

**Barentsz – Bestandteil eines konservierten  
Ribonucleoprotein-Komplexes aus dem Rattenhirn**

**DISSERTATION**

**der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen**

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

**2004**

**vorgelegt von**

**SVEN KRÖNING**

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Dezember 2004  
Dekan: Prof. Dr. Stefan Laufer  
1. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Michael Kiebler  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Gabriele Dodt

---

## Inhaltsverzeichnis:

<b>1. Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Einleitung</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1 Lokalisierung von mRNAs in polarisierten Zellen</b> .....	<b>2</b>
<b>2.2 Mechanismen der mRNA-Lokalisierung</b> .....	<b>4</b>
2.2.1 Postleitzahlen und <i>cis</i> -agierende Elemente .....	4
2.2.2 Postboten und <i>trans</i> -agierende Faktoren .....	5
2.2.3 Motorproteine .....	7
<b>2.3 Rolle von Barentsz bei der Lokalisierung von <i>oskar</i> mRNA in</b> <i>Drosophila melanogaster</i> .....	<b>8</b>
<b>2.4 Lokalisierung von mRNAs in polarisierten Neuronen</b> .....	<b>11</b>
<b>2.5 Identifizierung von Komponenten der mRNA-Transportmaschinerie</b> .....	<b>12</b>
<b>2.6 Aufgabenstellung</b> .....	<b>15</b>
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>16</b>
<b>3.1 Material</b> .....	<b>16</b>
3.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	16
3.1.2 Enzyme .....	19
3.1.3 Antikörper .....	19
3.1.3.1 Primärantikörper .....	19
3.1.3.2 Sekundärantikörper .....	22
3.1.4 Plasmide .....	22
3.1.5 Oligonukleotide (Primer) .....	22
3.1.6 Geräte .....	23
3.1.7 Rotoren .....	24
3.1.8 Tiere .....	25
3.1.9 Bakterien .....	25
3.1.10 Säugerzellen .....	25
3.1.11 Puffer und Lösungen .....	25
3.1.11.1 Expression und Reinigung von Proteinen .....	25
3.1.11.2 Analyse von Proteinen .....	26
3.1.11.3 Analyse von DNA und RNA .....	29
3.1.11.4 Zellkultur .....	29
3.1.11.5 Zell- und Gewebeextraktion .....	30
3.1.11.6 Gelfiltrations-Chromatographie .....	31

<b>3.2 Methoden</b> .....	<b>31</b>
<b>3.2.1 Herstellung von bakteriell exprimiertem Antigen</b> .....	<b>31</b>
3.2.1.1 Expression der Proteine in <i>E.coli</i> .....	31
3.2.1.2 Reinigung von Polyhistidin-Fusionsproteinen .....	32
3.2.1.3 Reinigung von GST-Fusionsproteinen .....	32
3.2.1.4 Vorbereitung des Antigens zur Injektion .....	32
<b>3.2.2 Gewinnung von polyklonalen Antikörpern</b> .....	<b>33</b>
3.2.2.1 Immunisierung von Mäusen .....	33
3.2.2.2 Immunisierung von Kaninchen .....	33
3.2.2.3 Gewinnung der Seren .....	33
3.2.2.4 Affinitätsreinigung von Antikörpern .....	33
<b>3.2.3 Transfektion von Säugerzellen</b> .....	<b>34</b>
<b>3.2.4 Analyse von Proteinen</b> .....	<b>35</b>
3.2.4.1 Protein-Bestimmung nach Bradford .....	35
3.2.4.2 Proteinfällung mit Trichloressigsäure .....	35
3.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	35
3.2.4.4 Zweidimensionale Gelelektrophorese .....	36
3.2.4.5 Western Blotting .....	37
3.2.4.6 Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen .....	37
3.2.4.7 Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen .....	38
3.2.4.8 North-Western Blotting .....	38
<b>3.2.5 Isolierung von Proteinen</b> .....	<b>39</b>
3.2.5.1 Herstellung von Zellextrakten .....	39
3.2.5.2 Herstellung von Gewebeextrakten .....	39
3.2.5.3 Differentielle Zentrifugation .....	39
3.2.5.4 Gelfiltrations-Chromatographie .....	40
3.2.5.5 RNase-Behandlung .....	40
3.2.5.6 DNase-Behandlung .....	40
3.2.5.6 Behandlung mit alkalischer Phosphatase .....	41
3.2.5.7 Immunpräzipitation .....	41
<b>3.2.6 Analyse von RNA</b> .....	<b>42</b>
3.2.6.1 RNA-Isolierung aus Immunpräzipitationen mit anti-Barentsz Antikörpern .....	42
3.2.6.2 Amplifikation von RNAs mittels RT-PCR .....	42
3.2.6.3 Radioaktive reverse Transkription .....	43
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>44</b>
<b>4.1 Gewinnung und Charakterisierung von spezifischen anti-Barentsz   Antikörpern</b> .....	<b>44</b>
<b>4.1.1 anti-Barentsz Antiseren aus der Maus</b> .....	<b>44</b>
<b>4.1.2 anti-Barentsz Antiseren aus Kaninchen</b> .....	<b>45</b>
<b>4.1.3 Affinitätsreinigung der anti-Barentsz Antiseren aus Kaninchen</b> .....	<b>47</b>
<b>4.2 Expressionsstudien von Barentsz in Hirngeweben der Ratte</b> .....	<b>51</b>

<b>4.3 Interaktion von Barentsz mit Staufen1</b> .....	<b>53</b>
<b>4.3.1 Barentsz interagiert mit Staufen1-HA in BHK-Zellen</b> .....	<b>54</b>
<b>4.3.2 RNA-abhängige Interaktion von Barentsz mit Staufen1-HA in BHK-Zellen</b> .....	<b>56</b>
<b>4.3.3 Interaktion von Barentsz mit Staufen1 in Hirnextrakten der Ratte</b> .....	<b>61</b>
<b>4.4 Nachweis weiterer Interaktionspartner von Barentsz</b> .....	<b>64</b>
<b>4.4.1 Barentsz interagiert mit Staufen2-HA in BHK-Zellen</b> .....	<b>64</b>
<b>4.4.2 Identifizierung von RNAs in Barentsz-Komplexen in Hirnextrakten der Ratte</b> .....	<b>66</b>
<b>4.4.3 Identifizierung weiterer Interaktionspartner von Barentsz in Hirnextrakten der Ratte</b> .....	<b>68</b>
<b>4.5 Identifizierung von Kinesin-Motorproteinen als mögliche Interaktionspartner von Barentsz</b> .....	<b>72</b>
<b>4.5.1 Assoziation von zwei Kinesin-Motorproteinen mit Barentsz-Komplexen</b> ..	<b>72</b>
<b>4.5.2 Charakterisierung der Interaktion von Barentsz mit Kinesin-Motorproteinen</b> .....	<b>75</b>
4.5.2.1 Barentsz interagiert mit KHC in Hirnextrakten der Ratte .....	<b>75</b>
4.5.2.2 Charakterisierung der Interaktion von Barentsz mit KIF-150 .....	<b>75</b>
4.5.2.3 Interaktion von Barentsz mit Kinesin-Motorproteinen in Hirnextrakten adulter Ratten .....	<b>78</b>
4.5.2.4 Einfluß der Salzkonzentration auf die Interaktion von Barentsz mit Kinesin-Motorproteinen .....	<b>79</b>
4.5.2.5 RNA-unabhängige Interaktion von Barentsz mit Kinesin-Motorproteinen .....	<b>82</b>
4.5.2.6 Phosphorylierungs-abhängige Interaktion von Barentsz mit Kinesin-Motorproteinen .....	<b>82</b>
<b>4.5.3 Identifizierung von assoziierten Proteinen aus Barentsz-Komplexen</b> .....	<b>83</b>
4.5.3.1 Molekulare Identifizierung des KIF-150 .....	<b>84</b>
4.5.3.2 Identifizierung von assoziierten Proteinen aus Barentsz-Komplexen .....	<b>88</b>
4.5.3.3 Größenfraktionierung von löslichen Barentsz-Komplexen über Gelfiltration .....	<b>90</b>
4.5.3.4 Auftrennung von anti-Barentsz Immunpräzipitationen über 2D-Gelelektrophorese .....	<b>92</b>
<b>4.6 Depletion von Barentsz aus Hirnextrakten der Ratte</b> .....	<b>94</b>
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>99</b>
<b>5.1 Barentsz und Staufen sind Teil eines konservierten mRNP-Komplexes</b> .....	<b>99</b>
<b>5.2 Identifizierung weiterer Komponenten von Barentsz-Komplexen</b> .....	<b>101</b>
<b>5.3 Existenz von verschiedenen Barentsz-Komplexen im Rattenhirn</b> .....	<b>105</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>107</b>

**Abkürzungsverzeichnis:**

2D-Gelelektrophorese	zweidimensionale Gelelektrophorese
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AR	Affinitätsreinigung
Arc	<i>activity regulated cytoskeleton associated gene</i>
BC1	<i>brain cytoplasmic 1</i>
BDM	2,3-Butandion-2-monoxim
BHK	<i>baby hamster kidney</i>
BSA	Rinderserum-Albumin
Btz	Barentsz
CaMKII $\alpha$	$\alpha$ -Untereinheit der Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	(3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-1-propansulfonat
CIP	<i>calf intestine phosphatase</i>
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DOC	Desoxycholat
dsRBD	Doppelstrang-RNA-Bindedomäne
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF	eukaryontischer Initiationsfaktor
ER	endoplasmatisches Reticulum
Exu	Exuperantia
FKS	fötale Kälberserum
FMRP	fragiles X mentales Retardationsprotein
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	Hämagglutinin
HBSS	<i>HEPES buffered saline solution</i>
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
hnRNP	heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein
HRP	Meerrettichperoxidase
hts	hu-li-tai-shao
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IP	Immunpräzipitation
IPG	immobilisierter pH-Gradient
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranosid
KH	hnRNP K-homolog
KHC	schwere Kette von Kinesin ( <i>kinesin heavy chain</i> )
KIF	<i>kinesin family protein</i>
KIF-150	Kinesin-Motorprotein mit einem Molekulargewicht von 150 kDa
MAP1B	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MAP1B HC	schwere Kette von MAP1B
MAP1B LC	leichte Kette von MAP1B
MBP	<i>myelin basic protein</i>
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
OD	optische Dichte
P100	Pellet nach Zentrifugation mit 100.000 g

PABP	poly(A)-bindendes Protein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pI	isoelektrischen Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pur $\alpha$	<i>purine rich single-stranded DNA binding protein alpha</i>
RBD	RNA-Bindedomäne
rER	rauhes endoplasmatisches Reticulum
RNA	Ribonucleinsäure
RNP	Ribonucleoprotein-Partikel
RRM	<i>RNA recognition motif</i>
S100	Überstand nach Zentrifugation mit 100.000 g
SDS	Natriumdodecylsulfat
Stau	Staufen
TAP	<i>tandem affinity purification</i>
TB-RBP	<i>testis- and brain-specific RNA-binding protein</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNAs	<i>transfer-RNA</i>
U/min	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
Vg1	<i>vegetal hemisphere protein 1</i>
Vg1RBP	Vg1-RNA-Bindeprotein
WT	Wildtyp
ZBP	<i>zipcode binding protein</i>

## 1. Zusammenfassung

Bei komplexen Hirnfunktionen wie z. B. der Gedächtnisbildung werden einzelne Kontaktstellen zwischen Nervenzellen durch die lokale Aktivität bestimmter Proteine moduliert. Der Transport der entsprechenden mRNAs in die Dendriten von Neuronen und deren anschließende lokale Translation an aktivierten Synapsen stellt hierbei einen möglichen Mechanismus dar. Staufen-Proteine spielen bei diesem Transportprozeß entlang von Mikrotubuli vom Zellkörper an die Synapsen eine wichtige Rolle. Weitere, daran beteiligte Proteine sind jedoch noch weitgehend unbekannt. Daher war ein Ziel meiner Doktorarbeit, Komponenten dieser Ribonucleoprotein-Partikel (RNPs) zu identifizieren.

In *Drosophila melanogaster* sind Staufen, Barentsz sowie die schwere Kette von Kinesin (KHC) essentielle Proteine, die an der Lokalisierung von *oskar* mRNA an den posterioren Pol der Oocyte beteiligt sind. Daher habe ich mich zunächst mit der Frage beschäftigt, ob Säuger-Barentsz eine Komponente der Staufen/mRNP-Komplexe in Neuronen darstellt. Über Immunpräzipitationen gelang mir der Nachweis, daß Barentsz mit Staufen1 und zwei Staufen2-Isoformen interagiert. Diese Interaktion ist RNA-abhängig und erfolgt über die konservierte Domäne von Barentsz. Interessanterweise kommen sowohl die dendritisch lokalisierte *BCI* RNA sowie mehrere noch nicht identifizierte mRNAs in den Barentsz-Komplexen vor. Weiterhin interagiert Barentsz mit dem eukaryontischen Initiationsfaktor eIF4AIII, dem RNA-Bindeprotein FMRP, der leichten und schweren Kette von MAP1B sowie mehreren noch nicht identifizierten RNA-Bindeproteinen.

Im zweiten Teil meiner Doktorarbeit untersuchte ich, ob ein Kinesin-Motorprotein in diesen RNPs vorhanden ist. Wiederum gelang mir über Immunfällungen der Nachweis, daß Barentsz mit einem noch nicht identifizierten Kinesin mit einem Molekulargewicht von 150 kDa sowie mit KHC interagiert. Barentsz liegt in Gehirnextrakten phosphoryliert vor. Da eine Dephosphorylierung von Barentsz die Interaktion mit KHC verstärkt, könnte dies eine Regulation des Transportprozesses darstellen.

Zusammenfassend legen diese Ergebnisse nahe, daß Staufen, Barentsz und KHC Proteine eines konservierten Komplexes darstellen, der für die mRNA-Lokalisierung in verschiedenen Organismen verantwortlich ist.

## 2. Einleitung

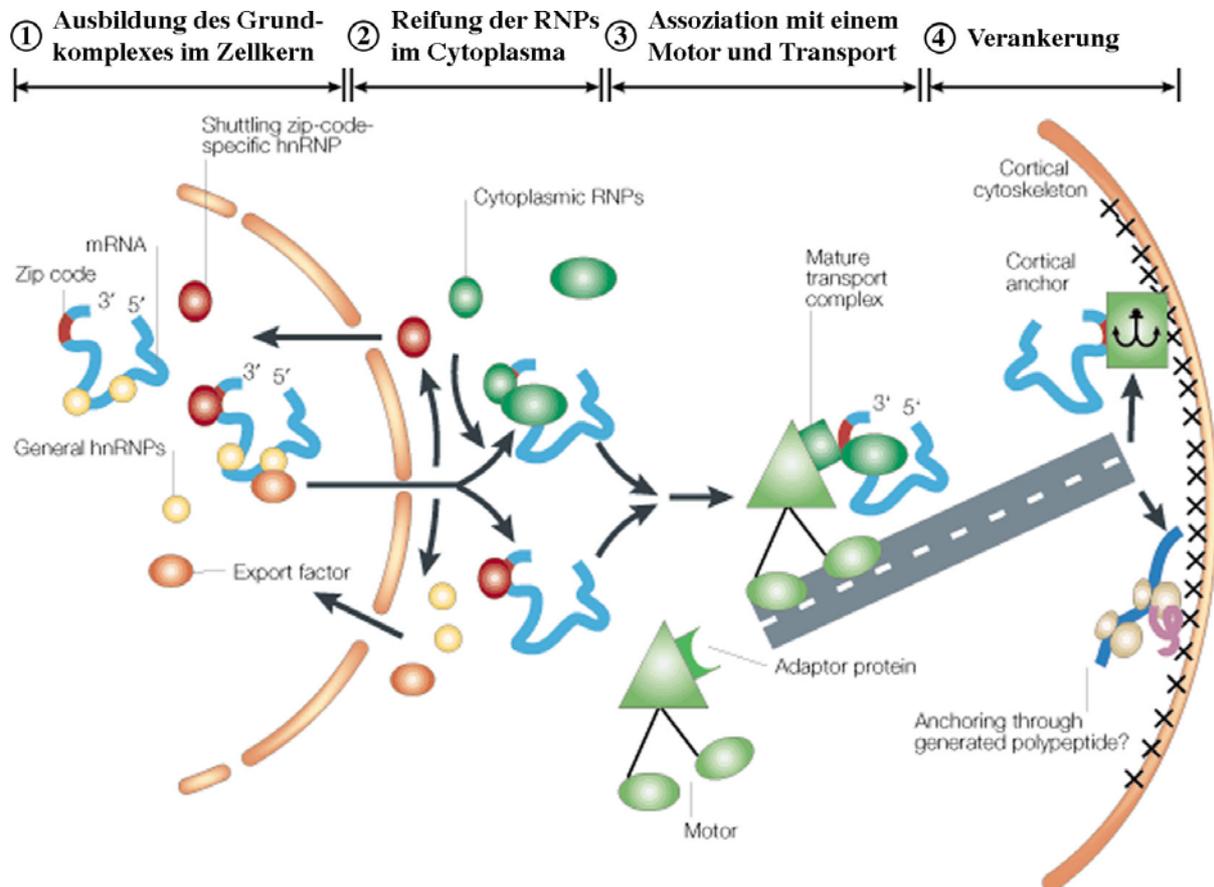
Eine grundlegende Eigenschaft von eukaryontischen Zellen ist deren Aufteilung in verschiedene Zellkompartimente, die jeweils ein bestimmtes Repertoire an Proteinen enthalten. Um bestimmte Proteine in einem Zellkompartiment anzureichern, nützt die Zelle zwei verschiedene Mechanismen. Viele Proteine werden nach ihrer Synthese im Cytoplasma in einem posttranslationalen Prozeß in Zellorganellen wie z. B. Zellkerne, Mitochondrien oder Peroxisomen importiert. Meistens dient hierbei eine spezifische Peptidsequenz als Sortiersignal. In einem zweiten Mechanismus wird die asymmetrische Proteinverteilung durch eine Lokalisierung der entsprechenden Boten-RNA (mRNA von *messenger*-RNA) erreicht, die anschließend im entsprechenden Zellkompartiment lokal translatiert wird.

### 2.1 Lokalisierung von mRNAs in polarisierten Zellen

Seit der Entdeckung der ersten lokalisierten mRNA durch Jeffery und Mitarbeiter im Jahr 1983 wurden mittlerweile mehr als 90 lokalisierte mRNAs identifiziert (Jansen, 2001). Die mRNA-Lokalisierung ist ein universeller Mechanismus und wird in Einzellern, Pflanzen und Tieren dazu benützt, um zelluläre Asymmetrien und Zellpolarität auszubilden (St Johnston, 1995). In Eizellen sowie frühen Embryonen findet man zahlreiche lokalisierte mRNAs. Während der Oogenese und Embryogenese von *Drosophila melanogaster* werden beispielsweise mehr als 20 mRNAs lokalisiert, in der Eizelle des Krallenfrosches *Xenopus laevis* mehr als 25 (Jansen, 2001). Aber auch in somatischen Zellen wie Neuronen, Gliazellen, Fibroblasten oder Epithelzellen werden zahlreiche mRNAs lokalisiert, um während der Differenzierungsphase Polarität auszubilden und diese anschließend aufrecht zu erhalten.

Die Lokalisierung von mRNAs hat verschiedene biologische Funktionen. In *Saccharomyces cerevisiae* wird durch die Lokalisierung von *Ash1* mRNA zur Spitze der Tochterzelle verhindert, daß die Tochterzelle den Paarungstyp wechseln kann (Long *et al.*, 1997; Takizawa *et al.*, 1997). In *Drosophila melanogaster* bestimmt die Lokalisierung der *oskar* mRNA zum posterioren Pol der Oocyte, wo das Abdomen und die Keimbahn angelegt werden, während die Lokalisierung von *bicoid* mRNA zum anterioren Pol festlegt, wo sich Kopf und Thorax ausbilden (Ephrussi und Lehmann, 1992; Driever, 1993; Lasko, 1999). In Säuger-Neuronen spielt die Translation von dendritisch lokalisierten mRNAs möglicherweise eine Rolle bei der Ausbildung von synaptischer Plastizität und Gedächtnis (Kiebler und DesGroseillers, 2000; Smith *et al.*, 2001; Steward und Schuman, 2001). Die mRNA-Lokalisierung stellt zudem eine elegante Alternative dar, wie Proteinsynthese in bestimmten Zellkompartimenten verhindert

werden kann. So führt eine fehlerhafte Lokalisierung von *oskar* oder *nanos* mRNA zu schweren Mißbildungen während der Entwicklung (Gavis und Lehmann, 1992; Smith *et al.*, 1992; Ephrussi und Lehmann, 1992).



**Abbildung 1: Vierstufiges Modell des mRNA-Transports (aus Jansen, 2001).**

**① Ausbildung des Grundkomplexes im Zellkern.** Heterogene nukleäre Ribonukleoproteine (hnRNPs) binden das Transkript (in blau) im Zellkern. Neben den generellen hnRNPs (gelbe Kreise) erkennen dabei spezielle hnRNPs (rote Ovale) die Lokalisierungssequenz der mRNA, die sogenannte Postleitzahl oder engl. *zip code*. Anschließend assoziieren sowohl die nicht lokalisierten als auch die lokalisierten mRNAs mit Proteinen, die am mRNA-Export beteiligt sind (orangefarbene Ovale), und es erfolgt der Transport der mRNP-Komplexe ins Cytoplasma.

**② Reifung der RNPs im Cytoplasma.** Die generellen hnRNPs und die Exportfaktoren werden zurück in den Zellkern transportiert, die speziellen hnRNPs bleiben hingegen mit der mRNA assoziiert. Manche dieser speziellen hnRNPs können durch cytoplasmatische RNPs (grüne Ovale) ersetzt oder auch ergänzt werden.

**③ Assoziation mit einem Motor und Transport.** Die reifen RNP-Komplexe assoziieren mit einem Motorprotein (grünes Dreieck), in den meisten Fällen geschieht dies sehr wahrscheinlich über Adaptorproteine. Anschließend werden die RNP-Komplexe in dieser Form an ihren Bestimmungsort transportiert. Während des Transports wird die Translation durch gebundene Repressoren unterdrückt (hier nicht dargestellt).

**④ Verankerung.** Im letzten Schritt werden die RNPs von den Motorproteinen freigesetzt und am Zielort durch spezifische Ankerproteine (grünes Rechteck) am Cytoskelett verankert. Eine zweite Möglichkeit der Verankerung besteht durch einen Translations-abhängigen Prozeß.

## 2.2 Mechanismen der mRNA-Lokalisierung

Die drei wichtigsten Modelle für die Lokalisierung von mRNAs sind erleichterte Diffusion in Kombination mit Verankerung am Bestimmungsort (Glotzer *et al.*, 1997), lokale Stabilisierung der Transkripte (Ding *et al.*, 1993) sowie aktiver Transport (Wilhelm und Vale, 1993). Bei bestimmten mRNAs kann es auch zu einem Zusammenspiel verschiedener Mechanismen kommen.

Es wird angenommen, daß die meisten mRNAs über aktiven Transport lokalisiert werden. Dieser Prozeß benötigt ein intaktes Cytoskelett sowie Motorproteine, die sich entlang dieser Cytoskelett-Filamente bewegen. Ein Modell für diesen Prozeß wurde erstmalig 1993 von James Wilhelm und Ron Vale vorgeschlagen. Jüngste Studien legen jedoch nahe, dieses Modell um einen weiteren Schritt zu erweitern. Dieses modifizierte, vierstufige Modell des mRNA-Transports ist in Abbildung 1 dargestellt. Im ersten Schritt binden RNA-Bindeproteine im Zellkern die Lokalisierungssignale der entsprechenden mRNAs und es kommt zur Ausbildung sogenannter Ribonucleoprotein-Partikel (RNPs). Nach dem Export ins Cytoplasma erfolgt dort die Reifung der RNPs (Schritt 2). Anschließend assoziieren die Komplexe mit Motorproteinen, welche die mRNPs entlang des Cytoskeletts in die entsprechenden Zellkompartimente transportieren (Schritt 3). Im letzten Schritt werden dann die mRNAs an ihrem Bestimmungsort verankert, um die Diffusion der lokalisierten Transkripte zu verhindern.

### 2.2.1 Postleitzahlen und *cis*-agierende Elemente

Jeder Brief benötigt eine Adresse, um richtig zugestellt werden zu können. Einen wichtigen Teil der Adresse stellt die Postleitzahl (engl. *zip code*) dar. Daher wurde im Jahr 1993 von Robert Singer der Ausdruck „*zip code*“ als Bezeichnung für die *cis*-agierenden Lokalisierungselemente von mRNAs vorgeschlagen.

Die meisten Lokalisierungssignale befinden sich in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) der mRNA. Eine Schwierigkeit bei der Identifizierung von *cis*-agierenden Elementen ist jedoch die Tatsache, daß sie kein gemeinsames Strukturmerkmal aufweisen. Manche Signale bestehen aus kurzen Abschnitten mit einer genau definierten Nukleotid-Sequenz oder aus sich wiederholenden kurzen Sequenzen, wie beispielsweise die *Vg1* oder die  $\beta$ -*aktin* mRNA in *Xenopus* bzw. im Huhn (Mowry und Melton, 1992; Kislauskis *et al.*, 1994; Deshler *et al.*, 1997). Andererseits werden manche Lokalisierungssignale durch komplexe Sekundär- und Tertiärstrukturen, wie z. B. Haarnadelstrukturen, definiert, bei denen die Primärsequenz eine weniger wichtige Rolle spielt (Serano und Cohen, 1995; Gonzalez *et al.*, 1999; Chartrand *et*

*al.*, 1999). Manche lokalisierten mRNAs enthalten sogar mehrere Lokalisierungssignale. Diese Signale können überlappende Funktionen besitzen oder auch für aufeinander folgende Lokalisierungsschritte benötigt werden. Beispielsweise wird die *bicoid* mRNA in mehreren Schritten an den anterioren Pol lokalisiert. Diese schrittweise Lokalisierung wird durch die modularen Signale in seiner 3'-UTR wieder gespiegelt (Lasko, 1999).

Interessanterweise gibt es auch mehrere Beispiele in *Drosophila* und in der Hefe, bei denen die *cis*-agierenden Elemente in der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) oder auch im kodierenden Bereich der mRNAs identifiziert wurden (Capri *et al.*, 1997; Saunders und Cohen, 1999; Chartrand *et al.*, 1999; Thio *et al.*, 2000). Zum Beispiel sind in der *gurken* mRNA die Lokalisierungssignale über das gesamte Transkript verteilt: während eine Region in der 5'-UTR für die ersten Lokalisierungsschritte benötigt wird, ist ein Signal in der 3'-UTR für die Lokalisierung in die antero-dorsale Ecke verantwortlich. Außerdem wird angenommen, daß ein 230 Nukleotide umfassendes Element der kodierenden Region essentiell ist, um die mRNA vor Abbau zu schützen oder sie zu verankern (Thio *et al.*, 2000).

### 2.2.2 Postboten und *trans*-agierende Faktoren

Für die Zustellung eines Briefs wird neben einer Adresse mit einer Postleitzahl auch ein Postbote benötigt. Im Fall der Lokalisierung von mRNAs stellen RNA-Bindeproteine die Postboten dar, welche die Postleitzahlen bzw. die Lokalisierungssignale erkennen. Die RNA-Bindeproteine werden auch als *trans*-agierende Faktoren bezeichnet.

Die meisten *trans*-agierenden Faktoren wurden erst in den letzten Jahren identifiziert. Sie können meist drei verschiedenen Proteinfamilien zugeordnet werden (Schnapp, 1999): die heterogenen nukleären Ribonucleoproteine hnRNP (hnRNP A2, B, U, Squid), die *zip code* Bindeproteine (Vg1RBP oder Vera, ZBP-1 und ZBP-2) sowie die Doppelstrang-RNA Bindeproteine (Staufen, Proteinkinase R, RNase III). Die Mitglieder dieser Familien enthalten mindestens eine der folgenden drei RNA-Bindedomänen: die RRM-Domäne (*RNA recognition motif*), die hnRNP K homologe (KH-) Domäne sowie die Doppelstrang-RNA Bindedomäne (dsRBD). Jedoch konnte bei manchen RNA-Bindeproteinen wie dem *testis- and brain-specific RNA-binding protein* (TB-RBP) sowie She2p bisher kein erkennbares RNA-Bindemotiv identifiziert werden (Wu und Hecht, 2000; Böhl *et al.*, 2000; Long *et al.*, 2000).

Der *trans*-agierende Faktor hnRNP A2 besitzt zwei RRM-Motive sowie eine M9-Domäne, die für das Pendeln zwischen Zellkern und Cytoplasma verantwortlich ist. hnRNP A2 wird hauptsächlich im Zellkern exprimiert und wird dort mit dem Verpacken und Spleißen von

mRNAs in Verbindung gebracht (Hoek *et al.*, 1998). Vor kurzem wurde gezeigt, daß hnRNP A2 neben seinen Funktionen im Zellkern auch an der Lokalisierung der für das Myelin-basische Protein (MBP) kodierenden mRNA in die distalen Fortsätze von Oligodendrocyten der Maus beteiligt ist. Dies war der erste experimentelle Hinweis darauf, daß manche hnRNPs auch im Cytoplasma eine wichtige Rolle bei der mRNA-Lokalisierung spielen. Als weiteres Mitglied der hnRNP-Proteinfamilie wird Squid, das *Drosophila* Homolog des humanen hnRNP A1, bei der Lokalisierung von *gurken* mRNA in die antero-dorsale Ecke der Eizelle benötigt (Norvell *et al.*, 1999).

Die Proteinfamilie des *zip code* Bindeproteins-1 (ZBP-1) ist hoch konserviert. Vg1RBP/Vera in *Xenopus* ist ein Homolog von ZBP-1 im Huhn. Beide Proteine sind zu 78 % identisch und weisen denselben modularen Aufbau mit einem RRM-Motiv sowie vier KH-Domänen auf (Deshler *et al.*, 1998; Havin *et al.*, 1998; Oleynikov und Singer, 1998). Trotz der Konservierung binden ZBP-1 sowie Vg1RBP in verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Lokalisierungssignale und transportieren diese entlang von Aktin- bzw. Mikrotubuli-Filamenten. Beispielsweise bindet ZBP-1 an die *cis*-agierenden Elemente der  $\beta$ -Aktin mRNA, die anschließend entlang des Aktin-Cytoskeletts an die Wachstumsspitze von Fibroblasten-Zellen transportiert wird (Ross *et al.*, 1997). Andererseits erkennt Vg1RBP das Lokalisierungssignal der *Vg1* mRNA, die Mikrotubuli-abhängig an den vegetativen Pol der *Xenopus* Oocyte lokalisiert (Deshler *et al.*, 1998; Havin *et al.*, 1998). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Mitglieder der ZBP-1-Proteinfamilie einerseits hoch konservierte, generelle Faktoren bei der Lokalisierung von mRNAs darstellen, andererseits jedoch als Bindeplattform für verschiedene Transport-Maschinerien fungieren.

Staufen (Stau) ist das am besten charakterisierte Mitglied der dritten Klasse von *trans*-agierenden Faktoren. Genetische Studien in *Drosophila* zeigten, daß Staufen während der Oogenese und Embryogenese an der Lokalisierung von drei Transkripten beteiligt ist (Roegiers und Jan, 2000): Staufen wird für die Verankerung von *bicoid* mRNA am anterioren Pol benötigt; Staufen ist eine essentielle Komponente der Mikrotubuli-abhängigen Lokalisierung von *oskar* mRNA an den posterioren Pol der Eizelle; und außerdem ist Staufen in sich teilenden Neuroblasten an der Lokalisierung von *prospero* mRNA entlang von Aktinfilamenten in eine der beiden Tochterzellen beteiligt. *Drosophila* Staufen enthält fünf Kopien einer dsRBD-Domäne, von denen die Domänen 1, 3 und 4 *in vitro* doppelsträngige RNA binden (St Johnston *et al.*, 1992). Es gibt mehrere Hinweise, daß Staufen bestimmte Sekundärstrukturen wie Haarnadel-Strukturen erkennt (Macdonald *et al.*, 1993; Ferrandon *et al.*, 1997), jedoch bindet Staufen *in vitro* RNAs ohne erkennbare Spezifität. Dies legt nahe,

daß *in vivo* die Spezifität durch zusätzliche Faktoren wie z. B. RNA-Chaperone oder möglicherweise durch weitere RNA-Bindeproteine sichergestellt wird. Vor kurzem wurden zwei Säuger-Homologe von Staufen identifiziert (Marión *et al.*, 1999; Wickham *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2001; Duchaine *et al.*, 2002). In hippocampalen Neuronen bilden die Staufen-Proteine RNA-enthaltende Partikel, die mRNAs in Dendriten transportieren (Köhrmann *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2001). Bisher konnte jedoch noch nicht bestimmt werden, welche lokalisierten mRNAs durch Staufen in die Dendriten befördert werden. Diese Entdeckungen in *Drosophila* und in Säugern sind ein Indiz dafür, daß Staufen einen generellen Faktor bei der Lokalisierung von mRNAs darstellt, der als Teil einer konservierten Transportmaschinerie mRNAs in verschiedenen Organismen und in verschiedenen Zelltypen transportiert.

### 2.2.3 Motorproteine

Die Lokalisierung von mRNAs durch aktiven Transport benötigt ein intaktes Cytoskelett sowie Motorproteine. Der Transport entlang von Aktinfilamenten benötigt Myosin-Motorproteine, während der Mikrotubuli-abhängige Transport auf Dynein- oder Kinesin-Motorproteine angewiesen ist. Alle drei Typen von Motorproteinen sind am Transport von mRNAs beteiligt (Jansen, 2001; Tekotte und Davis; 2002; Heredia und Jansen, 2004).

Der Transport der *Ash1* mRNA in *Saccharomyces cerevisiae* stellt die am besten verstandene Myosin-abhängige mRNA-Lokalisierung dar. Das unkonventionelle Myosin-Motorprotein She1/Myo4p assoziiert hierbei über das RNA-Bindeprotein She2p sowie das Adaptorprotein She3p mit der *Ash1* mRNA (Chartrand *et al.*, 2001). Dieser Protein-Komplex ist außerdem an der Lokalisierung von 21 weiteren mRNAs beteiligt (Shepard *et al.*, 2003). Interessanterweise erfolgt ohne die Assoziation mit den zu transportierenden mRNP-Komplexen keine Lokalisierung von She1/Myo4p an seinen Bestimmungsort. Des weiteren deuten Versuche mit dem Myosin-ATPase-Inhibitor 2,3-Butandion-2-monoxim (BDM) darauf hin, daß der Transport von  $\beta$ -aktin mRNA in Hühner-Fibroblasten ebenfalls auf ein Myosin-Motorprotein angewiesen ist (Oleynikov und Singer, 2003).

Für die Lokalisierung von mRNAs durch Kinesin-Motorproteine gibt es mehrere Beispiele. Die Lokalisierung der *MBP* mRNA in Oligodendrocyten erfolgt in einem Mikrotubuli-abhängigen Mechanismus durch Kinesin, einem Plus-Ende-Motorprotein (Carson *et al.*, 1997). Des weiteren spielt die schwere Kette von Kinesin (KHC) bei der Lokalisierung von *oskar* mRNA an den posterioren Pol der Oocyte eine essentielle Rolle (Brendza *et al.*, 2000). Es konnte bisher jedoch noch nicht eindeutig geklärt werden, ob KHC die *oskar* mRNA auf direktem Wege an den posterioren Pol transportiert und wie die *oskar* mRNA an KHC

gekoppelt ist (Glotzer *et al.*, 1997; Cha *et al.*, 2002; Palacios und St Johnston, 2002). Außerdem legt eine Studie mit antisense-Oligonukleotiden nahe, daß KHC auch für die Lokalisierung der  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II $\alpha$  (CaMKII $\alpha$ ) mRNA in die Dendriten von hippocampalen Neuronen verantwortlich ist (Severt *et al.*, 1999; siehe auch Abschnitt 2.5).

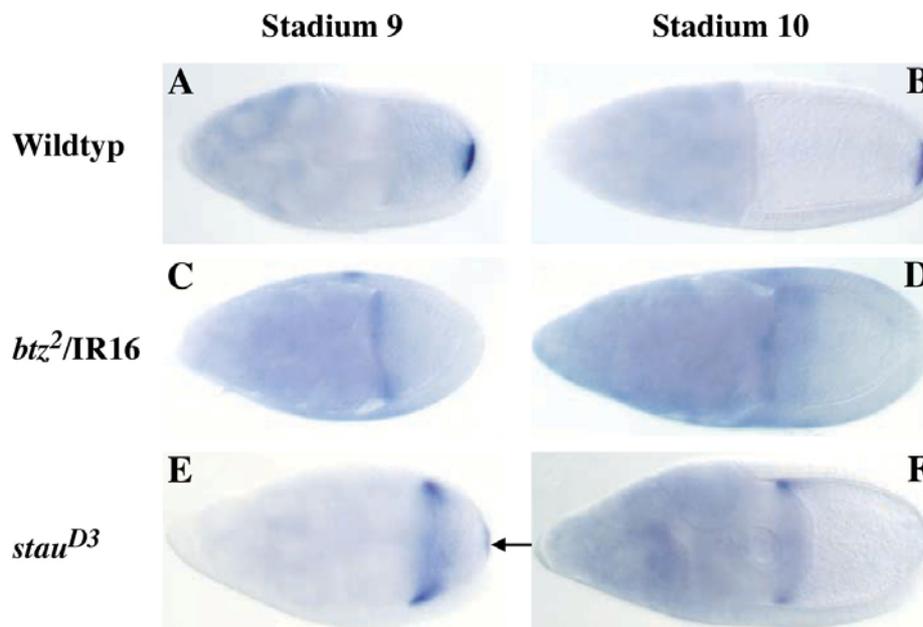
Neben den während der Oogenese lokalisierten maternalen mRNAs erfahren auch zahlreiche zygotische Transkripte während der Embryogenese von *Drosophila melanogaster* eine asymmetrische Verteilung. Durch Mikroinjektionen von Fluoreszenz-markierten RNAs in Kombination mit inhibitorischen Antikörpern wurde gezeigt, daß cytoplasmatisches Dynein, ein Minus-Ende-Motorprotein, für die Lokalisierung der *fushi tarazu* und *runt* mRNAs benötigt wird (Wilkie und Davis, 2001). Des Weiteren spielt das cytoplasmatische Dynein auch bei der Lokalisierung von mRNAs in der Oocyte eine wichtige Rolle: die Inhibition von cytoplasmatischem Dynein verhindert dabei die anteriore Lokalisierung von *bicoid* mRNA (Duncan und Warrior, 2002; Januschke *et al.*, 2002). Überraschenderweise ist bei dieser Lokalisierung auch ein Kinesin-Motorprotein beteiligt. In einer möglichen Erklärung für diesen scheinbaren Widerspruch wird inaktives Dynein durch Kinesin an die Plus-Enden der Mikrotubuli transportiert und somit recycelt. Anschließend steht das Dynein für einen weiteren Transport von *bicoid* mRNA zur Verfügung.

### **2.3 Rolle von Barentsz bei der Lokalisierung von *oskar* mRNA in *Drosophila melanogaster***

Die Ausbildung der Keimbahn sowie des Abdomens beruht auf der Lokalisierung von *oskar* mRNA an den posterioren Pol der Oocyte (Ephrussi *et al.*, 1991; Kim-Ha *et al.*, 1991). Während des Entwicklungsstadiums 9 der Oogenese sammelt sich die *oskar* mRNA vorübergehend am anterioren Pol der Oocyte, bevor sie an den posterioren Pol wandert. Die Lokalisierung vom anterioren zum posterioren Pol benötigt ein intaktes Mikrotubuli-Cytoskelett, was durch eine Behandlung mit Colchicin gezeigt werden konnte (Clark *et al.*, 1994). Außerdem ist die posteriore Lokalisierung von *oskar* mRNA spezifisch blockiert in Mutanten für *staußen*, *khc*, *mago nashi*, *tsunagi*, *tropomyosin II* sowie *eIF4AIII* (Ephrussi *et al.*, 1991; Kim-Ha *et al.*, 1991; Brendza *et al.*, 2000; Newmark und Boswell, 1994; Mohr *et al.*, 2001; Erdélyi *et al.*, 1995; Tetzlaff *et al.*, 1996; Palacios *et al.*, 2004).

Vor kurzem konnte mit Barentsz (Btz) eine weitere essentielle Komponente der *oskar* mRNA-Transportmaschinerie identifiziert werden (van Eeden *et al.*, 2001). Wie bereits

publiziert, konnten die Autoren in *stau<sup>D3</sup>*-Mutanten während des Stadiums 10 keine Lokalisierung von *oskar* mRNA an den posterioren Pol nachweisen, jedoch wiesen diese Mutanten im Stadium 9 geringe Mengen an lokalisierter *oskar* mRNA auf (siehe Abbildung 2 E und F; die lokalisierte *oskar* mRNA im Stadium 9 ist mit einem Pfeil markiert). Den ersten Hinweis auf eine Beteiligung von Barentsz bei der posterioren Lokalisierung von *oskar* mRNA erhielten die Autoren in *btz<sup>2</sup>*-Mutanten, bei denen *oskar* mRNA weder im Stadium 9 noch im Stadium 10 am posterioren Pol nachweisbar ist. Statt dessen verbleibt die *oskar* mRNA bis zum Stadium 10 B am anterioren Pol. Aufgrund dieses Phänotyps wurde das Gen nach Willem Barentsz benannt, einem holländischen Seefahrer, der im 16. Jahrhundert auf dem Seeweg eine Nordost-Passage nach China finden wollte, jedoch im Packeis vor Novaya Zemlya stecken blieb.

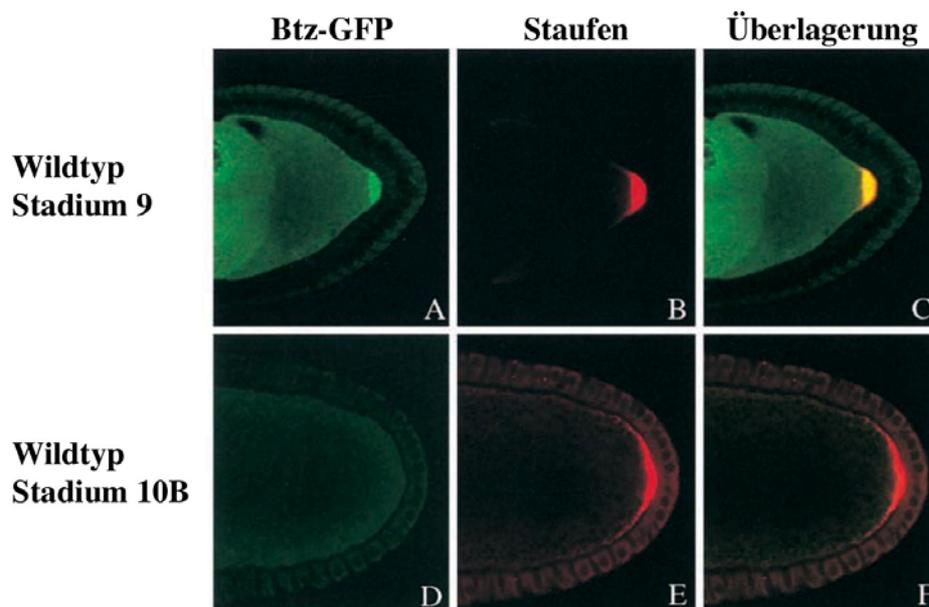


**Abbildung 2: Barentsz ist essentiell für die Lokalisierung von *oskar* mRNA zum posterioren Pol (aus van Eeden *et al.*, 2001).**

Lokalisierung von *oskar* mRNA im Stadium 9 (linke Seite) und Stadium 10 (rechte Seite) in Wildtyp- (A und B), *btz<sup>2</sup>/DF(3R)IR16*- (C und D) sowie *stau<sup>D3</sup>*-Eikammern (E und F). *btz<sup>2</sup>*, *stau<sup>D3</sup>* und *DF(3R)IR16* stellen jeweils Null-Mutationen dar. Die posterior lokalisierte *oskar* mRNA in *stau<sup>D3</sup>*-Mutanten während des Stadiums 9 ist mit einem Pfeil markiert.

Barentsz-Protein lokalisiert in der Oocyte zusammen mit *oskar* mRNA. In den Stadien 1 bis 6 der Oogenese sind sowohl Barentsz als auch *oskar* mRNA am posterioren Pol der Eizelle zwischen Zellkern und den benachbarten Follikelzellen lokalisiert. Im Stadium 8 erfolgt eine Verteilung im gesamten Cytoplasma der Eizelle. Diese frühen Lokalisierungen scheinen jedoch unabhängig voneinander aufzutreten, da die *barentsz*-Mutanten hier keinen Effekt auf

die Lokalisierung von *oskar* mRNA haben. Übereinstimmend mit seiner Rolle beim Transport von *oskar* mRNA lokalisiert Barentsz wie auch *oskar* mRNA und Staufen-Protein während des Stadiums 9 an den posterioren Pol: die Colokalisation eines Fusionsproteins bestehend aus Barentsz und dem grün-fluoreszierenden Protein (GFP) sowie endogenem Staufen-Protein ist in Abbildung 3 A – C zu sehen. Barentsz tritt jedoch im Gegensatz zu Staufen-Protein (siehe Abbildung 3 E) und *oskar* mRNA nur vorübergehend am posterioren Pol auf und die Lokalisierung verschwindet im Stadium 10 wieder (siehe Abbildung 3 D). Diese Ergebnisse sowie weitere Versuche mit verschiedenen Mutanten und transgenen Fliegen deuten darauf hin, daß Barentsz während des Transports vom anterioren zum posterioren Pol in einem gemeinsamen Komplex mit Staufen und *oskar* mRNA vorliegt. Außerdem legen die Lokalisierungen von *oskar* mRNA in *barentsz*- und in *khc*-Mutanten ein Modell nahe, in dem Barentsz möglicherweise als Adaptorprotein zwischen dem *oskar* mRNP-Komplex und KHC fungiert oder es für die Aktivierung des Motorproteins sorgt, sobald der Komplex ausgebildet ist.



**Abbildung 3: Transiente Colokalisierung von Barentsz mit Staufen am posterioren Pol der Eizelle (aus van Eeden *et al.*, 2001).**

Lokalisierung von Barentsz-GFP (A und D) und Staufen (B und E) sowie die überlagerten Bilder (C und F). Barentsz-GFP und Staufen colokalisieren im Stadium 9 (A – C) am posterioren Pol. Im Stadium 10 B verschwindet die Anreicherung von Barentsz-GFP am posterioren Pol (D). Im Gegensatz dazu bleibt Staufen dort verankert (E).

## 2.4 Lokalisierung von mRNAs in polarisierten Neuronen

In *Drosophila melanogaster* werden zahlreiche mRNAs während der Oogenese und Embryogenese in bestimmte Zellkompartimente lokalisiert, um deren Körperachsen festzulegen. Die Lokalisierung bestimmter mRNAs in die Dendriten von Säugerneuronen und die anschließende Proteinsynthese an aktivierten Synapsen ist möglicherweise für die strukturelle Reorganisation und damit eventuell für die Gedächtnisbildung verantwortlich. Bisher ist jedoch nur sehr wenig über den molekularen Mechanismus der Gedächtnisbildung bekannt. Einen wichtigen Schritt bei der Entschlüsselung dieses Vorgangs stellte die Entdeckung dar, daß Inhibitoren der Proteinsynthese das Langzeitgedächtnis blockieren (Goelet *et al.*, 1986). Lange Zeit nahm man an, daß die Proteinsynthese nur im Zellkörper der Nervenzellen auftritt. Jedoch löste die Entdeckung von Polyribosomen in oder in der Nähe von postsynaptischen Dornenfortsätzen, den sog. *spines*, durch Steward und Lewy im Jahr 1982 sowie die Entdeckung einer für das Mikrotubuli-assoziierte Protein2 (MAP2) kodierenden mRNA durch Garner und Mitarbeiter im Jahr 1988 ein Umdenken aus. Heute gilt es als gesichert, daß nach speziellen physiologischen Signalen die lokale Proteinsynthese in den postsynaptischen Dornen aktiviert wird. Man nimmt nun in diesem Zusammenhang an, daß dies eine lang anhaltende Veränderung der synaptischen Stärke und somit Gedächtnisbildung bewirkt.

Mittlerweile wurde eine ganze Reihe von mRNAs identifiziert, die in die Dendriten von Neuronen des zentralen Nervensystems lokalisieren (Bashirulla *et al.*, 1998; Kuhl und Skehel, 1998; Tiedge *et al.*, 1999). Sie kodieren für Cytoskelett-Proteine (MAP2 und Arc), Proteinkinasen (CaMKII $\alpha$ ), Ca<sup>2+</sup>-Bindeproteine (Dendrin und Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptor Typ I) und sogar integrale Membranproteine (Glycin-Rezeptoren und Glutamat-Rezeptoren). Des weiteren wurden auch nicht-kodierende RNAs wie BC1 und BC200 (*brain cytoplasmic*) in Dendriten nachgewiesen (Tiedge *et al.*, 1991 und 1993). Diese beiden RNA-Polymerase III Transkripte scheinen im Zusammenwirken mit dem fragilen X mentalen Retardationsprotein (FMRP) die Translation von lokalisierten mRNAs zu inhibieren (Zalfa *et al.*, 2003).

