neuronen, denen Stau2 fehlt, kommt es zu einer fehlerhaften Lokalisierung der dendritisch lokalisierten  $\beta$ -Aktin mRNA (Goetze et al. 2006). Zusätzlich gibt es Hinweise auf eine Interaktion zwischen Stau2 und KHC (Jeong et al. 2007). Die genaue Funktion der Staufenproteine während des RNA Transportes ist bisher jedoch ungeklärt.

Das RNA-Bindeprotein Barentsz (Btz) wurde wie Staufens erstmals in *Drosophila melanogaster* identifiziert. Btz ist zusammen mit Stau in einem *oskar* mRNA-enthaltenden Komplex enthalten und ist essentiell für den Transport dieser mRNA zum posterioren Pol der Oozyte (van Eeden et al. 2001). Btz kommt auch in hippocampalen Neuronen zusammen mit Stau1 in RNPs vor. Über Co-immunpräzipitation wurde eine RNA-abhängige Interaktion zwischen den beiden Proteinen nachgewiesen (Macchi et al. 2003). Vor kurzem wurde Btz (Degot et al. 2002) zusammen mit eIF4A3 (Chan et al. 2004) und dem Heterodimer Magoh-Y14 (Le Hir et al. 2001a) als Kernkomponente des exon-exon-junction Komplexes (EJC) identifiziert (Tange et al. 2005, Bono et al. 2006). Im Zellkern markiert der EJC gespleißte mRNAs etwa 20-24 nt oberhalb der Splice-Stelle. Dabei fungiert Btz als molekulares Bindeglied zwischen den Komponenten. Btz interagiert über seine *speckle localizer and RNA binding module* (SELOR)-Domäne direkt mit der RNA und den Proteinen eIF4A3 und Magoh (Bono et al. 2006, Ballut et al. 2005). Der EJC bleibt an die mRNA gebunden und bietet vermutlich eine Plattform für die Interaktion weiterer Proteine (Le Hir et al. 2001b). Damit könnte der EJC eine Brücke zwischen dem *nuclear priming* im Zellkern und der zytoplasmatischen RNA Lokalisation bilden. Zusätzlich spielt der EJC eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von fehlerhaften Transkripten (*Nonsense-mediated mRNA Decay*, NMD) (für eine Übersicht siehe (Maquat 2005, Chang et al. 2007).



**Abbildung 2.2: Schematische Darstellung von Stau1, Stau2 und Btz (Ratte)**

Alle Säuger-Staufens verfügen über mehrere Doppelstrang-RNA Bindedomönen (dsRBD) und eine potentielle Tubulin-Bindedomäne (TBD) (türkis). *In vitro* weisen nur dsRBD3 und dsRBD4 eine Bindekapazität auf. Die RBD2 ist durch eine Prolin-reiche Sequenz unterbrochen. Es kommen mindestens vier Isoformen von Stau2 vor. Diese enthalten Kern-Lokalisierungssignale (NLS) (violett) und in den Isoformen 59 und 52 auch ein NES (orange). Btz enthält in seiner N-terminalen Region ein Glycin-reiche (Gly reich) (gün) sowie eine Glutamin-reiche (Glu reich) (hellblau) und im C-terminalen Bereich eine Prolin-reiche (Pro reich) (hellgrün) Domäne. Die RNA-Bindung erfolgt über die sog. *speckle localizer and RNA binding module region* (SELOR)-Region. Zudem verfügt Btz über mehrere potentielle Protein-Protein-Interaktionsdomänen: coiled-coil (CC) (rot), SH2 und SH3 (blau). Btz enthält zwei NLS (violett) und ein NES (orange).

## **2.4 Ziele dieser Arbeit**

Die spezifische Veränderung einzelner Synapsen in komplexen Nervensystemen (synaptische Plastizität) ist eine Grundvoraussetzung für die Fähigkeit, zu Lernen und neue Gedächtnisinhalte zu speichern. Während die Bedeutung der RNA Lokalisierung und der lokalen Proteinsynthese für die synaptische Plastizität mittlerweile gut etabliert ist, ist die molekulare Maschine, die spezifische RNAs erkennt und in Dendriten transportiert, noch größtenteils unbekannt. Ein besseres Verständnis dieser Maschinerie ist aber eine Grundvoraussetzung, um verstehen zu können, wie Neurone diesen komplexen Vorgang bewerkstelligen.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die molekulare Zusammensetzung von neuronalen RNA-Transportpartikeln zu entschlüsseln. Dazu sollten endogene neuronale RNPs aus Rattenhirn anhand von drei Markerproteinen (Stau1, Stau2, Btz) biochemisch isoliert und die Protein-komponenten über Massenspektrometrie identifiziert werden. Zunächst sollte eine biochemische Reinigung mit anschließender quantitativer Immunpräzipitation der endogenen RNPs etabliert werden. Die Validierung und initiale Charakterisierung der Komponenten sollte über Western Blot-Analysen erfolgen. Neben der Identifizierung der Proteine, die den RNA Transport vermitteln, war ein weiteres Ziel, die in diesen RNPs enthaltenen RNAs zu identifizieren. Erste Kandidaten-Untersuchungen sollten mittels semi-quantitativer PCR durchgeführt werden. Die Identifikation unbekannter in den entsprechenden RNPs enthaltenen RNAs sollten über Genchip-Analysen ermittelt werden.

## **3. Material und Methoden**

Alle hier verwendeten Chemikalien stammen von den Firmen BioRad, GE-Healthcare, Fluka, Invitrogen, Merck, Roth, Roche, Serva und Sigma-Aldrich. Das Optiprep Dichtegradienten Medium stammt von der Firma Axis Shield.

### **3.1 Antikörper**

#### **3.1.1 Primärantikörper aus eigener Herstellung**

Alle affinitätsgereinigten Antikörper wurden sowohl für Western Blot als auch für Immunfärbungen in einer Konzentration von 1 µg/ml eingesetzt.

##### **Hase anti-Barentsz (anti-Btz H3)**

Dieses Antiserum wurde von Sven Kröning im Rahmen seiner Doktorarbeit hergestellt (Sven Kröning Doktorarbeit, 2004). Als Antigen diente eine C-terminale Region des Barentsz-Proteins (Btz<sub>C2</sub>). Die Antikörper wurden im Rahmen dieser Arbeit über eine GST-Btz<sub>C2</sub>-Säule affinitätsgereinigt.

Antigen: His<sub>6</sub>-Btz<sub>C2</sub> (AS 358-527)

##### **Hase anti-Barentsz (anti-Btz H12 und anti-Btz H13)**

Diese Antiseren wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Für die Isolierung von hochaffinen, spezifischen Antikörpern wurden GST-Btz<sub>C2</sub>-Affinitätssäulen verwendet.

Antigen: His<sub>6</sub>-Btz<sub>C2</sub> (AS 358-527)

##### **Hase anti-Barentsz (anti-Btz H8 und anti-Btz H9)**

Diese Antiseren wurden ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit hergestellt.

Als Antigen wurde das Barentsz-Gesamtprotein (Btz<sub>FL</sub>) als rekombinantes Fusionsprotein eingesetzt. Die Antikörper wurden über eine GST-Btz<sub>FL</sub>-Affinitätssäule gereinigt.

Antigen: His<sub>6</sub>-Btz<sub>FL</sub>

**Ziege anti-Barentsz (anti-Btz<sub>C</sub>)**

Dieses Antiserum wurde bei der Firma Biogenesis (Berlin) hergestellt (Sven Kröning Doktorarbeit 2004). Als Antigen diente eine C-terminale Region des Barentsz-Proteins. Für die Isolierung spezifischer Antikörper mittels Affinitätsreinigung wurde eine GST-Btz<sub>C2</sub>-Säule verwendet.

Antigen: His<sub>6</sub>-Btz<sub>C2</sub> (AS 358-527)

**Hase anti-Staufen1 (anti-Stau1 H4)**

Zur Generierung dieses Antiserums wurde das Gesamtprotein (Stau1<sub>FL</sub>) als Antigen verwendet. Dieses Antiserum wurde im Rahmen dieser Arbeit hergestellt und die Antikörper wurden über eine GST-Stau1<sub>FL</sub>-Affinitätssäule isoliert. Die Plasmide für die bakterielle Expression von His<sub>6</sub>- und GST-markiertem humanem Stau1<sub>FL</sub>, wurden von Dr. L. Maquat (Kim et al. 2005) zur Verfügung gestellt.

Antigen: His<sub>6</sub>-Stau1<sub>FL</sub>

**Hase anti-Staufen2 (anti-Stau2 H5 und anti-Stau2 H7)**

Diese Antiseren wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Als Antigen wurde die Gesamtlänge der 62 kDa Isoform des Staufen2 Proteins verwendet. Für die Isolierung spezifischer Antikörper wurden GST-Stau2<sup>62</sup>-Affinitätssäulen verwendet.

Antigen: His<sub>6</sub>-Stau2<sup>62</sup>

**3.1.2. weitere Primärantikörper**

Antikörper	Western Blot	Firma / beschrieben in
Hase anti-Calnexin	1:2000	A.Helenius (Chen et al. 1995)
Maus anti-CKII $\alpha$	1: 500	Abnova
Hase anti-DDX5	1:1000	Genway
Maus anti-DDX9	1:500	Abnova
Maus anti-eIF4E	1:500	Transduction Laboratories
Hase anti-eIF4A3	1:1000	N. Sonenberg (Li et al. 1999)
Maus anti-eIF4A3	1:100	A. Krainer (Zhang et al. 2007)
Maus anti-FMRP	1:500	Chemicon
Ziege anti-GST	1:1000	GE Healthcare (Amersham Pharmacia)
Maus anti-His	1:1000	Quiagen
Hase anti-hnRNP U	1:200	Abcam
Hase anti-KIF3A	1:2000	Sigma-Aldrich
Maus anti-NPM1	1:500	Abnova
Hase anti-NCBP80	1:1000	R.Lührmann (Merz et al. 2007)
Hase anti-PABP1	1:1000	USBiological
Ziege anti-Poly(rC)BP1	1:300	Santa Cruz
Hase anti-Pur- $\alpha$	1:1000	Peptid-AK (Biogenesis);S. Kröning (AG Kiebler)
Ziege anti-RBM4	1:100	Abcam
Ziege anti-RBMX (hnRNPG)	1:100	SantaCruz
Hase anti-L7a	1:1000	A. Ziemiecki (Ziemiecki et al. 1990)
Maus anti-Tubulin	1:5000	Sigma-Aldrich
Hase anti-U5-116kDa	1:1000	R.Lührmann (Merz et al. 2007)
Ziege anti-Upf1	1:200	Abcam
Kaninchen anti-ZBP1	1:1000	Dr. S. Hüttelmaier, Halle

### **3.1.3 Sekundärantikörper**

Alle Sekundärantikörper für Western Blotting wurden über die Firmen Rockland und LI-COR Bioscience bezogen. Sie sind entweder mit IRDye700 oder 800 konjugiert und werden mit dem Odyssey Infrarotfluoreszenzdetektor (LI-COR Bioscience) analysiert.

Protein A IRDye <sup>TM</sup> 800 konjugiert	1:2000
Esel anti-Kaninchen IgG IRDye <sup>TM</sup> 800 konjugiert	1:10000
Esel anti-Kaninchen IgG IRDye <sup>TM</sup> 700 konjugiert	1:10000
Esel anti-Maus IgG IRDye <sup>TM</sup> 700 konjugiert	1:5000
Esel anti-Maus IgG IRDye <sup>TM</sup> 800 konjugiert	1:10000
Esel anti-Ziege IgG IRDye <sup>TM</sup> 700 konjugiert	1:10000

Sekundärantikörper für Immunfärbungen wurden von den Firmen Invitrogen und Dianova bezogen.

Esel anti-Kaninchen Ziege Alexa488	1: 2000
Ziege anti-Kaninchen Cy3 konjugiert	1:2000
Ziege anti-Maus Cy3 konjugiert	1:2000
Ziege anti-Maus Alexa488	1:250

#### Markierung von Primärantikörpern:

Zenon <sup>TM</sup> Alexa Fluor 488 Rabbit IgG Labeling Kit	Invitrogen
---	------------

### 3.2 Plasmide

Vektor	Verwendung	Referenz
pRSETb	Bakterielle Expression von His <sub>6</sub> -markierten Fusionsproteinen	Invitrogen
pGEX-4T	Bakterielle Expression von GST-markierten Fusionsproteinen	GE Healthcare (Amersham Pharmacia)
pd2EGFP-N1	Expression von GFP-markierten Fusionsproteinen in Säugerzellen	Clontech
Ursprung pBluescript KS (β-Aktin Promotor)	Expression des TCR-β Mini Gens (Exon 3 bis Exon 6) WT 3C1 / PTC 7C6	(Muhlemann et al. 2001, Carter et al. 1995, Li et al. 1997b)
pSUPERIOR-EGFP	Expression von shRNAs in Säugerzellen	Oligoengine (Brummelkamp et al. 2002)

Für die bakterielle Expression von Btz, Stau1 und Stau2 wurden die im Folgenden aufgeführten Plasmide verwendet.

Fusionsprotein	Aminosäuresequenz (Spezies)	Vektor	Referenz
His <sub>6</sub> -Btz <sub>FL</sub> <sup>1)</sup>	AS 1-699 (Ratte)	pRSETb	Karra, im Rahmen dieser Arbeit
GST-Btz <sub>FL</sub> <sup>1)</sup>	AS 1-699 (Ratte)	pGEX-4T2	Karra, im Rahmen dieser Arbeit
His <sub>6</sub> -Btz <sub>C2</sub>	AS 358-527 (Ratte)	pProEX	Dr. Paolo Macchi (AG Kiebler)
GST-Btz <sub>C2</sub>	AS 358-527 (Ratte)	pGEX 4T1	Dr. Paolo Macchi (AG Kiebler)
His <sub>6</sub> -Stau1 <sub>FL</sub>	AS 1-496 (Mensch)	pRSETb	Dr. L. Maquat (Kim et al. 2005)
GST-Stau1 <sub>FL</sub>	AS 1-496 (Mensch)	pGEX-6P1	Dr. L. Maquat (Kim et al. 2005)
His <sub>6</sub> -Stau2 <sup>62</sup>	AS 1-570 (Maus)	pRSETb	Dr. Paolo Macchi (AG Kiebler)
GST-Stau2 <sup>62</sup>	AS1-570 (Maus)	pGEX-6P1	Dr. Paolo Macchi (AG Kiebler)

<sup>1)</sup>Die cDNA für diese Plasmide wurden aus einem bereits vorhandenen Vektor (pd2EGFP-Btz (Macchi et al. 2003)), durch PCR-Amplifikation (Primer s. 3.3.1) gewonnen und mit dem jeweils angegebenen, linearisierten, Vektor ligiert.

Das Plasmid zur bakteriellen Expression von GST-ZBP1 wurde freundlicherweise von Dr. Stefan Hüttelmaier (Halle) zur Verfügung gestellt.

### **3.3 Enzyme und Oligonukleotide (Primer)**

Enzyme und entsprechende Puffer wurden von den Firmen Promega, MBI Fermentas und New England Biolabs bezogen.

dNTPs, GeneRuler™ DNA Ladder Mix und Loading Dye Solution stammen von MBI Fermentas.

Die verwendeten Oligonukleotide wurden bei Sigma-Aldrich synthetisiert.

Soweit nicht anders beschrieben, wurde bei den verschiedenen Kits, die von den Firmen Peqlab, Promega und Qiagen stammen, jeweils analog den Herstellerangaben gearbeitet.

#### **3.3.1 Primer zur Klonierung der Barentsz-Konstrukte**

His<sub>6</sub>-und GST-Btz<sub>FL</sub>:

Vorwärts (*Bgl* II): 5'-TTA GAT CTA TGG CGG ACC GGC GGC GGC-3'

Rückwärts (*Xho* I): 5'-AAC TCG AGT TAA CTG GAA CCT CTG CTT ACA AC-3'

#### **3.3.2 Primer zur Herstellung der shRNA Plasmide (pSUPERIOR)**

siBtz-1:

Vorwärts 5'- GATCCCC**GGACCAATCTATACCCATGTTCAAGAGACCTGGTTAGA-**  
(Btz1651F): TATGGGTACTTTTTTA - 3'

Rückwärts 5'- AGCTTAAAA**GGACCAATCTATACCCATGTCTCTTGAACCTGGTTAGA-**  
(Btz1651R): TATGGGTACGGG -3'

Die hervorgehobene Sequenz liegt in der kodierenden Region der Barentsz mRNA (5'-GGACCAATCTATACCCATG -3', Genbank Acc.No. AF 525467) und ist spezifisch für Ratte, Mensch und Maus.

### **3.3.3 Primer für die Polymerase-Ketten Reaktion (PCR)**

Sofern nicht anders angegeben, betrug die Anlagerungstemperatur 58°C. Mit Ausnahmen von CaMKII $\alpha$  und Arc (Phusion-Taq Polymerase, Finnzymes), wurden alle Fragmente mit der Taq-Polymerase von MBI Fermentas amplifiziert.

TCR- $\beta$ pre-mRNA for	5'-GTA CCT GAT CCA GAC AGT TA-3'
TCR- $\beta$ mRNA for	5'-GAC TGA CTG TTC TCG AGG-3'
TCR- $\beta$ rev	5'-GTC AAG GTG TCA ACG AGG AA-3'
BC1 for:	5'-GGG GTT GGG GAT TTA GCT C-3'
BC1 rev:	5'-GGT TGT GTG TGC CAG TTA CC-3'
Arc for (55°C):	5'-CAT TCA GTA TGT GGT GGG CAC C -3'
Arc rev (55°C):	5'-ATG GGA GAG GGG CTT CTT GAT G -3'
MAP2 for:	5'-CAT GCC CCC ATT CCA TCT G-3'
MAP2 rev:	5'-GGA CCC ACT CCA CAA ACT C-3'
$\beta$ -Aktin for:	5'-TTC GCG GGC GAC GAT GCT CC-
$\beta$ -Aktin rev:	5'-CAG GTC CAG ACG CAG GAT GG-3'
tPA for:	5'-AAA GCG GCC GCC GGT CCT ACA GAG CGA CC -3'
tPA rev:	5'-AAA CTC GAG CGT GGT ATA CTT CCC TGC-3'
GAPDH for:	5'-GAG CTG AAC GGG AAG CTC AC-3'
GAPDH rev:	5'-GGA GAG TGC TCA GTG TTG GG-3'

### **3.4 Geräte**

Agarose-Gelkammer	Eigenbau (Werkstatt MPI für Entwicklungs- biologie Tübingen)
Axiovert S100, S200M Fluoreszenzmikros- kope	Zeiss
Dounce-Homogenisator	Multimed
Geldokumentationssystem CN-3000-WL	Peqlab
GeneQuant pro Spektralphotometer	GE Healthcare (Amersham Pharmacia)
Infrafluoreszenzdetektor Odyssey	LI-COR Bioscience
Inkubationsschüttler	Bartelt
Laborrührer RGL-55	Heidolph
Minifuge GL	Heraeus
Tischzentrifuge Universal 32	Hettich
Mini-Protean 3 Cell SDS-PAGE System	BioRad
TLX Optima Ultrazentrifuge	Beckman
Rotor: TLA 100.3	
PCR Maschine Thermal Cycler, PTC-200	MJ Research/Biozym
Peltier	
pH Meter MP 225	Mettler Toledo
Powerpac 300 Spannungsgerät	BioRad
Überkopf-Rotierer RZR-1 und REAX-2	Heidolph
UP 400S Ultraschallprozessor	Dr. Hielscher
Superspeed-Zentrifuge Avanti™ J-25	Beckman Coulter
Rotor: JLA10.500, JS13.1	
Thermomixer compact	Eppendorf
Trans-Blot Cell Naßblotzelle	BioRad
Ultraspeed-Zentrifuge Optima LE-80K	Beckman Coulter
Rotor: SW41	
Vortexer VF2	Janke & Kunkel IKA Labortechnik
Zentrifuge 5417C, 5417R	Eppendorf

### **3.5 Tiere**

Ratten (*Rattus norvegicus domesticus*):

Auszuchtstamm Him:

OFA SD (Sprague-Dawley)

Abteilung für Labortierkunde und –genetik  
(Medizinische Universität Wien, A2325 Him-  
berg, Österreich)

Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*):

New Zealand White

Abteilung für Labortierkunde und –genetik  
(Medizinische Universität Wien, A2325 Him-  
berg, Österreich)

### **3.6 Säugerzellen**

Primärkultur hippocampaler Neuronen  
(Ratte)

HeLa-Zelllinie

Eigene Herstellung (Sabine Thomas, John P.  
Vessey; Manuel Zeitelhofer)

DSMZ Braunschweig

Die hippocampalen Neuronen (Ratte) und HeLa-Zellen werden in unserem Labor kontinuierlich von Sabine Thomas und Martina Schwarz kultiviert und zur Verfügung gestellt.

### **3.7 Puffer und Lösungen**

#### **3.7.1 Expression und Reinigung von Proteinen**

LB–Medium:

10 g Trypton  
5 g Hefeextrakt  
10 g NaCl  
mit NaOH auf pH 7,0 einstellen  
mit destilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt  
autoklaviert

TYNP–Medium:

20 g Trypton  
15 g Hefeextrakt  
8 g NaCl  
2 g NaHPO<sub>4</sub>  
1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
mit NaOH auf pH 7,0 einstellen  
mit destilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt  
autoklaviert

IPTG	1 M Stammlösung in ddH <sub>2</sub> O
250x Ampicillin	25 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O
1000x Chloramphenicol	33 mg/ml in Ethanol

Proteinase Inhibitoren für *E.coli*:

1000x Leupeptin	1 mg/ml
1000x Pepstatin (in Methanol)	1 mg/ml
400x Pepfabloc	100 µg/ml

Reinigung von His<sub>6</sub>-Fusionsproteinen unter nativen Bedingungen:

Lysepuffer:	1x PBS pH 7,5 150 mM NaCl 200 µg/ml Lysozym 1% Triton X-100 Proteinase-Inhibitoren (für <i>E.coli</i> ) Nach der Zentrifugation Zugabe von 15 mM Imidazol zum löslichen Überstand
Waschpuffer 1:	1x PBS pH 7,5 15 mM Imidazol 150 mM NaCl
Waschpuffer 2:	1x PBS pH 7,5 1,5 M NaCl
Waschpuffer 3:	1x PBS pH 7.5 20 mM Imidazol
Elutionspuffer:	1x PBS pH 7,1 1 M Imidazol 0,25% Triton X-100 Proteinase-Inhibitoren (für <i>E.coli</i> )

Reinigung von His<sub>6</sub>-Fusionsproteinen unter Hybrid-Bedingungen:

Denaturierender Lysepuffer:	8 M Harnstoff 200 µg/ml Lysozym Proteinase Inhibitoren (für <i>E.coli</i> ) Nach der Zentrifugation Zugabe von 15 mM Imidazol zum löslichen Überstand
Denaturierender Waschpuffer 1:	8 M Harnstoff 15 mM Imidazol 150 mM NaCl

Denaturierender Waschpuffer 2:	8 M Harnstoff 1,5 M NaCl
Renaturierender Waschpuffer 3:	1x PBS pH 7.1
Elutionspuffer:	1x PBS pH 7,1 1 M Imidazol 0,25% Triton X-100 Proteinase-Inhibitoren (für <i>E.coli</i> )

#### Reinigung von GST-Fusionsproteinen:

Lysepuffer:	1x PBS pH 7,5 200 µg/ml Lysozym 1 mM DTT 1 mM EDTA 1 mM EGTA 10% Glycerin 0,5% Triton X-100 Proteinase Inhibitoren (für <i>E.coli</i> )
Waschpuffer 1:	1xPBS pH 7,5
Waschpuffer 2:	1xPBS pH 7,5 350 mM NaCl
Waschpuffer 3:	50 mM Tris pH 8,0
Elutionspuffer:	50 mM Tris pH 8,0 25–50 mM reduziertes Gluthation 0,25% Triton X-100 Proteinase Inhibitoren (für <i>E.coli</i> )

### **3.7.2 Affinitätsreinigung polyklonaler Antikörper**

Kopplungspuffer:	250 mM NaCl 25 mM Tris-Puffer pH 8,5
Waschpuffer 1:	1,5 M NaCl 25 mM Tris-Puffer pH 8,5
Waschpuffer 2:	0,5 M MgCl <sub>2</sub>
Elutionspuffer:	200 mM Glycin pH 2,5 neutralisieren mit 1,5 M Tris-Puffer pH 8,8
Optional: MgCl <sub>2</sub> Elution	4 M MgCl <sub>2</sub>

### 3.7.3 Analyse von Proteinen

SDS-Polyarylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE):

4x Laemmli-Puffer:	8% SDS
	200 mM Tris-HCl pH 6,8
	40% Glycerin (v/v)
	0,1% Bromphenolblau
	200 mM DTT

2x Laemmli-Puffer:	50% 4x Laemmli
	10% Tris pH 8,5

10x SDS-PAGE-Laufpuffer:	0,25 M Tris
	1,92 M Glycin
	1% SDS

Trenngele (5ml):	10%
Wasser	2 ml
30% Acrylamid-Mix	1,7 ml
1,5 M Tris pH 8,8	1,3 ml
10% SDS	50 $\mu$ l
10% APS	50 $\mu$ l
TEMED	2 $\mu$ l

Sammegel (1ml):	
Wasser	0,68 ml
30% Acrylamid-Mix	0,17 ml
1 M Tris pH 6,8	0,13 ml
10% SDS	10 $\mu$ l
10% APS	10 $\mu$ l
TEMED	1 $\mu$ l

Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen:

Coomassie-Lösung:	0,1% Coomassie Brilliant Blau R 250 40% Methanol 10% Essigsäure
Entfärbelösung:	40% Methanol 10% Essigsäure
Trocknungslösung:	20% Ethanol 3% Glycerin

Western Blotting:

10x Transferpuffer:	200 mM Tris 1,5 M Glycin
Ponceau-S-Lösung:	0,2% (w/v) Ponceau S 3% TCA (w/v) in destilliertem Wasser
10x TBS:	100 mM Tris 1,5 M NaCl mit konz. HCl auf pH 7,2 eingestellt
TBS-T:	1x TBS mit 0,1% Tween-20
Blocklösung:	1x DetectorBlock (KPL) in ddH <sub>2</sub> O

**3.7.4 Gewebeextraktion und Dichtegradient**Zellextraktion:

Lysepuffer:	50 mM Tris pH 7,5 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1% Triton X-100 Proteinase-Inhibitor-Cocktail (Tablette bei Verwendung zugeben)
-------------	---

Gewebeextraktion:

## a) Zytoplasmatisches Hirnextrakt

4x Extraktionspuffer (4x EB)	120 mM HEPES pH 7,0 600 mM KCl 16% Glycerin 0,4% NP-40 bei Verwendung frisch dazugeben: 40 U/ml RNase-Inhibitor 1 mM DTT Proteinase-Inhibitor-Cocktail Tablette
1x Extraktionspuffer (1xEB)	25% 4x Extraktions-Puffer 1 mM DTT Proteinase-Inhibitor-Cocktail (1 Tablette auf 10ml)

## b) Nukleares Hirnextrakt (NE)

Homogenisierungspuffer (HP II):	0,32 M Sucrose 1 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 3 mM $\text{MgCl}_2$ 1 mM EGTA pH7,0 10 mM HEPES Optional: 0,3% Triton X-100
Homogenisierungspuffer (HP III):	2,39 M Sucrose 1 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 3 mM $\text{MgCl}_2$ 1 mM EGTA pH7,0 10 mM HEPES Optional: 0,3% Triton X-100

*Nuclear protein extraction buffer*

(NEB):	20 mM HEPES 1,5 mM $\text{MgCl}_2$ 0,42 M NaCl 0,2 mM EDTA 25% Glycerin 1 mM DTT Proteinase-Inhibitor-Cocktail und RNase Inhibitor
--------	--

Dichtegradientenzentrifugation:

15% Gradientenlösung (10 ml)	5 ml ddH <sub>2</sub> O 2,5 ml 4x Extraktions-Puffer 2,5 ml 60% Optiprep (Axis Shield) 1 mM DTT
30% Gradientenlösung (10 ml)	2,5 ml ddH <sub>2</sub> O 2,5 ml 4x Extraktions-Puffer 5 ml 60% Optiprep 1 mM DDT

Die Ansätze sind für zwei Gradienten ausreichend.

**3.7.5 GST-Pulldown und Immunpräzipitation (IP)**GST-Pulldown:

Waschpuffer 1:	1x Extraktions-Puffer
Waschpuffer 2:	150 mM KCl 1x Extraktions-Puffer
Elutionspuffer:	2 M Harnstoff (in PBS pH 7,5 gelöst) 600 mM NaCl 0,1% NP-40 PBS pH 7,5 Proteinase-Inhibitor-Cocktail

Immunpräzipitation:

Blocklösung:	1 mg/ml tRNAs (Stammlösung 10mg/ml) 1 mg/ml BSA (Stammlösung 20mg/ml) 1x Extraktions-Puffer 1 mM DTT Proteinase-Inhibitor-Cocktail (1 Tablette) 40 U/ml RNase Inhibitor
Waschpuffer 1:	1x Extraktions-Puffer
RNase-Elution:	400 µ/ml RNase A/T1 Mix 1 mM MgCl <sub>2</sub> PBS pH 7,5 Proteinase-Inhibitor-Cocktail
Waschpuffer 2:	150 mM KCl (1x Extraktionspuffer ohne HEPES) 4% Glycerin 0,1% NP-40 1 mM DTT

## Proteinase-Inhibitor-Cocktail

Elutionspuffer: 0,2 M Glycin pH 2,5  
neutralisiert mit 1,5 M Tris-Puffer pH 8,8

**3.7.6 Immunfluoreszenz**

HBSS: 20 mM HEPES pH 7,3  
135 mM NaCl  
4 mM KCl  
1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
2 mM CaCl<sub>2</sub>  
1 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM Glucose

Fixierlösung: 4% Paraformaldehyd in HBSS

Blocklösung (100%): 2% fötales Kälberserum (FCS)  
0,2% Rinderserum-Albumin  
0,2% Fischgelatine  
in HBSS

DAPI-Lösung: 2 ng/ml DAPI in PBS

Einbettmedium: 2,4 g Mowiol (Calbiochem)  
6 g Glycerin  
10 min rühren  
über Nacht stehen lassen  
12 ml 0,2 M Tris pH8.5  
10 min bei 50°C  
2,5% DABCO (bei 37°C)  
15 min bei 5000 g zentrifugieren  
Lagerung bei -20°C

## **3.8 Methoden**

Soweit nicht anders angegeben, wurde bei den verschiedenen Kits der Firma Qiagen zur Isolierung von Plasmid-DNA jeweils analog den Herstellerangaben gearbeitet. Dort finden sich auch die Zusammensetzungen der nicht näher beschriebenen Puffer und Lösungen (Sambrook, Fritsch, Maniatis: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 1989).

### **3.8.1 Herstellung von bakteriell exprimierten Antigenen**

#### **3.8.1.1 Herstellung chemokompetenter *E.coli* ( $\text{CaCl}_2$ Methode)**

*E.coli* besitzt keine natürliche Kompetenz. Mit der im Folgenden beschriebenen Methode wurde der *E.coli* Stamm Rosetta<sup>TM</sup> (DE3) pLysS (Novagen) mittels Calciumchlorid zur Aufnahme von DNA befähigt.

200 ml LB-Medium, mit den entsprechenden Antibiotika versetzt, wurden mit 5 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte ( $\text{OD}_{600}$ ) von 0,5 unter Schütteln wachsen gelassen. Alle folgenden Schritte erfolgten auf Eis bzw. bei 4°C. Die Kultur wurde zur Abkühlung für eine Minute auf Eis gestellt und anschließend bei 5500rpm (JLA10.500) zentrifugiert. Die Zellen wurden vorsichtig mit 40ml steriler  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (100 mM  $\text{CaCl}_2$  und 10 mM Tris pH 7,5) gewaschen und zentrifugiert. Die Bakterien wurden in 40ml  $\text{CaCl}_2$ -Lösung resuspendiert und 30 min bis 2 h auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (5500rpm, JS13.1) wurden die Zellen in 8ml  $\text{CaCl}_2$ -Lösung und 8% Glycerin aufgenommen. 100µl Aliquots wurden in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

#### **3.8.1.2 Transformation von *E.coli***

Für die bakterielle Expression von Fusionsproteinen wurde der *E.coli* Stamm Rosetta, für die Amplifikation und Isolierung von DNA der *E.coli* Stamm One shot TOP10 (Invitrogen) mit der entsprechenden Plasmid-DNA wie folgt transformiert.

100 µl chemokompetente Bakterien wurden mit 1 µl der zu transformierenden Plasmid-DNA gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42°C in einem Wasserbad für eine Minute, wobei die Plasmid-DNA in die Zellen aufgenommen wird. Der Transformationsansatz wurde für 1 min auf Eis gestellt, mit 500 µl LB-Medium versetzt und bei 37°C für 1 h inkubiert. 200 µl der Bakterienkultur wurden auf einer Agarplatte mit den entsprechenden Antibiotikaresistenzen ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

### **3.8.1.3 Bakterielle Expression von Fusionsproteinen**

Als Vorkultur wurden 100 ml LB-Medium, das zuvor mit Ampicillin (Vektorresistenz) und Chloramphenicol (Resistenz des *E.coli* Stammes Rosetta) versetzt wurde, mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37° über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Kultur mit 200 ml vorgewärmtem TYNP-Medium und 2% Glukose verdünnt und bei 37°C für 1 h weiter geschüttelt. Nach Zugabe von 300 ml gekühltem (~12°C) TYNP-Medium wurde die Kultur bei 25°C bis zu OD<sub>600</sub> von 0,8 wachsen gelassen. Die Induktion der Expression erfolgte durch Zugabe von 0,1 mM IPTG. Nach 2-2<sup>1</sup>/<sub>2</sub>h wurden die Zellen bei 5500 rpm und 4°C (JLA10.500) pelletiert, einmal mit kaltem PBS (mit Proteinase Inhibitoren versetzt) gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das Pellet wurde bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

### **3.8.1.4 Reinigung von Polyhistidin-Fusionsproteinen**

Für eine Reinigung von Polyhistidin-Fusionsproteinen wurde die immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) durchgeführt. Die Reinigung kann prinzipiell sowohl unter nativen, denaturierenden als auch Hybrid-Bedingungen durchgeführt werden. In allen verwendeten Puffern sollte weder DTT, da es die Nickel-Ionen reduziert, noch Chelatliganden (z.B. EDTA und EGTA) vorhanden sein, da letztere mit den zweiwertigen Nickel-Ionen Komplexe bilden und diese somit von der Agarose lösen können. Die Elution wird durch eine kompetitive Verdrängung aus der Bindung mit Imidazol ermöglicht.

Native Bedingungen:

Das lösliche kleinere Barentsz-Antigen (His<sub>6</sub>-Btz<sub>C2</sub>) wurde unter nativen Bedingungen gereinigt. Alle folgenden Schritte wurden, sofern nicht anders angegeben, auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. Das Bakterien-Pellet wurde in 20 ml Lyse-Puffer resuspendiert und die Zellen wurden durch Ultraschallbehandlung aufgebrochen. Nach Abtrennung der Zelltrümmer (13.000 rpm, 25 min, JS13.1) wurde das Bakterienlysate mit 15 mM Imidazol versetzt und in einem 50ml Falcon-Röhrchen mit 4 ml Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose eine Stunde über Kopf rotieren gelassen. Ungebundene Proteine befinden sich nach einer einminütigen Zentrifugation (1000 rpm, Minifuge GL) im Überstand. Durch ausgiebiges Waschen (neun Säulenvolumen) unter stringenten Bedingungen (2x Waschpuffer 1, 1x Waschpuffer 2, 1x Waschpuffer 3) wurden unspezifisch gebundene Proteine von der Matrix entfernt. Anschließend wurde das Polyhistidin-Fusionsprotein zweimal mit je zwei Säulenvolumen 1 M Imidazol für 10 min auf dem Rotationsmischer bei RT geschüttelt. Das Eluat wurde durch eine einminütige Zentrifugation (1000 rpm) gewonnen und mittels Ultrafiltration (Vivaspin Concentrator) auf ein Volumen von 1 ml eingengt. Nach Zugabe von 20 ml PBS (mit Proteinase Inhibitoren versetzt) wurde die Imidazol-Konzentration verdünnt und das Eluat erneut auf ein Volumen von 1 ml konzentriert.

Hybrid-Bedingungen:

Die Gewinnung der Antigene His<sub>6</sub>-Stau1<sub>FL</sub>, His<sub>6</sub>-Stau2<sup>62</sup> und His<sub>6</sub>-Btz<sub>FL</sub> erfolgte unter Hybrid-Bedingungen. Dabei wurden die Lyse, die Adsorption und die Waschschriffe in denaturierenden Puffern (s. Abschnitt 7.1) durchgeföhrt. Die Renaturierung der an die Matrix gebundenen Proteine wurde mit mehreren aufeinanderfolgenden PBS-Waschschriffen erzielt. Die Fusionsproteine wurden, wie oben für die native Reinigung beschrieben, eluiert und konzentriert.

Die Reinheit und Spezifität aller verwendeten Antigene wurde mittels SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung und Western Blot überprüft. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte nach Bradford (Bradford 1976). Aliquots von je 0,7-1,0 mg Antigen wurden in einem maximalen Volumen von 700 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

### **3.8.1.5 Immunisierung von Hasen**

Die Haltung, Immunisierung und Blutung der Kaninchen wurde an der Medizinischen Universität Wien, Abteilung für Labortierkunde und -genetik unter der Leitung von Prof. Dr. Harald Höger durchgeföhrt. Für jedes Antigen wurden zwei Hasen immunisiert. Eine Woche vor der Erstinjektion wurde den Hasen Blut abgenommen und daraus Präimmunseren (PIS) aufbereitet. Letztere dienten später als Kontrolle in Immunpräzipitationen mit dem entsprechenden affinitätsgereinigten Antikörper. Für die Basisimmunisierung wurde 1 mg Antigen subkutan verabreicht. Einmal im Monat erfolgte eine weitere Injektion zur Stimulation mit je 750 µg Antigen. Nach drei Injektionen wurde ein erstes Testserum zur Bestimmung des Antikörpertiters abgenommen. Die Hasen wurden fortan alle zwei Wochen geblutet und einmal im Monat immunisiert bis der Antikörpertiter deutlich abfiel. Die Antiseren wurden mit 0,05% Natriumazid versetzt bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

### **3.8.1.6 Reinigung von Glutathion-S-Transferase (GST) -Fusionsproteinen**

Bei dieser Affinitätschromatographie dient Glutathion (GT) als immobilisierter Ligand, der kovalent an Agarose gebunden ist. Die Glutathion-S-Transferase (GST) geht mit Glutathion eine Wechselwirkung ein und ermöglicht so eine selektive und spezifische Bindung des Fusionsproteins an die Matrix. Die Elution erfolgte durch eine kompetitive Verdrängung aus der Bindung mit Glutathion.

Alle folgenden Schritte wurden auf Eis bzw. bei 4°C durchgeföhrt. Das Bakterien-Pellet wurde in 20 ml Lyse-Puffer resuspendiert und 5 min auf Eis stehen gelassen. Die Zellen wurden wie oben beschrieben unter nativen Bedingungen mit Ultraschall aufgebrochen und abzentri-

fugiert. Das Bakterienlysat wurde mit 4 ml GT-Sepharose (Glutathion Sepharose™ 4 Fast Flow, GE Healthcare) für eine Stunde über Kopf rotieren gelassen. Unspezifisch gebunden Proteine wurden durch mehrmaliges Waschen mit Waschpuffer 1, gefolgt von Waschpuffer 2 entfernt. Nach Äquilibration der Sepharose mit Waschpuffer 3 wurde das Fusionsprotein in zwei Schritten mit je 7 ml Elutions-Puffer gewonnen. Da Glutathion für die weitere Verwendung der Fusionsproteine hinderlich war, wurde das Eluat zunächst in einem Vivaspin Concentrator auf 5 ml eingeeengt und anschließend über Nacht gegen PBS mit 0,25% Triton X-100 dialysiert.

Die Qualität und Quantität der GST-Fusionsproteine wurde wie oben für die Polyhistidin-Fusionsproteine beschrieben überprüft.

Sowohl die Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose als auch die GT-Sepharosen wurden nach Verwendung dreimal mit PBS gewaschen und anschließend in PBS und 0,05% Natriumazid bei 4°C gelagert. Bei Nachlassen der Bindekapazität wurden die Säulen analog den Herstellerangaben gereinigt. Das Säulenmaterial kann für dasselbe rekombinante Fusionsprotein mehrfach eingesetzt werden.

## **3.8.2 Affinitätsreinigung von Antikörpern**

### **3.8.2.1 Herstellung der Antigen-Säule**

Zur Aufreinigung polyklonaler Antikörper aus dem Antiserum (s. Abschnitt 3.8.2.2) wurde eine Antigensäule hergestellt. Dazu wurde das entsprechende gereinigte Antigen als GST-Fusionsprotein an magnetische Glutathion Kügelchen (MagneGST™ Glutathion Partikel) kovalent gekoppelt. Die Bindekapazität für 1 ml Glutathion Partikel beträgt 5-10 mg rekombinantes Protein. Diese kann jedoch je nach Größe des zu bindenden Fusionsproteins negativ beeinflusst werden (sterische Hinderung). Insgesamt wurden pro Antigen je 3ml Antigen-Sepharose hergestellt.

Zunächst wurde die Matrix zweimal mit PBS, pH 7,5 gewaschen. Die entsprechende Menge an GST-Fusionsprotein wurde zugegeben und für 2 h bei RT auf dem Rotationsmixer geschüttelt. Die Partikel wurden mittels eines von außen an das Gefäß gehaltenen Magneten fixiert, der Überstand abgenommen und gesammelt. Die Kügelchen wurden zweimal mit neun Säulenvolumen 0,1 M HEPES, pH 8,5 gewaschen. Zur Überprüfung der Adsorption wurde eine Probe (10 µl) der Matrix und des Überstandes mit 4x Laemmli aufgekocht und mittels SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Blau Färbung analysiert. Zusätzlich wurde die Kopplungseffizienz durch eine Protein-Bestimmung des Überstandes berechnet (Bradford 1976). Die magnetischen Partikel wurden zweimal 45 min mit frisch angesetztem 40 mM Dimethylpimelimidat Dihydrochlorid (DMP) in HEPES, pH 8,5 auf dem Rotationsmixer bei RT geschüttelt. Um die Reaktion zu stoppen, wurde die Matrix zunächst mit 0,2 M Etha-

nolamin gewaschen und anschließend in vier Säulenvolumen 0,2 M Ethanolamin zwei Stunden bei RT oder über Nacht bei 4°C über Kopf rotiert. Die Antigen-Sepharose wurde mehrmals mit PBS, pH 7,5 gewaschen, mit 0,05% Natriumazid versetzt und bei 4°C bis zu Verwendung gelagert.

Auf die eben beschriebene Weise wurden auch affinitätsgereinigte Antikörper kovalent an Protein-A Sepharose gekoppelt. Zur Überprüfung der Kopplungseffizienz der Antikörper wurde der Überstand nach Adsorption an die Protein-A Sepharose auf Western Blots gegen embryonales Rattenhirnextakt überprüft und zusätzlich die Proteinkonzentration des Überstands bestimmt.

### **3.8.2.2 Affinitätsreinigung der Antikörper**

Mit Hilfe der Antigen-Säule wurden die Antikörper durch eine reversible, nichtkovalente Antigen-Antikörper-Wechselwirkung aus dem Antiserum isoliert. Die affinitätsgereinigten Antikörper wurden nach stringentem Waschen durch Herabsetzen des pH-Wertes oder mit  $MgCl_2$  wieder aus der Bindung gelöst (Harlow and Lane, Laboratory Manuel 1988).

Das Antiserum wurde zunächst 1:2 mit dem Kopplungspuffer verdünnt und anschließend auf die äquilibrierte Antigen-Säule geladen. Nach einer ein- bis zweistündigen Rotation über Kopf bei 4°C wurde der Überstand, der nichtgebundene Antikörper und Serumproteine enthält, gesammelt und die Antigensäule mit neunfachen Säulenvolumen viermal mit dem Kopplungspuffer, einmal mit Waschpuffer 1 (für 10 min, bei 4°C rotieren), und einmal mit Waschpuffer 2 gewaschen. Durch das stringente Waschen werden unspezifisch gebundene Antikörper und Antikörper mit geringer Affinität zum Antigen entfernt. Die Antikörper wurden bei RT mit 7 ml Glycin bei pH 2,5 eluiert und anschließend sofort neutralisiert. Optional wurde eine  $MgCl_2$ -Elution durchgeführt. Das Eluat wurde mittels Ultrafiltration (Viviaspin Concentrator) auf ein Volumen von 1 ml eingengt und nach Zugabe von 10 ml PBS, versetzt mit Proteinase Inhibitor Cocktail, erneut aufkonzentriert.

Die Spezifität der affinitätsgereinigten Antikörper wurde auf Western Blots gegen embryonales Rattenhirnextrakt überprüft. Die Proteinkonzentration wurde nach der Bradford Methode (Bradford 1976) bestimmt. Die Antikörper wurden nach Zugabe von 0,05% Natriumazid bis zu Verwendung bei 4°C oder in kleinen Aliquots bei -20°C gelagert.

### **3.8.3 Proteinanalytik**

#### **3.8.3.1 Denaturierende Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure/DOC**

Eine effiziente Methode um Proteine aus Lösungen auszufällen, ist die Säurefällung mit Trichloressigsäure (TCA) (Bensadoun & Weinstein 1976).

Die Proteinlösung wurde mit 0,02% DOC versetzt, gevortext und 5 min auf Eis inkubiert. Nach weiterer Zugabe von 11% TCA wurde die Proteinlösung erneut gevortext und 30 min bei 0°C inkubiert. Anschließend wird die Proteinlösung bei 4°C für 15 min und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und mögliche TCA-Reste wurden mit zwei Probenvolumen Aceton (-20°C) aus dem Pellet entfernt. Das Präzipitat wird luftgetrocknet und in 2x Laemmli-Puffer aufgenommen.

#### **3.8.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Zur Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrem Molekulargewicht wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE nach durchgeführt (Laemmli 1970). Für die Analyse von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 30-130kDa wurden 10%ige Trenngele verwendet.

Zur Vorbereitung wurden die Proben mit Laemmli-Puffer versetzt, 5-10 min bei 95°C denaturiert und auf das SDS-Gel geladen. Die Elektrophorese wurde für 60-70 min bei 130 V konstanter Spannung laufen gelassen (Mini-PROTEAN 3 Cell, BioRad).

#### **3.8.3.3 Färbung von Proteingelen**

Coomassie-Färbung:

Größere Proteinmengen (> 100 ng/Bande) wurden mit Coomassie angefärbt. Zunächst wurde das Gel kurz in destilliertem Wasser gewaschen, anschließend in der Coomassie-Lösung fixiert und für mehrere Stunden gefärbt. Die Inkubationszeit konnte auf ca. 30 min verkürzt werden, wenn die Coomassie-Lösung zuvor in der Mikrowelle erhitzt wurde. Anschließend wurde das Gel in der Entfärbelösung so lange gewaschen, bis der Hintergrund klar wurde.

#### **3.8.3.4 Western Blot**

Der Western Blot wurde von (Towbin et al. 1979) eingeführt und bezeichnet das Verfahren Proteine, die zuvor elektrophoretisch getrennt wurden, auf eine Membran zu übertragen. Der Nachweis erfolgt anschließend mit Hilfe von markierten Antikörpern.

Der Proteintransfer wurde nach der Tank-Blot Methode (90 min bei konstanten 250 mA) durchgeführt. Für den Transfer wurden die verwendeten Schwämme, Filter, das SDS-Gel und die Nitrocellulose-Membran (Porengröße 0,2µm) in 1x Blottingpuffer getränkt und in folgender Reihenfolge angeordnet: Kathode, Schwamm, 3x Filterpapier, Gel, Membran, 3x Fil-

terpapier, Schwamm, Anode. Zur Überprüfung des Transfers wurden die Proteine auf der Nitrocellulose-Membran reversibel mit Ponceau-S-Lösung gefärbt. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu minimieren, wurden die hydrophoben Bereiche der Membran mit Blocklösung für 30 min bei RT abgeblockt. Primär- und Sekundärantikörper wurden ebenfalls in der Blocklösung verdünnt. Die Inkubation mit dem entsprechenden Primärantikörper erfolgte für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Nichtgebundene und unspezifische Antikörper wurden durch dreimal zehnmütiges Waschen mit TBS-T entfernt. Anschließend wurde die Membran für eine Stunde in den mit IRDye700- oder 800-konjugierten entsprechenden Sekundärantikörper gelegt. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T wurden die Blots mit dem auf Infrarot basierenden Odyssey® Imaging System eingelesen und analysiert.

### **3.8.4 Gewebeextraktion und Dichtegradientenzentrifugation**

#### **3.8.4.1 Herstellung von Zellextrakten**

HeLa-Zellen wurden zunächst einmal mit vorgewärmtem (37°C) PBS gewaschen und anschließend in 500 µl Lyse-Puffer pro 10 cm Schälchen mit einem Zellkratzer abgelöst. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C wurde der Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und die Proteinkonzentration mittels Bradford-Test bestimmt.

#### **3.8.4.2 Herstellung von zytoplasmatischen und nuklearen Gewebeextrakten**

Die Entnahme und Präparation der Gehirne erfolgte durch S. Thomas, J. P. Vessey und M. Zeitelhofer. Sofern die Präparate nicht direkt weiter verwertet wurden, wurden sie in ein Eppendorfgefäß überführt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung auf -80°C gelagert. Alle Schritte erfolgten auf Eis bzw. bei 4°C und, sofern nicht anders angegeben, unter RNase-freien Bedingungen.

##### a) Zytoplasmatisches Hirnextrakt

3 ml der embryonalen Rattenhirne (embryonaler Tag 17; E17) wurden mit 1 ml 4x Extraktions-Puffer (EB) in einem Dounce-Homogenisator vermischt. Zunächst wurden die Gehirne manuell mit zehn vorsichtigen Stößen zerkleinert und anschließend mit dem Laborrührer (10x) bei 1500 rpm aufgeschlossen. Nicht-lysierte Zellen, Zellkerne und Mitochondrien wurden durch Zentrifugation (Eppendorf-Zentrifuge) bei 20000 x g für 10min aus dem Homogenat entfernt. Dieser lösliche Überstand wird im weiteren Verlauf als S20 bezeichnet.

**b) Zellkernextrakt aus Rattenhirn (E17)**

Die Isolierung der Zellkerne aus Rattenhirn wurde nach Vakakis (Vakakis et al. 1991) durchgeführt und wurde in weiteren Schritten modifiziert. 2ml der embryonalen Rattenhirne (E17) wurden in 3 ml HP II und 0,3% Triton-X100 im Dounce-Homogenisator mit 12 Stößen bei 1000 rpm vorsichtig homogenisiert und anschließend bei 850 x g für 10 min zentrifugiert. Das erste Zellkernpellet wurde in 1,5 ml HP II und HP III (im Verhältnis 1:6,25) aufgenommen und bei 39000rpm (63000 x g) für 45 min ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellkernpellet wurde erneut resuspendiert und wie oben ultrazentrifugiert. Die gereinigten Zellkerne wurden in 1 ml NEB (Hochsalzpuffer) resuspendiert und unter ständigem Mixen inkubiert. Nach Zugabe von 5 µg/ml RNase-freier DNase wurde 30 min bei RT inkubiert. Das Zellkernextrakt wurde durch 15minütiges Zentrifugieren bei 20.000 x g gewonnen. Die hohe Salzkonzentration des Extrakts wurde anschließend im Volumenverhältnis 1:2 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford 1976) wurde das Zellkernextrakt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei –80°C gelagert.

**3.8.4.3 Dichtegradientenzentrifugation**

Zur Auftrennung der Bestandteile des zytoplasmatischen Extrakts (S20) wurde die Dichtegradientenfraktionierung genutzt. Das Homogenat wurde auf die Oberfläche eines kontinuierlichen Dichtegradienten geladen. Bei der anschließenden Zentrifugation wurden die Zellbestandteile entsprechend ihrer Dichte angeordnet. Dieser Schritt diente zur Anreicherung der Barentsz- bzw. der Staufen-enthaltenden RNPs. Alle Schritte erfolgten - sofern nicht anders angegeben - unter RNase-freien Bedingungen und wurden auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt.

Zur Ausbildung eines stabilen, inerten und nicht-toxischen Dichtegradienten wurde Optiprep™ verwendet, das aus 60% (w/v) Iodixanol in Wasser besteht. Je 5 ml einer 15%igen und 5 ml einer 30%igen Optiprep-Lösung wurden in einen Gradientenmischer gegeben. Die niederkonzentrierte Lösung wurde während des Gießens kontinuierlich mit der hochkonzentrierten Optiprep-Lösung vermischt. Ungefähr 1 ml (ca. 30 mg/ml) E17 Rattenhirnextrakt wurde vorsichtig auf den linearen Gradienten aufgetragen und in der Ultrazentrifuge (SW-41 Rotor) bei 280000 x g für 2<sup>1</sup>/<sub>2</sub> h zentrifugiert. Anschließend wurden vorsichtig Fraktionen von je 1ml manuell von oben abgenommen und in ein Eppendorfgesäß überführt. 15 µl (1,5%) einer jeden Fraktion wurden im Immunoblot analysiert. Die Fraktionen wurden mit Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei –80°C gelagert.

Optional wurde das Rattenhirnextrakt vor der Zentrifugation für 30 min bei RT mit 100 µg RNaseA/T1-Mix behandelt, um die RNA Partikel aufzubrechen.

## **3.8.5 Isolierung von Barentsz- und Staufer- enthaltenden Komplexen**

### **3.8.5.1 GST-Pulldown aus Rattenhirnextrakt**

Der GST-Pulldown ist eine *in vitro* Methode zum Nachweis von Protein-Protein Interaktionen. Als Köder dient ein GST-Fusionsprotein, das an einer Glutathion (GT)-Sepharose immobilisiert wird. Mit Hilfe des GST-Pulldowns können Proteininteraktionen nachgewiesen oder aber auch bisher unbekannte Interaktionen aufgedeckt werden.

Das entsprechende rekombinante Fusionsprotein (GST-Btz, -Stau1 oder -Stau2) wurde, wie oben beschrieben, bakteriell exprimiert, gereinigt und dialysiert. Nach Adsorption an 500 µl frische GT-Sepharose wurden die Fusionsproteine wie für die Herstellung der Antigen-Säule chemisch quervernetzt (s. Abschnitte 3.8.1.3, 3.8.1.6, 3.8.2.1). Zu jedem Versuch wurde in einem Parallelansatz das GST-tag alleine exprimiert und gereinigt. Das ebenfalls kovalent an die Sepharose gekoppelte GST-tag diente im GST-Pulldown als Negativkontrolle. Der Extraktionspuffer wurde immer frisch angesetzt. Alle Schritte wurden auf Eis bzw. bei 4°C und unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt.

Die Sepharosen wurden in 1x Extraktions-Puffer äquilibriert. Das wie in Abschnitt 3.8.4.2 hergestellte E17 Lysat (S20) wurde im Überschuss (je 1 ml pro Sepharose) zugegeben, mit 0,5 ml 1x Extraktions-Puffer verdünnt und für 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub> h über Kopf rotieren gelassen. Nach fünf Waschschritten mit Waschpuffer 1 wurden die Proteine mit 750µl Elutions-Puffer (1<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Säulenvolumen) für 10 min bei RT eluiert und anschließend mit TCA gefällt. Die Proben wurden in 50 µl 2x Laemmli-Puffer aufgenommen, denaturiert, auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen und mittels Western Blotting analysiert. Um die Blots möglichst effizient mit unterschiedlichen Antikörpern dekorieren zu können, wurden die Membranen horizontal in Streifen geschnitten. Für die Identifizierung der Btz, Stau1 oder Stau2 assoziierten Proteine mittels Massenspektrometrie wurden die Proben von Dr. Keiryn Bennett am Zentrum für Molekulare Medizin (CeMM, Wien) auf einem 4-12%igen bis-Tris-Gradientengel (NuPAGE, Invitrogen) aufgetrennt und entweder mit Coomassie Blau- oder Silbernitratlösung sichtbar gemacht (Shevchenko et al. 1996). Die Proteine wurden wie in Abschnitt 3.8.6 beschrieben aufbereitet und massenspektrometrisch analysiert.

**Anmerkung:** In dem mit GST-Stau1 und GST-Stau2 durchgeführten GST-Pulldown Experimenten wurden keine kovalent gebundene Sepharose verwendet (Abbildung 4.7). Die Fusionsproteine wurden anschließend mit ihren assoziierten Proteinen durch Zugabe von 25 mM Glutathion kompetitiv aus der Bindung gedrängt. In allen folgenden GST-Pulldown Experimenten wurden chemisch quervernetzte Sepharosen verwendet und wie oben beschrieben verfahren.

### **3.8.5.2 Immunpräzipitation (IP)**

Mit Hilfe der Immunpräzipitation lässt sich ein Proteinkomplex aus einem Homogenat mittels spezifischer Antikörper, die gegen ein Protein dieses Komplexes gerichtet sind, isolieren. Der immungefällte Komplex wird nach stringentem Waschen wieder von der Matrix gelöst und seine Bestandteile können analysiert werden.

Für die Herstellung der Antikörper (AK)-Sephrose wurden die in Abschnitt 3.8.2.2 beschrieben, affinitätsgereinigten Antikörper über ihre konstante Region ( $F_C$ -Teil) an immobilisiertes Protein-A (*Staphylococcus aureus*) gebunden. Auf diese Weise liegen die Antigen-Bindestellen des jeweiligen Antikörpers frei und können somit das entsprechende Epitop erkennen und binden. Die Antikörper wurden, wie oben für die Antigen-Säule beschrieben (s. Abschnitt 3.8.2.1), mit DMP kovalent an die Protein-A Sepharose gebunden.

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Schritte der Immunpräzipitation auf Eis oder bei 4°C und RNase-freien Bedingungen durchgeführt.

a) quantitative Immunpräzipitation für die Identifizierung der Komponenten mittels Massenspektrometrie

Für die Identifizierung der Komponenten der Btz- bzw. Stau2-enthaltenden Komplexe wurden zunächst je 300 µg affinitätsgereinigte, monospezifische Antikörper in einem 2 ml Eppendorfgefäß kovalent an 300 µl Protein-A Sepharose gebunden. Eine entsprechende Menge an Immunglobulinen aus dem jeweiligen Präimmenserum (PIS) der Hasen wurde parallel ebenfalls an Protein-A Sepharose gebunden und quervernetzt. Dies dient als Negativkontrolle. Nichtkovalent gebundene Immunglobuline (IgG) wurden durch einen Waschschrift mit dem Elutionspuffer wieder von der Säule gelöst, da große Mengen an IgGs die spätere massenspektrometrischen Analyse beeinflussen. Anschließend wurden die Sepharosen mehrmals mit 1x Extraktionspuffer gewaschen und äquilibriert. Um unspezifische Bindungen zu minimieren, wurden die Säulen mit 300 µl Blocklösung für 30 min unter Rotieren inkubiert. Als Ausgangsmaterial für die Immunpräzipitation wurden die zuvor im Dichtegradienten angereicherten und vorgereinigten Fraktionen verwendet (Abbildung 4.10). Im Fall von Btz wurden die die Fraktionen F4-6 des Dichtegradienten im Fall von Stau2 die Fraktionen F5-7 vereinigt. Letztere wurden dann auf die entsprechenden Antikörper- und die dazugehörigen PIS-Sepharose geladen und für 75 min über Kopf rotieren gelassen. Die mit dem Immunpräzipitat gebundenen Kügelchen wurden mittels Zentrifugation (nicht mehr als 100 x g und 4 Sek., um Verunreinigungen durch präzipitierende Proteine aus dem Extrakt zu vermeiden) abgesetzt und der Überstand wurde zur späteren Analyse gesammelt. Nach fünf Waschschriften mit fünf Säulenvolumen Waschpuffer 1 wurden die Sepharosen mit zwei Säulenvolumen (600µl) RNase-Elutions-Puffer für 30 min bei RT über Kopf inkubiert. Anschließend wurde mit fünf Säulenvolumen Waschpuffer 2 gewaschen, gefolgt von einer zehn minütigen Inkubation bei RT mit zwei Säulenvolumen Elutions-Puffer. Das Eluat wurde sofort mit 75 µl

1,5 M Tris pH 8,8 neutralisiert. Die Proteine aus beiden Elutionen wurden mit TCA gefällt (s. Abschnitt 3.8.3.1) und in 40 µl 2x Laemmli-Puffer aufgenommen und 5 min bei 95°C aufgekocht. 10 µl der Eluate wurden auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen und mittels Immunoblot analysiert. Um die Western Blots möglichst effizient mit unterschiedlichen Antikörpern dekorieren zu können, wurden die Membranen horizontal in Streifen geschnitten. Weitere 10 µl der Proben wurden von Dr. Keiryn Bennett (CeMM, Wien) auf einem 4-12%igen Bis-Tris-Gradientengel (NuPAGE, Invitrogen) aufgetrennt, mit Silbernitratlösung sichtbar gemacht, wie in Abschnitt 3.8.6 beschrieben, aufbereitet und massenspektrometrisch analysiert.

