

Isolierung und Charakterisierung von Stufen-enthaltenden Ribonucleoprotein-Komplexen aus Rattenhirn

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

der Fakultät für Biologie
der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

vorgelegt

von

Anke Kerstin Deitinghoff, geb. Voß
aus Hürth-Hermülheim

2003

Tag der mündlichen Prüfung: 27.05.2003

Dekan: Prof. Dr. H. U. Schnitzler

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Bonhoeffer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Ammermann

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	5
1.1 Die Lokalisierung von RNA in polarisierten Zellen _____	6
1.2 Die Transportsignale in der RNA (<i>cis</i> -agierende Elemente) _____	9
1.3 Die am Transport beteiligten Proteine (<i>trans</i> -agierende Faktoren) _____	11
1.4 Die Lokalisierung von RNAs in Neuronen _____	14
1.5 Das Staufen Protein _____	17
2. Aufgabenstellung.....	20
3. Ergebnisse.....	21
3.1 Herstellung und Charakterisierung spezifischer anti-Staufen Antikörper _____	21
3.1.1 Polyklonale Antikörper aus Mäusen	21
3.1.2 Polyklonale Antikörper aus Kaninchen	30
3.2 Charakterisierung der zellulären Verteilung der Staufen Proteine _____	35
3.3 Isolierung löslicher Staufen Komplexe aus Rattenhirn _____	44
3.4 Charakterisierung der Staufen Partikel _____	50
3.5 Interaktion von Staufen und RNA in den isolierten Partikeln _____	52
3.6 Visualisierung der Partikel mittels EM _____	62
3.7 Weitere Reinigung der Staufen Komplexe mittels Dichtegradientenzentrifugation __	65
3.8 Analyse der teilweise zerfallenen Staufen-Transportpartikel _____	69
4. Diskussion	72
4.1 Spezifität der Staufen Antikörper _____	72
4.2 Die zelluläre Verteilung der Staufen Proteine _____	79
4.3 Isolierung und Charakterisierung löslicher Staufen Komplexe _____	82
4.4 Interaktion von Staufen und RNA _____	83
4.5 Visualisierung der Staufen1 Partikel _____	89
5. Zusammenfassung	90
6. Material und Methoden	92
6.1 Material _____	92
6.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	92
6.1.2 Enzyme.....	95
6.1.3 Antikörper	95
6.1.3.1 Primärantikörper.....	95
6.1.3.2 Sekundärantikörper.....	97
6.1.4 Plasmide zur Herstellung der bakteriell exprimierten Antigene.....	98
6.1.5 Oligonucleotide (Primer)	98
6.1.6 Geräte.....	99
6.1.7 Tiere	100
6.1.8 Bakterien.....	101

Inhaltsverzeichnis

6.1.9 Säugerzellen.....	101
6.1.10 Puffer und Lösungen.....	101
6.1.10.1 für die bakterielle Expression von Proteinen.....	101
6.1.10.2 für die Zellbiologie.....	102
6.1.10.3 für die Analyse von Proteinen.....	103
6.1.10.4 für die Zell- und Gewebeextraktion.....	105
6.1.10.5 für die Gelfiltrations-Chromatographie.....	105
6.1.10.6 für die Analyse von RNA.....	105
6.2 Methoden.....	106
6.2.1 Methoden zur Herstellung von bakteriell exprimiertem Antigen.....	106
6.2.1.2 Expression der Proteine.....	106
6.2.1.3 Aufreinigung mittels Ni-NTA Agarose.....	106
6.2.1.4 Aufreinigung mittels Sepharose.....	107
6.2.1.5 Vorbereitung des Antigens zur Injektion.....	107
6.2.2 Gewinnung von polyklonalen Antikörpern.....	107
6.2.2.1 Immunsierung der Mäuse.....	107
6.2.2.2 Immunisierung der Kaninchen.....	108
6.2.2.3 Aufarbeitung des Serums.....	108
6.2.3 Zellbiologische Methoden.....	108
6.2.3.1 Transfektion von Säugerzellen.....	108
6.2.3.2 Immunfluoreszenzfärbung.....	109
6.2.4 Methoden zur Analyse von Proteinen.....	109
6.2.4.1 Protein-Bestimmung nach Bradford.....	109
6.2.4.2 Proteinfällung mit Trichloressigsäure.....	110
6.2.4.3 Chloroform/Methanol-Extraktion.....	110
6.2.4.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	111
6.2.4.5 Western-Blotting.....	111
6.2.4.6 Silberfärbung von Proteinen.....	112
6.2.5 Methoden zur Isolierung von Proteinen.....	112
6.2.5.1 Herstellung von Zellextrakten.....	112
6.2.5.2 Herstellung von Hirnextrakten.....	113
6.2.5.3 Differentielle Zentrifugation.....	113
6.2.5.4 Gelfiltrations-Chromatographie.....	113
6.2.5.5 Dichtegradientenzentrifugation.....	114
6.2.6 Methoden zur Analyse von RNA.....	115
6.2.6.1 RNase-Behandlung.....	115
6.2.6.2 DNase-Behandlung.....	115
6.2.6.3 Extraktion von RNA aus Fraktionen der Gelfiltration.....	115
6.2.6.4 Überschreiben von RNA in cDNA mittels Reverser Transkriptase.....	116
6.2.6.5 Polymerase Kettenreaktion.....	116
7. Literaturverzeichnis.....	118
Anhang.....	127
Verzeichnis der Abkürzungen.....	127
Die Sequenzen der zur Herstellung der Antigene verwendeten Plasmide.....	129
Danksagung.....	130
Lebenslauf.....	131

1. Einleitung

Der Transport spezifischer Ribonucleinsäuren (RNA, von *ribonucleic acid*) in bestimmte Bereiche einer eukaryotischen Zelle ist ein weit verbreiteter Mechanismus, welcher in einer Vielzahl von Organismen, von der Hefe bis zu Säugerzellen, beobachtet werden kann. Die Lokalisierung der Boten-RNA (mRNA, von *messenger-RNA*) ermöglicht durch lokale Translation eine präzise Beschränkung einzelner Proteine auf subzelluläre Bereiche. Dies ist ein erster Schritt zur Polarisierung von Zellen. Durch die lokale Translation ist es zum einen möglich, aus wenigen zuvor lokalisierten mRNA-Molekülen in kurzer Zeit große Mengen eines Proteins anzureichern. Dadurch kann die Zelle, unter der Voraussetzung einer effizienten Translationskontrolle, sehr spezifisch auf Initiationsreize reagieren. Zum anderen wird die Synthese bestimmter Proteine auf den intrazellulären Bereich, in dem sie ihre Funktion erfüllen, beschränkt und so eine nicht erwünschte Wirkung ausgeschlossen.

Besonders ausführlich wurde der Transportmechanismus in der Oocyte untersucht und beschrieben. Hier bildet die asymmetrische Verteilung von Proteinen, welche die Differenzierung der Zellen und damit die Ausbildung einzelner Gewebe bestimmen, die Voraussetzung für die embryonale Entwicklung (Bashirullah *et al.*, 1998; King *et al.*, 1999; Lasko *et al.*, 1999; Mowry *et al.*, 1999). Auch somatische Zellen nutzen die Lokalisierung spezifischer mRNAs, um während der Differenzierungsphase Polarität herzustellen und diese anschließend aufrecht zu erhalten (Singer *et al.*, 1996; Steward *et al.*, 1997; Carson *et al.*, 1998; Kuhl *et al.*, 1998; Bassell *et al.*, 1999; Mohr *et al.*, 1999).

Bislang sind etwa siebzig verschiedene mRNAs und weitere nicht-codierende RNAs mit oft unbekannter Funktion identifiziert, welche in verschiedenen Zelltypen transportiert werden (Bashirullah *et al.*, 1998). Der komplexe Mechanismus der RNA-Lokalisierung beinhaltet mehrere Einzelschritte. Zuerst muß die mRNA, welche transportiert werden soll, identifiziert werden. Dies geschieht zumindest in einigen Fällen bereits im Zellkern (Hazelrigg *et al.*, 1998; Schnapp *et al.*, 1999). Für die Erkennung sind bestimmte Sequenzen des RNA-Moleküls verantwortlich, die meistens, aber nicht immer in der **3'-untranslatierten Region** (3'-UTR) vorliegen und als *cis*-agierende Elemente bezeichnet werden. Sie bilden die Bindestelle für eine Anzahl von Proteinen, die sogenannten *trans*-agierenden Faktoren, welche anschließend gemeinsam mit weiteren Molekülen den Transport der RNAs an ihren Bestimmungsort vermitteln. Die aus RNA und Proteinen zusammengesetzten **Ribonucleoprotein-** (RNP-) Komplexe werden meistens entlang den Elementen des Cytoskeletts (Mikrofilamente oder

1. Einleitung

Mikrotubuli) transportiert (Bassell *et al.*, 1997, Nasmyth *et al.*, 1997; Arn *et al.*, 1998). An der Zielposition werden die RNAs molekular verankert und unterstehen vermutlich lokaler Translationskontrolle. Ob die Unterdrückung und spezifische Aktivierung der Proteinsynthese bei der mRNA-Lokalisierung in somatischen Zelltypen eine Rolle spielt, ist noch unklar. In Entwicklungssystemen wie der Oogenese und Embryogenese von *Drosophila melanogaster* werden die mRNAs aber erst an ihrem Bestimmungsort translatiert (St. Johnston *et al.*, 1995). Die Aufhebung der Translationsrepression zum richtigen Zeitpunkt ist hierbei entscheidend (Gunkel *et al.*, 1998). Mittlerweile stehen genauere Daten aus unterschiedlichen Systemen zum Lokalisierungsmechanismus der RNA zur Verfügung. Im Folgenden werden die Untersuchungen in den Oocyten der Fruchtfliege und des Krallenfrosches, in der Spalthefe und in polarisierten somatischen Zellen, wie Hühner-Fibroblasten, Maus-Oligodendrocyten und Ratten-Neuronen näher dargestellt.

1.1 Die Lokalisierung von RNA in polarisierten Zellen

mRNAs können über unterschiedliche Mechanismen an ihren Bestimmungsort transportiert werden. Das am Besten untersuchte System ist das der Oocyten- und frühen Embryonalentwicklung der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Während der Oogenese werden etwa 20 verschiedene maternale mRNAs in einem zeitlich und örtlich streng kontrollierten Raster in genau festgelegten Regionen der Zelle lokalisiert. Sie codieren für Transkriptionsfaktoren, Bestandteile des Cytoskeletts, sekretierte Wachstumsfaktoren, RNA-Bindeproteine, Regulationsproteine des Zellzyklus, Transmembranproteine und weitere Proteine bislang unbekannter Funktion (Bashirullah *et al.*, 1998). Die Entwicklung des Oocyten dauert ungefähr 80 Stunden und ist in vierzehn morphologisch unterscheidbare Stadien unterteilt. Zunächst teilt sich im Germarium die oogoniale Stammzelle in eine Tochterstammzelle und den Cytoblasten. Dieser durchläuft vier Mitosezyklen mit unvollständiger Cytokinese. Die so entstandenen sechzehn Zellen sind über Cytoplasmabrücken, welche durch Ringkanäle stabilisiert werden, weiterhin miteinander verbunden. Während sich eine der beiden posterioren Zellen zur Oocyte entwickelt, durchlaufen die übrigen fünfzehn Zellen Kernteilungen und bilden die polyploiden Nährzellen. In ihnen werden im Folgenden die meisten Proteine und mRNAs für die frühe Embryonalentwicklung synthetisiert und zusammen mit Organellen durch die Ringkanäle in die Oocyte eingeschleust (Lasko *et al.*, 1999; Halsell *et al.*, 1995). Das erste Beispiel für eine transportierte mRNA war die des Transkriptionsfaktors Bicoid. Zellen die ihn enthalten

schlagen den anterioren Zellpfad ein. Eine falsche Lokalisierung führt zu einem veränderten Körpermuster. Nach der Transkription des Bicoid Gens in den Nährzellen ist die mRNA vorübergehend an ihrer apikalen Seite konzentriert. Anschließend wird sie durch die Ringkanäle zum anterioren Pol des Oocyten transportiert und liegt zum Ende der Oogenese dicht gepackt am anterioren Cortex vor (Whittaker *et al.*, 1995).

Im Vergleich zur *Drosophila* Oogenese lassen sich in der Oocyte des Krallenfrosches *Xenopus laevis* drei unterschiedliche Lokalisierungsmuster unterscheiden. Während der RNA-Transport zum animalen Pol immer gleich verläuft, erfolgt der in die vegetale Hemisphäre in zwei unterschiedlichen Phasen. In der Frühentwicklung werden mindestens acht RNAs (mRNAs und nicht-codierende Transkripte) innerhalb einer optisch dichten Masse lokalisiert. Diese als mitochondriale Wolke bezeichnete Struktur liegt nahe der vegetalen Seite des germinaler Vesikel genannten Zellkerns und besteht aus Mitochondrien, endoplasmatischem Reticulum (ER), Golgi-Apparat und Elementen des Cytoskeletts. Im weiteren Verlauf der Entwicklung beschränken sich die Transkripte auf einen Unterbereich des ER, welche als METRO (*messenger transport organizer*) bezeichnet wird, um schließlich zum vegetalen Pol transportiert zu werden. Während für die frühe Lokalisierung keine Cytoskelettelemente benötigt werden, beruht der Transport in die animale oder vegetale Hemisphäre im späteren Verlauf auf intakten Mikrotubuli (King *et al.*, 1999). Der Transport der *vegetal pole 1* (Vg1) mRNA zur vegetalen Hemisphäre ist besonders gut untersucht. Vg1 ist ein Wachstumsfaktor, der zur *transforming growth factor* β - (TGF β -) Familie gehört. Im frühen Oocyten ist die Vg1 mRNA gleichmäßig verteilt. Später reichert sie sich keilförmig nahe des germinalen Vesikels an, wird anschließend zum vegetalen Cortex transportiert und dort verankert (Mowry *et al.*, 1999). In Versuchen mit dem nicht-codierenden Transkript Xlsirt (*Xenopus laevis short interspersed repeat transcripts*), welches zu Beginn der Entwicklung transportiert wird, zeigte sich, daß die Injektion von *anti-sense* Oligonucleotiden zu einer vorzeitigen Loslösung der Vg1 mRNA vom vegetalen Cortex führt. Xlsirt RNA könnte somit eine Rolle in der Verankerung lokalisierter mRNAs in späteren Phasen haben. Dies zeigt, daß die Lokalisierungsphasen möglicherweise nicht vollkommen unabhängig voneinander sind (Kloc *et al.*, 1994).

Ein weiteres Modellsystem zur Untersuchung des RNA Transportmechanismus ist die Spalthefe, *Saccharomyces cerevisiae*. Während der Knospung wird der Repressor für den Wechsel des Paarungstyps asymmetrisch im Kern der Tochterzelle lokalisiert. Nach der Expression des ASH1 Gens in der Mutterzelle reichert sich die mRNA des Transkriptionsfaktors Ash1p in Partikeln an, welche entlang des Cytoskeletts in die Knospe der zukünftigen Tochterzelle

1. Einleitung

transportiert werden. Dort wird das ASH1 Transkript dann in einer halbmondförmigen Struktur nahe der Zellmembran verankert (Long *et al.*, 1997).

Der Transport bestimmter mRNAs und die anschließend lokal stattfindende Proteinsynthese könnte auch in somatischen Zellen eine Rolle spielen. In Oligodendrocyten ist die mRNA, welche für das **Myelin-basische-Protein (MBP)** codiert, in der Peripherie der Zellen angereichert. In Primärkulturen von Oligodendrocyten bilden sich nach der Injektion von MBP mRNA Partikel, welche anschließend entlang der Mikrotubuli zu den Ausläufern der Zellen transportiert werden (Ainger *et al.*, 1993). Möglicherweise wird so die Synthese von MBP, welches Membranschichten miteinander verbindet, auf den Zellbereich beschränkt, in dem es seine Funktion erfüllen soll.

In ähnlicher Weise wird in Hühner-Fibroblasten die β -Actin mRNA asymmetrisch in der Spitze der Filopodien lokalisiert. Während die RNA in Suspensionszellen gleichmäßig verteilt vorliegt, bilden sich unmittelbar nach der Übertragung der Zellen auf Kulturplatten Mikrofilamente aus Tubulin, Vimentin und β -Actin. In den distalen Regionen liegt β -Actin mRNA angereichert in partikulären Strukturen vor. Der Transport und die Verankerung der β -Actin mRNA Partikel ist Mikrofilament-abhängig. Es wird angenommen, daß die lokale Translation hier die strukturellen und physiologischen Eigenschaften der *leading edge* bestimmt und somit die Zellbewegung steuert (Sundell *et al.*, 1991).

Auch in Neuronen werden mRNAs und mindestens ein nicht-codierendes Transkript aus dem Soma in die Fortsätze der Zelle transportiert. Während die bekannte Anzahl der dendritisch-lokalisierten RNAs weiter steigt, stellt der RNA-Transport in das Axon wohl eher eine Ausnahme dar (Steward *et al.*, 1997; Kuhl *et al.*, 1998; Mohr *et al.*, 1999). Eine lokale Proteinsynthese, welche weit entfernt vom zentralen Zellkörper stattfindet, ist vermutlich für die Funktion der Nervenzellen und insbesondere die synaptische Plastizität von entscheidender Bedeutung (Feig *et al.*, 1993; Kang *et al.*, 1996). Bereits frühe anatomische Studien zeigten, daß sich in den Dendriten Polyribosomen und rauhes ER (rER) befinden (Gray *et al.*, 1959; Palay *et al.*, 1956), welche eine entscheidende Voraussetzung für lokale Translation sind. Inzwischen wurde auch die Neusynthese von Proteinen in isolierten synaptischen Fragmenten beschrieben (Steward *et al.*, 1997), was ein eindeutiger Beleg dafür ist, daß Dendriten die Möglichkeit zur Proteinsynthese besitzen (Tiedge *et al.*, 1996). Bislang ist aber weder bekannt, welche Moleküle für den RNA-Transport verantwortlich sind, noch wo und wie die spezifischen mRNAs translatiert werden (Schuman *et al.*, 1999; Wells *et al.*, 2000).

1.2 Die Transportsignale in der RNA (*cis*-agierende Elemente)

Das Transportsignal der RNA liegt im Molekül selbst vor. Normalerweise befinden sich diese *cis*-agierenden Elemente, welche auch als *zipcodes* bezeichnet werden, in der 3'-UTR der mRNA (Bashirullah *et al.*, 1998; Hazelrigg *et al.*, 1998). Es können aber auch zusätzliche Signale in der **5'-untranslatierten Region** (5'-UTR) und / oder im Bereich der codierenden Sequenz vorliegen, so zum Beispiel bei einigen mRNAs in der Oocyte von *Drosophila* (Capri *et al.*, 1997; Thio *et al.*, 2000) und in Neuronen (Prakash *et al.*, 1997). Die Lokalisierungs-Elemente bestehen meist aus mehreren hundert Nucleotiden (nt) (Bashirullah *et al.*, 1998), welche oftmals komplizierte Sekundärstrukturen ausbilden. Während die Sequenz sehr unterschiedlich sein kann, ist die Sekundärstruktur zum Teil über Artgrenzen hinweg konserviert, was auf eine funktionelle Bedeutung derselben hindeutet. Ein Beispiel hierfür sind die Lokalisierungs-Elemente in der 3'-UTR der *bicoid* mRNA. Während die Sequenz weit entfernter *Drosophila* Arten nur eine geringe Übereinstimmung zeigt, ist die Sekundärstruktur bemerkenswert ähnlich (Macdonald *et al.*, 1990). Man geht davon aus, daß 625 der insgesamt 817 nt der 3'-UTR entscheidend für die korrekte Lokalisation der *bicoid* mRNA sind. Innerhalb dieser Sequenz liegen funktionell unterschiedliche Unterregionen vor. Für die frühen Transportereignisse aus den Nährzellen zum anterioren Oocytenpol ist eine, als ***bicoid* Lokalisierungs-Element (BLE)** bezeichnete Region von 53 nt ausreichend, wenn sie in zwei Kopien vorliegt. In der weiteren Entwicklung kommt es dann aber zur posterioren Diffusion der *bicoid* mRNA, da für die anhaltende anteriore Lokalisierung weitere Sequenzenabschnitte innerhalb der 625 nt großen Region entscheidend sind (Whittaker *et al.*, 1995).

In der 1300 nt langen 3'-UTR der *Xenopus* Vg1 mRNA besteht das 340 nt umfassende Vg1 Lokalisierungs-Element (VLE) aus zwei Untereinheiten, einem 5'-gelegenen 85 nt großen Element und einem Abschnitt mit 135 nt nahe des 3'-Endes. Für eine korrekte Lokalisierung in der vegetalen Hemisphäre sind zwei Kopien des Unterelementes mit 85 nt oder je eine Kopie beider Elemente ausreichend. In beiden Abschnitten liegen fünf unterschiedliche, sich wiederholende Motive von fünf bis neun Nucleotiden in je zwei bis fünf Kopien vor. Die Deletion des gesamten VLE oder aller Elemente eines einzelnen Motivs verhindert bzw. beeinträchtigt die RNA-Lokalisierung. Daher geht man davon aus, daß der Mechanismus durch eine kritische Anzahl oder Kombination der Motive bedingt wird (Deshler *et al.*, 1998; Mowry *et al.*, 1999).

1. Einleitung

Auch in der Spaltheife liegt das entscheidende Element für den Transport der ASH1 RNA in der 3'-UTR. Es scheinen aber weitere Signale in der 5'-UTR und / oder der codierenden Region enthalten zu sein, da eine Hybrid-mRNA aus ASH1 mRNA, deren 3'-UTR durch die einer nicht-lokalisierenden mRNA ersetzt wird, immer noch transportiert wird, wenn auch in geringerem Maße (Long *et al.*, 1997). Die *cis*-agierenden Elemente für die Verankerung der ASH1 Transkripte in der Tochterzelle liegen dagegen nicht in der 3'-UTR, sondern ausschließlich innerhalb der codierenden Sequenz (Bertrand *et al.*, 1998).

In der 3'-UTR von MBP mRNA liegt ein zweiteiliges *cis*-agierendes Element vor. Um die MBP mRNA aus dem Soma zu leiten, ist ein 21 nt langes **RNA-Transportsignal (RTS)** nötig. Für die anschließende Lokalisierung der mRNA im Bereich der Myelinlamellen des Oligodendrocyten ist ein zweites komplexeres, als **RNA-Lokalisierungs-Signal (RLS)** bezeichnetes Element verantwortlich. Dieses besitzt eine über Artgrenzen hinweg konservierte Sekundärstruktur (Aiger *et al.*, 1997).

Die bislang kürzeste bestimmte Transportsequenz ist der *zipcode* in der β -Actin mRNA des Hühnchens (Kislauskis *et al.*, 1994). Schon die ersten 54 nt der 3'-UTR sind ausreichend für die Lokalisierung an der Wachstumsspitze des Hühner-Fibroblasten. Auch die vollständige β -Actin mRNA ohne *cis*-agierendes Element zeigt korrekten Transport. Dies ist auf eine zum *zipcode* homologe 43 nt Sequenz zurückzuführen, welche ausreichend für eine, wenn auch weniger effiziente Lokalisierung ist (Bashirullah *et al.*, 1998).

Der Transport spezifischer RNAs in Neuronen ist zwar bereits seit längerem bekannt, aber erst mittels nucleärer Mikroinjektion bzw. Transfektion war es möglich, die ersten Lokalisierungs-Elemente zu bestimmen. In der mRNA des **Mikrotubuli-assoziierten Proteins 2 (MAP2)** der Ratte, einem Marker des dendritischen Cytoskeletts, wurde ein etwa 600 nt langes *cis*-agierendes Element in der 3'-UTR identifiziert (Blichenberg *et al.*, 1999). Dagegen wird der Transport der mRNA des Ratten **Vasopressin (VP) Vorläufer-Proteins** über ein Signal von 395 nt vermittelt, das von Sequenzen der 3'-UTR und der codierenden Region gemeinsam gebildet wird (Prakash *et al.*, 1997; Mohr *et al.*, 1999). Für die dendritische Lokalisierung eines nicht-codierenden Transkriptes der Polymerase III, **brain cytoplasmic RNA 1 (BC1)**, ist schließlich ein *zipcode* von 62 nt im 5'-Bereich des Moleküls verantwortlich (Muslimov *et al.*, 1997). Spätere Studien zeigten, daß BC1 mit einer Geschwindigkeit von $242 \pm 25 \mu\text{m/h}$ transportiert wird; dies stimmt ziemlich genau mit der ermittelten Transportrate von RNA-enthaltenden Granula in lebenden Neuronen überein (Tiedge *et al.*, 1996). Die Transportgeschwindigkeit für RNP-Komplexe ist im allgemeinen

relativ schnell, so wurde für die MBP mRNA-enthaltenden Granula in Oligodendrocyten eine Geschwindigkeit von etwa 720 $\mu\text{m}/\text{h}$ ermittelt (Ainger *et al.*, 1993), was darauf hinweist, daß es sich um einen aktiven Transport handelt.

1.3 Die am Transport beteiligten Proteine (*trans*-agierende Faktoren)

In fast allen bislang untersuchten Zelltypen sind die lokalisierten RNAs in großen Granula organisiert, was auf die Existenz eines makromolekularen Transportkomplexes hindeutet (Arn *et al.*, 1998). In *Drosophila* wurden die lokalisierten maternalen mRNAs als Teil eines großen RNP-Komplexes beschrieben, welcher von den Nährzellen in die Oocyte transportiert wird (Theurkauf *et al.*, 1998). Auch aus Neuronalgewebe extrahierte BC1 liegt als Teil eines 10S RNP-Komplexes vor (Tiedge *et al.*, 1991) und dendritisch-lokalisierte mRNAs zeigen in hochauflösender *in situ* Hybridisierung (ISH) eine granuläre Verteilung (Taneja *et al.*, 1992). Fluoreszenzgefärbtes MBP bildet innerhalb kürzester Zeit ähnliche Partikel, wenn es in Oligodendrocyten injiziert wird (Ainger *et al.*, 1993).

Durch Untersuchungen von *Drosophila* Mutanten wurden fünf verschiedene Proteine identifiziert, welche für einzelne Schritte der *bicoid* mRNA-Lokalisierung in der Oocyte entscheidend sind (Bashirullah *et al.*, 1998; Lasko *et al.*, 1999). **Exuperantia** (Exu) ist ein RNA-Bindeprotein, welches selbst keine spezifische Interaktion mit der *bicoid* mRNA eingeht. Es zeigt aber als Bestandteil eines großen RNP-Komplexes eine ähnliche Verteilung in den Nährzellen (Theurkauf *et al.*, 1998). Bislang konnte eine direkte Colokalisierung noch nicht gezeigt werden, aber es wird angenommen, daß Exu gemeinsam mit weiteren Faktoren *bicoid* mRNA in die Transportpartikel einschließt und bei der anschließenden Lokalisierung in die Oocyte eine Rolle spielt. In der Exu Null-Mutante wird die *bicoid* mRNA zwar in die Oocyte transportiert, liegt aber homogen verteilt vor und auch zuvor in den Nährzellen zeigt sich keine apicale Lokalisierung. Bei **Exuperantia-like phenotype** (Exl) handelt es sich ebenfalls um ein RNA-Bindeprotein, dieses interagiert jedoch spezifisch mit dem BLE (*bicoid* Lokalisierungs-Element) und zwar nur, wenn zwei Kopien dieser Sequenz als *tandem repeat* vorliegen (Macdonald *et al.*, 1995). Das *cis*-agierende Element der *bicoid* mRNA enthält jedoch nur eine Kopie des BLE, womit wahrscheinlich ist, daß weitere Sequenzen an anderer Stelle in der 3'-UTR für die *in vivo* Bindung mit Exl benötigt werden. Die Exl Null-Mutante zeigt den gleichen Phänotyp wie Exu. Das dritte RNA-Bindeprotein ist **Staufen** (Stau), welches spezifisch Doppelstrang-RNA erkennt und mit bestimmten Sekundärstrukturen (Schleifen), die im Bereich der

1. Einleitung

3'-UTR der *bicoid* mRNA gebildet werden, interagieren könnte. An der Bildung der RNP-Komplexe sind wahrscheinlich mehrere mRNA Moleküle beteiligt, da für die *bicoid* mRNA-Stau Wechselwirkung eine quartäre RNA-Struktur benötigt wird (Ferrandon *et al.*, 1997). Die Bildung der Stau Partikel kann künstlich durch Injektion von 3'-UTR der *bicoid* mRNA in Oocyten eingeleitet werden. Der Stau Null-Mutante ist es nicht möglich, die anteriore Lokalisation der *bicoid* Transkripte in der späten Oogenese aufrechtzuerhalten. Das Stau Protein ist auch für den Transport anderer mRNAs von Bedeutung (Bashirullah *et al.*, 1998). Es wird angenommen, daß das Säugerhomologe des Stau Proteins bei der mRNA-Lokalisierung in Neuronen eine Rolle spielt (Kiebler & DesGroseillers, 2000). Während die Funktion des vierten Proteins Homeless noch vollkommen unklar ist, zeigte sich, daß **Swallow** (Swa) eine Wechselwirkung mit der leichten Kette des Dyneins, einem Mikrotubuli-assoziierten Motorprotein, eingeht (Schnorrer *et al.*, 2000). Es wird angenommen, daß die *bicoid* mRNA über Swa und Dynein mit den Mikrotubuli interagiert. Swa enthält zwar ein Motiv, welches Ähnlichkeit zu einem **RNA recognition motif** (RRM) aufweist, ob es jedoch mit *bicoid* mRNA wechselwirkt, ist noch unbekannt (Bashirullah *et al.*, 1998).

Für den Transport der ASH1 mRNA in die Tochterzelle von *S. cerevisiae* sind die Produkte von mindestens fünf SHE Genen (SHE1-5) verantwortlich. Zwei davon codieren für Proteine, die mit dem Cytoskelett assoziiert sind. SHE1, welches auch als MYO4 beschrieben ist, codiert für ein unkonventionelles Typ V-Myosin, ein Actin-assoziiertes, kontraktiles Protein, SHE5 für ein Protein, das in der Regulation des Actin-Cytoskeletts eine Rolle spielt (Long *et al.*, 1997; Bertrand *et al.*, 1998; Takizawa *et al.*, 2000). In den beiden Mutanten bilden sich normale Transportpartikel, die allerdings in der Mutterzelle bzw. am Übergang zur Tochterzelle verbleiben. Während She1p/Myo4p und She3p mit der ASH1 mRNA in den Partikeln colokalisieren, konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden, ob She2p ebenfalls Teil dieser Partikel ist (Bertrand *et al.*, 1998; Takizawa *et al.*, 2000). Da die Proteine She2p, She3p und She4p alle eine Rolle für die Entstehung der Partikel spielen, kommt es in den entsprechenden Mutanten zu keiner bzw. fehlerhafter Bildung der RNP-Komplexe. Es wird angenommen, daß She1p/Myo4p die Transportpartikel über den Adapter She3p an das Actin-Cytoskelett bindet (Bertrand *et al.*, 1998; Takizawa *et al.*, 2000). Videomikroskopische Aufnahmen des Transports in lebender Hefe zeigten, daß sich die Granula mit einer Geschwindigkeit von 720 bis 1584 µm/h bewegen; dies stimmt mit dem Transport durch einen Actin-vermittelten Motor überein (Bertrand *et al.*, 1998).

Auch die *trans*-agierenden Faktoren, welche für den Transport der Vg1 mRNA verantwortlich sind, konnten isoliert werden. Zwei Gruppen beschrieben unabhängig voneinander die Existenz eines 65 kDa Proteins mit einer hohen Affinität zum VLE (Vg1 Lokalisierungs-Element). Dieses als Vg1 **RNA-Bindeprotein** (RBP) (Havin *et al.*, 1998) bzw. Vera (Deshler *et al.*, 1998) benannte Protein zeigt interessanterweise eine starke Sequenzhomologie zum **zipcode Bindeprotein-1** (ZBP-1), welches für den β -Actin mRNA Transport im Hühner-Fibroblasten verantwortlich ist (Ross *et al.*, 1997). Die beiden verwandten RNA-Bindeproteine können *in vitro* mit den *cis*-agierenden Elementen verschiedener lokalisierter mRNAs in Wechselwirkung treten. Da die β -Actin mRNA entlang Mikrofilamenten transportiert wird und Vg1 mRNA entlang Mikrotubuli, wäre es möglich, daß die Proteine selbständig oder mit Hilfe weiterer Faktoren zwischen den Cytoskelettelementen wechseln könnten. Einen der möglichen Spezifikationsfaktoren könnte VgRBP60, ein homologes Protein des humanen heterogenen Kern-Ribonucleoproteins-I (hnRNP-I, von *hetero nuclear RNP-I*) darstellen. Es zeigt spezifische Wechselwirkung mit sich wiederholenden Motiven im VLE; Mutationen in diesem Motiv verhindern die Lokalisierung der mRNA in der *Xenopus* Oocyte (Mowry *et al.*, 1999; Cote *et al.*, 1999). Neben den gut definierten RNA-Bindedomänen enthalten Vg1RBP/Vera und ZBP-1 Kernimport und -export Signalsequenzen. Zusammen mit der Beobachtung, daß sich VgRBP60 hauptsächlich im Zellkern befindet, deutet dies darauf hin, daß die Erkennung und Bindung der lokalisierten Transkripte bereits erfolgt, bevor die mRNA das Cytoplasma erreicht. Die Beteiligung von Kernfaktoren an der RNA-Lokalisierung wird auch durch die Identifizierung des humanen hnRNP A2, welches an das RTS (**RNA-Transportsignal**) von MBP mRNA bindet, unterstützt (Hoek *et al.*, 1998). Trotzdem wird auch in das Cytoplasma injizierte mRNA sowohl in *Xenopus* Oocyten (Vg1) (Ainger *et al.*, 1993), wie auch in Maus Oligodendrocyten (MBP) korrekt lokalisiert (Yisraeli *et al.*, 1988).

Die Proteine, welche an der Lokalisierung von mRNAs in den Dendriten von Neuronen beteiligt sind, konnten bislang noch nicht identifiziert werden. Es wurde aber gezeigt, daß zwei Proteine, MARTA1 und MARTA2, *in vitro* an das dendritische *cis*-agierende Element von MAP2 mRNA binden (Rehbein *et al.*, 2000). Die beiden Proteine zeigen aber keine Wechselwirkung mit anderen dendritisch-lokalisierten RNAs. Dies kann darauf hindeuten, daß der Transportmechanismus hier sehr viel komplexer ist und möglicherweise viele unterschiedliche *trans*-agierende Faktoren für die Lokalisierung der einzelnen RNAs verantwortlich sind.

1.4 Die Lokalisierung von RNAs in Neuronen

Nachdem Dendriten lange Zeit als passive Zellausläufer betrachtet wurden, die lediglich die Signale von der Synapse zum Zellkörper übertragen, hat sich diese Ansicht durch neue Ergebnisse geändert. Sie sind biophysikalisch komplexe Strukturen, welche auf individuelle Signale entsprechend ihrer Bedeutung reagieren können (Magee *et al.*, 2000). Die Beobachtung, daß spezifische mRNAs in Dendriten lokalisiert sind und die Möglichkeit der lokalen Proteinsynthese besteht, führte zu der Überlegung, daß hierdurch Modulationen an den Synapsen als Reaktion auf ankommenden Signale erfolgen könnten.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, daß sich in Dendriten tubuläre Membranstrukturen mit Ribosomen finden, welche dem rER ähneln und früher als *Nissl bodies* bezeichnet wurden (Palay *et al.*, 1956). Diese Membranstrukturen sind insbesondere an den dendritischen Verzweigungspunkten stark konzentriert. In entfernten Bereichen des Dendriten ist hauptsächlich glattes ER enthalten, das ein fortlaufendes Netzwerk bildet und sich bis in die Spitze der *dendritic spines* fortsetzt. Während sich Ribosomen auf der gesamten Länge der Dendriten finden, liegen an den Übergängen der *dendritic spines* Polyribosomen vor (Steward *et al.*, 1985; Steward *et al.*, 1996). Der Golgi Apparat ist nur bis zum ersten Gabelpunkt primärer Dendriten vorhanden (Peters *et al.*, 1991), aber in den *dendritic spines* sind ähnliche Strukturen, die als *spine apparatus* bezeichnet werden, vorhanden (Gray *et al.*, 1959). Der *spine apparatus* besteht aus zwei oder drei membrangebundenen Zisternen, welche von dünnen Lamellen getrennt werden und durch Actinfilamente an die Plasmamembran gebunden sind (Tarrant *et al.*, 1977; Tarrant *et al.*, 1979; Matus *et al.* 2000).

Als erste dendritisch-lokalisierte RNA wurde die mRNA des **Acetylcholin Rezeptors (AChR)**, welche sich an der neuromuskulären Endplatte fand, beschrieben (Merlie *et al.*, 1985). Mittels ISH wurde später in Gewebeschnitten aus der corticalen Region von Rattenhirn auch eine Anreicherung der mRNA für das **Mikrotubuli-assozierte Protein2 (MAP2)** in Dendriten nachgewiesen. Dagegen zeigten Proben für Tubulin ein auf den Zellkörper beschränktes Signal (Garner *et al.*, 1988). Weitere dendritisch lokalisierte RNAs sind die für *neurofilament light polypeptide* (Kleiman *et al.*, 1990), **α -Calcium/Calmodulin-abhängige Protein Kinase II (α -CaMKII)** (Burgin *et al.*, 1990), **Inositol-1,4,5-Triphosphat-Rezeptor (InsP₃R)** (Furuichi *et al.*, 1993), Neurogranin (Landry *et al.*, 1994), Dendrin (Herb *et al.*, 1997), Glycin-Rezeptoren (Racca *et al.*, 1998), β -Actin (Bassell *et al.*, 1998) und **Aktivitäts-reguliertes Cytosketett-**

assoziiertes Protein (Arc) (Link *et al.*, 1995; Lyford *et al.*, 1995) codierenden mRNAs und BC1 (Tiedge *et al.*, 1996).

Die CaMKII ist ein negativer Aktivitäts-abhängiger Regulator für die Neurotransmitter-Freisetzung (Hinds *et al.*, 2003). Bei erhöhter Aktivität verschiebt sich das Gleichgewicht der Untereinheiten zugunsten der α -Untereinheit, bei reduzierter zugunsten der β -Untereinheit. Dieses Verhältnis ermöglicht es dem Holoenzym, auf unterschiedliche Intensitäten des Ca^{2+} -Signals fein abgestimmt zu reagieren (Thiagarajan *et al.*, 2002). Die β -Untereinheit wird im Zellkörper translatiert und über AMPA-Rezeptoren reguliert (Thiagarajan *et al.*, 2002). Die mRNA der α -Untereinheit findet sich über die gesamte Länge des Dendriten verteilt (Burgin *et al.*, 1990) und wird in Antwort auf neuronale Aktivität, reguliert über NMDA-Rezeptoren, lokal translatiert (Thiagarajan *et al.*, 2002). Muslimov *et al.* (1997) konnten zeigen, daß der Transport von einer Y-Element Sequenz der BC1 übermittlelt wird. *Antisense*-Oligonucleotide, welche komplementär zu einer Y-ähnlichen Struktur in der codierenden Region der α -CaMKII mRNA sind, heben die dendritische Verteilung auf (Severt *et al.*, 1999). Die α -Untereinheit der CaMKII ist ein Hauptprotein der *postsynaptic density*. Sie stellt den molekularen Schalter für die neocorticale, Erfahrungs-abhängige Plastizität der Synapse dar (Glazewski *et al.*, 1996). Bei Reizung kommt es über einen transienten Calciumeinfluß zu einer durch Autophosphorylierung verlängerten Aktivitätsphase.

BC1 ist eine kleine nicht-Boten-RNA (snmRNA, von *small non messenger RNA*), welche von der RNA Polymerase-III transkribiert wird (Martignetti & Brosius, 1995) und durch eine zentrale Adenosin-reiche Region charakterisiert ist. Sie kommt *in vivo* als Bestandteil eines 8.7S und 11.4S RNP-Komplexes vor (Kobayashi *et al.*, 1991). Evolutionsgeschichtlich handelt es sich um eine sehr junge RNA, welche durch Retroposition aus der Transfer-RNA für Alanin (tRNA^{Ala}) entstanden ist (Martignetti & Brosius, 1993) und keine Ähnlichkeit mit weiteren RNAs zeigt. BC1 wird im Gegensatz zum Großteil der snmRNAs, welche ubiquitär vorkommen, nahezu ausschließlich in den Neuronen von Nagern transkribiert (Tiedge *et al.*, 1991) und hat mit BC200 ein Homologes in Primaten (Tiedge *et al.*, 1993). Die RNA läßt sich beim oder unmittelbar nach dem Einsetzen der Synaptogenese im Zellkörper nachweisen und unterliegt einer regionalen und entwicklungsabhängigen Regulation. BC1 wird aktiv in die Dendriten transportiert und man nimmt an, daß sie eine Funktion in der Regulation der lokalen Translation hat (Muslimov *et al.*, 1998). Die Tatsachen, daß **Poly(A)-Bindeprotein** (PABP) *in vitro* an BC1 bindet und mit anti-PABP Antikörpern eine spezifische Coimmun-

1. Einleitung

präzipitation von PABP und BC1 gezeigt werden konnte (Muddashetty *et al.*, 2002), unterstützen diese Hypothese.

Da viele RNAs nur in sehr geringer Anzahl in Dendriten vorliegen, ist die klassische ISH nicht empfindlich genug, um weitere potentielle Kandidaten zu erkennen. Mit einer sensitiveren Kombination aus fluoreszierender ISH und digitaler Bildverarbeitung zeigte sich, daß die mRNA-Konzentrationen für verschiedene Glutamat-Rezeptor Typen in einzelnen Dendriten eines Neurons variieren (Miyashiro *et al.*, 1994). Auch der dendritische Wachstumskegel enthält in unterschiedlichen Entwicklungsstadien eine wechselnde Anzahl von Kopien der mRNAs für Membranrezeptoren, Enzyme und Cytoskelettelemente (Steward *et al.*, 2001). Inzwischen fanden sich über Polymerase-Kettenreaktion auch mRNAs, die für Transkriptionsfaktoren codieren, in entfernten Dendritenregionen (Crino *et al.*, 1998). Dies widerspricht der Annahme, daß ihre Funktion auf den Kern und den Zellkörper beschränkt ist, unterstützt aber die Hypothese, daß lokale Translation an der Synapse stattfindet.

Das Axon der Nervenzelle ist gewöhnlich viel länger als die Dendriten. Somit erscheint es sinnvoll, daß auch hier, an der Synapse, die weit entfernt vom Zellkörper liegt, lokale Proteinsynthese stattfindet. In den Axonen verschiedener Invertebraten wurde der Transport unterschiedlicher mRNAs, Transfer-RNAs (tRNA) und ribosomaler RNA (rRNA) eindeutig belegt (Black, *et al.*, 1977; Ingolia *et al.*, 1983; Chun *et al.*, 1997), dagegen konnte in Vertebraten bislang nur in einigen spezialisierten Neuronen eine Lokalisierung einzelner RNAs im Axon gezeigt werden. So findet sich im Axon von Hypothalamus-Neuronen VP (Trembleau *et al.*, 1994; Trembleau *et al.*, 1996), Oxytocin (Jirikowski *et al.*, 1990), Provasopressin, Prooxytocin und Prodynorphin (Mohr *et al.*, 1992) mRNA, sowie BC1 (Tiedge *et al.*, 1993). Auch die Neurone des olfaktorischen Systems enthalten mRNAs in ihren Axonen, die die olfaktorischen Marker *calcitonin-gene-related peptides* und *odorant Rezeptoren* (Ressler *et al.*, 1994; Vassar *et al.*, 1994; Denis-Donini *et al.*, 1998) codieren. Für eine im Axon stattfindende lokale Proteinsynthese in vollständig polarisierten Neuronen gibt aber kaum funktionelle Hinweise, noch konnten Komponenten der Translationsmaschinerie, wie Ribosomen und rER nachgewiesen werden. Somit ist wahrscheinlich, daß die Lokalisierung hier im Gegensatz zu Dendriten, eine andere Aufgabe hat.

1.5 Das Staufen Protein

Das Staufen Protein wurde erstmals 1986 von Schüpbach und Wieschaus an Hand einer unfruchtbaren Mutante der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* beschrieben. Die Mutanten waren gekennzeichnet durch eine fehlerhafte Entwicklung des Kopfendes, des Abdomens und durch das Fehlen von Keimzellen (Polzellen). Dies war auf eine unzureichende Ausbildung der anterioren-posterioren Achse zurückzuführen (St. Johnston *et al.*, 1991). Während der Oogenese ist das Staufen Protein für die Lokalisierung der maternalen mRNAs *bicoid* am anterioren Pol und *oskar* am posterioren Ende verantwortlich. Im späteren Embryo bilden die beiden resultierenden Proteine einen entgegengesetzten Gradienten. Das Bicoid Protein ist als anteriore Zellpaddeterminante für die Ausbildung des Kopf- und Thoraxbereiches verantwortlich. Ein Fehlen des Proteins führt zur Ausbildung eines zweiten Abdomens am Kopfende des Tieres (Driever *et al.*, 1993). Das Oskar Protein legt dagegen den Ort fest, an dem sich das Polplasma und somit die späteren Keimzellen bilden. Die Null-Mutanten entwickeln sich zwar normal, können sich aber aufgrund der fehlenden Polzellen nicht fortpflanzen (Kim-Ha *et al.*, 1991). Auch in der späteren Entwicklung des Embryos spielt das Staufen Protein eine Rolle. Während der Neurogenese bildet es durch die Lokalisierung der *prospero* mRNA die Asymmetrie im Neuroblasten aus (Broadus *et al.*, 1998).

Das Staufen Protein ist Mitglied einer Familie von **Doppelstrang-RNA** (dsRNA) bindenden Proteinen, zu der auch **RNA-abhängige Protein-Kinase** (PKR), RNase III, HIV *trans-acting response* Element- (TAR-bindendes) Protein und Vaccinia E3L Protein gehören (St. Johnston *et al.*, 1992). Diese sind gekennzeichnet durch mehrere **dsRNA-Binde-Domänen** (dsRBD), die eine jeweils 65 bis 68 Aminosäuren lange Konsensussequenz enthalten. Im Staufen Protein liegen vier vollständige dsRBD vor, von denen die zweite zweigeteilt ist. Die fünfte dsRBD ist eine verkürzte Kopie, die nur die 21 letzten Aminosäuren am C-Terminus des Motivs enthält (St. Johnston *et al.*, 1991; St. Johnston *et al.*, 1992). Während Staufen *in vivo* spezifisch Sekundärstrukturen nur bestimmter mRNAs erkennt, scheint es *in vitro* an jede dsRNA zu binden (St. Johnston *et al.*, 1992). Es ist daher möglich, daß die Spezifität durch weitere, bislang unbekannte Faktoren erreicht wird.

