

Aus dem Lehrstuhl für Zellbiologie, Anatomie III
Biomedizinisches Centrum (BMC)
Institut der Universität München
Vorstand: Herr Prof. Dr. Michael Kiebler

***Argonaute 2: Der Einfluss von Staufen 2 und Phosphorylierung
auf die Lokalisation in Neuronen***

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Melina Schlegel

aus

München

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Michael A. Kiebler

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. Christian Grimm

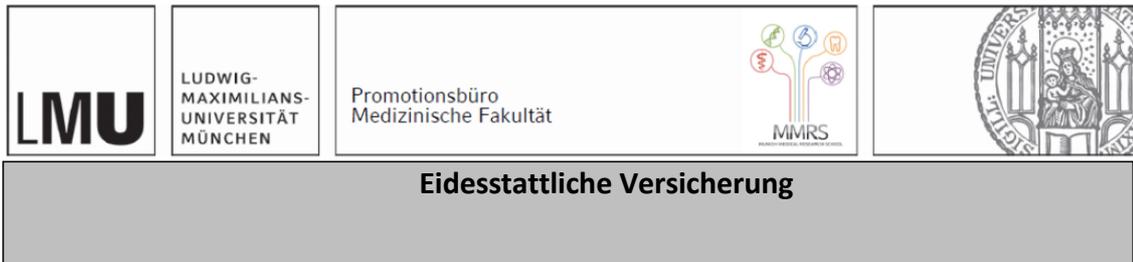
Prof. Dr. Mikael Simons

PD Dr. Carsten T. Wotjak

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 13.07.2023

Eidesstattliche Erklärung



Schlegel, Melina

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Argonaute 2: Der Einfluss von Staufen 2 und Phosphorylierung auf die Lokalisation in Neuronen

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 30.07.2023
Ort, Datum

Melina Schlegel
Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

“Things won’t go perfect. It’s all about how you adapt from those things and learn from mistakes”

Michael Phelps*

*Michael Phelps war Leistungsschwimmer und gehört zu den erfolgreichsten Sportlern aller Zeiten. In seiner Kindheit litt er an ADHS und fand schließlich früh den Ausgleich im Schwimmsport. Unermüdlicher Trainingseinsatz und das ständige Arbeiten an sich selbst, machten Phelps schließlich zu dem Topathleten unserer Zeit. Nach seinem Karriereende 2016 gestand Phelps, während seiner Laufbahn unter Depressionen gelitten und Selbstmordgedanken gehabt zu haben. Heute engagiert er sich dafür, psychische Probleme unter Spitzensportlern ins öffentliche Bewusstsein zu rufen und Vorbehalte diesbezüglich aus dem Weg zu räumen.

Zusammenfassung

RNA-Bindeproteine (RBPs) sind essenzieller Bestandteil der epigenetischen Genregulation. Mit ihrer Hilfe wird die RNA nach der Transkription transportiert, stabilisiert oder destabilisiert und letztendlich translatiert. Argonaute (Ago) Proteine spielen hierfür eine tragende Rolle. Als Herzstück des so genannten RNA induced silencing complex (RISC), bestehend aus Ago und einer kleinen, an Ago gebundenen, regulatorischen RNA, sowie weiteren Effektorproteinen, sind sie an der epigenetischen Genstilllegung und somit an der Destabilisierung und der Speicherung von Ziel-mRNAs beteiligt, ebenso wie an der Translationskontrolle. Prozessierungskörperchen (P-bodies), welche als Orte der temporären mRNA-Speicherung und des mRNA-Abbaus gelten, enthalten unter anderem Komponenten des RISC, wie Ago. Durch posttranslationale Modifikation wird die Funktion, sowie die Lokalisation von Ago in den Zellen beeinflusst. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, diesbezüglich zellspezifische Unterschiede aufzudecken. Für das Phosphorylierungscluster S/T824:34 wird gezeigt, dass Phosphorylierung in Neuronen zu einer Verdrängung von Ago2 aus P-bodies führt, während sich in HEK 293T Zellen keine Lokalisationsänderung zeigt. Aber nicht nur die posttranslationale Modifikation hat einen Einfluss auf die Ago Lokalisation. Es ist bereits wissenschaftlich etabliert, dass RBPs untereinander interagieren. Diesbezüglich kann gezeigt werden, dass das dsRBP Stau2 (Stau2) ebenfalls Einfluss auf die Ago2 Lokalisation in Neuronen hat. Stau2 ist ein in Neuronen gut exprimiertes RBP, welches für die neuronale Homöostase unerlässlich ist. Durch die Abwesenheit von Stau2 wird die Ago2-Assemblierung in P-bodies unterdrückt. Dieser Effekt ist Stau2 spezifisch. Abschließend deuten die experimentellen Ergebnisse auf einen gegensätzlichen Effekt von Stau2 und Ago auf die neuronale Verzweigung hin. Bei Stau2-Abwesenheit wird ein deutlicher Anstieg der neuronalen Verzweigung beobachtet. Dieser Phänotyp kann durch eine Reduktion von Ago1/2 aufgehoben werden. Somit ergeben sich Hinweise auf eine ausgewogene Interaktion zwischen Ago und Stau2, wobei beide für die ausgeglichene neuronale Homöostase sowie Morphologie unerlässlich sind.

Summary

RNA-binding proteins (RBPs) are essential components of epigenetic gene regulation. After transcription, the RNA is transported, stabilized or destabilized and finally translated with their support. Argonaute (Ago) proteins are known to play a major role in this process. As the core of the RNA induced silencing complex (RISC), composed of Ago and a small regulatory RNA bound to Ago, along with further effector proteins, they are involved in epigenetic gene silencing and therefore in the destabilization and storage of mRNA as well as translational control. Processing bodies (P-bodies), which are involved in temporary mRNA storage and degradation, contain Ago as well as other components of the RISC. It is already known that posttranslational modification affects the function and localization of Ago. In the context of this work, however, cell-specific differences become apparent in this process. For the phosphorylation cluster S/T824:34 it could be shown that phosphorylation in neurons leads to a displacement of Ago2 from P-bodies, whereas in HEK 293T cells no localization change could be detected. However, not only post-translational modification has an impact on Ago localization. It is already scientifically established that RBPs interact with each other. Here it can be shown that the dsRBP Stau2 (Stau2) has an influence on Ago2 localization in neurons. Stau2 is a well expressed RBP in neurons that is essential for neuronal homeostasis. The absence of Stau2 released Ago2 from P-bodies, this effect turned out to be Stau2 specific. Furthermore, experimental results indicated an opposite effect of Stau2 and Ago on neuronal branching. A marked increase in neuronal branching was observed in the absence of Stau2. This phenotype was rescued with Ago1/2 knockdown. Together, this provides an indication of a highly balanced interaction between Ago and Stau2, with both being essential for neuronal homeostasis as well as morphology.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	III
Zusammenfassung	VI
Summary	VII
Inhaltsverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	XI
1 Vorbemerkung	1
2 Einleitung	3
2.1 Einfluss von mRNAs und RNA-Bindeproteinen auf das Lernen und das Gedächtnis...	3
2.2 RNA-induzierte Genrepression	4
2.2.1 Kleine regulatorische RNAs als Komponenten der RNA-Interferenz	5
2.2.2 Argonaute Proteine und ihre Rolle in der Genrepression	7
2.3 Das RNA-Bindeprotein Argonaute 2	11
2.3.1 Zelluläre Lokalisation von Ago2	11
2.3.2 Posttranslationale Modifikation von Ago2 und Ago2 Mutanten	12
2.3.3 Einfluss der synaptischen Aktivierung auf Ago2	15
2.4 Das Doppelstrang-RNA-Bindeprotein Staußen 2	16
3 Ziel der Arbeit	18
4 Material und Methoden	19
4.1 Zellkulturmethoden	19
4.1.1 Neuronale Zellkultur	19
4.1.2 Kultivierung von HEK 293T Zellen	20
4.1.3 Transfektion	20
4.1.4 Transduktion	21
4.1.5 Neuronale Aktivierung und Hemmung	22
4.2 Immunfluoreszenz Färbung	22
4.3 Mikroskopie	23
4.3.1 eGFP-Ago2 Lokalisation	23
4.3.2 Sholl – Analyse	24
4.3.3 Fluoreszenzmessung und Quantifizierung der Proteinexpression	24
4.4 DNA-Methoden	25

4.4.1	Plasmidverdau	25
4.4.2	Agarose Gelelektrophorese	25
4.4.3	Ligation und Transformation in kompetente Escherichia coli.....	26
4.4.4	Plasmidpräparation	26
4.5	Virusproduktion	27
4.6	Protein Methoden	27
4.6.1	Herstellung des Protein-Lysats	27
4.6.2	SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)	28
4.6.3	Proteinanalyse mittels Western Blot	28
4.6.4	Immunpräzipitation.....	29
4.7	RNA Methoden.....	29
4.7.1	RNA Isolierung und Präzipitation	29
4.7.2	cDNA Synthese.....	30
4.7.3	Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion.....	31
4.7.4	Primer Validierung	33
4.8	Analyse und Statistik.....	33
4.8.1	Signifikanzen.....	33
4.8.2	Diagrammerstellung und Abbildungen.....	34
5	Ergebnisse.....	35
5.1	Ago2 Phosphomutanten in hippocampalen Neuronen.....	35
5.1.1	Lokalisation von eGFP-Ago2 in Processing bodies in HEK 293T Zellen sowie hippocampalen Neuronen.....	35
5.1.2	Veränderte Ago2 Proteinlokalisierung in primären hippocampalen Neuronen nach Phosphorylierung	39
5.1.3	Vermehrte Lokalisation von Ago2 in P-bodies durch neuronale Inhibierung	43
5.2	Stau2 Interaktion mit Ago2.....	46
5.2.1	Reduktion der Stau2 Expression nach Transduktion und Transfektion einer shRNA gegen Stau2.....	46
5.2.2	Auswirkung der Stau2 Reduktion auf die Ago2 Lokalisation in P-bodies	48
5.2.3	Relokalisation von Ago2 in P-bodies nach Stau2 Überexpression	55
5.2.4	Phosphorylierungsunabhängige Stau2 Regulation der eGFP-Ago2 Lokalisation...59	59
5.3	Funktionelle Eingliederung.....	61
5.3.1	Validierung der Ago2 Depletion mit Transduktion und Transfektion einer shRNA .61	61
5.3.2	Austestung des Effektes der Ago2 und Stau2 Reduktion auf Stau2 Ziel-mRNAs ..65	65
5.3.3	Etablierung der Immunpräzipitation von eGFP-Ago2	67
5.3.4	Gleichgewicht der neuronalen Verzweigung durch Ago2 und Stau2.....	69
6	Diskussion.....	74

6.1	Ago2 Phosphorylierung beeinflusst die Ago2 Lokalisation in Neuronen	74
6.2	Stau2 reguliert die Präsenz von Ago2 in P-bodies	76
6.3	Stau2 und Ago halten die neuronale Verzweigung im Gleichgewicht	78
7	Fazit	80
8	Ausblick	82
9	Anhang	83
9.1	Antikörper	83
9.2	Primer und Plasmide	84
9.3	Lösungen und Medien.....	86
9.4	Geräte	88
9.5	Software	88
9.6	Abbildungsverzeichnis.....	89
9.7	Tabellenverzeichnis.....	89
10	Literaturverzeichnis	91
11	Danksagung	102
	Publikation	103

Abkürzungsverzeichnis

a) Aminosäuren

Einbuchstabencode	Bedeutung
A	Alanin
E	Glutaminsäure
G	Glycin
L	Leucin
S	Serin
T	Threonin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

b) Begriffe und chemische Formeln

Abkürzung	Bedeutung (deutsch)	Bedeutung (englisch)
Ago	Argonaute	Argonaute
BBS	BES-gepufferte Kochsalzlösung	BES buffered saline solution
BFP	blau fluoreszierendes Protein	blue fluorescent protein
cDNA	komplementäre DNA	complementary DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	carbon dioxide
DIV	Tage in vitro	days in vitro
DMEM-HS	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium mit Pferde Serum	Dulbecco's Modified Eagle Medium with horse serum
DNA	Desoxyribonukleinsäure	desoxyribonucleic acid
DNase	Desoxyribonuklease	desoxyribonuclease
dsRNA	Doppelstrang Ribonukleinsäure	double strand ribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	ethylenediaminetetraacetic acid
eGFP	verstärktes grün fluoreszierendes Protein	enhanced green fluorescent protein

GFP	grün fluoreszierendes Protein	green florescent protein
H ₂ O	Wasser	water
HBSS	Hank's balancierte Salzlösung	Hank's balanced salt solution
HEK293T	293T immortalisierte menschliche embryonale Nierenzellen	human embryonic kidney cells
miRNA	microRNA	microRNA
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure	messenger ribonucleic acid
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat	N-Methyl-D-Aspartat
NMEM+B27	Neuronales minimal essenzielles Medium +B27	neuronal minimal essential medium +B27
NTC	Sequenz-unspezifische Kontrolle	non targeting control
o/n	über Nacht	over night
PAZ	PIWI/Argonaute/Zwille	PIWI/Argonaute/Zwille
P-bodies	Prozessierungskörperchen	processing bodies
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung	phosphate buffered saline
PBS-T	PBS Tween	PBS Tween
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd	paraformaldehyd
piRNA	PIWI-interagierende Ribonukleinsäure	piwi-interacting ribonucleic acid
Pum2	Pumilio 2	Pumilio 2
qPCR	quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion	quantitative real-time polymerase chain reaction
RBP	Ribonukleinsäure Bindeprotein	ribonucleic acid binding protein
RFP	rot fluoreszierendes Protein	red flurescent protein
RISC	RNA induzierter Genstilllegungskomplex	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure	ribonucleic acid
RNAi	Ribonukleinsäure-Interferenz	ribonucleic acid interference
RNase	Ribonuklease	ribonuclease
RNP	Ribonukleoproteinpartikel	ribonucleoprotein particle

rpm	Umdrehungen pro Minute	rounds per minute
RT	Raumtemperatur	room temperature
sec	Sekunde(n)	second(s)
shRNA	kleine RNA mit haarnadelähnlicher Struktur	small hairpin RNA
siRNA	kleine interferierende Ribonukleinsäure	small interfering ribonucleic acid
Stau2	Staufen 2	Staufen 2
UTR	untranslatierter Bereich	untranslated region
wt	Wildtyp	wildtype

1 Vorbemerkung

Erinnerungen sind ein zentraler Bestandteil unseres Lebens. Sie entstehen, wenn wir aktiv unser Umfeld entdecken und uns auf Neues einlassen. Gerd Kempermann, einer der führenden Wissenschaftler im Bereich der Neurogenese, also der Nervenzellneubildung, beschreibt das menschliche Gehirn als „ein Speicher für Erinnerungen, kombiniert mit der Möglichkeit, Vorhersagen treffen zu können. Das ist das, was wir >>Lernen<< nennen“ (Kempermann, 2016). Um dem Gehirn diese Fähigkeit zu ermöglichen, bilden Nervenzellen kontinuierlich an strategischen Stellen neue Verknüpfungen untereinander, so genannte Synapsen. Mit Hilfe dieser werden Signale, in Form von Aktionspotenzialen, von einem Neuron zum anderen weitergegeben (Albright, Jessell, Kandel, & Posner, 2000). Eine zentrale Rolle im Prozess des Lernens spielt der Hippocampus, der Teil des limbischen Systems ist. Das limbische System gilt als der Ort im Gehirn, in dem unsere Emotionen lokalisiert sind. Hier finden darüber hinaus auch entscheidende Abläufe für das Speichern von Informationen statt. Dabei ist die chemische wie auch die strukturelle Stabilität der Synapsen die tragende Komponente, ob Erinnerungen in das Langzeitgedächtnis gelangen oder wieder vergessen werden. Die Fähigkeit der Nervenzelle, Synapsen zu bilden/verstärken und auch wieder zu destabilisieren wird als synaptische Plastizität bezeichnet (Redondo & Morris, 2011). Ohne eine streng regulierte lokale Proteinexpression wäre der Prozess des kontinuierlichen Umbaus, ebenso wie die Neubildung der Nervenzellen, nicht möglich. Dafür unterliegt die Proteinexpression in Nervenzellen vielen Regulationsmechanismen.

Eine tragende Rolle in der Steuerung der lokalen Proteinexpression ist dabei die so genannte RNA-Interferenz (RNAi). Sie beruht auf einer epigenetischen Gen-Stillegung. Dies bedeutet, dass spezifische Ribonukleinsäuren (RNAs) nicht translatiert werden und somit das kodierte Protein auch nicht für die Zelle zur Verfügung steht. Entdeckt wurde RNAi in Tieren im Jahr 1998 von Andrew Fire und Craig Mello (Fire et al., 1998), wofür sie später den Nobelpreis erhielten. Heute ist RNAi von großem wissenschaftlichem Interesse. Sie ist aktuell in der Medikamentenentwicklung eines der führenden Forschungsgebiete und sehr vielversprechend. Mit Hilfe der RNAi gibt es einen neuen Ansatzpunkt für medizinische Therapeutika, die auf der Stillegung von spezifischen Genen basieren. Somit kann effektiv die Herstellung von krankheitsauslösenden Proteinen verhindert werden. Medikamente, die auf

RNAi beruhen, greifen demnach früher in einen krankheitsauslösenden Mechanismus ein als die meisten bisher bekannten Medikamente.

Zwanzig Jahre nach der Entdeckung der RNAi wurde mit *Patisiran (Onpattro)* das erste RNAi Therapeutikum von der Behörde für Lebens- und Arzneimittel (engl. *Food and Drug Administration, FDA*) der Vereinigten Staaten von Amerika zugelassen. Es wird für die Behandlung von Polyneuropathie, ausgelöst durch die hereditäre Transthyretin-vermittelte Amyloidose, angewendet. Diese Erbkrankheit führt durch Mutation im Transthyretin-Gen zu krankhaften Ablagerungen der fehlerhaften Proteine im Gewebe, wie beispielsweise dem peripheren Nervensystem, und damit im Verlauf häufig zu Behinderungen und Tod. (Hoy, 2018; Kristen et al., 2019)

Die Zulassung von Patisiran war in der pharmazeutischen Industrie ein großer und historischer Durchbruch. Mittlerweile sind weitere RNAi-Medikamente zugelassen. Als Beispiel ist hier das Therapeutikum *Inclisiran (Leqvio)* zu nennen, welches in der Therapie der Hypercholesterinämie Anwendung findet (Fitzgerald et al., 2017). In Zukunft wird den RNAi-Therapeutika auf Grund ihrer spezifischen Wirkweise eine zentrale Rolle unter anderem in der Behandlung von Erbkrankheiten und Stoffwechselerkrankungen zukommen (Weng, Xiao, Zhang, Liang, & Huang, 2019).

2 Einleitung

2.1 Einfluss von mRNAs und RNA-Bindeproteinen auf das Lernen und das Gedächtnis

Für die Bildung von Synapsen ist die Synthese von neuen Proteinen essenziell. Es ist bereits gezeigt worden, dass die Proteinsynthese hierfür auch lokal an den Synapsen stattfinden kann (Kang & Schuman, 1996). Zu diesem Zweck werden lokal verfügbare Boten-Ribonukleinsäuren (mRNA) translatiert, wodurch die Synthese des durch die mRNA kodierten Proteins ermöglicht wird (Doyle & Kiebler, 2011). Das neu synthetisierte Protein führt zu einer funktionell, sowie strukturell veränderten Synapse. Daraus ergibt sich, dass die Lokalisation der mRNA eine entscheidende Rolle spielt, um eine lokal streng regulierte Proteinexpression in Nervenzellen zu ermöglichen (St Johnston, 2005). Bei genauerer Betrachtung zeigt sich, dass für einer lokalisierte Translation viele Mechanismen, wie der Transport der mRNA und die Translationskontrolle derselben reibungslos ablaufen müssen. Dabei reicht die Translationskontrolle von der primären Translationsunterdrückung bis hin zur Translationsinitiierung an der aktivierten Synapse (Dahm & Kiebler, 2005; Fernandez-Moya, Bauer, & Kiebler, 2014; Kiebler & Bassell, 2006). Ohne eine strenge Regulation jedes einzelnen Prozesses wäre ein koordiniertes Zusammenspiel aller beteiligten Kompartimente undenkbar. Eine wesentliche Rolle als Regulator spielen hierbei RNA-Bindeproteine (RBPs). Sie übernehmen dabei eine tragende Komponente im mRNA Transport sowie der lokalen Translation (Fernandez-Moya et al., 2014). In Abbildung 2-1 (Doyle & Kiebler, 2011) ist der Mechanismus des mRNA Exports, Transportes und der lokalen Translation an der Synapse modellhaft dargestellt. Die mRNA wird nach der Transkription im Zellkern aus diesem exportiert und anschließend durch die Bindung von RBPs und anderen assoziierten Faktoren in so genannte Ribonukleoproteinpartikel (RNPs) verpackt (Abbildung 2-1 B). In diesen RNPs wird die mRNA entlang der Dendriten und Axone transportiert, um lokal an Ribosomen translatiert zu werden (Abbildung 2-1 C). Auf Grundlage dieses Ablaufes ist eine Neubildung von Synapsen möglich und die Grundvoraussetzung für das Lernen und die Überführung von Informationen ins Langzeitgedächtnis gegeben.

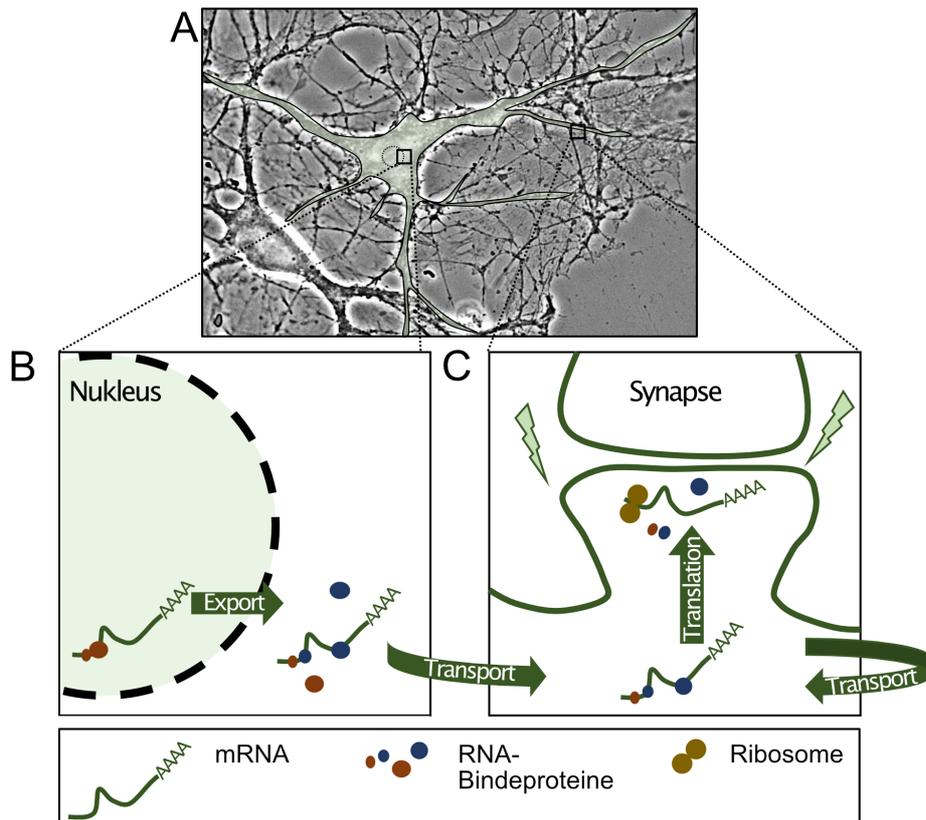


Abbildung 2-1 Schematische Darstellung des neuronalen mRNA Transports und der lokalen Translation an Synapsen (modifiziert nach (Doyle & Kiebler, 2011))

A. Lichtmikroskopische Aufnahme vom Phasenkontrast eines hippocampalen Neurons. Das Neuron ist schematisch mit dem Zellkern in grün hervorgehoben. Zur genauen Darstellung sind zwei Bereiche markiert und zudem in Vergrößerung gezeigt: zum einen der Zellkörper und zum anderen eine Synapse. **B.** Vergrößerte Darstellung des Zellkörpers. Nach der Transkription wird die mRNA mittels RBPs aus dem Zellkern durch die Kernporen exportiert. Die Assemblierung von Transport-RBPs und der mRNA findet also bereits im Zellkörper statt, eine Reifung zudem im Zytoplasma. **C.** Vergrößerte Darstellung der lokalen Translation an der Synapse. Die mRNA wird sowohl antero- wie auch retrograd entlang der Dendriten transportiert, bis sie letztendlich eine bestimmte Synapse erreicht. Dort findet an lokalen Ribosomen die Translation der mRNA statt. Die Legende fasst die wichtigsten Moleküle graphisch zusammen.

2.2 RNA-induzierte Genrepression

Neben dem mRNA-Transport übernehmen RBPs auch weitere regulatorische Aufgaben (Kiebler & Bassell, 2006). Hervorzuheben ist in diesem Bezug ein zielgerichteter Mechanismus der epigenetischen Genrepression, der ebenfalls eine tragende Komponente in der streng regulierten dendritischen Proteinexpression spielt und in allen Eukaryoten vorhanden ist.

Dieser wird RNA-Interferenz (RNAi) genannt. Dabei handelt es sich um eine hoch sequenzspezifische Gen-Stillegung, ausgelöst durch kleine doppelsträngige RNAs (dsRNAs) (Denli & Hannon, 2003; Finnegan & Matzke, 2003; Montgomery, Xu, & Fire, 1998).

Auf Grund des hohen wissenschaftlichen Interesses konnten in den letzten Jahren wichtige Erkenntnisse zum genaueren Ablauf und den beteiligten Komponenten der RNAi gewonnen werden. Es wurden verschiedene Klassen von nicht kodierenden, kleinen RNAs identifiziert (Kim, Han, & Siomi, 2009), sowie wichtige Proteine, unter anderem RBPs, denen eine tragende Rolle in der Gen-Repression zukommt (Ender & Meister, 2010). Im Folgenden werden die wichtigsten Akteure der RNAi näher erläutert.

2.2.1 Kleine regulatorische RNAs als Komponenten der RNA-Interferenz

Kleine nicht-kodierende RNAs umfassen verschiedene Klassen und Größen. In ihrer Funktion haben sie eine Gemeinsamkeit: die epigenetische Regulation der Genexpression (Chu & Rana, 2007). Die kleinen nicht-kodierenden-RNAs können drei verschiedenen Klassen zugeordnet werden: mikroRNAs (miRNAs), kleine interferierende RNAs (engl. *small interfering RNA*; siRNAs), und PIWI (engl. *P-element induced Wimpy Testis*; PIWI) interagierende RNAs (piRNAs). Die Zuteilung zu den einzelnen Klassen erfolgt an Hand der jeweiligen Proteininteraktion, sowie der Größe der regulatorischen RNAs (Kim et al., 2009) (Tabelle 2.1). Kurz nach der Entdeckung der RNAi machten sich Wissenschaftler diesen Mechanismus zunutze, um spezifische Gene auszuschalten. In dem Fall der künstlichen *in vitro* Gen-Repression werden kleine RNAs mit einer haarnadelähnlichen Struktur verwendet (engl. *small hairpin RNA*; shRNA). Nachfolgend wird auch auf die shRNA und ihre Verwendung eingegangen.

mikroRNAs: miRNAs sind Genom-kodierte RNAs, die von der RNA-Polymerase II als Vorläufermoleküle mit 50m⁷G Capping Strukturen und poly-A Schwänzen transkribiert werden (Lee et al., 2004). Diese langen primären Transkripte werden von dem RNase Enzym Drosha in eine Länge von 70 Nukleotiden gespalten und anschließend in das Zytoplasma exportiert. Sie bilden in diesem Stadium eine haarnadelähnliche Struktur. In einem weiteren Prozessierungsschritt und der Aufspaltung der haarnadelähnlichen Struktur durch die Aktivität

des RNase Enzyms Dicer entstehen die reifen kurzen miRNAs mit einer Länge von ca. 20-22 Nukleotiden. Diese besteht aus dem Leitstrang (miRNA) und dem Folgestrang (miRNA*), welcher anschließend degradiert wird (Kim, 2005).

Kleine interferierende RNAs: Ebenfalls an der RNAi beteiligt sind kleine interferierende RNAs (siRNA). Diese entstehen aus langen, meist exogenen, das heißt beispielsweise von Krankheitserregern zugeführten, dsRNAs durch das Prozessieren mit dem Enzym Dicer (Rana, 2007). Dadurch sind sie Bestandteil der Wirtsabwehr gegen fremde Nukleinsäuren (Finnegan & Matzke, 2003). Mittlerweile ist bekannt, dass es auch endogene, also körpereigene, Quellen für siRNAs gibt. Ihnen ist im Gegensatz zu den exogenen siRNAs eine Kernphase obligat (Carthew & Sontheimer, 2009; D. E. Golden, Gerbasi, & Sontheimer, 2008). Charakteristisch für die kleinen interferierenden RNAs sind ungepaarte kurze Überhänge von ca. zwei Nukleotiden am 3'-Ende und am 5'-Ende mehrere Phosphatgruppen (Elbashir, Lendeckel, & Tuschl, 2001; Meister & Tuschl, 2004). Auch die siRNAs setzen sich zusammen aus einem Folge- und einem Leitstrang. Die Auswahl, welcher der beiden Stränge der Leitstrang ist, bestimmt dabei die Thermodynamik und damit die Stabilität des 5'-Endes (Khvorova, Reynolds, & Jayasena, 2003).

Short hairpin RNAs: Mit der Entdeckung der RNAi haben sich auch mehrere Methoden entwickelt, wie man sich diese in der Forschung zunutze machen kann. Grundlegend kann die siRNA zur Transfektion direkt in das Zytosol verwendet werden. Aber es konnte eine weitere Methode zur RNAi entwickelt werden. Hierfür werden kurze Haarnadel-RNAs verwendet. Das Besondere ist, dass die shRNA zur Desoxyribonukleinsäure (DNA) Integration fähig ist. Das heißt mit Hilfe von DNA/Plasmid-Vektoren wird die shRNA im Zellkern transkribiert und anschließend ins Zytosol gebracht (Rao, Vorhies, Senzer, & Nemunaitis, 2009). Die shRNA besteht aus zwei komplementären RNA-Sequenzen, die 19-22 Nukleotide lang sind und die durch eine kurze Schleife verbunden sind (Moore, Guthrie, Huang, & Taxman, 2010). Nach der Transkription wird die shRNA in das Zytosol exportiert und dort zur siRNA oder miRNA weiterverarbeitet.

PIWI-interagierende RNAs: PIWI-Protein sind vor allem in Keimbahnzellen zu finden und spielen eine essenzielle Rolle in der Spermatogenese. Es wurde berichtet, dass PIWI-

Proteine mit einer Klasse kleiner RNAs interagieren. Diese sind länger als die miRNAs (ca. 26-31 Nukleotide) und werden als PIWI-Interagierende RNAs (piRNAs) bezeichnet (Aravin et al., 2006; Chu & Rana, 2007; Girard, Sachidanandam, Hannon, & Carmell, 2006; Grivna, Beyret, Wang, & Lin, 2006). Ihnen ist mit den miRNAs gemeinsam, dass sie vom Genom kodiert werden (Iwasaki, Siomi, & Siomi, 2015).

Tabelle 2.1 Klassen von kleinen regulatorischen RNAs und ihre Funktion. Übernommen und angepasst nach Chu & Rana, 2007

Klasse	Länge (Nukleotide)	Funktion
miRNA	19-25	v.a Translationsunterdrückung
siRNA	19-21	v.a. Degradation der Ziel-mRNA
piRNA	26-31	Transposon-Kontrolle in Keimzellen

2.2.2 Argonaute Proteine und ihre Rolle in der Genrepression

Neben den kleinen regulatorischen RNAs sind Proteine der Argonaute Familie Schlüsselakteure in allen Gen-Repressions-Prozessen, die durch kleine regulatorische RNAs gesteuert werden (Bohmert K., 1998; Ma et al., 2005; J. S. Parker, Roe, & Barford, 2005). Argonaute Proteine (Ago) sind RNA-Bindeproteine, die hoch konserviert und nahezu in allen Eukaryoten zu finden sind (Meister, 2013). Sie binden hauptsächlich miRNAs und siRNAs und sind an der epigenetischen Regulation der Genexpression, vor allem an der RNAi, beteiligt (Hutvagner & Simard, 2008; Meister et al., 2004; Peters & Meister, 2007). Die Anzahl an Argonaute-Genen variiert in den verschiedenen Spezies von einem bis 27 Gene. Beim Menschen gibt es acht Argonaute-Gene, die in die Ago-Subfamilie und die PIWI-Subfamilie unterteilt werden (Hutvagner & Simard, 2008). Bisherige Erkenntnisse zeigen, dass die Expression der PIWI-Proteine auf die Keimbahn beschränkt ist, während die Ago-Proteine ubiquitär exprimiert werden (Carmell, Xuan, Zhang, & Hannon, 2002; Höck & Meister, 2008). Dabei ist bekannt, dass vor allem Ago1 und Ago2 im Gehirn vorkommen (Valdmanis et al.,

2012). Aus diesem Grund wird im Rahmen dieser Arbeit der Fokus auf die Ago-Subfamilie, vor allem auf Ago2, gelegt. Die Aufgaben von Argonaute-Proteinen im Rahmen der Gen-Repression sind die Bindung kleiner regulatorischer RNAs, sowie die Rekrutierung weiterer Proteine, die das Schicksal der Ziel-mRNA bestimmen (Chekulaeva & Filipowicz, 2009; Huntzinger & Izaurralde, 2011; Meister et al., 2005).