#### b) analytische Immunpräzipitation

Sofern keine großen Proteinmengen für die massenspektrometrische Analyse erforderlich waren, wurde die Immunpräzipitation im kleinen Maßstab von 30-50 µl AK-Sepharose durchgeführt. Es wurde wie unter a) beschrieben verfahren, wobei die Volumenangaben der Lösungen proportional angepasst wurden. Anstelle der Dichtegradientenfraktionen wurde in den angegebenen Fällen ein Zellkernextrakt aus Rattenhirn (E17) als Ausgangsmaterial für die IP eingesetzt.

### **3.8.6 Proteinidentifizierung über Massenspektrometrie**

Die Identifizierung der immungefällten Proteine mit anti-Btz und anti-Stau2 Antikörpern erfolgte durch Dr. Keiryn Bennett, Abteilung von Prof. Dr. Giulio Superti-Furga am Zentrum für Molekulare Medizin (CeMM, Wien, Österreich).

Im Folgenden werden hier kurz die einzelnen Schritte der Probenvorbereitung, der massenspektrometrischen Analyse sowie die anschließende Bioinformatik (verwendete Datenbanken und Software) beschrieben.

Bevor die Proben auf einer eindimensionalen SDS-PAGE (4-12%iges Bis-Tris Gel, NuPAGE, Invitrogen) aufgetrennt wurden, wurden zunächst die Cysteine der Proteine mit Iodoacetamid alkyliert. Nach Silberfärbung der Proteine wurde jeweils eine vollständige Probenspur in ungefähr 20 Stücke geschnitten und mit modifiziertem Trypsin proteolytisch verdaut (Shevchenko et al. 1996). Als nächstes wurden die trypsin-verdauten Proben gereinigt und an einer *reversed-phase* Säule konzentriert (Rappsilber et al. 2003, Mann & Jensen 2003). Anschließend wurden die Proben mit einem *nanoLiquid Chromatography (LC)* System (Agilent Technologies), das an ein Quadrupol-Time-Of-Flight (QTOF) Massenspektrometer gekoppelt ist, analysiert (QTOF Premier oder QTOF Ultima, Waters). Die Proteine wurden über eine automatisierte Datenbanksuche (Mascot Daemon, Matrix Science) gegen die murine *International Protein Index* Proteinsequenz Datenbank (IPI, Version 3.21 und 3.26 European Bioinformatics Institute, [www.ebi.ac.uk/IPI/](http://www.ebi.ac.uk/IPI/)) identifiziert. Die IPI-Datenbank verfügt über eine Sammlung von Einträgen aus Swiss-Prot, TrEMBL (<http://www.expasy.ch/sprot/>), RefSeq (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>) und Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>).

Der murinen IPI-Datenbank wurde humanes Keratin beigefügt, um Verunreinigungen durch menschliches Keratin in den Proben zu detektieren. Die MS und MSMS Toleranz lag bei 20 ppm und 0.1 Da. Ein Protein galt als verlässlich identifiziert, sofern mindestens 2 Peptide einer Länge von  $\geq 6$  AS mit einem Mascot *peptide score*  $\geq 20$  detektiert wurden. In allen hier durchgeführten Experimenten wurden die Proben mit den Sequenzen der Maus verglichen, da die Datenbank der Ratte zu Beginn dieser Arbeit noch nicht vollständig war. Die Ergebnisse der Datenbanksuche wurden in EpiCenter (Proxeon Biosystems, Odense) zur automatisierten Validierung und Proteingruppierung (basierend auf der Anzahl der gemeinsam identifizierten Peptide durch die MSMS) analysiert (Kristensen et al. 2004).

Die auf diese Weise generierten Rohdaten der GST-Pulldown Experimente sowie der Immunpräzipitationen wurden weiter bearbeitet. Die in den entsprechenden Negativkontrollen (GST im GST-Pulldown bzw. Präimmunserum in IPs) identifizierten Peptide, wurden von den Peptiden, die im GST-Stau1, -Stau2 und -Btz Pulldown bzw. in den anti-Stau2 und anti-Btz IPs detektiert wurden, subtrahiert. Für einige Proteine sind mehrere Acc. No. ermittelt worden. Zum einen wurden Peptide unterschiedlichen Isoformen des entsprechenden Proteins zugeordnet, zum anderen sind in den Datenbanken mehrere Einträge für ein und dasselbe Protein zu finden (Redundanz, s. Anhang, Tabelle 7.1 und 7.2). Synonyme sowie mögliche Funktionen einzelner Proteine wurden über die Datenbanken iHop (<http://www.iHop-net.org/UniPub/iHOP/>) und NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/>) ermittelt und die Proteine unter dem Symbol des geläufigsten Proteinnamens gruppiert. Die Proteine wurden weiter in 6 große Gruppen eingeteilt (s. Tabelle 4.1 und Anhang Tabelle 7.1 und 7.2). Die Listen wurden untereinander verglichen und ausgewertet.

**Anmerkung:**

Es wurden je zwei unabhängige mit anti-Btz und anti-Stau2 Antikörpern durchgeführte Immunpräzipitationen massenspektrometrisch analysiert. Die resultierenden Daten der entsprechenden Eluate wurden verglichen und manuell miteinander vereinigt. Wurden für eine und dieselbe Acc. No. zwei unterschiedliche *unique peptide hits* in den beiden Experimenten identifiziert, so wurde zu Gunsten der höheren Zahl entschieden (s. Anhang Tabelle 7.2). In der Übersichtstabelle in Abschnitt 4.3.2.2 sind die Proteine, die in beiden IPs identifiziert wurden gekennzeichnet (s. Tabelle 4.1).

### **3.8.7 Identifizierung von RNAs aus Barentsz- und Staufer- enthaltenden Komplexen**

#### **3.8.7.1 RNA-Isolierung aus Immunpräzipitationen**

Die RNA-Isolierung aus den immungefällten Btz- bzw. Staufer-enthaltenden RNPs erfolgte mit TRIzol. Für die RNA-Isolierung wurden IPs im analytischen Maßstab (50 µl) durchgeführt. Nach ausgiebigem Waschen mit Waschpuffer 1 wurde der Überstand verworfen, 800 µl TRIzol zu den Sepharosen gegeben und gevortext. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde das Homogenat durch Invertieren gut gemischt. Anschließend wurden die Phasen durch Zentrifugation getrennt. Die RNA befindet sich in der oberen wässrigen Phase. Aus der Interphase und der unteren organischen Phase wurden zu einem späteren Zeitpunkt die DNA und die Proteine gefällt. Die obere Phase wurde in ein neues, RNase-freies Eppendorfgefäß überführt und die RNA mit 400 µl Isopropanol und 10 µg Glykogen gefällt. Das RNA Pellet wurde mit Ethanol (70%) gewaschen und anschließend an Luft getrocknet. Das Pellet sollte dabei nicht völlig austrocknen, da es sich sonst nur schlecht resuspendieren lässt. Die RNA wurde in 20µl RNase-freiem ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und für 5 min bei 50°C gelöst. Um mögliche DNA-Kontaminationen auszuschließen, wurde die RNA mit RNase-freier DNase versetzt und für 30 min inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion wurde die Konzentration der Gesamt-RNA bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm mit einem Spektrophotometer bestimmt. Als Positivkontrolle wurde parallel die Gesamt-RNA aus 30 µl eines embryonalen Rattenhirnextrakts (S20) isoliert. Sofern die RNA nicht direkt in cDNA überschrieben wurde, wurde sie mit RNase Inhibitor versetzt und bei – 80°C gelagert.

Zur Überprüfung der Immunpräzipitation wurden anschließend auch die Proteine analog den Herstellerangaben aus der Inter- und unteren Phase isoliert und im Western Blot analysiert.

#### **3.8.7.2 Reverse Transkriptase (RT) Reaktion und semiquantitative Amplifizierung von RNAs mittels PCR**

Die isolierten RNAs aus den anti-Btz- und anti-Staufer IPs wurden mittels RT-PCR mit anschließender PCR analysiert. Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase wurde die einzelsträngige RNA in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Diese komplementäre DNA (cDNA) diente in einem nächsten Schritt als Matrize (*template*) für die Amplifizierung durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

Für die reverse Transkription wurden zunächst zu 14 µl der jeweiligen RNA-Lösung (nicht mehr als 2 µg RNA) 0,5 µg Random Primer H<sub>6</sub> gegeben und für fünf Minuten bei 70°C inkubiert, um Sekundärstrukturen im *template* zu lösen und so das Anlagern der Primer zu ermöglichen. Die Proben wurden auf Eis gestellt und 5 µl 5x RT-Puffer, 10mM dNTPs, 40 U RNase Inhibitor sowie 200 U M-MLV Reverse Transkriptase in einem Endvolumen von 25 µl

zugegeben. Nach einer anfänglichen Inkubation bei 25°C für 10min, erfolgte die Reaktion bei 40°C für 60 min und wurde abschließend durch Erhitzen auf 70°C für 15 min inaktiviert. Die cDNA wurde entweder direkt als *template* für die nachfolgende PCR eingesetzt oder bis zu ihrer Verwendung auf -20°C gelagert. Für die anschließende PCR wurden 1µl cDNA, 1x Taq-Puffer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, jeweils 0,4 µM des Vorwärts- und Rückwärts-Primer (für CaMKII $\alpha$  und Arc jeweils 1,5 µM; Phusion Taq Polymerase) sowie 1 U Taq-Polymerase in einem Volumen von 20 µl gemischt. Die Reaktion wurde in einem PCR-Cycler mit beheizbarem Deckel durchgeführt. Nach einer anfänglichen Denaturierung von 40 Sekunden bei 94°C wurden 25 Zyklen durchlaufen. (Denaturierung: 40 Sek bei 94°C; Anlagerung: 40 Sek, Temperatur s. Abschnitt 3.3. 3; Elongation: 1 min bei 72°C). Abschließend wurde eine fünfminütige Endsynthese bei 72°C durchgeführt. Die amplifizierte DNA-Fragmente wurden nach Zugabe von DNA-Ladepuffer auf einem mit Ethidiumbromid gefärbten 2%igem Agarose-Gel ihrer Größe entsprechend aufgetrennt.

### **3.8.8 Immunfluoreszenz und Transfektionen**

#### **3.8.8.1 Immunfluoreszenz**

Eine Möglichkeit, endogene Proteine innerhalb einer Zelle oder eines Zellverbandes sichtbar zu machen, ist die Immunfärbung. Dabei bedient man sich der Wechselwirkung zwischen Antigen und Antikörper. Der Primärantikörper bindet dabei in der Zelle an das Zielprotein und wird anschließend durch einen markierten Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte kurz beschrieben.

Zunächst wurden die Zellen kurz in vorgewärmtem (37°C) HBSS gewaschen und anschließend für 15 min in 4% Paraformaldehyd (37°C) fixiert. Alle weiteren Schritte erfolgten bei RT. Die Zellen wurden 3x mit HBSS gewaschen. Um ein Eindringen der Antikörper in die Zellen zu ermöglichen, wurden die Membranen 5 min mit einer 1%igen Triton X-100 Lösung permeabilisiert. Unspezifische Bindungen wurden durch eine Inkubation mit Blocklösung für 30 min vermindert. Die Primärantikörper wurden in 10%iger Blocklösung verdünnt (die eigens hergestellten affinitätsgereinigten Antikörper wurden in einer Endkonzentration von 1µg/µl eingesetzt) und für 2 h inkubiert. Nach drei fünfminütigen Waschschritten mit HBSS wurden die Zellen mit den fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern (in 10%iger Blocklösung verdünnt) für 45 min inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die nukleare DNA für 3 min mit DAPI angefärbt. Die Deckgläschen wurden 2x in HBSS und anschließend 1x in ddH<sub>2</sub>O gewaschen, vorsichtig auf einem Papiertuch abgetupft und in Mowiol eingebettet.

Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M Mikroskop, Zeiss) mit einem 10x bzw. 40x /1,3 Öl Plan Neofluor Objektiv (Zeiss). Die Aufnahmen wurden mit einer Digitalkamera (Coolsnap HQ CCD Kamera, Roper Scientific/Fa. Visitron) angefertigt und mit

der MetaMorph 6.3 Imaging Software (Universal Imaging, Vistron) bzw. Adobe Photoshop 7.0 (San Jose, USA) bearbeitet.

### **3.8.8.2 Markierung von Primärantikörpern**

Mit der eben beschriebenen Methode lassen sich auch mehrere Proteine detektieren. Voraussetzung ist allerdings, dass die Primärantikörper der entsprechenden Proteine in unterschiedlichen Spezies generiert wurden, da es ansonsten zu Kreuzreaktionen der Sekundärantikörper kommt.

Eine Methode, Primärantikörper derselben Spezies für eine Immunfärbung zu verwenden, besteht darin, einen der Antikörper zunächst mit Hilfe des *Zenon IgG labeling Kits* mit einem Fluorophor zu koppeln. Um eine auswertbare Immunfärbung zu erhalten, wurde 1 µg Primärantikörper pro Deckgläschen markiert. Der zweite Primärantikörper wurde dann sequentiell wie oben beschrieben angefärbt.

### **3.8.8.3 Transiente Transfektion von Säugerzellen**

Eine weitere Methode, ein Zielprotein in der Zelle genauer zu untersuchen, ist die exogene Expression von Fusionsproteinen. Dabei wird die entsprechende Plasmid-DNA transient in die Zellen eingeschleust.

Transiente Transfektion von hippokampalen Neuronen:

Für die transiente Transfektion von reifen hippokampalen Neuronen der Ratte in Zellkultur wurde die Kalzium-Phosphat-Methode (Goetze et al. 2004) durchgeführt. Eine Verbesserung der Transfektionseffizienz wurde durch die Nukleofektion mit dem Nucleofector<sup>TM</sup> der Firma Amaxa (Zeitelhofer et al. 2007) (Zeitelhofer und Karra et al 2008 submitted) erreicht. Die Nukleofektion von hippokampalen Neuronen der Ratte wurde in unserem Labor routinemäßig von S. Thomas sowie J. P. Vessey und M. Zeitelhofer durchgeführt.

Transiente Transfektion von HeLa-Zellen:

Für HeLa-Zellextrakte wurden in einer Dichte von 350.000 Zellen pro 6 cm-Gewebe Kulturschalen ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen bei einer Dichte von 50-70% transfiziert. Mindestens 30 min vor Transfektionsbeginn wurde das Medium gewechselt. Pro Transfektionsansatz wurde zu 250 µl vorgewärmtem OptiMem zunächst 7,5 µg Plasmid-DNA und anschließend 20 µl FugeneHD Lipofektionsreagenz gegeben. Der Ansatz wurde gevortext, für 15 min bei RT inkubiert und anschließend tröpfchenweise zu den Zellen gegeben. Die Expression des Fusionsproteins erfolgte über Nacht, die von small hairpin RNA (shRNA) exprimierender Plasmide für 72 Stunden. Die Zellextrakte wurden wie unter 3.8.4.1

beschrieben hergestellt. Für eine Doppel-Transfektion eines shRNA Plasmids und des TCR- $\beta$  mini-Gens wurde verfahren wie für die Einzel-Transfektion beschrieben. Die geringe Menge an TCR- $\beta$  Plasmid-DNA (100 ng; C. Giorgi persönliche Kommunikation) wurden bei der Berechnung vernachlässigt.

Für die mikroskopische Analyse wurden HeLa-Zellen auf Deckgläschen ausgesät. Die transiente Transfektion von Zellen auf einzelnen Deckgläschen erfolgte in einer 12-well Platte in einem kleineren Ansatz (50  $\mu$ l OptiMem, 1,5  $\mu$ g Plasmid-DNA, 4  $\mu$ l FugenHD Reagenz). Die Zellen wurden nach Beendigung der Expression fixiert, wenn angegeben immungefärbt und eingebettet (s. Abschnitt in 3.8.8.1).

### **3.8.9 Regulierung der Genexpression durch Vektor-basierende Expression von shRNA**

Eine Möglichkeit, um in einer Zelle gezielt die Expression eines Gens zu regulieren, ist die RNA Interferenz (RNAi), in dieser Arbeit die Vektor-basierte Expression von shRNAs (Brummelkamp et al. 2002). Es handelt sich hierbei um kleine RNAs, die eine Haarnadelstruktur ausbilden. In der Zelle wird die shRNA durch die RNA Polymerase III zu einer siRNAs (small interfering RNAs) degradiert. Die Doppelstränge werden durch eine RNA Helikase aufgetrennt. Die einzelsträngige siRNA bindet an den *sog. RNA-induced silencing complex* (RISC) und im nächsten Schritt an die Ziel-mRNA. Infolgedessen wird die mRNA abgebaut. Der durch die shRNA induzierte Knock-down eines Gens ermöglicht *loss-of-function* Studien innerhalb einer Zelle. Es wurden mehrere Zielsequenzen (jeweils 19 Nukleotide) innerhalb der Zielgene mit der öffentlich zugänglichen RNAi Designer Software von Invitrogen (<https://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/>) entworfen und nochmals auf ihre Spezifität überprüft (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Das weitere Primerdesign und alle darauffolgenden Schritte wurden analog den Herstellerangaben (Oligoengine) durchgeführt und werden an dieser Stelle nur kurz erwähnt. Es wurden zwei einzelne, zueinander komplementäre Oligonukleotide synthetisiert (Sigma-Aldrich). Nach Hybridisierung wurden die entstandenen Doppelstränge in den linearisierten pSUPERIOR-EGFP Vektor kloniert. Nach einer Transformation in *E.coli* Top10 kompetente Zellen wurden positive Klone mittels Kolonie-PCR und anschließender Agarose-Gelelektrophorese identifiziert. Die Plasmid-DNA des entsprechenden Klons wurde in *E.coli* TOP10 Zellen amplifiziert, isoliert (Endofree™ Plasmid Maxi-Kit, Qiagen) und in kleinen Aliquots bei -20°C bis zur Verwendung gelagert. Die shRNA Plasmid-DNA wurde wie unter 3.8.8.3 beschrieben transient in HeLa-Zellen transfiziert und mittels Western Blot und Immunzytochemie analysiert. Um die Effizienz der shRNA in hippocampalen Neuronen zu überprüfen, wurde zunächst eine mikroskopische Analyse durchgeführt. Sofern diese positiv ausfiel, wurden die shRNAs auch über Immunoblot analysiert.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Gewinnung und Charakterisierung von spezifischen anti-Btz, anti-Stau1 und anti-Stau2 Antikörpern**

Ein Ziel meiner Doktorarbeit war es, Transport-RNPs aus dem Rattenhirn mit Hilfe von Immunfällungen im quantitativen Maßstab zu reinigen. Dazu bedarf es hochaffiner, monospezifischer Antikörper. Zu Beginn meiner Doktorarbeit stand nur noch eine geringe Anzahl an Immunsereen für die Affinitätsreinigung von anti-Btz, anti-Stau1 und anti-Stau2 Antikörpern zur Verfügung. Diese polyklonalen Antiseren wurden von Anke Deitinghoff und Sven Kröning hergestellt und sind in deren Doktorarbeiten charakterisiert worden (Deitinghoff, Dissertation, 2003; Kröning, Dissertation, 2004). Daher bestand die erste Aufgabe darin, Antigene für die Immunisierung neuer Kaninchen herzustellen.

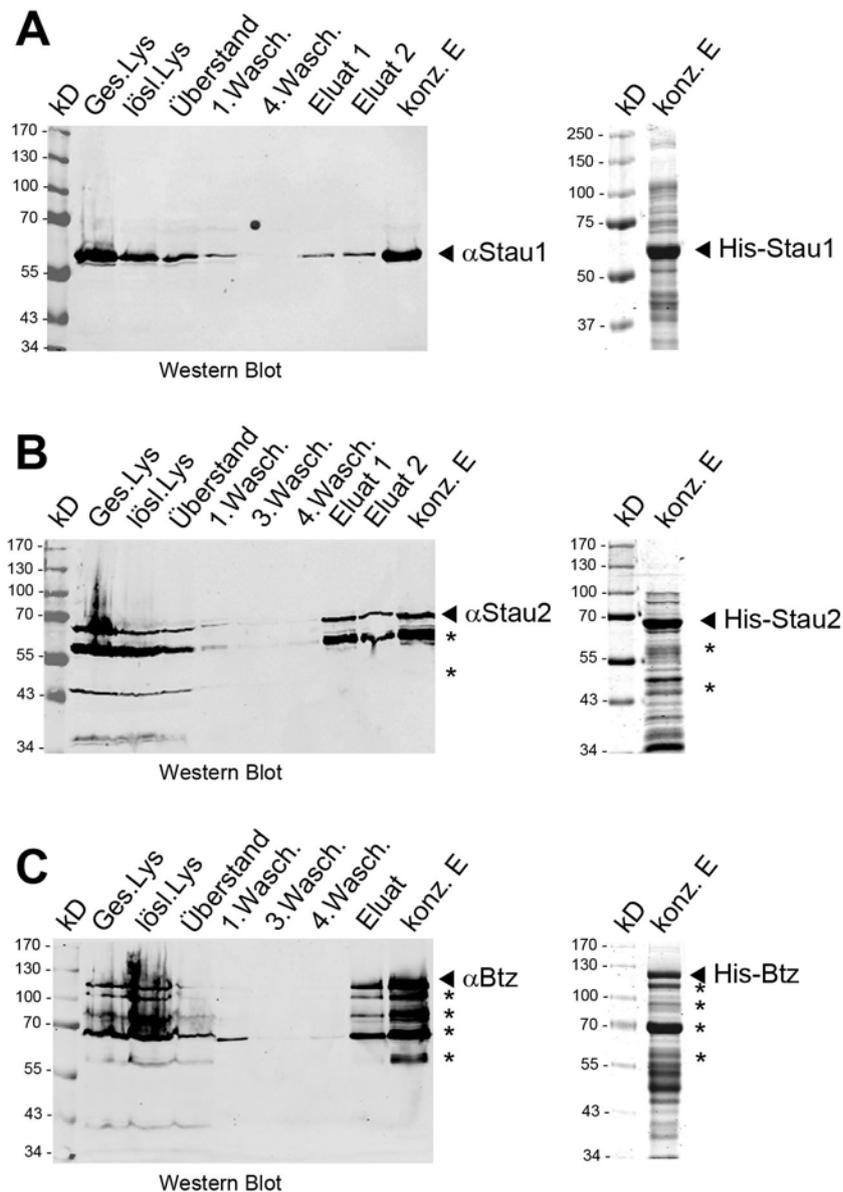
#### **4.1.1 Herstellung von bakteriell exprimierten Antigenen zur Erzeugung polyklonaler Antikörper**

Für die bereits vorhandenen Immunsereen wurde jeweils eine C-terminale Domäne des entsprechenden Proteins als Antigen gewählt, die sich gut in *E.coli* exprimieren ließ. Um die Anzahl der Epitope, die von den jeweiligen poly-klonalen Antikörpern erkannt werden können, zu erhöhen, wurde für die Immunisierung der neuen Kaninchen jeweils das Gesamtprotein, das als rekombinantes Fusionsprotein gereinigt wurde, injiziert. Für die bakterielle Expression von humanem Stau1 wurden His<sub>6</sub>- und GST-markierte Fusionsproteine verwendet (His<sub>6</sub>-Stau1<sub>FL</sub> und GST-Stau1<sub>FL</sub>) (Kim et al. 2005). Für die Herstellung der anti-Stau2 Antikörper wurde die gesamte murine 62 kDa Isoform als rekombinantes Fusionsprotein exprimiert (His<sub>6</sub>-Stau2<sup>62</sup> und GST-Stau2<sup>62</sup>) (Zeitelhofer et al., 2008 submitted). Durch die Verwendung der längsten Stau2-Isoform wurden polyklonale Antikörper hergestellt, die alle Stau2-Isoformen erkennen (Abbildung 4.3B, Hase 5 und Hase 7). Im Fall von Barentsz wurde die vollständige Ratten-Barentsz cDNA aus einem schon vorhandenen Vektor (pEGFP-Btz (Macchi et al. 2003)) mit den in Abschnitt 3.3.1 beschriebenen Primern durch PCR amplifiziert und in die entsprechenden Expressionsvektoren pRSETb und pGEX (His<sub>6</sub>-Btz<sub>FL</sub> und GST-Btz<sub>FL</sub>) kloniert.

Für die Herstellung aller Immunsereen wurden His<sub>6</sub>-markierte Fusionsproteine verwendet. Zunächst wurde versucht, die Polyhistidin-Fusionsproteine (His<sub>6</sub>-Btz<sub>FL</sub>, His<sub>6</sub>-Stau1<sub>FL</sub>, His<sub>6</sub>-Stau2<sup>62</sup>) unter nativen Bedingungen aus dem löslichen Bakterienlysat zu gewinnen. Die Verwendung nativ gefalteter Proteine sollte die Wahrscheinlichkeit erhöhen, Antikörper zu erhalten, die bei einer späteren Immunfällung das in einem Komplex gebundene native Protein erkennen.

Trotz unterschiedlichster Expressionsbedingungen, gelang es nur in begrenztem Maße die beiden Staufer-Fusionsproteine löslich in *E.coli* zu exprimieren (Daten nicht gezeigt). Bei der Expression des Barentsz-Fusionsproteins (His<sub>6</sub>-Btz<sub>FL</sub>) führte weniger die Löslichkeit als der schnelle Abbau des rekombinanten Proteins zu Schwierigkeiten (Abbildung 4.1C und 4.2C). Optimierungsversuche, wie z.B. die Expression in Protease-defizienten *E.coli*-Stämmen, führten nicht zum gewünschten Erfolg.

Generell konnte die beste Expression für alle in dieser Arbeit verwendeten Fusionsproteine schließlich im *E.coli*-Stamm Rosetta erzielt werden. Dadurch konnte eine Reinigung der löslichen Polyhistidin-Fusionsproteine unter nativen Bedingungen über eine Ni<sup>2+</sup>-NTA Matrix ermöglicht werden. Jedoch war die Ausbeute im Gegensatz zu den früher verwendeten kleineren Antigenen (C-terminale Domäne des entsprechenden Barentsz- oder Stauferproteins) sehr gering. Abbildung 4.1 zeigt eine repräsentative Reinigung der entsprechenden Polyhistidin-Fusionsproteine unter nativen Bedingungen. Die Spezifität wurde mittels Western Blot, die Reinheit der entsprechenden Fusionsproteine anhand von Coomassie-Gelen überprüft (Abbildung 4.1A, 4.1B, 4.1C). Die Laufhöhe des Barentsz-Proteins (Doppelbande von ~115 kDa; phosphorylierte und unphosphorylierte Form von Btz (Degot et al. 2002)) stimmt nicht mit dem theoretischen Molekulargewicht von 76 kDa überein. Dieses, in der SDS-PAGE größer erscheinende, Molekulargewicht ist auf der einen Seite durch das Vorhandensein von sauren Aminosäuren am N-Terminus und auf der anderen Seite durch den Prolin-reichen C-Terminus des Barentsz-Proteins zurückzuführen (Degot et al. 2002). Wie auf den Coomassie-gefärbten SDS-Gele in Abbildung 4.1 zu sehen ist, enthielten alle drei unter nativen Bedingungen gereinigten Antigene erhebliche bakterielle Verunreinigungen und waren daher für eine Immunisierung nicht geeignet (Abbildung 4.1A, 4.1B, 4.1C, rechts).

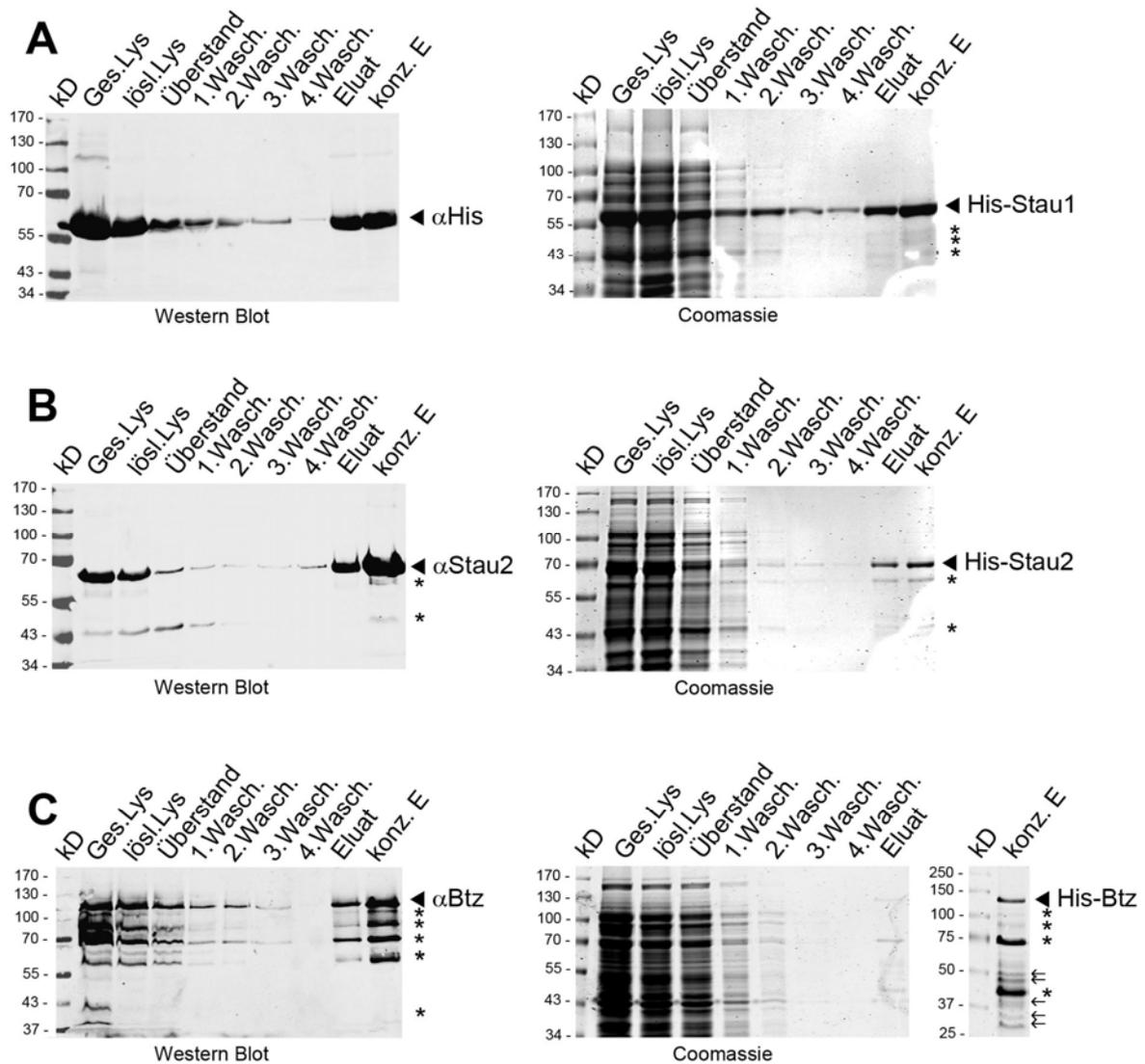


**Abb. 4.1: Native Reinigung von His<sub>6</sub>-Stau1<sub>FL</sub>, His<sub>6</sub>-Stau2<sup>62</sup> und His<sub>6</sub>-Btz<sub>FL</sub> nach Expression in *E.coli*.**

**A: Links:** 10 µl von jedem Reinigungsschritt wurden auf einem 10%igen SDS-PA Gel aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und diese mit anti-Stau1 Antikörpern (αStau1) dekoriert: Spur 1: Gesamtlysat (Gesamt-Bakterienlysat vor Ultraschallbehandlung), Spur 2: lösliches Bakterienlysat (nach Zentrifugation), Spur 3: Überstand nach Adsorption an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix (enthält nichtgebundenes Protein), Spur 4 und 5: Waschschritte, Spur 6 und 7: unkonzentrierte Eluate, Spur 8: vereinigtes und konzentriertes His<sub>6</sub>-Stau1<sub>FL</sub>-Eluat. **Rechts:** 20 µl eines konzentrierten His<sub>6</sub>-Stau1<sub>FL</sub>-Eluats wurde über ein 10%iges SDS-PA Gel getrennt und mit Coomassie gefärbt. Die Laufhöhe des Fusionsproteins ist durch die Pfeilspitze markiert. Die bakteriellen Verunreinigungen der drei Reinigungen sind auf dem entsprechenden Coomassie-Gel deutlich erkennbar und wurden nicht einzeln markiert. **B: Links:** Es wurde wie in **A** verfahren. Der Western Blot wurde mit anti-Stau2 Antikörpern (αStau2) dekoriert. Die mit dem Stern markierten Banden stellen Abbau-Produkte des His<sub>6</sub>-Stau2<sup>62</sup> Fusionsproteins dar. **C:** Es wurde wie in **A** beschrieben verfahren, der Western Blot wurde mit anti-Btz Antikörpern (αBtz) inkubiert.

Erst eine Reinigung der Polyhistidin-Fusionsproteine unter Hybrid-Bedingungen führte zu einer wesentlichen Verbesserung der Proteinausbeute. Dabei wurden die Fusionsproteine unter denaturierenden Bedingungen lysiert, an die  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Matrix gebunden und gewaschen. Auf diese Weise ließen sich auch die beiden sich in unlöslichen Einschlusskörperchen befindlichen Stufen-Fusionsproteine in ausreichender Menge gewinnen (vergl. Abbildung 4.1A mit 4.2A, 4.1B mit 4.2B). Anschließend wurden die Proteine noch an der Säule gebunden, in ihre ursprüngliche, native Konformation zurückgefaltet (s. Abschnitt 3.8.1.4). Abbildung 4.2 zeigt jeweils einen repräsentativen Western Blot und ein Coomassie-gefärbtes SDS-Gel einer Reinigung der entsprechenden  $\text{His}_6$ -markierten Fusionsproteine unter Hybrid-Bedingungen (Abbildung 4.2A, 4.2B, 4.2C). Im Fall von Barentsz konnte durch diese Bedingungen keine wesentliche Verminderung der Abbauprodukte bzw. keine Verbesserung der Proteinausbeute sowie der Reinheit des Fusionsproteins erzielt werden (vergl. Abbildung 4.1C und 4.2C). Die erwähnten Abbauprodukte, die bei Western Blot-Analysen von anti-Btz Antikörpern erkannt wurden, stellen kleinere Fragmente des Btz-Fusionsproteins dar. Daher wurden die Barentsz-Antigene, wie in Abbildung 4.2C gezeigt, für die Immunisierung der Hasen eingesetzt. Da alle drei Fusionsproteine häufig parallel gereinigt wurden, wurden die Hybrid-Bedingungen auch für das Barentsz-Protein als Standard-Methode gewählt. Auf diese Weise konnten die Antigene schließlich in ausreichender Menge und Reinheit hergestellt werden.

In der Doktorarbeit von Sven Kröning (Kröning, Dissertation 2004) wurde gezeigt, dass sich eine C-terminale Domäne des Barentsz-Proteins ( $\text{Btz}_{\text{C}2}$ ) sehr gut für eine Immunisierung eignet. Dieses kleinere, lösliche Antigen wurde im Rahmen dieser Arbeit unter nativen Bedingungen gereinigt und ebenfalls zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern in Kaninchen injiziert (Abbildung 4.3C Hase 12 und Hase 13).



**Abb. 4.2: Reinigung von His<sub>6</sub>-Stau1<sub>FL</sub>, His<sub>6</sub>-Stau2<sup>62</sup> und His<sub>6</sub>-Btz<sub>FL</sub> unter Hybrid-Bedingungen nach Expression in *E.coli*.**

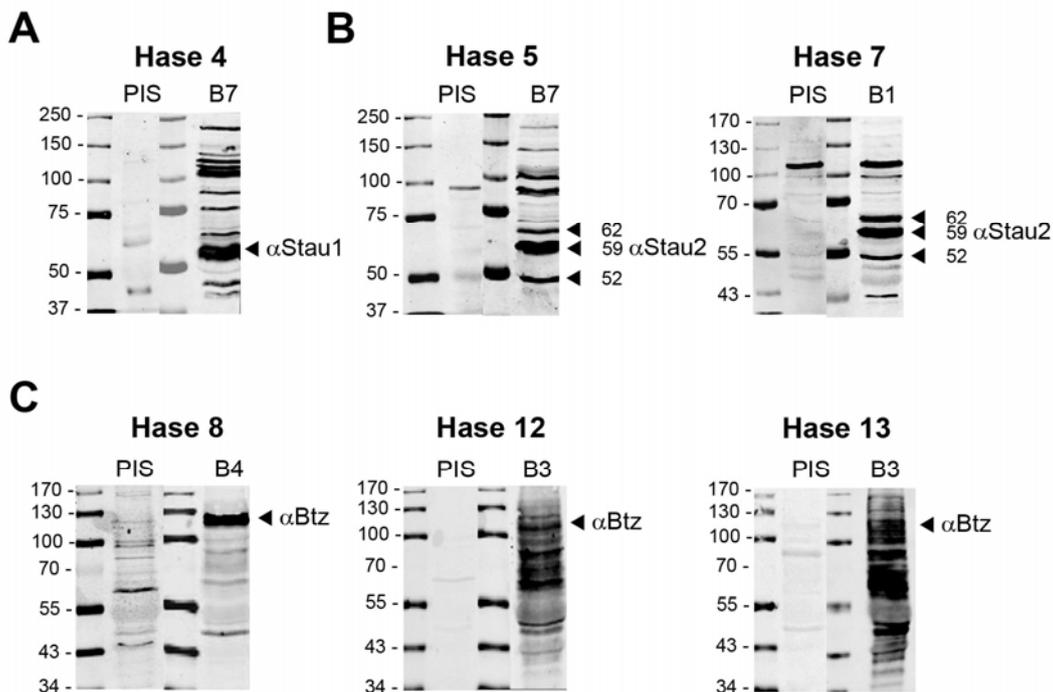
**A: Links:** 10 µl jedes Reinigungsschritte wurden mittels Western Blot (dekoriert mit anti-His Antikörpern) analysiert. Es wurde verfahren wie in Abbildung 4.1 A beschrieben. **Rechts:** Repräsentatives Coomassie-Gel (15 µl je Fraktion geladen). Die Laufhöhe des Fusionsproteins ist durch die Pfeilspitze gekennzeichnet. Die Sterne markieren Abbauprodukte des Stau1-Fusionsproteins. **B:** Gezeigt sind die einzelnen Schritte einer His<sub>6</sub>-Stau2<sup>62</sup>-Reinigung. Es wurde verfahren wie unter **A** beschrieben. Die beiden Sterne kennzeichnen zwei Abbauprodukte des Stau2<sup>62</sup>-Fusionsproteins. **C: Links:** Gezeigt wird ein Western Blot einer His<sub>6</sub>-Btz<sub>FL</sub> Reinigung wie unter **A** beschrieben. **Rechts:** 20 µl des konzentrierten His<sub>6</sub>-Btz<sub>FL</sub> Eluats wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel mit Coomassie gefärbt. Die Laufhöhe des Fusionsproteins ist durch die Pfeilspitze gekennzeichnet. Die Sterne markieren die Hauptabbauprodukte des Fusionsproteins. Die Pfeile kennzeichnen die Banden der wenigen bakteriellen Verunreinigungen.

## **4.1.2 Affinitätsreinigung der Antiseren aus Hasen**

### **4.1.2.1 Antiseren**

Pro Antigen wurden zwei Hasen, wie in Abschnitt 3.8.1.5 beschrieben, in der Abteilung für Labortierkunde und –genetik der Medizinischen Universität Wien durch Prof. Dr. Harald Höger immunisiert. Leider kam es zu keiner nennenswerten Immunantwort in Hase 3, der mit His<sub>6</sub>-Stau1<sub>FL</sub> immunisiert wurde, so dass dieser nach der Analyse des siebten Testserums eliminiert wurde (Daten nicht gezeigt). Zudem verstarben die mit Stau2 (Hase 6) bzw. mit Btz (Hase 9) immunisierten Hasen relativ früh. Die wenige Antiseren dieser beiden Hasen wurden daher im weiteren Verlauf dieser Arbeit nicht verwendet (Daten nicht gezeigt). Anstelle von Hase 6 wurde ein weiterer Hase mit His<sub>6</sub>-Stau2<sup>62</sup> Antigen immunisiert (Hase 7). Die Analyse des entsprechenden Präimmunserums (PIS) und einer jeweiligen Blutung (Blutung, B) von allen Hasen ist in Abbildung 4.3 zu sehen. Bei der Analyse der Antiseren zeigte sich, dass das Stau2-Antigen im Vergleich zu den Stau1- und Btz-Antigenen bereits zu Beginn eine starke Immunreaktion auszulösen scheint. Wie am Beispiel von Hase 7 (Stau2) in Abbildung 4.3B zu sehen ist, erfolgte schon bei der ersten Testblutung eine deutliche Reaktion auf das injizierte Antigen. Bei den anti-Stau1 und anti-Btz Antiseren wurde erst bei späteren Blutungen ein hoher Antikörpertiter beobachtet. Eine mögliche Erklärung liefert das Expressionsmuster der verwendeten Proteine. Sowohl Btz als auch Stau1 werden ubiquitär exprimiert. Dies führt im Hasen möglicherweise zu einer Immuntoleranz und infolgedessen zu einem geringeren Antikörpertiter. Im Gegensatz dazu ist Stau2 überwiegend im Gehirn (immunprivilegiertes Gewebe) vorhanden (Duchaine et al. 2002) und eignet sich offenbar gut als Antigen. Wie in Abbildung 4.3 zu sehen ist, erkannten alle Antiseren neben den gewünschten Banden noch weitere, unspezifische Banden. Diese können durch Kreuzreaktionen hervorgerufen werden. Es ist auch möglich, dass diese Antikörper durch bakterielle Verunreinigungen des Antigens erzeugt wurden. Bei der Herstellung der Antiseren wurden auch anti-His<sub>6</sub> Antikörper im Hasen produziert, diese können ebenfalls zu Kreuzreaktionen mit Proteinen des embryonalen Rattenhirnextrakts führen. Daher war eine Isolierung der spezifischen Antikörper über eine Antigensäule unabdingbar (s. Abschnitt 4.1.2.2).

Neben den selbst hergestellten Antiseren wurde noch ein weiteres anti-Btz Serum (anti-Btz Hase 3; Antigen: His<sub>6</sub>-Btz<sub>C2</sub>) verwendet, das in der Doktorarbeit von Sven Kröning beschrieben und im Rahmen dieser Arbeit affinitätsgereinigt wurde (Abbildung 4.5) (Kröning, Dissertation 2004).

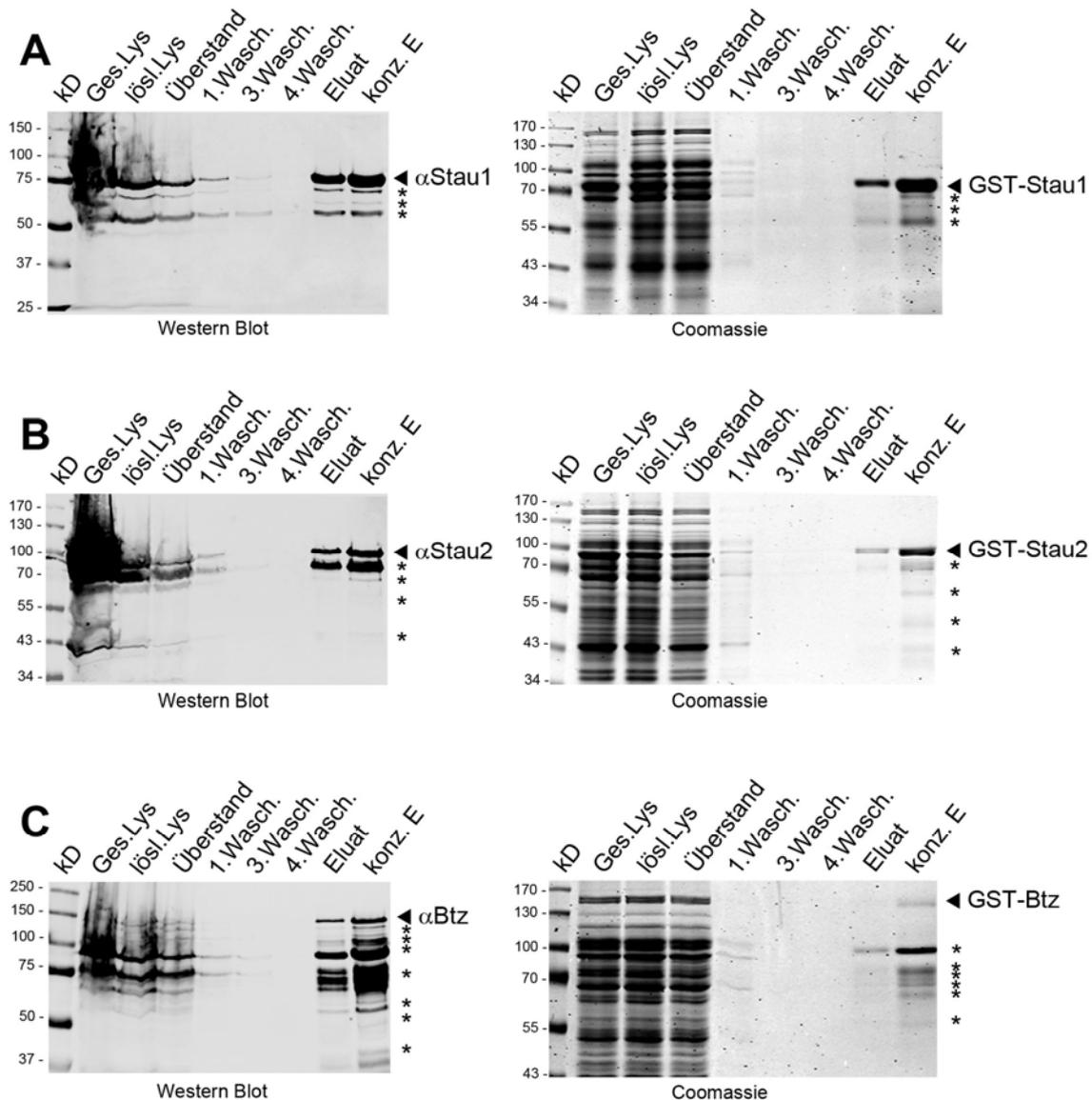


**Abb. 4.3: Erkennung von Stau1, Stau2 und Btz im Hirnextrakt der Ratte (E17) durch die selbst hergestellten anti-Stau1, anti-Stau2 und anti-Btz Antiseren aus Hasen.**

**A:** Für die Charakterisierung der Präimmunsere (PIS) und eines Antiserums (Blutung 7, B7) des Hasen 4 wurden 70 µg Hirnextrakt (S20) aus embryonalen Rattenhirnen (E17) auf einem 10%igen SDS-PA Gel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Alle Seren wurden 1:500 verdünnt. Die Bande, die dem Molekulargewicht von Stau1 (55 kDa) entspricht, ist durch die Pfeilspitze gekennzeichnet. **B:** Dargestellt ist die Analyse der PIS und anti-Stau2 Antiseren. Es wurde verfahren wie unter **A** beschrieben. Auf der rechten Seite sind die unterschiedlichen Stau2-Isoformen (52 kDa, 59 kDa, 62 kDa) jeweils mit einer Pfeilspitze markiert. In **C** sind die Seren der Barentsz-Hasen gezeigt. Es wurde verfahren wie unter **A** beschrieben. Die Laufhöhe des Barentsz-Proteins ist auf der rechten Seite durch die Pfeilspitze gekennzeichnet.

#### **4.1.2.2 Affinitätsreinigung der Antiseren**

Für die Immunfällung von nativen Proteinkomplexen sind hochaffine, monospezifische Antikörper notwendig. Die Isolierung antigen-spezifischer Antikörper aus dem Antiserum erfolgte über eine Antigensäule. Um eine Anreicherung von anti-His<sub>6</sub> Antikörpern zu vermeiden, wurde für die Herstellung der Antigen-Matrix (Abschnitt 3.8.2.1) das entsprechende rekombinante Protein als GST-Fusionsprotein verwendet. Abbildung 4.4 zeigt die Analyse einer repräsentativen Affinitätsreinigung des entsprechenden GST-Stau1<sub>FL</sub>, GST-Stau2<sup>62</sup> bzw. GST-Btz<sub>FL</sub> Fusionsproteins mittels Western Blot und Coomassie-Gel (Abbildung 4A, 4B, 4C). Bei der Reinigung des Barentsz-Fusionsproteins traten, wie in Abbildung 4C zu sehen, einige Abbauprodukte auf.

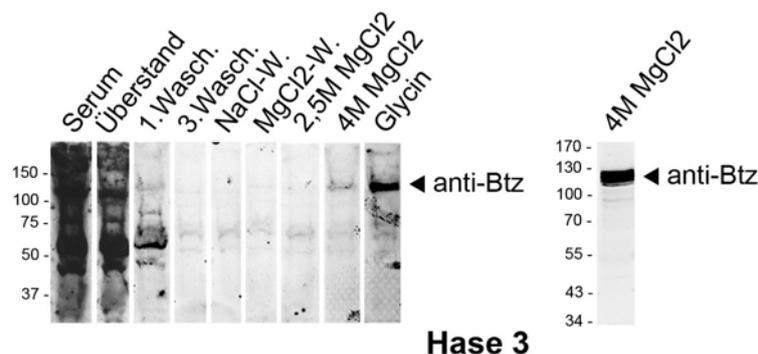


**Abb. 4.4: Reinigung von GST-Stau1<sub>FL</sub>, GST-Stau2<sup>62</sup> bzw. GST-Btz<sub>FL</sub> nach Expression in *E.coli*.**

**A: Links:** 10 µl der folgenden Reinigungsschritte wurden mittels Immunoblot überprüft. Spur 1: Gesamtlysate (Bakterienlysate vor Ultraschallbehandlung), Spur 2: lösliches Bakterienlysate nach Zentrifugation, Spur 3: Überstand nach Adsorption an Glutathion Sepharose (enthält nichtgebundenes Protein), Spur 4-6: Waschschr. 1-3, Spur 7: unkonzentriertes Eluat, Spur 8: dialysiertes und konzentriertes GST-Stau1<sub>FL</sub>-Eluat. Die Laufhöhe des Fusionsproteins (durch das GST um ~26 kDa größer als das endogene Stau1) ist mit der Pfeilspitze gekennzeichnet. Die Sterne markieren Abbauprodukte des GST-Fusionsproteins. **Rechts:** Ein mit Coomassie gefärbtes repräsentatives SDS-Gel zeigt die eben aufgelisteten Fraktionen (je 20 µl). **B und C:** Es wurde verfahren wie in **A** beschrieben. Die Laufhöhe des Fusionsproteins ist durch die Pfeilspitze markiert. Die mit einem Stern gekennzeichneten Banden sind Abbauprodukte des jeweiligen Fusionsproteins.

Die gereinigten, dialysierten und konzentrierten GST-Fusionsproteine wurden an magnetische Glutathion-Kügelchen gebunden, chemisch quervernetzt und für die Isolierung spezifischer Antikörper aus dem entsprechenden Antiserum eingesetzt. Das bereits in unserem Labor etablierte Protokoll für die Affinitätsreinigung von Antikörpern wurde im Rahmen dieser Arbeit für die selbsthergestellten Antisera optimiert. Alle Schritte einer Antikörper-Reinigung wurden, wie in Abbildung 4.5 am Beispiel von Hase 3 (Btz) gezeigt, auf Western Blots gegen embryonales Rattenhirnextrakt überprüft. Eine Erhöhung des pH-Wertes während der Inkubation mit der Antigen-Säule führte zu einer effizienteren Antigen-Antikörper Bindung (Daten

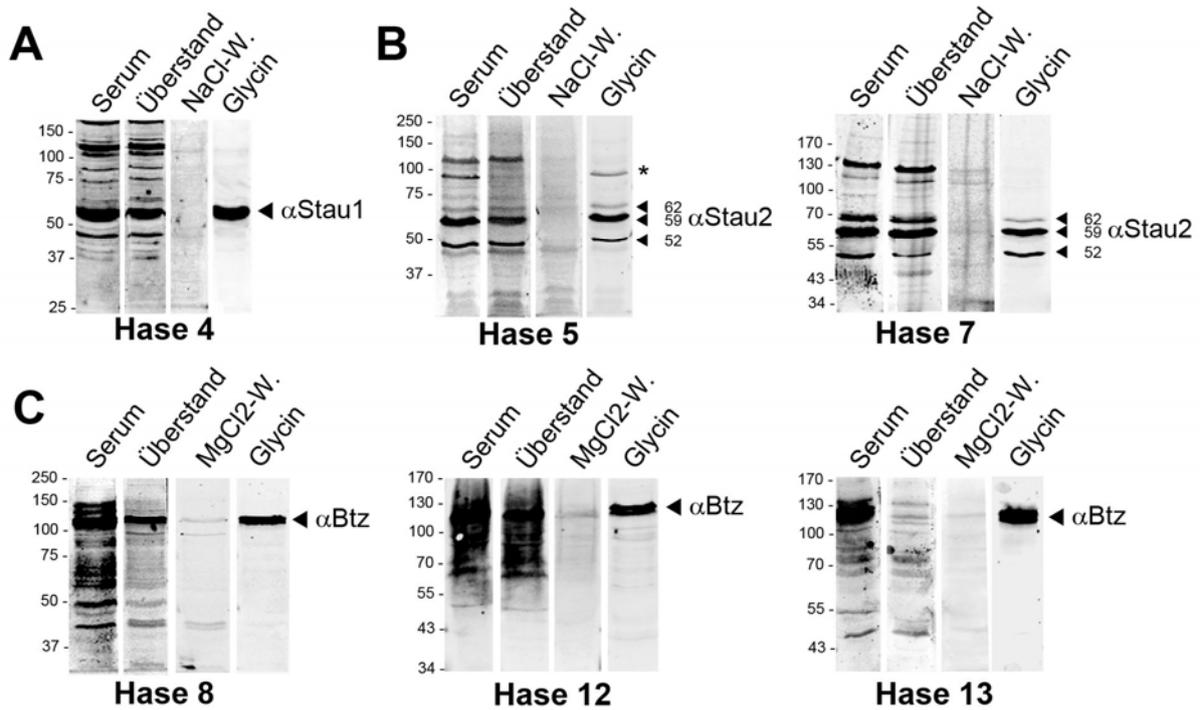
nicht gezeigt). Durch stringente Waschschr itte mit steigendem Salzgehalt wurden unspezifisch gebundene Antikörper von der Antigen-Säule gewaschen (Abbildung 4.5 und 4.6 siehe Spuren Wasch. und NaCl-W.) In einem letzten Schritt wurden Antikörper, die eine geringe Affinität zum Antigen haben, durch einen 0,5 M MgCl<sub>2</sub>-Waschschritt entfernt. Abbildung 4.5 zeigt die Optimierung der Elutionsbedingungen für die Affinitätsreinigung. Die meisten Antikörper lassen sich mit abwechselnden Zyklen von hohen und niedrigen pH-Werten von der Antigen-Säule lösen. Für hochaffine Antikörper ist dies nicht immer der Fall, daher wurden sie mit einer MgCl<sub>2</sub>-Elution gewonnen (Harlow and Lane, Laboratory Manuel 1988). Wie in Abbildung 4.5 zu sehen ist, ließen sich mit 2,5 M MgCl<sub>2</sub> keine anti-Btz Antikörper von der Säule lösen. Die Erhöhung auf 4 M MgCl<sub>2</sub> führte zum gewünschten Effekt. Jedoch war die Ausbeute dieser hochaffinen Antikörper sehr gering. Das 4 M MgCl<sub>2</sub>-Eluat wurde in einer geringeren Verdünnung nochmals analysiert (Abbildung 4.5 rechts). Eine Elution mit einem niedrigen pH-Wert erzielte die beste Ausbeute an mono-spezifischen Antik orpfern und wurde daher als Standard-Elution für alle hier verwendeten Antikörper eingesetzt.



**Abb. 4.5: Optimierung der Affinitätsreinigung von anti-Btz Antik orpfern aus Antiserum.**

Anti-Btz Antikörper des Hasen 3 wurden mit einer Antigen-Affinitätssäule aufgereinigt. **Links:** Die einzelnen Schritte der Reinigung wurden auf Western Blots gegen embryonales Rattenhirnextrakt überprüft (alle 1:500 verdünnt). Spur 1: Antiserum des Hasen 3 (Serum); Spur 2: Überstand nach Inkubation mit der Antigen-säule (enthält ungebundene Antikörper), Spuren 3-6: Waschschr itte mit ansteigender Stringenz; Spuren 7-9: konzentrierte Eluate (2,5 M MgCl<sub>2</sub>, 4 M MgCl<sub>2</sub> und Glycin pH 2,5). Die Laufhöhe des Btz-Proteins ist durch die Pfeilspitze gekennzeichnet. **Rechts:** Repräsentativ wurde eine 4 M MgCl<sub>2</sub>-Elution einer anti-Btz Affinitätsreinigung 1:100 verdünnt gegen embryonales Hirnextrakt getestet.

In Abbildung 4.6 sind repräsentativ die Analysen weiterer, in dieser Arbeit hergestellter, Antiseren gezeigt. Die Antikörpertiter der Staufer-Antiseren (Hase 4, Hase 5 und Hase 7) waren sehr hoch und erlaubten die Reinigung in mehreren aufeinander folgenden Inkubationsschritten mit der Antigen-säule, bis die Antikörper im Überstand abgereichert waren (Abbildung 4.6A und 4.6B Überstand). Bei der Isolierung der anti-Stau2 Antikörper aus Hase 5 wurde eine Kreuzreaktion mit einem unbekanntem Protein von ~90 kDa beobachtet (Abbildung 4.6B). Daher wurde zunächst entschieden, die gereinigten anti-Stau2 Antikörper des Hasen 7 für die weiteren Experimente zu verwenden. Im Fall von Barentsz ließen sich, wie in Abbildung 4.5 und 4.6C gezeigt, aus allen verwendeten Antiseren monospezifische anti-Btz Antikörper isolieren. Die beste Ausbeute wurde dabei mit dem Antiserum des Hasen 8 erzielt.