Vor kurzem gelang es, mehrere *trans*-agierende Faktoren zu identifizieren, die bei der dendritischen Lokalisierung von mRNAs eine Rolle spielen. So konnte gezeigt werden, daß die zu *Drosophila* homologen Säuger-Proteine Staufen1 und Staufen2 in die Dendriten von polarisierten hippocampalen Neuronen lokalisieren. Staufen1 colokalisiert außerdem mit RNA-enthaltenden Partikeln, die sich Mikrotubuli-abhängig in beide Richtungen der Dendriten bewegen (Köhrmann *et al.*, 1999). Auf die Identifizierung weiterer Komponenten

der mRNA-Transportmaschinerie in Säuger-Neuronen über verschiedenste Methoden werde ich im folgenden Kapitel näher eingehen.

## 2.5 Identifizierung von Komponenten der mRNA-Transportmaschinerie

Bei der Untersuchung der mRNA-Lokalisierung galt bis vor einigen Jahren das Hauptinteresse der Identifizierung und Charakterisierung der *cis*-agierenden Signale der lokalisierten mRNAs. Um den molekularen Mechanismus verstehen zu können, mit dem mRNAs in bestimmte Zellkompartimente lokalisiert werden, wurden daher in den letzten Jahren mehrere Studien durchgeführt, die mit Hilfe von verschiedenen genetischen und biochemischen Methoden die bei der Lokalisierung beteiligten *trans*-agierenden Faktoren und Motorproteine identifizierten und charakterisierten.

In zahlreichen genetischen Studien wurden mehrere Komponenten der *oskar* mRNA-Transportmaschinerie in *Drosophila* identifiziert. Auf diese Weise konnte neben dem ersten *trans*-agierenden Faktor Staufen auch die folgenden Komponenten als essentielle Faktoren des *oskar* mRNA-Lokalisierungskomplexes nachgewiesen werden: Barentsz, das Kinesin-Motorprotein KHC sowie Mago nashi (St Johnston *et al.*, 1991; van Eeden *et al.*, 2001; Brendza *et al.*, 2000; Newmark und Boswell, 1994). In einem eleganten genetischen Screen gelangen Martin und Mitarbeiter (2003) die Identifizierung zahlreicher neuer Gene, welche für die korrekte Lokalisierung eines GFP-Staufen-Fusionsproteins, einem Marker für die Lokalisierung von *oskar* und *bicoid* mRNA, in lebenden *Drosophila* Oocyten notwendig sind. Die hierbei untersuchten Mutanten beeinträchtigten die Organisation des Mikrotubuli-Cytoskeletts, den Transport sowie die Verankerung der mRNAs. In einer weiteren Studie benützten Wilhelm und Mitarbeiter (2000) ein Fusionsprotein bestehend aus GFP und Exuperantia (GFP-Exu), um anschließend durch Immunpräzipitationen mit anti-GFP Antikörpern einen aus acht Proteinen bestehenden Komplex zu isolieren. Älteren genetischen Studien zufolge ist Exuperantia neben Swallow und Staufen in der Lokalisierung von *bicoid* mRNA impliziert (Berleth *et al.*, 1988; St Johnston *et al.*, 1989). Überraschenderweise wurde bei der Isolierung des Exu-enthaltenden Komplexes jedoch keine *bicoid* mRNA, sondern *oskar* mRNA nachgewiesen. Bei den vorangegangenen genetischen Studien ist die Beteiligung von Exuperantia bei der Lokalisierung von *oskar* mRNA möglicherweise übersehen worden, da *exu*-Mutanten nur eine geringere Menge an *oskar* mRNA lokalisieren. Über ein Two-Hybrid-System in der Hefe wurden des weiteren die leichte Kette von Dynein, eine essentielle Komponente des cytoplasmatischen Dynein-Komplexes (King *et al.*, 1996),

als Interaktionspartner von Swallow sowie Tsunagi (dem *Drosophila* Homolog des humanen Y14) als Interaktionspartner von Mago nashi identifiziert, die daher als Komponenten der *bicoid* bzw. *oskar* mRNA-Transportmaschinerie in Betracht kommen (Schnorrer *et al.*, 2000; Mohr *et al.*, 2001).

Zur Identifizierung von RNA-Bindeproteinen wird häufig ein sog. EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) verwendet. Dabei kommt es durch die Assoziation der RNA-Bindeproteine mit der RNA zu einer Veränderung der Wanderungsgeschwindigkeit der proteinbeladenen Fragmente während der Gelelektrophorese. Durch ein spezielles Reinigungsschema isolierten Arn und Mitarbeiter (2003) einen aus mehreren Proteinen bestehenden Komplex, der in einem solchen Versuch ein minimales Lokalisierungssignal der *bicoid* mRNA bindet. Der Komplex besteht aus den RNA-Bindeproteinen Modulo, dem Poly(A)-Bindeprotein (PABP), Smooth und Swallow sowie Nod, einem Mitglied der Kinesin-Familie. Andererseits bindet der Komplex mit reduzierter Affinität an mutierte Transkripte, was die Beteiligung dieses Komplexes bei der Lokalisierung von *bicoid* mRNA bekräftigt. Außerdem konnten die Autoren durch genetische Experimente zeigen, daß Modulo, das bisher noch nicht an der mRNA-Lokalisierung impliziert war, bei den Lokalisierungen der beiden *bicoid* und *hu-li-tai-shao* (*hts*) mRNAs beteiligt ist. Interessanterweise zeigen die einzelnen RNA-Bindeproteine jedoch im Gegensatz zum gesamten Komplex keine hohe Bindungsspezifität. Daher schlagen die Autoren vor, daß bei diesem Komplex die Affinität und Spezifität der RNA-Bindung durch die Summe mehrerer Interaktionen mit niedriger Affinität zustande kommt.

In einer weiteren Studie wurde TB-RBP als genereller *trans*-agierender Faktor des Y-Elements, einem Lokalisierungssignal der dendritisch lokalisierten *ligatin* und *CaMKII $\alpha$*  mRNAs, in hippocampalen Neuronen in einem EMSA identifiziert (Severt *et al.*, 1999). In Anwesenheit von antisense-Oligonukleotiden, die komplementär zum Y-Element sind, kommt es zu einer Aufhebung der RNA-Protein-Interaktion und somit zu einem verminderten Transport der endogenen *ligatin* und *CaMKII $\alpha$*  mRNAs in die Dendriten von hippocampalen Neuronen. Dies bestätigt die Beteiligung des Y-Elements bei der dendritischen Lokalisierung beider mRNAs. Weitere Versuche mit antisense-Oligonukleotiden deuten darauf hin, daß KHC für die dendritische Lokalisierung von *CaMKII $\alpha$*  mRNA verantwortlich ist, jedoch war kein Effekt für *ligatin* mRNA sowie für nicht lokalisierte mRNAs zu erkennen. Somit scheint *ligatin* mRNA durch ein anderes Motorprotein in die Dendriten transportiert zu werden.

Krichevsky und Kosik (2001) wählten für die Isolierung und Charakterisierung von Ribonucleoprotein-Partikeln aus kultivierten Neuronen eine Auftrennung über Saccharose-Gradienten. Dabei sahen sie vier verschiedene RNA-Fractionen: leichte mRNP-Komplexe, freie Ribosomen, translationsaktive Polyribosomen sowie eine schwere Fraktion unterhalb der Polysomen. Diese letzte Fraktion war in Saccharose-Gradienten von HEK293-, PC12- oder COS-Zelllinien nicht vorhanden, was darauf hindeutet, daß diese Fraktion Neuronenspezifisch ist. Bei einer Untersuchung dieser Fraktion über Elektronenmikroskopie fanden die Autoren Ansammlungen von vielen dicht gepackten Ribosomen mit einer Größe von 150 – 1.000 nm. Da diese Ribosomen-Ansammlungen Staufen, einem Marker für RNA-Granula in Dendriten (Kiebler *et al.*, 1999; Köhrmann *et al.*, 1999), enthielten, wurden sie als RNA-Granula bezeichnet. Interessanterweise beinhalteten diese RNA-Granula weder eukaryontische Initiationsfaktoren (eIF2 $\alpha$ , eIF4E, eIF4G) noch tRNAs, was darauf hin deutet, daß diese Granula wahrscheinlich translational inaktiv sind. Durch eine Depolarisierung der Neuronen kam es zu einer Umstrukturierung der RNA-Granula mit einer weniger dichten Packung an Ribosomen. Außerdem bewirkte die Depolarisierung eine Umverteilung in den vier RNA-Fractionen. Einerseits nahm die Menge der Polysomen ab, gleichbedeutend mit einer geringeren Gesamt-Proteinsynthese. Andererseits kam es jedoch zu einer verstärkten Assoziation von mRNAs, die mit synaptischer Plastizität in Verbindung gebracht werden (CaMKII $\alpha$ , trkB und NMDA-Rezeptor 1), mit Polysomen und zu einer Abnahme der entsprechenden mRNAs in den RNA-Granula. Die Autoren spekulierten daher, daß diese Verschiebung nach der Depolarisierung möglicherweise eine Art makromolekulare Kontrolle der Translation speziell in Neuronen darstellt.

Das DNA- und RNA-Bindeprotein Pur $\alpha$  wird im Cytoplasma von Neuronen stark exprimiert. Es ist mit Polysomen assoziiert und außerdem für die dendritische Lokalisierung von BC1 RNA verantwortlich (Ohashi *et al.*, 2000). In einer weiteren Studie zeigten Ohashi und Mitarbeiter (2002) durch Immunpräzipitationen mit anti-Pur $\alpha$  Antikörpern, daß nach Behandlung mit EDTA ein Komplex bestehend aus Pur $\alpha$ , Staufen, FMRP, Myosin Va und einigen weiteren Proteinen mit unbekannter Identität sowie nicht identifizierter mRNAs von den Polysomen freigesetzt wird. Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, daß dieser Komplex möglicherweise über das rauhe endoplasmatische Reticulum (rER) mit KHC assoziiert ist. Daher schlugen die Autoren vor, daß dieser Komplex bestehend aus Pur $\alpha$ , KHC und Myosin Va den Transport von Polyribosomen entlang von Mikrotubuli und Aktin-Filamenten vermitteln könnte.

## 2.6 Aufgabenstellung

Schon seit einiger Zeit war bekannt, daß Staufen während der frühen Entwicklung von *Drosophila melanogaster* für die Lokalisierung von mehreren Transkripten beteiligt ist (Roegiers und Jan, 2000). Neuere Ergebnisse legen nahe, daß das Säuger-Homolog von Staufen am RNA-Transport in Dendriten von Neuronen beteiligt ist (Kiebler und DesGroseillers, 2000). Des weiteren konnten van Eeden und Mitarbeiter im Jahr 2001 zeigen, daß Barentsz wie auch Staufen eine essentielle Komponente der *oskar* mRNA-Transportmaschinerie darstellt. Daher stellte sich die Frage, ob das Säuger-Homolog von Barentsz auch bei der Lokalisierung von mRNAs in Säugerneuronen eine wichtige Rolle spielt – möglicherweise in einem konservierten Komplex zusammen mit Staufen. Im ersten Versuchsteil habe ich daher spezifische anti-Barentsz Antikörper hergestellt, um zu untersuchen, ob Barentsz in Hirngeweben der Ratte exprimiert wird. Im zweiten Versuchsteil sollte dann über Immunpräzipitationen herausgefunden werden, ob Barentsz und Staufen auch in Säugerzellen miteinander interagieren und welche Domäne von Barentsz diese Interaktion bewirkt. Da Staufen ein RNA-Bindeprotein darstellt, wirft dies natürlich die Frage auf, ob und welche RNAs mit dem Barentsz/Staufen-Komplex assoziiert sind. In einem dritten Versuchsteil war mein Ziel, weitere Interaktionspartner von Barentsz in Rattenhirn-Extrakten zu identifizieren. Dabei habe ich mich mit der Frage beschäftigt, ob Barentsz möglicherweise als Adaptorprotein für Kinesin-Motorproteine fungiert, und somit den Transport der Barentsz/Staufen-Komplexe in die Dendriten vermitteln könnte.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Aceton	Merck, Darmstadt
30 % Acrylamid-Mix	Roth, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Ampholyte 3/10	BioRad, München
[ <sup>32</sup> P-γ]ATP	Amersham Pharmacia, Freiburg
BHK-21 Medium-Pulver	Gibco Life Technology, Karlsruhe
100-bp-DNA-Leiter	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Bradford-Färbelösung	BioRad, München
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Centriplus YM-30 (30 kDa MWCO)	Millipore, Eschborn
(3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS)	Sigma, Taufkirchen
Chloroform (für die Molekularbiologie)	Fluka, Taufkirchen
Chloroform p.a.	Merck, Darmstadt
CNBr-aktivierte Sepharose <sup>®</sup> 4B	Amersham Pharmacia, Freiburg
Coomassie Brilliant Blau R250	Merck, Darmstadt
Criterion Precast Gel 4 – 15 % Tris·HCl 12 + 2 comb	BioRad, München
[ <sup>32</sup> P-α]dCTP	Amersham Pharmacia, Freiburg
Desoxycholat, Natrium-Salz (DOC)	Sigma, Taufkirchen
Destilliertes Wasser (eigene Herstellung mit Millipore-Anlage)	Millipore, Eschborn
Diethylether	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham Pharmacia, Freiburg
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Fluka, Taufkirchen

Ethylendiamintetraacetat, Natrium-Salz (EDTA)	Sigma, Taufkirchen
Falcon-Röhrchen (15 ml und 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Fötales Kälberserum (FKS)	Gibco Life Technology, Karlsruhe
Freund's Reagenz	Sigma, Taufkirchen
FuGene Transfektions-Reagenz	Roche, Mannheim
Glucose	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Promocell, Heidelberg
Glutardialdehyd	Merck, Darmstadt
Glutathion Sepharose <sup>TM</sup> 4 Fast Flow	Amersham Pharmacia, Freiburg
Glutathion	Roche, Mannheim
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glykogen	Roche, Mannheim
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma, Taufkirchen
Hyperfilm	Amersham Pharmacia, Freiburg
IPG strip pH 5 – 8, 11 cm	BioRad, München
Imidazol	Merck, Darmstadt
Iodacetamid	Fluka, Taufkirchen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma, Taufkirchen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Mikroreaktionsgefäße (1,5 ml und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Milchpulver	Frema Reform, Lüneburg
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Sigma, Taufkirchen
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt

Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Merck, Darmstadt
Natrium-o-vanadat	Merck, Darmstadt
Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
Nitrocellulose-Membran (0,2 µm)	Schleicher & Schuell, Dassel
OptiMem	Gibco Life Technology, Karlsruhe
Page Ruler Protein Ladder	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Penicillin	Gibco Life Technology, Karlsruhe
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (24:25:1; pH 4,7)	Fluka, Taufkirchen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth, Karlsruhe
o-Phosphorsäure 85 %	Merck, Darmstadt
Poly(rI)·Poly(rC)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Ponceau S	Merck, Darmstadt
Prestained Broad Range Protein Standard	BioRad, München
Protein A Sepharose CL-4B	Amersham Pharmacia, Freiburg
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	BioRad, München
Proteinase-Inhibitor-Cocktail, EDTA-frei	Roche, Mannheim
Pyruvat	Promocell, Heidelberg
QIAQuick <sup>®</sup> PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Random Primer H <sub>6</sub>	Invitrogen, Karlsruhe
Reaktionsgefäße für PCR	PeQLab, Erlangen
Rinderserum-Albumin (BSA)	Calbiochem, Schwalback
RNase-Inhibitor	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Roti <sup>®</sup> -Blue kolloidale Coomassie-Färbung	Roth, Karlsruhe
Salzsäure, rauchend (37 %)	Merck, Darmstadt
Sephacryl S300 HR	Amersham Pharmacia, Freiburg
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Steritop Filter	Millipore, Eschborn
Streptomycin	Gibco Life Technology, Karlsruhe
Thioharnstoff	Merck, Darmstadt
Trichloressigsäure (TCA)	Merck, Darmstadt

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Trypton	Roth, Karlsruhe
Tween-20	Roth, Karlsruhe
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman, München
Vivaspin 6 Concentrator (50 kDa MWCO PES)	Vivascience, Hannover
Vivaspin 20 Concentrator (50 kDa MWCO PES)	Vivascience, Hannover
Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Whatman 3 MM Chromatographie Papier	VWR, Bruchsal

### 3.1.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DNase I, RNase frei	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
MuLV-Rreverse Transkriptase	Genaxxon, Stafflangen
Proteinase K	Roche, Mannheim
RNase A	Sigma, Taufkirchen
RNase A/T1-Mix	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
SuperScript™ II reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Taq-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4 Polynukleotid-Kinase	New England Biolabs, Frankfurt

### 3.1.3 Antikörper

#### 3.1.3.1 Primärantikörper

Angegeben ist jeweils die Verdünnung für Western Blotting

Maus anti-Barentsz 1:500

Dieses Antiserum wurde im Rahmen dieser Arbeit hergestellt.

Antigen: His<sub>6</sub>-Btz<sub>NT</sub>.

Das Antigen wurde in *E.coli* exprimiert und unter nativen Bedingungen mittels Affinitätschromatographie (Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose) gereinigt. Nach Auftrennung über SDS-PAGE wurde die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten, lyophilisiert und in PBS resuspendiert. Jeweils 50 – 200 µg Antigen wurden pro Maus injiziert.

Kaninchen anti-Barentsz	1:10.000 (anti-Btz2) 1:10.000 (anti-Btz3) 1:2.000 (anti-Btz12)
Diese affinitätsgereinigten Antikörper wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Antigen: His <sub>6</sub> -Btz <sub>CT</sub> . Das Antigen wurde in <i>E.coli</i> , exprimiert und unter nativen Bedingungen mittels Affinitätschromatographie (Ni <sup>2+</sup> -NTA-Agarose) gereinigt. Jeweils 750 – 1.000 µg Antigen wurden pro Kaninchen injiziert. Für die Isolierung spezifischer Antikörper mittels Affinitätsreinigung wurden GST-Btz <sub>CT</sub> -Affinitätssäulen verwendet.	
Kaninchen anti-Calnexin Von Stressgene/BioMol, Hamburg	1:1.000
Kaninchen anti-eIF4AIII Von Dr. N. Sonenberg, Universität Montreal, Canada Peptidantikörper, beschrieben in Li <i>et al.</i> , 1999	1:1.000
Maus anti-Fragile X-Mental Retardation Protein (FMRP) Von Chemicon, Hofheim	1:1.000
Kaninchen anti-Green Fluorescent Protein (GFP) Von Molecular Probes, Leiden, Holland	1:2.000
Maus anti-Green Fluorescent Protein (GFP) Von Clontech, Heidelberg	1:2.000
Ziege anti-GST Von Amersham Pharmacia, Freiburg	1:2.000
Maus anti-HA (Klon HA.11) Von Babco/Eurogentec, Köln	1:1.000
Kaninchen anti-HIPYR Von Dr. Vladimir Gelfand, Universität Illinois, USA Als Antigen diente das Peptid HIPYR, das nahe der ATP-Bindungsstelle liegt und in Kinesin-Motorproteinen hochkonserviert ist (Sawin <i>et al.</i> , 1992). Spezifische Antikörper wurden mittels Affinitätsreinigung isoliert. Siehe auch Kaninchen anti-LAGSE	1:1.000
Maus anti-His Von Qiagen, Hilden	1:1.000
Maus anti-Kinesin Heavy Chain (anti-KIF; SUK4) Von Babco/Eurogentec, Köln Antigen: 130 kDa Kinesin Heavy Chain aus Seeigel Epitop: C-Terminus der Motordomäne; zeigt Kreuzreaktivität mit Kinesinen aus <i>Drosophila melanogaster</i> und Rind, beschrieben in Ingold <i>et al.</i> , 1988	1:1.000
anti-Kinesin Heavy Chain (anti-KHC) Von Chemicon, Hofheim Antigen: Kinesin Heavy Chain aus Rinderhirn Epitop: N-Terminus (Motordomäne); zeigt Kreuzreaktivität mit KHC aus Säuger, Huhn, Seeigel und Tintenfisch	1:2.000

- Kaninchen anti-LAGSE 1:1.000  
 Dr. Vladimir Gelfand, Universität Illinois, USA  
 Als Antigen diente das Peptid LAGSE, das nahe der ATP-Bindungsstelle liegt und in Kinesin-Motorproteinen hochkonserviert ist (Sawin *et al.*, 1992). Spezifische Antikörper wurden mittels Affinitätsreinigung isoliert. Siehe auch Kaninchen anti-HIPYR
- Kaninchen anti-MAP1B Heavy Chain 1:800  
 Von Dr. F. Propst, Biozentrum der Universität Wien, Österreich  
 Affinitätsgereinigter Peptid-Antikörper
- Kaninchen anti-MAP1B Light Chain 1:1.000  
 Von Dr. F. Propst, Biozentrum der Universität Wien, Österreich  
 Affinitätsgereinigter Peptid-Antikörper
- Maus anti-c-myc (Klon 9E10) 1:1.000  
 Von Sigma, Taufkirchen
- Kaninchen anti-Staufen 1 (Hase K) 1:2.000  
 Dieser affinitätsgereinigte Antikörper wurde von Dr. A. Deitinghoff (AG Kiebler) hergestellt.  
 Antigen: ZZ-Stau1<sub>RBD5</sub>-His<sub>6</sub> (Expressionsvektor pNzztev80 stammt von Dr. Dirk Görlich, ZMBH Heidelberg; beschrieben in Mingot *et al.*, 2004).  
 Das Antigen wurde in *E.coli*, exprimiert und unter nativen Bedingungen mittels Affinitätschromatographie (Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose) gereinigt. 1 – 1,5 mg Antigen wurden injiziert. Für die Isolierung spezifischer Antikörper mittels Affinitätsreinigung wurden GST-Stau1<sub>RBD5</sub>-Affinitätssäulen verwendet.
- Kaninchen anti-Staufen 1 (Hase P) Verwendung für Immunpräzipitation  
 Dieser affinitätsgereinigte Antikörper wurde von Dr. A. Deitinghoff (AG Kiebler) hergestellt.  
 Antigen: His<sub>6</sub>-Stau1<sub>CT</sub>.  
 Das Antigen wurde in *E.coli*, exprimiert und unter nativen Bedingungen mittels Affinitätschromatographie (Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose) gereinigt. 1 – 1,5 mg Antigen wurden injiziert. Für die Isolierung spezifischer Antikörper mittels Affinitätsreinigung wurden GST-Stau1<sub>CT</sub>-Affinitätssäulen verwendet.
- Kaninchen anti-Staufen 2 (Hase N) 1:2.000  
 Dieser affinitätsgereinigte Antikörper wurde von Dr. A. Deitinghoff (AG Kiebler) hergestellt.  
 Antigen: ZZ-Stau2<sub>RBD5</sub>-His<sub>6</sub> (Expressionsvektor pNzztev80 stammt von Dr. Dirk Görlich, ZMBH Heidelberg; beschrieben in Mingot *et al.*, 2004).  
 Das Antigen wurde in *E.coli*, exprimiert und unter nativen Bedingungen mittels Affinitätschromatographie (Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose) gereinigt. 1 – 1,5 mg Antigen wurden injiziert. Für die Isolierung spezifischer Antikörper mittels Affinitätsreinigung wurden GST-Stau2<sub>RBD5</sub>-Affinitätssäulen verwendet.
- Rabbit anti-Testis- and Brain-specific RNA-binding Protein (TB-RBP)  
 Von Dr. N. Hecht, Universität von Pennsylvania, USA 1:10.000  
 Affinitätsgereinigter Antikörper, beschrieben in Cho *et al.*, 2004
- Maus anti- $\alpha$ Tubulin 1:10.000  
 Von Sigma, Taufkirchen

## 3.1.3.2 Sekundärantikörper

Angegeben ist jeweils die Verdünnung für Western Blotting

Protein A HRP-konjugiert Von Amersham Pharmacia, Freiburg	1:5.000
Esel anti-Kaninchen IgG HRP-konjugiert Von Amersham Pharmacia, Freiburg	1:5.000
Schaf anti-Maus IgG HRP-konjugiert Von Amersham Pharmacia, Freiburg	1:5.000
Esel anti-Ziege IgG HRP-konjugiert Von Dianova, Hamburg	1:5.000

## 3.1.4 Plasmide

pProEX HT	Invitrogen, Karlsruhe
pGEX 4T	Amersham Pharmacia, Freiburg
Btz-GFP	hergestellt von Dr. P. Macchi (AG Kiebler): cDNA aus Rattenhirn kloniert in pd2EGFP-N1 (Clontech, Heidelberg); beschrieben in Macchi <i>et al.</i> , 2003
Btz	hergestellt von Dr. P. Macchi (AG Kiebler) cDNA aus Rattenhirn kloniert in pd2EGFP-N1, Stop-Codon vor EGFP (Clontech, Heidelberg); beschrieben in Macchi <i>et al.</i> , 2003
Btz <sub>1-158</sub> -GFP, Btz <sub>152-359</sub> -GFP, Btz <sub>1-359</sub> -GFP	hergestellt von Dr. P. Macchi (AG Kiebler) cDNA aus Rattenhirn amplifiziert durch PCR mit sequenzspezifischen Primern, kloniert in pd2EGFP-N1 (Clontech, Heidelberg); beschrieben in Macchi <i>et al.</i> , 2003
Stau1-HA <sub>WT</sub>	hergestellt von Dr. T. Duchaine (Montreal, Kanada) cDNA aus Maus kloniert in pCDNA3/RSV-Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) mit 3 Kopien des HA-Tags; beschrieben in Duchaine <i>et al.</i> , 2000
Stau1-HA <sub>AMA</sub> und Stau1-HA <sub>IV</sub>	hergestellt von Dr. P. Macchi (AG Kiebler) Die Aminosäuren „AMA“ (H <sub>124</sub> MK <sub>126</sub> zu AMA) und sowie vier Aminosäuren „IV“ (H <sub>124</sub> MK <sub>126</sub> ···K <sub>146</sub> K <sub>147</sub> zu AMA···AA) wurden durch den QuickChange Site-directed mutagenesis Kit (Stratagene, Heidelberg) in Stau1-HA <sub>WT</sub> eingefügt
Stau2 <sup>59</sup> -HA und Stau2 <sup>62</sup> -HA	hergestellt von Dr. P. Macchi (AG Kiebler) cDNA aus Maus kloniert in pCDNA3/RSV-Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) mit 3 Kopien des HA-Tags; beschrieben in Macchi <i>et al.</i> , 2004
Axin1-c-myc	hergestellt von Dr. F. Fagotto (Montreal, Kanada) cDNA aus Maus kloniert in pCS2-MT; beschrieben in Fagotto <i>et al.</i> , 1999

## 3.1.5 Oligonukleotide (Primer)

BC1:

Vorwärts: 5'-GGG GTT GGG GAT TTA GCT C-3'  
Rückwärts: 5'-GGT TGT GTG TGC CAG TTA CC-3'

MAP2:  
 Vorwärts: 5'-CAT GCC CCC ATT CCA TCT G-3'  
 Rückwärts: 5'-GGA CCC ACT CCA CAA ACT C-3'

CaMKII $\alpha$ :  
 Vorwärts: 5'-GCA GCC AAC TCA TGT AGA CC-3'  
 Rückwärts: 5'-CCA GTA GCA GAA AGT TTG AGC-3'

$\beta$ -Aktin:  
 Vorwärts: 5'-TTC GCG GGC GAC GAT GCT CC-3'  
 Rückwärts: 5'-CAG GTC CAG ACG CAG GAT GG-3'

Histon H1:  
 Vorwärts: 5'-CTC CGG TTA AAT GGG AGT GG-3'  
 Rückwärts: 5'-CCC GGC ACT AGT TAC ACT TG-3'

GAPDH:  
 Vorwärts: 5'-GAG CTG AAC GGG AAG CTC AC-3'  
 Rückwärts: 5'-GGA GAG TGC TCA GTG TTG GG-3'

### 3.1.6 Geräte

Agarose-Gelkammer	Eigenbau (Werkstatt MPI für Entwicklungsbiologie Tübingen)
Controlled Environment Incubator Shaker	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Criterion Precast Gel System	BioRad, München
Dounce-Homogenisator	über Multimed, Kirchheim/Teck
Drystar Gelrockner	H. Hölzel GmbH, Wörth
Fluo-Link Geldokumentationsanlage	MWG-Biotech, Ebersberg
FPLC-Anlage LCC-500	Amersham Pharmacia, Freiburg
Fraktionssammler Frac-200	Amersham Pharmacia, Freiburg
Gelfiltrationssäule Sephacryl S-300 HR XK26/100	Amersham Pharmacia, Freiburg
GeneQuant pro Spektralphotometer	Amersham Pharmacia, Freiburg
IEF cell	BioRad, München
Inkubationsschüttler, Clim-O-Shake	Kühner, Basel, CH
Laborrührer RGL-55	Heidolph, Schwabach
Lyophilisator CIT2	Leybold-Heraeus, Hanau
Medical Film Processor QX-70	Konica, Hohenbrunn

Minifuge GL	Heraeus, Stuttgart
Mini-Protean 3 Cell SDS-PAGE System	BioRad, München
Optima™ TL Ultrazentrifuge	Beckman, München
PCR Maschine Thermal Cycler, PTC-200 Peltier	MJ Research/Biozym, Oldendorf
pH Meter MP 225	Mettler Toledo, Schwarzenbach, CH
Power Pac 300 Spannungsgerät	BioRad, München
Refrigerated Condensation Trap	Bachofer, Reutlingen
Überkopf-Rotierer RZR-1 und REAX-2	Heidolph, Schwabach
Sonifier B-12	Branson, Danbury, CT (USA)
Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge	Sorvall/Du Pont, Hamburg
Spektralphotometer	Shimadzu, Japan
Thermomixer compact	Eppendorf, Wesseling-Bergdorf
TL-100 Ultrazentrifuge	Beckman, München
Trans-Blot Cell Naßblotzelle	BioRad, München
L7 Ultrazentrifuge	Beckman, München
Vakuumpumpe	AEG, Frankfurt/Main
Vortexer VF2	Janke & Kunkel, Staufen
Zentrifuge 5417C, 5417R	Eppendorf, Wesseling-Bergdorf
Zentrifuge ZK 401	Hermle, Wehingen

### 3.1.7 Rotoren

Rotoren für Zentrifuge ZK 401:

Rotor A 8.24	Hermle, Wehingen
Rotor A 6.9	Hermle, Wehingen

Rotoren für Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge:

Rotor GS3	Sorvall, Du Pont, Hamburg
Rotor SS34	Sorvall, Du Pont, Hamburg

Rotoren für L7 Ultrazentrifuge:

Rotor SW28	Beckman, München
Rotor Ti45	Beckman, München
Rotor Ti60	Beckman, München

Rotor für TL-100 Ultrazentrifuge:

Rotor TLA 100.3

Beckman, München

### 3.1.8 Tiere

Ratten (*Rattus norvegicus domesticus*):  
Stamm Sprague-Dawley (CD)

Charles River, Sulzfeld

Mäuse (*Mus musculus*): Stamm Balb/C

Charles River, Sulzfeld

Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*):  
Hauskaninchenrasse

Eigenzucht bzw. von  
Karl Groß, Wurmlingen

### 3.1.9 Bakterien

One Shot TOP10 kompetente Zellen

Invitrogen, Karlsruhe

Rosetta<sup>TM</sup> (DE3)pLysS

Novagen, Schwalbach

### 3.1.10 Säugerzellen

BHK-21

ATCC, Manassas, USA

HeLa

EMBL Heidelberg

### 3.1.11 Puffer und Lösungen

#### 3.1.11.1 Expression und Reinigung von Proteinen

LB-Medium:

10 g Trypton

5 g Hefeextrakt

10 g Natriumchlorid

⇒ mit NaOH auf pH 7,0 einstellen

⇒ mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen

⇒ autoklavieren

1000x IPTG:

1 M

1.000x Ampicillin:

100 mg/ml in Wasser

1.000x Chloramphenicol:

34 mg/ml in Ethanol

Reinigung von Polyhistidin-Fusionsproteinen:

Lyse-Puffer:

50 mM Natriumphosphat pH 8,0

300 mM NaCl

10 mM Imidazol

Proteinase-Inhibitor-Cocktail (1 Tablette für 25 ml)

Wasch-Puffer: 50 mM Natriumphosphat pH 8,0  
300 mM NaCl  
20 mM Imidazol

Elutions-Puffer: 50 mM Natriumphosphat pH 8,0  
300 mM NaCl  
250 mM Imidazol

#### Reinigung von GST-Fusionsproteinen:

Lyse-Puffer: 1x PBS  
Proteinase-Inhibitor-Cocktail (1 Tablette für 25 ml)

Wasch-Puffer 1: 1x PBS

Wasch-Puffer 2: 50 mM Tris pH 8,0

Elutions-Puffer: 50 mM Tris pH 8,0  
150 mM NaCl  
20 mM Glutathion

#### Affinitätsreinigung von Antikörpern:

Kopplungspuffer: 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
500 mM NaCl

Waschpuffer 1: 100 mM Natriumacetat pH 4,0  
500 mM NaCl

Waschpuffer 2: 100 mM Tris pH 8,0  
500 mM NaCl

Elutions-Puffer: 100 mM Glycin pH 2,5  
150 mM NaCl

#### 3.1.11.2 Analyse von Proteinen

##### SDS-Polyacrylamid-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  
5 % β-Mercaptoethanol

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

### 3. Material und Methoden

Trenngele:	8%	10 %
	Wasser	18,5 ml
	30 % Acrylamid-Mix	10,7 ml
	1,5 M Tris pH 8,8	10 ml
	10 % SDS	400 µl
	10 % APS	400 µl
	TEMED	28 µl
Sammelgel (5 %):	Wasser	13,8 ml
	30 % Acrylamid-Mix	3,3 ml
	1 M Tris pH 6,8	2,5 ml
	10 % SDS	200 µl
	10 % APS	200 µl
	TEMED	20 µl
2D-Gelelektrophorese:		
Rehydrierungspuffer:	7 M Harnstoff	
	2 M Thioharnstoff	
	0,5 % CHAPS	
	0,25 % DTT	
	0,5 % Ampholyte 3/10	
	0,002 % Bromphenolblau	
Äquilibrierungs-Lösung:	6 M Harnstoff	
	0,375 M Tris pH 8,8	
	2 % SDS	
	20 % Glycerin	
Einbettungs-Agarose:	0,8 % Agarose	
	0,002 % Bromphenolblau	
	0,5x SDS-PAGE-Laufpuffer	
Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen:		
Färbe-Lösung:	0,1 % Coomassie Brilliant Blau R 250	
	40 % Methanol	
	10 % Essigsäure	
Entfärbe-Lösung:	40 % Methanol	
	10 % Essigsäure	
Trocknungslösung:	20 % Ethanol	
	3 % Glycerin	
Wäßrige Coomassie-Lösung:	0,05 % Coomassie Brilliant Blau R250	
	in destilliertem Wasser	

#### Kolloidale Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen:

Fixier-Lösung:	79 ml destilliertes Wasser 1 ml o-Phosphorsäure 85 % 20 ml Methanol
Färbe-Lösung:	60 ml destilliertes Wasser 20 ml Methanol 20 ml 5x Roti <sup>®</sup> -Blue Färbelösung
Waschlösung:	25 % Methanol

#### Silber-Färbung von Polyacrylamid-Gelen:

Fixier-Lösung:	40 % Ethanol 10 % Essigsäure
Wasch-Lösung:	30 % Ethanol
Konditionier-Lösung:	0,02 % Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Färbe-Lösung:	0,2 % AgNO <sub>3</sub> 0,02 % Formaldehyd
Entwicklungs-Lösung:	3 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,05 % Formaldehyd 0,0005 % Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Stop-Lösung:	0,5 % Glycin

#### 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 einstellen
TBS-T:	1x TBS mit 0,1 % Tween-20
Blocklösung:	5 % Milchpulver in 1x TBS oder 3 % BSA in 1x TBS

#### North-Western Blotting:

10x TBS:	250 mM Tris 450 mM NaCl 27 mM KCl ⇒ mit konz. HCl auf pH 7,5 einstellen
----------	--

Blocklösung: 10 mM HEPES pH 8,0  
 25 mM NaCl  
 10 mM MgCl<sub>2</sub>  
 0,1 mM EDTA  
 1 mM DTT  
 0,1 % Tween-20

Wasch-Puffer: 10 mM HEPES pH 8,0  
 50 mM NaCl  
 10 mM MgCl<sub>2</sub>  
 0,1 mM EDTA  
 1 mM DTT  
 0,05 % Tween-20

#### 3.1.11.3 Analyse von DNA und RNA

6x Ladepuffer (DNA-Gel): 0,2 % Bromphenolblau  
 60 % Glycerin  
 60 mM EDTA

50x TAE-Lösung: 2 M Tris  
 1 M Essigsäure  
 50 mM EDTA

Agarose-Gel: 2 % Agarose in 1x TAE

10x TBE: 890 mM Tris pH 8,3  
 890 mM Borsäure  
 20 mM EDTA

2x Ladepuffer (RNA-Gel): 60 µl 6x Ladepuffer (DNA-Gel)  
 240 µl Formamid

6 % Polyacrylamid-RNA-Gel: 30 % Acrylamid-Mix 12 ml  
 Harnstoff 25,22 g  
 10x TBE 3 ml  
 ⇒ mit destilliertem Wasser auf 60 ml auffüllen  
 10 % APS 600 µl  
 TEMED 24 µl

#### 3.1.11.4 Zellkultur

GMEM-Medium (für BHK-21): 14,2 g BHK-21 Medium  
 2,75 g Natriumhydrogencarbonat  
 10 ml 1 M HEPES pH 7,3  
 50 ml fötales Kälberserum (FCS)  
 ⇒ mit destilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen  
 ⇒ steril filtrieren und Lagerung bei 4 °C

DMEM-Medium (für HeLa): 450 ml DMEM-Pulvermedium  
5 ml 1,1 % Pyruvat  
5 ml 200 mM L-Glutamin  
50 ml fötales Kälberserum (FCS)  
⇒ pH-Wert mit konz. HCl auf 6,95 einstellen  
⇒ steril filtrieren und Lagerung bei 4 °C

Trypsin-Lösung: 100 ml Trypsin-EDTA  
1 ml 1 M HEPES  
1 ml Penicillin-Streptomycin-Zusatz  
⇒ Lagerung bei -20 °C

#### 3.1.11.5 Zell- und Gewebeextraktion

10x PBS: 1,37 M NaCl  
27 mM KCl  
43 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
14 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
⇒ pH-Wert mit HCl auf pH 7,4 einstellen

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

Lyse-Puffer für Zellextrakte: 50 mM Tris·HCl pH 7,5  
100 mM KCl  
0,5 % Triton X-100  
1 mM PMSF  
Proteinase-Inhibitor-Cocktail (1 Tablette für 10 ml)

Lyse-Puffer für Gewebeextrakte: 50 mM HEPES pH 7,3  
150 mM KCl  
4 mM MgCl<sub>2</sub>  
Proteinase-Inhibitor-Cocktail (1 Tablette für 10 ml)  
40 U/ml RNase-Inhibitor

Lyse-Puffer für RNA-Isolierung aus Hirnextrakten:  
50 mM Tris·HCl pH 7,5  
100 mM KCl  
1 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,5 % Triton X-100  
1 mM PMSF  
Proteinase-Inhibitor-Cocktail (1 Tablette für 10 ml)

RNase-Puffer: 10 mM Tris pH 7,5  
15 mM NaCl

Waschpuffer für Immunpräzipitation (für Zellextrakte):

50 mM Tris·HCl pH 7,5  
100 mM KCl  
0,1 % Triton X-100  
1 mM PMSF

Waschpuffer für Immunpräzipitation (für Gewebeextrakte):

50 mM HEPES pH 7,3  
150 mM KCl  
4 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,5 % Triton X-100  
Proteinase-Inhibitor-Cocktail (1 Tablette für 10 ml)

Waschpuffer für Immunpräzipitation (für RNA-Isolierung aus Hirnextrakten):

50 mM Tris·HCl pH 7,5  
100 mM KCl  
1 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,5 % Triton X-100  
1 mM PMSF

Resuspensionspuffer für P100 (Analyse der Interaktion zwischen Barentsz und FMRP):

50 mM HEPES pH 7,3  
150 mM KCl  
15 mM EDTA  
0,2 % Triton X-100

#### 3.1.11.6 Gelfiltrations-Chromatographie

Lyse-Puffer:

50 mM HEPES pH 7,3  
150 mM KCl  
4 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 mM DTT  
Proteinase-Inhibitor-Cocktail (1 Tablette für 10 ml)  
40 U/ml RNase-Inhibitor

Laufpuffer:

50 mM HEPES pH 7,3  
150 mM KCl  
4 mM MgCl<sub>2</sub>

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Herstellung von bakteriell exprimiertem Antigen

#### 3.2.1.1 Expression der Proteine in *E.coli*

Für die Expression der Proteine werden chemokompetente *E.coli* des Stammes Rosetta mit den entsprechenden Plasmiden durch Hitzebehandlung (45 Sekunden bei 42°C) transformiert. Als Vorkultur werden 50 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C mit 180 U/min geschüttelt. Am nächsten Tag werden 40 ml der Übernacht-Kultur

mit 4 Liter LB-Medium verdünnt und bis zu einer  $OD_{600\text{ nm}}$  von etwa 0,5 wachsen gelassen. Dann wird die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach 3 Stunden werden die Bakterien 15 Minuten mit 4.000 U/min bei 4°C im GS3-Rotor zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren (4.000 U/min, 15 Minuten, 4°C, Minifuge GL) wird das Pellet bis zu seiner Verwendung bei -80°C eingefroren.

#### 3.2.1.2 Reinigung von Polyhistidin-Fusionsproteinen

Das Bakterien-Pellet wird in 90 ml Lyse-Puffer resuspendiert. Nach dem Aufbrechen der Zellen mittels Ultraschall wird das Lysat zur Abtrennung von Zelltrümmern 30 Minuten mit 12.000 U/min bei 4°C im SS34-Rotor zentrifugiert. Der Überstand wird anschließend mit 4 ml Ni-NTA-Agarose eine Stunde im Kühlraum über Kopf rotiert. Nach einer einminütigen Zentrifugation mit 1.000 U/min bei 4°C (Minifuge GL) verbleiben die ungebundenen Proteine im Überstand und können von der Matrix abgetrennt werden. Nach vier Waschschritten mit jeweils 30 ml erfolgt die Elution des gebundenen Antigens in 1-ml-Fractionen. Die gereinigten Polyhistidin-Fusionsproteine werden anschließend bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert.

#### 3.2.1.3 Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Nach der Lyse der Bakterien mittels Ultraschall wird 1 % Triton X-100 zugegeben und anschließend zentrifugiert (12.000 U/min, 30 Minuten, 4 °C, SS34-Rotor). 4 ml Glutathion-Sepharose werden mit PBS äquilibriert, zum Überstand zugegeben und 1 Stunde im Kühlraum über Kopf rotiert. Nach dreimaligem Waschen mit 50 ml PBS und einmaligem Waschen mit 50 mM Tris pH 8,0 wird das gebundene Antigen in 1-ml-Fractionen eluiert. Die gereinigten Proteine werden bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert.

#### 3.2.1.4 Vorbereitung des Antigens zur Injektion

Für die Injektion von Mäusen mit Antigen in denaturierter Form werden die eluierten Proteine zunächst mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Zum Entfernen des SDS wird das Gel vier Mal 15 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend mit wässriger Coomassie-Lösung 10 Minuten angefärbt. Die Nachweisgrenze mit dieser Färbemethode liegt bei 1 – 2 µg. Nach der Entfärbung mit destilliertem Wasser wird die entsprechende Antigen-Bande ausgeschnitten und zerkleinert. Die Gelstücke werden 2 Stunden bei -80°C eingefroren und danach über Nacht lyophilisiert. Am nächsten Tag wird das Gelmaterial zu einem feinen Pulver zermahlen und in PBS mit einer Proteinkonzentration von ca. 0,1 µg/µl aufgenommen.

Für die Immunisierung von Kaninchen mit nativem Antigen werden die gereinigten Antigene durch Verdünnen auf eine Proteinkonzentration von 2 – 3 mg/ml eingestellt. Die Injektion erfolgt mit einer Emulsion aus jeweils 1 Volumen Antigen und Freund's Adjuvant.

#### 3.2.2 Gewinnung von polyklonalen Antikörpern

##### 3.2.2.1 Immunisierung von Mäusen

Zur Gewinnung von Maus anti-Barentsz Antiseren wurden 5 Mäuse des Stammes Balb/C mit 20 µg denaturiertem His<sub>6</sub>-Barentsz<sub>NT</sub> immunisiert. Die Mäuse werden durch intraperitoneale Injektionen am Tag 1, 14, 28 und 35 mit einem Maximalvolumen von 200 µl Antigen-Lösung immunisiert. Nach einer Probeblutung am Tag 42 werden im Abstand von jeweils 7 Tagen weitere Injektionen vorgenommen, bis die Tiere einen guten Antikörper-Titer aufweisen.

Zur Gewinnung der Präimmun- bzw. Probeseren wird Blut aus der Schwanzvene entnommen. Die finale Blutentnahme erfolgt aus dem Herzen unmittelbar nach Tötung der Tiere durch Genickbruch.

##### 3.2.2.2 Immunisierung von Kaninchen

Für die Herstellung der Kaninchen anti-Barentsz Antiseren wurden drei Tiere mit nativem His<sub>6</sub>-Btz<sub>CT</sub> immunisiert. Für die Basisimmunisierung wurden 1 mg, für alle weiteren Immunisierungen, den sog. *Boosts*, 750 µg Antigen pro Tier verwendet.

Die Immunisierung der Kaninchen erfolgt durch jeweils vier subcutane und zwei intramuskuläre Injektionen im Abstand von einem Monat. Zehn Tage nach der zweiten Immunisierung werden die Tiere zum ersten Mal geblutet. Sobald ein guter Antikörper-Titer erreicht ist, werden die Tiere alle vier Tage aus der Ohrvene geblutet.

##### 3.2.2.3 Gewinnung der Seren

Nach einer Inkubation des frischen Blutes von 2 Stunden bei RT bzw. über Nacht bei 4°C wird das Serum durch zwei Zentrifugationen (zuerst 2.500 U/min, 15 Minuten, 4°C, Minifuge GL, dann 10.000 U/min, 15 Minuten, 4°C, SS34-Rotor) gewonnen. Die Lagerung des Serums erfolgt nach Zugabe von 0,05 % Natriumazid bei -20°C.

##### 3.2.2.4 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Zur Isolierung spezifischer Antikörper aus dem jeweiligen Antiserum wird eine Affinitätsreinigung mit dem an eine Matrix kovalent gekoppelten Antigen durchgeführt. Die biospezifische Wechselwirkung mit dem Antigen wird dabei genutzt, die Antikörper aus der

komplexen Mischung des Antiserums reversibel zu adsorbieren. Die Elution der Antikörper erfolgt durch einen Konformationswechsel nach Absenken des pH-Werts.

Im ersten Schritt wird das Antigen kovalent über seine primären Aminogruppen an eine mit Bromcyan aktivierte Sepharose gekoppelt. Zuerst wird die Antigen-Lösung vier Mal gegen Kopplungspuffer dialysiert. 1 g aktivierte Sepharose wird zunächst mit 200 ml 1 mM HCl und danach kurz mit destilliertem Wasser gewaschen, um der Sepharose zugesetzte Additive zu entfernen. Nach der Dialyse werden 7 – 8 mg Antigen zur Sepharose gegeben. Die Kopplung erfolgt über Nacht bei 4°C unter ständiger Rotation. Die Kopplungseffizienz, die üblicherweise bei > 90 % liegt, wird durch eine Protein-Bestimmung des Durchflusses berechnet. Nach dem Waschen mit 25 ml Kopplungspuffer werden die verbliebenen reaktiven Gruppen der Sepharose durch eine zweistündige Inkubation bei RT mit 20 ml 0,1 M Tris pH 8,0 abgesättigt. Daraufhin wird die Affinitätssäule alternierend mit jeweils 25 ml Waschpuffer 1 und Waschpuffer 2 gewaschen. Dieser Zyklus wird drei Mal wiederholt. Abschließend wird die Säule mit 25 ml PBS gewaschen und in PBS mit 0,05 % Natriumazid bei 4°C gelagert.

Für die Affinitätsreinigung des Antiserums wird dieses zuerst 1:3 mit PBS verdünnt. Die Bindung an die Affinitätssäule erfolgt durch über Kopf Rotieren für 2 Stunden bei 4°C. Der Durchfluß mit den nicht gebundenen Antikörpern bzw. Serumproteinen wird zur Kontrolle ebenfalls gesammelt. Nach Waschen mit 30 ml PBS werden die gebundenen, spezifischen Antikörper bei pH 2,5 eluiert. Da die Antikörper bei saurem pH-Wert denaturieren, werden die Eluate sofort mit 1 M Tris pH 8,0 neutralisiert. Nachfolgend werden die Antikörper-enthaltenen Fraktionen mittels Ultrafiltration (Vivaspin 6 Ultrafiltrationssäule mit einer Ausschlußgröße von 50 kDa) vereinigt und aufkonzentriert. Die konzentrierte Antikörper-Lösung wird abschließend mit 50 % Glycerin versetzt und kann so langfristig bei -20°C gelagert werden.