Ago Proteine sind aus vier verschiedenen Domänen aufgebaut, die unterschiedliche Aufgaben übernehmen. Die PAZ Domäne (benannt nach drei Proteinfamilien, welche diese Domäne enthalten: PIWI, Argonaute und Zwillie) erkennt den kurzen ca. zwei Nukleotide langen 3'-Überhang der kleinen regulatorischen RNAs (L. Cerutti, 2000; Lingel, Simon, Izaurralde, & Sattler, 2003). In der Mitte des Proteins befindet sich die mittlere (MID) Domäne (Jin, Zhan, & Zhou, 2021). Dort werden die kurzen RNAs durch Erkennung des 5'-Cap-Struktur gebunden (Lingel et al., 2003; Song et al., 2003). Beide Domänen zusammen fungieren als Maßstab für die Länge der kleinen regulatorischen RNAs (Abbildung 2-2 b). Am N-Terminus des Proteins liegt die danach benannte N-Domäne, hier werden die kurzen, noch doppelsträngigen RNAs eingeklemmt und aufgebrochen, so dass der Folgestrang degradiert werden kann (Kwak & Tomari, 2012) (Abbildung 2-2 a). Die C-terminale PIWI Domäne ist strukturell vergleichbar mit einer RNase (Boland, Huntzinger, Schmidt, Izaurralde, & Weichenrieder, 2011; Yuan et al., 2005) und rekrutiert außerdem Mitglieder der GW-Protein Familie (Pfaff et al., 2013; Schirle & MacRae, 2012) (Abbildung 2-2 c). GW-Proteine sind reich an Tryptophan (W), welches oft von Glycin (G) begleitet wird. Diese charakteristische Eigenschaft ist namensgebend für die Proteine. In verschiedenen Spezies werden sie unterschiedlich bezeichnet. So werden sie im Menschen TNRC6A, TNRC6B und TNRC6C genannt, während sie in *Drosophila* GW182 heißen. Durch die Ribonuklease (RNase)-Aktivität in der PIWI Domäne sind einige der Ago Proteine in der Lage, die Ziel-RNA zu spalten. Im Menschen ist nur Ago2 katalytisch aktiv (Lui et al., 2004; Meister et al., 2004). Durch die Endoribonuklease-Aktivität ist humanes Ago2 somit in der Lage, die gebundene Ziel-RNA abzubauen. Aber auch die anderen Ago-Protein sind durch Rekrutierung von Faktoren an der RNA Repression, im Sinne eine Translationsrepression, Deadenylierung und dem mRNA-Zerfall beteiligt (Huntzinger & Izaurralde, 2011; Kobayashi & Tomari, 2016). In Abbildung 2-2 ist der

Aufbau von humanem Ago2 und die Funktion der einzelnen Domänen schematisch verdeutlicht.

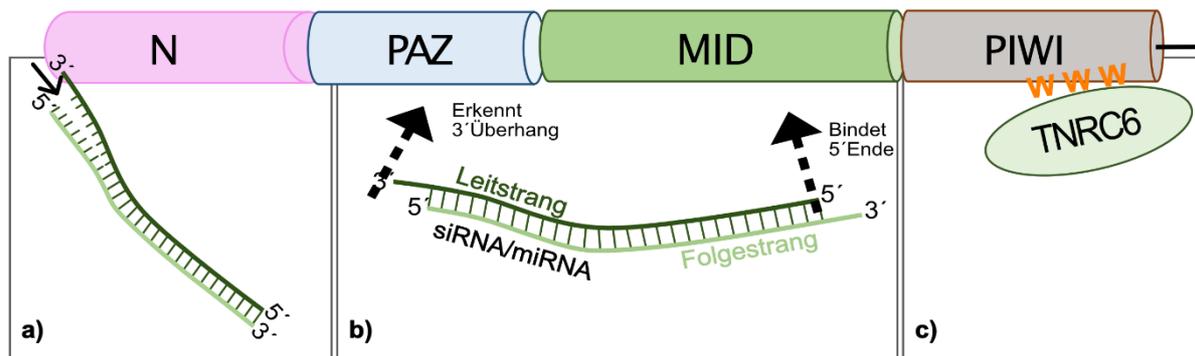


Abbildung 2-2 Struktur von humanem Argonaute 2

Vereinfachte Proteinstruktur von humanem Ago2, modifiziert nach (Hutvagner & Simard, 2008). **a)** In der N-Domäne (lila) werden die noch doppelsträngigen RNAs eingeklemmt und aufgebrochen, so dass der Folgestrang degradiert werden kann. **b)** PAZ Domäne in blau und die MID Domäne in grün dargestellt: sie fungieren beide als eine Art Lineal. Die PAZ-Domäne erkennt den 3'-Überhang der kleinen RNAs und die MID-Domäne bindet das 5'-Ende des Leitstrangs. **c)** Die PIWI-Domäne, in braun dargestellt, ist katalytisch aktiv und interagiert über mehrere Tryptophane (W) mit Proteinen der GW-Familie, in humanen Zellen ist es das TNRC6A-C.

Argonaute Proteine gelten als das Herzstück des so genannten RNA induced silencing complex (RISC), bestehend aus einem Ago Protein, der gebunden kleinen regulatorischen-RNA, der Ziel-mRNA, sowie weiteren regulatorischen, von Ago rekrutierten, Effektorproteinen, wie beispielsweise TNRC6. Durch ihre Hilfe wird ein Zusammenspiel aus Erkennung der Ziel-RNA und der eigentlichen epigenetischen Translationsregulation geschaffen (Kawamata & Tomari, 2010). Dabei ist die Assemblierung des RISC streng reguliert und die einzelnen Schritte unterliegen einer ständigen Kontrolle. Die Kopplung zwischen Ago und der siRNA/miRNA ist von essenzieller Bedeutung. Es können zwei Schritte unterschieden werden: Erstens die Bindung von den doppelsträngigen kleinen regulatorischen RNAs an Ago, sowie zweitens die Trennung der zwei Stränge und Degradation des Folgestrangs. Wichtig in diesem Prozess ist, dass nicht zufällig bestimmt wird, welcher der RNA Stränge der Leitstrang ist und damit fest mit Ago verbunden wird. Es konnte gezeigt werden, dass der Strang, welcher am 5'-Ende thermodynamisch weniger stabil in seiner Basenpaarung ist, als Leitstrang fungiert (Tomari, Matranga, Haley, Martinez, & Zamore, 2004). Ein weiteres Merkmal des 5'-Endes der kleinen regulatorischen RNAs sind Phosphatgruppen (Javier Martinez & Tuschl, 2002).

Beispielsweise konnte auch von David Salzman *et al.* 2016 gezeigt werden, dass es von der miRNA miR-34 mehrere reife miRNAs in der Zelle gibt, die allerdings durch das Fehlen der Phosphatgruppe inaktiv sind (Salzman *et al.*, 2016). Insgesamt gibt es demnach mehrere Faktoren, die nicht nur beeinflussen, welche kleine RNA an Ago gebunden wird, sondern auch welcher Strang als der Leitstrang fungiert. Die Kombination aus kleiner regulatorischen ds-RNA und Ago nennt man dabei pre-RISC.

Zur Entwicklung des reifen RISC fehlt noch die Spaltung des Folgestrangs, sowie die Bindung an die Ziel-mRNA. Ago2 ist katalytisch aktiv und kann mit Hilfe der so genannten Slicer-Aktivität den Folgestrang abspalten (Matranga, Tomari, Shin, Bartel, & Zamore, 2005). In Ago 1, 3 und 4 gibt es hierfür spaltungsunabhängige Mechanismen, die vor allem mit der Genauigkeit bzw. mit der Fehlpaarung der Basenpaarung zwischen Leit- und Folgestrang zusammenhängen (Kawamata & Tomari, 2010).

Nach der RISC Assemblierung leitet die si/mi-RNA den RISC zur Ziel-mRNA. Dabei wird der am 3'-Ende gelegene untranslatierte Bereich (3'-UTR) erkannt. Dieser liegt auf der mRNA nach dem eigentlichen für das Protein codierenden Teil. Interessanterweise scheint es einen Unterschied zu geben, ob zuvor eine miRNA oder eine siRNA an Ago gebunden wurde. Es wird davon ausgegangen, dass eine Bindung der miRNA an die Ziel-mRNA im Gegensatz zu siRNAs zur Inhibition der Translation und nicht zum Abbau der Ziel-mRNA führt. Diese Unterscheidung, welches Schicksal die Ziel-mRNA unterliegt, scheint dabei auch von der Basenpaarung zwischen mi/si-RNA und Ziel-mRNA abzuhängen. So führt eine perfekte Paarung eher zum Abbau und eine inkomplette Paarung eher zur Translationsinhibition der Ziel-mRNA (Doench, Petersen, & Sharp, 2003; Hutvagner & Zamore, 2002).

Um eine genau epigenetische Translationsregulation zu ermöglichen, sind zwar Ago Proteine der Hauptbestandteil des RISC, aber nicht die alleinigen Akteure. Sie rekrutieren verschiedene weitere Effektoren, die Aufgaben in der Translationsinhibition übernehmen. Akteure sind beispielsweise Proteine der TNRC6 Familie, die über die PIWI-Domäne mit Ago interagieren. TNRC6 wiederum beeinflusst die Stabilität des PolyA Schwanzes der Ziel-mRNA. Es kommt durch die daraus resultierende Destabilisierung generell zu einer weniger effizienten Translation der Ziel-mRNA (Eulalio *et al.*, 2009; Lian *et al.*, 2006; Pfaff & Meister, 2013). Als weiterer Interakteur ist das Enzym DDX6 zu nennen, welches den Zerfall der Ziel-mRNA fördert und damit die Translation hemmt (Bartel, 2018).

2.3 Das RNA-Bindeprotein Argonaute 2

2.3.1 Zelluläre Lokalisation von Ago2

Bisherige Forschungsergebnisse zeigen, dass Argonaute-Proteine überwiegend im Zytoplasma der Zellen lokalisiert sind. Dabei gibt es sowohl eine diffuse Verteilung als auch Orte, wo Ago konzentriert u.a. in Proteinaggregaten vorliegt. Diese konzentrierte Lokalisation von Ago steht mit so genannten Prozessierungskörperchen (*engl. processing bodies, P-bodies*) in Zusammenhang (Liu, Valencia-Sanchez, Hannon, & Parker, 2005; Meister et al., 2005; Sen & Blau, 2005). Es wurden bereits Lokalisationsanalysen von Ago2 in menschlichen embryonalen Nierenzellen (*engl.: human embryonic kidney cells, HEK 293T Zellen*), sowie in primären hippocampalen Neuronen durchgeführt, welche dieses Verteilungsmuster bestätigen (Höck & Meister, 2008; Lessel et al., 2020; Peters & Meister, 2007). Neben der zytoplasmatischen Lokalisation deuten bisherige Forschungsergebnisse auch auf ein Vorkommen von Ago2 im Zellkern hin. Hervorzuheben ist jedoch, dass die beschriebene RISC Assemblierung vor allem ein zytoplasmatischer Prozess ist (Ohrt et al., 2008).

Grundsätzlich lokalisiert Ago2 in P-bodies, doch die Frage, was P-bodies genau sind, ist bis heute nicht ausreichend geklärt. Klar ist, dass sie mit der Maschinerie der Translationsunterdrückung in Zusammenhang stehen (Cougot, Babajko, & Seraphin, 2004; R. Parker & Sheth, 2007). P-bodies sind große RNA-Granula, die zytoplasmatisch lokalisiert sind (Aizer & Shav-Tal, 2008). Dabei ist auffällig, dass sie sich vor allem in der Nähe des Zellkerns befinden. In Neuronen kommen sie überwiegend im Soma vor, aber es konnte auch gezeigt werden, dass sie in (distalen) Dendriten zu finden sind (Zeitelhofer et al., 2008). Als Bestandteile der P-bodies sind neben Argonaute-Proteinen weitere verschiedene an der Genrepression beteiligte Proteinklassen zu nennen. Zum einen das Decapping-Enzym, kurz Dcp1, sowie der Decapping-Aktivator DDX6 (Andrei et al., 2005; Cougot et al., 2004). Letzterer wurde schon als eines der Effektorproteine des RISC vorgestellt. Desweiteren befinden sich verschiedene mRNAs in P-bodies. Damit sind P-bodies ein möglicher Ort für die Regulierung der mRNA-Speicherung und des mRNA-Abbaus. Für diese These sprechen folgende Beobachtungen: zum einen eine Abnahme der P-bodies, wenn der Pool an mRNAs abnimmt, zum anderen eine Zunahme der P-bodies unter Hemmung der Translationsinitiierung, wie es beispielsweise bei Stress der Fall ist (R. Parker & Sheth, 2007; Sheth & Parker, 2003). Es gilt hier

hervorzuheben, dass eine mRNA, die in P-bodies lokalisiert ist, nicht zwangsläufig unwiderruflich abgebaut wird. Es konnte gezeigt werden, dass zwischengelagerte mRNAs, beispielsweise bei Wachstum der Zelle, die P-bodies wieder verlassen und translatiert werden können (Bregues, Teixeira, & Parker, 2005). P-bodies fungieren demnach ebenfalls als Speicherort für mRNAs.

Unterdessen deuten Forschungsergebnisse in *Drosophila* daraufhin, dass die Lokalisation von Ago, ob diffus im Zytoplasma oder konzentriert in P-bodies, nicht bestimmend dafür ist, ob Ago2 die Ziel-mRNA in der Translation reprimieren kann (Eulalio, Behm-Ansmant, Schweizer, & Izaurralde, 2007; Höck & Meister, 2008). P-bodies sind viel mehr als Folge des mRNA-Abbaus zu sehen.

2.3.2 Posttranslationale Modifikation von Ago2 und Ago2 Mutanten

Argonaute-Proteine können posttranslational auf verschiedene Weise modifiziert und somit teilweise in ihrer Funktion beeinflusst werden (Jee & Lai, 2014). Dabei spielen überwiegend Phosphorylierungs- und Hydroxylierungsprozesse eine Rolle, wobei in dieser Arbeit die posttranslationale Phosphorylierung von Ago2 im Vordergrund steht.

Es konnten mehrere Phosphorylierungsstellen in humanem Ago2 identifiziert werden (Quevillon Huberdeau et al., 2017; Rüdell et al., 2011). Inwieweit die Phosphorylierung von Ago2 einen Einfluss auf die Funktion hat, ist Bestandteil aktueller Forschungen. Bisher konnte gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung an Serin-378 (S378), welche in der MID-Domäne von Ago2 lokalisiert ist, zu einer Veränderung der zellulären Lokalisation führt. Die durchgeführten Experimente implizieren, dass durch die Phosphorylierung die Anreicherung in P-bodies erleichtert und die translationsunterdrückende Wirkung von Ago2 erhöht wird (Zeng, Sankala, Zhang, & Graves, 2008). Ähnliches konnte auch für eine weitere Phosphorylierungsstelle in der MID Domäne gezeigt werden. Trägt Ago2 an Tyrosin 529 (Y529) eine negative Ladung, so ändert es seine Lokalisation im Hinblick auf eine Anreicherung in P-bodies (Rüdell et al., 2011). Aber auch funktionelle Untersuchungen brachten interessante Ergebnisse. Es wurde beobachtet, dass Punktmutationen in der PAZ Domäne dazu führen, dass Ago deutlich weniger mit kleinen regulatorischen RNAs interagiert und außerdem die Ago2 Funktion, im Sinne einer Spaltung der Ziel-mRNA, reduziert ist (Liu et al., 2005).

Eindrucksvoll ist, dass mit diesem funktionellen Einfluss auch eine Änderung der Lokalisation einhergeht. Die Ago2-PAZ9 Mutante, eine PAZ Domäne mit insgesamt neun Punktmutationen, ist nicht in P-bodies angereichert (Liu et al., 2005).

Eine weitere Phosphorylierungsstelle in Ago2 ist in der PIWI Domäne gelegen. In dem Cluster 824:34 befinden sich mehrere Phosphorylierungsstellen (R. J. Golden et al., 2017; Quevillon Huberdeau et al., 2017). Grundsätzlich sind die Aminosäuren Serin (S), Threonin (T) und Tyrosin (Y) die an der posttranslationalen Phosphorylierung beteiligten Aminosäuren. Konkret bedeutet das für das in Ago2 gefundenen Phosphorylierungscluster S/T 824:34, dass hier an fünf Stellen eine Phosphorylierung möglich ist. Insgesamt ist hier viermal die Aminosäure Serin und einmal die Aminosäure Threonin codiert.

Miguel Quévillon Huberdeau *et al.* konnten 2017 Ago2 Mutanten generieren, die zum einen eine Hyperphosphorylierung in dem Cluster 824:34 imitiert, hier wurden alle fünf möglichen Phosphorylierungsstellen zu Glutamat (E) mutiert. Glutamat ist bei physiologischem pH negativ geladen, so dass durch die negative Ladung eine physiologische Phosphorylierung vorgespiegelt wird (Quevillon Huberdeau et al., 2017). Die Ago2 S/T 824:34E Mutante imitiert dementsprechend phosphoryliertes Ago2. Im Gegensatz dazu konnte durch eine Mutation von den Aminosäuren Serin und Threonin zu Alanin (A) eine Mutante generiert werden, die nicht mehr phosphoryliert werden kann. Demnach imitiert Ago2 S/T 824:34A nicht phosphoryliertes Ago2.

Forschungsergebnisse, welche mit Hilfe der Mutanten erzeugt werden konnten, deuten auf einen funktionellen Einfluss der posttranslationalen Ago2 Phosphorylierung hin (R. J. Golden et al., 2017; Quevillon Huberdeau et al., 2017). Es konnte gezeigt werden, dass Ago2 S/T824:34E eine deutlich geringere Interaktion mit mRNAs zeigt. Durch die negativ geladene Aminosäure Glutamat entsteht eine repulsive Kraft zwischen Ago2 und der ebenfalls negativ geladenen mRNA, was eine Bindung deutlich erschwert. Dies deutet darauf hin, dass eine Hyperphosphorylierung von Ago2, im Sinne einer Phosphorylierung aller fünf möglichen Aminosäuren, zu einer verminderten mRNA Bindung führt. Gleiche Versuche mit Ago2 824:34A zeigen hingegen keinen Unterschied in der mRNA Bindung im Vergleich zum nicht mutierten Ago2, also dem Wildtyp (wt). Interessanterweise konnte jedoch kein Unterschied in der Fähigkeit zur miRNA Bindung oder zur Interaktion mit TNRC6 festgestellt werden. Auch Lokalisationsanalysen in HEK 293T Zellen blieben ohne signifikante Ergebnisse. Sowohl Ago2

S/T824:34A also auch Ago2 S/T824:34E lokalisierten wie auch der wt in zytoplasmatischen P-bodies (R. J. Golden et al., 2017; Quevillon Huberdeau et al., 2017).

In Abbildung 2-3 sind die funktionellen Unterschiede der Ago2 Phosphomutanten schematisch verdeutlicht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Plasmide verwendet, die strukturell auf den Ago2 Phosphomutanten von Miguel Quévillon Huberdeau *et al.* basieren.

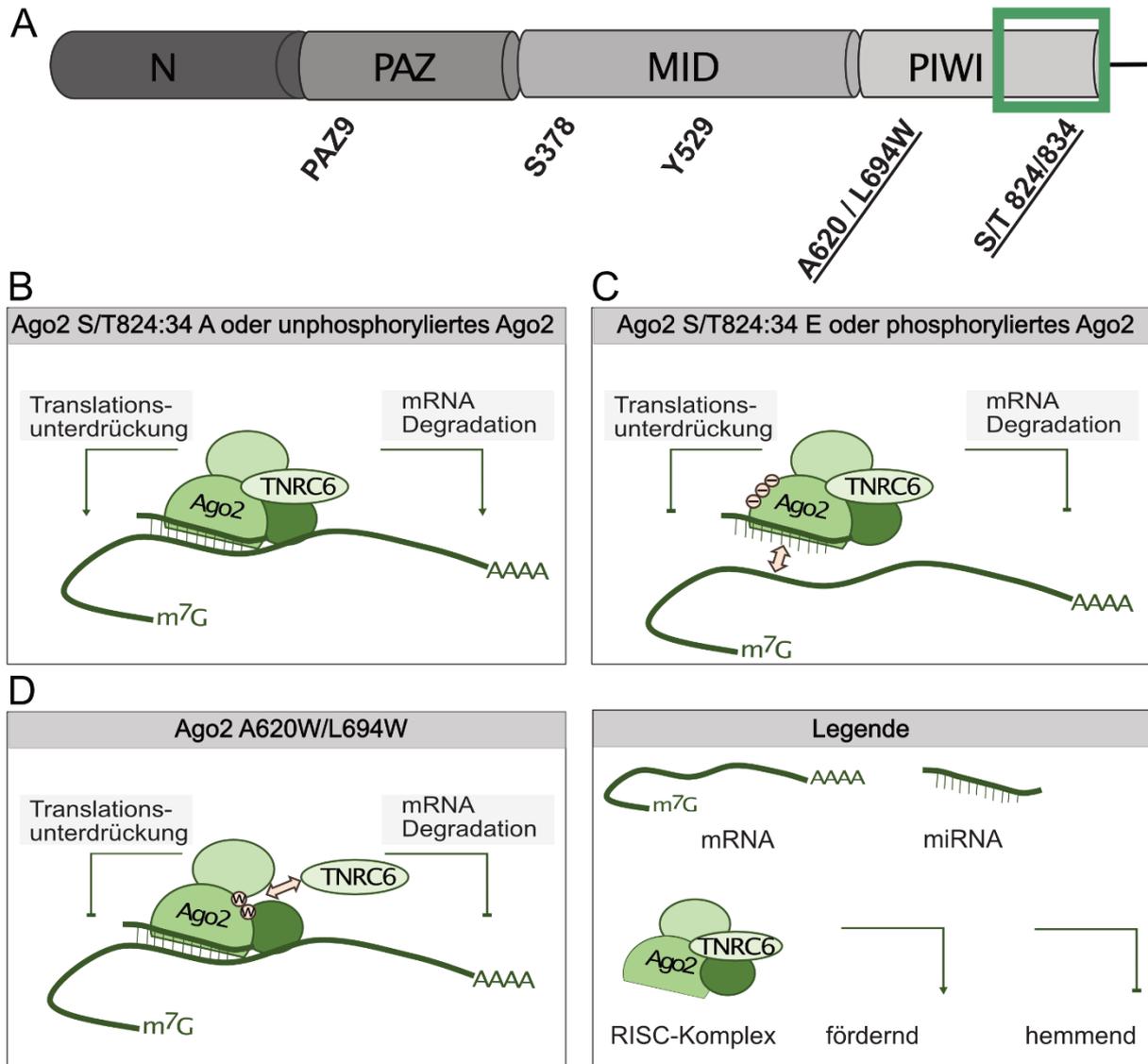


Abbildung 2-3: Schematische Darstellung der Ago2 Phosphomutanten

A. Schematische Darstellung der Lokalisation der Ago2 Mutanten. In grün ist die Lokalisation der Ago2 Phosphomutante markiert. **B.** Ago2 S/T824:34A oder unphosphoryliertes Ago2: Der Komplex von miRNA und Ago2 kann sich bilden und die komplementäre Ziel RNA wird in der Translation gehemmt. **C.** Ago2 S/T824:34E oder phosphoryliertes Ago2: Ago2 kann die Ziel-mRNA nicht mehr binden, somit ist diese auch nicht von der Gen-Repression betroffen. **D.** Ago2 A620/L694W: Der RISC-Komplex kann sich nicht mehr effektiv assemblieren, so dass die gebundene mRNA nicht in der Translation gehemmt bzw. degradiert werden kann. In der Legende sind die wichtigsten Komponenten graphisch zusammengefasst.

Als weitere Mutante ist Ago2 A620/L694W für diese Arbeit wichtig. Die Mutation liegt hier ebenfalls in der PIWI Domäne, genauer gesagt wurde die Bindestelle für TNRC6 mutiert. Dabei sind die Aminosäuren Alanin und Leucin (L) zu Tryptophan (W) mutiert. Für diese Ago2 Mutante ist bekannt, dass sie nicht mit TNRC6 interagieren kann und nicht in P-bodies lokalisiert (Quevillon Huberdeau et al., 2017). Im Rahmen dieser Arbeit wurde Ago2 A620/L694W für die Lokalisationsanalysen als Negativkontrolle verwendet.

Graphisch dargestellt in Abbildung 2-3 ist, dass Ago2 mit Mutation von Serin und Threonin an der Stelle 824:34 zu Alanin nicht mehr phosphoryliert werden kann, dadurch kann sich der Komplex von miRNA und Ago2 mit zugehörigen Komponenten ungehindert bilden. Durch Bindung der miRNA wird die komplementäre Ziel-RNA in der Translation gehemmt bzw. degradiert (Abbildung 2-3 B). Betrachtet man hingegen Ago2 S/T824:34E bzw. phosphoryliertes Ago2, zeigte sich, dass durch die daraus resultierende negative Polarisierung von Ago2, welche durch die physiologische Phosphorylierung bzw. die Aminosäure Glutamat (E) entsteht, die ebenfalls negativ geladenen mRNA nicht mehr gebunden werden kann. Die Ziel-mRNA ist somit auch nicht von der Genrepression betroffen (Abbildung 2-3 C). Die bereits erwähnte Mutation in der PIWI Region führt dazu, dass Ago2 A620/L694W das Protein TNRC6 nicht mehr binden kann. Dadurch kann sich der RISC Komplex nicht mehr effektiv assemblieren, so dass die gebundene mRNA nicht in der Translation gehemmt bzw. degradiert werden kann (Abbildung 2-3 D).

2.3.3 Einfluss der synaptischen Aktivierung auf Ago2

Die lokale Proteinsynthese ist abhängig von der neuronalen Aktivität. Dies heißt, dass mehr mRNAs zu den Dendriten transportiert werden, wenn das Neuron aktiviert/stimuliert wird (C. Jiang & Schuman, 2002). Es ist also auch anzunehmen, dass bei hoher Aktivität mehr mRNA gebraucht wird, um Proteine, welche u.a. für die Synapse wichtig sind, zu synthetisieren. Führt man diese Überlegungen weiter, dann ergibt sich daraus, dass in aktivierten Neuronen weniger RNAi geschieht. Paradis-Isler *et al.* haben genau diesen Aspekt untersucht (Paradis-Isler & Boehm, 2018). Durch Stimulierung des N-Methyl-D-Aspartat Rezeptors (NMDA-Rezeptor) liegt weniger Ago2 dendritisch lokalisiert vor als ohne Stimulation (Paradis-Isler & Boehm, 2018). Eine Erklärung hierfür ist, dass NMDA-Rezeptoren

zur Gruppe der Glutamat Rezeptoren gehören, welche eine erregende Wirkung auf das zentrale Nervensystem haben. Desweiteren kann beobachtet werden, dass eine Stimulation der synaptischen Aktivität eine vorübergehende Erhöhung der Interaktion von Ago2 und TNRC6 zur Folge hat (Rajgor, Sanderson, Amici, Collingridge, & Hanley, 2018). Auch der Phosphorylierungsstatus von Ago2 an der Stelle S387 lässt sich durch Stimulation des NMDA-Rezeptors beeinflussen (Paradis-Isler & Boehm, 2018; Rajgor et al., 2018). Paradis-Isler *et al.* erkannten durch die NMDA-Rezeptor Stimulation in hippocampalen Neuronen eine Verringerung an S387 phosphoryliertem Ago2 im Vergleich zum gesamten Ago2, während Rajgor *et al.* genau das Gegenteil beobachteten (Paradis-Isler & Boehm, 2018; Rajgor et al., 2018). Übergreifend wird jedoch beobachtet, dass die synaptische Aktivität generell einen Einfluss auf Ago2 und somit auf die mRNA Translation hat.

2.4 Das Doppelstrang-RNA-Bindeprotein Stau2

Neben Ago2 gibt es zahlreiche weitere RBPs, welche die lokale Translation beeinflussen. Zu den Neuronen-spezifischen RBPs zählt Stau2 (Stau2). Die Stau2 Proteine bilden eine eigene Klasse von RBPs, welche an doppelsträngige RNAs binden und dadurch die RNA Faltung und die Zugänglichkeit durch andere RBPs beeinflussen. In Säugetieren existieren zwei Orthologe von Stau. Stau1 ist ubiquitär exprimiert, während Stau2 spezifisch in Neuronen vorkommt (Duchaîne et al., 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wird sich auf die Neuronen-spezifische Isoform Stau2 fokussiert, da Stau2 im Gehirn relativ hoch exprimiert ist und unerlässlich für die Morphologie der Neurone ist (Goetze et al., 2006). Stau2 ist überwiegend im Zytoplasma lokalisiert, kann aber auch zwischen Zytosol und Zellkern wandern, dabei interagiert es im Zellkern mit der Ziel-mRNA und wird als Komplex wieder ins Zytosol transportiert (Kiebler, Jansen, Dahm, & Macchi, 2005). Demnach ist Stau2 in RNPs lokalisiert. Grundsätzlich ist Stau2 an der dendritischen mRNA Lokalisation beteiligt (Kiebler et al., 1999; Köhrmann et al., 1999), ebenso wie an der RNA-Stabilität (Heraud-Farlow et al., 2013) und der lokalen Translation. Dabei bindet Stau2 an die 3'-UTR der Ziel-mRNA und ermöglicht so einen gerichteten dendritischen Transport (Bauer et al., 2019; Sharangdhar et al., 2017). Durch wegweisende Experimente wurden verschiedene Stau2 Zieltranskripte identifiziert (Heraud-Farlow et al., 2013). Eins davon ist die mRNA, die für das Protein Rgs4 codiert. Rgs4 ist der

Regulator von G-Protein gekoppelten-Rezeptor Signalwegen (De Vries, Zheng, Fischer, Elenko, & Farquhar, 2000). Stau2 bindet die mRNA und stabilisiert diese. Als weiteres Stau2 Ziel ist Complexin1 zu nennen. Dieses Protein hat Einfluss auf die Vesikelexozytose in Neuronen (McMahon, Missler, Li, & Südhof, 1995; Reim et al., 2001). Bisher konnten einige Einflüsse, die Stau2 auf die Ziel-RNA hat, aufgedeckt werden. Eine Repression von Stau2 führt zu einer sinkenden Expression der Stau2 Ziel-mRNAs (Heraud-Farlow et al., 2013; Mikl, Vendra, & Kiebler, 2011). Aber nicht nur auf mRNAs hat die Stau2 Expression einen Einfluss. Auf Proteinebene interagiert Stau2 mit anderen RBPs (Fritzsche et al., 2013). Interessanterweise zeigten sich hierunter auch einige RBPs, die an der RNAi beteiligt sind. Dabei ist Stau2 selbstverständlich nicht das einzige RBP, welches mit der miRNA-Maschinerie interagiert. Gezeigt wurde, dass beispielsweise auch das ubiquitär exprimierte RBP HuR mit Ago2 und auch mit miRNA regulatorisch interagiert (Ehse, Fernandez-Moya, Schroger, & Kiebler, 2021; Li, Estep, & Karginov, 2018). Gleiches gilt für das RBP Pumilio2 (Pum2) (Sternburg, Estep, Nguyen, Li, & Karginov, 2018). Abschließend lässt sich hervorheben, dass aktuelle Forschungsergebnisse die These einer kombinatorischen Interaktion zwischen verschiedenen RBPs untermauern. Nach derzeitigem Stand ist diese Interaktion für die grundsätzliche Regulation der mRNA Expression unerlässlich. Demnach lässt sich auch eine Interaktion zwischen Stau2 und der RNAi vermuten, da auch Stau2 ein Schlüsselakteur für eine regulierte lokale dendritische Proteintranslation ist.