Inzwischen wurden Staufen Homologe in anderen Organismen, wie *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Caenorhabditis elegans*, und *Danio rerio* gefunden (Marión *et al.*, 1999; Wickham *et al.*, 1999; Kiebler *et al.*, 1999; H. Knaut, persönliche Mitteilung). Die Sequenz des **humanen Staufen** Proteins (hStau) stimmt zu 38% mit dem Protein in *Drosophila*

1. Einleitung

melanogaster (dmStau) überein. Innerhalb der Säugerhomologen ist die Konservierung des Proteins noch deutlicher, so sind die Sequenzen von Maus und Mensch zu 90% identisch und zu 98% homolog. Während die Expression von dmStau auf wenige Zelltypen während der Oogenese und Embryonalentwicklung beschränkt ist, zeigten Untersuchungen mit verschiedenen humanen Zelllinien (HEK293, HeLa, IM9 Lymphocyten, humane Neuroblastomzellen) sowie unterschiedlichen Geweben, daß hStau ubiquitär exprimiert wird (Marión *et al.*, 1999; Wickham *et al.*, 1999). Das humane Protein kommt in zwei unterschiedlichen Isoformen vor, welche durch insgesamt vier, durch alternatives Spleißen erzeugte Transkripte entstehen. Drei der Transkripte haben etwa die gleiche Länge von 3217 nt, das vierte Transkript unterscheidet sich durch eine Insertion von 289 **Basenpaaren** (bp) an Position 324, wodurch eine 3506 nt lange mRNA entsteht. Auch wenn die einzelnen Fragmente unterschiedlich stark im Gewebe exprimiert werden, ist die relative Häufigkeit der einzelnen Transkripte zwischen den Geweben gleich. Die drei kürzeren mRNAs codieren für ein Protein von 55 kDa, im folgenden **Staufen⁵⁵** genannt. Das 3506 nt lange Transkript erzeugt durch ein zweites, 5'-gelegenes ATG-Initiationscodon ein um 81 Aminosäuren N-terminal verlängertes Protein von 63 kDa, welches als **Staufen⁶³** bezeichnet wird (Wickham *et al.*, 1999).

Die Aminosäuresequenz des dmStau zeigt große Ähnlichkeit zu der von hStau und murinem **Staufen Protein (mStau)**, sowie einem nicht weiter charakterisierten offenen Leserahmen auf dem X-Chromosom von *Caenorhabditis elegans*. Die Gesamtstruktur und die relative Lage der vollständigen und C-terminal verkürzten dsRBD ist konserviert und zeigt eine hohe Sequenzübereinstimmung in den korrespondierenden Binde-Domänen. Die Domänenstruktur der Säugerhomologen unterscheidet sich von der des dmStau durch das Fehlen der ersten dsRBD und des langen N-Terminus, der für die spezifische Bindung an Oskar Protein verantwortlich ist. Zusätzlich befindet sich dafür zwischen der dritten und vierten dsRBD eine Region von 91 Aminosäuren, welche 25% Übereinstimmung und 66% Ähnlichkeit zur **Tubulin-Binde-Domäne (TBD)** des **Mikrotubuli-assoziierten Proteins 1B (MAP1B)** zeigt (Wickham *et al.*, 1999).

Das humane **Staufen Protein** liegt in HeLa-Zellen mit rER assoziiert vor, besitzt aber keine Signalsequenz für das ER. Es zeigt keine Colokalisation mit den Komponenten des endocytotischen Weges und obwohl eine partielle Übereinstimmung mit dem Golgi-Apparat beobachtet wurde, ist das Färbemuster nicht typisch, so daß auch hier eine Colokalisation unwahrscheinlich ist. In Zellfraktionierungs- und Sedimentationsexperimenten liegt hStau in der Polyribosomenfraktion vor (Marión *et al.*, 1999, Wickham *et al.*, 1999).

Funktionelle Untersuchungen der Säugerhomologen belegen, daß sowohl hStau wie auch mStau *bicoid* mRNA *in vitro* binden und die beiden vollständigen dsRBD (dsRBD3 und dsRBD4) unabhängig voneinander ausreichend für die Bindung sind. Die dsRBD2 und dsRBD5 sind dagegen nicht in der Lage, mit der mRNA in Wechselwirkung zu treten. Auch eine Bindung der TBD an Mikrotubuli wurde *in vitro* nachgewiesen (Wickham *et al.*, 1999).

Das Stauen Protein der Ratte (rStau) zeigt ebenfalls große Ähnlichkeit mit seinen Homologen. So ist seine Aminosäuresequenz zu 48% mit der von dmStau und zu 92% bzw. 98% mit der von hStau bzw. mStau identisch. In Extrakten aus hippocampalen Neuronen, Astrocyten und Hippocampusgewebe wurde eine 65 kDa lange Form des Proteins nachgewiesen, welche wahrscheinlich hStaufen⁶³ entspricht, aber bislang noch nicht kloniert wurde (Kiebler *et al.*, 1999). Während der Entwicklung von hippocampalen Neuronen in Primärkultur kann ein wechselndes Expressionsmuster für rStau beobachtet werden. In frühen Stadien liegt rStau in allen Neuriten vor; im weiteren Verlauf der Entwicklung, nach der Ausbildung von Axon und Dendriten, ist das Protein im Axon nur noch in geringer Menge nachzuweisen. In vollständig polarisierten Neuronen beschränkt sich rStau auf den Zellkörper und die Dendriten. Es colokalisiert ebenso wie hStau mit dem rER und Polyribosomen, aber nicht mit Markern des Golgi-Apparats. Außerdem zeigte sich in elektronenmikroskopischen Studien eine Assoziation mit Mikrotubuli (Kiebler *et al.*, 1999). In lebenden hippocampalen Neuronen wurden RNA-haltige Granula beschrieben, welche Ribosomen, RNA, Translationsfaktoren sowie Proteine enthalten und Mikrotubuli-abhängig transportiert werden (Knowles *et al.*, 1996). Diese Granula colokalisieren ebenfalls mit rStau (Kiebler *et al.*, 1999). Köhrmann *et al.* (1999) konnten zeigen, daß nach der Transfektion von Neuronen mit einem Plasmid, das für ein Fusionsprotein aus dem hStau und dem Grün-fluoreszierenden-Protein (GFP) codiert, RNA-enthaltende Partikel gebildet werden. Die Stauen-GFP/RNA Partikel zeigten einen bidirektionalen Transport in Dendriten mit einer Geschwindigkeit von 384 bis 1458 $\mu\text{m}/\text{h}$, der nach Depolymerisation der Mikrotubuli nicht mehr zu beobachten war. Diese Geschwindigkeit entspricht in etwa der anderer RNA-enthaltender Granula in Neuronen Tiedge *et al.*, 1996), Hefe (Bertrand *et al.*, 1998) und Oligodendrocyten (Ainger *et al.*, 1993).

2. Aufgabenstellung

Ein weit verbreiteter Mechanismus zur Polarisierung von Zellen ist der spezifische Transport von RNAs in bestimmte Zellkompartimente, in denen diese anschließend lokal translatiert werden. Auch in Neuronen werden RNAs in Dendriten lokalisiert, nähere Erkenntnisse über den Transportmechanismus fehlen aber. Als eine potentielle Komponente des Transportkomplexes wird das Säugerhomologe des Staufen Proteins angesehen. Dieses Protein liegt in vollständig polarisierten Neuronen somato-dendritisch lokalisiert vor. Während es im Zellkörper mit dem ER assoziiert ist, findet es sich in den Dendriten in RNA-enthaltenden Partikeln. Nach der Transfektion von Neuronen mit hStau-GFP bilden sich RNA-enthaltende Partikel, welche einen Mikrotubuli-abhängigen Transport in Dendriten zeigen (Köhrmann *et al*, 1999). Das Ziel der Arbeit war die biochemische Isolation der mikroskopisch visualisierten Staufen-enthaltenden Ribonucleoproteinpartikel aus Rattenhirn und deren anschließende nähere Charakterisierung.

Um die Partikel während der biochemischen Aufreinigung verfolgen zu können, war es zunächst erforderlich, spezifische Antikörper gegen das als Marker verwendete Staufen Protein der Ratte herzustellen. Während der Arbeiten hierzu deutete sich an, daß neben dem bereits beschriebenen Staufen Protein ein weiteres homologes Protein in Säugern vorkommt, Staufen2. Daher sollten monospezifische Antikörper auch gegen Staufen2 hergestellt und die Eigenschaften der beiden Proteine zunächst auf zellulärer Ebene genauer analysiert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten dann die Staufen Komplexe biochemisch isoliert werden. Die zentrale Untersuchung befasste sich hierbei mit der Frage, ob beide Staufen Proteine Teil desselben Partikels darstellen oder ob unterschiedliche Staufen-enthaltende Komplexe im Gehirn der Ratte vorliegen.

Den dritten Schwerpunkt stellte die Charakterisierung der isolierten Partikel dar. Hierbei galt es zum einen die Frage zu klären, ob die Komplexe ein Motorprotein enthalten, welches einen aktiven Transport vermitteln könnte. Zum anderen war es entscheidend, ob die isolierten Staufen Partikel RNA enthalten und somit tatsächlich Ribonucleoprotein-Komplexe darstellen. Danach galt es ferner zu klären, ob die enthaltene RNA tatsächlich dendritisch-lokalisierte Transkripte darstellt, was eine Funktion des Staufen Proteins im dendritischen RNA-Transport in Neuronen belegen könnte.

3. Ergebnisse

3.1 Herstellung und Charakterisierung spezifischer anti-Staufen Antikörper

Um die Isolierung der Staufen-enthaltenden RNP-Komplexe aus Rattenhirn zu verfolgen, sollten zunächst spezifische Maus-Antikörper gegen das Säuger Staufen1 Protein hergestellt werden.

Bereits zu Beginn meiner Arbeiten wurde ein weiteres Staufen Protein im Säuger Staufen2 beschrieben (Buchner *et al.*, 1999). Da außer genomischen Untersuchungen keine weiteren Daten über dieses Homologe bekannt waren, lag es nahe, auch spezifische Antikörper gegen das Staufen2 Protein herzustellen und mit Hilfe der monospezifischer Antikörper beide Proteine näher zu untersuchen.

Die beiden Homologen unterscheiden sich hauptsächlich in der Aminosäureabfolge des C-Terminus. Aus diesem Grund wurden für die Immunisierung Antigene gewählt, welche jeweils den C-terminalen Bereich des Proteins umfassen. Für die Herstellung des ersten Antigens wurde ein Plasmid verwendet, welches für den C-Terminus des humanen Staufen1 codiert und mir von Dr. J. Ortín zur Verfügung gestellt wurde. Das zweite Plasmid codiert den C-Terminus des murinen Staufen2 und wurde mir von Dr. L. DesGroseillers zur Verfügung gestellt. Für die Immunisierung mit dem Staufen1 Antigen wurde das Protein in denaturierter Form eingesetzt. Die Immunisierung mit dem Staufen2 Protein erfolgte mit nativen und denaturiertem Antigen.

3.1.1 Polyklonale Antikörper aus Mäusen

Vor der Erstimmunisierung der Tiere wurden die Präimmunseren auf mögliche Kreuzreaktion mit Extrakten aus primären hippocampalen Neuronen der Ratte (im folgenden Neuronenextrakt genannt) und Rattenhirn getestet. Hierdurch sollte festgestellt werden, ob bereits vor der Immunisierung enthaltene Antikörper an Rattenhirnproteine binden. Es konnte keine Reaktion der Seren mit den verwendeten Extrakten beobachtet werden.

Als erstes wird die Charakterisierung der Staufen1 Antikörper besprochen. Die Blutung der mit dem Staufen1 Protein immunisierten Mäuse wurde zunächst darauf getestet, ob die enthaltenen Antikörper das Antigen erkennen. Die Seren aller immunisierten Tiere reagierten

3. Ergebnisse

positiv. Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, ob die Antikörper, die gegen das humane Staufen1 Protein gerichtet sind, auch das Ratten Homologe erkennen. Dazu wurde Neuronenextrakt verwendet. Meine Studien ergaben, daß eine Vielzahl von Antiseren dazu neigt, unspezifisch an ein 65 kDa Protein zu binden. Da das Staufen Protein eine Größe von etwa 65 kDa hat, wurde ein spezieller Test entwickelt, um Fehlinterpretationen auszuschließen. Dazu werden BHK-21 (Zelllinie aus *Baby-Hamster-Kidney*: BHK) Zellen mit zwei verschiedenen Staufen Plasmiden transfiziert. Das eine codiert für ein Fusionsprotein aus GFP und der 55 kDa Isoform des humanen Staufen1 Proteins (Stau1⁵⁵-GFP). Das andere führt zu einem Fusionsprotein aus GFP mit der 63 kDa Isoform des humanen Staufen1 Proteins (Stau1⁶³-GFP). Das GFP liegt jeweils C-terminal zu Staufen. Durch die Fusion ist das exogene Protein größer als 65 kDa und Fehlinterpretationen werden vermieden.

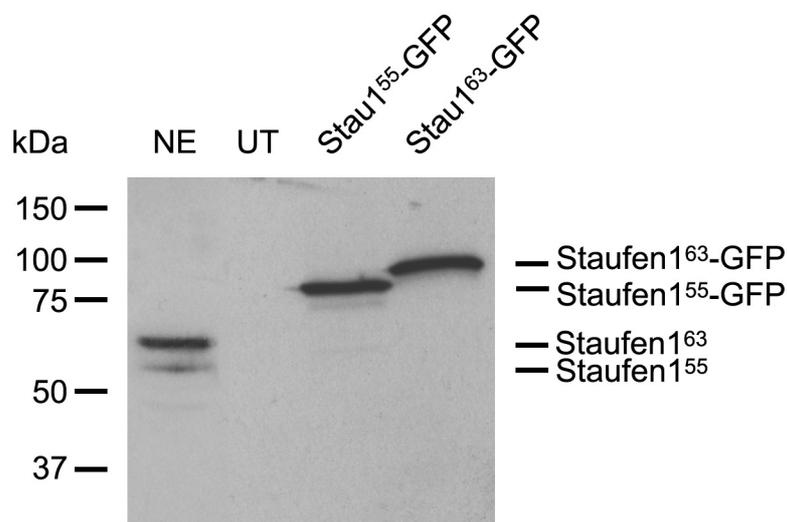


Abbildung 1 spezifische Erkennung von 2 Isoformen des Ratten Staufen1 Proteins und rekombinant exprimiertem humanem Staufen1-GFP Fusionsprotein mit Maus-anti-Staufen1 Antikörpern: Die Extrakte aus hippocampalen Neuronen der Ratte (NE), untransfizierten (UT), hStaufen1⁵⁵-GFP- (Stau1⁵⁵-GFP) und hStaufen1⁶³-GFP- (Stau1⁶³-GFP) transfizierten BHK Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit Maus-anti-Staufen1 immundetektiert.

Abbildung 1 zeigt einen repräsentativen Western-Blot für die Mausblutung, die für die Abbildungen im Ergebnisteil durchgehend verwendet wurde. In dem Extrakt aus untransfizierten BHK Zellen wird kein Protein erkannt. Somit kann eine Kreuzreaktion mit endogenen Proteinen aus den Hamster Zellen ausgeschlossen werden. Das Antiserum zeigt eine deutliche Bindung an ein 85 kDa Protein in dem Extrakt der BHK Zellen, die mit dem Stau1⁵⁵-GFP Plasmid transfiziert wurden. Im Extrakt der Stau1⁶³-GFP transfizierten Zellen wird ein Protein von etwa 95 kDa erkannt. Dies stimmt gut mit der kalkulierten Größe für die Fusionsproteine

überein. Als weitere Spezifitätskontrolle wurde die Reaktion eines GFP-spezifischen Antikörpers mit den Extrakten der BHK Zellen getestet, um die genaue Größe der Fusionsproteine zu überprüfen. Die erkannten Proteine wiesen dieselbe Größe auf. Daraus kann man schließen, daß das Antiserum sowohl die 63 kDa Isoform, wie auch die 55 kDa Isoform des humanen Staufer Proteins eindeutig erkennt. Im Neuronenextrakt binden die Antikörper deutlich an zwei Proteine von etwa 55 kDa und 65 kDa. Dies zeigt, daß der hergestellte Antikörper gegen das humane Staufer Protein auch das Rattenhomologe erkennt. In diesem Zusammenhang ist zu bemerken, daß bislang nur die 55 kDa Isoform kloniert werden konnte, andererseits wird rStau aber als 65 kDa Protein beschrieben (Kiebler *et al.*, 1999). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß das Rattenhomolog, ebenso wie das humane Protein in zwei Isoformen vorkommt, daher wurde im folgenden die Nomenklatur mit den beiden 55 kDa und 63 kDa Isoformen von hStau übernommen.

BHK + Staufer1⁶³-GFP

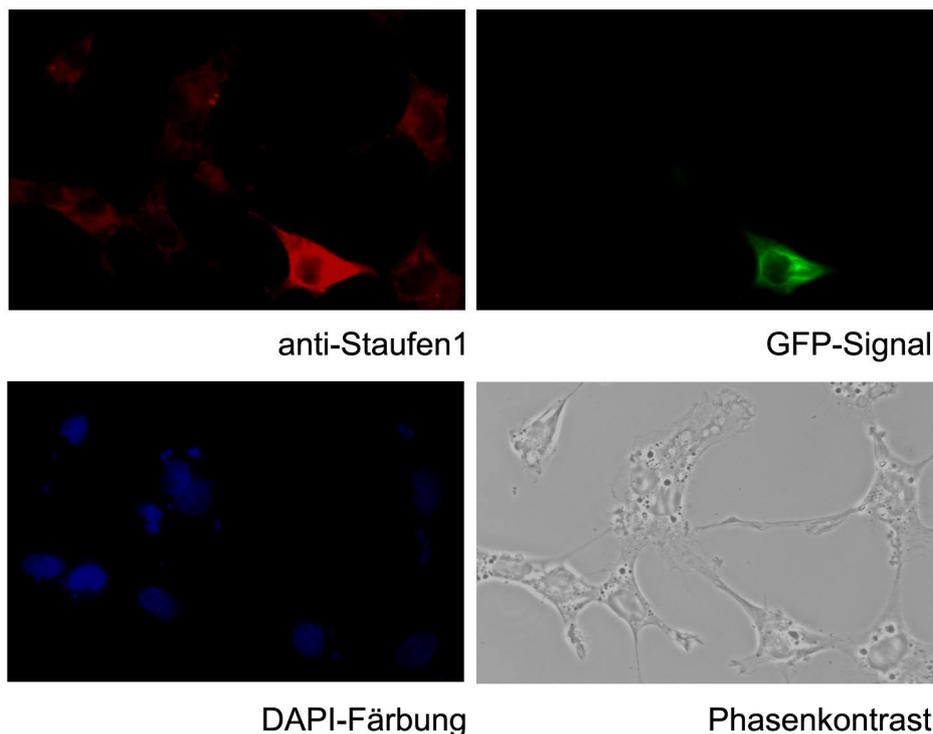


Abbildung 2 spezifische Erkennung von rekombinant exprimiertem hStau1⁶³-GFP Fusionsprotein mit Maus-anti-Staufer1 Antikörpern: BHK Zellen wurden mit einem Plasmid, codierend für Stau1⁶³-GFP, transfiziert, anschließend mit Maus-anti-Staufer1 immundetektiert und die Zellkerne mit DAPI gefärbt.

Im Western-Blot liegen die Proteine in denaturierter Form vor. Für die geplanten Untersuchungen war es aber entscheidend, Antikörper zu besitzen, welche Staufer in einer Immun-

3. Ergebnisse

fluoreszenzfärbung erkennen. Um dies zu testen, wurden wiederum Stau1⁶³-GFP-transfizierte BHK Zellen verwendet. In Abbildung 2 erkennt man eine transfizierte Zelle (GFP Signal) zwischen mehreren untransfizierten. Diese Zelle wird vom Antikörper deutlich stärker angefärbt als die umliegenden. Das bedeutet, daß das Antiserum einerseits ein endogenes Protein in BHK Zellen erkennt und andererseits an exogenes hStaufen1⁶³-GFP bindet. Der Antikörper erkennt also spezifisch transfiziertes humanes Staufen1 Protein im Western-Blot und in der Immunfluoreszenzfärbung.

Staufen2 zeigt insbesondere in seinem C-Terminus große Unterschiede in der Aminosäureabfolge zu Staufen1. Da für die Immunisierung der Tiere Sequenzen aus dem C-Terminus verwendet wurden, bestand eine hohe Wahrscheinlichkeit, Staufen1-spezifische Antikörper zu besitzen, die keine Kreuzreaktion mit Staufen2 zeigen. Um dies zu überprüfen, wurde ebenfalls ein Western-Blot durchgeführt. Für die positive Kontrolle wurden wiederum Neuronenextrakt sowie untransfizierte bzw. Stau1⁶³-GFP transfizierte BHK Zellen verwendet. Zur Überprüfung der Kreuzreaktivität wurden COS7 (COS) Zellen mit zwei verschiedenen Plasmiden, welche für die spezifische Aminosäuresequenz des murinen Staufen2 Proteins codieren (Stau2⁵⁹ und Stau2⁶²), transfiziert. Das Ergebnis des Tests ist in Abbildung 3A dargestellt. Im Neuronenextrakt und in den COS Zellextrakten erkennt das Antiserum zwei Proteine von 55 kDa und 65 kDa. Bei den COS Zellen handelt es sich um eine Zelllinie aus der afrikanischen grünen Meerkatze. Da zu den Affenproteinen eine größere Homologie des humanen Staufen als zu den Hamsterproteinen bestehen sollte, ist es wahrscheinlich, daß die beiden Proteine die Isoformen des Meerkatzen Staufen1 darstellen. Bei dem zusätzlich erkannten 75 kDa Protein handelt es sich möglicherweise um ein endogenes Protein, welches unspezifisch gebunden wird. In den Extrakten der Stau1⁶³-GFP transfizierten BHK Zellen bindet der Antikörper Staufen1⁶³-GFP. In den beiden Extrakten der mit den Staufen2-Plasmiden transfizierten COS Zellen erkennt der Antikörper ausschließlich die gleichen Proteine, wie in denen der untransfizierten Zellen. Es ist weder eine zusätzliche Bande von 59, noch eine zusätzliche oder stärkere Bande von 62 kDa zu beobachten. Aufgrund der Tatsache, daß ein Staufen2-spezifischer Antikörper (siehe auch Abbildung 7) zumindest das exogene Staufen2⁶² Protein in den COS Zellextrakten bindet, kann bestätigt werden, daß Staufen2 Protein in den Extrakten vorhanden ist, welches vom Staufen1-spezifischen Antiserum nicht erkannt wird.

In einem weiteren Test wurden gereinigte Proteingemische aus Rattenhirn eingesetzt, welche ausschließlich Staufen1 oder Staufen2 Protein enthalten. Das Ergebnis ist in Abbildung 3B

dargestellt. Während der Antikörper im Neuronenextrakt, in Fraktion 2 und in Fraktion 4 deutlich an Stau1⁶³ bindet, reagiert er nicht mit Proteinen in den Fraktionen, welche Stau2 aber nicht Stau1 (Stau1-) enthalten. Dies zeigt deutlich, daß die spezifischen Antikörper gegen das Stau1 Protein keine Bindung an denaturiertes Stau2 Protein zeigen.

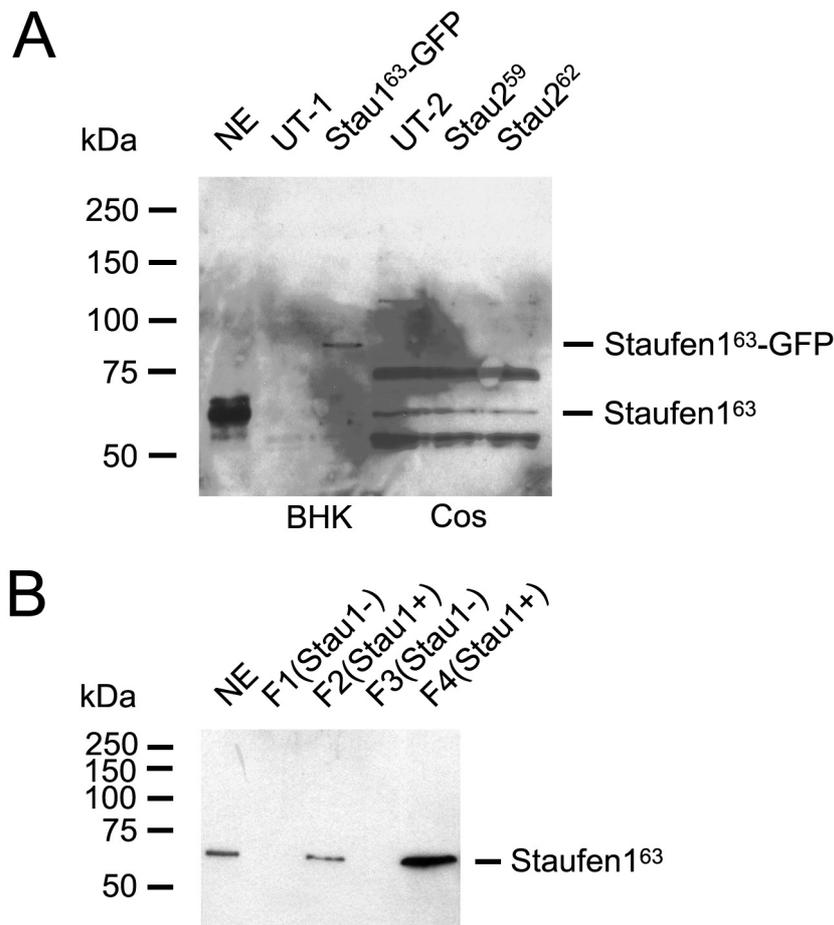


Abbildung 3 Spezifität der Maus-anti-Staufen1 Antikörper: A) Extrakte aus hippocampalen Neuronen (NE), untransfizierten (UT-1) und hStaufen1⁶³-GFP- (Stau1⁶³-GFP) transfizierten BHK Zellen, sowie untransfizierten (UT-2), mStaufen2⁵⁹- (Stau2⁵⁹) und mStaufen2⁶²- (Stau2⁶²) transfizierten COS Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine anschließend im Western-Blot mit Maus-anti-Staufen1 immundetektiert. B) Neuronenextrakt und gereinigte Protein-Fractionen, die ausschließlich Stau1 (F2, F4) bzw. Stau2 (F1, F3) enthalten wurden über SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend im Western-Blot mit Maus-anti-Staufen1 immundetektiert.

Da Stau2 als homologes Protein zu Stau1 eine zumindest teilweise ähnliche Sekundär- bzw. Tertiärstruktur zu diesem haben sollte, bestand die Möglichkeit, daß der Antikörper an nicht denaturiertes Stau2 Protein binden könnte. Aus diesem Grund wurde wiederum eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Diesmal wurden die BHK Zellen mit einem Fusionsprotein aus murinem Stau2⁶² und GFP transfiziert. Das Ergebnis zeigt Abbildung 4. Wäh-

3. Ergebnisse

rend der Antikörper in allen Zellen an ein endogenes Protein bindet, zeigt er keine stärkere Färbung der transfizierten Zelle (GFP-Signal). Aus diesem Grund kann ausgeschlossen werden, daß der Antikörper das exogene Staufen2 Fusionsprotein erkennt.

BHK + Staufen2⁶²-GFP

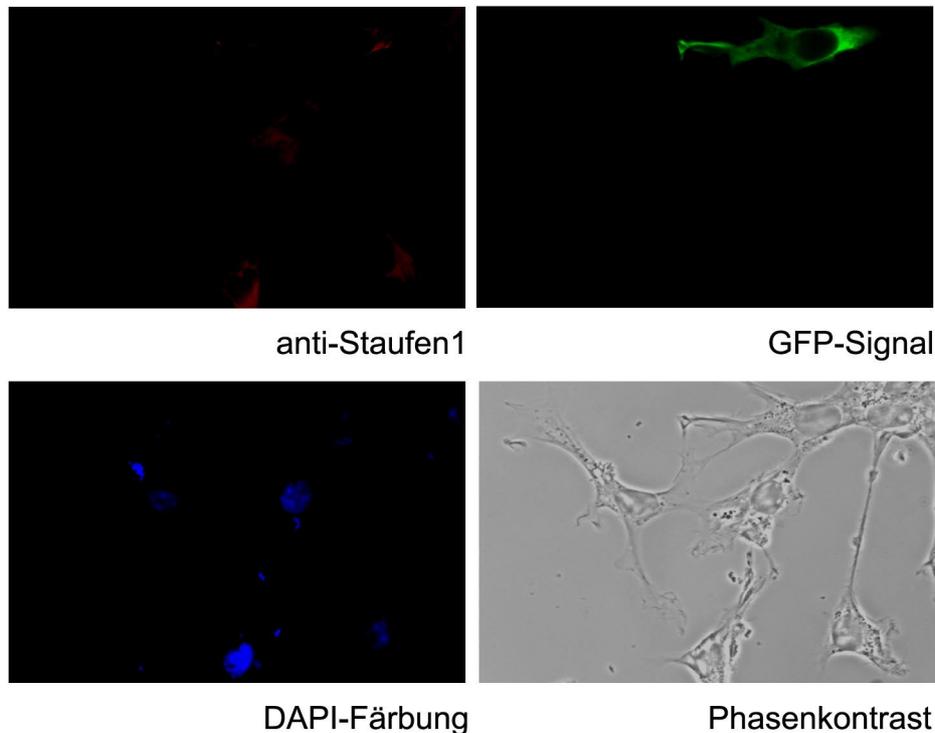


Abbildung 4 Spezifität der Maus-anti-Staufen1 Antikörper: BHK Zellen wurden mit einem Plasmid, codierend für Stau2⁶²-GFP, transfiziert, mit Maus-anti-Staufen1 immunodetektiert und die Zellkerne mit DAPI gefärbt.

Zusammenfassend kann man festhalten, daß das hergestellte Maus Staufen1 Antiserum sowohl mit den beiden Isoformen des denaturierten humanen Staufen1 Proteins als auch mit den Homologen aus der Ratte reagiert. Ebenso wird as humane Staufen1 Protein in der Immunfluoreszenzfärbung erkannt. Im Gegensatz dazu bindet der Antikörper weder im Western-Blot noch in der Immunfluoreszenz das murine Staufen2 Protein.

Als nächstes wird die Charakterisierung der Staufen2-spezifischen Antikörper dargestellt. Die Antikörper der ersten Blutung der mit dem Staufen2 C-Terminus immunisierten Mäuse wurden zunächst auf die Bindung an Antigen getestet. Dabei zeigte eine der fünf Mäuse gar keine Reaktion und eine weitere lediglich eine sehr schwache. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß im Gegensatz zum humanen Staufen1 ein murines Staufen2 Antigen verwendet wurde. Die weiteren Tests wurden anschließend nur mit den eindeutig positiv reagie-

renden Seren durchgeführt. Als repräsentatives Beispiel ist wiederum das Ergebnis für die Mausblutung gezeigt, welche für die nachfolgenden Experimente verwendet wurde. In Neuro-nenextrakten reagierte der Staufen2 Antikörper mit einem Protein von etwa 59 kDa. Das von Buchner *et al.* (1999) beschriebene Staufen2 Protein beinhaltet 479 Aminosäuren, womit ein geringeres Molekulargewicht zu erwarten wäre. Bei Untersuchungen mit Rattenhirnextrakten stellte sich heraus, daß in der differentiellen Zentrifugation (siehe auch Kapitel 3.2: intrazelluläre Verteilung der Staufen Proteine), das Sediment nach 100.000 xg insgesamt drei Proteine enthält, welche vom Antikörper erkannt werden. Die Existenz von zwei Isoformen des Staufen2 Proteins wurde von Dr. L. DesGroseillers Gruppe bestätigt, die eine 59 kDa sowie eine 62 kDa Isoform aus einer fetalen Maus cDNA Bibliothek klonierte (Duchaîne *et al.*, 2002). Als dritte Isoform sahen sie das von Buchner beschriebene Protein mit einem Molekulargewicht von 52 kDa an. Um eine Fehleinschätzung durch unspezifische 65 kDa Banden zu verhindern, wurde wieder der bereits beschriebene Test mit Fusionsproteinen verwendet. Als Fusionspartner für GFP diente murines Staufen2⁶².

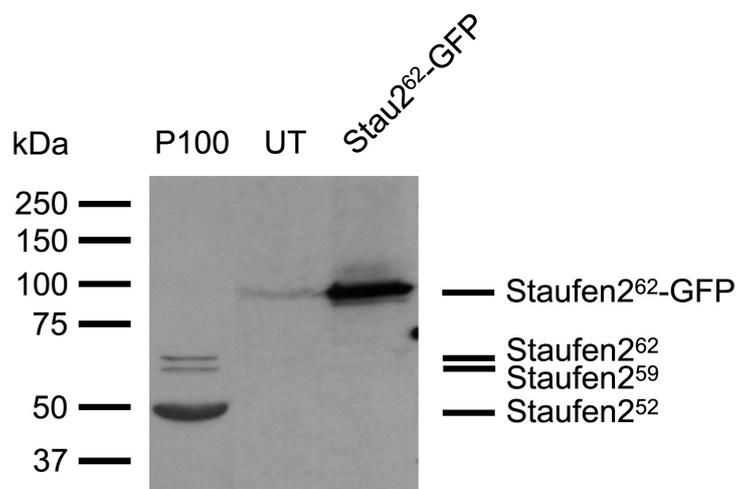


Abbildung 5 spezifische Erkennung von 3 Isoformen des Ratten Staufen2 Proteins und rekombinant exprimiertem murinem Staufen2⁶²-GFP Fusionsprotein mit Maus-anti-Staufen2 Antikörpern: Die Extrakte aus untransfizierten (UT) und mStaufen2⁶²-GFP- (Stau2⁶²-GFP) transfizierten BHK Zellen, sowie das Sediment nach 100.000 xg (P100), wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine anschließend im Western-Blot mit Maus-anti-Staufen2 immundetektiert.

Der Western-Blot in Abbildung 5 zeigt im Extrakt der mit Stau2⁶²-GFP transfizierten BHK Zellen eine deutliche Reaktion der Antikörper mit einem Protein von etwa 90 kDa, was der kalkulierten Größe des exogenen Proteins entspricht. Die schwache Bande gleicher Größe in den untransfizierten Zellen stellt entweder einen schwachen unspezifischen Hintergrund dar oder ist, was wahrscheinlicher sein dürfte, auf eine Kontamination durch Extrakt aus der

3. Ergebnisse

Nachbarspur, der beim Auftragen des Gels erfolgte zurückzuführen. Die exakte Größe des Fusionsproteins wurde wie für Staufen1 mit einem GFP-spezifischen Antikörper überprüft. Im P100 aus Rattenhirn erkennt der Antikörper drei Isoformen des Staufen2 Proteins von 52 kDa, 59 kDa und 62 kDa.

BHK + Staufen2⁶²-GFP

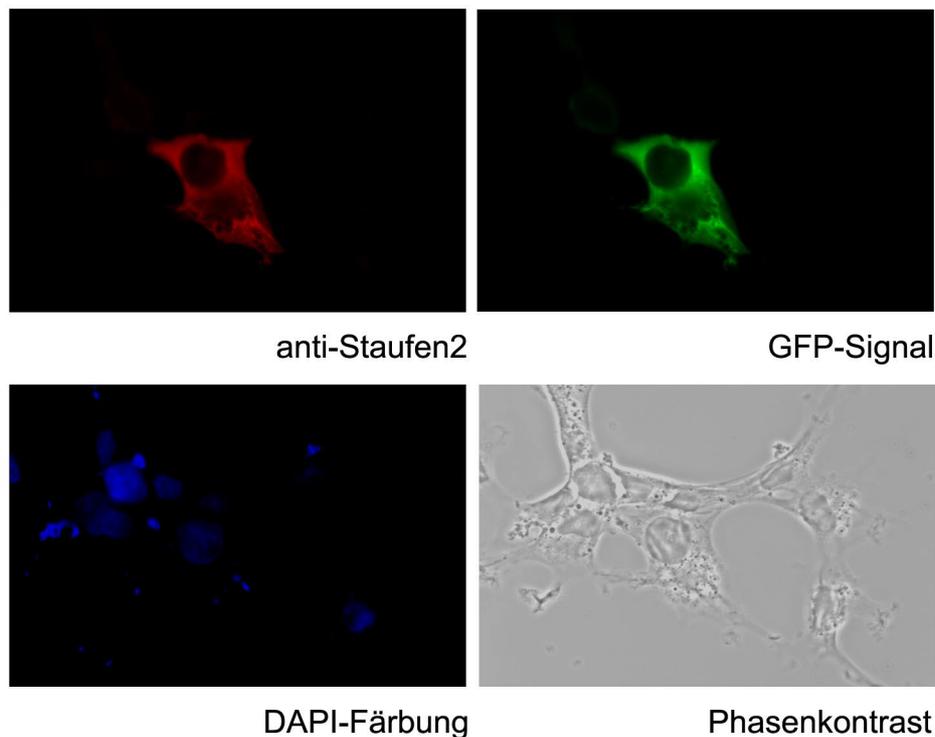


Abbildung 6 spezifische Erkennung von murinem Staufen2⁶²-GFP Fusionsprotein mit Maus-anti-Staufen2 Antikörpern: Die BHK Zellen wurden mit einem Plasmid, codierend für Stau2⁶²-GFP, transfiziert, anschließend mit Maus-anti-Staufen2 immundetektet und die Zellkerne mit DAPI gefärbt.

Für die Immunisierung der Mäuse wurde sowohl denaturiertes als auch natives Antigen eingesetzt (siehe Kapitel 6.2.2.1: Immunisierung der Mäuse). Aus diesem Grund konnte man damit rechnen, daß das Antiserum das Staufen2 Protein auch in der Immunfluoreszenz erkennt. Zur Überprüfung wurden wiederum Staufen2⁶²-GFP transfizierte BHK Zellen verwendet. Abbildung 6 zeigt eine transfizierte Zelle (GFP-Signal) zwischen mehreren untransfizierten (Phasenkontrast). Während der Antikörper die transfizierte Zelle deutlich anfärbt, scheint er nicht an Proteine in den untransfizierten Zellen zu binden. Dies bedeutet, daß kein endogenes Protein in BHK Zellen erkannt wird, sondern lediglich das rekombinant exprimierte Staufen2 Fusionsprotein. Da Untersuchungen der Gruppe von Dr. L. DesGroseillers zeigten, daß Staufen2 hauptsächlich im Gehirn exprimiert wird (Duchaîne *et al.*, 2002), sollte es dementsprechend in Nierenzellen (BHK) nicht oder nur in geringen Mengen vorkommen.

Für die geplanten Untersuchungen wurden Staufen2-spezifische Antikörper benötigt, die nicht mit Staufen1 kreuzreagieren. Um die Bindung der Antikörper an Staufen1 zu untersuchen, wurde zunächst wieder denaturiertes Protein im Western-Blot verwendet. Abbildung 7 zeigt den analogen Blot zu Abbildung 3 für den Maus-Staufen2-Antikörper.

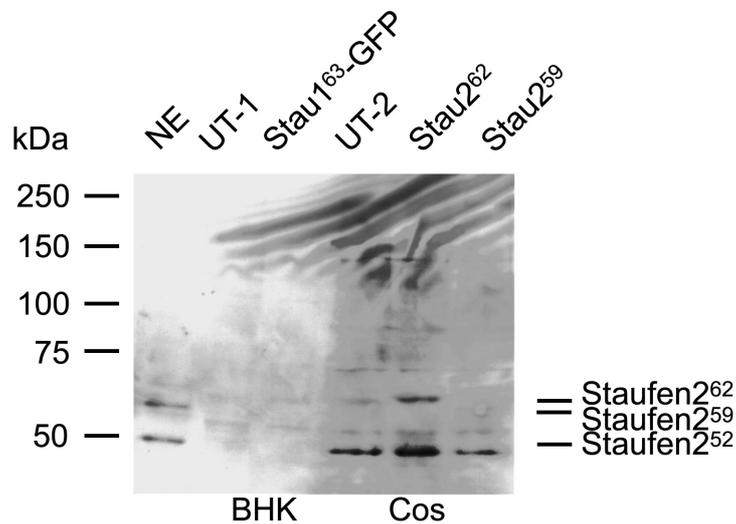


Abbildung 7 Spezifität der Maus-anti-Staufen2 Antikörper: Die Extrakte aus hippocampalen Neuronen (NE), untransfizierten (UT-1) und hStaufen1⁶³-GFP- (Stau1⁶³-GFP) transfizierten BHK Zellen, sowie untransfizierten (UT-2), mStaufen2⁵⁹- (Stau2⁵⁹) und mStaufen2⁶²- (Stau2⁶²) transfizierten COS Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine dann im Western-Blot mit Maus-anti-Staufen2 immundetektiert.

Das Antiserum reagiert deutlich mit zwei Proteinen von 52 kDa und 59 kDa Protein (Staufen2⁵² und Staufen2⁵⁹) im Neuronenextrakt. Es bindet aber weder das Staufen1⁶³-GFP Protein, noch an endogene Proteine in BHK Zellextrakten. In COS Zellen werden eine starke und mehrere schwache unspezifische Banden angezeigt. In den Extrakten der transfizierten Zellen reagiert das Serum deutlich mit dem Staufen2⁶² Protein, aber nicht mit Staufen2⁵⁹. Das Ergebnis zeigt klar, daß der Staufen2 Antikörper weder an humanes Staufen1 Protein noch an die beiden Staufen1 Isoformen der Ratte bindet.

Um eine Kreuzreaktion mit Staufen1 in der Immunfluoreszenz auszuschließen, wurde im Anschluß eine Färbung von Staufen1⁶³-GFP-transfizierten BHK Zellen durchgeführt (siehe Abbildung 8). Der Antikörper zeigt weder eine Bindung an endogene Proteine in BHK Zellen, noch an exogenes Staufen1⁶³-GFP-Fusionsprotein.

BHK + Staufen1⁶³-GFP

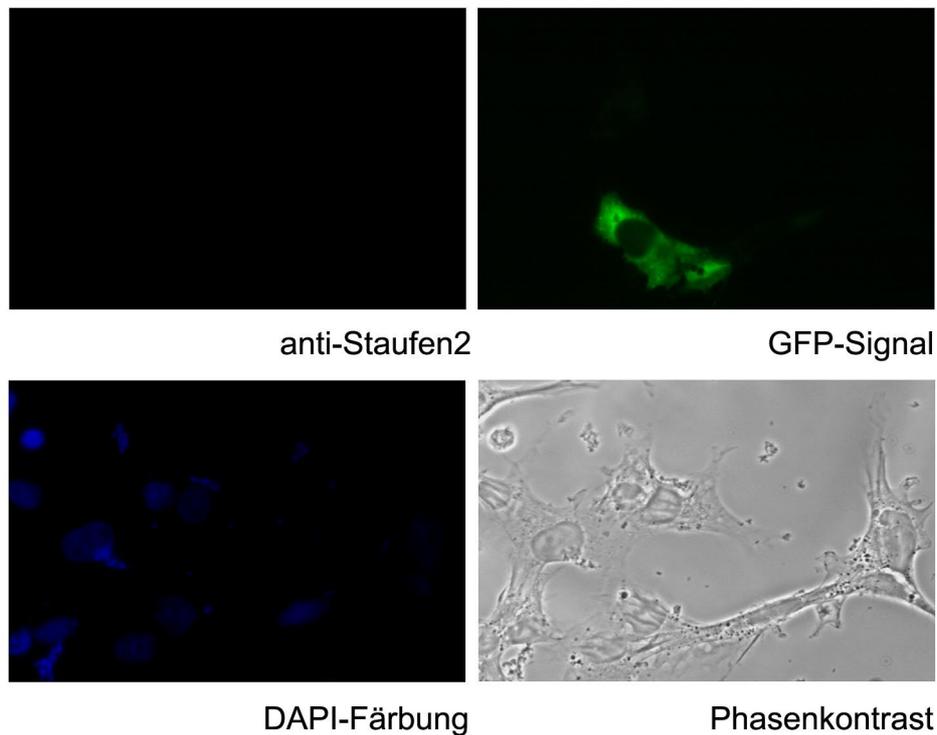


Abbildung 8 Spezifität der Maus-anti-Staufen2 Antikörper: Die BHK Zellen wurden mit einem Plasmid, codierend für Stau1⁶³-GFP, transfiziert, anschließend mit Maus-anti-Staufen2 immunodetektiert und die Zellkerne mit DAPI gefärbt.

Zusammenfassend kann man festhalten, daß der Maus-anti-Staufen2 Antikörper drei Isoformen des Staufen2 Proteins von 52 kDa, 59 kDa und 62 kDa in Extrakten aus Rattenhirn erkennt. Er reagiert im Western-Blot und in der Immunfluoreszenz mit dem murinen Staufen2⁶², aber weder mit Ratten Staufen1, noch mit humanem Staufen1⁶³.

3.1.2 Polyklonale Antikörper aus Kaninchen

Mausseren stehen aufgrund der geringen Größe der Tiere nur in sehr begrenzter Menge zur Verfügung. Zudem kann die zelluläre Verteilung der beiden Staufen Proteine in der selben Zelle nur mittels Doppelfärbung untersucht werden. Aus diesem Grund wurden neben den Mausantikörpern auch polyklonale Antikörper aus Kaninchen hergestellt. Als Antigene wurden zusätzlich zu den beiden C-terminalen Proteinen zwei weitere verwendet, welche jeweils die fünfte Doppelstrang-RNA-Bindedomäne (dsRBD5) des murinen Staufen1 bzw. Staufen2 Proteins umfassen. Die beiden Plasmide zur Herstellung dieser Antigene wurden mir von Dr. P. Macchi zur Verfügung gestellt. Die Reinigung und Vorbereitung des bakteriell expri-

mierten Antigens, sowie die Immunisierung der Tiere und die Aufarbeitung des Serums ist ausführlich in Kapitel 6.2.1 und 6.2.2 dargestellt.

Kaninchenserum enthalten, da es sich um keine reinen Laborstämme handelt, immer eine ganze Reihe von Antikörpern, die auf bakterielle Infektionen der Tiere zurückzuführen sind. Diese können auch unspezifisch mit Säugerproteinen reagieren. In diesem Fall spricht man von einem Hintergrund. Daher wird in den folgenden Abbildungen jeweils der Western-Blot des Präimmunserums (links), dem des Serums der ersten Blutung (rechts) gegenübergestellt. Von jeweils zwei immunisierten Kaninchen ist immer nur ein repräsentativer Blot pro Antigen gezeigt.