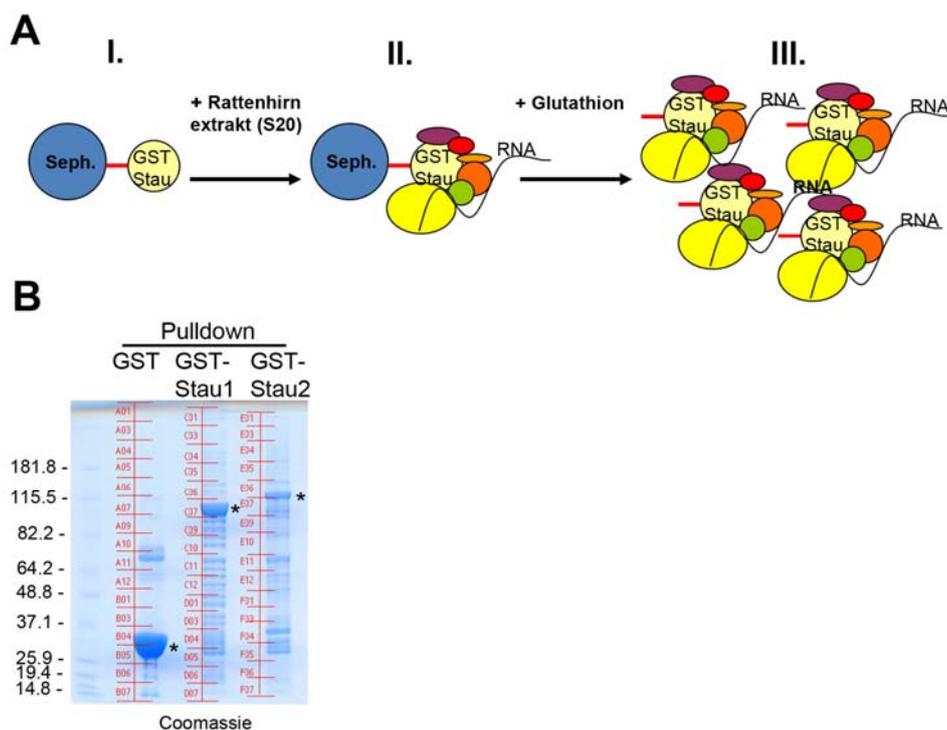


**Abb. 4.6: Affinitätsreinigung von anti-Stau1, anti-Stau2 und anti-Btz Antikörpern aus Antiseren**

**A:** Zur Herstellung von polyklonalen anti-Stau1 Antiseren wurde Hase 4 mit His<sub>6</sub>-Stau1<sub>FL</sub> Antigen immunisiert. Für die Isolierung der anti-Stau1 Antikörper wurde verfahren wie in Abb. 5 beschrieben. Allerdings wurde standardmäßig mit Glycin pH 2,5 und nur optional mit MgCl<sub>2</sub> eluiert. Gezeigt sind das Antiserum des Hasen 4 (Serum), der Überstand nach Adsorption an die Antigensäule, der Salzwaschschritt (1,5 M NaCl) und das konzentrierte Eluat (Glycin pH 2,5). Die Laufhöhe des Stau1-Proteins ist durch die Pfeilspitze markiert. Alle gezeigten Schritte der Affinitätsreinigung wurden 1:500 verdünnt. **B:** Zur Herstellung von polyklonalen anti-Stau2 Antiseren wurden Hase 5 und Hase 7 mit His<sub>6</sub>-Stau2<sup>62</sup> Antigen immunisiert. Es wurde verfahren wie unter **A** beschrieben. Die drei Stau2-Isoformen (52 kDa, 59 kDa, 62 kDa) sind mit Pfeilspitzen gekennzeichnet. Die mit dem Stern markierte Bande ist eine Kreuzreaktion mit einem nicht identifizierten Protein im Rattenhirnextrakt. **C:** Für die Herstellung der polyklonalen anti-Btz Antiseren wurden verschiedene Antigene eingesetzt. Hase 8 wurde mit His<sub>6</sub>-Btz<sub>FL</sub> Antigen, Hasen 12 und 13 wurden mit His<sub>6</sub>-Btz<sub>C2</sub> immunisiert. Es wurde verfahren wie unter **A** beschrieben. In diesem Fall ist der MgCl<sub>2</sub>-Waschschritt gezeigt. Die Laufhöhe des Btz-Proteins ist jeweils mit einer Pfeilspitze gekennzeichnet.

## **4.2 Identifizierung von Interaktionspartnern für Btz, Stau1 und Stau2 durch *in vitro* GST-Pulldown Experimente**

Um die bei der RNA-Lokalisation zugrunde liegenden Vorgänge besser verstehen zu können, ist es wichtig, die Komponenten der dafür verantwortlichen Transportmaschinerie zu kennen. Bisher wurden nur wenige Interaktionspartner von Stau1, Stau2 bzw. Btz identifiziert. Auch ist die Funktion der drei Proteine beim Transport von RNA nicht bekannt. Eine klassische Methode, um Interaktionspartner eines Proteins zu finden, ist der *in vitro* GST-Pulldown. Als Ausgangsmaterial wurde embryonales, zytoplasmatisches Rattenhirnextrakt (embryonaler Tag 17; E17) verwendet. Sowohl Stau1 als auch Btz sind vor der Geburt im Rattenhirn am höchsten exprimiert. Der Höhepunkt der Expression von Stau2 hingegen ist in der ersten Woche nach der Geburt (Sven Kröning, Dissertation, 2004). Als Köderprotein für den GST-Pulldown diente das entsprechende bakteriell exprimierte, gereinigte, rekombinante GST-Fusionsprotein (s. Abbildung 4: GST-Stau1<sub>FL</sub>, GST-Stau2<sup>62</sup> und GST-Btz<sub>FL</sub>). Um Proteine identifizieren zu können, die an den GST-Teil binden, wurde zu jedem Experiment in einem Parallelansatz ein Pulldown mit dem GST durchgeführt. In Abbildung 4.7A ist die Versuchsdurchführung für die in Abbildung 4.7B gezeigten GST-Pulldowns schematisch dargestellt. (I.) Zunächst wurden die gereinigten Fusionsproteine (GST-Stau1<sub>FL</sub>, GST-Stau2<sup>62</sup>) sowie das GST an Glutathion-Sepharose immobilisiert. (II.) Nach Inkubation mit embryonalem Rattenhirnextrakt assoziierten spezifische Proteine und RNAs mit dem entsprechenden Köderprotein. (III.) Nach mehreren stringenten Waschschritten wurden die GST-Fusionsproteine und damit auch ihre assoziierten Proteine und RNAs durch Zugabe von der Sepharose eluiert.



**Abb. 4.7:** *In vitro* GST-Pulldown mit GST, GST-Stau1<sub>FL</sub> und GST-Stau2<sup>62</sup> aus Rattenhirnextrakt (E17).

**A:** Schematische Darstellung eines *in vitro* GST-Pulldowns, wie er für die in **B** gezeigten Experimente durchgeführt wurde. **I:** Das bakteriell exprimierte und gereinigte GST-Fusionsprotein wurde an Glutathion-Sepharose gekoppelt. **II:** Nach der Inkubation mit löslichem embryonalem Rattenhirnextrakt (S20) sind die Stauen-assoziierten Proteine und RNAs über das Köderprotein an die Sepharose gebunden. **III:** Nach mehreren stringenten Waschschritten wurden die assoziierten Proteine zusammen mit dem GST-Fusionsprotein durch eine kompetitive Verdrängung mit Glutathion von der Säule gelöst. Als Negativkontrolle wird in einem Parallelansatz ein Pulldown mit dem an Sepharose gekoppelten GST durchgeführt. **B:** 5 µl der GST-, GST-Stau1<sub>FL</sub> und GST-Stau2<sup>62</sup> assoziierten Proteine wurden auf einem 4-12%igen Gradientengel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Die Sterne markieren das jeweils entsprechende GST bzw. GST-Fusionsprotein. Anschließend wurden die einzelnen Spuren in ~20 Stücke geschnitten und massenspektrometrisch analysiert (CeMM, Wien).

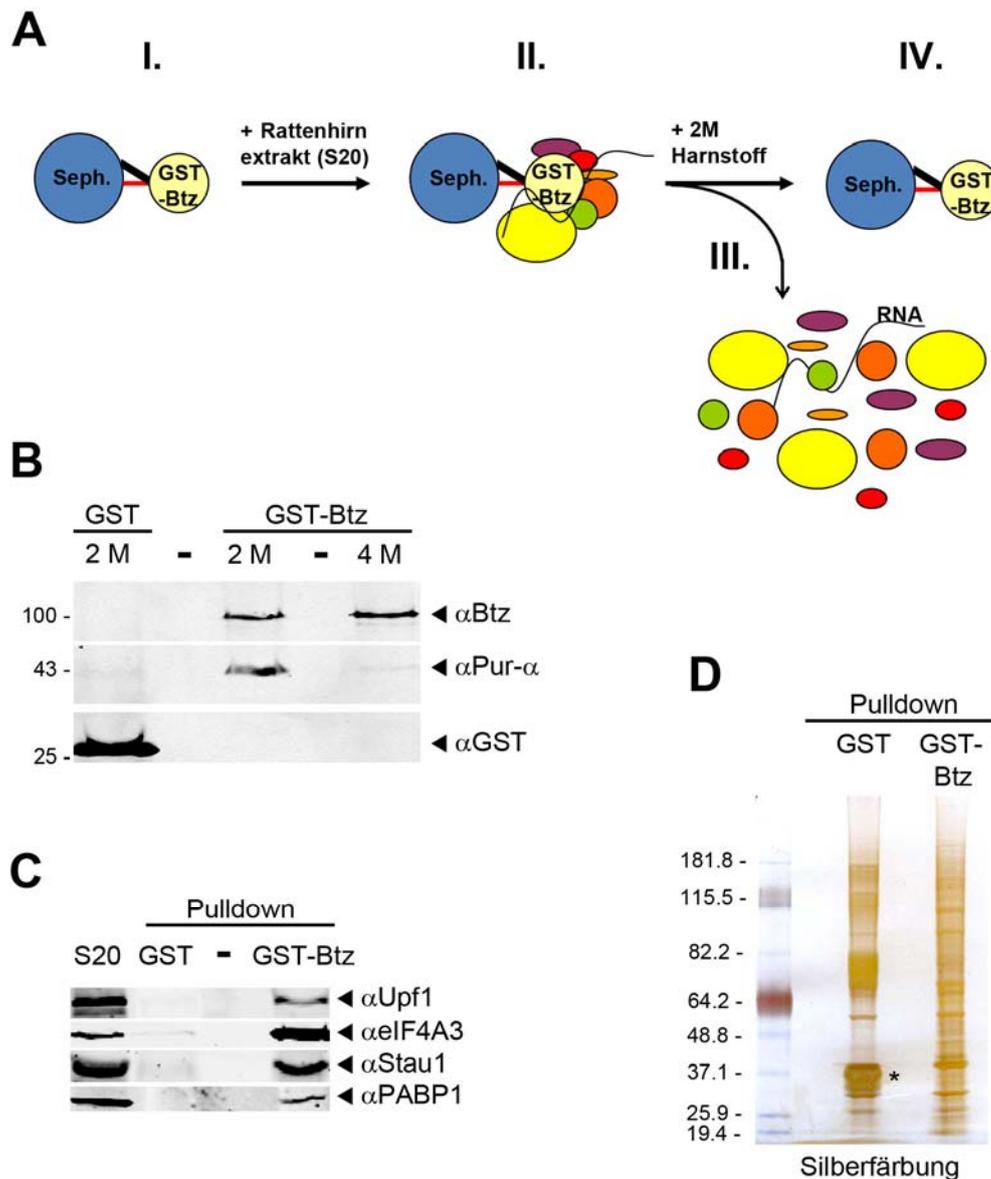
Abbildung 4.7B zeigt die auf einem Gradienten-Gel aufgetrennten und mit Coomassie gefärbten Eluate der parallel durchgeführten GST-Pulldown Experimente mit GST, GST-Stau1 bzw. GST-Stau2. Die Sterne markieren die von der Matrix gelösten Köderproteine. Die drei Spuren wurden, wie gekennzeichnet, in ungefähr 20 Stücke geschnitten und, wie in Abschnitt 3.8.6 beschrieben, massenspektrometrisch analysiert.

Die große Menge an rekombinantem Protein erschwert oft die Identifizierung von Peptiden potentieller Interaktionspartner bei der späteren massenspektrometrischen Analyse. Um das Ablösen des jeweiligen GST-Fusionsproteins von der Matrix zu minimieren, wurden die Fusionsproteine in einem nächsten Experiment chemisch mit der Matrix quervernetzt (Abbildung 4.8A I.). Abbildung 4.8A stellt den Versuchsablauf am Beispiel von GST-Btz schematisch dar. Btz-spezifische Proteine und RNAs binden nach einer Inkubation mit embryonalem Rattenhirnextrakt an das Köderprotein (II.). Wie auch für das in Abbildung 4.7A beschriebene (konventionelle) GST-Pulldown Experiment, wurde auch in diesem Fall ausgiebig gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu lösen. Durch die chemische Quervernetzung der Köderproteine an die Matrix war eine Elution mit Glutathion, die das GST-Protein aus der

Bindung verdrängt und dadurch auch die assoziierten Proteine und RNAs von der Matrix löst, nicht mehr möglich.

In einem Vorversuch wurde versucht, Btz-assoziierte Proteine durch Denaturierung mit 2 und 4 M Harnstoff zu eluieren. Die Eluate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 4.8B ist zugehörige Western Blot gezeigt. Trotz chemischer Quervernetzung wurde das GST sowie das ~100 kDa große Hauptabbauprodukt des GST-Btz<sub>FL</sub> (s. auch Abbildung 4.4) wenn auch nur in geringen Mengen von der Matrix gelöst (Abbildung 4.8B, Spur 1 und 3). Der Hauptanteil der GST-markierten Proteine blieb jedoch kovalent an die Sepharose gebunden. Das RNA-bindende Protein Pur- $\alpha$  wurde in diesem Versuch als Marker für Transport-RNPs eingesetzt, da es in mehreren unabhängige Studien in verschiedenen Systemen in Transport-RNPs detektiert wurde. Pur- $\alpha$  konnte mit 2M Harnstoff eluiert werden. Durch höhere Harnstoffkonzentrationen wurde überwiegend das Köderprotein (Abbildung 4.8B Spur 5) von der Säule gelöst. Gleichzeitig zeigt dieser Versuch, dass Pur- $\alpha$  eine mögliche neue Komponente von Btz-RNPs ist (Abbildung 4.8B, Spur 3). Aus vorangegangenen Arbeiten konnte eine Interaktion von Btz mit Upf1 und eIF4A3 vermutet werden. Die Interaktion von Btz mit eIF4A3 war bereits in *Drosophila* (Palacios et al. 2004) und Hek293T-Zellen (Shibuya et al. 2006) detektiert worden. Darüberhinaus konnte ein Komplex bestehend aus Btz, eIF4A3 und dem Heterodimer Magoh-Y14 mit Hilfe von rekombinanten Proteinen rekonstruiert werden (Ballut et al. 2005). Dieses Tetramer bildet den Kernkomplex des exon-exon-junction Komplexes, der unter anderem eine wichtige Rolle im *Nonsense-mediated mRNA Decay* spielt, indem er die RNA-Helikase Upf1 rekrutiert (Gehring et al. 2005, Kashima et al. 2006). Abbildung 4.8C zeigt, dass die RNA-Helikasen Upf1 und eIF4A3 sowie Stau1 spezifisch mit GST-Btz und nicht mit dem GST assoziieren. Das zytoplasmatische Poly(A)-Bindepotein 1 bindet die Poly(A) reiche Region von mRNAs. Die Detektion von PABP1 deutet darauf hin, dass zusätzlich zu den Proteinen auch mRNAs mit GST-Btz assoziiert sind. Zusammenfassend bestätigen die hier präsentierten Ergebnisse, dass sich in den beschriebenen Pulldown-Experimenten tatsächlich Protein-RNA-Komplexe gebildet hatten.

Um weitere, bisher unbekannt, mit Barentsz assoziierte Proteine zu identifizieren wurden die Eluate eines GST und eines GST-Btz<sub>FL</sub> Pulldown Experiments mittels Massenspektrometrie analysiert. Die jeweils identifizierten Proteine (Stau1<sub>FL</sub>, GST-Stau2<sup>62</sup> und GST-Btz<sub>FL</sub>) sind in Tabelle 4.1 aufgeführt und werden zusammen mit den Ergebnissen aus den endogenen IPs in Abschnitt 4.3.2.2 behandelt (Tabelle 4.1). Die in der jeweiligen Negativkontrolle (GST) identifizierten Peptide stellen Hintergrund dar und wurden daher aus der Interaktionsliste entfernt.



**Abb. 4.8: *In vitro* GST-Pulldown Experimente mit kovalent an die Matrix gebundenem Köderprotein.**

**A:** Schematische Darstellung eines *in vitro* GST-Pulldown Experiments (gezeigt am Beispiel von GST-Btz<sub>FL</sub>).

**I:** Das bakteriell exprimierte und gereinigte GST-Btz<sub>FL</sub>-Fusionsprotein wird an Glutathion Sepharose gekoppelt und chemisch quervernetzt. **II:** Während der Inkubation mit embryonalem Rattenhirnextrakt (S20) binden die Proteine und RNAs an das Köderprotein. **III:** Nach mehreren stringenten Waschschritten wurden die assoziierten Proteine durch Zugabe von 2 M Harnstoff eluiert. **IV:** Die GST-Btz<sub>FL</sub>-Sepharose wurde gewaschen und kann anschließend wiederverwendet werden. Als Negativkontrolle diente jeweils eine mit GST gekoppelte Sepharose.

**B:** Optimierung der Elutionsbedingungen des GST und GST-Btz<sub>FL</sub> Pulldowns aus Rattenhirnextrakt (E17): Die mit GST und GST-Btz<sub>FL</sub> assoziierten Proteine (je 10 µl) wurden über eine 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet und diese mit den angegebenen Antikörpern dekoriert. 2 M Harnstoff waren ausreichend, um mit Btz-assoziierte Proteine (gezeigt für Pur-α, vergl. Spur 3 mit Spur 5) von der Säule zu lösen.

**C:** Nachweis einiger Kandidaten im GST-Btz Pull-down Experiment mittels Western Blot. Die Western Blots wurden horizontal geschnitten und mit den rechts angegebenen Antikörpern dekoriert.

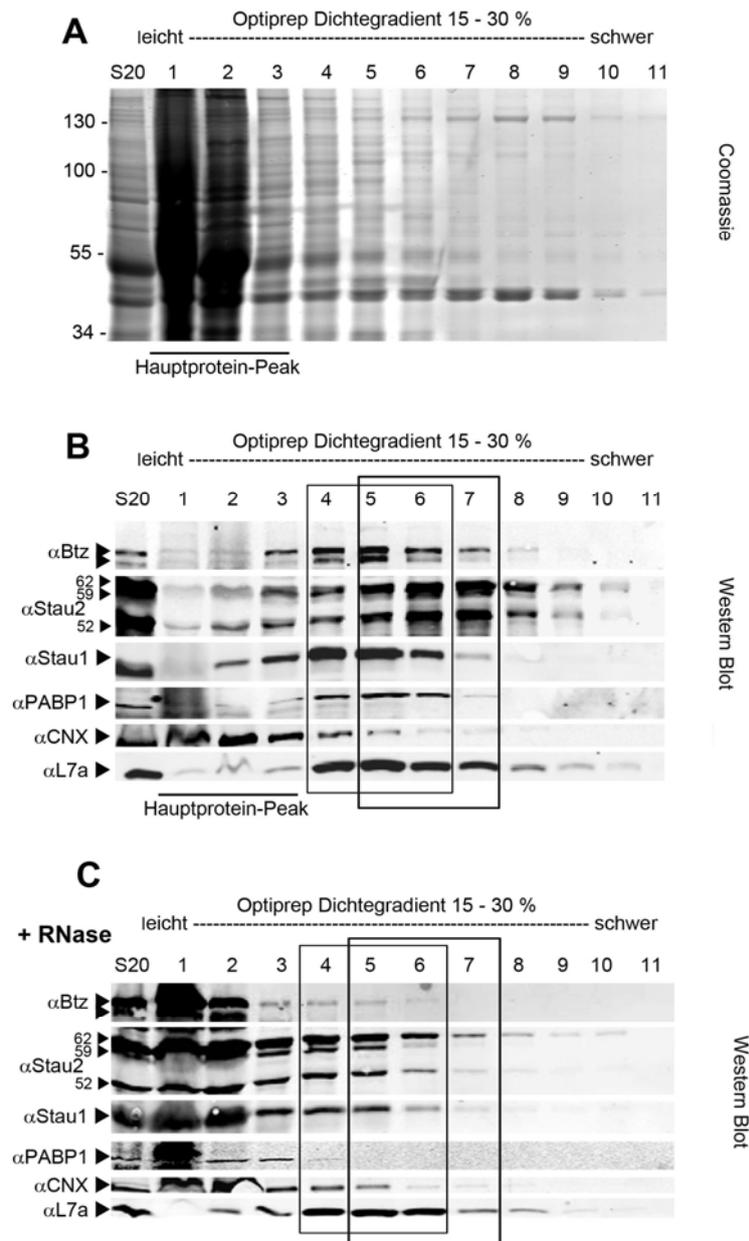
**D:** 2,5 µl der mit GST bzw. GST-Btz<sub>FL</sub> assoziierten Proteine wurden auf einem Gradientengel aufgetrennt und über eine Silberfärbung visualisiert. Da durch das Silber auch die assoziierte RNA gefärbt wird, erscheinen die Banden etwas unscharf. Es wurde verfahren wie unter A beschrieben. Der Stern kennzeichnet das GST, das trotz Quervernetzung von der Säule gelöst wurde. Die assoziierten Proteine wurden anschließend mittels Massenspektrometrie identifiziert.

## **4.3 Isolierung und Identifizierung von endogenen Barentsz- bzw. Staufen- enthaltenden Komplexen**

*In vitro* GST-Pulldown-Experimente bieten eine schnelle Möglichkeit, potentielle Interaktionspartner zu identifizieren. In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass es prinzipiell möglich ist, RNP-Komplexe um das entsprechende Köderprotein zu rekonstituieren (Kanai et al. 2004). Jedoch ist nicht geklärt, ob die auf diese Weise isolierten RNPs tatsächlich nativen RNPs in der Zelle entsprechen. Daher bestand eine zentrale Aufgabe meiner Doktorarbeit darin, eine neue Methode zu etablieren, um endogene neuronale RNPs unter physiologischen Bedingungen zu isolieren.

### **4.3.1 Anreicherung von neuronalen RNPs mittels Optiprep™ Dichtegradientenzentrifugation**

Um Immunfällungen im quantitativen Maßstab durchführen zu können, wurden die neuronalen RNPs zunächst mittels Optiprep™ Dichtegradientenfractionierung angereichert und dabei gleichzeitig vom Großteil der im Rattenhirnextrakt enthaltenen löslichen Proteine bzw. Proteinkomplexe mit abweichender Dichte abgetrennt. Abbildung 4.10A zeigt die über SDS-PAGE aufgetrennten und mit Coomassie gefärbten Proteine der jeweiligen Dichtegradientenfractionen. Der überwiegende Teil des Gesamtproteins aus dem Rattenhirnlysat (Hauptprotein-Peak) befand sich in den leichten Fractionen 1-3 (Abbildung 4.10A). Die Analyse mittels Western Blot (Abbildung 4.10B) zeigte eine deutliche Abtrennung der RNP-Markerproteine (Btz, Stau1 und Stau2) von den Hauptproteinen des zytoplasmatischen Rattenhirnextraktes. Btz kommt gemeinsam mit Stau1 und PABP1 in den Fractionen (F4-6) vor. Der Stau2-Peak hingegen war routinemäßig um eine Fraction versetzt, in Fractionen 5-7 (F5-7). Calnexin (CNX) und das ribosomale Protein L7a dienten als Marker für das endoplasmatische Retikulum (ER) bzw. die Ribosomen. Die Co-fractionierung von PABP1 zusammen mit Btz und den Staufen Proteinen deutet auf die Anwesenheit von RNA in diesen Fractionen hin. In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob eine RNase-Behandlung des löslichen Rattenhirnextraktes (S20) einen Einfluss auf das Sedimentationsverhalten der genannten Markerproteine hat (Abbildung 4.10C). Die beiden Staufen Proteine sowie Btz und PABP1 wurden durch die RNase-Behandlung in die oberen, leichten Fractionen des Dichtegradienten verschoben. Im Gegensatz dazu wurde kein Effekt auf das ER und die Ribosomen beobachtet (vergl. Abbildung 4.10A und 4.10B). Folglich wurde angenommen, dass die RNPs durch die biochemische Fractionierung nicht zerstört werden und nach wie vor RNAs enthalten. Erst durch die RNase-Behandlung zerfallen die RNPs partiell und weisen daher eine geringe Dichte als die intakten, nativen Komplexe auf. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich die hier verwendete biochemische Fractionierung zur Vorreinigung und Anreicherung von neuronalen RNPs eignet.



**Abb. 4.9: Anreicherung der RNP-Komplexe durch Optiprep™ Dichtegradientenfractionierung.**

**A:** Embryonales lösliches Rattenhirnextrakt (S20) wurde auf einen kontinuierlichen (15-30%) Optiprep Dichtegradienten geladen und bei 280000x g für 2½ h ultrazentrifugiert. 11 Fraktionen von je 1 ml wurden manuell von oben abgenommen. 1,5% einer jeden Fraktion (F) wurde mittels 10%iger SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie gefärbt. Der Großteil der Proteine (Hauptprotein-Peak) befand sich in den leichten, oberen Fraktionen 1-3 (F1-3). **B:** Es wurde verfahren wie unter **A** beschrieben. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels Immunblot mit den links angegebenen Antikörpern analysiert. Der kleinere schwarze Kasten markiert Btz-enhaltende bzw. Stau1-enhaltende Fraktionen (F4-6). Der Stau2-Peak ist um eine Fraktion versetzt in Fraktionen 5-7 (F5-7), gekennzeichnet durch den größeren, schwarzen Kasten. Calnexin (CNX) und das ribosomale Protein L7a dienen als Marker für das endoplasmatische Retikulum (ER) bzw. für die Ribosomen. **C:** Embryonales lösliches Rattenhirnextrakt (S20) wurde für 30 min mit 100 µg RNase A/T1 inkubiert. Anschließend wurde verfahren wie unter **A** beschrieben und die einzelnen Fraktionen wurden mittels Immunoblot wie in **B** analysiert.

Ein Teil der Staufr Proteine co-fractionieren trotz RNase-Behandlung mit den Ribosomen. In der Diplomarbeit von Kerstin Buhlert wurde dies genauer untersucht (Buhlert, Diplomarbeit, 2005). Auch durch die Zugabe verschiedener Antibiotika, die die Translation inhibieren und teilweise eine Dissoziation der Ribosomen hervorrufen, ließen sich die Staufr Pro-

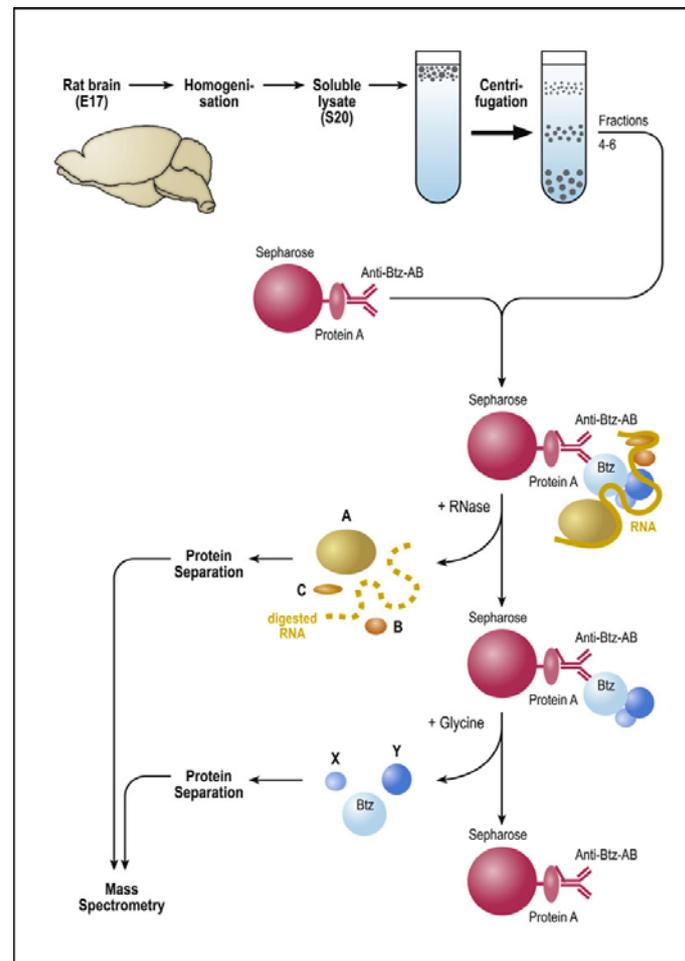
teine nicht von den Ribosomen trennen. Dies deutet auf eine Protein-Protein Wechselwirkung zwischen den Staufen Proteinen und Ribosomen hin, die auch schon von anderen Arbeitsgruppen beobachtet wurde (Brendel et al. 2004, Duchaine et al. 2002). Weitere Experimente sind notwendig, um diese Interaktion auf molekularer Ebene zu verstehen.

### **4.3.2 Immunpräzipitation von endogenen RNPs**

#### **4.3.2.1 Optimierung der Immunpräzipitation nativer RNPs**

Zur Isolierung der endogene neuronale RNPs wurden die über Dichtegradientenzentrifugation angereicherten und vorgereinigten RNP-Fractionen als Ausgangsmaterial für die IPs eingesetzt. Die im Folgenden beschriebene Optimierung des Versuchsprotokolls wurde zunächst mit bereits vorhandenen Antiseren (hauptsächlich von Hase 3 immunisiert mit Btz) durchgeführt, da die oben beschriebenen, selbst hergestellten Antikörper noch nicht zur Verfügung standen. Zudem galt es herauszufinden, in welchem präparativen Maßstab die Immunpräzipitationen durchgeführt werden müssen, um genügend Material für die Massenspektrometrie zu erhalten. Um die mono-spezifischen affinitätsgereinigten Antikörper möglichst effizient einzusetzen, wurden die Antikörper irreversibel an Protein-A Sepharose gekoppelt. Das Quervernetzen der Antikörper ermöglicht eine Wiederverwendung der Antikörper-Sepharose und verringert den Hintergrund an Immunglobulinen (IgGs) bei der späteren massenspektrometrischen Analyse. Da eine herkömmliche SDS-Elution die Antikörper trotz Quervernetzung von der Säule lösen, wurden in Zusammenarbeit mit Kerstin Buhlert zunächst unterschiedliche Elutionsmittel (z.B. 0,2 M Glycin; pH 2,5 oder  $MgCl_2$ ) untersucht, die leider auch nicht zum gewünschten Effekt führten (Kerstin Buhlert, Diplomarbeit, 2005). Um zu überprüfen, ob möglicherweise die in den Komplexen enthalten RNA für diese ungewöhnlich starke Wechselwirkung verantwortlich ist, wurde die mit dem Immunpräzipitat gebundene Antikörper-Sepharose zunächst mit einem Gemisch aus RNase A/T1 behandelt und der Überstand (*RNase-Eluat*) zur späteren Analyse aufbewahrt. Anschließend wurden die noch verbliebenen Proteine mit einem pH-Sprung eluiert (*Glycin-Eluat*) (Abbildung 4.10). Die Verwendung dieser zweistufigen Elution („2-step“ Elution) hat den großen Vorteil, dass man zwischen RNA-Protein- und möglichen Protein-Protein-Interaktionen unterscheiden kann. Proteine, die eine über RNA vermittelte Interaktion mit dem entsprechenden Antigen (Btz, Stau1 bzw. Stau2) eingehen, befanden sich nach einer RNase Behandlung im Überstand. Proteine, die möglicherweise eine direkte Protein-Protein Wechselwirkung mit Btz, Stau1 bzw. Stau2 oder aber mit einem Interaktionspartner des entsprechenden Antigens eingehen, wurden dadurch nicht beeinflusst und verblieben auf der Säule. Erst durch den pH-Sprung wurden diese zusammen mit Btz, Stau1 bzw. Stau2 eluiert (s. Abbildung 4.11, 4.16, 4.17 und 4.18). Diese zweistufige Elution wurde fortan für alle folgenden Immunpräzipitationen durchgeführt.

In Abbildung 4.10 ist das verwendete Verfahren zur Isolierung der endogenen RNPs am Beispiel von Btz aus embryonalem Rattenhirn schematisch dargestellt.

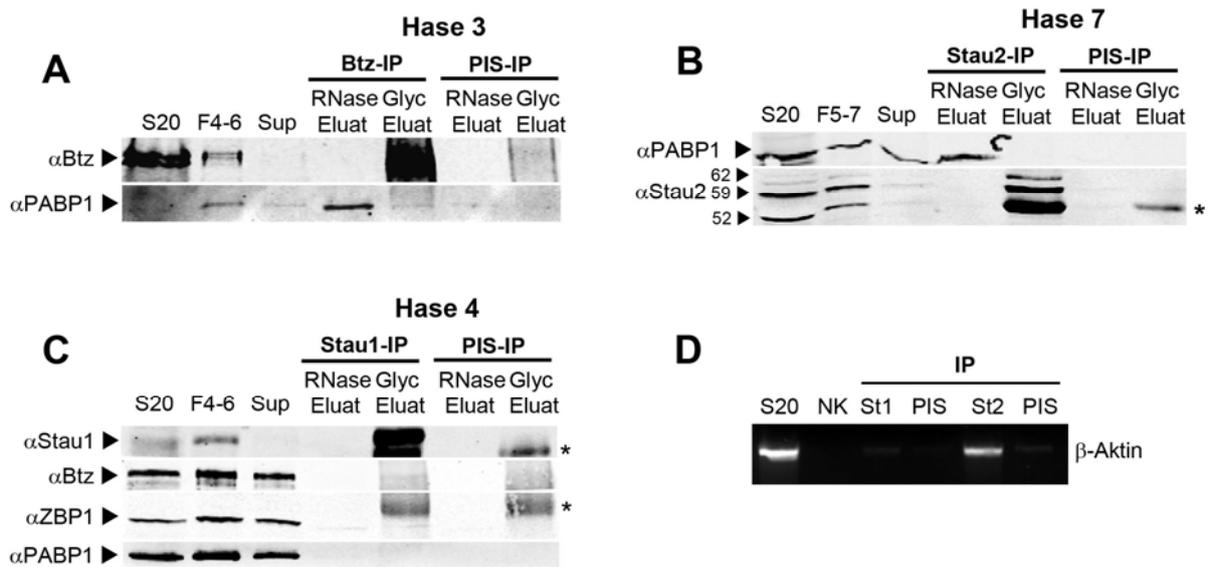


**Abb. 4.10 Schematische Darstellung der Isolierung von endogenen Btz-RNPs.**

Embryonales (E17) Rattenhirn wurden mit einem Dounce-Homogenisator vorsichtig zerkleinert. Bei der anschließenden Zentrifugation (20000x g) wurden Zellkerne und Zelltrümmer entfernt. Der lösliche Überstand (*soluble lysate*, S20) wurde auf einen kontinuierlichen 15-30% Optiprep™ Dichtegradienten geladen und ultrazentrifugiert (280000x g). Die angegebenen Fraktionen (Fraktionen 4-6) wurden vereint und mit kovalent an Protein-A Sepharose gekoppelten anti-Btz Antikörpern (anti-Btz-AB) inkubiert. Der immungefällte Komplex wurde in zwei aufeinander folgenden Schritten von der Antikörper-Sepharose gelöst. RNA-abhängige Interaktionspartner von Btz wurden zunächst durch eine RNase-Behandlung (+ RNase) vom Komplex gelöst. In einem zweiten Schritt wurden mögliche Protein-Protein Interaktoren durch einen pH Sprung (+ *Glycine*) von der Antikörper-Sepharose eluiert. Die Proteine beider Eluate wurden auf Gradienten-Gelen aufgetrennt und anschließend massenspektrometrisch analysiert.

Abbildung 4.11 A zeigt eine Western Blot-Analyse einer Btz-IP (anti-Btz Antikörper, Hase 3) aus den entsprechenden Dichtegradientenfraktionen. Das in den Fraktionen F4-6 enthaltene Btz war nach Inkubation mit den anti-Btz Antikörpern im Überstand abgereichert und im Glycin-Eluat signifikant angereichert, nicht aber in der parallel durchgeführten IP mit dem entsprechenden Präimmunserum (PIS) (vergl. Abb. 4.16A, Spur 2 mit 3, Spur 5 mit 7). PABP1 wurde als interne Kontrolle für einen erfolgreichen RNase-Verdau verwendet und wurde routinemäßig im RNase-Eluat detektiert (Abbildung 4.11 A, Spur 4). Als nächstes wurde getestet, ob das Antigen mit den selbst hergestellten Antikörpern aus den entsprechenden Gradientenfraktionen immungefällt werden kann. Auch die Stau2 Antikörper binden spezifisch ihr Antigen (Stau2) aus den Fraktionen 5-7. Es ließ sich anschließend effizient durch einen pH Sprung eluieren (vergl. Abbildung 11B, Spur 2 mit 3, Spur 5 mit 7). Wie im Fall der Btz-IP lässt sich PABP1 im RNase-Eluat detektieren, was auf die Anwesenheit von RNA in dem Proteinkomplex hinweist. Abbildung 11C zeigt einen Western Blot einer mit anti-Stau1 Antikörpern (Hase 4) durchgeführten IP. Das Stau1 Protein war nach Inkubation mit der Antikörper-Säule deutlich abgereichert und wurde immungefällt (Abb 16C, vergl. Spur 2 mit 3 und Spur 5). Jedoch wurde wider Erwarten weder PABP1 noch Btz co-immungefällt. Ein weiteres RNA-bindendes Protein, das *zipcode*-bindende Protein 1 (ZBP1), das oft in Transport-RNPs gefunden wurde (Tiruchinapalli et al. 2003, Huttelmaier et al. 2005, Farina et al. 2003), war ebenfalls nicht vorhanden.

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob in den hier isolierten Stau1-RNPs RNA enthalten ist. In einem Parallelansatz wurde die Gesamt-RNA aus einer Stau1-IP und einer Stau2-IP, wie in Abschnitt 3.8.7.1 beschrieben, isoliert. Der RNA-Gehalt der aus den Stau1-IPs isoliert wurde, unterschied sich nicht wesentlich von dem der entsprechenden Negativkontrolle (mit PIS durchgeführte IP). Nach Umschreiben der mRNA in cDNA wurde versucht, mittels PCR-Amplifikation einige Kandidaten-RNAs nachzuweisen. Im Fall von Stau1 ließ sich keine der getesteten RNAs detektieren (Daten nicht gezeigt). Beispielhaft ist in Abbildung 4.11D ein Nachweis der  $\beta$ -Aktin mRNA gezeigt. Als Positivkontrolle für die Reverse Transkriptase Reaktion und die anschließende PCR mit spezifischen Primern diente cDNA, die aus embryonalem löslichen Rattenhirnextrakt (S20) gewonnen wurde. Auf dem abgebildeten Agarosegel ist, die  $\beta$ -Aktin mRNA sowohl im Rattenhirn als auch in der Stau2-IP, jedoch nicht in der Stau1-IP angereichert. Zusammenfassend kann daraus der Schluß gezogen werden, dass die selbst hergestellten anti-Stau1 Antikörper (Hasen 4) nicht für Immunpräzipitationen geeignet sind. Jedoch bleibt ungeklärt, warum das Antigen (Stau1), nicht aber der Stau1-enthaltende Komplex immungefällt werden konnte (Abbildung 4.11C, Spur 5). Alle anderen selbst hergestellten Antikörper (Btz Antikörper von Hase 8, 12, 13 und Stau2 Antikörper von Hase 5) sind für Immunpräzipitationen geeignet (Abbildungen 4.16 und 4.17).



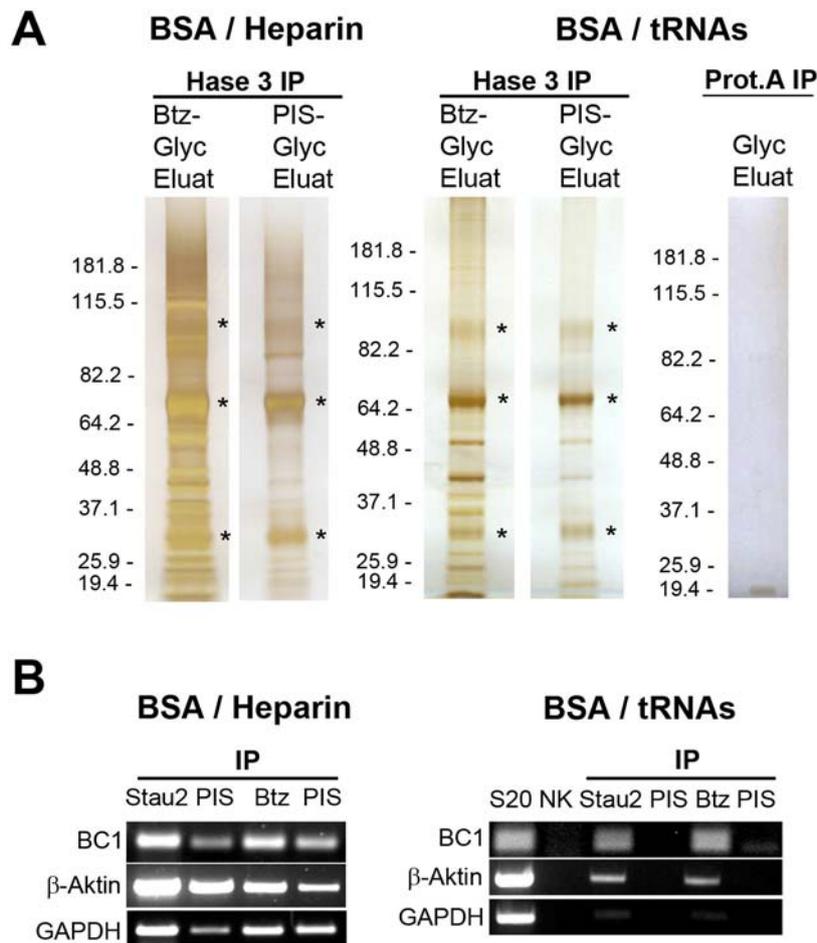
**Abb. 4.11 Immunpräzipitation von Stau1, Stau2 sowie Btz aus fraktioniertem Rattenhirnlysat**

**A:** IP mit anti-Btz Antikörpern (Hasen 3). Es wurde verfahren wie in **Abb. 10** schematisch dargestellt. Folgende IP-Fractionen wurden mittels Immunoblot analysiert: Spur 1: ~70  $\mu$ g des löslichen Rattenhirnextraktes (S20) als Ausgangsmaterial für den Dichtegradienten, Spur 2: 15  $\mu$ l der Fraktionen 4-6 (F4-6), Spur 3: 15  $\mu$ l des Überstand (*supernatant*, Sup) nach Inkubation mit den immobilisierten Antikörpern, Spuren 4 und 5: „2-step“ Elution, je 10  $\mu$ l *RNase-Eluat* und *Glycin-Eluat*. Das Btz-Protein ist nach Inkubation mit der Antikörper-Säule im Überstand (Sup) abgereichert und im Glycin-Eluat deutlich angereichert, nicht aber in der IP mit dem entsprechenden PIS (vergl. Spur 2 mit 3 und Spur 5 mit 7). Zudem konnte PABP1 co-immungefällt werden. Die mit Sternchen markierten Banden sind Kreuzreaktionen des Sekundärantikörpers mit Antikörperketten im entsprechenden Glycin-Eluat. In einem Parallelansatz wurde eine IP mit dem entsprechenden Präimmunserum (PIS) des Hasen durchgeführt. **B:** IP mit anti-Stau2 Antikörpern (Hase 7). Es wurde verfahren wie unter **A** beschrieben. Mit diesen Antikörpern ließen sich sowohl alle drei Stau2-Isoformen (52 kDa, 59 kDa und 62kDa) wie auch PABP1 immungefällt werden. **C:** IP mit anti-Stau1 Antikörpern des Hasen 4. Es wurde verfahren wie unter **A** beschrieben. **D:** Nachweis der  $\beta$ -Aktin mRNA mittels RT-PCR und anschließender Agarosegelelektrophorese in Stau1- bzw. Stau2-IPs. Eine Probe des löslichen Rattenhirnextrakts (S20) diente als Positivkontrolle für die RT-PCR. Als Negativkontrolle (NK) wurde das Experiment ohne Reverse Transkriptase durchgeführt.

Um bei einer IP unspezifische Protein-RNA Interaktionen mit der jeweiligen Antikörper-Sepharosen zu minimieren, wurden verschiedene Bedingungen getestet. Zunächst wurden die Antikörper-Säulen mit einem Überschuss an Heparin (Shan et al. 2000) und BSA (beides in einer Konzentration von 5 mg/ml) für 30 min präinkubiert. In einem zweiten Experiment wurde anstelle von Heparin und BSA ein Gemisch aus BSA und tRNAs (Kanai et al. 2004) verwendet. Anschließend wurden die Immunpräzipitate auf einem Gradientengel aufgetrennt und die Proteine mittels Silberfärbung visualisiert (Abbildung 4.12A). In einem Parallelansatz wurden ebenfalls Stau2-IPs durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Die in Abbildung 4.12A gezeigten IPs wurden im selben Maßstab durchgeführt und es wurden je 10  $\mu$ l der jeweiligen Eluate geladen. Der Vergleich der Bandenmuster zwischen den mit Heparin / BSA und tRNAs / BSA durchgeführten Btz-IPs lässt vermuten, dass durch die Zugabe von tRNAs die Stringenz der IP erhöht wurde. Da die Experimente weder in einem Parallelansatz durchgeführt, noch auf demselben Gradientengel aufgetrennt wurden, und Silberfärbungen generell nur schwer reproduzierbar sind, lassen sich hieraus noch keine genauen Schlüsse ziehen. In einem nächsten Schritt wurde überprüft, ob die unterschiedlichen Vorbehandlungen einen Einfluss auf den anschließenden Nachweis mitgefällter Kandidaten-RNAs zeigt. Dazu wurde

von den Btz- bzw. den parallel durchgeführten Stau2-IPs die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben, mittels PCR mit spezifischen Primern amplifiziert und anschließend mit einer Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Bis dato sind kaum dendritisch lokalisierte RNAs beschrieben worden, die spezifisch mit Btz- oder Stau2-RNPs assoziiert sind. Die nicht kodierende *brain cytoplasmic 1* (BC1) RNA wurde in Btz-IPs nachgewiesen (Macchi et al. 2003). Daher wurde überprüft, ob BC1 sowie eine weitere dendritisch lokalisierte mRNA  $\beta$ -Aktin in den isolierten Btz- bzw. Stau2-RNPs enthalten sind. Eine nicht dendritisch lokalisierte mRNA *GAPDH* diente in diesem Ansatz als Negativkontrolle. Abbildung 4.12B (links) zeigt, dass alle drei RNAs, BC1,  $\beta$ -Aktin und *GAPDH* in den RNPs enthalten sind. Jedoch wurden alle getesteten RNAs auch in den mit den entsprechenden PIS durchgeführten IPs detektiert (Abbildung 4.12B, links, Spur 2 und 4). Eine deutliche Verbesserung konnte durch die Vorinkubation der Antikörper-Säulen mit BSA und tRNAs erzielt werden. Unter diesen Bedingungen wurden sowohl BC1 RNA als auch  $\beta$ -Aktin mRNA in beiden IPs nachgewiesen, nicht jedoch in den mit dem PIS durchgeführten IPs. Des Weiteren wurde für die nicht lokalisierte *GAPDH* mRNA nur ein sehr schwaches Signal, das als Hintergrund-Signal betrachtet werden kann, detektiert (Abbildung 4.12B, rechts, Spur 3 und 5). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Verwendung von BSA und tRNAs zu einer Erhöhung der Stringenz in den entsprechenden IPs führte. Daher wurden in allen folgenden Experimenten tRNAs anstelle von Heparin eingesetzt.

Um die Spezifität der IPs weiter zu kontrollieren, wurde außerdem eine Präzipitation mit Protein-A Sepharose durchgeführt. Auf diese Weise können Proteine identifiziert werden, die an die Matrix binden. Das mit Silber gefärbte Gel in Abbildung 4.12A (rechts) zeigt das Glycin-Eluat dieser Präzipitation. Es wurde nur sehr wenige, schwache Banden detektiert.

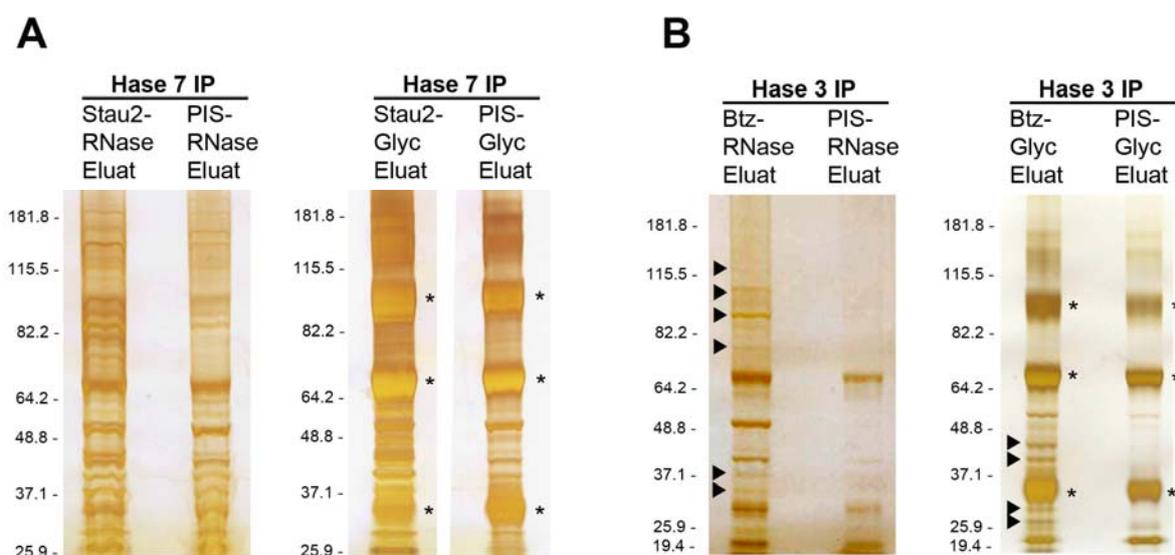


**Abb. 4.12 Optimierung der Bedingungen für die quantitativen Immunpräzipitationen.**

**A:** Die IPs wurden wie in **Abb. 10** beschrieben durchgeführt. Je 10  $\mu$ l der resultierenden Glycin-Eluate (Btz-Glyc Eluat, PIS-Glyc Eluat, Glyc Eluat) wurden auf einem 4-12%igen Gradientengel aufgetrennt und mittels Silberfärbung visualisiert. **Links:** Die Sepharosen wurden mit einem Gemisch aus BSA / Heparin für 30 min vorinkubiert. **Rechts:** Die Sepharosen wurden anstelle von Heparin mit einem Gemisch aus BSA und tRNAs inkubiert. Die Sterne markieren die Laufhöhe der quervernetzten Antikörperketten. Zusätzlich wurde in einem Parallelansatz eine IP mit der Protein-A Sepharose (Prot.A-IP) durchgeführt und das Glycin-Eluat ebenfalls mittels Silberfärbung analysiert. **B:** Die Stau2- und Btz-IPs (und die entsprechenden PIS) wurden wie unter **A** beschrieben unterschiedlich geblockt. Nach RNA Isolierung und RT-PCR wurden die folgende RNAs, BC1,  $\beta$ -Aktin, GAPDH durch PCR-Amplifikation nachgewiesen und auf einem 2%igen Agarosegel analysiert. **Links:** Für alle drei RNAs sind ebenfalls Signale in den mit dem entsprechenden PIS durchgeführten IPs zu erkennen (vergl. Spur 1 mit 2; 3 mit 4). **Rechts:** Letztere sind nach Vorinkubation der Sepharosen mit BSA und tRNAs nicht mehr nachzuweisen. (vergl. Spur 3 mit 4; 5 mit 6). Eine Probe des löslichen Rattenhirnextrakts (S20) diente als Positivkontrolle für die RT-PCR. Als Negativkontrolle (NK) wurde dem S20 keine Reverse Transkriptase zugegeben.

Diese Vorversuche ergaben die geeigneten Bedingungen für die quantitative IP zur Identifizierung der assoziierten Komponenten neuronaler RNPs. Für die Isolierung und Identifizierung der endogenen Stau2- und Btz-enthaltenden Komplexe wurden je zwei unabhängige IP-Experimente unter den eben beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Die resultierenden RNase- und Glycin-Eluate der mit anti-Btz bzw. anti-Stau2 Antikörpern bzw. den entsprechenden PIS durchgeführten Immunpräzipitationen wurden am Zentrum für Molekulare Medizin von Dr. Keiryn Bennett auf einem Gradientengel separiert und mit Silberfärbung visualisiert. Ein Vergleich der Bandenmuster der RNase-Eluate sowie der Glycin-Eluate der Stau2 bzw. der mit dem PIS durchgeführten IP ließ leider keine qualitativen, sondern nur quantitative Aussagen zu (Abbildung 4.13A). Im Gegensatz dazu konnten bei den in Abbild-

ung 4.13B gezeigten Eluaten der Btz-IP und der entsprechenden PIS-IP deutliche Unterschiede im Bandenmuster festgestellt werden. Die einzelnen Spuren wurden wie in Abschnitt 3.8.6 prozessiert und massenspektrometrisch analysiert. Generell lieferten die mit dem PIS des Hasen 7 durchgeführten IPs im Vergleich zum PIS des Hasen 3 einen stärkeren Hintergrund. Auch auf RNA-Ebene traten verstärkt Hintergrundsignale in IPs mit dem PIS des Hasen 7 auf (Daten nicht gezeigt). Für eine zweite unabhängige massenspektrometrische Analyse diente daher eine IP mit anti-Stau2 Antikörpern des Hasen 5 als Grundlage. Im Fall von Btz wurde für das zweite IP-Experiment ebenfalls Antikörper des Hasen 3 eingesetzt.



**Abb. 4.13: Auftrennung der endogenen, immungefällten Stau2- und Btz-RNPs**

**A:** 10  $\mu$ l der resultierenden RNase- bzw. Glycin-Eluate der mit anti-Stau2 Antikörpern oder dem entsprechenden Präimmunserum (PIS) durchgeführten IP, wurden auf einem 4-12%igen Gradientengel aufgetrennt und mit Silberfärbung visualisiert. Die Sterne markieren quervernetzte Antikörperketten in den entsprechenden Glycin-Eluaten. Die einzelnen Spuren wurden in  $\sim$ 20 Stücke geschnitten und massenspektrometrisch analysiert.

**B:** RNase bzw. Glycin-Eluate der Btz- bzw. PIS-IP. Es wurde verfahren wie unter **A** beschrieben. Die Pfeilspitzen markieren einige spezifische Banden in den entsprechenden Eluaten der Btz-IP. Die Sterne markieren die Laufhöhe der quervernetzten Antikörperketten.

#### **4.3.2.2 Identifizierung der RNP-Komponenten mittels Massenspektrometrie**

Eine Übersicht über die identifizierten Proteine aus neuronalen RNPs (*in vitro* sowie endogen) dieser Arbeit ist in Tabelle 4.1 enthalten. Eine detaillierte Liste aller Proteine findet sich im Anhang (Tabelle 7.1 und 7.2). In den endogenen RNPs wurden insgesamt  $\sim$ 150 (Stau2) bzw.  $\sim$ 100 (Btz), in den *in vitro* assemblierten RNPs  $\sim$ 160 (GST-Stau1),  $\sim$ 105 (GST-Stau2) bzw.  $\sim$ 125 (GST-Btz) assoziierte Proteine identifiziert. Einige der RNA-Bindeproteine wurden über Western Blot-Analysen validiert und werden in Abschnitt 4.2 behandelt.