3 Ziel der Arbeit

In Neuronen spielt eine exakt regulierte Proteinexpression eine große Rolle, um die Funktionalität und die einwandfreie Entwicklung des Gehirns zu ermöglichen. Prozesse wie eine gezielte Verknüpfung der Neurone über Synapsen, sowie strukturelle und funktionelle Veränderungen von Synapsen sind ohne eine strenge Regulation nicht fehlerfrei möglich. Dabei sind die Kenntnisse über die molekularen Abläufe in Neuronen ein wichtiger Bestandteil, um die Prozesse des Lernens und Erinnerns verstehen zu können. Ago Proteine sind als Teil des RISC Schlüsselproteine in der Regulation von mRNA Translation und Degradation. Im Rahmen dieser Arbeit soll zum einen die Ago2 Protein Lokalisation, unter Berücksichtigung der posttranslationalen Ago2 Modifikation, in hippocampalen Neuronen charakterisiert werden. Neben Ago2 ist auch das Doppelstrang-RBP Stau2 ein Schlüsselakteur in der Regulation der dendritischen mRNA Translation in Neuronen. Basierend auf diesen Grundlagen wird als zweites Ziel die Interaktion zwischen Stau2 und Ago2 näher beleuchtet. Zu diesem Zweck wird der Einfluss einer Reduktion der Stau2 Proteinexpression auf die Lokalisation von Ago2 in hippocampalen Neuronen näher untersucht. Um die Wichtigkeit der regulierten Proteinexpression im Gehirn zu verdeutlichen, wird als drittes Ziel der Einfluss der Stau2 und Ago Proteinexpression auf die neuronale Verzweigung charakterisiert. Hierfür wird sowohl Ago als auch Stau2 in hippocampalen Neuronen runterreguliert und anschließend werden die Neurone auf mögliche morphologische Unterschiede hin beurteilt. Die Ziele wurden in der Erwartung ausgewählt, somit einen Einblick in die posttranskriptionelle Genregulation in Neuronen zu gewinnen.

4 Material und Methoden

Im Folgenden werden die angewandten Methoden vorgestellt. Dabei wird sowohl auf die experimentelle Durchführung als auch auf die anschließende mikroskopische und statistische Analyse eingegangen. Im Anhang findet sich eine Auflistung aller für die Experimente verwendeten Plasmide, Antikörper, Lösungen und Medien, Geräte und Softwares.

4.1 Zellkulturmethoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden *in vitro* sowohl primäre Zellen als auch Zelllinien verwendet. Es erfolgte die Kultivierung von primären hippocampalen und kortikalen Neuronen, sowie menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK 293T Zellen).

4.1.1 Neuronale Zellkultur

Alle Tiere wurden nach dem German Welfare for Experimental Animals genutzt (LMU-München, Regierung von Oberbayern).

Es wurden primäre hippocampale und kortikale Neurone aus Rattenembryos Embryonentag 17 isoliert (Kaech & Banker, 2006). Hierfür wurden die Feti aus dem Uterus der schwangeren Ratte entnommen und das Gehirn separiert. Unter einem Mikroskop wurden die Meningen entfernt und Cortex und Hippocampus getrennt. Während des gesamten Vorgangs wurde das Gewebe in vorgewärmter (37°C) Hank's balancierter Salzlösung (engl. *Hank's balanced salt solution*, HBSS) gehalten. Anschließend wurde das Gewebe bei 37°C für 10 min in 2,5% Trypsinlösung inkubiert. Die Inaktivierung des Trypsins erfolgte durch Zugabe von Dulbecco's Modified Eagle Medium mit Pferde Serum (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium with horse serum*, DMEM-HS). Kortikale Zellen wurden für 5 min bei 1000 x *g* zentrifugiert. Durch Pipitieren mit einer 1000 µl Pipette wurden die Zellen voneinander separiert und zusätzlich mit 100 µm, 70 µm und 40 µm Filtern voneinander getrennt. Hippocampale Zellen wurden durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit einer Glaspipette voneinander separiert. Dabei erfolgte dieser Schritt zweimal, mit bei dem zweiten Mal auf die

Hälfte reduzierten Durchmesser der Glaspipette (Zeitelhofer et al., 2007). Die Zellzahl wurde manuell mit Hilfe einer Zählkammer gezählt. Die hippocampalen Neuronen wurden auf poly-L-Lysin behandelten Deckgläsern in 6 cm Petrischalen in neuronalem minimal essenziellem Medium +B27 (NMEM+B27) ausplattiert. Inkubiert wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂. Nach drei Tagen wurden die Neurone in Petrischalen mit einer Glia-Kokultur weiterkultiviert und an Tag 10-16 *in vitro* (engl. *days in vitro*, DIV) mittels Calcium Phosphat Co-Präzipitation transfiziert (Goetze, Grunewald, Baldassa, & Kiebler, 2004).

Die kortikalen Neuronen wurden in 6 cm Petrischalen in einer Dichte von 1,5 - 2 Millionen ausplattiert. Bei einer Verwendung der Neurone nach DIV 7 wurde 50% des NMEM+B27 Mediums ausgewechselt.

4.1.2 Kultivierung von HEK 293T Zellen

HEK 293T Zellen wurden in DMEM mit fetalem Rinderserum (FCS; DMEM; Invitrogen) in Zellkultur Flaschen bei 37°C und 5% CO₂ gezüchtet. Bei rund 80-100% Konfluenz wurden die Zellen gesplittet. Dazu wurde das Medium entfernt und die Zellen einmal mit vorgewärmter phosphatgepufferter Kochsalzlösung (engl. *phosphate-buffered Saline*, PBS) gewaschen und mit Hilfe von Trypsin von der Kulturflasche gelöst. In frischem Medium wurden die Zellen durch Pipettieren resuspendiert. Abhängig von der Konfluenz wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:7 bis 1:12 gesplittet. Hierfür wurde der jeweils überschüssige Anteil an Zellen entfernt und die übrigen in 15 ml frischem DMEM-HS Medium weiter inkubiert. Je nach Verwendung wurden die übrigen Zellen gezählt und ausplattiert oder verworfen.

Ein Tag vor der Transfektion wurden die HEK 293T Zellen auf poly-L-Lysin behandelten Deckgläsern oder vorgefertigt beschichteten Petrischalen ausplattiert. Für die Transfektion wurde das Calcium-Phosphat Protokoll (vgl. 4.1.3) verwendet (Goetze et al., 2004).

4.1.3 Transfektion

Die neuronalen Zellen und HEK 293T Zellen wurden, wie bereits beschrieben mittels Calcium-Phosphat Präzipitation transfiziert (Goetze et al., 2004). Hierfür wurden das Transfektionsmedium und das HBSS (Transfektion) auf 37°C vorgewärmt. Es wurden 6 µl CaCl₂

und 3-5 µg DNA mit H₂O in einem Volumen von insgesamt 60 µl gemischt. Ein Gesamtvolumen von 120 µl wurde durch die schrittweise Zugabe von 60 µl 2x BES-gepufferter Kochsalzlösung (engl. *BES-buffered saline*, BBS) (pH 7,15 – 7,20) erreicht. Anschließenden wurden mit der Pipette durch umgekehrtes Pipettieren ca. 5-mal Luftblasen induziert. Alle Komponenten wurden langsam und einzeln hinzugefügt.

Die hippocampalen Neurone wurden in Transfektionsmedium inkubiert und anschließend wurde die Transfektionslösung langsam zugefügt. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation der Zellen für 45-60 min bei 37°C. Zur Entfernung des im Mikroskop sichtbaren Präzipitates wurden die hippocampalen Neuronen in HBSS (Transfektion) für 2-5 min gewaschen. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ in NMEM+B27 inkubiert. Fixiert wurden die Zellen nach 16-72 Stunden Expression mit 4% Paraformaldehyd (PFA) für 15 min. Die Experimente wurden mit kultivierten Neuronen zwischen DIV 10-15 durchgeführt.

Zellen der Zelllinie HEK 293T wurden ebenfalls mittels Calcium-Phosphat Präzipitation transfiziert. Dafür wurde die Transfektionslösung auf die Zellen gegeben und für 16 h auf den Zellen belassen. Nach Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen mit vorgewärmten HBSS gewaschen und anschließend mit 4% PFA fixiert.

4.1.4 Transduktion

Transduziert wurden im Rahmen dieser Arbeit kortikale und hippocampale Neurone. Die Transduktion erfolgte mit Neuronen zwischen DIV 8-10. 4-6 µl der Lentiviren, die shNTC, shStau2, shAgo1, shAgo2 exprimieren, wurden pro 6 cm Petrischale verwendet und die Neurone wurden bei 37°C mit 5% CO₂ inkubiert. Neben der Virus Zugabe wurde den Zellen ebenfalls zusätzlich 1 ml frisches NMEM+B27 zugefügt. Nach vier bis sechs Tagen Virusexposition wurden die Zellen zweimal in vorgewärmten HBSS gewaschen und anschließend in 4% PFA fixiert. Zur Coexpression von Ago2, als Fusionsprotein mit dem grün fluoreszierenden Protein (engl. *enhanced green fluorescent protein*, eGFP) wurden die Neurone gegebenenfalls 16-20 h vor der Fixierung mittels Calcium-Phosphat Präzipitation transfiziert.

4.1.5 Neuronale Aktivierung und Hemmung

Zur Simulierung neuronaler Aktivität bzw. Inhibierung dergleichen wurden hippocampalen Neurone an DIV 14 mit pCMV-eGFP-Ago2wt, pCMV-eGFP-Ago2-824:34A oder pCMV-eGFP-Ago2-824:34E transfiziert. 12-16 h nach Transfektion erfolgte die Behandlung zur Hemmung der neuronalen Aktivität. Hierfür wurden die Zellen für 4 h bei 37°C mit 100 µM 6-Cyano-7-nitrochinoxalin-2,3-dion (CNQX; Sigma), 50 µM 2-Amino-5-phosphonopentansäure (AP5; Sigma) und 1 µM Tetrodotoxin (TTX; Abcam) in NMEM+B27 Medium inkubiert. Für die Kontrollkondition wurden Zellen mit der äquivalenten Menge an DMSO (50 µM) inkubiert. Die Zellen für die Kondition der neuronalen Inhibition wurden im Anschluss in 4% PFA fixiert.

Zellen für die Erholungskondition wurden kurz in vorgewärmtem HBSS gewaschen und danach erfolgte eine 15-minütige Regeneration in NMEM+B27 bei 37°C. Darauf folgend wurden die Zellen fixiert.

Stimulation durch NMDA erfolgte durch ein kurzes Waschen in vorgewärmtem HBSS (nach 4 h Behandlung mit CNQX, AP5 und TTX), eine kurze (2-5 sec) Behandlung mit PBS und 15 min Inkubation mit 50 µM NMDA in NMEM+B27. Anschließend wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert (vgl. Abbildung 5-6 A).

4.2 Immunfluoreszenz Färbung

Nach Transfektion und Fixierung der primären hippocampalen Neurone in 4% PFA wurden die Deckgläser mit den Zellen dreimal für 5 min in PBS gewaschen, um Rückstände des PFAs zu entfernen. Nach einer Behandlung mit Titron X-100 (0,1% in PBS) für 5 min erfolgte ein erneuter Waschvorgang, um die Zellen anschließend für 30 min in 150 µl 100%iger Blockierungslösung zu inkubieren, um unspezifische Bindestellen der Antikörper zu blockieren. Die Behandlung mit dem Primärantikörper, der in 10%iger Blockierungslösung verdünnt wurde, erfolgte über Nacht (o/n) bei 4°C. Nach einem erneuten Waschvorgang in PBS wurde der fluoreszierende Sekundärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur (RT) auf die Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln. Für die Färbung der DNA wurden die Zellen für 3-5 min bei RT in 50 µl DAPI Lösung inkubiert und anschließend dreimal in PBS gewaschen. Vor dem Transfer der Deckgläser auf die Objektträger wurden die Wachspunkte

auf diesen mit einer 1000 µl Pipettenspitze entfernt. Anschließend wurden die Deckgläser kurz in H₂O getaucht und mit den Zellen nach unten auf die Objektivträger gelegt. Hierfür wurde pro Deckglas 11 µl Fluoromount Aqueous Mounting Medium (Sigma) verwendet. Die Proben wurden nach kurzem Trocknen bei RT im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

4.3 Mikroskopie

Die Fluoreszenz-Aufnahmen wurden mit einem 63x Plan-Apochromat-Ölimmersionsobjektiv an einem Zeiss Z1 Axio Observer Mikroskop mit AxioCam 506 Kamera durchgeführt. Als Lichtquellen wurden eine HXP 120 und COLIBRI.2 LED verwendet. Die Steuerung erfolgte über die ZEN Software von Zeiss. Alle Einzelbilder wurden auf die dendritische Ebene fokussiert oder es wurde eine Z-Stack Aufnahme (0,26 µm Schrittgröße) angefertigt.

4.3.1 *eGFP-Ago2 Lokalisation*

Um die Ago2-Lokalisation in Zellen zu vergleichen, die mit pCMV-eGFP-Ago2 bzw. pCMV-eGFP-Ago2 824:34A/E und pCMV-eGFP-Ago2 A620WL694W transfiziert worden sind, wurden Zellen, die das Plasmide erfolgreich inkorporiert hatten, selektiert. Es wurden Aufnahmen von GFP und Phasenkontrast gemacht. Bei einer zusätzlichen Immunfärbung gegen Dcp1a oder DDX6 erfolgte ebenfalls eine Aufnahme in den Kanälen Cy5 bzw. Cy3. Zusätzlich wurde von jedem Neuron eine Z-Stack Aufnahme, bestehend aus 30 Bildern in den Z-Ebenen, im GFP-Kanal und bei zusätzlicher Immunfärbung in Cy3 bzw. Cy5 aufgenommen.

Für die Ago2 Lokalisationsanalyse in Abhängigkeit der Expression von Stau2, HuR, Pum2 bzw. Ago2 wurden Zellen, die mit pCMV-eGFP-Ago2 und entweder pSuperior-tagBFP-shNTC, pSuperior-tagBFP-shStau2, pSuperior-tagBFP-shHuR, Fu3aH1-shPum2-pCamKIIa-tagRFP oder pSuperior-tagBFP-shAgo2 (bzw. Fu3aH1-shAgo2-pCamKIIa-tagRFP bei der Transduktion) transfiziert worden sind, selektiert. Es musste darauf geachtet werden, dass die Zellen beide transfizierte Plasmide erfolgreich exprimieren. Analog erfolgte eine Aufnahme von Phasenkontrast, GFP, BFP bzw. RFP und bei zusätzlicher Immunfärbung gegen Dcp1a, Stau2, oder Pum2 von Cy3 bzw. Cy5. Abermals wurde zusätzlich von jedem Neuron ein 3-D Bild,

bestehend aus 30 Bildern in der Z-Ebene, im GFP-Kanal und bei zusätzlicher Immunfärbung in Cy3 bzw. Cy5 aufgenommen.

Für die Analyse der eGFP-Ago2 Partikel wurde eine Z-Projektion in ImageJ mit maximaler Intensität durchgeführt und die Anzahl an Partikeln manuell mit dem Multipoint-Tool gezählt. Dieselbe Analyse erfolgte für die Zählung der Dcp1a und RCK Partikel.

4.3.2 Sholl – Analyse

Die Sholl Analyse ist eine Möglichkeit, die Morphologie von Neuronen quantitativ zu analysieren. 1953 veröffentlichte Sholl die nach ihm benannte Methode (Sholl, 1953). Es steht die Analyse der Verzweigung der Neurone im Vordergrund. Für die Analyse der neuronalen Verzweigung im Rahmen dieser Arbeit wurden die Neurone nach Expression aller transfizierten Plasmide selektiert. Dies erfolgte mikroskopisch anhand der Darstellung der jeweiligen im Plasmid enthaltenen Fluoreszenzproteine. Es wurden Einzelbildaufnahmen von Phasenkontrast, GFP, BFP und RFP gemacht. Desweiteren erfolgte eine Z-Stack Aufnahme. Die Sholl Analyse wurde mit Hilfe des Programms ImageJ durchgeführt. Nach Import in das Programm wurde ein Z-Projektion mit maximaler Intensität eingestellt und anschließend die Bildgröße in acht Bit geändert. Für eine klare Differenzierung zwischen Hintergrund und der Zelle (Vordergrund) wurde in ImageJ der Threshold dementsprechend angepasst. Um die Messung nicht mit nichtrealen, sondern zum Hintergrund gehörigen Punkten zu verfälschen, wurden diese entfernt. Dadurch konnte eine möglichst exakte Analyse gewährleistet werden. Als Zentrum der Analyse wurde der Mittelpunkt des Zellkörpers definiert. Anschließend wurde vom Programm die Sholl Analyse durchgeführt. Dabei wurden um den Mittelpunkt (entspricht 0 μm) Kreise gezogen. Die Radien der Kreise wurden dabei in 10 μm Abständen erhöht. Ausgezählt wurde die Anzahl an Schnittpunkten der Dendriten mit den zuvor gezogenen Kreisen. Die Auszählung der Anzahl an Schnittpunkte erfolgte automatisch.

4.3.3 Fluoreszenzmessung und Quantifizierung der Proteinexpression

Für die Auswertung der Proteinexpression wurde die Fluoreszenzintensität im Zellkörper von eGFP-Ago2, oder das Proteinsignal von Stau2, Pum2 und Dcp1a gemessen.

Hierfür erfolgte die Aufnahme von Einzelbildern. Für die Quantifizierung wurde die Messfunktion der Zeiss Zen Software verwendet, dabei wurde die durchschnittliche Intensität (*Mean Intensity*) gemessen. Für die Messung der Zellkörpergröße wurde basierend auf der Phasenkontrastaufnahme der Zellkörper per Hand nachgefahren. Verwendet wurden hierfür Bilder auf Ebene der Dendriten.

4.4 DNA-Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit dienten die DNA-Methoden primär der Herstellung von Plasmiden zur Transfektion von Neuronen, sowie HEK 293T Zellen.

4.4.1 Plasmidverdau

Für den Plasmidverdau wurden Plasmide mit Restriktionsenzymen im entsprechenden Puffer für 2 h inkubiert. Es wurde ein Gesamtvolumen von 20 µl angesetzt. Dabei wurde 1 µl Enzym, 2 µl entsprechender Puffer, 2-6 µl der jeweiligen Plasmide in H₂O gemischt und für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Enzyme wurden bei 85°C für 2 min hitzeinaktiviert.

4.4.2 Agarose Gelelektrophorese

Um die DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen, wurde ein 1%iges Agarosegel mit einem 0,007 - 0,011%igem Gehalt an Ethidiumbromid verwendet. Die angelegte Spannung beträgt zwischen 100 - 110 Volt (V). Zuvor wurde die DNA mit Restriktionsenzymen verdaut. Als Größenreferenz dient eine 1 kb Leiter, die neben den Proben lief und somit eine Einteilung sowie eine Zuordnung der DNA-Segmente anhand ihrer Größe ermöglicht. Um benötigte DNA-Fragmente aus dem Gel zu isolieren, wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Anleitung verwendet.

4.4.3 Ligation und Transformation in kompetente Escherichia coli

Nach erfolgter Ligation von Vektor und Insert erfolgte die Transformation. Für die Verknüpfung der DNA-Segmente wurde ein Ansatz von 20 µl mit 2 µl T4-DNA-Ligase-Reaktionspuffer, 1 µl T4-DNA-Ligase (NEB), 1-2 µl dephosphoryliertem Vektor (Antarctic Phosphatase - NEB) und 4-16 µl Insert gemacht. Nach Inkubation bei 16°C o/n erfolgte die Transformation. Hierfür wurde die gesamte Ligation (20 µl) in 50 µl chemisch kompetenten Escherichia coli Bakterien (TOP10) transferiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 40 sec und anschließendem Abkühlen auf Eis für 2 min wurde 200 µl S.O.C. Medium zugegeben und für 1 h bei 37°C und 1100 rpm inkubiert. Anschließend wurden die transformierten Zellen auf einer Agarplatte mit Antibiotika, gegen welches die gewünschten Plasmide Resistenzen enthalten, ausplattiert und o/n bei 37°C inkubiert. Durch die Zugabe des Antibiotikums wurde ein Wachstum von Bakterien, welche das gewünschte Plasmid nicht inkorporiert hatten, verhindert. Um das korrekte Konstrukt zu identifizieren, wurde im Anschluss ein Plasmidverdau zur Kontrolle durchgeführt.

4.4.4 Plasmidpräparation

Die auf den Agarplatten gewachsenen Einzelkolonien wurden in 3 ml LB Medium mit Antibiotika bei 37°C o/n inkubiert. Für die Isolation der DNA wurde das GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) laut beiliegendem Protokoll verwendet. Die Plasmidpräparation erfolgte mit den Plasmid Midi und Maxi Kits (Qiagen). Für die Präparation wurde das im Kit beiliegende Protokoll verwendet. Die folgenden Schritte wurden im Rahmen der Experimente für diese Arbeit angepasst. Für den Maxi Prep wurden 250 ml und für den Midi Prep 100 ml Bakterienkultur angesetzt. Für den Midi Prep wurden Papierfilter verwendet, um den Überstand zu trennen. Nach der Präzipitation der DNA mit Isopropanol erfolgte die Zentrifugation bei 4°C, 4.200 x g für 1 h. Das Präzipitat wurde anschließend mit 800 µl endotoxinfreiem 70%igem Ethanol gewaschen, welcher danach abpipettiert wurde. Das getrocknete Pellet wurde in 50-200 µl TE Puffer gelöst.

4.5 Virusproduktion

Für die Produktion von Lentiviren wurden HEK 293T Zellen in frühen Passagen verwendet. Dabei wurden die HEK 293T Zellen in 10 cm Platten in einer Dichte von 1 - 1,5 Mio pro 10 ml DMEM/FCS medium ausplattiert. Zwei Tage nach dem Ausplattieren wurden die Zellen mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation transfiziert (Goetze et al., 2004). Als Basisvektoren wurden psPAX2 und pVSVg verwendet. Kotransfiziert wurden die entsprechenden lentiviralen LTR-Vektoren.

4-8 h nach der Transfektion wurde das alte Medium gegen neues DMEM/FCS Medium mit 1,25% BSA ersetzt. Die Effektivität der Transfektion wurde im Fluoreszenzmikroskop beurteilt.

48 h nach der Transfektion wurde das überstehende Medium in 50 ml Röhrchen gesammelt und für 5 min bei 600 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe eines 0,45 µm Millex-HV Filter gefiltert und mit einer Ultrazentrifuge (Beckmann-Coulter) bei 23.000 rpm für 2 h 20 min bei 4°C zentrifugiert. Das entstandene Viruspellet wurde, nach Entfernung des Überstandes, in 150 µl OptiMEM für 4 h bei 4°C inkubiert und daraufhin resuspendiert. Nach dem Aliquotieren wurden die Lentiviren bei -80°C gelagert. Zur Erfolgskontrolle wurden, nach einer Viruspräparation, primäre Neuronen transduziert und die Effektivität dieser im Fluoreszenzmikroskop beurteilt.

4.6 Protein Methoden

Die verwendeten Proteinmethoden dienen der Herstellung des Protein-Lysats, der Separierung der Proteine nach ihrem molekularen Gewicht, sowie der Proteinausfällung.

4.6.1 Herstellung des Protein-Lysats

Zur Herstellung eines Protein-Lysats wurden Zellkulturschalen mit primären neuronalen Zellen oder Zelllinien mit vorgewärmtem PBS gewaschen. Nach dem Waschen wurde die Zelllyse durch direkte Zugabe von 3x SDS-Ladepuffer in die Schale initiiert (100 µl pro 6 cm Schale). Im Anschluss erfolgte eine komplette Lösung der Zellen von der Petrischale mit Hilfe

eines Zellschabers. Das Protein-Lysat wurde anschließend in ein Reaktionsgefäß übertragen. Die Proben wurden mit Benzonase Nuklease (Sigma) behandelt.

4.6.2 SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem molekularen Gewicht wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Die verwendeten Proben wurden in 3x SDS (Natrium-Dodecyl-Sulfat) Puffer gelöst und anschließend erhitzt. Bei Zellen, welche zuvor mit einem eGFP-Ago2 Fusionskonstrukt transfiziert wurden, erfolgte dies bei 60°C für 10 min, da sich bei Vorexperimenten gezeigt hatte, dass bei Erhitzung über 65°C das verwendete eGFP-Ago nicht mehr detektiert werden konnte. In den Versuchen zur Stau2 Depletion erfolgte die Erhitzung auf 95°C.

Verwendet wurden im Rahmen der Arbeit ein 8%-iges oder ein 10%-iges Trenngel. Zur Größenreferenz wurden 2 µl einer vorgefärbten Proteinleiter (SERVA) neben die Probe gegeben. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für 90-120 min.

4.6.3 Proteinanalyse mittels Western Blot

Für die Western-Blot-Analyse wurden die Proteine im Anschluss an die SDS-PAGE auf eine Nitrocellulose-Membran im Wet-Blot Verfahren transferiert (Towbin, Staehelin, & Gordon, 1979). Der Proteintransfer erfolgte für 90-120 min bei 100 V. Anschließend wurde die Membran für mindestens 30 min in Western Blot Blockierlösung inkubiert, um unspezifische Proteinbindestellen zu blockieren. Darauf folgte eine Inkubation mit dem primären Antikörper für 2 h bei RT oder bei 4°C o/n. Zur Ladungskontrolle wurde der primären Antikörper gegen α Tubulin (α Tub) verwendet. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit PBS, welches 0,1vol% Tween 20 enthält (PBS-T) für 15 min wurde der zweite fluoreszierende Antikörper auf die Membran gegeben. Diese waren an IRDye® 800CW oder 680RD (Licor) konjugiert. Nach einer Inkubation von 45-60 min bei RT im Dunkeln wurde dieser entfernt. Anschließend wurden die ungebundenen Reste des Antikörpers erneut mit PBS-T abgewaschen. Der Waschvorgang erfolgte dreimal. Zum Scannen der Membran wurde das Odyssey CLx Imaging

System (Licor) verwendet. Die Analyse des Western-Blot-Signals erfolgte mit der Software Image Studio™ Lite.

4.6.4 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation wurden kortikale Neuronen mit pCMV-eGFP-Ago2 und pSuperior-TagBFP-shNNTC sowie pSuperior-TagBFP-shStau2-2 transduziert und an DIV 4+5 in 500 µl Lysepuffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl₂, 0,5 mM EDTA und 0,4% NP40) lysiert und auf Eis für 15 min inkubiert. Dem Lysepuffer wurde außerdem ein Proteaseinhibitor (Roche) zugefügt. Nach 5 min Zentrifugieren bei 4°C wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß transferiert. 10% des Volumens wurden als Input/Kontrolle verwendet. *Beads* wurden mit PBS mehrfach gewaschen und anschließend 150-200 µl pro Probe zugegeben, um unspezifische Wechselwirkungen zwischen der Probe und den *beads* zu blockieren. Es erfolgte eine Inkubation für 1 h bei 4°C. Die Proben wurden anschließend bei 4°C für 5 min zentrifugiert. Im Pellet befanden sich die zugefügten *beads*. Mit dem Überstand erfolgte die Immunpräzipitation. Es wurden die *beads* mit anti-GFP-Nanobody der Probe zugeben. Nach Inkubation bei 4°C für 2 h sowie erneuter Zentrifugation erfolgte der Waschvorgang mit dem Waschpuffer (10 mM Tris, 150 mM NaCl₂ und 0,5 mM EDTA) für 3x 10 min bei 4°C (Rajgor et al., 2018). Zur Analyse der gebundenen Proteine wurde eine SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot durchgeführt.

4.7 RNA Methoden

Die im Folgenden erläuterten Methoden zur RNA Isolierung, Präzipitation, sowie Amplifikation dienen der Expressionsanalyse von Genen auf RNA Ebene.

4.7.1 RNA Isolierung und Präzipitation

Die RNA aus kortikalen Neuronen wurde mittels Trizol™ (Invitrogen) isoliert. Die in 6 cm Schalen gezüchteten Zellen wurden zunächst zweimal in vorgewärmten (37°C) HBSS gewaschen und anschließend in 1 ml Trizol™ lysiert. Nach Zugabe des Trizols™ wurden die Neuronen mit einem Zellschaber gelöst und für das weitere Vorgehen in RNase freie 2 ml

Tubes transferiert. Nach der Zugabe von 200 μl Chloroform isoamylalkohol pro 1 ml Trizol™ wurde die RNA gemäß Herstellerangaben isoliert.

Den RNA Proben wurden für die Präzipitation je 550 μl Isopropanol (100%), 10 μl Natriumacetat (pH 5,5), 0,5 μl Glycogen, 100 μl H₂O (RNase frei) und 300 μl Ethanol (100%) hinzugefügt. Nach Inkubation über Nacht bei -20°C wurden die Proben bei 4°C und 25.000 x g für 15 min zentrifugiert. Die RNA wurde mit 1 ml kaltem Ethanol (70%) gewaschen und anschließend in 15 μl RNase freiem H₂O gelöst. Nach Inkubation für 5 min bei 55°C wurde die RNA Konzentration mit Hilfe des Nanodrop Spektrophotometers (Thermo) gemessen.

4.7.2 cDNA Synthese

Zur Herstellung der komplementären DNA (cDNA) wurden 2 μg RNA verwendet. Die RNA wurde für 30 min bei 37°C in einem Gesamtvolumen von 9,5 μl , das 0,5 μl Ribolock RNase-Inhibitor (Thermo), 1 μl RNase-freie DNase I (Thermo) und 2 μl 10x DNase-Puffer mit MgCl₂ (Thermo) enthält, inkubiert. Nach der Inkubation wurde den Proben 1 μl 50 mM EDTA zugegeben und es erfolgte eine Inkubation bei 70°C für 15 min. Die Probe wurden geteilt und 5 μl wurden für die cDNA-Synthese und die andere Hälfte (5 μl) für die negative reverse Transkriptionskontrolle verwendet.

Die cDNA wurde somit auf Basis von einem Mikrogramm mit DNase behandelte RNA unter Verwendung von 0,5 μl Random-Primer N6 (Biolabs), 0,5 μl T20 Primer und 1 μl Superscript RT SS3 (Invitrogen), laut Anweisung der Firma, hergestellt. Hierfür wurde zuerst ein Mastermix mit den Primern (Tabelle 4.1) hergestellt, um Pipettierfehler zu minimieren.

Tabelle 4.1 Primer Mastermix für die cDNA Synthese

Substanz	Volumen
RNA	5 μl
Random Primer + T20 Primer (1:1)	1 μl
10 mM dNTPs	2 μl
H ₂ O (RNase frei)	5 μl

Nach Zugabe der Primer erfolgte eine Inkubation für 5 min bei 65°C und ein anschließendes Abkühlen der Proben auf Eis. Im Anschluss daran erfolgte die Zugabe des

zweiten Mastermix (Tabelle 4.2). Für jede Probe erfolgte die Herstellung einer Negativkontrolle, diese wurde wie die positiven Proben, unter Ausnahme der Zugabe der reversen Transkriptase, behandelt.

Tabelle 4.2 Mastermix 2 für die cDNA Synthese

Substanz	Volumen
5x First Strand buffer	4 µl
0,1M DTT	1 µl
H ₂ O (RNase frei)	Positivkontrolle: 1 µl Negativkontrolle: 2 µl
SS III Superscript RT	Positivkontrolle: 1 µl Negativkontrolle: 0 µl

Nach Zugabe des zweiten Mastermix wurden die Proben mit diesem für 5 min bei 35°C, für 60 min bei 50°C und für 15 min bei 70°C inkubiert. Die Lagerung der Proben bis zur Verwendung für die qPCR erfolgte bei -20°C.

4.7.3 Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der quantitativen Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wird die quantitative RNA Expression von spezifischen mRNAs bestimmt. Hierfür wurde die RNA durch reverse Transskription in cDNA umgeschrieben (vgl. 4.7.2 cDNA Synthese). Für die Durchführung der qPCR wurde die cDNA 1:50 in RNase freiem H₂O verdünnt und auf Eis gekühlt. Diese Verdünnung wurde für jede qPCR neu durchgeführt.

Die Primerpaare wurden 1:1 vermischt und von 2,5 - 7,5 µM in RNase freiem Wasser verdünnt und ebenfalls auf Eis gelagert. Es wurde ein SYBR® Green Mastermix (Tabelle 4.3) eigenständig hergestellt und auf Eis gelagert.

Tabelle 4.3 SYBR Green Mastermix

Substanzen	Volumen
10x Taq-Buffer (NEB)	200 µl
Betaine 5 M (Sigma)	400 µl
BSA 20 mg/ml (NEB)	20 µl
dNTPs 10 mM (NEB)	16 µl
RNase free H ₂ O (Sigma)	360 µl
SYBR-Green 1:100 in H ₂ O	4 µl

Ebenso wurde pro Primerpaar ein Primer Mastermix (Tabelle 4.4) vorbereitet. Die einzelnen Versuche enthielten jeweils eine Negativkontrolle. Hier wurde der RNA keine reverse Transkriptase zugefügt. Desweiteren erfolgte pro Primer eine Kontrolle nur mit H₂O. Somit wurde pro Loch (96 Mikrotiterplatte) ein Gesamtvolumen von 10 µl bestehend aus 7,5 µl SYBR® Green Mix, 2 µl Primer, 0,12 µl Hot Start Taq und 0,38 µl H₂O verwendet und anschließend 5 µl der cDNA-Verdünnung, H₂O oder der negativen reversen Transkriptionskontrolle transferiert. Während des gesamten Ablaufs wurde darauf geachtet, dass die Proben, welche SYBR® Green beinhielten, im Dunkeln gelagert wurden.