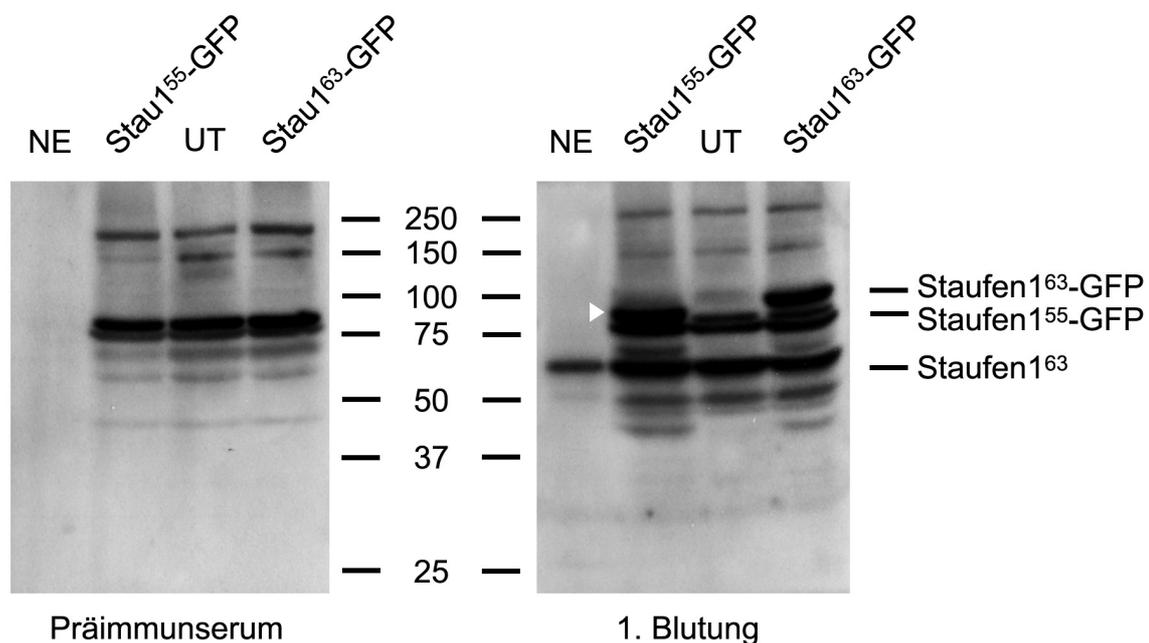


Abbildung 9 spezifische Erkennung von Ratten Staufen1⁶³ und rekombinant exprimiertem humanem Staufen1-GFP Fusionsprotein mit Kaninchen-anti-Staufen1 Antikörpern: Die Extrakte aus hippocampalen Neuronen (NE), untransfizierten (UT), hStaufen1⁵⁵-GFP- (Stau1⁵⁵-GFP) und hStaufen1⁶³-GFP- (Stau1⁶³-GFP) transfizierten BHK Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine anschließend im Western-Blot mit Kaninchen-anti-Staufen1 immundetektiert.

Abbildung 9 zeigt das Ergebnis des Western-Blots für ein Kaninchen, welches mit der dsRBD5 des Staufen1 Proteins immunisiert wurde. Das Präimmunserum reagiert mit keinem Protein im Neuronenextrakt. In den BHK Zellen bindet es dagegen deutlich an mindestens fünf verschiedene Proteine. Das Serum der ersten Blutung zeigt im Neuronenextrakt eine deutliche Reaktion mit einem Protein von 65 kDa. In den BHK Zellextrakten ist diese Bande ebenfalls zu beobachten. In den Extrakten der Stau1⁵⁵-GFP transfizierten Zellen ist außerdem eine zusätzliche Bande von etwa 85 kDa, in denen der Stau1⁶³-GFP transfizierten eine von 95 kDa zu sehen. Diese Banden stellen das Staufen1⁶³, das Staufen1⁵⁵-GFP und das Staufen1⁶³-

3. Ergebnisse

GFP Protein dar und zeigen, daß das Serum der ersten Blutung spezifische Antikörper gegen das murine Staufen1 Protein enthält, welche sowohl mit dem Staufen1⁶³ der Ratte wie auch mit beiden Isoformen des humanen Staufen1 Proteins reagiert. Zusätzlich erkennt das Antiserum weitere Proteine von etwa 50 kDa in allen BHK Zellextrakten und 40 kDa und 70 kDa in den Extrakten der transfizierten Zellen. Diese Banden werden vom Präimmunserum nicht erkannt und sind damit klar auf die Immunisierung zurückzuführen. Ob diese Proteine durch Proteasen teilweise abgebaute Staufen Proteine darstellen oder eine Sequenzhomologie zwischen der dsRBD5 von Staufen1 und endogenen Hamster Proteinen vorliegt, kann nicht eindeutig geklärt werden.

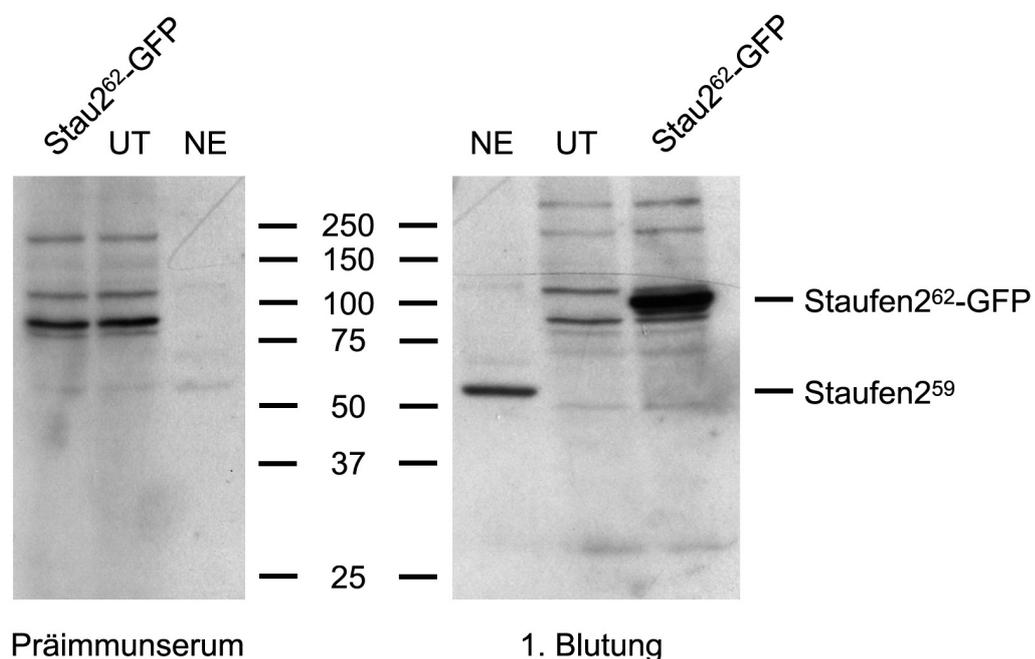


Abbildung 10 spezifische Erkennung von Ratten Staufen2⁵⁹ und rekombinant exprimiertem murinem Staufen2⁶²-GFP Fusionsprotein mit Kaninchen-anti-Staufen2 Antikörpern: Die Extrakte aus hippocampalen Neuronen (NE), untransfizierten (UT) und Staufen2⁶²-GFP (Stau2⁶²-GFP) transfizierten BHK Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine dann im Western-Blot mit Kaninchen-anti-Staufen2 immundetektiert.

In Abbildung 10 ist der repräsentative Western-Blot für das Serum eines Kaninchens gezeigt, welches mit der dsRBD5 des Staufen2 Proteins immunisiert wurde. Das Präimmunserum reagiert im Neuronenextrakt schwach mit mindestens einem Protein von 54 kDa. In den Extrakten der BHK Zellen werden deutlich mindestens vier Proteine von 80 kDa, 85 kDa, 110 kDa und 200 kDa erkannt. Nach der Immunisierung enthält das Serum der ersten Blutung Antikörper, welche deutlich mit Staufen2⁵⁹ im Neuronenextrakt reagieren. In den Extrakten der transfizierten BHK Zellen binden die Antikörper klar Staufen2⁶²-GFP. Das vom Antiserum erkannte Protein von mehr als 250 kDa ist möglicherweise auf Aggregation oder un-

vollständige Denaturierung zurückzuführen. Die gegen das native murine Stau2 Protein hergestellten Antikörper reagieren also spezifisch mit denaturiertem murinen Stau2⁶² und erkennen auch das Stau2⁵⁹ Protein der Ratte.

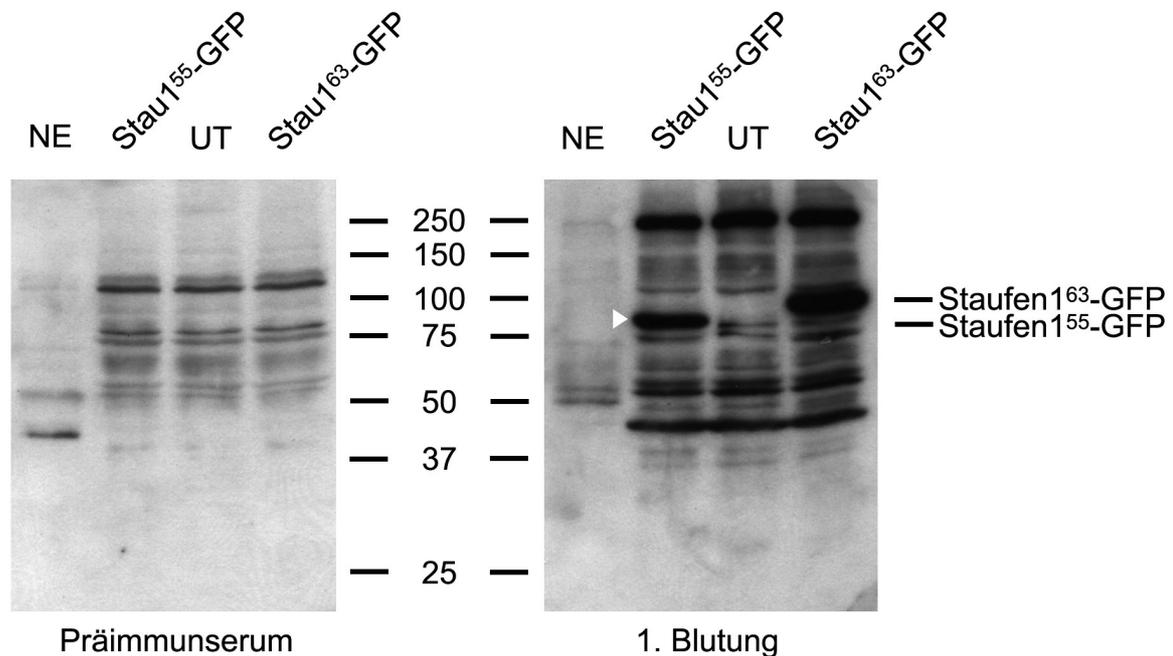


Abbildung 11 spezifische Erkennung von rekombinant exprimiertem humanem Stau1-GFP Fusionsprotein mit Kaninchen-anti-Staufen1 Antikörpern: Die Extrakte aus hippocampalen Neuronen (NE), untransfizierten (UT), Stau1⁵⁵-GFP- (Stau1⁵⁵-GFP) und Stau1⁶³-GFP- (Stau1⁶³-GFP) transfizierten BHK Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine anschließend im Western-Blot mit Kaninchen-anti-Staufen1 immundetektiert.

Abbildung 11 zeigt das Ergebnis des Western-Blots für ein Kaninchen, welches mit dem C-terminalen Stau1 Proteinfragment immunisiert wurde. Das Präimmunserum erkennt im Neuronenextrakt mindestens zwei Proteine von 40 kDa und 54 kDa. In den BHK Zellextrakten reagiert es mit mindestens sieben Proteinen zwischen 54 kDa und 120 kDa. Die Antikörper der ersten Blutung zeigen zusätzlich eine schwache Reaktion mit einem 50 kDa Protein im Neuronenextrakt. Dafür ist aber die 40 kDa Bande nicht mehr zu beobachten. Die Intensität des Signals läßt eine spezifische Immunantwort unwahrscheinlich erscheinen. In den Extrakten der BHK Zellen binden die Antikörper an mindestens 13 Proteine zwischen 35 kDa und 250 kDa. Eine deutliche Reaktion läßt sich nur mit einem 40 kDa und einem 250 kDa Protein erkennen. Ob diese auf die Immunisierung zurückzuführen ist, läßt sich nicht mit Sicherheit feststellen. Die Reaktion des Serums der ersten Blutung mit Stau1⁵⁵-GFP und Stau1⁶³-GFP zeigt aber deutlich, daß nach der Immunisierung spezifische Antikörper gegen beide Isoformen des humanen Stau1 Proteins vorhanden sind. Diese Antikörper liegen

3. Ergebnisse

aber entweder nicht in ausreichender Menge im Serum vor, um die im Vergleich zum überexprimierten Staufen1-GFP Fusionsprotein geringeren Mengen endogenen Staufen1 im Neuronenextrakt nachzuweisen, oder sie reagieren nicht mit den Rattenhomologen.

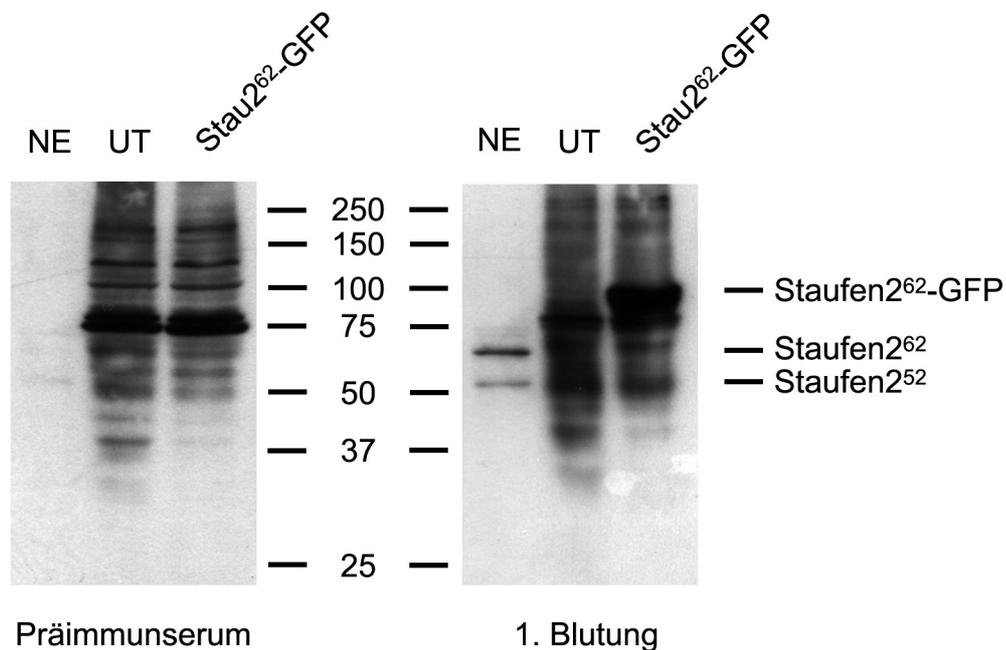


Abbildung 12 spezifische Erkennung von Ratten Staufen2⁵², rStaufen2⁶² und rekombinant exprimiertem murinem Staufen2⁶²-GFP Fusionsprotein mit Kaninchen-anti-Staufen2 Antikörpern: Die Extrakte aus hippocampalen Neuronen (NE), untransfizierten (UT) und Staufen2⁶²-GFP- (Stau2⁶²-GFP) transfizierten BHK Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine anschließend im Western-Blot mit Kaninchen-anti-Staufen2 immundetektiert.

In Abbildung 12 ist der repräsentative Western-Blot mit dem Serum eines Kaninchens gezeigt, welches mit dem C-terminalen Staufen2 Antigen immunisiert wurde. Das Präimmunserum reagiert sehr schwach mit einem Protein von etwa 52 kDa. Dagegen binden die enthaltenen Antikörper deutlich an eine ganze Reihe von Proteinen in den Extrakten aus BHK Zellen. Das Serum der ersten Blutung zeigt im Vergleich dazu zwei deutliche Banden von 52 kDa und 62 kDa im Neuronenextrakt an. Diese beiden Proteine dürften Staufen2⁵² und Staufen2⁶² der Ratte darstellen. Es ist zu bemerken, daß alle zuvor untersuchten Antikörper im Neuronenextrakt lediglich die 59 kDa Isoform des Staufen2 Proteins erkannt haben, welche von diesem Antiserum nicht gebunden wird. Staufen2⁵² ließ sich ebenso wie Staufen2⁶² nur im P100 von Hirnextrakten nachweisen (siehe auch Abbildung 5). Da aber durch die Reaktion mit exogenem Staufen2 in BHK Zellextrakten ein Vorhandensein spezifischer Antikörper belegt wird und beide Banden mit der kalkulierten Größe für Staufen2⁵² und Staufen2⁶² übereinstimmen, ist es unwahrscheinlich, daß es sich hier um ein Artefakt handelt.

Zusammenfassend läßt sich folgendes festhalten: Die Mausantikörper gegen das denaturierte humane Staufen1 und das murine Staufen2 Protein erkennen spezifisch humanes Staufen1 bzw. murines Staufen2 im Western-Blot und in der Immunfluoreszenz. Außerdem reagieren sie mit allen Isoformen des jeweiligen denaturierten homologen Proteins der Ratte. Die Mausantikörper sind monospezifisch und zeigen keine Kreuzreaktivität mit dem korrespondierenden Staufen Protein.

Die Kaninchenantiseren enthalten teilweise unspezifische Antikörper, welche an endogene Proteine der Ratte binden. Der gegen die native dsRBD5 des murinen Staufen1 Proteins hergestellte Antikörper erkennt nur die 65 kDa Isoform des Ratten Staufen1, aber beide Isoformen des humanen Homologen. Das Serum des mit dem nativen humanen C-terminalen Staufen1 Antigen immunisierten Tieres erkennt nur die Isoformen des humanen Staufen1, reagiert aber nicht mit den Homologen der Ratte. Der gegen dsRBD5 des murinen Staufen2 Proteins hergestellte Antikörper bindet sowohl stark an murines Staufen2⁶², als auch an Staufen2⁵⁹ der Ratte. Das Kaninchenserum des mit nativem, C-terminalem Staufen2 Antigen immunisierten Tieres enthält Antikörper, welche Staufen2⁶² in Ratte und Maus sowie Ratten Staufen2⁵² erkennen.

3.2 Charakterisierung der zellulären Verteilung der Staufen Proteine

Nach der Herstellung der Antikörper sollte nun mit diesen die intrazelluläre Verteilung der beiden Staufen Proteine untersucht werden. Dazu wurden zunächst Immunfluoreszenzfärbungen von reifen, vollständig polarisierten Neuronen der Ratte durchgeführt. Abbildung 13 zeigt die intrazelluläre Verteilung des Staufen1 Proteins. In 40-facher Vergrößerung läßt sich deutlich eine starke Färbung im Bereich des Zellkörpers erkennen. Das Protein liegt dicht um den Zellkern herum, der selbst kein Staufen1 enthält. Diese ringförmige Struktur, welche als perinucleärer Ring bezeichnet wird, ist typisch für eine Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen Proteine des ER (Kiebler *et al.*, 1999). Dies spricht für eine Colokalisation von Staufen1 und ER. In 63-facher Vergrößerung und bei längerer Belichtung kann man in den Ausläufern des Neurons feine Partikel erkennen. Diese Partikel liegen relativ dicht gepackt bis in die feinsten Verästelungen vor (100x). Genauere Untersuchungen von Indradeo Hemraj mit spezifischen Antikörpern gegen axonale bzw. dendritische Proteine konnten ein Vorkommen des Proteins im Axon weitgehend ausschließen.

3. Ergebnisse

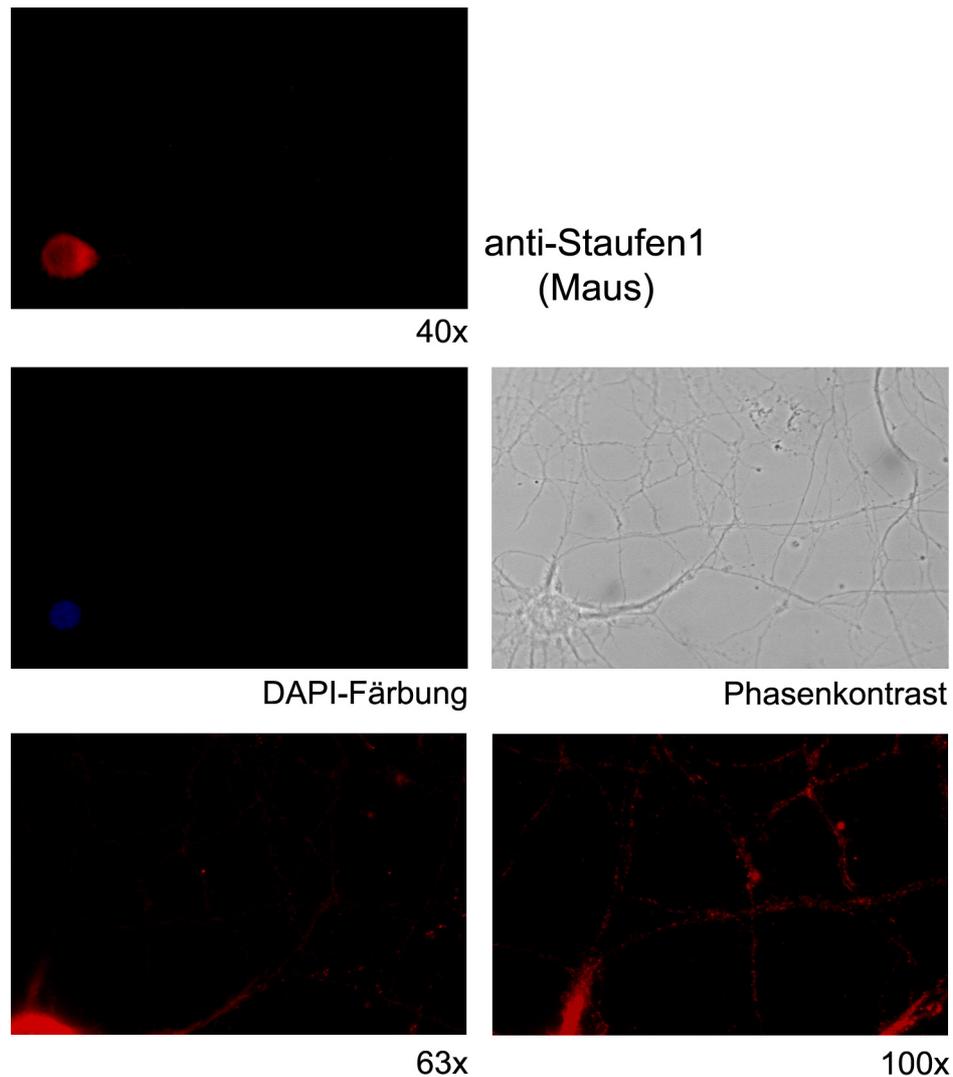


Abbildung 13 somato-dendritische Verteilung von Staufen1 in Neuronen: Immunfluoreszenzfärbung eines reifen hippocampalen Neurons der Ratte mit Maus-anti-Staufen1 und DAPI.

Im Vergleich dazu ist in Abbildung 14 die Immunfluoreszenzfärbung eines Neurons mit dem Maus-anti-Staufen2 Antikörper zu sehen. Die 40-fache Vergrößerung zeigt eine starke Färbung im Zellkörper und eine schwächere in den Ausläufern des Neurons. Das Protein kommt im Zellkern nicht vor und scheint, genau wie Staufen1, im perinucleären Ring im Soma lokalisiert zu sein. In den Ausläufern liegen punktierte Strukturen vor, die bei stärkerer Vergrößerung (63x) deutlich als feine Partikel zu erkennen sind. In 100-facher Vergrößerung und mit längerer Belichtung wirken die Staufen2 Partikel im Vergleich zu Staufen1 dichter gepackt; die Zellfortsätze scheinen nahezu gefüllt. Die Untersuchungen von Indradeo Hemraj mit axonalen bzw. dendritischen Markerproteinen zeigten auch für Staufen2 eine Beschränkung auf Dendriten.

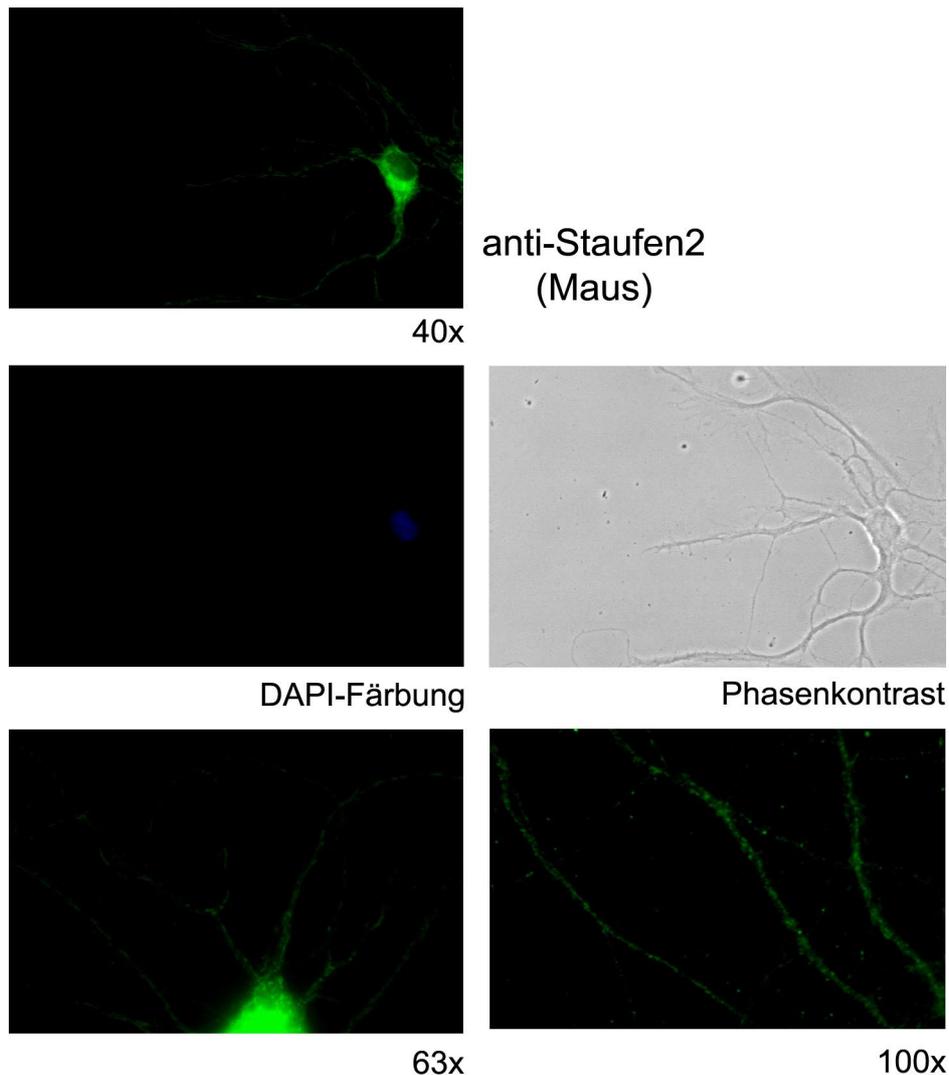


Abbildung 14 somato-dendritische Verteilung von Staufen2 in Neuronen: Immunfluoreszenzfärbung eines reifen hippocampalen Neurons der Ratte mit Maus-anti-Staufen2 und DAPI.

Vergleicht man die intrazelluläre Verteilung der beiden Säugerhomologen des Staufen Proteins, so zeigt sich klar, daß beide Proteine somato-dendritisch vorkommen. Im Zellkörper colokalisieren sie mit den Strukturen des ER, während sie im Dendriten als feine Partikel vorkommen. Die zelluläre Verteilung beider Proteine scheint also sehr ähnlich. Bei genauerer Betrachtung fällt aber auf, daß das Verhältnis zwischen dem somatischen Anteil des Proteins und den dendritischen Partikeln unterschiedlich ist. Während Staufen1 hauptsächlich im Zellkörper konzentriert erscheint, ist der Anteil von Staufen2 in Dendriten viel größer. Um die Staufen1 Partikel klar zu erkennen, muß eine längere Belichtungszeit gewählt werden, welche die Unterscheidung von Strukturen im Soma nicht mehr zuläßt. Die Staufen2 Partikel sind dagegen gemeinsam mit dem perinucleären Ring im Zellkörper deutlich zu erkennen. Auch die Konzentration der Partikel erscheint unterschiedlich. Während die Staufen1 Partikel zwar deutlich im gesamten Dendritenbaum verteilt sind, liegt Staufen2 in den Dendriten gleichsam

3. Ergebnisse

dicht gepackt vor. Dies deutet auf eine sehr viel höhere Konzentration des Proteins in diesem subzellulären Bereich hin. Insgesamt ist die intrazelluläre Verteilung der beiden Stufen Proteine sehr ähnlich. Mit den vorliegenden Ergebnissen kann jedoch nicht geklärt werden, ob die beiden Proteine colokalisieren und damit möglicherweise Komponenten desselben Komplexes darstellen. Diese Untersuchung kann nur durch Doppelfärbung eines Neurons mit spezifischen Antikörpern gegen Stufen1 und Stufen2 erfolgen.

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurde ein monospezifischer Kaninchen-anti-Staufen1 Antikörper und der bereits zuvor eingesetzte Maus-anti-Staufen2 Antikörper verwendet. Die Färbung und die Aufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit Indradeo Hemraj angefertigt. Im oberen Teil von Abbildung 15 ist die Färbung eines reifen Neurons für Stufen1 und Stufen2 dargestellt. Beide Proteine liegen somato-dendritisch in der Zelle vor. Es ist deutlich zu erkennen, daß der Anteil von Stufen1 im Zellkörper sehr viel höher ist, wohingegen Stufen2 in den Dendriten deutlich konzentrierter vorliegt. In der Doppelfärbung zeigt sich, daß die beiden Proteine im Bereich des Zellkörpers colokalisieren; das Signal ist aber zu stark und die Vergrößerung zu klein, um spezifische Strukturen auszumachen. In den Dendriten ist nahezu ausschließlich Stufen2 zu erkennen. Um die Colokalisierung im dendritischen Bereich näher zu untersuchen, wurde dieser stärker vergrößert und mit einer längeren Belichtungszeit dargestellt. Das Ergebnis ist im unteren Bereich der Abbildung 15 zu sehen. Der Ausschnitt zeigt deutlich das Vorliegen von Stufen1 und Stufen2 Partikeln im Dendriten. Die Anzahl der Stufen2 Partikel scheint größer, wie aus den Einzelfärbungen zu erwarten war. Die Immunfluoreszenzfärbung erlaubt keinerlei Rückschlüsse auf die tatsächliche Größe von Komplexen, daher sind eventuell zu beobachtende Größenunterschiede der Partikel ohne Bedeutung. In der Abbildung ist deutlich zu erkennen, daß die beiden Stufen Partikel getrennt voneinander vorliegen und eine Überlagerung des Signals nur an wenigen Stellen zu beobachten ist. Diese ist auf Grund der Seltenheit zufällig, und eine Colokalisation der beiden Proteine und damit ihr Vorkommen im gleichen Komplex kann somit im dendritischen Bereich weitgehend ausgeschlossen werden.

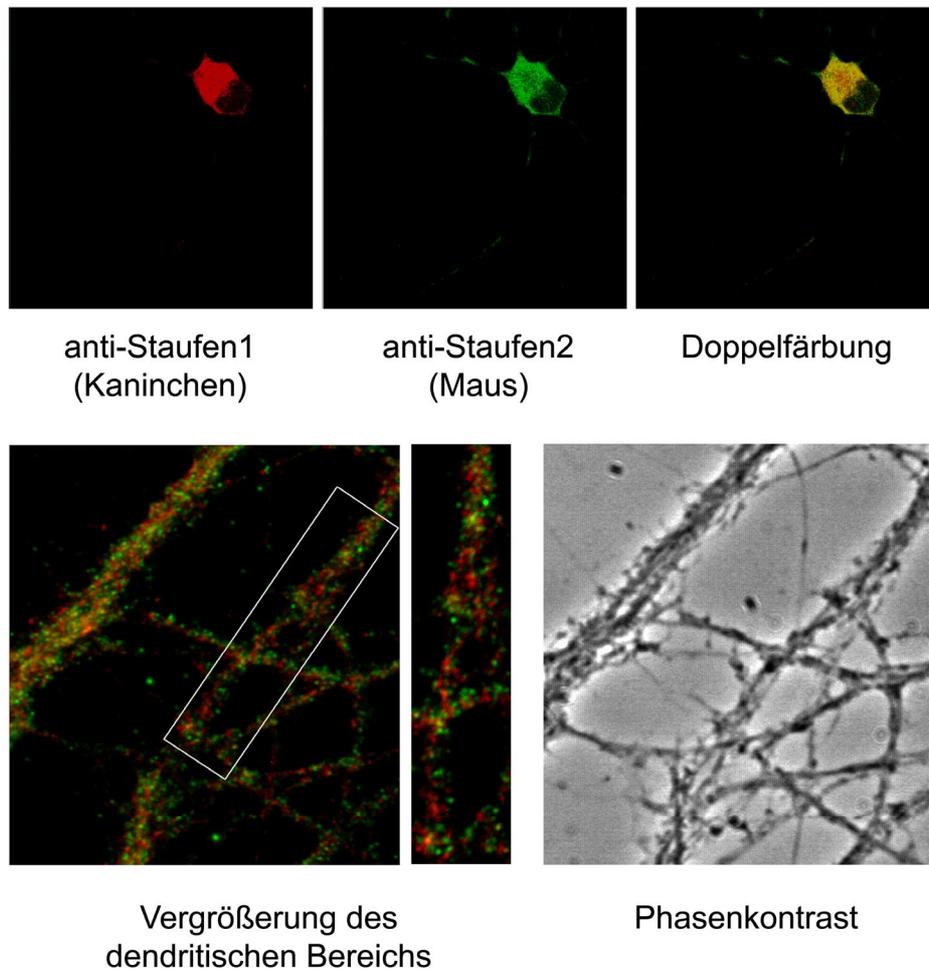


Abbildung 15 Vergleich der intrazellulären Verteilung von Staufen1 und Staufen2: Doppelfärbung eines reifen hippocampalen Neurons der Ratte mit Kaninchen-anti-Staufen1 und Maus-anti-Staufen2. Zur Amplifizierung des Staufen2 Signals wurde eine Biotin-Streptavidin-Kaskade verwendet.

Die Untersuchung mittels Immunfluoreszenzfärbung deutet klar darauf hin, daß beide Staufen Proteine in zwei unterschiedlichen Formen in Neuronen vorkommen. Die somatische Form ist mit ER assoziiert bzw. liegt zumindest in unmittelbarer Nähe zu diesem vor. In diesem intrazellulären Bereich besteht die Möglichkeit, daß beide Proteine gemeinsam in einem Komplex vorkommen. Die partikuläre Form ist in Dendriten lokalisiert. Da die beiden Proteine in diesem intrazellulären Bereich nicht colokalisieren, handelt es sich um distinkte Staufen1 und Staufen2 Partikel.

3. Ergebnisse

Die Resultate auf zellulärer Ebene aus der Immunfluoreszenz sollten als nächstes mit biochemischen Methoden untermauert werden. Als eine klassische Technik zur Zellfraktionierung bietet sich die differentielle Zentrifugation von Zellextrakten an. Hierbei macht man sich die unterschiedlichen Sedimentationsgeschwindigkeiten der einzelnen Zellbestandteile zunutze.

Um eine ausreichende Menge an Material für die Untersuchungen zur Verfügung zu haben, wurden keine einzelnen Neuronen, sondern der gesamte Cortex von sechs bis acht Wochen alten Ratten verwendet. Dieses Alter wurde gewählt, um entwicklungsbedingte bzw. degenerative Veränderungen auszuschließen. Zum Erhalt der Partikel in nativer Form wurde auf den Zusatz von Detergenz bei der Zellyse verzichtet und die Auflösung der Zellverbände, sowie das Aufbrechen der Zellen rein mechanisch mit Hilfe eines Dounce-Homogenisators durchgeführt. In einem ersten Zentrifugationsschritt wurden bei 16.000 xg intakte Zellen, Zellkerne und größere Zellorganellen, wie Mitochondrien, abgetrennt. Der Überstand wurde anschließend bei 100.000 xg in die unlöslichen Zellbestandteile, wie Golgi-Apparat, ER, insbesondere rER, sowie Polysomen und die löslichen Kompartimente, wie Membranvesikel (Golgi-Vesikel, ER-Vesikel), freie Proteine und RNA getrennt. Viele bislang bekannten Ribonucleoprotein- (RNP-) Komplexe liegen in löslicher Form in der Zelle vor und sollten sich somit im Überstand (S100) befinden. Zunächst wurde die Konzentration an gesamtem Protein in den einzelnen Fraktionen der differentiellen Zentrifugation - Zellhomogenat (Hom), Sediment nach der ersten Zentrifugation (P16), der korrespondierende Überstand (S16), sowie Überstand und Sediment nach der zweiten Zentrifugation (P100 & S100) - mittels Bradford-Test bestimmt.

Fraktion	Proteingehalt	Konzentration in Prozent
Hom	38 mg	100%
P16	20,2 mg	50%
S16	19,7 mg	50%
P100 (aus S16)	3,8 mg	10%
S100 (aus S16)	15,6 mg	40%

Tabelle 1 Gesamtproteingehalt in den einzelnen Fraktionen der differentiellen Zentrifugation: Der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen - Zellhomogenat (Hom), Sediment nach 16.000 xg (P16), Überstand nach 16.000 xg (S16), sowie Sediment (P100) und Überstand (S100) nach 100.000 xg - wurde mittels Bradford-Test bestimmt. Die Sedimente wurden dazu zuvor in Lysepuffer gelöst. Um den Proteingehalt der einzelnen Fraktionen ins Verhältnis zueinander zu setzen, wurde der des Homogenats gleich 100% gesetzt.

Anschließend wurde jeweils die gleiche Menge Gesamtprotein aus den einzelnen Fraktionen über **SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)** aufgetrennt. Die beiden Staufen Proteine wurden dann im Western-Blot mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen und die jeweilige Signalintensität im Vergleich zueinander abgeschätzt.

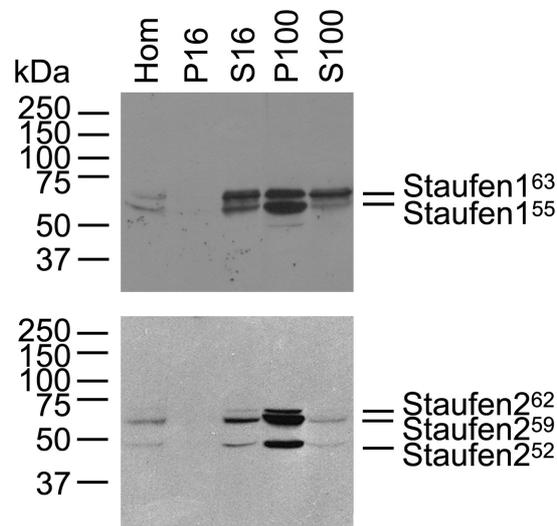


Abbildung 16 intrazelluläre Verteilung von Staufen1 und Staufen2: Der Cortex junger adulter Ratten wurde in detergentenfreiem Lysepuffer homogenisiert und anschließend bei 16.000 xg und 100.000 xg zentrifugiert. Die Proteine der jeweiligen Fraktionen der differentiellen Zentrifugation - Zellhomogenat (Hom), Sediment nach 16.000 xg (P16), der korrespondierende Überstand (S16), sowie Überstand und Sediment nach der zweiten Zentrifugation (P100 & S100) - wurden Chloroform-Methanol extrahiert, anschließend über SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit Maus-anti-Staufen1 und Kaninchen-anti-Staufen2 immun-detektiert. Zum Vergleich wurden jeweils 50 µg Gesamtprotein pro Fraktion geladen.

Im oberen Teil von Abbildung 16 ist die Verteilung von Staufen1 auf die einzelnen Fraktionen der differentiellen Zentrifugation dargestellt. Während Staufen1 nur in geringer Menge im Homogenat vorliegt, ist es im S16 deutlich angereichert. Im P16 läßt es sich dagegen mit dieser Analyseverfahren nicht nachweisen. Nach der zweiten Zentrifugation liegt Staufen1 zu etwa 75% im P100 und 25% im S100 vor. Die beiden Isoformen des Proteins zeigen ein deutlich unterschiedliches Verhalten. Während die 55 kDa Isoform nahezu ausschließlich sedimentiert (ca. 90% im P100), liegt Staufen1⁶³ zu etwa 40% im S100 vor. Setzt man die abgeschätzte Signalintensität unter Berücksichtigung der jeweiligen Gesamtproteinkonzentration (10% im P100 zu 40% im S100) zueinander in Beziehung, läßt sich die prozentuale Verteilung der Staufen1 Proteine auf die einzelnen Fraktionen bestimmen, wie die folgende Tabelle zeigt.

3. Ergebnisse

	Staufen1	Staufen1⁵⁵	Staufen1⁶³
P100 gebundenes Protein	50%	75%	33,3%
lösliches Protein im S100	50%	25%	66,6%

Tabelle 2 prozentuale Verteilung von Staufen1 in der differentiellen Zentrifugation: Die jeweilige Konzentration an Staufen1 wurde über die Signalintensität im Western-Blot abgeschätzt und anschließend, unter Berücksichtigung des Gesamtproteinverhältnisses, in Beziehung gesetzt. Es ist die Gesamtverteilung für Staufen1, sowie die Verteilung für die einzelnen Isoformen auf die jeweiligen Fraktionen der differentiellen Zentrifugation dargestellt.

Dieses Ergebnis der biochemischen Analyse zeigt eine deutliche Übereinstimmung mit den Daten aus der Immunfluoreszenz. In der Färbung war ein Großteil des Staufen1 Proteins im Zellkörper konzentriert. Dieser Teil zeigte eine deutliche Colokalisation zum ER. In der differentiellen Zentrifugation sedimentiert etwa 50% des Proteins im P100 und ist damit wahrscheinlich mit dem ER/rER assoziiert. Demgegenüber lag ein weiterer Teil von Staufen1 in der Immunfluoreszenz als dendritisch-lokalisierte Partikel vor. Dieser entspricht dem löslichen Anteil an Protein im S100 der differentiellen Zentrifugation. In der Immunfluoreszenz erschien der somatische Anteil an Staufen1 viel höher als der partikuläre in Dendriten. Berücksichtigt man aber die Länge der Dendriten und damit den Anteil, den diese am Volumen der Zelle ausmachen, so erscheint es durchaus möglich, daß das Verhältnis 1:1 beträgt. Durch die Daten der differentiellen Zentrifugation lassen sich die beiden Formen der Immunfluoreszenz nun eindeutig charakterisieren. Während es zuvor nur auf zellulärer Ebene möglich war, den Zellkörper-gebundenen vom partikulären Anteil zu unterscheiden, lassen sich nun mit den biochemischen Daten die beiden Staufen1 Isoformen dem unterschiedlichen Verhalten zuordnen. Die Verteilung der einzelnen Isoformen auf die jeweiligen Fraktionen kann logischerweise nicht ausschließlich erfolgen, da die biochemische Trennung über die Sedimentationsgeschwindigkeit nicht zu 100% möglich ist. Staufen1⁵⁵ ist aber die hauptsächlich ER/rER-assoziierte Isoform, wohingegen Staufen1⁶³ überwiegend als lösliches Protein in der Zelle vorliegt. Daneben kommt Staufen1⁶³ auch unlöslich in Form hochmolekularer Granula in Neuronen vor (Krichevsky und Kosik, 2001). Diese Komplexe enthalten neben Staufen1⁶³ auch mRNA und dicht gepackte Ribosomencluster und stellen vermutlich Translations-inkompetente Speicher für lokalisierte mRNA dar. Da diese Strukturen laut Krichevsky und Kosik einen höheren Sedimentationskoeffizienten als Polysomen besitzen, sollten sie im P100 sedimentieren. Diese Granula erklären den größeren Anteil (33% statt 25%) im P100.

Im unteren Teil der Abbildung 16 sieht man die Western-Blot Analyse der differentiellen Zentrifugation mit Staufen2-spezifischen Antikörpern. Staufen2 ist nur in geringer Menge im Homogenat enthalten. Während es sich im P16 nicht nachweisen läßt, ist seine Konzentration im S16 verglichen zum Homogenat leicht erhöht. Bei 100.000 xg sedimentiert Staufen2 nahezu ausschließlich (etwa 95% im P100), nur ein geringer Anteil (etwa 5%) liegt in löslicher Form im S100 vor. Über die Verteilung der einzelnen Isoformen läßt sich keine eindeutige Aussage treffen. Staufen2⁵⁹ ist das häufigste Staufen2 Protein in allen Fraktionen, wohingegen die beiden anderen Isoformen nur in geringer Menge vorkommen. Staufen2⁵² ist dabei etwas häufiger als Staufen2⁶² vertreten. Eine klare Präferenz einzelner Isoformen, wie für Staufen1 beobachtet, läßt sich für Staufen2 nicht feststellen.

Setzt man wiederum die abgeschätzte Signalintensität unter Berücksichtigung der jeweiligen Gesamtproteinkonzentration (10% im P100 zu 40% im S100) in Beziehung, läßt sich die prozentuale Verteilung von Staufen2 auf die einzelnen Fraktionen bestimmen.

	Staufen2
P100 gebundenes Protein	86%
lösliches Protein im S100	14%

Tabelle 3 prozentuale Verteilung von Staufen2 in der differentiellen Zentrifugation: Die jeweilige Konzentration an Staufen2 wurde über die Signalintensität im Western-Blot abgeschätzt und anschließend, unter Berücksichtigung des Gesamtproteinverhältnisses, in Beziehung gesetzt.

Das Ergebnis der biochemischen Untersuchung scheint für Staufen2 nicht so gut mit den Daten aus der Antikörperfärbung übereinzustimmen. In der Immunfluoreszenz erschien der Anteil an Staufen2 im Zellkörper geringer als der für Staufen1. Dagegen war die Anzahl der dendritischen Partikel deutlich höher. Dies hätte vermuten lassen, daß der lösliche Anteil an Staufen2 im S100 deutlich mehr als 50% beträgt. Tatsächlich liegt aber nach der differentiellen Zentrifugation 86% des Proteins gebunden im P100 vor.