#### **3.2.3 Transfektion von Säugerzellen**

Für BHK- und HeLa-Zellextrakte werden 300.000 Zellen in 6-cm-Gewebekulturschalen ausgesät. Die Transfektion erfolgt am darauffolgenden Tag bei einer Dichte von 50 – 70 %. Pro Ansatz werden 400 µl OptiMem zuerst mit 12 µl FuGene und anschließend mit 2,5 µg DNA gemischt. Nach einer Inkubation von 20 Minuten bei RT wird der Transfektionsansatz vorsichtig auf die Zellen pipettiert. Die Zellen werden 12 bis 18 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend lysiert.

#### 3.2.4 Analyse von Proteinen

##### 3.2.4.1 Protein-Bestimmung nach Bradford

Bei der Protein-Bestimmung nach Bradford kommt es zu einer Komplexbildung zwischen dem sauren Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G 250 und Proteinen. Der Farbstoff bindet unspezifisch an kationische und hydrophobe Seitenketten der Proteine. Dabei kommt es zu einer Stabilisierung des Farbstoffs in seiner unprotonierten, anionischen Sulfonat-Form, was eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nach 595 nm bewirkt.

Pro Meßansatz werden bis zu 7,5 µg einer Protein-Lösung zu 1 ml einer 1:5-Verdünnung der Farbstoff-Lösung pipettiert. Anschließend mißt man die Absorption bei 595 nm. Die Protein-Konzentration wird über eine Eichgerade mit bekannten Mengen an BSA bestimmt.

##### 3.2.4.2 Proteinfällung mit Trichloressigsäure

Für die quantitative Fällung sehr kleiner Proteinkonzentrationen für die Gelelektrophorese wird eine denaturierende Proteinfällung mit Trichloressigsäure/DOC durchgeführt (Bensadoun und Weinstein, 1976).

Die Proteinlösung wird mit 0,1 Volumen 0,15 % Desoxycholat-Lösung gemischt und 10 Minuten bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 0,05 Volumen einer 100 %igen Trichloressigsäure-Lösung wird gevortext und 10 Minuten mit 14.000 U/min bei 4°C zentrifugiert. Das Protein-Pellet wird zwei Mal mit kaltem Aceton gewaschen und in 1x-Laemmli-Puffer aufgenommen.

##### 3.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die vertikale Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) wird zur Auftrennung von Protein-Gemischen verwendet. Um Proteine mit einem Molekulargewicht von 50 – 300 kDa optimal aufzutrennen, werden 8 %ige Gele benützt, zur Auftrennung von Proteinen zwischen 20 und 120 kDa 12 %ige Gele. Als Gelelektrophorese-Apparaturen werden entweder das Minigel- oder das Criterion-System der Firma BioRad verwendet.

Die Protein-Gemische werden mit einer entsprechenden Menge an Laemmli-Puffer versetzt und 5 Minuten bei 94°C denaturiert, wobei gleichzeitig die Disulfidbrücken der Proteine durch die Zugabe von β-Mercaptoethanol und DTT reduziert werden. Nach dem Auftragen der Proben werden die Proteine im weitporigen Sammelgel konzentriert (Minigele: 80 V; Criterion-Gele: 120 V). Anschließend werden die Proteine im Trenngel nach ihrer Größe aufgetrennt (Minigele: 150 V; Criterion-Gele: 200 V).

#### 3.2.4.4 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Mit der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2D-Gelelektrophorese) war O'Farrell als erster in der Lage, ganze Gewebeextrakte in seine sämtlichen Proteine aufzutrennen (1975). Die Methode wurde jedoch erst durch die Einführung von immobilisierten pH-Gradienten zu einer reproduzierbaren, hochauflösenden Technik (Bjellqvist *et al.*, 1982). Die Proteine werden dabei nach zwei unabhängigen Parametern aufgetrennt: dem isoelektrischen Punkt (pI, in der ersten Dimension) sowie der elektrophoretischen Beweglichkeit bei einer denaturierenden SDS-PAGE (in der zweiten Dimension).

Für die Analyse der immungefällten Barentszkomplexe über 2D-Gelelektrophorese wird der S100 eines Rattenhirn-Extrakts vor der Immunpräzipitation mit RNase A/T1 verdaut. Nach der Immunfällung wird die Matrix zusätzlich mit 50 mM HEPES pH 7,3 und 0,5 % Triton X-100 gewaschen, um die bei der isoelektrischen Fokussierung (IEF) störenden Salze zu entfernen. Anschließend werden die immungefällten Komplexe vier Mal 10 Minuten bei RT mit 46 µl Rehydrierungspuffer (ca. 185 µl Gesamtvolumen) eluiert. Hierbei muß beachtet werden, daß die Probe auf nicht mehr als 37°C erwärmt wird, da der Harnstoff im Rehydrierungspuffer bei höherer Temperatur instabil ist und dies zu einer Carbamylierung der Proteine führt. Anschließend wird die Probe in die IEF-Kammer pipettiert und der IPG-Streifen (engl. *immobilized pH gradient strips*) mit der Gelseite nach Unten auf die Lösung gelegt, wobei unbedingt auf die richtige Orientierung des Streifens zu achten ist. Nach 10 Minuten wird der Ansatz mit 1,8 ml Mineralöl überschichtet. Die Rehydrierung des Gels wird bei 20°C durchgeführt und dauert 15 Stunden. Bei der Rehydrierung wird eine Spannung von 50 V angelegt, was die Aufnahme von Proteinen, insbesondere mit hohem Molekulargewicht, in den IPG-Streifen erleichtert. Daraufhin werden jeweils 2 mit destilliertem Wasser benetzte Filterpapierstückchen zwischen dem IPG-Streifen und den beiden Elektroden platziert. Die isoelektrische Fokussierung läuft in drei Schritten mit einer maximalen Stromstärke von 50 µA ab: zuerst wird innerhalb von einer Stunde die Spannung in einem flachen Gradienten von 50 V auf 250 V erhöht, dann innerhalb von vier Stunden auf 5.000 V. Im dritten Schritt wird die Spannung bei 5.000 V gehalten, bis eine Summe von 30 – 35 kWh erreicht ist. Nach der isoelektrischen Fokussierung wird der IPG-Streifen vorsichtig mit destilliertem Wasser gewaschen und bis zu seiner weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren. Vor der zweiten Dimension wird der IPG-Streifen jeweils 15 Minuten mit 2 % DTT bzw. 2,5 % Iodacetamid in Äquilibriumlösung bei RT geschüttelt, um die Ausbildung der Protein/SDS-Komplexe zu ermöglichen. Der IPG-Streifen wird kurz in 1x SDS-PAGE-Laufpuffer getränkt, anschließend auf ein Criterion Precast Gel aufgebracht

und möglichst luftblasenfrei mit Einbettungsagarose überschichtet. Während der ersten 30 Minuten der SDS-PAGE wird eine Spannung von 60 V angelegt, um elektroosmotische Effekte zu minimieren. Die Auftrennung der Proteine erfolgt dann bei 150 V.

#### 3.2.4.5 Western Blotting

Das Western Blotting wurde 1979 von Towbin und Renard eingeführt und bezeichnet den Elektrotransfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Membran mit anschließender Immundetektion.

Nach der Auftrennung über SDS-PAGE werden die Proteine für 90 Minuten bei 250 mA in der Miniblot-Apparatur der Firma BioRad auf eine Nitrocellulose-Membran mit 0,2 µm Porengröße gebロットet. Die Protein-Banden auf der Membran färbt man reversibel mit Ponceau-S-Lösung. Um die unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran zu minimieren, wird diese für 30 – 45 Minuten bei RT in Blocklösung geschüttelt. Die Inkubation mit dem in Blocklösung verdünnten primären Antikörper erfolgt über Nacht bei 4°C oder 2 Stunden bei RT. Man wäscht einmal kurz sowie zwei Mal 10 Minuten mit TBS-T, bevor die Membran 1 Stunde mit dem in Blocklösung verdünnten Sekundärantikörper inkubiert wird. Danach wird wie zuvor gewaschen mit einem zusätzlichen abschließenden Waschschrift von 5 Minuten mit 1x TBS. Zur Detektion des Antigen-Antikörper-Komplexes werden gleiche Volumina der beiden ECL-Reagentien gemischt und auf die Membran gegeben. Die Meerrettich-Peroxidase des Sekundärantikörpers spaltet Peroxid unter Bildung hochreaktiver Sauerstoffradikale, welche in alkalischem Medium Luminol oxidieren. Das Oxidationsprodukt befindet sich in einem angeregten Zustand und geht unter Abgabe von Chemolumineszenz in den Grundzustand über. Die Detektion der Strahlung erfolgt durch einen Röntgenfilm.

#### 3.2.4.6 Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Zur Detektion von größeren Proteinmengen (mehr als 100 ng pro Bande) wird eine Coomassie-Färbung der Polyacrylamid-Gele durchgeführt. Zuerst fixiert man die Proteine 30 Minuten mit Färbelösung. Anschließend wird das Gel kurz mit destilliertem Wasser gewaschen und dann entfärbt.

Zur Detektion von geringeren Proteinmengen (ca. 30 ng pro Bande) werden die Proteine mit einer kolloidalen Coomassie-Lösung angefärbt. Wie bei der unten beschriebenen Silberfärbung besteht die Möglichkeit der Protein-Sequenzierung mittels

Massenspektrometrie, jedoch ist die Sensitivität ungefähr um den Faktor 10 geringer. Das Gel wird zunächst 1 Stunde fixiert, dann erfolgt über Nacht die Färbung durch sanftes Schütteln. Im Gegensatz zur herkömmlichen Coomassie-Färbung ist die Hintergrundfärbung mit dieser Methode minimal. Auf dem Gel ausgefallene Farbstoffkomplexe lassen sich durch Schütteln in Waschlösung wieder in Lösung bringen.

#### 3.2.4.7 Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen

Zur Detektion von sehr geringen Proteinmengen (ca. 1 ng pro Bande) wird eine Silberfärbung mit einem modifizierten Protokoll nach Blum (1987) durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode ist neben der hohen Sensitivität auch die Möglichkeit der Protein-Sequenzierung mittels Massenspektrometrie, da kein Glutardialdehyd wie bei manch anderen Silberfärbungs-Protokollen verwendet wird. Hierbei gilt es jedoch zu beachten, daß ein möglicherweise nachfolgender Trypsin-Verdau durch Silber inhibiert wird.

Nach der SDS-PAGE wird das Gel für mindestens eine Stunde fixiert. Anschließend wäscht man zwei Mal 20 Minuten mit 30 % Ethanol sowie ein Mal 20 Minuten mit destilliertem Wasser. Zur Konditionierung inkubiert man 1 Minute. Danach wird drei Mal 20 Sekunden mit destilliertem Wasser gewaschen und das Gel 20 Minuten in der Färbe-Lösung eingelegt. Dabei werden Silber-Ionen von den Proteinen gebunden. Nach drei weiteren Waschschritten à 20 Sekunden mit destilliertem Wasser zur Entfernung der übrigen Silberionen erfolgt in einem Mechanismus ähnlich der Photographie die Reduktion der gebundenen Silberionen zu metallischem Silber durch die Entwicklungs-Lösung. Die Reaktion wird durch eine starke pH-Änderung abgestoppt.

#### 3.2.4.8 North-Western Blotting

Zur Identifizierung von Protein/RNA-Interaktionen wird das sog. North-Western Blotting durchgeführt. Der Name rührt daher, daß die Techniken von Western und Northern Blotting miteinander verknüpft werden. Zuerst werden wie beim Western Blotting die über SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Dann erfolgt jedoch kein Nachweis der Proteine mittels Immundetektion, sondern es werden diejenigen Proteine detektiert, die Doppelstrang-RNA *in vitro* binden.

Nach dem Elektrotransfer wird die Nitrocellulose-Membran 10 Minuten in 1x TBS mit 1 mM DTT und 8 M Harnstoff gewaschen. Anschließend wird die Konzentration des Harnstoffs in 10 Waschschritten à 20 Minuten in einer Verdünnungsreihe langsam reduziert. Dabei werden die auf der Membran immobilisierten Proteine renaturiert. Im letzten Waschschriff wird die

Membran in 1x TBS mit 1 mM DTT geschüttelt. Zur radioaktiven Markierung der Sonde werden 4 µg Poly(rI)·Poly(rC), 2 µl 1x Puffer, 1 µl T4 Polynukleotidkinase und 5 µl [<sup>32</sup>P-γ]ATP in einem Gesamtvolumen von 20 µl gemischt und 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Kinase wird 10 Minuten bei 60°C inaktiviert. Die Membran wird zunächst 30 Minuten geblockt und dann 45 Minuten mit der in Wasch-Puffer verdünnten RNA-Sonde inkubiert. Nach neun Waschschritten à 5 Minuten werden die Proteine mit dem gebundenen, radioaktiv markierten Poly(rI)·Poly(rC) mit Hilfe eines Röntgenfilms visualisiert.

#### **3.2.5 Isolierung von Proteinen**

##### 3.2.5.1 Herstellung von Zellextrakten

HeLa- oder BHK-Zellen werden zunächst zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend in 500 µl Lyse-Puffer pro 6-cm-Schale mit einem Zellkratzer abgelöst. Anschließend werden Zelldebris sowie die größeren Zellorganellen mit 14.000 U/min 10 Minuten bei 4°C abzentrifugiert. Die Protein-Konzentration des Überstandes wird mittels eines Bradford-Tests bestimmt.

##### 3.2.5.2 Herstellung von Gewebeextrakten

Der Lyse-Puffer wird unmittelbar vor der Präparation frisch angesetzt. Alle Schritte erfolgen auf Eis oder bei 4°C unter RNase-freien Bedingungen soweit nicht anders angegeben.

Die mit Ether betäubten Ratten werden enthauptet und die Gehirne entnommen. Bei den embryonalen Ratten wird das gesamte Gehirn, bei älteren Ratten die beiden Cortexhälften entnommen. Nach Waschen in HBSS wird die Hirnhaut mit den Blutgefäßen entfernt und das Gewebe im Dounce-Homogenisator in Lyse-Puffer zerkleinert.

##### 3.2.5.3 Differentielle Zentrifugation

Die differentielle Zentrifugation nützt die unterschiedlichen Sedimentationsgeschwindigkeiten der einzelnen Zellbestandteile aus und stellt häufig der erste Schritt der Zellfraktionierung dar.

Die Gewebehomogenate werden zunächst 10 Minuten mit 14.000 U/min bei 4°C (Eppendorf-Zentrifuge) zentrifugiert. Das hier erhaltene Pellet wird als P14 bezeichnet und enthält unter anderem Zellkerne sowie Mitochondrien. Der Überstand der ersten Zentrifugation, der sog. S14, wird anschließend 20 Minuten mit 100.000 g bei 4°C im TLA 100.3-Rotor zentrifugiert. Bei dieser Zentrifugalbeschleunigung werden kleinere Organellen, Membranvesikel und

Polysomenkomplexe pelletiert; das Pellet wird als P100 bezeichnet. Der Überstand stellt den sog. S100 dar und enthält unter anderem die löslichen cytoplasmatischen Proteine sowie Ribonucleoprotein-Partikel (RNPs).

#### 3.2.5.4 Gelfiltrations-Chromatographie

Die Gelfiltrations-Chromatographie, auch Ausschlußchromatographie genannt, trennt gelöste Moleküle nach ihrer Größe. Der Trennungseffekt kommt durch die unterschiedliche Permeation der Analyten in ein poröses Trägermaterial mit kontrollierter Porengröße zustande. Kleinere Moleküle können in diese Poren eindringen und erfahren somit eine Verzögerung gegenüber den größeren Molekülen.

Als Säulenmaterial wird Sephacryl S300 HR in einer XK 26/100-Säule mit einem Bettvolumen von 430 ml verwendet. Diese Säule hat einen Trennbereich von 1,5 MDa bis 10 kDa. Die Chromatographie wird mit einer Flußrate von 2,5 ml/Minute durchgeführt. Um eventuell vorhandene RNasen aus dem Säulenmaterial zu entfernen, wird die Säule regelmäßig mit einem Bettvolumen 0,2 M NaOH gewaschen. Für einen Gelfiltrationslauf werden 2,5 ml S100 mit einer Protein-Konzentration von ca. 10 mg/ml geladen und je 5-ml-Fractionen von 135 ml bis 250 ml gesammelt. Nach einer Proteinfällung mit Trichloressigsäure/DOC werden jeweils 10 % der einzelnen Fractionen über SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend durch Western Blotting analysiert.

#### 3.2.5.5 RNase-Behandlung

Für die RNase-Behandlung werden 5 mg S14 eines Hirnextrakts bzw. 0,5 mg S14 eines BHK-Zellextrakts mit 5 mM EDTA sowie 40 µg/ml RNase A (Stammlösung: 10 mg/ml in RNase-Puffer) oder als Kontrolle mit 5 mM EDTA sowie demselben Volumen an RNase-Puffer versetzt. Der RNase-Verdau erfolgt eine Stunde bei 30°C. Anschließend werden die Hirnextrakte mit 100.000 g zentrifugiert und der S100 sowie der P100 mittels Western Blottings analysiert. Zur Analyse der RNA-abhängigen Interaktion zwischen Barentsz und Staufen1-HA wird der BHK-Zellextrakt nach dem Verdau für Immunpräzipitationen eingesetzt.

#### 3.2.5.6 DNase-Behandlung

Die DNase-Behandlung wird mit 5 mg S14 eines Hirnextrakts bzw. 0,5 mg S14 eines BHK-Zellextrakts durchgeführt. Nach der Zugabe von 5 mM EDTA sowie 2 U RNase-freie DNase I wird der Extrakt 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach 15 Minuten werden weitere 2 U

RNase-freie DNase I zugegeben. Anschließend werden die Extrakte wie bei der RNase-Behandlung beschrieben weiter behandelt.

#### 3.2.5.6 Behandlung mit alkalischer Phosphatase

Um Proteine auf eine mögliche Phosphorylierung zu untersuchen, wird eine Behandlung des S14 eines Hirnextraktes mit alkalischer Phosphatase durchgeführt. 1,5 mg Extrakt wird mit 50 U/ml alkalischer Phosphatase versetzt. Zur Kontrolle wird ein Extrakt mit Phosphatase-Inhibitoren (1 mM Natriumfluorid und 1 mM Natrium-o-vanadat) oder mit der gleichen Menge an Lyse-Puffer versetzt. Die Phosphatase-Behandlung wird 45 Minuten bei 30°C durchgeführt. Anschließend werden die Proteinextrakte mittels Western Blottings oder Immunpräzipitationen analysiert.

#### 3.2.5.7 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation ist eine häufig angewandte Technik, um Interaktionspartner eines Proteins zu isolieren und identifizieren. Dabei macht man sich die Eigenschaft von Antikörpern zu Nutze, über ihren F<sub>c</sub>-Teil an Protein A, einem Zellwandprotein von *Staphylococcus aureus*, zu binden. Durch Kopplung von Protein A an eine Matrix kann das Zielprotein mit seinen Interaktionspartnern mittels eines Immunkomplexes bestehend aus Antigen, Antikörper und Protein A-Matrix aus einer komplexen Mischung gefällt werden.

Die lyophilisierte Protein A-Sepharose wird zuerst mehrere Male mit Lyse-Puffer gewaschen. Anschließend wird eine 50 %ige Suspension hergestellt. Die Hirnextrakte werden zunächst mit 0,5 % Triton X-100 versehen und dann in einer Präinkubation mit 40 µl Protein A-Sepharose-Suspension 1 Stunde über Kopf rotiert. Dabei werden Proteine entfernt, die unspezifisch an die Protein A-Matrix binden. Nach einer Zentrifugation mit 2.500 U/min für 2 Minuten bei 4°C (Eppendorf-Zentrifuge) wird der Überstand für die Immunpräzipitation verwendet. Bei BHK- oder HeLa-Zellextrakten wird der S14 ohne vorherige Präinkubation für die Immunpräzipitation benützt. Für die Immunpräzipitation werden 2 – 3 mg Hirnextrakt bzw. 500 µg BHK- oder HeLa-Zellextrakt sowie 40 µl Protein A-Sepharose-Suspension mit dem jeweiligen Antikörper (5 µl Kaninchen anti-GFP, 10 µl Maus anti-HA, 10 – 20 µl Präimmenserum/Antiserum, 15 µg affinitätsgereinigte Antikörper, 10 µl Maus anti-KIF oder 5 µl Maus anti-KHC) in einem Volumen von 1 ml Lyse-Puffer gemischt und 1,5 Stunden über Kopf rotiert. Danach werden die immungefällten Komplexe 20 Sekunden mit 2.500 U/min bei 4°C abzentrifugiert und fünf Mal mit 1 ml gewaschen. Der Überstand nach dem letzten Waschschrift wird mit Hilfe einer Hamilton-Spritze vollständig abgenommen.

Die Matrix wird mit 1x Laemmli-Puffer versetzt und 5 Minuten bei 94°C inkubiert. Dadurch werden die an die Matrix gebundenen Antikörper sowie die mitgefällten Proteine eluiert und anschließend über SDS-PAGE analysiert.

#### 3.2.6 Analyse von RNA

##### 3.2.6.1 RNA-Isolierung aus Immunpräzipitationen mit anti-Barentsz Antikörpern

Um eine ausreichende Menge an RNA für nachfolgende Analysen zur Verfügung zu haben, werden sechs anti-Barentsz Immunpräzipitationen für die RNA-Isolierung gesammelt. Anschließend erfolgt in 500 µl IP-Waschpuffer ein Protein-Verdau mit Proteinase K (200 µg/ml) für 20 Minuten bei 55°C. Nach Zugabe von 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol wird gut gemischt und 10 Minuten mit 14.000 U/min bei 4°C (Eppendorf-Zentrifuge) zentrifugiert. Um die Proteine vollständig zu entfernen, wird die Extraktion mit der wässrigen Phase wiederholt. Bei einer weiteren Extraktion mit 1 Volumen Chloroform entfernt man in der wässrigen Phase gelöstes Phenol. Anschließend wird die RNA mit 1 µl Glykogen (20 mg/ml), 50 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 1 ml kaltem Ethanol 30 Minuten bei -80°C gefällt. Nach einer Zentrifugation von 30 Minuten mit 14.000 U/min bei 4°C (Eppendorf-Zentrifuge) wird das Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Das RNA-Pellet wird vorsichtig in 22 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert.

##### 3.2.6.2 Amplifikation von RNAs mittels RT-PCR

Die isolierten RNAs der Immunpräzipitationen mit anti-Barentsz Antikörpern werden mittels einer RT-PCR analysiert. Die Reaktion läuft in zwei Schritten ab. Im ersten Schritt, der sog. reversen Transkription (RT), wird die RNA mit einer reversen Transkriptase (RTase) in die komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Anschließend dient die cDNA im zweiten Schritt, der sog. Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR), als Matrize für die Taq-Polymerase und wird unter Verwendung spezifischer Primer amplifiziert. Für die reverse Transkription werden auf Eis 1 µg RNA, 250 ng *random*-Primer H6 und 1 mM dNTPs in einem Volumen von 10 µl gemischt. Der Ansatz wird zur Denaturierung der RNA 5 Minuten bei 67°C inkubiert und sofort wieder auf Eis gestellt. Nach zwei Minuten werden 1x RT-Puffer, 10 mM DTT und 40 U RNase-Inhibitor in einem Gesamtvolumen von 19 µl zugegeben. Die Reaktion wird 2 Minuten bei 25°C inkubiert, anschließend werden 100 U M-MuLV Reverse Transkriptase zugefügt. Nach einer weiteren Inkubation von 10 Minuten bei 25°C erfolgt die Reaktion für 1 Stunde bei 42°C und wird durch eine 15-minütige Inkubation bei 70°C abgestoppt.

Für die PCR-Reaktion werden 2 µl cDNA, 1x PCR-Puffer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, jeweils 0,4 µM des Vorwärts- und des Rückwärts-Primers sowie 0,1 U Taq-Polymerase in einem Volumen von 50 µl gemischt. Die PCR wird in einem PCR-Block mit beheizbarem Deckel durchgeführt. Nach einer anfänglichen Denaturierung für 1 Minute bei 95°C werden 35 Reaktionszyklen durchlaufen. Jeder Zyklus besteht aus einer Denaturierung (40 Sekunden bei 94°C), der Anlagerungsreaktion (45 Sekunden bei 58°C für MAP2, alle übrigen bei 54°C) und der Strangsynthese (1 Minute bei 72°C). Danach wird nochmals eine 10-minütige Endsynthese bei 72°C durchgeführt. Die amplifizierte DNA-Fragmente werden anschließend mit Ladebuffer versetzt und in einem mit Ethidiumbromid gefärbten 2%-igen Agarose-Gel aufgetrennt.

#### 3.2.6.3 Radioaktive reverse Transkription

Um eine RNA-Probe auf vorhandene mRNAs zu überprüfen, wird eine radioaktive reverse Transkription mit Oligo-(dT)-Primern durchgeführt.

1 µg RNA, 10 mM dNTPs ([dCTP] = 0,5 mM) und 500 ng Oligo-(dT)<sub>12-18</sub>-Primer werden in einem Gesamtvolumen von 10 µl gemischt. Der Ansatz wird zur Denaturierung der RNA für 5 Minuten bei 65°C inkubiert und sofort wieder auf Eis gestellt. Nach zwei Minuten werden 1x RT-Puffer, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 40 U RNase-Inhibitor und 1 µl [<sup>32</sup>P-α]dCTP (3.000 mCi/mM) in einem Gesamtvolumen von 19 µl zugegeben. Die Reaktion wird 2 Minuten bei 25°C inkubiert, anschließend werden 50 U SuperScript II reverse Transkriptase zugefügt. Nach einer weiteren Inkubation von 10 Minuten bei 25°C erfolgt die Reaktion für 1 Stunde bei 42°C. Die Proben werden anschließend mit dem QIAQuick<sup>®</sup> PCR Purification Kit von den nicht eingebauten Radionukleotiden gereinigt. Die Proben werden mit 2x Ladebuffer versetzt und 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung der radioaktiv markierten DNA erfolgt in einem denaturierenden 6 %igen Polyacrylamidgel 40 Minuten bei 350 V mit 0,5x TBE als Laufpuffer. Abschließend wird das Gel getrocknet und die Radioaktivität durch einen Röntgenfilm detektiert.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Gewinnung und Charakterisierung von spezifischen anti-Barentsz Antikörpern

Während meiner Diplomarbeit habe ich bereits verschiedene anti-Barentsz Antikörper aus Kaninchen hergestellt und charakterisiert. Ein affinitätsgereinigter Peptid-Antikörper zeigte beim Western Blotting nur ein schwaches Signal für Barentsz; zudem wurden mehrere andere Proteine in Gewebeextrakten der Ratte erkannt. Außerdem standen mir zwei weitere anti-Barentsz Antiseren zur Verfügung, die ich durch Immunisierungen mit einem C-terminalen Fragment von Barentsz (His<sub>6</sub>-Btz<sub>C</sub>, bestehend aus den Aminosäuren 356 - 697) gewonnen habe. Diese Antiseren wiesen neben dem spezifischen Barentsz-Signal ebenfalls Hintergrund auf. Bei diesen Antiseren war jedoch leider keine Affinitätsreinigung möglich, da das gereinigte Antigen nicht in ausreichenden Mengen zur Verfügung stand. Daher standen zu Beginn meiner Doktorarbeit keine brauchbaren anti-Barentsz Antikörper zur Verfügung. Um eine mögliche Funktion von Barentsz beim dendritischen mRNA-Transport in der Ratte untersuchen zu können, galt es zunächst, neue spezifische anti-Barentsz Antikörper herzustellen.

Für die Herstellung der für die Immunisierung verwendeten Antigene wurden zwei Plasmide eingesetzt, die für Polyhistidin-Fusionsproteine kodieren. Das erste Plasmid kodiert für eine N-terminale Domäne von Maus-Barentsz (Aminosäuren 106 – 351, im Weiteren als His<sub>6</sub>-Btz<sub>NT</sub> bezeichnet) und wurde bereits in meiner Diplomarbeit verwendet. Das zweite Plasmid kodiert für eine C-terminale Domäne von Ratten-Barentsz (Aminosäuren 356 – 517, im Weiteren als His<sub>6</sub>-Btz<sub>CT</sub> bezeichnet) und wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Paolo Macchi kloniert.

#### 4.1.1 anti-Barentsz Antiseren aus der Maus

Die polyklonalen anti-Barentsz Antiseren aus der Maus wurden im Gegensatz zu den anti-Barentsz Antikörpern aus Kaninchen nur gelegentlich in dieser Arbeit verwendet. Daher möchte ich an dieser Stelle nur kurz auf die Herstellung der Maus anti-Barentsz Antiseren eingehen.

Das für die Immunisierung der Mäuse verwendete Antigen His<sub>6</sub>-Btz<sub>NT</sub> wurde in *E.coli* exprimiert und wies nach seiner nativen Aufreinigung über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose einige Abbauprodukte sowie bakterielle Proteine als Verunreinigungen auf (Daten nicht gezeigt).

Daher wurden die Eluate über SDS-PAGE aufgetrennt und die Antigen-Bande gemäß dem in 3.2.1.4 beschriebenen Protokoll ausgeschnitten und lyophilisiert. Das in PBS gelöste Antigen wurde für die Immunisierung von insgesamt 5 Mäusen verwendet.

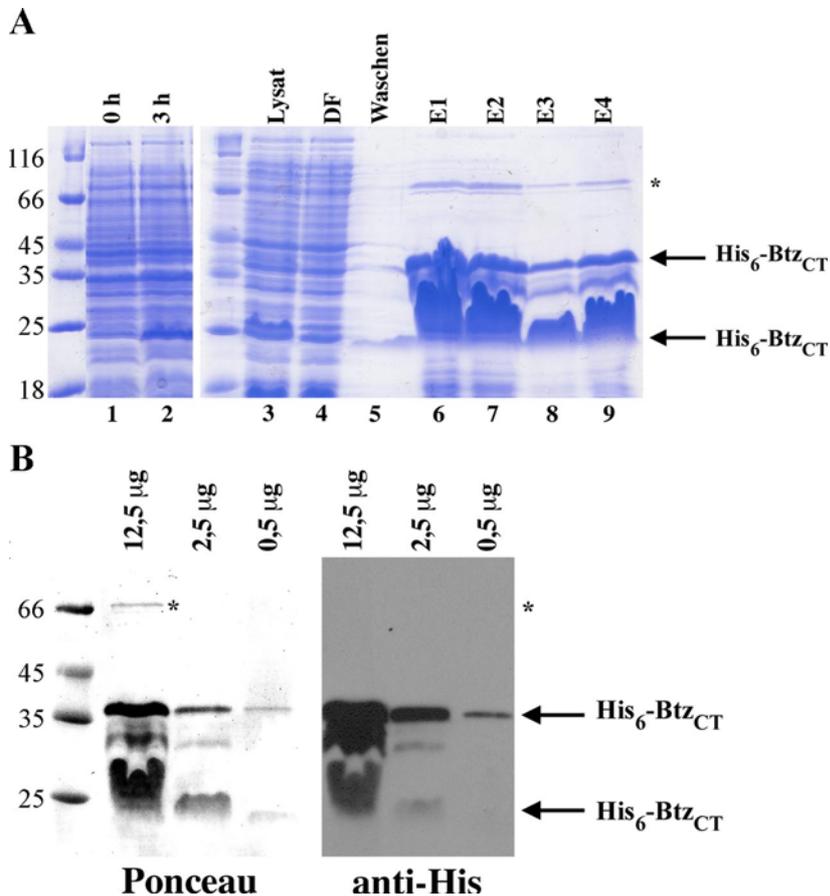
Beim Western Blotting zeigten alle Antiseren ein spezifisches Signal für Barentsz, jedoch trat sehr häufig eine mehr oder weniger starke Kreuzreaktivität mit mindestens einem Protein bei ~ 65 kDa auf (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise ist die Kreuzreaktivität auf die Kontaminierung der Antiseren mit anti-Keratin Antikörpern zurückzuführen. Trotz größter Vorsicht während der Antigen-Präparation könnte Keratin in die Antigen-Lösung gelangt und damit ebenfalls injiziert worden sein. Da bei Maus Nr. 4 diese Erkennung am schwächsten war, wurde das Antiserum dieser Maus für die weiteren Versuche eingesetzt.

#### **4.1.2 anti-Barentsz Antiseren aus Kaninchen**

Von den Maus-Antiseren standen auf Grund der geringen Blutmenge der Mäuse nur sehr begrenzte Mengen zur Verfügung. Daher wurden zusätzlich Kaninchen mit Barentsz-Antigen immunisiert. Aus diesen Antiseren wurden anschließend mittels Affinitätsreinigung größere Mengen an spezifischen Antikörper isoliert, die dann für Western Blotting sowie Immunpräzipitationen eingesetzt wurden.

Das für die Immunisierung der Kaninchen verwendete Antigen His<sub>6</sub>-Btz<sub>CT</sub> wurde in *E.coli* exprimiert. Die Expression des Antigens His<sub>6</sub>-Btz<sub>CT</sub> ließ sich effektiv induzieren (siehe Abbildung 4 A, Spuren 1 und 2) und erreichte bereits nach 2 Stunden eine Sättigung (Daten nicht gezeigt). Das hier verwendete Antigen His<sub>6</sub>-Btz<sub>CT</sub> zeigte eine deutlich bessere Expression als das bei der Diplomarbeit verwendete längere Antigen His<sub>6</sub>-Btz<sub>C</sub>, das für die gesamte C-terminale Hälfte kodiert (Daten nicht gezeigt). Überraschenderweise traten bei der Induktion von His<sub>6</sub>-Btz<sub>CT</sub> zwei Hauptprodukte mit 25 bzw. 35 kDa auf. Außerdem zeigten beide Proteine bei der SDS-PAGE eine seltsame Bandenform, obwohl das Gel nicht überladen wurde. Das 25 kDa-Protein war selbst nach der Induktion oder im Lysat nicht als normale Bande zu erkennen (siehe Abbildung 4 A, Spuren 2 und 3). Nach der Expression wurde His<sub>6</sub>-Btz<sub>CT</sub> unter nativen Bedingungen über eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix aufgereinigt. Eine repräsentative Reinigung ist in Abbildung 4 A zu sehen. Das gereinigte Antigen wurde anschließend mittels Western Blottings mit einem anti-His Antikörper auf mögliche Abbauprodukte, die ebenfalls das His<sub>6</sub>-Peptid enthalten und daher vom anti-His Antikörper erkannt werden, sowie auf bakterielle Verunreinigungen, die kein His<sub>6</sub>-Peptid enthalten, überprüft (siehe Abbildung 4 B). Nur das Protein bei 66 kDa zeigte dabei kein Signal mit dem

anti-His Antikörper und stellte daher eine bakterielle Verunreinigung dar (in Abbildung 4 mit einem Stern markiert). Somit stand von dem Antigen His<sub>6</sub>-Btz<sub>CT</sub> eine ausreichende Menge mit großer Reinheit für die Immunisierung der Kaninchen zur Verfügung.



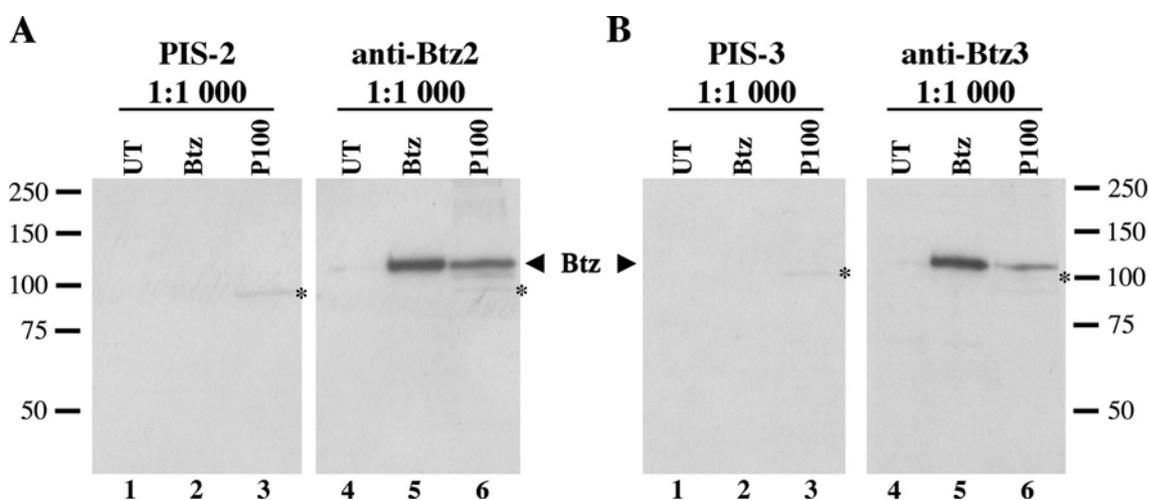
**Abbildung 4: Expression und Reinigung des Antigens His<sub>6</sub>-Btz<sub>CT</sub> in *E.coli*.**

**A: Induktion und Reinigung von His<sub>6</sub>-Btz<sub>CT</sub>.** Folgende Proben wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Coomassie angefärbt: 0 h (Kultur vor Induktion): 10 µl; 3 h (Kultur 3 Stunden nach Induktion): 10 µl; Lysat: 5 µl; DF (Durchfluß nach Binden des Antigens an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix): 5 µl; Waschfraktion: 20 µl; E1 – E4 (Eluate 1 – 4): 12 µl. Das mit \* gekennzeichnete Protein stellt eine bakterielle Verunreinigung dar, die mit Pfeilen gekennzeichneten Banden die beiden Hauptprodukte des aufgereinigten His<sub>6</sub>-Btz<sub>CT</sub>.

**B: Nachweis des gereinigten Antigens durch Western Blotting mit anti-His Antikörpern.** Die entsprechenden Mengen der aus E1 – E4 gepoolten Eluate wurden aufgetragen. Links ist die Ponceau-Färbung, rechts der zugehörige Western Blot mit anti-His Antikörper zu sehen.

Das gereinigte Antigen His<sub>6</sub>-Btz<sub>CT</sub> wurde wie in Abschnitt 3.2.2.2 beschrieben für die Immunisierung von drei Kaninchen verwendet. Die Analyse des Präimmunserums sowie der ersten Blutung der Kaninchen 2 und 3 ist in Abbildung 5 zu sehen. Beide Antiseren erkannten das in BHK-Zellen überexprimierte Barentsz (siehe Abbildung 5, jeweils Spur 5), während bei dieser Probe die Präimmunseren mit derselben Verdünnung keine Immunreaktion zeigten

(siehe jeweils Spur 2). Beim P100 eines Hirnextrakts von embryonalen Ratten erfolgte eine starke Erkennung von endogenem Barentsz durch beide Antiseren (siehe jeweils Spur 6). Beide Präimmunsereen erkannten in diesem Extrakt lediglich eine sehr schwache Bande bei  $\sim 100$  kDa (siehe jeweils Spur 3, Markierung mit einem Stern), die ebenfalls bei den entsprechenden Antiseren auftrat (siehe Spur 6, Markierung mit einem Stern). Endogenes Barentsz der BHK-Zellen wurde hingegen von den anti-Barentsz Antiseren kaum erkannt (siehe jeweils Spur 4). Das Antiserum des dritten Kaninchens (#12) erkannte ebenfalls sowohl überexprimiertes als auch endogenes Barentsz, zeigte aber beim Rattenhirn-Extrakt eine weitere schwache, unspezifische Bande bei 150 kDa (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 5: Erkennung von Barentsz durch die selbst hergestellten anti-Barentsz Antiseren aus Kaninchen.**

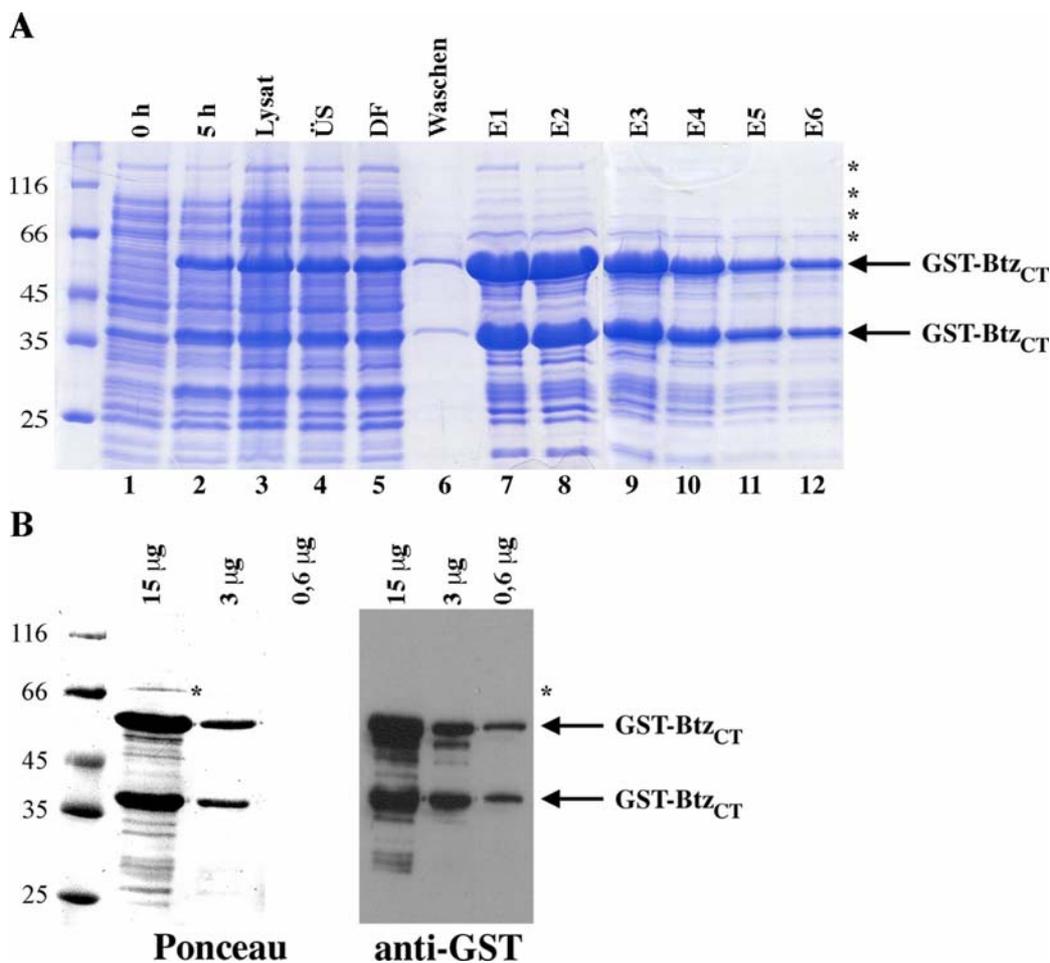
Für die Analyse der 1. Blutung der beiden anti-Barentsz Antiseren (A: anti-Btz2; B: anti-Btz3) bzw. der entsprechenden Präimmunsereen (A: PIS-2; B: PIS-3) wurden folgende Extrakte über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet: UT (5  $\mu$ g Extrakt von untransfizierten BHK-Zellen); Btz (5  $\mu$ g Extrakt von BHK-Zellen, die mit *Barentsz* cDNA transfiziert wurden); P100 (50  $\mu$ g P100 eines Hirnextrakts von embryonalen E17 Ratten). Die Seren wurden jeweils 1:1.000 verdünnt. Das Molekulargewicht von Barentsz wird jeweils durch eine Pfeilspitze angezeigt. Die Sterne markieren eine Kreuzreaktivität mit Proteinen von  $\sim 100$  kDa.

#### 4.1.3 Affinitätsreinigung der anti-Barentsz Antiseren aus Kaninchen

Der Test der anti-Barentsz Antiseren aus Kaninchen ergab zwar schon ein gutes Ergebnis beim Western Blotting, jedoch sollte die Spezifität der Antikörper durch eine Affinitätsreinigung weiter erhöht werden. Außerdem werden bei dieser Reinigung unerwünschte Serumproteine wie z. B. Albumine oder RNasen entfernt. Die gereinigten

Antikörper können daher bei Immunpräzipitationen unter RNase-freien Bedingungen eingesetzt werden.

Die Kaninchen wurden wie oben beschrieben mit dem Polyhistidin-Fusionsprotein His<sub>6</sub>-Btz<sub>CT</sub> immunisiert. Daher werden im Kaninchen nicht nur Antikörper gegen das Barentsz-Antigen produziert, sondern auch gegen das His<sub>6</sub>-Peptid. Um diese anti-His Antikörper zu entfernen, wurde bei der Affinitätsreinigung der Antiseren dieselbe Domäne von Barentsz benützt, dieses Mal aber als GST-Fusionsprotein (GST-Btz<sub>CT</sub>).



**Abbildung 6: Expression und Reinigung des Antigens GST-Btz<sub>CT</sub> in *E.coli*.**

**A: Induktion und Reinigung von GST-Btz<sub>CT</sub>.** Folgende Proben wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Coomassie angefärbt: 0 h (10 µl Kultur vor Induktion); 5 h (10 µl Kultur 5 Stunden nach Induktion); 5 µl Lysat; 5 µl ÜS (Überstand nach Zentrifugation); DF (5 µl Durchfluß nach Binden des Antigens an Glutathion-Sepharose-Matrix); 20 µl Waschfraktion; E1 – E6 (12 µl Eluate 1 – 6). Die mit \* gekennzeichnete Proteine stellen bakterielle Verunreinigungen dar, die mit Pfeilen gekennzeichneten Banden die beiden Hauptprodukte des aufgereinigten GST-Btz<sub>CT</sub>.

**B: Nachweis des gereinigten Antigens durch Western Blotting mit anti-GST Antikörpern.** Es wurden die entsprechenden Mengen der aus E1 – E4 gepoolten Eluate aufgetragen. Links ist die Ponceau-Färbung, rechts der zugehörige Western Blot mit anti-GST Antikörper zu sehen.

Die Expression von GST-Btz<sub>CT</sub> erfolgte ebenfalls in *E.coli* (siehe Abbildung 6 A, Spuren 1 und 2) und war sogar stärker als bei His<sub>6</sub>-Btz<sub>CT</sub>. Wie auch bei der Induktion von His<sub>6</sub>-Btz<sub>CT</sub> wurden erneut zwei Hauptprodukte mit 38 sowie 56 kDa gebildet. Das kleinere Protein ist somit entweder ein Hauptabbauprodukt des 56 kDa-Proteins oder möglicherweise ist dieses Laufverhalten als Doppelbande eine spezielle Eigenschaft dieser Barentsz-Domäne. Im Gegensatz zum Polyhistidin-Fusionsprotein zeigten die beiden Proteine nicht diese seltsame Bandenform, obwohl ähnliche Proteinmengen geladen wurden. Dies läßt sich möglicherweise durch die deutlich größere GST-Domäne erklären, die die Laufeigenschaften des Fusionsproteins normalisiert. Die native Reinigung von GST-Btz<sub>CT</sub> über Glutathion-Sepharose ist in Abbildung 6 A zu sehen. Die Reinigung war sehr effektiv, was die Western Blots mit dem anti-GST Antikörper bestätigen (siehe Abbildung 6 B). Die meisten Proteine unterhalb von GST-Btz<sub>CT</sub> sind auf Grund der Immunreaktion mit dem anti-GST Antikörper Abbauprodukte, nur die wenigen mit einem Stern markierten Proteine stellen bakterielle Verunreinigungen dar.

Das gereinigte Antigen GST-Btz<sub>CT</sub> wurde wie im Abschnitt 3.2.2.4 beschrieben kovalent an eine mit Bromcyan aktivierte Sepharose gekoppelt und anschließend als Affinitätssäule für die Reinigung der anti-Barentsz Antiseren aus Kaninchen verwendet. Die Analyse der Affinitätsreinigung der beiden Kaninchen-Antiseren #2 und 3 ist in Abbildung 7 zu sehen. Sowohl die Antiseren als auch die affinitätsgereinigten Antikörper erkannten endogenes Barentsz im P100 und S100 eines Hirnextrakts von embryonalen Ratten sowie das in BHK-Zellen überexprimierte Barentsz (siehe Abbildung 7A). Die affinitätsgereinigten Antikörper zeigten bei einer deutlich höheren Verdünnung sogar ein stärkeres Signal als die entsprechenden Antiseren, was vor allem im S100 deutlich zu sehen ist (vergleiche Spuren 6 und 12). Den Erfolg der Reinigung kann man auch daran erkennen, daß mehrere Kreuzreaktionen, die beim Präimmenserum, dem Antiserum sowie dem Durchfluß zu sehen waren, bei den gereinigten Antikörpern nicht mehr auftraten (in Abbildung 7 A mit Sternen markiert). Bei den affinitätsgereinigten Antikörpern trat neben dem sehr starken spezifischen Signal nur eine sehr geringe oder gar keine Kreuzreaktivität mehr auf. Des weiteren ist hier anzumerken, daß der Durchfluß immer noch anti-Barentsz Antikörper enthielt, jedoch war die Immunreaktion deutlich schwächer als mit dem jeweiligen Antiserum. Zusätzlich wurde die Spezifität der beiden gereinigten Antikörper durch das Verschwinden der Barentsz-Bande nach Präinkubation mit dem Antigen His<sub>6</sub>-Btz<sub>CT</sub> bestätigt (siehe Abbildung 7 B).