Tabelle 4.4 Primer Mastermix

Substanzen	Volumen
2x SYBR® Green master mix	7,50 µl
Hot Start Taq Pol. 5,000 U/mL (NEB)	0,12 µl
Primer (2,5 – 7,5µM)	2,00 µl
RNase free H ₂ O (Sigma)	0,38 µl

Um das gesamte befüllte Volumen am Boden der jeweiligen Kammer zu sammeln, wurde die 96 Mikrotiterplatte bei 1000 x *g* für 2 min zentrifugiert, nachdem sie zuvor versiegelt worden war. Die qPCR wurde in einer Light Cycler® 96 (Roche) durchgeführt. Die qPCR Zyklen liefen wie in Tabelle 4.5 dargestellt ab.

Tabelle 4.5 Ablauf der qPCR

Arbeitsschritte	Zyklen	Temperatur und Zeit
Preinkubation	1	95°C
Amplifikation	45	95°C für 15 sec 60°C für 15 sec 68°C für 20 sec
Schmelzvorgang	1	95°C für 10 sec 60°C für 60 sec 97°C für 1 sec
Abkühlung	1	37°C für 30 sec

Alle qPCR-Daten wurden unter Verwendung der relativen Quantifizierungsanalyse mit der Lightcycler-Software (Roche) ausgewertet. Für alle Versuche wurde Pp1a als Referenzgen verwendet. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 9.3 aufgeführt.

4.7.4 Primer Validierung

Zur Validierung der qPCR-Primer wurde eine qPCR mit einer cDNA Verdünnungsreihe durchgeführt. Dabei wurde mit einer Verdünnung 1:10 begonnen. Diese wurde anschließend kontinuierlich 1:5 verdünnt. Es erfolgten fünf Verdünnungsschritte. Der Primer Ago1 wurde in einer Verdünnung von 2,5 μ M, 5 μ M und 7,5 μ M getestet. Die qPCR wurde wie in 4.7.3 beschrieben durchgeführt. Die Primersequenzen und ihre Effizienz sind in Tabelle 9.3 aufgeführt.

4.8 Analyse und Statistik

Im letzten Abschnitt des *Material und Methoden* Kapitels wird auf die statistischen Auswertungen, insbesondere auf die angewendete Signifikanztestung Bezug genommen.

4.8.1 Signifikanzen

Um Unterschiede im Mittelwert von zwei Bedingungen auf Signifikanzen zu testen, wurde ein T-Test durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein gepaarter T-Test angewendet, sofern die Replikate der jeweiligen Konditionen einem biologischen Replikat zuzuordnen waren. War dies nicht möglich, erfolgte der T-Test ungepaart. Es wurde immer eine zweiseitige Zufallsverteilung gewählt. Für die Durchführung des T-Test wurde das Programm Microsoft Excel verwendet. Bei Versuchen, bei denen zwei oder weniger biologische Replikate ausgewertet wurden, wurde auf eine Signifikanzprüfung verzichtet.

Ein Signifikanzintervall von $p < 0,05$ wurde mit *, eines mit $p < 0,01$ mit ** und eines mit $p < 0,001$ mit *** in den Abbildungen markiert. Nicht signifikante Ergebnisse wurden mit n.s. markiert.

4.8.2 Diagrammerstellung und Abbildungen

Die Erstellung der Diagramme erfolgte mit GraphPad Prism. Dabei wurden die Daten in Microsoft Excel vorbereitet und in GraphPad Prism importiert. Die Abbildungen wurden mit Affinity Designer erstellt.

5 Ergebnisse

In diesem Kapitel sind die mit den vorgestellten Methoden erzielten Ergebnisse dargestellt. Diese sind anhand der Zielsetzung der Arbeit in folgende drei Abschnitte untergliedert: die Ago2 Phosphomutanten, die Ago2 und Stau2 Interaktion und den Einfluss der Stau2 und Ago Proteinexpression auf die neuronale Verzweigung.

5.1 Ago2 Phosphomutanten in hippocampalen Neuronen

5.1.1 Lokalisation von eGFP-Ago2 in Processing bodies in HEK 293T Zellen sowie hippocampalen Neuronen

Bislang wurde Ago2 sowohl in HEK 293T Zellen als auch in Neuronen überexprimiert (Höck & Meister, 2008; Lessel et al., 2020; Peters & Meister, 2007). Um mit vergleichbaren Ausgangswerten arbeiten zu können, wurde das verwendete pCMV-eGFP-Ago2 Konstrukt in den beiden Zellreihen mittels transienter Transfektion exprimiert. Hierfür wurden HEK 293T Zellen und primäre hippocampale Neurone von Ratten mit dem GFP markierten Ago2 transfiziert. Die Neurone wurden an DIV 14 mit eGFP-Ago2 transfiziert und nach 16-20h fixiert. Die HEK 293T Zellen wurden ausplattiert, nach 24 h mit eGFP-Ago2 transfiziert und nach 16-20 h fixiert.

Lichtmikroskopische Aufnahmen der transfizierten HEK 293T Zellen und Neurone sind jeweils exemplarisch dargestellt (Abbildung 5-1). In der Phasenkontrastaufnahme sind Ausschnitte der jeweiligen Zellkultur ohne Färbung zu erkennen. Herausgestellt werden zum Vergleich zwei biologische Replikate. In der Phasenkontrastaufnahme des biologischen Replikates eins und zwei für HEK 293T Zellen sind mehrere Zellen nebeneinander zuerkennen. Das Gleiche gilt für die Phasenkontrastaufnahme des ersten biologischen Replikates der hippocampalen Neurone. Neben den Phasenkontrastbildern ist eine Fluoreszenzaufnahme des gleichen Ausschnittes zu sehen, um eGFP sichtbar zu machen. Hier sind nur die mit pCMV-eGFP-Ago2 transfizierten Zellen zu sehen. Zur Verdeutlichung werden die Aufnahmen in schwarz/weiß dargestellt und invertiert, so dass GFP dunkel erscheint.

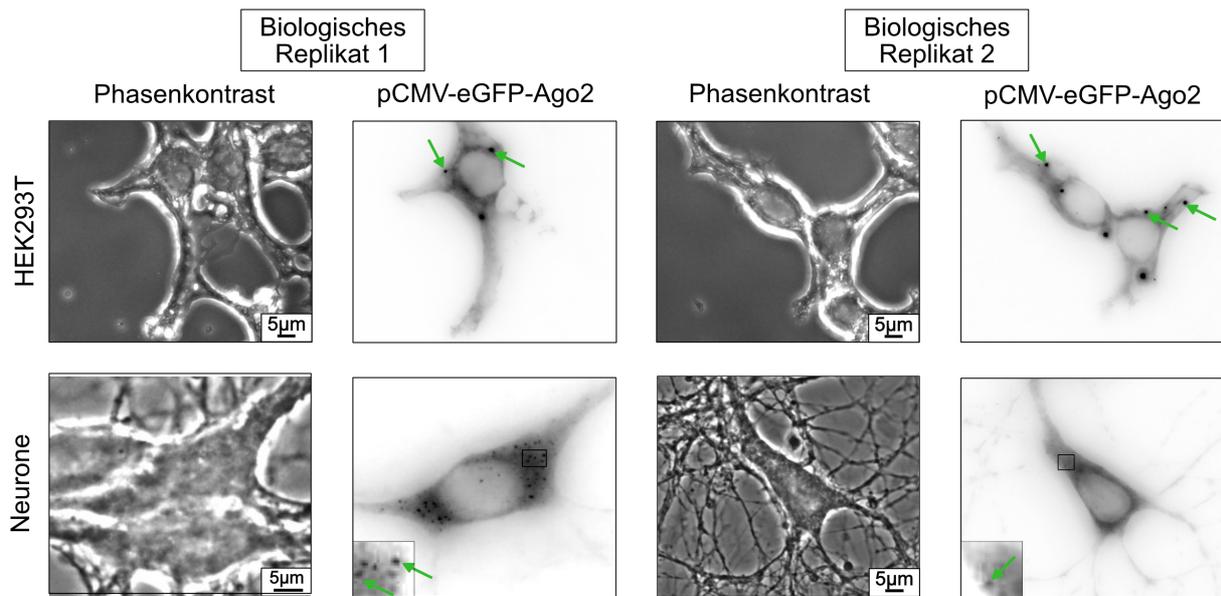


Abbildung 5-1 Lichtmikroskopische Aufnahmen von transfizierten HEK 293T Zellen und Neuronen

Exemplarische Darstellung von hippocampalen Neuronen und HEK 293T Zellen. Grüne Pfeile indizieren Orte, an denen eGFP-Ago2 vermehrt lokalisiert und sich eGFP-Ago2 Partikel bilden. Zur Verdeutlichung wurde bei den Neuronen jeweils eine Vergrößerung (unten links) mit dargestellt. Maßstabsleiste 5 µm.

EGFP-Ago2 liegt in Partikeln im Zytoplasma vor (beispielhaft hervorgehoben durch die grünen Pfeile), wobei der Zellkern ausgespart ist. Neben der Lokalisation von eGFP-Ago2 in Partikeln ist auch eine diffuse, also nicht partikuläre, Ago2 Proteinlokalisierung erkennbar (Abbildung 5-1 A Neurone; Biologisches Replikat 2). Um die Proteinverteilung von eGFP-Ago2 in der Zelle auswerten zu können, wurden eGFP-Ago2 Partikel pro Zelle manuell gezählt. Die Anzahl an Partikeln pro Zelle sowohl in HEK 293T Zellen als auch in hippocampalen Neuronen wurde anhand ihrer relativen Verteilung aufgetragen (Abbildung 5-2). Hervorzuheben ist, dass dabei kumulativ 50% der hippocampalen Neurone zwischen 20 und 79 Partikel haben. 27% zeigen weniger als 20 Partikel pro Zelle und rund 22% haben mindestens 80 Partikel pro Zelle (Abbildung 5-2 B). Die generelle Anzahl an eGFP-Ago2 Teilchen ist bei HEK293T Zellen deutlich geringer. Die meisten Zellen (rund 23%) haben fünf eGFP-Ago2 Partikeln (Abbildung 5-2 A). Die Auswertung zeigt, dass pCMV-eGFP-Ago2 sowohl in hippocampalen Neuronen als auch in HEK 293T Zellen, entsprechend der Literatur (Cougot et al., 2008; Oh et al., 2013; Zeitelhofer et al., 2008), partikulär im Zytoplasma lokalisiert.

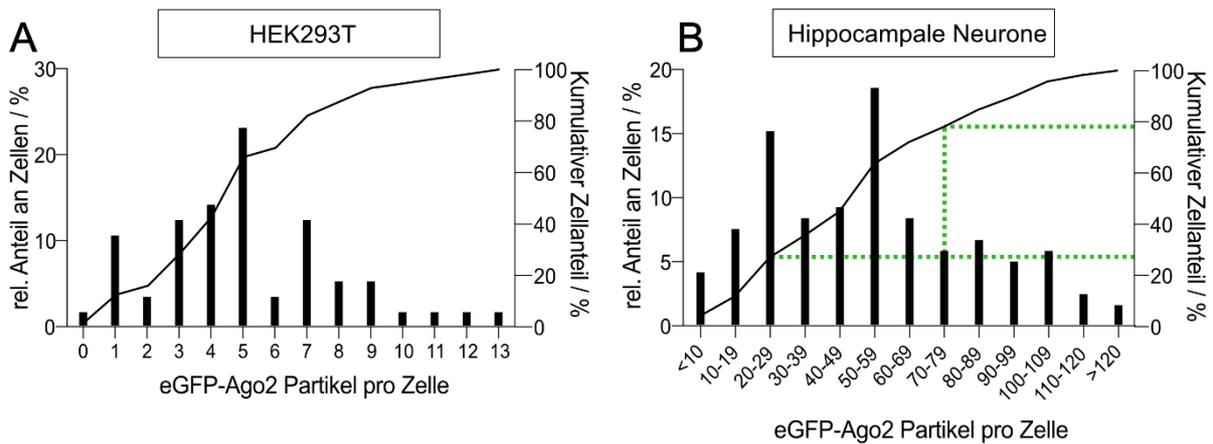


Abbildung 5-2 Partikuläre Lokalisation von eGFP-Ago2 in HEK 293T Zellen und hippocampalen Neuronen

A. Dargestellt ist die rel. Häufigkeitsverteilung der Anzahl an eGFP-Ago2 Partikel pro Zelle in HEK 293T Zellen (linke y-Achse). Die rechte y-Achse zeigt die kumulative Häufigkeit über der Anzahl an eGFP-Ago2 Partikel pro Zelle. Ausgewertet wurden 56 Zellen aus zwei biologischen Replikaten. **B.** Dargestellt ist die rel. Häufigkeitsverteilung der Anzahl an eGFP-Ago2 Partikel pro Zelle in hippocampalen Neuronen an der linken y-Achse. Die rechte y-Achse zeigt die kumulative Häufigkeit über der Anzahl an eGFP-Ago2 Partikel pro Zelle. Zur Verdeutlichung wurde ein ausgewähltes Intervall, in welchem kumulativ 50% der Neurone liegen, mit gestrichelten Linien in grün hervorgehoben. Ausgewertet wurden 118 Zellen aus fünf biologischen Replikaten.

Die Identifizierung der eGFP-Ago2 Partikel als Bestandteil von P-bodies erfolgte mittels Immunfärbung gegen die etablierten P-body Marker Dcp1a (Ingelfinger, Arndt-Jovin, Luhrmann, & Achsel, 2002; Liu et al., 2005) und RCK (DDX6) (Andrei et al., 2005) und gleichzeitiger Expression von eGFP-Ago2. Hippocampale Neurone wurden mit eGFP-Ago2 transfiziert und nach Fixierung Dcp1a mit Cyanin Farbstoff Cy5 (in der Abb. lila) oder RCK mit Cy3 (in der Abb. rot) angefärbt (Abbildung 5-3 A). Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ermöglichen eine Auswertung der Kolo-kalisation von eGFP-Ago2 mit Dcp1a bzw. RCK. In der Kombinationsansicht zeigen sich Dcp1a und eGFP-Ago2 positive Partikel durch Farbüberlappung als weiße und RCK und eGFP-Ago2 positive Partikel als gelbe Punkte (Abbildung 5-3 A letzte Spalte). In beiden Konditionen ist die Lokalisation von eGFP-Ago2 in Partikeln zu sehen. Auch die P-body Marker zeigen eine partikuläre zytoplasmatische Lokalisation in der Zelle mit Aussparung des Zellkerns.

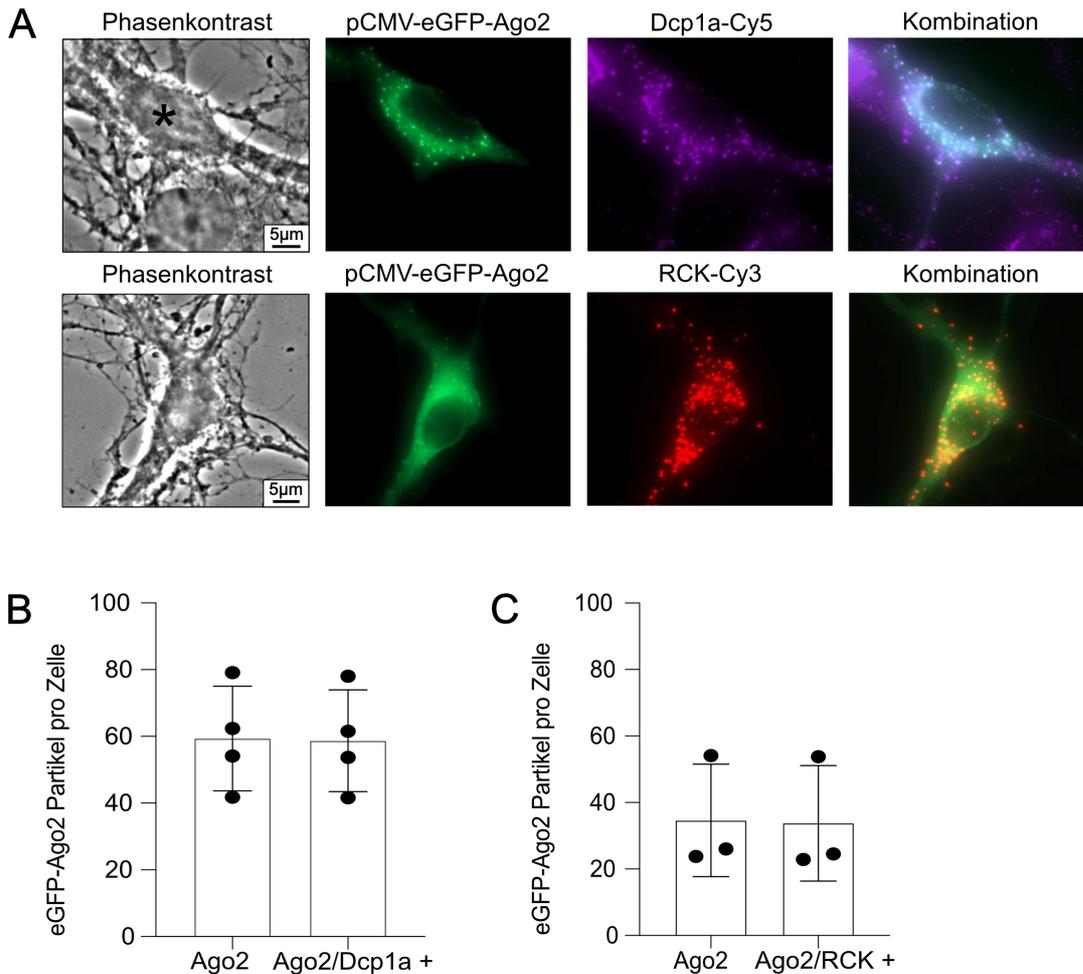


Abbildung 5-3 Kolokalisation von eGFP-Ago2 mit den P-body Markern RCK und Dcp1a

A. Beispielhafte Veranschaulichung der Kolokalisation von eGFP-Ago2 mit P-body Markern Dcp1a und RCK. Hippocampale Neurone wurden mit eGFP-Ago2 transfiziert. Zur Darstellung der P-body Marker wurden Antikörper gegen Dcp1a und RCK verwendet. In der oberen Reihe ist die Kolokalisation von eGFP-Ago2 mit Dcp1a dargestellt. Die untere Reihe veranschaulicht die Kolokalisation mit RCK. In der Zusammenfassung erscheinen eGFP-Ago2 und Dcp1a positive Partikel weiß bzw. eGFP-Ago2 und RCK positive Partikel gelb. Maßstabsleiste 5 μm . **B.** - **C.** Hohe Kolokalisation zwischen eGFP-Ago2 und Dcp1a bzw. RCK in hippocampalen Neuronen. Ausgewertet wurden alle eGFP-Ago2 Partikel pro Zelle und die eGFP-Ago2 Partikel, die zugleich entweder Dcp1a oder RCK positiv (+) sind. Bei Dcp1a wurden vier biologische Replikate ausgewertet mit insgesamt 81 Zellen, bei RCK drei biologische Replikate mit insgesamt 49 Zellen.

Die Kombinationsansicht von eGFP-Ago2 und Dcp1a zeigt eine deutliche Überlappung der beiden Partikel, wobei zu sehen ist, dass endogenes Dcp1a durch die Immunfärbung in jeder Zelle sichtbar gemacht wurde, während eGFP nur in den erfolgreich transfizierten Zellen exprimiert wird. Neben dem mit Stern markierten Neuron, in dem die Kolokalisation ausgewertet werden konnte, ist im Cy5 Kanal und im Phasenkontrast eine weitere Zelle zu

sehen (Abbildung 5-3 A obere reihe), welche allerdings nicht mit eGFP-Ago2 transfiziert ist. Die endogenen RCK Partikel erscheinen im Vergleich zu Dcp1a und eGFP-Ago2 teilweise größer und mit weniger diffusem Hintergrund. Aber auch hier ist eine deutliche Kolokalisation mit eGFP markiertem Ago2 durch die Farbüberlappung wie auch einer Darstellung der Partikel in Gelb zu sehen (Abbildung 5-3 A untere Reihe).

Für die statische Auswertung wurden vorweg eGFP-Ago2 Partikel pro Zelle gezählt, um anschließend diejenigen eGFP-Ago2 Partikel zu zählen, die gleichzeitig Dcp1a positiv sind (Ago2/Dcp1a +) (Abbildung 5-3 B). Das gleiche wurde auch für den zweiten P-body Marker RCK durchgeführt (Abbildung 5-3 C). Mit beiden P-body Markern zeigt eGFP-Ago2 nahezu vollständige Kolokalisation. Von allen gezählten Ago2 Partikeln sind über 98,9% auch Dcp1a positiv. EGFP-Ago2 und RCK positiv sind rund 97% der ausgewerteten Partikeln. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die gesehenen Partikel eine Anreicherung von überexprimierten Ago2 in P-bodies darstellen.

5.1.2 Veränderte Ago2 Proteinlokalisierung in primären hippocampalen Neuronen nach Phosphorylierung

Um zu untersuchen, inwieweit die posttranslationale Modifikation, v.a. die Phosphorylierung, von Ago2 einen Einfluss auf die Proteinlokalisierung und damit eventuell auch auf die Funktion von Ago2 in hippocampalen Neuronen hat, wurden bereits identifizierte Ago2 Mutanten transfiziert. Bekannt ist, dass eine Phosphorylierung von Ago2 im Cluster S/T 824:34 durch die negative Polarisierung zu einer abstoßenden Kraft zwischen der negativen mRNA und Ago2 führt. Eine Verminderung der Bindungseffektivität ist die Folge (R. J. Golden et al., 2017; Quevillon Huberdeau et al., 2017). Die Ago2 S/T824:34A Mutante simuliert nicht phosphoryliertes Ago2, im Gegensatz dazu imitiert Ago2 S/T824:34E phosphoryliertes Ago2. Als Kontrolle diente hierbei eine Ago2 Mutante, von der bekannt ist, dass Ago2 durch Mutation in der PIWI Domäne nicht mehr an TNRC6 binden kann und damit keine Anreicherung von Ago2 in P-bodies erfolgt, Ago2 A620WL694W (Quevillon Huberdeau et al., 2017). Die vorgestellten Mutanten, ebenso wie eGFP-Ago2 wt wurden in hippocampalen Neurone an DIV 14 und HEK 293T Zellen mittels Calcium-Phosphat Präzipitation transfiziert. Fixiert wurden die Zellen nach 16 h Expression und anschließend erfolgte die

Fluoreszenzmikroskopie sowie die statistische Auswertung der beobachteten Ergebnisse (Abbildung 5-4).

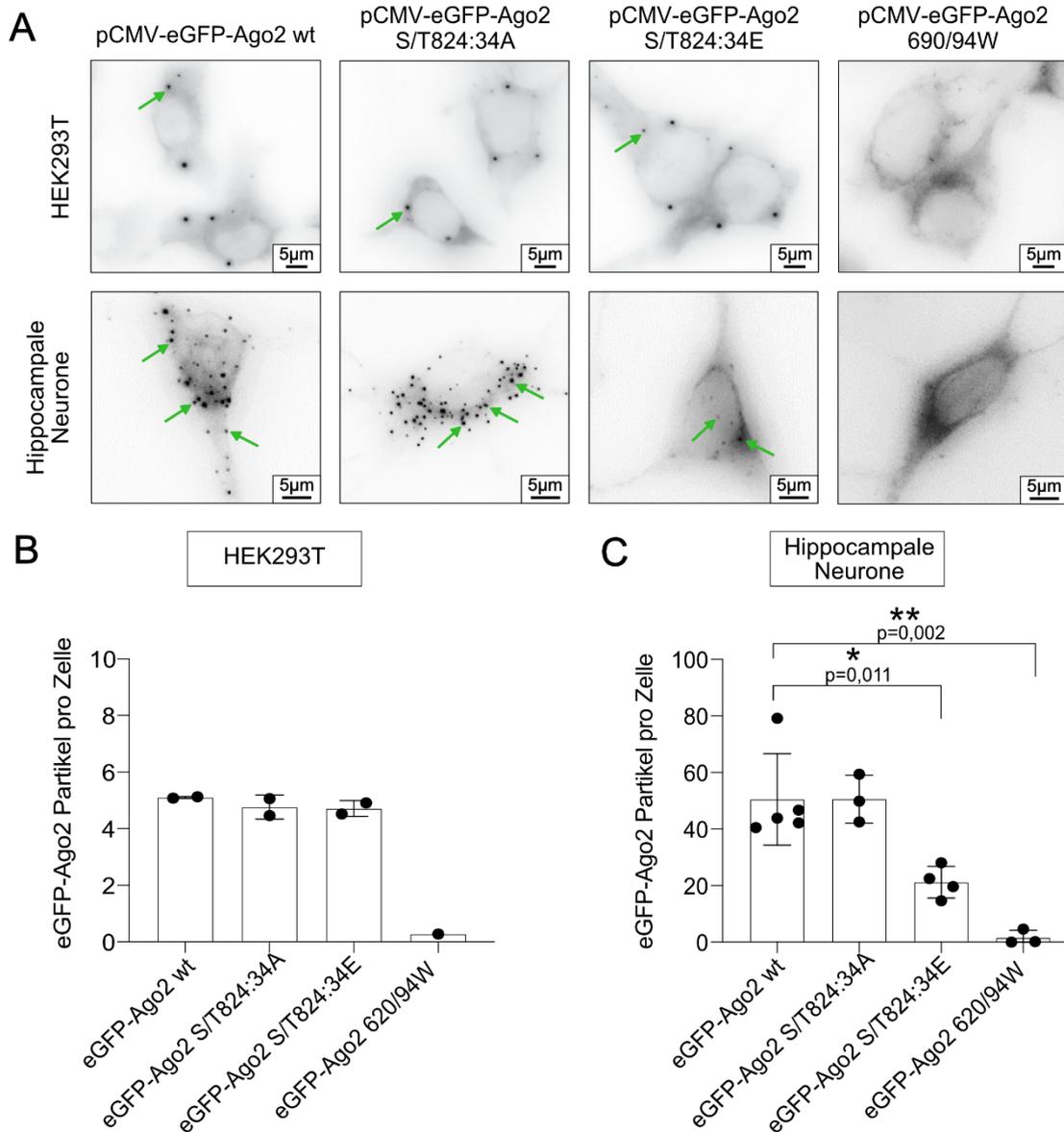


Abbildung 5-4 Unterschiedliche Lokalisation der eGFP-Ago2 Phosphomutanten in Neuronen

A. Exemplarische Darstellung der eGFP-Ago2 Phosphomutanten in HEK 293T und hippocampalen Neuronen. eGFP-Ago2 wt, S/T824:34A, S/T824:34E und A690W/L94W wurden in hippocampalen Neuronen (DIV 14) sowie in HEK 293T transfiziert. Fixiert wurden die Zellen nach 16 h Expression. Die grünen Pfeile heben eGFP-Ago2 Partikel hervor. Maßstabsleiste 5 μ m **B.** Auswertung der eGFP-Ago2 Partikel pro Zelle in HEK 293T. Ausgewertet wurden bei eGFP-Ago2 wt und S/T824:34A/E jeweils zwei biologische Replikate mit insgesamt 56-63 Zellen. **C.** Auswertung der eGFP-Ago2 Partikel pro Zelle in hippocampalen Neuronen. Dargestellt sind bei eGFP-Ago2 wt fünf biologische Replikate mit insgesamt 86 Zellen; bei eGFP-Ago2 S/T824:34A und eGFP-Ago2 620/94W drei biologische Replikate mit insgesamt 32 bzw. 38 Zellen. Bei eGFP-Ago2 S/T824:34E wurden 4 biologische Replikate mit insgesamt 52 Zellen ausgewertet. Zur Signifikanzprüfung wurde ein ungepaarter T-Test über die Mittelwerte der biologischen Replikate durchgeführt. Als Signifikanzintervalle wurden *p < 0,05; **p < 0,01 und ***p < 0,001 verwendet.

Die Phosphomutanten in HEK 293T Zellen zeigen eine dem Wildtyp (wt) ähnliche Verteilung in den Zellen. Alle drei Mutanten sind in HEK 293T Zellen in P-bodies angereichert (Abbildung 5-4 A; obere Reihe). Dargestellt ist eine Fluoreszenzaufnahme von HEK 293T Zellen mit transfizierten eGFP-Ago2, wobei zur besseren Darstellung die Bilder invertiert wurden. Es sind deutliche Partikel (indiziert mit den grünen Pfeilen) in der wt und 824:34A/E Kondition zusehen. Nur eGFP-Ago2 A620WL694W zeigt keine Partikel, sondern ausschließlich diffuse Lokalisation. Im Gegensatz dazu ist interessanterweise in primären hippocampalen Neuronen eine veränderte Lokalisation von eGFP-Ago2 in Abhängigkeit von der Phosphorylierung im Cluster S/T824:34 zu sehen (Abbildung 5-4 A; untere Reihe). Während eGFP-Ago2 S/T824:34A ebenso wie der wt in P-bodies lokalisiert, zeigt die eGFP-Ago2 824:34E Mutante ein diffuseres Erscheinungsbild. Weiterhin sind eGFP-Partikel zu sehen, aber im Vergleich zum wt und Ago2 S/T824:34A ist eine deutliche Reduktion der Anreicherung in P-bodies zu beobachten. Zur Auswertung wurden die eGFP-Ago2 Partikel pro Zelle für den eGFP-Ago2 wt, die eGFP-Ago2 S/T824:34A und eGFP-Ago2S/T824:34E Mutante, sowie für die Kontrollmutante, eGFP-Ago2 A620WL694W, gezählt. In HEK 293T Zellen zeigen sich dabei für die Phosphomutanten eine nahezu gleiche Anzahl wie für wt Ago2. Nur die als Kontrolle dienende Ago2 Mutante zeigt keine Lokalisation in P-bodies (Abbildung 5-4 B). Dem Gegenüber zu stellen ist die Anreicherung von eGFP-Ago2 in P-bodies abhängig von der Phosphorylierung in hippocampalen Neuronen. Hier zeigt sich für die eGFP-Ago2 S/T824:34A Mutante eine dem wt gleiche Partikelanzahl, während eGFP-Ago2 S/T824:34E signifikant weniger in P-bodies angereichert ist. Die Zahl der Partikel pro Zelle ist herabgesetzt. Wie in den HEK 293T Zellen, lokalisiert auch in Neuronen das zur Kontrolle verwendete eGFP-Ago2 A620WL694W nicht in P-bodies (Abbildung 5-4 C). Dies deutet darauf hin, dass die Phosphorylierung im Cluster S/T824:34 die Assemblierung von Ago2 in RNPs in hippocampalen Neuronen reguliert, während in HEK 293T Zellen die Phosphorylierung in diesem Cluster, in Bezug auf die Ago2 Lokalisation, nur eine untergeordnete Rolle spielt.

Um zu überprüfen, ob der Phosphorylierungseinfluss auf die Ago2 Lokalisation charakteristisch für das Protein selbst ist oder ob auch andere P-body-assoziierte Proteine betroffen sind, wurden in hippocampalen Neuronen eGFP-Ago2-WT, eGFP-Ago2 S/T824:34A, eGFP-Ago2 S/T824:34E und eGFP-Ago2 A620WL694W für 16 h überexprimiert. Es erfolgte mittels Immunfärbung anschließend die Detektion von Dcp1a, welches häufig als Marker für die Analyse zellulärer P-bodies verwendet wird (Lykke-Andersen, 2002; R. Parker & Sheth,

2007). Die mikroskopischen Aufnahmen, sowie die Analyse der Experimente sind in Abbildung 5-5 dargestellt.