3.3 Isolierung löslicher Staufen Komplexe aus Rattenhirn

Durch den ersten Reinigungsschritt, der differentiellen Zentrifugation, ist es möglich, den Anteil an Staufen Protein, welcher mit ER/rER assoziiert ist, von den löslichen Komplexen zu trennen. Neben den Staufen-enthaltenden Proteinprikteln sind aber im S100 eine Vielzahl weiterer Komplexe, Proteine, Vesikel und cytoplasmatische RNA enthalten. Als nächster Reinigungsschritt wurde die Gelfiltrations-Chromatographie ausgewählt. Die auch Ausschlußvolumenchromatographie genannte Gelchromatographie basiert auf der unterschiedlichen Permeation der Analyten in ein poröses Trägermaterial mit kontrollierter Porengröße, wodurch eine Trennung der gelösten Moleküle nach ihrer Größe erfolgt. Diese Methode hat den Vorteil, daß die Partikel in nativer Form erhalten werden können, da es zu keiner direkten Interaktion zwischen der Matrix und dem Analysegemisch kommt. Das Trägermaterial wird für unterschiedliche Anwendungen als fertige Säule angeboten. Für die gestellten Anforderungen bot sich eine Sephacryl S-300 HR Säule an, die für die quantitative Trennung von Proteinkomplexen zwischen 2 MDa und 50 kDa optimiert ist. Die Größe der in den einzelnen Fraktionen enthaltenen Proteine und Komplexe wurde zuvor in einer Eichung mit Proteinen bekannten Molekulargewichts bestimmt. Um die Verteilung der Staufenproteine innerhalb der einzelnen Größenbereiche zu untersuchen, wurden Fraktionen von jeweils 3 ml gesammelt und die enthaltenen Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Im Western-Blot sind die Proteine dann mit spezifischen Antikörpern nachweisbar. Um die beobachteten Signale eindeutig den einzelnen Staufen Isoformen zuzuordnen zu können, wurde als Positiv-Kontrolle jeweils der Extrakt hippocampaler Neuronen der Ratte aufgetragen. In Abbildung 17 ist ein repräsentativer Western-Blot dargestellt. Der oberste Blot wurde mit Staufen1-spezifischen Antikörpern inkubiert. Staufen1 zeigt mindestens drei Maxima im untersuchten Bereich. Das erste befindet sich im oberen Trennbereich der Säule (90 ml bis 99 ml) und stellt hochmolekulare Komplexe von über 2 MDa dar. In diesen Fraktionen kommen beide Isoformen vor, wobei die 63 kDa Isoform deutlich stärker vertreten ist. In einem Bereich mit einem Molekulargewicht von circa 650 kDa bis 800 kDa (111 ml bis 120 ml) befindet sich das zweite Maximum. In diesen Fraktionen ist fast ausschließlich die 63 kDa Isoform repräsentiert. Die dritte Anreicherung (168 ml bis 201 ml) findet sich im niedermolekularen Trennbereich der Säule. Die Fraktionen enthalten hier Proteine eines Molekulargewichts von etwa 150 kDa bis 50 kDa. Staufen1 liegt hier ausschließlich in der 63 kDa Isoform vor. Während die beiden erstgenannten Maxima jeweils einen scharf umgrenzten Bereich von etwa 3 Fraktionen (9 ml) umfassen,

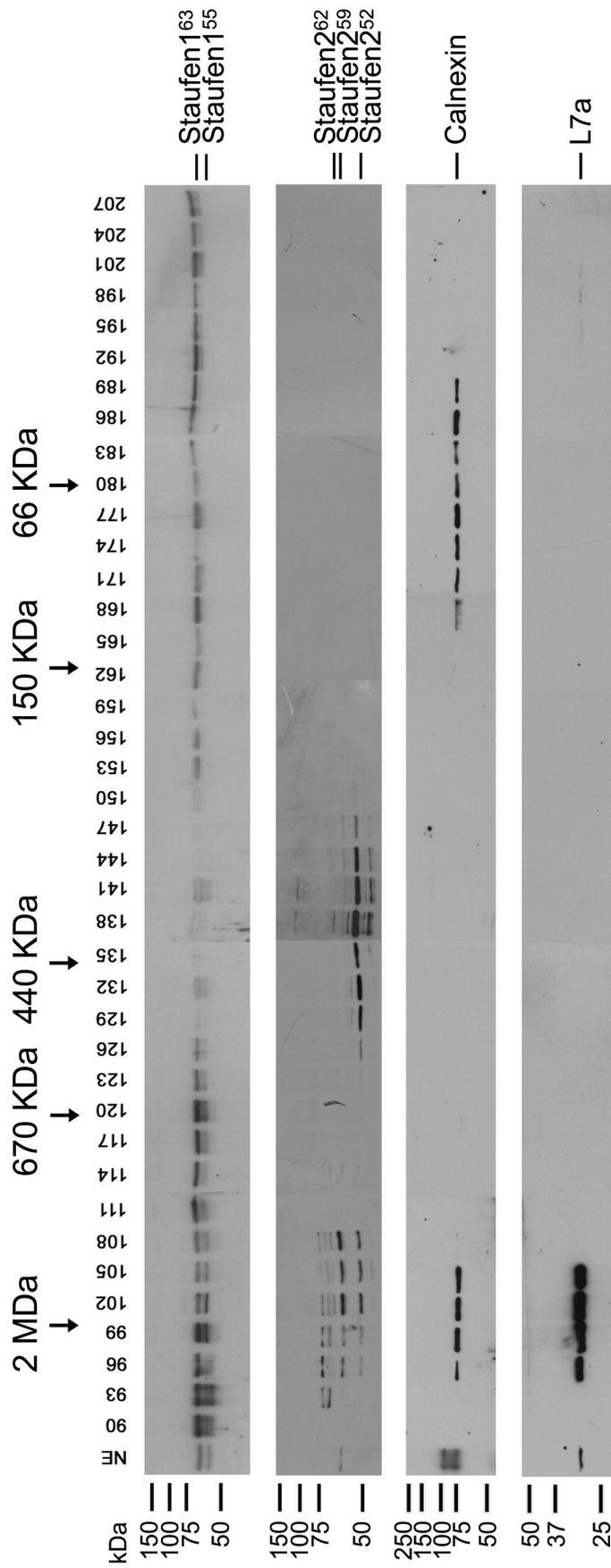


Abbildung 17 Gelfiltrationsanalyse der löslichen Staufen Komplexe: Der S100 von Rattenhirn Homogenat wurde über Gelfiltration aufgetrennt. Die Proteine der einzelnen Fraktionen wurden nach TCA-Fällung mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit spezifischen Antikörpern gegen Staufen1, Staufen2, Calnexin und L7a immunodetektiert.

3. Ergebnisse

verteilt sich Staufen1 hier über mehr als 33 ml. Dies ist auf die verwendete Methode zurückzuführen und läßt sich auch mit den zur Eichung verwendeten Proteinen beobachten. Die kleinen Analyten verweilen sehr viel länger im Trägermaterial und unterliegen dann nach einer gewissen Zeit den Gesetzen der Diffusion. Aus diesem Grund weiten sich die Maxima am unteren Ende der Trennleistung der Säule auf.

Der zweite Western-Blot in Abbildung 17 zeigt die Analyse mit Staufen2-spezifischen Antikörpern. Innerhalb der Trennleistung der Säule lassen sich hier zwei deutlich voneinander getrennte Maxima unterscheiden. Das Erste (96 ml bis 108 ml) repräsentiert einen Größenbereich von etwa 2 MDa. In diesen Fraktionen kommt hauptsächlich die 59 kDa Isoform vor. Wie bereits im Kapitel zur Charakterisierung der Antikörper dargestellt, erkennt der Antikörper im Neuronenextrakt nur diese Isoform, welche offensichtlich am stärksten exprimiert wird. Zu einem geringeren Anteil ist auch die 52 kDa Isoform vorhanden. Die 62 kDa Isoform, welche insgesamt am seltensten vorkommt, ist nur in den Fraktionen 102 ml bis 108 ml vorhanden. Neben diesen klar definierten Staufen2 Isoformen werden noch zwei weitere Proteine von circa 68 kDa und 73 kDa erkannt. Während diese Banden in allen durchgeführten Gelfiltrationsexperimenten in gleicher Form auftraten, wurden weder in Hirnextrakten noch in Extrakten aus hippocampalen Neuronen Proteine vergleichbarer Größe vom Antikörper detektiert. Vermutlich werden die Proteine erst durch die Gelfiltration soweit angereichert, daß sie über das Antiserum nachweisbar sind. Da beide ausschließlich mit Staufen2 cofraktionieren ist es unwahrscheinlich, daß die Banden auf unspezifische Kreuzreaktion der Antikörper zurückzuführen sind. Möglicherweise sind die beiden Proteine auf spezifische Modifikationen von Staufen2 innerhalb der Komplexe zurückzuführen. Das zweite Maximum (129 ml bis 144 ml) ist vom ersten deutlich abgegrenzt und enthält Proteine bzw. Proteinkomplexe mit einem Molekulargewicht von etwa 440 kDa. In diesem Bereich liegt nur die 52 kDa Isoform vor. Weiterhin werden auch in diesen Staufen2-positiven Fraktionen wieder zusätzliche Proteine von den Antikörpern erkannt. Die Intensität der Banden ist aber im Vergleich zum Staufen2⁵²-Signal sehr gering. Die erkannten Proteine lassen sich somit möglicherweise auf unvollständige Denaturierung der Proteine oder unspezifischen Abbau durch Proteasen erklären.

Im Vergleich zu Staufen1 sind die Staufen2 Komplexe kleiner, etwa 2 MDa und 440 kDa. Auffallend ist auch, daß Staufen2 in freier, also monomerer Form nicht nachzuweisen ist. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz haben klar gezeigt, daß die Staufen1 und Staufen2 Partikel nebeneinander im Dendriten vorliegen und nicht Bestandteile desselben Komplexes darstel-

len. Im Bereich der hochmolekularen Komplexe (etwa 2MDa) kann eine Cofraktionierung der beiden Stufen Proteine nicht ausgeschlossen werden, obwohl die Maxima nicht in den gleichen Fraktionen vorliegen. Die kleineren Komplexe (700 kDa und 440 kDa) liegen dagegen völlig getrennt voneinander vor. Dies stimmt mit den Daten aus der Färbung überein und spricht dafür, daß es sich bei den isolierten Komplexen um die auf zellulärer Ebene beobachteten Stufen Partikel handelt.

Die Ergebnisse der zellulären Verteilung sprechen dafür, daß beide Stufen Proteine teilweise mit rER assoziiert sind. Auch in der Literatur wurde vielfach eine spezifische Interaktion von Stufen1 mit Ribosomen und ER beschrieben (Marión *et al.*, 1999; Wickham *et al.*, 1999; Kiebler *et al.*, 1999; Krichevsky & Kosik, 2001; Luo *et al.*, 2001) sowie gezeigt, daß Stufen2 mit Ribosomen interagieren kann (Duchaîne *et al.*, 2002). Während der differentiellen Zentrifugation werden rER und Polysomen weitgehend abgetrennt. Ribosomen und ER-Vesikel liegen dagegen gemeinsam mit den löslichen Komplexen im S100 vor. Um zu überprüfen, ob die in der Gelfiltration getrennten Fraktionen ER und Ribosomen enthalten, wurde im folgenden auf die Gegenwart von Calnexin, einem Protein im ER, und L7a, einer Komponente der kleinen Ribosomen-Untereinheit, getestet.

Das Ergebnis ist in der unteren Hälfte von Abbildung 17 dargestellt. Im Trennbereich der Säule finden sich zwei Maxima für Calnexin. Das Erste liegt im hochmolekularen Bereich um etwa 2 MDa. Hier cofraktioniert Calnexin mit Stufen1 und Stufen2, wobei die Maxima der einzelnen Proteine aber nicht übereinstimmen. Das zweite liegt im niedermolekularen Bereich um 70 kDa. Da das Protein ein Molekulargewicht von 75 kDa besitzt, handelt es sich hierbei wahrscheinlich um Monomere. L7a cofraktioniert ausschließlich mit dem hochmolekularen Maximum für Calnexin; Monomere finden sich nicht. Da beide Proteine gemeinsam in den hochmolekularen Fraktionen vorliegen, enthalten diese rER. Theoretisch sollte dieses zwar nach der differentiellen Zentrifugation im P100 vorliegen, doch wie bereits erläutert, kann keine vollständige Trennung über die Sedimentationsgeschwindigkeit erfolgen.

Zusammenfassend lassen sich folgende Punkte festhalten. Als lösliches Protein im S100 liegt Stufen1 überwiegend in der 63 kDa Isoform vor. Die 55 kDa Isoform findet sich lediglich zu einem geringen Teil in den hochmolekularen Fraktionen der Gelchromatographie. Dies entspricht den Ergebnissen der differentiellen Zentrifugation, welche nahelegen, daß Stufen1⁶³ die lösliche Isoform und Stufen1⁵⁵ die ER/rER-gebundene Form darstellt. Stufen1 kommt zum einen monomer bzw. in einem niedermolekularen Komplex mit einem Molekulargewicht

3. Ergebnisse

von bis zu etwa 150 kDa vor. Außerdem finden sich im S100 zwei hochmolekulare Staufen1 Komplexe mit einer Größe von mehr als 2 MDa und etwa 700 kDa. Der größere Komplex cofraktioniert zumindest teilweise mit rER und enthält Staufen1⁵⁵. Es handelt sich hierbei vermutlich um gebundenes Staufen1, welches während der differentiellen Zentrifugation nicht vollständig abgetrennt wurde. Dieser Komplex wird im folgenden, analog den mikroskopischen Daten (Kiebler *et al.*, 1999) Staufen1 Granula genannt. Dagegen enthalten die Fraktionen, in denen sich das Maximum für den löslichen 700 kDa Staufen1 Komplex befindet, weder ER noch Ribosomen. Im folgenden wird dieser als Staufen1 Partikel bezeichnet.

Staufen2 kommt in löslicher Form ausschließlich in zwei hochmolekularen Komplexen von etwa 2 MDa und 440 kDa vor. Während sich die Isoformen in der differentiellen Zentrifugation weitgehend gleich verhalten, zeigen sie eine deutliche Präferenz für jeweils einen der beiden mittels Gelfiltration aufgetrennten Komplexe. Staufen2⁵⁹ und Staufen2⁶² liegen ausschließlich im 2 MDa Komplex vor. Dagegen reichert sich Staufen2⁵² deutlich in den Fraktionen um 440 kDa an. Die hochmolekularen Komplexe cofraktionieren wie auch die für Staufen1 teilweise mit rER. Möglicherweise stellen sie an rER gebundenes Staufen2 dar, das in der differentiellen Zentrifugation unvollständig abgetrennt wurde. Diese Komplexe sollen im folgenden, analog zu Staufen1, als Staufen2 Granula bezeichnet werden. Aufgrund der zumindest partiellen Cofraktionierung beider Granula läßt sich ein Vorliegen beider Staufen Proteine im selben Komplex nicht vollständig ausschließen. Dies stimmt auch mit Beobachtungen aus der Immunfluoreszenz überein, nach denen eine Colokalisierung der beiden Proteine im Bereich des Zellkörpers möglich ist. Die kleineren Staufen2 Komplexe, im folgenden Staufen2 Partikel genannt, liegen dagegen in Fraktionen vor, die kein Staufen1 Protein enthalten. Auch dies stimmt mit den Ergebnissen auf zellulärer Ebene überein. So befinden sich die Staufen1 und Staufen2 Partikel zwar gemeinsam in Dendriten, die Doppelfärbung konnte aber ausschließen, daß beide Teil desselben Komplexes sind. Die vorliegenden Ergebnisse sprechen dafür, daß die Granula Komplexe darstellen, die für gewöhnlich nicht in der löslichen Fraktion des S100 auftreten, sondern vielmehr assoziiert mit rER im P100 sedimentieren. Da aber Ribosomen sowohl in Dendriten vorkommen, als auch erwiesenermaßen mit Staufen1 und Staufen2 interagieren (Marión *et al.*, 1999; Duchaine *et al.*, 2002) kann nicht ausgeschlossen werden, daß es sich bei den beobachteten Granula um Staufen-Ribosomen Komplexe handelt, welche in Dendriten zu beobachten sind. Um die Daten der Gelfiltrationsanalyse auf zellulärer Ebene zu überprüfen, wurde im folgenden eine Doppelfärbung für Staufen2 und L7a durchgeführt. Diese sollte klären, ob die beiden Proteine in Dendriten colokalisieren und

somit beide gemeinsam in zumindest einem Teil der Partikel vorliegen. Das Ergebnis der Immunfluoreszenzfärbung eines reifen Neurons zeigt Abbildung 18.

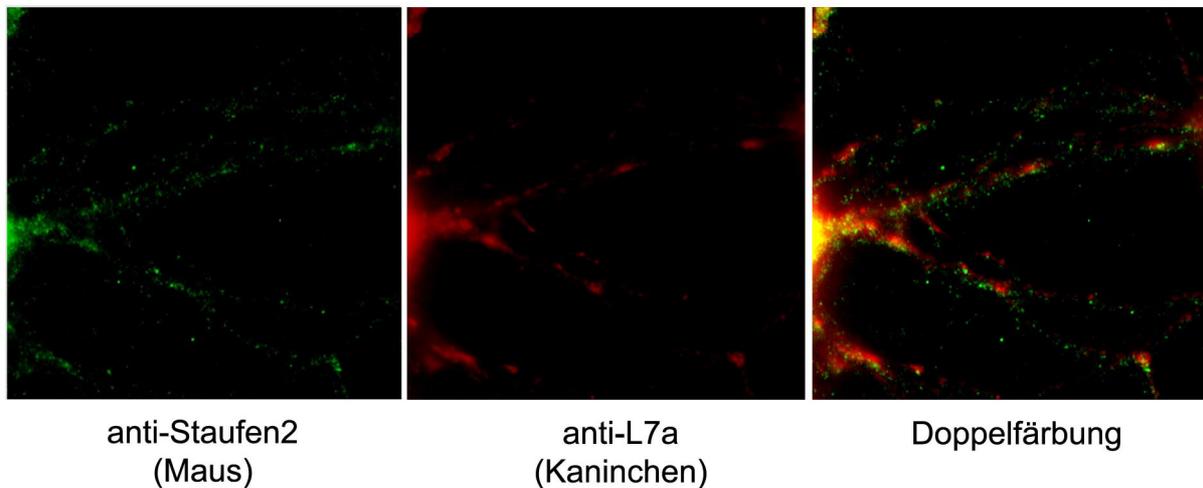


Abbildung 18 Vergleich der intrazellulären Verteilung von Staufen2 und L7a: Doppelfärbung eines reifen hippocampalen Neurons der Ratte mit Maus-anti-Staufen2 und Kaninchen-anti-L7a. Zur Amplifizierung des Staufen2 Signals wurde eine Biotin-Streptavidin-Kaskade verwendet.

In den Dendriten kommt Staufen2 in feinen Partikeln vor. Diese sind über die gesamte Länge des Dendritenbaumes verteilt. Dagegen liegen wenige, große L7a Komplexe hauptsächlich in den Verzweigungspunkten der Dendriten vor. Die L7a Komplexe erscheinen größer als die Staufen2 Partikel; ob dies tatsächlich der Fall ist, kann auf diese Weise nicht festgestellt werden, da die Immunfluoreszenz keine Rückschlüsse auf eine eventuelle Größe beobachteter Strukturen zulässt. Die Doppelfärbung zeigt aber deutlich, daß eine Colokalisierung der beiden Proteine im Bereich der Dendriten ausgeschlossen werden kann. Die teilweise Übereinstimmung ist auf das im Vergleich zu Staufen2 stärkere L7a Signal zurückzuführen und rein zufällig. Auch in von Indradeo Hemraj durchgeführten Doppelfärbungen mit Calnexin und Staufen2 (Duchaîne *et al.*, 2002), konnte keine Colokalisierung der beiden Proteine im dendritischen Bereich beobachtet werden. Diese Ergebnisse schließen aus, daß die Granula, welche Calnexin und L7a zusammen mit Staufen2 enthalten, in den Dendriten von Neuronen vorliegen. Vielmehr deuten alle Resultate darauf hin, daß die isolierten 700 kDa Staufen1 Komplexe und die 440 kDa Staufen2 Komplexe die in Dendriten beobachteten Partikel repräsentieren.

3.4 Charakterisierung der Staufen Partikel

Nach der biochemischen Isolierung der Staufen-enthaltenden Partikel sollte deren molekulare Zusammensetzung näher charakterisiert werden. In Versuchen mit Staufen1-GFP transfizierten Neuronen konnte die Bildung von Partikeln beobachtet werden, welche im folgenden Mikrotubuli-abhängig transportiert wurden (Köhrmann *et al.*, 1999). Da das Staufen Protein selbst keine Motordomäne enthält, welche einen solchen Transport vermitteln könnte, muß es möglicherweise indirekt an ein entsprechendes Motorprotein binden. Grundsätzlich gibt es zwei verschiedene Typen Mikrotubuli-assoziiierter Motorproteine, cytoplasmatisches Dynein und Kinesin. Dynein wandert entlang der Mikrotubuli zum Minus-Ende, Kinesin (normalerweise) zum Plus-Ende (Ausnahme: unkonventionelles Kinesin). In Neuronen von Säugern kommt eine Vielzahl von Kinesinen vor (Miki *et al.*, 2001). Der überwiegende Teil beschränkt sich auf das Axon, in dem alle Mikrotubuli in Plus-Richtung zur Synapse verlaufen. Nur wenige Kinesine wurden bisher auch in Dendriten nachgewiesen. Während der Nahtransport in Dendriten über das Actin-Cytoskelett vermittelt wird, sind die Mikrotubuli für den Ferntransport bidirektional angelegt. Somit ist es möglich, mit dem selben Motorprotein einen Transport in beide Richtungen durchzuführen (Baas *et al.*, 1989). In *Drosophila melanogaster* wurde bereits ein Kinesin-abhängiger Transport der Staufen Partikel beschrieben (Brendza *et al.*, 2000). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Fraktionen der Gelfiltration auf die Gegenwart von Tubulin und Kinesin getestet, um zu überprüfen, ob der Transport in Säuger Neuronen ebenfalls über ein Kinesin vermittelt wird. Für die Detektion von Tubulin wurde ein spezifischer Antikörper gegen β -Tubulin verwendet; der Nachweis von Kinesin erfolgte mit einem affinitätsgereinigten Antikörper gegen die hochkonservierte Motordomäne. Das Ergebnis ist in Abbildung 19 dargestellt. Zur Orientierung sind die Staufen-enthaltenden Fraktionen als Balken dargestellt. Der oberste Blot zeigt die Verteilung von β -Tubulin auf die einzelnen Fraktionen der Gelfiltration. Das Protein liegt angereichert in zwei Maxima vor. Das Erste befindet sich im Bereich der Staufen1 Partikel (108 ml bis 117 ml). Das zweite Maximum liegt im unteren Trennbereich der Säule (162 ml bis 183 ml) und umfaßt einen Größenbereich von etwa 120 kDa bis 50 kDa. Da die Aufarbeitung des Materials auf Eis erfolgt, sollten die Mikrotubuli depolymerisiert vorliegen. Demzufolge ist zu erwarten, daß der Großteil des Tubulins als Monomer bzw. Dimer vorliegt. Das Kinesin-spezifische Antiserum erkennt im Neuronenextrakt ein Protein von etwa 120 kDa (Abbildung 19 Mitte). Das häufigste Kinesin ist *Kinesin-Heavy-Chain* (KHC) mit einem Molekulargewicht von 120 kDa. In den Fraktionen der Gelfiltration kommt KHC von 99 ml bis 150 ml vor. Das Maximum liegt eindeutig im Be-

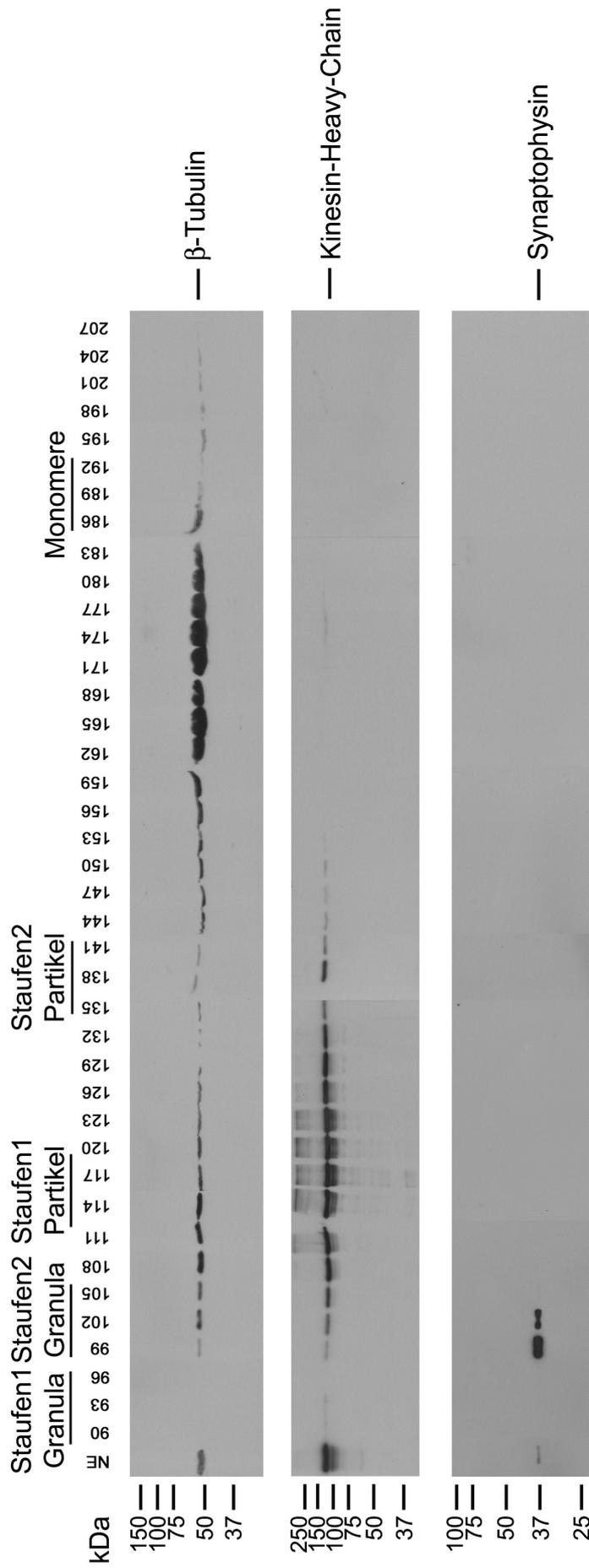


Abbildung 19 Gelfiltrationsanalyse der löslichen Staufen Komplexe: Der S100 aus Rattenhirn Homogenat wurde über Gelfiltration aufgetrennt. Die Proteine der einzelnen Fraktionen wurden mit TCA gefällt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit spezifischen Antikörpern gegen β -Tubulin, Kinesin-Heavy-Chain und Synaptophysin immunodetektiert.

3. Ergebnisse

Bereich der Staufen1 Partikel (108 ml bis 126 ml). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen deutlich, daß Staufen1 zusammen mit β -Tubulin und KHC cofraktioniert und die Maxima in den gleichen Fraktionen liegen, es kann aber keineswegs belegt werden, daß Staufen1 und KHC Teil desselben Komplexes sind. In Neuronen wurde KHC bislang hauptsächlich als Motor für synaptische Vesikel beschrieben (Gho *et al.*, 1982; Ellure *et al.*, 1995). Diese werden im Axon transportiert und stehen in keinem Zusammenhang mit dendritischen Partikeln. Da die Gel-filtration lösliche Partikel lediglich aufgrund ihres Molekulargewichts trennt, kann nicht ausgeschlossen werden, daß synaptische Vesikel eine ähnliche Größe wie die Staufen1 Partikel besitzen und daher zufällig cofraktionieren. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde im folgenden ein Blot mit Antikörpern gegen Synaptophysin, einem Hauptprotein synaptischer Vesikel, inkubiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 19 unten dargestellt. Das Protein und damit die synaptischen Vesikel beschränken sich ausschließlich auf den hochmolekularen Trennbereich der Säule, wo es mit den Staufen2 Granula cofraktioniert. Die Fraktionen, welche KHC, β -Tubulin und Staufen1 enthalten, sind frei von Synaptophysin. Eine zufällige Cofraktionierung der Staufen1 Partikel und synaptischer Vesikel kann damit ausgeschlossen werden.

Mit den vorliegenden Ergebnissen besteht die Möglichkeit, daß die löslichen Staufen1 Partikel mit einem Molekulargewicht von etwa 700 kDa KHC enthalten und dieses als Motorprotein den Transport der Komplexe in die Dendriten vermittelt. Die nächsten Experimenten sollten nun klären, ob die Staufen1 Partikel tatsächlich Dendriten-spezifische RNAs enthalten und damit für die Lokalisation dieser Transkripte eine Rolle spielen.

3.5 Interaktion von Staufen und RNA in den isolierten Partikeln

In den Versuchen mit Staufen1-GFP transfizierten Neuronen (Köhrmann *et al.*, 1999) konnte eine Colokalisation der Transportpartikel und Nucleinsäuren nachgewiesen werden. Die verwendete Methode erlaubt aber keine Rückschlüsse auf die Natur der Nucleinsäure. Lediglich in *in vitro* Studien mit dem Säuger Staufen Protein wurde eine spezifische Bindung an dsRNA gezeigt (Marión *et al.*, 1999). In den folgenden Experimenten wurde getestet, ob die Staufen Komplexe RNA enthalten und damit RNP-Partikel darstellen. Durch Inkubation mit einer RNase sollte zunächst eventuell vorhandene RNA entfernt werden, um dann mit den schon zuvor verwendeten biochemischen Methoden zu untersuchen, ob die Komplexe eine Veränderung bezüglich ihrer Größe oder ihrer Assoziationspartner erfahren haben.

Als Ausgangsmaterial wurde zunächst der S16 verwendet, da in den bisher durchgeführten Versuchen kein Staufen im P16 nachgewiesen werden konnte. Um zu gewährleisten, daß eventuelle Beobachtungen auch wirklich auf das Entfernen der RNA zurückzuführen sind, wurden neben der Inkubation mit RNase A auch zwei Kontrollen mit RNase-freier DNase I und Puffer ohne Nuclease durchgeführt. Anschließend wurde der S16 wie zuvor im zweiten Zentrifugationsschritt bei 100.000 xg in unlösliche Zellkomponenten und lösliche Komplexe getrennt. Der Proteingehalt der jeweiligen Fraktionen der differentiellen Zentrifugation wurde wieder mittels Bradford-Test ermittelt und jeweils gleiche Mengen Gesamtprotein über SDS-PAGE aufgetrennt. Die Analyse der einzelnen Proben mit Hilfe Staufen1- und Staufen2-spezifischer Antikörper zeigt Abbildung 20. Die Intensität der Signale wurde wieder im Verhältnis zueinander geschätzt.

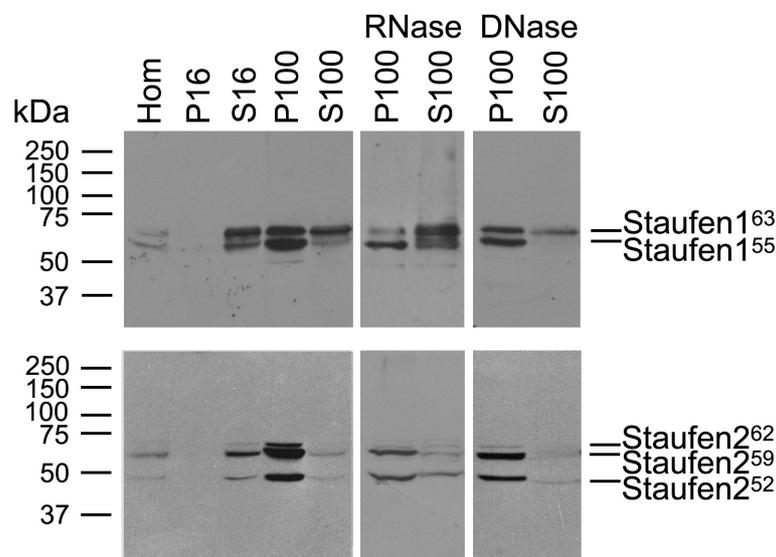


Abbildung 20 Aufhebung der Assoziation von Staufen mit Komponenten, welche im P100 sedimentieren nach RNase Vorbehandlung: Der S16 der differentiellen Zentrifugation wurde zum Teil mit RNase A, mit RNase-freier DNase I oder mit Puffer ohne Nuclease inkubiert und anschließend bei 100.000 xg zentrifugiert. Die Proteine der erhaltenen Fraktionen wurden Chloroform-Methanol extrahiert, über SDS-PAGE aufgetrennt und danach im Western-Blot mit Maus-anti-Staufen1 und Kaninchen-anti-Staufen2 immundetektiert. Zum Vergleich wurden jeweils 50 µg Gesamtprotein pro Fraktion geladen.

Die Verteilung der Staufen1 Proteine auf die jeweiligen Fraktionen in der mit Puffer behandelten Probe entspricht der zuvor an Hand von Abbildung 16 beschriebenen. Die Salzzusammensetzung des Puffers und die Inkubation bei 30°C hat also keinerlei Einfluß auf die Komplexe. In den mit DNase vorbehandelten Proben ist das Signal zwar insgesamt etwas schwächer, die Verteilung der Proteine auf Sediment und Überstand ist aber unverändert mit etwa 90% der 55 kDa Isoform und circa 60% Staufen1⁶³ im P100. Dagegen stellt sich das Verhält-

3. Ergebnisse

nis nach der RNase-Vorbehandlung vollkommen anders dar. Nach der zweiten Zentrifugation liegt Staufen1 zu circa 60% im S100 und 40% im P100 vor. Staufen1⁵⁵ sedimentiert zu 60% im P100, 40% liegen löslich im S100 vor. Die 63 kDa Isoform befindet sich zu etwa 80% im S100 und zu 20% im P100. Die Gesamtproteinkonzentration der einzelnen Fraktionen verändert sich aufgrund der Inkubation nicht, nach wie vor stehen 10% im P100 40% im S100 gegenüber.

Berücksichtigt man das Verhältnis der Proteine im S100 und P100 und berechnet die Konzentration von Staufen1 in den einzelnen Fraktionen mittels der abgeschätzten Verteilung aus dem Western-Blot, so ergibt sich folgendes Bild.

Vorbehandlung		P100 gebundenes Protein	lösliches Protein im S100
RNase	Staufen1	18%	82%
	Staufen1⁵⁵	33%	67%
	Staufen1⁶³	8%	92%
Kontrolle	Staufen1	50%	50%
	Staufen1⁵⁵	75%	25%
	Staufen1⁶³	33%	67%

Tabelle 4 prozentuale Verteilung von Staufen1 in der differentiellen Zentrifugation nach RNase-Vorbehandlung: Die jeweilige Konzentration an Staufen1 wurde über die Signalintensität im Western-Blot abgeschätzt und anschließend unter Berücksichtigung des Gesamtproteinverhältnisses in Beziehung gesetzt. Es ist die Gesamtverteilung für Staufen1, sowie die Verteilung für die beiden Isoformen dargestellt.

Die Verteilung des Staufen1 Proteins auf Sediment und Überstand nach der zweiten Zentrifugation unterscheidet sich nach der RNase Vorbehandlung deutlich von den zuvor erhaltenen Ergebnissen (Kontrolle). Während das Verhältnis des im P100 gebundenen Staufen1 zu den löslichen Staufen1 Komplexen unter nativen Bedingungen etwa 1:1 beträgt, liegt nach Entfernen der RNA ein weitaus größerer Teil von 82% in löslicher Form vor. Die Gegenwart von RNA scheint für das Staufen Protein von entscheidender Bedeutung zu sein. Während die 55 kDa Isoform normalerweise zu 75% ER-assoziiert in der Zelle vorliegt, befindet sie sich nach RNase Vorbehandlung zu 67% im S100. Die Interaktion zwischen Staufen1⁵⁵ und dem ER ist also direkt oder indirekt RNA-abhängig. Staufen1⁶³ kommt in der Zelle überwiegend in der löslichen S100 Fraktion vor. Die Untersuchungen von Krichevsky und Kosik (2001) zeigen aber klar, daß es zu einem gewissen Anteil auch gebunden an Ribosomen und RNA auftritt

und dann im P100 sedimentiert, da die Granula einen höheren Sedimentationskoeffizienten als Polyribosomen besitzen. Durch das Entfernen der RNA könnten diese hochmolekularen Komplexe zerfallen und weiteres Staufen1⁶³ in den S100 freisetzen. So läßt sich erklären, daß unter nativen Bedingungen 67% des Proteins im S100 vorliegt, nach der RNase-Vorbehandlung dagegen 92%.

Das Staufen2 Protein zeigt genau wie Staufen1 keine Veränderung der Verteilung auf die jeweiligen Fraktionen in den mit Puffer-behandelten Proben. In den DNase-vorbehandelten Proben ist das Signal ebenfalls etwas schwächer, aber das Verhältnis ist wiederum unverändert. Somit kann auch für Staufen2 ein Einfluß der Salzzusammensetzung des Puffers, der Inkubation bei 30°C und der DNase I auf die Komplexe ausgeschlossen werden. Die Verteilung des Staufen2 Proteins auf die jeweiligen Fraktionen nach Vorbehandlung mit RNase zeigt aber, wie auch für Staufen1, eine Veränderung. Nach der zweiten Zentrifugation liegt Staufen2 zu etwa 25% im S100 und 75% im P100 vor. Die prozentuale Verteilung von Staufen2 wurde wieder unter der Berücksichtigung, daß 40% des Gesamtproteins im S100 10% im P100 gegenüberstehen, berechnet.

Vorbehandlung	P100 gebundenes Protein	lösliches Protein im S100
RNase	50%	50%
Kontrolle	86%	14%

Tabelle 5 prozentuale Verteilung von Staufen2 in der differentiellen Zentrifugation nach RNase Vorbehandlung: Die jeweilige Konzentration an Staufen2 wurde über die Signalintensität im Western-Blot abgeschätzt und anschließend unter Berücksichtigung des Gesamtproteinverhältnisses in Beziehung gesetzt.

Die Verteilung des Staufen2 Proteins auf Sediment und Überstand nach der zweiten Zentrifugation unterscheidet sich nach der RNase-Vorbehandlung deutlich von den zuvor erhaltenen Ergebnissen (Kontrolle). Während unter nativen Bedingungen der überwiegende Teil des Proteins von 86% gebunden im P100 vorliegt, reduziert sich dieser nach Entfernen der RNA auf etwa 50%. Die Gegenwart von RNA scheint für die Bindung von Staufen2 mit seinen Partnern erforderlich zu sein. Die Untersuchungen von Duchaine *et al.* (2002) zeigen eine spezifische Interaktion zwischen Staufen2 und Ribosomen *in vitro*. Diese kann durch das Entfernen der RNA empfindlich gestört werden. Aus den vorliegenden Ergebnissen läßt sich aber nicht schließen, ob durch die RNase Vorbehandlung rRNA aus den Ribosomen entfernt wird, wodurch diese zerfallen, oder ob die Ribosomen RNA-abhängig direkt oder indirekt an Stau-

3. Ergebnisse

fen2 binden. Insgesamt ist der für Staufen2 beobachtete Effekt nicht so deutlich wie für Staufen1. Dies kann einerseits darauf zurückzuführen sein, daß nur ein Teil der Staufen2 Komplexe RNA-abhängig mit seinen Bindungspartnern in Wechselwirkung tritt. Andererseits könnte die RNA geschützt im Inneren der Proteinkomplexe vorliegen, wodurch der Abbau durch RNase A verhindert wird.

Zusammenfassend kann man feststellen, daß sowohl die im S16 enthaltenen Staufen1 wie auch die Staufen2 Komplexe ein RNA-abhängiges Verhalten zeigen. Durch Entfernen der RNA aus den Komplexen ist die Interaktion der Staufen Proteine mit seinen jeweiligen Bindungspartnern gestört. Daher liegt anschließend ein Teil des normalerweise an unlösliche Zellkomponenten gebundenen Proteins im S100 vor.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen noch keine Aussage darüber zu, ob die in der Gelchromatographie isolierten Staufen Partikel RNA enthalten und damit RNP-Komplexe darstellen. Aus diesem Grund wurden im nächsten Versuch ausschließlich die löslichen Staufen Komplexe im S100 der differentiellen Zentrifugation der RNase-Vorbehandlung unterzogen. Um eine Veränderung der Komplexe aufgrund einer veränderten Salzzusammensetzung oder durch Erwärmen des Ausgangsmaterials auf 30°C auszuschließen, wurde wiederum ein paralleler Kontrollansatz mit Puffer ohne Nuclease durchgeführt. Nach der Inkubation wurden beide behandelten S100 in der Gelfiltration aufgetrennt. Die Proteine in den erhaltenen Fraktionen wurden wie zuvor TCA-gefällt, über SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot auf Staufen1 und Staufen2 getestet. Das Ergebnis der Analyse zeigt Abbildung 21. Im obersten Blot ist die Verteilung von Staufen1 auf die jeweiligen Fraktionen der Kontroll-Gelfiltration dargestellt. Das Protein zeigt im oberen Trennbereich der Säule zwei Maxima. Das Erste (93 ml bis 105 ml) enthält beide Isoformen des Proteins und entspricht den zuvor an Hand von Abbildung 17 beschriebenen Staufen1 Granula. Das zweite Maximum liegt in Fraktionen (120 ml bis 126 ml), die Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa 650 kDa enthalten. Dieses Maximum ist im Vergleich zu Abbildung 17 etwas verschoben. Trotzdem läßt es sich eindeutig den Staufen1 Partikeln zuordnen. Das zuvor beschriebene dritte Maximum im unteren Trennbereich der Säule scheint in diesem Versuch zweigeteilt. Insgesamt entspricht die Verteilung des Staufen1 Proteins auf die einzelnen Fraktionen dem vorherigen Ergebnis. Die Maxima sind allerdings etwas breiter, so daß sich das Protein auf eine größere Anzahl von Fraktionen verteilt. Dies könnte auf die Inkubation bei 30°C zurückzuführen sein, welche möglicherweise den Zusammenhalt der Komplexe negativ beeinflusst.

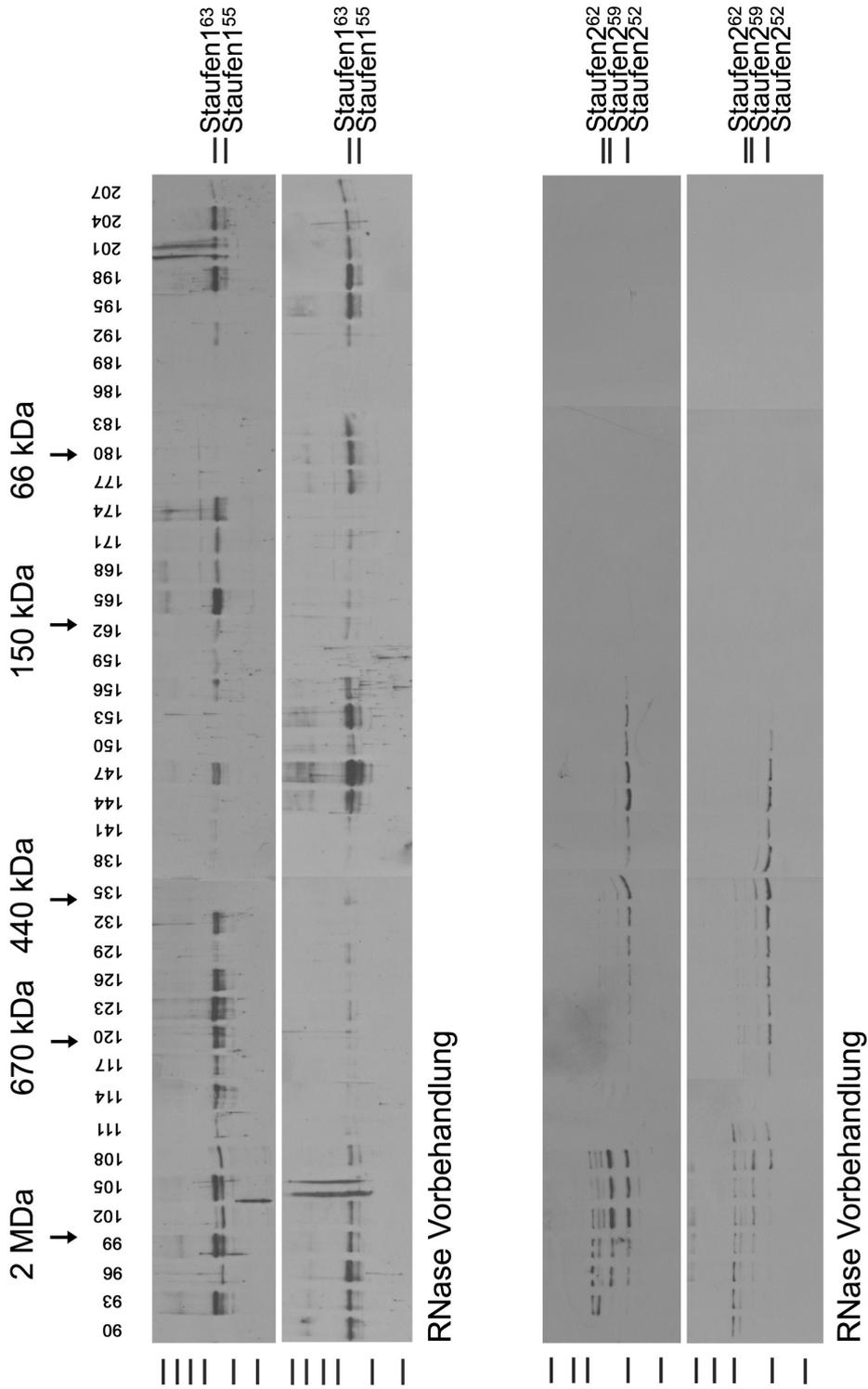


Abbildung 21 Spezifische Größenreduktion der Staufen1 Partikel nach Entfernen der RNA: Der S100 aus Rattenhirn Homogenat wurde einerseits mit RNase und andererseits mit Puffer ohne Nuclease behandelt und anschließend über Gelfiltration aufgetrennt. Die in den Fraktionen enthaltenen Proteine wurden mit TCA präzipitiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und dann mit spezifischen Antikörpern gegen Staufen1 und Staufen2 immunodetektiert. Der jeweils obere Blot zeigt die Analyse der unbehandelten Kontrolle, der untere die der RNase-vorbehandelten Proben.

3. Ergebnisse

Der zweite Blot stellt das Fraktionierungsverhalten der Staufen1 Komplexe nach Vorbehandlung mit RNase dar. Es sind wieder zwei Maxima im oberen Trennbereich der Säule zu beobachten. Das Erste (90 ml bis 108 ml) umfaßt nahezu die gleichen Fraktionen wie in der Kontrolle. Es ist lediglich etwas breiter. Die Staufen1 Granula werden also durch die RNase-Behandlung nicht beeinflusst. Das zweite Maximum (144 ml bis 156 ml) befindet sich in Fraktionen, die Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa 250 kDa enthalten. Es ist also im Vergleich zur Kontrolle (120 ml bis 126 ml, entsprechend 650 kDa) deutlich in den niedermolekularen Bereich verschoben. Die 650 kDa Partikel sind nach Entfernen der RNA nicht mehr vorhanden. Stattdessen treten neue Komplexe mit einem Molekulargewicht von 250 kDa auf. Offensichtlich erfahren die Staufen1 Partikel unter dem Einfluß von RNase eine erhebliche Größenreduktion. Dies kann nicht alleine auf das Entfernen von im Komplex gebundener RNA zurückzuführen sein. Vielmehr scheint der Zusammenhalt der Proteinkomponenten des Partikels die Gegenwart von RNA zu erfordern. Durch das Entfernen der RNA zerfallen die Partikel teilweise und Staufen1 verbleibt zusammen mit weiteren Proteinen in einem stabilen Proteinkomplex von 250 kDa.

Im unteren Teil der Abbildung 21 ist das Ergebnis für Staufen2 aufgeführt. In der Kontrolle (Blot 3) erkennt man deutlich zwei Maxima. Das erste umfaßt die Fraktionen 93 ml bis 108 ml und enthält neben Staufen2⁵⁹ auch Staufen2⁵². Außerdem werden wiederum die zuvor angesprochenen größeren Proteine vom Antikörper erkannt. Es handelt sich um die bereits beschriebenen Staufen2 Granula. Das zweite Maximum liegt im mittleren Trennbereich der Säule (123 ml bis 153 ml) und entspricht den Staufen2 Partikeln aus Abbildung 17. In diesen Fraktionen ist nahezu ausschließlich die 52 kDa Isoform des Proteins vorhanden. Das Maximum für die Staufen2 Partikel ist sehr viel breiter als das zuvor beschriebene. Dies dürfte auf die Inkubation bei 30°C zurückzuführen sein, welche möglicherweise den Zusammenhalt der Komplexe negativ beeinflusst. Im untersten Blot der Abbildung 21 ist das Fraktionierungsverhalten von Staufen2 nach RNase-Vorbehandlung dargestellt. Auch hier zeigen sich zwei Maxima. Das erste umfaßt die Fraktionen 90 ml bis 111 ml und ist damit breiter als das für die Fraktionierung des Kontroll-S100. Es repräsentiert die Staufen2 Granula mit einem Molekulargewicht um 2 MDa. Es ist auffällig, daß die 52 kDa Isoform nur noch in Fraktion 108 ml und 111 ml zu beobachten ist. Auch die hochmolekularen Proteine zeigen ein leicht verändertes Fraktionierungsverhalten. Das zweite Maximum (120 ml bis 150 ml) enthält nahezu ausschließlich Staufen2⁵². Es ist im Vergleich zur Kontrolle um eine Fraktion in den höhermolekularen Bereich verschoben. Eine derartig geringfügige Verlagerung liegt aber im Tole-

ranzbereich und hat daher wahrscheinlich keine Bedeutung. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann nicht belegt werden, ob die Staufen2 Komplexe RNA enthalten und damit RNP-Partikel darstellen.