Symbol	Name (engl.)	Anzahl der identifizierten Peptide <sup>2</sup>						Referenz	
		Btz	GST- Stau1	Stau2	Btz-IP RNase Glyc		Stau2-IP RNase Glyc		
<b>I. RNA-bindende Proteine (RBPs)</b>									
<b>a) heterogene nukleäre Ribonukleoproteine (hnRNPs)</b>									
hnRNP A0	hnRNP A0		5	6	9 <sup>1</sup>		2		B; C; E
hnRNP A1 *	hnRNP A1		49	44			26		C; E; F
hnRNP A3 *	hnRNP A3	78	211	196			126		B; E
hnRNP A / B	hnRNP A/B		27	25			18		C; E; F
hnRNP A2 / B1	hnRNP A2/B1		28	40			33	9	B; E; F
hnRNP C *	hnRNP C1/C2					22	47	23	
hnRNP D *	hnRNP D0		50	36			26	29	A; C; E; F
hnRNP H1, hnRNP F	hnRNP H1 und hnRNP F	24	37	35	8		16	18	B; E
hnRNP H2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 (hnRNP H')	15	6	3	7		3	3	
hnRNP I	Polypyrimidine tract binding protein 1 (hnRNP I)				11		10 <sup>1</sup>		E
hnRNP L	hnRNP L	4		4			19		A; B; E; F
hnRNP M	hnRNP M	6	24	20			4		E
hnRNP R, hnRNP Q	hnRNP R und hnRNP Q	38	59	73			36	3	A; B; C; E; F
hnRNP U *	hnRNP U	12				6 <sup>1</sup>	8	3	A; B; C; D; E; F
hnRNP U-like	hnRNP U-like protein 1	20	32	15		8	10 <sup>1</sup>	3	
RALY	hnRNP-associated with lethal yellow (RNA-binding protein Raly)				23	15	18	12	
<b>b) Zipcode bindende Proteine (ZBPs)</b>									
ZBP1 *	Coding region determinant binding protein (Zipcode-binding protein 1)	7	6	10		4	10	6 <sup>1</sup>	B; E; F
ZBP2	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2 (Zipcode-binding protein 2)	7	7	7			15		B; E
ZBP3 *	insulin-like growth factor 2, binding protein 3 (Zipcode-binding protein 3)	4	7	8		3	8	2	B
<b>c) Doppelstrang RNA-bindende Proteine</b>									
STAU1	Double-stranded RNA-binding protein Stau1 homolog 1		67	8		11	35	25 <sup>1</sup>	C
STAU2	Double-stranded RNA-binding protein Stau1 homolog 2			142				45 <sup>1</sup>	A; D; E
Dicer1	Endoribonuclease Dicer		12	10					
PACT *	Interferon-inducible double stranded RNA-dependent protein kinase activator A	5	2			5			A; E
ILF-2	Interleukin enhancer-binding factor 2		11	8		3 <sup>1</sup>	6	5	E; F
ILF-3	Interleukin enhancer-binding factor 3 (Nuclear factor 90)	12	48				34		A; B; E; F

d) andere RNA-bindende Proteine								
<b>Btz</b>	Cancer susceptibility candidate 3 (MLN51 / Btz)	9				1		
<b>PAIP1</b>	Polyadenylate-binding protein-interacting protein 1				4		6	
<b>PABPN1</b>	Poly(A) binding protein, nuclear 1				4		4 <sup>1</sup>	4
<b>PABP1* , PABP4</b>	Polyadenylate-binding protein 1 und 4 (inducible form)	146	30					82
<b>FMRP, FXR1, FXR2</b>	Fragile X mental retardation 1 protein, Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1, Fragile X mental retardation syndrome-related protein 2	6			65			
<b>NPM1</b>	Nucleophosmin	20	17	16	39 <sup>1</sup>			14
<b>NCL</b>	Nucleolin	5					5	
<b>MAGOH</b>	Protein mago nashi homolog					6		
<b>THOC4</b>	THO complex 4 (RNA and export factor-binding protein 2 )		6		2		12 <sup>1</sup>	
<b>RNPS1</b>	S1 RNA-binding domain-containing protein 1			2				
<b>PURA</b>	Transcriptional activator protein Pur-alpha		15	6	9		6	
<b>PURB</b>	Transcriptional activator protein Pur-beta		3	3				
<b>YB-1, YB-2</b>	Nuclease sensitive element binding protein 1 (YB-1) und YB-2	12					53	29
<b>PAI-RBP1</b>	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	11	30	23			15	43
<b>SSA, SSB</b>	Lupus La protein homolog		23	23	3		7	
<b>LARP1</b>	La-related protein	10						8 <sup>1</sup>
<b>LARP4, 5, 7</b>	La-related protein 4, La-related protein 5, La ribonucleoprotein domain family, member 7	15					17	16
<b>RBM4, 4B</b>	RNA-binding protein 4, RNA-binding protein 4B		25	19	23 <sup>1</sup>	11		
<b>RBMX</b>	RNA binding motif protein, X-linked (hnRNP G)		25	25		14 <sup>1</sup>	31	28
<b>RBM14</b>	RNA-binding protein 14						16	24
<b>MSI1</b>	RNA-binding protein Musashi homolog 1		20	8				
<b>MSI2</b>	RNA-binding protein Musashi homolog 2		13	6			13	
<b>NCBP80</b>	Nuclear cap-binding protein subunit 1, 80 kDa	9					6	
<b>MYEF2</b>	Myelin expression factor 2	24	38	37	24		10	6
<b>CIRBP</b>	Cold-inducible RNA-binding protein		5	7	2			
<b>CSDE1</b>	Cold shock domain-containing protein E1, RNA binding		12					
<b>TARDBP</b>	TAR DNA-binding protein 43		13	13	13 <sup>1</sup>		29	
<b>HuB, HuC, HuD *</b>	Elav (embryonic lethal, abnormal vision, drosophila)-like-proteins (Hu antigen B, C, D)					44		119
<b>HuR</b>	ELAVL1							6
<b>RBM3</b>	Putative RNA-binding protein 3		2					
<b>RBM39</b>	RNA-binding region containing protein 2		12	9				
<b>RBM9</b>	RNA binding motif protein 9		16					
<b>Poly(rC)BP1</b>	Poly(rC)-binding protein 1 (hnRNP E1)		3		2	2		
<b>Poly(rC)BP2</b>	Poly(rC)-binding protein 2 (hnRNP E2)				9 <sup>1</sup>		18	
<b>Poly(rC)BP3</b>	Poly(rC)-binding protein 3						4	
<b>G3BP2</b>	Ras GTPase-activating protein-binding protein 2				4		7	4

<b>RNG105</b>	Cytoplasmic activation/proliferation-associated protein 1 (RNA granule protein 105)				3		2	2	A; E
<b>ZFR</b>	Zinc finger RNA binding protein		5	3					
<b>e) RNA-Helikasen</b>									
<b>UPF1 *</b>	Regulator of nonsense transcripts 1(Upf1)	4	10	20		5	52	18	A; E
<b>eIF4A3</b>	Eukaryotic initiation factor 4A-III (DDX48)	29			24 <sup>1</sup>	66 <sup>1</sup>			F (WB)
eIF4A1	Eukaryotic initiation factor 4A-I	2			2				
eIF4A2	Eukaryotic initiation factor 4A-II	2			2				
<b>DDX1</b>	ATP-dependent RNA helicase DDX1	7		3	2				A; C; E
<b>DDX5, DDX3, DDX17</b>	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5, ATP-dependent RNA helicase DDX3, RNA-dependent helicase p72	164	68	53		17	12		B; C; E
<b>DDX41</b>	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX41	5							
<b>DDX6</b>	DDX6 (Rck)	4					9		E
<b>DHX15</b>	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 15	10	6						
<b>DHX30</b>	Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30	52	37	64			22		A
<b>DHX36</b>	Probable ATP-dependent RNA helicase DHX36	3	4	4			3		
<b>DDX21</b>	DDX 21 (Nucleolar RNA helicase 2)	10	14		10 <sup>1</sup>				B
<b>DDX9 *</b>	ATP-dependent RNA helicase A	11	23	15			25		A; D; E; F
<b>DHX57</b>	Putative ATP-dependent RNA helicase DHX57		23	21					
<b>DDX39</b>	Spliceosome RNA helicase Bat1 (DDX39)						2		E
<b>G3BP1</b>	Ras-GTPase-activating protein SH3-domain binding protein						13		E
<b>MOV-10</b>	Putative helicase MOV-10						2		B
<b>f) Translationsinitiationsfaktoren</b>									
<b>eIF2A</b>	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1				2				E
<b>eIF2B</b>	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2				6				
<b>eIF2S3</b>	Eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3						6		
<b>eIF2C1, eIF2C2</b>	Eukaryotic translation initiation factor 2C 1 (Ago1) / eIF2C 2 (Ago2)				15				
<b>eIF3s10</b>	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 10	10	5						E
<b>eIF3s8</b>	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 8	4	7	6					
<b>eIF6</b>	Eukaryotic translation initiation factor 6		4						

g) Splicingfaktoren und nukleäre Proteine								
<b>SFRS1</b>	Splicing factor, arginine/serine-rich 1	10	15	16				
<b>SRPK2</b>	Serine/arginine-rich protein specific kinase 2						2	B
<b>SFRS3</b>	Splicing factor, arginine/serine-rich 3		8					A
<b>SFRS9</b>	Splicing factor, arginine/serine-rich 9	2						
<b>SFPQ</b>	Splicing factor, proline- and glutamine-rich		35	15			4	A
<b>SF3B</b>	Splicing factor 3B		12	6		5	5	A
<b>SNRP70</b>	U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa		10					B; C
<b>CPSF6</b>	Cleavage and polyadenylation specificity factor 6	6						
<b>U5-116 kD</b>	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component					10 <sup>1</sup>		
<b>U5-200 kD</b>	Activating signal cointegrator 1 complex subunit 3-like 1						4	
<b>NHP2L1</b>	Nhp2-like protein 1		9		17		14	
<b>Nop56</b>	Nucleolar protein Nop56 (Nol5A)	5	9	6	5	7	2	
<b>Nol1</b>	Nucleolar protein 1		3					
<b>Nol5</b>	Nucleolar protein 5	4	4	6	4	3	5	
<b>similar to FBL</b>	Similar to fibrillarin		12		4			
<b>small nuclear RNPs:</b>	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide F	8			8			
	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1		2					
	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2		17	17				
	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3			2	2		2	
	Small nuclear ribonucleoprotein G		2		3			
	Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein N *			2				
	Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein B *			2				
<b>IPO4</b>	Importin-4	3						
<b>IPOB</b>	Karyopherin (importin) beta 1 (Importin beta-1 subunit )		12					
<b>TPR</b>	Nuclear pore complex-associated intranuclear coiled-coil protein TPR		2					
<b>BTF3</b>	Transcription factor BTF3 Bicoid homolog		2					
II. Kinasen / Phosphatasen / Transferasen								
<b>CSNK1</b>	Casein kinase I				27			
<b>CSNK2</b>	Casein kinase II	15	4					
<b>CaMKII</b>	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II				24			A
<b>CSK</b>	Tyrosine-protein kinase CSK				2			
<b>SRPK1</b>	Serine/threonine-protein kinase SRPK1	2						
<b>SRPK2</b>	serine/arginine-rich protein specific kinase 2		2					
<b>KALRN und TRIO</b>	Serine/threonine-protein kinase Duet (kalirin, RhoGEF kinase) und triple functional domain (PTPRF interacting);	146						
<b>NAT10</b>	N-acetyltransferase 10			2				E
<b>PP1</b>	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit		49					
<b>DIMT1</b>	Probable dimethyladenosine transferase				3			

III. Motorproteine und Cytoskelett-assoziierte Proteine								
<b>Untereinheiten des Kinesin-2 Motorproteinkomplexes:</b>								
KIF3A	Kinesin-like protein KIF3A	8						
KIF3C	Kinesin-like protein KIF3C	12						
KIF3B	Kinesin-like protein KIF3B	2						
KAP3	Kinesin-associated protein 3	8						
DCTN1	Dynactin-1		3				E	
SPTAN1	Spectrin alpha 2		12	8			E	
FLNA	Filamin -A		8	4				
DBN1	Drebrin 1				4			
MAP1B	Microtubule-associated protein 1B	11					A; E	
STMN1	Stathmin	9						
TUBA *	Tubulin alpha					35	E	
TUBB *	Tubulin beta					33	28	E
VIM	Vimentin				14	11		
DES	Desmin					2		
CKAP4 *	Cytoskeleton-associated protein 4					4		
GNB2L1 *	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta 2-like 1	8						
DPYSL3 *	Dihydropyrimidinase-related protein 3	2					12	
PTN	Pleiotrophin precursor (heparin binding growth factor 8, neurite growth-promoting factor 1)		4					
MK	Midkine precursor (neurite growth-promoting factor 2)		8					
14-3-3 Proteine	14-3-3 proteins	18	29	26		33		
<b>IV. Proteine, die nicht die oben genannten Gruppen fallen</b>								
<b>a) Regulierung der Transkription</b>								
MECP2	Methyl-CpG-binding protein 2		6					
TFIIS	Transcription elongation factor A protein 1				4			
ZFR9	Cellular nucleic acid-binding protein		11	8				
ZFR22	Zinc finger protein 22		7					
ZFR512	Zinc finger protein 512	2						
MATR3	Matrin-3		2	4			E	
TRIM41	Tripartite motif-containing 41	8						
TRIM28	Tripartite motif protein 28	2						
MYBBP1A	Myb-binding protein 1A	3	10	2				
NAP1L1	Nucleosome assembly protein 1-like 1	12						
RUVBL2	Ruvb-like 2				2			
CHD3	Chromodomain helicase DNA binding protein 3		6	4				
SMARCC	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily C, member 1, 2 and 4		25					

<b>b) Chaperone</b>								
TCP1 *	T-complex protein 1	8	13	6		3	3	E
PPIB	peptidylprolyl isomerase B				2			
GNB2L1 *	Guanine nucleotide binding protein subunit beta-2-like 1 (RACK1)						7	E
HSPA9	Stress-70 protein, mitochondrial precursor						10	
<b>c) wenig charakterisierte Proteine</b>								
HSPC117	HSPC117 homolog	10						C
KHDRBS1	KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1	4						
GRWD1	Glutamate-rich WD repeat-containing protein 1		4					
TRIP12	Thyroid hormone receptor interactor 12		5					
similar to CG31855-PA	Similar to CG31855-PA	2						
B930007L02Rik	RIKEN cDNA B930007L02 gene	9						
KIAA0690	Protein KIAA0690	2	2	2				
KIAA1967	Protein KIAA1967 homolog		3	3				
Protein FAM98	Protein FAM98	2		2				
C22orf28 homolog	UPF0027 protein C22orf28 homolog		9	11				
LOC72640	Hypothetical protein LOC72640			2				
C14orf166 homolog	Protein C14orf166 homolog	4	7					
LOC289641	Hypothetical Trp-Asp	5						
WDR18	WD repeat protein 18					2		
FBXO45	F-box/SPRY-domain protein 1					2		
DJ1103G7.7	DJ1103G7.7 (PUTATIVE NOVEL PROTEIN) homolog				3	2	7 <sup>1</sup>	2
C9orf114 homolog	Uncharacterized protein C9orf114 homolog				4		4	
KCTD12	BTB/POZ domain-containing protein KCTD12				8			
ATAD3	ATPase family AAA domain-containing protein 3					15 <sup>1</sup>		12
LYAR	Cell growth-regulating nucleolar protein						2	
F120C	UPF0318 protein FAM120C						6	
YTHDF	YTH domain family protein 3							10
KIAA0376	KIAA0376 protein					3		
ERH	Enhancer of rudimentary homolog	4						
<b>V. Ribosomale Proteine</b>								<i>cut off</i>
<b>a) Proteine der kleinen ribosomalen Untereinheit</b>								
S2	40S ribosomal protein S2		63	51			89	61
S3	40S ribosomal protein S3	8						6
S3a	40S ribosomal protein S3a	9					31	15
S4	40S ribosomal protein S4	30	26	14				13
S5	40S ribosomal protein S5		3	2			5	
S6	40S ribosomal protein S6		26	27			29	19
S7	Ribosomal protein S7			6			12	6
S8	Ribosomal protein S8	21	29	21			31	10

S9	40S ribosomal protein S9	5	8			5	
S10	40S ribosomal protein S10		13	7		10	7
S11	Ribosomal protein S11		9			8	14
S12	Ribosomal protein S12	8	16	25		35	
S13	40S ribosomal protein S13	8	10	8		6	6
S14	40S ribosomal protein S14	7				9	6
S15	40S ribosomal protein S15a		8			4	
S15a	40S ribosomal protein S15a	8	4	10		21	15
S16	40S ribosomal protein S16	8	15	8	6 <sup>1</sup>	13	21
S17	40S ribosomal protein S17		15	23		14	2
S18	40S ribosomal protein S18	10	57	27	27	34	30
S19	40S ribosomal protein S19	44	40	16			20
S20	40S ribosomal protein S20	2				3	
S21	40S ribosomal protein S21	2			2 <sup>1</sup>		
S23	Ribosomal protein S23	6	4	4			
S24	40S ribosomal protein S24		15	6	10 <sup>1</sup>	21 <sup>1</sup>	6
S25	40S ribosomal protein S25	25				14	28
S26	40S ribosomal protein S26		10	10		12	12
S27	40S ribosomal protein S27	6	6		6		4
S27a	40S ribosomal protein S27		8				
S28	40S ribosomal protein S28	4				2	2
S30	40S ribosomal protein S30		4				
SA	40S ribosomal protein SA						36
<b>b) Proteine der großen ribosomalen Untereinheit</b>							
P1	60S acidic ribosomal protein P1					8	
P2	60S acidic ribosomal protein P2	8	8	4			
L3	60S ribosomal protein L3	38	77	14	41	50	75
L4	60S ribosomal protein L4	5	10	6			9 <sup>1</sup>
L5	60S ribosomal protein L5	33				10	14
L6	60S ribosomal protein L6		35	6		17	37
L7	60S ribosomal protein L7	2	28	23		21	13
L7a	60S ribosomal protein L7a	121				30	14
L8	60S ribosomal protein L8	4	7			2	
L9	60S ribosomal protein L9	26	43			35	
L10	60S ribosomal protein L10	8	56			20	
L10a	60S ribosomal protein L10A	10	7	2			
L11	60S ribosomal protein L11	15	17				
L12	60S ribosomal protein L12						20
L13	60S ribosomal protein L13	34	13			36	31
L13a	60S ribosomal protein L13a		12			17	
L14	Ribosomal protein L14		6	6		6	
L15	60S ribosomal protein L15		39	10			20

L17	60S ribosomal protein L17		84				62	22
L18	60S ribosomal protein L18		9		6	11 <sup>1</sup>	12	6
L18a	60S ribosomal protein L18a	4	12	7			8	
L19	Ribosomal protein L19	37	37					21
L21	Ribosomal protein L21	116	66					
L22	60S ribosomal protein L22	9	4				2	2
L22-I1	Ribosomal protein L22-like 1	4	6					
L23	HL23 ribosomal protein		4	6			8	6
L23a	60S ribosomal protein L23a	27	87				97	41
L24	Ribosomal protein L24	6	22				12	
L26	60S ribosomal protein L26	35	15		17		10	
L27	60S ribosomal protein L27	8	14	2	13	19		4
L27a	Ribosomal protein L27a		24	16			36	32
L28	60S ribosomal protein L28	12	11					
L30	60S ribosomal protein L30		53	30			14	24
L31	Ribosomal protein L31	4	26	4				4
L32	60S ribosomal protein L32	4	4	4		5		6
L34	60S ribosomal protein L34	4	8			4		
L35	Ribosomal protein L35		8					
L35a	60S ribosomal protein L35a	8	13	6				8
L36	Ribosomal protein L36		12			23		4
L36a	Ribosomal protein L36a					6		
L37a	Ribosomal protein L37a	4	7					
L38	60S ribosomal protein L38		9	9				6

VI. Kontaminationen *							
<b>TOP1</b>	DNA topoisomerase 1	4	8		6		10
<b>TOP2</b>	DNA topoisomerase 2-beta	17					2
<b>DDB1</b>	Damage specific DNA binding protein 1	5					
<b>DNAJA</b>	DnaJ homolog subfamily A member 1	14					
<b>PDCD11</b>	Programmed cell death protein 11		8				
<b>NUMA1</b>	Nuclear mitotic apparatus protein 1		5				
<b>NACA</b>	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha		8				
<b>N-PAC</b>	Cytokine-like nuclear factor n-pac			4			2
<b>C1QBP</b>	Complement component 1, q subcomponent binding protein	3					
<b>GPC1</b>	Glypican-1 precursor	3					
<b>GPC2</b>	Glypican-2 precursor	2					
<b>PA2G4</b>	Proliferation-associated protein 2G4						7
<b>eEF2</b>	Elongation factor 2		8				
<b>Histon H4</b>	Histone H4	24	24	24			16
<b>Histon H1</b>	Histone H1		13	2			8 <sup>1</sup> 2
<b>Histon H2B</b>	Histone H2b		46				
<b>Histon H2A</b>	Histone H2a			44		28	
<b>HP1BP3</b>	Heterochromatin protein 1, binding protein 3		5	7	6	13	
<b>HDAC1</b>	Histone deacetylase 1					8	
<b>DUS3L</b>	tRNA-dihydrouridine synthase 3-like		5				
<b>RTN1</b>	Reticulon 1 isoform RTN1-C			2			
<b>HB</b>	Hemoglobin		8	12			
<b>YARS</b>	Tyrosyl-tRNA synthetase, cytoplasmic				2		
<b>PARP1</b>	Poly [ADP-ribose] polymerase 1				9 <sup>1</sup>		
<b>USP10</b>	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 10						2
<b>Ubiquitin</b>	Ubc protein						14
<b>PRPS2</b>	Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase-associated protein 2				6		
<b>PRPS1</b>	Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1				24		

<b><u>Vesikel assoziierte Proteine:</u></b>						
<b>VCP</b>	Valosin containing protein (Transitional endoplasmic reticulum ATPase)	9		4		
<b>AP2A2</b>	Adaptor protein complex AP-2, alpha 2 subunit					
<b>SEC23IP</b>	Sec23 interacting protein				4	
<b>VAPA</b>	Vesicle-associated membrane protein-associated protein A			2		
<b>ENTH</b>	Novel ENTH domain containing protein					12
<b><u>Mitochondriale Proteine:</u></b>						
<b>SUCLG2</b>	Dihydropyridyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex			3		
<b>MEST</b>	Mesoderm-specific transcript protein					4
<b>ADP/ATP translocase 1</b>	Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 4				6	

**Tabelle 4.1: Über Massenspektrometrie identifizierte Proteine der GST-Stau1, GST-Stau2 und GST-Btz Pulldowns sowie der Immunpräzipitationen mit anti-Btz und anti-Stau2 Antikörpern**

Die Proteinbanden der GST-Pulldown Experimente sowie der Immunpräzipitationen wurden massenspektrometrisch analysiert (s. Abschnitt 3.8.6). Die spezifisch für den angegebenen GST-Pulldown (Spalten 3-5) bzw. die entsprechenden Eluate der Immunpräzipitationen (Spalten 6 und 7) identifizierten Proteine wurden in fünf Proteinklassen eingeteilt: I. RNA-bindende Proteine (RBPs); II. Kinasen, Phosphatasen, Transferasen; III. Motorproteine und Cytoskelett-assoziierte Proteine; IV. andere Proteine, die nicht in die anderen Gruppen fallen V. Ribosomale Proteine sowie Kontaminationen (VI.). Die Gruppen I., IV. und V. wurden nochmal unterteilt. Bei dieser sehr vereinfachten Tabelle wurden unterschiedliche Isoformen einzelner identifizierter Protein vernachlässigt (s. auch Anhang Tabelle 7.1 und 7.2). In einigen Fällen ist ein weiterer Proteinname in Klammern angegeben (Synonym).

Für jedes Protein (Btz, Stau1 und Stau2) wurde ein GST-Pulldown Experiment analysiert. Für die Immunpräzipitationen wurden je zwei unabhängige Experimente durchgeführt.

1 Protein, das in zwei unabhängigen Immunpräzipitationen identifiziert wurde

2 Anzahl der identifizierten Peptide; entspricht der Summe der unique peptide hits (s. Anhang Tab)

\* teilweise wurden Peptide dieses Proteins auch in der entsprechenden Negativkontrolle identifiziert

Andere massenspektrometrische Analysen (s. auch Abschnitt 5.1): A (Angenstein et al. 2005); B (Bannai et al. 2004); C (Kanai et al. 2004); D (Villace et al. 2004); E (Elvira et al. 2006b); F (Jonson et al. 2007)

Die Proteine wurden in fünf große Klassen gruppiert: I. RNA-bindende Proteine (RBPs), II. Kinasen, Phosphatasen, Transferasen, III. Motorproteine und Cytoskelett-assoziierte Proteine IV. andere Proteine, die nicht in die oben genannte Gruppen fallen und V. ribosomale Proteine. Die Zuordnung der identifizierten Proteine in die einzelnen Gruppen und Unterguppen erfolgte mit Hilfe öffentlich zugänglicher Datenbanken (s. auch Abschnitt 3.8.6). Für die meisten der hier aufgeführten Proteine ist mindestens ein weiterer Namen bekannt. Das ist unter anderem dadurch zu erklären, dass Proteine oft mehrere Funktionen ausüben können. In Tabelle 4.1 wurden die Proteine unter ihrem geläufigsten Namen aufgeführt. In manchen Fällen kann der Name daher etwas irreführend sein. An dieser Stelle wird nur kurz auf einige wenige Proteine eingegangen. Anhand von einzelnen Beispielen soll erläutert werden, wie die Proteine gruppiert wurden.

Den größten Anteil nehmen dabei die RNA-bindenden Proteine (I.) einschließlich der heterogenen nukleären Ribonukleoproteine (hnRNPs), *Zipcode*-bindenden Proteine (ZBPs), Doppelstrang RNA-bindende Proteine (dsRBPs), RNA-Helikasen, Translationsinitiationsfaktoren und Spleißingfaktoren ein (Übersichtsdiagramme s. Abbildung 4.14 und 4.15). Spleißingfaktoren sind - vereinfacht gesagt - RNA-Bindeproteine, die beim Prozessieren der RNA im Zellkern beteiligt sind. Eine zusätzliche Funktion einiger dieser Proteine im Zytoplasma ist aber nicht auszuschließen (Glanzer et al. 2005).

Proteinkinasen und Phosphatasen (II.) kommen in Stau1- und Btz-, nicht aber in Stau2-RNPs vor. Eine mögliche Interaktion zwischen Btz und der Casein Kinase II (CKII) wird im Abschnitt 4.4.4 behandelt. Die von Monshausen und Mitarbeitern identifizierte Interaktion der Serin/Threonin-Proteinphosphatase PP1 mit Stau1 konnte hier massenspektrometrisch bestätigt werden (Tabelle 4.1) (Monshausen et al. 2002, Brendel et al. 2004).

Den aktiven Transport der RNPs entlang von Mikrotubuli ermöglichen Motorproteine (Kinesin und Dynein) (III.). Bis dato wurde nur wenige Mitgliedern der Kinesin-Familie (KIF) mit der Lokalisation von RNAs in Verbindung gebracht (Hirokawa & Takemura 2004). Da Interaktionen mit Motorproteinen sehr dynamisch sind, können diese oft nur schwer detektiert werden. In diesem Fall gelang es einen vollständigen Motorproteinkomplex (alle Untereinheiten des Kinesin-2) zu identifizieren, der spezifisch mit Btz-assoziiert. Die Western Blot-Analyse bestätigte diese Assoziation durch die Detektion der Untereinheit KIF3A (Tabelle 4.1 und Abbildung 4.14B).

In die Gruppe IV. wurden Proteine, die nicht in die anderen Gruppen (I.-III. sowie V. und VI.) fallen, eingeteilt. Dazu wurden unter anderem Proteine gezählt, die eine Zinkfinger-Domäne (Zfr) enthalten. Diese können DNA binden und sind häufig an der Regulierung der Transkription beteiligt. Des weiteren sind in dieser Gruppe Chaperone aufgeführt. Hierbei handelt es sich um Proteine, die anderen Proteinen bei der Faltung helfen. Proteine, die bisher wenig oder gar nicht charakterisiert wurden, wurden ebenfalls in dieser Gruppe eingeordnet.

Den zweitgrößten Anteil der identifizierten Proteine stellen ribosomale Proteine dar (V.). Auf die Rolle der Ribosomen beim RNA Transport wird im Verlauf dieser Arbeit jedoch nicht weiter eingegangen.

Insgesamt wurden nur wenige Proteine identifiziert, die als Kontamination (VI.) gewertet wurden, wie z.B. Histone oder mitochondriale Proteine (Tabelle 4.1, Abbildung 4.14A und 4.15). Dazu ist folgendes anzumerken: Die in den in der entsprechenden Negativkontrolle (GST oder PIS) identifizierten Peptide eines Proteins wurden aus den Interaktionsliste eliminiert. In manchen Fällen konnten aber noch weitere Peptide des entsprechenden Proteins in der IP oder dem GST-Pulldown identifiziert werden und wurden in der Interaktionsliste aufgeführt. Jedoch konnten im Verlauf dieser Arbeit einige Proteine reproduzierbar in unterschiedlichen Negativkontrollen detektiert werden. Diese unspezifisch bindenden Proteine werden daher in diesem Fall als Kontaminationen bezeichnet.

## **4.4 Validierung spezifischer Interaktionspartner von Stau1, Stau2 und Btz im Rattenhirn**

In bestimmten Fällen lassen sich Proteine nicht eindeutig über die Massenspektrometrie identifizieren, wenn sie z.B. ähnliche Domänen (wie z.B. DDX) enthalten.

Existieren unterschiedliche Spleißformen eines Proteins, so ist eine spezifische Zuordnung zu einer der Isoformen meist nicht möglich. Des Weiteren besteht bei der massenspektrometrischen Analyse auch die Möglichkeit, falsch positive bzw. negative Ergebnisse zu erhalten.

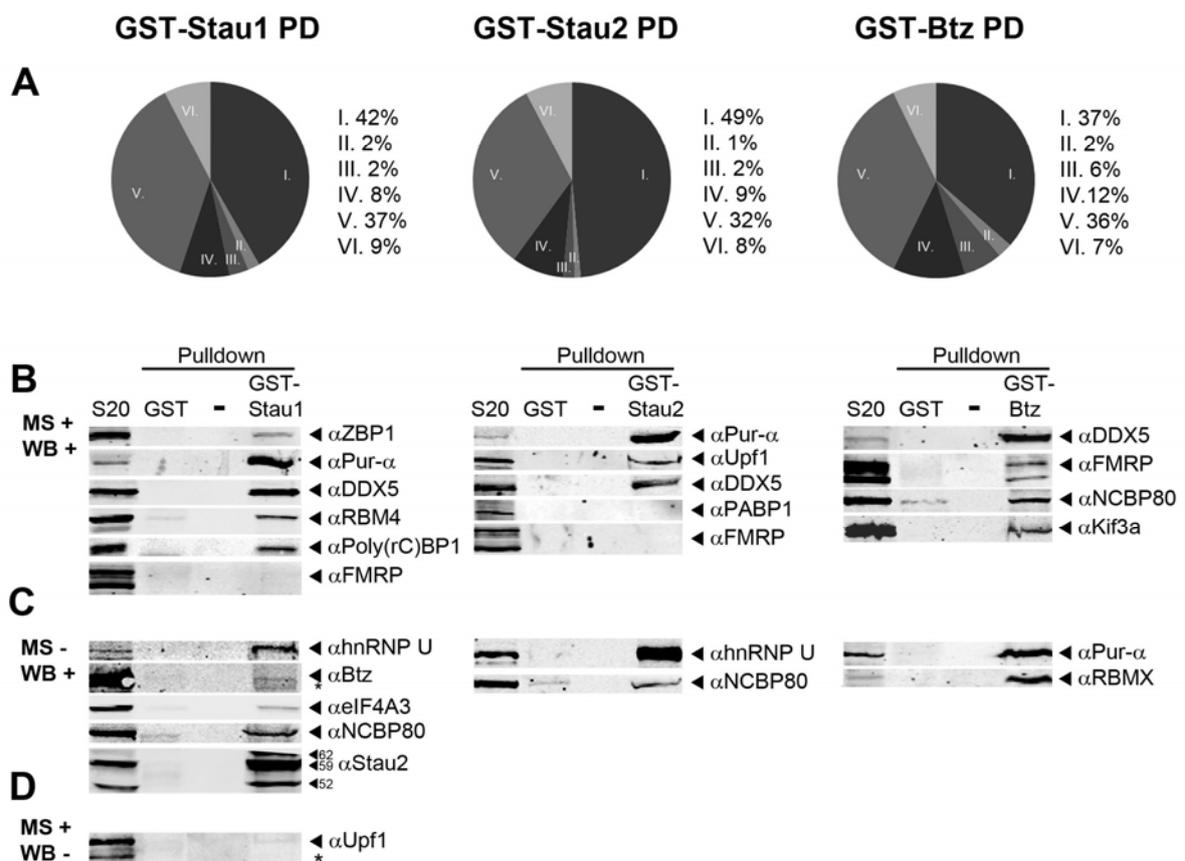
Aus diesen Gründen ist eine Überprüfung der über die Massenspektrometrie gewonnenen Daten mittels spezifischer Antikörper im Western Blot empfehlenswert.

### **4.4.1 Validierung spezifischer Interaktionspartner aus *in vitro* GST-Pulldown Experimenten mittels Western Blot-Analysen**

Zur Validierung bestimmter Interaktionspartner wurden die Eluate der GST-Stau1, -Stau2 und -Btz Pulldown Experimente mit den angegebenen Antikörpern im Western Blot dekoriert. Abbildung 4.14B zeigt eine Auswahl der Interaktionen, die im Western Blot verifiziert werden konnten (s. auch Abbildung 4.8C). Interessanterweise ließen sich zudem Proteine, die nicht über Massenspektrometrie identifiziert worden waren, mittels Western Blot-Analysen in den entsprechenden GST-Pulldown Experimenten nachweisen (Abbildung 4.14C). Ein großer Teil der identifizierten Proteine ist in allen drei isolierten RNPs vorhanden (Tabelle 4.1 und Abb. 4.14).

Einige Proteine zeigen jedoch Spezifität. Die Proteine Stau2, Btz und eIF4A3 sind Bestandteile der Stau1-RNPs (Tabelle 4.1, Abbildung 4.8 und Abbildung 4.14C), jedoch sind die bei-

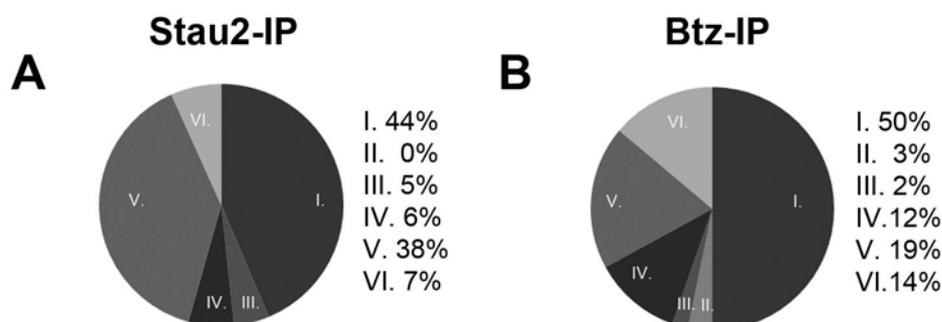
den letztgenannten nicht in Stau2-RNPs enthalten (Tabelle 4.1, und siehe auch Abbildung 4.18). Interessant ist die Abwesenheit von PABP1 in den *in vitro* assemblierten Stau2-RNPs (Tabelle 4.1, Abbildung 4.14B). Das RNA-Bindeprotein FMRP ist ausschließlich mit Btz assoziiert (Tabelle 4.1 und Abbildung 4.14B). Eine bekannte Interaktion von Stau1 mit Upf1 und eine damit zusammenhängenden Beteiligung von Stau1 beim mRNA-Abbau (*Stau1-mediated mRNA Decay*, SMD) (Kim et al. 2005), konnte massenspektrometrisch bestätigt werden. Allerdings bleibt unklar, warum der Nachweis mittels Western Blot nicht erbracht werden konnte (Tabelle 4.1, Abbildung 4.14).



**Abb. 4.14: Übersicht und Validierung bestimmter über Massenspektrometrie identifizierter Komponenten der GST-Pulldowns über Immunoblot**

**A:** Übersicht der in den einzelnen GST-Pulldown (PD) Experimenten identifizierten Proteine. Die Proteine wurden wie in Tabelle 1 aufgeführt gruppiert: I. RNA-bindende Proteine (RBPs), II. Kinasen, Phosphatasen, Transferasen III. Motorproteine und Cytoskelett assoziierte Proteine IV. weitere Proteine, die nicht in die anderen Gruppen fallen V. Ribosomale Proteine sowie VI. Kontaminationen. Der prozentuale Anteil der entsprechenden Gruppen ist rechts neben den Diagrammen angegeben. **B, C, D:** Überprüfung bestimmter Komponenten der Stau1-, Stau2-, und Btz-RNPs im Western Blot. Die assoziierten Proteine des entsprechenden GST-Pulldowns wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Die Western Blots wurden horizontal geschnitten und mit den rechts angegebenen Antikörpern dekoriert. **MS + WB +** Bestätigung der massenspektrometrisch erhobenen Daten, **MS - WB +** über WB identifiziert, aber nicht über Massenspektrometrie detektiert, **MS + WB -** Identifizierung über Massenspektrometrie konnte im Western Blot nicht bestätigt werden.

#### 4.4.2 Validierung bestimmter Interaktionspartner in endogenen Stau2- und Btz-RNPs mittels Co-Immunpräzipitationen



**Abb. 4.15: Übersicht der über Massenspektrometrie identifizierten Komponenten endogener Stau2- und Btz- enthaltender Komplexe**

Übersicht der in den beiden Stau2- (A) und Btz- (B) Immunpräzipitationen identifizierten Proteine. Die Proteine wurden wie in Tabelle 1 aufgeführt gruppiert: I. Der prozentuale Anteil der entsprechenden Gruppen ist rechts neben dem Diagramm angegeben.

Abbildung 4.15 zeigt eine Übersicht der in den endogenen RNPs identifizierten Proteingruppen und Kontaminationen. Beim Vergleich der Diagramme der *in vitro* assoziierten RNPs mit dem der endogenen RNPs ergibt sich eine große Übereinstimmung in der Zusammensetzung (vergl. Abbildung 4.14A und 4.15). Wie beim GST-Pulldown sind auch bei den endogenen RNPs beinahe die Hälfte aller identifizierten Proteine RNA-Bindeproteine (Stau2-RNP 44% und Btz-RNP 50%) (Abbildung 4.15A und B). Proteine der ribosomalen Untereinheiten sind, wie auch in den *in vitro* assoziierten RNPs, in den endogenen RNPs angereichert. Allerdings ist der prozentuale Anteil an Ribosomen in Btz-RNPs im Vergleich zum *in vitro* GST-Btz Pulldown deutlich niedriger. Im Gegensatz dazu ist der Anteil an Ribosomen in endogenen Stau2-RNPs sogar etwas angestiegen (Tabelle 4.1, Abbildung 4.14A und 4.15). Wie bereits im GST-Stau2 Pulldown ließen sich in den endogenen Stau2-RNPs keine assoziierten Kinasen oder Phosphatasen nachweisen. Alle Säuger Stau-Homologe enthalten eine mögliche Tubulin-Bindedomäne (TBD), die im Fall von Stau1 von Wickham und Kollegen analysiert wurde (Wickham et al. 1999). Die spezifische Identifizierung der Cytoskelett-Proteine  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin im endogenen Stau2-RNP lassen eine funktionsfähige TBD des Stau2-Proteins vermuten (Tabelle 4.1).

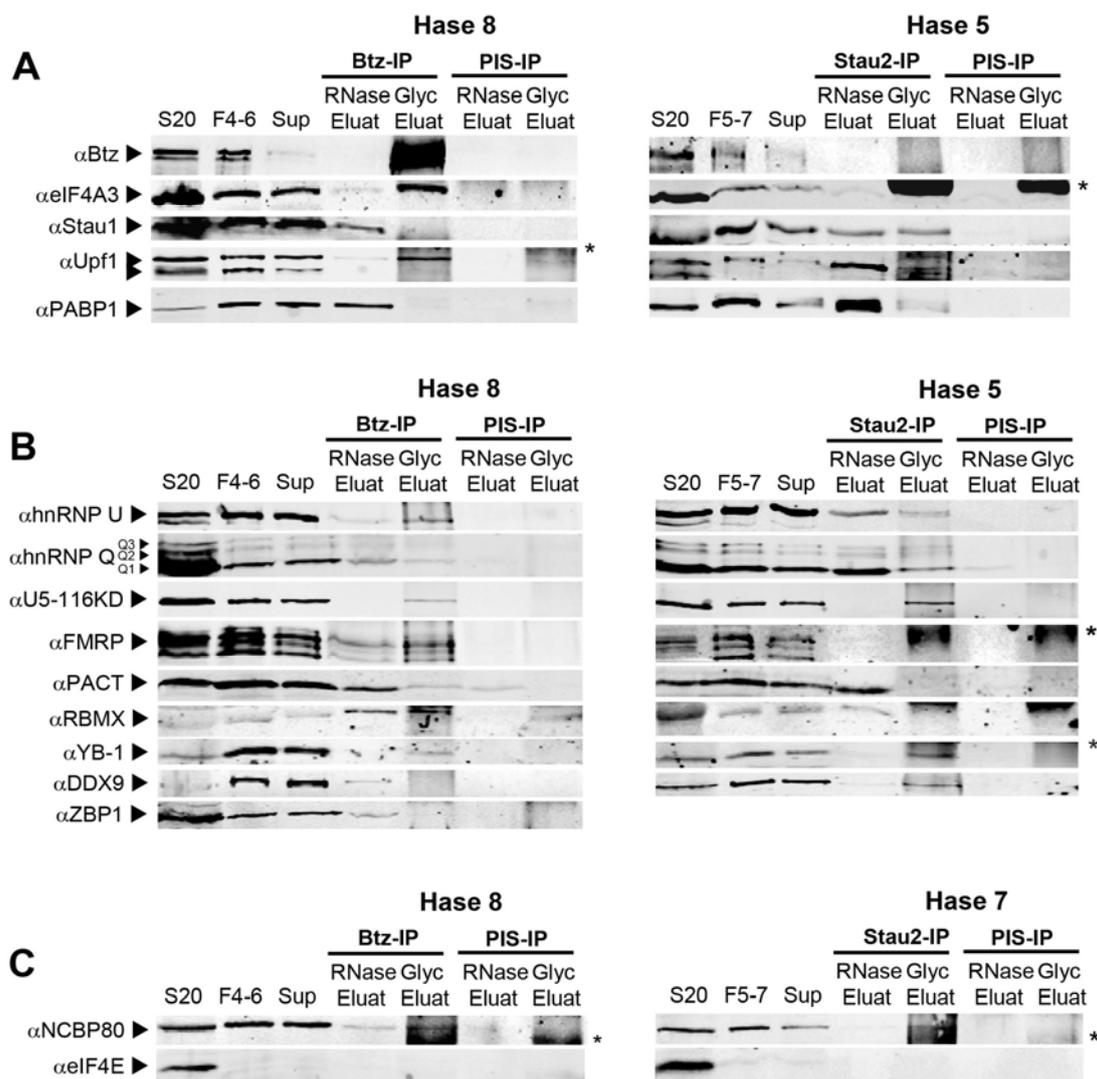
Wie für die GST-Pulldown Experimente galt es auch hier, die in den endogenen RNPs massenspektrometrisch identifizierten Proteine mittels spezifischer Antikörper in den Co-Immunpräzipitationen zu bestätigen. Um Unterschiede und Gemeinsamkeiten der beiden isolierten endogenen Btz- und Stau2-RNPs hervorzuheben, wurden die entsprechenden Western Blots nebeneinander gestellt (Abbildung 4.16). Abbildung 4.16A zeigt die Analyse bekannter Btz Interaktoren, z.B. eIF4A3, in Btz- bzw. Stau2-RNPs (Tabelle 4.1 und Abbil-

dung 4.16A). Sowohl Btz als auch eIF4A3 ist nicht in Stau2-RNPs enthalten. Upf1 dagegen kommt sowohl in Btz- als auch Stau2-RNPs vor. Eine RNA-vermittelte Interaktion zwischen Btz und Stau1 im Hirngewebe der Ratte wurde ebenfalls mittels Western Blot bestätigt (Machi et al. 2003). Die Interaktion zwischen Stau2 und Stau1 scheint nur teilweise RNA vermittelt zu sein (Tabelle 4.1 und Abbildung 4.16A). Als Kontrolle für einen effizienten RNase-Verdau wurden die Western Blots, wie auch in Abbildung 4.11 gezeigt, mit anti-PABP1 Antikörpern dekoriert. Bei den RNA-Bindeproteinen hnRNP U, hnRNP Q (Syncrip), YB-1, dem Doppelstrang RNA-Bindeprotein PACT sowie dem Spleißfaktor U5-116KD handelt es sich um bisher nicht identifizierte Komponenten der endogenen Btz- bzw. Stau2-RNPs (Abbildung 4.16B). FMRP, sowie dessen verwandte Proteine FXR1 und FXR2, findet man ausschließlich als Komponenten der Btz-RNPs (Tabelle 4.1, Abbildung 4.14B und C und Abbildung 4.16B). Obwohl die RNA-Helikase DDX9 massenspektrometrisch nicht in den Btz-RNPs detektiert werden konnte, scheint dennoch eine schwache RNA-abhängige Interaktion zu existieren (Tabelle 4.1 und Abbildung 4.16B). Im Gegensatz dazu wurde eine RNA-vermittelte Interaktion zwischen DDX9 und Stau2 nachgewiesen (Tabelle 4.1). Bei der anschließenden Analyse mittels Western Blot stellte sich diese aber als weitgehend resistent gegenüber einer RNase-Behandlung heraus (Abbildung 4.16B).

Die RNA-Bindeproteine RBM4 und RBMX konnten in allen drei in dieser Arbeit untersuchten RNPs detektiert und validiert werden (Tabelle 4.1, Abbildung 4.14B und Abbildung 4.16B). RBMX ist im Vergleich zum Ausgangsmaterial deutlich in der Btz-IP angereichert und findet sich sowohl im RNase- als auch im Glycin-Eluat (Abbildung 4.16B, Links: Vergleiche Spur 2, 4 und 5). Für die Stau2-IPs ist die Interaktion mit RBMX weniger klar. Obwohl über die Massenspektrometrie eine große Anzahl an Peptiden für RBMX in Stau2-RNPs identifiziert worden war, konnte nur eine schwache Interaktion experimentell nachgewiesen werden (Tabelle 4.1 und Abbildung 4.16B).

Der *cap*-Bindekomplex (CBC), der sich aus den nukleären *cap*-Bindeproteinen NCBP80 und NCBP20 zusammensetzt, bindet im Kern an die 5'-*cap*-Struktur der prä-mRNA und bleibt an dieser auch während des Spleiß-Vorgangs gebunden, wird aber vermutlich nach der initialen Translation der mRNA zu durch sein zytoplasmatische Gegenstücks eIF4E ausgetauscht (Ishigaki et al. 2001). Abbildung 4.16C zeigt, dass das nukleäre *cap*-Bindeprotein (NCBP80) sowohl mit anti-Btz- als auch anti-Stau2 Antikörpern co-immunofällt wurde, nicht aber eIF4E (s. auch Tabelle 4.1 und Abbildung 4.14).

In den beiden folgenden Abschnitten wird je ein möglicher neuer Interaktionspartner von Btz sowie von Stau2 genauer betrachtet.



**Abb. 4.16: Validierung und Vergleich ausgewählter identifizierter Komponenten der endogenen Stau2- und Btz-RNPs**

IPs mit anti-Btz und anti-Stau2 Antikörpern wurden im analytischen Maßstab wie in **Abb. 4.10** beschrieben durchgeführt und mittels Western Blot analysiert. Spur 1: ~70 µg des löslichen Rattenhirnextraktes (S20) für den Dichtegradienten, Spur 2: 15 µl der RNP-Fractionen (F4-6 bzw. F5-7), Spur 3: 15 µl des Überstands (Sup) nach Inkubation mit der Antikörper-Sepharose, Spuren 4-8 Eluate der entsprechenden spezifischen IP bzw. mit PIS durchgeführten Kontroll-IP („2-step“ Elution). Die Membranen wurden horizontal in Streifen geschnitten und mit den auf der linken Seite angegebenen Antikörpern dekoriert. Die Sterne markieren Kreuzreaktionen der Sekundärantikörper mit Antikörperketten im entsprechenden Glycin-Eluat.

#### **4.4.3 Identifizierung von Casein Kinase II (CKII) als möglichen Interaktionspartner von Barentsz im Rattenhirn**

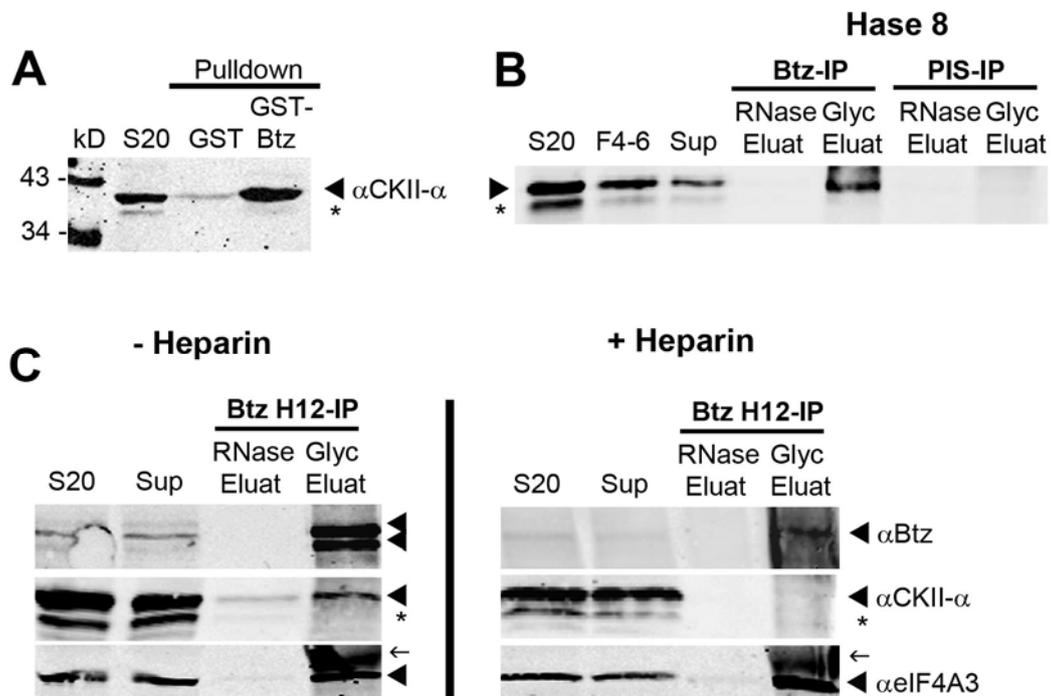
Im Western Blot erscheint Barentsz typischerweise als Doppelbande (~115 kDa und 120 kDa). Diese durch Phosphorylierung hervorgerufene Verschiebung des Molekulargewichts wurde von Degot und Mitarbeitern in unterschiedlichen Zelllinien aufgedeckt (Degot et al. 2002). Bislang wurde jedoch noch keine Proteinkinase für die Phosphorylierung identifiziert bzw. als spezifischer Interaktionspartner von Btz nachgewiesen. In der Btz-Primärsequenz wurden mehrere potentielle Bindestellen für die Proteinkinase CKII ermittelt (Degot et al. 2002). Die funktionelle CKII ist ein Heterotetramer, das aus zwei Alpha- ( $\alpha$  bzw.  $\alpha'$ ) und

zwei Beta-Untereinheiten besteht, ubiquitär exprimiert wird und bevorzugt saure Substrate bindet. Die katalytischen Kinase-Domänen befinden sich in den Alpha-Untereinheiten. In der N-terminalen Domäne von Btz kommen gehäuft saure Aminosäuren vor (Degot et al. 2002). Daher wurde in dieser Arbeit die CKII als möglicher Interaktionspartner von Btz und als Effektor kinase genauer untersucht. Zunächst wurde die über Massenspektrometrie identifizierte Assoziation mit Btz experimentell überprüft. Die Interaktion der alpha-Untereinheit (CKII- $\alpha$ ) ließ sich im GST-Btz Pulldown mittels Western Blot-Analyse nachweisen (Tabelle 4.1 und Abbildung 4.17A). Bisher wurde eine Vielzahl an Substraten für die Proteinkinase CKII von anderen Arbeitsgruppen identifiziert (für eine Übersicht siehe (Meggio & Pinna 2003)). Daher kann allein durch die Anwesenheit im *in vitro* GST-Btz Pulldown keine Aussage über eine direkte Interaktion zwischen CKII und Btz bzw. über eine mögliche Phosphorylierung getroffen werden. Im nächsten Schritt wurde eine IP aus mit Btz angereicherten Dichtegradientenfractionen durchgeführt. Die CKII konnte spezifisch mit anti-Btz Antikörpern und nicht mit dem entsprechenden PIS co-immungefällt werden (Abbildung 4.17B). Die Alpha-Untereinheit der CKII wurde dabei zusammen mit Btz im Glycin-Eluat detektiert. Durch polyanionische Substanzen wie Heparin lässt sich die Aktivität der CKII inhibieren (Hathaway et al. 1980). Daher wurde in einem nächsten Ansatz untersucht, ob die Inhibition der Kinase-Aktivität die Interaktion mit Btz verhindert (Abbildung 4.17C). In Anwesenheit von Heparin lässt sich an Stelle der sonst detektierten Doppelbande für Btz nur noch eine einzelne Bande im Western Blot detektiert (Abbildung 4.17C, vergl. Spur 4 mit 8). In der mit Heparin durchgeführten IP wird CKII nicht mehr co-immunpräzipitiert (Abbildung 4.17, vergl. Spur 4 mit 8). Zusammengefasst wird daher vermutet, dass Btz ein weiteres Substrat der CKII ist.

Die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von Btz scheint dagegen keinen Einfluss auf die Interaktion von Btz mit eIF43 bzw. Upf1 zu haben, da beide Proteine unter den erwähnten Bedingungen mit Btz co-immungefällt werden konnten (Abbildung 4.17C und Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu sind die RNA-Bindeproteine FMRP und NPM1 in Anwesenheit von Heparin nicht mehr in den Eluaten der Btz-IP (Daten nicht gezeigt). Jedoch sei hier angemerkt, dass sowohl FMRP (Siomi et al. 2002), als auch NPM1 (Szebeni et al. 2003) durch die CKII phosphoryliert werden.

Eine weitere Möglichkeit, die Aktivität der CKII zu inhibieren, stellt das Benzimidazolderivat DRB (5,6-Dichloro-1-( $\beta$ -D-ribofuranosyl)-benzimidazol) dar (Zandomeni et al. 1986, Zandomeni 1989). In einem initialen Experiment sollte untersucht werden, ob die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von Btz Auswirkungen auf die subzelluläre Lokalisation von Btz in Neuronen hat. Dazu wurden hippokampale Neuronen mit DRB behandelt, die Zellen wie in Abschnitt 3.8.8.1 fixiert und mit anti-Btz Antikörpern immungefärbt. Bei der nachfolgenden fluoreszenz-mikroskopischen Analyse wurde im Vergleich zu den unbehandelten Zellen insgesamt eine deutliche schwächere Intensität der Immunfärbung festgestellt. Eine Veränderung der Lokalisation von Btz wurde in diesem Experiment nicht festgestellt (Daten nicht ge-

zeigt). Jedoch soll hier angemerkt werden, dass eine Behandlung mit DRB zu einem frühzeitigen Abbruch der Transkription führt (Zandomeni et al. 1986, Yamaguchi et al. 1998). Daher sind mögliche Effekte der DRB-Behandlung kritisch zu betrachten.



**Abb. 4.17: Interaktion zwischen Btz und Casein Kinase II (CKII)**

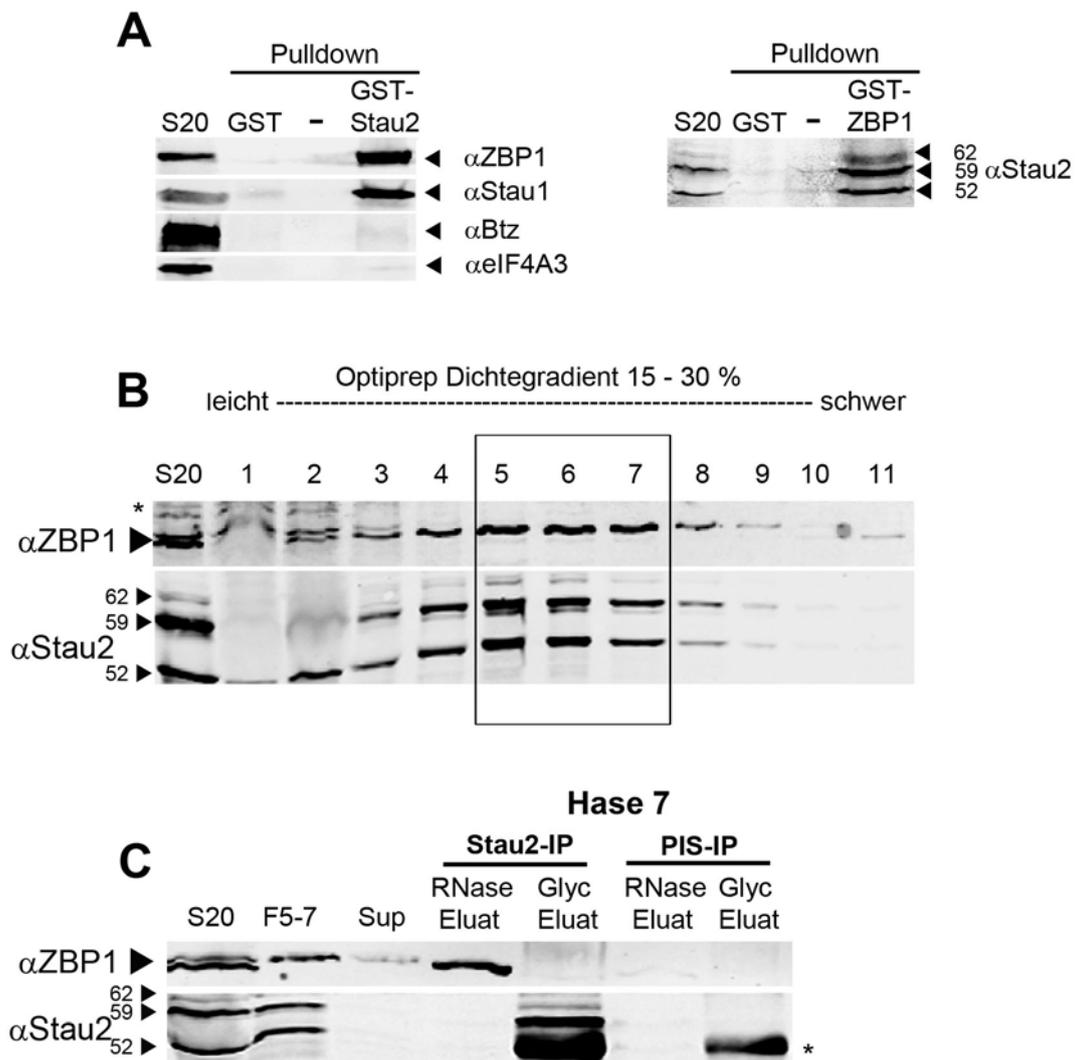
**A:** Anreicherung von CKII- $\alpha$  im GST-Btz Pulldown: Das Experiment wurde durchgeführt wie in **Abb. 8** schematisch dargestellt. 5  $\mu$ l der Eluate (aus GST und GST-Btz Pulldown) wurden zusammen mit dem Input (2,5  $\mu$ l S20) auf einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mittels Immunoblot analysiert. Die Laufhöhe der Alpha-Untereinheit (UE) der CKII (CKII- $\alpha$ ) ist durch die Pfeilspitze markiert. Der Stern kennzeichnet eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit der  $\alpha$ -UE der CKII. **B:** Identifizierung einer Protein-Protein Interaktion von Btz mit CKII mittels co-IP aus Dichtegradientenfraktionen: Die Btz-IP wurde durchgeführt wie in **Abb. 10** beschrieben und mittels Western Blot analysiert. Die CKII- $\alpha$  wurde im Glycin-Eluat der Btz-IP detektiert und nicht im parallel durchgeführten Ansatz mit dem PIS. **C:** Inhibierung der CKII durch Heparin: Das Ausgangsmaterial für Btz-IPs (embryonales Rattenhirnextrakt, S20) wurde unbehandelt (links: - Heparin) oder mit 5 mg/ml Heparin (rechts: + Heparin) versetzt, für 30 min. inkubiert und anschließend auf die anti-Btz Antikörper-Säulen geladen. Die IP-Fractionen wurden mittels Immunoblot analysiert. Die Banden für das phosphorylierte bzw. unphosphorylierte Btz sind mit einer Pfeilspitze markiert. Nach Inkubation mit Heparin ist nur noch eine Bande sichtbar (vergl. Spur 4 mit 8). CKII- $\alpha$  ist nicht mehr zu detektieren (Vergl. Spur 4 mit 8). Um die Einzelbanden des immungefällten Btz sichtbar zu machen, wurde die Intensität bei der Analyse mittels Western Blot stark herabgesetzt, weshalb das Btz-Signal im Ausgangsmaterial sehr schwach erscheint. Die kleinen Pfeile kennzeichnen Kreuzreaktionen des Sekundärantikörpers mit Antikörperketten im Glycin-Eluat.

#### **4.4.4 RNA-abhängige Interaktion zwischen dem RNA-Bindeprotein**

##### **ZBP1 und Stau2**

Das RNA-Bindeprotein ZBP1 bindet an die *zipcode* Sequenz in der 3'-UTR der  $\beta$ -Aktin mRNA, und ist in Neuronen mit dieser mRNA in Wachstumskegeln sowie Dendriten assoziiert (Ross et al. 1997, Farina et al. 2003). Neuere Daten zeigten, dass ZBP1 für den Transport und die Translationskontrolle der  $\beta$ -Aktin mRNA essentiell ist (Huttelmaier et al. 2005). Zudem beeinflusst, die durch RNA Interferenz (RNAi) hervorgerufene Geninaktivierung von Stau2 in reifen hippocampalen Neuronen die Expression der  $\beta$ -Aktin mRNA (Goetze et al.

2006). Aufgrund der Identifizierung von  $\beta$ -Aktin mRNA in endogenen Stau2-RNPs (Abbildung 4.11 und Abbildung 4.12) und der massenspektrometrisch identifizierten Assoziation von ZBP1 mit Stau2, wurde eine mögliche, bislang unbekannte, Interaktion zwischen Stau2 und ZBP1 genauer untersucht, zunächst biochemisch an embryonalen Rattenhirnextrakt und in einem zweiten Schritt in differenzierenden hippokampalen Neuronen. In einem GST-Pulldown Experiment interagierten ZBP1 und Stau1 jeweils mit GST-Stau2, nicht aber mit dem GST (Abbildung 4.18A). Des Weiteren ließen sich die EJC-Komponenten Btz und eIF4A3 nicht in Stau2-RNPs nachgewiesen (Abbildung 4.18, Vergl. Spur 2 mit 4; s. auch Abbildung 4.16). In einem umgekehrten Pulldown Experiment mit GST-ZBP1 als Köderprotein konnten alle drei Stau2-Isoformen mittels Western Blot detektiert werden (Abbildung 4.18A, rechts). Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob diese Interaktion auch in endogenen Stau2-RNPs stattfindet. Abbildung 4.18B zeigt, dass ZBP1 gemeinsam mit Stau2 im Dichtegradienten fraktioniert. Die mit Stau2 und ZBP1 angereicherten Fraktionen (F5-7) wurden für eine mit anti-Stau2 Antikörpern durchgeführte Immunpräzipitation eingesetzt (Abbildung 4.18C). ZBP1 wurde spezifisch in der Stau2-IP und nicht mit dem entsprechenden PIS co-immungefällt (Abbildung 4.18C, vergl. Spur 4 mit 6). Die Interaktion zwischen Stau2 und ZBP1 wurde durch Behandlung mit RNase gelöst. Diese Daten deuten daher auf eine RNA-vermittelte Interaktion zwischen ZBP1 und Stau2 hin.