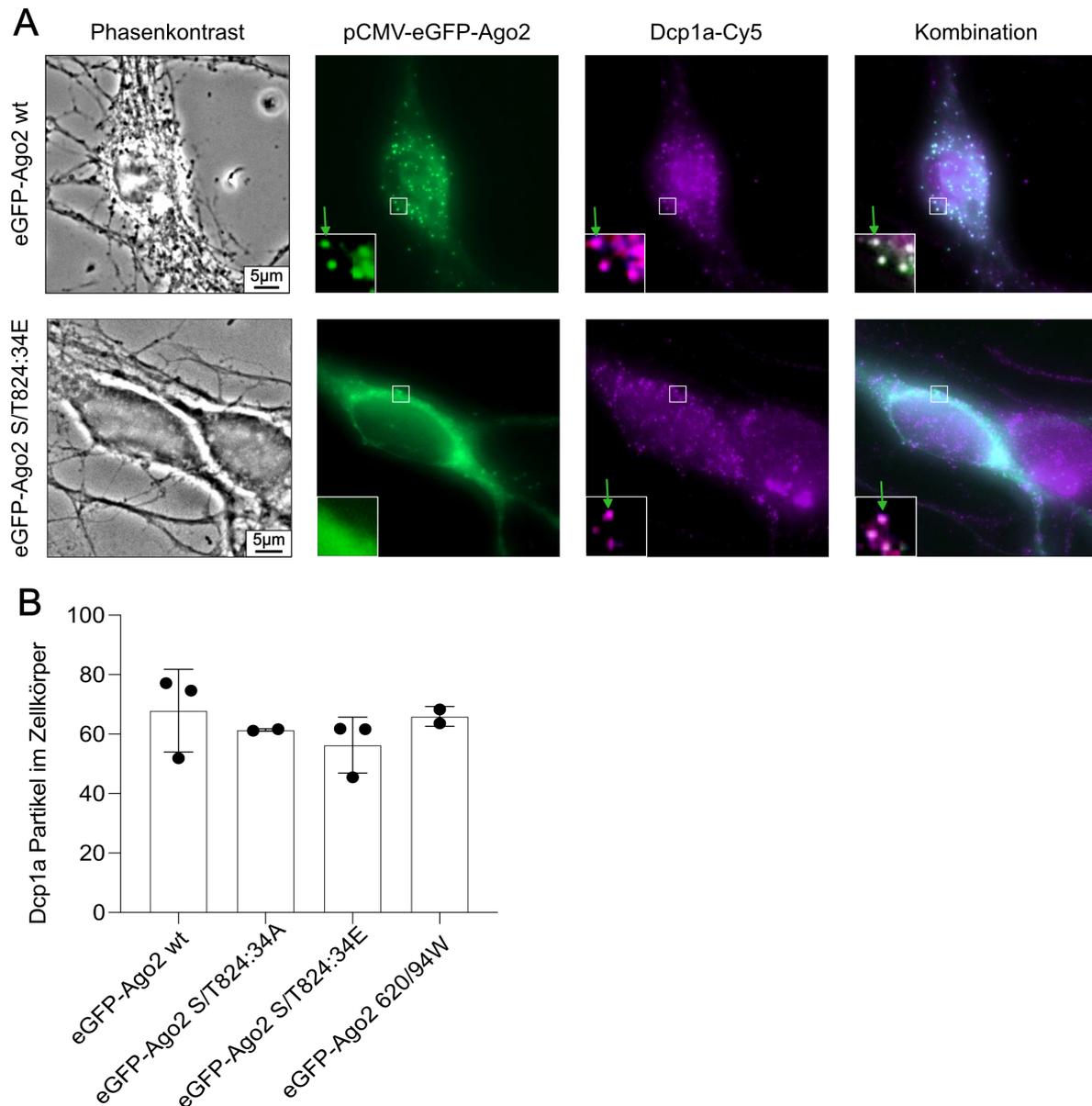


Abbildung 5-5 EGFP-Ago2 unabhängige Lokalisation des P-body Markers Dcp1a

A. Beispielhafte Darstellung der Dcp1a Lokalisation in transfizierten hippocampale Neuronen. In der ersten Reihe ist exemplarisch ein Neuron dargestellt, welches mit eGFP-Ago2 wt transfiziert wurde. Die zweite Reihe veranschaulicht ein Neuron, welches mit eGFP-Ago2 S/T824:34E transfiziert wurde. Die Neuronen wurden an DIV 14 transfiziert und nach 16 h Expression fixiert. Endogenes Dcp1a wurde mit einem Antikörper gegen Dcp1a sichtbar gemacht. Die grünen Pfeile heben eGFP-Ago2 Partikel und Dcp1a Partikel hervor. Maßstabsleiste 5 µm. **B.** Auswertung der totalen Dcp1a Partikel pro Zelle nach Transfektion der eGFP-Ago2 Phosphomutanten und 620/94W Mutante. Gezählt wurden Dcp1a Partikel im Zellkörper. Analysiert wurden zwei bzw. drei biologische Replikate.

Sowohl in der Kontrolle mit eGFP-Ago2 wt als auch mit Überexpression von eGFP-Ago2 S/T824:34E ist die typische Lokalisation von Dcp1a in P-bodies zu sehen (Abbildung 5-5 A). Dabei ist nochmals hervorzuheben, dass eGFP-Ago2 und Dcp1a kolokalisieren (Abbildung 5-5 A obere Reihe grüne Pfeile). Da eGFP-Ago2 S/T824:34E eine verminderte Lokalisation in P-bodies zeigt (vgl. Abbildung 5-4), sind hier keine deutlichen eGFP-Partikel zu sehen, während Dcp1a weiterhin in RNPs lokalisiert (Abbildung 5-5 A untere Reihe). Dcp1a lokalisiert unabhängig von der Überexpression der eGFP-Ago2 Phosphomutanten in P-bodies, was die Auszählung der Dcp1a Partikel im Zellkörper zeigt (Abbildung 5-5 B). Zusammenfassend implizieren die Ergebnisse, dass die Phosphorylierung im S/T824:34 Cluster spezifisch Einfluss auf die eGFP-Ago2 Lokalisation in hippocampalen Neuronen hat, während die P-body Assemblierung davon unbeeinflusst ist.

5.1.3 Vermehrte Lokalisation von Ago2 in P-bodies durch neuronale Inhibierung

Wie berichtet wurde, hat Stimulation des NMDA Rezeptors Einfluss auf die Phosphorylierung von Ago2 und auch auf die Interaktion von Ago2 mit TNRC6. Gezeigt wurde dies für die Phosphorylierung an S387 (Paradis-Isler & Boehm, 2018; Rajgor et al., 2018). Um zu prüfen, ob die phosphorylierungsabhängige Lokalisation von eGFP-Ago2 in hippocampalen Neuronen von NMDA bzw. Inhibierung der neuronalen Aktivität abhängig ist, wurde ein initiales Experiment dazu initiiert. Hierfür wurden transfizierte Neurone folgendermaßen aufbereitet: Nach 16-stündiger Expression der Ago2 Fusionsproteine erfolgte eine Behandlung der Neurone. Insgesamt wurden dabei vier verschiedene Konditionen getestet: die Kontrollkondition mit DMSO, die neuronale Inhibierung, die Erholungskondition und die Aktivierung mit NMDA. Für die Inhibierung der neuronalen Aktivität wurden AMPA Rezeptoren, NMDA Rezeptoren und Na²⁺ Kanäle blockiert (verwendet wurden CNQX - kompetitiver AMPA Rezeptorantagonist, AP5 - selektiver NMDA Rezeptorantagonist und TTX – Blockierung spannungsabhängiger Na²⁺ Kanäle). Für die neuronale Inhibierungskondition wurden die Neurone nach vierstündiger Inkubation mit CNQX, AP5 und TTX fixiert.

Um sich von der Inhibierung zu erholen, wurde den Zellen der Erholungskondition nach der Inhibierungsbehandlung für 15 min frisches Medium hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Fixierung in 4% PFA. Die Aktivierung der Neurone erfolgte mittels NMDA und stellt die

letzte Kondition dar. Abermals wurden erst die Zellaktivität für vier Stunden inhibiert, um anschließend den primären Neuronen frisches Medium mit NMDA zuzugeben und diese so zu aktivieren. Als Kontrolle diente die Behandlung mit DMSO für vier Stunden.

Die Aufbereitung der Zellen ist übersichtshalber in Abbildung 5-6 A dargestellt. Es wurden für dieses Experiment an DIV 14 transfizierten hippocampalen Neuronen verwendet.

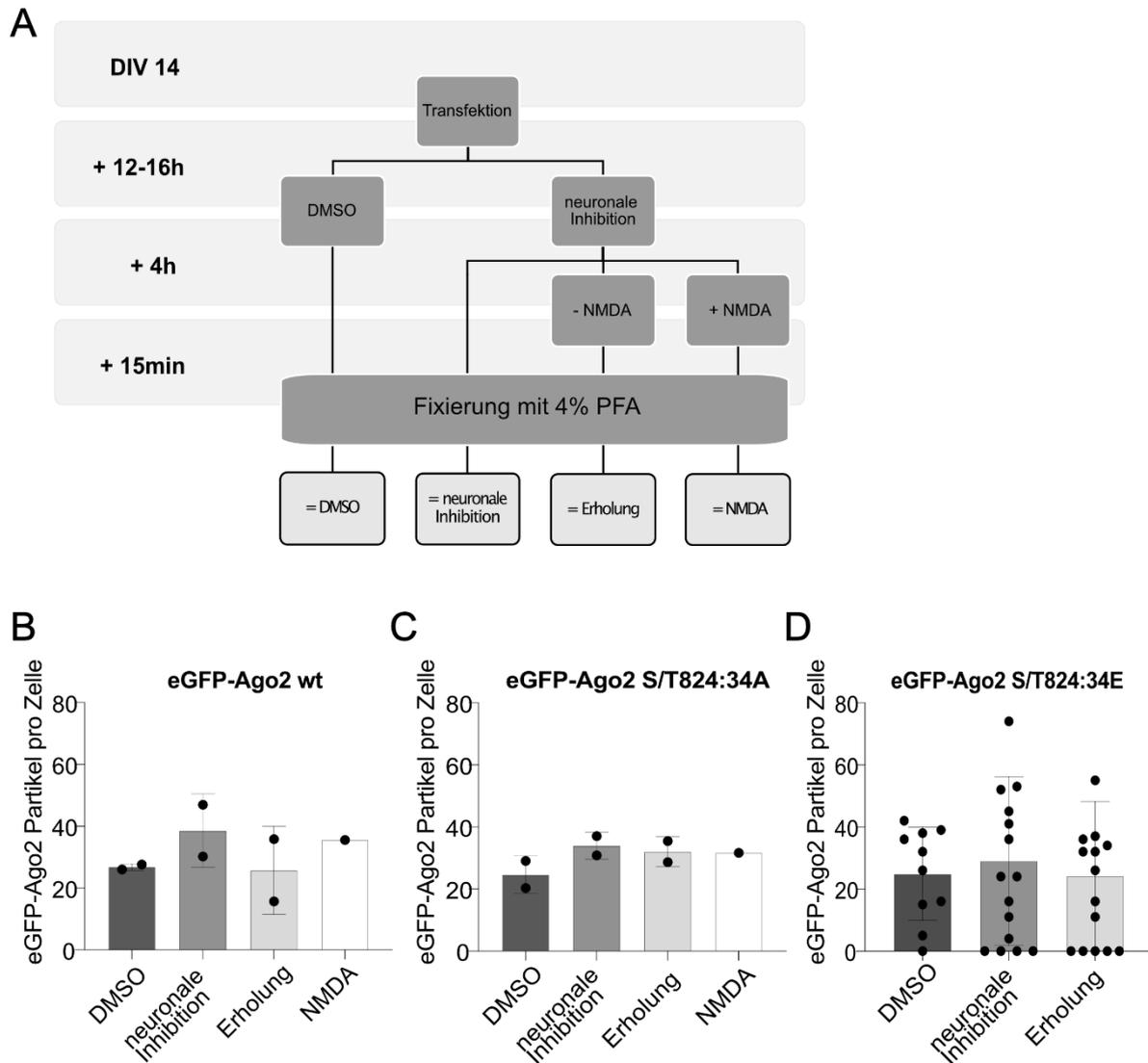


Abbildung 5-6 Inhibierung der neuronalen Aktivität führt zu einer Anreicherung von eGFP-Ago2 in P-bodies

A. Schematische Darstellung der experimentellen Durchführung. **B. - D.** Analyse der eGFP-Ago2 Partikel pro Zelle. Hippocampale Neuronen wurden an DIV 14 mit eGFP-Ago2 wt und eGFP-Ago2 S/T824:34A/E transfiziert und nach 12-16 h nach dem in (A) gezeigten Schema weiter behandelt. Ausgewertet wurden bei eGFP-Ago2 wt und eGFP-Ago2 S/T824:34A jeweils 2 biologische Replikate. Bei der Kondition eGFP-Ago2 S/T824:34E wurde ein biologisches Replikate ausgewertet, dabei ist in der Auswertung die Verteilung der einzelnen Zellen dargestellt.

Um einen Einblick zu bekommen, ob die Aktivität der Neurone einen Einfluss auf die eGFP-Ago2 Proteinlokalisierung hat, wurden eGFP-Ago2 Partikel gezählt (Abbildung 5-6 B - D).

Die Auswertung zweier biologisch unabhängiger Replikate zeigt, dass eGFP-Ago2 wt sich durch neuronale Inhibierung vermehrt in P-bodies anreichert verglichen mit der DMSO Kontrolle. Dieser Effekt lässt sich durch Erholung der Zellen rückgängig machen. Dabei verringerten sich die eGFP-Ago2 Partikel von durchschnittlich 39 (in der Inhibierungskondition), auf im Schnitt 26 Partikel pro Zelle in der Erholungskondition (vgl. 27 Partikel pro Zelle in der Kontrolle). Hingegen zeigt die NMDA Kondition wieder eine vermehrte Lokalisation von eGFP-Ago2 wt zu P-bodies. Hierfür ist allerdings zu beachten, dass lediglich ein Replikat analysiert wurde (Abbildung 5-6 B).

Um zu evaluieren, ob NMDA bzw. Aktivitätsinhibierung Einfluss auf die Phosphorylierung von Ago2 bei S/T824:34 hat, wurden auch eGFP-Ago2 S/T824:34A/E transfizierte Neuronen nach Aktivitätsbehandlung hinsichtlich eGFP-Ago2 Lokalisation analysiert (Abbildung 5-6 C - D). Bei eGFP-Ago2 824:34A ist, wie beim wt, eine Erhöhung der Anzahl an eGFP-Partikeln von im Schnitt 25 auf 34 Partikel pro Zelle zu sehen (Abbildung 5-6 C). Einen ähnlichen Effekt sieht man auch bei eGFP-Ago2 824:34E, allerdings wurde hier nur ein Replikat ausgewertet (Abbildung 5-6 D). Auffällig ist, dass die Erholung der mit eGFP-Ago2 824:34A transfizierten Zellen, nicht, wie beim wt, eine Rückkehr der Lokalisation bewirkt (vgl. 34 Partikel pro Zelle bei neuronaler Inhibierung und 32 Partikel pro Zelle nach Erholung mit frischem Medium). eGFP-Ago2 S/T824:34A lokalisiert weiterhin vermehrt in P-bodies (Abbildung 5-6 C). Dieser für eGFP-Ago2 S/T824:34A zu beobachtende Effekt ließ sich bei eGFP-Ago2 824:34E nicht nachweisen (Abbildung 5-6 D). Zusammenfassend erweckt es den Eindruck, als würde die Inhibierung der neuronalen Aktivität zu einer vermehrten Lokalisation von eGFP-Ago2 in P-bodies, unabhängig vom S/T824:34 Phosphorylierungscluster, führen. Dieser Effekt kann durch Erholung der Zellen für eGFP-Ago2 wt und eGFP-Ago2 S/T824:34E rückgängig gemacht werden. Im Gegensatz dazu lokalisiert eGFP-Ago2 S/T824:34A auch nach Erholung der Neurone weiterhin vermehrt zu P-bodies. Zur Validierung, inwieweit dieser Effekt auf eine verstärkte Bindung der mRNA durch unphosphoryliertes Ago2 beruht, bedarf es weiterer Experimente. Auf eine Signifikanzprüfung wurde in diesem Experiment verzichtet, da es sich um ein initiales Experiment handelte und zur Signifikanzprüfung weitere Replikate notwendig sind.

5.2 Stau2 Interaktion mit Ago2

Es wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung von Ago2 in hippocampalen Neuronen in dem Cluster S/T824:34 einen Einfluss auf die Ago2 Proteinlokalisierung hat. Die Lokalisation von Ago2 in P-bodies und das Vorhandensein von Enzymen, die am mRNA-Abbau beteiligt sind, zeigt eine Assoziation mit mRNA Degradierung innerhalb von P-bodies (Eulalio, Behm-Ansmant, & Izaurralde, 2007; Liu et al., 2005). Ziel-mRNAs werden abgebaut und stehen somit nicht zur Translation zur Verfügung. Der Effekt der phosphorylierungsabhängigen Lokalisationsänderung von Ago2 ist spezifisch für hippocampale Neurone (vgl. Abbildung 5-4). Stau2 ist ein in Neuronen gut exprimiertes dsRBP. Es ist bereits beschrieben worden, dass Stau2 Einfluss auf die Stabilität von mRNAs hat. Eine Reduktion der Stau2 Expression führt dabei zu einer verminderten Stabilität der Ziel-mRNAs, wie bereits gezeigt werden konnte (Mikl et al., 2011). Ebenfalls beschrieben wurde, dass Stau2 mit verschiedenen anderen RBPs interagiert (Fritzsche et al., 2013). Inwieweit Stau2 mit Ago2 interagiert, ist eine interessante Fragestellung. Es könnte ein indirekter Einfluss von Stau2 auf die RISC Maschinerie und damit auf die Degradation von Ziel-mRNAs bestehen. Im folgenden Projekt wurde untersucht, ob und wie Stau2 und Ago2 sich gegenseitig beeinflussen.

5.2.1 Reduktion der Stau2 Expression nach Transduktion und Transfektion einer shRNA gegen Stau2

Um die Reduktion der Stau2 Expression zu validieren, wurden kortikale Neurone an DIV 9 mit einer shRNA, die kein Zielgen hat (shNTC – engl. *not targeting control*; shKontrolle) oder shStau2 transduziert und nach 5 Tagen lysiert. Abschließend erfolgte eine Analyse der Stau2 Proteinexpression mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot. Dabei kann eine deutliche Reduktion der Stau2 Proteinexpression nachgewiesen werden (Abbildung 5-7 A). Eine Abnahme des Stau2 Proteinsignals um 98% konnte in zwei unabhängigen biologischen Replikaten erreicht werden, welche schon in der Blot-Aufnahme deutlich ersichtlich ist.

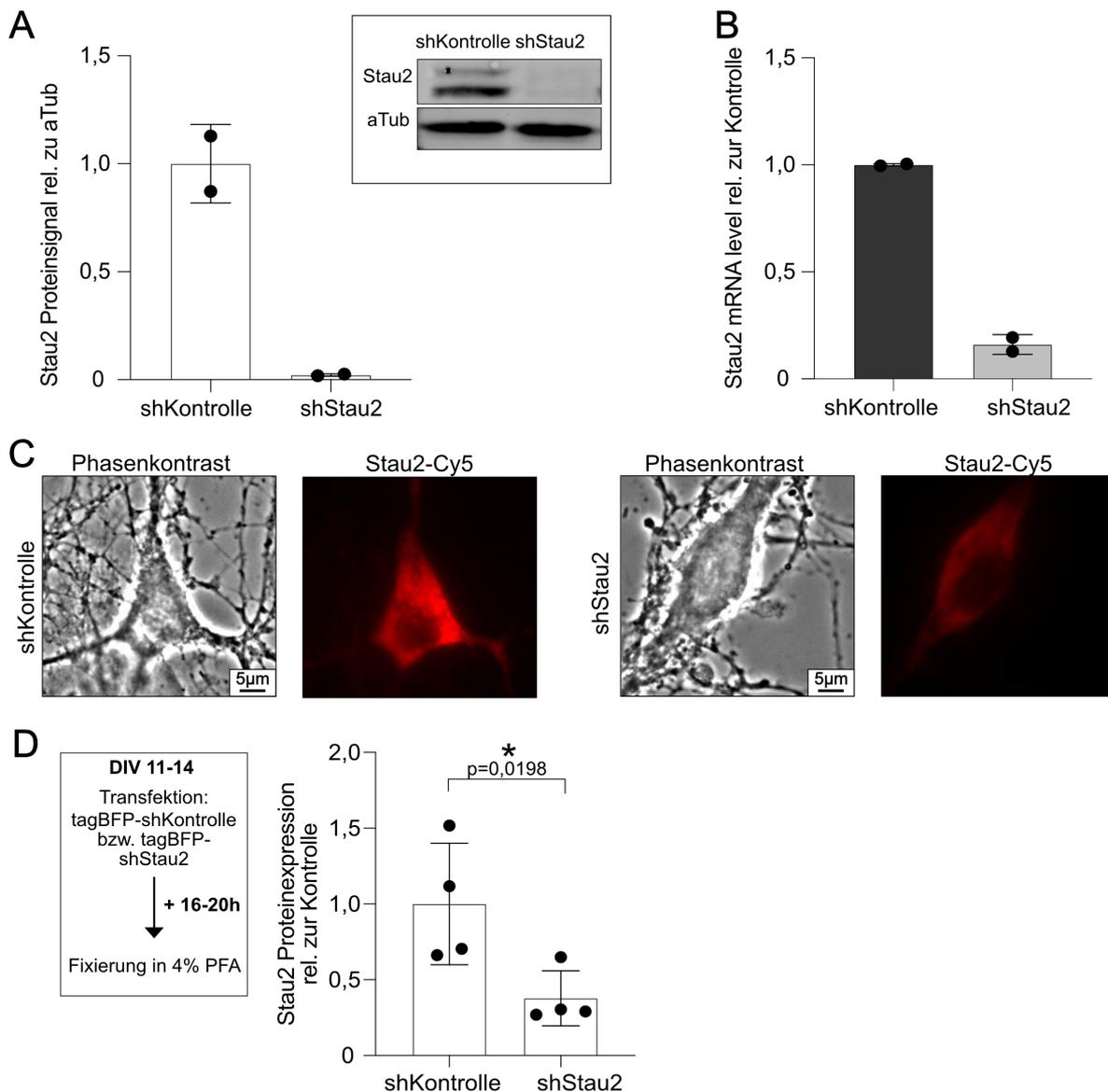


Abbildung 5-7 shStau2 vermittelte Reduktion der Stau2 Expression

A. Stau2 Proteinexpression in kortikalen Neuronen. Kortikale Neurone wurden mit shKontrolle oder shStau2 transduziert und nach 5 Tagen lysiert. Stau2 wurde nach SDS-PAGE mittels Western Blot detektiert. Der Western Blot ist exemplarisch dargestellt. Der Graph veranschaulicht das Stau2 Proteinsignal im Western Blot normalisiert zu aTub. Es wurden zwei Replikate ausgewertet. **B.** Stau2 mRNA Level in kortikalen Neuronen nach Transduktion an DIV 9 von shKontrolle oder shStau2. Im Anschluss erfolgte eine qPCR zur Bestimmung der mRNA Level. Ausgewertet wurden zwei biologische Replikate. **C.** Veranschaulichung von Stau2 in hippocampalen Neuronen, nach Transfektion von shKontrolle oder shStau2. Endogenes Stau2 wurde mittels Antikörper gegen Stau2 sichtbar gemacht. Maßstabsleiste 5 μ m. **D.** Analyse des Stau2 Proteinsignals nach Transfektion von shKontrolle oder shStau2 in hippocampalen Neuronen. Gemessen wurde das Stau2 Proteinsignal im Zellkörper. Der experimentelle Ablauf ist schematisch dargestellt. Ausgewertet wurden vier biologische Replikate. Zur Signifikanzanalyse wurde ein gepaarter T-Test über die Mittelwerte der Replikate durchgeführt. Als Signifikanzintervalle wurden * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ verwendet.

Ebenfalls eine signifikante Verringerung der Stau2 mRNA konnte in transduzierten kortikalen Neuronen belegt werden (Abbildung 5-7 B). Hierfür wurde nach Transduktion von kortikalen Neuronen an DIV 9 mit shKontrolle oder shStau2 eine qPCR zur Bestimmung der mRNA Level durchgeführt. Auf eine Signifikanzanalyse wurde auf Grund der Anzahl von bisher zwei biologischen Replikaten verzichtet. Um vergleichbare Werte in hippocampalen Neuronen zu bekommen, wurden diese mit shStau2 transfiziert und es erfolgte eine Immunfärbung gegen endogenes Stau2. Zur Analyse wurden fluoreszenzmikroskopische Bilder angefertigt (Abbildung 5-7 C). Zur Auswertung des Stau2 Proteinsignals wurde die durchschnittliche Fluoreszenzintensität im Zellkörper gemessen. Nach bereits 16 h Expression von pSuperior-TagBFP-shStau2 konnte eine signifikante Reduktion der Stau2 Proteinexpression beobachtet werden (Abbildung 5-7 D).

5.2.2 Auswirkung der Stau2 Reduktion auf die Ago2 Lokalisation in P-bodies

Eine effektive Stau2 Depletion in hippocampalen Neuronen konnte bereits gezeigt werden (vgl. Abbildung 5-7 D). Aufbauend auf die vorangegangenen Experimente wurde ein möglicher Einfluss von Stau2 auf die eGFP-Ago2 Lokalisation in Abhängigkeit von der Stau2 Expression untersucht. Es wurden hippocampale Neurone mit eGFP-Ago2 transfiziert und die shRNA gegen Stau2 wurde kotransfiziert (Abbildung 5-8 A untere Reihe). Als Kontrolle wurde shNTC transfiziert. Die shRNAs sind mit BFP markiert, um mittels Fluoreszenzmikroskopie eine sichere Transfektionskontrolle durchführen zu können (Abbildung 5-8 A letzte Spalte). Die Expression der beiden Plasmide erfolgte für 16 h. Für diesen Zeitraum konnte in den vorangegangenen Experimenten eine starke Stau2 Reduktion nach Transfektion von shStau2 festgestellt werden (vgl. Abbildung 5-7 D). In Abbildung 5-8 sind sowohl die mikroskopischen Bilder zur Veranschaulichung als auch die statistische Auswertung der eGFP-Ago2 Partikel dargestellt.

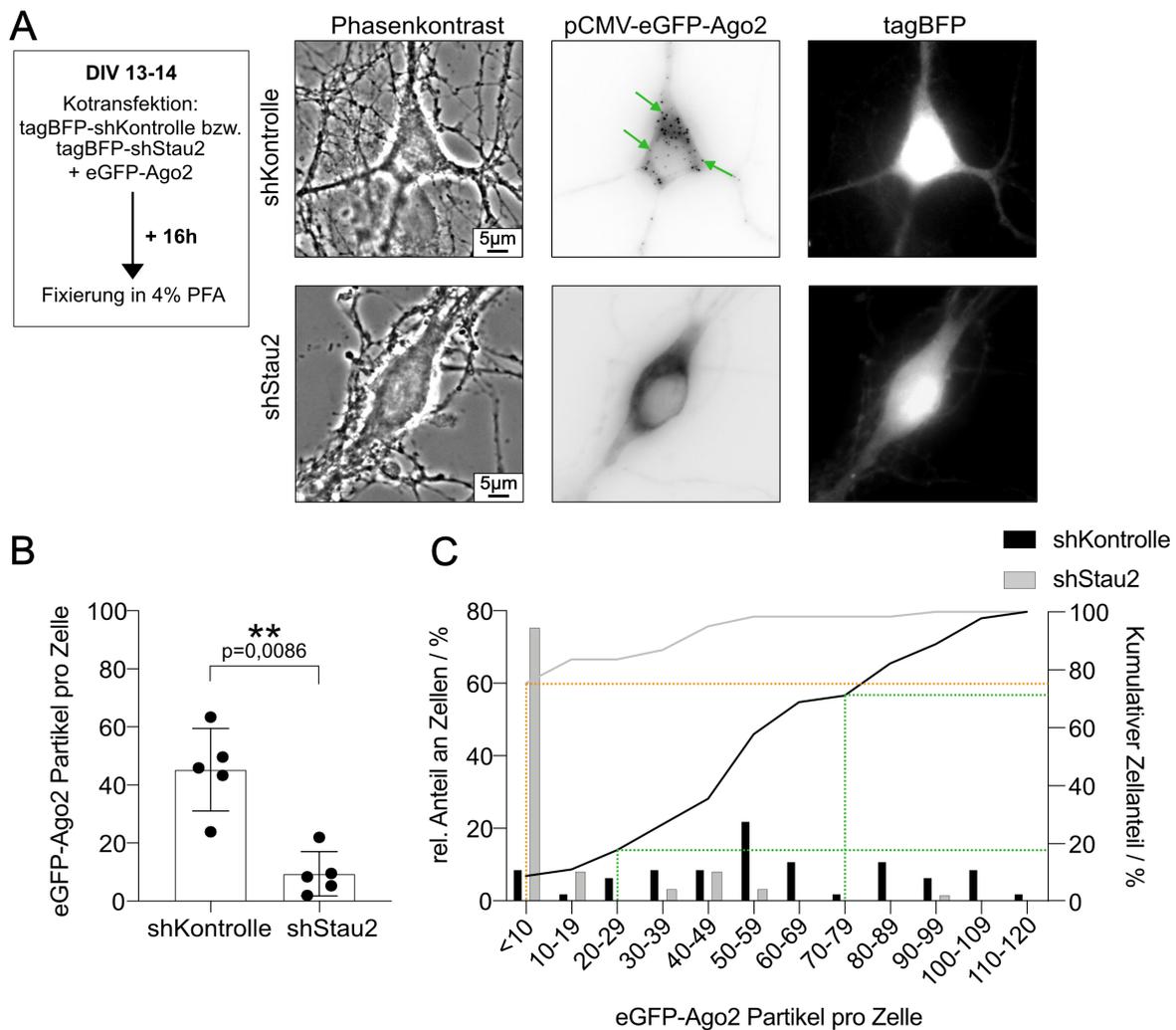


Abbildung 5-8 Stau2 reguliert eGFP-Ago2 Lokalisation in hippocampalen Neuronen

A. Exemplarische Darstellung der eGFP-Ago2 Lokalisation in hippocampalen Neuronen nach Depletion von Stau2. In der ersten Reihe ist die Kontrolle gezeigt, in der zweiten Reihe ein Neuron nach shStau2 und GFP-Ago2 Kotransfektion. Hippocampale Neurone wurden an DIV 13/14 mit eGFP-Ago2 und tagBFP-shKontrolle oder tagBFP-shStau2 kotransfiziert. Nach 16 h Expression erfolgte die Fixierung. Grüne Pfeile heben eGFP-Ago2 Partikel hervor. Maßstabsleiste 5 μm . **B.** eGFP-Ago2 Partikel pro Zelle nach Kotransfektion von hippocampalen Neuronen mit shKontrolle oder shStau2 an DIV 13/14. Ausgewertet wurden pro Kondition fünf biologische Replikate. Zur Signifikanzanalyse wurde ein gepaarter T-Test über die Mittelwerte der Replikate durchgeführt. Als Signifikanzintervalle wurden $*p < 0,05$; $**p < 0,01$ und $***p < 0,001$ verwendet. **C.** Dargestellt an der linken y-Achse ist die rel. Häufigkeitsverteilung der Anzahl an eGFP-Ago2 Partikel pro Zelle in hippocampalen Neuronen nach Transfektion der shKontrolle oder shStau2. Die rechte y-Achse zeigt die kumulative Häufigkeit über der Anzahl an eGFP-Ago2 Partikel pro Zelle. Zur Verdeutlichung wurden ausgewählte Intervalle, in welchen mehr als die Hälfte der analysierten Neurone liegen, mit gestrichelten Linien (grün = shKontrolle; orange = shStau2) hervorgehoben. Ausgewertet wurden jeweils drei biologische Replikate mit insgesamt 45 Zellen für die shKontrolle Kondition und 61 Zellen für die shStau2 Kondition.

An den mikroskopischen Aufnahmen ist deutlich zu erkennen, dass eGFP-Ago2 in der Kontrolle gleichermaßen, in P-bodies (grüne Pfeile) sowie diffus im Cytoplasma, lokalisiert, wie ohne eine Expression einer shRNA (vgl. Abbildung 5-1 und Abbildung 5-8 A). Nach Kotransfektion von shStau2 wurde allerdings eine Veränderung der eGFP-Ago2 Proteinlokalisierung in hippocampalen Neuronen festgestellt. Die Reduktion von Stau2 durch die transfizierte shRNA führt zu einer verringerten Lokalisation von Ago2 in P-bodies (Abbildung 5-8 A untere Reihe). Es konnte dabei deutlich weniger Ago2 in P-bodies detektiert werden als in der Kontrollkondition. Ago2 ist hier diffus im Zytosol lokalisiert.

Die Auszählung der eGFP-Ago2 Partikel pro Zelle zeigt eine signifikante Reduktion der eGFP-Ago2 Partikel in shStau2 transfizierten Neuronen. Mit shStau2 Transfektion wurde eine Reduktion der eGFP-Ago2 Partikel auf rund 9 Partikel pro Zelle erreicht, während die Neurone in der Kontrolle im Schnitt 45 Partikel pro Zelle aufweisen (Abbildung 5-8 B). Im Histogramm wird nochmal deutlich, dass über 75% der Zellen (vgl. orange Linie) aus drei unabhängigen biologischen Replikate nach Stau2 Depletion keine bzw. nur eine geringe Lokalisation zu P-bodies zeigen (<10 Partikel/Zelle). Dem gegenüberzustellen sind die in der Kontrollkondition kumulativ circa 72% der Zellen, die zwischen 0 und 79 Partikel haben (vgl. grüne Linien). Davon liegen über 50% zwischen 20 und 79 eGFP-Partikeln (Abbildung 5-8 C). Diese Verteilung ist nahezu gleich wie in den Neuronen, welche nicht mit shKontrolle kotransfiziert wurden (vgl. Abbildung 5-2). Zusammenfassend zeigen diese Daten einen Einfluss von Stau2 auf die eGFP-Ago2 Lokalisation in P-bodies in hippocampalen Neuronen.

Um einen genaueren Einblick auf die Wirkmechanismen von Stau2 auf Ago2 zu bekommen, wurde untersucht, inwieweit der beobachtete Effekt Ago2 spezifisch ist. Es wurden Experimente zur Überprüfung des Einflusses von Stau2 auf die P-body Assemblierung in hippocampalen Neuronen durchgeführt. Die Neurone wurden an DIV 14 mit shKontrolle bzw. shStau2 und eGFP-Ago2 kotransfiziert. Nach 16-stündiger Expression erfolgte eine Immunfärbung gegen endogenes Dcp1a, welches als P-body Marker etabliert ist und eine nahezu vollständige Kollokalisierung mit eGFP-Ago2 zeigt (vgl. Abbildung 5-3 B). Ebenfalls mittels Immunfärbung wurde endogenes Stau2 detektiert. Die Ergebnisse des Versuchs sind in Abbildung 5-9 dargestellt.