Zusammengefaßt hat die gelchromatographische Auftrennung des RNase-vorbehandelten S100 ergeben, daß die Staufen1 Granula kein RNase-abhängiges Verhalten zeigen. Die Staufen1 Partikel enthalten RNA und sind damit RNP-Komplexe. Durch Entfernen der RNA aus den Partikeln zerfallen diese teilweise zu einem kleineren Komplex von etwa 250 kDa. Die Staufen2 Partikel zeigen im Gegensatz dazu kein RNase-abhängiges Verhalten. Für die Staufen2 Granula läßt sich kein eindeutiges Ergebnis formulieren. Möglicherweise hat das Entfernen der RNA Einfluß auf in den Granula gebundenes Staufen2⁵². Dieses könnte durch die Behandlung gemeinsam mit weiteren Proteinen freigesetzt werden und anschließend als Staufen2 Partikel fraktionieren. Dies wäre eine Erklärung, warum Staufen2⁵² nach der RNase Vorbehandlung im Granula Bereich fast nicht mehr nachzuweisen ist und das Staufen2 Partikel Maximum leicht in den höhermolekularen Bereich verschoben ist.

Anhand der bislang vorliegenden Ergebnisse steht fest, daß es über differentielle Zentrifugation und Gelfiltration möglich ist, lösliche 700 kDa Staufen1 Komplexe zu isolieren. Diese Partikel sind frei von ER und Ribosomen und enthalten möglicherweise KHC. Der Zusammenhalt der Partikel erfordert RNA, wird diese entfernt, zerfällt der Komplex in einen kleineren Staufen1-enthaltenden Unterkomplex von 250 kDa und weitere Komponenten. Die biochemischen Daten dieser RNP-Komplexe zeigen große Analogie zu Partikeln, welche auf zellulärer Ebene in Dendriten von Neuronen vorliegen. Auch diese RNP-Partikel enthalten Staufen1 und werden Mikrotubuli-abhängig transportiert (Köhrmann *et al.*, 1999). Es besteht also die berechnete Vermutung, daß die isolierten, biochemisch charakterisierten Partikel mit den in der Immunfluoreszenz beobachteten identisch sind.

Für die in Neuronen beobachteten Staufen-RNP-Komplexe wurde eine Funktion für den Transport dendritisch-lokalisierter RNAs postuliert. Aus diesem Grund war es erforderlich, im nächsten Schritt die in den Staufen1 Partikeln enthaltene RNA genauer zu analysieren.

Dazu isolierte Juliane Müller aus den von mir aufgetrennten Fraktionen RNA und bestimmte die Konzentration. Das Ergebnis ist in Abbildung 22 dargestellt. Es lassen sich deutlich zwei Maxima für die RNA Konzentration feststellen. Das Erste liegt im Bereich der Staufen2 Granula (96 ml bis 105 ml). Wie bereits zuvor ausgeführt (siehe Abbildung 17) befindet sich in diesen Fraktionen auch das ribosomale Protein L7a. Daher ist dieses Maximum vermutlich auf

3. Ergebnisse

die Gegenwart von ribosomaler RNA (rRNA) und Transfer-RNA (tRNA) zurückzuführen. Die zweite Anreicherung befindet sich im niedermolekularen Trennbereich der Säule (177 ml bis 204 ml), in Fraktionen in denen Staufen1 als Monomer vorliegt. Hierbei handelt es sich höchstwahrscheinlich um freie RNA, die löslich im Cytosol vorkommt und sich daher im S100 findet. In den Fraktionen der Staufen1 Partikel, die nachweislich RNA enthalten, befindet sich nur eine sehr geringe Konzentration.

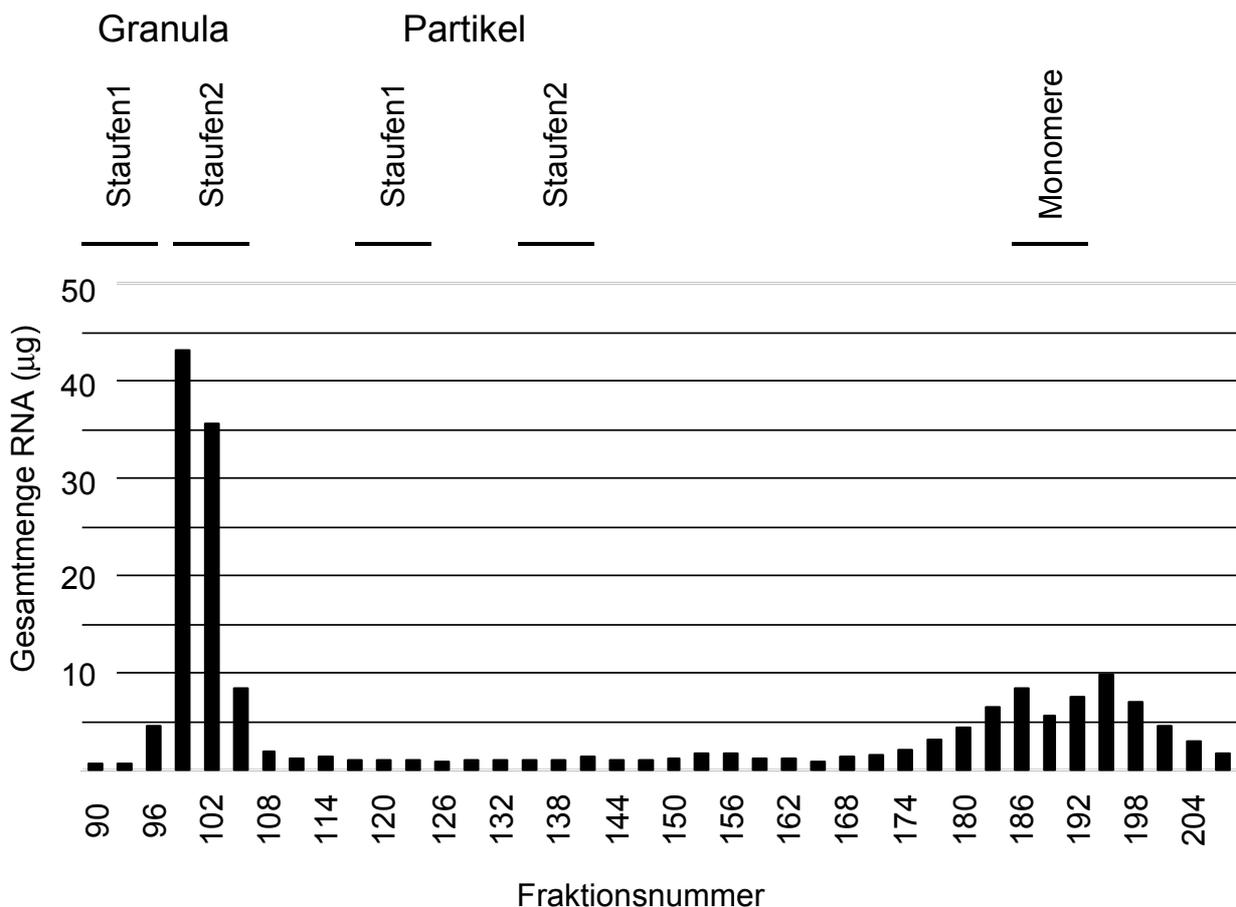


Abbildung 22: Verteilung der Gesamt RNA auf die Fraktionen der Gelfiltration: Die in den einzelnen Fraktionen enthaltene RNA wurde isoliert und die Konzentration anschließend über die Bestimmung der OD₂₆₀ ermittelt. Zur Orientierung ist die Verteilung der Staufen Proteine auf die einzelnen Fraktionen als Balken dargestellt.

In einem weiteren Experiment bestimmte Juliane Müller den Anteil an mRNA in den einzelnen Fraktionen. Durch die Verwendung eines Oligo-dT Primers wurde ausschließlich mRNA vervielfältigt und diese anschließend radioaktiv nachgewiesen. Sie konnte so zeigen, daß die mRNA im Vergleich zur Gesamt-RNA in den Staufen1 Partikel Fraktionen deutlich angereichert ist (Mallardo *et al.*, 2003).

Um zu beweisen, daß die Staufen1 Partikel tatsächlich dendritisch-lokalisierte Transkripte enthalten, sollten spezifische RNAs über Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachgewiesen werden. Dazu wurde die in den Fraktionen enthaltene RNA isoliert und mittels Reverser

Transkriptase in cDNA (komplementäre Desoxyribonucleinsäure) überschrieben. Für die folgende PCR wurden einerseits spezifische Primer für dendritisch-lokalisierte RNAs und andererseits solche für cytosolische, nicht-lokalisierte Kontroll-mRNAs verwendet. Als Kontrolle, daß die untersuchte RNA auch tatsächlich in den Hirnextrakten der Ratte vorliegt, wurde cDNA aus dem S100 parallel amplifiziert. Das Ergebnis für vier untersuchte RNAs ist in Abbildung 23 dargestellt.

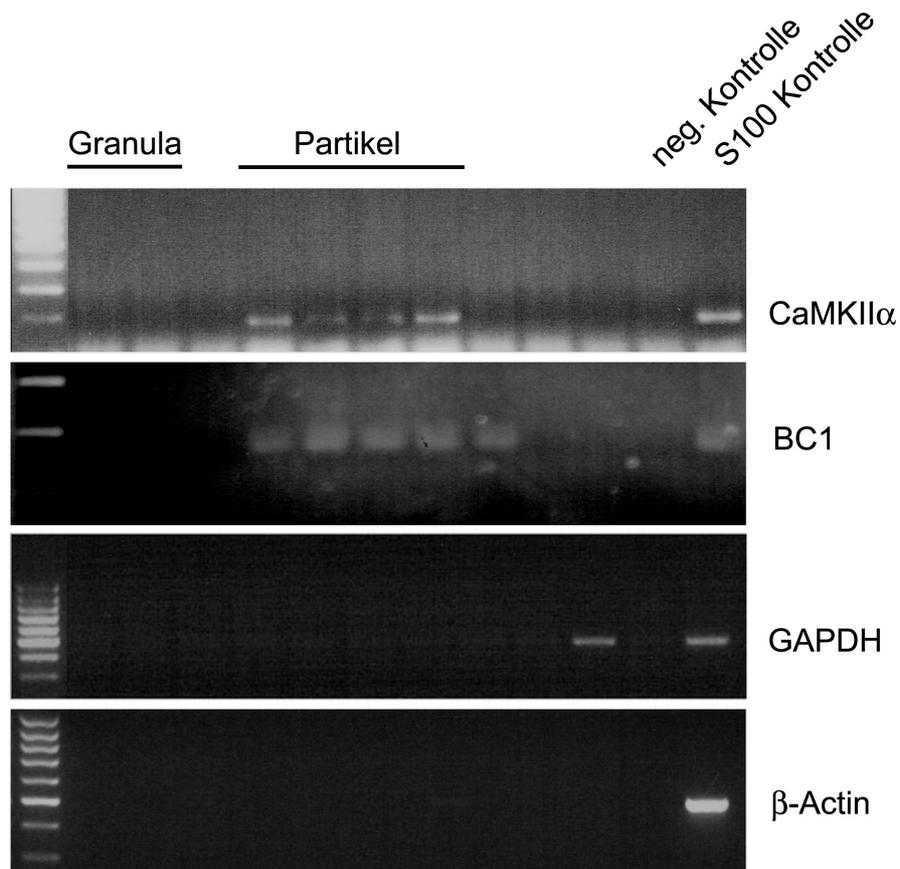


Abbildung 23 spezifische Anreicherung von dendritisch-lokalisierten RNAs in den Staufen1 Partikel Fraktionen: Mit Hilfe spezifischer Primer wurden die Fraktionen der Gefiltration auf die Gegenwart von zwei dendritisch-lokalisierten RNAs α -CaMKII und BC1 und zwei cytosolischen Kontroll-RNAs GAPDH und β -Actin getestet. Nur α -CaMKII und BC1 konnten in den Staufen1 Partikel Fraktionen spezifisch amplifiziert werden.

Die obere Hälfte der Abbildung zeigt die Amplifikation mit spezifischen Primern für die dendritisch lokalisierten RNAs α -Calcium/Calmodulin-abhängige Protein Kinase II (α -CaMKII) und *brain cytoplasmic* RNA 1 (BC1). Beide RNAs finden sich im eingesetzten Ausgangsmaterial S100 aus Rattenhirn. Im Bereich der Staufen Granula kann weder α -CaMKII noch BC1 nachgewiesen werden. Dies legt nahe, daß die Staufen Granula keine Funktion im dendritischen RNA-Transport haben. Demgegenüber wird in den Staufen1 Partikel Fraktionen sowohl α -CaMKII als auch BC1 spezifisch amplifiziert. Die Staufen1 Partikel cofraktionieren

3. Ergebnisse

also eindeutig mit dendritisch-lokalisierten Transkripten. Im unteren Bereich der Abbildung ist das Ergebnis der PCR für zwei mRNAs dargestellt, welche ausschließlich im Zellkörper, aber nicht in Dendriten reifer Neuronen nachgewiesen werden können, **Glycerinaldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH)** und β -Actin. Aus der cDNA des S100 aus Rattenhirn können beide mRNAs amplifiziert werden. Dies zeigt klar, daß sie im Ausgangsmaterial vorhanden sind. In den untersuchten Fraktionen der Gelfiltration lassen sich aber weder GAPDH noch β -Actin nachweisen. Das GAPDH-Signal in Spur 11 liegt außerhalb der Staufen1-positiven Fraktionen und ist daher für die Untersuchungen ohne Bedeutung.

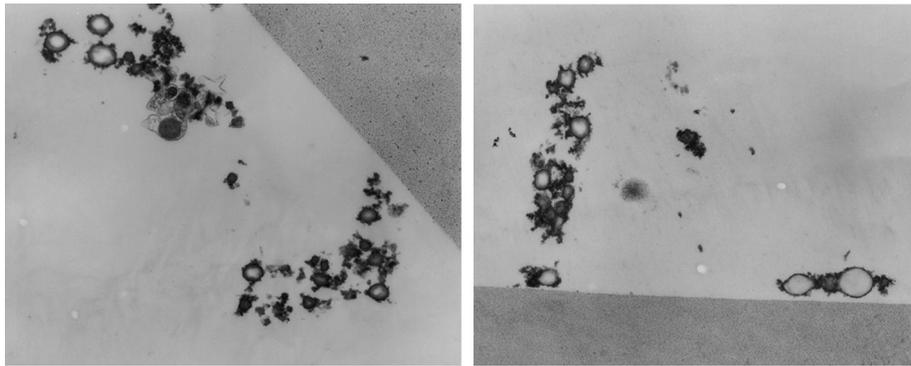
Durch die Kombination von Immunfluoreszenzfärbung und *in situ* Hybridisierung konnte Dr. M. Mallardo nachweisen, daß die Staufen1 Partikel in den Dendriten vollständig polarisierter Neuronen α -CaMKII und BC1 enthalten (Mallardo *et al.*, 2003).

Zusammengefaßt belegen die vorliegenden Ergebnisse eindeutig, daß mit der verwendeten Methode lösliche RNP-Komplexe aus Rattenhirn isoliert werden können, in denen neben Staufen1 wahrscheinlich auch KHC vorliegt. Der Zusammenhalt der Partikel ist größtenteils RNA-abhängig. Während in den Fraktionen der RNP-Komplexe keine Zellkörper-spezifischen mRNAs vorliegen, enthalten sie spezifisch mindestens zwei dendritisch-lokalisierte RNAs.

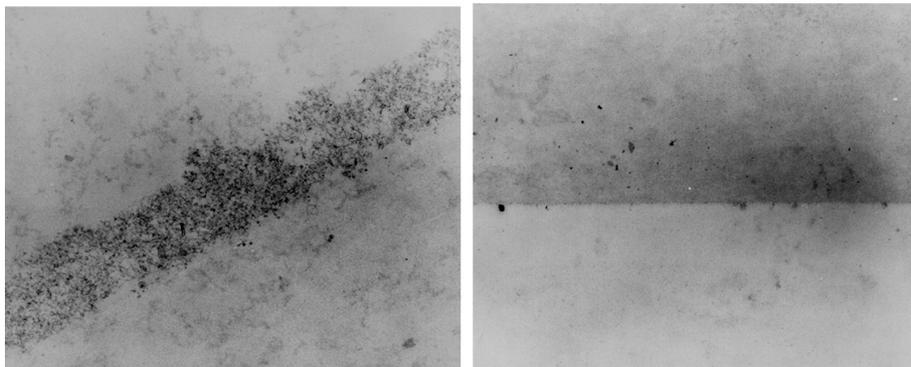
3.6 Visualisierung der Partikel mittels EM

Nach der Isolierung und Charakterisierung der Staufen1-enthaltenden RNP-Komplexe aus Rattenhirn und dem eindeutigen Hinweis, daß sie im dendritischen RNA-Transport eine Rolle spielen, stellte sich die Frage, ob sich solche Proteinkomplexe sichtbar machen lassen. Wie bereits zuvor dargelegt, läßt die Immunfluoreszenz keine Aussage über die eventuelle Größe und Gestalt beobachteter Partikel zu. Nur durch elektronenmikroskopische Untersuchungen kann diese Frage geklärt werden.

Als Ausgangsmaterial wurden repräsentative Fraktionen der drei Staufen1 Maxima verwendet. Für die Granula wurde Fraktion 105, für die Partikel Fraktion 120 und als Kontrolle für monomeres Staufen Fraktion 177 ausgewählt. Die jeweiligen Proben wurden kontrastiert und nach Entwässerung in Epon eingebettet. Ultradünnschnitte der Fraktionen wurden anschließend im Elektronenmikroskop untersucht. Die Bearbeitung der Proben und die Aufnahmen in Abbildung 24 wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Heinz Schwarz (MPI für Entwicklungsbiologie, Tübingen) durchgeführt.



Fraktion 120
Staufen1 Partikel



Fraktion 105
Staufen1 Granula

Fraktion 177
Staufen1 Monomere

Abbildung 24 spezifische Strukturen in Untradünnschnitten der Staufen1 Partikel Fraktion: Die Proteine einzelner Fraktionen der Gefiltration wurden in Kapillaren konzentriert, mit Uranylacetat kontrastiert und nach Entwässerung in Epon eingebettet. Die Untradünnschnitte der Fraktionen wurden anschließend im Elektronenmikroskop untersucht. (Fraktion 120 & 177: Vergrößerungsfaktor 24800; Fraktion 105: Vergrößerungsfaktor 45600)

In der Staufen1 Granula Fraktion (105 ml) ist eine hohe Konzentration von Proteinen und kleineren Partikeln zu sehen, vereinzelt finden sich auch Membranfragmente. Große granuläre Strukturen, ähnlich den von Krichevsky und Kosik (2001) beschriebenen, lassen sich jedoch nicht ausmachen. In der Staufen1 Monomerfraktion (177 ml) finden sich nur wenige Proteine und keinerlei größere Komplexe oder Membranstrukturen. Im Gegensatz dazu findet sich in der Staufen1 Partikel Fraktion (120 ml) eine spezifische Struktur, die in keiner der Kontrollen zu beobachten ist. Es handelt sich um dichte Partikel mit einem weniger kontrastierten Kern und einem Durchmesser von etwa 240 nm. Die runde bis ovale Struktur ist an der Außenseite von Proteinen bedeckt. Diese Partikel finden sich in allen untersuchten Schnitten dieser Fraktion. Da die Struktur sich nur in der Staufen1 Partikel Fraktion befindet und der Durchmesser von 240 nm zu einem abgeschätzten Molekulargewicht von 500 kDa führt, lag es nahe, diese Strukturen genauer zu untersuchen. Aus diesem Grund wurde im Folgenden eine Negativfär-

3. Ergebnisse

bung der Staufen1 Partikelfraktion (120 ml) und der Monomerfraktion (186 ml) als Kontrolle durchgeführt. Die Bearbeitung der Proben und die Aufnahmen erfolgten in Kooperation mit Dr. A. Hoenger (EMBL, Heidelberg). Das Ergebnis der Untersuchung ist in Abbildung 25 dargestellt.

Vergrößerung

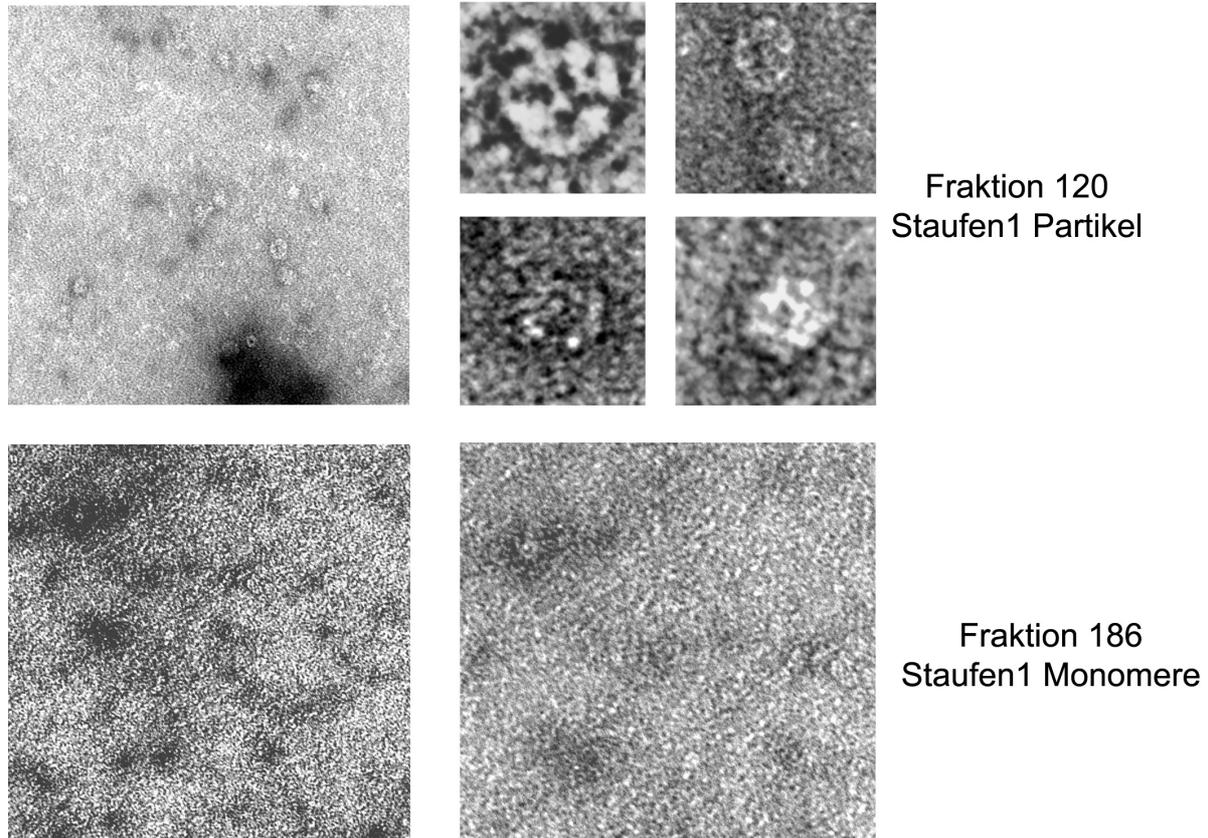


Abbildung 25 spezifische Strukturen in der Negativfärbung der Staufen1 Partikel Fraktion: Die Proteine einzelner Fraktionen der Gefiltration wurden verdünnt und nach Kontrastierung mit Uranylacetat im Elektronenmikroskop untersucht. Die Partikel in Fraktion 120 haben einen Durchmesser von etwa 200 nm.

In der monomeren Fraktion (186 ml) lassen sich keine spezifischen Komplexe ausmachen. Es liegt eine feingranuläre unregelmäßige Struktur vor, die auch in der Vergrößerung keine Partikel erkennen läßt. Interessant ist dagegen erneut die Staufen1 Partikel Fraktion (120 ml). Wie in der zuvor durchgeführten Untersuchung der Ultradünnschnitte kommen auch hier rundliche Partikel in großer Zahl vor. Die Vergrößerung zeigt deutlich einen gleichförmigen, dicht gepackten, stark kontrastierten Komplex mit regelmäßiger Oberflächenstruktur. Diese Partikel stellen spezifische Proteinkomplexe dar.

Obwohl die beobachteten Komplexe nur nach einer positiven Färbung mit Staufen1 spezifischen Antikörpern eindeutig als Staufen1 Partikel identifiziert werden können, legen die ver-

gleichenden elektronenmikroskopischen Untersuchungen nahe, daß es sich tatsächlich um die biochemisch-isolierten, dendritischen RNA-Transportpartikel handeln könnte.

3.7 Weitere Reinigung der Staufen Komplexe mittels Dichtegradientenzentrifugation

Mit den bislang durchgeführten Experimenten ist es gelungen, die Staufen1-enthaltenden RNP-Partikel aus Rattenhirn zu isolieren und deren Zusammensetzung teilweise zu charakterisieren. Die Fraktionen der Gelfiltration enthalten aber neben den Proteinen, die im Staufen RNP-Komplex gebunden sind, wahrscheinlich noch eine Vielzahl weiterer Proteine, die in keinem Zusammenhang mit den Staufen1 Partikeln stehen. Um alle im Komplex gebundenen Proteine zu identifizieren, war es daher notwendig, diesen noch weiter aufzureinigen.

Durch die Gelfiltrations-Chromatographie erfolgte eine Trennung einzelner Teilchen nach ihrer Größe. Komplexe ähnlicher Größe unterscheiden sich häufig in ihrer Dichte, was die Möglichkeit einer weiteren Anreicherung spezifischer Teilchen bietet. Hierzu wird die isopyknische Zentrifugation, auch Sedimentations-Gleichgewichtszentrifugation genannt, eingesetzt. In einem Dichtegradienten wird über einen längeren Zeitraum mit hoher Geschwindigkeit bis zur Einstellung des Gleichgewichts zentrifugiert. Für die Trennung löslicher Ribonucleoprotein -Komplexe wurde der Einsatz linearer Saccharosegradienten von 10% bis 50% bereits zuvor beschrieben (Gonzalez *et al.*, 1975; Muyldermans *et al.*, 1980) und daher auch für die folgenden Versuche eingesetzt. Die einzelnen Staufen-enthaltenden Komplexe wurden zunächst mittels Gelfiltration isoliert und anschließend im Saccharosegradienten bis zur Gleichgewichtseinstellung zentrifugiert.

Abbildung 26 zeigt das Ergebnis für die in einem linearen Gradienten aufgetrennten, Staufen1 Granula. Im Blot läßt sich eine Anreicherung der Staufen Komplexe im Bereich von etwa 10% bis 30% Saccharose (Fraktion 3 bis 9) deutlich erkennen. Nur ein geringer Anteil befindet sich in Fraktion 1 (0% Saccharose) und im unteren Bereich (Fraktion 11 bis 19). Dieses Ergebnis war nicht zu erwarten, denn die von Krichevsky und Kosik (2001) beschriebenen Granula besitzen einen höheren Sedimentationskoeffizienten als Polysomen und sollten sich daher im unteren Bereich des Gradienten befinden. Daher ist es unwahrscheinlich, daß die mittels Gelfiltration aufgetrennten Staufen1 Granula dem inaktiven-Speicherkomplex von Krichevsky und Kosik entsprechen.

3. Ergebnisse

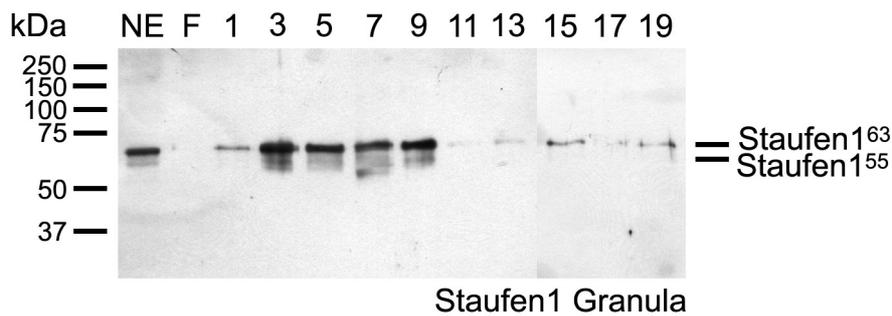


Abbildung 26 Sedimentation der Staufen1 Granula im linearen Saccharosegradienten: Die mittels Gelfiltration getrennten Staufen1 Granula (93 ml) wurden in einem linearen Gradienten von 10% bis 50% Saccharose einer isopyknischen Zentrifugation unterzogen. Die Proteine der einzelnen Fraktionen des Gradienten (1: 0% Saccharose, 3: 10% Saccharose bis 19: 50% Saccharose), sowie der Staufen1 Granula Fraktion (F) wurden mit TCA gefällt, über SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Western-Blot mit Maus-anti-Staufen1 immundetektiziert.

Abbildung 27 zeigt einen repräsentativen Blot für einen Gradienten der Staufen2 Granula. Hier liegt nur ein sehr geringer Teil im oberen Bereich des Gradienten (Fraktion 1 bis 4 entspricht 0% bis etwa 6% Saccharose) vor. Dagegen befinden sich Maxima im dichteren Bereich des Gradienten. So gibt es eine deutliche Aufkonzentrierung in den Fraktionen 7 bis 9 (etwa 15% bis 20% Saccharose), 13 (circa 30% Saccharose) und 16 (etwa 40% Saccharose). In allen Fraktionen kommt ausschließlich die 62 kDa Isoform vor. Dies erscheint ungewöhnlich, da diese Isoform zum einen nur sehr gering exprimiert wird und andererseits die 59 kDa Isoform als Hauptbestandteil der Staufen2 Granula identifiziert wurde. Diese Form läßt sich aber in den Gradientenfraktionen so gut wie nicht nachweisen. Der untere Bereich der Abbildung zeigt das dazugehörige Silbergel. Es ist deutlich erkennbar, daß der Hauptteil des Gesamtproteins auf die Fraktionen 1 bis 7 beschränkt ist. In diesem Bereich ist aber nur ein geringer Anteil des Staufen2 Proteins zu finden. Eine deutliche Anreicherung des Staufen2 Proteins liegt in Fraktion 7 vor. Das Silbergel zeigt jedoch deutlich, daß es hier zu keiner Anreicherung des Gesamtproteins kommt. Auch in Fraktion 9 liegt eine höhere Konzentration von Staufen2⁶² vor. Hier scheint aber auch die Menge des Gesamtprotein zumindest im Bereich von 40 bis 68 kDa erhöht. In Fraktion 13 reichert sich das Gesamtprotein wie auch Staufen2 wieder an. In den Fraktionen 14 und 17 scheint Material verloren gegangen zu sein, da weder ein Staufen2 Signal, noch Proteine im Silbergel sichtbar sind. Vergleicht man das Bandenmuster des Silbergels mit den Staufen2 spezifischen Banden, so erkennt man, daß eine Bande von etwa 65 kDa in allen Silbergelspuren deutlich verstärkt vorkommt, in denen auf dem Blot ein Signal zu sehen ist. Aus diesem Grund ist es wahrscheinlich, daß diese Bande das Staufen2⁶²

Protein darstellt. Während alle Banden im Silbergel ein weitgehend homogenes Muster über mehrere Fraktionen zeigen, unterscheidet sich Fraktion 16 deutlich von den benachbarten. Im Silbergel erkennt man außer der Staufen2⁶² Bande deutlich eine ganze Reihe spezifischer Proteinbanden gleicher Intensität, die in den Nachbarfraktionen nicht vorhanden sind. Wie bereits angesprochen, erscheint es relativ sicher, daß die Proben in den Spuren 14 und 17 verloren gingen, allerdings zeigt ein Vergleich mit der benachbarten Fraktion 15, daß hier nur drei Banden etwa gleicher Intensität vorliegen. In Fraktion 16 sind dagegen neben diesen drei mindestens neun weitere Proteine gleicher Konzentration vorhanden. Die Proteine dieser Fraktion unterscheiden sich also in der Tat deutlich von denen in anderen Fraktionen. Zusätzlich ist in dieser Fraktion ein deutlich verstärktes Signal für Staufen2 zu finden. Die in dieser Spur enthaltenen Proteine könnten also tatsächlich die Bestandteile der Staufen2 Granula darstellen, die in einem Bereich mit einem hohen Sedimentationskoeffizienten (etwa 40% Saccharose) vorliegen.

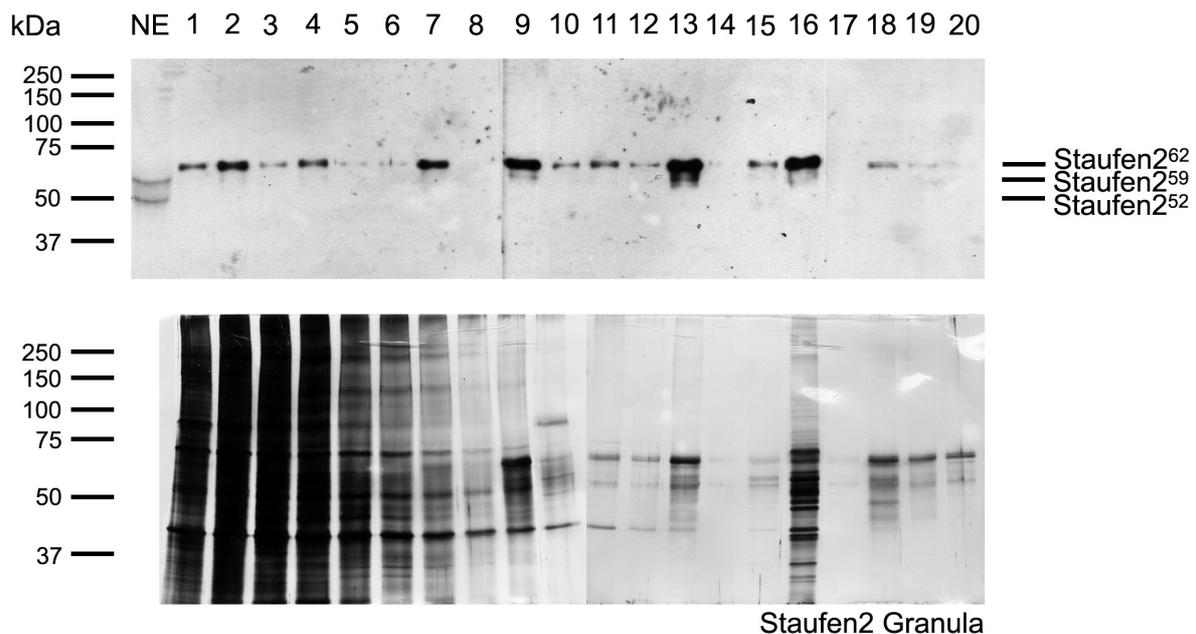


Abbildung 27 Sedimentation der Staufen2 Granula im linearen Saccharosegradienten: Die Staufen2 Granula (102 ml) wurden in einem linearen Gradienten von 10% bis 50% Saccharose isopyknisch zentrifugiert. Die Proteine der einzelnen Fraktionen (1: 0%, 3: 10% bis 20: 50% Saccharose) wurden mit TCA gefällt, über SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Western-Blot mit Maus-anti-Staufen2 immunodetektiert bzw. Silber-gefärbt

Abbildung 28 zeigt einen repräsentativen Gradienten für die Staufen1 Partikel. Das Protein ist über einen weiten Bereich hinweg nahezu ausschließlich in seiner 63 kDa Isoform vertreten. Bereits in der Gelfiltration zeigte dieses Protein keine so deutliche Begrenzung des Fraktionierungsbereichs wie die Staufen2 Komplexe. Ein Maximum liegt im oberen Bereich des Gradienten mit 0% Saccharose. Hier befindet sich auch der Großteil des Gesamtproteins (siehe

3. Ergebnisse

Silbergel). Eine weitere Anreicherung liegt im mittleren Bereich um Fraktion 9 (entspricht etwa 25% Saccharose). Das dritte Maximum liegt im Bereich hoher Sedimentationskoeffizienten (Fraktion 13 entspricht etwa 35% Saccharose) und zieht sich bis zum Boden des Gradienten (50% Saccharose) hin. In diesem Bereich finden sich nur wenige spezifische Proteine, wie das Silbergel deutlich zeigt. Das Bandenmuster von Fraktion 9 bis zum Boden des Gradienten ist weitgehend homogen und unterscheidet sich nur in der Intensität einzelner Signale. Insbesondere in Fraktion 13 scheint die Proteinkonzentration deutlich erhöht. In den Fraktionen, in denen der Staufen1 Antikörper ein starkes Signal zeigt (Fraktionen 1, 3, 9 und 13) ist neben der 63 kDa Isoform auch das Staufen1⁵⁵ Protein zu beobachten. Eine eindeutige Zuordnung spezifischer Proteine zu den Staufen1 Partikeln ist hier im Gegensatz zu den Staufen2 Granula nicht möglich.

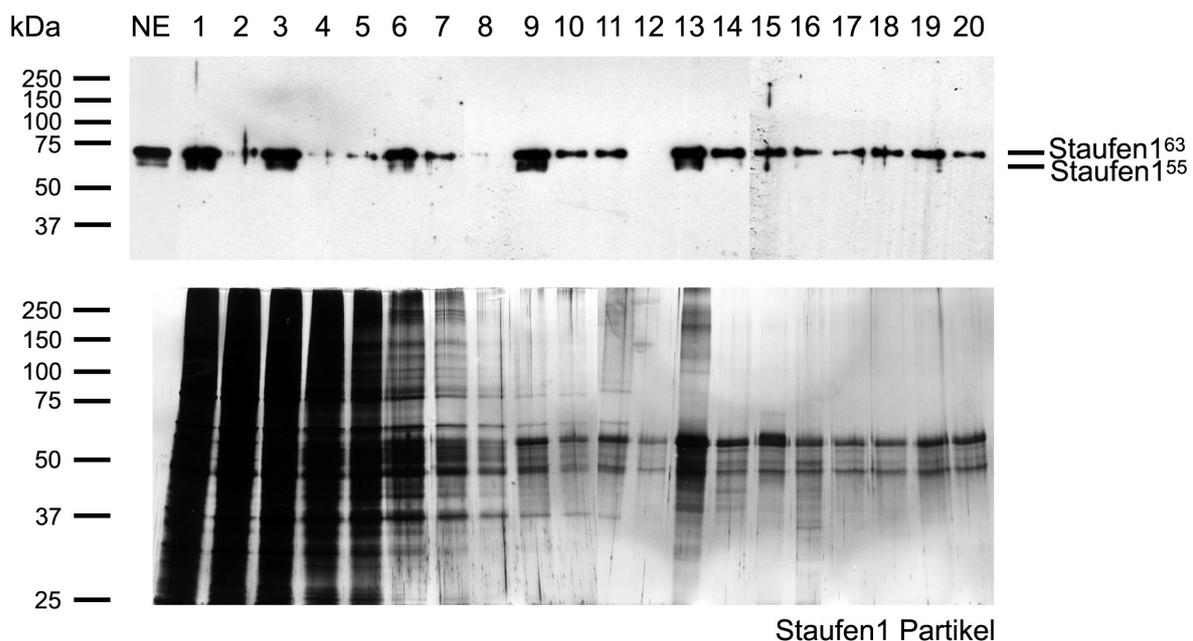


Abbildung 28 Sedimentation der Staufen1 Partikel im linearen Saccharosegradienten: Die Staufen1 Partikel (120 ml) wurden in einem linearen Gradienten von 10% bis 50% Saccharose isopyknisch zentrifugiert. Die Proteine der einzelnen Fraktionen (1: 0%, 3: 10% bis 20: 50% Saccharose) wurden mit TCA gefällt, über SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Western-Blot mit Maus-anti-Staufen1 immundetektiert bzw. Silber-gefärbt.

Der Gradient für die Staufen2 Partikel positiven Fraktionen (Abbildung 29) stellt sich vollkommen anders dar, als die bisher beschriebenen. Es liegen ausschließlich die 59 kDa und 52 kDa Isoformen des Proteins vor und zwar beschränkt auf die Fraktionen im oberen Bereich bis etwa 10% Saccharose. Lediglich ein weiteres, schwaches Signal für die 59 kDa Isoform ist in Fraktion 15 zu erkennen. Der Vergleich mit dem zugehörigen Silbergel zeigt, daß sich Staufen2 ausschließlich im Bereich hoher Konzentrationen für das Gesamtprotein findet; eine Trennung der Staufen2 Partikel vom Rest der Größenfraktion ist durch diese Methode nicht

möglich. In Fraktion 15 ist zwar eine leicht erhöhte Konzentration für Staufen2⁵⁹ zu beobachten, allerdings ist hier im Unterschied zu den Nachbarfraktionen viel mehr Gesamtprotein enthalten und eine veränderte Proteinverteilung ist nicht zu beobachten. Eine vom Silbergel her interessante Spur stellt Fraktion 9 dar, hier liegt aber kein Staufen2 Protein vor, wodurch das Bandenmuster für die behandelte Fragestellung keine Bedeutung hat.

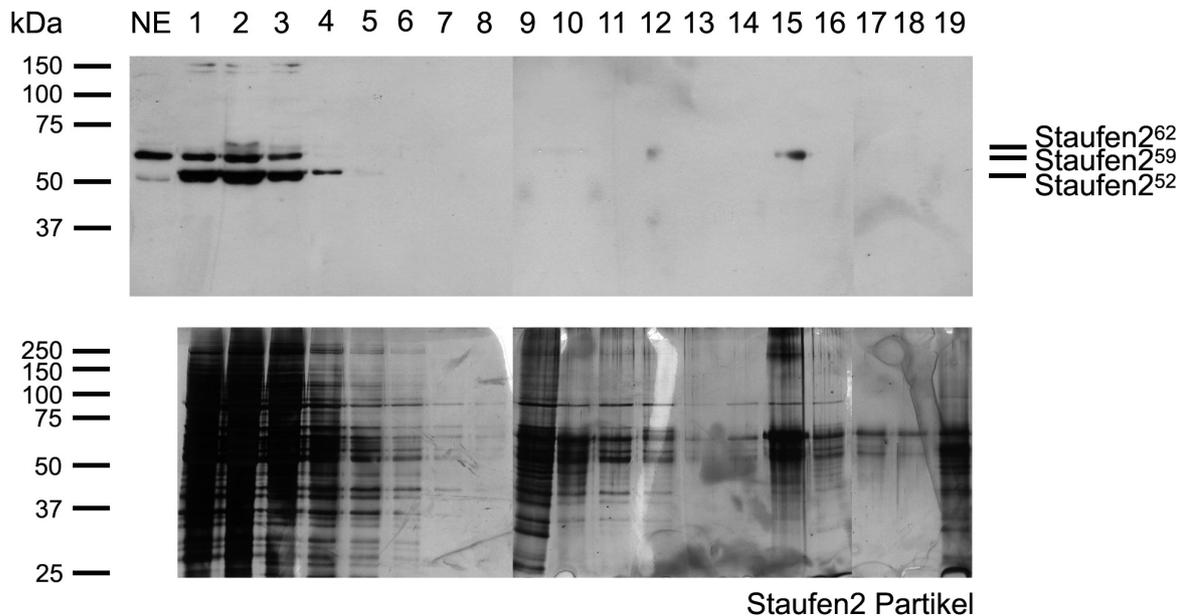


Abbildung 29 Sedimentation der Staufen2 Partikel im linearen Saccharosegradienten: Die Staufen2 Partikel (138 ml) wurden in einem linearen Gradienten von 10% bis 50% Saccharose isopyknisch zentrifugiert. Die Proteine der einzelnen Fraktionen (1: 0%, 3: 10% bis 19: 50% Saccharose) wurden mit TCA gefällt, über SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Western-Blot mit Maus-anti-Staufen2 immundetektiert bzw. Silber-gefärbt.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß die Staufen1 Granula und die Staufen2 Partikel mit der verwendeten Methode nicht weiter aufgereinigt werden können. Dagegen verspricht das spezifische Muster in Fraktion 16 für die Staufen2 Granula eine tatsächliche Isolierung der Komplexe beschränkt auf eine einzelne Fraktion. Für die Staufen1 Partikel läßt sich eine so deutliche Anreicherung bislang nicht ausmachen, da das Silbergel keine so deutlich unterschiedliche Zusammensetzung der Staufen1 Komplexe im Verlauf des Gradienten zeigt.

3.8 Analyse der teilweise zerfallenen Staufen-Transportpartikel

Bereits in der Analyse mittels Gelfiltration zeigten die Staufen1 Partikel ein RNA-abhängiges Verhalten. Die Vielzahl der in den Gelfiltrationsfraktionen beobachteten Proteine ließ aber keine Zuordnung einzelner Proteine zu den Staufen1 Partikeln oder dem teilweise zerfallenen

3. Ergebnisse

250 kDa Unterkomplex zu. Daher wurden im Folgenden die Staufen1 Partikel Fraktionen mit RNase A inkubiert. Als Kontrolle wurde wieder die bereits zuvor beschriebene Inkubation mit Puffer ohne Nuclease durchgeführt. Das Ergebnis nach der anschließenden Gleichgewichtszentrifugation im Saccharosegradienten zeigt Abbildung 30.