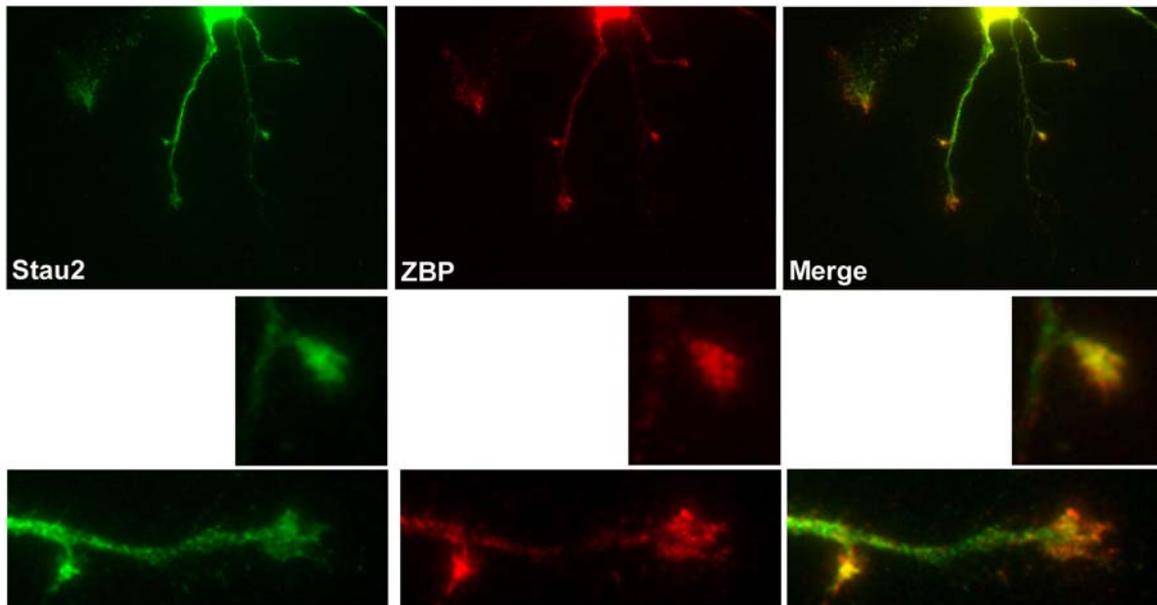
**Abb. 4.18: RNA-vermittelte Interaktion zwischen Stau2 und dem ZBP1**

**A:** ZBP1 co-präzipitiert mit GST-Stau2<sup>62</sup>: Für das *in vitro* GST-Pulldown Experiment wurde verfahren wie in **Abb. 8** beschrieben. 10 µl der resultierenden Eluate wurden zusammen mit 2,5 µl des Inputs (S20) mittels Western Blot analysiert. **Rechts:** Umgekehrt wurde ein Pulldown-Experiment mit GST-ZBP1 als Köderprotein durchgeführt. Alle drei Stau2-Isoformen (52 kDa, 59 kDa, 62 kDa) wurden dabei co-präzipitiert (vergl. Spur 2 mit 4, rechts). Die jeweilige Laufhöhe der entsprechenden Proteine ist durch die Pfeilspitzen markiert. Das Minuszeichen (-) kennzeichnet eine leere Gelspur. **B:** Co-Fraktionierung von Stau2 und ZBP1 im Dichtegradienten: Es wurde verfahren wie in **Abb. 9** beschrieben. Die einzelnen Fraktionen des Gradienten wurden mittels Western Blot analysiert. Der Stau2 und ZBP1 Peak ist durch einen Kasten hervorgehoben. Der Stern markiert eine unspezifische Kreuzreaktion des ZBP1 Antikörpers. **C:** RNA-abhängige Interaktion von ZBP1 mit Stau2: Für die anti-Stau2 IP wurde verfahren wie in **Abb. 10** beschrieben. Die IP Fraktionen wurden mittels Immunoblot analysiert. Der Stern markiert Kreuzreaktionen des Sekundärantikörpers mit den Antikörperketten.

#### 4.4.5 Co-Lokalisierung von ZBP1 und Stau2 in Wachstumskegeln von differenzierenden hippocampalen Neuronen

Im zweiten Schritt wurde ein Co-Lokalisierungsexperiment von Stau2 und ZBP1 in jungen, hippocampalen Neuronen durchgeführt. Abbildung 4.19 zeigt eine Doppelimmunfärbung mit spezifischen anti-Stau2 und anti-ZBP1 Antikörpern. Stau2 kommt dabei im axonalen Schaft und auch in Wachstumskegeln differenzierender hippocampaler Neuronen vor. ZBP1 ist in den Wachstumskegeln der Neurite angereichert. In der Überlagerung (*Merge*) der beiden

Einzelbilder wird deutlich, dass Stau2 mit ZBP1 in den Wachstumskegeln von differenzierenden hippocampalen Neuronen teilweise co-lokalisiert (Abbildung 4.19).



**Abb. 4.19: Lokalisierung von endogenem Stau2 und dem ZBP1 in differenzierenden hippocampalen Neuronen**

Co-Lokalisierung von Stau2 mit ZBP1 in axonalen Wachstumskegeln von jungen hippocampalen Neuronen: Auf Deckgläschen kultivierte hippocampale Neuronen der Ratte wurden am Tag 4 in Zellkultur fixiert und co-immungefärbt. Anti-Stau2 Antikörper (Stau2) wurden mit dem *rabbit IgG Alexa488 labeling Zenon-Kit* (s. Abschnitt 3.3.8.2) **grün** markiert. Die Anti-ZBP1 (ZBP) Antikörper wurden anschließend mit einem Sekundäntikörper (**rot**) markiert. Die Immunfärbungen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Zu sehen sind jeweils die einzelnen Immunfärbungen, sowie die überlagerten Bilder (*Merge*). Die Vergrößerungen zeigen, dass Stau2 sowohl im axonalen Schaft als auch im Wachstumskegel vorhanden ist. ZBP1 ist im Wachstumskegel angereichert und co-lokalisiert dort teilweise mit Stau2 (**gelb**).

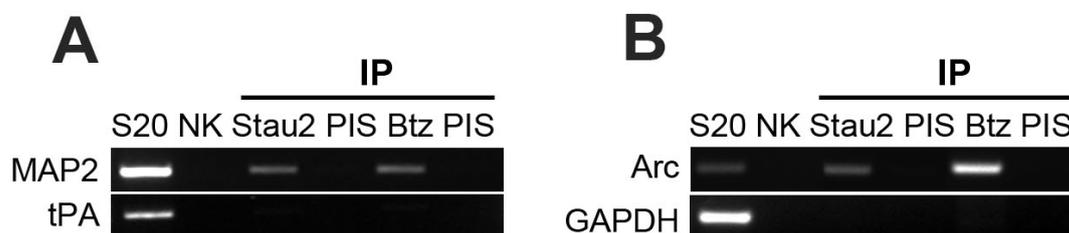
## 4.5 Identifizierung von RNAs aus endogenen Btz- und

### Stau2-RNPs

#### 4.5.1 Kandidaten Untersuchung mittels semi-quantitativer RT-PCR

Mittels semi-quantitativer RT-PCR wurde untersucht, ob bestimmte mRNAs in den Btz- bzw. Stau2-RNPs vorkommen. Abbildung 4.12 (s. Abschnitt 4.3.2.1) zeigt, dass die dendritisch lokalisierte  $\beta$ -Aktin mRNA, sowie die nichtkodierende *BC1* RNA, nicht aber die nicht dendritisch lokalisierte *GAPDH* mRNA, spezifisch in Btz- und Stau2-IPs nachgewiesen werden konnten. Bei der Untersuchung weiterer mRNA Kandidaten konnte zusätzlich die dendritisch lokalisierte *MAP2* mRNA, nicht aber die ebenfalls lokalisierte *tPA* mRNA, in beiden RNPs nachgewiesen werden (Abbildung 4.20A). Das in Abbildung 4.20B gezeigte Experiment wurde an adultem Material durchgeführt, da sich *Arc* nicht aus embryonalem Rattenhirnlysat amplifizieren ließ (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise ist die *Arc* mRNA im embryonalen Rattenhirn nicht oder nur sehr schwach exprimiert. Interessanterweise lässt sich *Arc* mRNA

sowohl in Btz- aber auch Stau2-RNPs nachweisen (Abbildung 4.20B). Im Vergleich zur Stau2-IP ist die *Arc* mRNA jedoch in der Btz-IP deutlich angereichert (Abbildung 4.20B vergl. Spur 1 mit 5 und Spur 3 mit 5).



**Abb. 4.20: Identifizierung von Kandidaten mRNAs aus endogenen Stau2- und Btz-RNPs**

**A:** RNA Isolierung aus Btz- und Stau2 IPs. Nach Umschreiben der isolierten RNAs in cDNA und PCR-Amplifikation mit spezifischen Primern (MAP2, tPA) wurden die PCR-Produkte auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt. Eine Probe des embryonalen Rattenhirnextrakts (S20) diente als Positivkontrolle für die RT-PCR. Als Negativkontrolle (NK) wurde keine Reverse Transkriptase verwendet. **B:** RNA Isolierung aus Btz- bzw. Stau2-IPs aus adultem Rattenhirn. Es wurde verfahren wie unter **A** beschrieben. Getestet wurde für *Arc* und *GAPDH* mRNA. Eine Probe des adulten Rattenhirnextrakts (S20) diente als Positivkontrolle für die RT-PCR. Als Negativkontrolle (NK) wurde keine Reverse Transkriptase zugegeben.

#### **4.5.2 Identifizierung von mRNAs mittels Genchip Analyse**

Eine Möglichkeit, möglichst viele der in den endogenen RNPs enthaltenen RNAs zu identifizieren, bietet die Genchip Analyse. In Zusammenarbeit mit Dr. Martin Bilban (Medizinische Universität Wien) wurden die isolierten RNAs von je einer Btz- bzw. Stau2-IP (aus Dichtegradientenfraktionen F4-6 und F5-7) mittels rattenspezifischer Genchips (Affymetrix) analysiert. Die Btz-IP wurde mit anti-Btz Antikörpern des Hasen 12 durchgeführt und die Gesamt-RNA, wie in Abschnitt 3.8.3.1 beschrieben, isoliert. Die Stau2-IP mit anti-Stau2 Antikörpern und die anschließende RNA Isolierung (MirvanaKit, Ambion) wurde von Dr. Anetta Konecna durchgeführt. Die anschließende Analyse von M. Bilban ergab, dass insgesamt 5263 bzw. 8442 RNAs in den endogenen Stau2- bzw. Btz-RNPs identifiziert (Abbildung 21). Von diesen waren insgesamt 111 bzw. 3290 RNAs spezifisch mit Stau2 bzw. Btz assoziiert. Wie schon für die Proteinkomposition gezeigt, ergab sich beim Vergleich der identifizierten mRNAs aus beiden Komplexen eine große Übereinstimmung (60% bzw. 5152 RNAs) festgestellt (Abbildung 21).

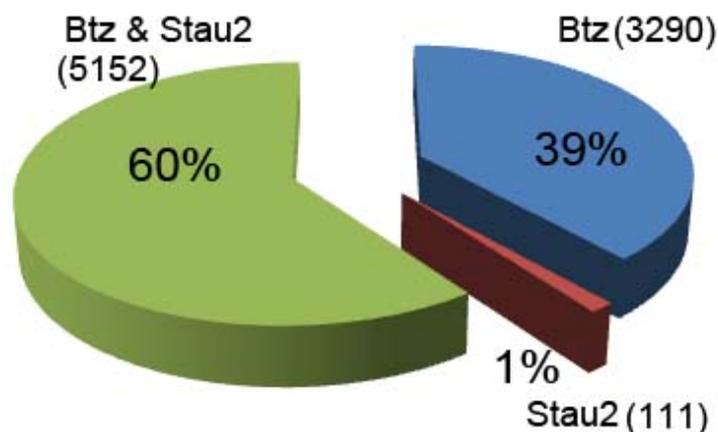
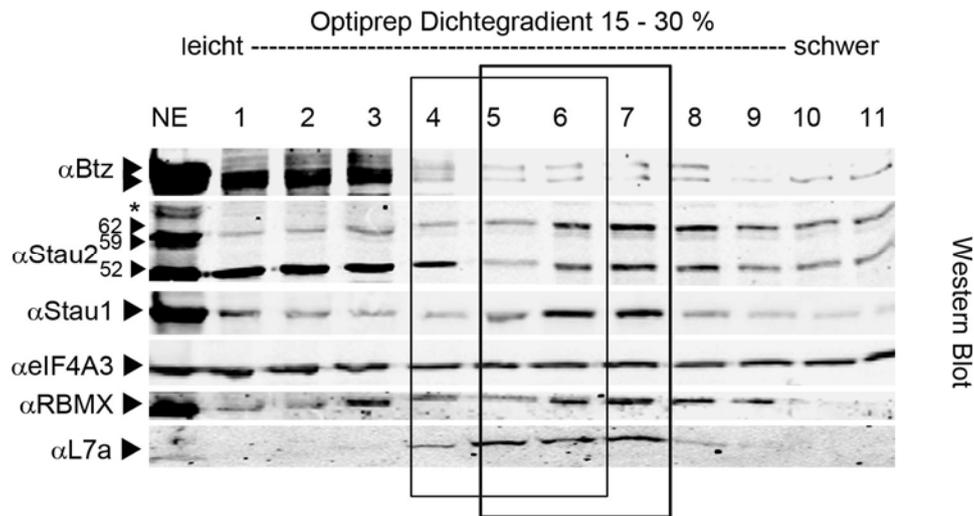


Abb. 4.21: Übersicht der identifizierten mRNAs in endogenen Btz- und Stau2-RNPs.

## **4.6 Nuclear priming im Zellkern**

Wenig erforscht ist bis heute die Assemblierung der RNPs im Zellkern (*nuclear priming*). Man geht davon aus, dass diese bereits einen wichtigen Schritt für die spätere Lokalisierung der mRNAs im Zytoplasma darstellt (Kress et al. 2004, Czaplinski & Singer 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zunächst mittels Western Blot-Analysen gezeigt werden, dass sowohl Barentsz als auch die beiden Stau-Proteine Stau1 und Stau2 im Zellkernextrakt, welches zuvor aus embryonalem Rattenhirn (E17) gewonnen wurde, vorhanden sind (Abbildung 4.22, Spur 1). Nach Anreicherung der nukleären RNP-Komplexe mittels Optiprep™ Dichtegradientenfractionierung konnten im Western Blot deutliche Unterschiede im Vergleich zur Fraktionierung der zytoplasmatischen RNPs festgestellt werden (Vergl. Abbildung 4.22 mit 4.9). Die nukleären Btz-RNPs haben eine geringe Dichte und befinden sich somit in den Fraktionen F1-3 (Abbildung 4.22). Im Gegensatz zu den zytoplasmatischen haben die nukleären Stau1- bzw. Stau2-RNPs eine größere Dichte und befinden sich in den Fraktionen F6-7 bzw. F6-8. Allerdings sind zusätzlich leichtere Stau2-RNPs vorhanden (F1-4), die überwiegend die kleinste 52 kDa Isoform enthalten (Abbildung 4.22). eIF4A3 ist in allen Fraktionen vorhanden. RBMX kommt in RNPs von geringeren Dichte (F3) vor, ist aber auch in schwereren Fraktionen (F6-8) enthalten (Abbildung 4.22).



**Abbildung 4.22: Anreicherung der nukleären RNP-Komplexe durch Optiprep™ Dichtegradientenfraktionierung.**

Embryonales nukleäres Rattenhirnextrakt (NE) wurde auf einen kontinuierlichen (15-30%) Optiprep Dichtegradienten geladen und bei 280000x g für 2½ h ultrazentrifugiert. 11 Fraktionen von je 1 ml wurden manuell von oben abgenommen. 1,5% einer jeden Fraktion (F) wurde mittels 10%iger SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunblot mit den links angegebenen Antikörpern analysiert. Um einen Vergleich mit den zytoplasmatischen Btz- bzw. Stau2-RNPs zu ermöglichen, markiert der kleinere schwarze Kasten zytoplasmatische Btz-enhaltende bzw. Stau1-enhaltende Fraktionen (F4-6) und der größere, schwarze Kasten den zytoplasmatischen Stau2-Peak (F5-7). Das ribosomale Protein L7a dient als Marker für die Ribosomen. Der Stern kennzeichnet eine Kreuzreaktion des Stau2 Antikörpers mit einem unbekanntem Protein aus dem Zellkernextrakt.

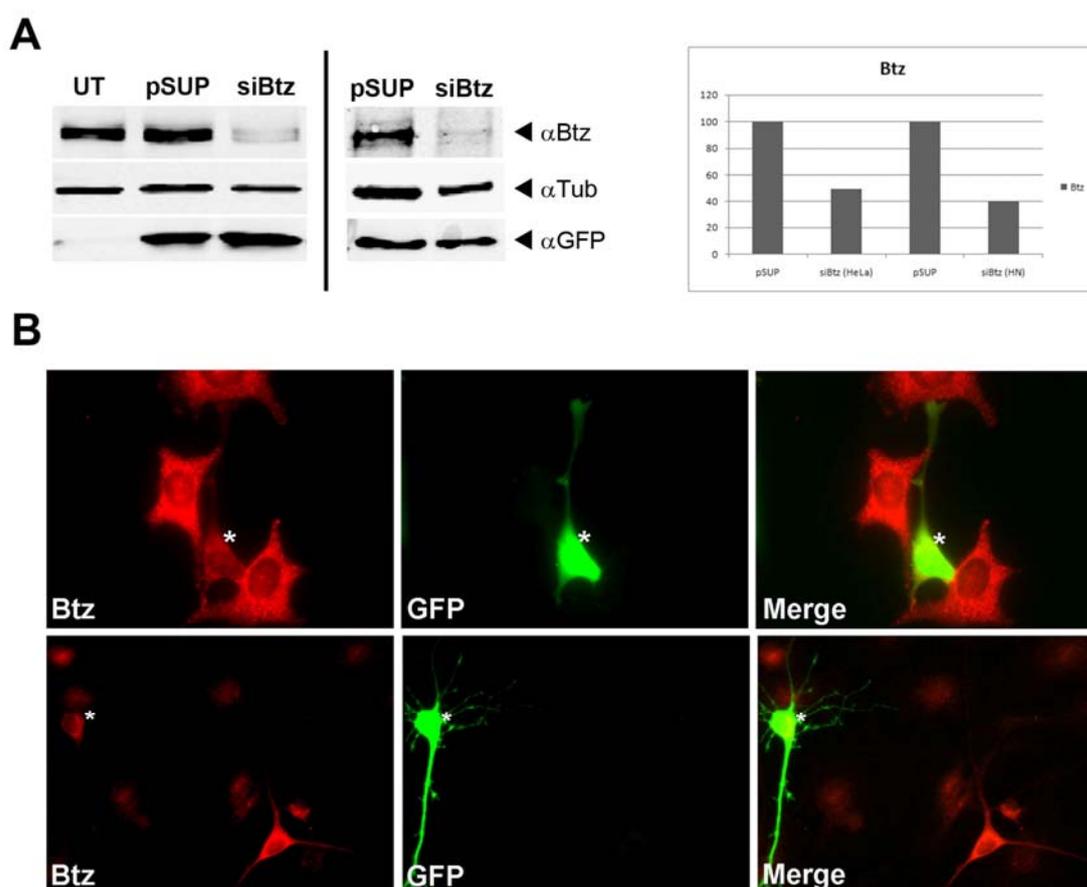
## 4.7 Funktionelle Analyse ausgewählter Btz-Interaktionspartner

Der EJC-Komplex spielt eine wichtige Rolle beim Abbau von fehlerhaften Transkripten (*Non-sense-mediated mRNA Decay*, NMD) (Palacios et al. 2004). Transkripte, die ein vorzeitiges Stop-Codon (*premature termination Codon*, PTC) enthalten, werden von der NMD-Maschinerie erkannt und abgebaut. Dies ist ein wichtiger Mechanismus, um die mögliche Expression verkürzter Proteine innerhalb einer Zelle zu verhindern (für eine Übersicht siehe (Chang et al. 2007)). Kernkomponenten der NMD-Maschinerie sind die *up-frameshift* (Upf)-Proteine (Lykke-Andersen et al. 2000), die über Interaktionen mit dem EJC-Komplex zum PTC-enhaltenden Transkript rekrutiert werden (Lykke-Andersen et al. 2001, Kashima et al. 2006).

Da in dieser Arbeit einige Komponenten des EJC-Komplexes in Btz-RNPs identifiziert wurden, galt es, bisher unbekannte Btz-Interaktionspartner auf eine mögliche Funktion in *Non-sense-mediated mRNA Decay* (NMD) zu untersuchen. Eine elegante Methode dafür bietet der von der Arbeitsgruppe um Miles Wilkinson etablierte NMD-Assay (Li et al. 1997b, Carter et al. 1995, Muhlemann et al. 2001). Dabei werden HeLa-Zellen entweder mit einem Reporterkonstrukt für die Expression einer Wildtyp (WT) oder einer fehlerhaften PTC-enhaltenden mRNA (in dieser Arbeit, TCR-β Minigen) transient transfiziert (Carter et al. 1995, Li et al. 1997b). Unter normalen Bedingungen wird eine PTC-enhaltende mRNA durch die NMD-

Maschinerie abgebaut. Wird jedoch eine essentielle Komponente dieser Maschinerie innerhalb der Zelle (z.B. mittels RNAi) ausgeschaltet, so führt dies zu einer Anreicherung des fehlerhaften Transkripts. Dies wurde unter anderem für Upf1 (Sun et al. 1998), eIF4A3 (Ferraiuolo et al. 2004) und Btz (Palacios et al. 2004) gezeigt.

Zunächst wurde ein Plasmid, wie in Abschnitt 3.8.9 beschrieben, hergestellt, das eine hairpin RNA exprimiert, die spezifisch Btz (Ratte und Mensch) über RNA Interferenz (RNAi) (Brummelkamp et al. 2002) inaktiviert. Die Herabregulierung von Btz (siBtz) wurde mittels Western Blot-Analyse sowohl in HeLa-Zellen als auch hippocampalen Neuronen überprüft (Abbildung 4.23A). Wie die Quantifizierung der Western Blots veranschaulicht, wurde Btz reproduzierbar um ~50 bzw. ~60% reduziert. Auch die immunzytochemische Analyse bestätigte eine deutliche Herabregulierung von Btz in mit dem shRNA Plasmid transfizierten Zellen (Abbildung 4.23B).

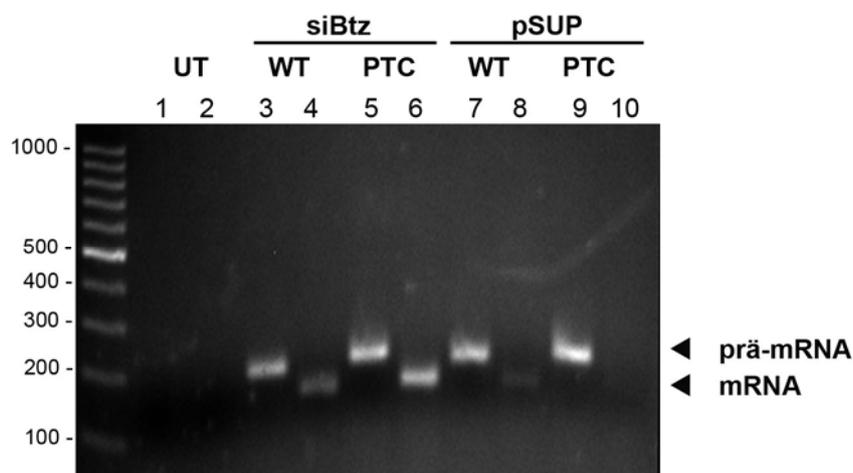


**Abb. 4.23: RNAi-induzierte Geninaktivierung von Btz in HeLa-Zellen und kultivierten hippocampalen Neuronen**

**A:** Transiente Transfektion von HeLa-Zellen (Lipofektion) bzw. kultivierten hippocampalen Neuronen (Nucleofektion) mit folgenden shRNA Plasmiden: Kontroll-Plasmid (leerer pSUPERIOR Vektor, pSUP), pSUPERIOR shRNA Plasmid für Btz (siBtz). Nach Expression (72 h) wurden die Zellen lysiert und mittels Immunoblot analysiert. Die Proteinmengen von Btz ( $\alpha$ Btz) wurden bezogen auf die Proteinmengen von Tubulin ( $\alpha$ Tub) normalisiert (rechts: Quantifizierung). Die Transfektion wurde durch Inkubation mit anti-GFP Antikörpern ( $\alpha$ GFP) kontrolliert. **B:** Auf Deckgläschen ausgesäte HeLa-Zellen (oben) bzw. hippocampale Neuronen wurden transient mit siBtz Plasmid-DNA transfiziert. Nach 72 h wurden die Zellen fixiert und mit anti-Btz Antikörpern (**rot**) immungefärbt. Die transfizierten Zellen wurden durch die Co-Expression von EGFP (pSUPERIOR-EGFP-Vektor) ermittelt und sind mit einem Stern gekennzeichnet. UT (untransfiziert) *Merge* (Überlagerung)

In unserem Labor wurden bislang keine NMD-Versuche durchgeführt. In dem in Abbildung 4.24 gezeigten initialen NMD-Experiment, weisen Btz-defiziente HeLa Zellen eine deutliche Anreicherung der PTC-enhaltenden TCR- $\beta$  mRNA auf (Abbildung 4.24, vergl. Spur 6 mit 4, 8 und 10). Das fehlerhafte Transkript kann also nicht mehr effektiv abgebaut werden. Das bedeutet, dass das Fehlen von Btz einen negativen Effekt auf die NMD-Maschinerie bewirkt. Damit wurden vorangegangene Arbeiten bestätigt (Palacios et al. 2004).

Bei der anschließenden Untersuchung der Kandidaten in diesem NMD-Assay, wurde die Herabregulierung von Btz als Positivkontrolle eingesetzt werden.



**Abb. 4.24: Barentsz und Nonsense-mediated mRNA Decay (NMD)**

Co-Transfektion von shBtz (siBtz) bzw. einem Kontroll-Plasmid (pSUP) und TCR- $\beta$  Minigen Plasmid-DNA (WT: Wildtyp, PTC: enthält *premature termination codon*) in HeLa-Zellen. Nach einer Inkubation über 72 h wurden die Zellen lysiert, die RNA isoliert, revers-transkribiert und die prä-mRNA sowie die mRNA des TCR- $\beta$  mini Gens mit spezifischen Primern mittels semiquantitativer PCR-Amplifikation nachgewiesen. Da die Laufhöhe der resultierenden PCR-Produkte sehr eng beieinander lag (TCR- $\beta$  prä-mRNA: 200bp und mRNA: 150bp), wurden aus der entsprechenden cDNA-Probe (UT, WT, PTC) in Parallelansätzen PCRs mit den entsprechenden Primerpaaren durchgeführt und nebeneinander auf dem Agarosegel aufgetragen (Spuren 1, 3, 5, 7, 9 spezifische Primer für die prä-mRNA und Spuren 2, 4, 6, 8, 10 spezifische Primer für die gespleißte mRNA). Die Herabregulierung des Btz-Proteins führt zu einer Hochregulierung des PTC-enhaltenden TCR- $\beta$  prä- und mRNA im Vergleich zur WT TCR- $\beta$  RNA und zum Kontroll-Plasmid (Vergl. Spuren 3, 5, 7 und 9 für die prä-mRNA mit 4, 6, 8 und 10 für die mRNA).

Für eine Kandidaten-Analyse wurden zunächst neue mögliche Protein-Protein Interaktionspartner, die in den endogenen Btz-RNPs identifiziert wurden, ausgewählt: NPM1, DDX5, U5-116kD sowie RBM4 (s. Tabelle 4.1 und Abbildung 4.16). Sowohl für NPM1 als auch für die RNA-Helikase DDX5 finden sich in der Literatur Hinweise auf eine mögliche Funktion in der Regulierung von fehlerhaften Transkripten (Bond et al. 2001, Palaniswamy et al. 2006). Da diese Untersuchung den Rahmen dieser Arbeit übersteigen, aber dennoch wichtige Erkenntnisse über mögliche Interaktionspartner von Btz liefern könnte, wurde sie als Diplomarbeitsthema an Ingrid Kieweg vergeben. In Zusammenarbeit mit Ingrid Kieweg wurden für alle genannten Proteine shRNA-Plasmide hergestellt, die nach einer Transfektion in HeLa-Zellen zu einer Herabregulierung des entsprechenden Proteins führen (Daten nicht gezeigt). Die Diplomarbeit wird derzeit unter meiner Betreuung im Labor von Prof. Dr. Kiebler angefertigt.

## **5. Diskussion**

Ziel dieser Arbeit war es, die molekulare Zusammensetzung neuronaler RNA-Transportpartikel aufzuklären. Dieses Wissen ist entscheidend dafür zu verstehen, wie lokalisierte RNAs erkannt, in Transport-RNPs verpackt und entlang des Zytoskeletts in distale Dendriten lokalisiert werden. Weitere ungeklärte Aspekte der dendritischen RNA-Lokalisierung sind, über welche Motorproteine RNPs in Dendriten transportiert werden oder aber wie die Translation der lokalisierten mRNAs während des Transport verhindert wird und wie spezifische Signale die Proteinsynthese induzieren können. Darüberhinaus ist eine zentrale, bislang noch ungeklärte Frage, ob alle lokalisierten RNAs in denselben RNPs transportiert werden oder ob es verschiedene Komplexe gibt, die spezifische RNAs und Protein-Komponenten enthalten. Mit der vorliegenden Arbeit ist ein wichtiger erster Schritt in Richtung einer Aufklärung der molekularen Maschine erfolgt, die den dendritischen RNA-Transport vermittelt.

### **5.1 Identifizierung der Komponenten neuronaler Stau1-, Stau2- und Btz- enthaltender RNPs aus Rattenhirn**

#### **5.1.1 Identifizierung der Proteinkomponenten**

In der hier vorgelegten Arbeit wurden anhand von drei etablierten Markerproteinen der RNA-Transportmaschinerie, Stau1, Stau2 und Btz, endo-gene neuronale RNPs erfolgreich isoliert und deren molekulare Zusammensetzung aufgeklärt. Auffällig dabei ist die große Übereinstimmung der Proteinkomponenten der Stau1-, Stau2- und Btz-RNPs (Tabelle 4.1). Dennoch sind diese nicht identisch und es konnten spezifische Unterschiede aufgedeckt werden.

Die RNA-Helikase eIF4A3 beispielsweise wurde spezifisch als Btz-assoziiertes Protein in neuronalen RNPs identifiziert (Tabelle 4.1, Abbildung 4.16A), womit vorangegangene Arbeiten in anderen Zelltypen bestätigt wurden (Palacios et al. 2004, Ballut et al. 2005, Bono et al. 2006, Shibuya et al. 2006, Noble & Song 2007). eIF4A3 und Btz sind Kernkomponenten des EJC-Komplexes und kommen zusammen mit Stau1 in den *oskar*-enthaltenden RNPs in *Drosophila melanogaster* vor (Palacios et al. 2004, Hachet & Ephrussi 2004). Diese Interaktion scheint daher hochkonserviert zu sein (Tabelle 4.1, Abbildungen 14 und 16). Interessanterweise ist weder Btz noch eIF4A3 ein Bestandteil von Stau2-RNPs (Tabelle 4.1 und Abbildung 4.16A und 4.18A). Kürzlich wurde eine Interaktion zwischen Stau2 und einer weiteren Kernkomponente des EJC-Komplexes, dem Heterodimer Magoh-Y14 identifiziert (Monshausen et al. 2004), die allerdings in dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte (Ta-

belle 4.1). Diese Daten sind ein erster Hinweis darauf, dass unterschiedliche RNA-enthaltende Komplexe existieren. Für eine Heterogenität von Transport-RNPs sprechen unter anderem auch die Daten vorangegangener Arbeiten aus hippokampalen Neuronen. Beispielsweise kommen in den distalen Regionen von Dendriten nur wenige RNPs vor, die Stau1 und Stau2 (Duchaine et al. 2002) bzw. Stau1 und Btz (Macchi et al. 2003) enthalten. Doppelimmunfluoreszenz-Experimente bestätigten, dass Btz und Stau2 nicht in gemeinsamen Partikeln in hippokampalen Neuronen vorkommen (Daten nicht gezeigt), was die biochemischen Daten dieser Arbeit bestätigt.

In dieser Arbeit gelang es, einen vollständigen Motorproteinkomplex, Kinesin-2, spezifisch in GST-Btz Pulldowns zu identifizieren (Tabelle 4.1). Es ist bekannt, dass eine Untereinheit des Kinesin-2, KIF3C, mit dem RNA-Bindeprotein FMRP interagiert (Davidovic et al. 2007), das ebenfalls ausschließlich in Btz-RNPs enthalten ist (Tabelle 4.1 und Abbildung 4.16). Dies bestärkt die Hypothese, dass unterschiedliche Transport-RNPs vorhanden sind. Es wurde bereits postuliert, dass FMRP beim Transport als Adapter zwischen RNP-Komponenten und Motorproteinen fungiert (Davidovic et al. 2007). Generell sind Interaktionen mit Motorproteinen jedoch sehr dynamisch und daher schwer zu identifizieren. In den endogenen Btz-RNPs konnte Kinesin-2 nicht mehr nachgewiesen werden. Möglicherweise wird eine solch dynamische Interaktion zwischen Motorproteinen und RNPs bei der Dichtegradientenzentrifugation gelöst.

Die Dynamik von Protein-Protein und Protein-RNA Interaktionen innerhalb der RNPs wird unter anderem durch die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung einzelner Proteine vermittelt (Huttelmaier et al. 2005). Die Identität der Kinasen und ihrer Substrate ist jedoch nur in sehr wenigen Fällen bekannt. Deshalb war es interessant, dass die Serin/Threonin Proteinkinasen CKI, CKII, CaMKII, Serin/Arginin Proteinkinase 1 (SRPK1) und Kalirin/Trio sowie eine Tyrosin Proteinkinase, CSK, massenspektrometrisch spezifisch in Btz-RNPs identifiziert werden konnten (Tabelle 4.1). Btz ist ein Phosphoprotein (Degot et al. 2002), jedoch konnte bis dato keine spezifische Interaktion zwischen Btz und einer Kinase nachgewiesen werden. Die vorliegende Arbeit liefert somit direkte experimentelle Hinweise auf eine mögliche Protein-Protein-Interaktion zwischen Btz und der CKII (s. auch Abschnitt 4.4.3). Darüberhinaus wird diese Interaktion durch die Inhibierung der Kinase-Aktivität mittels Heparin gelöst (Abbildung 4.17C). Allerdings ist nicht auszuschließen, dass durch die Heparin-Behandlung weitere Kinasen inaktiviert werden. Es wäre interessant zu untersuchen, ob sich die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von Btz auf dessen Lokalisation in Neuronen und damit möglicherweise den Transport von RNPs auswirkt. In einem initialen Experiment wurde daher die CKII mit einem spezifischen Inhibitor (DRB) gehemmt (Zandomeni et al. 1986), es konnte jedoch keine Veränderung der Lokalisation von Btz festgestellt werden. Zudem führt eine Behandlung mit DRB zu einem frühzeitigen Abbruch der Transkription, was möglicherweise durch eine Interaktion der CKII mit der RNA-Polymerase II vermittelt wird

(Zandomeni et al. 1986, Yamaguchi et al. 1998). Zudem sind für die CKII mittlerweile über 160 Substrate (zur Übersicht siehe: (Faust et al. 2002, Meggio & Pinna 2003)) bekannt, die an verschiedensten zellulären Prozessen beteiligt sind. Daher ist ein möglicher Effekt einer DRB-Behandlung bzw. einer Inhibierung der Casein Kinase II in Zellkultur eher kritisch zu betrachten. Zukünftige Experimente sollten daher eine direkte Protein-Protein-Interaktion und die dazugehörigen Bindestellen, z.B. mit Hilfe von rekombinanten Proteinen, identifizieren. Durch gezielte Mutationen, könnten dann weitere Lokalisierungsexperimente in Zellkultur durchgeführt werden. Ein weiterer interessanter Ansatz wäre eine massenspektrometrische Analyse einer mit Heparin durchgeführten Btz-IP. Auf diese Weise ließe sich die Zusammensetzung der RNPs, die unphosphoryliertes Btz enthalten, aufklären und mit den in dieser Arbeit isolierten Btz-RNPs vergleichen.

Eine erste wichtige Funktion für Btz ist bereits bekannt. Zusammen mit der RNA-Helikase eIF4A3 und dem Heterodimer Magoh-Y14 bildet Btz die Kernkomponenten des EJC-Komplexes, der gespleißte mRNAs ungefähr 20-24 nt oberhalb der Spleißstelle markiert (Le Hir et al. 2000, Kataoka et al. 2000) und dabei gleichzeitig eine Plattform für weitere Interaktionspartner bildet (Le Hir et al. 2001b). Zusätzlich rekrutiert der EJC-Komplex die NMD-Maschinerie zu fehlerhaften Transkripten (Kashima et al. 2006) und spielt damit eine wichtige Rolle bei der posttranskriptionalen mRNA-Qualitätskontrolle. Das Fehlen einer Komponente des EJC-Komplexes oder aber der NMD Maschinerie reicht aus, um den Abbau fehlerhafter mRNAs zu verhindern. Innerhalb einer Zelle könnte dies zu einer Anreicherung von fehlerhaften bzw. verkürzten Proteinen führen (für eine Übersicht siehe (Chang et al. 2007)). Diese Funktion von Btz konnte in dieser Arbeit bestätigt werden (s. Abschnitt 4.6).

Für Stau2 sind im Gegensatz dazu bis dato kaum Interaktionspartner und auch keine Funktion bekannt. Es wurde aber vor kurzem gezeigt, dass das RNA-bindende Protein Zfr spezifisch mit Stau2 und nicht mit Stau1 interagiert und für den Export der 62kDa Isoform aus dem Nukleus benötigt wird (Elvira et al. 2006a). Zfr wurde in dieser Arbeit in Stau1- sowie in Stau2- nicht aber in Btz-RNPs identifiziert (Tabelle 4.1). Die Detektion in den Stau1-RNPs kann durch die Anwesenheit von Stau2 erklärt werden (Abbildung 4.14C). Darüberhinaus scheint Stau1 zumindest teilweise eine mögliche, bisher nicht untersuchte, Protein-Protein Wechselwirkung mit Stau2 einzugehen (Tabelle 4.1 und Abbildung 4.16A). Zusätzlich konnte eine weitere bisher unbekannte RNA-abhängige Interaktion zwischen Stau2 und ZBP1 biochemisch nachgewiesen werden (Abschnitt 4.4.4). ZBP1 ist eines der bisher am besten charakterisierten Proteine, die an der Lokalisierung von RNAs beteiligt sind. Zum einen wurde das Sequenzmotiv, über das ZBP1 an seine Ziel-RNA bindet, identifiziert: der sog. *zipcode*, eine 54 nt lange Sequenz in der 3'-UTR der  $\beta$ -Aktin mRNA (Ross et al. 1997). Zum anderen ist ZBP1 nicht nur essentiell für die Lokalisierung von  $\beta$ -Aktin mRNA in z.B. die Wachstumskegel von auswachsenden Neuriten (Yao et al. 2006, Zhang et al. 2001), sondern es inhibiert auch die Translation der transportierten mRNA. Eine Phosphorylierung von ZBP1 durch die

Kinase Src am Zielort der RNA Lokalisation ist das Signal, dass dazu führt, dass ZBP1 von der RNA abfällt und die Translation einsetzen kann (Huttelmaier et al. 2005). Interessanterweise co-lokalisiert die  $\beta$ -Aktin mRNA in Dendriten reifer hippokampaler Neurone auch mit Stau2 (Goetze et al. 2006). Über Western Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Expression von Stau2 im Rattenhirn kurz nach der Geburt ansteigt (Daten nicht gezeigt, Kröning, Dissertation 2004). Dies lässt vermuten, dass Stau2 möglicherweise beim Auswachsen der Neurite beteiligt sein könnte. Daraus ergibt sich die Frage, ob Stau2 und ZBP1 in denselben Partikeln vorkommen und bei der Lokalisierung und Translationskontrolle der  $\beta$ -Aktin mRNA in differenzierenden Neuronen kooperieren. In dieser Arbeit wurde die  $\beta$ -Aktin mRNA in endogenen Stau2-RNPs nachgewiesen (Abbildung 4.11 und 4.12). Möglicherweise könnte die RNA-abhängige Interaktion zwischen Stau2 und ZBP1 somit über die  $\beta$ -Aktin mRNA vermittelt werden. Welche Rolle Stau2 beim Transport oder möglicherweise bei der Stabilität der  $\beta$ -Aktin mRNA spielt, ist noch unklar und wird derzeit in Zusammenarbeit mit Yunli Xie in unserer Arbeitsgruppe untersucht. Es soll an dieser Stelle erwähnt werden, dass ZBP1 auch in Stau1- und Btz-RNPs vorkommt (Abbildung 4.14B und 4.16B). Allerdings deutete die Western-Blot Analyse, im Gegensatz zu der Interaktion zwischen ZBP1 und Stau2, auf eine eher schwache Wechselwirkung zwischen den entsprechenden Proteinen hin.

Im Gegensatz zu dieser RNA-vermittelten Interaktion weist die Western Blot-Analyse für die DNA- und RNA-Helikase DDX9 (RNA Helikase A) auf eine mögliche, bisher unbekannte, Protein-Protein Wechselwirkung zwischen Stau2 und DDX9 hin (Abbildung 4.16B). Zukünftige Experimente müssen allerdings zeigen, ob es sich dabei um eine direkte Protein-Protein Interaktion handelt oder ob diese durch ein weiteres Protein vermittelt wird. DDX9 ist an vielen zellulären Prozessen beteiligt. Unter anderem ist DDX9 beim Prozessieren von microRNAs und damit an der sequenz-spezifischen posttranskriptionalen Geninaktivierung beteiligt. DDX9 interagiert mit Komponenten des *RNA-induced silencing complexes* (RISC) wie TRBP, Ago2 und Dicer (Robb & Rana 2007); für eine Übersicht s. (Cao et al. 2006). Interessanterweise enthalten die in dieser Arbeit isolierten neuronalen Stau2-RNPs ebenfalls die RISC-Komponenten Dicer, PACT (Lee et al. 2006) und Mov10 (Armitage) (Chekulaeva & Ephrussi 2004) (Tabelle 4.1). Es gibt Hinweise darauf, dass microRNAs die Translation der Ziel-mRNA während des Transports inhibieren (Ashraf et al. 2006, Schratt et al. 2006). Die Vorläufer der microRNAs, die prä-microRNAs, werden über Exportin-5 aus dem Zellkern exportiert (Yi et al. 2003, Kim 2004). Kürzlich wurde gezeigt, dass die längste Stau2 Isoform (62 kDa) ebenfalls über Exportin-5 in das Zytoplasma gelangt (Macchi et al. 2004). Es kann daher spekuliert werden, dass die Stau2-enthaltenden Partikel eventuell auch microRNAs beinhalten (s. auch Buhler, Diplomarbeit 2005). Dies wird derzeit von Dr. Anetta Konecna und Sabine Spath im Labor von Prof. Kiebler genauer untersucht.

Die Translationsinaktivierung ist laut dem gängigen Modell der RNA Lokalisierung (Abbildung 2.1) eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche lokale Proteinsynthese. Es gibt meh-

rere Mechanismen, um dies sicherzustellen. Beispielsweise ist das nukleäre cap-bindende Protein NCBP80 mit allen in dieser Arbeit isolierten RNPs (Stau1, Stau2 und Btz) assoziiert (Tabelle 4.1, Abbildung 4.14 und 4.16). Das deutet darauf hin, dass die in den RNPs enthaltenen mRNAs mit dem nukleären CBP80/CBP20 Komplex gebunden sind. Solche mRNAs werden wiederum vom EJC-Komplex gebunden und Letzterer wird bei der initialen Translation entfernt (Ishigaki et al. 2001, Lejeune et al. 2002). Zusammen mit der Identifizierung einiger EJC-Komponenten (s.o.) legt dies nahe, dass sich die hier isolierten RNPs in einem translational inaktiven Zustand befinden. Des Weiteren konnten in den endogenen RNPs einige wenige Translationsinitiationsfaktoren nicht aber Translationselongationsfaktoren detektiert werden (Tabelle 4.1).

Zusammenfassend ist anzunehmen, dass die in dieser Arbeit identifizierten Proteine nicht die Komposition eines einzigen, makromolekularen Stau1-, Stau2- bzw. Btz-RNPs, sondern viel mehr die eines Pools an heterogenen Stau1-, Stau2- bzw. Btz-enthaltenden Komplexen widerspiegeln. Auch in der Arbeit von Sven Kröning wird schon auf das Vorhandensein unterschiedlicher Btz-enthaltender RNPs im Rattenhirn hingewiesen (Kröning, Dissertation 2004). Eine Möglichkeit, diesen Pool an isolierten RNPs weiter aufzutrennen, bietet die Gel-filtration. Dabei werden die einzelnen Komplexe ihrer Größe nach aufgetrennt. Dies konnte bereits für die Stau1- und Stau2-enthaltende Komplexe gezeigt werden (Mallardo et al. 2003). Eine anschließende Immunpräzipitation und massenspektrometrische Analyse, könnte die Identifizierung unterschiedlicher Stau1-, Stau2- und Btz-enthaltender RNPs ermöglichen.

Vergleicht man die in dieser Arbeit identifizierten Proteine mit vorangegangenen massenspektrometrischen Analysen von Transport-RNPs, so lässt sich eine große Übereinstimmung feststellen (Angenstein et al. 2005, Bannai et al. 2004, Kanai et al. 2004, Elvira et al. 2006b, Villace et al. 2004, Jonson et al. 2007). In drei dieser Studien wurden die RNPs über Fusionsproteine (Stau1, hnRNP Q/Syncrip bzw. ZBP1/IMP1), die in nicht-neuronalen Zelllinien (Hek293T bzw. 293EBNA) überexprimiert wurden, isoliert (Jonson et al. 2007, Villace et al. 2004, Bannai et al. 2004). Zudem waren bei der Isolierung von Bannai und Mitarbeitern 25% der identifizierten Proteine mitochondrialen Ursprungs (Bannai et al. 2004). In einer weiteren Studie wurde ein klassisches GST-Pulldown Experiment mit einem GST-markierten Motorprotein (KHC, Kinesin-1) aus Rattenhirnextrakt durchgeführt (Kanai et al. 2004). Somit war bei diesen Studien eine physiologische Zusammensetzung der RNPs nicht gewährleistet. In einer weiteren Untersuchung wurden neuronale RNPs zusammen mit Clathrin-ummantelten Vesikeln angereichert und ohne weitere Affinitätschromatographie massenspektrometrisch analysiert (Elvira et al. 2006b). Dabei könnte die Anhäufung von vesikulären Proteinen (19% der gesamt isolierten Proteine) die Identifizierung anderer Proteine in der Massenspektrometrie überlagert haben. In der aussagekräftigsten Studie von Angenstein und Mitarbeitern

wurden endogene neuronale RNPs zunächst in einem Saccharose-Dichtegradienten vorge-reinigt und anschließend die Poly(A)-enthaltenden mRNPs über eine Oligo(dT)-Sepharose affinitätsgereinigt (Angenstein et al. 2005).

Proteine, die in den genannten Studien und den hier isolierten RNPs identifiziert wurden, wurden um einen Vergleich zu ermöglichen in Tabelle 4.1 gekennzeichnet. Dieser Vergleich verdeutlicht die große Übereinstimmung an Proteinkomponenten. Dies wirft die Frage auf, ob alle RNPs trotz ihrer Heterogenität eine Art Kernkomplex enthalten. Gemessen an der Häufigkeit ihrer Identifizierung könnten unter anderem die Proteine hnRNP A3, hnRNP U, hnRNP Q, ZBP1, PABP1, Pur- $\alpha$ , Stau1, Nucleolin, Upf1 und DDX9 zu solch einem Kernkomplex gehören. Die Spezifität der einzelnen Proteine wird wahrscheinlich durch die Interaktion mit weiteren Proteinen hervorgerufen (Arn et al. 2003).

Generell gelang in der vorgelegten Studie der Nachweis von deutlich mehr RNA-Bindeproteinen als in den einzelnen anderen Studien mit Ausnahme von Angenstein et al (Angenstein et al. 2005). Dies verdeutlicht die Notwendigkeit einer Vorreinigung der RNPs, die es ermöglichte, einige bis dato nicht mit RNA-Transport in Verbindung gebrachte Proteine zu identifizieren. Dazu zählen unter anderem drei hnRNPs (hnRNP C, hnRNP H2 und RALY), vier DDX-Proteine (DDX15, DDX36, DDX41 und DDX57) sowie die vier RNA-Bindeproteine RBM4, RBM9, RBM14 und RBMX. Die Assoziation von RBMX sowie RBM4 wurde über Western Blot-Analysen in allen drei in dieser Arbeit untersuchten RNPs bestätigt (Tabelle 1, Abbildungen 4.14B und 4.16B), wobei zwischen Btz und RBMX eine mögliche Protein-Protein Wechselwirkung identifiziert wurde (Abbildung 4.16B). RBMX ist bislang wenig erforscht, jedoch wurde in Knock-down Experimenten im Zebrafisch gezeigt, dass das Fehlen von RBMX zu einer Unterentwicklung von Kopf und Augen und einer im Vergleich zum Wildtyp kleineren Körpergröße führt (Tsend-Ayush et al. 2005). RBMX spielt daher eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Gehirns (Tsend-Ayush et al. 2005) und stellt einen interessanten Kandidaten für weitere Studien, z.B. RNAi Experimente in primären hippocampalen Neuronen dar.

### **5.1.2 GST-Pulldown, Immunpräzipitation und Massenspektrometrie**

In dieser Arbeit wurden RNPs über zwei unterschiedliche, biochemische Ansätze gereinigt. Dabei ist die Isolierung unter physiologischen Bedingungen (IP) sicherlich der *in vitro* Methode vorzuziehen (GST-Pulldown). Trotzdem sollten die Möglichkeiten des GST-Pulldowns zur Identifizierung neuer Interaktionspartner nicht unterschätzt werden. Beim Vergleich der *in vitro* assemblierten und der endogenen RNPs ließ sich eine große Übereinstimmung feststellen (Tabelle 4.1 und Abbildungen 4.14 und 4.16). Demnach gelang der Nachweis für viele Proteine über zwei unterschiedliche Methoden.

Vergleicht man die Zahl der identifizierten Peptide in den GST-Pulldown Experimenten mit den entsprechenden IPs, so lieferte insgesamt der GST-Pulldown eine höhere Peptidzahl für

die jeweiligen Proteine bei der anschließenden massenspektrometrischen Analyse. Sehr wahrscheinlich ist das damit zu erklären, dass für die entsprechenden GST-Pulldowns mehr Probenmaterial bei der massenspektrometrischen Analyse eingesetzt wurde (vergl. Abbildungen 4.7 und 4.8 mit 4.13). Generell lässt die Zahl der identifizierten Peptide eines Proteins nur eine semiquantitative Aussage über die relative Menge des Proteins in der Präparation zu, da sie von unterschiedlichen Parametern abhängig ist, z.B. der Zahl der durch den Trypsin Verdau entstehenden Peptide oder der Extrahierbarkeit der Proteine aus dem Gelsstück (Elvira et al. 2006b). Eine weitere Limitation ist die Tatsache, dass eine Gelbande nicht nur ein, sondern meistens mehrere Proteine enthält. Generell ist die Analyse für abundante Proteine mit einer ähnlichen Verteilung von Arginin und Lysin am erfolgreichsten (Blondeau et al. 2004). Einer der genannten Gründe erklärt möglicherweise, weshalb für das Protein Barentsz in der mit anti-Btz Antikörpern durchgeführten IP massenspektrometrisch nur ein Peptid identifiziert werden konnte (Tabelle 4.1). Auch eine zusätzliche massenspektrometrische Analyse, bei der das Programm dahingehend verändert wurde, dass es vorzugsweise nach Peptiden der Btz-Sequenz sucht („*inclusion list*“), blieb erfolglos. Diese Schwierigkeiten bei der massenspektrometrischen Identifizierung von Btz waren allerdings im Vorfeld bekannt (Kröning, Dissertation 2004). Bei der Analyse mittels Western Blot gelang es, Btz spezifisch nachzuweisen (Abbildung 4.11, 4.16 und 4.17).

Eine weitere Einschränkung ergibt sich bei der Identifizierung eng verwandter Proteine oder unterschiedlicher Spleiß-Isoformen eines Proteins. Diese können über die Massenspektrometrie häufig nicht eindeutig bestimmt werden. Die Translationsinitiationsfaktoren eIF4A1, eIF4A2 und eIF4A3 unterscheiden sich beispielsweise nur in ihren N-terminalen Regionen (Chan et al. 2004). Die wenigen in den Btz-RNPs identifizierten Peptide für eIF4A1 bzw. eIF4A2 stammen sehr wahrscheinlich aus Regionen, die in allen drei Proteinen vorhanden sind. Dies bedarf einer genaueren Analyse der Peptidsequenzen bzw. einer Überprüfung mittels Western Blot. Aus den eben genannten Gründen sollte einer Identifizierung eines Proteins über die Massenspektrometrie immer eine Validierung mittels Western Blot mit spezifischen Antikörpern im entsprechenden GST-Pulldown bzw. der entsprechenden IP angeschlossen werden.

### **5.1.3 Identifizierung der RNAs in endogenen Stau2- und Btz-RNPs**

Neben der Aufklärung der Protein-Komponenten von RNPs ist die Identifizierung der in diesen Transportkomplexen enthaltenen RNAs von entscheidendem Interesse. Während die Untersuchung der Proteine Aufschlüsse über die molekularen Mechanismen der RNA Lokalisierung gibt, ermöglicht die Kenntnis der transportierten RNAs eine bessere Einschätzung, welche Proteine lokal an postsynaptischen Orten gebildet werden und wie sie zur synaptischen Plastizität beitragen. Darüber hinaus sind nicht-kodierende RNAs, wie BC1 (Wang et

al. 2005) oder microRNAs (Schratt et al. 2006), wahrscheinlich an der Translationskontrolle lokalisierter mRNAs beteiligt und somit essentielle Komponenten von RNPs.

Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit initiale Experimente zur Untersuchung der in den endogenen neuronalen Stau2- und Btz-RNPs enthaltenden RNAs durchgeführt. Bis dato sind nur wenige dendritisch lokalisierte, spezifisch mit Btz- bzw. Stau2-RNPs assoziierte RNAs identifiziert worden (Macchi et al. 2003, Goetze et al. 2006). Die Assoziation der nicht-kodierenden dendritisch lokalisierten BC1 RNA konnte für Btz bestätigt (Macchi et al. 2003) und für Stau2 neu aufgedeckt werden. Es ist bekannt, dass die Herabregulierung von Stau2 in hippokampalen Neuronen in einer reduzierten Expression der  $\beta$ -Aktin mRNA resultiert (Goetze et al. 2006). Der Nachweis der  $\beta$ -Aktin mRNA, sowie der dendritisch lokalisierten MAP2 mRNA in Stau2- und auch Btz-RNPs gelang im Rahmen dieser Arbeit (Abbildung 4.11 und 4.12). Giorgi und Mitarbeiter hatten vor kurzem gezeigt, dass die dendritisch lokalisierte Arc mRNA (Wallace et al. 1998) ein Bestandteil eines eIF4A3-enthaltenden Komplexes ist (Giorgi et al. 2007). Da Btz im EJC-Komplex direkt mit eIF4A3 interagiert (Bono et al. 2006), wurde Arc mRNA als weiterer Kandidat gewählt und konnte sowohl aus Btz- als auch aus Stau2-RNPs isoliert werden (Abbildung 4.20). Dabei scheint die Arc mRNA in den Btz-RNPs stärker angereichert zu sein. Allerdings ist eine quantitative Aussage nur über eine *Real-time* PCR möglich.

Mit der in dieser Arbeit entwickelten Methode zur Isolierung von endogenen RNPs lassen sich also nicht nur Proteine, sondern auch RNAs in den RNP-Komplexen spezifisch nachweisen. Jedoch eignet sich die PCR-Amplifikation nur für einen Nachweis bestimmter, bekannter Kandidaten. Mit Hilfe der Genchip-Analyse lassen sich dagegen die meisten in den Transport-RNPs enthaltenen mRNAs ermitteln. Vor kurzem wurden zwei Arbeiten veröffentlicht, in denen mit Hilfe von Genchip-Analysen die Identität der in Transport-RNPs enthaltenen mRNAs identifiziert wurde (Jonson et al. 2007, Furic et al. 2008). In beiden Studien wurden dazu Fusionsproteine, Stau1 und Stau2 bzw. IMP-1 (ZBP1), in Hek293T-Zellen überexprimiert und die RNPs anschließend affinitätsgereinigt. Dabei waren 7% und 11% bzw 3% des mRNA Transkriptoms aus Hek293T-Zellen in den entsprechenden RNPs vorhanden. Zudem wurde beim Vergleich der in Stau1 und Stau2 enthaltenen mRNAs eine Übereinstimmung von 51% festgestellt (Furic et al. 2008). Es ist allerdings fraglich, ob diese aus Hek293T-Zellen isolierten RNPs tatsächlich neuronalen RNPs ähneln. In der hier vorgelegten Studie wurde daher in einem initialen Experiment mittels Genchip-Analyse die in endogenen neuronalen RNPs enthaltenden mRNAs identifiziert. Insgesamt wurden 5263 bzw. 8442 mRNAs in den endogenen Stau2- bzw. Btz-RNPs nachgewiesen. Diese Zahlen sind erstaunlich hoch, wenn man bedenkt, dass eine Ratte nur ~20,000 Gene besitzt. Man kann nicht davon ausgehen, dass es sich dabei ausschließlich um lokalisierte mRNAs handelt. Auf der anderen Seite ist zumindest Btz als Kernkomponente des EJC-Komplexes auf jeder gespleißten mRNA vorhanden. Um einen Vergleich zum Ausgangsmaterial zu ermöglichen, sollten in

jedem Fall auch die RNAs aus den entsprechenden Dichtegradienten-Fractionen parallel analysiert werden. Im Moment werden diese Versuche in Zusammenarbeit mit Anetta Konecna und Martin Bilban wiederholt. Hierbei werden nur RNAs als positiv gewertet, die in drei unabhängigen Experimenten identifiziert werden können. Möglicherweise könnte man auch versuchen, Stau2- und Btz-RNPs aus hippokampalen Neuronen aus Zellkultur zu isolieren. Für eine Analyse der mRNAs mittels Genchip sollte die auf diese Weise gewonnene Menge an Material ausreichend sein. Anschließend wird eine Auswahl dieser identifizierten mRNAs mittels RT-PCR validiert. Eine mögliche Co-Lokalisierung einer entsprechenden Kandidaten-mRNA mit Stau2 bzw. Btz in hippokampalen Neuronen wird über Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) ermittelt. In einem nächsten Schritt könnte, z.B. über den siRNA-vermittelten Knock-Down der Protein-Kandidaten, untersucht werden, ob durch das Fehlen eines oder mehrerer Proteine der Transport einer spezifischen RNA inhibiert wird. Solche funktionellen Studien sind allerdings nur möglich, wenn die Zusammensetzung der jeweiligen RNPs bekannt ist. Der erste Schritt zur Entschlüsselung dieser Komponenten, wurde im Rahmen dieser Arbeit gemacht.

#### **5.1.4 Die Rolle von Btz und Stau2 beim *nuclear priming* im Zellkern**

Lange Zeit wurde angenommen, dass die Transport-RNPs im Zytoplasma gebildet werden. Mittlerweile ist man jedoch der Meinung, dass die Assemblierung der RNPs im Zellkern (*nuclear priming*) eine wichtige Rolle für die spätere Lokalisierung der mRNAs im Zytoplasma spielt (Kress et al. 2004, Czaplinski & Singer 2006). Allerdings ist dies bisher wenig erforscht. Sowohl Btz (Degot et al. 2002), Stau1 (Martel et al. 2006) wie auch Stau2 (Miki et al. 2005, Macchi et al. 2004) können zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma pendeln. Im Fall von Stau2 wurden Unterschiede beim Export der verschiedenen Isoformen festgestellt (Miki et al. 2005, Macchi et al. 2004). Es wurde daher spekuliert, dass diese mit verschiedenen RNAs aus dem Kern transportiert werden (Miki et al. 2005). In einem Modell für die Assemblierung von Transport-RNPs in der Oocyte von *Drosophila melanogaster* wird angenommen, dass Btz erst bei bzw. nach dem Export aus dem Zellkern durch die EJC-Komponente eIF4A3 zu den RNPs rekrutiert wird (St Johnston 2005). Darüberhinaus wurde bei einer umfangreichen massenspektrometrischen Analyse von humanen nukleären RNPs, die *in vitro* gespleißte mRNAs enthielten, kein Btz identifiziert (Merz et al. 2007). Diese Ergebnisse stehen allerdings im Widerspruch mit anderen Arbeiten, bei denen vermutet wird, dass die Kernkomponenten des EJC-Komplexes, Btz, eIF4A3 und Magoh-Y14 im Zellkern an gespleißte mRNA binden und mit dieser aus dem Zellkern exportiert werden (Le Hir et al. 2001b). Daraufhin wurden im Rahmen dieser Arbeit erste Versuche durchgeführt, um eine mögliche Rolle von Btz sowie den beiden Stau2 Proteinen beim *nuclear priming* von neuronalen RNPs zu entschlüsseln. Nach einem modifizierten Protokoll von Vakakis et al (Vakakis et al.