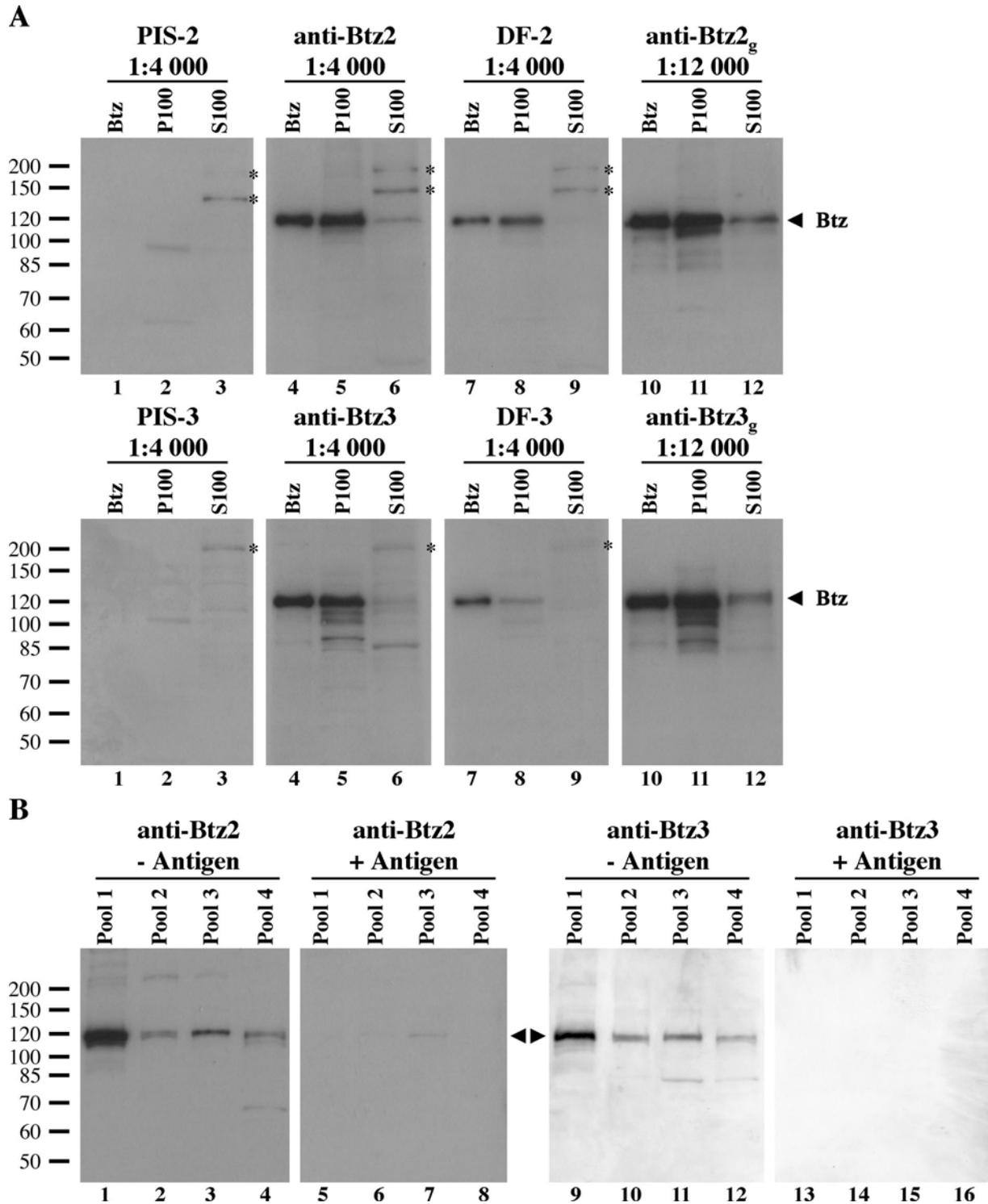


Abbildung 7: Charakterisierung der anti-Barentsz Antikörper aus Kaninchen.

**A:** Analyse der affinitätsgereinigten anti-Barentsz Antiseren aus Kaninchen mittels Western Blottings. Folgende Extrakte wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet: Btz (5  $\mu$ g Extrakt von BHK-Zellen, die mit *Barentsz* cDNA transfiziert wurden); P100/S100 (jeweils 50  $\mu$ g P100/S100 eines Hirnextrakts von embryonalen E17 Ratten). Das Präimmunserum (PIS), das anti-Barentsz Antiserum (anti-Btz), der Durchfluß mit den bei der Affinitätsreinigung nicht gebundenen Antikörpern (DF) sowie die gereinigten anti-Barentsz Antikörper (anti-Btz<sub>g</sub>) wurden wie angegeben verdünnt. Die Pfeilspitze

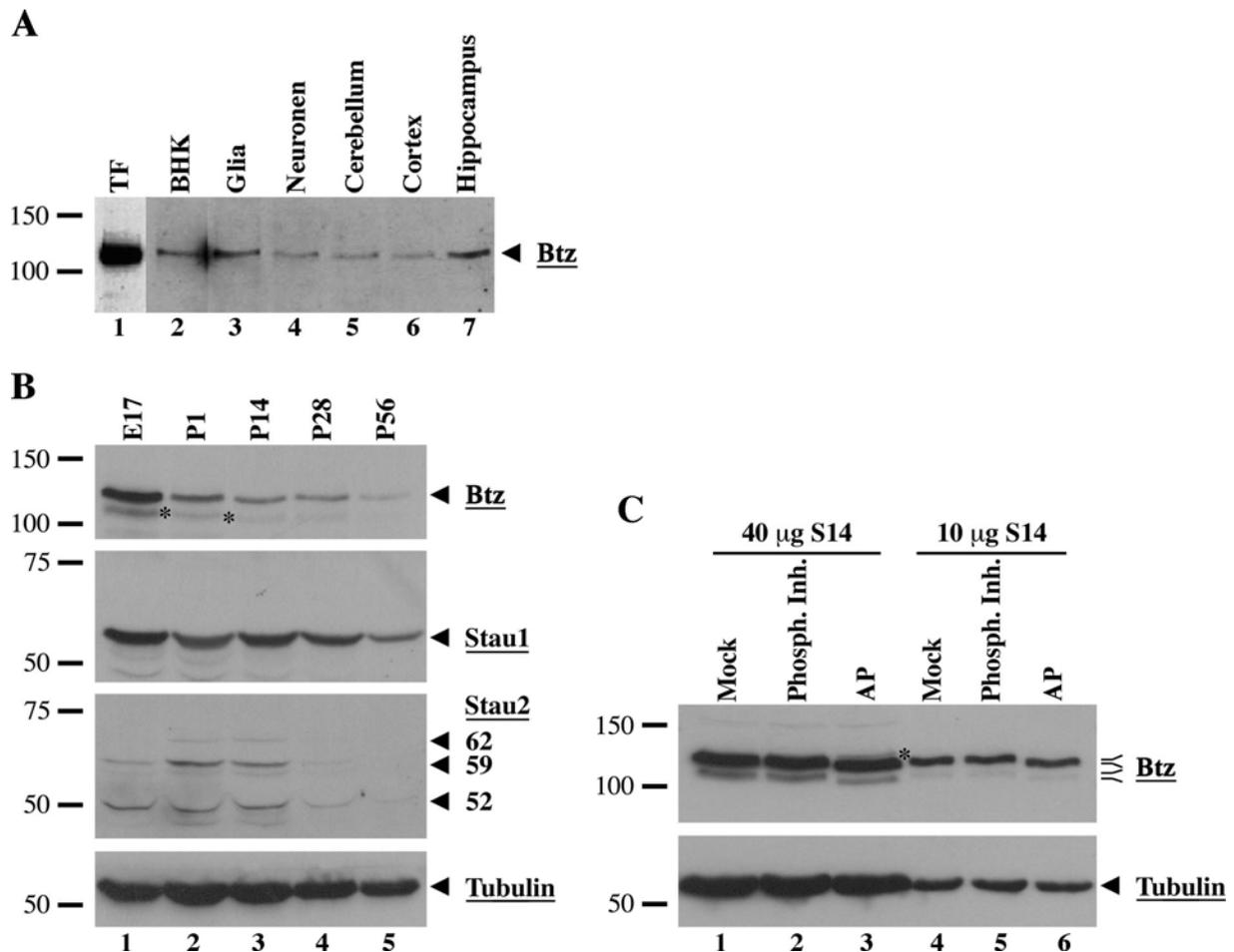
markiert das Molekulargewicht von Barentsz (120 kDa). Die mit einem Stern markierten Proteine stellen eine Kreuzreaktivität der verwendeten Antikörper dar.

**B: Präinkubation der gereinigten anti-Barentsz Antikörper mit Antigen als Spezifitätstest.** Auftrag bei der SDS-PAGE: jeweils 10 % von Pool 1 – 4 (gepoolte Fraktionen einer Gelfiltration mit dem S100 eines Rattenhirn-Extrakts, siehe Abbildung 27). Die Präinkubation erfolgte ohne Antigen bzw. mit 20 µg His<sub>6</sub>-Btz<sub>CT</sub> pro µg gereinigtem Antikörper durch über Kopf Rotieren für eine Stunde bei RT. Nach der Präinkubation wurde ein Western Blot durchgeführt. Die Pfeilspitzen markieren jeweils Barentsz.

## 4.2 Expressionsstudien von Barentsz in Hirngeweben der Ratte

Zunächst wurde mit den spezifischen anti-Barentsz Antikörpern aus der Maus die Expression von Barentsz in verschiedenen Hirngeweben der adulten Ratte untersucht (siehe Abbildung 8 A). Dabei zeigte sich eine ähnliche Expression in Zellextrakten von kultivierten Glia-Zellen oder hippocampalen Neuronen sowie in Gewebeextrakten des Cerebellums oder des Cortex, während im Hippocampus eine geringfügig größere Menge an Barentsz exprimiert wird. Als Größenstandard dienten Zellextrakte von untransfizierten bzw. mit *Barentsz* cDNA transfizierten BHK-Zellen.

Bisher war noch nichts über die Expression von Barentsz in verschiedenen Entwicklungsstadien der Ratte bekannt. Daher wurde als nächstes durch Western Blotting mit dem anti-Barentsz2 Antikörper aus Kaninchen die Expression von Barentsz in Hirnextrakten von Ratten verschiedenen Alters untersucht (siehe Abbildung 8 B). Barentsz wird demnach im embryonalen Rattenhirn (E17, d.h. am 17. Tag nach der Befruchtung; siehe Abbildung 8 B, Spur 1) deutlich stärker exprimiert als in 1, 14, 28 oder 56 Tage alten Ratten (P1, P14, P28 bzw. P56; Spuren 2 – 5). Bei der Verwendung der anti-Barentsz Antikörper aus Kaninchen wurde häufig neben der spezifischen 120 kDa-Bande eine zweite, schwächere Bande bei ~ 110 kDa detektiert (markiert mit einem Stern in Abbildung 8 B, Spuren 1 und 2). Bisher konnte noch nicht eindeutig geklärt werden, ob auch die 110 kDa-Bande eine Barentsz-Isoform darstellt. Das Verschwinden dieser Bande nach der Präinkubation mit dem Antigen (siehe Abbildung 7 B) ist jedoch ein Hinweis, daß es sich dabei um eine spezifische Immunerkennung handelt. Zusätzlich wurde auch die Protein-Expression von Staufen1 und Staufen2 analysiert. Während bei Staufen1 eine leichte, stetige Abnahme der Expression zu erkennen war, zeigte die Expression von Staufen2 ein Maximum bei 1 und 14 Tage alten Ratten. Wie bei Barentsz trat sowohl bei Staufen1 als auch bei Staufen2 die geringste Protein-Expression bei den 56 Tage alten Ratten auf (siehe Spur 5). Beim Staufen2-Western Blot war außerdem die Expression der drei verschiedenen Staufen2-Isoformen mit Molekulargewichten



**Abbildung 8: Expressionsstudien von Barentsz in Hirngeweben der Ratte.**

**A: Expression von Barentsz in verschiedenen Hirngeweben der Ratte.** Jeweils 50 µg der folgenden Extrakte wurden geladen: Glia bzw. Neuronen: Zellextrakt von kultivierten Gliazellen bzw. hippocampalen Neuronen; Cerebellum, Cortex, Hippocampus: verschiedene Gewebeextrakte einer adulten Ratte. Als Ladekontrolle wurden zusätzlich jeweils 10 µg von mit *Barentsz* cDNA transfizierten bzw. untransfizierten BHK-Zellen (TF bzw. BHK) geladen. Der Western Blot wurde mit dem anti-Barentsz Antiserum aus der Maus durchgeführt.

**B: Geringere Expression von Barentsz in adulten Hirnextrakten der Ratte.** Jeweils 50 µg Hirnextrakt von Ratten verschiedenen Alters wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blottings mit anti-Barentsz2, anti-Staufen1 und anti-Staufen2 Antikörpern aus Kaninchen analysiert. Zur Kontrolle wurde dieselbe Membran mit anti-Tubulin Antikörpern immundekoriert. Die jeweils verwendeten Antikörper sind seitlich durch Unterstreichen gekennzeichnet. Die drei Staufen2-Isoformen sind durch Pfeilspitzen und dem zugehörigen Molekulargewicht markiert.

**C: Phosphorylierung von Barentsz in Rattenhirn-Extrakten.** Der S14 von embryonalen Hirnextrakten der Ratte (E17) wird Mock, mit Phosphatase-Inhibitoren oder mit alkalischer Phosphatase (AP) behandelt. 40 µg bzw. 10 µg dieser Extrakte wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western Blotting mit dem anti-Barentsz2 Antikörper aus Kaninchen analysiert. Die vier Linien an der Seite markieren die vier durch den anti-Barentsz2 Antikörper erkannten Barentsz-Proteine, der Stern das nach der Behandlung mit alkalischer Phosphatase noch nicht dephosphorylierte Barentsz. Zur Kontrolle wurde dieselbe Membran mit anti-Tubulin Antikörpern immundekoriert.

von 52, 59 sowie 62 kDa schön zu sehen (in Abbildung 8B an der Seite jeweils mit einer Pfeilspitze markiert). Als Ladekontrolle wurde ein Western Blot mit anti-Tubulin Antikörpern durchgeführt, der für alle Entwicklungsstadien ein sehr ähnliches Signal ergab. Außerdem zeigte die Ponceau-Färbung vor dem Western Blot gleiche Proteinmengen für alle Proben (Daten nicht gezeigt).

Vor kurzem wurde die Phosphorylierung von Barentsz in Extrakten von verschiedenen Zellkulturzellen beschrieben (Degot *et al.*, 2002). Um eine mögliche Phosphorylierung von Barentsz in Hirnextrakten von embryonalen Ratten zu untersuchen, wurde der S14 eines solchen Extrakts mit Phosphatase-Inhibitoren bzw. zur Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase behandelt. In einer weiteren Kontrolle wurde zum Extrakt lediglich Puffer zugegeben und unter denselben Bedingungen inkubiert (Bezeichnung mit Mock). Zur besseren Visualisierung wurden zwei unterschiedliche Mengen der drei Proben über SDS-PAGE aufgetrennt und per Western Blotting mit dem anti-Barentsz2 Antikörper aus Kaninchen analysiert (siehe Abbildung 8 C, 40 µg: Spuren 1 – 3, 10 µg: Spuren 4 – 6). Dabei zeigten die Proben nach der Mock-Behandlung und der Zugabe von Phosphatase-Inhibitoren erneut die beiden oben erwähnten Barentsz-Banden von 120 und 110 kDa (siehe Abbildung 8 C, Spuren 1 und 2 bzw. 4 und 5). Nach der Behandlung mit alkalischer Phosphatase wurden zwei weitere Banden mit einem geringfügig, aber signifikant schnelleren Laufverhalten detektiert (siehe Abbildung 8 C, Spuren 3 und 6). In Abbildung 8 C sind die vier durch den anti-Barentsz2 Antikörper erkannten phosphorylierten bzw. dephosphorylierten Barentsz-Proteine jeweils seitlich mit einem Strich markiert. Des Weiteren ist in Spur 3 ein kleiner Rest des 120 kDa-Proteins zu erkennen, das noch nicht dephosphoryliert wurde (in Abbildung 8 C markiert mit einem Stern). Daher scheinen beide Barentsz-Proteine in Ratten-Hirnextrakten phosphoryliert vorzuliegen.

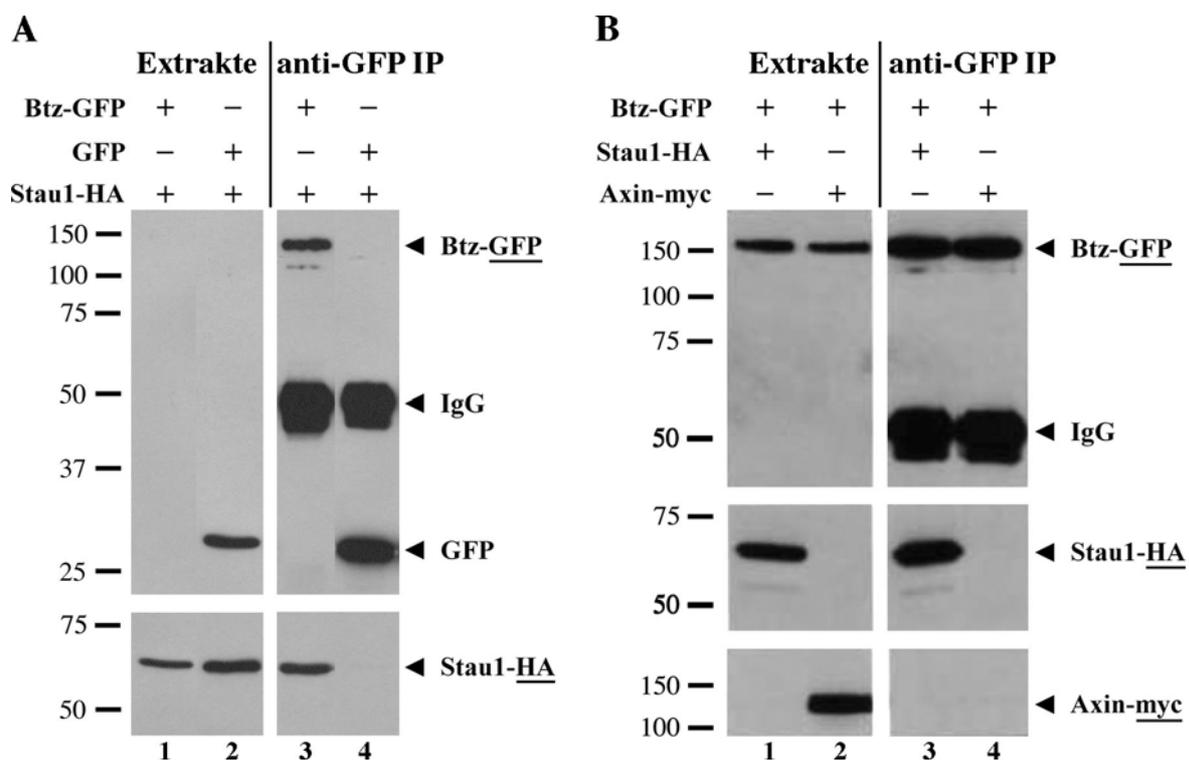
### 4.3 Interaktion von Barentsz mit Staufen1

Staufen und Barentsz liegen in der Oocyte von *Drosophila melanogaster* in einem gemeinsamen mRNP-Komplex vor. Experimente aus unserer Arbeitsgruppe legen zudem nahe, daß das zu *Drosophila* Staufen homologe Staufen1 am mRNA-Transport in Dendriten von hippocampalen Säuger-Neuronen beteiligt ist. Somit könnte möglicherweise das Säuger-Homolog von Barentsz mit Staufen1 in einem konservierten Protein/RNA-Komplex vorliegen, der für die Lokalisierung von mRNAs in die Dendriten von hippocampalen

Neuronen verantwortlich ist. Um eine Interaktion von Barentsz mit Staufen1 zu untersuchen, habe ich zunächst Immunpräzipitationen mit Zell-Lysaten von BHK-Zellen durchgeführt, die mit Fusionsproteinen transfiziert waren. Anschließend sollte die Interaktion in Hirnextrakten der Ratte untersucht werden.

#### 4.3.1 Barentsz interagiert mit Staufen1-HA in BHK-Zellen

BHK-Zellen wurden zunächst mit den folgenden Konstrukten transfiziert: Ratte-Barentsz mit einer C-terminalen GFP-Domäne (Btz-GFP) sowie Maus-Staufen1 mit drei C-terminalen HA-Peptiden (Stau1-HA). Mit dem Lysat der transfizierten Zellen wurde eine Immunpräzipitation mit anti-GFP Antikörpern durchgeführt. Der Zellextrakt und die Immunfällung wurden anschließend durch Western Blotting analysiert (siehe Abbildung 9 A, Spuren 1 und 3; die jeweils verwendeten Antikörper sind seitlich durch Unterstreichen gekennzeichnet). Neben

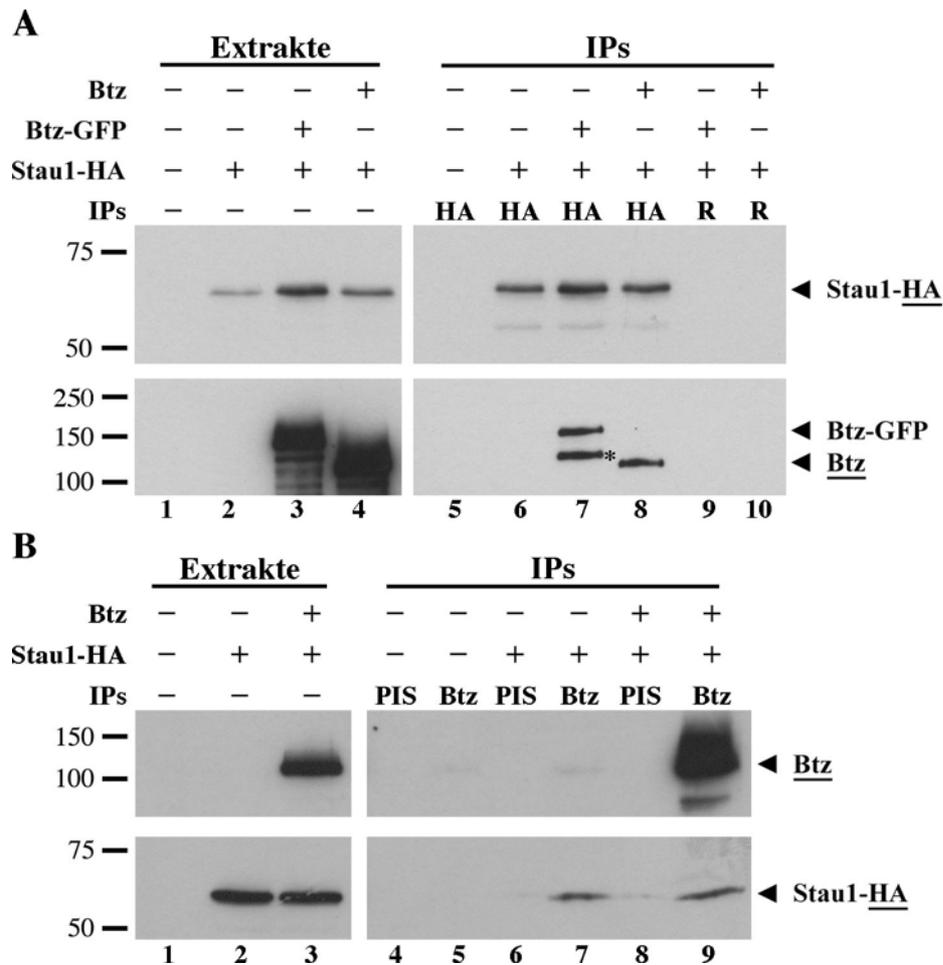


**Abbildung 9: Coimmunpräzipitation von Staufen1-HA mit Barentsz-GFP in BHK-Zellen.**

**A: Staufen1-HA coimmunpräzipitiert spezifisch mit Barentsz-GFP.**

**B: Axin1-c-myc wird nicht mit Barentsz-GFP coimmungefällt.**

A, B: BHK-Zellen wurden wie angezeigt transfiziert. Nach der Lyse wurden die Zellextrakte (Extrakte, siehe linke Seite) für Immunpräzipitationen mit anti-GFP Antikörpern verwendet (anti-GFP IP, siehe rechte Seite). Die Western Blots wurden mit den durch Unterstreichen markierten Antikörpern durchgeführt. IgG markiert die schweren Ketten der IgGs bei 50 kDa.



**Abbildung 10: Barentsz interagiert mit Stau1-HA in BHK-Zellen.**

**A: Barentsz coimmunpräzipitiert mit Stau1-HA.** BHK-Zellen wurden mit den angezeigten Konstrukten transfiziert. Nach der Lyse erfolgten Immunpräzipitationen mit anti-HA bzw. anti-Reticulin Antikörpern (Markierung mit HA bzw. R). Der Stern steht für ein Abbauprodukt von Barentsz-GFP, das ebenfalls mit Stau1-HA coimmunpräzipitiert wurde.

**B: Stau1-HA coimmunpräzipitiert mit Barentsz.** BHK-Zellen wurden wie angezeigt transfiziert. Nach der Lyse (Extrakte, siehe linke Seite) wurden die Proben aufgeteilt und für Immunpräzipitationen (siehe rechte Seite: IPs) mit dem anti-Barentsz12 Antikörper bzw. als Negativkontrolle mit dem Präimmenserum des Kaninchens 12 (Markierung mit Btz bzw. PIS) verwendet.

Barentsz-GFP wurde auch Stau1-HA coimmungefällt, was eine Interaktion der beiden Proteine nahe legt. Zur Kontrolle habe ich BHK-Zellen mit GFP sowie Stau1-HA transfiziert (siehe Abbildung 9 A, Spur 2). Die Immunpräzipitation mit anti-GFP Antikörpern fällte jedoch nur GFP, aber kein Stau1-HA (siehe Abbildung 9 A, Spur 4). Damit konnte ich ausschließen, daß Stau1-HA von dem anti-GFP Antikörper direkt immungefällt wird oder daß Stau1-HA durch die GFP-Domäne coimmunpräzipitiert wird. Um sicher zu stellen, daß die Coimmunfällung von Stau1-HA nicht durch Überexpression zustande kam,

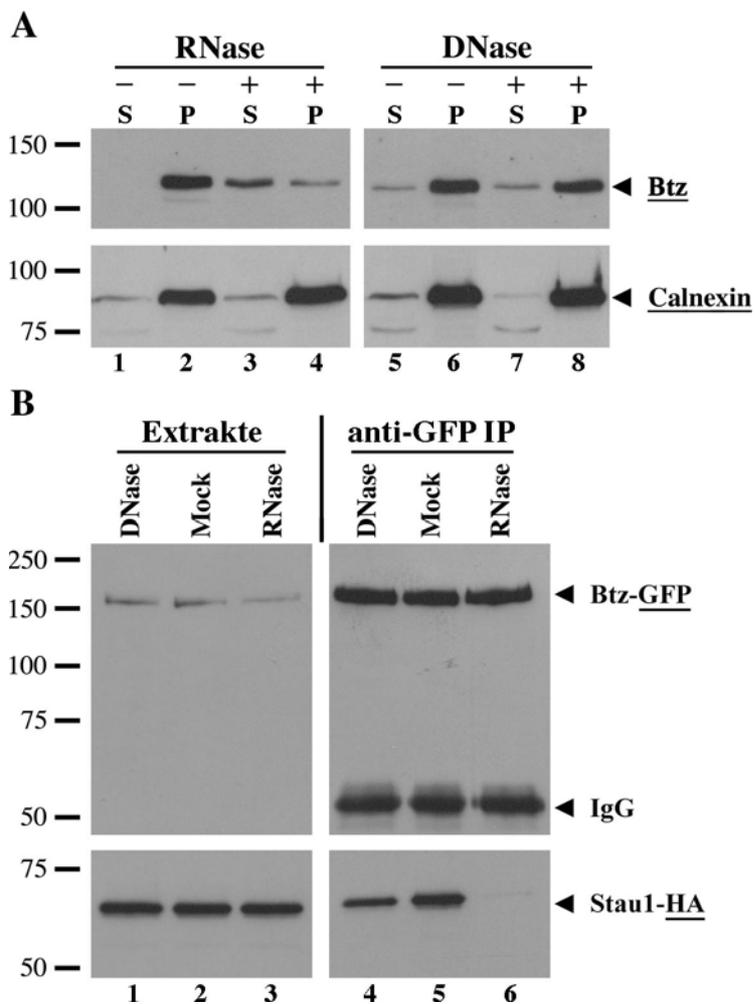
wurden BHK-Zellen mit Barentsz-GFP sowie Axin1-c-myc anstelle von Staufen1-HA transfiziert. Wie erwartet ließ sich bei einer Immunpräzipitation mit anti-GFP Antikörpern kein Axin1-c-myc nachweisen (siehe Abbildung 9 B, Spur 4), während bei der Kontrolle Staufen1-HA mit Barentsz-GFP coimmungefällt wurde (siehe Abbildung 9 B, Spur 3). In Immunpräzipitationen mit dem anti-HA Antikörper bestätigte die Anwesenheit von Barentsz bzw. Barentsz-GFP die spezifische Interaktion zwischen Barentsz und Staufen1 (siehe Abbildung 10 A, Spur 7 und 8). Des Weiteren wurde Staufen1-HA auch in Immunpräzipitationen mit dem anti-Barentsz12 Antiserum coimmungefällt (siehe Abbildung 10 B, Spuren 7 und 9). Interessanterweise ist die Menge an coimmungefälltem Staufen1-HA unabhängig davon, ob eine geringe Menge endogenes oder überexprimiertes Barentsz gefällt wurde (vergleiche Abbildung 10 B, Spuren 7 und 9). In zusätzlichen Kontrollversuchen wurden weder Barentsz noch Staufen1 mit anti-Reticulin Antikörpern (siehe Abbildung 10 A, Spuren 9 und 10) sowie mit dem Präimmunserum von Kaninchen 12 (siehe Abbildung 10 B, Spuren 4, 6 und 8) immungefällt. Zusammenfassend belegen diese Versuche, daß Barentsz und Staufen1 in Säugerzellen spezifisch miteinander interagieren.

#### **4.3.2 RNA-abhängige Interaktion von Barentsz mit Staufen1-HA in BHK-Zellen**

Im vorigen Abschnitt wurde gezeigt, daß Barentsz mit Staufen1 in BHK-Zellen interagiert. Da Staufen1 wahrscheinlich am mRNA-Transport in hippocampalen Neuronen beteiligt ist, sollte im Folgenden untersucht werden, ob Barentsz möglicherweise ebenfalls eine Komponente der Staufen1-enthaltenden mRNPs in Nervenzellen darstellt.

In einem ersten Versuch wurde die Verteilung von Barentsz in verschiedenen, differentiell zentrifugierten Ratten-Hirnextrakten untersucht. Der Großteil von Barentsz befand sich im P100 (vergleiche Spuren 1 und 2 in Abbildung 11 A), was eine Assoziation von Barentsz mit intrazellulären Membranen oder mit Polysomenkomplexen vermuten läßt. Eine ähnliche Verteilung wurde auch bei den Staufen-Proteinen beobachtet (Mallardo *et al.*, 2003). Interessanterweise wurden sowohl Barentsz als auch die Staufen-Proteine nach einer RNase-Behandlung aus dem P100 freigesetzt: nach einer solchen Behandlung befand sich Barentsz zu ungefähr gleichen Teilen in S100 und P100 (siehe Abbildung 11 A, Spuren 3 und 4). Eine Behandlung mit DNase I hatte hingegen keinen Einfluß auf die Verteilung von Barentsz (siehe Abbildung 11 A, Spuren 7 und 8). Zur Kontrolle wurde dieselbe Membran mit dem anti-Calnexin Antikörper immundekoriert. Calnexin diente als Marker des endoplasmatischen Reticulums ER), das bei einer Zentrifugation mit 100.000 g pelletiert wird. Die Versuche mit

der RNase-Behandlung lassen vermuten, daß Barentsz und Staufen1 auch in Hirnextrakten Komponenten eines gemeinsamen Komplexes sind und daß dieser Komplex mit intrazellulären Membranen (wie z. B. dem rauhen endoplasmatischen Reticulum, rER) oder auch Polysomen assoziiert zu sein scheint. Möglicherweise erfolgt die Assoziation von Barentsz mit Staufen1 über die in den Komplexen enthaltenen mRNAs.



**Abbildung 11: RNA-abhängige Interaktion von Barentsz mit Staufen1-HA.**

**A: RNA-abhängige Assoziation von Barentsz mit Zellorganellen in Rattenhirn-Extrakten.** Der S14 von Hirnextrakten 3 Wochen alter Ratten wurde mit RNase A, DNase I bzw. Mock behandelt. Nach Zentrifugation mit 100.000 g wurden jeweils 50 µg des Pellets und des Überstandes (P = P100 bzw. S = S100) durch Western Blotting mit den angezeigten Antikörpern analysiert.

**B: Barentsz interagiert RNA-abhängig mit Staufen1 in BHK-Zellen.** BHK-Zellen wurden mit Barentsz-GFP und Staufen1-HA transfiziert. Das Lysat wurde mit RNase A, DNase I oder Mock behandelt (Extrakte, siehe linke Seite) und anschließend für Immunpräzipitationen mit anti-GFP Antikörpern verwendet (anti-GFP IP, siehe rechte Seite).

Auf Grund dieser Vermutungen sollte im folgenden Versuch untersucht werden, ob die Interaktion zwischen Barentsz mit Staufen1 tatsächlich RNA-abhängig ist. Dazu habe ich BHK-Zellen mit Barentsz-GFP sowie Staufen1-HA transfiziert. Die Zell-Lysate wurden mit RNase A behandelt und anschließend mit anti-GFP Antikörpern immungefällt. Wie bereits vermutet, hebt die RNase-Behandlung die Interaktion von Barentsz mit Staufen1-HA auf (siehe Abbildung 11 B, Spur 6), wohingegen die Mock- bzw. DNase-Behandlung vor der Immunpräzipitation keinen Effekt auf die Interaktion hatten (siehe Abbildung 11 B, Spuren 4 und 5).

Die Interaktion von Barentsz mit Staufen sowohl in *Drosophila melanogaster* als auch in Säugerzellen läßt auf eine konservierte Interaktion der beiden Proteine schließen. Da die N-terminale Hälfte von Barentsz die zu *Drosophila* konservierte Region enthält, wurden von Dr. Paolo Macchi mehrere Konstrukte kloniert, die für verschiedene N-terminale Domänen von Barentsz mit einer C-terminalen GFP-Domäne kodieren. Mit diesen Fusionsproteinen sollte im Folgenden getestet werden, welche Barentsz-Domäne die RNA-abhängige Interaktion mit Staufen1 vermittelt. Die vier in Abbildung 12 A schematisch dargestellten Barentsz-Konstrukte wurden zusammen mit Staufen1-HA in BHK-Zellen transfiziert. Wie vermutet, zeigten die Barentsz-GFP-Fusionsproteine, welche die zu *Drosophila* konservierte Domäne beinhalten (Btz-GFP, Btz<sub>1-359</sub>-GFP sowie Btz<sub>152-359</sub>-GFP), eine RNA-abhängige Interaktion mit Staufen1-HA (siehe Abbildung 12 B; Spuren 9 – 12 sowie 15 und 16). Das Protein Btz<sub>1-158</sub>-GFP, das die konservierte Domäne nicht enthält, zeigte hingegen auch in Gegenwart von RNA keine Interaktion mit Staufen1-HA (siehe Abbildung 12 B, Spuren 13 und 14). Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die RNA-abhängige Interaktion zwischen Barentsz und Staufen1 über die konservierte Domäne von Barentsz vermittelt wird. Möglicherweise besitzt das mit RNA beladene Staufen1 eine spezielle Konformation, die von Barentsz erkannt wird.

Wenn die Hypothese stimmt, daß Barentsz nur mit Staufen1 interagiert, welches RNA gebunden hat, dann sollte Barentsz nicht mit Staufen1-Mutanten interagieren, die keine RNA binden können. Bei Staufen1<sub>AMA</sub>-HA wurden von Dr. Paolo Macchi zwei für die RNA-Bindung essentielle Aminosäuren zu Alanin mutiert, nämlich **H**<sub>124</sub>**MK**<sub>126</sub> zu **A**<sub>124</sub>**MA**<sub>126</sub> (für weitere Informationen siehe Ramos *et al.*, 2000 und Macchi *et al.*, 2004). Daher ist diese Staufen1-Mutante nicht mehr in der Lage, *in vitro* Doppelstrang-RNA zu binden. Um nun die oben genannte Hypothese zu überprüfen, habe ich BHK-Zellen in Doppeltransfektionen mit Barentsz-GFP und Staufen1<sub>WT</sub>-HA (dem bisher verwendeten Konstrukt) bzw. Staufen1<sub>AMA</sub>-HA transfiziert. Nach einer Mock- bzw. RNase-Behandlung habe ich die Extrakte für

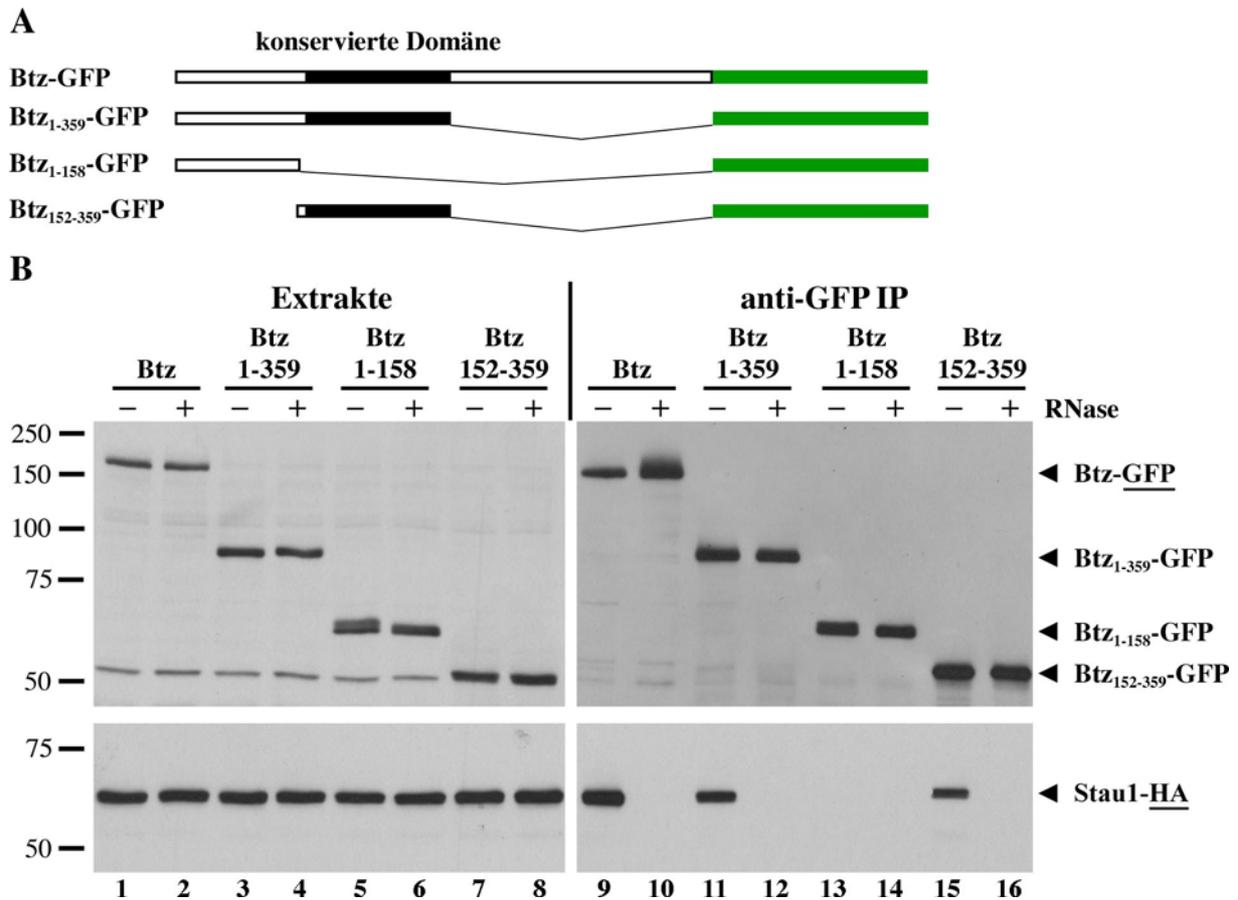
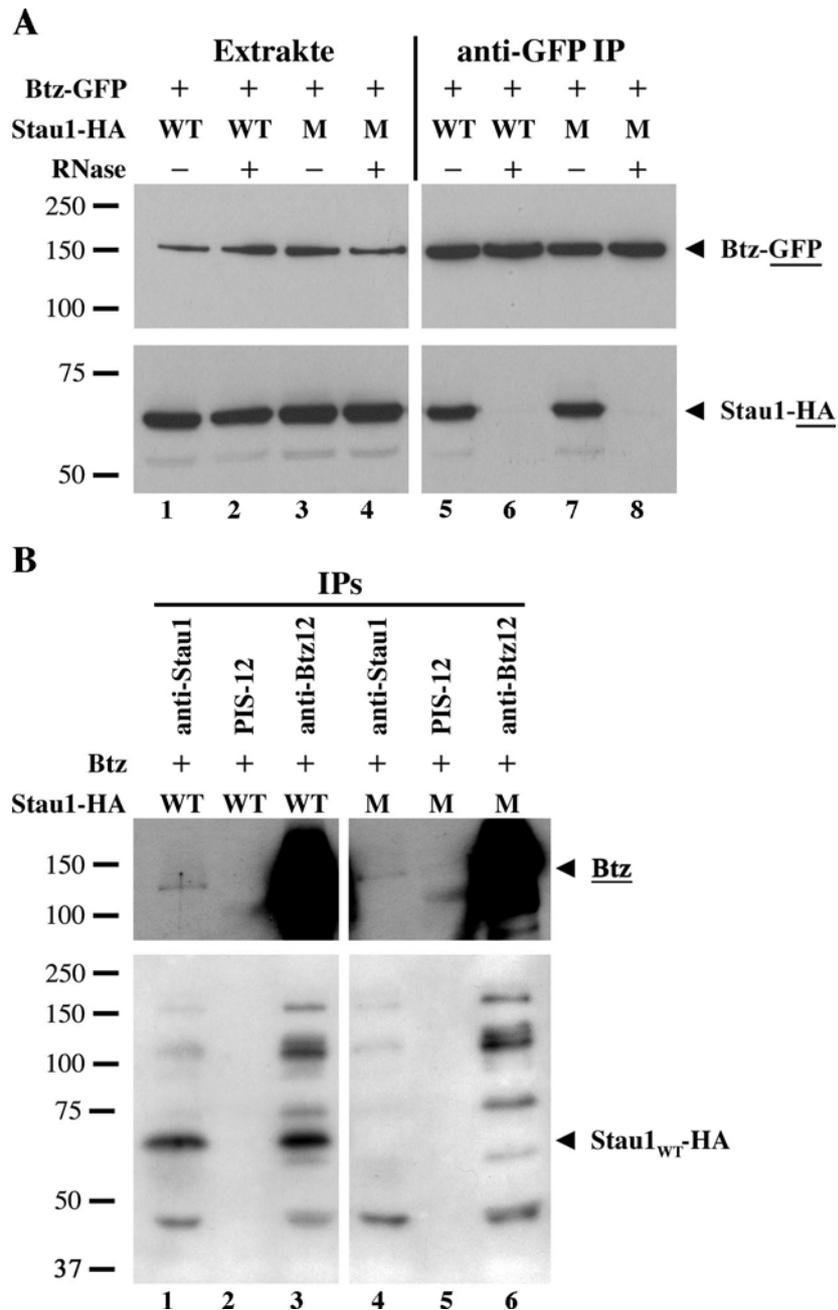


Abbildung 12: RNA-abhängige Interaktion der konservierten Barentsz-Domäne mit Stau1-HA in BHK-Zellen.

**A:** Schematische Übersicht der verwendeten Barentsz-GFP-Fusionsproteine.

**B:** Die konservierte Domäne von Barentsz bewirkt die RNA-abhängige Interaktion mit Stau1. Verschiedene N-terminale Barentsz-Domänen – jeweils fusioniert mit GFP – wurden zusammen mit Stau1-HA in BHK-Zellen exprimiert. Nach Mock- bzw. RNase-Behandlung wurden die Lysate (Extrakte, siehe linke Seite) für Immunpräzipitationen mit anti-GFP Antikörpern verwendet (anti-GFP IP, siehe rechte Seite). Die jeweiligen Fusionsproteine sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet.

Immunpräzipitationen mit anti-GFP Antikörpern verwendet. Überraschenderweise interagiert die Stau1-Mutante wie das WT-Protein mit Barentsz in Gegenwart von RNA (siehe Abbildung 13 A, Spuren 5 und 7). Die Interaktion zu Barentsz wurde bei beiden Proteinen durch die RNase-Behandlung aufgehoben (siehe Abbildung 13 A, Spuren 6 und 8). Dieser Widerspruch kann folgendermaßen erklärt werden. Zum einen wurde der RNA-Bindungsversuch, bei dem gezeigt wurde, daß die Mutante keine RNA binden kann, *in vitro* über North-Western Blotting durchgeführt. Möglicherweise kann die Stau1-Mutante *in vivo* trotz der beiden Mutationen in der dritten Doppelstrang-RNA Bindedomäne (dsRBD3) weiterhin Doppelstrang-RNA binden, vielleicht durch eine Bindung von RNA über die



**Abbildung 13: RNA-abhängige Interaktion von Barentsz mit Stau1-Mutanten, die keine Doppelstrang-RNA binden können.**

**A: RNA-abhängige Interaktion von Barentsz mit Stau1<sub>AMA</sub>-HA in BHK-Zellen.** BHK-Zellen wurden mit Barentsz-GFP und Stau1<sub>WT</sub>-HA bzw. Stau1<sub>AMA</sub>-HA (WT = Wildtyp bzw. M = Mutante) transfiziert. Die Lysate wurden Mock oder mit RNase A behandelt. Bei der Immunpräzipitation mit anti-GFP Antikörpern wurde Stau1<sub>AMA</sub>-HA ebenfalls wie Stau1<sub>WT</sub>-HA in Gegenwart von RNA mit Barentsz-GFP coimmungefällt.

**B: Coimmunpräzipitation von mehreren Doppelstrang-RNA bindenden Proteinen in anti-Barentsz und anti-Stau1 Immunpräzipitationen in BHK-Zellen.** BHK-Zellen wurden wie angezeigt mit Barentsz und Stau1<sub>WT</sub>-HA bzw. Stau1<sub>IV</sub>-HA transfiziert und lysiert. Die Immunpräzipitationen wurden mit anti-Stau1 und anti-Barentsz12 Antikörpern sowie mit dem Präimmunserum von Kaninchen 12 als Negativkontrolle durchgeführt. Oben: Western Blotting mit anti-Barentsz Antikörpern; Unten: North-Western Blotting.

dsRBD4-Domäne, von der ebenfalls RNA-Bindeaktivität berichtet wurde, oder über das Zusammenwirken der übrigen dsRBD-Domänen. Eine zweite Erklärung könnte das Vorhandensein von weiteren RNA-Bindeproteinen in den Barentsz/Staufen1-Komplexen sein, welche zusammen die RNA-Bindung bewirken. In diesem Falle wäre Staufen1 für die RNA-Bindung hilfreich, aber nicht notwendigerweise essentiell. Um dies näher zu untersuchen, wurden BHK-Zellen mit Barentsz sowie Staufen1<sub>WT</sub>-HA bzw. Staufen1<sub>IV</sub>-HA (eine andere Vierfach-Staufen1-Mutante, die *in vitro* ebenfalls keine Doppelstrang-RNA binden kann) transfiziert. Anschließend wurden mit den Zellextrakten Immunpräzipitationen mit anti-Staufen1 sowie anti-Barentsz12 Antikörpern durchgeführt. Die Immunpräzipitationen habe ich über Western sowie North-Western Blotting analysiert, um coimmungefällte RNA-Bindeproteine zu detektieren. Bei der Immunfällung mit den anti-Staufen1 Antikörpern wurde aus den mit Staufen1<sub>WT</sub>-HA bzw. mit Staufen1<sub>IV</sub>-HA transfizierten Extrakten neben einer geringen Menge an Barentsz auch 4 bzw. 3 RNA-Bindeproteine mitgefällt (siehe Abbildung 13 B, Spuren 1 und 4), wobei eines der RNA-Bindeproteine Staufen1<sub>WT</sub>-HA darstellt (siehe Spur 1). Wie erwartet bindet Staufen1<sub>IV</sub>-HA keine RNA, und wurde daher auch beim North-Western Blotting nicht detektiert (siehe Spuren 4 und 6). Bei den entsprechenden Immunpräzipitationen mit den anti-Barentsz Antikörpern wurden neben Barentsz 8 bzw. 7 RNA-Bindeproteine coimmungefällt (siehe Abbildung 13 B, Spuren 3 und 6). Interessanterweise sind alle mit den anti-Staufen1 Antikörpern gefällten RNA-Bindeproteine auch mit den anti-Barentsz Antikörpern coimmunpräzipitiert worden. Dies ist ein weiterer Hinweis, daß Barentsz und Staufen1 in BHK-Zellen Komponenten eines gemeinsamen RNP-Komplexes sind. Außerdem könnte die Coimmunfällung mehrerer RNA-Bindeproteine eine Erklärung dafür sein, daß Barentsz auch in Gegenwart von RNA mit den Staufen1-Mutanten interagiert.