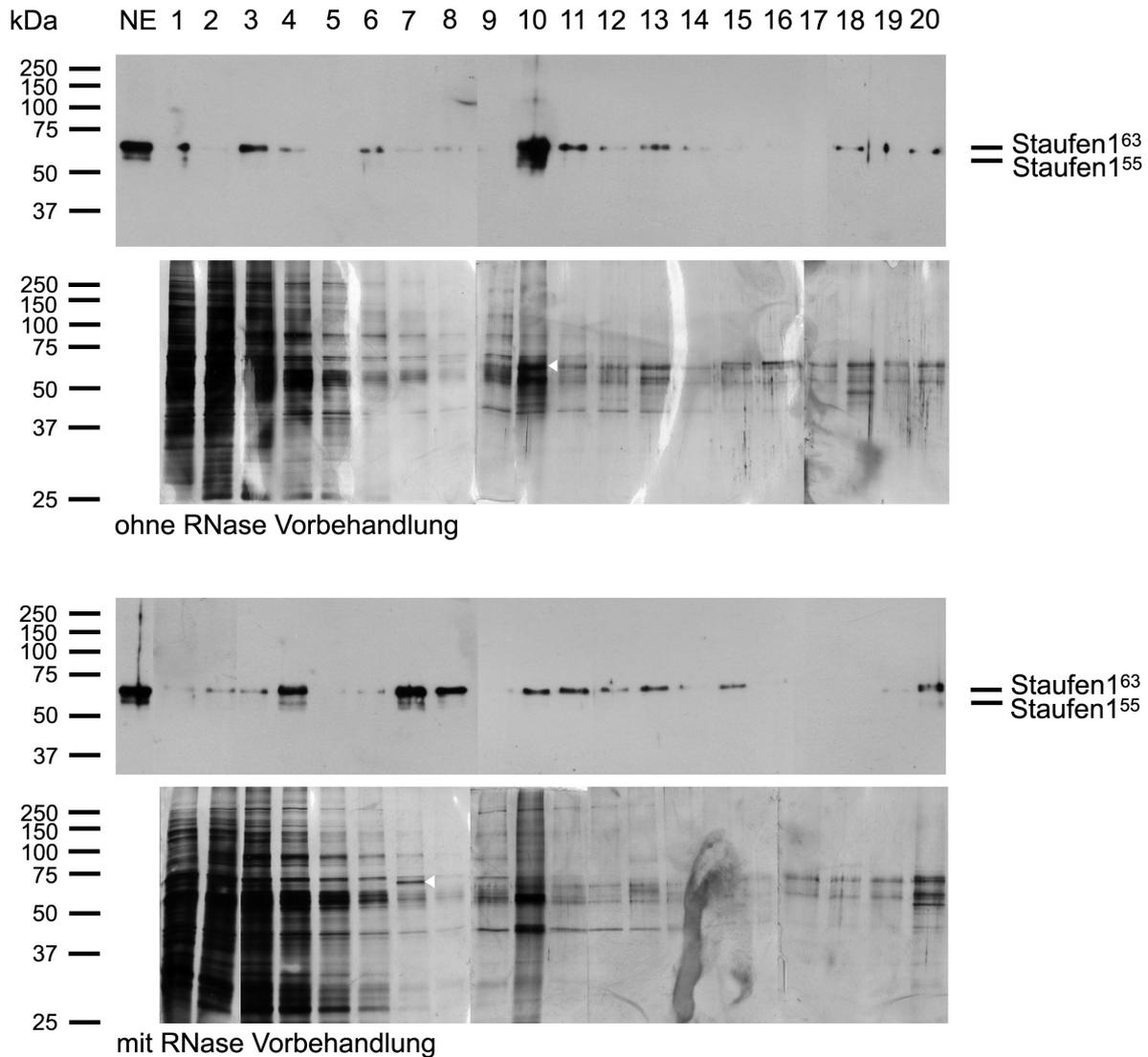


Abbildung 30 Analyse der nativen und nach RNase-Vorbehandlung teilweise zerfallenen Staufen1 Partikel: Die mittels Gelfiltration getrennten Staufen1 Partikel (120 - 123 ml) wurden mit RNase A bzw. Nuclease-freiem Puffer inkubiert und anschließend im linearen 10 % bis 50% Saccharosegradienten isopyknisch zentrifugiert. Die Proteine der resultierenden Fraktionen (1: 0%, 3:10% bis 20: 50% Saccharose) wurden jeweils mit TCA gefällt, über SDS-PAGE getrennt und anschließend mit Maus-anti-Staufen1 im Western-Blot immundetektiert bzw. Silber-gefärbt. Staufen1⁶³ ändert seinen Sedimentationskoeffizienten nach RNase-Vorbehandlung (siehe Pfeil).

In den unbehandelten Proben finden sich drei Maxima für Staufen1. Das Erste liegt im weniger dichten Bereich (Fraktionen 1 bis 4). Das zweite Maximum findet sich in einem Dichtebereich von etwa 25% bis 30% Saccharose (Fraktionen 10 bis 13). Außerdem läßt sich noch eine

Anreicherung am Boden des Gradienten beobachten (Fraktionen 18 bis 20). In den RNase-vorbehandelten Proben lassen sich ebenfalls drei Maxima feststellen. Eines liegt in den Fraktionen 1 bis 4, ein weiteres in Fraktion 20 analog zu den unbehandelten Proben vor. Ein Großteil des im mittleren Dichtebereich (Fraktionen 10 bis 13) angereicherten Staufen1 ist dagegen in den RNase-vorbehandelten Proben deutlich in einen weniger dichten Bereich von 20% Saccharose (Fraktionen 7 bis 8) verschoben. Dieses Verhalten läßt sich dadurch erklären, daß die Komplexe nach dem Entfernen der RNA weniger dicht gepackt vorliegen. Die Proteinverteilung im Silbergel zeigt insgesamt kaum Veränderungen. Bei genauerem Hinsehen werden aber Unterschiede deutlich. Die Proteinverteilung in den Fraktionen 1 bis 6 der korrespondierenden Gele ist sehr ähnlich. Auch in den Fraktionen 11 bis 20 ist ein fast identisches Bandenmuster mit kleinen Intensitätsunterschieden zu beobachten. Auffällig sind allerdings die Fraktionen 7 bis 10. Die beiden deutlichsten Banden dieser Fraktionen entsprechen Proteinen mit einem Molekulargewicht von etwa 65 kDa und 60 kDa. Dazu sind weitere schwache Banden zu erkennen. Während das 60 kDa Protein in beiden Gelen in gleicher Intensität vorliegt, ist das 65 kDa Protein in Fraktion 10 der RNase-vorbehandelten Probe nicht mehr nachzuweisen. Dafür tritt die 42 kDa Bande, die in allen Fraktionen bis zu einer Dichte von etwa 35% Saccharose vorkommt, deutlich stärker hervor. Das 65 kDa Protein liegt dagegen nach Entfernen der RNA aus dem Ausgangsmaterial in Fraktion 7 vor (siehe Pfeil). Dieses Verhalten ist analog der von den Staufen1 Antikörpern erkannten Bande im Western-Blot. Daher erscheint es wahrscheinlich, daß dieses Protein Staufen1⁶³ ist.

Die übrigen Banden zeigen keine auffälligen Unterschiede, allerdings sind die Proteine in diesem Fraktionsbereich relativ gleichmäßig verteilt, so daß geringe Unterschiede in der Proteinkonzentration schwierig zu beurteilen sind. Für genauere Analysen wurden die korrespondierenden Fraktionen aus den unbehandelten und RNase-vorbehandelten Proben in benachbarte Spuren geladen. Auf diese Weise war es möglich eine Reihe von Proteinen zu bestimmen, welche nach Entfernen der RNA aus den Proben gemeinsam mit Staufen1⁶³ in einen weniger dichten Bereich wechseln. Die Proteine konnten aber bislang noch nicht identifiziert werden, weshalb auch keinerlei Aussagen über ihre Funktion und Bedeutung innerhalb des Staufen1-enthaltenden RNP-Komplexe gemacht werden können. Die vorliegenden Ergebnisse belegen aber eindeutig, daß die Staufen1 Transportpartikel nach Entfernen der RNA teilweise zerfallen und die daraus resultierenden Subkomplexe neben einer verringerten Größe von 250 kDa auch einen geringeren Sedimentationskoeffizienten aufweisen.

4. Diskussion

4.1 Spezifität der Staufen Antikörper

Das für die Immunisierung der Mäuse verwendete Staufen1 Antigen zeigt eine starke Reaktivität in Mäusen. Obwohl das humane und murine Protein eine hohe Homologie zueinander aufweisen, scheinen einzelne Aminosäureunterschiede ausreichend für eine starke Immunantwort der Tiere zu sein, denn alle Mäuse entwickelten eine Immunität gegenüber dem verwendeten humanen Antigen. Die beiden verwendeten Stämme sind reine Laborlinien, welche unter sterilen Bedingungen gehalten werden und daher kaum unspezifische Antikörper besitzen. Insbesondere können vorhandene Antikörper gegen Säugerproteine ausgeschlossen werden, weshalb das Präimmunserum erwartungsgemäß keine Reaktion mit Proteinen aus Extrakten von Ratten- oder Hamsterzellen zeigt.

Auch zwischen rStau1 und hStau1 bestehen einzelne Unterschiede in der Aminosäuresequenz, die Homologie ist aber ausreichend für eine Bindung des gegen das humane Staufen1 Protein gebildeten Antikörpers an das Rattenhomologe im Neuronenextrakt. Das Ratten Staufen1 wird in zwei Isoformen, entsprechend hStau1⁵⁵ und hStau1⁶³, erkannt. In der Literatur wird rStau1 als 65 kDa Protein beschrieben (Kiebler *et al.*, 1999), welches hStau1⁶³ entsprechen sollte. Die Tatsache, daß der im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Antikörper im Vergleich zum beschriebenen zusätzlich die 55 kDa Isoform der Ratte erkennt ist möglicherweise durch die beiden zur Immunisierung verwendeten Antigene begründet. Im Gegensatz zum hier verwendeten C-Terminus des humanen Staufen1, wurde für den beschriebenen Peptidantikörper eine 18 Aminosäuren umfassende Sequenz im N-Terminus des Proteins verwendet. Die beiden Isoformen des Staufen1 gehen auf zwei differentiell gespleißte Transkripte zurück. Das längere (codierend für hStau1⁶³) unterscheidet sich vom kürzeren (codierend für hStau1⁵⁵) durch eine Insertion von 289 bp an Position 324. Durch ein zweites 5'-gelegenes ATG-Initiationscodon wird anschließend ein um 81 Aminosäuren N-terminal verlängertes Protein synthetisiert (Wickham *et al.*, 1999). Die fehlende Bindung des Peptidantikörpers an die 55 kDa Isoform könnte dadurch begründet sein, daß er Epitope im N-Terminus des Proteins erkennt, welche in Staufen1⁵⁵ aufgrund des Fehlens der 81 Aminosäuren in veränderter Form vorliegen.

In Extrakten aus BHK Zellen wird weder ein 55 kDa noch ein 63 kDa Protein von den Antikörpern erkannt. Dies könnte möglicherweise bedeuten, daß das entsprechende Hamsterho-

mologie hier nicht exprimiert wird. Die Untersuchungen in humanen Zelllinien wie auch in Maus und Ratte zeigen aber, daß das Staufen1 Protein im Gegensatz zum Staufen2 Protein in nahezu allen Zelllinien vorliegt. Daher ist es wahrscheinlicher, daß die Konzentration der Antikörper im Serum nicht ausreicht, um eine Reaktion mit Hamster Staufen zu zeigen. Dies scheint allerdings nur für das denaturierte Protein zu gelten. Im Gegensatz zum Western-Blot zeigt das Maus-Antiserum in der Immunfluoreszenzfärbung eine deutliche Reaktion mit einem endogenen Protein in BHK Zellen. Es ist selbstverständlich nicht auszuschließen, daß es sich hierbei um eine unspezifische Kreuzreaktion handelt, wahrscheinlicher ist aber, daß die Antikörper in der Immunfluoreszenz an das Hamster Staufen1 Protein binden. Die Immunisierung der Mäuse wurde zwar mit denaturiertem Antigen durchgeführt, aber der Titer der epitopspezifischen Antikörper für das denaturierte Hamsterprotein scheint sehr viel geringer zu sein, als derjenige für Antikörper, die unabhängig von der Aminosäureabfolge eine Sekundärstruktur erkennen. Diese sollte zumindest in Teilbereichen, wie den dsRBD nahezu vollständig konserviert sein. Daher ist es wahrscheinlich, daß die Färbung in den BHK Zellen tatsächlich auf endogenes Hamster Staufen1 zurückzuführen ist.

Für die Immunisierung der Mäuse mit Staufen2 wurde ein Antigen verwendet, welches dem C-Terminus des murinen Staufen2 entspricht. Aus diesem Grund ist zu erwarten, daß die Immunreaktivität herabgesetzt sein sollte, da Tiere normalerweise keine Immunantwort auf körpereigene Proteine zeigen. Trotzdem bildet der Großteil der Mäuse Antikörper gegen das Protein. Hierfür kann eine Vielzahl von Gründen verantwortlich sein. Zum einen kann der für die Erstimmunisierung verwendete denaturierte C-Terminus eine stark abweichende Struktur zum nativen Staufen2 besitzen. Da der Großteil der Immunsierungen aber mit dem nativen Protein durchgeführt wurde, erscheint dies eher unwahrscheinlich. Zum zweiten könnte der für die Herstellung der Staufen2 Antikörper verwendete Laborstamm Balb/C eine stark herabgesetzte Immunsuppression gegenüber körpereigenen Proteinen zeigen. Die Tiere zeichnen sich zwar durch eine besonders starke Immunantwort auch mit konservierten Proteinen aus, aber Belege für diese Theorie lassen sich in der Literatur nicht finden. Am wahrscheinlichsten ist die Ursache für die Immunität der Mäuse gegenüber dem körpereigenen Protein darauf zurückzuführen, daß Stau2 nahezu ausschließlich in Gehirn exprimiert wird (Duchaîne *et al.*, 2002). Aufgrund der Blut-Hirn-Schranke kommt es hier, außer in ganz beschränkten Sonderfällen, zu keiner klassischen Immunreaktion. Somit stellen Antikörper gegen körpereigene hirsnspezifische Proteine keine Gefahr einer Autoimmunreaktion dar, wodurch die stark herabgesetzte Immunsuppression zu erklären ist.

4. Diskussion

Im Neuronenextrakt erkennt der Antikörper ein Protein von etwa 59 kDa. Das zuvor beschriebene Staufen2 Protein umfaßt 479 Aminosäuren (Buchner *et al.*, 1999) und hätte daher ein geringeres Molekulargewicht erwarten lassen. Insgesamt zeigt aber eine große Anzahl von Proteinen zum Teil erhebliche Unterschiede zwischen der kalkulierten Größe und der in der SDS-PAGE beobachteten. Im Sediment von Rattenhirnhomogenat nach 100.000 xg finden sich drei Proteine, welche vom Antikörper erkannt werden. Neben dem bereits im Neuronenextrakt nachgewiesenen 59 kDa Protein liegen ein 52 kDa und ein 62 kDa Protein vor. Das Kürzeste würde dem von Buchner beschriebenen 479 Aminosäure Protein eher entsprechen als das 59 kDa Protein im Neuronenextrakt. Endgültige Belege für die Existenz mehrerer Staufen2 Isoformen brachte die Klonierung von zwei Transkripten aus einer fetalen Maus cDNA Bibliothek (Duchaîne *et al.*, 2002). Sie codieren für zwei Proteine von 538 (Stau2⁵⁹) und 570 (Stau2⁶²) Aminosäuren und unterscheiden sich in der Ausdehnung im N-Terminus. Als dritte Staufen2 Isoform wurde das von Buchner beschriebene 479 Aminosäuren umfassende Protein (Stau2⁵²) angesehen, welches zusätzlich eine Deletion am C-Terminus aufweist. Neuere Erkenntnisse sprechen allerdings dafür, daß das von Buchner beschriebene Protein eine fehlerhafte Sequenz im Bereich des C-Terminus aufweist und daher nicht Staufen2⁵² darstellt (Dr. P. Macchi, persönliche Mitteilung).

Im Gegensatz zum Säuger Stau1 enthält Stau2 die zu dmStau homologe dsRBD1. Während in Stau2⁶² die dsRBD1 in voller Länge vorhanden ist, enthält Stau2⁵⁹ nur die C-terminale Hälfte der Domäne. Die zweigeteilte dsRBD2, die dsRBD3 und dsRBD4, sowie die TBD liegen analog Stau1 vor. Die dsRBD5 findet sich vollständig in Stau2⁶² und Stau2⁵⁹. In Stau2⁵² liegt nur der C-terminale Teil in einer neu geordneten Form vor (Duchaîne *et al.*, 2002). Mittels RT-PCR Amplifikation konnte T. Duchaine nachweisen, daß sowohl das Transkript, welches für Stau2⁵⁹ codiert, wie auch das resultierende Protein weitaus konzentrierter in der Zelle vorliegt als die beiden übrigen. So erscheint es durchaus logisch, daß sich im Neuronenextrakt nur die am stärksten exprimierte Form nachweisen läßt. In der differentiellen Zentrifugation kommt es dagegen zu einer spezifischen Anreicherung des Staufen2 Proteins (siehe auch Kapitel 3.2), wodurch alle drei Isoformen nachweisbar sind. Der Antikörper reagiert am stärksten mit der 52 kDa Isoform des Proteins, wogegen die 59 kDa Form in größerer Konzentration vorliegen sollte und damit ein stärkeres Signal erwarten lassen würde. Dies ist möglicherweise dadurch begründet, daß die Homologie zwischen der 59 kDa Isoform des Maus- und Rattenproteins nicht so groß ist, wie die von Stau2⁵². Weiterhin besteht die Möglichkeit, daß im Serum mehr Antikörper gegen spezifische Epitope der 52 kDa Isoform vorliegen. Dadurch

könnte eine größere Anzahl an Stau2⁵² binden und die Bande stärker erscheinen als die für Stau2⁵⁹.

Aufgrund der Tatsache daß die Immunisierung der Mäuse sowohl mit denaturiertem als auch mit nativem Antigen durchgeführt wurde, war anzunehmen, daß das Antiserum auch das Protein in der Immunfluoreszenz erkennt. Im Gegensatz zu den Stau1 Antikörpern erkennt das Stau2 Serum kein endogenes Protein in den BHK Zellen. Hierfür können wieder mehrere Gründe verantwortlich sein. Zum einen besteht die Möglichkeit, daß kein homologes Stau2 im Hamster vorliegt. Dies ist aber eher unwahrscheinlich, da alle bislang untersuchten Säugerpezies (Mensch, Maus, Ratte) das Protein besitzen. Die zweite Möglichkeit ist, daß das murine Stau2 nur eine geringe Übereinstimmung mit seinem Hamster Homologen aufweist. Auch diese Erklärung kann man vermutlich eher ausschließen, da wie bereits in Zusammenhang mit den Stau1 Antikörpern angeführt, zumindest die Sekundärstruktur der Proteine eine gewisse Homologie aufweisen sollte. Der naheliegendste Grund liegt wiederum in der weitgehend hirnspezifischen Expression von Stau2. Da es sich bei den verwendeten BHK Zellen um eine Zelllinie aus der Niere handelt, wird Stau2 hier wohl nicht exprimiert.

Eine Kreuzreaktivität der Stau1 und Stau2 Antikörper konnte nicht festgestellt werden. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß jeweils Sequenzen aus dem C-Terminus als Antigene eingesetzt wurden. Die Aminosäuresequenzen zeigen in diesem Bereich die größten Unterschiede. Aufgrund der Homologie der beiden Proteine insbesondere im Bereich der dsRBD konnte eine Kreuzreaktion vor allem in der Immunfluoreszenz jedoch nicht von vornherein ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend kann man feststellen, daß es im Rahmen dieser Arbeit möglich war, Maus-Antikörper herzustellen, welche monospezifisch Ratten Stau1 bzw. Stau2 erkennen. Die Antikörper erlauben eindeutige Aussagen über das Vorkommen der jeweiligen Proteine auf zellulärer Ebene und in biochemischen Untersuchungen.

Im Vergleich zur Herstellung polyklonaler Antiseren aus Mäusen besitzt die Verwendung von Kaninchen zur Immunisierung zwei Vorteile. Zum einen liefern die Tiere durch ihre Größe sehr viel mehr Serum und zum anderen können in ihnen auch Antikörper gegen murine Proteine hergestellt werden, was aufgrund der Immunsuppression gegen körpereigene Proteine normalerweise in Mäusen nicht möglich ist. Dagegen haben Kaninchen oft den Nachteil, daß sie für gewöhnlich bereits vor der Immunisierung durch bakterielle Infektionen eine große Bandbreite von Antikörpern besitzen, die mit verschiedenen Säugerproteinen reagieren kön-

4. Diskussion

nen. Dies ist dadurch begründet, daß es sich bei ihnen nicht um unter weitgehend sterilen Bedingungen gehaltene Laborstämme handelt, sondern um diverse Hauskaninchenrassen. Durch die Infektion bilden die Tiere Antikörper gegen bakterielle Proteine und insbesondere jene gegen Hitzeschockproteine können mit Proteinen in den Extrakten aus Säugerzellen kreuzreagieren. Um tatsächlich spezifische Antikörper zur Verfügung zu haben, ist daher eine Affinitätsreinigung des Antiserums mit dem entsprechenden Antigen häufig unumgänglich. Auch die Präimmunsereen aller im Rahmen dieser Arbeit immunisierten Kaninchen zeigen eine Reaktion mit Extrakten aus BHK Zellen und teilweise auch mit Neuronenextrakt.

Da die Antikörper hauptsächlich für Doppelfärbungen in der Immunfluoreszenz und für eventuelle Immunpräzipitationen gedacht waren, wurden alle Kaninchen mit nativ aufgereinigtem Antigen immunisiert. Die Immunantwort der Kaninchen ist deutlich verschieden zu der der Mäuse. Während das Maus Staufen1 Antiserum mit beiden Isoformen des humanen Staufen1 und den homologen Proteinen der Ratte reagiert, erkennen die Antikörper des mit dem Staufen1 C-Terminus immunisierten Kaninchen, ausschließlich die beiden überexprimierten humanen Staufen1-GFP Fusionsproteine in den transfizierten BHK Zellen. Mit den Rattenhomologen im Neuronenextrakt zeigt das Serum keine spezifische Reaktion. Auch das Serum des mit dsRBD5 immunisierten Kaninchens erkennt Stau1⁵⁵ lediglich in überexprimierter Form als hStaufen1⁵⁵-GFP in BHK Zellen, es bindet aber spezifisch an die 63 kDa Isoform im Neuronenextrakt. Obwohl beide Antiseren eindeutig spezifische Antikörper gegen das humane Staufen1 Protein enthalten, kommt es zu keiner deutlichen Reaktion mit den Rattenhomologen. Dies erscheint ungewöhnlich, da der Mausantikörper sehr wohl mit diesen Homologen reagierte. Dazu kommt, daß aufgrund der näheren Verwandtschaft zwischen Ratte und Maus die Sequenzhomologie des Staufen1 sehr viel größer sein müßte. Somit wäre eine Immunsuppression und damit eine geringere Konzentration an Staufen1 Antikörpern, welche mit dem Rattenhomologen reagieren, wahrscheinlicher gewesen. Die einzige Erklärung besteht in der Verwendung nativem Antigen im Gegensatz zu denaturiertem. Die Menge an Antikörper, der denaturiertes Stau1⁵⁵ erkennt, reicht möglicherweise nicht aus, um die geringen Mengen an endogenem Protein nachzuweisen. Eine deutlich unterschiedliche Fähigkeit denaturiertes und teilweise natives Staufen1 zu erkennen, konnte auch für die Mausantikörper in Bezug auf das Hamsterprotein beobachtet werden. Während das denaturierte Protein in BHK Zellextrakten nicht nachzuweisen war, reagierte das Serum eindeutig mit einem endogenem Protein in der Immunfluoreszenz.

In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß auch der für die Erstbeschreibung des rStau1 (Kiebler *et al.*, 1999) verwendete Peptidantikörper in Kaninchen hergestellt wurde. Auch dieser erkannte in Neuronenextrakten nur ein 65 kDa Protein jedoch keine 55 kDa Isoform. Da die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten polyklonalen Kaninchenserum im Gegensatz zu den Maus Antikörpern in Neuronenextrakt ebenfalls nur rStaufen1⁶³ erkennen, besteht die Möglichkeit, daß es sich hierbei um eine artspezifische Besonderheit handelt, welche die Konzentration von Antikörpern, die Staufen1⁵⁵ binden, gering hält.

Besonders auffällig ist die Tendenz der Kaninchenserum nach der Immunisierung mit Proteinen in BHK Zellen zu reagieren. Dies trifft insbesondere auf das Kaninchen zu, welches mit dsRBD5 injiziert wurde. Die Reaktion ist eindeutig auf die Immunisierung zurückzuführen, da die Banden vom Präimmenserum nicht erkannt werden. Die Größe der Proteine läßt aber eine spezifische Reaktion mit Staufen Proteinen unwahrscheinlich erscheinen. Die zusätzlichen Banden könnten durch Proteasen teilweise abgebaute Staufen Proteine darstellen. Dies erscheint aber eher unwahrscheinlich, denn die Mausantikörper, welche sehr spezifisch Staufen1 in beiden Isoformen erkennen, reagieren mit diesen Banden nicht.

Worauf die schlechte Immunantwort für das C-terminale Staufen1 zurückzuführen ist, läßt sich nicht klären. Eine Möglichkeit ist, daß die Struktur des nativen, verkürzten Proteins von der des Stau1 so stark abweicht, daß kaum Antikörper gegen Staufen1 im Serum vorliegen. Dies würde auch erklären, warum das Protein in höherer Konzentration (überexprimiert in BHK) dagegen sehr wohl erkannt wird.

Die Immunantwort der Kaninchen auf die murinen Staufen2 Antigene ist erwartungsgemäß sehr viel stärker als die der Mäuse. Wie bereits in Zusammenhang mit den Mausserum besprochen, wird das Vorkommen von Antikörpern gegen körpereigene Proteine aufgrund der Immunsuppression stark herabgesetzt. Daher reagieren die Kaninchen deutlich stärker auf die murinen Antigene als die Mäuse.

Das Serum des mit Staufen2 dsRBD5 immunisierten Kaninchens reagiert besonders stark mit der 59 kDa Isoform des Ratten Staufen2 Proteins, das des mit dem Staufen2 C-Terminus immunisierten Kaninchens bindet dagegen an Staufen2⁵² und Staufen2⁶². Die beiden Seren zeigen somit einen deutlichen Unterschied in der Bindung an einzelne Staufen2 Isoformen. In diesem Zusammenhang soll auch noch mal darauf hingewiesen werden, daß auch der Maus Staufen2 Antikörper eine deutliche Präferenz für eine der drei Isoformen, nämlich Stau2⁵², zeigte. Alle Seren haben somit eine individuelle Zusammensetzung bezüglich der Antikörper

4. Diskussion

gegen spezifische Epitope des Staufen2 Proteins, je nach genetischem Hintergrund der Tiere. Auf den ersten Blick erscheint es ungewöhnlich, daß ein Antiserum gerade Staufen2⁵² und Staufen2⁶² zusammen erkennen sollte und Staufen2⁵⁹ im Gegensatz dazu nicht. Während die 62 kDa Isoform das Gesamtprotein darstellt, ist die 59 kDa Form N-terminal und die 52 kDa Isoform N- und C-terminal verkürzt. Daher wäre zu erwarten gewesen, daß ein Antikörper, welcher die 52 kDa Isoform erkennt, auch an die beiden anderen bindet. Dagegen würde die Reaktion mit Staufen2⁵⁹ dafür sprechen, daß auch Staufen2⁵² erkannt wird. Die abweichende Beobachtung läßt sich folgendermaßen erklären. Staufen2⁵⁹ ist die am stärksten exprimierte Isoform. Daher ist es durchaus möglich, daß im Serum eine Vielzahl von Antikörpern enthalten sind, welche auch die beiden anderen Isoformen erkennen. Aufgrund der geringen Expression dieser Proteine lassen sie sich aber im Neuronenextrakt nicht nachweisen. Diese Beobachtung stimmt auch mit der für den Maus Staufen2 Antikörper überein, der im Neuronenextrakt ausschließlich die 59 kDa Isoform erkannte, im P100 dagegen alle drei. Das Bindungsverhalten des anderen Antikörpers ist schwieriger zu erklären. Denn die 59 kDa Isoform sollte aufgrund der starken Expression deutlich erkannt werden. Die einzige Möglichkeit ist, daß das Serum keine oder nahezu keine Antikörper enthält, welche an denaturiertes Staufen2⁵⁹ binden. Auch der Mausantikörper weist einen hohen Gehalt an Antikörpern auf, welche Staufen2⁵² binden. Somit könnte der Staufen2 C-Terminus insbesondere Antikörper gegen Epitope erzeugen, welche in Staufen2⁵² stärker exponiert sind. Die Bindung des Antiserums an Staufen2⁶² scheint dagegen noch ungewöhnlicher, da diese Isoform nur in sehr geringer Menge in der Zelle vorliegt. Dies könnte aber durch die Tatsache begründet sein, daß die native Proteindomäne starke Homologie in einem Bereich des Proteins zeigt, welche mit dem denaturierten Staufen2⁶² übereinstimmt.

Im Gegensatz zu Staufen1 dsRBD5 scheint Staufen2 dsRBD5 für die Immunisierung in Kaninchen sehr wohl geeignet zu sein. Die Immunantwort erreicht eine große Menge spezifischer Antikörper im Serum und auch das Auftreten unspezifischer Banden nach der Immunisierung kann nicht beobachtet werden.

Zusammenfassend kann man feststellen, daß die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Kaninchenantikörper gegen Staufen1 nur eine geringe Reaktivität zeigen. Dagegen bindet ein Großteil der im Serum vorhandenen Antikörper unspezifisch an Säugerproteine. Erst nach Affinitätsreinigung konnte ein Antikörper für die Untersuchungen eingesetzt werden. Die Kaninchenantikörper gegen das Staufen2 Protein zeigten dagegen eine spezifische Bindung an denaturiertes Staufen2.

Für die weitere Untersuchung der Staufen Proteine in Rattenhirn stehen einerseits hoch-spezifische Mausseren gegen beide Säugerhomologen zur Verfügung, die mit dem jeweils anderen nicht kreuzreagieren. Verglichen mit den Mausantikörpern zeigten die Kaninchenseren eine hohe Tendenz, unspezifische Proteine zu binden. Daher konnten sie nur bedingt für weitere Experimente genutzt werden. Durch die Affinitätsreinigung konnte der Anteil spezifischer Antikörper soweit erhöht werden, daß sie für Western-Blot Untersuchungen und Immunfluoreszenzfärbungen verwendet werden konnten.

4.2 Die zelluläre Verteilung der Staufen Proteine

Mit den hergestellten monospezifischen Staufen Antikörpern war es möglich, die intrazelluläre Verteilung der beiden Proteine getrennt zu untersuchen. Die Immunfluoreszenzfärbungen mit den Antiseren zeigten eine somato-dendritische Lokalisierung beider Proteine. Sie belegen, daß sowohl Staufen1 als auch Staufen2 in zwei unterschiedlichen Formen in Neuronen vorliegt; zum einen in einer komplexen Struktur im Soma, welche ringförmig den Zellkern umschließt. Diese als perinucleärer Ring bezeichnete Struktur ist typisch für das endoplasmatische Reticulum (ER), was dafür spricht, daß die Staufen Proteine mit ER assoziiert sind. Die Colokalisation von Staufen 1 und ER wurde bereits zuvor gezeigt (Marión *et al.*, 1999; Wickham *et al.*, 1999). Da Staufen2 ebenfalls mit dem perinucleären Ring colokalisiert, ist anzunehmen, daß es ebenfalls mit ER assoziiert ist bzw. in unmittelbarer Nähe zu diesem vorliegt. Ob die beiden Staufen Proteine im Soma colokalisieren, kann durch die vorliegenden Ergebnisse weder belegt, noch ausgeschlossen werden.

Neben dem Vorliegen im Zellkörper von Neuronen, finden sich beide Staufen Proteine auch in Dendriten, wo sie über die gesamte Länge hinweg fein verteilt in Form von Partikeln vorliegen. Diese Partikel wurden zuvor bereits für Staufen1 beschrieben (Kiebler *et al.*, 1999), die Ergebnisse dieser Arbeit belegen zudem, daß auch Staufen2 diese Art von Komplexen in Dendriten bildet. Weiterhin kann beobachtet werden, daß der partikuläre Anteil an Staufen2 sehr viel höher ist als der von Staufen1. Insbesondere in distalen Regionen des Dendritenbaumes liegt mehr Staufen2 vor. Die durchgeführten Doppelfärbungen zeigen deutlich, daß die beiden Proteine in Dendriten überwiegend nicht im selben Komplex vorkommen, sondern statt dessen spezifische Staufen1 Partikel und Staufen2 Komplexe in den Dendriten vorhanden sind.

4. Diskussion

Die im weiteren Verlauf der Arbeit durchgeführten biochemischen Untersuchungen stützen die Beobachtungen der Immunfluoreszenz. Die differentielle Zentrifugation belegt, daß beide Staufr Proteine in zwei unterschiedlichen Formen in Gehirnextrakten vorkommen. Zum einen in einer P100 gebundenen Form und zum anderen als lösliche Proteine bzw. Proteinkomplexe im S100. Etwa 50% des Staufr1 Proteins und circa 86% des Staufr2 Proteins sedimentieren gemeinsam mit rER und Polysomen. Dies stimmt mit den Beobachtungen aus der Immunfluoreszenz überein, daß ein Großteil der Proteine im Soma mit ER colokalisiert. Auffällig ist jedoch, daß die Zellfärbungen eher darauf hindeuteten, daß der somatische Anteil an Staufr1 höher ist als der für Staufr2. Diese Diskrepanz zwischen dem mikroskopisch beobachteten und über biochemische Analyse ermittelten rER-gebundenem Anteil kann aber mit den durchgeführten Untersuchungen nicht näher beleuchtet werden. Während die Ergebnisse von Duchaine *et al.* (2002) belegen, daß einzelne Staufr2 Isoformen spezifisch mit zellulären Komponenten in Wechselwirkung treten, konnte im Rahmen dieser Arbeit keine Präferenz einzelner Staufr2 Isoformen zur Assoziation mit rER und Polysomen festgestellt werden. Dagegen zeigen meine Untersuchungen klar, daß Stau1⁵⁵ überwiegend im P100 sedimentiert, während Stau1⁶³ überwiegend in löslicher Form im Gewebe vorliegt. Die Ergebnisse ermöglichen also eine Zuordnung der mikroskopisch beobachteten somatischen Form zu rStaufr1⁵⁵ und der dendritischen Partikel zu rStaufr1⁶³. Frühere Untersuchungen konnten nicht ausschließen, daß die beiden mikroskopisch beobachteten Formen ineinander übergehen, die Partikel also möglicherweise vom rER gelöst werden, die vorliegenden Ergebnisse sprechen aber eindeutig dafür, daß es sich um klar abgrenzbare Formen mit unterschiedlicher Funktion handelt. Während die somatische 55 kDa Isoform möglicherweise entscheidend für die Proteinsynthese am rER ist, könnte Stau1⁶³ eine wichtige Rolle im dendritischen RNA-Transport spielen.

In diesem Zusammenhang muß betont werden, daß das Vorkommen beider Isoformen bislang nur im Menschen belegt ist; hier wurden vier, durch alternatives Spleißen erzeugte Transkripte gefunden. Während drei davon die gleiche Länge aufweisen und für Stau1⁵⁵ codieren, ist das vierte länger und codiert für die 63 kDa Isoform (Wickham *et al.*, 1999). In Maus und Ratte konnte bislang nur die 55 kDa Isoform kloniert werden. Die ersten Untersuchungen beschrieben allerdings rStaufr1 als 65 kDa Protein, welches in Extrakten aus Neuronen vorlag (Kiebler *et al.*, 1999). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente sprechen eindeutig dafür, daß auch in der Ratte beide Isoformen vorkommen und unterschiedliche Funktionen in der Zelle erfüllen.

Ob die einzelnen Isoformen für Staufen2 ebenfalls unterschiedliche Funktionen erfüllen, kann mit den vorliegenden Resultaten nicht geklärt werden. Die Ergebnisse der differentiellen Zentrifugation sprechen vielmehr dafür, daß alle drei Isoformen sowohl Bestandteil der gebunden wie auch der löslichen Staufen2 Fraktion sind. Die Überprüfung dieser Beobachtung würde nur eine mikroskopische Untersuchung mit spezifischen Antikörpern gegen einzelne Staufen2 Isoformen ermöglichen.

Staufen2 wird eine bedeutende Rolle in der lokalen Translationskontrolle zugeschrieben. Die Untersuchungen von Duchaine *et al.* (2002) zeigen eine Coimmunpräzipitation von Staufen2 mit Antikörpern gegen ribosomale Proteine. Auch die vorliegenden Ergebnisse der differentiellen Zentrifugation belegen, daß Staufen2 zum Teil an rER bzw. Polyribosomen gebunden ist. Die Untersuchungen der Gelfiltration deuten zusätzlich darauf hin, daß auch der lösliche Anteil von Staufen2 zumindest teilweise mit Ribosomen assoziiert sein könnte.

Die beiden Säugerhomologen gehen vermutlich auf ein gemeinsames Vorläuferprotein zurück. Die Tatsache, daß Staufen2 eine größere Homologie zu dmStau aufweist als Staufen1, spricht dafür, daß Staufen2 die ursprünglichere Form darstellt. Das universelle Vorliegen von Staufen1 in einer Vielzahl von Geweben (Marión *et al.*, 1999), deutet dagegen an, daß dieses eine generelle Funktion hat, während das auf Hirngewebe beschränkte Staufen2 (Duchaine *et al.*, 2002) eine eher spezialisierte Rolle spielen dürfte. Analog der oben angesprochenen Hypothese kann das somatisch vorliegende Stau1⁵⁵ generell in einer Vielzahl von Geweben an der Proteinsynthese am rER beteiligt sein und die ursprüngliche Form des Proteins darstellen. Dagegen liegt Stau1⁶³ in löslichen Komplexen im Hirngewebe vor. Die Beobachtung von Köhrmann *et al.* (1999), daß Staufen1⁶³-GFP in lebenden Neuronen RNA-haltige Partikel bildet, welche anschließend transportiert werden, deutet zusammen mit meinen Daten auf eine Neuronen-spezifische Rolle im dendritischen RNA-Transport hin. Das Vorliegen von Staufen1 und Staufen2 in unterschiedlichen Partikeln zeigt ferner, daß Staufen2 vermutlich keine Rolle für die Lokalisation selbst spielt. Allerdings liegt es ebenfalls in Dendriten vor und könnte damit sehr wohl eine Funktion in der lokalen Translationskontrolle spielen. Diese Hypothese wird auch durch die unterschiedliche Konzentration von Staufen1 und Staufen2 in Dendriten unterstützt. So ist zu vermuten, daß nur eine relativ begrenzte Anzahl an RNP-Komplexen gleichzeitig transportiert wird, wohingegen lokale Translations-komplexe über die gesamte Länge des Dendriten verteilt vorliegen sollten.

4.3 Isolierung und Charakterisierung löslicher Staufen Komplexe

Weitere Erkenntnisse brachte die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Isolierung löslicher Staufen-enthaltender Komplexe mittels Gelfiltration. Analog den Daten aus der Immunfluoreszenz liegen die beiden Säugerhomologen des dmStau nicht im selben Komplex vor, sondern fraktionieren deutlich getrennt voneinander. Insgesamt lassen sich fünf verschiedene Staufen Komplexe trennen. Hochmolekulare Staufen1 Granula mit einem Molekulargewicht von über 2MDa, etwas kleinere Staufen2 Granula (circa 2 MDa), Staufen1 Partikel mit einem Molekulargewicht von etwa 700 kDa und circa 440 kDa große Staufen2 Partikel. Außerdem kommt Staufen1 noch in niedermolekularen Fraktionen mit einem Molekulargewicht von 65 kDa bis circa 150 kDa vor. Staufen2 läßt sich in niedermolekularen Komplexen bzw. als Monomer nicht nachweisen.

Die hochmolekularen Staufen1 Granula enthalten neben der löslichen 63 kDa Isoform auch einen gewissen Anteil an Stau1⁵⁵. Dies könnte dafür sprechen, daß die Granula eigentlich mit rER-assoziiert sind, während der Aufreinigung aber von diesem abgelöst wurden und nun als eigenständiger Komplex vorliegen. Hierfür spricht, daß L7a und Calnexin nur teilweise cofraktionieren. Aufgrund des Molekulargewichtes von über 2 MDa besteht auch die Möglichkeit, daß die Granula auf unspezifische Aggregation von Proteinen zurückzuführen ist.

Im Gegensatz zu den Staufen1 Granula scheinen die Staufen2 Granula mit Ribosomen und ER assoziiert zu sein, da eine Cofraktionierung von Staufen2, L7a und Calnexin in diesem Bereich zu beobachten ist. Dies unterstützt die Hypothese, daß das Protein eine Funktion in der lokalen Translationskontrolle haben könnte. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Doppelfärbungen mit Staufen2- und L7a-spezifischen Antikörpern belegen allerdings, daß im Bereich der Dendriten die beiden Proteine nicht colokalisieren. Daher müssen die Staufen2 Granula Strukturen repräsentieren, welche im Soma der Neurone vorliegen. Interessanterweise ließ sich für Staufen2, im Gegensatz zu Staufen1, in der differentiellen Zentrifugation keine Präferenz einzelner Isoformen erkennen, mit bestimmten Zell-Komponenten in Wechselwirkung zu treten. Alle drei Isoformen lagen sowohl gebunden im P100 als auch löslich im S100 vor. Die Analyse mittels Gelfiltration belegt aber, daß die einzelnen Staufen2 Isoformen sehr wohl unterschiedliche Komplexe bilden. So kommt in den Staufen2 Granula nahezu ausschließlich die 59 kDa Isoform vor. Dieses Ergebnis zeigt, daß zumindest ein Teil Stau2⁵⁹ in einem löslichen hochmolekularen Proteinkomplex vorliegt, welcher mit Ribosomen und ER Vesikeln bzw. rER im Soma der Neurone assoziiert ist.

Die 440 kDa Partikel stellen einen weiteren löslichen Staufen2 Komplex dar. In ihnen ist aber nahezu ausschließlich Stau2⁵² enthalten. Diese Partikel assoziieren nicht mit Ribosomen und ER und stellen daher vermutlich die in der Immunfluoreszenz beobachtete partikuläre Form von Staufen2 in Dendriten dar. Der im Saccharosegradienten beobachtete geringe Sedimentationskoeffizient der Staufen2 Partikel läßt eine wenig dicht gepackte Struktur des Komplexes vermuten.

Im Vergleich dazu stellen die Staufen1 Partikel einen vergleichsweise dicht gepackten Komplex dar, welcher nahezu ausschließlich das lösliche Stau1⁶³ enthält. Die Vermutung, daß diese Partikel analoge Transporteinheiten zu den exogenen RNA-enthaltenden Staufen2⁶³-GFP Komplexen (Köhrmann *et al.*, 1999) darstellen, liegt nahe. Die Gelfiltrationsanalyse belegt eindeutig, daß *Kinesin-Heavy-Chain* (KHC) gemeinsam mit Staufen1 in diesen Fraktionen vorliegt. Da KHC in Neuronen hauptsächlich für den Transport synaptischer Vesikel verantwortlich ist und Synaptophysin, das Hauptprotein dieser Vesikel, nicht cofraktioniert, erscheint ein aktiver Transport der Staufen1 Partikel durch KHC möglich.

In niedermolekularer Form liegt ausschließlich Staufen1 vor. Einerseits kann dies auf ein natürliches Vorkommen monomeren Staufen1 in der Zelle zurückzuführen sein. Andererseits besteht die Möglichkeit, daß die höhermolekularen Staufen1 Partikel und / oder Granula teilweise zerfallen und dadurch niedermolekulare Komplexe entstehen, die Staufen1 enthalten bzw. monomeres Staufen1 freisetzen. Hierfür spricht, daß Staufen1 über einen weiten Molekulargewichtsbereich von 65 kDa bis circa 150 kDa verteilt vorliegt. Ein weiterer Beleg für diese Hypothese findet sich in der Analyse der Staufen1 Partikel im Saccharosegradienten. Während der Hauptteil der Staufen1 Komplexe dicht gepackt im unteren Bereich des Gradienten vorliegt, findet sich ein geringerer Anteil gemeinsam mit monomeren, löslichen Proteinen. Dagegen scheinen die Staufen2 Komplexe einen festeren Zusammenhalt zu besitzen, obwohl zumindest die Staufen2 Partikel einen weniger dicht gepackten Komplex darstellen. Weiterhin scheint Staufen2 unmittelbar nach seiner Synthese komplex gebunden werden, da es sich nicht als Monomer nachweisen läßt.

4.4 Interaktion von Staufen und RNA

In *Drosophila* bindet das Staufen Protein spezifisch Doppelstrang-RNA (dsRNA) *in vitro* und *in vivo* (St. Johnston *et al.*, 1992). Auch für das Säugerhomolog konnte *in vitro* eine Bindung an dsRNA gezeigt werden (Marión *et al.*, 1999; Wickham *et al.*, 1999; Duchaine *et al.*, 2002).

4. Diskussion

In den Dendriten von Neuronen ist RNA sowohl in endogenen Staufraktionen als auch in exogenen Staufraktion-GFP Partikeln (Köhrmann *et al.*, 1999) enthalten. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es einerseits, mit biochemischen Daten eine spezifische Interaktion des Staufraktion1 Proteins mit RNA sowohl für die Zellkörper-gebundene 55 kDa Isoform als auch für das lösliche in Partikeln vorliegende Staufraktion1⁶³ zu zeigen. Andererseits ermöglichte die Analyse der isolierten RNP-Komplexe erstmals die Identifizierung von zwei dendritisch-lokalisierten RNAs, welche in Staufraktion1 Partikeln transportiert werden könnten.

Unter RNase-freien Bedingungen ist Staufraktion1 zu etwa 50% im S100 nachzuweisen. Dieser Anteil steigt nach RNase-Vorbehandlung auf circa 82%. Durch das Entfernen der RNA trennt sich demnach ein erheblicher Teil des Proteins bzw. der Proteinkomplexe von den bei 100.000 xg sedimentierenden Zellkomponenten und befindet sich anschließend in löslicher Form in der Zelle. Das normalerweise zu 75% im P100 gebundene Stau1⁵⁵ liegt nach der RNase-Vorbehandlung zu 67% als lösliches Protein bzw. Proteinkomplex im S100 vor. Etwa 40% Staufraktion1⁵⁵ bindet also in Gegenwart von RNA an Komponenten des P100. Unter der zuvor beschriebenen Hypothese, daß die 55 kDa Isoform für die Proteinsynthese am rER von Bedeutung ist, ergibt sich folgendes Bild: Unter nativen Bedingungen könnte Stau1⁵⁵ in einen hochmolekularen Komplex, die Staufraktion1 Granula, eingebunden sein. Die Daten aus der Gelfiltration belegen klar, daß der im S100 befindliche Anteil an Stau1⁵⁵ keineswegs als Monomer, sondern hauptsächlich in einem Proteinkomplex mit einem Molekulargewicht von über 2 MDa vorliegt. Durch die Bindung von Staufraktion1 an RNA könnten die Granula dann in Wechselwirkung mit den Ribosomen des rER treten und die Proteinsynthese einsetzen. Nach Abschluß der Translation und Freisetzung der RNA trennen sich die Granula von den Ribosomen und der Proteinkomplex liegt wieder löslich im Cytoplasma vor. Somit würden die in der Gelfiltration beobachteten hochmolekularen Komplexe keineswegs unspezifische Aggregate, sondern definierte Granula darstellen, die momentan inaktiv nicht in Wechselwirkung mit dem rER stehen. Ein Verhältnis von 75% RNA-gebundenen Staufraktion1/rER Komplexen gegenüber 25% zeitweilig inaktiver Granula erscheint durchaus realistisch. Auch nach Entfernen der RNA sind weiterhin 33% der Stau1⁵⁵-Komplexe mit dem rER assoziiert. Dies läßt sich dadurch begründen, daß die RNase zum Abbau Zugang zur RNA haben muß. Für gewöhnlich ist die mRNA während der Translation weitgehend in einen großen Proteinkomplex integriert. Daher ist es durchaus einleuchtend, daß ein gewisser Anteil an RNA Molekülen nicht abgebaut werden kann und die funktionellen Staufraktion1 Granula demzufolge weiter mit rER assoziiert vorliegen. Die Tatsache, daß nach der RNase-Vorbehandlung etwa 40% des

P100 gebundenen Stau1⁵⁵ als lösliches Protein bzw. löslicher Komplex in den S100 übergehen, zeigt aber deutlich, daß RNA die Wechselwirkung zwischen den Stau1 Komplexen und rER vermittelt.