1991) wurden Zellkernextrakte aus embryonalem (E17) Rattenhirn gewonnen (s. auch 3.8.4.2). Western Blot-Analysen bestätigten die Anwesenheit von Btz, Stau1 und Stau2 im Zellkernextrakt (s. auch Abbildung 4.22). Erste Versuche zeigten, dass Btz aus neuronalen Zellkernextrakten immungefällt werden kann (Daten nicht gezeigt). Im nächsten Schritt wurden das Sedimentationsverhalten der neuronalen nukleären Btz-, Stau1- und Stau2-RNPs im Dichtegradienten untersucht. Bei den anschließenden Western Blot-Analyse wurden deutliche Unterschiede im Vergleich zur Fraktionierung der zytoplasmatischen RNPs festgestellt (Vergl. Abbildung 4.22 mit Abbildung 4.9). Btz-RNPs befinden sich nach der Dichtegradientenzentrifugation in den leichten Fraktionen F1-3 und nicht wie für das Zytoplasma gezeigt in den Fraktionen F4-6 und sind somit von den Ribosomen (F5-7) abgetrennt. Im Gegensatz zu den zytoplasmatischen haben die nukleären Stau1- bzw. Stau2-RNPs eine größere Dichte und befinden sich in den Fraktionen F6-7 bzw. F6-8. Interessanterweise gibt es zudem leichtere Stau2-RNPs, die überwiegend die kleinste 52 kDa Isoform enthalten (F1-4) (Abbildung 4.22).

Während der Herstellung wurde das Zellkernextrakt mit RNase-freier DNase behandelt, daher ist auszuschließen, dass es sich bei den isolierten Komplexen um DNA-Protein-Komplexe handelt. Darüberhinaus werden die nukleären RNPs, wie auch für die zytoplasmatischen gezeigt, durch eine RNase-Behandlung in die leichten Fraktionen verschoben (s. Abbildung 4.9 und Daten nicht gezeigt). Dies verdeutlicht die Heterogenität von RNPs, die auch schon für die zytoplasmatischen RNPs festgestellt wurde und untermauert, die Vermutung, dass die verschiedenen Stau2 Isoformen möglicherweise mit unterschiedlichen RNAs aus dem Zellkern exportiert werden (Miki et al. 2005).

Mit der in dieser Arbeit etablierten Methode lassen sich also nicht nur zytoplasmatische, sondern auch nukleäre RNPs isolieren. Zukünftige Experimente z.B. mittels IP und anschließender massenspektrometrischer Analyse könnten die Zusammensetzung dieser nukleären Btz-, Stau1 und Stau2-RNPs identifizieren. Ob in diesen unterschiedliche RNAs enthalten sind oder ob es sich bei den unterschiedlichen RNPs um verschiedene Schritte des RNA-Metabolismus handelt, muss noch geklärt werden.

Dadurch könnten neue Erkenntnisse für die RNP-Assemblierung im Zellkern (*nuclear priming*) gewonnen und somit ein weiterer Schritt des Mechanismus der mRNA Lokalisation entschlüsselt werden.

## Literaturverzeichnis

- Angenstein, F., Evans, A. M., Ling, S. C., Settlage, R. E., Ficarro, S., Carrero-Martinez, F. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. and Greenough, W. T. (2005) Proteomic characterization of messenger ribonucleoprotein complexes bound to nontranslated or translated poly(A) mRNAs in the rat cerebral cortex. *J Biol Chem*, 280, 6496-6503.
- Arn, E. A., Cha, B. J., Theurkauf, W. E. and Macdonald, P. M. (2003) Recognition of a bicoid mRNA localization signal by a protein complex containing Swallow, Nod, and RNA binding proteins. *Dev Cell*, 4, 41-51.
- Ashraf, S. I., McLoon, A. L., Sclarsic, S. M. and Kunes, S. (2006) Synaptic protein synthesis associated with memory is regulated by the RISC pathway in *Drosophila*. *Cell*, 124, 191-205.
- Ballut, L., Marchadier, B., Baguet, A., Tomasetto, C., Seraphin, B. and Le Hir, H. (2005) The exon junction core complex is locked onto RNA by inhibition of eIF4AIII ATPase activity. *Nat Struct Mol Biol*, 12, 861-869.
- Bannai, H., Fukatsu, K., Mizutani, A., Natsume, T., Iemura, S., Ikegami, T., Inoue, T. and Mikoshiba, K. (2004) An RNA-interacting protein, SYNCRIP (heterogeneous nuclear ribonuclear protein Q1/NSAP1) is a component of mRNA granule transported with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 mRNA in neuronal dendrites. *J Biol Chem*, 279, 53427-53434.
- Bashirullah, A., Cooperstock, R. L. and Lipshitz, H. D. (1998) RNA localization in development. *Annu Rev Biochem*, 67, 335-394.
- Bensadoun, A. and Weinstein, D. (1976) Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal Biochem*, 70, 241-250.
- Blichenberg, A., Rehbein, M., Muller, R., Garner, C. C., Richter, D. and Kindler, S. (2001) Identification of a cis-acting dendritic targeting element in the mRNA encoding the alpha subunit of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II. *Eur J Neurosci*, 13, 1881-1888.
- Blondeau, F., Ritter, B., Allaire, P. D. et al. (2004) Tandem MS analysis of brain clathrin-coated vesicles reveals their critical involvement in synaptic vesicle recycling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 3833-3838.
- Bond, A. T., Mangus, D. A., He, F. and Jacobson, A. (2001) Absence of Dbp2p alters both nonsense-mediated mRNA decay and rRNA processing. *Mol Cell Biol*, 21, 7366-7379.
- Bono, F., Ebert, J., Lorentzen, E. and Conti, E. (2006) The crystal structure of the exon junction complex reveals how it maintains a stable grip on mRNA. *Cell*, 126, 713-725.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
- Brendel, C., Rehbein, M., Kreienkamp, H. J., Buck, F., Richter, D. and Kindler, S. (2004) Characterization of Staufen 1 ribonucleoprotein complexes. *Biochem J*, 384, 239-246.

- Brummelkamp, T. R., Bernards, R. and Agami, R. (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, 296, 550-553.
- Bullock, S. L. (2007) Translocation of mRNAs by molecular motors: think complex? *Semin Cell Dev Biol*, 18, 194-201.
- Cao, X., Yeo, G., Muotri, A. R., Kuwabara, T. and Gage, F. H. (2006) Noncoding RNAs in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci*, 29, 77-103.
- Carter, M. S., Doskow, J., Morris, P., Li, S., Nhim, R. P., Sandstedt, S. and Wilkinson, M. F. (1995) A regulatory mechanism that detects premature nonsense codons in T-cell receptor transcripts in vivo is reversed by protein synthesis inhibitors in vitro. *J Biol Chem*, 270, 28995-29003.
- Chan, C. C., Dostie, J., Diem, M. D., Feng, W., Mann, M., Rappsilber, J. and Dreyfuss, G. (2004) eIF4A3 is a novel component of the exon junction complex. *RNA*, 10, 200-209.
- Chang, Y. F., Imam, J. S. and Wilkinson, M. F. (2007) The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu Rev Biochem*, 76, 51-74.
- Chekulaeva, M. and Ephrussi, A. (2004) Drosophila development: RNA interference ab ovo. *Curr Biol*, 14, R428-430.
- Chen, W., Helenius, J., Braakman, I. and Helenius, A. (1995) Cotranslational folding and calnexin binding during glycoprotein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 6229-6233.
- Cordin, O., Banroques, J., Tanner, N. K. and Linder, P. (2006) The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene*, 367, 17-37.
- Czaplinski, K. and Singer, R. H. (2006) Pathways for mRNA localization in the cytoplasm. *Trends Biochem Sci*, 31, 687-693.
- Dahm, R. and Kiebler, M. (2005) Cell biology: silenced RNA on the move. *Nature*, 438, 432-435.
- Dahm, R., Kiebler, M. and Macchi, P. (2007) RNA localisation in the nervous system. *Semin Cell Dev Biol*, 18, 216-223.
- Davidovic, L., Jaglin, X. H., Lepagnol-Bestel, A. M., Tremblay, S., Simonneau, M., Bardoni, B. and Khandjian, E. W. (2007) The fragile X mental retardation protein is a molecular adaptor between the neurospecific KIF3C kinesin and dendritic RNA granules. *Hum Mol Genet*, 16, 3047-3058.
- Degot, S., Regnier, C. H., Wendling, C., Chenard, M. P., Rio, M. C. and Tomasetto, C. (2002) Metastatic Lymph Node 51, a novel nucleo-cytoplasmic protein overexpressed in breast cancer. *Oncogene*, 21, 4422-4434.
- Dreyfuss, G., Matunis, M. J., Pinol-Roma, S. and Burd, C. G. (1993) hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem*, 62, 289-321.
- Duchaine, T. F., Hemraj, I., Furic, L., Deitinghoff, A., Kiebler, M. A. and DesGroseillers, L. (2002) Staufen2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles. *J Cell Sci*, 115, 3285-3295.
- Eberwine, J., Miyashiro, K., Kacharina, J. E. and Job, C. (2001) Local translation of classes of mRNAs that are targeted to neuronal dendrites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 7080-7085.

- Elvira, G., Massie, B. and DesGroseillers, L. (2006a) The zinc-finger protein ZFR is critical for Staufen 2 isoform specific nucleocytoplasmic shuttling in neurons. *J Neurochem*, 96, 105-117.
- Elvira, G., Wasiak, S., Blandford, V. et al. (2006b) Characterization of an RNA granule from developing brain. *Mol Cell Proteomics*, 5, 635-651.
- Farina, K. L., Huttelmaier, S., Musunuru, K., Darnell, R. and Singer, R. H. (2003) Two ZBP1 KH domains facilitate beta-actin mRNA localization, granule formation, and cytoskeletal attachment. *J Cell Biol*, 160, 77-87.
- Faust, M., Gunther, J., Morgenstern, E., Montenarh, M. and Gotz, C. (2002) Specific localization of the catalytic subunits of protein kinase CK2 at the centrosomes. *Cell Mol Life Sci*, 59, 2155-2164.
- Ferraiuolo, M. A., Lee, C. S., Ler, L. W., Hsu, J. L., Costa-Mattioli, M., Luo, M. J., Reed, R. and Sonenberg, N. (2004) A nuclear translation-like factor eIF4AIII is recruited to the mRNA during splicing and functions in nonsense-mediated decay. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 4118-4123.
- Ferrandon, D., Elphick, L., Nusslein-Volhard, C. and 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, 1221-1232.
- Furic, L., Maher-Laporte, M. and DesGroseillers, L. (2008) A genome-wide approach identifies distinct but overlapping subsets of cellular mRNAs associated with Staufen1- and Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes. *RNA*, 14, 324-335.
- Gallia, G. L., Johnson, E. M. and Khalili, K. (2000) Puralpha: a multifunctional single-stranded DNA- and RNA-binding protein. *Nucleic Acids Res*, 28, 3197-3205.
- Garner, C. C., Tucker, R. P. and Matus, A. (1988) Selective localization of messenger RNA for cytoskeletal protein MAP2 in dendrites. *Nature*, 336, 674-677.
- Gehring, N. H., Kunz, J. B., Neu-Yilik, G., Breit, S., Viegas, M. H., Hentze, M. W. and Kulozik, A. E. (2005) Exon-junction complex components specify distinct routes of nonsense-mediated mRNA decay with differential cofactor requirements. *Mol Cell*, 20, 65-75.
- Giorgi, C., Yeo, G. W., Stone, M. E., Katz, D. B., Burge, C., Turrigiano, G. and Moore, M. J. (2007) The EJC factor eIF4AIII modulates synaptic strength and neuronal protein expression. *Cell*, 130, 179-191.
- Glanzer, J., Miyashiro, K. Y., Sul, J. Y., Barrett, L., Belt, B., Haydon, P. and Eberwine, J. (2005) RNA splicing capability of live neuronal dendrites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 16859-16864.
- Goetze, B., Grunewald, B., Baldassa, S. and Kiebler, M. (2004) Chemically controlled formation of a DNA/calcium phosphate coprecipitate: application for transfection of mature hippocampal neurons. *J Neurobiol*, 60, 517-525.
- Goetze, B., Tuebing, F., Xie, Y., Dorostkar, M. M., Thomas, S., Pehl, U., Boehm, S., Macchi, P. and Kiebler, M. A. (2006) The brain-specific double-stranded RNA-binding protein Staufen2 is required for dendritic spine morphogenesis. *J Cell Biol*, 172, 221-231.
- Hachet, O. and Ephrussi, A. (2004) Splicing of oskar RNA in the nucleus is coupled to its cytoplasmic localization. *Nature*, 428, 959-963.

- Hathaway, G. M., Lubben, T. H. and Traugh, J. A. (1980) Inhibition of casein kinase II by heparin. *J Biol Chem*, 255, 8038-8041.
- Hengst, U. and Jaffrey, S. R. (2007) Function and translational regulation of mRNA in developing axons. *Semin Cell Dev Biol*, 18, 209-215.
- Hirokawa, N. and Takemura, R. (2004) Kinesin superfamily proteins and their various functions and dynamics. *Exp Cell Res*, 301, 50-59.
- Huttelmaier, S., Zenklusen, D., Lederer, M., Dichtenberg, J., Lorenz, M., Meng, X., Bassell, G. J., Condeelis, J. and Singer, R. H. (2005) Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature*, 438, 512-515.
- Ishigaki, Y., Li, X., Serin, G. and Maquat, L. E. (2001) Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. *Cell*, 106, 607-617.
- Jansen, R. P. (2001) mRNA localization: message on the move. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 247-256.
- Jeong, J. H., Nam, Y. J., Kim, S. Y., Kim, E. G., Jeong, J. and Kim, H. K. (2007) The transport of Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes involves kinesin motor protein and is modulated by mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurochem*, 102, 2073-2084.
- Johnson, E. M., Kinoshita, Y., Weinreb, D. B., Wortman, M. J., Simon, R., Khalili, K., Winkler, B. and Gordon, J. (2006) Role of Pur alpha in targeting mRNA to sites of translation in hippocampal neuronal dendrites. *J Neurosci Res*, 83, 929-943.
- Jonson, L., Vikesaa, J., Krogh, A., Nielsen, L. K., Hansen, T., Borup, R., Johnsen, A. H., Christiansen, J. and Nielsen, F. C. (2007) Molecular composition of IMP1 ribonucleoprotein granules. *Mol Cell Proteomics*, 6, 798-811.
- Kanai, Y., Dohmae, N. and Hirokawa, N. (2004) Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron*, 43, 513-525.
- Kashima, I., Yamashita, A., Izumi, N., Kataoka, N., Morishita, R., Hoshino, S., Ohno, M., Dreyfuss, G. and Ohno, S. (2006) Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev*, 20, 355-367.
- Kataoka, N., Yong, J., Kim, V. N., Velazquez, F., Perkinson, R. A., Wang, F. and Dreyfuss, G. (2000) Pre-mRNA splicing imprints mRNA in the nucleus with a novel RNA-binding protein that persists in the cytoplasm. *Mol Cell*, 6, 673-682.
- Kiebler, M. A. and DesGroseillers, L. (2000) Molecular insights into mRNA transport and local translation in the mammalian nervous system. *Neuron*, 25, 19-28.
- Kim, V. N. (2004) MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends Cell Biol*, 14, 156-159.
- Kim, Y. K., Furic, L., Desgroseillers, L. and Maquat, L. E. (2005) Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell*, 120, 195-208.
- Kislauskis, E. H. and Singer, R. H. (1992) Determinants of mRNA localization. *Curr Opin Cell Biol*, 4, 975-978.

- Klann, E. and Dever, T. E. (2004) Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*, 5, 931-942.
- Knowles, R. B., Sabry, J. H., Martone, M. E., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Bassell, G. J. and Kosik, K. S. (1996) Translocation of RNA granules in living neurons. *J Neurosci*, 16, 7812-7820.
- Kobayashi, S., Agui, K., Kamo, S., Li, Y. and Anzai, K. (2000) Neural BC1 RNA associates with pur alpha, a single-stranded DNA and RNA binding protein, which is involved in the transcription of the BC1 RNA gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 277, 341-347.
- Kohrmann, M., Luo, M., Kaether, C., DesGroseillers, L., Dotti, C. G. and 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, 2945-2953.
- Kress, T. L., Yoon, Y. J. and Mowry, K. L. (2004) Nuclear RNP complex assembly initiates cytoplasmic RNA localization. *J Cell Biol*, 165, 203-211.
- Kristensen, D. B., Brond, J. C., Nielsen, P. A. et al. (2004) Experimental Peptide Identification Repository (EPIR): an integrated peptide-centric platform for validation and mining of tandem mass spectrometry data. *Mol Cell Proteomics*, 3, 1023-1038.
- Kuhl, D. and Skehel, P. (1998) Dendritic localization of mRNAs. *Curr Opin Neurobiol*, 8, 600-606.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Le Hir, H., Gatfield, D., Braun, I. C., Forler, D. and Izaurralde, E. (2001a) The protein Mago provides a link between splicing and mRNA localization. *EMBO Rep*, 2, 1119-1124.
- Le Hir, H., Gatfield, D., Izaurralde, E. and Moore, M. J. (2001b) The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and non-sense-mediated mRNA decay. *EMBO J*, 20, 4987-4997.
- Le Hir, H., Izaurralde, E., Maquat, L. E. and Moore, M. J. (2000) The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *EMBO J*, 19, 6860-6869.
- Lee, Y., Hur, I., Park, S. Y., Kim, Y. K., Suh, M. R. and Kim, V. N. (2006) The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J*, 25, 522-532.
- Lejeune, F., Ishigaki, Y., Li, X. and Maquat, L. E. (2002) The exon junction complex is detected on CBP80-bound but not eIF4E-bound mRNA in mammalian cells: dynamics of mRNP remodeling. *EMBO J*, 21, 3536-3545.
- Li, P., Yang, X., Wasser, M., Cai, Y. and Chia, W. (1997a) Inscuteable and Staufen mediate asymmetric localization and segregation of prospero RNA during Drosophila neuroblast cell divisions. *Cell*, 90, 437-447.
- Li, Q., Imataka, H., Morino, S., Rogers, G. W., Jr., Richter-Cook, N. J., Merrick, W. C. and Sonenberg, N. (1999) Eukaryotic translation initiation factor 4AIII (eIF4AIII) is functionally distinct from eIF4AI and eIF4AII. *Mol Cell Biol*, 19, 7336-7346.

- Li, S., Leonard, D. and Wilkinson, M. F. (1997b) T cell receptor (TCR) mini-gene mRNA expression regulated by nonsense codons: a nuclear-associated translation-like mechanism. *J Exp Med*, 185, 985-992.
- Linder, P. (2006) Dead-box proteins: a family affair--active and passive players in RNP-remodeling. *Nucleic Acids Res*, 34, 4168-4180.
- Link, W., Konietzko, U., Kauselmann, G., Krug, M., Schwanke, B., Frey, U. and Kuhl, D. (1995) Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 5734-5738.
- Lyford, G. L., Yamagata, K., Kaufmann, W. E. et al. (1995) Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron*, 14, 433-445.
- Lykke-Andersen, J., Shu, M. D. and Steitz, J. A. (2000) Human Upf proteins target an mRNA for nonsense-mediated decay when bound downstream of a termination codon. *Cell*, 103, 1121-1131.
- Lykke-Andersen, J., Shu, M. D. and Steitz, J. A. (2001) Communication of the position of exon-exon junctions to the mRNA surveillance machinery by the protein RNPS1. *Science*, 293, 1836-1839.
- Macchi, P., Brownawell, A. M., Grunewald, B., DesGroseillers, L., Macara, I. G. and Kiebler, M. A. (2004) The brain-specific double-stranded RNA-binding protein Staufeu2: nucleolar accumulation and isoform-specific exportin-5-dependent export. *J Biol Chem*, 279, 31440-31444.
- Macchi, P., Kroening, S., Palacios, I. M. et al. (2003) Barentsz, a new component of the Staufeu-containing ribonucleoprotein particles in mammalian cells, interacts with Staufeu in an RNA-dependent manner. *J Neurosci*, 23, 5778-5788.
- Mallardo, M., Deitinghoff, A., Muller, J., Goetze, B., Macchi, P., Peters, C. and Kiebler, M. A. (2003) Isolation and characterization of Staufeu-containing ribonucleoprotein particles from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 2100-2105.
- Mann, M. and Jensen, O. N. (2003) Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol*, 21, 255-261.
- Maquat, L. E. (2005) Nonsense-mediated mRNA decay in mammals. *J Cell Sci*, 118, 1773-1776.
- Martel, C., Macchi, P., Furic, L., Kiebler, M. A. and Desgroseillers, L. (2006) Staufeu1 is imported into the nucleolus via a bipartite nuclear localization signal and several modulatory determinants. *Biochem J*, 393, 245-254.
- Matus, A. (2005) Growth of dendritic spines: a continuing story. *Curr Opin Neurobiol*, 15, 67-72.
- Meggio, F. and Pinna, L. A. (2003) One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? *FASEB J*, 17, 349-368.
- Merz, C., Urlaub, H., Will, C. L. and Luhrmann, R. (2007) Protein composition of human mRNPs spliced in vitro and differential requirements for mRNP protein recruitment. *RNA*, 13, 116-128.

- Micklem, D. R., Adams, J., Grunert, S. and St Johnston, D. (2000) Distinct roles of two conserved Staufen domains in oskar mRNA localization and translation. *EMBO J*, 19, 1366-1377.
- Miki, T., Takano, K. and Yoneda, Y. (2005) The role of mammalian Staufen on mRNA traffic: a view from its nucleocytoplasmic shuttling function. *Cell Struct Funct*, 30, 51-56.
- Monshausen, M., Gehring, N. H. and Kosik, K. S. (2004) The mammalian RNA-binding protein Staufen2 links nuclear and cytoplasmic RNA processing pathways in neurons. *Neuromolecular Med*, 6, 127-144.
- Monshausen, M., Rehbein, M., Richter, D. and Kindler, S. (2002) The RNA-binding protein Staufen from rat brain interacts with protein phosphatase-1. *J Neurochem*, 81, 557-564.
- Muhlemann, O., Mock-Casagrande, C. S., Wang, J., Li, S., Custodio, N., Carmo-Fonseca, M., Wilkinson, M. F. and Moore, M. J. (2001) Precursor RNAs harboring nonsense codons accumulate near the site of transcription. *Mol Cell*, 8, 33-43.
- Noble, C. G. and Song, H. (2007) MLN51 stimulates the RNA-helicase activity of eIF4AIII. *PLoS ONE*, 2, e303.
- Ohashi, S., Koike, K., Omori, A., Ichinose, S., Ohara, S., Kobayashi, S., Sato, T. A. and 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, 37804-37810.
- Palacios, I. M., Gatfield, D., St Johnston, D. and Izaurralde, E. (2004) An eIF4AIII-containing complex required for mRNA localization and nonsense-mediated mRNA decay. *Nature*, 427, 753-757.
- Palaniswamy, V., Moraes, K. C., Wilusz, C. J. and Wilusz, J. (2006) Nucleophosmin is selectively deposited on mRNA during polyadenylation. *Nat Struct Mol Biol*, 13, 429-435.
- Rappsilber, J., Ishihama, Y. and Mann, M. (2003) Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal Chem*, 75, 663-670.
- Robb, G. B. and Rana, T. M. (2007) RNA helicase A interacts with RISC in human cells and functions in RISC loading. *Mol Cell*, 26, 523-537.
- Ross, A. F., Oleynikov, Y., Kislauskis, E. H., Taneja, K. L. and Singer, R. H. (1997) Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. *Mol Cell Biol*, 17, 2158-2165.
- Schnapp, B. J. (1999) A glimpse of the machinery. *Curr Biol*, 9, R725-727.
- Schratt, G. M., Tuebing, F., Nigh, E. A., Kane, C. G., Sabatini, M. E., Kiebler, M. and Greenberg, M. E. (2006) A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature*, 439, 283-289.
- Shan, J., Moran-Jones, K., Munro, T. P., Kidd, G. J., Winzor, D. J., Hoek, K. S. and Smith, R. (2000) Binding of an RNA trafficking response element to heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A1 and A2. *J Biol Chem*, 275, 38286-38295.
- Shan, J., Munro, T. P., Barbarese, E., Carson, J. H. and Smith, R. (2003) A molecular mechanism for mRNA trafficking in neuronal dendrites. *J Neurosci*, 23, 8859-8866.

- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. and Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*, 68, 850-858.
- Shibuya, T., Tange, T. O., Stroupe, M. E. and Moore, M. J. (2006) Mutational analysis of human eIF4AIII identifies regions necessary for exon junction complex formation and nonsense-mediated mRNA decay. *RNA*, 12, 360-374.
- Siomi, M. C., Higashijima, K., Ishizuka, A. and Siomi, H. (2002) Casein kinase II phosphorylates the fragile X mental retardation protein and modulates its biological properties. *Mol Cell Biol*, 22, 8438-8447.
- St Johnston, D. (2005) Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 363-375.
- St Johnston, D., Beuchle, D. and Nusslein-Volhard, C. (1991) Staufen, a gene required to localize maternal RNAs in the Drosophila egg. *Cell*, 66, 51-63.
- Steward, O. and Levy, W. B. (1982) Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus. *J Neurosci*, 2, 284-291.
- Steward, O. and Schuman, E. M. (2001) Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annu Rev Neurosci*, 24, 299-325.
- Sun, X., Perlick, H. A., Dietz, H. C. and Maquat, L. E. (1998) A mutated human homologue to yeast Upf1 protein has a dominant-negative effect on the decay of nonsense-containing mRNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 10009-10014.
- Szebeni, A., Hingorani, K., Negi, S. and Olson, M. O. (2003) Role of protein kinase CK2 phosphorylation in the molecular chaperone activity of nucleolar protein b23. *J Biol Chem*, 278, 9107-9115.
- Tang, S. J., Meulemans, D., Vazquez, L., Colaco, N. and Schuman, E. (2001) A role for a rat homolog of staufen in the transport of RNA to neuronal dendrites. *Neuron*, 32, 463-475.
- Tange, T. O., Shibuya, T., Jurica, M. S. and Moore, M. J. (2005) Biochemical analysis of the EJC reveals two new factors and a stable tetrameric protein core. *RNA*, 11, 1869-1883.
- Tiedge, H. and Brosius, J. (1996) Translational machinery in dendrites of hippocampal neurons in culture. *J Neurosci*, 16, 7171-7181.
- Tiedge, H., Freneau, R. T., Jr., Weinstock, P. H., Arancio, O. and Brosius, J. (1991) Dendritic location of neural BC1 RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 2093-2097.
- Tiruchinapalli, D. M., Oleynikov, Y., Kelic, S., Shenoy, S. M., Hartley, A., Stanton, P. K., Singer, R. H. and Bassell, G. J. (2003) Activity-dependent trafficking and dynamic localization of zipcode binding protein 1 and beta-actin mRNA in dendrites and spines of hippocampal neurons. *J Neurosci*, 23, 3251-3261.
- Torre, E. R. and Steward, O. (1996) Protein synthesis within dendrites: glycosylation of newly synthesized proteins in dendrites of hippocampal neurons in culture. *J Neurosci*, 16, 5967-5978.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 4350-4354.

- Tsend-Ayush, E., O'Sullivan, L. A., Grutzner, F. S., Onnebo, S. M., Lewis, R. S., Delbridge, M. L., Marshall Graves, J. A. and Ward, A. C. (2005) RBMX gene is essential for brain development in zebrafish. *Dev Dyn*, 234, 682-688.
- Vakakis, N., Hearn, M. T., Veitch, B. and Austin, L. (1991) Rapid isolation of rat brain nuclei on percoll gradients. *J Neurochem*, 57, 307-317.
- van Eeden, F. J., Palacios, I. M., Petronczki, M., Weston, M. J. and 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. and 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, 2411-2420.
- Wallace, C. S., Lyford, G. L., Worley, P. F. and Steward, O. (1998) Differential intracellular sorting of immediate early gene mRNAs depends on signals in the mRNA sequence. *J Neurosci*, 18, 26-35.
- Wang, H., Iacoangeli, A., Lin, D., Williams, K., Denman, R. B., Hellen, C. U. and Tiedge, H. (2005) Dendritic BC1 RNA in translational control mechanisms. *J Cell Biol*, 171, 811-821.
- Wickham, L., Duchaine, T., Luo, M., Nabi, I. R. and 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, 2220-2230.
- Wilhelm, J. E. and Vale, R. D. (1993) RNA on the move: the mRNA localization pathway. *J Cell Biol*, 123, 269-274.
- Yamaguchi, Y., Wada, T. and Handa, H. (1998) Interplay between positive and negative elongation factors: drawing a new view of DRB. *Genes Cells*, 3, 9-15.
- Yao, J., Sasaki, Y., Wen, Z., Bassell, G. J. and Zheng, J. Q. (2006) An essential role for beta-actin mRNA localization and translation in Ca<sup>2+</sup>-dependent growth cone guidance. *Nat Neurosci*, 9, 1265-1273.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G. and Cullen, B. R. (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*, 17, 3011-3016.
- Zandomeni, R., Zandomeni, M. C., Shugar, D. and Weinmann, R. (1986) Casein kinase type II is involved in the inhibition by 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole of specific RNA polymerase II transcription. *J Biol Chem*, 261, 3414-3419.
- Zandomeni, R. O. (1989) Kinetics of inhibition by 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole on calf thymus casein kinase II. *Biochem J*, 262, 469-473.
- Zeitelhofer, M., Vessey, J. P., Xie, Y., Tubing, F., Thomas, S., Kiebler, M. and Dahm, R. (2007) High-efficiency transfection of mammalian neurons via nucleofection. *Nat Protoc*, 2, 1692-1704.
- Zhang, C., Krainer, A. R. and Zhang, M. Q. (2007) Evolutionary impact of limited splicing fidelity in mammalian genes. *Trends Genet*, 23, 484-488.
- Zhang, H. L., Eom, T., Olynykov, Y., Shenoy, S. M., Liebelt, D. A., Dichtenberg, J. B., Singer, R. H. and Bassell, G. J. (2001) Neurotrophin-induced transport of a beta-actin mRNP

---

complex increases beta-actin levels and stimulates growth cone motility. *Neuron*, 31, 261-275.

Ziemiecki, A., Muller, R. G., Fu, X. C., Hynes, N. E. and Kozma, S. (1990) Oncogenic activation of the human trk proto-oncogene by recombination with the ribosomal large subunit protein L7a. *EMBO J*, 9, 191-196.

## **Internetreferenzen**

<http://www.ensembl.org/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

[www.ebi.ac.uk/IPI/](http://www.ebi.ac.uk/IPI/)

<http://www.expasy.ch/sprot/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>

<http://www.iHop-net.org/UniPub/iHOP/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/>

<https://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaiexpress/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>

## **Fachliteratur**

Sambrook, Fritsch, Maniatis: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 1989

Harlow and Lane, Antibodies, A Laboratory Manual 1988

---

**Veröffentlichungen, die während meiner Arbeit entstanden sind:**

1. Vessey JP, Vaccani A, Xie Y, Dahm R, **Karra D**, Kiebler MA, Macchi P (2006). Dendritic localization of the translational repressor Pumilio 2 and its contribution to Neuronal RNA granules dendritic stress granules. **Journal of Neuroscience** 26, 6496-508.
2. Zeitelhofer M, **Karra D**, Macchi P, Tolino M, Thomas S, Schwarz M, Kiebler M, Dahm R. (2008) Dynamic interaction between P-bodies and transport RNPs in dendrites of mature hippocampal neurons **Journal of Neuroscience**, *accepted upon revision*
3. **Karra D**, Zeitelhofer M, Vessey JP, Jaskic E, Macchi P, Thomas S, Riefler J, Kiebler M, Dahm R. (2008) Improved protocol for high-efficiency transfection of shRNA-encoding plasmids into primary hippocampal neurons **J. Neuroscience Research**, *submitted*

**Review**

Vessey JP and **Karra D**. 2007. More than just synaptic building blocks: postsynaptic density proteins regulate dendritic patterning. **J. Neurochemistry** 102, 324-32.

# Anhang

Symbol	Acc. No.	Name (engl.)	Unique peptide Hits <sup>1</sup>		
			Btz	Stau1	Stau2
<b>I. RNA-bindende Proteine (RBPs)</b>					
<b>a) heterogene nukleäre Ribonukleoproteine (hnRNPs)</b>					
hnRNP A0	IPI00109813.1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0 (hnRNP A0)		5	6
hnRNP A1 *	IPI00817004.1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 isoform a		12	10
	IPI00553777.2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1		12	10
	IPI00621201.3	28 kDa protein		8	7
	IPI00129808.7	Similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (Helix-destabilizing protein) (Single-strand binding protein) (hnRNP core protein A1) (HDP-1) (Topoisomerase-inhibitor suppressed) isoform 1		6	4
	IPI00461698.5	27 kDa protein		5	4
	IPI00469298.2	Similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (Helix-destabilizing protein) (Single-strand binding protein) (hnRNP core protein A1) (HDP-1) (Topoisomerase-inhibitor suppressed) isoform 1		4	3
	IPI00620806.3	Similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (Helix-destabilizing protein) (Single-strand binding protein) (hnRNP core protein A1) (HDP-1) (Topoisomerase-inhibitor suppressed) isoform 2		4	3
	IPI00468274.5	29 kDa protein		3	3
hnRNP A3 *	IPI00750059.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 3	2	9	8
	IPI00756768.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 4	2		
	IPI00675934.4	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 6	2		
	IPI00677959.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 5	2		
	IPI00678360.2	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 2	2	8	7
	IPI00752179.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 1	2	9	8
	IPI00677689.2	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 12	2	9	8
	IPI00757344.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 15	2		
	IPI00459722.2	Hnrpa3 protein	2	9	8
	IPI00664047.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 5	2	9	8
	IPI00757339.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 8	2		
	IPI00670732.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 4	2		
	IPI00663550.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 1	2	7	6
	IPI00754589.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 6	2		
	IPI00670004.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 5	2	9	8
	IPI00757273.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 6	2		
	IPI00753691.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 3	2		
	IPI00750428.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 13	2	9	
	IPI00754734.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 7	2		
	IPI00664791.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 3	2		
	IPI00668954.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 4	2		
	IPI00674712.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 1	2	9	8
	IPI00667787.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 16	2	9	
	IPI00675624.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 1	2		8
	IPI00749895.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 14	2		
	IPI00470076.5	32 kDa protein	2	9	8
	IPI00269662.1	Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	2	9	8
	IPI00757731.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 6	2		
	IPI00749630.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 4	2	9	8
	IPI00751134.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 2	2		
	IPI00623731.1	PREDICTED: similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 5	2	9	8
	IPI00269661.1	Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	2	9	8
	IPI00660502.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 2	2		
	IPI00670189.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 4	2		
	IPI00461800.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 1	2	8	7
	IPI00670681.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 7	2	8	7
	IPI00466185.3	33 kDa protein	2	9	8
	IPI00755861.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 7	2		
	IPI00659723.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 5	2	7	6
	IPI00750283.1	32 kDa protein		8	7
	IPI00849556.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3		8	7
	IPI00757273.2	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 6		7	6
	IPI00458033.5	17 kDa protein		5	5
	IPI00626666.3	24 kDa protein		5	5
	IPI00464170.6	21 kDa protein		4	3
	IPI00605872.3	25 kDa protein		3	2
	IPI00751584.2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3		2	2
	IPI00750428.2	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 13			8
hnRNP A / B	IPI00117288.3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B		8	9
	IPI00648228.3	Hnrpab protein		8	8
	IPI00277066.4	S1 protein C2		8	8

<b>hnRNP A2 / B1</b>	IPI00622847.2	Isoform 2 of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1		7	10	
	IPI00405058.6	Isoform 3 of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1		7	10	
	IPI00828488.1	Isoform 1 of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1		7	10	
	IPI00853914.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1		7	10	
<b>hnRNP D *</b>	IPI00330958.2	Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0		10	8	
	IPI00798477.1	30 kDa protein		10	8	
	IPI00336873.1	Isoform 3 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0		10	8	
	IPI00230086.2	Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0		8	6	
	IPI00336874.1	Isoform 4 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0		8	6	
	IPI00129417.1	JKTBP (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like)		2		
	IPI00755892.1	46 kDa protein		2		
<b>hnRNP H1 und hnRNP F</b>	IPI00224729.1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1	9	8	7	
	IPI00133916.2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1	9	8	7	
	IPI00226073.1	Ribonucleoprotein F	3			
	IPI00761708.1	44 kDa protein	3	5	5	
	IPI00798511.1	Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F		6	6	
	IPI00226073.2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F		6	6	
	IPI00621538.2	46 kDa protein		4	4	
<b>hnRNP H2</b>	IPI00108143.1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H'	11	6	3	
	IPI00378188.5	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	4			
<b>hnRNP L</b>	IPI00620362.3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	2		2	
	IPI00653643.2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	2		2	
<b>hnRNP M</b>	IPI00480357.5	Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	3			
	IPI00132443.3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	3	12	10	
	IPI00480357.6	Isoform 2 of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M		12	10	
<b>hnRNP R und hnRNP Q *</b>	IPI00128441.3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	8	11	14	
	IPI00135308.3	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R homolog (Fragment)	7	10	13	
	IPI00406117.1	Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	6	16	17	
	IPI00648869.1	30 kDa protein	6	6	10	
	IPI00406118.1	Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	6	16	17	
	IPI00136702.1	NS1-associated protein 1 isoform 1	5			
<b>hnRNP U *</b>	IPI00458583.2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U, full insert sequence	10			
	IPI00756515.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	2			
<b>hnRNP U-like</b>	IPI00123501.3	Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1	8	8	6	
	IPI00742433.1	Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1	8	8	6	
	IPI00269280.1	Isoform 3 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1	4	3	3	
		IPI00849047.1	Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2		5	
		IPI00222208.2	MLF1 associated nuclear protein		5	
		IPI00762321.1	20 kDa protein		3	

### b) Zipcode bindende Proteine (ZBPs)

<b>ZBP1 *</b>	IPI00131056.1	Coding region determinant binding protein	7	6	10
<b>ZBP2</b>	IPI00761863.1	Isoform 1 of Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2	3	3	3
	IPI00338748.3	Isoform 2 of Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2	2	2	3
	IPI00761700.1	Isoform 3 of Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2	2	2	2
<b>ZBP3 *</b>	IPI00331315.8	Insulin-like growth factor 2, binding protein 3	4	7	8

### c) Doppelstrang-RNA-bindende Proteine

<b>STAU1</b>	IPI00750382.1	54 kDa protein		15	2
	IPI00756688.1	Staufen		15	2
	IPI00749596.1	Staufen (RNA binding protein) homolog 1 (Drosophila)		14	2
	IPI00323319.3	Double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 1		14	2
	IPI00464391.1	Staufen		9	0
<b>STAU2</b>	IPI00404785.1	Isoform 5 of Double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 2			7
	IPI00273362.1	Isoform 4 of Double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 2			15
	IPI00649849.1	Isoform 3 of Double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 2			35
	IPI00621913.1	Isoform 2 of Double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 2			40
	IPI00407779.1	Isoform 1 of Double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 2			45
<b>Dicer1</b>	IPI00762585.1	Hypothetical protein		6	5
	IPI00227881.4	Endoribonuclease Dicer		6	5
<b>PACT *</b>	IPI00471256.2	Interferon-inducible double stranded RNA-dependent protein kinase activator A	5	2	
<b>ILF-2</b>	IPI00318550.5	Interleukin enhancer-binding factor 2		11	8
<b>ILF-3</b>	IPI00555078.1	Isoform 1 of Interleukin enhancer-binding factor 3	3	8	

	IPI00776384.1	Nuclear factor 90	3	8	
	IPI00130591.2	Isoform 3 of Interleukin enhancer-binding factor 3	3	8	
	IPI00403996.2	Isoform 2 of Interleukin enhancer-binding factor 3	3	8	
	IPI00475177.4	Isoform 2 of spermatid perinuclear RNA-binding protein		6	
	IPI00128254.2	Isoform 1 of spermatid perinuclear RNA-binding protein		6	
	IPI00762404.1	Spermatid perinuclear RNA binding protein		4	
<b>d) andere RNA-bindende Proteine</b>					
<b>Btz (CASC3, MLN51)</b>	IPI00322598.4	Cancer susceptibility candidate 3, full insert sequence	9		
<b>Poly(A) bindendes Protein 1 * und Poly(A)</b>	IPI00124287.1	Polyadenylate-binding protein 1	16	4	
	IPI00331552.3	Poly A binding protein, cytoplasmic 1	16	4	
	IPI00137145.1	Poly A binding protein, cytoplasmic 1	10	2	
	IPI00420950.3	Poly A binding protein, cytoplasmic 4 (inducible form)	7	3	
	IPI00666636.1	68 kDa protein	7	3	
	IPI00172364.1	Poly A binding protein, cytoplasmic 4	7	3	
	IPI00649252.1	71 kDa protein	7	3	
	IPI00648982.1	69 kDa protein	7	3	
	IPI00653624.1	Poly A binding protein, cytoplasmic 4	5	2	
	IPI00664935.1	Similar to poly(A) binding protein, cytoplasmic 4 isoform 1 isoform 2	4		
	IPI00672434.1	Similar to poly(A) binding protein, cytoplasmic 4 isoform 2 isoform 4	4		
	IPI00673758.1	Similar to poly(A) binding protein, cytoplasmic 4 isoform 2 isoform 3	4		
	IPI00667159.1	Similar to poly(A) binding protein, cytoplasmic 4 isoform 1 isoform 2	4		
	IPI00271915.2	Similar to poly(A) binding protein, cytoplasmic 4 isoform 1 isoform 1	4		
	IPI00666151.1	Similar to poly(A) binding protein, cytoplasmic 4 isoform 1 isoform 4	4		
	IPI00461269.3	Similar to poly(A) binding protein, cytoplasmic 4 isoform 1 isoform 1	4		
	IPI00675647.1	Similar to poly(A) binding protein, cytoplasmic 4 isoform 2 isoform 2	4		
	IPI00120954.1	Poly A binding protein, cytoplasmic 2	4	3	
	IPI00677210.1	Similar to poly(A) binding protein, cytoplasmic 4 isoform 1 isoform 5	4		
	IPI00661503.1	Similar to poly(A) binding protein, cytoplasmic 4 isoform 1 isoform 3	4		
	IPI00751451.1	Similar to poly(A) binding protein, cytoplasmic 4 isoform 2	2		
	IPI00752962.1	Similar to Polyadenylate-binding protein 1	2		
	IPI00756383.1	Similar to Polyadenylate-binding protein 1	2		
	IPI00226644.1	Poly A binding protein, cytoplasmic 5	2		
	IPI00678527.3	Similar to Polyadenylate-binding protein 1	2		
<b>FXR2</b>	IPI00126389.2	Fragile X mental retardation, autosomal homolog 2	2		
	IPI00652944.1	Fragile X mental retardation gene 2, autosomal homolog	2		
	IPI00675666.1	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 2	2		
<b>NPM1</b>	IPI00127415.1	Nucleophosmin	4	3	3
	IPI00648014.1	nucleophosmin 1	4	2	2
	IPI00649841.1	Nucleophosmin 1	4	2	2
	IPI00515155.1	Nucleophosmin 1	4	3	2
	IPI00468717.6	Similar to Nucleophosmin (NPM) (Nucleolar phosphoprotein B23) (Numatrin) (Nucleolar protein NO38) isoform 1	4	2	2
	IPI00849626.1	Similar to Nucleophosmin		3	3
	IPI00130905.5	25 kDa protein		2	2
<b>THOC4</b>	IPI00122339.3	Isoform 2 of THO complex subunit 4		2	
	IPI00114407.2	THO complex 4 (Aly / Ref)		2	
	IPI00377350.1	Isoform 2 of RNA and export factor-binding protein 2		2	
<b>RNPS1</b>	IPI00751568.3	Isoform 1 of S1 RNA-binding domain-containing protein 1			2
<b>PURA</b>	IPI00118447.1	Transcriptional activator protein Pur-alpha		5	2
	IPI00757181.1	Similar to Transcriptional activator protein Pur-alpha (Purine-rich single-stranded DNA-binding protein alpha) isoform 2		5	2
	IPI00751607.1	Similar to Transcriptional activator protein Pur-alpha (Purine-rich single-stranded DNA-binding protein alpha) isoform 1		5	2
<b>PURB</b>	IPI00128867.3	Transcriptional activator protein Pur-beta		3	3
<b>YB-1</b>	IPI00647981.2	Similar to nuclease sensitive element binding protein 1	6		
	IPI00120886.2	Nuclease sensitive element-binding protein 1 (YB-1)	6		
<b>PAI-RBP1</b>	IPI00471477.1	Isoform 3 of Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	3	8	6
	IPI00471475.1	Isoform 1 of Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	3	8	6
	IPI00471476.1	Isoform 2 of Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	3	8	6
	IPI00471478.1	Isoform 4 of Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	2	6	5
<b>SSA und SSB</b>	IPI00134300.1	Lupus La protein homolog		9	10
	IPI00473603.1	Sjogren syndrome antigen B		7	7
	IPI00758127.2	Sjogren syndrome antigen B		5	4
	IPI00116360.3	60 kDa SS-A/Ro ribonucleoprotein		2	2
<b>LARP1</b>	IPI00344088.5	La related protein	4		
	IPI00670545.2	Similar to la related protein isoform 1	4		
	IPI00649353.1	Isoform 2 of La-related protein 1	2		

<b>LARP7</b>	IPI00340860.4	La ribonucleoprotein domain family, member 7	5		
	IPI00666363.2	Similar to multi sex combs CG12058-PA	2		
	IPI00670177.1	Larp7 protein	2		
	IPI00280366.1	20 kDa protein	2		
	IPI00620570.3	24 kDa protein	2		
	IPI00750062.1	Similar to multi sex combs CG12058-PA	2		
<b>RBM4 und RBM4B</b>	IPI00309195.2	Isoform 1 of RNA-binding protein 4		8	6
	IPI00177224.1	RNA-binding protein 4B		8	6
	IPI00403780.1	Isoform 2 of RNA-binding protein 4		5	4
	IPI00127509.1	Neosin (Fragment)		4	3
<b>RBMX</b>	IPI00474144.1	42 kDa protein		4	4
	IPI00124979.2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G		4	4
	IPI00775821.1	33 kDa protein		4	4
	IPI00604873.2	Similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G		4	4
	IPI00663587.1	RNA binding motif protein, X chromosome retrogene		4	4
	IPI00775899.1	11 kDa protein		3	3
	IPI00130885.1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G		2	2
<b>MSI1</b>	IPI00121300.1	Isoform 1 of RNA-binding protein Musashi homolog 1		4	2
	IPI00462260.1	Isoform 2 of RNA-binding protein Musashi homolog 1		4	2
	IPI00750364.1	Protein		3	2
	IPI00849678.1	Similar to RNA-binding protein		3	2
<b>MSI2</b>	IPI00120924.1	Isoform 1 of RNA-binding protein Musashi homolog 2		3	2
	IPI00462900.1	Isoform 3 of RNA-binding protein Musashi homolog 2		3	2
	IPI00462899.1	Isoform 2 of RNA-binding protein Musashi homolog 2		3	2
	IPI00648031.1	Musashi homolog 2 (Drosophila)		2	
	IPI00656163.1	Msi2h protein		2	
<b>NCBP80</b>	IPI00458056.3	Nuclear cap-binding protein subunit 1	7		
	IPI00759985.1	80 kDa nuclear cap binding protein (NCBP 80 kDa subunit) (CBP80) homolog	2		
<b>MYEF2</b>	IPI00154084.2	Isoform 2 of Myelin expression factor 2	4	9	8
	IPI00226891.1	Isoform 1 of Myelin expression factor 2	4	9	8
	IPI00654425.1	Myelin basic protein expression factor 2, repressor	4		
	IPI00556709.1	Isoform 4 of Myelin expression factor 2	3	7	7
	IPI00556805.1	Isoform 3 of Myelin expression factor 2	3	6	7
	IPI00752119.1	58 kDa protein	3		
	IPI00404685.4	47 kDa protein	3		
	IPI00404685.5	Similar to Myef2 protein		7	7
<b>CIRBP</b>	IPI00121073.1	Cold-inducible RNA-binding protein		3	4
	IPI00830486.1	12 kDa protein		2	3
<b>CSDE1</b>	IPI00274747.6	Cold shock domain-containing protein E1, RNA binding		6	
	IPI00338717.3	MKIAA0885 protein (Fragment)		6	
<b>TARDBP</b>	IPI00121758.1	TAR DNA-binding protein 43		3	3
	IPI00459625.1	TAR DNA binding protein isoform 4		2	2
	IPI00515147.1	TAR DNA binding protein isoform 2		2	2
	IPI00280967.3	TAR DNA binding protein isoform 3		2	2
	IPI00515174.1	TAR DNA binding protein isoform 5		2	2
	IPI00807899.1	Tardbp protein		2	2
<b>RBM3</b>	IPI00130883.1	Putative RNA-binding protein 3		2	
<b>RBM39</b>	IPI00223371.2	RNA-binding region containing protein 2		4	3
	IPI00127763.3	Isoform 1 of RNA-binding protein 39		4	3
	IPI00223372.1	Isoform 3 of RNA-binding protein 39		4	3
<b>RBM9</b>	IPI00153974.1	ataxin 2 binding protein 1 isoform alpha		2	
	IPI00153656.1	RNA binding motif protein 9		2	
	IPI00607041.1	Ataxin-2 binding protein 1 variant 4		2	
	IPI00331207.5	Fxh variant 2 (Fragment)		2	
	IPI00223425.1	8 days embryo whole body cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:5730462H23 product:fox-1 homolog (C. elegans), full insert sequence		2	
	IPI00475068.2	Ataxin 2 binding protein 1 isoform gamma		2	
	IPI00121045.1	Ataxin-2-binding protein 1		2	
	IPI00606138.1	Ataxin-2 binding protein 1 variant 3 (Fragment)		2	
<b>Poly(rC)BP1</b>	IPI00128904.1	Poly(rC)-binding protein 1		3	
<b>ZFR</b>	IPI00131810.1	Zinc finger RNA binding protein		5	3

**e) RNA-Helikasen**

<b>UPF (RENT1) *</b>	IPI00420949.2	Regulator of nonsense transcripts 1, full insert sequence (Upf1)	4		
	IPI00850525.1	Isoform 2 of regulator of nonsense transcripts 1		5	10
	IPI00420949.3	Isoform 1 of regulator of nonsense transcripts 1		5	10
<b>eIF4A3</b>	IPI00126716.3	Eukaryotic initiation factor 4A-III (DDX48)	4		
	IPI00407909.1	Similar to Probable ATP-dependent RNA helicase DDX48	4		
	IPI00127479.4	Similar to Probable ATP-dependent RNA helicase DDX48	4		
	IPI00750063.1	Similar to Probable ATP-dependent RNA helicase DDX48	4		
	IPI00458502.2	Similar to Probable ATP-dependent RNA helicase DDX48	4		
	IPI00648352.1	34 kDa protein	3		
	IPI00758278.1	Similar to Probable ATP-dependent RNA helicase DDX48	2		
	IPI00400432.2	Similar to Probable ATP-dependent RNA helicase DDX48	2		

eIF4A1	IPI00118676.3	Eukaryotic initiation factor 4A-I	2		
eIF4A2	IPI00409918.1	Isoform 2 of Eukaryotic initiation factor 4A-II	2		
	IPI00761992.1	46 kDa protein	2		
<b>DDX1</b>	IPI00127172.3	ATP-dependent RNA helicase DDX1	7		3
<b>DDX5, DDX3 und DDX17</b>	IPI00420363.2	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	22	14	10
	IPI00230035.6	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	16		
	IPI00753112.1	69 kDa protein	18	11	8
	IPI00648528.1	46 kDa protein	16		2
	IPI00133708.1	Putative ATP-dependent RNA helicase P110	13	4	2
	IPI00752873.1	Similar to DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, Y-linked	13		
	IPI00405364.2	Isoform 2 of Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17	10	8	3
	IPI00396797.2	Isoform 1 of Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17	12	10	6
	IPI00653307.1	DEAD box polypeptide 17 isoform 1	12	10	6
	IPI00134371.1	ATP-dependent RNA helicase DDX3Y	12	3	2
	IPI00648763.1	20 kDa protein	5	2	3
	IPI00649370.1	10 kDa protein	4		2
	IPI00649028.1	P68 RNA helicase (Fragment)	4		
	IPI00649028.2	DEAD (asp-glu-ala-asp) box polypeptide 5			2
	IPI00649260.1	14 kDa protein	3		
	IPI00649129.1	8 kDa protein	2		
	IPI00170041.2	DEAD box polypeptide 17 isoform 3	2	2	3
	IPI00230035.7	ATP-dependent RNA helicase DDX3X		4	2
<b>DDX41</b>	IPI00127071.3	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX41	5		
<b>DDX6</b>	IPI00311827.1	DEAD (aspartate-glutamate-alanine- aspartate) box polypeptide 6	2		
	IPI00109932.1	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6 (Rck)	2		
<b>DHX15</b>	IPI00775838.1	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 15 isoform 1	5	3	
	IPI00128818.2	Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15	5	3	
<b>DHX30</b>	IPI00270064.2	Isoform 1 of Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30	14	10	17
	IPI00127902.2	Isoform 3 of Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30	14	10	17
	IPI00761204.1	Isoform 2 of Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30	14	10	17
	IPI00403301.5	MKIAA0890 protein (Fragment)	10	7	13
<b>DHX36</b>	IPI00351266.2	Probable ATP-dependent RNA helicase DHX36	3	4	4
<b>DDX21</b>	IPI00652987.3	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 21	5	7	
	IPI00120691.3	Nucleolar RNA helicase 2	5	7	
<b>DDX9 *</b>	IPI00607980.1	Isoform 2 of ATP-dependent RNA helicase A	4	8	5
	IPI00339468.3	Isoform 1 of ATP-dependent RNA helicase A	4	8	5
	IPI00607914.1	Isoform 3 of ATP-dependent RNA helicase A	3	7	5
<b>DHX57</b>	IPI00453609.1	Isoform 1 of Putative ATP-dependent RNA helicase DHX57		7	6
	IPI00420351.4	Isoform 2 of Putative ATP-dependent RNA helicase DHX57		7	6
	IPI00755243.1	Isoform 3 of Putative ATP-dependent RNA helicase DHX57		5	3
	IPI00753147.1	Isoform 4 of Putative ATP-dependent RNA helicase DHX57		2	3
	IPI00752611.1	Isoform 5 of Putative ATP-dependent RNA helicase DHX57		2	3

#### f) Translationsinitiationsfaktoren

<b>eIF3s10</b>	IPI00762107.1	162 kDa protein	5		
	IPI00129276.1	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 10	5	5	
<b>eIF3s8</b>	IPI00321647.2	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 8	2	4	4
	IPI00752459.1	Similar to eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 8	2		
	IPI00849863.1	Similar to eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 8		3	2
<b>eIF6</b>	IPI00115862.1	Eukaryotic translation initiation factor 6		4	

#### g) Splicingfaktoren und nukleäre Proteine

<b>SFRS1</b>	IPI00420807.3	Splicing factor, arginine/serine-rich 1 isoform 1	4	5	6
	IPI00515505.2	Isoform 3 of Splicing factor, arginine/serine-rich 1	3	5	
	IPI00457656.2	Isoform 2 of Splicing factor, arginine/serine-rich 1	3	5	
	IPI00457656.3	Splicing factor, arginine/serine-rich 1 isoform 2			5
	IPI00515505.3	Isoform 3 of splicing factor, arginine/serine-rich 1			5
<b>SFRS3</b>	IPI00649438.1	PREDICTED: similar to Splicing factor, arginine/serine-rich 3		2	
	IPI00129323.1	Isoform Long of Splicing factor, arginine/serine-rich 3		2	
	IPI00221826.1	Isoform Short of Splicing factor, arginine/serine-rich 3		2	
	IPI00474970.2	Similar to Splicing factor, arginine/serine-rich 3		2	
<b>SFRS9</b>	IPI00132340.1	Splicing factor, arginine/serine-rich 9	2		
<b>SFPQ</b>	IPI00129430.1	Splicing factor, proline- and glutamine-rich		13	6
	IPI00849080.1	Similar to PTB-associated splicing factor		12	5
	IPI00320016.7	Isoform 1 of Non-POU domain-containing octamer-binding protein		8	4
	IPI00471251.3	Isoform 2 of Non-POU domain-containing octamer-binding protein		2	
<b>SF3B</b>	IPI00623284.3	Splicing factor 3B subunit 1		5	
	IPI00349401.3	splicing factor 3b, subunit 2		3	
	IPI00122011.2	Isoform 1 of splicing factor 3b subunit 3		2	2
	IPI00625759.2	Isoform 2 of splicing factor 3b subunit 3		2	2
	IPI00117687.1	Pre-mRNA branch site protein p14 /Splicing factor 3B 14 kDa subunit			2

<b>SNRP70</b>	IPI00625105.2	Isoform 1 of U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa		4	
	IPI00408577.1	Snrp70 protein (Fragment)		3	
	IPI00230541.3	Isoform 2 of U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa		3	
<b>CPSF6</b>	IPI00421085.1	Cleavage and polyadenylation specificity factor 6	3		
	IPI00754832.1	Similar to cleavage and polyadenylation specific factor 6	3		
<b>NHP2L1</b>	IPI00621272.3	Nhp2-like protein 1		3	
	IPI00670422.2	hypothetical protein isoform 2		3	
	IPI00671010.1	Similar to Nhp2 non-histone chromosome protein 2-like 1		3	
<b>Nop56</b>	IPI00318048.5	Nucleolar protein Nop56 (Nol5A)	3	7	6
	IPI00758218.1	33 kDa protein	2		
	IPI00758218.3	Nucleolar protein 5A		2	
<b>No11</b>	IPI00311453.4	Nucleolar protein 1		3	
<b>No15</b>	IPI00463468.3	Nucleolar protein 5	4	4	6
<b>NCL</b>	IPI00317794.4	Nucleolin	5		
<b>similar to FBL</b>	IPI00848611.1	Similar to fibrillar isoform 2		4	
	IPI00119581.2	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillar		4	
	IPI00473920.1	PREDICTED: similar to fibrillar		4	
<b>small nuclear RNPs:</b>	IPI00117371.5	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide F	2		
	IPI00379355.4	Similar to Small nuclear ribonucleoprotein F	2		
	IPI00749759.1	Similar to Small nuclear ribonucleoprotein F	2		
	IPI00666526.2	Similar to Small nuclear ribonucleoprotein F	2		
	IPI00322749.3	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1		2	
	IPI00119220.1	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2		5	5
	IPI00116535.1	13 kDa protein		3	3
	IPI00125265.1	Similar to small nuclear ribonucleoprotein D2		3	3
	IPI00605628.1	Similar to small nuclear ribonucleoprotein D2		3	3
	IPI00660581.1	Similar to small nuclear ribonucleoprotein D2		3	3
	IPI00119224.1	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3			2
	IPI00230150.1	Small nuclear ribonucleoprotein G		2	
	IPI00128699.3	Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein N *			2
	IPI00114052.1	Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein B *			2
<b>IPO4</b>	IPI00128880.3	Importin-4	3		
<b>IPOB</b>	IPI00742334.1	Karyopherin (importin) beta 1		6	
	IPI00323881.1	Importin beta-1 subunit		6	
<b>TPR</b>	IPI00177059.4	Nuclear pore complex-associated intranuclear coiled-coil protein TPR		2	
<b>BTF3</b>	IPI00131186.2	Isoform 2 of Transcription factor BTF3 Bicoid homolog		2	