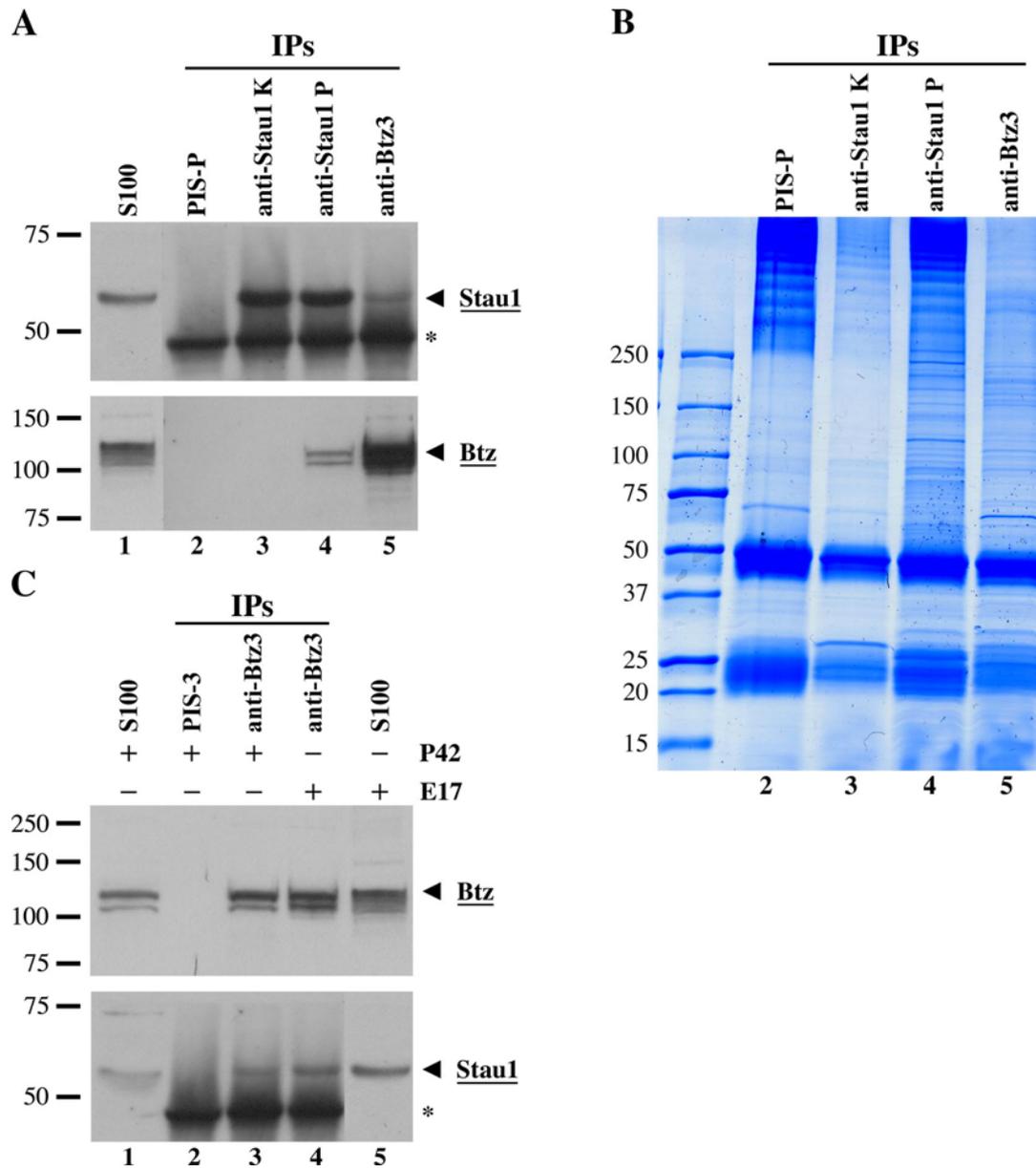
#### **4.3.3 Interaktion von Barentsz mit Staufen1 in Hirnextrakten der Ratte**

Nachdem in den beiden vorherigen Abschnitten die Interaktion zwischen Barentsz und Staufen1 in BHK-Zellen genau charakterisiert wurde, sollte nun überprüft werden, ob die beiden Proteine auch in Hirnextrakten der Ratte miteinander interagieren, und möglicherweise RNAs in einem gemeinsamen Komplex in die Dendriten von Neuronen transportieren.

Da die Expression von Barentsz und auch die von Staufen1 in Hirnextrakten von embryonalen Ratten am höchsten ist (siehe Abbildung 8 B), wählte ich diesen Extrakt als Ausgangsmaterial für den ersten Versuch. Nach differentieller Zentrifugation wurde der S100 des Rattenhirn-

Extrakts für die Immunfällung verwendet. Der S100 von Hirnextrakten embryonaler Ratten (E17) wurde auch bei den weiteren Immunfällungen verwendet soweit nicht anders vermerkt. Eine Probe des S100, jeweils 3 – 5 % der bei der Fällung verwendeten Proteinmenge, wurde immer als Ladekontrolle aufgetragen (Bezeichnung mit S100). Für die ersten Immunpräzipitationen habe ich zwei verschiedene anti-Staufen1 Antikörper, nämlich von Kaninchen K und P (siehe Abbildung 15 A und B, Spuren 3 und 4), sowie ein anti-Barentsz Antikörper, nämlich von Kaninchen 3 (siehe Abbildung 14 A und B, Spur 5) verwendet. Bei allen Antikörpern kam es zu einer starken Anreicherung des jeweiligen Antigens. Bei den Fällungen mit anti-Staufen1 P und anti-Barentsz3 Antikörpern ließ sich zudem Barentsz bzw. Staufen1 nachweisen, was die Interaktion der beiden Proteine auch in Rattenhirn-Extrakten bestätigt. Um die Spezifität der Immunpräzipitationen zu zeigen, führte ich als Negativkontrolle eine Fällung mit dem Präimmunserum von Kaninchen P durch (siehe Abbildung 14 A und B, Spur 2). Hierbei konnten weder über Western Blotting noch über eine Coomassie-Färbung Hintergrundproteine nachgewiesen werden. Jedoch muß an dieser Stelle angemerkt werden, daß mit dem anti-Staufen1 K Antikörper zwar Staufen1 gefällt wurde, jedoch kein Barentsz nachweisbar war. Dies kann möglicherweise dadurch erklärt werden, daß manche Antikörper zwar ihr Antigen erkennen, aus sterischen Gründen jedoch die Interaktion mit anderen Proteinen aufheben. Dies würde auch erklären, warum im Coomassie-Gel neben den Antikörper-Banden bei ~ 25 und 50 kDa keine bzw. kaum andere Proteine zu sehen sind (siehe Abbildung 14 B, Spur 3). Im Gegensatz dazu wurden mit den anti-Staufen1 P und anti-Barentsz3 Antikörpern neben Barentsz und Staufen1 viele andere Proteine mitgefällt. Die Spezifität der coimmungefällten Proteine gilt es jedoch in weiteren Versuchen zu analysieren.

Nachdem die Interaktion von Barentsz und Staufen1 in Hirnextrakten von embryonalen Ratten nachgewiesen wurde, sollte durch weitere Immunfällungen herausgefunden werden, ob die beiden Proteine auch in adulten Ratten (P42) miteinander interagieren. Beide Proteine werden jedoch in diesen Tieren wie bereits erwähnt deutlich weniger exprimiert als in embryonalen Ratten (siehe auch Abbildung 8 B). In der Immunpräzipitation mit anti-Barentsz3 Antikörpern wurde neben Barentsz auch Staufen1 coimmunpräzipitiert (siehe Abbildung 14 C, Spur 3). Als Negativkontrolle wurde eine Fällung mit dem Präimmunserum von Kaninchen 3 durchgeführt, bei der jedoch weder Barentsz noch Staufen1 gefällt wurden. Dies zeigt, daß Barentsz und Staufen1 auch im Hirngewebe von adulten Ratten in einem gemeinsamen Komplex vorliegen.



**Abbildung 14: Interaktion von Barentsz mit Stau1 in Hirnextrakten von embryonalen und adulten Ratten.**

**A, B: Barentsz interagiert mit Stau1 in Hirnextrakten von embryonalen Ratten.** Aus dem S100 von embryonalen Ratten (E17) wurde mit den angezeigten Antikörpern immungefällt. Als Negativkontrolle diente eine Immunpräzipitation mit dem Präimmenserum von Kaninchen P, als Ladekontrolle wurden 50 µg des verwendeten S100 aufgetragen. A: Western Blot (die mit \* markierte Bande stellt Protein A bzw. die schweren Ketten von IgGs dar). B: zugehöriges kolloidales Coomassie-Gel.

**C: Barentsz interagiert mit Stau1 in Hirnextrakten von adulten Ratten.** Mit Hirnextrakten von adulten Ratten (P42) wurden Immunpräzipitationen mit anti-Barentsz3 Antikörpern (Spur 3) bzw. als Negativkontrolle mit dem Präimmenserum von Kaninchen 3 (Spur 2) durchgeführt. Zudem wurde eine Immunpräzipitation mit anti-Barentsz3 Antikörpern aus embryonalen Hirnextrakten (Spur 4) sowie jeweils 50 µg des verwendeten S100 von adulten bzw. embryonalen Ratten aufgetragen (Spuren 1 und 5). Die Detektion erfolgte durch Immundekoration mit den angezeigten Antikörpern.

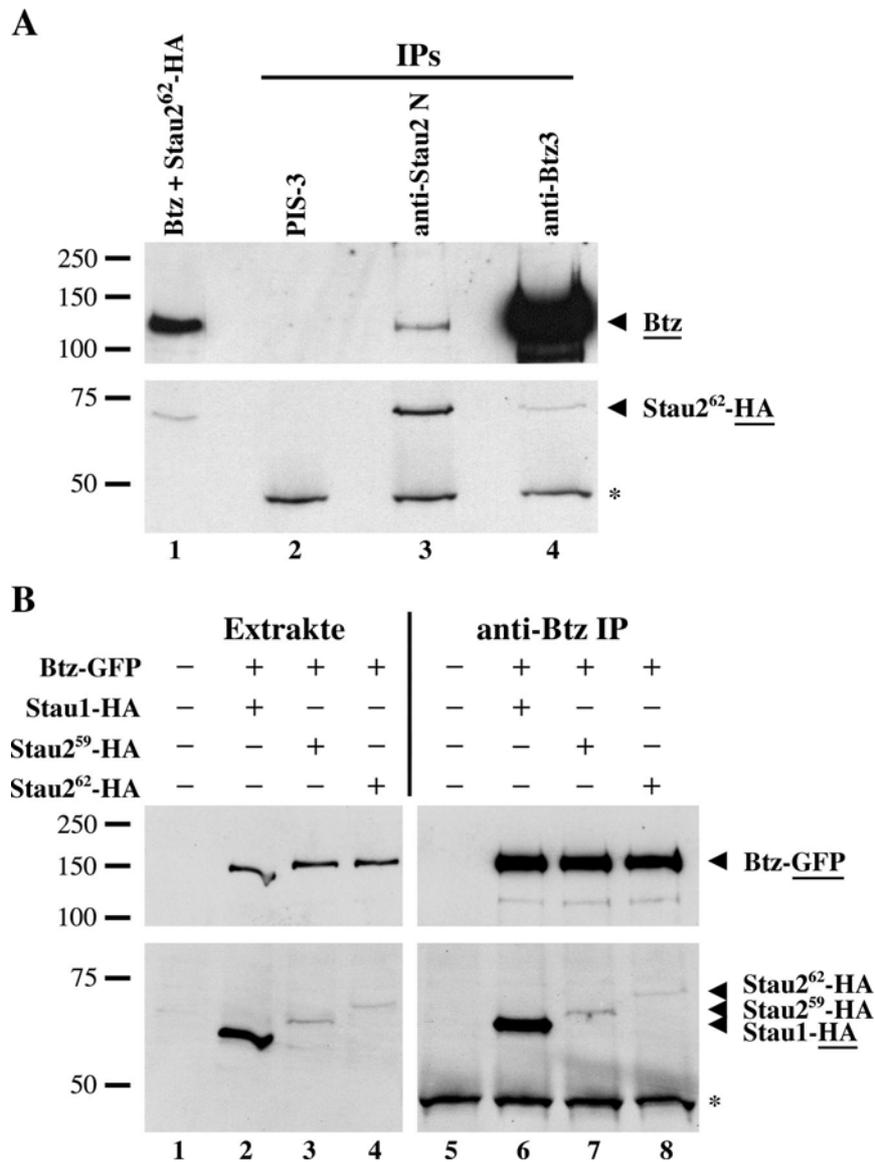
An dieser Stelle möchte ich auf ein technisches Detail beim Western Blotting eingehen, das bei der Detektion von Proteinen nach Immunpräzipitationen wichtig ist. Wie bei den Immunpräzipitationen aus BHK-Zellextrakten wurden bei den Immunfällungen aus Hirnextrakten hauptsächlich Kaninchen-Antikörper eingesetzt. Bei der Detektion von immungefällten Proteinen mit einem Molekulargewicht von ~ 50 kDa ergab sich daher das Problem, daß das spezifische Signal durch das der schweren Ketten der bei den Immunfällungen eingesetzten Antikörper überlagert wurde. Dieses Signal kam durch die Verwendung des HRP-konjugierten anti-Kaninchen IgG Sekundär-Antikörpers zustande, wenn beim Western Blot als Primärantikörper ein Kaninchen-Antikörper eingesetzt wurde. Bei der Detektion von Staufen1-HA ließ sich dies durch die Verwendung eines anti-HA Primärantikörper aus der Maus vermeiden. Bei den Immunpräzipitationen aus Hirnextrakten standen zur Detektion der gefällten Proteine jedoch häufig nur Kaninchen-Antikörper zur Verfügung. Um hier das starke Signal der schweren IgG-Ketten zu minimieren, wurde anstelle des HRP-konjugierten anti-Kaninchen IgG Antikörpers das HRP-konjugierte Protein A als Pseudo-Sekundärantikörper eingesetzt. Dieses erkennt spezifisch die nativen Antikörper des beim Western Blotting eingesetzten Primärantikörpers, jedoch nicht die denaturierten schweren Ketten der bei den Immunpräzipitationen eingesetzten Antikörper. Häufig wurde jedoch trotzdem eine Bande bei 50 kDa erkannt, die bei der Verwendung des anti-Staufen1 K Antikörpers teilweise recht stark war. Diese Bande wird im folgenden jeweils mit einem Stern markiert.

### **4.4 Nachweis weiterer Interaktionspartner von Barentsz**

Bisher wurde die Interaktion von Barentsz mit Staufen1 sowohl in BHK-Zellextrakten als auch in Hirnextrakten der Ratte genau untersucht. Im folgenden Versuchsteil wird die Interaktion von Barentsz mit Proteinen analysiert, die auf Grund der in der Einleitung aufgeführten Forschungsergebnisse in Frage kommen, mit Barentsz zu interagieren.

#### **4.4.1 Barentsz interagiert mit Staufen2-HA in BHK-Zellen**

Nachdem die Interaktion von Barentsz mit Staufen1 genau analysiert wurde, lag es nahe zu untersuchen, ob Barentsz auch mit dem zweiten Staufen-Protein, Staufen2, interagiert. Zunächst wurde auch hier die Interaktion in Zellkultur-Zellen mit überexprimierten Proteinen untersucht. Im Gegensatz zu den bisherigen Versuchen wurden jedoch HeLa-Zellen verwendet.



**Abbildung 15: Interaktion von Barentsz mit Staufen2-Isoformen in HeLa-Zellen.**

**A: Charakterisierung der spezifischen Interaktion von Barentsz mit Staufen2<sup>62</sup>-HA.** HeLa-Zellen wurden mit Barentsz und Staufen2<sup>62</sup>-HA transfiziert. Das Lysat wurde für Immunpräzipitationen mit anti-Staufen2 und anti-Barentsz3 Antikörpern verwendet. Als Negativkontrolle diente die Immunpräzipitation mit dem Präimmunserum von Kaninchen 3. Spur 1: 10 µg Extrakt der transfizierten Zellen.

**B: Barentsz interagiert sowohl mit Staufen2<sup>59</sup>-HA als auch mit Staufen2<sup>62</sup>-HA.** HeLa-Zellen wurden wie angezeigt transfiziert (Extrakte, siehe linke Seite) und die Lysate für Immunpräzipitationen mit anti-Barentsz3 Antikörpern eingesetzt (anti-Btz IP, siehe rechte Seite). Seitlich sind die jeweiligen Fusionsproteine mit Pfeilspitzen markiert.

HeLa-Zellen wurden mit Barentsz und Staufen2<sup>62</sup>-HA, der langen Isoform von Staufen2 mit einem Molekulargewicht von 62 kDa, transfiziert. Die Expression von Staufen2<sup>62</sup>-HA war jedoch im Vergleich zu Staufen1-HA deutlich geringer (vergleiche dazu auch Abbildung 15 B, Spuren 2 und 4). Für die Immunpräzipitationen aus den Zellextrakten habe ich anti-

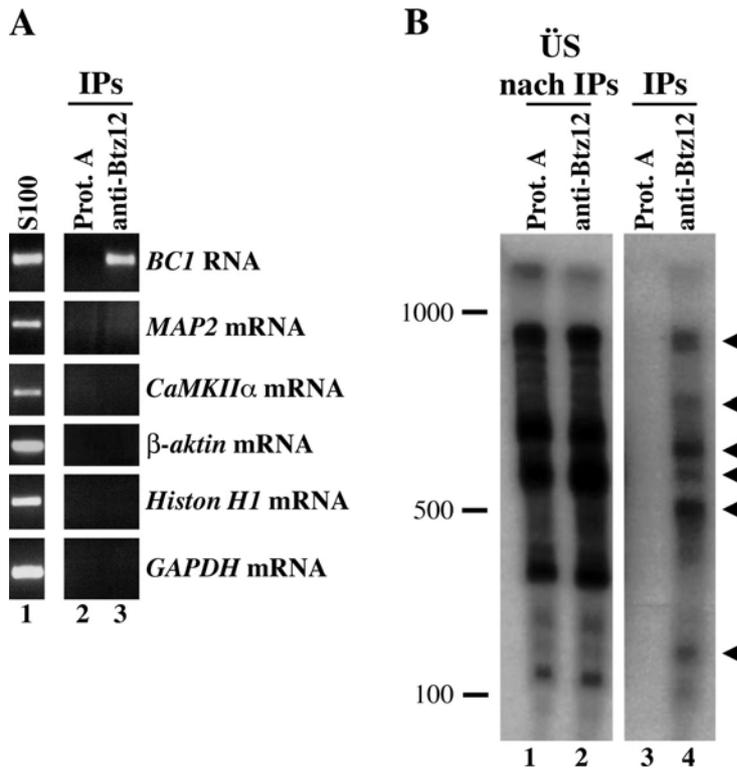
Staufen2 und anti-Barentsz3 Antikörper verwendet (siehe Abbildung 15 A, Spuren 3 und 4). Bei beiden Antikörpern wurde das jeweilige Antigen deutlich angereichert. Bei der anti-Staufen2 Immunpräzipitation wurde Barentsz ebenso nachgewiesen wie Staufen2<sup>62</sup>-HA in der anti-Barentsz Immunpräzipitation. Die Menge an coimmungefälltem Staufen2<sup>62</sup>-HA war auf Grund der sehr geringen Expression von Staufen2<sup>62</sup>-HA ebenfalls nur sehr gering, aber signifikant. Um die Spezifität der Immunfällungen zu überprüfen, wurde derselbe Zellextrakt auch für eine Immunpräzipitation mit dem Präimmenserum von Kaninchen 3 verwendet. Diese Fällung ergab jedoch weder für Barentsz noch für Staufen2<sup>62</sup>-HA ein Signal (siehe Abbildung 15 A, Spur 2). Damit wurde gezeigt, daß Barentsz auch mit Staufen2 in HeLa-Zellen interagiert.

Um zu überprüfen, ob die Interaktion zwischen Barentsz und Staufen2 möglicherweise auf eine Isoform beschränkt ist, wurden HeLa-Zellen in Doppeltransfektionen mit Barentsz und Staufen2<sup>62</sup>-HA bzw. Staufen2<sup>59</sup>-HA transfiziert. Bei den anschließenden Immunpräzipitationen mit anti-Barentsz3 Antikörpern wurden beide Isoformen coimmunpräzipitiert (siehe Abbildung 15 B, Spuren 7 und 8). Als Positivkontrolle diente eine anti-Barentsz3 Immunpräzipitation aus mit Barentsz und Staufen1-HA transfizierten Zellextrakten (siehe Abbildung 15 B, Spur 6). Somit interagiert Barentsz sowohl mit Staufen1 als auch mit den beiden getesteten Staufen2-Isoformen.

#### 4.4.2 Identifizierung von RNAs in Barentsz-Komplexen in Hirnextrakten der Ratte

Barentsz und Staufen sind essentielle Faktoren für die Lokalisierung von *oskar* mRNA in *Drosophila melanogaster*. Des weiteren gibt es gute Hinweise auf eine Beteiligung von Staufen1 am mRNA-Transport in hippocampalen Neuronen. Im ersten Teil meiner Doktorarbeit gelang mir wie gezeigt der Nachweis, daß die Interaktion zwischen Barentsz und Staufen auch in Säugerzellen konserviert ist und daß ihre Interaktion RNA-abhängig ist. Daher galt es im Folgenden, weitere Komponenten der Barentsz-enthaltenden Komplexe zu identifizieren: zum einen weitere mit Barentsz interagierende Proteine, zum anderen die in diesem Komplex vorhandenen RNAs.

Um die an der Interaktion beteiligten RNAs zu isolieren, habe ich die Barentsz-Komplexe in insgesamt 4 parallel durchgeführten Immunpräzipitationen mit anti-Barentsz12 Antikörpern angereichert, die gefällte RNA extrahiert und anschließend mittels RT-PCR analysiert. Mit dieser Methode konnte nur eine begrenzte Anzahl von RNAs analysiert werden. Daher fiel die Wahl auf Kandidaten, die in den Dendriten von hippocampalen Neuronen lokalisieren und



**Abbildung 16: Charakterisierung von RNAs in Barentsz-enthaltenden RNPs aus Rattenhirn-Extrakten.**

**A: *BCI* RNA coimmunpräzipitiert mit Barentsz-Komplexen.** Jeweils vier Immunpräzipitationen aus dem Hirnextrakt von embryonalen Ratten (E17) wurden in Abwesenheit von Antikörpern bzw. mit anti-Barentsz12 Antikörpern durchgeführt (Spuren 2 und 3: Bezeichnung mit Prot. A IP bzw. anti-Btz12 IP). Die aus diesen Immunpräzipitationen isolierte RNA wurde durch RT-PCR mit Primern spezifisch für dendritisch lokalisierte RNAs (*BCI*, *MAP2* und *CaMKII $\alpha$* ) oder nur im Zellkörper vorkommende mRNAs ( $\beta$ -*Aktin*, *Histon H1* und *GAPDH*) amplifiziert. Als Positivkontrolle wurde die aus dem S100 isolierte RNA für die RT-PCR verwendet.

**B: Radioaktive Markierung von mRNAs in Barentsz-RNPs.** Wie unter A beschrieben, wurde RNA von Immunpräzipitationen isoliert. Mittels radioaktiver reverser Transkription mit oligo(dT)-Primern wurden mRNAs markiert, die in Barentsz-Immunpräzipitationen vorkommen (Spur 4: anti-Btz12 IP). Die spezifischen mRNAs sind mit Pfeilspitzen gekennzeichnet. In der Negativkontrolle ohne Antikörper wurden keine mRNAs detektiert (Spur 3: Prot. A IP). Als Positivkontrollen wurden die jeweiligen Überstände nach den Immunpräzipitationen verwendet (Spuren 1 und 2: ÜS nach IP).

deshalb möglicherweise mit RNA-bindenden Proteinen wie Staufen1 assoziiert sind, wie z. B. *BCI* RNA, *MAP2* mRNA oder *CaMKII $\alpha$*  mRNA. Als Negativkontrollen fungierten mRNAs, die nur im Zellkörper vorkommen (z. B. *GAPDH* mRNA,  $\beta$ -*Aktin* mRNA oder *Histon H1* mRNA). Während *BCI* RNA als eine der lokalisierten RNAs mittels RT-PCR aus der gefällten RNA amplifiziert wurde (siehe Abbildung 16 A, Spur 3), ließen sich weder die beiden übrigen lokalisierten *MAP2* und *CaMKII $\alpha$*  mRNAs noch die drei im Zellkörper vorkommenden mRNAs nachweisen. Zur Spezifitätskontrolle der Coimmunfällung von *BCI*

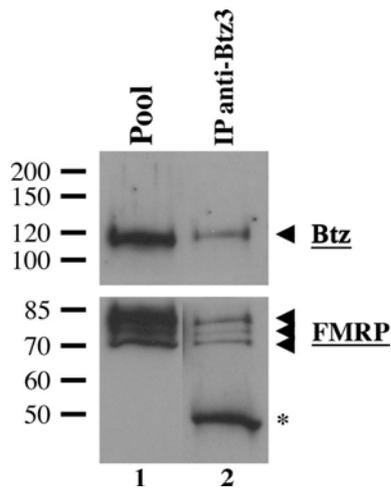
RNA habe ich vier Immunpräzitationen ohne spezifischen Antikörper mit dem Rattenhirn-Extrakt durchgeführt. Bei den RT-PCR-Reaktionen mit der hieraus isolierten RNA wurde keine der untersuchten RNAs amplifiziert (siehe Abbildung 16 A, Spur 2). Als Ladekontrolle wurde aus dem S100 isolierte RNA für die RT-PCR eingesetzt (siehe Abbildung 16 A, Spur 1). Somit ist *BCI* RNA die erste RNA, die in den Barentsz-enthaltenden RNPs von Rattenhirn-Extrakten identifiziert wurde.

Wie bereits erwähnt, konnte mittels RT-PCR nur eine begrenzte Anzahl an RNAs untersucht werden. Um herauszufinden, ob neben *BCI* RNA weitere mRNAs in den Barentsz-RNPs enthalten sind, wurde die nach den anti-Barentsz Immunpräzitationen isolierte RNA durch reverse Transkription mit oligo-(dT)-Primern radioaktiv markiert (siehe Abbildung 16 B, Spur 4). Als Negativkontrolle diente RNA, die von Immunpräzitationen ohne spezifischen Antikörper aus Rattenhirn-Extrakt isoliert wurde (siehe Abbildung 16 B, Spur 3). Als Positivkontrolle erfolgte eine radioaktive Markierung cytosolischer RNA, die aus den Überständen nach den beiden Immunpräzitationen isoliert wurde (siehe Abbildung 16 B, Spuren 1 und 2). In der mit anti-Barentsz Antikörpern gefällten RNA wurden mindestens 6 diskrete mRNAs radioaktiv markiert (in Abbildung 16 B markiert mit Pfeilspitzen), während in der Kontrolle ohne spezifische Antikörper keine mRNAs nachweisbar waren. Daher sind neben der nicht kodierenden *BCI* RNA auch weitere mRNAs in den Barentsz-RNPs von Ratten-Hirnextrakten enthalten, die in weiteren Versuchen molekular identifiziert werden müssen.

#### **4.4.3 Identifizierung weiterer Interaktionspartner von Barentsz in Hirnextrakten der Ratte**

Nach der Identifizierung von Staufen1 und zwei Staufen2-Isoformen sowie *BCI* RNA als Interaktionspartner von Barentsz wurden weitere Proteine getestet, ob sie mit Barentsz assoziiert sind. Auf Grund von Forschungsergebnissen anderer Arbeitsgruppen kamen hierfür unter anderem das fragile X-mentale Retardationsprotein (FMRP), der eukaryontische Initiationsfaktor eIF4AIII, die leichte bzw. die schwere Kette des Mikrotubuli-assoziierten Proteins 1B (MAP1B LC und HC) sowie das *testis- and brain-specific RNA binding protein* (TB-RBP) als Kandidaten in Frage.

In Zusammenarbeit mit Thomas Grosskopff in der Arbeitsgruppe wurde die Interaktion von Barentsz mit FMRP untersucht, welches zusammen mit Staufen, Pur $\alpha$  und Myosin Va mRNP-Komplexe in Hirnextrakten bildet (Ohashi *et al.*, 2002). In einem Vorversuch fand



**Abbildung 17: Barentsz interagiert mit FMRP in Hirnextrakten von adulten Ratten.**

4 Cortex-Hälften von adulten Ratten (P42) wurden in 4 ml Lyse-Puffer für die Gelfiltrations-Chromatographie homogenisiert (in Zusammenarbeit mit Thomas Grosskopff). Nach der differentiellen Zentrifugation wurde der P100 in 2 ml Resuspensionspuffer aufgenommen. Nicht solubilisiertes Material wurde durch Zentrifugation mit 14.000 U/min 10 Minuten bei 4°C entfernt. Der Überstand wurde auf zwei 10 ml 10 – 50 % Saccharose-Stufengradienten aufgetragen und mit 30.000 U/min 5 Stunden bei 4°C zentrifugiert (SW40/II-Rotor). Die Fraktionen 5 – 7 ml, die sowohl Barentsz als auch FMRP enthielten, wurden über Ultrafiltration (Vivaspin 20 mit einer Ausschlußgröße von 50 kDa) auf 6 ml eingeengt und mit 6 ml Resuspensionspuffer zum Verdünnen der Saccharose versetzt. Die Immunpräzipitation erfolgte nach Zugabe von 50 µl Protein A-Sepharose-Suspension und 15 µg anti-Barentsz3 Antikörpern durch über Kopf Rotieren für 2 Stunden bei 4°C. Nach fünfmaligem Waschen mit 1 ml Waschpuffer wurden die gebundenen Komplexe durch Kochen mit 25 µl 1x Laemmli-Puffer eluiert. Die Immunpräzipitation und ein Aliquot des Pools mit Barentsz und FMRP als Positivkontrolle wurden durch Western Blotting mit anti-Barentsz2 und anti-FMRP Antikörpern analysiert. Die Pfeilspitzen markieren verschiedene Isoformen von FMRP.

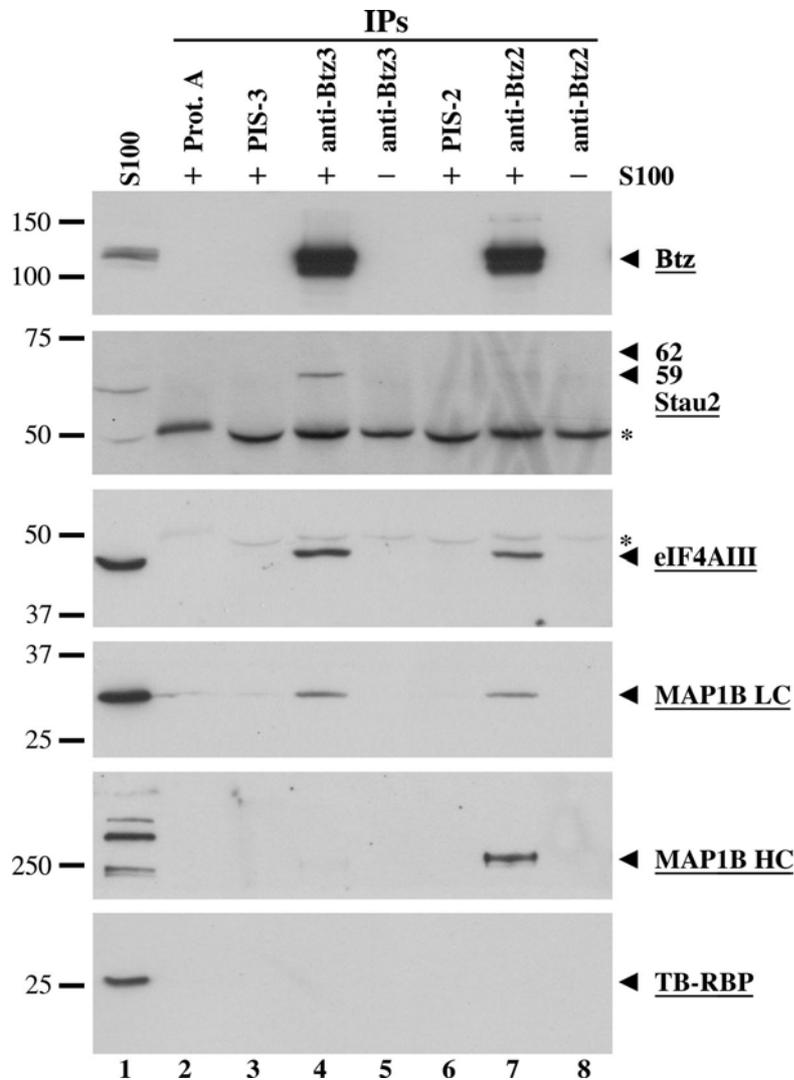
Thomas Grosskopff heraus, daß Barentsz und mehrere Isoformen von FMRP in einem Saccharose-Stufengradienten cofraktionieren. Als Ausgangsmaterial für den Saccharose-Gradienten verwendete er solubilierte Proteine des P100 eines Cortex-Extrakts von adulten Ratten (P42). In einem zweiten Versuch wurden dann diejenigen Fraktionen des Gradienten vereinigt, die sowohl Barentsz als auch FMRP enthielten (siehe Abbildung 17, Spur 1), um anschließend damit eine Immunpräzipitation mit anti-Barentsz3 Antikörpern durchzuführen. Die Coimmunpräzipitation mehrerer Isoformen von FMRP in der Immunfällung zeigt (siehe Abbildung 17, Spur 2; die verschiedenen Isoformen sind durch Pfeilspitzen symbolisiert), daß Barentsz und FMRP nicht nur im Saccharose-Gradienten cofraktionieren, sondern auch miteinander interagieren. Die Interaktion von Barentsz mit verschiedenen Isoformen von FMRP konnte auch durch Immunpräzipitationen mit anti-Barentsz12 und anti-Staufen1 Antikörpern in BHK-Zellen nachgewiesen werden, die mit Barentsz und Staufen1-HA

transfiziert waren (Daten nicht gezeigt). Diese Daten legen einen Komplex bestehend aus Barentsz, Staufen1 und FMRP nahe.

Um weitere Interaktionspartner von Barentsz im Hirnextrakt von embryonalen Ratten zu identifizieren, wurden anti-Barentsz2 und anti-Barentsz3 Immunpräzipitationen über SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet (siehe Abbildung 18, Spuren 7 und 4). Die Detektion der immungefällten Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern, welche Staufen2, eIF4AIII, MAP1B LC und HC sowie TB-RBP erkennen. Der Versuch wurde auch hier mit dem S100 durchgeführt, da dort die löslichen RNP-Komplexe vermutet werden, die den dendritischen mRNA-Transport bewirken. Als Kontrollen wurden Immunpräzipitationen ohne spezifische Antikörper (Spur 2, Bezeichnung mit Prot. A) bzw. mit dem Präimmenserum der Kaninchen 2 und 3 (Spuren 6 und 3) durchgeführt; als weitere Kontrolle wurde eine Immundefällung ohne Extrakte durchgeführt (Spuren 8 und 5). Alle bei der Immundefällung verwendeten Antikörper ergaben bei diesen Kontrollen keine Signale.

Barentsz wurde sowohl in den anti-Barentsz2 als auch den anti-Barentsz3 Immunpräzipitationen deutlich aus dem S100 angereichert (siehe Spuren 7 und 4). Nachdem die Interaktion von Barentsz mit Staufen2 bereits in HeLa-Zellen gezeigt wurde (siehe Abbildung 15), ließ sich diese Interaktion auch in Rattenhirn-Extrakten bestätigen: interessanterweise fällte der anti-Barentsz3 Antikörper selektiv die 59 kDa-Isoform von Staufen2, während mit den anti-Barentsz2 Antikörpern sehr geringe Mengen von Staufen2<sup>59</sup> und Staufen2<sup>62</sup> gefällt wurden. Als nächste Kandidaten wurden eIF4AIII und MAP1B LC sowie MAP1B HC untersucht. eIF4AIII und MAP1B LC wurden jeweils in beiden anti-Barentsz Immunpräzipitationen nachgewiesen, während MAP1B HC nur mit den anti-Barentsz2 Antikörpern coimmungefällt wurden. Als letztes der in Abbildung 18 untersuchten Proteine wurde das RNA-Bindeprotein TB-RBP überprüft, ob es mit Barentsz in einem gemeinsamen Komplex vorliegt. Von TB-RBP wurde kürzlich berichtet, daß es zusammen mit dem Kinesin-Motorprotein KHC an der Lokalisierung von *CaMKII $\alpha$*  mRNA in hippocampalen Neuronen beteiligt ist (Severt *et al.*, 1999). TB-RBP wurde zwar im S100 detektiert (siehe Spur 1), jedoch war dieses Protein in beiden anti-Barentsz Immunpräzipitationen nicht nachzuweisen (siehe Spuren 4 und 7). FMRP war nach der differentiellen Zentrifugation vollständig im P100 zu finden (Daten nicht gezeigt). Da die Fällungen mit den anti-Barentsz Antikörpern aber aus dem S100 durchgeführt wurden, konnte FMRP demzufolge auch nicht in diesen Barentsz-Komplexen nachgewiesen werden. Die Immunpräzipitationen aus Zellextrakten sowie aus Rattenhirn-Extrakten zeigten eine

Assoziation von Barentsz mit Staufen1, Staufen2<sup>59</sup>, Staufen2<sup>62</sup>, FMRP, eIF4AIII, MAP1B LC, MAP1B HC sowie der *BCI* RNA. Ob diese Komponenten alle in einem gemeinsamen Komplex vorkommen, ist jedoch noch nicht gesichert und wird später diskutiert werden.



**Abbildung 18: Barentsz interagiert mit Staufen2, eIF4AIII, der leichten und der schweren Kette von MAP1B in Hirnextrakten von embryonalen Ratten.**

Der S100 eines Hirnextrakts von embryonalen Ratten (E17) wurde für Immunpräzipitationen mit den anti-Barentsz3 und anti-Barentsz2 Antikörpern verwendet (siehe + anti-Btz3 und + anti-Btz2; Spuren 4 und 7). Als Negativkontrollen wurden Immunpräzipitationen mit den Präimmunsereen der Kaninchen 3 und 2 (siehe + PIS-3 und + PIS-2; Spuren 3 und 6), eine Inkubation des Extrakts mit Protein A-Sepharose ohne Antikörper (siehe + Prot. A; Spur 2) sowie eine Inkubation von Protein A-Sepharose mit den anti-Barentsz Antikörpern ohne Extrakt (siehe - anti-Btz3 und - anti-Btz2; Spuren 5 und 8) durchgeführt. Die beim Western Blotting verwendeten Antikörper sind seitlich durch Unterstreichen gekennzeichnet.

## 4.5 Identifizierung von Kinesin-Motorproteinen als mögliche Interaktionspartner von Barentsz

In *Drosophila* fungiert Barentsz beim Transport von *oskar* mRNA zum posterioren Pol möglicherweise als Adaptorprotein, das die RNA an das Motorprotein KHC koppelt (van Eeden *et al.*, 2001). Staufen ist neben Barentsz und KHC ebenfalls eine essentielle Komponente des *oskar* mRNA-Transportkomplexes. Wie ich im ersten Teil meiner Doktorarbeit zeigen konnte, sind Barentsz und die Staufen-Proteine in Säugerzellen Teil eines konservierten RNP-Komplexes. Daher stellt sich natürlich die Frage, ob dieser konservierte Komplex mit Barentsz und Staufen auch in Säugerzellen mit einem Kinesin-Motorprotein assoziiert ist, das die RNP-Komplexe entlang des Cytoskeletts in die Dendriten transportieren könnte. Dies sollte im letzten Teil meiner Doktorarbeit untersucht werden.

### 4.5.1 Assoziation von zwei Kinesin-Motorproteinen mit Barentsz-Komplexen

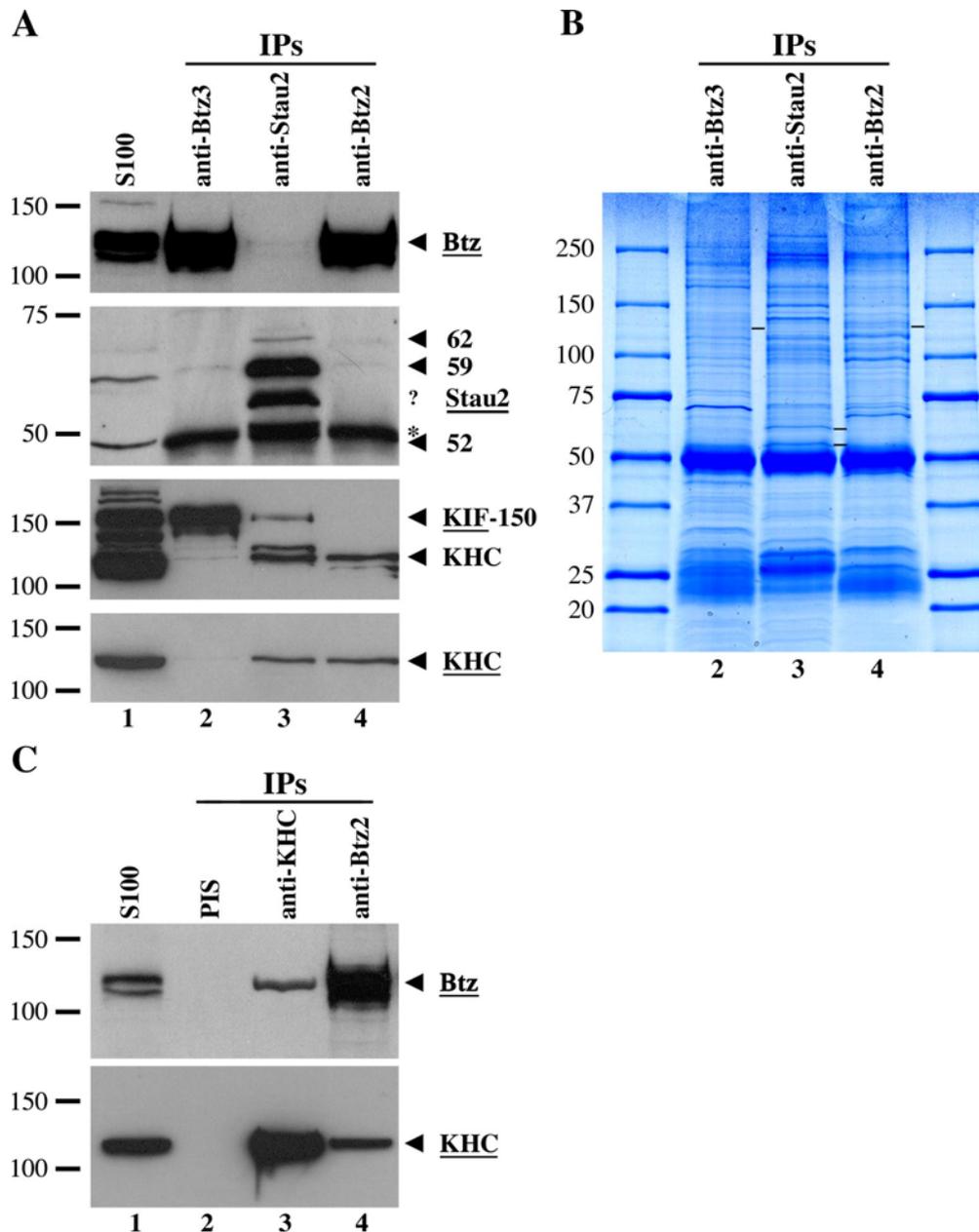
Zur Analyse der möglichen Assoziation von Kinesin-Motorproteinen mit Barentsz-Komplexen wurden vor allem die folgenden zwei monoklonalen anti-Kinesin Antikörper verwendet. Der Erste, im Folgenden als anti-KIF Antikörper bezeichnet, erkennt ein konserviertes Motiv der ATP-Bindedomäne, das in vielen der bisher 45 identifizierten Kinesin-Motorproteinen vorkommt (Miki *et al.*, 2001). Daher erkannte dieser Antikörper beim Western Blotting mehr als 8 verschiedene Proteine im S100 eines Rattenhirn-Extrakts (siehe Abbildung 19 A, dritter Western Blot von oben, Spur 1). Der zweite Antikörper, im Folgenden als anti-KHC Antikörper bezeichnet, erkennt monospezifisch die schwere Kette von Kinesin (*kinesin heavy chain* bzw. KHC). Beim Western Blotting erkannte der anti-KHC Antikörper daher ausschließlich eine Bande mit einem Molekulargewicht von 120 kDa (siehe Abbildung 19 A, unterster Western Blot, Spur 1).

Um zu untersuchen, ob Kinesin-Motorproteine mit dem konservierten Barentsz/Staufen-Komplex assoziiert sind, wurden Immunpräzipitationen mit anti-Barentsz sowie anti-Staufen2 Antikörpern durchgeführt. Anschließend wurden die Immunfällungen durch Western Blotting mit spezifischen Antikörpern auf die Anwesenheit von Barentsz, Staufen2 und Kinesin untersucht (siehe Abbildung 19 A). Bei den anti-Barentsz Immunpräzipitationen kam es zu einer starken Anreicherung von Barentsz (siehe Abbildung 19 A, anti-Barentsz3: Spur 2, anti-Barentsz2: Spur 4). Ebenso wurden alle drei Staufen2-Isoformen bei der anti-Staufen2 Immunpräzipitation angereichert (siehe Abbildung 19 A, Spur 3). Wie im vorangegangenen Versuch (siehe Abbildung 18) wurde in der Immunpräzipitation mit anti-Barentsz3

Antikörpern sehr geringe Mengen an Staufen2<sup>59</sup>, in der mit anti-Barentsz2 Antikörpern beide Staufen2-Isoformen coimmunpräzipitiert (siehe Spuren 2 und 4). Ebenso wird nur sehr wenig Barentsz in der Immunfällung mit anti-Staufen2 Antikörpern mitgefällt (siehe sehr schwache Bande in Spur 3).

In der Immunfällung mit anti-Barentsz3 Antikörpern (siehe Spur 2) konnte ich neben Staufen2 ein zweites, potentiell Motorprotein mit einem Molekulargewicht von 150 kDa nachweisen, das mit dem anti-KIF Antikörper eine sehr starke Immunreaktion zeigte. Neben diesem Motorprotein, das im Folgenden als KIF-150 bezeichnet wird, wurden in derselben Fällung beim Western Blotting mit dem anti-KIF Antikörper gelegentlich zwei weitere Motorproteine mit einem Molekulargewicht von 240 und 140 kDa erkannt, wobei letzteres möglicherweise ein Abbauprodukt von KIF-150 darstellt. Bei einer längeren Exposition erfolgte des weiteren eine schwache Detektion von KHC in der Immunfällung mit anti-Barentsz3 Antikörpern. Bei der Immunpräzipitation mit anti-Barentsz2 Antikörpern (siehe Spur 4) wurde KHC ebenfalls nachgewiesen, jedoch eine deutlich größere Menge als in den Fällungen mit anti-Barentsz3 Antikörpern. Interessanterweise konnte jedoch das KIF-150 in den anti-Barentsz2 Immunfällungen nicht nachgewiesen werden. Statt dessen wurde bei diesen Immunpräzipitationen mit dem anti-KIF Antikörper ein weiteres Kinesin-Motorprotein mit einem Molekulargewicht von 110 kDa nachgewiesen. Auch die anti-Staufen2 Antikörper fällten drei Kinesin-Motorproteine (siehe Spur 3): KHC, ein Motorprotein mit einem Molekulargewicht von 130 kDa sowie ein drittes Kinesin-Motorprotein, das mit dem bei den anti-Barentsz3 Immunpräzipitationen gefällten KIF-150 comigriert und wahrscheinlich mit diesem identisch ist. Die Immunpräzipitationen mit anti-Staufen1 Antikörpern (siehe auch Abbildung 14) wurden ebenfalls auf die Anwesenheit von Kinesin-Motorproteinen getestet, jedoch konnte mit den beiden anti-Kinesin Antikörpern kein Motorprotein detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Als Negativkontrollen wurden Immunfällungen mit verschiedenen Präimmunseren (Kaninchen 2, 3 sowie P) sowie ohne spezifischen Antikörper durchgeführt. Hier ließen sich jedoch mit den beiden anti-Kinesin Antikörpern keine Kinesine nachweisen (Daten nicht gezeigt). In einem parallelen Ansatz wurden die Immunpräzipitationen mit dem anti-Staufen2 sowie den beiden anti-Barentsz Antikörpern über SDS-PAGE aufgetrennt und mit kolloidalem Coomassie angefärbt (siehe Abbildung 19 B). Bei allen drei Immunpräzipitationen wurden neben den mit Strichen markierten Antigenen zahlreiche weitere Proteine angefärbt, wobei bei den einzelnen Immunfällungen meist unterschiedliche Proteine gefällt werden. Diese Ergebnisse legen nahe, daß zwei verschiedene Kinesin-Motorproteine mit dem konservierten Barentsz/Staufen2-Komplex assoziiert sind: zum einen

KHC, das mit anti-Barentsz2 und anti-Staufen2 Antikörpern coimmunpräzipitiert, sowie das unbekannte KIF-150, das mit anti-Barentsz3 und anti-Staufen2 Antikörpern coimmungefällt wird. Die Spezifität dieser Interaktionen soll in weiteren Versuchen analysiert werden.