Im Gegensatz zur 55 kDa Isoform liegt Stau1⁶³ unter nativen Bedingungen überwiegend zu etwa 67% löslich als Monomer oder gebunden in 700 kDa Komplexen in der Zelle vor. Nach Entfernen der RNA aus dem S16 befinden sich nach der Zentrifugation bei 100.000 xg 92% des Proteins in löslicher Form und nur etwa 8% gebunden an Zellkomponenten, welche im P100 sedimentieren. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit kann man schließen, daß es sich bei den Stau1 Partikeln um RNP-Komplexe handelt, die außer Stau1 auch KHC enthalten und für die Lokalisation spezifischer RNAs eine Rolle spielen. Diese Transportpartikel sollten allerdings ausschließlich in löslicher Form in der Zelle vorliegen und daher nicht im P100 sedimentieren. Der Anteil Stau1⁶³, welcher gebunden im P100 vorliegt und erst nach Entfernen der RNA in den S100 übertritt, muß also eine andere Ursache haben. Bei der Zellfraktionierung von Neuronen und anschließenden elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten Krichevsky und Kosik (2001) spezifische hochmolekulare Granula identifizieren, die neben Stau1⁶³ Ribosomen und RNA, aber keine Translationsfaktoren enthalten und vermutlich eine Translations-inaktive Speicherform für dendritisch-lokalisierte mRNAs darstellen. Sie ermittelten einen Sedimentationskoeffizienten, welcher höher ist als der von Polyosomen, was bedeutet, daß diese Strukturen sich eindeutig im P100 befinden müssen. Diese Granula könnten den P100 gebundenen Anteil an Stau1⁶³ repräsentieren, welcher nach RNase-Vorbehandlung in die lösliche Fraktion übertritt. Durch das Entfernen der RNA aus den hochmolekularen Komplexen sollten diese zumindest teilweise zerfallen und anschließend einen geringeren Sedimentationskoeffizienten aufweisen. Zusammen mit den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen würde sich folgendes Bild ergeben: Dendritisch-lokalisierte mRNAs werden zunächst in Stau1 Partikel eingebunden und KHC-vermittelt zu ihrem Bestimmungsort transportiert. Dort zerfällt der Komplex teilweise und die nach wie vor an Stau1⁶³ gebundene mRNA „wartet“ als Teil eines hochmolekularen Speicherkomplexes bis zur Translationsinitiation.

Wie bereits zuvor ausgeführt liegt Stau1⁵⁵ im S100 überwiegend in hochmolekularen Granula von mehr als 2 MDa vor. Entsprechend der oben angesprochenen Hypothese tritt der Komplex nach Bindung an RNA in Wechselwirkung mit rER würde dann im P100 gebunden sedimentieren. Die in der Gelfiltration aus dem S100 isolierten Stau1 Granula sollten also die RNA-ungebundene, lösliche Form des Komplexes darstellen. Daher wäre zu erwarten, daß

4. Diskussion

eine RNase-Vorbehandlung keinerlei Veränderung der Komplexe bewirkt. Im Gegensatz dazu müßten die löslichen Staufen1⁶³/RNA-Transportpartikel durch Entfernen der RNA ihr Molekulargewicht verringern und anschließend in niedrigeren Fraktionen der Gelfiltration vorliegen.

Genau diese Hypothese wird durch die Ergebnisse aus der Gelfiltration nach Vorbehandlung des S100 mit RNase belegt. Die Staufen1 Granula zeigen keinerlei Veränderung bezüglich ihres Molekulargewichts. Sie könnten also einerseits die zuvor beschriebenen hochmolekularen, RNA-freien, löslichen Staufen1⁵⁵ Komplexe darstellen, welche nach Bindung von RNA mit dem rER in Wechselwirkung treten. Andererseits besteht die Möglichkeit, daß aufgrund der komplexen Struktur der Staufen1 Granula die enthaltene RNA soweit geschützt ist, daß sie durch die RNase nicht abgebaut werden kann. Die Staufen1 Partikel zeigen dagegen durch die deutliche Größenreduktion nach der RNase-Vorbehandlung, daß sie eindeutig RNA enthalten und damit Ribonucleoprotein-Komplexe darstellen. Während die Partikel in nativer Form ein Molekulargewicht von etwa 700 kDa besitzen, fraktionieren die Komplexe nach Entfernen der RNA bei etwa 250 kDa. Zusätzlich belegen die Ergebnisse der Dichtegradientenzentrifugation der teilweise zerfallenen Staufen1 Partikel, daß diese neben der erheblichen Größenreduktion durch das Entfernen der RNA auch weniger dicht gepackt vorliegen. So zeigen die RNA-freien Staufen1 Partikel im Saccharosegradienten in ihrem Sedimentationsverhalten eine deutlich geringere Dichte relativ zu den RNA-haltigen. Durch die Analyse der Gesamtheit der Proteine in der Dichtegradientenzentrifugation über Silbergele konnte belegt werden, daß die Größenreduktion nicht allein auf das Entfernen der RNA aus dem Komplex zurückzuführen ist. Vielmehr scheinen die Partikel durch die RNA gebunden zu sein und nach dem Entfernen derselben teilweise zu zerfallen. Lediglich die Proteine, die direkte bzw. indirekte Wechselwirkung mit Staufen1 eingehen, bleiben an dieses gebunden und ändern gemeinsam mit Staufen1⁶³ ihren Sedimentationskoeffizienten. Die übrigen Proteine, welche lediglich über die RNA mit dem Komplex assoziiert waren, lösen sich und liegen anschließend als Monomere oder Teilkomplexe vor, die nicht mehr mit Staufen1 cofraktionieren. Die Identifikation der im Staufen1 RNP-Partikel enthaltenen Proteine steht aber noch aus, so daß hier keine Aussage über ihre Funktion und Bedeutung gemacht werden kann.

Auch die Hypothese, daß die mikroskopisch beobachteten RNP-Komplexe tatsächlich Transportpartikel für dendritisch-lokalisierte RNAs darstellen, läßt sich mit biochemischen Daten unterstützen. Während die Untersuchungen von Juliane Müller bereits zeigten, daß der Anteil an mRNA im Vergleich zur Gesamt-RNA in den Staufen1 Partikel Fraktionen deutlich erhöht

ist, konnte in Rahmen dieser Arbeit belegt werden, daß die 700 kDa Komplexe tatsächlich spezifisch mit mindestens zwei dendritisch-lokalisierten RNAs, BC1 und α -CaMKII, cofraktionieren. Dagegen ließen sich zwei stark exprimierte somatische mRNAs GAPDH und β -Actin nicht in den entsprechenden Fraktionen nachweisen.

Die Resultate deuten klar darauf hin, daß die beiden RNAs tatsächlich Bestandteil der Staufen1 Partikel sind und das letztere *Kinesin-Heavy-Chain*-vermittelt transportiert werden, sind aber noch kein ausreichender Beweis. Dazu muß man die vorliegenden Ergebnisse in Zusammenhang mit mikroskopischen Beobachtungen setzen. Die Untersuchungen von Köhrmann *et al.* (1999) zeigen in lebenden Neuronen einen dendritischen Mikrotubuli-abhängigen Transport RNA-haltiger, exogener Staufen1⁶³-GFP Partikel. Zusätzlich konnte Dr. M. Mallardo durch die Kombination von Immunfluoreszenzfärbung und ISH eine Colokalisation von Staufen1 und BC1, sowie Staufen1 und α -CaMKII in Dendriten belegen (Mallardo *et al.*, 2003). Als drittes Indiz kann man die Untersuchungen von Severt *et al.* (1999) anführen, die zeigen, daß durch die Inaktivierung von KHC der Transport von α -CaMKII mRNA-enthaltenden RNP-Komplexen in den Dendriten lebender Neuronen verhindert wird. Stellt man diese Beobachtungen auf zellulärer Ebene nun den im Rahmen dieser Arbeit ermittelten biochemischen Daten gegenüber, so ergibt sich folgendes Bild: Die isolierten 700 kDa RNP-Komplexe stellen die mikroskopisch beobachteten dendritischen Staufen1 Partikel dar. In ihnen liegt Staufen1⁶³ gemeinsam mit KHC, welches den Transport der Komplexe vermittelt, und mindestens zwei dendritisch-lokalisierten RNAs BC1 und α -CaMKII vor. Ob die beiden RNAs im selben Partikel vorliegen oder ob unterschiedliche Transportpartikel für die beiden Proteine existieren, läßt sich nicht nachweisen. Tatsache ist, daß BC1 eine Bedeutung in der Lokalisation von α -CaMKII zugeschrieben wird (Muslimov *et al.*, 1997). Dies würde eher darauf hindeuten, daß beide RNAs gemeinsam im Komplex vorliegen und es sich um spezifische α -CaMKII/BC1/KHC/Staufen1-Transportpartikel handelt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß auch das zweite Säugerhomolog Staufen2 an RNA bindet. Während in nativem Zustand der überwiegende Anteil des Proteins an Komponenten gebunden ist, welche im P100 sedimentieren, führt das Entfernen der RNA dazu, daß dieser Anteil sich auf etwa 50% reduziert. In der Literatur wird Staufen2 eine Funktion in der Translationskontrolle zugeschrieben. Somit ist es wahrscheinlich, daß es in der Zelle mit Ribosomen / Polysomen und rER assoziiert vorliegt. Dies kann teilweise durch die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Daten belegt werden. Ein Großteil des Staufen2 ist in der Zelle an

4. Diskussion

rER und Polysomen gebunden und sedimentiert daher im P100. Diese Wechselwirkung wird zumindest teilweise von RNA vermittelt. Durch das Entfernen der RNA lösen sich die Komplexe und liegen anschließend löslich im S100 vor. Allerdings ist dieser Effekt nicht so deutlich wie für das Staufen1 Protein. Dies kann mehrere Ursachen haben. Zum einen könnte Staufen2 neben einer indirekten Bindung über RNA direkt mit dem rER / Polysomen in Wechselwirkung treten. Dadurch würde die Assoziation von Staufen2 mit diesen Zellkomponenten zwar geschwächt, aber sie wäre immer noch ausreichend, um eine Sedimentation im P100 zu erreichen. Zum zweiten könnte der Translationskomplex, der Staufen2 enthält bzw. mit diesem assoziiert ist, die RNA vom Abbau durch die RNase weitgehend schützen. Drittens belegen die Untersuchungen von Duchaîne *et al.* (2002), daß Staufen2 an Ribosomen bindet. Somit besteht die Möglichkeit, daß die Lösung des Proteins von im P100 sedimentierenden Komponenten nach RNase-Vorbehandlung darauf zurückzuführen ist, daß durch das Entfernen von rRNA die Polysomen bzw. ER-gebundenen Ribosomen zerfallen und Staufen2 dadurch freigesetzt wird. Insgesamt reagiert aber ein großer Teil von Staufen2 nicht auf das Entfernen der RNA, es muß also im Gegensatz zu Staufen1 weitgehend unabhängig bzw. geschützt mit seinen Interaktionspartnern assoziiert sein.

Ein geringerer Teil Staufen2 ist im S100 gelöst. Hier kommt es einerseits hauptsächlich als Staufen2⁵⁹ gebunden an Ribosomen und ER-Vesikel als Staufen2 Granula und andererseits nahezu ausschließlich in der 52 kDa Isoform in 440 kDa Partikeln vor. Ob RNA in diesen Komplexen enthalten ist, konnte bisher nicht belegt werden. Weder die Staufen2 Granula noch die Staufen2 Partikel zeigen eine Größenreduktion nach der RNase-Vorbehandlung. Dies kann bedeuten, daß beide Komplexe keine RNA enthalten. Die Granula sind aufgrund der Tatsache, daß Staufen2 in Dendriten nicht mit Ribosomen colokalisiert, folglich im Soma der Neuronen lokalisiert. Falls in ihnen keine RNA vorliegt, sie aber sehr wohl mit Ribosomen cofraktionieren, stellen sie möglicherweise analog den Staufen1 Granula eine Form dar, die erst nach Bindung von RNA ihre Funktion für die Translationskontrolle erfüllt. Die biochemisch isolierten 440 kDa Staufen2 Komplexe bilden aufgrund der vorliegenden Ergebnisse mit großer Sicherheit die auf zellulärer Ebene beobachteten Partikel in Dendriten. Sollten sie, was nach den bestehenden Erkenntnissen durchaus möglich erscheint, weder RNA noch Kinesin enthalten, kann eine Funktion in der Lokalisation spezifischer RNAs ausgeschlossen werden. Auch eine Rolle in der Translationskontrolle erscheint auf Grund der Tatsache, daß sie nicht mit Ribosomen assoziiert sind, unwahrscheinlich. Die Beobachtung, daß die RNase-Vorbehandlung zu keiner Größenreduktion der Staufen2 Komplexe führt, kann

aber auch bedeuten, daß RNA in ihnen enthalten ist, diese aber soweit von den Proteinen geschützt wird, daß ein Abbau durch die RNase nicht möglich ist. Die Untersuchungen der Dichtegradientenzentrifugation sprechen allerdings dagegen, daß es sich bei den Staufen2 Partikeln um kompakte Strukturen handelt. Während die Granula einen hohen Sedimentationskoeffizienten zeigen und damit sehr wohl dicht gepackte Strukturen darstellen, liegen die 440 kDa Komplexe im oberen Bereich des Saccharosegradienten vor. Aufgrund der bestehenden Daten kann daher keine Aussage über die Gegenwart von RNA in den mittels Gelfiltration isolierten Staufen2 Komplexen getroffen werden.

4.5 Visualisierung der Staufen1 Partikel

Die durchgeführten elektronenmikroskopischen Untersuchungen belegen eindeutig, daß die Staufen1 Partikel Fraktionen definierte Komplexe enthalten, die sowohl von der geschätzten Größe als auch von der dicht gepackt erscheinenden Struktur zu den biochemischen Daten passen. Dagegen konnte in den Kontrollfraktionen der Staufen1 Granula und Monomere nichts Ähnliches beobachtet werden. Nach Aussage von Dr. H. Schwarz und Dr. A. Hoenger sind diese Komplexe spezifisch und könnten sehr gut die Staufen1 Partikel darstellen. Einen eindeutigen Beleg, ob die visualisierten Komplexe die Staufen1 Partikel repräsentieren oder eventuell zufällig im gleichen Größenbereich fraktionierende Proteasomen darstellen, kann aber lediglich eine Färbung der Strukturen mit Staufen1 spezifischen Antikörpern erbringen.

5. Zusammenfassung

In einer Vielzahl von Zellen werden spezifische RNAs in bestimmte intrazelluläre Bereiche transportiert und anschließend lokal translatiert. Dies ist ein weit verbreiteter Mechanismus zur Polarisierung von Zellen. Auch in Neuronen werden spezifische RNAs in Dendriten lokalisiert; nähere Erkenntnisse über den Mechanismus und die am Transport beteiligten Faktoren fehlen aber bislang. Eine potentielle Komponente stellt das Säugerhomologe des *Drosophila melanogaster* Staufen Proteins dar. In Dendriten wurden RNA-enhaltende Staufen Komplexe beschrieben, die einen Mikrotubuli-abhängigen Transport zeigen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, solche Staufen-enhaltenden Ribonucleoprotein-Komplexe aus Rattenhirn biochemisch zu isolieren und anschließend zu charakterisieren.

Mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten monospezifischen Antikörper gegen die beide Säugerhomologen Staufen1 und Staufen2 wurde einerseits die zelluläre Verteilung beider Proteine untersucht und andererseits die biochemische Reinigung Staufen-enhaltender Komplexe aus Rattenhirn etabliert.

Beide Staufen Proteine lokalisieren in vollständig ausgereiften Neuronen der Ratte nahezu ausschließlich im Zellkörper und in den Dendriten, jedoch nicht im Axon. Während die Homologen im Soma mit dem ER colokalisieren, liegen sie in den Dendriten als fein verteilte Partikel über die gesamte Länge hinweg in getrennten Komplexen vor.

Staufen bildet verschiedene Arten hochmolekularer, löslicher Komplexe: zum einen Granula mit einem Molekulargewicht von 2 MDa und mehr und zum anderen kleinere Partikel mit einem Molekulargewicht von etwa 440 kDa und 700 kDa. Die Staufen1 Partikel enthalten RNA und stellen damit Ribonucleoprotein-Komplexe dar. Durch Entfernen der RNA kommt es zum teilweisen Zerfall der Partikel. Diese Komplexe cofraktionieren in der Gelfiltration spezifisch mit zwei dendritisch-lokalisierten RNAs, *brain cytoplasmic* RNA 1 und der α -Untereinheit der Calcium/Calmodulin-abhängigen Protein Kinase II, sowie mit der schweren Kette des Kinesins, einem Mikotubuli-assoziertem Motorprotein.

In Hirngewebe und Neuronen der Ratte kommt Staufen1 in zwei Isoformen vor. Die kürzere Isoform (Staufen1⁵⁵) ist hauptsächlich mit dem rER assoziiert, wohingegen sich die längere Isoform (Staufen1⁶³) überwiegend in Form von löslichen Komplexen findet. Die Wechselwirkungen werden über RNA vermittelt.

Das Staufen2 Protein existiert im Hirngewebe der Ratte in drei Isoformen. Während die kürzeste (Staufen2⁵²) weitgehend in löslichen Komplexen vorliegt, sind die beiden längeren (Staufen2⁵⁹ und Staufen2⁶²) mit rER, Polysomen bzw. Golgi assoziiert. Diese Interaktion ist teilweise RNA abhängig.

Mit der von mir etablierten Isolierung der Staufen-enthaltenden Ribonucleoprotein-Komplexe aus Rattenhirn gelang erstmals die Identifizierung von zwei dendritisch-lokalisierten RNAs, die von Staufen1 spezifisch erkannt werden könnten. Aufgrund der vorliegenden Daten erscheint ein Transport dieser Ribonucleoprotein-Partikel über einen Kinesinmotor als sehr wahrscheinlich.

6. Material und Methoden

6.1 Material

6.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

[4-(2- H ydroxyethyl)- p iperazino]-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma, Taufkirchen
100 bp DNA Leiter	MBI, Fermentas, St. Leon-Rot
30% Acrylamid-Mix	Roth, Karlsruhe
Aceton	Merck, Darmstadt
Agarose	Biomol, Hamburg
Alkohol-Dehydrogenase	Sigma, Taufkirchen
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Apoferritin	Sigma, Taufkirchen
Aqua dest.; eigene Herstellung mit Millipore-Anlage	Millipore, Eschborn
Bakterien Trypton	Roth, Karlsruhe
BHK-21 Medium Pulver	GIBCO Life Technology, Karlsruhe
Blue Dextran	Sigma, Taufkirchen
B ovines Serum Albumin (BSA)	Calbiochem, Schwalbach
Bradford-Färbelösung	BioRad, München
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloroform (für die Molekularbiologie)	Fluka, Taufkirchen
Chloroform (p.a.)	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue R250	Merck, Darmstadt
D esoxycholat, Natrium-Salz	Sigma, Taufkirchen
Diethylether	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
D ithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
dNTP-Set (peqGOLD)	PeQLab, Erlangen
ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham Pharmacia, Freiburg
Eisessig	Merck, Darmstadt

Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Fluka, Taufkirchen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Na-Salz	Sigma, Taufkirchen
Falcon Röhrchen ; 15 ml / 50 ml PP	Greiner, Frickenhausen
Fisch-Gelatine	Sigma, Taufkirchen
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Fötales Kälberserum (FKS)	Gibco Life Technology, Karlsruhe
Freund's Reagenz, incomplete	Sigma, Taufkirchen
Fugene Transfektions-Reagenz	Roche, Mannheim
Glucose	Merck, Darmstadt
Glutardialdehyd	Merck, Darmstadt
Glutathion Sepharose™4 Fast Flow	Amersham Pharmacia, Freiburg
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Biomol, Hamburg
Glykogen (20 mg/ml)	Roche, Mannheim
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Hyperfilm	Amersham Pharmacia, Freiburg
Imidazol	Merck, Darmstadt
Isopropanol (2-Propanol)	Merck, Darmstadt
Isopropyl-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma, Taufkirchen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Mikroreaktionsgefäße (Eppis); 2 ml / 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Milchpulver	Frema Reform, Lüneburg
Mowiol	Calbiochem, Schwalbach
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Natrium (<i>Sodium</i>) dodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Sigma, Taufkirchen
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe

6. Material und Methoden

Natriumdihydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Merck, Darmstadt
Ni-NTA Agarose	QIAGEN, Hilden
Nitrocellulosemembran; 0,2 µm	Schleicher & Schuell, Dassel
OptiMem	GIBCO Life Technology, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin	Gibco Life Technology, Karlsruhe
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (124:25:1; pH 4,7)	Fluka, Taufkirchen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth, Karlsruhe
Ponceau S	Merck, Darmstadt
Prestained Broad Range Protein Standard	Bio-Rad, München
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad, München
Proteinase-Inhibitor-Cocktail complete, EDTA-frei	Roche, Mannheim
Random Primer H ₆	Invitrogen, Karlsruhe
Reaktionsgefäße für PCR	PeQLab, Erlangen
RNase Inhibitor	Promega, München
	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
RT-PCR Kit	MBI Fermentas, St-Leon-Rot
Saccharose	Merck, Darmstadt
Salzsäure, rauchend (37%)	Merck, Darmstadt
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Steritop Filter	Millipore, Eschborn
Streptomycin	Gibco Life Technology, Karlsruhe
Thyroglobulin	Sigma, Taufkirchen
TitriplexIII (Natrium EDTA)	Merck, Darmstadt
Trichloracetat (TCA)	Merck, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween-20	Sigma, Taufkirchen
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckmann, München
Whatman 3MM Chromatographie Papier	VWR, Bruchsal

6.1.2 Enzyme

DNase I	Boehringer, Ingelheim
DNase I, RNase frei	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Proteinase K	Roche, Mannheim
MuLV-Reverse Transkriptase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A	Sigma, Taufkirchen
Taq-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

6.1.3 Antikörper

6.1.3.1 Primärantikörper

Maus-anti-Tubulinβ (Verdünnung 1:2000)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Kaninchen-anti-Calnexin (Verdünnung 1:1000)	Stressgene/BioMol, Hamburg
Maus-anti-Synaptophysin (Verdünnung 1:500)	Roche, Mannheim
Kaninchen-anti-Kinesin affinitätsgereinigter Antikörper gegen die hoch- konservierte Motordomäne von Kinesinen (mc44) (Verdünnung 1:25.000)	Dr. M. McNiven Mayo Klinik, Rochester, USA
Kaninchen-anti-L7a Peptidantikörper gegen das ribosomale Protein L7a (Verdünnung 1:1000 für Western-Blot) (Verdünnung 1:2000 für Immunfluoreszenz)	Dr. A. Ziemiecki Universität Bern, Schweiz

6. Material und Methoden

Maus-anti-Staufen1

im Rahmen dieser Arbeit hergestelltes Antiserum gegen den C-Terminus des humanen Staufen1 Proteins (129SvEv 1)

(Verdünnung 1:1000 für Western-Blot)

(Verdünnung 1:400 für Immunfluoreszenz)

Kaninchen-anti-Staufen1

im Rahmen dieser Arbeit hergestelltes Antiserum gegen dsRBD5 des murinen Staufen1 Proteins (K)

(Verdünnung 1:1000 für Western-Blot)

Kaninchen-anti-Staufen1

im Rahmen dieser Arbeit hergestelltes Antiserum gegen den C-Terminus des humanen Staufen1 Proteins (O)

(Verdünnung 1:1000 für Western-Blot)

Maus-anti-Staufen2

im Rahmen dieser Arbeit hergestelltes Antiserum gegen den C-Terminus des murinen Staufen2 Proteins (Nr. 2)

(Verdünnung 1:1000 für Western-Blot)

(Verdünnung 1:800 für Immunfluoreszenz; für die Doppelfärbungen wurde mit einer Biotin-Streptavidin-Kaskade amplifiziert.)

Kaninchen-anti-Staufen2

im Rahmen dieser Arbeit hergestelltes Antiserum gegen dsRBD5 des murinen Staufen2 Proteins (N)

(Verdünnung 1:1000 für Western-Blot)

Kaninchen-anti-Staufen2

im Rahmen dieser Arbeit hergestelltes Antiserum gegen den C-Terminus des murinen Staufen2 Proteins (Q)

(Verdünnung 1:1000 für Western-Blot)

6.1.3.2 Sekundärantikörper

Esel-anti-Kaninchen IgG HRP (Meerrettich-Peroxydase) konjugiert (Verdünnung 1:5000)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Ziege-anti-Kaninchen IgG HRP konjugiert (Verdünnung 1:4000)	Dianova, Hamburg
Schaf-anti-Maus IgG HRP konjugiert (Verdünnung 1:5000)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Ziege-anti-Maus IgG HRP konjugiert (Verdünnung 1:4000)	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Kaninchen IgG Fab Fragment Texas Red konjugiert, affinitätsgereinigt (Verdünnung 1:500)	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Kaninchen IgG (H+L) Alexa Fluor 488 konjugiert (Verdünnung 1:500)	Molecular Probes, Leiden, Holland
Ziege-anti-Maus IgG Fab Fragment Texas Red konjugiert, affinitätsgereinigt (Verdünnung 1:500)	Dianova, Hamburg
Schaf-anti-Maus IgG Biotin konjugiert (Verdünnung 1:500)	Roche, Mannheim

6. Material und Methoden

Ziege-anti-Maus IgG (H+L) Cy3 konjugiert, affinitätsgereinigt (Verdünnung 1:800)	Dianova, Hamburg
Streptavidin FITC konjugiert (Verdünnung 1:2000)	Amersham Pharmacia, Freiburg

6.1.4 Plasmide zur Herstellung der bakteriell exprimierten Antigene

Staufen1 C-Terminus humanes Staufen1 Protein, Aminosäuren 179 bis 578 (Stopp) in pRSet; His ₆ -Tag N-terminal	von Dr. J. Ortín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spanien
Staufen2 C-Terminus Maus Staufen2 Protein (Stau2 ⁶²), Aminosäuren 357 bis 569 (Stopp) in pGEX; GST-Tag N-terminal	von Dr. L. DesGroseiller, University of Montreal, Canada
Staufen1 dsRBD5 Maus Staufen1 Protein, Aminosäuren 455 bis 578 (Stopp) in ZZTev80; His ₆ -Tag N-terminal	von Dr. P. Macchi, MPI für Entwicklungsbiologie, Tübingen
Staufen2 dsRBD5 Maus Staufen2 Protein (Stau2 ⁶²), Aminosäuren 459 bis 569 (Stopp) in ZZTev80; His ₆ -Tag N-terminal	von Dr. P. Macchi, MPI für Entwicklungsbiologie, Tübingen

Die genauen Aminosäuresequenzen der jeweiligen Antigene sind im Anhang aufgeführt.

6.1.5 Oligonucleotide (Primer)

BC1:

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

α -CaMKII:

Vorwärts 5'-GCA GCC AAC TCA TGT AGA CC-3'

Rückwärts 5'-CCA GTA GCA GAA AGT TTG AGC-3'

GAPDH:

Vorwärts 5'-GAG CTG AAC GGG AAG CTC AC-3'

Rückwärts 5'-GGA GAG TGC TCA GTG TTG GG-3'

 β -Actin:

Vorwärts 5'-TTC GCG GGC GAC GAT GCT CC-3'

Rückwärts 5'-CAG GTC CAG ACG CAG GAT GG-3'

6.1.6 Geräte

Agarosegelkammer	Selbstbau, Werkstatt MPI für Entwicklungs- biologie, Tübingen
Biofuge A	Heraeus, Stuttgart
COHU Cooled LCD Camera	Chromophor, Duisburg
Dounce-Homogenisator	über Multimed, Kirchheim/Teck
Drystar Gel Trockner	H. Hölzel GmbH, Wörth
Fluo-Link Geldokumentationsanlage	MWG-Biotech, Ebersberg
Fluoreszenzmikroskop Axioplan	Zeiss, Göttingen
FPLC-Anlage LCC-500	Amersham Pharmacia, Freiburg
Fraktionssammler Frac-200	Amersham Pharmacia, Freiburg
French Pressure Cell Press	American Instrument Company, Silverspring, USA
Gelfiltrationssäulen: Sephacryl S-300 HR, Sephacryl S-500 HR	Amersham Pharmacia, Freiburg
GeneQuant pro Spektralphotometer	Amersham Pharmacia, Freiburg
Inkubations-Schüttler, Clim-O-Shake	Kühner, Basel, Schweiz
Lyophilisator	Heraeus, Stuttgart
Medical Film Processor QX-70	Konica, Hohenbrunn
Minifuge GL	Heraeus, Stuttgart

6. Material und Methoden

Mini-Protean 3 Cell SDS-PAGE System	Bio-Rad, München
Optima™TL Ultrazentrifuge	Beckman, München
pH Meter MP 225	Mettler Toledo, Schwarzenbach, Schweiz
Power Pack 300	Bio-Rad, München
Refrigerated Condensation Trap	Bachofer, Reutlingen
Rotor GS3	Sorvall, Du Pont, Hamburg
Rotor SS34	Sorvall, Du Pont, Hamburg
Rotor SW28	Beckmann, München
Rotor Ti60	Beckmann, München
Rotor TL 100.3	Beckman, München
Rotor TLA 100.3	Beckman, München
Sorvall® RC-5B Refrigerated Superspeed Zentrifuge	Sorvall, Du Pont, Hamburg
Spektralphotometer UV-160A	Shimadzu, Japan
Thermal Cycler, PTC-200 Peltier	MJ Research, über Biozym, Hess. Oldendorf
Thermomixer compact	Eppendorf, Wesseling-Bergdorf
TL-100 Ultrazentrifuge	Beckmann, München
Trans-Blot Cell Naßblotzelle	Bio-Rad, München
Ultraschallbad	Branson, über Heinemann, Schwäbisch-Gemünd
Ultrazentrifuge	Beckman, München
Vakuumpumpe	AEG, Frankfurt/Main
Vortex	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Zentrifugen 5417C, 5417R	Eppendorf, Wesseling-Bergdorf

6.1.7 Tiere

Ratten (<i>Rattus norvegicus domesticus</i>): Stamm Sprague-Dawley (CD)	Eigenzucht / Charles Rivers, Sulzfeld
Mäuse (<i>Mus musculus</i>): Stamm Black6	Eigenzucht
Stamm 129 SvEv	Eigenzucht
Stamm Balb/C	Charles Rivers, Sulzfeld

Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*):
Hauskaninchenrasse
Eigenzucht

6.1.8 Bakterien

Escherichia coli, Stamm Rosetta™
Novagen, Schwalbach

6.1.9 Säugerzellen

BHK-21 (*Baby Hamster Kidney*)
DSMZ, Braunschweig

COS-7 (aus der afrikanischen Grünen Meerkatze)
DSMZ, Braunschweig

Neuronen: Die primären hippocampalen Neuronen aus E17 Embryos von *Rattus norvegicus domesticus* wurden entsprechend dem Standard Protokoll von Banker und Goslin (1998) mit Modifikationen (Köhrmann *et al.*, 1999) präpariert und kultiviert.

6.1.10 Puffer und Lösungen

6.1.10.1 für die bakterielle Expression von Proteinen

LB-(Luria Bertani) Medium: 10 g Bakterien Trypton
 5 g Hefeextrakt
 10 g Natriumchlorid
 ⇒ mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen, pH 7,0 einstellen
 (Natronlauge) und autoklavieren

5x PBS: 700 mM Natriumchlorid
 13,5 mM Kaliumchlorid
 50 mM Dinatriumhydrogenphosphat
 9 mM Kaliumdihydrogenphosphat
 ⇒ pH 7,3 bzw. 8,0 einstellen

6. Material und Methoden

Lysepuffer: 2x PBS, pH 8,0
1 mM PMSF
1x Proteinase Inhibitor complete
0,05% Tween 20
0,02 mg/ml DNase I
0,2 mg/ml Lysozym
0,05 mg/ml RNase A

Waschpuffer: 2x PBS, pH 8,0
20 mM Imidazol

Elutionspuffer: 2x PBS, pH 8,0
250 mM Imidazol

Glutathion-Elutionspuffer: 50 mM Tris
10 mM reduziertes Glutathion
⇒ pH 8,0 einstellen

6.1.10.2 für die Zellbiologie

HBSS-Puffer: 135 mM Natriumchlorid
20 mM HEPES
4 mM Kaliumchlorid
1 mM Dinatriumhydrogenphosphat
2 mM Calciumchlorid
1 mM Magnesiumchlorid
10 mM Glucose
⇒ pH 7,3 einstellen

Blocklösung: 2% FKS
2% BSA
0,2% Fisch Gelatine
in PBS, pH 7,3

GMEM-Medium (für BHK-21): 14,2 g BHK-21 Medium
2,75 g Natriumdihydrogencarbonat
10 ml 1 M HEPES, pH 7,3
50 mg Streptomycin
48 mg Penicillin
50 ml FKS
⇒ mit Aqua dest auf 1 l auffüllen und steril filtrieren

6.1.10.3 für die Analyse von Proteinen

10x SDS-Laufpuffer: 0.25 M Tris
1.92 M Glycin
1% SDS

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

10x Transferpuffer (Western-Blot): 0,2 M Tris
1,5 M Glycin

Ponceau-S-Lösung: 0,2% (w/v) Ponceau S
3% TCA (w/v)

10x TBS: 100 mM Tris
1,5 M Natriumchlorid
⇒ pH auf 7,2 einstellen (konz. Salzsäure)

TBS-T: 1x TBS mit 0,05% Triton X-100

Blockierlösung: 5% Magermilchpulver in TBS

6. Material und Methoden

10% Trenngel (5 ml Lösung):

Aqua dest.	2,0 ml
30% Acrylamidmix	1,7 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8,8	1,3 ml
10% SDS	50 µl
10% APS	50 µl
TEMED	2 µl

2,5% Sammelgel (2 ml Lösung):

Aqua dest.	0,68 ml
30% Acrylamid-Mix	0,17 ml
1M Tris-HCl, pH 6,8	1,13 ml
10% SDS	10 µl
10% APS	10 µl
TEMED	1 µl

Fixierlösung (für Silbergele):	30% Ethanol
	10% Eisessig
	60 % Aqua dest.

Conditionierlösung (für Silbergele):	0,5% Glutardialdehyd
	0,1% Natriumthiosulfat
	30% Ethanol
	in 0,4 M Natriumacetat, pH 6,0

Färbelösung (für Silbergele):	100 mg Silbernitrat
	25 µl 37% Formaldehyd
	in 100 ml Aqua dest.

Entwickler (für Silbergele):	2,5% Natriumcarbonat
	40 µl 37% Formaldehyd
	in 100 ml Aqua dest.

Stopplösung (für Silbergele): 50 mM TitriplexIII

6.1.10.4 für die Zell- und Gewebeextraktion

Lysepuffer für Gewebeextrakte: 50 mM HEPES
150 mM Kaliumchlorid
1 mM DTT
1 Proteinase-Inhibitor Tablette/10 ml
40U/ml RNase-Inhibitor
in sterilem, RNase-freiem Aqua dest. angesetzt

Lysepuffer für Zellextrakte: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5
100 mM Natriumchlorid
0,5% Triton X-100
10% Glycerin
25 mM Natriumfluorid
1 mM EDTA
1 mM PMSF
1 mM DTT
1 Proteinase-Inhibitor Tablette/10 ml

6.1.10.5 für die Gelfiltrations-Chromatographie

Laufpuffer: 50 mM HEPES
150 mM Kaliumchlorid
in sterilem, RNase-freiem Aqua dest. ansetzen,
anschließend filtrieren und entgasen

6.1.10.6 für die Analyse von RNA

50x TAE-Puffer: 40 mM Tris
20 mM Natriumacetat
1 mM EDTA
⇒ pH 7,5 einstellen (mit Eisessig)

6.2.1.4 Aufreinigung mittels Sepharose

Für das Lysat der GST-Tag Antigene werden 2 ml Glutathion Sepharose (50% Suspension) zweimal mit reichlich PBS, pH 7,3 gewaschen und dann mit 2 ml PBS, pH 7,3 gemischt. Nach der Zugabe des Lysats wird 30 min bei Raumtemperatur unter Rotieren inkubiert und die Sepharose anschließend durch Zentrifugation (5 min, 500 xg) von den ungebundenen Proteinen getrennt. Nach dreimaligem Waschen mit reichlich PBS, pH 7,3 werden die gebundenen Proteine in drei Schritten eluiert. Dazu wird die Sepharose jeweils 10 Minuten mit 1 ml Glutathion-Elutionspuffer bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zentrifugiert.

6.2.1.5 Vorbereitung des Antigens zur Injektion

Für die Injektion mit Antigen in denaturierter Form werden die im Eluat enthaltenen Proteine zunächst mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wird das Gel 3 - 4 Mal in reichlich Aqua dest. gewaschen und in 150 ml 0,05% Coomassie Brilliant Blue R250 in Aqua dest. für 10 min angefärbt. Danach wird das Gel gründlich mit Aqua dest. entfärbt. Die Nachweisgrenze mit dieser Färbemethode beträgt 1-2 µg. Die entsprechenden Antigene werden aus dem Gel ausgeschnitten und auf Parafilm zerkleinert. Nach Überführen in einen Mörser werden die Gelstücke für 2 h bei -80°C eingefroren und anschließend über Nacht lyophilisiert. Am nächsten Tag werden die Fragmente zu feinem Pulver zermahlen und in PBS aufgenommen. Die Proteinkonzentration sollte 0,1 µg/µl betragen.

Für die Immunisierung mit nativem Antigen werden die Eluate auf eine Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml (für die Mäuse) bzw. 2-4 mg/ml (für die Kaninchen) eingestellt. Die Injektion erfolgt mit einer Emulsion aus 1 Volumen Antigenlösung und 1 Volumen Freund's Adjuvant.

6.2.2 Gewinnung von polyklonalen Antikörpern

6.2.2.1 Immunisierung der Mäuse

Für die Gewinnung der Maus-anti-Staufen1 Antikörper wurden 5 Mäuse des Stammes BLACK6 und 5 Mäuse des Stammes 129 SvEv mit jeweils 20 µg des denaturiertem Staufen1 C-Terminus immunisiert.

Zur Herstellung Staufen2-spezifischer Antikörper in Mäusen erfolgte eine Immunisierung von 5 Mäusen des Stammes Balb/C mit dem Staufen2 C-Terminus. Für die beiden ersten Injektio-

6. Material und Methoden

nen wurden je 20 µg denaturiertes Antigen, für die weiteren jeweils 50 µg natives Antigen pro Tier verwendet.

Die Mäuse werden durch intraperitoneale Injektionen an Tag 1, 14, 28 und 35 mit einem Maximalvolumen von 200 µl Antigenlösung immunisiert. Nach der Probeblutung an Tag 42 werden im Abstand von jeweils 7 Tagen weitere Injektionen vorgenommen, bis die Tiere eine befriedigende Immunantwort zeigen. Zur Gewinnung von Präimmun- und Probeserum wird Blut aus der Schwanzvene entnommen. Die finale Blutung erfolgt unmittelbar nach dem Töten der Tiere durch Genickbruch aus dem Herzen.

6.2.2.2 Immunisierung der Kaninchen

Für die Herstellung der Kaninchenantikörper wurden jeweils zwei Tiere mit nativ aufgereinigtem Staufen1 dsRBD5, Staufen2 dsRBD5, Staufen1 C-Terminus und Staufen2 C-Terminus immunisiert. Für die Erstimmunisierung wurden jeweils 1,5 mg, für alle weiteren 1 mg Antigen pro Tier verwendet.

Die Immunisierung der Kaninchen erfolgt durch jeweils zwei bis vier subcutane Injektionen im Abstand von einem Monat. Zehn Tage nach der zweiten Immunisierung wird das erste Mal eine Probeblutung entnommen. Nach Erreichen einer befriedigenden Immunantwort werden die Tiere alle vier Tage durch Öffnung der Ohrvene geblutet.

6.2.2.3 Aufarbeitung des Serums

Nach einer Inkubation des frischen Blutes von 2 h bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4°C wird das Serum durch zwei Zentrifugationen von 10 min bei 3.000 xg und 15 min bei 10.000 xg abgetrennt. Anschließend wird das Komplementsystem durch 20-minütiges Erhitzen auf 56°C inaktiviert. Die Lagerung des Serums erfolgt bei -20°C.

6.2.3 Zellbiologische Methoden

6.2.3.1 Transfektion von Säugerzellen

Für Zellextrakte aus BHK-21 und COS-7 werden jeweils 300.000 Zellen pro 6-cm Gewebekulturschale, für die Immunfluoreszenzfärbungen 60.000 Zellen auf ein steril gebackenes Deckglaschen in der 12-well Platte ausgesät. Am nächsten Tag sind die Zellen zu etwa 50%

konfluent. Pro 6-cm Schale werden 200 µl OptiMem mit 6 µl Fugene und 2 µg DNA vorsichtig gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für ein Deckgläschen wird der halbe Ansatz verwendet. Anschließend wird die Mischung vorsichtig auf die Zellen aufgebracht. Nach einer Inkubation von 12 bis maximal 24 h können die Zellen lysiert bzw. fixiert werden.

6.2.3.2 Immunfluoreszenzfärbung

Die Deckgläschen werden kurz in vorgewärmten HBSS gewaschen und anschließend 15 min lang in 4% PFA fixiert. Dann werden die Zellen dreimal je 5 min mit PBS gewaschen und 10 min mit 0,1% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Nach erneutem Waschen werden die Deckgläschen 30 min in Blocklösung gelegt und anschließend mit dem Primärantikörper in 10% Blocklösung (verdünnt mit PBS) für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach wiederum drei Waschschritten von je 5 min in PBS werden die Zellen in Sekundärantikörper in 10% Blocklösung überführt. Diese Inkubation dauert 45 min bei Raumtemperatur, anschließend wird erneut dreimal 5 min in PBS gewaschen. Im Anschluß wird noch 5 min mit DAPI-Lösung gefärbt und wiederum dreimal 5 min mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen werden dann mit der „Zellseite“ auf mit MOWIOL benetzte Objektträger gelegt, welches über Nacht bei 4°C aushärtet. Für die Doppelfärbungen erfolgt vor der Inkubation mit Sekundärantikörper noch die mit dem zweiten Primärantikörper.

Bei den Doppelfärbungen mit primären Kaninchenantikörpern (anti-Staufen1 bzw. anti-L7a) und Maus-anti-Staufen2 wird für den letzteren eine Biotin-Streptavidinkaskade verwendet, um ein vergleichbar starkes Signal der beiden Antikörper zu erreichen. Nach der Inkubation mit den Primärantikörpern werden die Deckgläschen zunächst für 45 min in den Kaninchen-Sekundärantikörper überführt. Im Anschluß werden die Zellen gewaschen und dann 1 h mit dem Biotin-konjugierten Ziege-anti-Maus IgG inkubiert. Danach werden die Deckgläschen wiederum gewaschen und anschließend 30 min mit FITC-konjugiertem-Streptavidin inkubiert.

6.2.4 Methoden zur Analyse von Proteinen

6.2.4.1 Protein-Bestimmung nach Bradford

Der 1976 von Bradford entwickelte Test beruht auf einer Komplexbildung zwischen dem sauren Farbstoff Coomassie-Brilliant Blau G250 und Proteinen. Der Farbstoff bindet unspezifisch

6. Material und Methoden

an kationische und unpolare hydrophobe Seitenketten der Proteine, wodurch die unprotonierte, anionische Sulfonatform stabilisiert wird. Es erfolgt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm.

Die Messung sollte im linearen Bereich der Sättigungskurve erfolgen. Daher werden für jede Messung maximal 15 µg Protein mit 1 ml einer 1:5 Verdünnung der Farbstoff-Lösung versetzt und die Absorption bei 595 nm gemessen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt über eine Eichgerade mit einer bekannten Menge an BSA.

6.2.4.2 Proteinfällung mit Trichloressigsäure

Eine häufig eingesetzte Methode, um Proteine aus Lösungen auszufällen, ist die Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) (analog Bollag & Edelstein, 1991). Diese Methode denaturiert die Proteine und wird daher vor allem zur Konzentrationserhöhung für die Gelelektrophorese eingesetzt.

Für die Fällungsreaktion wird die Proteinlösung mit 0,2 Volumen 100%-iger TCA unter vortexen gemischt und 30 min bei -20°C inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 30 min bei 16.000 xg und 4°C, wird das Präzipitat zweimal mit eiskaltem Aceton gewaschen und 10 min getrocknet. Die Proteine werden anschließend in Laemmli-Puffer aufgenommen.

Für eine quantitative Fällung sehr kleiner Proteinkonzentrationen wird 1 ml Proteinlösung mit 0,1 ml 0,15% Desoxycholat unter vortexen gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl 100% TCA wird erneut gevortext und 5 min bei 16.000 xg zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, die Proteine gewaschen und in Puffer aufgenommen.

6.2.4.3 Chloroform/Methanol-Extraktion

Um Detergenzien und Lipide aus Proteinlösungen zu entfernen, wird häufig die Extraktion mit einem Chloroform/Methanol-Gemisch nach Wässel und Flügge (1984) eingesetzt.

Die Proteinlösung wird mit 4 Volumen Methanol unter vortexen gemischt und 10 sec bei 16.000 xg zentrifugiert. Nach Zugabe von 1 Volumen Chloroform wird wieder 10 gevortext und zentrifugiert. Die Trennung in wäßrige und organische Phase erfolgt über die anschließende Zugabe von 3 Volumen Aqua dest., danach wird für 30 sec gevortext und die Phasen durch eine Zentrifugation von 2 min bei 16.000 xg getrennt. Die obere Phase wird entfernt und die Proteine durch Zugabe von 3 Volumen Methanol gefällt. Nach 10 sec vortexen und

einer 2 minütigen Zentrifugation bei 16.000 xg wird der Überstand abgenommen und die Proteine nach dem Trocknen in Laemmli-Puffer aufgenommen.

6.2.4.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Das von Laemmli (1970) entwickelte Verfahren (SDS-PAGE) macht sich die Eigenschaft des anionischen Detergenz SDS (Abkürzung für *sodium dodecyl sulfat*, Natriumdodecylsulfat) zunutze, die Eigenladung von Proteinen zu überdecken, so daß Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen.

Bei der Probenvorbereitung werden die Proteine in einem Überschuß von SDS auf 95°C erhitzt, so daß die Sekundär- und Tertiärstrukturen aufgelöst werden. Die Disulfidbrücken werden durch Zugabe von Dithiothreitol reduziert. Mit der diskontinuierlichen Elektrophorese verhindert man ein Aggregieren von Proteinen beim Eintritt in das Gel und erhält schärfere Banden. Die Gelmatrix wird hierfür in zwei Bereiche eingeteilt. Die Proteine werden zunächst im weitporigen Sammelgel bei 100 V konzentriert und anschließend im engporigen Trenngel bei 150 V nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Elektrophorese wird im Minigel System der Firma BioRad durchgeführt.

6.2.4.5 Western-Blotting

Durch das 1979 von Renart und Towbin entwickelte Verfahren werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes transferiert und immobilisiert und so aus der Polyacrylamidmatrix auf eine Membran aus Nitrocellulose übertragen. Anschließend lassen sich die Proteine mit spezifischen Antikörpern direkt auf der Membran nachweisen.