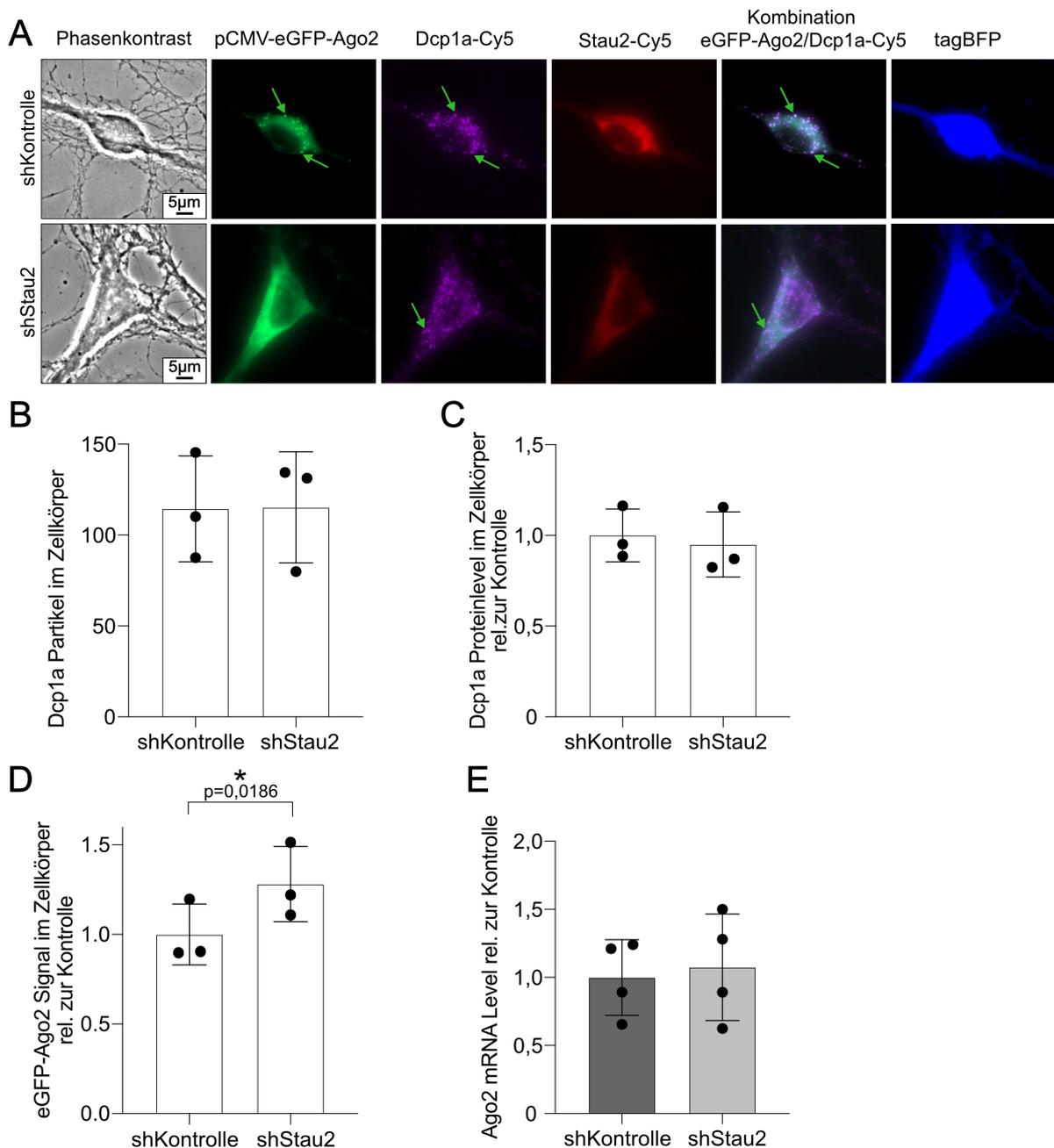


Abbildung 5-9 Reduktion von Stau2 beeinflusst nicht die P-body Assemblierung in hippocampalen Neuronen

A. Lichtmikroskopische Aufnahmen von shStau2/shKontrolle und eGFP-Ago2 kotransfizierten hippocampalen Neuronen. Endogenes Stau2 und Dcp1a wurden mittels Antikörperfärbung sicherbar gemacht. Die grünen Pfeile heben eGFP-Ago2 bzw. Dcp1a Partikel hervor. Maßstabsleiste 5 μm . **B.** Analyse der Dcp1a Partikel im Zellkörper. Ausgewertet nach Transfektion von hippocampalen Neuronen mit shKontrolle/shStau2 an DIV14. Ausgewertet wurden drei biologische Replikate. **C.** Auswertung des Dcp1a Proteinsignals, im Zellkörper von mit shKontrolle/shStau2 transfizierten Neuronen gemessen. Endogenes Dcp1a wurde mittels Antikörperfärbung detektiert. Die Analyse erfolgte anhand drei biologischer Replikate.

Ergebnisse

D. EGFP-Ago2 Signal nach Kotransfektion von hippocampalen Neuronen mit shKontrolle bzw. shStau2 und eGFP-Ago2. Gemessen wurde das durchschnittliche GFP-Signal im Zellkörper. Ausgewertet wurden drei biologische Replikate. Zur Signifikanzanalyse wurde ein gepaarter T-Test über die Mittelwerte der Replikate durchgeführt. Als Signifikanzintervalle wurden * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ verwendet. E. Ago2 mRNA Level (in grau dargestellt) in kortikalen Neuronen nach Transduktion an DIV 9 von shKontrolle oder shStau2. Das mRNA Level wurden mittels qPCR bestimmt. Ausgewertet wurden vier biologische Replikate.

Zu sehen ist in den transfizierten Zellen eine vollständige BFP Expression ohne Aussparung des Zellkerns, was als Transfektionskontrolle der shRNA diente (Abbildung 5-9 A letzte Spalte). Ebenfalls Erfolgskontrolle für die Reduktion der Stau2 Expression und damit der Wirkung der shStau2 RNA ist die endogene Stau2 Detektion (Abbildung 5-9 A Stau2). Ausgewertet wurden nur Neurone, welche eGFP-Ago2 und BFP exprimierten. In der Überlagerung von eGFP-Ago2 und Dcp1a (lila) erscheinen kolokalisierende Partikel weiß. Da endogenes Dcp1a und Stau2 mittels Immunfärbung sichtbar gemacht wurden, ist die Expression der beiden Proteine in allen Zellen des Experiments ersichtlich. In der Kontrolle lokalisiert eGFP-Ago2 in Partikeln (beispielhaft indiziert mit den grünen Pfeilen), ebenso wie Dcp1a. In der Kombinationsansicht ist eine hohe Kolokalisation von eGFP-Ago2 und Dcp1a zu sehen (Abbildung 5-9 A obere Reihe). Die shStau2 Kondition zeigt eine diffuse eGFP-Ago2 Lokalisation, während Dcp1a weiterhin in Partikeln vorliegt (beispielhaft gezeigt an den grünen Pfeilen). Die Stau2 Expression hat sich dabei mit der Transfektion der shStau2 verringert, was die verringerte Fluoreszenz im Vergleich mit der Kontrolle verdeutlicht (Abbildung 5-9 A untere Reihe). Um die Dcp1a Lokalisation zu quantifizieren, wurden die Dcp1a Partikel im Zellkörper pro Zelle für die Kontrolle, sowie die shStau2 Kondition gezählt. In drei unabhängigen biologischen Replikaten zeigt sich in der Dcp1a Lokalisation kein Unterschied zwischen der Kontrolle und der Kondition nach Stau2 Reduktion (Abbildung 5-9 B). Auch die gemessene durchschnittliche Fluoreszenz von Dcp1a bleibt nahezu gleich in beiden Konditionen (Abbildung 5-9 C). Die Dcp1a Fluoreszenzintensität wurde im Zellkörper gemessen, wobei das Phasenkontrastbild als Referenz diente. Das gleiche Verfahren wurde auch für die Messung der eGFP-Ago2 Intensität verwendet. Es zeigt sich interessanterweise eine Zunahme der eGFP-Ago2 Fluoreszenzintensität mit der Transfektion von shStau2 im Vergleich zur nicht zielgerichteten shKontrolle (Abbildung 5-9 D). Die eGFP-Ago2 Fluoreszenz erhöht sich um das 1,3-fache im Vergleich zur Kontrolle und zeigt somit eine signifikante Änderung. Basierend auf diesem Ergebnis diente ein Experiment mit kortikalen Neuronen

dazu, einen Blick auf die mRNA Expression von Ago2 nach Stau2 Reduktion zu richten. Die kortikalen Neurone wurden mit shKontrolle und shStau2 transduziert, um anschließend eine qRT-PCR durchzuführen und das endogene Ago2 mRNA Level zu bestimmen. In vier unabhängigen biologischen Replikaten konnte keine signifikante Erhöhung der Ago2 mRNA Level festgestellt werden, obgleich ein leichtes Inkrement von rund acht Prozent ersichtlich ist. Basierend auf diesen Ergebnissen bestätigt sich, dass die Stau2 Reduktion in hippocampalen Neuronen spezifisch die Ago2 Lokalisation in selbigen verändert.

Um sicherzustellen, dass der Effekt von Stau2 auf die eGFP-Ago2 Lokalisation, Stau2 spezifisch ist und nicht durch eine Überexpression einer Ago2-abhängigen shRNA herbeigeführt wird, wurde in den folgenden Experimenten eine shRNA gegen die RBPs Pum2 oder HuR exprimiert. Es wurden hippocampale Neurone an DIV 13/14 mit eGFP-Ago2 und shHuR und shPum2 sowie shKontrolle kotransfiziert. Die Expression der Plasmide erfolgte für 16-72 h. Die in Abbildung 5-10 dargestellten Phasenkontrastaufnahmen zeigen definierte Ausschnitte der neuronalen Zellkultur, wobei abermals mittels Fluoreszenzmikroskopie die eGFP-Ago2 Lokalisation beurteilt wird. Weder die Pum2 noch die HuR Reduktion der Proteinexpression führten zu einer veränderten eGFP-Ago2 Lokalisation in den Zellen. In beiden Konditionen, sowie in der Kontrolle, zeigt sich eGFP-Ago2 lokalisiert in P-bodies (indiziert an den grünen Pfeilen). Um eine Transfektion mit der shRNA zu garantieren, wurde diese im Mikroskop überprüft. Die shRNA gegen Pum2 ist mit tagRFP markiert, die gegen HuR mit tagBFP, ebenso wie die nicht-zielgerichtete shKontrolle (Abbildung 5-10 A). Die Auswertung der eGFP-Ago2 Partikel pro Zelle in HuR defizienten Neuronen zeigt keine signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrolle. Die Anzahl an eGFP-Partikeln bleibt mit rund 41 pro Zelle in der Kontrolle und circa 35 Partikeln pro Zelle in der shHuR Kondition nahezu unverändert (Abbildung 5-10 B). Das Gleiche zeigt sich in Abwesenheit von Pum2. Der Pum2 Mangel in den Neuronen führt zu keiner Veränderung der eGFP-Ago2 Lokalisation in P-bodies. Die Anzahl an eGFP-Ago2 Partikeln bleibt in Pum2 defizienten Neuronen im Vergleich zur Kontrolle mit 43 zu 37 Partikeln pro Zelle annähernd konstant (Abbildung 5-10 D). Zur Sicherstellung der Pum2 Reduktion in hippocampalen Neuronen nach shPum2 Transfektion wurde endogenes Pum2 mittels Immunfärbung detektiert. Es erfolgte eine Messung der Fluoreszenzintensität von Pum2 in mit shKontrolle bzw. mit shPum2 transfizierten Neuronen. Es konnte eine Abnahme der Pum2 Expression um 30% erreicht werden (Abbildung 5-10 C). Die Effektivität der HuR Reduktion nach Transduktion von der verwendeten shRNA konnte

bereits arbeitsgruppenintern bestätigt werden. Im Western Blot zeigt sich eine signifikante Reduktion der HuR Proteinexpression (Ehse et al., 2021), sodass diese Versuche nicht wiederholt wurden.

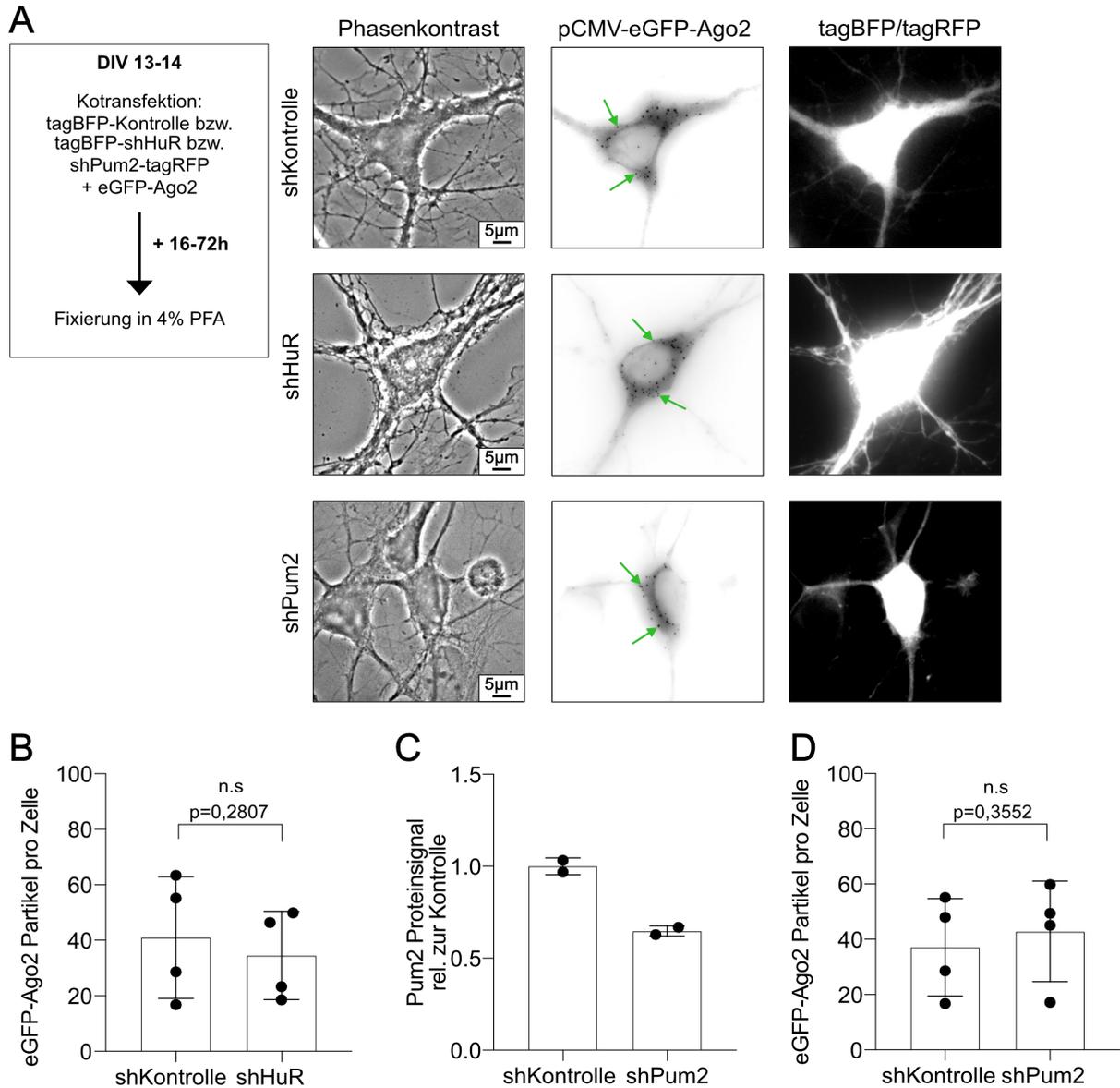


Abbildung 5-10 Pum2 und HuR beeinflussen nicht die eGFP-Ago2 Lokalisation in hippocampalen Neuronen

A. Dargestellt sind beispielhaft hippocampale Neurone, nach Kotransfektion von tagBFP-shKontrolle, tagRFP-shPum2 oder tagBFP-shHuR und eGFP-Ago2 an DIV 13/14. Grüne Pfeile heben eGFP-Ago2 Partikel hervor. Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufes ist links im Bild verdeutlicht. Maßstabsleiste 5 μ m. **B.** Auswertung der eGFP-Ago2 Partikel pro Zelle nach Transfektion mit shKontrolle oder shHuR. Analysiert wurden vier biologische Replikate. Zur Signifikanzanalyse wurde ein gepaarter T-Test durchgeführt. Dabei steht n.s. für nicht signifikant, $p > 0,05$. **C.** Pum2 Proteinsignal nach Transfektion von shPum2 rel. zu shKontrolle in hippocampalen Neuronen. Endogenes Pum2 wurde mittels Antikörperfärbung detektiert. **D.** Auswertung der eGFP-Ago2 Partikel pro Zelle nach Transfektion mit shKontrolle oder shPum2. Analysiert wurden vier biologische Replikate. Zur Signifikanzanalyse wurde ein gepaarter T-Test durchgeführt, n.s. steht für nicht signifikant, $p > 0,05$.

Durch diese Experimente kann ausgeschlossen werden, dass die reine Überexpression einer shRNA die Veränderung der eGFP-Ago2 Lokalisation verursacht. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Effekt der Lokalisationsänderung von eGFP-Ago2 Stau2 spezifisch ist.

5.2.3 Relokalisation von Ago2 in P-bodies nach Stau2 Überexpression

In vorherigen Ergebnissen wurde gezeigt, dass Stau2 die Lokalisation von eGFP-Ago2 in P-bodies beeinflusst. Dabei führte eine Stau2 Reduktion in hippocampalen Neuronen zu einer verminderten eGFP-Ago2 Lokalisation in P-bodies. Im Folgenden wird gezeigt, dass eine Wiederherstellung des Stau2 Proteinspiegels dazu führt, dass eGFP-Ago2 wieder in P-bodies lokalisiert. Zu diesem Zweck wurden hippocampale Neurone mit shKontrolle bzw. shStau2 und eGFP-Ago2 kotransfiziert. Als weiteres Konstrukt wurde mit tagRFP markiertes Stau2, welches gegen die shRNA resistent ist (tagRFP-Stau2*), kotransfiziert. Als Kontrolle diente unmarkiertes tagRFP. Die Kombination aus den Konstrukten ergab die im folgenden beschriebenen Konditionen: Als Ausgangspunkt dienten triple transfizierte Neurone mit shKontrolle, eGFP-Ago2 und tagRFP. Die Neurone zeigten eine eGFP-Ago2 Lokalisation wie ohne Transfektion von einer shRNA und tagRFP (vgl. Abbildung 5-1 A). eGFP-Ago2 liegt in den Zellen in Partikeln vor (beispielhaft verdeutlicht durch die grünen Pfeile). Die Transfektionskontrolle der nicht zielgerichteten shRNA erfolgte mikroskopisch durch den Fluoreszenznachweis von tagBFP. Die transfizierte Zelle zeigt eine komplette, den Zellkern ausfüllende, tagBFP Expression. Das gleiche gilt für die tagRFP Expression (Abbildung 5-11 A erste Reihe).

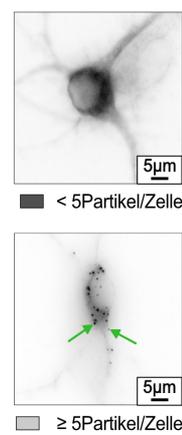
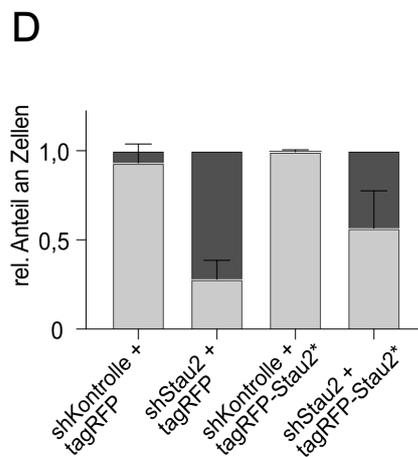
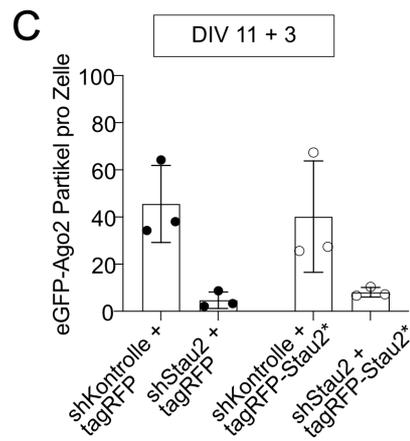
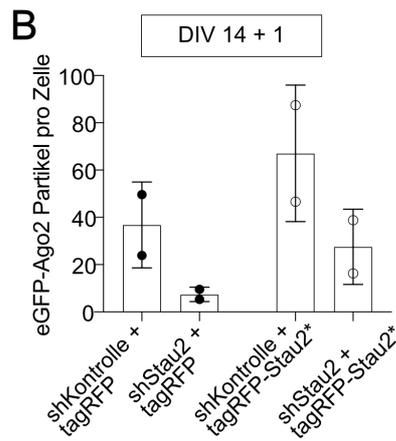
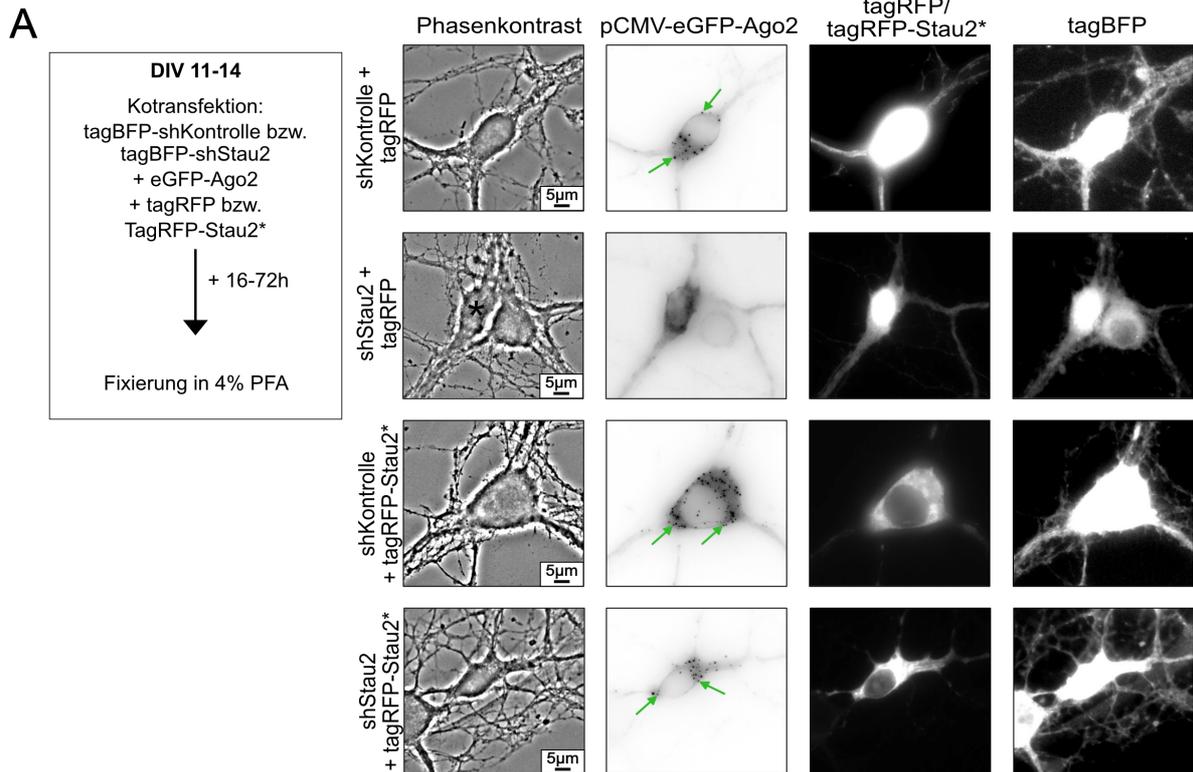
Die zweite Kondition sind transfizierte Neurone mit shStau2, eGFP-Ago2 und tagRFP. Die eGFP-Ago2 Lokalisation verhält sich dabei wie bereits beschrieben (vgl. Abbildung 5-8). eGFP-Ago2 liegt diffus im Cytoplasma verteilt vor, es sind keine Partikel sichtbar. In der Phasenkontrastaufnahme sind zwei benachbarte Neurone zu sehen, wobei das transfizierte Neuron mit einem Stern markiert ist. Im Gegensatz dazu ist in der Fluoreszenzaufnahme von eGFP und tagRFP nur ein, das transfizierte, Neuron gezeigt. TagRFP ist auch hier wieder in der ganzen Zelle, inkl. Zellkern, exprimiert. Auch in der tagBFP Darstellung zeigt das transfizierte Neuron eine Expression von tagBFP in der gesamten Zelle, während das tagBFP Signal des untransfizierten Neurons eine Aussparung des Zellkerns erkennen lässt (Abbildung 5-11 A

zweite Reihe). Alles in allem verdeutlicht dies die effektive Transfektionskontrolle der drei eingebrachten Plasmide.

Eine Überexpression von Stau2 in hippocampalen Neurone erfolgte mit Transfektion von shKontrolle, eGFP-Ago2 und shRNA resistentem Stau2 (TagRFP-Stau*), welches mit tagRFP markiert ist. EGFP-Ago2 ist in dieser Kondition weiterhin in P-bodies lokalisiert. Indessen lässt sich bereits anhand der exemplarischen mikroskopischen Aufnahmen ein Anstieg der eGFP-Ago2 Partikel vermuten. TagRFP-Stau2* ist diffus in der Zelle, abgesehen vom Zellkern, exprimiert. TagBFP zeigt erneut eine komplette, den Zellkern ausfüllende Fluoreszenz (Abb. 5-11 A dritte Reihe).

Die Wiederherstellung der Stau2 Proteinlevel stellt die vierte und letzte Kondition da. Es ist die Kombination aus shStau2, eGFP-Ago2 und tagRFP-Stau2*. TagBFP und tagRFP-Stau2* lokalisieren in dieser Bedingung wie bereits oben beschrieben. Die Lokalisation von eGFP-Ago2 zeigt eine Relokalisation von eGFP-Ago2 in P-bodies, welche in der Abbildung beispielhaft durch grüne Pfeile verdeutlicht sind (Abbildung 5-11 A letzte Reihe).

Das oben beschriebene Experiment wurde in zwei verschiedenen zeitlichen Intervallen durchgeführt. Einmal erfolgte die Expression der Plasmide für 16 h. Die Neurone wurden dafür an DIV 14 transfiziert. Andere Replikate erfolgten mit Transfektion an DIV 11 und Expression für 72 h. Um die eGFP-Ago2 Lokalisation in den beschriebenen Bedingungen quantitativ zu erfassen, wurden die eGFP-Ago2 Partikel pro Zelle gezählt. Für die an DIV 14 transfizierten Neuronen zeigt sich in Stau2 reduzierten Neuronen, mit Koexpression von tagRFP, die gewohnte Reduktion der eGFP-Ago2 Partikel pro Zelle von 37 Partikel auf 7 Partikel pro Zelle. Mit Koexpression von tagRFP-Stau2* zeigt sich hingegen eine Relokalisation von eGFP-Ago2 in P-bodies. Die Anzahl an Partikeln pro Zelle konnte auf 28 Partikel pro Zelle regeneriert werden. Auch auffällig ist, dass die reine Überexpression von Stau2 zu einer vermehrten partikulären Lokalisation von eGFP-Ago2 im Vergleich zur Kontrolle führt (Abbildung 5-11 B). Ausgewertet wurden zwei biologische Replikate, weshalb auf eine Signifikanztestung verzichtet wurde. Dabei zeigt sich innerhalb der Replikate eine große Streuung. Hervorzuheben ist jedoch, dass die jeweils oberen Datenpunkte ein biologisches Replikat repräsentieren und die jeweils unteren Datenpunkte ein zweites. Demnach ist hier von einer echten Wiederherstellung des Proteinlevels auszugehen. Zu notwendigen Signifikanztestung sind daher weitere Experimente notwendig.



Ergebnisse

Abbildung 5-11 Reorganisation der eGFP-Ago2 Partikel nach Stau2 Überexpression

A. Beispielhafte lichtmikroskopische Aufnahmen aus definierten Abschnitten der Zellkultur. Dargestellt sind tripletransfizierte hippocampale Neurone. Links ist schematisch der experimentelle Ablauf dargestellt. Die grünen Pfeile stellen eGFP-Ago2 Partikel heraus. Maßstabsleiste 5 μm . **B. - C.** Auswertung der eGFP-Ago2 Partikel pro Zelle in hippocampalen Neuronen nach Tripletransfektion. In B. erfolgte die Auswertung an zwei biologischen Replikaten, in denen hippocampale Neurone an DIV 14+1 transfiziert wurden. C. zeigt drei biologische Replikate, in welchen die Transfektion an DIV 11+3 erfolgte. **D.** Dargestellt ist der Anteil der hippocampalen Neuronen nach Tripletransfektion mit entweder <5 Partikel pro Zelle oder ≥ 5 Partikel pro Zelle. Ausgewertet wurden fünf biologische Replikate. Es wurden die eGFP-Ago2 Partikel pro Zelle gezählt und in die jeweilige Kategorie <5 oder ≥ 5 Partikel eingeteilt. Rechts beispielhafte Darstellung der Neurone der jeweiligen Kategorie. Maßstabsleiste 5 μm .

Nach Expression der Plasmide für drei Tage ist eGFP-Ago2 in Stau2 defizienten Neuronen ebenfalls diffus lokalisiert. Im Schnitt zeigen sich lediglich fünf eGFP-Ago2 Partikeln pro Neuron. Die Überexpression von shRNA resistentem Stau2 führt nach dreitägiger Expression allerdings in den drei ausgewerteten biologischen Replikaten nicht zu einer vermehrten Lokalisation von eGFP-Ago2 in P-bodies. Auch der Effekt der beschriebenen Relokalisation nach Expression von tagRFP-Stau2* und shStau2 ist mit einem Anstieg von fünf auf acht Partikeln pro Neuron schwächer ausgeprägt (Abbildung 5-11 C).

Summiert man die Ergebnisse aller fünf unabhängigen biologischen Replikate, ungeachtet der Dauer der Expression, weisen in der Kontrolle über 93% der Zellen mehr als fünf eGFP-Ago2 Teilchen auf, während nach shStau2 Transfektion lediglich 28% der ausgewerteten Neurone mehr als fünf eGFP-Ago2 Partikel zeigen. Die Transfektion von shRNA resistentem Stau2 zeigt in der Kontrolle (dies entspricht einer Stau2 Überexpression) eine noch deutlichere Lokalisation von eGFP-Ago2 in P-bodies. Nur circa 0,5% der Neurone haben weniger als fünf Partikel. Bei Kotransfektion von shStau2 und tagRFP-Stau2* kann eine Umstellung der diffusen Lokalisation zur partikulären detektiert werden. 57% der Neurone haben mehr als fünf eGFP-Ago2 Partikel pro Zelle, was 29% mehr als in der Kontrolle sind. Alles in allem deuten die Ergebnisse daraufhin, dass Stau2 die Ago2 Lokalisation in P-bodies reguliert.

5.2.4 Phosphorylierungsunabhängige Stau2 Regulation der eGFP-Ago2 Lokalisation

Ein spezifischer Effekt von Stau2 auf die eGFP-Ago2 Lokalisation in hippocampalen Neuronen konnte bereits in den vorangegangenen Experimenten gezeigt werden. Es wurde hierfür eine generelle Auswirkung der Überexpression einer Ago2 abhängigen shRNA ausgeschlossen (vgl. Abbildung 5-10). Wie gezeigt wurde, hat auch die Phosphorylierung von Ago2 Auswirkung auf die Lokalisation des RBPs in P-bodies. Betrachtet man die Veränderung der eGFP-Ago2 Lokalisation in Abhängigkeit von zum einen der Stau2 Expression und zum anderen der posttranslationalen Phosphorylierung von Ago2, könnte Stau2 die Ago2 Lokalisation über dessen Phosphorylierungsstatus regulieren. Im Hinblick auf diese Fragestellung wurden hippocampale Neurone an DIV 13-14 mit eGFP-Ago2 S/T824:34A transfiziert und die shRNA gegen Stau2 kotransfiziert. Als Kontrolle diente hierbei die Kotransfektion der shRNA ohne gerichtetes Ziel. Die Expression der Plasmide erfolgt für 16 h. Ago2 S/T824:34A simuliert unphosphoryliertes Ago2 und lokalisiert in P-bodies. Sollte Stau2 über den Phosphorylierungsstatus im Cluster S/T824:34 die Ago2 Lokalisation ändern, dann würde bei der Kotransfektion von Ago2 S/T824:34A und shStau2 kein Effekt auf die Ago2 Lokalisation zu beobachten sein. In Abbildung 5-12 sind die Ergebnisse des Versuchs dargestellt. Zur optischen Einprägung sind dabei abermals die lichtmikroskopischen Aufnahmen der jeweiligen Kondition veranschaulicht (Abbildung 5-12 A). Betrachtet man die Ergebnisse, ist deutlich ersichtlich, dass eGFP-Ago2 S/T824:34A in der Kontrolle gleichermaßen in P-bodies (grüne Pfeile) lokalisiert, wie das nicht mutierte eGFP-Ago2 (Abbildung 5-12 A und vgl. Abbildung 5-8). Nach Kotransfektion von shStau2 wurde die gleiche Veränderung der eGFP-Ago2 S/T824:34A Proteinlokalisierung in hippocampalen Neuronen festgestellt wie auch nach Transfektion von eGFP-Ago2 wt. Die Reduktion der Stau2 Expression führt zu einer verringerten Lokalisation von eGFP-Ago2 S/T824:34A in P-bodies (Abbildung 5-12 A untere Reihe). Es konnten deutlich weniger eGFP-Ago2 Teilchen detektiert werden als unter Kontrollkonditionen.