**Abbildung 19: Interaktion von Barentsz und Staufen2 mit Kinesin-Motorproteinen in Hirnextrakten von embryonalen Ratten.**

**A, B:** Barentsz und Staufen2 interagieren sowohl mit KHC als auch mit KIF-150. Der S100 eines Hirnextrakts embryonaler Ratten (E17) wurde für Immunpräzipitationen mit anti-Barentsz2, anti-Barentsz3 sowie anti-Staufen2 Antikörpern verwendet und diese mittels Western Blottings (A) analysiert. Pfeilspitzen markieren die drei Isoformen von Staufen2 mit einem Molekulargewicht von 52, 59 bzw. 62 kDa. Das Fragezeichen steht für eine Kreuzreaktivität des anti-Staufen2 Antikörpers, deren Identität nicht bekannt ist. Beim anti-KIF Western Blot sind zwei Motorproteine mit Pfeilspitzen markiert: einerseits ein potentielles

Motorprotein mit einem Molekulargewicht von 150 kDa, das im folgenden als KIF-150 bezeichnet wird, sowie andererseits die schwere Kette von Kinesin (KHC), die ebenfalls mit dem monospezifischen anti-KHC Antikörper identifiziert wurde (siehe auch anti-KHC Western Blot). B: zugehöriges kolloidales Coomassie-Gel. Die Striche markieren die Immunfällung der jeweiligen antigenen Proteine Barentsz sowie Staufen2.

**C: Barentsz interagiert spezifisch mit KHC.** Aus dem S100 eines Hirnextrakts embryonaler Ratten (E17) wurde Barentsz mit dem monospezifischen anti-KHC Antikörper coimmungefällt (Spur 3). Damit lassen sich die interagierenden Proteine sowohl mit dem anti-KHC als auch den anti-Barentsz2 (Spur 4) Antikörpern nachweisen. Als Negativkontrolle diente eine Fällung mit einem Präimmenserum einer Maus (Spur 2).

### 4.5.2 Charakterisierung der Interaktion von Barentsz mit Kinesin-Motorproteinen

In den nächsten Versuchen wurde zunächst die Spezifität der Interaktion von Barentsz mit den Kinesin-Motorproteinen KHC bzw. KIF-150 weiter analysiert. Anschließend wurde untersucht, welchen Einfluß die Salzkonzentration, die An- bzw. Abwesenheit von RNA sowie die Phosphorylierung der Proteine auf die Interaktion haben.

#### 4.5.2.1 Barentsz interagiert mit KHC in Hirnextrakten der Ratte

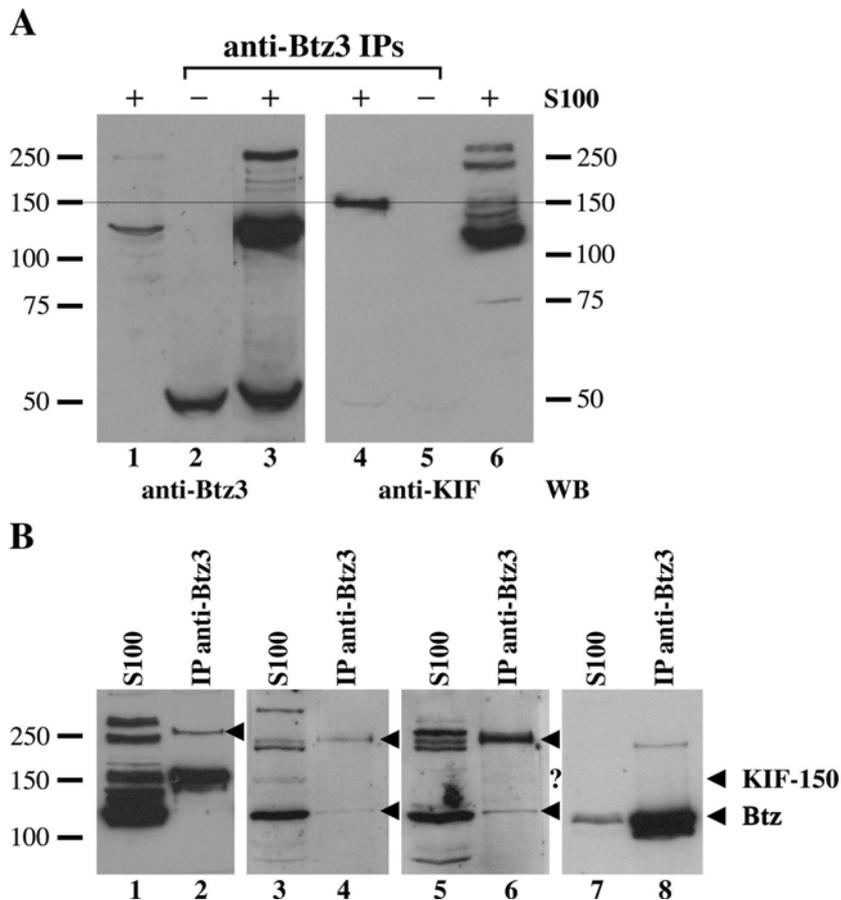
Die Spezifität der Coimmunpräzipitation von KHC in Barentsz-Komplexen habe ich überprüft, indem ich den monospezifischen anti-KHC Antikörper neben dem anti-Barentsz2 Antikörper für Immunfällungen aus Hirnextrakten von embryonalen Ratten verwendete (siehe Abbildung 19 C, Spuren 3 und 4). Da der anti-KHC Antikörper ein monoklonaler Maus-Antikörper ist, habe ich als Kontrolle eine Immunfällung mit dem Präimmenserum einer Maus durchgeführt (siehe Abbildung 19 C, Spur 2). Während bei der Kontrolle weder Barentsz noch KHC gefällt wurden, bestätigte die Coimmunfällung von Barentsz mit KHC die Spezifität der Interaktion zwischen Barentsz und KHC.

#### 4.5.2.2 Charakterisierung der Interaktion von Barentsz mit KIF-150

Um die Spezifität der Interaktion zwischen Barentsz und KIF-150 zu überprüfen, wurden zwei weitere Kontrollen durchgeführt. Zunächst wurde der anti-Barentsz3 Antikörper mit Protein A-Sepharose ohne Extrakt inkubiert. Diese Probe zeigte beim Western Blotting mit dem anti-KIF Antikörper keine Bande bei 150 kDa (siehe Abbildung 20 A, Spur 5). Damit konnte ich ausschließen, daß das Signal für KIF-150 durch nicht reduzierte IgG-Moleküle zustande kommt, die ebenfalls ein Molekulargewicht von 150 kDa besitzen. In der zweiten Kontrolle wurde eine anti-Barentsz3 Immunpräzipitation aus Rattenhirn-Extrakt mit demselben anti-Barentsz3 Antikörper immundekoriert (siehe Abbildung 20 A, Spur 3). Es

erfolgte bei einer langen Belichtungszeit eine sehr starke Immunerkennung von Barentsz sowie schwache Immunreaktionen mit Proteinen mit Molekulargewichten zwischen 170 und 250 kDa. Es ließ sich jedoch keine Kreuzreaktivität dieses Antikörpers mit einem 150 kDa-Protein nachweisen. Dies zeigt, daß das KIF-150 nicht direkt von den anti-Barentsz3 Antikörpern gefällt wird.

Bisher ist die Immundetektion des KIF-150 durch den anti-KIF Antikörper der einzige Hinweis, daß es sich bei diesem Protein um ein Kinesin-Motorprotein handeln könnte. Der anti-KIF Antikörper erkennt wie bereits oben beschrieben ein konserviertes Motiv der ATP-Bindedomäne, das in mehreren Kinesin-Motorproteinen vorkommt. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, daß dieser monoklonale Antikörper eine Kreuzreaktivität mit einem 150 kDa-Protein zeigt, das kein Kinesin-Motorprotein ist. Daher wurden anti-Barentsz3 Immunpräzipitationen mit anderen anti-Kinesin Antikörpern immundekoriert, die ebenfalls konservierte Motive von Kinesin-Motorproteinen erkennen. Als Größenstandard für das KIF-150 diente bei diesem Versuch der anti-KIF Western Blot (siehe Abbildung 20 B, Spuren 1 und 2). Als weitere Kontrolle wurde eine Immundekoration mit anti-Barentsz2 Antikörpern durchgeführt (siehe Abbildung 20 B, Spuren 7 und 8). Der anti-KHC Antikörper scheidet für die Immunerkennung von KIF-150 aus, da er monospezifisch KHC erkennt. Statt dessen wurden die zwei affinitätsgereinigten anti-LAGSE und anti-HIPYR Antikörper (freundlicherweise von Dr. Vladimir Gelfand zur Verfügung gestellt) verwendet, die zwei hochkonservierte Peptide nahe der ATP-Bindungsstelle von Kinesin-Motorproteinen mit der Aminosäuresequenz LAGSE bzw. HIPYR erkennen (Sawin *et al.*, 1992). Wie erwartet zeigten beide Antikörper im S100 eine Immundetektion von mehreren Proteinen (siehe Abbildung 20 B, Spuren 3 und 5), jedoch wurden nicht so viele Proteine wie mit dem anti-KIF Antikörper erkannt (siehe Abbildung 20 B, Spur 1). Manche Proteine wie z. B. KHC wurden von allen drei anti-Kinesin Antikörpern erkannt, die Mehrzahl der erkannten Proteine unterschied sich jedoch. In der anti-Barentsz3 Immunpräzipitation erkannten beide Antikörper sowohl KHC als auch ein 250 kDa-Protein (siehe Abbildung 20 B, Spuren 4 und 6, Markierung mit Pfeilspitzen), das vielleicht auch durch den anti-KIF Antikörper erkannt wurde (siehe Spur 2, Markierung mit einer Pfeilspitze). Der anti-HIPYR Antikörper erkennt möglicherweise bei einer sehr langen Belichtungszeit ein 150 kDa-Protein (siehe Spur 6, siehe Fragezeichen). Ob es sich hier um KIF-150 handelt, ist jedoch fraglich. Bei den Immundekorationen der anti-Barentsz3 Fällungen mit den anti-LAGSE und anti-HIPYR Antikörpern ergaben sich somit leider keine neuen eindeutigen Hinweise, daß es sich beim KIF-150 tatsächlich um ein Kinesin-Motorprotein handelt.



**Abbildung 20: Charakterisierung der Coimmunfällung von KIF-150 mit anti-Barentsz3 Antikörpern.**

**A: KIF-150 wird nicht direkt von anti-Barentsz3 Antikörpern immungefällt.** Immunpräzipitationen mit anti-Barentsz3 Antikörpern ohne Hirnextrakt (Spuren 2 und 5) sowie aus dem S100 von embryonalen E17 Hirnextrakten (Spuren 3 und 4) wurden über SDS-PAGE aufgetrennt. Als Ladekontrollen wurden außerdem jeweils 50  $\mu$ g des verwendeten Extrakts (Spuren 1 und 6) aufgetragen. Die Immundetektion erfolgte mit dem anti-KIF sowie dem anti-Barentsz3 Antikörper, mit dem auch die Immunpräzipitation durchgeführt wurde. Zur Orientierung markiert eine dünne Linie das Molekulargewicht von 150 kDa.

**B: Immunerkennung von KIF-150 durch verschiedene Kinesin-Antikörper.** 50  $\mu$ g S100 eines embryonalen Hirnextrakts sowie Immunpräzipitationen mit anti-Barentsz3 Antikörpern wurden vier Mal über SDS-PAGE aufgetrennt und mit verschiedenen Antikörpern immundekoriert. Neben den bisher verwendeten anti-KIF und anti-Barentsz2 Antikörpern wurden die anti-LAGSE und anti-HIPYR Antikörper verwendet, die beide ein hochkonserviertes Epitop nahe der ATP-Bindungsstelle von Kinesin-Motorproteinen erkennen. Beim anti-HIPYR Antikörper erfolgte möglicherweise wie beim anti-KIF Antikörper eine sehr schwache Erkennung desselben Proteins mit einem Molekulargewicht von  $\sim$  150 kDa (markiert durch ein Fragezeichen). KHC sowie das durch die anti-Kinesin Antikörper erkannte Motorprotein mit einem Molekulargewicht von 250 kDa sind durch Pfeilspitzen markiert.

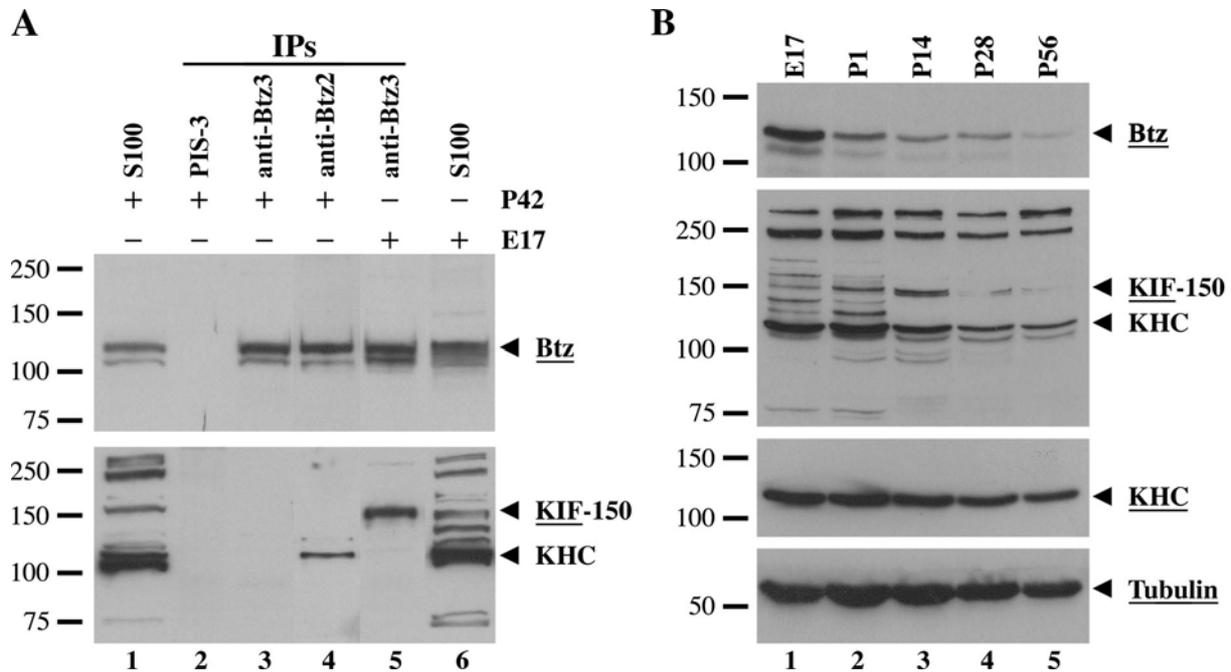
## 4.5.2.3 Interaktion von Barentsz mit Kinesin-Motorproteinen in Hirnextrakten adulter Ratten

In den vorherigen Versuchen wurde die Interaktion zwischen Barentsz und den beiden Kinesin-Motorproteinen KHC und KIF-150 in Hirnextrakten von embryonalen Ratten untersucht. Nun stellte sich die Frage, ob diese Interaktion auch im adulten Tier besteht.

Bei Immunpräzipitationen mit dem anti-Barentsz2 Antikörper aus Hirnextrakten 6 Wochen alter Ratten konnte ich neben Barentsz auch KHC nachweisen (siehe Abbildung 21 A, Spur 4), jedoch konnte in der Immunpräzipitation mit anti-Barentsz3 Antikörpern kein KIF-150 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 21 A, Spur 3). Als Kontrolle wurde mit dem S100 eine weitere Immunfällung mit dem Präimmunserum von Kaninchen 3 durchgeführt, die weder Barentsz noch die beiden Kinesin-Motorproteine KIF-150 oder KHC enthielt (siehe Abbildung 21 A, Spur 2). Als Positivkontrolle für das KIF-150 wurde zudem eine Immunpräzipitation mit dem anti-Barentsz3 Antikörper aus dem S100 eines Hirnextrakts von embryonalen E17 Ratten aufgetragen (siehe Abbildung 21 A, Spur 5). Da in adulten Ratten die Interaktion von Barentsz mit KIF-150 scheinbar nicht mehr besteht, wurde die Expression von Kinesin-Motorproteinen während verschiedener Entwicklungsstadien der Ratte analysiert. Dabei zeigte sich, daß KIF-150 möglicherweise nach der Geburt ein Expressionsmaximum aufweist, jedoch in 8 Wochen alten Ratten kaum mehr exprimiert wird (siehe Abbildung 21 B). Dies würde erklären, warum in adulten Ratten keine Interaktion von Barentsz mit KIF-150 mehr auftritt. Im Gegensatz zu KIF-150 wurde KHC auch in adulten Ratten exprimiert. Auch hier ist ein leichter Rückgang der Expression zu erkennen, die jedoch bei weitem nicht so deutlich ist wie für Barentsz (siehe Abbildung 8 B). Somit kann es auch in adulten Ratten zu einer Ausbildung eines Komplexes zwischen Barentsz und KHC kommen. Interessanterweise zeigten einige der vom anti-KIF Antikörper erkannten Kinesin-Motorproteine eine entwicklungsabhängige Expression. Die größte Anzahl an Motorproteinen wurde in frühen Entwicklungsstadien der Ratte exprimiert (siehe Abbildung 21 B, Spuren 1 und 2), während in 56 Tage alten Ratten nur noch 4 – 5 nachgewiesen wurden (siehe Abbildung 21 B, Spur 5). Die Immundekoration der gleichen Membran mit anti-Tubulin Antikörpern zeigte, daß gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden.

Die unterschiedlichen Immunpräzipitationen mit anti-Barentsz2, anti-Staufen2 und anti-KHC Antikörpern deuten darauf hin, daß das Kinesin-Motorprotein KHC mit dem Barentsz/Staufen2-Komplex in Hirnextrakten von jungen und adulten Ratten assoziiert ist. Mit dem Kinesin-Motorprotein KIF-150 ist möglicherweise eine weitere Komponente des

Barentsz/Staufen2-Komplexes identifiziert worden. Der Komplex mit KIF-150 läßt sich jedoch nur in embryonalen Hirnextrakten nachweisen.



**Abbildung 21: Interaktion von Barentsz mit KHC in Hirnextrakten von adulten Ratten.**

**A: Barentsz interagiert mit KHC in Hirnextrakten.** Mit Hirnextrakten von adulten Ratten (P42) wurden Immunpräzipitationen mit anti-Barentsz3 sowie anti-Barentsz2 Antikörpern, als Negativkontrolle eine Immunfällung mit dem Prämumserum von Kaninchen 3 durchgeführt (Spuren 2 – 4). Als Kontrolle für die Coimmunfällung von KIF-150 wurde eine Immunpräzipitation mit anti-Barentsz3 Antikörpern aus embryonalen Hirnextrakten (Spur 5) aufgetragen. Zudem sind jeweils 50 µg der verwendeten S100 von adulten bzw. embryonalen Ratten aufgetragen (Spuren 1 und 6).

**B: Analyse der Expression von Kinesin-Motorproteinen in verschiedenen Entwicklungsstadien der Ratte.** Hirnextrakte von Ratten verschiedenen Alters (jeweils 50 µg) wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und per Western Blotting mit den angegebenen Antikörpern analysiert.

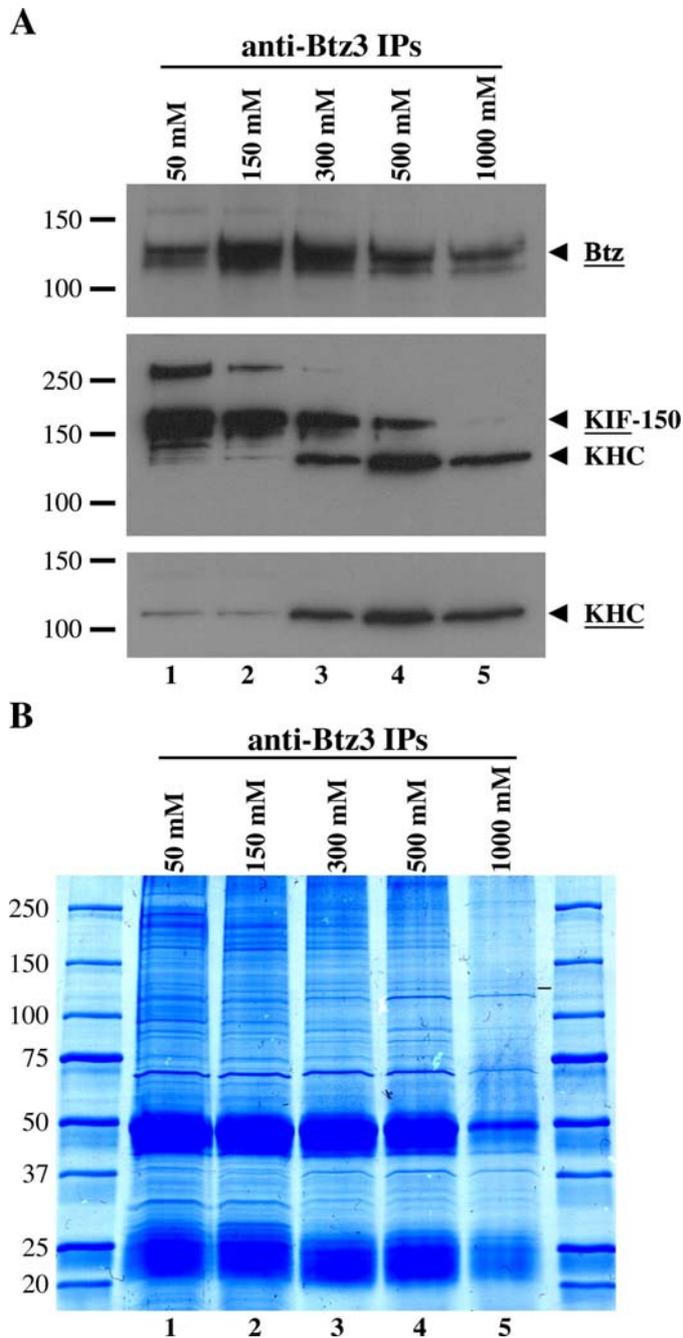
#### 4.5.2.4 Einfluß der Salzkonzentration auf die Interaktion von Barentsz mit Kinesin-Motorproteinen

Im nächsten Experiment habe ich untersucht, welchen Einfluß die Salzkonzentration auf die Interaktion zwischen Barentsz und dem Kinesin-Motorprotein KIF-150 hat. Möglicherweise werden bei höherer Salzkonzentration weniger Proteine coimmungefällt, was die Identifizierung von KIF-150 per Massenspektrometrie erleichtern würde. Daher habe ich Gehirne von embryonalen Ratten in Lyse-Puffern mit 50, 150, 300, 500 bzw. 1.000 mM KCl homogenisiert. Nach differentieller Zentrifugation wurde der jeweilige S100 für anti-Barentsz3 Immunpräzipitationen verwendet (siehe Abbildung 22). Bei der Analyse der

gefällten Proteine (siehe Abbildung 22 A) wurden drei verschiedene Kinesin-Motorproteine durch Western Blotting nachgewiesen: KHC, KIF-150 sowie ein 250 kDa-Motorprotein, das möglicherweise mit dem durch die anti-LAGSE und anti-HIPYR Antikörper erkannten Motorprotein identisch ist (siehe Abbildung 20 B, Spuren 4 und 6). Letzteres Protein war jedoch nur relativ schwach mit dem Barentsz-Komplex assoziiert, da es bereits bei einer Salzkonzentration von 300 mM nicht mehr in der anti-Barentsz3 Immunpräzipitation nachweisbar war (siehe Abbildung 22 A, Spur 3). KIF-150 ging eine starke Bindung mit dem Barentsz-Komplex ein, da es selbst bei 500 mM KCl noch coimmungefällt wurde (siehe Abbildung 22 A, Spur 4). Interessanterweise wurde KHC bei niedrigen Salzkonzentrationen bis 150 mM KCl kaum gefällt, jedoch nahm die Menge bei mittleren Salzkonzentrationen und sogar bei 1 M KCl deutlich zu (siehe Abbildung 22 A, Spuren 3 – 5). Eine mögliche Erklärung für dieses ungewöhnliche Verhalten ist, daß bei niedrigen Salzkonzentrationen ein unbekanntes Protein X an den Barentsz/KHC-Komplex bindet. Die Bindungsstelle des Proteins X ist jedoch identisch mit der Bindungsstelle des anti-Barentsz3 Antikörpers und daher wurden unter diesen Bedingungen nur sehr geringe Mengen dieses Komplexes gefällt. Bei höheren Salzkonzentrationen erfolgt eine Freisetzung dieses Proteins X vom Komplex. Da die Antikörper-Bindungsstelle nun frei zugänglich ist, konnte der Barentsz/KHC-Komplex gefällt werden. Bei den anti-Barentsz2 Coimmunfällungen bindet der Antikörper an eine andere antigene Stelle des Barentsz-Proteins, die auch bei niedrigen Salzkonzentrationen zugänglich ist, und es kommt zu einer Coimmunpräzipitation von KHC auch unter diesen Bedingungen. Staufen1 und Staufen2 zeigten nur eine schwache Assoziation mit den Barentsz-Komplexen: bei 300 mM KCl war kein Staufen1 mehr detektierbar und nur noch sehr geringe Mengen an Staufen2 (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise erfolgte wie bei KHC eine Coimmunfällung von Staufen2<sup>62</sup> erst bei 300 mM KCl. Dies ist ein Hinweis auf die Existenz eines Komplexes bestehend aus Barentsz, KHC und Staufen2<sup>62</sup>.

Die Immunpräzipitationen mit den anti-Barentsz3 Antikörpern unter verschiedenen Salzbedingungen wurde ebenfalls mittels eines kolloidalen Coomassie-Gels analysiert (siehe Abbildung 22 B). Wie erwartet wurden bei 50 mM KCl die meisten Proteine mitgefällt, da hier die Stringenz sowohl bei der Bindung als auch beim Waschen am geringsten war. Mit höherer Salzkonzentration nahm die Stringenz zu und daher die Anzahl der Proteinbanden ab. Bei 1 M KCl wurden nur noch sehr wenige Proteine neben den Antikörper-Banden mitgefällt (siehe Spur 5). Für die Identifizierung von KIF-150 sind die Bedingungen mit 150 und 300 mM KCl interessant, da einerseits im Vergleich zu 50 mM KCl die Anzahl der Proteinbanden deutlich reduziert, andererseits bei diesen Konzentrationen immer noch eine ausreichende

Menge an KIF-150 gefällt wurde. Die Probe mit 300 mM KCl zeigte dabei auch keine freiliegende Bande im Bereich um 150 kDa, so daß beide Bedingungen für die Identifizierung von KIF-150 ähnlich gut geeignet sind.



**Abbildung 22: Immunpräzipitationen mit anti-Barentsz3 Antikörpern unter verschiedenen Salzbedingungen.**

Die Gehirne von embryonalen E17 Ratten wurden in verschiedenen Lyse-Puffern mit den angegebenen KCl-Konzentrationen homogenisiert. Nach differentieller Zentrifugation wurde der jeweilige S100 für Immunpräzipitationen mit anti-Barentsz3 Antikörpern eingesetzt. **A:** Western Blotting. **B:** zugehöriges kolloidales Coomassie-Gel. Der Strich markiert die Bande des immunpräzipitierten Barentsz.

#### 4.5.2.5 RNA-unabhängige Interaktion von Barentsz mit Kinesin-Motorproteinen

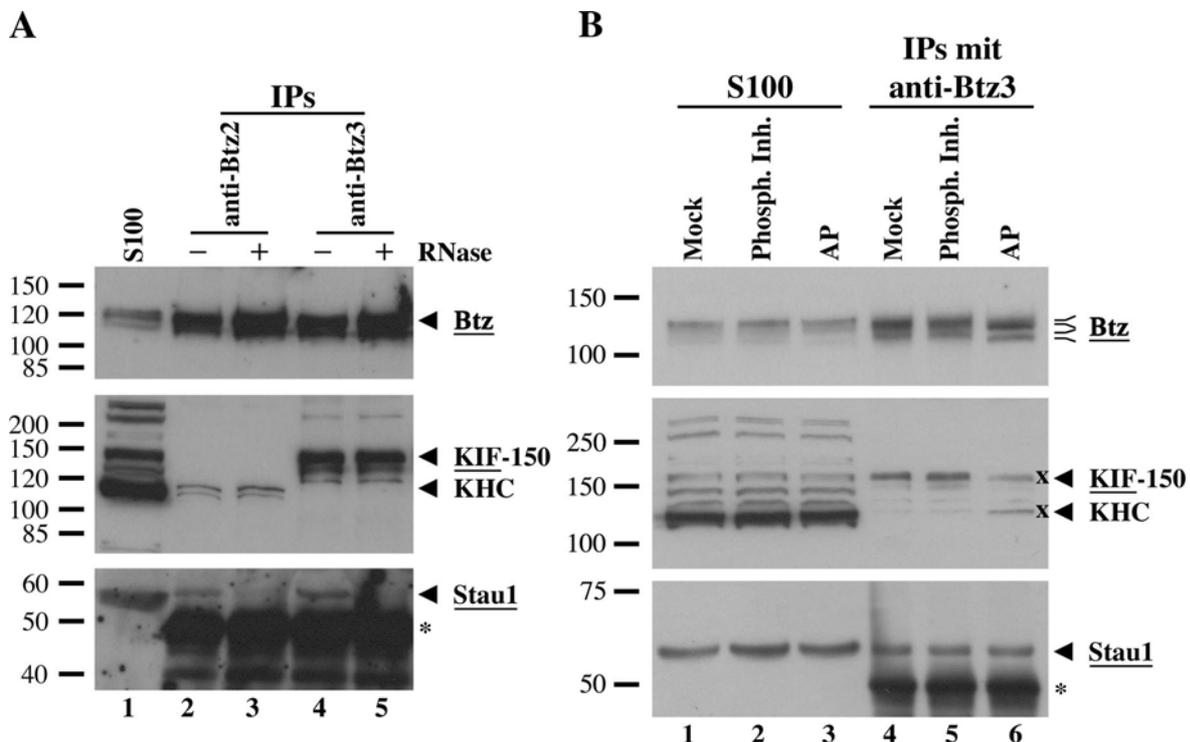
Wie bereits oben beschrieben gelang mir der Nachweis, daß die Interaktion von Barentsz mit Staufen1 RNA-abhängig ist. Daher wurde nun getestet, ob die Interaktion von Barentsz mit KHC bzw. mit KIF-150 durch eine RNase-Behandlung ebenfalls aufgelöst wird. Die Mock- bzw. RNase-Behandlung wurde mit dem S100 eines Hirnextrakts von embryonalen Ratten durchgeführt. Anschließend wurden die Komplexe mit anti-Barentsz3 und anti-Barentsz2 Antikörpern immungefällt. Bei der Analyse über Western Blotting zeigte sich wie erwartet eine RNA-abhängige Bindung von Staufen1 an beide Barentsz-Komplexe. Im Gegensatz dazu wurden jedoch KIF-150 sowie KHC auch in Abwesenheit von RNA coimmunpräzipitiert (siehe Abbildung 23 A, Spur 3 und 5).

#### 4.5.2.6 Phosphorylierungs-abhängige Interaktion von Barentsz mit Kinesin-Motorproteinen

Häufig werden zelluläre Vorgänge durch Phosphorylierungen reguliert. Da Barentsz in Hirnextrakten phosphoryliert vorliegt (siehe Abbildung 8 C), wirft dies die Frage auf, ob möglicherweise die Phosphorylierung von Barentsz die Interaktion mit den assoziierten Kinesin-Motorproteinen beeinflußt. Um dies herauszufinden, habe ich den S100 von Hirnextrakten embryonaler Ratten vor den Immunpräzipitationen mit anti-Barentsz3 Antikörpern Mock, mit Phosphatase-Inhibitoren oder mit alkalischer Phosphatase behandelt (siehe Abbildung 23 B, Extrakte: Spuren 1 – 3, anti-Barentsz3 Immunpräzipitationen: Spuren 4 – 6). Interessanterweise wurde durch die Dephosphorylierung von Barentsz nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase die Interaktion mit KIF-150 geschwächt, während die Interaktion mit KHC deutlich verstärkt wurde (in Abbildung 23 B jeweils mit einem x markiert). Beide Effekte ließen sich in mehreren Versuchen reproduzieren. Im Gegensatz zur Interaktion von Barentsz mit den beiden Kinesin-Motorproteinen wurde die Interaktion mit Staufen1 jedoch nicht beeinflußt.

Die letzten Versuche zeigten, daß sich die Interaktion von Barentsz mit den Staufen-Proteinen einerseits bzw. mit den Kinesin-Motorproteinen andererseits grundsätzlich unterscheidet. Die Dephosphorylierung von Barentsz verstärkt die Interaktion mit KHC, schwächt aber die Interaktion mit KIF-150. Die Assoziation von Barentsz mit den Staufen-Proteinen wird hingegen durch die Phosphorylierung nicht beeinflußt. Die Assoziation mit Staufen wiederum ist auf die Anwesenheit von RNA angewiesen, während die Interaktion mit den Motorproteinen RNA-unabhängig ist. Ein weiterer Unterschied besteht in der Stabilität der Komplexe in Abhängigkeit der Salzkonzentration: während die Assoziation mit Staufen schon

bei 300 mM KCl aufgehoben wird, sind die Komplexe mit den Motorproteinen noch bei 500 mM KCl stabil.



**Abbildung 23: Charakterisierung der Interaktion von Barentsz mit Kinesin-Motorproteinen in Hirnextrakten der Ratte.**

**A: RNA-unabhängige Interaktion von Barentsz mit KHC bzw. KIF-150.** Vor der Immunpräzipitation mit anti-Barentsz2 bzw. anti-Barentsz3 Antikörpern wurde der Hirnextrakt von embryonalen Ratten (E17) Mock bzw. mit RNase A/T1 behandelt. Als Positivkontrolle für den RNase-Verdau fungierte die RNA-abhängige Interaktion von Barentsz mit Staufen1 (siehe Spuren 3 und 5). Die beim Western Blotting verwendeten Antikörper sind seitlich durch Unterstreichen gekennzeichnet.

**B: Phosphorylierungs-abhängige Interaktion zwischen Barentsz und KIF-150 bzw. KHC.** Der Hirnextrakt von embryonalen Ratten wurde vor der Immunpräzipitation mit anti-Barentsz3 Antikörpern mit alkalischer Phosphatase behandelt (Spuren 3 und 6). Als Kontrollen dienten die Immunpräzipitationen nach Zugabe von Phosphatase-Inhibitoren (Spuren 2 und 5) sowie die Mock-Behandlung (Spuren 1 und 4). Die leichte Veränderung im Laufverhalten bei der SDS-PAGE diente als Positivkontrolle für die Dephosphorylierung (vergleiche Spuren 5 und 6). Die vier Linien an der Seite markieren die vier durch den anti-Barentsz2 Antikörper erkannten Barentsz-Proteine.

#### 4.5.3 Identifizierung von assoziierten Proteinen aus Barentsz-Komplexen

Nachdem im vorigen Abschnitt die Interaktion von Barentsz mit den beiden Kinesin-Motorproteinen KHC bzw. KIF-150 genauer untersucht wurde, sollten nun weitere assoziierte Proteine der Barentsz-Komplexe identifiziert werden. Der Hauptfokus lag hierbei auf der

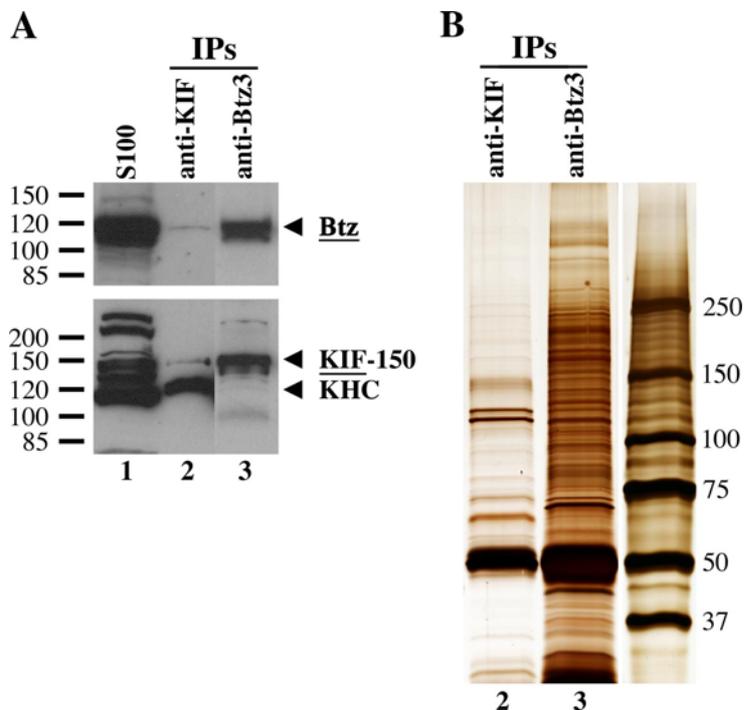
molekularen Identifizierung des Kinesin-Motorproteins KIF-150. KIF-150 wäre nach KHC das zweite Motorprotein, das möglicherweise am mRNA-Transport in Dendriten von hippocampalen Neuronen beteiligt ist.

#### 4.5.3.1 Molekulare Identifizierung des KIF-150

Bisher ist vom KIF-150 nur das über SDS-PAGE und Western Blotting bestimmte Molekulargewicht von 150 kDa bekannt. In der Maus, einer nahen verwandten Spezies der Ratte, wurden bis heute jedoch 45 Kinesin-Motorproteine identifiziert (Miki *et al.*, 2001). Da aber von den meisten dieser Motorproteine nicht die gesamte Sequenz bekannt ist, kann aus dem Molekulargewicht von 150 kDa leider nicht auf die molekulare Identität des KIF-150 geschlossen werden. Aus diesem Grunde wurde die folgende Strategie gewählt: eine KIF-150-enthaltende Probe wird über SDS-PAGE aufgetrennt und mit kolloidalem Coomassie angefärbt. Anschließend werden die Protein-Banden im Bereich um 150 kDa ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie analysiert. Als erste Probe steht die Immunpräzipitation mit dem anti-Barentsz3 Antikörper zur Verfügung. Jedoch ist bei dieser Probe im Bereich um 150 kDa keine freiliegende Bande zu erkennen (siehe Abbildung 19 B, Spur 2 und Abbildung 22 B, Spuren 2 und 3). Daher habe ich im Folgenden versucht, über eine andere Methode eine freiliegende KIF-150-Bande zu erhalten, möglichst mit einer größeren Proteinmenge.

In einem ersten Versuch habe ich eine Immunpräzipitation mit dem anti-KIF Antikörper parallel zu einer Immunpräzipitation mit dem anti-Barentsz3 Antikörper durchgeführt. Für diese Immunfällungen wurde der S100 eines Hirnextrakts von embryonalen Ratten verwendet. Beim Western Blotting erkannte der anti-KIF Antikörper im S100 eines Ratten-Hirnextrakt mehr als 8 Proteine (siehe Abbildung 24 A, Spur 1), bei der Immunpräzipitation mit dem anti-KIF Antikörper wurden jedoch überraschenderweise nur zwei dieser acht Kinesin-Motorproteine gefällt (siehe Abbildung 24 A, Spur 2). Eines der Proteine ist KHC, das mit dem monospezifischen anti-KHC Antikörper identifiziert wurde (Daten nicht gezeigt). Das zweite Protein hat ein Molekulargewicht von ~ 150 kDa und comigriert scheinbar mit dem mit KIF-150, das durch die anti-Barentsz3 Antikörper coimmungefällt wurde (siehe Abbildung 24 A, Spur 3). In der Fällung mit dem anti-KIF Antikörper ist jedoch das Signal für dieses Protein deutlich geringer als das Signal für KIF-150 und auch im mit Silber angefärbten SDS-PAGE Gel (siehe Abbildung 24 B, Spur 2) ist in dem Bereich um 150 kDa keine freiliegende Bande zu erkennen. Daher wurde davon abgesehen, diese Präparation für die Identifizierung von KIF-150 zu benutzen. Interessanterweise wurde mit dem anti-KIF

Antikörper ebenfalls Barentsz coimmungefällt, was jedoch auch auf die Assoziation mit KHC zurückgeführt werden kann (siehe Abbildung 24 A, Spur 2).



**Abbildung 24: Immunpräzipitation mit anti-KIF Antikörpern aus Hirnextrakten von embryonalen Ratten.**

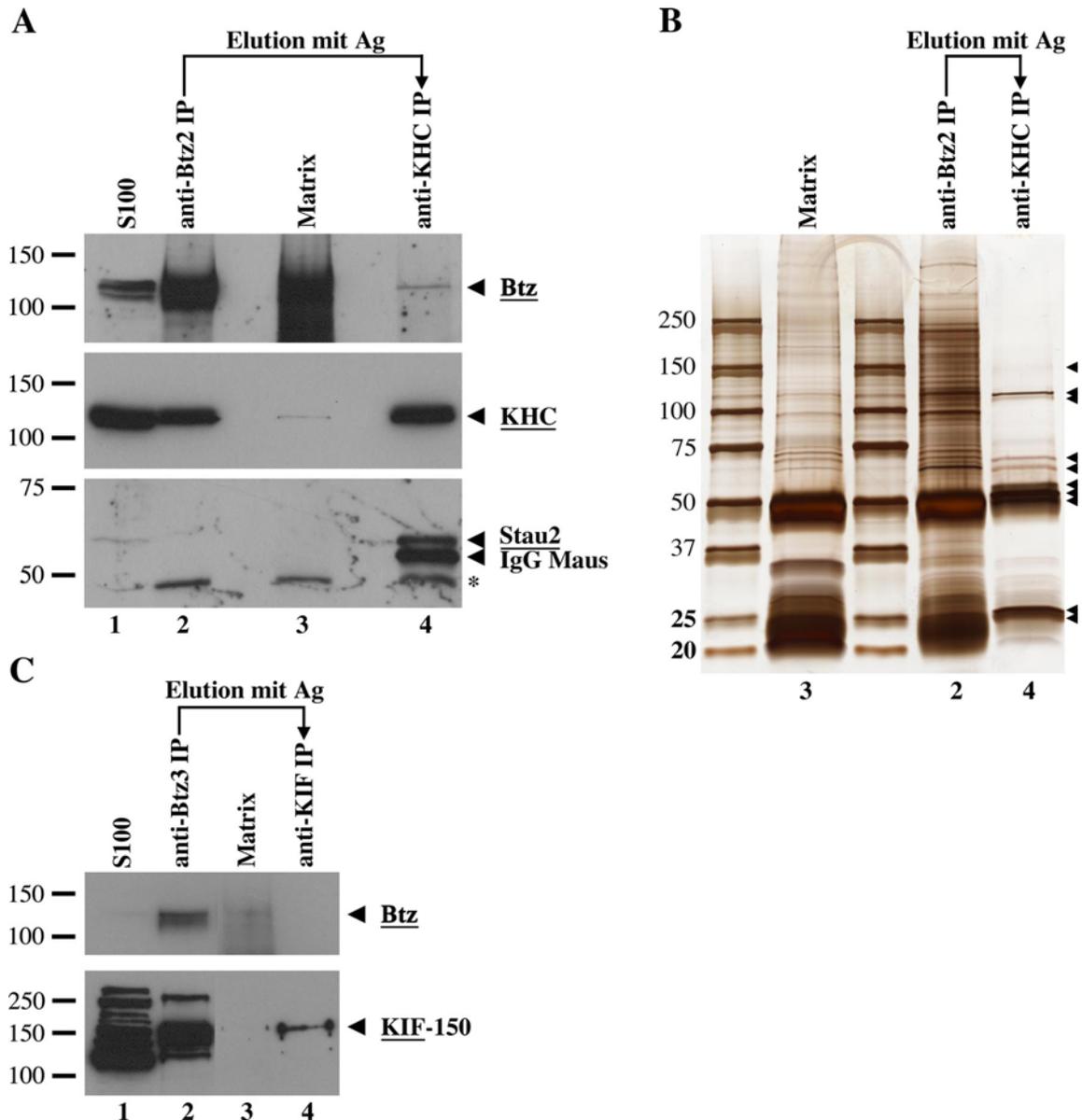
Der Hirnextrakt von embryonalen Ratten (E17) wurde für eine Immunpräzipitation mit anti-KIF Antikörpern verwendet. Dabei wird hauptsächlich KHC immungefällt sowie geringe Menge eines Motorproteins mit einem Molekulargewicht von ~ 150 kDa. Als Größenreferenz für das KIF-150 wurde eine Immunpräzipitation mit anti-Barentsz3 aufgetragen. **A:** Western Blot. **B:** zugehöriges, mit Silber angefärbtes Gel.

Ein Problem bei der Immunpräzipitation mit dem anti-KIF Antikörper aus dem S100 eines Ratten-Hirnextrakts ist, daß möglicherweise ein anderes Kinesin-Motorprotein mit einem ähnlichen Molekulargewicht wie KIF-150 ausgeschnitten und sequenziert wird (vergleiche Abbildung 24 A, Spuren 2 und 3). Um dies auszuschließen, wurden mehrere Immunpräzipitationen mit anti-Barentsz Antikörpern mit einer anschließenden Immunpräzipitation mit einem anti-Kinesin Antikörper gekoppelt. Anfangs war jedoch nicht klar, ob diese Methode mit zwei aufeinanderfolgenden Immunpräzipitationen überhaupt funktionieren würde. Daher sollte die Durchführbarkeit dieser Methode zuerst mit dem besser charakterisierten, monospezifischen anti-KHC Antikörper überprüft werden.

Im ersten Versuch wurden deshalb die Immunpräzipitationen mit dem anti-Barentsz2 Antikörper durchgeführt, um die Barentsz/KHC-Komplexe zu fällen (siehe Abbildung 25 A, Spur 2). Anschließend wurden die gebundenen Komplexe kompetitiv mit einem 10-fach

molaren Überschuß des bei der Immunisierung verwendeten Antigens His<sub>6</sub>-Btz<sub>CT</sub> in einem möglichst kleinen Volumen eluiert. Die auf diese Weise eluierten Komplexe wurden dann als Ausgangsmaterial für die zweite Immunpräzipitation mit dem anti-KHC Antikörper verwendet (siehe Abbildung 25 A, Spur 4). Bei dieser zweiten Immunpräzipitation wurde neben einer beträchtlichen Menge an KHC interessanterweise eine sehr geringe Menge an Barentsz sowie auch Staufenz<sup>59</sup> nachgewiesen. Als Kontrolle wurde eine Probe der Protein A-Sepharose-Matrix nach der erfolgten Elution aufgetragen (siehe Abbildung 25 A, Spur 3, Bezeichnung mit Matrix), die die anti-Barentsz Antikörper mit gebundenem Antigen, die nicht eluierten Komplexe sowie unspezifisch gebundene Proteine enthält. Beim Western Blotting mit dem anti-Barentsz Antikörper verursachte die große Menge an Antigen ein starkes Signal, während beim Western Blotting mit dem anti-KHC Antikörper sehr schön zu sehen ist, daß fast die gesamte Menge der KHC-Komplexe von der Protein A-Sepharose-Matrix eluiert werden konnte. Die beiden Immunpräzipitationen sowie eine Probe der Matrix nach der Elution wurden außerdem über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Silberfärbung analysiert (siehe Abbildung 25 B). Die meisten Proteine der ersten Immunpräzipitation mit dem anti-Barentsz2 Antikörper (siehe Abbildung 25 B, Spur 3) wurden bei der zweiten Immunpräzipitation mit dem anti-KHC Antikörper nicht mehr gefällt (siehe Abbildung 25 B, Spur 4) und scheinen daher keine Komponenten des Barentsz/KHC-Komplexes zu sein. Die gefällten Proteine der zweiten Immunpräzipitation mit dem anti-KHC Antikörper hingegen sind die Hauptkandidaten, die zusammen mit Barentsz und KHC einen Komplex bilden (in Abbildung 25 B markiert mit Pfeilspitzen). Bei der Probe mit den nach der Elution an die Matrix gebundenen Proteinen ist gut zu erkennen, daß die meisten Proteine nach der anti-Barentsz Immunpräzipitation mit dem Antigen eluiert werden konnten (vergleiche Abbildung 25 B, Spuren 2 und 3).