Der Elektrotransfer erfolgt in 2 h bei 200 mA in einer Miniblot-Apparatur der Firma BioRad und wird nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die verwendete Nitrocellulosemembran hat eine Porengröße von 0,2 µm. Nach dem Transfer werden die Proteinbanden auf der Membran reversibel mit Ponceau S-Lösung gefärbt und die einzelnen Spuren mit einem wasserfesten Stift markiert. Um die unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran zu unterdrücken, wird diese für mindestens 30 min bei Raumtemperatur in Blockierlösung geschüttelt. Anschließend wird die Membran mit dem in Blockierlösung verdünnten Primärantikörper für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Membran wird für je 5 min in TBS, TBS-T und TBS gewaschen. Danach wird die Membran 45 min bis 1 h mit

6. Material und Methoden

dem in Blockierlösung verdünnten Sekundärantikörper inkubiert. Anschließend wird wie zuvor gewaschen zusätzlich eines weiteren Schrittes in TBS, da geringe Konzentrationen an Detergenz die Chemolumineszenzreaktion beeinflussen können. Zum Schluß werden je 1 ml der ECL-Detektionslösungen auf der Membran verteilt. Während der einminütigen Inkubation beginnt die Meerrettich-Peroxidase der Sekundärantikörper Peroxide unter Bildung hochreaktiver Sauerstoffradikale zu spalten, welche in alkalischem Medium Luminol oxidieren. Das in angeregtem Zustand befindliche Oxidationsprodukt geht unter Abgabe von Chemolumineszenz in den Grundzustand über. Diese Strahlung wird in der Dunkelkammer auf einem Röntgenfilm festgehalten und dieser anschließend entwickelt.

6.2.4.6 Silberfärbung von Proteinen

Ein häufig eingesetzter Nachweis von Proteinen in Gelen ist die Silberfärbung (modifiziert nach Celis, 1994). Sie ist hochempfindlich und erreicht Nachweisgrenzen von Subnanogramm-Mengen von Protein.

Zunächst werden die Proteine durch Schwenken des Gels in Fixierlösung für mindestens 1 h fixiert. Anschließend wird das Gel für 16 min in Conditionierlösung für die Färbung vorbereitet. Nach gründlichem Waschen (3 x 5 min) mit Aqua dest. wird das Gel 20 min lang in die Färbelösung eingelegt. Dabei werden einige Silber-Ionen von den Proteinen gebunden und, initiiert von den funktionellen Gruppen und Peptidbindungen, durch Reduktion in Silberkeime umgewandelt. Um überschüssiges Silbernitrat im Gefäß zu entfernen, wird anschließend zweimal kurz (maximal 10 sec) mit Aqua dest. gewaschen, bevor die Silber-Ionen im Gel durch die Reduktionsmittel im Entwickler zu metallischem Silber reduziert werden. Dies findet in der Nähe der Silberkeime viel schneller statt als im übrigen Gel, daher färben sich die Proteinbanden schnell dunkelbraun bis schwarz. Damit nicht alle Silber-Ionen im gesamten Gel zu metallischem Silber reduziert werden, muß die Reaktion rechtzeitig (nach etwa 5 bis 15 min) durch die Zugabe der Stopplösung beendet werden.

6.2.5 Methoden zur Isolierung von Proteinen

6.2.5.1 Herstellung von Zellextrakten

Die Gewebekulturzellen werden zweimal mit eiskaltem HBSS gewaschen und anschließend in 300 µl Lysepuffer pro T75-Flasche bzw. 50 µl Lysepuffer pro 6-cm Schale mit einem Zell-

schaber abgekratzt. Die Zellen werden im folgenden 20 min auf Eis lysiert, dabei wird das Gefäß etwa alle 5 min invertiert. Anschließend werden die unlöslichen Bestandteile durch eine 15 minütige Zentrifugation bei 4°C und 16.000 xg abgetrennt. Die Proteinkonzentration des Überstandes wird mittels Bradford-Test bestimmt und die Proteine anschließend mit TCA gefällt. Jeweils 30 µg Protein pro Spur werden über SDS-PAGE aufgetrennt.

6.2.5.2 Herstellung von Hirnextrakten

Der Lysepuffer wird unmittelbar vor der Präparation frisch angesetzt und auf Eis gekühlt. Alle Schritte erfolgen auf Eis bzw. 4°C und unter streng RNase-freien Bedingungen. Die mit Ether betäubten Ratten werden enthauptet und das Gehirn entnommen. Dieses wird anschließend in vorgewärmten PBS gespült und die Cortexhälften vom Rest abgetrennt. Nach Entfernen der Hirnhäute und Blutgefäße wird das Gewebe im Dounce-Homogenisator in 1 ml Lysepuffer pro Cortexhälfte zerkleinert.

6.2.5.3 Differentielle Zentrifugation

Die differentielle Zentrifugation ist eine klassische Methode zur Zellfraktionierung und nutzt die unterschiedlichen Sedimentationsgeschwindigkeiten der einzelnen Zellbestandteile aus.

Das Cortex-Homogenat wird 15 min bei 16.000 xg und 4°C (Biofuge) zentrifugiert. Dadurch erfolgt eine Trennung in Sediment (P16) und Überstand (S16). Der Überstand wird anschließend in einem zweiten Zentrifugationsschritt von 20 min bei 100.000 xg und 4°C (TLA 100.3) weiter getrennt in Sediment (P100) und Überstand (S100).

Zur Bestimmung der in den einzelnen Fraktionen enthaltenen Proteinkonzentration wird der Bradford-Test verwendet. Die Pellets werden dazu in Lysepuffer resuspendiert. Um die Gesamtmenge des in den einzelnen Fraktionen enthaltenen Proteins zu berechnen, wird die ermittelte Proteinkonzentrationen mit dem Volumen der jeweiligen Fraktion multipliziert. Für die Auftrennung mittels SDS-PAGE werden die Proteine mit Chloroform/Methanol extrahiert und anschließend 50 µg Protein pro Spur geladen.

6.2.5.4 Gelfiltrations-Chromatographie

Die auch Ausschlußvolumenchromatographie genannte Gelfiltrations-Chromatographie basiert auf der unterschiedlichen Permeation der Analyten in ein poröses Trägermaterial mit

6. Material und Methoden

kontrollierter Porengröße. Dadurch werden lösliche Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt. Kleinere Moleküle können leichter in die Poren des Trägermaterials eindringen, wodurch sie längere Zeit brauchen, um eluiert zu werden. Als Trägermaterial wurde Sephacryl S300 bzw. Sephacryl S500 verwendet. Sephacryl S300 wird in einer fertig gepackten 60/26 High Resolution Säule angeboten und umfaßt einen Trennbereich von 1,5 MDa bis 10 kDa. Das Sephacryl S500 Material wurde von der Firma Amersham Pharmacia in eine gewerbliche 70/26 Säule gepackt und trennt Proteine bzw. Proteinkomplexe von 10 MDa bis etwa 100 kDa. Das Bettvolumen beider Säulen beträgt 320 ml.

Beide Säulen wurden gemäß den Herstellerangaben vorbereitet und anschließend mittels eines Gemisches aus käuflichen Proteinen bekannter Größe geeicht: Blue Dextran: 2 MDa, Thyroglobulin: 669 kDa, Apoferritin: 443 kDa, Alkohol-Dehydrogenase: 150 kDa, BSA: 66 kDa. Um eventuell vorhandene RNasen aus dem Säulenmaterial zu entfernen, werden die Säulen in regelmäßigen Abständen mit einem Bettvolumen 0,2 M NaOH gewaschen.

Die Chromatographie wird mit einer Flußrate von 1,3 ml/min für die Sephacryl S300-Säule bzw. 2,5 ml/min für die Sephacryl S500-Säule durchgeführt. Für einen Gelfiltrationslauf werden 2 ml S100 (entspricht etwa 20 – 30 mg) geladen. Es werden je 3 ml Fraktionen von 90 ml bis 210 ml (Sephacryl S300-Säule) bzw. 140 ml bis 257 ml (Sephacryl S500-Säule) gesammelt. Für die Analyse mittels SDS-PAGE und Western-Blot werden die Proteine mit TCA gefällt und jeweils 20% der Fraktionen pro Spur geladen.

6.2.5.5 Dichtegradientenzentrifugation

Teilchen ähnlicher Größe unterscheiden sich häufig in ihrer Dichte. Zur Trennung wird die isopyknische Zentrifugation, auch Sedimentations-Gleichgewichtszentrifugation genannt, eingesetzt. Hierbei zentrifugiert man über einen längeren Zeitraum mit hoher Geschwindigkeit in einem Dichtegradienten bis zur Gleichgewichtseinstellung.

Für die Zentrifugation wird ein linearer Gradient von 10 bis 50% Saccharose (in Gelfiltrations-Laufpuffer) verwendet. Die höchste Konzentration liegt im unteren Bereich des Röhrchens. Nach dem Übersichten des 25 ml Gradienten mit jeweils einer Fraktion der Gelfiltration (3 ml) wird für 3 h bei 25.000 rpm im SW28 zentrifugiert. Anschließend werden vorsichtig jeweils 1,5 ml Fraktionen von oben nach unten abgenommen.

Für den Dichtegradienten der RNase-behandelten bzw. kontrollbehandelten Stufen1 Partikel werden zwei benachbarte Gelfiltrationsfraktionen vereinigt (6 ml) und anschließend jeweils 3 ml getrennt behandelt.

6.2.6 Methoden zur Analyse von RNA

6.2.6.1 RNase-Behandlung

Die RNase-Vorbehandlung wurde mit dem S16 und dem S100 der differentiellen Zentrifugation, sowie mit der Stufen1 Partikel Fraktion aus der Gelfiltration durchgeführt. Die jeweilige Lösung wird mit einer Endkonzentration von 5 mM EDTA und 40 µg/ml RNase A (Stammlösung: 10 mg/ml in 10 mM Tris, pH 7,5; 15 mM Natriumchlorid) gemischt und 1 h bei 30°C inkubiert. Die analoge Inkubation der Kontroll-Lösung erfolgt mit einer Endkonzentration von 5 mM EDTA, 0,04 mM Tris, pH 7,5 und 0,06 mM Natriumchlorid.

6.2.6.2 DNase-Behandlung

Der S16 der differentiellen Zentrifugation wird mit einer Endkonzentration von 5 mM EDTA und 2 U RNase-freier DNase I gemischt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach 15 min erfolgt eine Zugabe von weiteren 2 U RNase-freier DNase I.

6.2.6.3 Extraktion von RNA aus Fraktionen der Gelfiltration

Um eine ausreichende Menge an RNA für die nachfolgende Analyse zur Verfügung zu haben, werden die Fraktionen von zwei Gelfiltrationen gesammelt. Die Proben werden sofort bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C eingefroren, um unspezifische Abbaureaktionen zu unterdrücken. Anschließend werden jeweils zwei aufeinanderfolgende Fraktionen aus beiden Gelfiltrationen vereinigt, so daß 12 ml Fraktionen zur Verfügung stehen. Diese werden mit je 12 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol gut gemischt und 10 min bei 3.000 xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird in ein frisches 50 ml Falcon überführt. Die Extraktion wird wiederholt und anschließend ein weiteres Mal mit reinem Chloroform durchgeführt. Die RNA-enthaltende Phase wird nun mit 1 µl Glycogen, 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,2 und 3 Volumen Ethanol gemischt. Die RNA wird anschließend durch eine Zentrifugation von 30 min bei 14.000 xg und 4°C im Ti60 Rotor präzipitiert. Das Pellet wird vorsichtig in 1,5 ml 70% Ethanol gelöst, in ein RNase-freies Mikroreaktionsgefäß überführt und 15 min bei 16.000 xg und 4°C zentrifugiert. Nach dem Trocknen wird die RNA vorsichtig in 22 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert.

Für die Bestimmung der Konzentration werden je 2 µl RNA mit 98 µl Aqua dest. verdünnt und die Absorption bei 260 und 280 nm im Spektralphotometer gemessen.

6. Material und Methoden

6.2.6.4 Überschreiben von RNA in cDNA mittels Reverser Transkriptase

Durch das Enzym Reverse Transkriptase (eine RNA-abhängige DNA-Polymerase) wird RNA in komplementäre DNA (cDNA) überschrieben. Die cDNA wird anschließend wie klassische DNA für molekularbiologische Methoden eingesetzt.

Auf Eis werden 0,5 - 1 µg RNA, 3 µg Random Primer H₆ und 1 mM dNTPs gemischt und das Volumen auf 10 µl mit RNase-freiem Aqua dest. aufgefüllt. Anschließend wird der Ansatz für 5 min bei 67°C inkubiert und sofort wieder auf Eis gestellt. Nach einer zweiminütigen Inkubation werden 1x RT-Puffer, 5 mM MgCl₂, 10 mM DTT und 20-50 Einheiten Rnase-Inhibitor pro Reaktion zugegeben und der Ansatz für 10 Minuten auf 25°C erhitzt. Nach 2 min werden jeder Reaktion 200 Einheiten M-MuLV Reverse Transkriptase zugefügt. Im Anschluß werden die Proben für 50 min bei 42°C inkubiert und die Reaktion durch eine 15-minütige Inkubation bei 70°C abgestoppt.

6.2.6.5 Polymerase Kettenreaktion

Die 1985 von Saiki entwickelte Polymerase-Kettenreaktion (PCR von *Polymerase chain reaction*) wird zur Vervielfältigung von Nucleinsäuresequenzen verwendet. Die Amplifikation erfolgt mit Hilfe von Primern, die komplementäre Abschnitte des DNA-Stranges umfassen. Der 5'-Primer liest in Richtung des Sinn-Stranges (*sense*), der 3'-Primer entgegengesetzt dazu (*antisense*). Nach Denaturierung des DNA-Doppelstranges lagern sich die Primer an und die hitzeresistente Polymerase aus *Thermus aquaticus* synthetisiert unter Verwendung von Nucleotiden jeweils einen neuen Einzel-DNA-Gegenstrang. Durch zyklische Wiederholung, in deren Verlauf auch die neusynthetisierten Stränge amplifiziert werden, kommt es zu einer exponentiellen Anreicherung der Nucleotidsequenz.

Für den Reaktionsansatz werden 2 µl cDNA (aus der RT), 1x (NH₃)₂SO₄-Puffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, je 0,4 pMol 3'-Primer und 5'-Primer, sowie 0,1 Einheiten Taq-Polymerase gemischt und mit Aqua dest. auf ein Volumen von 50 µl gebracht. Die PCR wird in einem PCR-Block mit beheizbarem Deckel durchgeführt. Nach einer anfänglichen Denaturierung des Doppelstranges von 1 min werden 30 Reaktionszyklen durchlaufen. Jeder Zyklus gliedert sich in eine einminütige Denaturierung bei 95°C, eine Anlagerungsreaktion (*annealing*) der Primer von 40 sec und einer anschließenden Synthese des Stranges für 45 sec bei 72°C. Danach wird nochmals eine fünfminütige Endsynthese bei 72°C durchgeführt und die Reaktion durch Abkühlung auf 4°C abgestoppt. Die Anlagerungstemperatur der Primer ist

von der Basenzusammensetzung abhängig. Für die α -CaMKII Primer wurde 54°C gewählt, für alle übrigen 58°C.

Die amplifizierten DNA-Fragmente werden anschließend nach Mischen mit Ladepuffer in einem mit Ethidiumbromid gefärbten 2%-igen Agarosegel aufgetrennt und mittels einer UV-Lampe sichtbar gemacht.

7. Literaturverzeichnis

- Ainger, D.; Avossa, D.; Diana, A.S.; Barry, C.; Barbarese, E.; Carson, J.H. Transport and localization elements in myelin basic protein mRNA. *J. Cell Biol.* **138**, 1077-1087 (1997)
- Ainger, K.; Avossa, D.; Morgan, F.; Hill, S.J.; Barry, C.; Barbarese, E.; Carson, J.H. Transport and localization of exogenous myelin basic protein mRNA microinjected into oligodendrocytes. *J. Cell Biol.* **123**, 431-441 (1993)
- Arn, E.A.; Macdonald, P.M. Motors driving mRNA localization: new insights from *in vivo* imaging. *Cell* **95**, 151-154 (1998)
- Baas, P.W.; Black, M.M.; Banker, G.A. Changes in microtubule polarity orientation during the development of hippocampal neurons in culture. *J. Cell Biol.* **109**, 3085-3094
- Bashirullah, A.; Cooperstock, R.L.; Lipshitz, H.-D. RNA localization in development. *Ann. Rev. Biochem.* **67**, 335-394 (1998)
- Bassell, G.; Oleynikov, Y.; Singer, R.H. The travels of mRNAs through all cells, large and small. *FASEB J.* **13**, 447-454 (1999)
- Bassell, G.; Singer, R.H. mRNA and cytoskeletal filaments. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 109-115 (1997)
- Bassell, G.J.; Zhang H.; Byrd, A.L.; Femino, A.M.; Singer, R.H.; Taneja, K.L.; Lifshitz, L.M.; Herman, I.M.; Kosik, K.S. Sorting of β -actin mRNA and protein to neurites and growth cones in culture. *J. Neurosci.* **18**, 251-265 (1998)
- Bertrand, E.; Chartrand, P.; Schaefer, M.; Shenoy, S.M.; Singer, R.H.; Long, R.M. Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast. *Mol. Cell* **2**, 437-445 (1998)
- Black, M.M.; Lasek, R.J. The presence of transfer RNA in the axoplasm of the squid giant axon. *J. neurobiol.* **8**, 229-237 (1977)
- Blichenberg, A.; Schwanke, B.; Rehbein, M.; Garner, C.C.; Richter, D.; Kindler, S. Identification of a *cis*-acting dendritic targeting element in MAP2 mRNAs, *J. Neurosci.* **19**, 8818-8829 (1999)
- Bollag, D.M.; Edelman, S.J. Protein Methods. *Wiley-Liss*, New York (1991)
- Broadus, J.; Fuerstenberg, S.; Doe, C.Q. Staufen-dependent localization of *prospero* mRNA contributes to neuroblast daughter-cell fate. *Nature* **391**, 792-795 (1998)
- Buchner, G.; Bassi, M.T.; Andolfi, G.; Ballabio, A.; Franco, B. Identification of a novel homolog of the *Drosophila* Staufen protein in the chromosome 8q13-q21.1 region. *Genomics* **62**, 113-118

- Burgin, K.E.; Waxham, M.N.; Rickling, S.; Westgate, S.A.; Mobley, W.C.; Kelly, P.T. *In situ* hybridization histochemistry of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in developing rat brain. *J. Neurosci.* **10**, 1788-1798 (1990)
- Capri, M.; Santoni, M.-J.; Thomas-Delaage, T.; Ait-Ahmed, O., Implication of a 5' coding sequence targeting maternal mRNA to the *Drosophila* oocyte. *Mech. Dev.* **68**, 91-100 (1997)
- Carson, J.H.; Known, S.; Barbarese, E. RNA trafficking in myelinated cells. *Curr. Opin. Neurobiol.* **8**, 607-612 (1998)
- Celis J.E. Cell Biology A Laboratory Handbook. *Academic Press*, San Diego (1994)
- Chun, J.T.; Gioio, A.E.; Crispino, M.; Eyman, M.; Guiditta, A.; Kaplan, B.B. Molecular cloning and characterization of a novel mRNA present in the squid giant axon. *J. Neurosci. Res.* **49**, 144-153 (1997)
- Cote, C.A.; Gautreau, D.; Denegre, J.M.; Kress, T.L.; Terry, N.A.; Mowry, K.L. A *Xenopus* protein related to hnRNP I has a role in cytoplasmic RNA localization. *Mol. Cell* **4**, 431-437 (1999)
- Denis-Donini, S.; Branduardi, P.; Campiglio, S.; Carnevali, M.D. Localization of calcitonin gene-related peptide mRNA in developing olfactory axons. *Cell Tissue Res.* **294**, 81-91 (1998)
- Deshler, J.O.; Highett, M.I.; Abramson T.; Schnapp, B.J. A highly conserved RNA-binding protein for cytoplasmic mRNA localization in vertebrates. *Curr. Biol.* **8**, 489-496 (1998)
- Driever, W. Maternal control of anterior development in the *Drosophila* embryo. in: The development of *Drosophila melanogaster*. Vol. 1. Bate, M.; Martínez-Arias, A. (Ed.) *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York, pp 301-324 (1993)
- Duchaîne, T.F.; Hemraj, I.; Furic, L.; Deitinghoff, A.; Kiebler, M.A.; DesGroseillers, L. Staufen2 Isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles. *J. Cell Sci.* **115**, 3285-3295 (2002)
- Feig, S.; Lipton, P. Pairing the cholinergic agonist carbachol with patterned Schaffer collateral stimulation initiates protein synthesis in hippocampal CA1 pyramidal cell dendrites via a muscarinic, NMDA-dependent mechanism, *J. Neurosci.* **13**, 1010-1021 (1993)

7. Literaturverzeichnis

- Ferrandon, D.; Koch, J.; Westhof, E.; Nüsslein-Volhard, C. RNA-RNA interaction is required for the formation of specific *bicoid* mRNA 3' UTR-Staufen ribonucleoprotein particles, *EMBO J.* **16**, 1751-1758 (1997)
- Furuichi, T. Simon-Chazottes, D.; Fujino, I.; Yamada, N.; Hasegawa, M.; Miyawaki, A.; Yoshikawa, S.; Guenet, J.L.; Mikoshiba, K. Widespread expression of inositol 1,4,5-triphosphate receptor type 1 gene (InsP₃R1) in the mouse central nervous system. *Receptors Channels* **1**, 11-24 (1993)
- Garner, C.C.; Tucker, R.P.; Matus, A. Selective localization of messenger RNA for cytoskeletal protein MAP2 in dendrites. *Nature* **336**, 674-677 (1988)
- Glazewski, S.; Chen, C.M., Siva, A.; Fox, K. Requirement for alpha-CaMKII in experience-dependent plasticity of the barrel cortex. *Science* **272**, 421-423 (1996)
- Gonzalez-Cadavid, N.F.; Perez, J.L. Electrophoretic and centrifugation behaviour of mitochondrial ribonucleic acid from Walker256 carcinosarcoma. *Biochem J.* **146**, 361-373
- Gray, E.G. Axo-somatic and Axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *J. Anat.* **93**, 420-433 (1959)
- Gunkel, N.; Yano, T.; Markussen, F.-H.; Olson, L.C.; Ephrussi, A. Localization-dependent translation requires a functional interaction between the 5' and 3' ends of *oskar* mRNA. *Genes Dev.* **12**, 1652-1664 (1998)
- Halsell, S.R.; Lipshitz, H.D. Mechanisms and functions of RNA localization to the posterior pole of the *Drosophila* oocyte and early embryo. in: Lipshitz, H.D. (Ed.), *Localized RNAs*, Springer, New York, pp. 9-39 (1995)
- Havin, L.; Git, A.; Elisha, Z.; Oberman, F.; Yisraeli, J.K. RNA-binding protein conserved in both microtubule- and microfilament-based RNA localization. *Genes Dev.* **12**, 1593-1598 (1998)
- Hazelrigg, T. The destinies and destinations of RNAs. *Cell* **95**, 451-460 (1998)
- Herb, A.; Wisden, W.; Catania, M.V.; Marechal, D.; Dresse, A.; Seeburg, P.H. Prominent dendritic localization in forebrain neurons of a novel mRNA and its product, dendrin. *Mol Cell. Neurosci.* **8**, 367-374 (1997)
- Hinds, H.L., Goussakov, I.; Nakazawa, K.; Tonegawa, S.; Bolshakov, V.Y. Essential function of alpha-calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in neurotransmitter release at glutamatergic central synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 4275-4280 (2003)

- Hoek, K.S.; Kidd, G.J.; Carson, J.H.; Smith, R. hnRNPA2 selectively binds the cytoplasmic transport sequence of myelin basic protein mRNA. *Biochemistry* **37**, 7021-7029 (1998)
- Ingoglia, N.A.; Giuditta, A.; Zanakis, M.F.; Babigian, A.; Tasaki, I.; Chakraborty, G.; Sturman, J.A. Incorporation of 3H-amino acids into proteins in a partially purified fraction of axoplasm: evidence for transfer RNA-mediated, post-translational protein modification in squid giant axons. *J. Neurosci.* **3**, 2463-2473 (1983).
- Jirikowski, G.F.; Sanna, P.P.; Bloom, F.E. mRNA coding for oxytocin is present in axons of the hypothalamo-neurohypophysial tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 7400-7404 (1990)
- Kang, H.; Schuman, E.M. A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity. *Science* **273**, 1402-1406 (1996)
- Kiebler, M.A.; DesGroseillers, L. Molecular insights into mRNA transport and local translation in the mammalian nervous system. *Neuron* **25**, 19-28 (2000)
- Kiebler, M.A.; Hemraj, I.; Verkade, P.; Köhrmann, M.; Fortes, P.; Marión, R.M.; Ortín, J.; Dotti, C.G. The mammalian Staufen protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport. *J. Neurosci.* **19**, 288-297 (1999)
- Kim-Ha, J.; Smith, L.; Macdonald, P.M. *oskar* mRNA is localized to the posterior pole of the *Drosophila* oocyte. *Cell* **66**, 23-35 (1991)
- King, M.L.; Zhou, Y; Bubunencko, M. Polarizing genetic information in the egg: RNA localization in the frog oocyte. *BioEssays* **21**, 546-557 (1999)
- Kislauskis, E.H.; Zhu, X.; Singer, R.H. Sequences responsible for localization of β -actin messenger RNA also affect cell phenotype. *J. Cell Biol.* **127**, 441-451 (1994)
- Kleiman, R.; Banker, G.; Steward, O. Differential subcellular localization of particular mRNAs in hippocampal neurons in culture. *Neuron* **5**, 821-830 (1990)
- Kloc, M.; Etkin, L.D. Delocalization of Vg1 mRNA from the vegetal cortex in *Xenopus* oocytes after destruction of Xlsirt RNA. *Science* **265**, 1101-1103 (1994)
- Knowles, R.B.; Sabry, J.H.; Martone, M.E.; Deerinck, T.J.; Ellisman, M.H.; Bassell, G.J.; Kosik, K.S. Translocation of RNA granules in living neurons. *J. Neurosci.* **16**, 7812-7820 (1996)

7. Literaturverzeichnis

- Kobayashi, S.; Goto, S.; Anzai, K. Brain-specific small RNA transcript of the identifier sequences is present as a 10 S ribonucleoprotein particle. *J. Biol. Chem.* **266**, 4726-4730 (1991)
- Köhrmann, M.; Luo, M.; Kaether, C.; DesGroseiller, L.; Dotti, C.G.; Kiebler, M.A. 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 (1999)
- Krichevsky, A.M.; Kosik, K.S. Neuronal RNA Granules: A Link between RNA localization and stimulation-dependent translation. *Neuron* **32**, 683-696 (2001)
- Kuhl, D.; Skehel, P. Dendritic localization of mRNAs. *Curr. Opin. Neurobiol.* **8**, 600-606 (1998)
- Landry, C.F.; Watson, J.B.; Kashima, T.; Campagnoni, A.T. Cellular influences on RNA sorting in neurons and glia: an *in situ* hybridization histochemical study. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **27**, 1-11 (1994)
- Lasko, P. RNA sorting in *Drosophila* oocytes and embryos. *FASEB J.* **13** (1999) 421-433
- Link, W.; Konietzko, U.; Kauselmann, G.; Krug, M.; Schwanke, B.; Frey, U.; Kuhl, D. Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 5734-5738 (1995)
- Long, R.M.; Singer, R.H.; Meng, X.; Gonzalez, I.; Nasmyth, K.; Jansen, R.-P. Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of ASH1 mRNA. *Science* **277**, 383-387 (1997)
- Luo, M.; Duchaine T.F.; DesGroseillers, L. Molecular mapping of the determinants involved in human Staufen/ribosome association. *Biochem. J.* **365**, 817-824 (2002)
- Lyford, G.L.; Yamagata, K.; Kaufmann, W.E.; Barnes, C.A.; Sanders, L.K.; Copeland, N.G.; Gilbert, D.J.; Jenkins, N.A.; Lanahan, A.A.; Worley, P.F. Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* **14**, 433-445 (1995)
- Macdonald, P.M. *Bicoid* mRNA localization signal: phylogenetic conservation of function and RNA secondary structure. *Development* **110**, 161-171 (1990)
- Macdonald, P.M.; Leask, A.; Kerr, K. Ex1 protein specifically binds BLE1, a *bicoid* mRNA localization element, and is required for one phase of its activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 10787-10791 (1995)

- Magee, J.C. Dendritic integration of excitatory synaptic input. *Nature Rev. Neurosci.* **1**, 181-190 (2000)
- Mallardo, M.; Deitinghoff, A.; Müller, J.; Goetze, B.; Macchi, P.; Peters, C.; Kiebler, M.A. Isolation and characterization of Staufen-containing ribonucleoprotein particles from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 2100-2105 (2003)
- Marión, R.M.; Fortes, P.; Beloso, A.; Dotti, C.G.; Ortín, J. 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 (1999)
- Martignetti, J.A.; Brosius, J. BC1 RNA: transcriptional analysis of a neural cell-specific RNA polymerase III transcript. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 1642-1650 (1995)
- Martignetti, J.A.; Brosius, J. Neural BC1 RNA as an evolutionary marker: guinea pig remains a rodent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9698-9702 (1993)
- Matus, A. Actin-based plasticity in dendritic spines. *Science* **290**, 754-758 (2000)
- Merlie, J.P.; Sanes, J.R. Concentration of acetylcholine receptor mRNA in synaptic regions of adult muscle fibres. *Nature* **317**, 66-68 (1985)
- Miki, H.; Setou, M.; Kaneshiro, K.; Hirokawa, N. All kinesin superfamily protein KIF, genes in mouse and human. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 7004-7011
- Miyashiro, D.; Dichter, M.; Eberwine, J. On the nature and differential distribution of mRNAs in hippocampal neurites: implications for neuronal functioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10800-10804 (1994)
- Mohr, E. Subcellular RNA compartmentalization. *Prog. Neurobiol.* **57**, 507-525 (1999)
- Mohr, E.; Meyerhof, W.; Richter, D. The hypothalamic hormone oxytocin: from gene expression to signal transduction. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **121**, 31-48 (1992)
- Mowry, K.L.; Cote C.A. RNA sorting in *Xenopus* oocytes and embryos. *FASEB J.* **13**, 435-445 (1999)
- Muslimov, I.A.; Banker, G.; Brosius, J.; Tiedge, H. Activity-dependent regulation of dendritic BC1 RNA in hippocampal neurons in culture. *J. Cell. Biol.* **141**, 1601-1611 (1998)
- Muslimov, I.A.; Santi, E.; Homel, P.; Perini, S.; Higgins, D.; Tiedge, H. RNA transport in dendrites: a *cis*-acting targeting element is contained within neuronal BC1 RNA. *J. Neurosci.* **17**, 4722-4733 (1997)
- Muyldermans, S.; Lasters, I.; Wyns, L.; Hamers, R. Upon the observation of superbeads in chromatin. *Nucleic acid Research* **8**, 2165-2172 (1980)

7. Literaturverzeichnis

- Nasmyth, K.; Jansen, R.-P. The cytoskeleton in mRNA localization and cell differentiation *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 396-400 (1997)
- Palay, S.L. Synapses in the central nervous system. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2** (Suppl.), 193-202 (1956)
- Peters, A. Fine Structure of the Nervous System. *Oxford Univ. Press*, Oxford, (1991)
- Prakash, N; Fehr, S.; Mohr, E.; Richter, D. Dendritic localization of rat vasopressin mRNA: ultrastructural analysis and mapping of targeting elements. *Eur. J. Neurosci.* **9**, 523-532(1997)
- Racca, C., Gardiol, A.; Triller, A. Cell-specific dendritic localization of glycine receptor α subunit messenger RNAs. *Neuroscience* **84**, 997-1012 (1998)
- Rehbein, M.; Kindler, S.; Horke, S.; Richter, D. Two *trans*-acting rat-brain proteins, MARTA1 and MARTA2, interact specifically with the dendritic targeting element in MAP2 mRNAs. *Mol. Brain Res.* **79**, 192-201 (2000)
- Ressler, K.J.; Sullivan, S.L.; Buck, L.B. Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. *Cell* **79**, 1245-1255 (1994)
- Ross, A.F.; Oleynikov, Y.; Kislauskis, E.H.; Taneja, K.L.; Singer, R.H. Characterization of β -actin mRNA zipcode-binding protein. *Mol. Cell Biol.* **17**, 2158-2165 (1997)
- Schnapp, B. RNA localization: a glimpse of the machinery. *Curr. Biol.* **9**, R725-R727 (1999)
- Schnorrer, F.; Bohmann, K.; Nüsslein-Volhard, C. The molecular motor synein is involved in targeting Swallow and *bicoid* RNA to the anterior pole of *Drosophila* oocytes. *Nature Cell Biol.* **2**, 185-190 (2000)
- Schuman, E.M. mRNA trafficking and local protein synthesis at the synapse. *Neuron* **23**, 645-648 (1999)
- Schupbach, T.; Wieschaus E. Germline autonomy of maternal-effect mutations altering the embryonic body pattern of *Drosophila*. *Dev. Biol.* **113**, 443-448 (1986)
- Severt, W.L.; Biber, T.U.; Wu, X.; Hecht, N.B.; DeLorenzo, R.J.; Jakoi, E.R. The suppression of testis-brain RNA binding protein and kinesin heavy chain disrupts mRNA sorting in dendrites. *J. Cell Sci.* **112**, 3691-3702 (1999)
- Singer, R.H. RNA: traffic report, *Trends Cell Biol.* **6**, 486-489 (1996)
- St. Johnston, D.; Beuchle, D.; Nüsslein-Volhard, C. *staufer*, a gene required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg. *Cell* **66**, 51-63 (1991)

- St. Johnston, D.; Brown, N.H.; Gall, J.G.; Jantsch, M. A conserved double-stranded RNA-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10979-10983 (1992)
- Steward, O. mRNA localization in neurons: a multipurpose mechanism. *Neuron* **18**, 9-12 (1997)
- Steward, O.; Falf, P.M. Polyribosomes under developing spine synapses: growth specializations of dendrites at sites of synaptogenesis. *J. Neurosci. Res.* **13**, 75-88 (1985)
- Steward, O.; Falk, P.M.; Torre, E.R. Ultrastructural basis for gene expression at the synapse: synapse-associated polyribosome complexes. *J. Neurocytol.* **25**, 717-734 (1996)
- Sundell, C.L.; Singer, R.H. Requirement of microfilaments in sorting actin messenger RNA. *Science* **253**, 1275-1277 (1991)
- Takizawa, P.A., Vale, R.D. The myosin motor, Myo4p, binds Ash1 mRNA via the adaptor protein, She3p. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 5273-5278 (2000)
- Taneja, K.L.; Lifshitz, L.M.; Fay, F.S.; Singer, R.H. Poly(A) RNA codistribution with microfilaments: evaluation by *in situ* hybridization and quantitative digital imaging microscopy. *J. Cell Biol.* **119**, 1245-1260 (1992)
- Tarrant, S.B.; Routtenberg, A. Postsynaptic membrane and spine apparatus: proximity in dendritic spines. *Neurosci. Lett.* **11**, 289-294 (1979)
- Tarrant, S.B.; Routtenberg, A. The synaptic spinule in the dendritic spine: electron microscopic study of the hippocampal dentate gyrus. *Tissue Cell* **9**, 461-473 (1977)
- Theurkauf, W.E.; Hazelrigg, T.I. *In vivo* analyses of cytoplasmic transport and cytoskeletal organization during *Drosophila* oogenesis: characterization of a multi-step anterior localization pathway, *Development* **125**, 3655-3666 (1998)
- Thiagarajan, T.C.; Piedras-Renteria, E.S.; Tsien R.W. alpha- and betaCaMKII. Inverse regulation by neuronal activity and opposing effects on synaptic strength. *Neuron* **36**, 1103-1114 (2002)
- Thio, G.L.; Pay, R.P.; Barcelo, G.; Schüpbach, T. Localization of gurken RNA in *Drosophila* oogenesis requires elements of the 5' and 3' regions of the transcript, *Dev. Biol.* **221**, 435-446 (2000)
- Tiedge, H.; Brosius, J. Translational machinery in dendrites of hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* **15**, 7171-7181 (1996)
- Tiedge, H.; Chen, W.; Brosius, J. Primary structure, neural-specific expression and dendritic location of human BC200 RNA. *J. Neurosci.* **13**, 2382-2390 (1993)

7. Literaturverzeichnis

- Tiedge, H.; Fremeau, R.T.; Weinstock, P.H.; Arancio, O.; Brosius, J. Dendritic localization of neural BC1 RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2093-2097 (1991)
- Tiedge, H.; Zhou, A.; Thorn, N.A.; Brosius, J. Transport of BC1 RNA in hypothalamo-neurohypophyseal axons. *J. Neurosci.* **13**, 4214-4219 (1993)
- Tiedge, H.; Brosius, J. Translational machinery in dendrites of hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* **16**, 7171-7181 (1996)
- Trembleau, A.; Morales, M.; Bloom, F.E. Aggregation of vasopressin mRNA in a subset of axonal swellings of the median eminence and posterior pituitary: light and electron microscopic evidence. *J. Neurosci.* **14**, 39-53 (1994)
- Trembleau, A.; Morales, M.; Bloom, F.E. Differential compartmentalization of vasopressin messenger RNA and neuropeptide within the rat hypothalamo-neurohypophysial axonal tracts: light and electron microscopic evidence. *Neuroscience* **70**, 113-125 (1996)
- Vassar, R.; Chao, S.K.; Sitcheran, R.; Nunez, J.M.; Vosshall, L.B.; Axel, R. Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell* **79**, 981-991 (1994)
- Wells, D.G.; Richter, J.D.; Fallon, J.R. Molecular mechanisms for activity-regulated protein synthesis in the synapto-dendritic compartment. *Curr. Opin. Neurobiol.* **10**, 132-137 (2000)
- Whittaker, K.L.; Lipshitz, H.D. Mechanisms and functions of RNA localization to the anterior pole of the *Drosophila* oocyte and early embryo. in: Lipshitz, H.D. (Ed.), *Localized RNAs*, Springer, New York, pp. 41-61 (1995)
- Wickham, L.; Duchaine, T.; Luo, M.; Nabi, I.R.; DesGroseillers, L. Mammalian Staufen is a double-stranded-RNA- and Tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2220-2230 (1999)
- Yisraeli, J.K.; Melton, D.A. The maternal mRNA Vg1 is correctly localized following injection into the *Xenopus* oocyte. *Nature* **336**, 592-595 (1988)

Anhang

Verzeichnis der Abkürzungen

3'-UTR	3'-untranslatierte Region
5'-UTR	5'-untranslatierte Region
AChR	Acetylcholin Rezeptor
Arc	Aktivitäts-reguliertes Cytoskelett-assoziiertes Protein
BC1	<i>brain cytoplasmic RNA 1</i>
BHK	<i>Baby-Hamster-Kidney</i> (BHK-21)
BLE	<i>bicoid</i> Lokalisierungs-Element
bp	Basenpaar
dmStau	<i>Drosophila melanogaster</i> Staufen Protein
DNA	Desoxyribonucleinsäure (<i>Desoxy-ribonucleic acid</i>)
dsRBD	dsRNA-Binde-Domäne
dsRNA	Doppelstrang-RNA
ER	endoplasmatisches Reticulum
Exl	Exuperantia-like phenotype
Exu	Exuperantia
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
hnRNP I	heterogenes Kern Ribonucleoprotein I (<i>heterogen nuclear RNP I</i>)
Hom	Homogenat
hStau	humanes Staufen
InsP ₃ R	Inositol-1,4,5-Triphosphat Rezeptor
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
kDa	Kilo Dalton
KHC	<i>Kinesin Heavy Chain</i>
MAP1B	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 1B
MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2
MBP	Myelin-basisches-Protein
MDa	Mega Dalton
METRO	<i>messenger transport organizer</i>
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)

Anhang

mStau	murines Staufen Protein
nt	Nucleotid
OD	optische Dichte
P100	Sediment (<i>pellet</i>) nach 100.000 xg Zentrifugation
P16	Sediment (<i>pellet</i>) nach 16.000 xg Zentrifugation
RBP	RNA-Bindeprotein
rER	rauhes ER
RLS	RNA-Lokalisierungs-Signal
RNA	Ribonucleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNP	Ribonucleoprotein
RRM	RNA <i>recognition motif</i>
rRNA	ribosomale RNA
rStau	Ratten Staufen Protein
RTS	RNA Transportsignal
S100	Überstand (<i>supernatant</i>) nach 100.000 xg Zentrifugation
S16	Überstand (<i>supernatant</i>) nach 16.000 xg Zentrifugation
snm RNA	<i>small non-messenger RNA</i>
Stau	Staufen
Stau ⁵⁵	Staufen1 ⁵⁵
Stau ⁶³	Staufen1 ⁶³
Swa	Swallow
TBD	Tubulin-Binde-Domäne
TGF β	<i>transforming growth factor β</i>
tRNA	Transfer-RNA
Vg1	<i>vegetal pole 1</i>
VLE	Vg1 Lokalisierungs-Element
VP	Vasopressin
Xlsirt	<i>Xenopus laevis short interspersed repeat transcripts</i>
ZBP-1	<i>zipcode</i> Bindeprotein-1
α -CaMKII	α -Calcium/Calmodulin-abhängige Protein Kinase II

Die Sequenzen der zur Herstellung der Antigene verwendeten Plasmide

Staufen1 C-Terminus (hStaufen1 AS¹⁷⁹-AS⁵⁷⁸)

ENLNKSEISQ VFEIALKRNL PVNFEVARES GPPHMKNFVT
 KSVSGEFVGE GEGKSKKISK KNAAIIVLEE LKKLPPLPAV
 ERVKPRIKKK TKPIVKPOTS PEYGQGINPI SRLAQIQQAK
 KEKEPEYTLL TERGLPRRRE FVMQVKVGNH TAEGTGTNKK
 VAKRNAAENM LEILGFKVPQ RQPTKPALKS EEKTPIKKPG
 DGRKVTFFEP GSGDENGTSN KEDEFRMPYL SHQQLPAGIL
 PMVPEVAQAV GVSQGHHTKD FTRAAPNPAK ATVTAMIARE
 LLYGGTSPTA ETILKNNISS GHVPHGPLTR PSEQLDYLSR
 VQGFQVEYKD FPKNNKNEFV SLINCSSQPP LISHGIGKDV
 ESCHDMAALN ILKLLSELDQ QSTEMPRTGN GPMSVCGRC*

Staufen1 dsRBD5 (mStaufen1 AS⁴⁵⁵-AS⁵⁷⁸)

IARELLYEET SPTAETILKN NISSGHVPHG PLTRPSEQLD
 YLSRVQGFQV EYKDFPKNNK NECVSLINCS SQPPLISHGI
 GKDVESCHDM AALNILKLLS ELDQQSTEMP RTGNGPMSVC GRC*

Staufen2 C-Terminus (mStaufen2 AS³⁵⁷-AS⁵⁶⁹)

KKIAKKNARE AMLLQLGYKA STSLQDPLDK TGENKGWSGP
 KPGFPEPTNN TPKGILHLSP DVYQEMEASR HRVTS GTTLS
 YLSPKDMNQP SSSFFSVSPS STSSATVARE LLMNGTSPTA
 EAIGLKGSSP TSPCSSVQPS KQLEYLARIQ GFQAALSALK
 QFSEQGLES I DGAVNVEKGS LEKQAKHLRE KADNNQRPPA
 SISQDCKKSN SAI*

Staufen2 dsRBD5 (mStaufen2 AS⁴⁵⁹-AS⁵⁶⁹)

SSTSSATVAR ELLMNGTSPT AEAIGLKGSS PTSPCSSVQP
 SKQLEYLARI QGFQAALSAL KQFSEQGLES IDGAVNVEKG
 SLEKQAKHLR EKADNNQRPP ASISQDCKKS NSAI*

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, um allen denen zu danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. M. Kiebler für die Stellung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, vor allem aber für sein großes persönliches Interesse am Fortgang der Arbeit und seine stetige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. F. Bonhoeffer möchte ich danken, daß er sich bereit erklärt hat die Arbeit zu betreuen und Herrn Prof. Dr. D. Ammermann für die Vertretung der Arbeit gegenüber der Fakultät für Biologie.

Ich danke Dr. M. Mallardo und J. Müller für die nette Zusammenarbeit, sowie Dr. C. Peters für seine wertvollen Tips.

Dr. H. Schwarz und Dr. A. Hoenger danke ich für die Unterstützung bei der Bearbeitung der Proben für das EM und den wertvollen Expertenrat.

Desweiteren möchte ich Dr. L. DesGroseillers, Dr. J. Ortin und Dr. P. Macchi für die Bereitstellung der Plasmide zur Antigenherstellung, sowie Dr. M. McNieven und Dr. A. Ziemiecki für die Antiseren danken.

Barbara Grunewald danke ich insbesondere für die Unterstützung bei der Zellkulturarbeit.

Mein besonderer Dank gilt dem Graduiertenkolleg Neurobiologie, welches die Arbeit zwei Jahre lang mit einem Stipendium gefördert hat und den Mitkollegiaten für viele lehrreiche und lustige Stunden.

Außerdem danke ich der gesamten Arbeitsgruppe: Barbara Grunewald, Bernhard Goetze, Dr. Concetta Ambrosini, Fabian Tuebing, Indradeo Kavish Hemraj, Juliane Müller, Dr. Massimo Mallardo, Dr. Paolo Macchi und Sven Kröning

„Last-but-not-least“ möchte ich meiner Familie danken für ihre ständige Unterstützung und Ermunterung, sowie ihr großes Interesse an meiner Arbeit.

Lebenslauf

Name: Anke Kerstin Deitinghoff Geburtsname: Voß
 Geburtsdatum: 26.11.1971 Geburtsort: Hürth-Hermülheim
 Eltern: Fred P. Voß, Christa Voß-Krüger, geb. Krüger
 Familienstand: verheiratet
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Adresse: Danziger Strasse 21
 72072 Tübingen

Ausbildung:

1978 - 1982: Johannesschule, Groß-Königsdorf
 1982 - 1989: Liebfrauenschule, Köln-Lindenthal
 1989 - 1991: Friedrich-Wilhelm-Gymnasium, Köln
 01.10.1991 - 30.09.1999 Diplomstudiengang Biologie an der Johannes Gutenberg-
 Universität, Mainz
 01.10.1993 - 30.09.1998 Diplomstudiengang Chemie an der Johannes Gutenberg-
 Universität, Mainz
 01.10.1998 - 31.03.1999 Department of Microbiology and Immunology,
 Universität Leicester, UK
 01.04.1999 - 30.09.1999 Institut für Immunologie der Bundesforschungsanstalt für
 Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen
 01.10.1999 - 31.05.2003 Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen
 01.01.2000 - 31.12.2001 Stipendiatin des Graduiertenkollegs Neurobiologie
 01.04.2000 - 31.03.2003 Promotionsstudiengang der Fakultät für Biologie der
 Eberhard Karls Universität, Tübingen

Publikationen:

- Duchaîne, T.F.; Hemraj, I.; Furic, L.; Deitinghoff, A.; Kiebler, M.A.; DesGroseillers, L. Staufen2 Isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organells. *J. Cell Sci.* **115**, 3285-3295 (2002)
- Mallardo, M.; Deitinghoff, A.; Müller, J.; Goetze, B.; Macchi, P.; Peters, C.; Kiebler, M.A. Isolation and characterization of Staufen-containing ribonucleoprotein particles from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 2100-2105 (2003)

Anhang

Im Selbstverlag herausgegeben von:

Deitinghoff, Anke Kerstin

Danziger Straße 21

D-72072 Tübingen