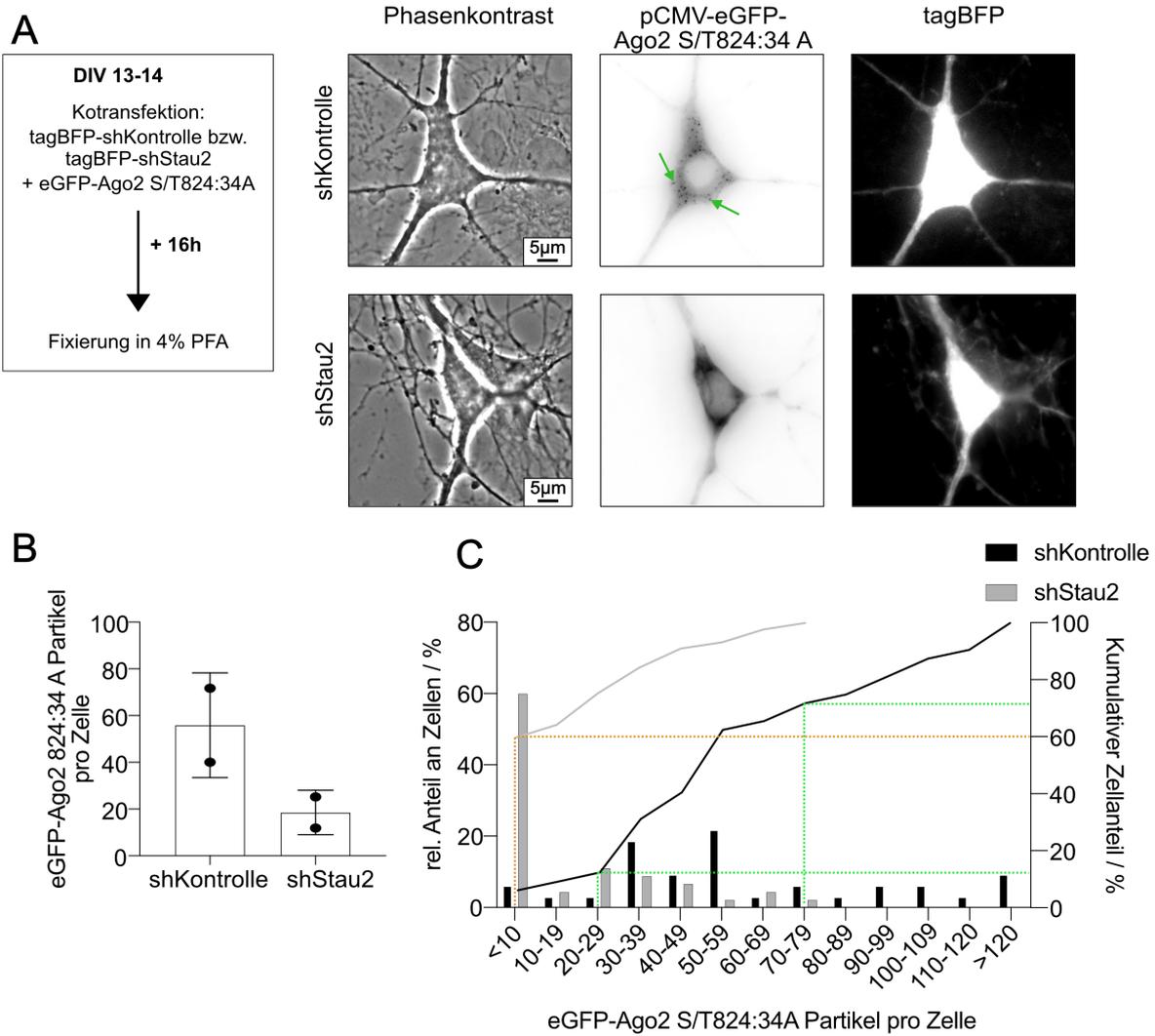


Abbildung 5-12 Stau2 Regulation der eGFP-Ago2 Lokalisation in hippocampalen Neuronen ist unabhängig von der eGFP-Ago2 Phosphorylierung

A. Exemplarische Darstellung der eGFP-Ago2 S/T824:34 A Lokalisation in hippocampalen Neuronen nach Depletion von Stau2. In der ersten Reihe ist die Kontrolle veranschaulicht. Die zweite Reihe zeigt ein Neuron nach shStau2 und eGFP-Ago2 S/T824:34 A Kotransfektion. Der Versuchsablauf ist schematisch dargestellt. Grüne Pfeile heben eGFP-Ago2 S/T824:34 A Partikel hervor. Maßstabsleiste 5 μ m. **B.** EGPF-Ago2 S/T824:34 A Partikel pro Zelle nach Transfektion von hippocampalen Neuronen mit shKontrolle oder shStau2. Ausgewertet wurden pro Kondition zwei biologische Replikate. **C.** Dargestellt ist die rel. Häufigkeitsverteilung der Anzahl an eGFP-Ago2 S/T824:34 A Partikel pro Zelle in hippocampalen Neuronen nach Transfektion von shKontrolle/shStau2 an der linken y-Achse. Die rechte y-Achse zeigt die kumulative Häufigkeit über der Anzahl an eGFP-Ago2 S/T824:34 A Partikel pro Zelle. Zur Verdeutlichung wurden ausgewählte Intervalle, in welchen kumulativ mehr als 50% der Neurone liegen, mit gestrichelten Linien (grün = shKontrolle; orange = shStau2) hervorgehoben. Ausgewertet wurden jeweils zwei biologische Replikate mit insgesamt 32 Zellen für die shKontrolle Kondition und 45 Zellen für die shStau2 Kondition.

Die Auszählung der eGFP-Ago2 S/T824:34A Partikel pro Zelle zeigt eine Reduktion dieser in shStau2 transfizierten Neuronen (Abbildung 5-12 B). Zu diesem Experiment wurden zwei biologische Replikate durchgeführt. Aus diesem Grund ist die Reduktion nicht als signifikant anzusehen. Trotzdem ist eine deutliche Reduktion in beiden Replikaten eindeutig. Im Histogramm wird nochmal deutlich, dass 60% der Stau2 defizienten Neuronen weniger als zehn Partikel pro Zelle aufweisen. Betrachtet man hingegen die Kontrolle, haben 60% der Neurone zwischen 20 und 79 Partikeln pro Zelle (Abbildung 5-12 C). Die Linksverschiebung der Kurve wird im Histogramm sehr deutlich und führt zum abschließenden Ergebnis, dass Stau2 die Ago2 Lokalisation in hippocampalen Neuronen unabhängig von der Phosphorylierung im Cluster S/T824:34 reguliert.

5.3 Funktionelle Eingliederung

Um die bisherigen deskriptiven Ergebnisse auch funktionell einordnen zu können, wurde eine shRNA gegen Ago2 verwendet, um endogenes Ago2 in der Expression zu reduzieren und die Auswirkung der Ago2 und Stau2 Depletion in Neuronen zu untersuchen.

5.3.1 Validierung der Ago2 Depletion mit Transduktion und Transfektion einer shRNA

Zur Reduktion der Ago2 Expression wurden kortikale Neurone an DIV 9 mit einer shRNA gegen Ago2 transduziert. Als Kontrolle diente die Transduktion der Neurone mit der nicht-zielgerichteten shRNA (shKontrolle). Nach fünf Tagen erfolgt die Zelllyse. Endogenes Ago2 wurde nach SDS-PAGE mittel Western Blot detektiert. Mit dieser Methodik kann die Ago2 Reduktion auf Proteinebene detektiert werden. Um die Ago2 Suppression auf mRNA Ebene zu untersuchen, wurden ebenfalls kortikale Neurone verwendet. Der experimentelle Ablauf gliederte sich dabei wie bereits oben beschrieben. Die Expression der Plasmide erfolgte für fünf Tage. Im Anschluss daran wurde eine qPCR durchgeführt, um die endogenen Ago2 mRNA Level in den jeweiligen Konditionen zu bestimmen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-13 dargestellt.

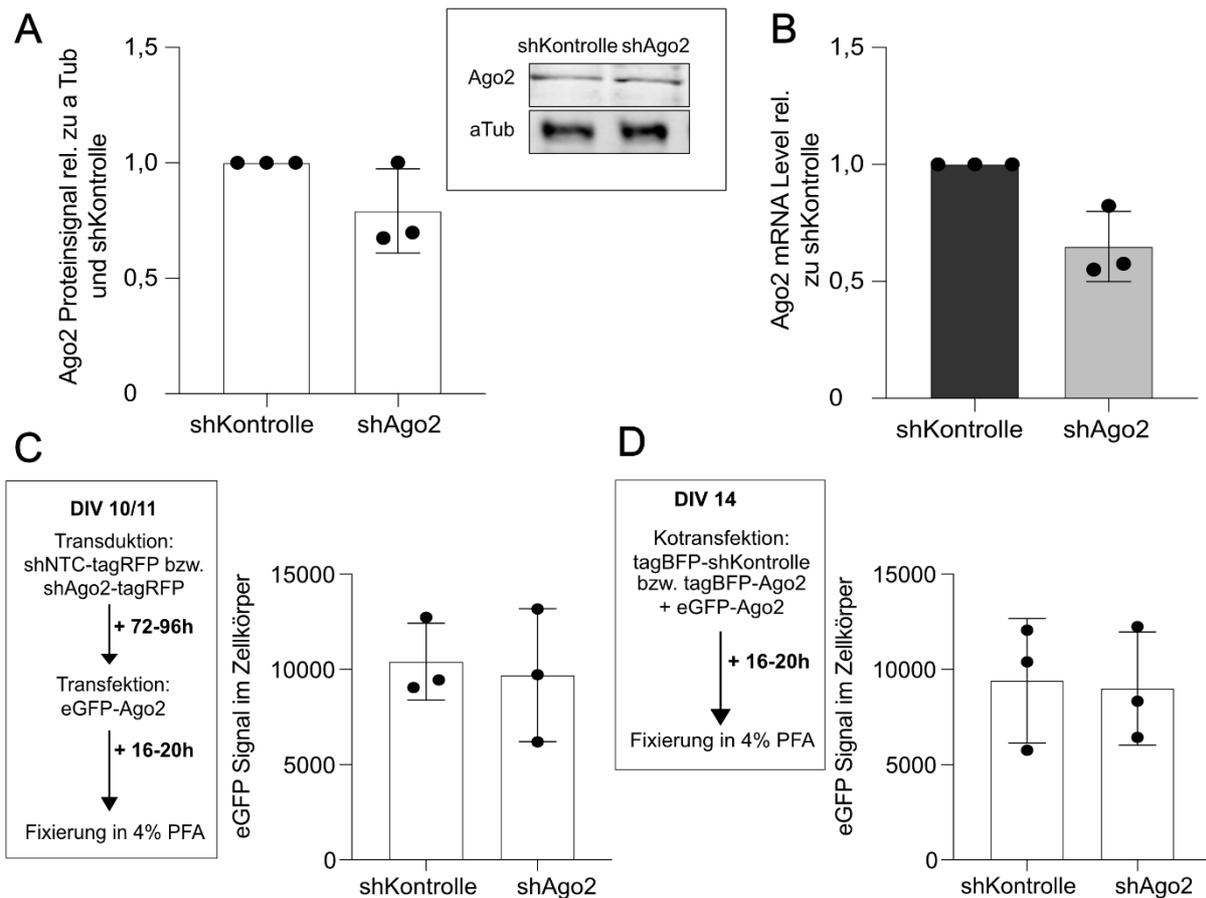


Abbildung 5-13 Quantitative Bestimmung der Ago2 Depletion

A. Auswertung des Ago2 Proteinexpression in kortikalen Neuronen. Der Western Blot ist exemplarisch dargestellt. Der Graph zeigt das gemessene Ago2 Proteinsignal im Western Blot normalisiert zu aTub und zur Kontrolle. Es wurden drei biologische Replikate ausgewertet. **B.** Ago2 mRNA Level nach Transduktion von shKontrolle oder shAgo2. Es wurden drei biologische Replikate analysiert. **C.** Ausgewertet wurde das eGFP-Ago2 Signal im Zellkörper von hippocampalen Neuronen nach Transduktion von shKontrolle oder shAgo2. Der Versuchsablauf ist schematisch dargestellt. Analysiert wurden drei biologische Replikate. **D.** Ausgewertet wurde das eGFP-Ago2 Signal im Zellkörper von hippocampalen Neuronen nach Kotretransfektion von shKontrolle oder shAgo2 mit eGFP-Ago2 an DIV 14. Die zeitliche Abfolge des Experiments ist schematisch abgebildet. Zur Analyse wurden drei biologische Replikate verwendet.

Im Western Blot kann eine Suppression der Ago2 Proteinexpression nachgewiesen werden. Vergleichend mit der Kontrolle zeigt sich nach Transduktion mit Lentiviren, die die shRNA gegen Ago2 enthalten, eine Reduktion der Ago2 Proteinexpression auf 80% (Abbildung 5-13 A). Eine deutlichere Verringerung erfolgt dagegen auf mRNA Ebene. Nach Transduktion der shRNA gegen Ago2 wird ein rund 35% niedrigeres mRNA Level gemessen (Abbildung 5-13 B).

Bezugnehmend auf die vorherigen Experimente in hippocampalen Neuronen soll auch in diesen die Reduktion der Ago2 Expression validiert werden. Hierfür wurden zwei verschiedene experimentelle Verfahren gewählt. Zum einen wurden hippocampale Neurone mit Lentiviren, die die shRNA gegen Ago2 exprimieren, transduziert. Die Expression erfolgt für 72-96 h. Zum anderen wurde ein Plasmid, mit einer shRNA gegen Ago2 ebenso wie eGFP-Ago2, in den hippocampalen Neuronen mittels Calcium-Phosphat-Transfektion exprimiert. Um die Ago2 Expression numerisch auswerten zu können, wurde in den transduzierten Neuronen 16 h vor Fixierung eGFP-Ago2 kotransfiziert. Als Maß für die Ago2 Proteinexpression wurde das GFP Signal im Zellkörper gemessen. Der Versuchsablauf ist schematisch dargestellt (Abbildung 5-13 C-D).

Sowohl nach Transduktion als auch nach Transfektion von shAgo2 kann keine signifikante Reduktion des koexprimierten eGFP-Ago2 gemessen werden. Mittels Transduktion liegt die erreichte Reduktion lediglich bei circa 7% (Abbildung 5-13 C). Die Transfektion der shRNA zeigt mit einer GFP Expression, die rund 96% des Kontrollwerts entspricht, einen noch geringeren Effekt als die Transduktion (Abbildung 5-13 D). Da unter den biologischen Replikaten eine erhebliche Streuung zu erkennen ist, kann kein Effekt der shRNA gegen Ago2 auf koexprimiertes eGFP-Ago2 in der Signalmessung erzielt werden. Die shRNA gegen Ago2 scheint hier nicht effizient genug zu sein, um eine Reduktion der Ago2 Expression unter dem CMV Promotor zu erreichen.

Hinsichtlich des ausbleibenden Effekts in der Expressionsmessung von eGFP-Ago2 in hippocampalen Neuronen wurde als zweite Messmöglichkeit eine Lokalisationsanalyse von eGFP-Ago2 durchgeführt. Diese ist schon von vorangegangenen Experimenten bekannt. Transfizierte und transduzierte hippocampale Neurone wurden unter einem Lichtmikroskop untersucht. Anhand der Fluoreszenz von kotransfiziertem eGFP-Ago2 kann eine Auswertung der Anzahl an Partikeln erfolgen. Der Versuchsaufbau war abermals wie folgt: Hippocampale Neurone wurden mit Lentiviren, die die shRNA gegen Ago2 enthalten, transduziert. Die Expression erfolgt für 72-96 h. Es erfolgte eine Kotransfektion von eGFP-Ago2 16 h vor Fixierung. Als zweiter Versuchsansatz wurde ein Plasmid, mit einer shRNA gegen Ago2 ebenso wie eGFP-Ago2, in den hippocampalen Neuronen mittels Calcium-Phosphat-Transfektion exprimiert. Lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellen nach Transfektion/Transduktion und Fixierung sind in Abbildung 5-14 veranschaulicht. Zur besseren Kontrastierung wurden die Bilder im eGFP-Kanal invertiert, so dass eGFP-Ago2 dunkel erscheint.

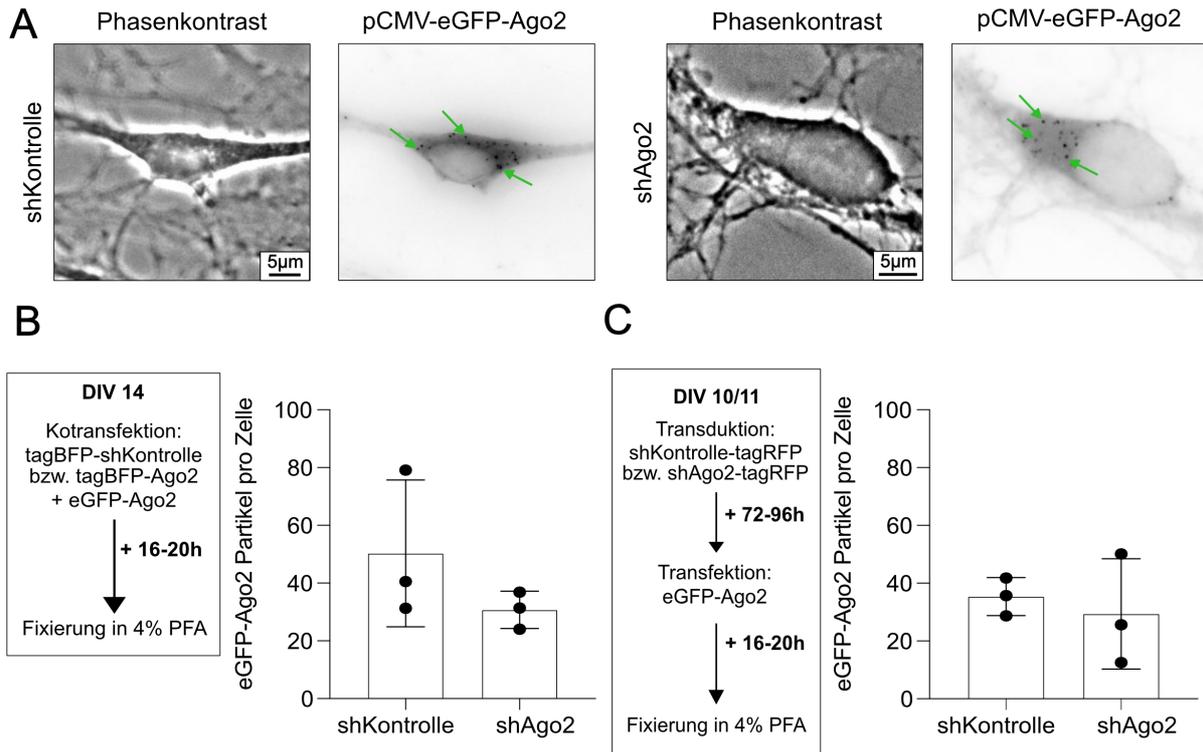


Abbildung 5-14 EGFP-Ago2 Partikel nach Ago2 Reduktion in hippocampalen Neuronen

A. Dargestellt sind hippocampale Neurone (DIV 14+1) nach Kotransfektion von eGFP-Ago2 und shKontrolle (links) oder shAgo2 (rechts). Die grünen Pfeile indizieren eGFP-Ago2 Partikel. Maßstabsleiste 5 μ m. **B.** Auswertung der eGFP-Ago2 Partikel pro Zelle nach Kotransfektion von eGFP-Ago2 und shKontrolle/shAgo2 in hippocampalen Neuronen. Die schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs ist beigegefügt. Analysiert wurden drei biologische Replikate. **C.** Auswertung der eGFP-Ago2 Partikel pro Zelle nach Transduktion von shKontrolle oder shAgo2 und anschließender Transfektion von eGFP-Ago2 16-20 h vor Fixierung. Die zeitliche Abfolge des Experiments ist schematisch abgebildet. Analysiert wurden drei biologische Replikate.

Es zeigt sich sowohl für die Kontrolle als auch für die shAgo2 Kondition eine partikuläre Lokalisation des eGFP-Ago2 Konstruktes (Abbildung 5-14 A). Auffallend ist jedoch, dass bei genauerer Hinsicht die Partikel nach shAgo2 Expression deutlich seltener in der Zelle zu finden sind. Im Mittelwert sind beinahe doppelt so viele eGFP-Ago2 Partikel pro Neuron in der Kontrolle, im Vergleich zu mit shAgo2 transfizierten Neuronen, zu finden (Abbildung 5-14 B). Die Transduktion war in dieser Hinsicht nicht wirklich erfolgreich. Die Reduktion der eGFP-Ago2 Partikel von 35 auf 29 Teilchen pro Neuron bleibt hier hinter den Ergebnissen der Transfektion zurück (Abbildung 5-14 C). Inwieweit die Anzahl an Partikeln pro Zelle als Maß für die Effektivität der shRNA gegen Ago2 verwendet werden kann, bleibt nach diesen Ergebnissen offen.

5.3.2 Austestung des Effektes der Ago2 und Stau2 Reduktion auf Stau2 Ziel-mRNAs

Als Anregung für weitere Versuche diente die entdeckte signifikante Erhöhung der eGFP-Ago2 Proteinexpression (vgl. Abbildung 5-9 D), sowie die leichte Erhöhung der Ago2 mRNA Level (vgl. Abbildung 5-9 E) in Abwesenheit von Stau2. Im Rahmen der beschriebenen Effizienztestung der shRNAs wurde somit neben der eigentlichen Bestimmung der mRNA Level für Ago2 und Stau2 selbst auch mRNAs getestet, die von dem dsRBP Stau2 gebunden werden. Für diese soll ein eventueller Effekt der Änderungen in der Stau2 und Ago2 Expression aufgedeckt werden. Initial wurde hierfür zunächst eine doppelte Reduktion für Ago2 und Stau2 kreiert. Kortikale Neurone wurden zu diesem Zweck sowohl mit Lentiviren mit einer shRNA gegen Stau2 als auch mit Lentiviren, die eine shRNA gegen Ago2 enthalten, transduziert. Die Lyse der Zellen für die darauffolgende qPCR erfolgt nach 72 h. Die Validierung dieser doppelten Reduzierung erfolgte über die Messung der mRNA Level für Ago2 und Stau2. Neben Ago2 wurde auch das mRNA Level für Ago1 verwendet, um kompensatorische Effekte der anderen Subtypen der Ago-Familie zu untersuchen.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-15 dargestellt. Werden die Ergebnisse der qRT-PCR betrachtet, zeigt sich eine deutliche Verminderung von Ago2 und Stau2. Sowohl Ago2 als auch Stau2 sind in der Expression der mRNA reduziert. Dies gilt in Stau2 bzw. Ago2 defizienten Neuronen ebenso wie in Neuronen, die mit beiden shRNAs transduziert wurden. Dabei ist die verminderte Expression von Stau2 in beiden Konditionen signifikant. Die Ago2 mRNA Level hingegen sind bei gleichzeitiger Reduktion der Stau2 und Ago2 Expression nicht so stark vermindert wie in kortikalen Neuronen, die nur mit shAgo2 transduziert wurden (Abbildung 5-15 A).

Werden des Weiteren die Effekte der Reduktion von Stau2 bzw. Ago2 auf die Ago1 mRNA betrachtet, so lässt sich eine deutliche Erhöhung auf das 1,2-fache, im Vergleich zur Kontrolle, in Abwesenheit von Stau2 erkennen. Im Gegensatz dazu ergibt sich nach Transduktion von shAgo2 auch für Ago1 eine Reduktion der mRNA Expression um 27%. Die Ago2 mRNA Expression sinkt mit shAgo2 um rund 55%, um einen Vergleich heranzuziehen. Ausgewertet wurden im Rahmen des Experiments drei voneinander unabhängige biologische Replikate, wodurch sich die große Streuung der Ergebnisse erklären lässt. Die Reduktion von beiden RBP, Ago2 und Stau2, führt zu ähnlich hohem Ago1 mRNA Level, wie nach alleiniger

Stau2 Depression (Abbildung 5-15 A). Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen eine suffiziente Reduktion der Stau2 bzw. Ago2 mRNA durch Transduktion ableiten, so dass diese Methode für weitere Experiment genutzt werden konnte.

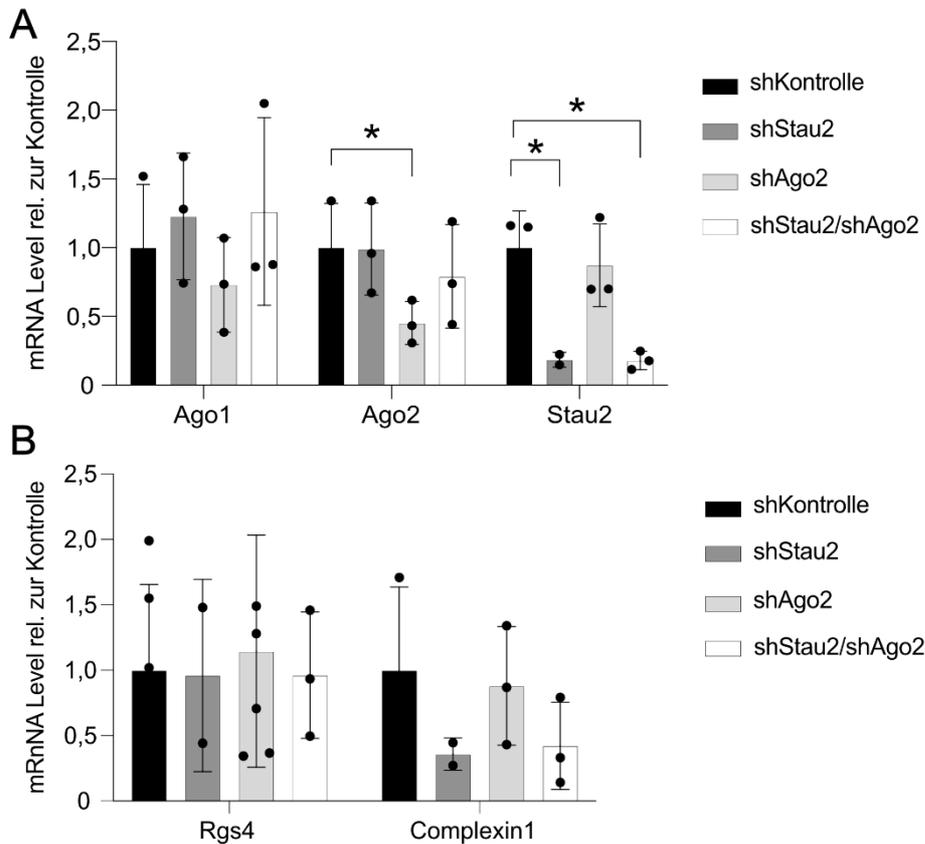


Abbildung 5-15 Doppelte Reduktion von shStau2 und shAgo2 und Auswirkung auf Stau2 Ziel-mRNAs

A. Validierung des Doppelknockdown von shStau2/shAgo2. Ago1, Ago2, Stau2 mRNA Level in kortikalen Neuronen nach Transduktion an DIV 9 mit shKontrolle, shStau2, shAgo2 oder shStau2/shAgo2. Zur Signifikanzanalyse wurde ein gepaarter T-Test über die Replikate durchgeführt. Als Signifikanzintervalle wurden * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$ verwendet. **B.** Rgs4 und Complexin mRNA Level in kortikalen Neuronen nach Transduktion an DIV 9 mit shKontrolle, shStau2, shAgo2 oder shStau2/shAgo2.

Unter Betrachtung der bisherigen Ergebnisse zeigt sich, dass durch Stau2 Reduktion Ago2 weniger in P-bodies lokalisiert, gleichzeitig aber eine signifikante Erhöhung der eGFP-Ago2 Proteinexpression detektiert werden kann. Mit der Frage, welcher physiologische Zusammenhang hinter diesen Beobachtungen steckt, gilt es, eine mögliche Theorie experimentell zu adressieren. Um zu untersuchen, ob durch Stau2 Reduktion Stau2 Ziel-mRNAs vermehrt in der Zelle zur Verfügung stehen und damit beispielsweise von Ago2

gebunden und in ihrer Translation gehemmt werden, wurde folgendes Experiment durchgeführt. Nach Transduktion einer shRNA gegen Stau2/Ago2 bzw. der nicht-zielgerichteten shRNA wurde erneut eine qPCR durchgeführt. Dabei wurden Primer für Complexin und Rgs4 verwendet. Für beide ist bekannt, dass die mRNAs von Stau2 gebunden werden. Es zeigt sich für Complexin eine deutliche Reduktion der mRNA Level nach Stau2 Reduktion. Ebenfalls führt die Transduktion von shAgo2 im Mittel zu verminderten mRNA Levels für Complexin. Dies ist jedoch mit einer Verringerung des mRNA Levels um rund 12% deutlich geringer ausgeprägt als bei Stau2 defizienten Neuronen (circa 64% Verringerung). Betrachtet man die kortikalen Neurone, die mit shStau2 und shAgo2 transduziert wurden, findet sich ebenfalls eine Suppression der Complexin mRNA. Diese liegt mit einer Verringerung um 58% zwischen den Werten in Neuronen nach alleiniger shAgo2 bzw. shStau2 Transduktion (Abbildung 5-15).

Als weitere mRNA wurde Rgs4 getestet. Rgs4 bleibt nach Stau2 Reduktion in der Expression der mRNA nahezu unverändert. In Ago2 defizienten Neuronen zeigt sich hingegen eine Erhöhung der Rgs4 mRNA Expression um fast 15%. Dieser Effekt kann mit der doppelten Reduktion von Ago2 und Stau2 wieder auf das ursprüngliche Rgs4 mRNA Level gebracht werden (Abbildung 5-15 B).

Zusammenfassend konnte primär eine erfolgreiche doppelte Dezimierung für Ago2 und Stau2 erreicht werden. Diesbezüglich hervorzuheben ist, dass eine Suppression der Stau2 Expression zu Erhöhung des Ago1 mRNA Levels führt. Im sekundären Versuch, einen Effekt auf die Stau2 Ziel-mRNAs auszutesten, konnte kein signifikanter Effekt auf Rgs4 und Complexin gezeigt werden. Lediglich Tendenzen sind erkennbar, sodass es weiterer Experimente bedarf, da auch auf Grund der hohen Streuung der Datenpunkte keine signifikanten Ergebnisse erreicht werden konnten.

5.3.3 Etablierung der Immunpräzipitation von eGFP-Ago2

Hinsichtlich des Versuchs, die bisherigen Ergebnisse funktionell eingliedern zu können, wurde eine Immunpräzipitation von eGFP-Ago2 etabliert. Bei dieser Immunpräzipitation wird Ago2 mitsamt seiner Interaktionspartner präzipitiert. Das heißt, dass die verwendete Methode als Nachweis einer Protein-Protein Interaktion verwendet werden kann. Untersucht

wurde eGFP-Ago2 in Stau2 defizitären Neuronen. Als Kontrolle dienen kortikale Neurone, welche mit der nicht-zielgerichteten shRNA transduziert wurden. pCMV-eGFP-Ago2 sowie shStau2 bzw. shKontrolle wurden in kortikale Neurone transduziert und nach fünf Tagen die Zellen lysiert.