## II. Kinasen / Phosphatasen / Transferasen

<b>CSNK2</b>	IPI00126762.1	Casein kinase II subunit beta	2		
	IPI00408176.2	Casein kinase II alpha subunit	5	2	
	IPI00120162.1	Casein kinase II subunit alpha	5	2	
	IPI00118795.1	Casein kinase II subunit alpha'	3		
	IPI00753421.1	Similar to Casein kinase II subunit alpha	3		
	IPI00750022.1	16 kDa protein	2		
<b>SRPK1</b>	IPI00387234.2	Serine/threonine-protein kinase SRPK1	2		
<b>SRPK2</b>	IPI00751009.1	serine/arginine-rich protein specific kinase 2		2	
<b>KALRN und TRIO</b>	IPI00605176.3	Similar to triple functional domain (PTPRF interacting) isoform 5	17		
	IPI00604947.4	Triple functional domain (PTPRF interacting) isoform 1	17		
	IPI00672146.2	PREDICTED: similar to triple functional domain (PTPRF interacting) isoform 5	17		
	IPI00753248.1	Similar to kalirin, RhoGEF kinase	9		
	IPI00776346.1	Protein	9		
	IPI00776383.1	219 kDa protein	9		
	IPI00673239.3	Kalirin, RhoGEF kinase isoform 10 (Serine/threonine-protein kinase Duet)	9		
	IPI00750942.1	Similar to kalirin, RhoGEF kinase	9		
	IPI00620349.3	Kalirin, RhoGEF kinase isoform 3	9		
	IPI00776083.1	162 kDa protein	8		
	IPI00776209.1	117 kDa protein	7		
	IPI00762436.2	96 kDa protein	7		
	IPI00653391.3	Visual cortex cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:K230010A12 product:Delta kalirin-7 homolog	7		
	IPI00753510.1	Similar to triple functional domain	5		
IPI00604856.2	Kalirin, RhoGEF kinase isoform 2	4			
IPI00669152.1	Kalirin, RhoGEF kinase isoform 6	3			
<b>NAT10</b>	IPI00276866.1	N-acetyltransferase 10			2
<b>PP1</b>	IPI00311873.5	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit		12	
	IPI00130185.1	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit		11	
	IPI00227773.1	Isoform Gamma-2 of Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit		10	
	IPI00123862.1	Isoform Gamma-1 of Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit		10	
	IPI00752131.1	Similar to protein phosphatase 1, catalytic subunit, gamma isoform 9		6	

### III. Motorproteine und Cytoskelett-assoziierte Proteine

<b>UE des Kinesin-2</b>					
<b>Motorproteinkomplexe:</b>					
<b>KIF3A</b>	IPI00312076.3	Kinesin-like protein KIF3A	4		
	IPI00408582.1	Kinesin family member 3A	4		
<b>KIF3C</b>	IPI00720123.1	kinesin family member 3C	6		
	IPI00126443.1	Kinesin-like protein KIF3C	6		
<b>KIF3B</b>	IPI00465809.2	Kinesin-like protein KIF3B	2		
<b>KAP3</b>	IPI00230068.1	Isoform KAP3B of Kinesin-associated protein 3	4		
	IPI00320484.4	Isoform KAP3A of Kinesin-associated protein 3	4		
<b>DCTN1</b>	IPI00115663.1	Dynactin-1	3		
<b>SPTAN1</b>	IPI00757353.2	spectrin alpha 2	3	2	
	IPI00753793.2	Isoform 2 of Spectrin alpha chain, brain	3	2	
	IPI00753815.2	Isoform 1 of Spectrin alpha chain, brain	3	2	
	IPI00798592.1	Spectrin alpha 2	3	2	
<b>FLNA</b>	IPI00131138.10	Isoform 1 of filamin -A	4	2	
	IPI00664643.2	Filamin alpha	4	2	
<b>MAP1B</b>	IPI00130920.1	Microtubule-associated protein 1B	11		
<b>STMN1</b>	IPI00551236.2	Stathmin	3		
	IPI00649157.1	17 kDa protein	2		
	IPI00648723.1	12 kDa protein	2		
	IPI00475138.1	Novel protein similar to stathmin 1 Stmn1	2		
<b>GNB2L1 *</b>	IPI00317740.4	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta 2-like 1	6		
	IPI00648477.1	Guanine nucleotide binding protein, beta 2, related sequence 1	2		
<b>DPYSL3 *</b>	IPI00122349.1	Dihydropyrimidinase-related protein 3	2		
<b>PTN</b>	IPI00125215.1	Pleiotrophin precursor (heparin binding growth factor 8, neurite growth-promoting factor 1)	4		
<b>MK</b>	IPI00403788.1	midkine	3		
	IPI00114392.1	Midkine precursor (neurite growth-promoting factor 2)	3		
	IPI00720242.1	Embryonic-specific truncated midkine B	2		
<b>14-3-3 Proteine</b>	IPI00656269.1	Isoform 2 of 14-3-3 protein theta	3	3	2
	IPI00754545.1	34 kDa protein	3		2
	IPI00116498.1	14-3-3 protein zeta/delta	3	3	3
	IPI00408378.4	Isoform 1 of 14-3-3 protein theta	3	3	2
	IPI00760000.1	Isoform Short of 14-3-3 protein beta/alpha	2		
	IPI00761361.1	17 kDa protein	2	3	2
	IPI00230682.6	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide	2		
	IPI00118384.1	14-3-3 protein epsilon		4	4
	IPI00230707.6	14-3-3 protein gamma		3	3
	IPI00853924.1	34 kDa protein		3	2
	IPI00754545.2	Similar to YWHAQ protein		3	
	IPI00853851.1	Similar to 14-3-3 zeta		2	2
	IPI00828266.2	Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide		2	2
	IPI00227392.5	14-3-3 protein eta			2

### IV. Proteine, die nicht in die oben genannten Gruppen fallen

#### a) Regulierung der Transkription

<b>MECP2</b>	IPI00775806.2	Isoform B of Methyl-CpG-binding protein 2		3	
	IPI00131063.4	Isoform A of Methyl-CpG-binding protein 2		3	
<b>ZFR9</b>	IPI00137229.1	Isoform 2 of Cellular nucleic acid-binding protein (Zinc finger protein 9)		4	3
	IPI00454151.1	Isoform 3 of Cellular nucleic acid-binding protein		4	3
	IPI00330767.1	Isoform 1 of Cellular nucleic acid-binding protein		3	2
<b>ZFR22</b>	IPI00124708.1	Zinc finger protein 22		5	
	IPI00626057.1	17 kDa protein		2	
<b>ZFR512</b>	IPI00222382.4	NOD-derived CD11c +ve dendritic cells cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:F630111F22 product:zinc finger protein 512, full insert sequence	2		
<b>MATR3</b>	IPI00453826.2	Matrin-3		2	4
<b>TRIM41</b>	IPI00123806.4	Tripartite motif-containing 41	3		
	IPI00648704.2	Similar to tripartite motif-containing 41 isoform 1 isoform 2	3		
	IPI00551187.1	Tripartite motif-containing 41	2		
<b>TRIM28</b>	IPI00312128.3	Tripartite motif protein 28	2		
<b>MYBBP1A</b>	IPI00331361.2	Myb-binding protein 1A	3	8	2
	IPI00652799.1	5 days embryo whole body cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:IOC0003A04 product:MYB binding protein (P160) 1a, full insert sequence		2	
<b>NAP1L1</b>	IPI00133977.3	Bone marrow stroma cell CRL-2028 SR-4987 cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:G430136P17 product:nucleosome assembly protein 1-like 4, full insert sequence	6		
	IPI00123199.1	Nucleosome assembly protein 1-like 1	6		
<b>CHD3</b>	IPI00675483.2	Chromodomain helicase DNA binding protein 3		3	2
	IPI00551435.3	Chromodomain helicase DNA binding protein 3		3	2

<b>SMARCC2</b>	IPI00459742.2	Isoform 1 of SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily C member 2	3	
	IPI00381019.1	Isoform 2 of SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily C member 2	3	
	IPI00651846.1	Hypothetical protein (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 2) homolog	3	
	IPI00752367.2	123 kDa protein	2	
	IPI00830298.1	107 kDa protein	2	
	IPI00830923.1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily C, member 1	2	
	<b>SMARCC1</b>	IPI00125662.2	Isoform 1 of SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily C member 1	2
IPI00515361.1		Isoform 2 of SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily C member 1	2	
<b>SMARCA4</b>	IPI00654251.1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4	2	
	IPI00761335.1	182 kDa protein	2	
	IPI00460668.2	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4	2	

### b) Chaperone

<b>TCP1 *</b>	IPI00116283.1	T-complex protein 1 subunit gamma	2		
	IPI00118678.1	T-complex protein 1 subunit alpha A	3		
	IPI00459493.4	T-complex protein 1 subunit alpha B	3		
	IPI00116277.3	T-complex protein 1 subunit delta		3	
	IPI00116281.3	T-complex protein 1 subunit zeta		2	
	IPI00469268.5	T-complex protein 1 subunit theta		3	
	IPI00320217.9	T-complex protein 1 subunit beta		3	4
	IPI00653274.1	Brain cDNA, clone MNCb-1272, similar to Mus musculus chaperonin subunit 2 (beta) (Cct2), mRNA		2	2

### c) wenig charakterisierte Proteine

<b>HSPC117</b>	IPI00116850.2	Activated spleen cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:F830101M02 product:HSPC117 homolog	10	
<b>KHDRBS1</b>	IPI00458765.2	KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1	4	
<b>GRWD1</b>	IPI00123005.2	Glutamate-rich WD repeat-containing protein 1		2
	IPI00762808.1	SIMILAR TO GLUTAMATE RICH WD REPEAT PROTEIN GRWD		2
<b>TRIP12</b>	IPI00623570.3	Thyroid hormone receptor interactor 12		3
	IPI00277519.1	Trip12 protein		2
<b>similar to CG31855-PA</b>	IPI00381086.1	Similar to CG31855-PA	2	
<b>RIKEN cDNA B930007L02 gene</b>	IPI00420227.2	RIKEN cDNA B930007L02 gene	6	
	IPI00653483.1	Hypothetical Lissencephaly type-1-like homology motif/Proline-rich region profile/LIS1 homology (LisH) motif profile/ARM repeat fold containing protein	3	
<b>KIAA0690</b>	IPI00420344.1	Protein KIAA0690	2	2
<b>KIAA1967</b>	IPI00123624.8	Protein KIAA1967 homolog		3
<b>Protein FAM98</b>	IPI00457756.2	Protein FAM98A	2	
	IPI00465946.1	Protein FAM98B		2
<b>Protein C22orf28 homolog</b>	IPI00116850.3	UPF0027 protein C22orf28 homolog		9
<b>LOC72640</b>	IPI00356269.4	Hypothetical protein LOC72640		2
	IPI00761886.1	28 kDa protein	2	3
<b>Protein C14orf166 homolog</b>	IPI00132456.1	Protein C14orf166 homolog	2	4
	IPI00221414.1	Hypothetical Trp-Asp	3	
<b>LOC289641</b>	IPI00677591.1	Similar to CG17293-PA isoform 6	2	
	IPI00403589.1	Enhancer of rudimentary homolog	2	
<b>ERH</b>	IPI00761683.1	12 kDa protein	2	

### V. Ribosomale Proteine

#### a) Proteine der kleinen ribosomalen Untereinheit

<b>S2</b>	IPI00606379.2	Similar to 40S ribosomal protein S2 isoform 1		5
	IPI00134607.6	Hypothetical protein		5
	IPI00318492.10	40S ribosomal protein S2		5
	IPI00604967.3	Similar to 40S ribosomal protein S2		5
	IPI00606508.1	Similar to 40S ribosomal protein S2 isoform 1		5
	IPI00458629.2	Similar to 40S ribosomal protein S2 isoform 1		4
	IPI00380130.2	Ribosomal protein S2		4
	IPI00752723.1	Similar to 40S ribosomal protein S2 isoform 2		4
	IPI00378671.3	Similar to 40S ribosomal protein S2		3
	IPI00466145.3	26 kDa protein		3
	IPI00749556.1	25 kDa protein		3
	IPI00605141.2	similar to 40S ribosomal protein S2 isoform 1		3
	IPI00625569.3	27 kDa protein		2
				2

	IPI00665910.2	Similar to ribosomal protein S2 isoform 2		2	2
	IPI00463285.3	14 kDa protein		2	2
	IPI00621927.3	22 kDa protein		2	
	IPI00761576.1	24 kDa protein		2	2
	IPI00658614.1	Similar to 40S ribosomal protein S2 isoform 3		2	
	IPI00621568.3	26 kDa protein		2	
	IPI00621639.4	24 kDa protein			2
	IPI00849155.1	Similar to HCG2016250			2
	IPI00318492.10	40S ribosomal protein S2			3
	IPI00605141.2	Similar to 40S ribosomal protein S2 isoform 1			3
	IPI00752723.1	Similar to 40S ribosomal protein S2 isoform 2			3
	IPI00621568.3	26 kDa protein			3
	IPI00606379.2	Similar to 40S ribosomal protein S2 isoform 1			4
	IPI00604967.3	Similar to 40S ribosomal protein S2			4
	IPI00380130.2	ribosomal protein S2			4
	IPI00606508.1	Similar to 40S ribosomal protein S2 isoform 1			4
<b>S3</b>	IPI00134599.1	40S ribosomal protein S3	8		
<b>S3a</b>	IPI00679159.2	Similar to 40S ribosomal protein S3a	3		
	IPI00331345.4	40S ribosomal protein S3a	3		
	IPI00473521.1	30 kDa protein	3		
<b>S4</b>	IPI00331092.6	40S ribosomal protein S4, X isoform	9		
	IPI00662162.1	Similar to 40S ribosomal protein S4, X isoform isoform 1	6		
	IPI00471047.1	RIKEN cDNA 1110033J19 gene	6		
	IPI00752798.2	Similar to 40S ribosomal protein S4, X isoform isoform 1	6	7	5
	IPI00339573.8	27 kDa protein	3	2	
	IPI00331092.7	40S ribosomal protein S4, X isoform		9	6
	IPI00471047.2	Ribosomal protein S4, Y-linked 2		6	3
	IPI00339573.8	27 kDa protein		2	
<b>S5</b>	IPI00125521.3	40S ribosomal protein S5		3	2
<b>S6</b>	IPI00671512.2	Similar to 40S ribosomal protein S6		4	4
	IPI00761509.1	28 kDa protein		4	4
	IPI00474622.1	Similar to 40S ribosomal protein S6 isoform 1		4	4
	IPI00113655.1	40S ribosomal protein S6		4	4
	IPI00480225.1	PREDICTED: similar to 40S ribosomal protein S6 isoform 1		4	4
	IPI00108454.1	Similar to 40S ribosomal protein S6		3	4
	IPI00672455.1	Similar to 40S ribosomal protein S6 isoform 1		3	3
<b>S7</b>	IPI00850934.1	Similar to ribosomal protein S7			2
	IPI00666161.1	Similar to 40S ribosomal protein S7 (S8) isoform 1			2
	IPI00136984.1	40S ribosomal protein S7			2
<b>S8</b>	IPI00756959.1	Similar to ribosomal protein S8	3		
	IPI00756488.1	Similar to ribosomal protein S8	3		
	IPI00466820.3	40S ribosomal protein S8	3	5	
	IPI00621229.1	Similar to ribosomal protein S8 isoform 1	3	5	3
	IPI00475203.1	Ribosomal protein S8	3	5	3
	IPI00274175.1	Similar to ribosomal protein S8 isoform 1	2	3	2
	IPI00671398.1	Similar to ribosomal protein S8 isoform 1	2	4	3
	IPI00627028.3	22 kDa protein	2		2
	IPI00849948.1	Similar to ribosomal protein S8		5	3
	IPI00466820.4	40S ribosomal protein S8			3
	IPI00849417.1	Similar to HCG1994130		2	2
<b>S9</b>	IPI00420726.2	40S ribosomal protein S9	5		
	IPI00420726.3	40 S ribosomal protein S9		8	
<b>S10</b>	IPI00112448.1	40S ribosomal protein S10		5	3
	IPI00762525.1	18 kDa protein		4	2
	IPI00830211.1	Ribosomal protein S10		4	2
<b>S11</b>	IPI00117569.3	Ribosomal protein S11		4	
	IPI00625021.1	18 kDa protein		3	
	IPI00762542.1	18 kDa protein		2	
<b>S12</b>	IPI00757455.1	Similar to ribosomal protein S12	2		
	IPI00554850.1	40S ribosomal protein S12	2		
	IPI00225634.6	Ribosomal protein S12	2	3	4
	IPI00473415.1	Similar to ribosomal protein S12	2	3	4
	IPI00554850.2	40S ribosomal protein S12		2	3
	IPI00116908.1	Similar to ribosomal protein S12		2	3
	IPI00405659.1	Similar to ribosomal protein S12		2	3
	IPI00463052.1	Similar to ribosomal protein S12		2	3
	IPI00463049.1	Similar to ribosomal protein S12 isoform 2		2	3
	IPI00120475.1	Similar to 40S ribosomal protein S12			2
<b>S13</b>	IPI00125901.4	40S ribosomal protein S13	3	5	4
	IPI00751092.1	Similar to ribosomal protein S13	3	5	4
	IPI00673997.1	Similar to ribosomal protein S13	2		
<b>S14</b>	IPI00322562.4	40S ribosomal protein S14	3		
	IPI00112407.3	Similar to ribosomal protein S14	2		
	IPI00663582.1	Similar to ribosomal protein S14 isoform 1	2		
<b>S15</b>	IPI00850964.1	Similar to insulinoma protein (rig) isoform 1		2	
	IPI00319231.4	40S ribosomal protein S15		2	

	IPI00831483.1	ribosomal protein S15		2	
	IPI00755989.2	Similar to 40S ribosomal protein S15		2	
<b>S15a</b>	IPI00230660.4	40S ribosomal protein S15a	2		
	IPI00462491.4	Similar to ribosomal protein S15a	2		
	IPI00756107.1	Similar to ribosomal protein S15a	2		
	IPI00749889.1	Similar to ribosomal protein S15a	2		2
	IPI00113394.5	Similar to ribosomal protein S15a		2	3
	IPI00230660.5	40S ribosomal protein S15a		2	3
	IPI00849692.1	Similar to HCG1994130			2
<b>S16</b>	IPI00469918.4	Rps16 protein	3	4	3
	IPI00755046.1	18 kDa protein	3	4	3
	IPI00463248.6	15 kDa protein	2	2	
	IPI00850220.1	Similar to Rps16 protein		3	2
	IPI00463248.6	15 kDa protein		2	
<b>S17</b>	IPI00465880.4	40S ribosomal protein S17		5	7
	IPI00755495.2	Similar to 40S ribosomal protein S17		3	5
	IPI00848900.1	Similar to 40S ribosomal protein S17		3	5
	IPI00622165.2	Similar to 40S ribosomal protein S17		2	4
	IPI00277965.3	Similar to 40S ribosomal protein S17		2	2
<b>S18</b>	IPI00474174.1	OTTMUSP0000000606	3	9	5
	IPI00317590.5	40S ribosomal protein S18	3	9	5
	IPI00620156.1	18 kDa protein	3	9	5
	IPI00275455.2	17 kDa protein	2	7	4
	IPI00268802.1	18 kDa protein	2	6	3
	IPI00851049.1	Similar to ribosomal protein		9	5
	IPI00381655.4	Similar to ribosomal protein S18		5	
	IPI00111248.1	Similar to ribosomal protein S18		3	
	IPI00669224.2	Similar to ribosomal protein S18		3	
	IPI00663555.1	Similar to ribosomal protein S18		2	
<b>S19</b>	IPI00113241.6	40S ribosomal protein S19	7		
	IPI00625139.1	Similar to 40S ribosomal protein S19	6		
	IPI00125787.4	Similar to 40S ribosomal protein S19 isoform 3	5	7	3
	IPI00675325.1	Similar to 40S ribosomal protein S19	5		
	IPI00665513.2	Similar to 40S ribosomal protein S19	5	8	4
	IPI00350414.6	Similar to 40S ribosomal protein S19	4	5	2
	IPI00670906.1	Similar to 40S ribosomal protein S19	3		
	IPI00669614.1	Similar to 40S ribosomal protein S19	3	2	
	IPI00668018.1	Similar to 40S ribosomal protein S19	3		
	IPI00664029.1	Similar to 40S ribosomal protein S19	3		
	IPI00626015.2	9 kDa protein	2	2	
	IPI00113241.7	40S ribosomal protein S19		9	4
	IPI00664029.2	Similar to Rps19 protein		5	3
	IPI00343021.3	Similar to 40S ribosomal protein S19		2	
<b>S20</b>	IPI00323819.3	40S ribosomal protein S20	2		
<b>S21</b>	IPI00132950.1	40S ribosomal protein S21	2		
<b>S23</b>	IPI00131357.7	ribosomal protein S23	2	2	2
	IPI00761494.1	16 kDa protein	2	2	2
	IPI00343077.5	40S ribosomal protein S23	2		
<b>S24</b>	IPI00465568.5	40S ribosomal protein S24		4	2
	IPI00402981.2	Isoform 2 of 40S ribosomal protein S24		4	2
	IPI00753456.1	Isoform 3 of 40S ribosomal protein S24		4	2
	IPI00751050.2	Hypothetical protein		3	
<b>S25</b>	IPI00137735.1	40S ribosomal protein S25	4		
	IPI00115992.1	similar to 40S ribosomal protein S25	3		
	IPI00625320.2	14 kDa protein	3		
	IPI00677917.1	Similar to 40S ribosomal protein S25	3		
	IPI00461419.2	Similar to 40S ribosomal protein S25	3		
	IPI00605858.2	Similar to 40S ribosomal protein S25	3		
	IPI00622928.2	12 kDa protein	2		
	IPI00753093.1	Similar to 40S ribosomal protein S25	2		
	IPI00624402.1	13 kDa protein	2		
<b>S26</b>	IPI00762861.1	13 kDa protein		2	2
	IPI00377441.3	40S ribosomal protein S26		2	2
	IPI00261455.5	Similar to 40S ribosomal protein S26		2	2
	IPI00754798.1	Similar to 40S ribosomal protein S26		2	
	IPI00674601.1	Similar to 40S ribosomal protein S26		2	2
	IPI00658829.1	Ribosomal protein S26			2
<b>S27</b>	IPI00173160.3	40S ribosomal protein S27	3	2	
	IPI00124709.3	40S ribosomal protein S27-like protein	3	2	
	IPI00848859.1	imilar to ribosomal protein S27		2	
<b>S27a</b>	IPI00762833.1	21 kDa protein		2	
	IPI00470152.2	Ribosomal protein S27a		2	
	IPI00138892.2	Uba52 protein		2	
	IPI00758106.1	Similar to ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1		2	
<b>S28</b>	IPI00623913.1	8 kDa protein	2		
	IPI00137736.1	40S ribosomal protein S28	2		

<b>S30</b>	IPI00849113.1	Similar to Fau		2	
	IPI00399483.1	40S ribosomal protein S30		2	
<b>b) Proteine der großen ribosomalen Untereinheit</b>					
<b>P2</b>	IPI00742383.1	2600001A11Rik protein	3	3	2
	IPI00139795.2	60S acidic ribosomal protein P2	3	3	2
	IPI00761261.1	12 kDa protein	2	2	
<b>L3</b>	IPI00753623.1	Similar to 60S ribosomal protein L3	4	12	2
	IPI00755309.1	Ribosomal protein L3	4		
	IPI00754487.1	Similar to 60S ribosomal protein L3 (J1 protein) isoform 2	4	12	2
	IPI00762363.1	46 kDa protein	4	12	2
	IPI00321170.8	60S ribosomal protein L3	4	12	2
	IPI00605077.1	Similar to 60S ribosomal protein L3	3	7	2
	IPI00754157.1	Similar to ribosomal protein L3 isoform b isoform 3	3	11	2
	IPI00751485.1	Similar to ribosomal protein L3 isoform b isoform 3	3	11	2
	IPI00749579.1	Similar to 60S ribosomal protein L3 (L4) isoform 1	2		
	IPI00752359.1	Similar to 60S ribosomal protein L3 (L4) isoform 1	2		
	IPI00753883.1	Similar to 60S ribosomal protein L3	2		
	IPI00755309.1	Ribosomal protein L3		12	2
	IPI00849994.1	Similar to ribosomal protein L3 isoform 2		9	2
	IPI00849816.1	Similar to ribosomal protein L3 isoform 2		9	2
	IPI00458105.1	Similar to 60S ribosomal protein L3		7	2
	IPI00848821.1	Similar to ribosomal protein L3 isoform 3		7	2
IPI00850098.1	Similar to ribosomal protein L3 isoform 2		5	2	
<b>L4</b>	IPI00111412.2	60S ribosomal protein L4	5		
	IPI00111412.3	60S ribosomal protein L4		10	6
<b>L5</b>	IPI00308706.3	60S ribosomal protein L5	10		
	IPI00762217.1	Ribosomal protein L5	9		
	IPI00750357.1	Similar to 60S ribosomal protein L5	8		
	IPI00469084.5	Similar to 60S ribosomal protein L5	6		
<b>L6</b>	IPI00626312.1	Similar to 60S ribosomal protein L6		6	2
	IPI00313222.5	60S ribosomal protein L6		6	2
	IPI00457852.3	Similar to ribosomal protein L6		5	
	IPI00762885.1	31 kDa protein		4	2
	IPI00750333.1	33 kDa protein		4	
	IPI00282248.1	Similar to 60S ribosomal protein L6		4	
	IPI00848644.1	Similar to ribosomal protein L6 isoform 2		2	
	IPI00378933.4	Similar to 60S ribosomal protein L6		2	
	IPI00853789.1	Similar to ribosomal protein L6		2	
<b>L7</b>	IPI00311236.1	60S ribosomal protein L7	2	8	6
	IPI00775948.1	Protein		7	4
	IPI00606682.3	27 kDa protein		5	3
	IPI00458337.4	29 kDa protein		4	3
	IPI00605755.4	28 kDa protein		4	2
	IPI00673513.1	similar to 60S ribosomal protein L7 isoform 2		4	5
	IPI00626848.2	29 kDa protein		2	
<b>L7a</b>	IPI00330363.7	60S ribosomal protein L7a	7		
	IPI00462006.3	Similar to 60S ribosomal protein L7a	7		
	IPI00755770.1	Similar to 60S ribosomal protein L7a	7		
	IPI00462453.4	Similar to 60S ribosomal protein L7a	7		
	IPI00756848.1	Similar to 60S ribosomal protein L7a	7		
	IPI00622160.3	Similar to 60S ribosomal protein L7a	7		
	IPI00751517.1	Similar to 60S ribosomal protein L7a	7		
	IPI00663453.1	Similar to 60S ribosomal protein L7a	6		
	IPI00607052.3	Similar to 60S ribosomal protein L7a	6		
	IPI00265107.4	Similar to 60S ribosomal protein L7a (Surfeit locus protein 3) isoform 1	6		
	IPI00461677.2	Similar to 60S ribosomal protein L7a	6		
	IPI00761338.1	23 kDa protein	5		
	IPI00278580.6	Similar to 60S ribosomal protein L7a	5		
	IPI00354363.3	Similar to 60S ribosomal protein L7a (Surfeit locus protein 3) isoform 1	5		
	IPI00606944.2	Similar to 60S ribosomal protein L7a	4		
	IPI00356199.5	Similar to 60S ribosomal protein L7a	4		
	IPI00757549.1	Similar to 60S ribosomal protein L7a	4		
	IPI00751333.1	Similar to 60S ribosomal protein L7a	4		
	IPI00626062.2	Similar to 60S ribosomal protein L7a	3		
	IPI00750348.1	26 kDa protein	2		
	IPI00122931.4	Similar to 60S ribosomal protein L7a	2		
	IPI00623117.3	16 kDa protein	2		
	IPI00757168.1	Similar to 60S ribosomal protein L7a	2		
IPI00621005.2	27 kDa protein	2			
IPI00469578.4	30 kDa protein	2			
IPI00461356.1	ribosomal protein L7a	2			
<b>L8</b>	IPI00137787.2	60S ribosomal protein L8	4		
	IPI00137787.3	60S ribosomal protein L8		7	

L9	IPI00762232.1	22 kDa protein	3	6	
	IPI00753645.1	Similar to ribosomal protein L9	3		
	IPI00117610.2	Similar to ribosomal protein L9	3	5	
	IPI00275118.3	Similar to ribosomal protein L9 isoform 2	3		
	IPI00122413.2	60S ribosomal protein L9	3		
	IPI00407917.1	Similar to ribosomal protein L9	3	5	
	IPI00473762.1	PREDICTED: similar to ribosomal protein L9 isoform 2	3	6	
	IPI00756253.1	Similar to ribosomal protein L9	3		
	IPI00131534.1	Similar to 60S ribosomal protein L9	2	2	
	IPI00122413.2	60S ribosomal protein L9		6	
	IPI00275118.4	Similar to 60S ribosomal protein L9 isoform 2		5	
	IPI00756253.2	Similar to 60S ribosomal protein L9		4	
	IPI00850681.1	Similar to 60S ribosomal protein L9 isoform 2		4	
L10	IPI00474637.3	60S ribosomal protein L10	3	8	
	IPI00775915.1	23 kDa protein	3	8	
	IPI00340103.1	Similar to ribosomal protein L10	2	7	
	IPI00849598.1	Similar to QM protein		8	
	IPI00340103.1	Similar to ribosomal protein L10		7	
	IPI00403956.1	Similar to ribosomal protein L10 isoform 2		5	
	IPI00112024.2	Similar to ribosomal protein L10		3	
	IPI00761769.1	23 kDa protein		2	
	IPI00475155.1	QM protein (Fragment)		2	
	IPI00850568.1	Similar to ribosomal protein L10		2	
	IPI00850627.1	Similar to ribosomal protein L10		2	
	IPI00130596.1	Similar to ribosomal protein L10		2	
	L10a	IPI00127085.6	60S ribosomal protein L10A	7	3
IPI00122598.3		Similar to ribosomal protein L10a	3		
IPI00849927.1		Ribosomal protein L10a		4	2
L11	IPI00331461.3	60S ribosomal protein L11	3	3	
	IPI00474856.1	20 kDa protein	3	3	
	IPI00624735.4	20 kDa protein	3	3	
	IPI00626239.2	20 kDa protein	2	3	
	IPI00118707.1	Similar to 60S ribosomal protein L11	2		
	IPI00340036.2	Similar to 60S ribosomal protein L11	2		
	IPI00848952.1	Similar to ribosomal protein L11		3	
	IPI00462147.5	18 kDa protein		2	
L13	IPI00224505.6	60S ribosomal protein L13	7		
	IPI00134097.1	Similar to 60S ribosomal protein L13	6	2	
	IPI00653474.1	Rpl13 protein	4	2	
	IPI00625838.4	22 kDa protein	4	2	
	IPI00761637.1	19 kDa protein	4	2	
	IPI00675368.1	Similar to 60S ribosomal protein L13	3		
	IPI00621028.2	24 kDa protein	3		
	IPI00667008.2	Similar to ribosomal protein L13	3		
	IPI00224505.7	60S ribosomal protein L13		3	
	IPI00848571.1	Hypothetical protein		2	
L13a	IPI00223217.6	60S ribosomal protein L13a		6	
	IPI00462204.1	Similar to 60S ribosomal protein L13a		3	
	IPI00654400.1	Ribosomal protein L13a		3	
L14	IPI00473728.1	Ribosomal protein L14		3	3
	IPI00133185.3	60S ribosomal protein L14		3	3
L15	IPI00273803.4	60S ribosomal protein L15		6	2
	IPI00762221.1	24 kDa protein		6	2
	IPI00473532.1	24 kDa protein		6	2
	IPI00667252.1	Similar to ribosomal protein L15		5	2
	IPI00850320.1	Similar to ribosomal protein L15		5	2
	IPI00379391.2	Similar to ribosomal protein L15		4	
	IPI00756180.1	24 kDa protein		4	
	IPI00462237.4	Similar to ribosomal protein L15		3	
L17	IPI00468667.4	21 kDa protein		6	
	IPI00761421.2	Similar to Rpl17 protein		6	
	IPI00453768.4	60S ribosomal protein L17		6	
	IPI00625498.3	22 kDa protein		6	
	IPI00762032.1	22 kDa protein		6	
	IPI00626233.3	Similar to Rpl17 protein		6	
	IPI00853832.1	Similar to Rpl17 protein isoform 1		5	
	IPI00460039.2	21 kDa protein		5	
	IPI00755857.3	Similar to Rpl17 protein		5	
	IPI00850068.1	Similar to Ac2-210 isoform 2		4	
	IPI00848671.1	Similar to Rpl17 protein isoform 2		4	
	IPI00625457.2	Similar to 60S ribosomal protein L17		4	
	IPI00849377.1	Similar to Rpl17 protein		3	
	IPI00849522.1	Similar to Ac2-210 isoform 1		3	
	IPI00848802.1	Similar to Ac2-210 isoform 2		3	
	IPI00850153.1	Similar to Rpl17 protein		3	
	IPI00762850.1	21 kDa protein		3	

	IPI00853989.1	Similar to ribosomal protein L17 isoform 2		2	
	IPI00461292.4	Similar to 60S ribosomal protein L17		2	
	IPI00848437.1	Similar to Ac2-210		2	
<b>L18</b>	IPI00555113.2	60S ribosomal protein L18		3	
	IPI00665953.1	22 kDa protein		3	
	IPI00761489.1	22 kDa protein		3	
<b>L18a</b>	IPI00162790.1	60S ribosomal protein L18a	2	4	3
	IPI00625255.1	21 kDa protein	2	3	2
	IPI00850871.1	Similar to ribosomal protein L18a		3	2
	IPI00807971.1	Rpl18a protein		2	
<b>L19</b>	IPI00466604.2	Similar to ribosomal protein L19	5		
	IPI00264398.3	23 kDa protein	5	5	
	IPI00648315.1	23 kDa protein	5	5	
	IPI00122426.1	60S ribosomal protein L19	5	5	
	IPI00459850.2	Similar to ribosomal protein L19	4		
	IPI00354889.6	24 kDa protein	4		
	IPI00754211.1	Similar to ribosomal protein L19	3	8	
	IPI00666677.1	Similar to ribosomal protein L19	3		
	IPI00381692.4	Similar to ribosomal protein L19	3	3	
	IPI00850221.1	rRibosomal protein L19		5	
	IPI00853788.1	Similar to ribosomal protein L19		3	
	IPI00849754.1	Ssimilar to ribosomal protein L19		3	
<b>L21</b>	IPI00473445.1	Similar to ribosomal protein L21	4	4	
	IPI00664929.1	Similar to ribosomal protein L21	4	4	
	IPI00757947.1	Similar to ribosomal protein L21	4		
	IPI00315548.2	Ribosomal protein L21	4	4	
	IPI00468385.1	19 kDa protein	4	4	
	IPI00756660.1	Similar to ribosomal protein L21	4		
	IPI00758311.1	Similar to ribosomal protein L21	4		
	IPI00378437.3	Similar to ribosomal protein L21	3	3	
	IPI00606615.1	Similar to ribosomal protein L21	3	3	
	IPI00667719.1	Similar to ribosomal protein L21	3		
	IPI00468944.1	Similar to ribosomal protein L21 isoform 2	3		
	IPI00666311.1	Similar to ribosomal protein L21	3		
	IPI00755890.1	Similar to ribosomal protein L21	3		
	IPI00462005.1	Similar to 60S ribosomal protein L21 isoform 1	3	3	
	IPI00754244.1	Similar to 60S ribosomal protein L21	3		
	IPI00273514.3	Similar to ribosomal protein L21	3	3	
	IPI00555045.1	60S ribosomal protein L21	3	3	
	IPI00469983.2	19 kDa protein	3	3	
	IPI00380998.3	Similar to ribosomal protein L21	3	3	
	IPI00470042.3	Similar to ribosomal protein L21	3	3	
	IPI00626639.1	19 kDa protein	3	3	
	IPI00467197.5	19 kDa protein	3	3	
	IPI00407707.2	Similar to ribosomal protein L21	3	3	
	IPI00757792.1	15 kDa protein	3	3	
	IPI00661977.1	Similar to ribosomal protein L21	3		
	IPI00404653.2	Similar to ribosomal protein L21	2	2	
	IPI00751900.1	Similar to 60S ribosomal protein L21	2		
	IPI00461504.1	Similar to ribosomal protein L21 isoform 1	2	2	
	IPI00749628.1	Smilar to ribosomal protein L21	2	2	
	IPI00624454.1	Similar to ribosomal protein L21	2	2	
	IPI00130348.3	Similar to 60S ribosomal protein L21	2	2	
	IPI00460090.4	13 kDa protein	2	2	
	IPI00676916.2	Similar to 60S ribosomal protein L21	2	2	
	IPI00666286.1	Similar to ribosomal protein L21	2		
	IPI00112409.5	Similar to ribosomal protein L21	2		
	IPI00469646.1	Similar to ribosomal protein L21	2		
	IPI00753865.1	Similar to 60S ribosomal protein L21	2		
	IPI00668573.1	Similar to ribosomal protein L21	2		
	IPI00468196.1	Similar to ribosomal protein L21	2	2	
	IPI00457946.1	Similar to ribosomal protein L21	2	2	
	IPI00751563.1	Similar to 60S ribosomal protein L21	2		
	IPI00117543.3	18 kDa protein	2	2	
	IPI00112409.5	Similar to ribosomal protein L21		2	
<b>L22</b>	IPI00222546.4	60S ribosomal protein L22	3		
	IPI00222546.5	60S ribosomal protein L22		4	
	IPI00755995.1	Similar to 60S ribosomal protein L22	2		
	IPI00660661.1	Similar to 60S ribosomal protein L22	2		
	IPI00350162.6	Similar to 60S ribosomal protein L22	2		
<b>L22-11</b>	IPI00110724.2	Isoform 1 of Ribosomal protein L22-like 1	2	3	
	IPI00762362.1	Isoform 2 of Ribosomal protein L22-like 1	2	3	
<b>L23</b>	IPI00849782.1	Similar to HL23 ribosomal protein		2	3
	IPI00139780.1	60S ribosomal protein L23		2	3
<b>L23a</b>	IPI00758298.1	Similar to 60S ribosomal protein L23a	3	7	
	IPI00761283.1	18 kDa protein	3	7	

	IPI00461456.1	60S ribosomal protein L23a	3	8	
	IPI00625549.2	16 kDa protein	3	6	
	IPI00754976.1	18 kDa protein	3	7	
	IPI00752639.1	Similar to 60S ribosomal protein L23a	2	6	
	IPI00719955.1	Similar to 60S ribosomal protein L23a isoform 4	2		
	IPI00752985.1	Similar to 60S ribosomal protein L23a	2	6	
	IPI00458748.2	11 kDa protein	2	5	
	IPI00606009.2	Similar to 60S ribosomal protein L23a isoform 3	2		
	IPI00475232.1	18 kDa protein	2	7	
	IPI00849847.1	Similar to 60S ribosomal protein L23a		8	
	IPI00848364.1	Similar to 60S ribosomal protein L23a		5	
	IPI00762853.1	15 kDa protein		4	
	IPI00756014.1	Similar to 60S ribosomal protein L23a		3	
	IPI00620925.2	Similar to 60S ribosomal protein L23a		2	
	IPI00623004.3	Similar to 60S ribosomal protein L23a		2	
	IPI00672807.2	Similar to 60S ribosomal protein L23a		2	
	IPI00662290.1	Similar to 60S ribosomal protein L23a		2	
<b>L24</b>	IPI00134202.4	Similar to ribosomal protein L24	2	6	
	IPI00323806.4	Ribosomal protein L24, full insert sequence	2	6	
	IPI00762051.1	60S ribosomal protein L24	2	6	
	IPI00625025.4	18 kDa protein		4	
<b>L26</b>	IPI00750986.1	Similar to 60S ribosomal protein L26	5		
	IPI00132460.1	60S ribosomal protein L26	5	4	
	IPI00474008.1	Ribosomal protein L26	4		
	IPI00649136.1	Ribosomal protein L26	4	3	
	IPI00753572.1	Similar to 60S ribosomal protein L26	4	3	
	IPI00461916.2	Similar to 60S ribosomal protein L26-like 1	3		
	IPI00118166.1	Similar to 60S ribosomal protein L26	3		
	IPI00761176.1	16 kDa protein	3		
	IPI00753763.1	Similar to 60S ribosomal protein L26	2		
	IPI00474008.1	Ribosomal protein L26		3	
	IPI00118166.1	Similar to 60S ribosomal protein L26		2	
<b>L27</b>	IPI00122421.5	60S ribosomal protein L27	2	6	2
	IPI00674087.1	Similar to ribosomal protein L27	2		
	IPI00623893.2	Similar to ribosomal protein L27 isoform 1	2	5	
	IPI00749639.1	Similar to ribosomal protein L27	2		
	IPI00648920.1	10 kDa protein		3	
<b>L27a</b>	IPI00133503.1	Similar to ribosomal protein L27a		3	2
	IPI00626628.1	Ribosomal protein L27a		3	2
	IPI00673031.1	12 kDa protein		3	2
	IPI00474407.2	Similar to ribosomal protein L27a		3	2
	IPI00762417.1	16 kDa protein		3	2
	IPI00137687.3	Similar to ribosomal protein L27a		3	2
	IPI00755204.2	Similar to ribosomal protein L27a		2	
	IPI00114472.3	Similar to ribosomal protein L27a		2	2
	IPI00136263.1	Similar to ribosomal protein L27a		2	2
<b>L28</b>	IPI00222547.5	60S ribosomal protein L28	4		
	IPI00222547.6	60S ribosomal protein L28		4	
	IPI00473429.2	16 kDa protein	4	4	
	IPI00620288.1	16 kDa protein	4	3	
<b>L30</b>	IPI00222549.6	60S ribosomal protein L30		6	4
	IPI00463886.1	Similar to ribosomal protein L30		6	4
	IPI00762797.1	13 kDa protein		6	4
	IPI00377381.4	13 kDa protein		6	4
	IPI00553826.3	13 kDa protein		5	3
	IPI00755623.2	13 kDa protein		4	2
	IPI00475363.1	13 kDa protein		4	3
	IPI00849828.1	Similar to ribosomal protein L30		4	2
	IPI00464369.5	13 kDa protein		4	2
	IPI00379029.4	13 kDa protein		2	
	IPI00118775.1	Similar to ribosomal protein L30		2	
	IPI00850777.1	Similar to ribosomal protein L30		2	2
	IPI00283156.1	Similar to ribosomal protein L30		2	2
<b>L31</b>	IPI00469629.1	Similar to ribosomal protein L31	2	3	
	IPI00676466.1	Similar to ribosomal protein L31	2		
	IPI00123007.1	60S ribosomal protein L31		5	2
	IPI00677102.1	Similar to ribosomal protein L31 isoform 1		5	2
	IPI00461413.1	Similar to ribosomal protein L31		3	
	IPI00624673.3	Similar to ribosomal protein L31		3	
	IPI00466822.2	Similar to ribosomal protein L31		3	
	IPI00126910.2	Similar to ribosomal protein L31		2	
	IPI00379380.5	Rpl31 protein		2	
<b>L32</b>	IPI00230623.8	60S ribosomal protein L32	2	2	2
	IPI00128267.4	Similar to 60S ribosomal protein L32	2	2	2
<b>L34</b>	IPI00466153.4	60S ribosomal protein L34	2	3	
	IPI00621625.1	13 kDa protein	2	3	

	IPI00460103.1	13 kDa protein		2	
<b>L35</b>	IPI00761789.1	14 kDa protein		3	
	IPI00263879.4	Ribosomal protein L35		3	
	IPI00625702.1	15 kDa protein		2	
<b>L35a</b>	IPI00115902.2	60S ribosomal protein L35a	3	3	2
	IPI00627049.2	13 kDa protein	3	2	
	IPI00279674.1	12 kDa protein	2	2	2
	IPI00115233.1	Similar to ribosomal protein L35a		2	2
	IPI00850130.1	Similar to ribosomal protein L35a		2	
	IPI00850395.1	Similar to ribosomal protein L35a		2	
<b>L36</b>	IPI00463297.4	Similar to ribosomal protein L36		3	
	IPI00474487.1	12 kDa protein		3	
	IPI00656330.1	Similar to ribosomal protein L36		2	
	IPI00230679.5	60S ribosomal protein L36		2	
	IPI00849174.1	Similar to rat ribosomal protein L36		2	
<b>L37a</b>	IPI00272545.4	10 kDa protein	2	2	
	IPI00272545.5	Similar to ribosomal protein L37a		2	
	IPI00222550.8	ribosomal protein L37a	2	3	
<b>L38</b>	IPI00331121.4	60S ribosomal protein L38		3	3
	IPI00138302.1	Similar to ribosomal protein L38		3	3
	IPI00677340.1	Similar to ribosomal protein L38		3	3

**VI. Kontaminationen \***

<b>TOP1</b>	IPI00109764.1	DNA topoisomerase 1	4		
	IPI00109764.2	DNA topoisomerase 1		8	
<b>TOP2</b>	IPI00135443.2	DNA topoisomerase 2-beta	17		
<b>DDB1</b>	IPI00316740.3	Damage specific DNA binding protein 1, full insert sequence	5		
<b>DNAJA</b>	IPI00132208.1	DnaJ homolog subfamily A member 1	4		
	IPI00623518.2	Similar to DnaJ-like protein 2 isoform 2	3		
	IPI00758205.1	Similar to DnaJ-like protein 2 isoform 1	3		
	IPI00649780.1	23 kDa protein	2		
	IPI00649208.1	31 kDa protein	2		
<b>PDCD11</b>	IPI00551454.3	Programmed cell death protein 11		5	
	IPI00475334.4	81 kDa protein		3	
<b>NUMA1</b>	IPI00263048.1	Nuclear mitotic apparatus protein 1		3	
	IPI00761284.1	83 kDa protein		2	
<b>NACA</b>	IPI00111831.1	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form		4	
	IPI00121297.1	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha		4	
<b>N-PAC</b>	IPI00817029.1	Cytokine-like nuclear factor n-pac isoform 1 = Nuclear protein N60			2
	IPI00111821.6	Cytokine-like nuclear factor n-pac isoform 2			2
<b>C1QBP</b>	IPI00132799.4	Complement component 1, q subcomponent binding protein	3		
<b>GPC1</b>	IPI00137336.1	Glypican-1 precursor	3		
<b>GPC2</b>	IPI00222709.1	Glypican-2 precursor	2		
<b>eEF2</b>	IPI00466069.3	Elongation factor 2		5	
	IPI00849291.1	Similar to eukaryotic translation elongation factor 2		3	
<b>Histon H4</b>	IPI00407339.6	Histone H4	3	3	
	IPI00621789.1	11 kDa protein	3	3	3
	IPI00624933.1	Hist1h4h protein (Fragment)	3	3	3
	IPI00621374.1	11 kDa protein	3	3	3
	IPI00624840.1	Hist1h4h protein (Fragment)	3	3	
	IPI00623776.3	Similar to germinal histone H4 gene	3	3	3
	IPI00329998.2	histone 4 protein	3	3	3
	IPI00336741.2	Hist2h4 protein (Fragment)	3		
	IPI00844736.1	12 kDa protein		3	3
	IPI00407339.7	Histone H4			3
	IPI00624840.2	12 kDa protein			3
<b>Histon H1</b>	IPI00118590.1	H1 histone family, member X		4	2
	IPI00228616.5	Histone H1.1		2	
	IPI00331597.6	Histone H1.3		3	
	IPI00223713.5	Histone H1.2		2	
<b>Histon H2B</b>	IPI00230133.5	Histone H1.5		2	
	IPI00114642.4	Histone H2b type 1-F/J/L		3	
	IPI00554853.3	Histone H2b type 1-B		3	
	IPI00134534.2	H2B histone family, member S		3	
	IPI00453744.2	16 kDa protein		3	
	IPI00648991.1	Histone 1, H2bp		3	
	IPI00265768.3	Histone H2b type 1-K		3	
	IPI00227930.3	Histone H2b type 1-H		3	
	IPI00461514.4	Histone H2b		3	
	IPI00282269.9	Histone H2b type 1-M		3	
	IPI00282266.3	Histone H2b type 1-C/E/G		3	
	IPI00761713.2	Isoform 2 of Histone H2B type 1-P		3	
	IPI00348270.3	Histone H2b type 2-B		3	

<b>Histon H3</b>	IPI00229539.2	Histone 3, H2bb	2	
	IPI00124518.3	Similar to H2B histone family, member J	2	
	IPI00187543.3	Histone H2b type 2-E	2	
	IPI00553774.3	Histone H2b type 3-A	2	
	IPI00459318.1	Histone H2B homolog	2	
	IPI00473818.3	14 kDa protein		2
<b>Histon H2A</b>	IPI00229545.3	Histone H2A type 1-K		2
	IPI00229544.3	Histone H2A type 1-H		2
	IPI00153400.2	Histone H2A family, member J		2
	IPI00330000.4	Histone H2A type 2-A		2
	IPI00272033.3	Histone H2A type 2-C		2
	IPI00229542.1	Histone protein Hist1h2aa		2
	IPI00265761.6	Histone H2A type 1		2
	IPI00229543.3	Histone H2A type 1-F		2
	IPI00221463.3	Histone H2A type 3		2
	IPI00473844.3	14 kDa protein		2
<b>HP1BP3</b>	IPI00342766.7	heterochromatin protein 1, binding protein 3	3	3
	IPI00649600.1	33 kDa protein	2	
	IPI00649004.1	23 kDa protein		2
	IPI00649203.2	Heterochromatin protein 1, binding protein 3		2
<b>VCP</b>	IPI00761428.1	valosin containing protein	3	
	IPI00622235.3	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	3	
	IPI00676914.1	Similar to Transitional endoplasmic reticulum ATPase (TER ATPase) (15S Mg(2+)-ATPase p97 subunit) (Valosin-containing protein) (VCP) isoform 1	3	
<b>DUS3L</b>	IPI00129184.3	Isoform 1 of tRNA-dihydrouridine synthase 3-like	3	
	IPI00776080.1	Isoform 2 of tRNA-dihydrouridine synthase 3-like	2	
<b>RTN1</b>	IPI00459442.1	Reticulon 1 isoform RTN1-C		2
<b>HB</b>	IPI00316491.4	Hemoglobin subunit beta-2	2	2
	IPI00751307.1	Similar to Hemoglobin epsilon-Y2 subunit (Hemoglobin epsilon-Y2 chain) (Epsilon-Y2-globin) isoform 4		2
	IPI00621417.1	Hbb-b2 protein	2	2
	IPI00828873.1	Beta-2 globin (fragment)	2	2
	IPI00555131.2	Hemoglobin subunit epsilon-Y2	2	2
	IPI00553333.2	Hemoglobin subunit beta-1		2

**Tabelle 7.1: Über Massenspektrometrie identifizierte Proteine der GST-Stau1, GST-Stau2 und GST-Btz Pulldowns**

Die Proteinbanden der GST-Pulldown Experimente wurden massenspektrometrisch analysiert (s. Abschnitt 3.8.6). Die Proteine wurden in fünf Klassen eingeteilt: I. RNA-bindende Proteine (RBPs); II. Kinasen, Phosphatasen, Transferasen; III. Motorproteine und Cytoskelett-assoziierte Proteine IV. weitere Proteine, die nicht in die anderen Gruppen fallen; V. Ribosomale Proteine sowie Kontaminationen (VI.). Die Gruppen I., IV und V wurden wie angegeben weiter unterteilt. Es wurde je ein GST-Pulldown Experiment für die Proteine Btz, Stau1 und Stau2 analysiert.

1 angegeben ist jeweils die Anzahl der *unique peptide hits*, die für die in Spalte 2 aufgeführte Acc.No. (IPI, Version 3.21 und 3.26 European Bioinformatics Institute, [www.ebi.ac.uk/IPI/](http://www.ebi.ac.uk/IPI/)) identifiziert wurde

\* teilweise wurden Peptide dieses Proteins auch in der entsprechenden Negativkontrolle identifiziert

Symbol	Accession No.	Name (engl.)	Unique Peptide Hits <sup>1</sup>			
			Btz-IP		Stau2-IP	
			RNaseEI	GlycEI	RNaseEI	GlycEI
<b>I. RNA-bindende Proteine (RBPs)</b>						
<b>a) heterogene nukleäre Ribonukleoproteine (hnRNPs)</b>						
hnRNP A0	IPI00109813.1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0 (hnRNP A0)	5		2	
	IPI00756005.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	4			
hnRNP A1 *	IPI00553777.2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1			6	
	IPI00817004.1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 isoform a			6	
	IPI00621201.3	28 kDa protein			4	
	IPI00461698.5	27 kDa protein			3	
	IPI00129808.7	Similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (Helix-destabilizing protein) (Single-strand binding protein) (hnRNP core protein A1) (HDP-1) (Topoisomerase-inhibitor suppressed) isoform 1				3
	IPI00469298.2	Similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (Helix-destabilizing protein) (Single-strand binding protein) (hnRNP core protein A1) (HDP-1) (Topoisomerase-inhibitor suppressed) isoform 1				2
	IPI00620806.3	Similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (Helix-destabilizing protein) (Single-strand binding protein) (hnRNP core protein A1) (HDP-1) (Topoisomerase-inhibitor suppressed) isoform 2				2
hnRNP A / B proteins	IPI00117288.3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B			6	
	IPI00648228.3	Hnrpab protein			6	
	IPI00277066.4	S1 protein C2			6	
hnRNP A2 / B1	IPI00828488.1	Isoform 1 of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1			9	3
	IPI00622847.2	Isoform 2 of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1			8	3
	IPI00405058.6	Isoform 3 of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1			8	
	IPI00853914.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1			8	
	IPI00405058.5	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 isoform 2				3
hnRNP A3 *	IPI00677689.2	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 12			5	
	IPI00750059.2	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3, isoform 3			5	
	IPI00459722.2	Hnrpa3 protein			5	
	IPI00664047.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 5			5	
	IPI00670004.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 5			5	
	IPI00750283.1	32 kDa protein			5	
	IPI00674712.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 1			5	
	IPI00667787.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 16			5	
	IPI00849731.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3			5	
	IPI00470076.5	32 kDa protein			5	
	IPI00269662.1	Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3			5	
	IPI00749630.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 4			5	
	IPI00623731.1	PREDICTED: similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 5			5	
	IPI00269661.1	Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3			5	
	IPI00466185.3	33 kDa protein			5	
	IPI00678360.3	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 2			5	
	IPI00752179.2	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 1			5	
	IPI00750428.2	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 13			5	
	IPI00458033.5	17 kDa protein			4	
	IPI00663550.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 1			4	
	IPI00757273.2	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 6			4	
	IPI00626666.3	24 kDa protein			4	
	IPI00461800.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 1			4	
IPI00670681.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 7			4		
IPI00849556.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3			4		
IPI00659723.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 isoform 5			4		
IPI00605872.3	25 kDa protein			2		
IPI00464170.6	21 kDa protein			2		
hnRNP C *	IPI00223443.1	Isoform C1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	5		9	4
	IPI00130343.2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C	5		9	4
	IPI00759886.1	Isoform 5 of Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	4		8	4
	IPI00223444.1	Isoform 3 of Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	4		8	4
	IPI00759870.1	Isoform 4 of Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	4		8	4
	IPI00762002.1	33 kDa protein			5	3

<b>hnRNP D *</b>	IPI00330958.2	Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0		4	6
	IPI00798477.1	30 kDa protein		4	6
	IPI00336873.1	Isoform 3 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0		4	6
	IPI00129417.1	JKTBP (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like)		4	
	IPI00755892.1	46 kDa protein		4	
	IPI00230086.2	Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0		3	6
	IPI00336874.1	Isoform 4 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0		3	5
<b>hnRNP H1 und hnRNP F</b>	IPI00224729.1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1	4	5	6
	IPI00133916.2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1	4	5	6
	IPI00798511.1	Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F		2	2
	IPI00761708.1	44 kDa protein		2	2
	IPI00226073.2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F		2	2
<b>hnRNP H2</b>	IPI00108143.1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H'	4		3
	IPI00378188.5	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	3		
	IPI00108143.1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H'		3	
<b>hnRNP I</b>	IPI00136883.3	Polypyrimidine tract binding protein 1	4	4	
	IPI00475378.4	Polypyrimidine tract binding protein 1 isoform 1	4	4	
	IPI00749991.3	Polypyrimidine tract-binding protein 1 (hnRNP I)	3	2	
<b>hnRNP L</b>	IPI00620362.3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L		8	
	IPI00653643.2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L		8	
	IPI00457527.1	Similar to RNA-binding protein XlhnRNPL		3	
<b>hnRNP M</b>	IPI00480357.6	Isoform 2 of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M		2	
	IPI00132443.3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M		2	
<b>hnRNP R und hnRNP Q</b>	IPI00406117.1	Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q		8	3
	IPI00406118.1	Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q		8	3
	IPI00135308.3	Similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R homolog		7	
	IPI00128441.3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R		7	
	IPI00648869.1	30 kDa protein		6	
<b>hnRNP U *</b>	IPI00756515.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	6		3
	IPI00458583.3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U		8	
<b>hnRNP U-like</b>	IPI00123501.3	Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1		2	
	IPI00742433.1	Isoform 2 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1		2	
	IPI00849047.1	Similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 2		3	
	IPI00222208.2	MLF1 associated nuclear protein	6	3	3
	IPI00762321.1	20 kDa protein	2		
<b>RALY</b>	IPI00754017.1	32 kDa protein	4	3	3
	IPI00130147.2	Isoform 2 of RNA-binding protein Raly	4	3	3
	IPI00308402.1	Isoform 1 of RNA-binding protein Raly	4	3	3
	IPI00757982.1	23 kDa protein	4	3	3
	IPI00828741.1	hnRNP-associated with lethal yellow	4	3	3
	IPI00750190.1	16 kDa protein	3		3

### b) Zipcode bindende Proteine (ZBPs)

<b>ZBP1 *</b>	IPI00131056.1	Coding region determinant binding protein	4	10	6
<b>ZBP2</b>	IPI00761863.1	Isoform 1 of Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2		6	
	IPI00338748.3	Isoform 2 of Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2		5	
	IPI00761700.1	Isoform 3 of Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2		4	
<b>ZBP3 *</b>	IPI00331315.8	Insulin-like growth factor 2, binding protein 3	3	8	2

### c) Doppelstrang-RNA-Bindeproteine

<b>STAU1</b>	IPI00323319.3	Double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 1	3	8	5
	IPI00750382.1	54 kDa protein	3	8	6
	IPI00756688.1	Staufen	3	8	6
	IPI00749596.1	Staufen (RNA binding protein) homolog 1 (Drosophila)	2	7	5
	IPI00464391.1	Staufen		4	3
<b>STAU2</b>	IPI00407779.1	Isoform 1 of Double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 2			14
	IPI00621913.1	Isoform 2 of Double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 2			12
	IPI00649849.1	Isoform 3 of Double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 2			11
	IPI00273362.1	Isoform 4 of Double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 2			5
	IPI00404785.1	Isoform 5 of Double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 2			3