Nachdem gezeigt wurde, daß die Methode mit den aufeinanderfolgenden Immunpräzipitationen prinzipiell funktioniert, habe ich sie zur Identifizierung des KIF-150 angewendet. Zuerst wurden mehrere Immunpräzipitationen mit dem anti-Barentsz3 Antikörper durchgeführt (siehe Abbildung 25 C, Spur 2). Nach der Immunfällung wurden die gefällten Barentsz/KIF-150-Komplexe kompetitiv mit einem Überschuß an Antigen eluiert und die eluierten Komplexe dann in der zweiten Immunpräzipitation mit dem anti-KIF Antikörper eingesetzt (siehe Abbildung 25 C, Spur 4). Zwar konnte bei dieser zweiten Immunpräzipitation eine signifikante Menge an KIF-150 immungefällt werden, jedoch scheint die Affinität des Antikörpers zu gering zu sein, um eine für die Sequenzierung ausreichende Menge an KIF-150 zu fällen. Im Gegensatz zur guten Fällungseffizienz mit dem



**Abbildung 25: Immunfällung von Kinesin-Motorproteinen aus Barentsz-Komplexen.**

**A, B: Immunfällung von KHC aus Barentsz-Komplexen.** Mit dem S100 von embryonalen Ratten (E17) wurden vier Immunpräzipitationen mit anti-Barentsz2 Antikörpern durchgeführt (Spur 2). Danach wurden die gebundenen Komplexe kompetitiv mit einem 10-fach molaren Überschuss Antigen His<sub>6</sub>-Btz<sub>CT</sub> von der Antikörper-Protein A-Sepharose-Matrix eluiert, indem eine Stunde bei 4°C über Kopf rotiert wurde. In Spur 3 wurde ein Aliquot der nach der Elution an die Matrix gebundenen Proteine aufgetragen (Bezeichnung mit Matrix). Der Überstand nach der Elution wurde für eine Immunfällung mit dem monospezifischen anti-KHC Antikörper verwendet (Spur 4). Die Analyse erfolgte mittels Western Blot: siehe **A, B**: zugehöriges, mit Silber angefärbtes Gel.

**C: Immunfällung von KIF-150 aus Barentsz-Komplexen.** Der Versuch wurde analog zu A durchgeführt mit den folgenden Modifikationen: für die ersten Immunpräzipitationen wurde statt des anti-Barentsz2 Antikörpers der anti-Barentsz3 Antikörper, für die zweite Immunpräzipitation der anti-KIF Antikörper an Stelle des anti-KHC Antikörpers verwendet.

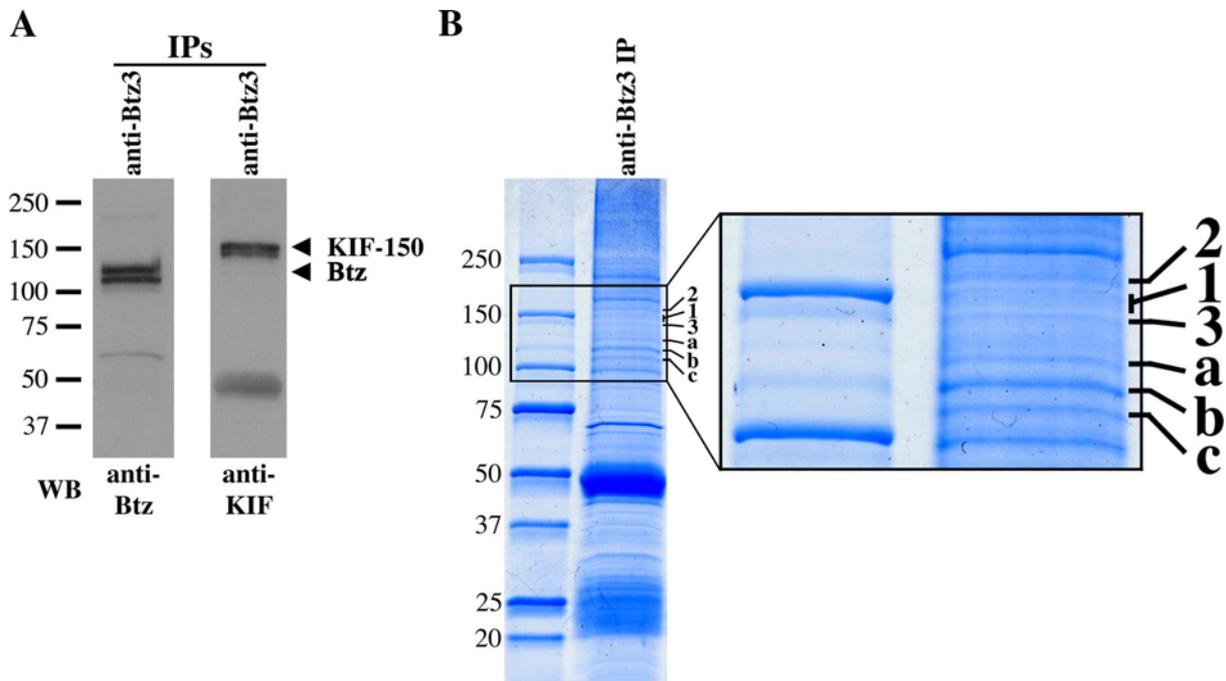
anti-KHC Antikörper wurden nur wenige Prozent des KIF-150 gefällt. Daher ist leider auch diese Methode nicht geeignet, ausreichende Mengen für die molekulare Identifizierung des KIF-150 zu liefern.

#### 4.5.3.2 Identifizierung von assoziierten Proteinen aus Barentsz-Komplexen

Die beiden Immunpräzipitationen mit dem anti-KIF Antikörper aus dem S100 und aus den eluierten Barentsz-Komplexen lieferten leider keine für die Sequenzierung ausreichende Menge an KIF-150. Die vielversprechendste Probe war immer noch die Immunpräzipitation mit dem anti-Barentsz3 Antikörper aus dem Hirnextrakt von embryonalen Ratten, da hier mit Abstand die größte Menge an KIF-150 gefällt wurde. Für die molekulare Identifizierung von KIF-150 sowie weiteren mit Barentsz assoziierten Proteinen wurde daher die Immunpräzipitation mit dem anti-Barentsz3 Antikörper über ein 4 – 20 % Gradientengel aufgetrennt und mit kolloidalem Coomassie angefärbt (siehe Abbildung 26 B). Als Kontrolle wurde auf demselben Gel dieselbe Menge der Immunpräzipitation aufgetragen und durch Western Blotting analysiert, um einen genauen Größenstandard für das KIF-150 zu haben (siehe Abbildung 26 A). Zur Identifizierung von KIF-150 wurden drei Banden um 150 kDa (in Abbildung 26 B seitlich mit 1 – 3 gekennzeichnet) sowie zur Identifizierung von Barentsz drei Banden im Bereich 110 – 125 kDa (seitlich mit a – c gekennzeichnet) ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie im Labor von Dr. Christoph Turck (MPI für Psychiatrie in München) sequenziert.

Die Sequenzierung der sechs ausgeschnittenen Banden lieferte Sequenzen für elf Proteine (siehe Tabelle 1). Barentsz konnte dabei überraschenderweise nicht identifiziert werden. Bei einer weiteren Sequenzanalyse über Massenspektrometrie wurde ein Fusionsprotein bestehend aus Barentsz und GFP ausgeschnitten. Hierbei konnte nur die Sequenz von GFP, jedoch nicht die von Barentsz gefunden werden. Dies deutet darauf hin, daß die Identifizierung von Barentsz über Massenspektrometrie erschwert ist. Von den bei der ersten Sequenzierung identifizierten Proteinen (siehe Tabelle 1) sind interessanterweise fünf Proteine direkt oder indirekt mit RNA assoziiert: ein Spleißfaktor (Spleißfaktor 3b, Untereinheit 1), ein Protein ist an der Biogenese von snRNPs beteiligt (Gemin 5) und drei Proteine stellen Untereinheiten des eukaryontischen Translations-Initiationsfaktors 3 dar (eIF3, Untereinheiten 8 – 10). Des weiteren wurden ein Transkriptionsfaktor (Transkriptionsfaktor TFII-I $\beta$ ), eine Kinase ( $\beta$ -Kette der Phosphorylasekinase), ein Protein der ER-Golgi-Transportmaschinerie (Sec23-interagierendes Protein p125) sowie drei Proteine

mit unbekannter Funktion identifiziert. Leider war jedoch kein Kinesin-Motorprotein unter den identifizierten Proteinen. Auch bei einer genaueren Analyse der Proteine mit unbekannter Funktion wurde keine Ähnlichkeit mit Kinesin-Motorproteinen gefunden.



**Abbildung 26: Identifizierung von KIF-150 und assoziierten Proteinen aus Barentsz-Komplexen.**

Der S100 eines Hirnextrakts von embryonalen Ratten (E17) wurde für eine Immunpräzipitation mit anti-Barentsz3 Antikörpern verwendet. Die immungefällten Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mit kolloidalem Coomassie angefärbt (B). Als Größenstandard für das KIF-150 diente auf demselben Gel dieselbe Probe, die durch Western Blotting mit anti-Barentsz2 bzw. anti-KIF Antikörpern analysiert wurde (A). Ein vergrößerter Ausschnitt des Coomassie-Gels ist auf der rechten Seite wiedergegeben. Die mit 1 – 3 bzw. a – c markierten Banden wurden ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie sequenziert.

Da bei der Sequenzierung der sechs Banden kein Kinesin-Motorprotein identifiziert werden konnte, habe ich in einem weiteren Versuch mehrere Banden im Bereich um 150 kDa ausgeschnitten, um das KIF-150 zu identifizieren. Die Analyse per Massenspektrometrie lieferte die Sequenzen von drei Proteinen (in Tabelle 1 mit A – C bezeichnet), jedoch erneut keine Kinesin-Motorprotein-Sequenz. Mit dem Rho GTPase-aktivierenden Protein wurde jedoch ein interessantes Protein identifiziert, da dieses Protein an der Signaltransduktion in den dendritischen Dornen von Neuronen, den sog. *Spines*, beteiligt ist (Okabe *et al.*, 2003). Das zweite Protein ist am Fett-Stoffwechsel beteiligt, das dritte ein Protein mit unbekannter Funktion. Enttäuschenderweise wurde kein Protein der ersten Sequenzierung identifiziert.

Protein-bande	GI-Nummer	Spezies	Protein	Funktion
a	27680140	HS, RN	similar to Sec23-interacting protein p125	ER-Golgi-Transport
b	31418260	MM	<i>Mus musculus</i> cDNA clone	unbekannt
	109359	K	phosphorylase kinase $\beta$ -chain	Kinase
	27679942	HS, RN	similar to eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 8	Translation
c	3123230	HS	similar to eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 9	Translation
1	17485036	HS	similar to mKIAA0376	unbekannt
	14042921	MM	splicing factor 3b, subunit 1	Spleißen
2	4503509	HS	similar to eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 10	Translation
	28972343	MM	mKIAA0674 protein	unbekannt
	27671424	RN	similar to gemin 5	Biogenese von snRNPs
3	17223644	MM	transcription factor TFII-I-beta	Transkription
A	6678716	MM	low density lipoprotein receptor-related protein 5	Fett-Stoffwechsel
B	28893539	MM	Rho GTPase activating protein	Signaltransduktion
C	38089492	MM	similar to KIAA1389 protein	unbekannt

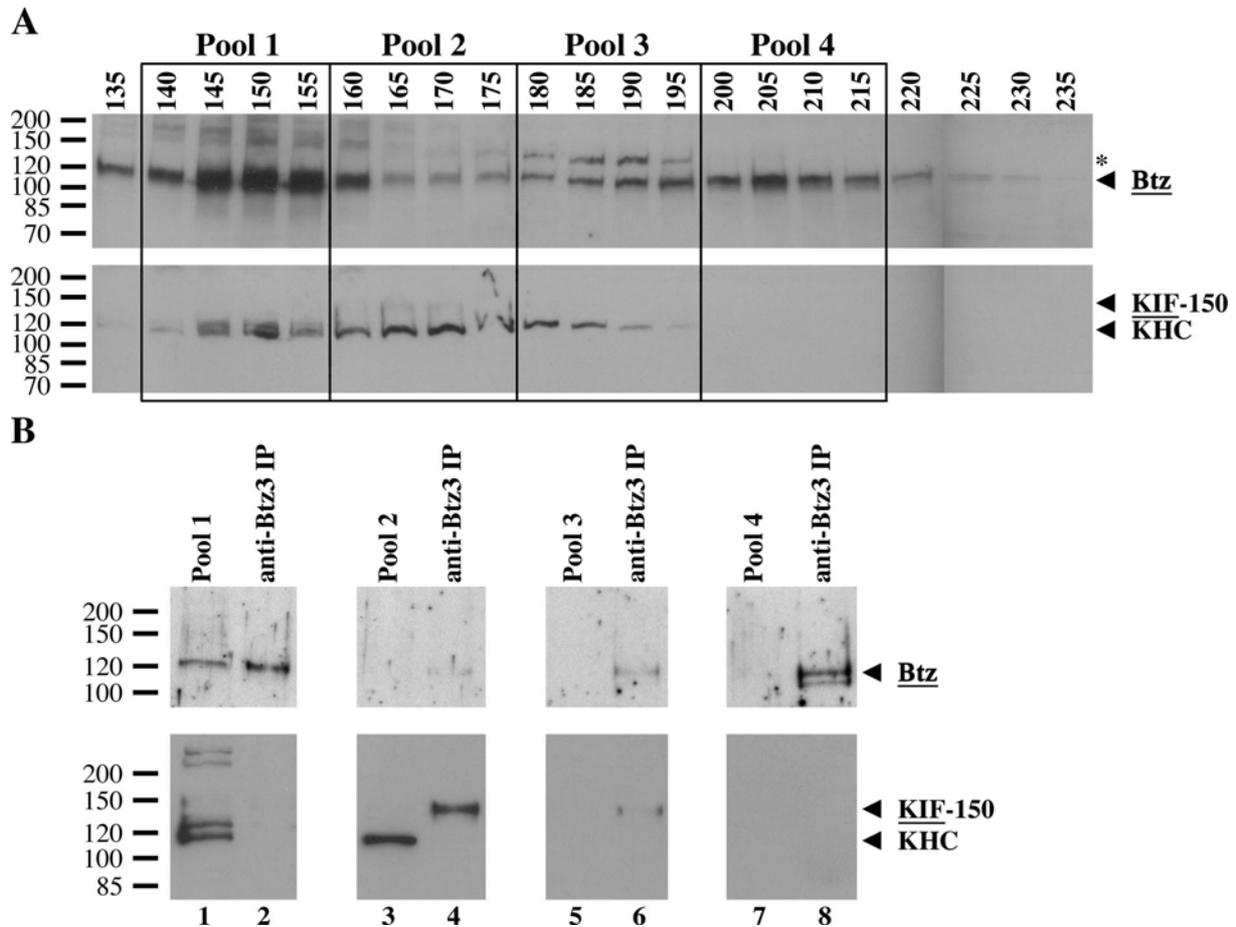
**Tabelle 1: Über Massenspektrometrie identifizierte Proteine der Immunpräzipitation mit anti-Barentsz3 Antikörpern**

Die Analyse der sechs Proteinbanden der anti-Barentsz3 Immunpräzipitation über Massenspektrometrie (siehe Abbildung 26 B) identifizierte elf Proteine (Bezeichnung mit a – c sowie 1 – 3). Bei einer zweiten Sequenzierung wurden drei weitere Proteine identifiziert (Bezeichnung mit A – C). Die Spezies gibt an, aus welchem Organismus die jeweilige Protein-Sequenz stammt (HS: *Homo sapiens*, MM: *Mus musculus*, RN: *Rattus norvegicus*, K: Kaninchen). Des Weiteren sind für jedes Protein die GI-Nummer, die Protein-Bezeichnung sowie dessen Funktion aufgelistet.

#### 4.5.3.3 Größenfraktionierung von löslichen Barentsz-Komplexen über Gelfiltration

Bei der molekularen Identifizierung von KIF-150 über Massenspektrometrie war ein Problem, daß die KIF-150-Bande sehr wahrscheinlich von anderen Proteinen überdeckt wurde und daher nicht identifiziert werden konnte. In den nächsten Versuchen wurde deshalb nach weiteren Möglichkeiten gesucht, diese Hintergrundproteine abzureichern, um möglichst eine freiliegende KIF-150-Bande zu erhalten. Gleichzeitig sollte die Menge an KIF-150 zumindest gleich bleiben oder gar erhöht werden. In einem ersten Versuchsansatz sollte dies durch eine Größenfraktionierung des Hirnextrakts über Gelfiltration mit anschließender Immunpräzipitation erreicht werden. Im zweiten Versuchsansatz wurde die 2D-Gelelektrophorese anstelle der SDS-PAGE verwendet, um eine bessere Auftrennung der immungefällten Proteine zu erhalten.

In einem Vorversuch wurde zunächst die Größenverteilung der Komplexe mit Barentsz und Kinesin-Motorproteinen analysiert (siehe Abbildung 27 A). Dazu wurde der S100 eines Hirnextrakts von embryonalen Ratten über eine Sephacryl S300 HR-Säule aufgetrennt. Die Barentsz-enthaltenden Komplexe zeigten eine sehr breite Verteilung mit zwei Maxima bei 145 – 155 ml sowie bei 200 – 210 ml, die Kinesin-Komplexe eine nicht ganz so breite Verteilung mit einem Maximum bei 170 ml. Auf Grund dieser Verteilung habe ich 4 Pools à 20 ml gebildet, die ich für Immunpräzipitationen mit dem anti-Barentsz<sup>3</sup> Antikörper verwendete (in Abbildung 27 A durch Boxen gekennzeichnet): Pool 1 und 4 mit den beiden Barentsz-Maxima, Pool 2 mit dem Maximum der Kinesin-Motorproteine sowie einem weiteren Pool 3, um den gesamten Größenbereich abzudecken. Bei den Immunfällungen aus den vier Pools fällte ich wie erwartet die größte Menge an Barentsz aus den Pools 1 und 4, da hier die beiden Barentsz-Maxima auftraten (siehe Abbildung 27 B, Spuren 2 und 8). Jedoch ließ sich in diesen Pools das KIF-150 nicht nachweisen. Das KIF-150 wurde hingegen aus dem Pool 2 gefällt, wo jedoch nur eine geringe Menge an immungefälltem Barentsz nachgewiesen wurde (siehe Abbildung 27 B, Spur 4). Durch den Vergleich der Größenverteilung der Barentsz- und Motorprotein-Komplexe auf einer geeichten Superose 6-Säule konnte die Größe des Barentsz/KIF-150-Komplexes auf 650 – 700 kDa geschätzt werden. An dieser Stelle sollte angemerkt werden, daß die tatsächliche Menge an immungefälltem Barentsz größer ist, als es das schwache Signal des bei diesem Western Blotting verwendeten anti-Barentsz Antikörpers aus der Maus vortäuscht (Abbildung 27 B). Dieser zeigt nämlich im Vergleich zum anti-Barentsz<sup>12</sup> Antikörper aus dem Kaninchen, der für die Gelfiltrations-Analyse verwendet wurde (Abbildung 27 A), ein deutlich schwächeres Signal. Diese Daten belegen, daß in Hirnextrakten nur ein sehr geringer Anteil der Barentsz-Proteine in einem Komplex mit KIF-150 vorliegen. Leider konnten mit dieser Methode nicht wie erhofft größere Mengen an KIF-150 gefällt werden: für die Gelfiltration wurde ungefähr die 10-fache Menge einer Immunpräzipitation eingesetzt, jedoch konnte nur ungefähr dieselbe Menge an KIF-150 coimmungefällt werden. Außerdem wurden aus diesem Pool ähnlich viele Proteine gefällt wie aus dem S100 (Daten nicht gezeigt). Dies zusammen mit dem sehr hohen Aufwand führte zu der Entscheidung, das KIF-150 mit einer anderen Methode zu identifizieren.



**Abbildung 27: Nachweis von KIF-150 in einem 650 – 700 kDa großen Barentsz-Komplex.**

**A: Auftrennung der löslichen Komplexe eines Rattenhirn-Extrakts über Gelfiltration.** 25 mg S100 eines embryonalen Rattenhirn-Extrakts (E17) wurden über eine Sephacryl S300 HR-Gelfiltrationssäule aufgetrennt. Für die SDS-PAGE wurden die einzelnen Fraktionen mit TCA gefällt und jeweils 10 % pro Spur geladen. Der Western Blot wurde mit dem Kaninchen anti-Barentsz12 (der Stern markiert eine Kreuzreaktivität dieses Antikörpers mit einem 150 kDa-Protein) sowie dem anti-KIF Antikörper immundekoriert.

**B: Coimmunfällung von KIF-150 in anti-Barentsz3 Immunpräzipitationen aus dem Pool 2 von Gelfiltrationsexperimenten.** Wie bei A wurde der S100 über Gelfiltration aufgetrennt. Die in A gekennzeichneten Pools à 20 ml wurden mittels Ultrafiltration (Centriplus YM-30) auf 10 ml eingengt und anschließend für Immunpräzipitationen mit anti-Barentsz3 Antikörpern eingesetzt. Die immungefällten Komplexe sowie eine Probe der mit TCA gefällten Pools als Ladekontrolle wurden über SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mit dem Maus anti-Barentsz und dem anti-KIF Antikörper über Western Blotting.

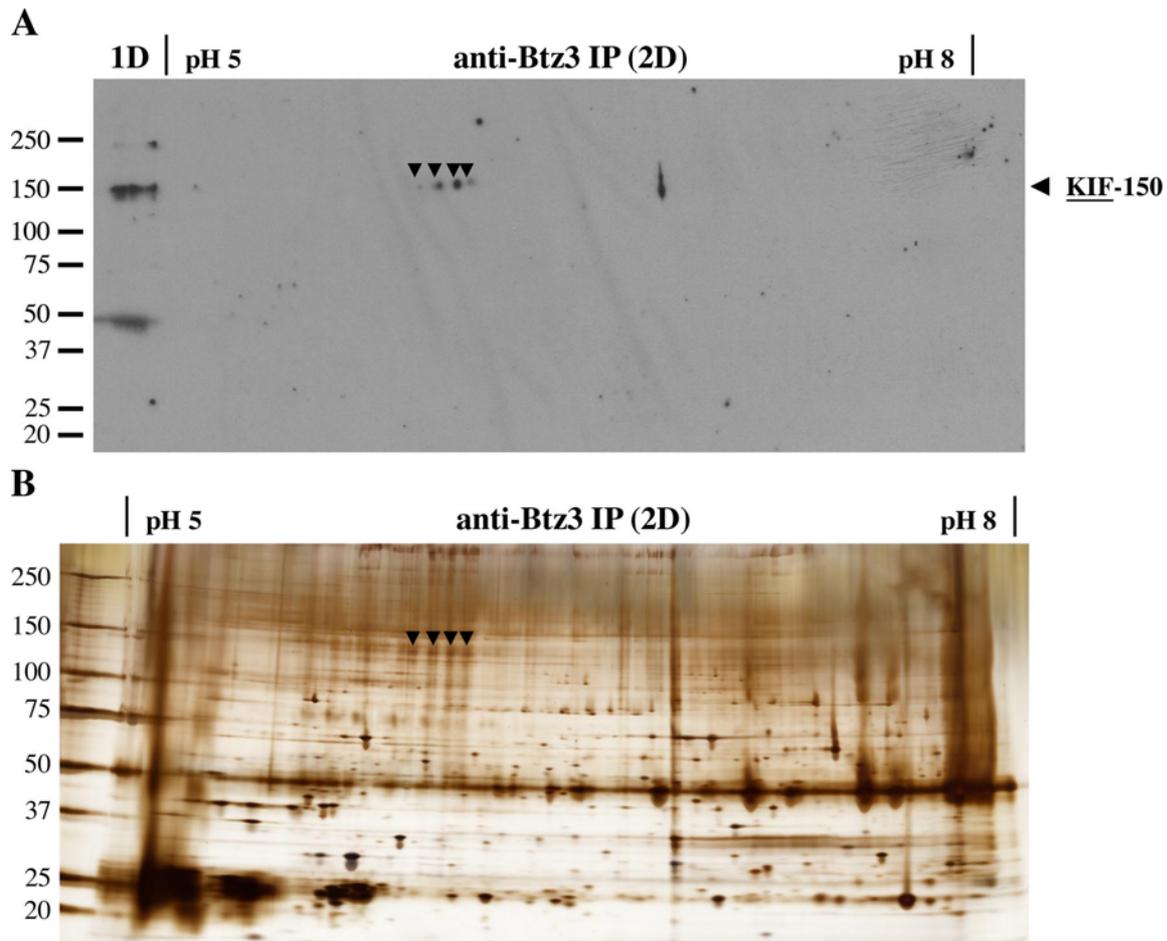
#### 4.5.3.4 Auftrennung von anti-Barentsz Immunpräzipitationen über 2D-Gelelektrophorese

Die 2D-Gelelektrophorese trennt Proteine nach zwei unabhängigen Parametern auf: zum einem dem isoelektrischen Punkt (pI) in der ersten Dimension sowie der elektrophoretischen Beweglichkeit bei einer denaturierenden SDS-PAGE in der zweiten Dimension. Daher

werden Proteingemische mit dieser Methode deutlich besser aufgetrennt als durch die normale SDS-PAGE.

Für die Identifizierung von KIF-150 über 2D-Gelelektrophorese wurden zwei Immunpräzipitationen mit anti-Barentsz3 Antikörpern durchgeführt (siehe Abbildung 28). Vor der Immunfällung wurde der S100 mit RNase A/T1 behandelt, da die mitgefällte RNA das Laufverhalten der 2D-Gele stört. Die Interaktion von Barentsz mit KIF-150 wurde wie bereits gezeigt durch diese Behandlung jedoch nicht beeinflusst (siehe Abbildung 23 A). Die immungefällten Komplexe wurden anschließend mit Rehydrierungspuffer eluiert. In Vorversuchen wurde sichergestellt, daß die Komplexe vollständig im Rehydrierungspuffer solubilisiert wurden (Daten nicht gezeigt), da die Probe wegen des Harnstoffs im Rehydrierungspuffer nicht auf mehr als 37°C erwärmt werden darf. Für die erste Dimension wurde ein 11 cm langer IPG-Streifen pH 5 – 8, für die zweite Dimension ein 4 – 20 % Gradientengel verwendet. Ein 2D-Gel wurde durch Western Blotting mit dem anti-KIF Antikörper analysiert (siehe Abbildung 28 A). Bei der zweiten Dimension wurde als Größenstandard für das KIF-150 zusätzlich eine anti-Barentsz3 Immunpräzipitation geladen (siehe Abbildung 28 A, Spur markiert mit 1D). Bei einem pI von ca. 6 sowie einem Molekulargewicht von 150 kDa erfolgte eine Immunerkennung von vier Spots, bei denen es sich möglicherweise um unterschiedlich phosphorylierte Formen des KIF-150 handelt (in Abbildung 28 A markiert durch Pfeilspitzen). Bei der Silberfärbung eines entsprechenden 2D-Gels wurden im selben Bereich (pI ~ 6 sowie 150 kDa) ebenfalls vier Proteinspots angefärbt (siehe Abbildung 28 B), die sehr wahrscheinlich dem KIF-150 entsprechen.

Nachdem die KIF-150-Proteinspots auf dem 2D-Gel genau lokalisiert wurden, erfolgte eine präparative Auftrennung von acht Immunpräzipitationen mit anti-Barentsz3 Antikörpern über 2D-Gelelektrophorese. Da Silber den Trypsin-Verdau bei der Sequenzanalyse mittels Massenspektrometrie inhibiert, wurde das 2D-Gel nach einem besonders sensitiven Protokoll mit kolloidalem Coomassie angefärbt. Ein KIF-150-Proteinspot wurde auf dem Gel ausgeschnitten und ebenfalls über Massenspektrometrie im Labor von Dr. Christoph Turck untersucht. Leider ergab eine erste Sequenzanalyse keine Kinesinsequenz.



**Abbildung 28: Isolierung von KIF-150 über 2D-Gelelektrophorese.**

Nach einer RNase A/T1 Behandlung wurde der S100 von embryonalen Hirnextrakten (E17) für Immunpräzipitationen mit anti-Barentsz3 Antikörpern verwendet. Jeweils 2 Fällungen wurden über 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt: ein Gel wurde geblottet und mit anti-KIF Antikörpern immundekoriert (**A**; hier wurde bei der SDS-PAGE als zweiter Dimension zusätzlich noch eine anti-Barentsz3 Immunpräzipitation als Positivkontrolle geladen, Bezeichnung mit 1D), beim zweiten Gel wurden die Proteine mit Silber angefärbt (**B**). Die Pfeilspitzen markieren die vier KIF-150-Proteinspots.

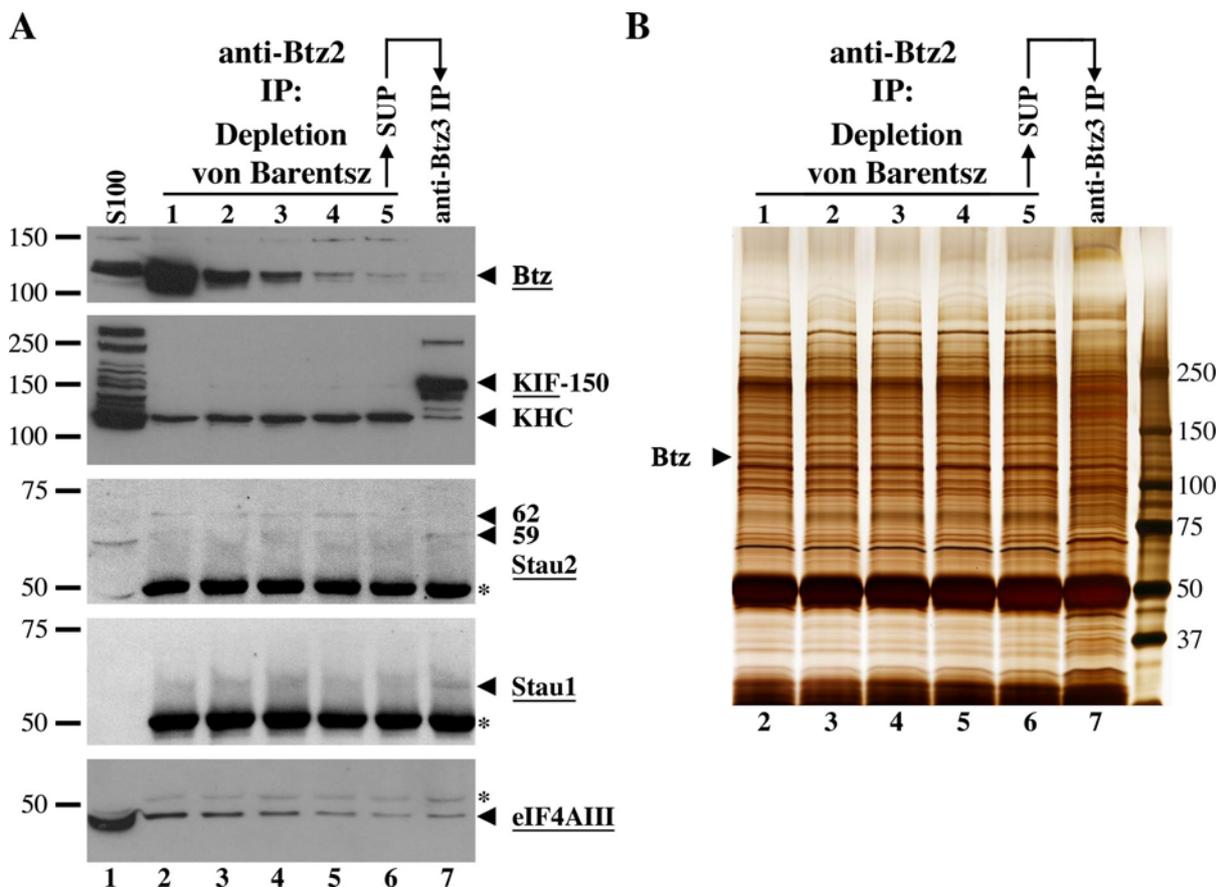
#### 4.6 Depletion von Barentsz aus Hirnextrakten der Ratte

Mehrere Ergebnisse deuten darauf hin, daß es im Rattenhirn zwei verschiedene Komplexe von Barentsz mit Kinesin-Motorproteinen gibt: einen Komplex mit KHC sowie einen mit KIF-150. In den Immunpräzipitationen mit dem anti-Barentsz2 und dem anti-KHC Antikörper wurde der Barentsz/KHC-Komplex gefällt, das KIF-150 war aber im Immunpräzipitat nicht nachzuweisen (siehe Abbildung 19 A und Daten nicht gezeigt). Um die beiden Komplexe weiter zu untersuchen, wurde in mehreren aufeinanderfolgenden Immunpräzipitationen versucht, einen der beiden Barentsz/Motorprotein-Komplexe zu depletieren. Falls tatsächlich

zwei unterschiedliche Komplexe existieren, so sollte der zweite Komplex nach wie vor aus dem depletieren Extrakt immunpräzipitiert werden können.

In einem ersten Versuch galt es, den Barentsz/KHC-Komplex aus dem S100 eines Hirnextrakts von embryonalen Ratten zu depletieren. Dazu habe ich den S100 für eine Immunpräzipitation mit dem anti-Barentsz2 Antikörper verwendet, den Überstand anschließend für eine zweite Immunfällung ebenfalls mit dem anti-Barentsz2 Antikörper. Insgesamt habe ich fünf aufeinanderfolgende Immunpräzipitationen mit dem anti-Barentsz2 Antikörper durchgeführt. Nach der fünften Immunpräzipitation wurde mit dem depletieren Überstand eine Immunfällung mit dem anti-Barentsz3 Antikörper durchgeführt. Die Immunpräzipitate wurden nach der Auftrennung über SDS-PAGE mittels Western Blottings analysiert (siehe Abbildung 29 A) sowie mit Silber angefärbt (siehe Abbildung 29 B). Wie erwartet wurde Barentsz durch die sequentiellen Immunpräzipitationen aus dem S100 depletiert: im ersten Immunpräzipitat war eine große Menge an Barentsz enthalten, während in der fünften Immunpräzipitation nur noch eine geringe Menge nachzuweisen war (siehe Abbildung 29 A, Spuren 2 – 6). Jedoch erfolgte für Staufen1 und Staufen2<sup>62</sup>, die beide in nur sehr geringen Mengen coimmungefällt wurden, sowie für KHC überraschenderweise keine Depletion. In allen aufeinanderfolgenden Immunpräzipitationen sind ähnliche Mengen dieser Proteine vorhanden. eIF4AIII ließ sich hingegen stark abreichern: dies ist ein weiterer Beweis, daß eIF4AIII eine *bona fide* Komponente der Barentsz-Komplexe im Rattenhirn ist. In der anti-Barentsz3 Immunpräzipitation nach der Depletion (siehe Abbildung 29 A, Spur 7) wurde neben sehr geringen Mengen an Barentsz auch KIF-150 nachgewiesen. Des weiteren wurden hier auch geringe Mengen an Staufen2<sup>59</sup>, Staufen1 sowie eIF4AIII coimmunpräzipitiert. Dieser Versuch bestätigt die bisherigen Ergebnisse, daß im embryonalen Rattenhirn verschiedene Barentsz-Komplexe vorliegen. Die Depletion von Barentsz und eIF4AIII deutet darauf hin, daß eIF4AIII in den meisten Barentsz-Komplexen enthalten ist. Da KHC, Staufen1 und Staufen2<sup>62</sup> nicht depletiert werden konnten, sind diese Proteine wahrscheinlich keine Komponenten des Barentsz/eIF4AIII-Komplexes. In der ersten Immunpräzipitation bewirkte eine große Menge an Barentsz die Coimmunfällung von KHC, in der fünften Immunpräzipitation jedoch eine geringe Menge an Barentsz die Coimmunfällung derselben Menge an KHC. Dieser scheinbare Widerspruch kann möglicherweise dadurch erklärt werden, daß nur wenige der polyklonalen anti-Barentsz2 Antikörper den Barentsz/KHC-Komplex immunfällen können und daß daher dieser Komplex mit diesen Antikörpern nicht depletiert werden kann. Ein ideales Werkzeug zur Untersuchung dieses Komplexes wäre daher ein monoklonaler anti-Barentsz Antikörper, der diesen

Komplex in größeren Mengen immunpräzipitiert. Die Coimmunfällung von KIF-150 nach der Barentsz-Depletion ist ein weiterer Beleg für die Existenz von zwei verschiedenen Barentsz-Komplexen mit KIF-150 einerseits und KHC andererseits. Weiterhin fällt auf, daß bei der Immunpräzipitation des Barentsz/KHC-Komplexes präferentiell Stau2<sup>62</sup> (siehe Spuren 2 – 6), während bei der Immunpräzipitation des Barentsz/KIF-150-Komplexes Stau2<sup>59</sup> (siehe Spur 7) coimmungefällt wird. Dies spricht für unterschiedliche Funktionen der beiden Stau2-Isoformen in verschiedenen Komplexen mit Kinesin-Motorproteinen.



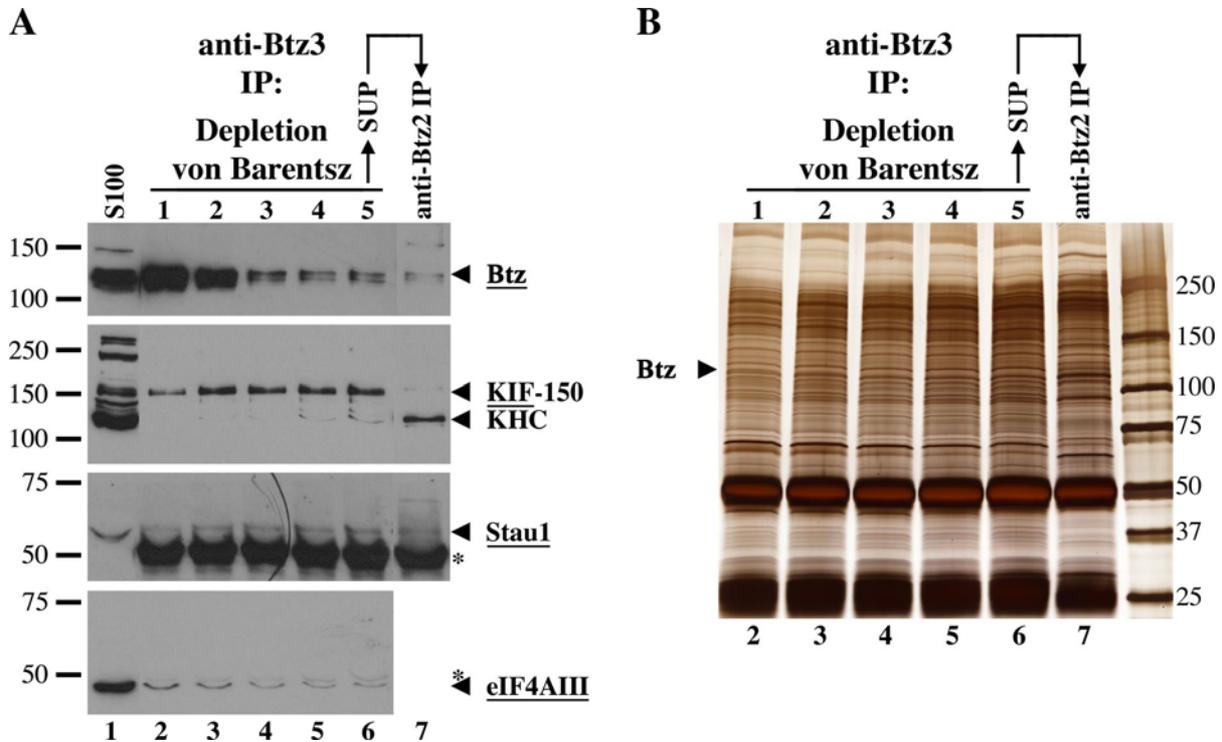
**Abbildung 29: Depletion von Barentsz über sequentielle anti-Barentsz2 Immunpräzipitationen.**

Der S100 von embryonalen Ratten (E17) wurde für eine Immunpräzipitation mit anti-Barentsz2 Antikörpern verwendet. Nach der Immunfällung wurde die Matrix mit den gebundenen Komplexen wie gewöhnlich gewaschen (Spur 2: Depletion von Barentsz #1), der Überstand für eine zweite Immunpräzipitation mit anti-Barentsz2 Antikörpern benützt (Spur 3: Depletion von Barentsz #2). Diese Immunpräzipitationen mit anti-Barentsz2 Antikörpern wurden drei weitere Male wiederholt (Spuren 4 – 6: Depletion von Barentsz #3 – 5), bevor mit dem depletierten Überstand der fünften Fällung eine Immunpräzipitation nun mit dem anti-Barentsz3 Antikörper durchgeführt wurde (Spur 7: anti-Btz3 IP). Die Proben wurden nach Auftrennung über SDS-PAGE durch Western Blotting mit den angezeigten Antikörpern analysiert (A) bzw. mit Silber angefärbt (B). Die Pfeilspitze markiert die Depletion von Barentsz über aufeinanderfolgende Immunpräzipitationen.

Bei der Analyse der Depletion über die Silberfärbung zeigte nur die Barentsz-Bande eine Reduktion (siehe Abbildung 29 B, Markierung mit einer Pfeilspitze). Alle übrigen Banden konnten nicht depletiert werden und wiesen die gleiche Bandenintensität auf. Dies spricht dafür, daß diese Proteine nicht über Barentsz coimmungefällt werden und daß sie unspezifisch an die Protein A-Sepharose-Matrix mit den gebundenen anti-Barentsz2 Antikörpern binden. Die äußerst geringe Menge an Barentsz in der fünften Immunpräzipitation (siehe Abbildung 29 B, Spur 6) ist ebenfalls ein Argument gegen eine spezifische Coimmunfällung der übrigen Proteine. Im allgemeinen sollte das gefällte Protein, also in diesem Fall Barentsz, in einer größeren oder zumindest gleichen Menge wie die coimmungefällten Proteine immunpräzipitiert werden, wenn man einen äquimolaren Komplex voraussetzt. Gegen eine unspezifische Bindung aller Proteine spricht jedoch die kompetitive Elution der immungefällten Komplexe mit dem Antigen (siehe Abbildung 25 B): das Antigen sollte durch das Binden an die Antigen-Bindungsstelle der Antikörper die Barentsz-Komplexe verdrängen. Die Proteine, die nach der Elution immer noch an die Matrix gebunden sind, sollten daher unspezifisch gebundene Proteine darstellen (siehe Abbildung 25 B, Spur 3). Die Coimmunfällung von KIF-150 ist unter diesen Gesichtspunkten mit größerer Vorsicht zu betrachten. Für eine spezifische Interaktion spricht die Tatsache, daß nur ein geringer Teil des zellulären Barentsz aus Pool 2 mit KIF-150 assoziiert ist (siehe Abbildung 27 B), genauso wie eine geringe Menge Barentsz nach der Depletion zur Coimmunfällung von KIF-150 führte (siehe Abbildung 29 A, Spur 7). Die Fällung des Barentsz/KHC-Komplexes durch den anti-Barentsz2 sowie durch den anti-KHC Antikörper ist jedoch ein klarer Hinweis, daß diese Interaktion spezifisch ist.

In Analogie zum vorherigen Versuch habe ich die Depletion der Barentsz/KIF-150-Komplexe durch fünf aufeinanderfolgende anti-Barentsz3 Immunpräzipitationen durchgeführt. Nach der fünften Immunpräzipitation habe ich dann den Überstand für eine Immunfällung mit dem anti-Barentsz2 Antikörper verwendet. Die Immunpräzipitate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blottings analysiert (siehe Abbildung 30 A) bzw. mit Silber angefärbt (siehe Abbildung 30 B). Sowohl Barentsz als auch eIF4AIII wurden erneut durch die aufeinanderfolgenden Immunfällungen depletiert (siehe Abbildung 30 A, Spuren 2 – 6), während für Staufen1 und KIF-150 in allen Immunpräzipitationen ähnliche Proteinmengen detektiert wurden. Somit konnte wie beim vorherigen Versuch der Barentsz/Motorprotein-Komplex nicht depletiert werden. Die anti-Barentsz2 Immunpräzipitation nach der Depletion (siehe Abbildung 30 A, Spur 7) fällte neben geringen Mengen an Barentsz auch KHC sowie

Staufen1 (diese Probe wurde nicht auf die Anwesenheit von eIF4AIII getestet). Auch die Analyse des Silbergels ergab erneut nur die Depletion der Barentsz-Bande (siehe Abbildung 30 B). Damit wurde Existenz der verschiedenen Barentsz-Komplexe erneut bestätigt.



**Abbildung 30: Depletion von Barentsz über sequentielle anti-Barentsz3 Immunpräzipitationen.**

In Analogie zum vorherigen Versuch wurde der S100 von embryonalen Rattenhirn-Extrakten (E17) durch Immunpräzipitationen mit anti-Barentsz3 Antikörpern depletiert. Nach der fünften Immunpräzipitation wurde der depletierte Überstand für eine Immunfällung mit dem anti-Barentsz2 Antikörper verwendet. Die Proben wurden mittels Western Blottings (**A**) sowie eines mit Silber angefärbten SDS-PAGE Gels (**B**) analysiert. Die Pfeilspitze markiert die Depletion von Barentsz durch die aufeinander folgenden Immunpräzipitationen.

## 5. Diskussion

### 5.1 Barentsz und Staufen sind Teil eines konservierten mRNP-Komplexes

Das Ziel dieser Doktorarbeit war die Identifizierung von Komponenten der Staufen-enthaltenden Ribonucleoprotein-Komplexe im Rattenhirn, die möglicherweise für den mRNA-Transport in die Dendriten von Säuger-Neuronen verantwortlich sind. Als Kandidat kam hierfür das Säuger-Homolog von *Drosophila* Barentsz in Frage. Letzteres ist zusammen mit den Proteinen Staufen, Mago nashi, Tsunagi/Y14 und KHC an der Lokalisierung von *oskar* mRNA in *Drosophila* beteiligt (van Eeden *et al.*, 2001). In homozygoten *btz*<sup>2</sup>-Mutanten verblieb die *oskar* mRNA auf ihrem Weg zum posterioren Pol am anterioren Ende der *Drosophila* Oocyte. Die Autoren wiesen auf die partielle Homologie von *Drosophila* Barentsz mit einem kürzlich in der Maus identifizierten Protein namens MLN51 (*metastatic lymph node 51*) hin, dessen mRNA in Brustkrebs überexprimiert ist (Tomasetto *et al.*, 1995). Bei der Expression eines Fusionsproteins bestehend aus MLN51 und GFP in einer Wildtyp-Eikammer von *Drosophila* colokalisierte dieses Protein mit Staufen und *oskar* mRNA am posterioren Pol (Macchi *et al.*, 2003). Dies deutet darauf hin, daß MLN51 tatsächlich das Säuger-Homolog von *Drosophila* Barentsz darstellt, da es scheinbar über seine konservierte Domäne mit *Drosophila* Staufen interagiert. Andererseits blieb jedoch bei der Expression des Säuger-Homologs in *btz*<sup>1</sup>-Mutanten die Lokalisierung von Staufen und *oskar* mRNA an den posterioren Pol aus. Dies legt nahe, daß das Säuger-Barentsz nicht vollständig in *Drosophila* übernehmen kann, da möglicherweise eine nicht konservierte Domäne im C-terminalen Bereich für die Kopplung der *oskar* mRNP-Komplexe an das Motorprotein KHC verantwortlich ist.

Um die Interaktion der homologen Säugerproteine von Barentsz und Staufen zu untersuchen, habe ich zunächst Immunpräzipitationen mit transfizierten Zellkulturzellen durchgeführt. Dabei gelang mir der Nachweis, daß Barentsz über seine konservierte Domäne RNA-abhängig mit Staufen1 interagiert (Abbildung 12) und daß auch eine Interaktion von Barentsz mit zwei Isoformen von Säuger-Staufen2 besteht (Abbildung 15). In weiteren Versuchen ließ sich die Interaktion von Barentsz mit den Staufen-Proteinen ebenso in Rattenhirn-Extrakten nachweisen (Abbildung 14 und 19). Diese Ergebnisse wurden durch Immunfärbungen in der Arbeitsgruppe bestätigt (Macchi *et al.*, 2003). Diese zeigten, daß sowohl Barentsz als auch Staufen1 Partikel bilden, die im Zellkörper und in geringerem Ausmaß auch in Dendriten auftreten. Die Colokalisierung der beiden Proteine war im Zellkörper am höchsten, nahm jedoch in den Dendriten mit zunehmender Entfernung vom Zellkörper ab. Dies spricht dafür,

daß Barentsz möglicherweise wie in der *Drosophila* Oocyte nur während des Transports mit den mRNP-Komplexen assoziiert ist, Staufen1 jedoch weiterhin an die transportierte mRNA gebunden bleibt. Daher kommt es durch den Zerfall der Komplexe zu der beschriebenen Abnahme der Colokalisation. Alternativ könnte Barentsz auch mit anderen RNA-Bindeproteinen, wie z. B. Staufen2, interagieren, das bei diesen Immunfärbungen jedoch nicht untersucht wurde.

Die RNA-abhängige Interaktion zwischen Barentsz und Staufen1 läßt vermuten, daß Barentsz spezifisch ein mit RNA beladenes Staufen1 erkennt. In Versuchen mit mutierten Staufen1-Proteinen, die keine RNA binden können, wies ich jedoch im Widerspruch dazu ebenfalls eine RNA-abhängige Interaktion nach (Abbildung 13 A). Möglicherweise vermitteln weitere im Barentsz/Staufen1-Komplex nachgewiesene RNA-Bindeproteine (Abbildung 13 B) die Interaktion zwischen Barentsz und Staufen1. Der Nachweis von mehreren RNA-Bindeproteinen in dem Komplex steht im Einklang mit Studien, die ebenfalls mehrere RNA-Bindeproteine in einem mRNP-Komplex gefunden haben (Arn *et al.*, 2003; Wilhelm *et al.*, 2000, Ohashi *et al.*, 2002). Die Interaktion könnte jedoch auch über die kürzlich berichtete RNA-Bindeaktivität von Barentsz erfolgen (Degot *et al.*, 2004). Die Ergebnisse dieser Studie weisen auf eine Bindung von einzelsträngiger RNA hin, was wahrscheinlich der Grund dafür ist, daß ich über einen North-Western Blot mit Doppelstrang-RNA keine RNA-Bindeaktivität von Barentsz nachweisen konnte.