<b>PACT *</b>	IPI00471256.2	Interferon-inducible double stranded RNA-dependent protein kinase activator A	5		
<b>ILF-2</b>	IPI00318550.5	Interleukin enhancer-binding factor 2	3	6	5
<b>ILF-3</b>	IPI00555078.1	Isoform 1 of Interleukin enhancer-binding factor 3		7	
	IPI00776384.1	Nuclear factor 90		7	
	IPI00130591.2	Isoform 3 of Interleukin enhancer-binding factor 3		7	
	IPI00403996.2	Isoform 2 of Interleukin enhancer-binding factor 3		7	
	IPI00762404.1	spermatid perinuclear RNA binding protein		2	
	IPI00475177.4	Isoform 2 of spermatid perinuclear RNA-binding protein		2	
	IPI00128254.2	Isoform 1 of spermatid perinuclear RNA-binding protein		2	
<b>d) andere RNA-bindende Proteine</b>					
<b>Btz (CASC3, MLN51)</b>	IPI00322598.4	Cancer susceptibility candidate 3	1		
<b>PAIP1</b>	IPI00816997.1	Poly(A) binding protein interacting protein 1 isoform 2	2	2	
	IPI00123882.1	Polyadenylate-binding protein-interacting protein 1	2	2	
	IPI00753270.1	Similar to poly(A) binding protein interacting protein 1		2	
<b>Poly(A) bindende Proteine 1 und 4 *</b>	IPI00331552.4	Poly a binding protein, cytoplasmic 1			12
	IPI00124287.1	Polyadenylate-binding protein 1			12
	IPI00137145.1	Poly a binding protein, cytoplasmic 1			9
	IPI00420950.3	Poly A binding protein, cytoplasmic 4 (inducible form)			7
	IPI00649252.1	71 kDa protein			7
	IPI00666636.1	68 kDa protein			7
	IPI00648982.1	69 kDa protein			7
	IPI00172364.1	Poly A binding protein, cytoplasmic 4			7
	IPI00120954.2	Poly A binding protein, cytoplasmic 2			6
	IPI00653624.1	Poly A binding protein, cytoplasmic 4			5
	IPI00850617.1	Similar to Poly A binding protein, cytoplasmic 4 isoform 1			3
<b>PABPN1</b>	IPI00410858.2	Isoform 2 of polyadenylate-binding protein 2	2	2	2
	IPI00136169.1	Poly(A) binding protein, nuclear 1	2	2	2
<b>FMRP / FXR1 / FXR2</b>	IPI00652944.1	Fragile X mental retardation gene 2, autosomal homolog	7		
	IPI00126389.2	Fragile X mental retardation, autosomal homolog 2	7		
	IPI00675666.1	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 2	6		
	IPI00230602.1	Isoform G of Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1	3		
	IPI00230601.1	Isoform F of Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1	3		
	IPI00230600.1	Isoform D of Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1	3		
	IPI00230599.1	Isoform C of Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1	3		
	IPI00230598.1	Isoform B of Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1	3		
	IPI00122521.1	Isoform E of Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1	3		
	IPI00230597.1	Isoform A of Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1	3		
	IPI00776121.1	67 kDa protein	2		
	IPI00227013.2	Isoform ISO9 of Fragile X mental retardation protein 1 homolog	2		
	IPI00469993.2	Isoform ISO7 of Fragile X mental retardation protein 1 homolog	2		
	IPI00475390.4	Isoform ISO8 of Fragile X mental retardation protein 1 homolog	2		
	IPI00776271.1	71 kDa protein	2		
	IPI00230030.2	Isoform ISO11 of Fragile X mental retardation protein 1 homolog	2		
	IPI00227005.1	Isoform ISO3 of Fragile X mental retardation protein 1 homolog	2		
	IPI00474739.1	Isoform ISO1 of Fragile X mental retardation protein 1 homolog	2		
	IPI00754279.1	Similar to fragile X mental retardation protein 1	2		
	IPI00270737.5	Fragile X mental retardation syndrome 1 homolog	2		
<b>NPM1</b>	IPI00127415.1	Nucleophosmin	7		2
	IPI00648014.1	Nucleophosmin 1	6		2
	IPI00649841.1	Nucleophosmin 1	6		2
	IPI00515155.1	Nucleophosmin 1	6		2
	IPI00468717.6	Similar to Nucleophosmin (NPM) (Nucleolar phosphoprotein B23) (Numatrin) (Nucleolar protein NO38) isoform 1	6		2
	IPI00130905.5	25 kDa protein	3		2
	IPI00674226.4	Similar to Nucleophosmin (NPM) (Nucleolar phosphoprotein B23) (Numatrin) (Nucleolar protein NO38) isoform 1	3		
	IPI00606698.2	Similar to Nucleophosmin	2		
	IPI00849626.1	Similar to Nucleophosmin			2
<b>MAGOH</b>	IPI00551412.1	Protein mago nashi homolog	2		
	IPI00132692.1	Protein mago nashi homolog 1-related	2		
	IPI00467348.3	17 kDa protein	2		

<b>THOC4</b>	IPI00114407.2	THO complex 4 (Aly / REF)	2		2	
	IPI00850366.1	RNA and export factor-binding protein 2			2	
	IPI00122339.3	Isoform 2 of THO complex subunit 4			2	
	IPI00311103.1	Isoform 1 of RNA and export factor-binding protein 2			2	
	IPI00377350.1	Isoform 2 of RNA and export factor-binding protein 2			2	
	IPI00473437.3	24 kDa protein			2	
<b>PURA</b>	IPI00751607.1	Similar to Transcriptional activator protein Pur-alpha (Purine-rich single-stranded DNA-binding protein alpha) isoform 1	3		2	
	IPI00118447.1	Transcriptional activator protein Pur-alpha	3		2	
	IPI00757181.1	Similar to Transcriptional activator protein Pur-alpha (Purine-rich single-stranded DNA-binding protein alpha) isoform 2	3		2	
<b>YB-1 und YB-2</b>	IPI00120886.3	Nuclease element-binding protein 1			10	5
	IPI00849786.1	Similar to transcription factor eF1			10	5
	IPI00647981.3	Nuclease element binding protein 1			7	3
	IPI00131034.1	Isoform 1 of Y-box-binding protein 2			3	2
	IPI00274739.1	Isoform 2 of DNA-binding protein A			3	2
	IPI00849342.1	Similar to Y box binding protein 2			3	2
	IPI00330591.1	Isoform 1 of DNA-binding protein A			3	2
	IPI00753114.1	Csda protein			3	2
	IPI00121311.1	DbpA murine homologue			3	2
	IPI00553286.3	Isoform 2 of Y-box-binding protein 2			3	2
	IPI00474439.1	Y-box binding protein (Fragment)			3	2
	IPI00623394.3	Ybx2 protein			2	
	<b>PAI-RBP</b>	IPI00471477.1	Isoform 3 of Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein			4
IPI00471475.1		Isoform 1 of Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein			4	12
IPI00471476.1		Isoform 2 of Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein			4	12
IPI00471478.1		Isoform 4 of Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein			3	8
<b>SSB</b>	IPI00134300.1	Lupus La protein homolog	3		4	
	IPI00473603.1	8 days embryo whole body cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:5730546E07 product:Sjogren syndrome antigen B, full insert sequence			3	
<b>LARP1</b>	IPI00344088.6	La related protein				4
	IPI00670545.2	Similar to la related protein isoform 1				4
<b>La related</b>	IPI00828620.1	La-related protein 4			4	2
	IPI00761759.1	2 cells egg cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:B020036B10 product:C-Mpl binding protein homolog			4	2
	IPI00828610.1	La ribonucleoprotein domain family, member 4 isoform 2			4	2
	IPI00831428.1	Isoform 3 of La-related protein 5			3	
	IPI00469235.3	Larp5 protein			2	2
	IPI00346582.7	Hypothetical protein LOC207214 isoform 1				2
	IPI00620564.1	Weakly similar to C-MPL BINDING PROTEIN				2
	IPI00664415.2	Similar to La-related protein 4				2
	IPI00754198.1	Similar to La-related protein 4				2
<b>RBM4 und RBM4B</b>	IPI00177224.1	RNA-binding protein 4B	7	3		
	IPI00309195.2	Isoform 1 of RNA-binding protein 4	6	3		
	IPI00403780.1	Isoform 2 of RNA-binding protein 4	5	3		
	IPI00127509.1	Neosin (Fragment)	4	2		
<b>RBMX</b>	IPI00776401.1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G		2		4
	IPI00474144.1	42 kDa protein		2	5	4
	IPI00124979.2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G		2	5	4
	IPI00775821.1	33 kDa protein		2	4	4
	IPI00775899.1	11 kDa protein		2	4	3
	IPI00604873.2	Similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G		2	5	3
	IPI00663587.1	RNA binding motif protein, X chromosome retrogene		2	5	4
	IPI00130885.1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G			3	2
<b>RBM14</b>	IPI00404707.1	Isoform 1 of RNA-binding protein 14			6	11
	IPI00649362.1	Isoform 2 of RNA-binding protein 14			5	7
	IPI00761500.1	16 kDa protein			5	6
<b>MSI2</b>	IPI00120924.1	Isoform 1 of RNA-binding protein Musashi homolog 2			3	
	IPI00462900.1	Isoform 3 of RNA-binding protein Musashi homolog 2			3	
	IPI00462899.1	Isoform 2 of RNA-binding protein Musashi homolog 2			3	
	IPI00656163.1	Msi2h protein			2	
	IPI00648031.1	Musashi homolog 2 (Drosophila)			2	
<b>NCBP80</b>	IPI00458056.3	Nuclear cap-binding protein subunit 1			4	
	IPI00759985.1	80 kDa nuclear cap binding protein (NCBP 80 kDa subunit) (CBP80) homolog			2	
<b>MYEF2</b>	IPI00154084.2	Isoform 2 of Myelin expression factor 2	4		2	2
	IPI00226891.1	Isoform 1 of Myelin expression factor 2	4		2	2
	IPI00654425.1	Myelin basic protein expression factor 2, repressor	4			2
	IPI00556709.1	Isoform 4 of Myelin expression factor 2	3		2	
	IPI00556805.1	Isoform 3 of Myelin expression factor 2	3		2	
	IPI00752119.1	58 kDa protein	3			
	IPI00404685.4	47 kDa protein	3			
	IPI00404685.5	Similar to Meyf2 protein			2	

<b>CRIP</b>	IPI00121073.1	Cold-inducible RNA-binding protein	2			
<b>TARDBP</b>	IPI00121758.1	TAR DNA-binding protein 43	3		5	
	IPI00459625.1	TAR DNA binding protein isoform 4	2		5	
	IPI00515147.1	TAR DNA binding protein isoform 2	2		5	
	IPI00280967.3	TAR DNA binding protein isoform 3	2		5	
	IPI00515174.1	TAR DNA binding protein isoform 5	2		5	
	IPI00807899.1	Tardbp protein	2		4	
<b>HuB * und HuC * und HuD *</b>	IPI00466120.1	Elavl4 protein		3		7
	IPI00648506.1	RNA-binding protein HUD3		3		7
	IPI00650057.1	40 kDa protein		3		7
	IPI00473324.4	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 4 (Hu antigen D)		3		7
	IPI00229977.1	Isoform 2 of ELAV-like protein 4		3		6
	IPI00648762.1	42 kDa protein		3		7
	IPI00649229.1	Adult male diencephalon cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:9330166O05 product:ELAV		3		7
	IPI00828663.1	Elav (embryonic lethal, abnormal vision, drosophila)-like 4.		3		6
	IPI00649068.1	43 kDa protein		2		7
	IPI00222990.1	Isoform HuC-S of ELAV-like protein 3		2		6
	IPI00410779.1	ELAV-like 2 isoform 1		2		7
	IPI00121676.1	ELAV-like protein 2		2		7
	IPI00648092.1	43 kDa protein		2		7
	IPI00649574.1	38 kDa protein		2		6
	IPI00648800.1	41 kDa protein		2		6
	IPI00122451.1	Isoform HuC-L of ELAV-like protein 3		2		6
	IPI00457664.1	ELAV-like 2 isoform 3		2		6
	IPI00649298.1	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 2 (Hu antigen B)		2		7
<b>HuR</b>	IPI00108271.1	ELAV-like protein 1				2
	IPI00649908.1	15 kDa protein				2
	IPI00466032.3	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, drosophila)-like 1				2
<b>Poly(rC)BP1</b>	IPI00128904.1	Poly(rC)-binding protein 1 (hnRNP E1)	2	2		
<b>Poly(rC)BP2</b>	IPI00221799.1	Isoform 3 of Poly(rC)-binding protein 2 (hnRNP E2)	3		4	
	IPI00221796.1	Isoform 2 of Poly(rC)-binding protein 2	3		4	
	IPI00127707.1	Isoform 1 of Poly(rC)-binding protein 2	3		4	
	IPI00473425.1	Hypothetical protein			2	
	IPI00751759.1	Isoform 1 of Polypyrimidine tract-binding protein 2			2	
	IPI00136002.1	Isoform 2 of Polypyrimidine tract-binding protein 2			2	
<b>Poly(rC)BP3</b>	IPI00411074.1	Isoform 1 of Poly(rC)-binding protein 3			2	
	IPI00411075.1	Isoform 2 of Poly(rC)-binding protein 3			2	
<b>G3BP2</b>	IPI00124245.1	Isoform A of Ras GTPase-activating protein-binding protein 2	2		4	2
	IPI00331295.4	Isoform B of Ras GTPase-activating protein-binding protein 2	2		3	2
<b>RNG105</b>	IPI00757359.1	Cytoplasmic activation/proliferation-associated protein 1 (RNA granules protein 105)	3		2	2
<b>e) RNA-Helikasen</b>						
<b>UPF1 (RENT1)</b>	IPI00420949.2	Regulator of nonsense transcripts 1(Upf1)		5		
	IPI00850525.1	Isoform 2 of regulator of nonsense transcripts 1			26	9
	IPI00420949.3	Isoform 1 of regulator of nonsense transcripts 1			26	9
<b>eIF4A3</b>	IPI00126716.3	Eukaryotic initiation factor 4A-III (DDX48)	5	12		
	IPI00407909.1	Similar to Probable ATP-dependent RNA helicase DDX48	5	11		
	IPI00127479.4	Similar to Probable ATP-dependent RNA helicase DDX48	4	10		
	IPI00750063.1	Similar to Probable ATP-dependent RNA helicase DDX48	4	10		
	IPI00458502.2	Similar to Probable ATP-dependent RNA helicase DDX48	4	10		
	IPI00648352.1	34 kDa protein	2	8		
	IPI00758278.1	Similar to Probable ATP-dependent RNA helicase DDX48	3	5		
	IPI00400432.2	Similar to Probable ATP-dependent RNA helicase DDX48	2			
<b>eIF4A1</b>	IPI00118676.3	Eukaryotic initiation factor 4A-I	2			
<b>eIF4A2</b>	IPI00409918.1	Isoform 2 of Eukaryotic initiation factor 4A-II	2			
<b>DDX1</b>	IPI00127172.3	ATP-dependent RNA helicase DDX1	2			
<b>DDX5 und DDX17</b>	IPI00420363.2	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5		5	4	
	IPI00753112.1	69 kDa protein		3	2	
	IPI00648528.1	46 kDa protein		3		
	IPI00405364.2	Isoform 2 of Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17		2	2	
	IPI00396797.2	Isoform 1 of Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17		2	2	
	IPI00653307.1	DEAD box polypeptide 17 isoform 1		2	2	
<b>DDX6</b>	IPI00311827.1	DEAD (aspartate-glutamate-alanine- aspartate) box polypeptide 6			3	
	IPI00606483.2	50 kDa protein			3	
	IPI00109932.1	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6 (Rck)			3	
<b>DHX30</b>	IPI00270064.2	Isoform 1 of Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30			6	
	IPI00127902.2	Isoform 3 of Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30			6	
	IPI00761204.1	Isoform 2 of Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30			6	
	IPI00403301.5	MKIAA0890 protein (Fragment)			4	

<b>DHX36</b>	IPI00351266.2	Probable ATP-dependent RNA helicase DHX36			3
<b>DDX21</b>	IPI00652987.3	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 21	5		
	IPI00120691.3	Nucleolar RNA helicase 2	5		
<b>DDX9 *</b>	IPI00607980.1	Isoform 2 of ATP-dependent RNA helicase A			9
	IPI00339468.3	Isoform 1 of ATP-dependent RNA helicase A			9
	IPI00607914.1	Isoform 3 of ATP-dependent RNA helicase A			7
<b>DDX39</b>	IPI00409462.2	Spliceosome RNA helicase Bat1			2
<b>G3BP1</b>	IPI00654422.1	Ras-GTPase-activating protein SH3-domain binding protein			5
	IPI00130095.1	Ras GTPase-activating protein-binding protein 1			5
	IPI00465608.5	50 kDa protein			3
<b>MOV-10</b>	IPI00130328.5	Putative helicase MOV-10			2

#### f) Translationsinitiationsfaktoren

<b>eIF2A</b>	IPI00474446.4	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1	2		
<b>eIF3B</b>	IPI00116302.3	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	3		
	IPI00480398.1	38 kDa protein	3		
<b>eIF2S3</b>	IPI00475020.1	Eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3, structural gene Y-linked, full insert sequence			2
	IPI00230415.5	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3, x-linked			2
	IPI00230416.5	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3, y-linked			2
<b>eIF2C1 und eIF2C2</b>	IPI00229989.1	Eukaryotic translation initiation factor 2C 1 (Ago1)	4		
	IPI00648175.1	Eukaryotic translation initiation factor 2C 1 (EIF2C 1) (EIF-2C 1) (PUTATIVE RNA-BINDING PROTEIN Q99) homolog	4		
	IPI00229988.2	Eukaryotic translation initiation factor 2C 2 (Ago2)	3		
	IPI00752166.1	Similar to GERp95	2		
	IPI00753110.1	Similar to Eukaryotic translation initiation factor 2C 1	2		

#### g) Splicingfaktoren und nukleäre Proteine

<b>SRPK2</b>	IPI00751009.1	Serine/arginine-rich protein specific kinase 2			2
<b>SFPQ</b>	IPI00129430.1	Splicing factor, proline- and glutamine-rich			2
	IPI00849080.1	Similar to PTB-associated splicing factor			2
<b>SF3B</b>	IPI00623284.3	Splicing factor 3B subunit 1	3		5
	IPI00117687.1	Pre-mRNA branch site protein p14 = Sf3bs14	2		
<b>U5-116 kD</b>	IPI00469260.3	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	5		
	IPI00649950.3	U5 small nuclear ribonucleoprotein	5		
<b>U5-200 kD</b>	IPI00420329.1	Activating signal cointegrator 1 complex subunit 3-like 1			4
<b>NHP2L1</b>	IPI00621272.3	Nhp2-like protein 1 = U4/U6.U5 tri-snRNP 15.5 kDa protein	3		3
	IPI00670422.1	Similar to Nhp2 non-histone chromosome protein 2-like 1 isoform 2			3
	IPI00458509.1	Similar to Nhp2 non-histone chromosome protein 2-like 1	3		3
	IPI00828392.1	14 kDa protein	3		
	IPI00671010.1	Similar to Nhp2 non-histone chromosome protein 2-like 1	3		3
	IPI00672137.1	Similar to Nhp2 non-histone chromosome protein 2-like 1	2		2
<b>Nop56</b>	IPI00318048.5	Nucleolar protein Nop56 (Nol5A)	5	4	2
	IPI00758218.1	33 kDa protein		3	
<b>Nol5</b>	IPI00463468.3	Nucleolar protein 5	4	3	5
<b>NCL</b>	IPI00317794.5	Nucleolin			5
<b>similar to FBL</b>	IPI00119581.2	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarinn			
	IPI00473920.1	PREDICTED: similar to fibrillarinn	2		
<b>small nuclear RNPs:</b>	IPI00119224.1	Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3			2
	IPI00230150.1	Small nuclear ribonucleoprotein G	2		
	IPI00117371.5	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide F	3		
	IPI00379355.4	similar to Small nuclear ribonucleoprotein F	2		
	IPI00749759.1	similar to Small nuclear ribonucleoprotein F	2		
	IPI00666526.2	similar to Small nuclear ribonucleoprotein F	2		

#### II. Kinasen / Phosphatasen / Transferasen

<b>CSNK1</b>	IPI00138790.2	Casein kinase 1, delta	4		
	IPI00761242.1	Isoform 1 of Casein kinase I isoform delta	4		
	IPI00410959.1	Isoform 2 of Casein kinase I isoform delta	4		
	IPI00649032.1	Protein	3		
	IPI00653061.1	Casein kinase 1, epsilon	2		
	IPI00321396.1	Casein kinase I isoform epsilon	2		
	IPI00330729.4	Isoform 1 of Casein kinase I isoform alpha	4		
	IPI00467055.3	Isoform 2 of Casein kinase I isoform alpha	4		
<b>CaMKII</b>	IPI00475302.2	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta	2		
	IPI00228044.1	Isoform 2 of Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II gamma chain			2
	IPI00624499.1	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta			2
	IPI00228045.1	Isoform 3 of Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II gamma chain			2

	IPI00474502.2	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II beta chain	2		
	IPI00515172.1	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta	2		
	IPI00648630.1	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta	2		
	IPI00124695.1	Isoform 1 of Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II gamma chain	2		
	IPI00470962.1	Camk2b protein	2		
	IPI00649296.1	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta	2		
	IPI00649778.1	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta	2		
	IPI00515669.1	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, beta	2		
<b>CSK</b>	IPI00112648.1	Tyrosine-protein kinase CSK	2		
	IPI00331152.2	c-src tyrosine kinase	2		
<b>DIMT1</b>	IPI00132415.1	Probable dimethyladenosine transferase	3		

### III. Motorproteine und Cytoskelett-assoziierte Proteine

<b>DBN1</b>	IPI00331516.3	12 days embryo head cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:3010022H11 product:drebrin 1, full insert sequence	2		
	IPI00135475.3	Isoform A of Drebrin	2		
<b>TUBB *</b>	IPI00117352.1	Tubulin beta-5 chain		6	6
	IPI00338039.1	Tubulin beta-2A chain		5	5
	IPI00109061.1	Tubulin beta-2B chain		5	5
	IPI00112251.1	Tubulin beta-3 chain		3	3
	IPI00169463.1	Tubulin beta-2C chain		3	4
	IPI00850173.1	Similar to Tubulin, beta 4		3	3
	IPI00662501.1	Similar to tubulin, beta 3		2	
	IPI00109073.5	Tubulin beta-4 chain		2	2
	IPI00122928.1	Tubulin beta-6 chain		2	
	IPI00348094.4	Similar to beta tubulin 1, class VI		2	
<b>TUBA *</b>	IPI00403810.2	Tubulin alpha-6 chain		5	
	IPI00110753.1	Tubulin alpha-1 chain		5	
	IPI00117348.4	Tubulin alpha-2 chain		5	
	IPI00755835.1	50 kDa protein		4	
	IPI00621551.2	37 kDa protein		4	
	IPI00665335.1	Similar to tubulin, alpha 2 isoform 2 isoform 3		4	
	IPI00129028.1	Similar to Tubulin alpha-2 chain (Alpha-tubulin 2) isoform 1		4	
	IPI00466390.1	Tubulin alpha-3/alpha-7 chain		2	
	IPI00117350.1	Tubulin alpha-4 chain		2	
<b>VIM</b>	IPI00227299.6	Vimentin	12	11	
	IPI00751833.1	11 kDa protein	2		
<b>DES</b>	IPI00130102.4	Desmin		2	
<b>CKAP4 *</b>	IPI00223047.2	Cytoskeleton-associated protein 4		4	
<b>DPYSL3 *</b>	IPI00312527.4	Crmp1 protein			5
	IPI00122349.1	Dihydropyrimidinase-related protein 3			4
	IPI00621526.3	Collapsin response mediator protein 1, full insert sequence			3
<b>14-3-3 Proteine</b>	IPI00118384.1	14-3-3 protein epsilon		7	
	IPI00828266.2	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide		4	
	IPI00656269.1	Isoform 2 of 14-3-3 protein theta		2	
	IPI00853924.1	34 kDa protein		2	
	IPI00227392.5	14-3-3 protein eta		2	
	IPI00118286.1	14-3-3 protein sigma		2	
	IPI00116498.1	14-3-3 protein zeta/delta		2	
	IPI00844680.1	Stratifin		2	
	IPI00760000.1	Isoform Short of 14-3-3 protein beta/alpha		2	
	IPI00408378.4	Isoform 1 of 14-3-3 protein theta		2	
	IPI00230707.6	14-3-3 protein gamma		2	
	IPI00230682.6	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide		2	
	IPI00754545.2	Similar to YWHAQ		2	

### IV. Proteine, die nicht in oben genannten Gruppen fallen

#### a) Regulierung der Transkription

<b>TFIIS</b>	IPI00121887.5	Isoform 2 of Transcription elongation factor A protein 1	2		
	IPI00623923.2	33 kDa protein	2		
<b>RUVBL2</b>	IPI00123557.3	Ruvb-like 2	2		

#### b) Chaperone

<b>TCP1 *</b>	IPI00116283.1	T-complex protein 1 subunit gamma	3		
	IPI00469268.5	T-complex protein 1 subunit theta		3	
<b>PPIB</b>	IPI00135686.2	peptidylprolyl isomerase B	2		
<b>HSPA9</b>	IPI00133903.1	Stress-70 protein, mitochondrial precursor (Mortalin)			4
	IPI00751600.1	Similar to Stress-70 protein, mitochondrial precursor			3
	IPI00668383.2	Similar to Stress-70 protein, mitochondrial precursor			3

<b>GNB2L1 *</b>	IPI00317740.5	Guanine nucleotide binding protein subunit beta-2-like 1 (RACK1)				4
	IPI00648477.1	Guanine nucleotide binding protein, beta 2, related sequence 1				3

**c) wenig charakterisierte Proteine**

<b>WDR18</b>	IPI00136252.3	WD repeat protein 18		2		
<b>FBXO45</b>	IPI00170059.2	F-box/SPRY-domain protein 1		2		
<b>DJ1103G7.7</b>	IPI00223503.1	DJ1103G7.7 (PUTATIVE NOVEL PROTEIN) homolog	3	2	7	2
<b>C9orf114</b>	IPI00224127.2	Isoform 1 of Uncharacterized protein C9orf114 homolog	2		2	
	IPI00760075.1	Isoform 2 of Uncharacterized protein C9orf114 homolog	2		2	
<b>KCTD12</b>	IPI00421206.1	BTB/POZ domain-containing protein KCTD12	6			
	IPI00775881.1	Kctd12 protein	2			
<b>ATAD3</b>	IPI00126913.5	Isoform 1 of ATPase family AAA domain-containing protein 3		8		6
	IPI00464208.3	Isoform 2 of ATPase family AAA domain-containing protein 3		7		6
<b>LYAR</b>	IPI00113232.3	Cell growth-regulating nucleolar protein			2	
<b>F120C</b>	IPI00416122.1	Isoform 1 of UPF0318 protein FAM120C			2	
	IPI00416125.2	Similar to Hypothetical protein FLJ20506			2	
	IPI00719966.1	Isoform 3 of UPF0318 protein FAM120C			2	
<b>YTHDF</b>	IPI00227149.4	Isoform 3 of YTH domain family protein 3				2
	IPI00187444.1	YTH domain family protein 1				2
	IPI00465894.1	Isoform 2 of YTH domain family protein 3				2
	IPI00752810.1	64 kDa protein				2
	IPI00742314.1	Isoform 1 of YTH domain family protein 3				2
<b>KIAA0376</b>	IPI00229645.2	KIAA0376 protein		3		

**V. Ribosomal Proteine****a) Proteine der kleinen ribosomalen Untereinheit**

<b>S2</b>	IPI00606379.2	Similar to 40S ribosomal protein S2 isoform 1			7	5
	IPI00604967.3	Similar to 40S ribosomal protein S2			7	5
	IPI00606508.1	Similar to 40S ribosomal protein S2 isoform 1			7	
	IPI00318492.10	40S ribosomal protein S2			6	4
	IPI00380130.2	Ribosomal protein S2			6	4
	IPI00752723.1	Similar to 40S ribosomal protein S2 isoform 2			6	4
	IPI00466145.3	26 kDa protein			5	4
	IPI00605141.2	Similar to 40S ribosomal protein S2 isoform 1			5	4
	IPI00378671.3	Similar to 40S ribosomal protein S2			4	3
	IPI00458629.2	Similar to 40S ribosomal protein S2 isoform 1			4	2
	IPI00134607.6	Hypothetical protein			4	2
	IPI00761576.1	24 kDa protein			4	4
	IPI00658614.1	Similar to 40S ribosomal protein S2 isoform 3			4	4
	IPI00621568.3	26 kDa protein			4	2
	IPI00749556.1	25 kDa protein			3	2
	IPI00665910.2	Similar to ribosomal protein S2 isoform 2			3	2
	IPI00761827.1	24 kDa protein			2	2
	IPI00625569.3	27 kDa protein			2	
	IPI00621639.4	24 kDa protein			2	
	IPI00626139.2	ES cells cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:2400007N24 product:unclassifiable, full insert sequence			2	2
	IPI00463285.3	14 kDa protein			2	
	IPI00622068.1	31 kDa protein			2	2
	IPI00850650.1	Similar to HCG2016250			2	2
	IPI00849155.1	Similar to HCG2016250			2	2
<b>S3</b>	IPI00134599.1	40S ribosomal protein S3				6
<b>S3a</b>	IPI00331345.5	40S ribosomal protein S3a			11	5
	IPI00473521.1	30 kDa protein			11	5
	IPI00679159.2	Similar to 40S ribosomal protein S3a			9	5
<b>S4</b>	IPI00331092.7	40S ribosomal protein S4, X isoform				5
	IPI00752798.2	Similar to 40S ribosomal protein S4, X isoform isoform 1				3
	IPI00471047.2	Ribosomal protein S4, Y-linked 2				3
	IPI00339573.8	27 kDa protein				2
<b>S5</b>	IPI00125521.3	40S ribosomal protein S5			5	
<b>S6</b>	IPI00671512.2	Similar to 40S ribosomal protein S6			4	3
	IPI00761509.1	28 kDa protein			4	3
	IPI00474622.1	Similar to 40S ribosomal protein S6 isoform 1			4	3
	IPI00480225.1	PREDICTED: similar to 40S ribosomal protein S6 isoform 1			4	3
	IPI00113655.1	40S ribosomal protein S6			4	3
	IPI00672455.1	Similar to 40S ribosomal protein S6 isoform 1			4	2
	IPI00108454.1	Similar to 40S ribosomal protein S6			3	2
	IPI00625845.3	28 kDa protein			2	
<b>S7</b>	IPI00850934.1	Similar to ribosomal protein S7			4	2
	IPI00666161.1	Similar to 40S ribosomal protein S7 (S8) isoform 1			4	2
	IPI00136984.1	40S ribosomal protein S7			4	2
<b>S8</b>	IPI00621229.1	Similar to ribosomal protein S8 isoform 1			5	2
	IPI00466820.4	40S ribosomal protein S8			5	2
	IPI00671398.1	Similar to ribosomal protein S8 isoform 1			5	2

	IPI00475203.1	Ribosomal protein S8		5	2
	IPI00274175.1	Similar to ribosomal protein S8 isoform 1		4	
	IPI00849948.1	Similar to ribosomal protein S8		4	2
	IPI00627028.3	22 kDa protein		3	
<b>S9</b>	IPI00420726.3	40S ribosomal protein S9		5	
<b>S10</b>	IPI00112448.1	40S ribosomal protein S10		4	3
	IPI00762525.1	18 kDa protein		3	2
	IPI00830211.1	Ribosomal protein S10		3	2
<b>S11</b>	IPI00117569.3	Ribosomal protein S11		5	7
	IPI00762542.1	18 kDa protein		3	5
	IPI00625021.1	18 kDa protein			2
<b>S12</b>	IPI00225634.6	Ribosomal protein S12		5	
	IPI00473415.1	Similar to ribosomal protein S12		5	
	IPI00554850.2	40S ribosomal protein S12		4	
	IPI00116908.1	Similar to ribosomal protein S12		4	
	IPI00405659.1	Similar to ribosomal protein S12		4	
	IPI00463052.1	Similar to ribosomal protein S12		4	
	IPI00463049.1	Similar to ribosomal protein S12 isoform 2		4	
	IPI00120475.1	Similar to 40S ribosomal protein S12		3	
	IPI00133104.1	EG237433 protein		2	
<b>S13</b>	IPI00751092.1	Similar to ribosomal protein S13		3	3
	IPI00125901.5	40S ribosomal protein S13		3	3
<b>S14</b>	IPI00322562.5	40S ribosomal protein S14		4	2
	IPI00663582.1	Similar to ribosomal protein S14 isoform 1		3	2
	IPI00112407.3	Similar to ribosomal protein S14		2	2
<b>S15</b>	IPI00319231.4	40S ribosomal protein S15	3	2	
	IPI00755989.2	Similar to 40S ribosomal protein S15	3	2	
	IPI00653962.1	Ribosomal protein S15	3		
	IPI00673173.1	Similar to 40S ribosomal protein S15	2		
	IPI00659112.1	Similar to 40S ribosomal protein S15	2		
<b>S15a</b>	IPI00113394.5	Similar to ribosomal protein S15a		4	2
	IPI00230660.5	40S ribosomal protein S15a		4	2
	IPI00849417.1	Similar to HCG1994130		3	3
	IPI00849692.1	Similar to HCG1994130		3	2
	IPI00749889.1	Similar to ribosomal protein S15a		3	2
	IPI00621613.1	15 kDa protein		2	2
	IPI00850815.1	Similar to Rps15a protein		2	2
<b>S16</b>	IPI00469918.4	Rps16 protein	3	4	7
	IPI00755046.1	18 kDa protein	3	4	7
	IPI00850220.1	Similar to Rps16 protein		3	5
	IPI00463248.6	15 kDa protein		2	2
<b>S17</b>	IPI00465880.4	40S ribosomal protein S17		4	2
	IPI00755495.2	Similar to ribosomal protein S17		3	
	IPI00848900.1	Similar to ribosomal protein S17		3	
	IPI00622165.2	Similar to 40S ribosomal protein S17		2	
	IPI00277965.3	Similar to 40S ribosomal protein S17		2	2
<b>S18</b>	IPI00474174.1	OTTMUSP00000000606	4	5	5
	IPI00317590.5	40S ribosomal protein S18	4	5	5
	IPI00620156.1	18 kDa protein	4	5	5
	IPI00275455.2	17 kDa protein	3	4	4
	IPI00268802.1	18 kDa protein	2	4	3
	IPI00381655.4	Similar to ribosomal protein S18	2	2	3
	IPI00663555.1	Similar to ribosomal protein S18	2		2
	IPI00669224.2	Similar to ribosomal protein S18	2	2	3
	IPI00752364.1	Similar to ribosomal protein S18	2		
	IPI00660316.1	Similar to ribosomal protein S18	2		
	IPI00851049.1	Similar to ribosomal protein		5	5
	IPI00111248.1	Similar to ribosomal protein S18		2	2
<b>S19</b>	IPI00113241.7	40S ribosomal protein S19			5
	IPI00665513.2	Similar to 40S ribosomal protein S19			5
	IPI00125787.4	Similar to 40S ribosomal protein S19 isoform 3			4
	IPI00664029.2	Similar to Rps19 protein			3
	IPI00350414.6	Similar to 40S ribosomal protein S19			3
<b>S20</b>	IPI00323819.3	40S ribosomal protein S20		3	
<b>S21</b>	IPI00132950.1	40S ribosomal protein S21	2		
<b>S24</b>	IPI00465568.4	Isoform 1 of 40S ribosomal protein S24	2	3	
	IPI00465568.5	40S ribosomal protein S24		2	2
	IPI00408720.2	Similar to ribosomal protein S24	2	3	2
	IPI00402981.2	Isoform 2 of 40S ribosomal protein S24	2	3	2
	IPI00753684.1	similar to ribosomal protein S24	2	3	
	IPI00753456.1	Isoform 3 of 40S ribosomal protein S24	2	3	2
	IPI00460891.3	Similar to ribosomal protein S24		2	
	IPI00678771.1	Similar to ribosomal protein S24		2	
	IPI00751050.1	Similar to ribosomal protein S24		2	

<b>S25</b>	IPI00115992.1	Similar to 40S ribosomal protein S25		2	4
	IPI00848593.1	Similar to HCG1640785		2	4
	IPI00625320.2	14 kDa protein		2	4
	IPI00677917.1	Similar to 40S ribosomal protein S25		2	4
	IPI00461419.2	Similar to 40S ribosomal protein S25		2	3
	IPI00137735.1	40S ribosomal protein S25		2	
	IPI00850188.1	Similar to ribosomal protein S25 isoform 1		2	4
	IPI00605858.2	Similar to 40S ribosomal protein S25			3
IPI00624402.1	13 kDa protein			2	
<b>S26</b>	IPI00762861.1	13 kDa protein		2	2
	IPI00377441.3	40S ribosomal protein S26		2	2
	IPI00658829.1	Ribosomal protein S26		2	2
	IPI00261455.5	Similar to 40S ribosomal protein S26		2	2
	IPI00754798.1	Similar to 40S ribosomal protein S26		2	2
	IPI00674601.1	Similar to 40S ribosomal protein S26		2	2
<b>S27</b>	IPI00173160.3	40S ribosomal protein S27	3		2
	IPI00124709.3	40S ribosomal protein S27-like protein	3		2
<b>S28</b>	IPI00137736.1	40S ribosomal protein S28		2	2
<b>SA</b>	IPI00123604.4	40S ribosomal protein SA			6
	IPI00850840.1	Ribosomal protein SA			6
	IPI00622968.1	33 kDa protein			6
	IPI00111272.1	Similar to 40S ribosomal protein SA			5
	IPI00753827.1	19 kDa protein			4
	IPI00659629.1	similar to 40S ribosomal protein SA (p40) (34/67 kDa laminin receptor) isoform 1			4
	IPI00676858.2	similar to 40 kDa ribosomal protein			3
	IPI00849484.1	similar to 40 kDa ribosomal protein			2

#### b) Proteine der großen ribosomalen Untereinheit

<b>P1</b>	IPI00755227.1	Similar to 60S acidic ribosomal protein P1		2	
	IPI00753932.1	Similar to 60S acidic ribosomal protein P1		2	
	IPI00118632.1	Similar to 60S acidic ribosomal protein P1		2	
	IPI00113377.1	60S acidic ribosomal protein P1		2	
<b>L3</b>	IPI00753623.1	Similar to 60S ribosomal protein L3	4	4	8
	IPI00755309.1	Ribosomal protein L3	4	4	8
	IPI00754487.1	Similar to 60S ribosomal protein L3 (J1 protein) isoform 2	4	4	8
	IPI00762363.1	46 kDa protein	4	4	8
	IPI00321170.8	60S ribosomal protein L3	4	3	8
	IPI00605077.1	Similar to 60S ribosomal protein L3	3	4	6
	IPI00754157.1	Similar to ribosomal protein L3 isoform b isoform 3	3	4	5
	IPI00751485.1	Similar to ribosomal protein L3 isoform b isoform 3	3	4	5
	IPI00749579.1	Similar to 60S ribosomal protein L3 (L4) isoform 1	3		6
	IPI00752359.1	Similar to 60S ribosomal protein L3 (L4) isoform 1	3		6
	IPI00753883.1	Similar to 60S ribosomal protein L3	3		3
	IPI00458105.1	Similar to 60S ribosomal protein L3	3	3	4
	IPI00850098.1	Similar to ribosomal protein L3 isoform 2		4	
	IPI00849994.1	Similar to ribosomal protein L3 isoform 2		4	
IPI00848821.1	Similar to ribosomal protein L3 isoform 3		4		
IPI00849816.1	Similar to ribosomal protein L3 isoform 2		4		
<b>L4</b>	IPI00111412.3	60S ribosomal protein L4			9
<b>L5</b>	IPI00308706.4	60S ribosomal protein L5		4	5
	IPI00762217.1	Ribosomal protein L5		3	5
	IPI00469084.5	Similar to 60S ribosomal protein L5		3	4
<b>L6</b>	IPI00626312.1	Similar to 60S ribosomal protein L6		4	6
	IPI00313222.5	60S ribosomal protein L6		4	6
	IPI00457852.3	Similar to 60S ribosomal protein L6		3	5
	IPI00848644.1	Similar to 60S ribosomal protein L6 isoform 2		2	4
	IPI00853789.1	Similar to ribosomal protein L6		2	4
	IPI00282248.1	Similar to 60S ribosomal protein L6		2	5
	IPI00750333.1	33 kDa protein			4
IPI00378933.4	Similar to 60S ribosomal protein L6			3	
<b>L7</b>	IPI00775948.1	Protein		4	3
	IPI00606682.3	27 kDa protein		4	2
	IPI00311236.1	60S ribosomal protein L7		4	3
	IPI00458337.4	29 kDa protein		3	3
	IPI00605755.4	28 kDa protein		3	
IPI00673513.1	Similar to 60S ribosomal protein L7 isoform 2		3	2	
<b>L7a</b>	IPI00354363.3	Similar to 60S ribosomal protein L7a (Surfeit locus protein 3) isoform 1		3	2
	IPI00265107.4	Similar to 60S ribosomal protein L7a (Surfeit locus protein 3) isoform 1		3	2
	IPI00462006.3	Similar to 60S ribosomal protein L7a		3	2
	IPI00330363.8	60S ribosomal protein L7a		3	2
	IPI00622160.3	Similar to 60S ribosomal protein L7a		3	2
IPI00462453.4	Similar to 60S ribosomal protein L7a		3	2	

	IPI00761338.1	23 kDa protein		2	
	IPI00606944.2	Similar to 60S ribosomal protein L7a		2	
	IPI00461677.2	Similar to 60S ribosomal protein L7a		2	
	IPI00356199.5	Similar to 60S ribosomal protein L7a		2	
	IPI00461356.1	Ribosomal protein L7a		2	
	IPI00122931.4	Similar to 60S ribosomal protein L7a		2	2
<b>L8</b>	IPI00137787.3	60S ribosomal protein L8		2	
<b>L9</b>	IPI00122413.2	60S ribosomal protein L9		5	
	IPI00407917.1	Similar to ribosomal protein L9		5	
	IPI00756253.2	Similar to 60S ribosomal protein L9		4	
	IPI00762232.1	22 kDa protein		4	
	IPI00117610.2	Similar to ribosomal protein L9		4	
	IPI00473762.1	PREDICTED: similar to ribosomal protein L9 isoform 2		4	
	IPI00275118.4	Similar to 60S ribosomal protein L9 isoform 2		4	
	IPI00850681.1	Similar to 60S ribosomal protein L9 isoform 2		3	
	IPI00131534.1	Similar to 60S ribosomal protein L9		2	
<b>L10</b>	IPI00849598.1	Similar to QM protein		4	
	IPI00775915.1	23 kDa protein		4	
	IPI00474637.4	60S ribosomal protein L10		4	
	IPI00403956.1	Similar to ribosomal protein L10 isoform 2		3	
	IPI00340103.1	Similar to ribosomal protein L10		3	
	IPI00761769.1	23 kDa protein		2	
<b>L10a</b>	IPI00127085.6	60S ribosomal protein L10A	2		
<b>L12</b>	IPI00338838.3	Similar to 60S ribosomal protein L12			4
	IPI00849793.1	60S ribosomal protein L12			4
	IPI00353099.2	Ribosomal protein L12			3
	IPI00463634.1	Hypothetical protein (Fragment)			3
	IPI00339474.3	Similar to 60S ribosomal protein L12			2
	IPI00659188.1	Similar to 60S ribosomal protein L12			2
	IPI00457862.4	Similar to 60S ribosomal protein L12			2
<b>L13</b>	IPI00653474.1	Rpl13 protein		6	5
	IPI00224505.7	60S ribosomal protein L13		6	5
	IPI00625838.4	22 kDa protein		6	5
	IPI00761637.1	19 kDa protein		6	5
	IPI00134097.1	Similar to 60S ribosomal protein L13		5	4
	IPI00621028.2	24 kDa protein		4	4
	IPI00848571.1	Hypothetical protein		3	3
<b>L13a</b>	IPI00223217.6	60S ribosomal protein L13a		7	
	IPI00654400.1	Ribosomal protein L13a		5	
	IPI00462204.1	Similar to 60S ribosomal protein L13a		3	
	IPI00662196.2	Similar to 60S ribosomal protein L13a		2	
<b>L14</b>	IPI00473728.1	Ribosomal protein L14, cytosolic homolog	4	3	
	IPI00133185.3	60S ribosomal protein L14	4	3	
<b>L15</b>	IPI00273803.4	60S ribosomal protein L15	3		4
	IPI00762221.1	24 kDa protein	3		4
	IPI00667252.1	Similar to ribosomal protein L15	3		2
	IPI00473532.1	24 kDa protein	3		4
	IPI00755957.1	Similar to ribosomal protein L15	3		3
	IPI00758080.1	Similar to ribosomal protein L15	3		3
	IPI00379391.2	Similar to ribosomal protein L15	2		
	IPI00762267.1	23 kDa protein	2		
	IPI00462237.3	24 kDa protein	2		
	IPI00756180.1	24 kDa protein			3
	IPI00663111.1	Similar to ribosomal protein L15			2
<b>L17</b>	IPI00468667.4	21 kDa protein		4	2
	IPI00453768.4	60S ribosomal protein L17		4	2
	IPI00625498.3	22 kDa protein		4	2
	IPI00626233.3	Similar to Rpl17 protein		4	2
	IPI00762032.1	22 kDa protein		4	2
	IPI00850068.1	Similar to AC2-210 isoform 2		3	
	IPI00853832.1	Similar to ribosomal protein L17 isoform 1		3	2
	IPI00848671.1	Similar to Rpl17 protein isoform 2		3	
	IPI00761421.2	Similar to Rpl17 protein		3	2
	IPI00625457.2	Similar to 60S ribosomal protein L17		3	2
	IPI00849522.1	Similar to AC2-210 isoform 1		3	
	IPI00848802.1	Similar to AC2-210 isoform 2		3	
	IPI00460039.2	21 kDa protein		3	2
	IPI00755857.3	Similar to Rpl17 protein		3	2
	IPI00762850.1	21 kDa protein		3	2
	IPI00853989.1	Similar to ribosomal protein L17 isoform 2		2	
	IPI00849377.1	Similar to Rpl17 protein		2	
	IPI00461292.4	Similar to 60S ribosomal protein L17		2	
	IPI00848437.1	Similar to AC2-210		2	
	IPI00108337.5	Similar to AC2-210		2	
	IPI00849736.1	Similar to ribosomal protein L17 isoform 1		2	

<b>L18</b>	IPI00665953.1	22 kDa protein	2	3	2	2
	IPI00555113.2	60S ribosomal protein L18	2	3	2	2
	IPI00761489.1	22 kDa protein	2	3	2	2
	IPI00465823.3	Similar to 60S ribosomal protein L18		2		
<b>L18a</b>	IPI00162790.1	60S ribosomal protein L18a			3	
	IPI00625255.1	21 kDa protein			3	
	IPI00807971.1	Rpl18a protein			2	
<b>L19</b>	IPI00754211.1	Similar to ribosomal protein L19				3
	IPI00466604.2	Similar to ribosomal protein L19				3
	IPI00264398.3	23 kDa protein				3
	IPI00648315.1	23 kDa protein				3
	IPI00122426.1	60S ribosomal protein L19				3
	IPI00459850.2	Similar to ribosomal protein L19				2
	IPI00666677.1	Similar to ribosomal protein L19				2
IPI00381692.4	Similar to ribosomal protein L19				2	
<b>L22</b>	IPI00222546.5	60S ribosomal protein L22			2	2
<b>L23</b>	IPI00849782.1	Similar to HL23 ribosomal protein			3	2
	IPI00139780.1	60S ribosomal protein L23			3	2
	IPI00648121.1	6 kDa protein			2	2
<b>L23a</b>	IPI00761283.1	18 kDa protein			7	4
	IPI00461456.1	60S ribosomal protein L23a			7	4
	IPI00849847.1	Similar to ribosomal protein L23a			7	4
	IPI00754976.1	18 kDa protein			7	4
	IPI00758298.1	Similar to 60S ribosomal protein L23a			6	3
	IPI00625549.2	16 kDa protein			6	3
	IPI00475232.1	18 kDa protein			6	3
	IPI00752639.1	Similar to 60S ribosomal protein L23a			5	3
	IPI00848364.1	Similar to ribosomal protein L23a			5	3
	IPI00752985.1	Similar to 60S ribosomal protein L23a			5	3
	IPI00458748.2	11 kDa protein			5	3
	IPI00762853.1	15 kDa protein			3	
	IPI00756014.1	Similar to 60S ribosomal protein L23a			3	2
	IPI00672807.2	Similar to 60S ribosomal protein L23a			3	2
	IPI00345911.2	Similar to 60S ribosomal protein L23a			2	
	IPI00379638.1	Similar to 60S ribosomal protein L23a			2	
	IPI00754636.2	Similar to HCG2001000			2	
	IPI00849834.1	Similar to Rpl23a protein			2	
	IPI00850004.1	Similar to Rpl23a protein			2	
	IPI00623004.3	Similar to 60S ribosomal protein L23a			2	
	IPI00662290.1	Similar to 60S ribosomal protein L23a			2	
IPI00379639.1	Similar to 60S ribosomal protein L23a			2		
<b>L24</b>	IPI00134202.4	Similar to ribosomal protein L24			3	
	IPI00323806.4	Ribosomal protein L24			3	
	IPI00762051.1	60S ribosomal protein L24			3	
	IPI00625025.4	18 kDa protein			3	
<b>L26</b>	IPI00750986.1	Similar to 60S ribosomal protein L26	3			
	IPI00132460.1	60S ribosomal protein L26	3		2	4
	IPI00474008.1	Ribosomal protein L26	3			4
	IPI00649136.1	Ribosomal protein L26	3			4
	IPI00753572.1	Similar to 60S ribosomal protein L26	3		2	4
	IPI00461916.2	Similar to 60S ribosomal protein L26-like 1	2		2	2
	IPI00118166.1	Similar to 60S ribosomal protein L26				2
	IPI00761176.1	16 kDa protein				2
	IPI00753763.1	Similar to 60S ribosomal protein L26	2			
	IPI00649136.1	Ribosomal protein L26			2	
IPI00474008.1	Ribosomal protein L26			2		
<b>L27</b>	IPI00626531.4	Similar to ribosomal protein L27	3	5		
	IPI00122421.5	60S ribosomal protein L27	3	5		2
	IPI00674087.1	Similar to ribosomal protein L27	2	4		
	IPI00623893.2	Similar to ribosomal protein L27 isoform 1	3	3		2
	IPI00749639.1	Similar to ribosomal protein L27	2	2		
<b>L27a</b>	IPI00133503.1	Similar to ribosomal protein L27a			2	2
	IPI00626628.1	ribosomal protein L27a			2	2
	IPI00673031.1	12 kDa protein			2	2
	IPI00474407.2	Similar to ribosomal protein L27a			2	2
	IPI00762417.1	16 kDa protein			2	2
	IPI00137687.3	Similar to ribosomal protein L27a			2	2
	IPI00114472.3	Similar to ribosomal protein L27a			2	2
	IPI00136263.1	Similar to ribosomal protein L27a			2	2
IPI00470152.2	Ribosomal protein S27a			2		
<b>L30</b>	IPI00222549.6	60S ribosomal protein L30			2	4
	IPI00762797.1	13 kDa protein			2	4
	IPI00850777.1	Similar to ribosomal protein L30			2	3
	IPI00475363.1	13 kDa protein			2	3
	IPI00463886.1	Similar to ribosomal protein L30			2	4

	IPI00283156.1	Similar to ribosomal protein L30		2	3
	IPI00377381.4	13 kDa protein		2	
	IPI00377381.4	13 kDa protein			4
	IPI00553826.3	13 kDa protein			3
	IPI00464369.5	13 kDa protein			3
	IPI00755623.2	13 kDa protein			2
	IPI00849828.1	Similar to ribosomal protein L30			2
<b>L31</b>	IPI00123007.1	60S ribosomal protein L31			2
	IPI00677102.1	Similar to ribosomal protein L31 isoform 1			2
<b>L32</b>	IPI00230623.8	60S ribosomal protein L32	3		4
	IPI00128267.4	Similar to 60S ribosomal protein L32	2		2
<b>L34</b>	IPI00466153.4	60S ribosomal protein L34	2		
	IPI00621625.1	13 kDa protein	2		
<b>L35a</b>	IPI00850130.1	similar to ribosomal protein L35a			2
	IPI00115902.2	60S ribosomal protein L35a			2
	IPI00627049.2	13 kDa protein			2
	IPI00850395.1	similar to ribosomal protein L35a			2
<b>L36</b>	IPI00623646.2	Similar to ribosomal protein L36	3		
	IPI00463297.4	Similar to ribosomal protein L36	3		2
	IPI00474487.1	12 kDa protein	3		2
	IPI00555019.1	Rpl36 protein	3		
	IPI00808085.1	60S ribosomal protein L36 homolog	3		
	IPI00230679.5	60S ribosomal protein L36	2		
	IPI00656330.1	Similar to ribosomal protein L36	2		
	IPI00662722.1	Similar to ribosomal protein L36	2		
	IPI00678749.1	Similar to ribosomal protein L36	2		
<b>L36a</b>	IPI00123164.2	12 kDa protein	2		
	IPI00225066.8	60S ribosomal protein L36A	2		
	IPI00474805.1	12 kDa protein	2		
<b>L38</b>	IPI00331121.4	60S ribosomal protein L38			2
	IPI00138302.1	Similar to ribosomal protein L38			2
	IPI00677340.1	Similar to ribosomal protein L38			2
<b>VI . Kontaminationen *</b>					
<b>TOP1</b>	IPI00109764.1	DNA topoisomerase 1	6		10
<b>TOP2</b>	IPI00135443.2	DNA topoisomerase 2-beta			2
<b>PA2G4</b>	IPI00119305.3	proliferation-associated protein 2G4			7
<b>HDAC1</b>	IPI00114232.1	Histone deacetylase 1	2		
	IPI00137668.1	Histone deacetylase 2	2		
	IPI00556893.3	55 kDa protein	2		
	IPI00458262.1	Histone deacetylase 2	2		
<b>Histon H1</b>	IPI00118590.1	H1 histone family, member X		2	
	IPI00228616.5	Histone H1.1		2	
	IPI00331597.6	Histone H1.3		2	
	IPI00223713.5	Histone H1.2		2	
	IPI00230133.5	Histone H1.5			2
<b>Histone H4</b>	IPI00407339.7	Histone H4			2
	IPI00844736.1	12 kDa protein			2
	IPI00621789.1	11 kDa protein			2
	IPI00624933.1	Hist1h4h protein (Fragment)			2
	IPI00621374.1	11 kDa protein			2
	IPI00623776.3	Similar to germinal histone H4 gene			2
	IPI00329998.2	Histone 4 protein			2
	IPI00624840.2	12 kDa protein			2
<b>Histon H2A</b>	IPI00272033.3	Histone H2A type 2-C	2		
	IPI00473818.3	14 kDa protein	2		
	IPI00229545.3	Histone H2A type 1-K	2		
	IPI00229544.3	Histone H2A type 1-H	2		
	IPI00330000.4	Histone H2A type 2-A	2		
	IPI00229542.1	Histone protein Hist1h2aa	2		
	IPI00751267.1	Similar to H2A histone family, member O	2		
	IPI00153400.1	H2afj protein	2		
	IPI00265761.6	Histone H2A type 1	2		
	IPI00229543.3	Histone H2A type 1-F	2		
	IPI00221463.3	Histone H2A type 3	2		
	IPI00473844.3	14 kDa protein	2		
	IPI00752163.1	Similar to H2A histone family, member O	2		
	IPI00756291.1	Similar to H2A histone family, member O	2		
<b>HP1BP3</b>	IPI00649131.4	Heterochromatin protein 1, binding protein 3	2	3	
	IPI00756389.1	Similar to heterochromatin protein 1, binding protein 3	2	3	
	IPI00342766.7	Heterochromatin protein 1, binding protein 3	2	3	
	IPI00649004.1	23 kDa protein			2
	IPI00649600.1	33 kDa protein			2

<b>PARP1</b>	IPI00112473.2	Isoform Long of Poly [ADP-ribose] polymerase 1	4	
	IPI00759945.1	Isoform Short of Poly [ADP-ribose] polymerase 1	3	
	IPI00139168.2	ADP-ribosyltransferase (NAD <sup>+</sup> ; poly (ADP-ribose) polymerase) 1	2	
<b>N-PAC</b>	IPI00817029.1	cytokine-like nuclear factor n-pac isoform 1		2
<b>USP10</b>	IPI00420601.3	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 10		2
<b>Ubiquitin</b>	IPI00755916.2	Ubc protein		2
	IPI00649896.1	Ubiquitin B		2
	IPI00750889.2	Ubc protein		2
	IPI00139518.3	Ubiquitin B		2
	IPI00762833.1	21 kDa protein		2
	IPI00138892.2	Uba52 protein		2
	IPI00762564.1	Ubiquitin		2
<b>PRPS2</b>	IPI00153950.1	Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase-associated protein 2	4	
	IPI00622143.1	PREDICTED: similar to phosphoribosyl pyrophosphate synthetase-associated protein 2	2	
<b>PRPS1</b>	IPI00654144.1	Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1	4	
	IPI00676841.1	Prps1 protein	4	
	IPI00318204.4	Sid6061p	4	
	IPI00554868.2	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 1	4	
	IPI00653091.1	Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1	4	
	IPI00656203.1	1700011K15Rik protein	2	
	IPI00411102.3	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 2	2	
<b>AP2A2</b>	IPI00753468.1	Adaptor protein complex AP-2, alpha 2 subunit	2	
	IPI00310131.5	AP-2 complex subunit alpha-2	2	
<b>SEC23IP</b>	IPI00648142.1	Sec23 interacting protein		2
	IPI00116752.7	SEC23-interacting protein		2
<b>VAPA</b>	IPI00125267.4	Vesicle-associated membrane protein-associated protein A	2	
<b>ENTH</b>	IPI00648186.4	Novel ENTH domain containing protein		3
	IPI00754096.1	Epsin 4 (Epsin-related protein) (EpsinR) (Enthoprotin) homolog		3
	IPI00403139.2	Isoform 2 of Clathrin interactor 1		3
	IPI00400154.5	Isoform 1 of Clathrin interactor 1		3
<b>SUCLG2</b>	IPI00134809.1	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial precursor	3	
<b>MEST</b>	IPI00754963.2	Isoform 2 of mesoderm-specific transcript protein		2
	IPI00118545.2	Isoform 1 of mesoderm-specific transcript protein		2
<b>ADP/ATP translocase1</b>	IPI00751119.1	Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, adenine nucleotide translocator), member 4		2
	IPI00676622.1	Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, adenine nucleotide translocator), member 4 isoform 2		2
	IPI00115564.5	ADP/ATP translocase 1		2
<b>YARS</b>	IPI00314153.4	Tyrosyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	2	

**Tabelle 7.2: Über Massenspektrometrie identifizierte Proteine der endogenen Btz- bzw. Stau2-RNPs**

Die Eluate der mit anti-Btz bzw. anti-Stau2 Antikörpern durchgeführten Immunpräzipitationen wurden massenspektrometrisch analysiert. Die aus je zwei unabhängigen Immunpräzipitationen resultierenden Daten wurden abgeglichen und manuell miteinander vereinigt (s. Abschnitt 3.8.6). Sofern für eine und dieselbe Acc. No. zwei unterschiedliche *unique peptide hits* in den beiden Experimenten identifiziert wurden, so wurde zu Gunsten der höheren Zahl entschieden. Die Proteine sind in fünf Klassen eingeteilt: I. RNA-bindende Proteine (RBPs); II. Kinasen, Phosphatasen, Transferasen; III. Motorproteine und Cytoskelett-assoziierte Proteine; IV. weitere Proteine, die nicht in die anderen Gruppen fallen V. Ribosomale Proteine sowie Kontaminationen (VI.). Die Gruppen I., IV und V wurden wie angegeben weiter unterteilt.

1 angegeben ist jeweils die Anzahl der unique peptide hits, die für die in Spalte 2 aufgeführte Acc.No. (IPI, Version 3.21 und 3.26 European Bioinformatics Institute, [www.ebi.ac.uk/IPI/](http://www.ebi.ac.uk/IPI/)) identifiziert wurde.

\* teilweise wurden Peptide dieser Proteine auch in der entsprechenden Negativkontrolle identifiziert

## **Danke**

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. Dr. hc. N. Blin für die Betreuung dieser Arbeit, die vorbehaltlose Unterstützung und speziell die, trotz des Termindruckes, schnelle Begutachtung der Arbeit.

Prof. Dr. Michael Kiebler für die Vergabe des interessanten Themas und die Möglichkeit in seinem Labor arbeiten zu dürfen.

Ganz besonders danke ich Prof. Dr. Paolo Macchi und Dr. Ralf Dahm für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, ihre fortwährende Unterstützung und die vielen nützlichen Ratschläge in jeglicher Beziehung.

Mein spezieller Dank geht an Martina Schwarz für eine herausragende und freundschaftliche Zusammenarbeit, ihre Unterstützung und zahlreiche lustige Stunden an der Laborbank.

Dr. Keiryn Bennett für die Durchführung zahlreicher massenspektrometrischer Analysen.  
Dr. Martin Bilban für die Durchführung der Genchip-Analyse.

Ganz herzlichen Dank an Kerstin Buhler, Fabian Tübing, Angelo Vaccani, John P. Vessey und Manuel Zeitelhofer für die äußerst angenehme und freundschaftliche Zusammenarbeit, die vielen Aufmunterungen und die vielen fachlichen sowie auch nicht so fachlichen Tipps.

Sabine Thomas für die Bereitstellung zahlreicher embryonaler Gehirne und viele lustige Stunden.

Dr. Eric Arn für die Einarbeitung in viele biochemische Methoden.

Bei allen weiteren ehemaligen und neuen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Kiebler möchte ich mich für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft bedanken.

Dr. Carsten Pusch und Dr. Nicola Schug der Arbeitsgruppe Blin, die immer ein offenes Ohr für das „Goldhändchen“ hatten.