Bisher wurde noch keine mRNA eindeutig identifiziert, die von den Staufen-Proteinen in die Dendriten von Säuger-Neuronen transportiert wird und die daher die RNA-abhängige Interaktion zwischen Barentsz und den Staufen-Proteinen vermitteln könnte. Die Tatsache, daß Staufen *in vitro* doppelsträngige RNA ohne jede Spezifität bindet, erschwert die Identifizierung von assoziierten mRNAs erheblich (St Johnston *et al.*, 1992). In einer vor kurzem veröffentlichten Arbeit wurde die Bindung von Staufen1 an das dendritische Lokalisierungselement der *MAP2* mRNA in einem Three-Hybrid-System gezeigt (Monshausen *et al.*, 2001). In einer weiteren Studie von Krichevsky und Kosik (2001) wurden die dendritisch lokalisierten *CaMKII $\alpha$* , *TrkB* und *NMDAR1* mRNAs als potentielle Kandidaten identifiziert. Außerdem wurde in unserer Arbeitsgruppe eine biochemische Reinigungsmethode etabliert, um Staufen-enthaltende RNP-Komplexe anzureichern. Mit dieser Methode waren Mallardo und Mitarbeiter (2003) in der Lage, dendritisch lokalisierte RNAs wie die nicht-kodierende *BCI* RNA und die *CaMKII $\alpha$*  mRNA sowie 15 neue mRNAs mit den Staufen1-RNPs aufzureinigen. In dieser Doktorarbeit konnte ich durch Immunpräzipitationen ebenfalls die *BCI* RNA sowie weitere unidentifizierte mRNA in den

Barentsz-Komplexen nachweisen (Abbildung 16). Die Identifizierung der *BCI* RNA durch zwei unabhängige Reinigungsmethoden bestärkt die Vermutung, daß Barentsz und Staufen1 Komponenten eines konservierten mRNP-Komplexes darstellen, der für die Lokalisierung von mRNAs in der *Drosophila* Oocyte und in Säuger-Neuronen verantwortlich ist.

## 5.2 Identifizierung weiterer Komponenten von Barentsz-Komplexen

Vor kurzem wurden erste Proteine identifiziert, die als potentielle Komponenten der Barentsz/Staufen-Komplexe in Frage kommen, unter ihnen FMRP (Ohashi *et al.*, 2002), eIF4AIII (Palacios *et al.*, 2004), die schwere und leichte Kette von MAP1B (Liu *et al.*, 2002; F. Propst und A.-D. Steffel, persönliche Mitteilung) und TB-RBP (Severt *et al.*, 1999). Die Interaktionen von Barentsz mit FMRP, eIF4AIII sowie den beiden Ketten von MAP1B in Hirnextrakten von embryonalen Ratten konnte ich durch Immunpräzipitationen mit anti-Barentsz Antikörpern bestätigen, während TB-RBP scheinbar in keinem gemeinsamen Komplex mit Barentsz vorliegt (Abbildungen 17 und 18). Des weiteren ließ sich neben KHC ein zweites potentielles Kinesin-Motorprotein mit einem Molekulargewicht von 150 kDa (KIF-150) in Immunfällungen mit zwei verschiedenen anti-Barentsz Antikörpern nachweisen (Abbildung 19). Für die Spezifität der RNA-unabhängigen Interaktion von Barentsz mit diesen Motorproteinen sprechen zahlreiche Kontrollversuche sowie die Tatsache, daß mit einem weiteren anti-Barentsz Antikörper (Barentsz12) beide Motorproteine coimmungefällt wurden (Daten nicht gezeigt). Das KIF-150 wäre nach KHC das zweite Kinesin-Motorprotein, das möglicherweise am mRNA-Transport in Dendriten von hippocampalen Neuronen beteiligt ist. Daher habe ich im letzten Versuchsteil zahlreiche Versuche unternommen, um die molekulare Identität dieses unbekanntes Motorproteins zu bestimmen. Die Sequenzanalyse von mehreren Protein-Banden über Massenspektrometrie (in Zusammenarbeit mit Dr. Christoph Turck, Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München) lieferte insgesamt vierzehn Proteine, jedoch leider kein Kinesin-Motorprotein (Tabelle 2). Die Spezifität der beobachteten Interaktionen sowie die molekulare Identifizierung von KIF-150 werden Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Kurz vor Beendigung dieser Doktorarbeit wurden drei Studien veröffentlicht, in denen weitere Komponenten von Staufen-enthaltenden Partikeln identifiziert wurden. Da diese für meine Arbeit relevant sind, möchte ich diese hier kurz vorstellen. Brendel und Mitarbeiter (2004) transfizierten HEK293-Zellen mit einem Fusionsprotein bestehend aus Staufen1 und

einer C-terminalen PDZ-Domäne, um mittels einer Peptid-Affinitätssäule Staufen1-enthaltende RNP-Komplexe zu isolieren. Dabei identifizierten die Autoren 21 Proteine, unter ihnen mehrere Proteine der großen und kleinen Ribosomen-Untereinheit, RNA-Bindeproteine (RNA-Helicase A, hnRNP U, NFAR, PABP, Nucleolin und FMRP), Cytoskelett-Proteine ( $\beta$ 4-Tubulin und  $\alpha$ -Tubulin) sowie Motorproteine (KHC und die mittlere Kette von Dynein). Interessanterweise wurde die Mehrzahl dieser Proteine ebenfalls in einer weiteren Studie identifiziert, bei der Staufen1 mit einer *tandem affinity purification* (TAP-) Domäne für eine Affinitätsreinigung verwendet wurde (Villacé *et al.*, 2004). Die Ergebnisse von Brendel und Mitarbeitern legen des weiteren nahe, daß Staufen1 über den P0-Komplex an Ribosomen bindet. P0 ist auf Grund seiner Interaktion mit Elongationsfaktoren für eine effiziente Translation notwendig. Möglicherweise erfolgt durch die Assoziation von Staufen1 mit dem P0/Ribosomen-Komplex eine Regulation der Translation. Bemerkenswerterweise wird *Drosophila* Staufen für die Translation von *oskar* mRNA benötigt (Micklethorn *et al.*, 2000).

In der dritten Studie wurde aus Gehirnextrakten der Maus mittels Affinitätsreinigung ein auffallend großer RNase-sensitiver Komplex bestehend aus mindestens 42 Proteinen sowie den beiden *CaMKII $\alpha$*  und *Arc* mRNAs als Interaktionspartner von KHC isoliert (Kanai *et al.*, 2004). Die identifizierten Proteine spielen bei den folgenden Prozessen eine Rolle: beim RNA-Transport (verschiedene hnRNPs, FMRP, FXR1, FXR2, Pur $\alpha$ , Pur $\beta$  und Staufen), bei der Proteinsynthese (eukaryontische Initiationsfaktoren, Hsp70 und ribosomale Proteine), bei anderen RNA-assoziierten Funktionen (RNA-Helicasen DDX1, 3 und 5; ALY, PSF, Nucleolin, SYNCRIP und TLS) bzw. stellen Proteine mit unbekannter Funktion dar. Siebzehn dieser Proteine wurden intensiv untersucht und dabei deren Interaktion über Immunpräzipitationen nachgewiesen. Außerdem colokalisieren diese Proteine in Granula in den Dendriten von hippocampalen Neuronen. Hierbei diente Pur $\alpha$  als Marker, da dieses Protein zusammen mit Pur $\beta$  und hnRNP U die stärkste Interaktion mit KHC zeigte. Außerdem visualisierten die Autoren den bidirektionalen Transport von GFP-Pur $\alpha$ -enthaltenden Granula in die Dendriten mit einer Geschwindigkeit von  $\sim 0,1 \mu\text{m/s}$ . Diese Geschwindigkeit stimmt sehr gut mit der von Partikeln überein, die *CaMKII $\alpha$*  mRNA enthalten (Rook *et al.*, 2000), die ja ebenfalls in den Granula identifiziert wurde. Des weiteren legen RNAi-Experimente nahe, daß Pur $\alpha$ , hnRNP U, PSF sowie Staufen für den Transport der mRNAs essentiell sind, während DDX3 und SYNCRIP für den Transport nicht notwendig sind. Diese Proteine üben möglicherweise in den Transport-Komplexen andere Funktionen wie z. B. die Regulation der Translation aus.

Alle Faktoren, die in diesen drei Studien (Brendel *et al.*, 2004; Villacé *et al.*, 2004; Kanai *et al.*, 2004) sowie in der Studie von Ohashi und Mitarbeitern (2002) identifiziert wurden, sind in Tabelle 2 aufgelistet. In allen Studien wurde eine Assoziation von Staufen mit FMRP, ribosomalen Proteinen und KHC nachgewiesen. Des Weiteren wurde in drei Fällen eine Interaktion mit Nucleolin und hnRNP U gefunden. Nucleolin ist bei der Biogenese von Ribosomen und bei deren Export ins Cytoplasma beteiligt (Ginisty *et al.*, 1999) und außerdem liegt dieses Protein in verschiedenen mRNPs zusammen mit FMRP vor (Ceman *et al.*, 1999). hnRNP U stellt ein weiteres Mitglied der hnRNP-Proteinfamilie dar, das neben seiner Funktion im Zellkern auch eine Rolle beim mRNA-Transport im Cytoplasma spielt. So wurde durch Gupta und Mitarbeiter im Jahr 1998 gezeigt, daß hnRNP U beim Transport von viralen RNPs im Cytoplasma beteiligt ist. In meiner Doktorarbeit konnte ich ebenfalls eine Assoziation von FMRP und KHC mit Barentsz nachweisen. Interessanterweise erfolgte die Interaktion mit FMRP jedoch im P100 (Abbildung 17), während die Interaktion mit KHC im S100 zu beobachten war (Abbildung 19). Diese Ergebnisse legen nahe, daß ein Barentsz-Komplex mit FMRP sowie ein unabhängiger Komplex mit KHC existieren. Möglicherweise ist der Barentsz/FMRP-Komplex im Zellkörper mit intrazellulären Membranen wie dem rER oder mit Polysomen assoziiert. Dies wird auch durch die Tatsache bestätigt, daß FMRP sowie der Großteil von Barentsz im P100 zu finden sind (Abbildung 11 A bzw. Daten nicht gezeigt). Dieser Komplex könnte daher mit dem von Krichevsky und Kosik (2001) untersuchten Komplex identisch sein, der mit einer Ansammlung von dicht gepackten Ribosomen assoziiert ist und nach einer Depolarisierung der Neuronen dendritisch lokalisierte mRNAs freisetzt. Andererseits könnte der Btz/KHC-Komplex für den dendritischen mRNA-Transport verantwortlich sein, da diese mRNP-Komplexe im S100 vermutet werden. Jedoch besteht natürlich auch die Möglichkeit, daß die Komplexe während der Präparation zerfallen und daß deshalb nur Subkomplexe isoliert werden. In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu wissen, ob die identifizierten Proteine, wie z. B. Ribosomen-Untereinheiten, Nucleolin oder hnRNP U, ebenfalls in den Barentsz-Immunpräzipitationen vorhanden sind. In diesen Studien wurde aber nicht der eukaryontische Initiationsfaktor eIF4AIII als Komponente der Staufen-RNPs identifiziert. Dies spricht dafür, daß Barentsz und eIF4AIII einen konservierten Komplex ohne die Beteiligung von Staufen ausbilden, der in einem als NMD (*nonsense-mediated mRNA decay*) bezeichneten Prozeß den Abbau von mRNAs mit einem falschen, frühreifen Stop-Codon bewirkt (Palacios *et al.*, 2004). Ob Staufen bei diesem Prozeß tatsächlich nicht benötigt wird, muß aber durch weitere Versuche bestätigt werden. In diesen Studien wurden des Weiteren ebenfalls wie in meiner Doktorarbeit mehrere RNA-

Publikation	Methode/Quelle	RNA-Transport	Protein-Synthese	hnRNPs	RNA-assoziierte Funktionen	Motorproteine	Cytoskelett	andere/unbekannte Funktionen
Kanai <i>et al.</i> , 2004	Gehirn-Extrakt der Maus (S10): AR mit GST-KHC <sub>CT</sub>	FMRP, FXR1, FXR2, <b>Pur α</b> , Purβ, <b>Staufen</b>	EF-1α, eIF2α, eIF2β, HSP70, <b>ribosomale Proteine</b> (u.a. L3)	hnRNP A/B, hnRNP A0, hnRNP A1, hnRNP D, <b>hnRNP U</b>	DDX1/3/5, ADP-ribosylation factor guanine nucleotide factor 6, ALY, cold inducible RBP, EWS, NonO, <b>Nucleolin</b> , paraspeckle protein 1, PSF, RNA 3'-terminal phosphate cyclase, RNA binding motif protein 3, SYNCRIP, TLS	<b>KHC</b> (1)		Ser/Thr kinase receptor associated protein, TRIM2/3, CGI-99, FLJ38426, HSPC-117, zfp385, 2610528C06Rik, 5730436H21Rik, 6720458F09Rik
Villacé <i>et al.</i> , 2004	mit Staufen1-TAP transfizierete HEK293T-Zellen: TAP	<b>Staufen1-TAP</b> (2), Staufen2, <b>FMRP</b>	PABP, <b>ribosomale Proteine</b> P0, S4, S6, L6, L28	<b>hnRNP U</b>	<b>RNA-Helicase A</b> , <b>Nucleolin</b>	<b>KHC</b> , Myosin heavy chain, <b>Dynein intermediate chain</b>	β5-Tubulin, <b>α-Tubulin</b> , Tau, β-Aktin, α-Internexin, Rac1, Cdc42, IQGAPI protein	p-associated protein kinase II, Ras GAP
Brendel <i>et al.</i> , 2004	mit Staufen1-PDZ transfizierete HEK293T-Zellen: AR mit Peptid-Säule	<b>Staufen1-PDZ</b> (3), <b>FMRP</b>	PABP, <b>ribosomale Proteine</b> P0, S2, S3a, S6, S8, L6, L7a, L10, L14, L15, L21	<b>hnRNP U</b>	<b>RNA-Helicase A</b> , <b>Nucleolin</b> , NFAR	<b>KHC</b> , <b>Dynein intermediate chain</b>	β4-Tubulin, <b>α-Tubulin</b>	
Ohashi <i>et al.</i> , 2002	Gehirn-Extrakt der Maus (P100): IP mit anti-Purα	<b>Pur α</b> (4), <b>Staufen</b> , <b>FMRP</b>	<b>ribosomale Proteine</b> S14*, L8*			Myosin Va, <b>KHC</b> <sup>#</sup>		

**Tabelle 2: Faktoren der Staufen/RNA-Lokalisierungsmaschinerie in Säugerzellen**

Die jeweilige Veröffentlichung ist in der ersten Spalte aufgeführt, die dabei verwendeten Methoden mit ihren jeweiligen Proteinquellen in der zweiten Spalte. Die identifizierten Faktoren sind entsprechend ihrer Funktionen aufgeführt. Proteine, die in drei oder vier Studien gefunden wurden, sind **fett** dargestellt, Proteine, die in zwei Studien gefunden wurden, **fett und kursiv**. Affinitätsreinigung mit der C-terminalen Domäne von KHC (1), mit Staufen1-TAP (2) bzw. mit Staufen1-PDZ (3) durchgeführt; Immunpräzipitationen mit anti-Purα Antikörpern (4); \* : Coimmunfällung der ribosomalen Proteine in Abwesenheit von EDTA; # : Coimmunfällung von KHC in Abwesenheit von NP-40. S10/P100: Überstand bzw. Pellet nach Zentrifugation mit 10.000 bzw. 100.000 g; AR: Affinitätsreinigung; TAP: *tandem affinity purification*; IP: Immunpräzipitation.

Bindeproteine in einem gemeinsamen Komplex gefunden (Abbildung 13 und Daten nicht gezeigt). Dies bestätigt die in der Einleitung erwähnte Hypothese, daß die Affinität und Spezifität der RNA-Bindung möglicherweise durch die Summe mehrerer Interaktionen zustande kommt (Arn *et al.*, 2003). Ob jedoch alle in diesen Studien identifizierten Faktoren am dendritischen RNA-Transport in Neuronen beteiligt sind und vor allem welche Rolle sie hierbei spielen, muß in weiteren Studien genauer untersucht werden.

### 5.3 Existenz von verschiedenen Barentsz-Komplexen im Rattenhirn

Mehrere Ergebnisse meiner Doktorarbeit deuten auf die Existenz von verschiedenen Barentsz-Komplexen in Rattenhirn-Extrakten hin. Im vorangegangenen Kapitel wurde bereits die Existenz eines Komplexes mit FMRP im P100 sowie mit KHC im S100 angesprochen. Des weiteren zeigten bei der Größenfraktionierung eines Hirnextrakts über Gelfiltration Barentsz-enthaltende Komplexe in den Pools 1 und 4 zwei Maxima (Abbildung 27 A). In Immunpräzipitationen ließen sich im Pool 1 der Barentsz/eIF4AIII-Komplex (Daten nicht gezeigt) und im Pool 2 sowohl der Barentsz/KIF-150- als auch der Barentsz/KHC-Komplex nachweisen (Abbildung 27 B und Daten nicht gezeigt). Möglicherweise ist Stau2<sup>62</sup> eine Komponente des Komplexes mit KHC, da diese Stau2-Isoform präferentiell mit KHC coimmunpräzipitiert wurde (Abbildung 29 A). Außerdem ließen sich sowohl KHC als auch Stau2<sup>62</sup> bei der Immunpräzipitation mit dem anti-Barentsz3 Antikörper erst bei 300 mM KCl verstärkt nachweisen (Abbildung 22 A und Daten nicht gezeigt). Als weitere, potentielle Kandidaten des Barentsz/KHC-Komplexes wurden in einem Versuch mit aufeinanderfolgenden Immunpräzipitationen mit anti-Barentsz2 sowie anti-KHC Antikörpern 10 Proteine bei einer Silberfärbung nachgewiesen (Abbildung 25 B). Die molekulare Identität dieser Proteine muß jedoch in weiteren Versuchen bestimmt werden. Andererseits stellt Stau2<sup>59</sup> vielleicht eine Komponente des Barentsz/KIF-150-Komplexes dar. So kommt es nach der Depletion des Barentsz/KHC-Komplexes zu einer Coimmunpräzipitation von Stau2<sup>59</sup> und KIF-150 mit Barentsz (Abbildung 29 A). Diese scheinbar unterschiedlichen Funktionen der beiden Stau2-Isoformen kamen nicht völlig überraschend, da die Ergebnisse von Macchi und Mitarbeitern (2004) auf unterschiedliche Funktionen dieser beiden Isoformen im Zellkern hinweisen.

Diese Daten legen die Existenz von mindestens drei verschiedenen Barentsz-Komplexen im Rattenhirn nahe. Der Komplex mit eIF4AIII sollte gemäß den Daten von Palacios und Mitarbeitern (2004) den Abbau von mRNAs mit einem falschen, frühreifen Stop-Codon

bewirken. Dieser Komplex scheint der am häufigsten im Rattenhirn vorkommende Barentsz-Komplex zu sein, da ich diesen Komplex aus dem Pool 1 einer Gelfiltration, bei dem Barentsz ein Maximum aufweist, immunfällen konnte (Daten nicht gezeigt). Dafür spricht auch die effiziente Depletion beider Proteine durch aufeinanderfolgende Immunpräzipitationen mit anti-Barentsz Antikörpern. Der zweite Komplex bestehend aus Barentsz, KHC sowie Staufen scheint auf Grund der Daten in *Drosophila* und der Ratte für die Lokalisierung von mRNAs in verschiedenen Organismen verantwortlich zu sein. In *Drosophila melanogaster* ist dieser konservierte Komplex bei der Lokalisierung von *oskar* mRNA an den posterioren Pol der Oocyte, in Säugern bei der Lokalisierung von bisher unidentifizierten mRNAs in die Dendriten von hippocampalen Neuronen beteiligt. Letzterer Prozeß sollte in allen Entwicklungsphasen der Ratte auftreten, was auch im Einklang mit meinen Daten steht: der Barentsz/KHC-Komplex ist im embryonalen wie auch im adulten Rattenhirn vorhanden (Abbildungen 19 A und 21 A). Bisher ist nur sehr wenig über die Regulation des mRNA-Transports in Säuger-Neuronen bekannt. Interessanterweise kommt es durch die Dephosphorylierung von Barentsz zu einer verstärkten Assoziation von Barentsz mit KHC (Abbildung 23 B). Andererseits wurde vor kurzem gezeigt, daß Staufen1 mit der Protein-Phosphatase 1 $\alpha$  interagiert (Monshausen *et al.*, 2001). Auf Grund dieser Daten könnte der mRNA-Transport nach dem folgenden Modell ablaufen. Nach der Ausbildung eines Ribonucleoprotein-Partikels mit Staufen, weiteren RNA-Bindeproteinen sowie Barentsz bindet die Protein-Phosphatase 1 $\alpha$  an Staufen1. Die Dephosphorylierung von Barentsz durch die Protein-Phosphatase 1 $\alpha$  bewirkt die Assoziation von KHC an diesen Komplex und anschließend könnte der Transport der mRNPs in die Dendriten erfolgen. In diesem Zusammenhang wäre es interessant herauszufinden, welcher phosphorylierter Aminosäure-Rest von Barentsz die Interaktion mit KHC verhindert und ob Barentsz tatsächlich ein Substrat der Protein-Phosphatase 1 $\alpha$  darstellt. Im Gegensatz zum Komplex mit KHC existiert der Barentsz/KIF-150-Komplex nur im embryonalen Rattenhirn (Abbildung 21), was auf eine spezielle Funktion dieses Komplexes in einer frühen Entwicklungsphase spekulieren läßt. Um diesen Komplex jedoch weiter untersuchen zu können, muß zunächst einmal die molekulare Identität des KIF-150 bestimmt werden.

## 6. Literaturverzeichnis:

- Arn, E.A., Cha, B.J., Theurkauf, W.E. und 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.
- Bashirullah, A., Cooperstock, R.L. and Lipshitz, H.D. (1998) RNA localization in development. *Annual Review Of Biochemistry* **67**, 335-394.
- Bensadoun, A. und Weinstein, D. (1976) Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal. Biochem.* **70**, 241-250.
- Berleth, T., Burri, M., Thoma, G., Bopp, D., Richstein, S., Frigerio, G., Noll, M. und Nusslein-Volhard, C. (1988) The role of localization of bicoid RNA in organizing the anterior pattern of the Drosophila embryo. *Embo J.* **7**, 1749-1756.
- Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P.G., Gianazza, E., Gorg, A., Westermeier, R. und Postel, W. (1982) Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J. Biochem. Biophys. Methods* **6**, 317-339.
- Bohl, F., Kruse, C., Frank, A., Ferring, D. und Jansen, R.P. (2000) She2p, a novel RNA-binding protein tethers ASH1 mRNA to the Myo4p myosin motor via She3p. *Embo J.* **19**, 5514-5524.
- Brendel, C., Rehbein, M., Kreienkamp, H.J., Buck, F., Richter, D. und Kindler, S. (2004) Characterization of Staufen 1 ribonucleoprotein complexes. *Biochem. J.* **Pt.**
- Brendza, R.P., Serbus, L.R., Duffy, J.B. und Saxton, W.M. (2000) A function for kinesin I in the posterior transport of oskar mRNA and Staufen protein. *Science* **289**, 2120-2122.
- Capri, M., Santoni, M.J., Thomas-Delaage, M. und Ait-Ahmed, O. (1997) Implication of a 5' coding sequence in targeting maternal mRNA to the Drosophila oocyte. *Mech. Dev.* **68**, 91-100.
- Carson, J.H., Worboys, K., Ainger, K. und Barbarese, E. (1997) Translocation of myelin basic protein mRNA in oligodendrocytes requires microtubules and kinesin. *Cell. Motil. Cytoskeleton* **38**, 318-328.
- Ceman, S., Brown, V. und Warren, S.T. (1999) Isolation of an FMRP-associated messenger ribonucleoprotein particle and identification of nucleolin and the fragile X-related proteins as components of the complex. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 7925-7932.
- Cha, B.J., Serbus, L.R., Koppetsch, B.S. und Theurkauf, W.E. (2002) Kinesin I-dependent cortical exclusion restricts pole plasm to the oocyte posterior. *Nat. Cell Biol.* **4**, 592-598.
- Chartrand, P., Meng, X.H., Singer, R.H. und Long, R.M. (1999) Structural elements required for the localization of ASH1 mRNA and of a green fluorescent protein reporter particle in vivo. *Curr. Biol.* **9**, 333-336.
- Chartrand, P., Singer, R.H. und Long, R.M. (2001) RNP localization and transport in yeast. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**, 297-310.
- Cho, Y.S., Chennathukuzhi, V.M., Handel, M.A., Eppig, J. und Hecht, N.B. (2004) The Relative Levels of Translin-associated Factor X (TRAX) and Testis Brain RNA-binding Protein Determine Their Nucleocytoplasmic Distribution in Male Germ Cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 31514-31523.

- Clark, I., Giniger, E., Ruohola-Baker, H., Jan, L.Y. und Jan, Y.N. (1994) Transient posterior localization of a kinesin fusion protein reflects anteroposterior polarity of the *Drosophila* oocyte. *Curr. Biol.* **4**, 289-300.
- Degot, S., Regnier, C.H., Wendling, C., Chenard, M.P., Rio, M.C. und Tomasetto, C. (2002) Metastatic Lymph Node 51, a novel nucleo-cytoplasmic protein overexpressed in breast cancer. *Oncogene* **21**, 4422-4434.
- Deshler, J.O., Highett, M.I., Abramson, T. und Schnapp, B.J. (1998) A highly conserved RNA-binding protein for cytoplasmic mRNA localization in vertebrates. *Curr. Biol.* **8**, 489-496.
- Deshler, J.O., Highett, M.I. und Schnapp, B.J. (1997) Localization of *Xenopus* Vg1 mRNA by Vera protein and the endoplasmic reticulum. *Science* **276**, 1128-1131.
- Ding, D., Parkhurst, S.M., Halsell, S.R. und Lipshitz, H.D. (1993) Dynamic Hsp83 RNA localization during *Drosophila* oogenesis and embryogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 3773-3781.
- Driever, W. (1993) Maternal control of anterior development in the *Drosophila* embryo. In the development of *Drosophila melanogaster*. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*, **1**, 301-324.
- Duchaine, T., Wang, H.J., Luo, M., Steinberg, S.V., Nabi, I.R. und DesGroseillers, L. (2000) A novel murine Staufen isoform modulates the RNA content of Staufen complexes. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 5592-5601.
- Duchaine, T.F., Hemraj, I., Furic, L., Deitinghoff, A., Kiebler, M.A. und DesGroseillers, L. (2002) Staufen2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles. *J. Cell Sci.* **115**, 3285-3295.
- Duncan, J.E. und Warrior, R. (2002) The cytoplasmic dynein and kinesin motors have interdependent roles in patterning the *Drosophila* oocyte. *Curr. Biol.* **12**, 1982-1991.
- Ephrussi, A., Dickinson, L.K. und Lehmann, R. (1991) Oskar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant nanos. *Cell* **66**, 37-50.
- Ephrussi, A. und Lehmann, R. (1992) Induction of germ cell formation by oskar. *Nature* **358**, 387-392.
- Erdelyi, M., Michon, A.M., Guichet, A., Glotzer, J.B. und Ephrussi, A. (1995) Requirement for *Drosophila* cytoplasmic tropomyosin in oskar mRNA localization. *Nature* **377**, 524-527.
- Fagotto, F., Jho, E., Zeng, L., Kurth, T., Joos, T., Kaufmann, C. und Costantini, F. (1999) Domains of axin involved in protein-protein interactions, Wnt pathway inhibition, and intracellular localization. *J. Cell Biol.* **145**, 741-756.
- Ferrandon, D., Koch, I., Westhof, E. und Nüsslein-Volhard, C. (1997) RNA-RNA interaction is required for the formation of specific bicoid mRNA 3' UTR-STAU-FEN ribonucleoprotein particles. *Embo J.* **16**, 1751-1758.
- Garner, C.C., Tucker, R.P. und Matus, A. (1988) Selective localization of messenger RNA for cytoskeletal protein MAP2 in dendrites. *Nature* **336**, 674-677.
- Gavis, E.R. und Lehmann, R. (1992) Localization of nanos RNA controls embryonic polarity. *Cell* **71**, 301-313.

- Ginisty, H., Sicard, H., Roger, B. und Bouvet, P. (1999) Structure and functions of nucleolin. *J. Cell Sci.* **112** ( Pt 6), 761-772.
- Glotzer, J.B., Saffrich, R., Glotzer, M. und Ephrussi, A. (1997) Cytoplasmic flows localize injected oskar RNA in Drosophila oocytes. *Curr. Biol.* **7**, 326-337.
- Goelet, P., Castellucci, V.F., Schacher, S. und Kandel, E.R. (1986) The long and the short of long-term memory--a molecular framework. *Nature* **322**, 419-422.
- Gonzalez, I., Buonomo, S.B., Nasmyth, K. und von Ahsen, U. (1999) ASH1 mRNA localization in yeast involves multiple secondary structural elements and Ash1 protein translation. *Curr. Biol.* **9**, 337-340.
- Gupta, A.K., Drazba, J.A. und Banerjee, A.K. (1998) Specific interaction of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particle U with the leader RNA sequence of vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* **72**, 8532-8540.
- Havin, L., Git, A., Elisha, Z., Oberman, F., Yaniv, K., Schwartz, S.P., Standart, N. und Yisraeli, J.K. (1998) RNA-binding protein conserved in both microtubule- and microfilament-based RNA localization. *Genes Dev.* **12**, 1593-1598.
- Hoek, K.S., Kidd, G.J., Carson, J.H. und Smith, R. (1998) hnRNP A2 selectively binds the cytoplasmic transport sequence of myelin basic protein mRNA. *Biochemistry* **37**, 7021-7029.
- Ingold, A., Cohn, S. und Scholey, J. (1988) Inhibition of kinesin-driven microtubule motility by monoclonal antibodies to kinesin heavy chains. *J. Cell Biol.* **107**, 2657-2667.
- Jansen, R.P. (2001) mRNA localization: message on the move. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 247-256.
- Januschke, J., Gervais, L., Dass, S., Kaltschmidt, J.A., Lopez-Schier, H., St Johnston, D., Brand, A.H., Roth, S. und Guichet, A. (2002) Polar transport in the Drosophila oocyte requires Dynein and Kinesin I cooperation. *Curr. Biol.* **12**, 1971-1981.
- Jeffery, W.R., Tomlinson, C.R. und Brodeur, R.D. (1983) Localization of actin messenger RNA during early ascidian development. *Dev. Biol.* **99**, 408-417.
- Kanai, Y., Dohmae, N. und Hirokawa, N. (2004) Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* **43**, 513-525.
- Kiebler, M.A., Hemraj, I., Verkade, P., Köhrmann, M., Fortes, P., Marion, R.M., Ortin, J. and Dotti, C.G. (1999) The mammalian stau protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport. *J. Neurosci.* **19**, 288-297.
- Kiebler, M.A. und DesGroseillers, L. (2000) Molecular insights into mRNA transport and local translation in the mammalian nervous system. *Neuron* **25**, 19-28.
- Kim-Ha, J., Smith, J.L. und Macdonald, P.M. (1991) oskar mRNA is localized to the posterior pole of the Drosophila oocyte. *Cell* **66**, 23-35.
- King, S.M., Barbarese, E., Dillman, J.F., III, Patel-King, R.S., Carson, J.H. und Pfister, K.K. (1996) Brain Cytoplasmic and Flagellar Outer Arm Dyneins Share a Highly Conserved Mr 8,000Light Chain. *J. Biol. Chem.* **271**, 19358-19366.

- Kislauskis, E.H., Zhu, X. und Singer, R.H. (1994) Sequences responsible for intracellular localization of beta-actin messenger RNA also affect cell phenotype. *J. Cell Biol.* **127**, 441-451.
- Köhrmann, M., Luo, M., Kaether, C., DesGroseillers, L., Dotti, C.G. und 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.
- Krichevsky, A.M. und Kosik, K.S. (2001) Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation-dependent translation. *Neuron* **32**, 683-696.
- Kuhl, D. and Skehel, P. (1998) Dendritic localization of mRNAs. *Curr. Opin. Neurobiol.* **8**, 600-606.
- Lasko, P. (1999) RNA sorting in Drosophila oocytes and embryos. *Faseb J.* **13**, 421-433.
- Li, Q., Imataka, H., Morino, S., Rogers, G.W., Jr., Richter-Cook, N.J., Merrick, W.C. und Sonenberg, N. (1999) Eukaryotic translation initiation factor 4AIII (eIF4AIII) is functionally distinct from eIF4AI and eIF4AII. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 7336-7346.
- Liu, G., Grant, W.M., Persky, D., Latham, V.M., Jr., Singer, R.H. und Condeelis, J. (2002) Interactions of elongation factor 1alpha with F-actin and beta-actin mRNA: implications for anchoring mRNA in cell protrusions. *Mol. Biol. Cell* **13**, 579-592.
- Long, R.M., Singer, R.H., Meng, X., Gonzalez, I., Nasmyth, K. and Jansen, R.P. (1997) Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of ASH1 mRNA. *Science* **277**, 383-387.
- Long, R.M., Gu, W., Lorimer, E., Singer, R.H. und Chartrand, P. (2000) She2p is a novel RNA-binding protein that recruits the Myo4p-She3p complex to ASH1 mRNA. *Embo J.* **19**, 6592-6601.
- Macchi, P., Brownawell, A.M., Grunewald, B., DesGroseillers, L., Macara, I.G. und Kiebler, M.A. (2004) The Brain-specific Double-stranded RNA-binding Protein Staufen2: Nucleolar accumulation and isoform-specific exportin-5-dependent export. *J. Biol. Chem.* **279**, 31440-31444.
- Macchi, P., Kröning, S., Palacios, I.M., Baldassa, S., Grunewald, B., Ambrosino, C., Götz, B., Lupas, A., St Johnston, D. und Kiebler, M. (2003) Barentsz, a new component of the Staufen-containing ribonucleoprotein particles in mammalian cells, interacts with Staufen in an RNA-dependent manner. *J. Neurosci* **23**, 5778-5788.
- Macdonald, P., Kerr, K., Smith, J. und Leask, A. (1993) RNA regulatory element BLE1 directs the early steps of bicoid mRNA localization. *Development* **118**, 1233-1243.
- Mallardo, M., Deitinghoff, A., Muller, J., Goetze, B., Macchi, P., Peters, C. und Kiebler, M.A. (2003) Isolation and characterization of Staufen-containing ribonucleoprotein particles from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **100**, 2100-2105.
- Marion, R.M., Fortes, P., Beloso, A., Dotti, C. und Ortin, J. (1999) A human sequence homologue of Staufen is an RNA-binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2212-2219.
- Martin, S.G., Leclerc, V., Smith-Litiere, K. und St Johnston, D. (2003) The identification of novel genes required for Drosophila anteroposterior axis formation in a germline clone screen using GFP-Staufen. *Development* **130**, 4201-4215.

- Micklem, D.R., Adams, J., Grunert, S. und St Johnston, D. (2000) Distinct roles of two conserved Staufen domains in oskar mRNA localization and translation. *Embo J.* **19**, 1366-1377.
- Miki, H., Setou, M., Kaneshiro, K. und Hirokawa, N. (2001) All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**, 7004-7011.
- Mingot, J.M., Bohnsack, M.T., Jakle, U. und Gorlich, D. (2004) Exportin 7 defines a novel general nuclear export pathway. *Embo J.* **23**, 3227-3236.
- Mohr, S.E., Dillon, S.T. und Boswell, R.E. (2001) The RNA-binding protein Tsunagi interacts with Mago Nashi to establish polarity and localize oskar mRNA during *Drosophila* oogenesis. *Genes Dev.* **15**, 2886-2899.
- Monshausen, M., Putz, U., Rehbein, M., Schweizer, M., DesGroseillers, L., Kuhl, D., Richter, D. und Kindler, S. (2001) Two rat brain staufen isoforms differentially bind RNA. *J. Neurochem.* **76**, 155-165.
- Monshausen, M., Rehbein, M., Richter, D. und Kindler, S. (2002) The RNA-binding protein Staufen from rat brain interacts with protein phosphatase-1. *J. Neurochem.* **81**, 557-564.
- Mowry, K.L. und Melton, D.A. (1992) Vegetal messenger RNA localization directed by a 340-nt RNA sequence element in *Xenopus* oocytes. *Science* **255**, 991-994.
- Newmark, P.A. und Boswell, R.E. (1994) The mago nashi locus encodes an essential product required for germ plasm assembly in *Drosophila*. *Development* **120**, 1303-1313.
- Norvell, A., Kelley, R.L., Wehr, K. und Schupbach, T. (1999) Specific isoforms of squid, a *Drosophila* hnRNP, perform distinct roles in *Gurken* localization during oogenesis. *Genes Dev.* **13**, 864-876.
- O'Farrell, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-4021.
- Ohashi, S., Kobayashi, S., Omori, A., Ohara, S., Omae, A., Muramatsu, T., Li, Y. und Anzai, K. (2000) The single-stranded DNA- and RNA-binding proteins pur alpha and pur beta link BC1 RNA to microtubules through binding to the dendrite-targeting RNA motifs. *J. Neurochem.* **75**, 1781-1790.
- Ohashi, S., Koike, K., Omori, A., Ichinose, S., Ohara, S., Kobayashi, S., Sato, T.A. und 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.
- Okabe, T., Nakamura, T., Nishimura, Y.N., Kohu, K., Ohwada, S., Morishita, Y. und Akiyama, T. (2003) RICS, a novel GTPase-activating protein for Cdc42 and Rac1, is involved in the beta-catenin-N-cadherin and N-methyl-D-aspartate receptor signaling. *J. Biol. Chem.* **278**, 9920-9927.
- Oleynikov, Y. und Singer, R.H. (1998) RNA localization: different zipcodes, same postman? *Trends Cell Biol.* **8**, 381-383.
- Oleynikov, Y. und Singer, R.H. (2003) Real-time visualization of ZBP1 association with beta-actin mRNA during transcription and localization. *Curr. Biol.* **13**, 199-207.

- Palacios, I.M., Gatfield, D., St Johnston, D. und Izaurralde, E. (2004) An eIF4AIII-containing complex required for mRNA localization and nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* **427**, 753-757.
- Palacios, I.M. und St Johnston, D. (2002) Kinesin light chain-independent function of the Kinesin heavy chain in cytoplasmic streaming and posterior localisation in the *Drosophila* oocyte. *Development* **129**, 5473-5485.
- Ramos, A., Grunert, S., Adams, J., Micklem, D.R., Proctor, M.R., Freund, S., Bycroft, M., St Johnston, D. und Varani, G. (2000) RNA recognition by a Staufen double-stranded RNA-binding domain. *Embo J.* **19**, 997-1009.
- Roegiers, F. und Jan, Y.N. (2000) Staufen: a common component of mRNA transport in oocytes and neurons? *Trends in Cell Biology* **10**, 220-224.
- Rook, M.S., Lu, M. und Kosik, K.S. (2000) CaMKIIalpha 3' untranslated region-directed mRNA translocation in living neurons: visualization by GFP linkage. *J. Neurosci.* **20**, 6385-6393.
- Ross, A.F., Oleynikov, Y., Kislauskis, E.H., Taneja, K.L. und Singer, R.H. (1997) Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2158-2165.
- Saunders, C. und Cohen, R.S. (1999) The role of oocyte transcription, the 5'UTR, and translation repression and derepression in *Drosophila* gurken mRNA and protein localization. *Mol. Cell* **3**, 43-54.
- Sawin, K.E., Mitchison, T.J. und Wordeman, L.G. (1992) Evidence for kinesin-related proteins in the mitotic apparatus using peptide antibodies. *J. Cell Sci.* **101 ( Pt 2)**, 303-313.
- Schnapp, B.J. (1999) A glimpse of the machinery. *Curr. Biol.* **9**, R725-727.
- Schnorrer, F., Bohmann, K. und Nusslein-Volhard, C. (2000) The molecular motor dynein is involved in targeting swallow and bicoid RNA to the anterior pole of *Drosophila* oocytes. *Nat. Cell Biol.* **2**, 185-190.
- Serano, T.L. und Cohen, R.S. (1995) A small predicted stem-loop structure mediates oocyte localization of *Drosophila* K10 mRNA. *Development* **121**, 3809-3818.
- Severt, W.L., Biber, T.U., Wu, X., Hecht, N.B., DeLorenzo, R.J. und Jakoi, E.R. (1999) The suppression of testis-brain RNA binding protein and kinesin heavy chain disrupts mRNA sorting in dendrites. *J. Cell Sci.* **112 ( Pt 21)**, 3691-3702.
- Shepard, K.A., Gerber, A.P., Jambhekar, A., Takizawa, P.A., Brown, P.O., Herschlag, D., DeRisi, J.L. und Vale, R.D. (2003) Widespread cytoplasmic mRNA transport in yeast: identification of 22 bud-localized transcripts using DNA microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **100**, 11429-11434.
- Smith, J.L., Wilson, J.E. und Macdonald, P.M. (1992) Overexpression of oskar directs ectopic activation of nanos and presumptive pole cell formation in *Drosophila* embryos. *Cell* **70**, 849-859.
- Smith, W.B., Aakalu, G. und Schuman, E.M. (2001) Local protein synthesis in neurons. *Curr. Biol.* **11**, R901-903.

- St Johnston, D., Beuchle, D. und Nusslein-Volhard, C. (1991) Staufen, a gene required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg. *Cell* **66**, 51-63.
- St Johnston, D., Brown, N.H., Gall, J.G. und Jantsch, M. (1992) A conserved double-stranded RNA-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **89**, 10979-10983.
- St Johnston, D., Driever, W., Berleth, T., Richstein, S. und Nusslein-Volhard, C. (1989) Multiple steps in the localization of bicoid RNA to the anterior pole of the *Drosophila* oocyte. *Development* **107 Suppl**, 13-19.
- Steward, O. und Schuman, E.M. (2001) Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 299-325.
- Takizawa, P.A., Sil, A., Swedlow, J.R., Herskowitz, I. und Vale, R.D. (1997) Actin-dependent localization of an RNA encoding a cell-fate determinant in yeast. *Nature* **389**, 90-93.
- Tang, S.J., Meulemans, D., Vazquez, L., Colaco, N. und Schuman, E. (2001) A role for a rat homolog of staufen in the transport of RNA to neuronal dendrites. *Neuron* **32**, 463-475.
- Tekotte, H. und Davis, I. (2002) Intracellular mRNA localization: motors move messages. *Trends Genet.* **18**, 636-642.
- Tetzlaff, M.T., Jackle, H. and Pankratz, M.J. (1996) Lack of *Drosophila* cytoskeletal tropomyosin affects head morphogenesis and the accumulation of oskar mRNA required for germ cell formation. *Embo J.* **15**, 1247-1254.
- Thio, G.L., Ray, R.P., Barcelo, G. und Schupbach, T. (2000) Localization of gurken RNA in *Drosophila* oogenesis requires elements in the 5' and 3' regions of the transcript. *Dev. Biol.* **221**, 435-446.
- Tiedge, H., Freneau, R., Jr, Weinstock, P., Arancio, O. und Brosius, J. (1991) Dendritic Location of Neural BC1 RNA. *PNAS* **88**, 2093-2097.
- Tiedge, H., Chen, W. und Brosius, J. (1993) Primary structure, neural-specific expression, and dendritic location of human BC200 RNA. *J. Neurosci.* **13**, 2382-2390.
- Tiedge, H., Bloom, F.E. und Richter, D. (1999) RNA, whither goest thou? *Science* **283**, 186-187.
- van Eeden, F.J., Palacios, I.M., Petronczki, M., Weston, M.J. und 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. und 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.
- Wickham, L., Duchaine, T., Luo, M., Nabi, I.R. und 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., Mansfield, J., Hom-Booher, N., Wang, S., Turck, C.W., Hazelrigg, T. und Vale, R.D. (2000) Isolation of a ribonucleoprotein complex involved in mRNA localization in *Drosophila* oocytes. *J. Cell Biol.* **148**, 427-440.
- Wilhelm, J.E. und Vale, R.D. (1993) RNA on the move: the mRNA localization pathway. *J. Cell Biol.* **123**, 269-274.

- Wilkie, G.S. und Davis, I. (2001) *Drosophila* wingless and pair-rule transcripts localize apically by dynein-mediated transport of RNA particles. *Cell* **105**, 209-219.
- Wu, X.Q. und Hecht, N.B. (2000) Mouse testis brain ribonucleic acid-binding protein/translin colocalizes with microtubules and is immunoprecipitated with messenger ribonucleic acids encoding myelin basic protein, alpha calmodulin kinase II, and protamines 1 and 2. *Biol. Reprod.* **62**, 720-725.
- Zalfa, F., Giorgi, M., Primerano, B., Moro, A., Di Penta, A., Reis, S., Oostra, B. und Bagni, C. (2003) The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses. *Cell* **112**, 317-327.

## **Lebenslauf**

Sven Kröning  
Ursrainer Ring 103  
72076 Tübingen

07.10.1974 geboren in Reutlingen

### **Schulischer Werdegang**

1981 – 1985 Hoffmannschule (GS) in Betzingen  
1985 – 1994 Albert-Einstein-Gymnasium in Reutlingen, Abitur

### **Wehrdienst**

1994 – 1995 Generaloberst-von-Fritsch-Kaserne in Pfullendorf

### **Studium**

1995 – 1999 Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
1999 – 2000 Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München (im Rahmen des Biochemie-Studiums der Universität Tübingen)  
2000 – 2001 Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen; Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie in Tübingen mit dem Thema „Identifizierung und Charakterisierung von Barentsz in Säugerzellen“  
2001 – 2004 Anfertigung der Dissertation am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie in Tübingen unter der Anleitung von Herrn PD Dr. Michael A. Kiebler (Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie) und Frau Prof. Dr. Gabriele Dodt (Eberhard-Karls-Universität Tübingen) mit dem Thema „Barentsz – Bestandteil eines konservierten Ribonucleoprotein-Komplexes aus dem Rattenhirn“  
Dezember 2004 Abschluß der Dissertation mit der mündlichen Prüfung  
2002 – 2004 Stipendiat der Claussen-Simon-Stiftung

## **Auflistung der akademischen Lehrer**

Herr Prof. Dr. K. Albert

Herr Prof. Dr. H. Bisswanger

Herr Prof. Dr. K. W. Bock

Frau Prof. Dr. U. Breyer-Pfaff

Frau Prof. Dr. G. Dodt

Herr Prof. Dr. R. Dringen

Herr Prof. Dr. K. Eisele

Herr Prof. Dr. G. Gauglitz

Herr Prof. Dr. H. Hagenmaier

Herr Prof. Dr. B. Hamprecht

Herr Prof. Dr. G. Jung

Herr PD Dr. M. Kiebler

Herr Prof. Dr. Lindner

Herr Prof. Dr. D. Mecke

Herr PD Dr. P. A. Münzel

Herr Prof. Dr. Nagel

Herr PD Dr. W. Neubert

Herr Prof. Dr. Pfeiffer

Herr Prof. Dr. H. Probst

Herr Prof. Dr. K. Reutter

Herr Prof. Dr. M. Schwarz

Herr Prof. Dr. W. Voelter

Herr Prof. Dr. Wegmann

Herr Prof. Dr. J. Werringloer

Herr Prof. Dr. U. Weser

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Dr. Michael A. Kiebler am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie in Tübingen angefertigt. Herrn Dr. Kiebler danke ich für seine Diskussionsbereitschaft und die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen.

Frau Prof. Dr. Gabriele Dodt danke ich für die Betreuung dieser Doktorarbeit.

Bei Herrn Dr. Paolo Macchi bedanke ich mich für die Zusammenarbeit bei der Veröffentlichung im *Journal of Neuroscience* sowie für die Bereitstellung mehrerer Plasmide.

Barbara Grunewald, Sabine Thomas und Bernhard Götze danke ich für die Bereitstellung der zahlreichen embryonalen Gehirne.

Bei Dr. Christoph Turck möchte ich mich für die Durchführung der Sequenzanalyse durch Massenspektrometrie bedanken.

Ein herzlicher Dank geht an Dr. Pratik Jagtap, der mich bei der Durchführung des 2D-Gelelektrophorese unterstützte.

Bei allen Mitgliedern und Gastwissenschaftlern der Arbeitsgruppe möchte ich mich für die freundliche Arbeitsatmosphäre, die kollegiale Zusammenarbeit sowie die vielen wissenschaftlichen Anregungen bedanken.

Diese Dissertation wurde durch ein Stipendium der Claussen-Simon-Stiftung finanziell unterstützt.

Meinen Eltern und Simone Kröning danke ich für ihre stetige Unterstützung während dieser Arbeit.