Grundsätzlich wird bei der Immunpräzipitation das Zelllysate zusammen mit einem spezifischen Antikörper inkubiert. Im Falle der Präzipitation von eGFP-Ago2 werden Antikörper gegen GFP verwendet. Die Präzipitation des Antikörper-Zielprotein Komplexes erfolgt über Zugabe von so genannten *beads*, welche diesen binden. Durch Zentrifugation kann das Präzipitat so vom restlichen Lysat getrennt werden. Anschließend wird die Immunpräzipitation mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

Die Ergebnisse des initialen Experiments für diese Methode sind in Abbildung 5-16 dargestellt. Neben der Auswertung der eGFP-Signalintensität des Western Blots ist auch der Western Blot selbst gezeigt. Vor der eigentlichen Immunpräzipitation wurde 10% des Zelllysats als Kontrolle entnommen. Diese verdeutlicht dementsprechend eine Art Startpunkt. Für die Kontrollprobe, welche im Western Blot zu sehen ist, wurde demzufolge keine Immunpräzipitation durchgeführt. Für die Immunpräzipitation von eGFP-Ago2, nach Stau2 Reduktion, zeigt sich ein deutlich erhöhtes eGFP-Ago2 Proteinsignal im Vergleich zur Kontrolle. Eine Erhöhung auf das 1,7-fache kann detektiert werden (Abbildung 5-16).

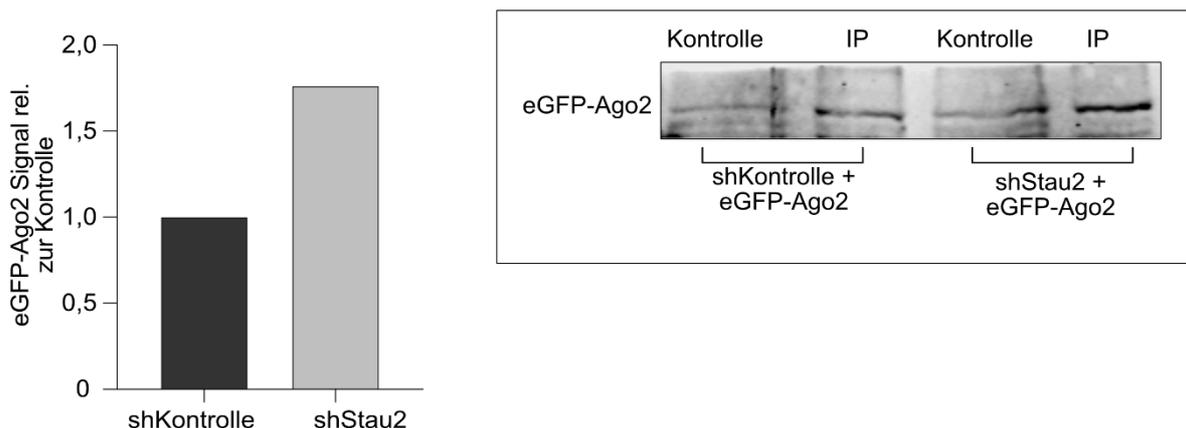


Abbildung 5-16 Immunpräzipitation von eGFP in kortikalen Neuronen (Pilotprojekt)

Immunpräzipitation von eGFP in kortikalen Neuronen. Detektion von eGFP-Ago2 wurde mittels Western Blot durchgeführt, welcher rechts dargestellt ist. In der Auswertung ist zu shKontrolle normalisiert. Es wurde ein Replikat ausgewertet.

In der Auswertung wurden die Ergebnisse zur jeweiligen Kontrolle normalisiert. Die Analyse stammt aus einem biologischen Replikat und dient einer initialen Einschätzung und Austestung der Methode. Nichtsdestotrotz führt dieser deutliche Anstieg des eGFP-Ago2 Signales in Stau2 defizienten Neuronen nach Präzipitation zu Spekulationen bezüglich eines Effektes der Stau2 Reduktion auf die Ago2 Expression und einer damit verbunden vermehrten Protein-Protein Interaktion.

5.3.4 Gleichgewicht der neuronalen Verzweigung durch Ago2 und Stau2

Zusammenfassend konnte bisher gezeigt werden, dass eine Stau2 Reduktion in Neuronen erstens eine verringerte Ago2 Lokalisation in P-bodies (vgl. Abbildung 5-8), zweitens einen Anstieg der Ago mRNA Level (vgl. Abbildung 5-15 A), drittens eine vermehrte Ago2 Proteinexpression (vgl. Abbildung 5-9 D) und viertens eine vermehrte Interaktion von Ago2 mit seinen Partnern (vgl. Abbildung 5-16) zur Folge hat. Beide RBPs haben Einfluss auf die lokale Proteinsynthese in Neuronen. Dies ist Voraussetzung dafür, dass jede einzelne neuronale Synapse sich in ihrer Funktion und Morphologie verändern kann, was entscheidend zur synaptischen Plastizität beiträgt. Bezugnehmend auf diesen Hintergrund wird abschließend der Einfluss einer Stau2 bzw. Ago1/2 Reduktion auf die Komplexität der neuronalen Verzweigung untersucht. Als Methode, den Grad der neuronalen Verzweigung zu messen, dient die Sholl-Analyse (Sholl, 1953).

Hippocampale Neurone wurden nach dreitägiger Expression der shRNAs an DIV 14 analysiert. Koexprimiert wurde in jeder Kondition GFP, um eine vollständige Füllung der Dendriten in der Fluoreszenzmikroskopie und damit optimale Voraussetzungen für die Analyse zu erreichen. Für die verschiedenen Konditionen wurden shRNAs gegen Stau2, Ago1 und Ago2 in unterschiedlicher Kombination und die als Kontrolle dienende nicht-zielgerichtete shRNA an DIV 11 transfiziert. Lichtmikroskopische Aufnahmen der transfizierten Neurone, welche für die Sholl-Analyse verwendet wurden, sind in Abbildung 5-17 veranschaulicht.

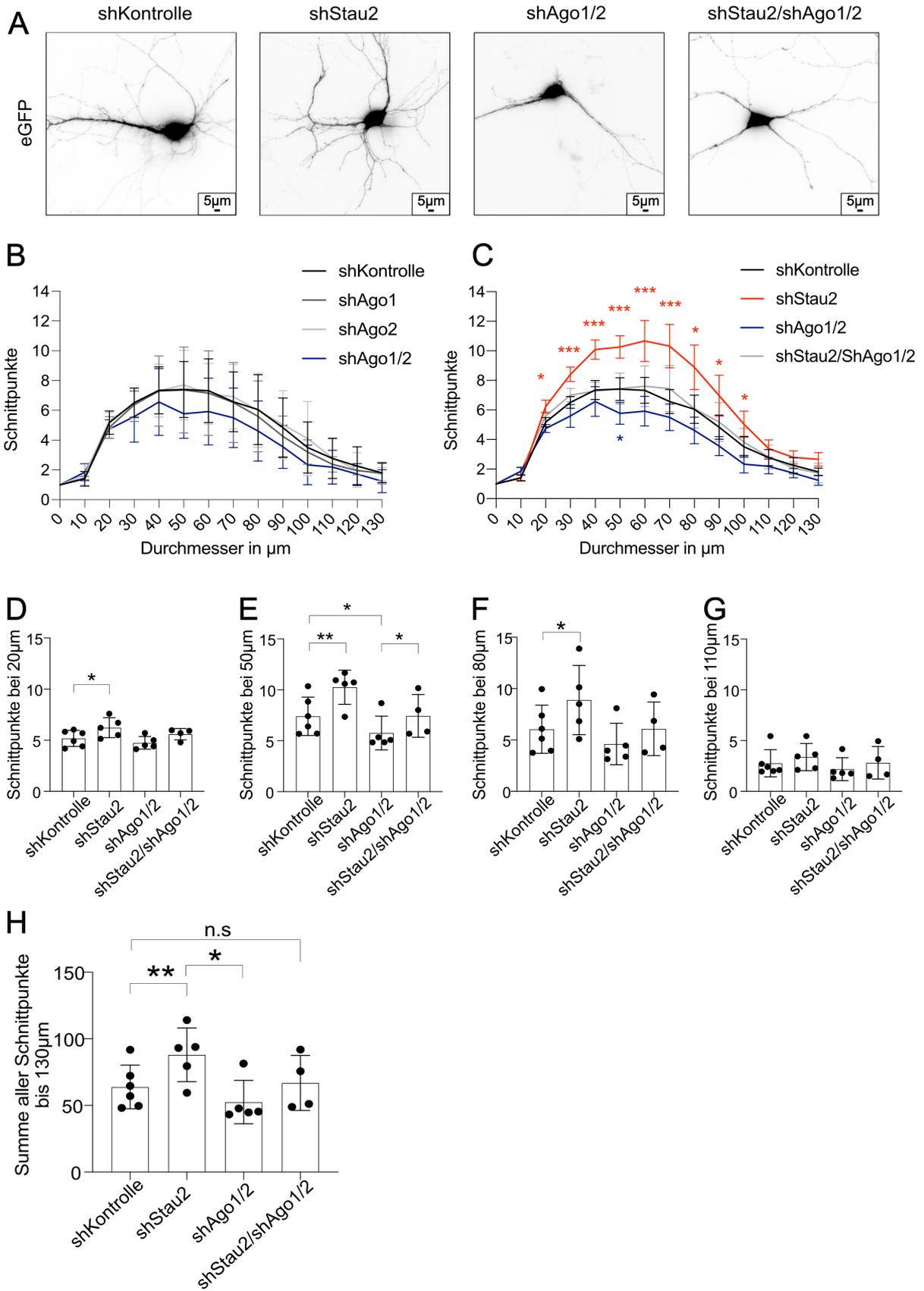


Abbildung 5-17 Stau2 beeinflusst neuronales Dendritenwachstum

A. Exemplarische Darstellung von hippocampalen Neuronen nach Transfektion für die Sholl-Analyse. Maßstabsleiste 5 μm . **B. - H.** Analysiert wurden für shKontrolle sechs biologische Replikate mit insgesamt 207 Zellen und für shStau2 fünf Replikate mit insgesamt 178 Zellen. Für die shAgo1 und shAgo2 Kondition wurden jeweils vier Replikate mit insgesamt 115 Zellen (shAgo1) und 143 Zellen (shAgo2) ausgewertet. Für die doppelte Depletion von Ago1 und Ago2 wurden fünf Replikate mit insgesamt 146 Zellen ausgewertet. Für die shStau2/shAgo1/2 Kondition wurden vier Replikate mit insgesamt 135 Zellen analysiert. Der Radius der Kreise wurde in 10 μm Abständen erhöht. Pro Kreis wurden die Schnittpunkte der Dendriten mit dem jeweiligen Kreis gezählt. Zur Signifikanzanalyse wurde ein gepaarter T-Test über die Replikate durchgeführt. Als Signifikanzintervalle wurden $*p < 0,05$; $**p < 0,01$ und $***p < 0,001$ verwendet. **B.** Auswertung der Verzweigung des Dendritenbaums pro Zelle in hippocampalen Neuronen nach Transfektion von shKontrolle, shAgo1, shAgo2 und shAgo1/2 **C.** Auswertung der Verzweigung des Dendritenbaums pro Zelle in hippocampalen Neuronen nach Transfektion von shKontrolle, shAgo1/2, shStau2 und shStau2/shAgo1/2. **D. - G.** Schnittpunkte der Dendriten mit dem Kreis mit Radius 20/50/80/110 μm wurden pro Kondition ausgewertet. **H.** Alle Schnittpunkte bis 130 μm wurden aufsummiert und pro Kondition dargestellt.

Werden lediglich die dargestellten Aufnahmen der Neurone betrachtet, ohne auf die Auswertung zu blicken, zeigen sich bereits hier deutliche morphologische Unterschiede. Im Vergleich zur Kontrolle zeigen Neurone nach Transfektion mit shStau2 ein deutlich stärkeres Verzweigungsmuster. Gleichzeitig führt die Reduktion von Ago1/2 in den hippocampalen Neuronen offensichtlich zu einer Reduktion der Dendriten. Eine Verringerung der Expression aller drei Proteine zeigt bei optischem Vergleich mit der Kontrolle keine ersichtliche Änderung der Verzweigung (Abbildung 5-17 A). Diese optisch bereits ersichtlichen Unterschiede spiegeln sich auch in der statistischen Auswertung wider. Für die Sholl-Analyse wurde der Mittelpunkt des Zellkörpers als Nullpunkt definiert. Mit einem Radius von 10 μm wurde ein Kreis um diesen Mittelpunkt gezogen und die Schnittpunkte der Dendriten mit dem Kreis gezählt. Als nächstes wurde erneut ein Kreis mit einem Radius 10 μm + 10 μm gezogen und erneut die Schnittpunkte ausgewertet. Im Abstand von jeweils plus 10 μm erfolgte dies, bis ein endgültiger Radius von 130 μm erreicht wurde. Für jeden Kreis wurden die Schnittpunkte mit dem Neuron gezählt. Die Auswertung ist in Abbildung 5-17 dargestellt.

Dabei zeigt sich für die einzelne Ago1 bzw. Ago2 Depletion ein dem der Kontrolle ähnliches Verzweigungsmuster. In allen drei Konditionen liegt die maximale Anzahl an Schnittpunkten zwischen durchschnittlich 7,4 - 7,7, bei einem Radius von 50 μm vom Zellmittelpunkt gemessen. Somit zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Mit einer doppelten Reduktion von Ago1/2 zeigt sich jedoch eine signifikante Abnahme der Schnittstellen auf im

Schnitt 5,8 bei 50 μm (Abbildung 5-17 B). In der Analyse der neuronalen Verzweigung nach Stau2 Reduktion in hippocampalen Neuronen zeigt sich eine drastische Zunahme der Verästelung. Im Mittelwert weisen die Stau2 defizitären Neurone bei einer Entfernung von 60 μm vom Zellmittelpunkt ein Maximum von 10,7 Schnittpunkten auf. Aber auch bei 50 μm ist mit durchschnittlich über zehn Schnittpunkten ein signifikanter Anstieg zu detektieren. Eine Ago1/2 Reduktion führt zu einer Verringerung der neuronalen Verzweigung, während Stau2 defiziente Neurone eine stärkere Verästelung beobachten lassen. Beide Effekte können sich gegenseitig aufheben. Eine gleichzeitige Reduktion von Ago1/2 und Stau2 führt zu einer der Kontrolle entsprechenden Verzweigung (Abbildung 5-17 C). In dieser Kondition zeigen sich rund 7,5 Schnittpunkte bei dem Kreis mit 50 μm Durchmesser.

Die Anzahl an Schnittpunkten wurde vom Zellmittelpunkt (0 μm) bis zu einem Radius von 130 μm gemessen. Um einen leichteren Vergleich der Verzweigung in den einzelnen Konditionen zu bekommen, wird die Schnittpunktzahl bei 20 μm , 50 μm , 80 μm und 110 μm nochmals im Balkendiagramm mit der Darstellung der einzelnen biologischen Replikate veranschaulicht (Abbildung 5-17 D-G). Auffallend ist, dass bereits bei einer Entfernung von 20 μm vom Zellmittelpunkt Stau2 defiziente Neurone, verglichen mit der Kontrolle, signifikant mehr Schnittpunkte haben, während hier für die Reduktion von Ago1/2 noch kein Unterschied zu sehen ist (Abbildung 5-17 D). Der größte Unterschied in der Verzweigung der Neurone unter Stau2 bzw. Ago1/2 Reduktion liegt bei 50 μm . Neben der signifikanten Erhöhung der Verzweigungskomplexität nach shStau2 Transfektion zeigen Ago1/2 defizitäre Neurone eine signifikante Verringerung der Schnittpunkte. Die doppelte Verminderung von Ago1/2 und Stau2 ist in den Ergebnissen der Kontrolle entsprechend (Abbildung 5-17 E). Vergrößert man die Entfernung vom Zellmittelpunkt auf einen Radius von 80 μm und analysiert erneut die neuronale Verästelung, zeigen Neurone nach Reduktion der Stau2 Expression weiterhin eine vermehrte Verzweigung (Abbildung 5-17 F), wohingegen die Analysen bei 120 μm Radius keine signifikante Änderung mehr zeigen (Abbildung 5-17 G). In Summe liegt die stärkste Ausprägung des beobachteten Effektes in einem Bereich zwischen 20 und 80 μm .

Eine Aufsummierung aller Schnittpunkte fasst die Ergebnisse zusammen. Hippocampale Neurone zeigen nach Stau2 Reduktion eine gravierende Zunahme der neuronalen Verzweigung. Die Depletion von Ago1/2 führt dagegen zu einer signifikanten Abnahme der

Verästelung. Die doppelte Reduktion von Stau2 und Ago1/2 führt zu einer Wiederherstellung der physiologischen Verzweigung (Abbildung 5-17 H).

Abschließend bleibt festzuhalten, dass die Ergebnisse darauf hindeuten, dass Ago1/2 und Stau2 funktionell einen gegensätzlichen Effekt auf die Verzweigungskomplexität in hippocampalen Neuronen haben.

6 Diskussion

Im nachfolgenden Kapitel werden die experimentellen Ergebnisse interpretiert und in den Kontext des aktuellen Forschungsstandes eingebettet. Die Struktur der Diskussion orientiert sich dabei an der Zielsetzung der Arbeit.

6.1 Ago2 Phosphorylierung beeinflusst die Ago2 Lokalisation in Neuronen

Primär wurde experimentell mittels Transfektion die Ago2 Protein Lokalisation, unter Berücksichtigung der posttranslationalen Ago2-Modifikation, in hippocampalen Neuronen charakterisiert (vgl. Abbildung 5-4). Es ist bereits wissenschaftlich bekannt, dass die posttranslationale Modifikation von Proteinen, die Eigenschaften und Funktion des jeweiligen Proteins verändern kann. Wie bereits gezeigt wurde, beeinflusst dabei die Modifikation von Ago2 dessen Lokalisation in P-bodies (Rüdel et al., 2011; Zeng et al., 2008). Zellspezifische Unterschiede konnten in den bisherigen Forschungsergebnissen allerdings noch nicht identifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit stellten sich jedoch interessanterweise spezifische Unterschiede in der zellulären Lokalisation von Ago2 Mutanten in hippocampalen Neuronen heraus. Eine Hyperphosphorylierung in dem Cluster S/T824:34 führte zu einer reduzierten Lokalisation von Ago2 in P-bodies (vgl. Abbildung 5-4). Beschrieben wurde für dieses Cluster bereits eine phosphorylierungsunabhängige Lokalisation in HEK 293T Zellen (Quevillon Huberdeau et al., 2017). Gleiches spiegelte sich auch in den hier gezeigten Ergebnissen wider, so dass ein Artefakt ausgeschlossen werden kann.

Diese in Neuronen spezifische Änderung der Lokalisation von Ago2 in P-bodies in Abhängigkeit von der Phosphorylierung wirft einige Fragen auf. Die Phosphorylierung in diesem Cluster führt zu einer reduzierten Fähigkeit von Ago2, die Ziel-mRNAs zu binden (R. J. Golden et al., 2017). Die Entstehung von P-bodies ist die Folge von einer erfolgreichen Gen-Stillegung (Eulalio, Behm-Ansmant, Schweizer, et al., 2007). Demnach stellte sich die Frage, ob nach Ago2 Phosphorylierung die P-body Assemblierung generell gestört ist oder lediglich die Ago2 Lokalisation in P-bodies. Die Ergebnisse zeigen eine ungestörte P-body Assemblierung trotz Ago2 Phosphorylierung. Die Daten deuten auf eine funktionierende P-body Bildung hin. Dcp1a, als Marker für P-bodies, war weiterhin in den mit der Phosphomutanten transfizierten Neuronen in unveränderter Lokalisation zu finden (vgl. Abbildung 5-5). Daraus lässt sich ableiten, dass die Phosphorylierung lediglich die Ago2

Lokalisation in P-bodies stört. Die Experimente zur Lokalisationsanalyse wurden mittels Transfektion durchgeführt. Die Ergebnisse sind demnach mit Hilfe einer Überexpression von Ago2 erzielt worden. Dabei wurde in analogen wissenschaftlichen Arbeiten überwiegend ebenfalls Transfektionen durchgeführt (Lessel et al., 2020; Quevillon Huberdeau et al., 2017; Rüdell et al., 2011). Inwieweit sich endogenes Ago2 analog zu den gezeigten Ergebnissen verhält, bleibt offen.

Neuronen werden ständig umgebaut, Synapsen werden neu gebildet, verstärkt oder auch wieder destabilisiert. Demnach unterliegt die Zelle ständig wechselnden endogenen wie auch exogenen Stimuli. Die Stimulation des NMDA Rezeptors hat dabei Einfluss auf die Phosphorylierung von Ago2 und auch auf die Interaktion von Ago2 mit TNRC6. Gezeigt wurde dies bereits für die Phosphorylierung an Position S387 (Paradis-Isler & Boehm, 2018; Rajgor et al., 2018). Als ein möglicher indirekter Regulationsmechanismus der Phosphorylierung von eGFP-Ago2 in hippocampalen Neuronen kommt die neuronale Aktivität, im Sinne einer Stimulation bzw. Inhibition, infrage. Hierfür wurde ein initiales Experiment initiiert. Anhand der gezeigten Ergebnisse ergeben sich erste Hinweise darauf, dass eine Inhibition der neuronalen Aktivität generell zu einer vermehrten Lokalisation von Ago2 in P-bodies, unabhängig von der Phosphorylierung im Cluster S/T824:34, führt (vgl. Abbildung 5-6). Als mögliche Erklärung kommt infrage, dass bei Inhibition der Zellaktivität, der Pool an mRNAs, welche nicht translatiert werden, vergrößert wird und dadurch mehr RNAi erforderlich ist. Eindrücklich ist in den gezeigten Resultaten ebenfalls die Verminderung der Ago2 Lokalisation in P-bodies in der Erholungskondition. Dies war aber nur für Neurone, welche mit eGFP-Ago2 wt bzw. eGFP-Ago2 S/T824:34E transfiziert wurden, der Fall. Das unphosphorylierte Ago2, experimentell simuliert durch die Transfektion von eGFP-Ago2 S/T824:34A, erholte sich von der Inhibition nicht so deutlich und die Anzahl an Ago2 Partikeln blieb nahezu konstant. Nicht phosphoryliertes Ago2 bindet die Ziel-mRNAs, während genau diese Funktion bei Hyperphosphorylierung reduziert ist (R. J. Golden et al., 2017). In Anbetracht der gezeigten Ergebnisse stellt sich die Frage, ob eine Stimulation der Zelle physiologisch zu einer Hyperphosphorylierung, und damit einer verminderten Fähigkeit von Ago2 die Ziel-mRNAs zu binden, führt. Dies wiederum impliziert eine verminderte Lokalisation in P-bodies und damit einen größeren Pool an mRNAs, welche translatiert werden. Um diese Fragestellung näher zu beleuchten, bedarf es weiterer Experimente. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nur ein initialer Versuch einer neuronalen Stimulation mittels NMDA durchgeführt, welcher keine

signifikanten Ergebnisse brachte, lediglich die beschriebenen Tendenzen konnten aus den Ergebnissen abgeleitet werden.

Bezüglich der Lokalisationsanalyse der Phosphomutanten in hippocampalen Neuronen ist hervorzuheben, dass aktuell für weitere Ago2 Mutanten eine veränderte Lokalisation zu P-bodies detektiert wurde. Dies wurde spezifisch für dendritische P-bodies festgestellt (Lessel et al., 2020). Es zeigen sich zusammenfassend vermehrt Hinweise, dass in Neuronen die Phosphorylierung von Ago2 dessen Lokalisation in der Zelle bestimmt. Dies führt zu der These, dass posttranslationale Modifikationen von Ago2 die lokale Translation in Neuronen mitreguliert und damit die synaptische Plastizität beeinflusst.

6.2 Stau2 reguliert die Präsenz von Ago2 in P-bodies

Das menschliche Genom kodiert für über Tausend RBPs (Castello et al., 2012; Gerstberger, Hafner, & Tuschl, 2014) und nochmal so viele miRNAs (Kozomara & Griffiths-Jones, 2014). Beide sind unerlässlich zur Aufrechterhaltung einer balancierten Proteinexpression. So ist mittlerweile bekannt, dass RBPs und miRNAs in verschiedenster Weise interagieren (Iadevaia & Gerber, 2015; P. Jiang, Singh, & Collier, 2013). Es wurde in der Arbeit die Interaktion zwischen Stau2 und Ago2 näher beleuchtet. Dabei konnte gezeigt werden, dass das dsRBP Stau2 Einfluss auf die Ago2 Lokalisation in P-bodies hat. Eine Stau2 Reduktion führt zu einer verringerten Ago2 Präsenz in P-bodies (vgl. Abbildung 5-8). Im Rahmen dieser Arbeit wurden hierfür zwei unterschiedliche mögliche Ursachen erforscht. Initial wurde die These, dass die Überexpression einer Ago2 abhängigen shRNA zur Verdrängung von Ago2 aus P-bodies führt, adressiert. Hierfür wurden analog der Stau2 Reduktionsexperimente, Transfektionen mit den shRNAs gegen Pum2 bzw. HuR durchgeführt. Beide lieferten keine vergleichbaren Ergebnisse, so dass diese Erklärung verworfen wurde (vgl. Abbildung 5-10). Als zweite These wurde, basierend auf den Ergebnissen der Lokalisationsanalyse der Phosphomutanten, der Einfluss der Phosphorylierung von Ago2 im Cluster 824:34 untersucht. Dabei wurde die Vermutung aufgestellt, dass Stau2 den Phosphorylierungsstatus von Ago2 beeinflusst. Es ist bekannt, dass die Kinase CSNK1a für die Phosphorylierung und die Phosphatase ANKRD52-PP6C für die Dephosphorylierung von Ago2 in dem Cluster S/T824:34 verantwortlich sind (R. J. Golden et al., 2017). Stau2 könnte bei der

Regulation dieser Enzyme beteiligt sein. Allerdings wurde gezeigt, dass Stau2 unabhängig von der Phosphorylierung die Ago2-Lokalisation beeinflusst. Transfiziertes eGFP-Ago2 S/T824:34A zeigte ebenfalls eine reduzierte Lokalisation in P-bodies in Stau2 defizienten Neuronen (vgl. Abbildung 5-12). Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die Verdrängung von Ago2 aus P-bodies weder durch die reine Überexpression einer Ago2 abhängigen shRNA zu erklären ist noch reguliert Stau2 über Phosphorylierung die Ago2 Lokalisation. Beide Theorien wurden somit verworfen.

Allerdings zeigte sich mit Reduktion der Stau2 Proteinexpression neben einer reinen Lokalisationsänderung auch steigende Ago2 Protein Level (vgl. Abbildung 5-9). Stau2 stabilisiert durch die Bindung der Ziel-mRNAs diese (Heraud-Farlow et al., 2013; Kretz et al., 2013; Park, Gleghorn, & Maquat, 2013). Fehlt nun Stau2, steht ein neuer Pool an mRNAs zur Verfügung, welche möglicherweise von Ago2 gebunden werden können. Daraus resultierend ergibt sich die Vermutung einer gegensätzlichen Regulation der Ziel-mRNAs durch Stau2 und Ago2. Gezeigt werden konnte im Rahmen der Arbeit mit Hilfe der Immunpräzipitation, dass Ago2 durch Stau2 Reduktion mehr Interaktionspartner hat, was diese Theorie untermauert. Zu beachten ist, dass dies lediglich ein Ergebnis aus einem biologischen Replikat ist, da nur ein initiales Experiment zur Methodenaustestung und -etablierung im Rahmen dieses Projekts durchgeführt wurde. Um signifikante Ergebnisse zu bekommen, sollte dieses Experiment noch reproduziert werden. Allerdings unterstützt die gezeigte Immunpräzipitation auch weitere aktuelle Forschungsergebnisse. Weiterführende Experimente zeigen eine Verminderung der Translation in Stau2 defizitären Neuronen (Ehse et al., 2022). Zusammenfassend deuten die Ergebnisse daraufhin, dass Stau2 und Ago2 das Schicksal der mRNAs in gegensätzlicher Weise beeinflussen: Stau2 macht die Ziel-mRNAs für Ago2 und damit für die RISC Assemblierung unzugänglich und im Gegensatz dazu kann bei Abwesenheit von Stau2 Ago2 Stau2 Ziel-mRNAs binden und in der Translation inhibieren.

Werden die Ergebnisse betrachtet, stellte sich die Frage, ob dieser Effekt spezifisch für Ago2 ist oder auch andere Ago-Proteine betroffen sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sich auf Ago2 fokussiert, allerdings konnte durch arbeitsgruppeninterne Experimente gezeigt werden, dass Stau2 auch auf Ago1 den gezeigten Effekt hat. Dies spricht dafür, dass Stau2 nicht selektiv die Ago2 Lokalisation zu P-bodies beeinflusst, sondern generell die Assemblierung von Ago-Proteinen zu RNPs (Ehse et al., 2022).

6.3 Stau2 und Ago halten die neuronale Verzweigung im Gleichgewicht

Eine regulierte Proteinexpression im Gehirn ist von größter Bedeutung für die Aufrechterhaltung der neuronalen Homöostase. Dabei beeinflussen RBPs die posttranskriptionelle Genexpression. Die gezeigten Ergebnisse führen zu der Hypothese, dass Ago2 und Stau2 gegensätzliche Funktionen dabei einnehmen. So konnte an verschiedenen Stau2 Ziel-mRNAs gezeigt werden, dass eine Stau2 Depletion zu einer verringerten mRNA von bspw. Complexin führt. Durch Ago2 Depletion konnte dieser Effekt nahezu auf das Basislevel gerettet werden (vgl. Abbildung 5-15). Signifikanz konnte bei den gezeigten Ergebnissen auf Grund der hohen Streuung (noch) nicht erreicht werden. Nichts destotrotz lassen diese Ergebnisse eine unterschiedliche Funktion im Sinne von Gegenspielern vermuten. Eine Ausweitung der Versuche auf mehr Stau2 Ziel-mRNAs wäre bezüglich dieser Theorie wegweisend und sollte in zukünftigen Experimenten durchgeführt werden.

Dass Stau2 und Ago2 eine unterschiedliche Wirkung auf Neuronen haben, kann auch mit den Ergebnissen der Sholl-Analyse untermauert werden (vgl. Abbildung 5-17). Der Verlust von Stau2 führt zu einer Steigerung der Komplexität der neuronalen Dendriten, das heißt zu einem deutlich ausgeprägteren Verzweigungsgrad. Dem entgegensetzen ist die Wirkung des Ago1/2 Verlustes auf die Neurone. Dieser führt nämlich zu einer deutlichen Reduktion der Verzweigung. Bei Ausschaltung beider Proteine zeigt sich wieder die ursprüngliche Morphologie der Neurone. Interessant bei diesen Ergebnissen ist, dass ein alleiniges Ausschalten von Ago2 nicht ausreichend war, um den Effekt einer Verzweigungsreduktion zu erreichen. Erklärt werden kann dies durch zwei mögliche Denkansätze. Zum einen kann der Grund eine nicht vollständige Ago2 Reduktion durch die Überexpression einer shRNA gegen Ago2 sein. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse in den hippocampalen und kortikalen Neuronen unterstützt. Weder durch Transfektion noch durch Transduktion einer shRNA gegen Ago2 konnte eine signifikante Reduktion von den Ago2 Proteinlevels in den Neuronen erreicht werden (vgl. Abbildung 5-13, Abbildung 5-14). Zweitens könnte ein kompensatorischer Effekt von Ago1 vermutet werden, wenn Ago2 in der Expression reduziert wird. Gegen dieses Modell spricht jedoch, dass gezeigt werden konnte, dass durch die Überexpression von shAgo2 auch die Ago1 mRNA Level in den Neuronen sinken (vgl. Abbildung 5-15). Demnach widerspricht dies der Vermutung, dass Ago1 die Funktion von Ago2 übernimmt bzw. den Ausfall gegebenenfalls kompensiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die gezeigten Ergebnisse eine gegensätzliche Funktion von Ago2 und Stau2 auf die Ziel-mRNAs implizieren. Dabei ist ein mögliches Modell, dass Stau2 seine Ziel-mRNAs bindet. In Abwesenheit von Stau2 in den Neuronen stehen diese mRNAs der Zelle zur Verfügung. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die frei gewordenen mRNAs von Ago2 gebunden werden und die RISC Assemblierung initiiert wird. Resultierend daraus spielen Ago2 und Stau2 eine tragende Rolle in der komplexen Regulation der mRNA Translation und somit auch der synaptischen Plastizität in Neuronen.

7 Fazit

Ziel dieser Arbeit war zum einen die Charakterisierung der Ago2 Protein Lokalisation, unter Berücksichtigung der posttranslationalen Ago2-Modifikation, in hippocampalen Neuronen. Hierfür wurden bekannte Ago2-Mutanten transfiziert. Des Weiteren sollte die Interaktion zwischen Stau2 und Ago2 untersucht werden. Primär wurden hier hippocampale Neurone nach Stau2 Depletion untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte für das Phosphorylierungscluster S/T824:34, welches in der PIWI-Domäne von Ago2 lokalisiert ist, gezeigt werden, dass Phosphorylierung in Neuronen zu einer Verdrängung von Ago2 aus P-bodies führt, während in HEK 293T Zellen keine Lokalisationsänderung detektiert werden kann. Dabei sprechen die Ergebnisse dafür, dass selektiv Ago2 aus den P-bodies verdrängt wird, da auch nach Transfektion keine Änderung der Dcp1a bzw. RCK Lokalisation zu erkennen war. Beide Proteine sind etablierte P-body Marker. Zusammenfassend zeigt Ago2 nach Phosphorylierung im oben genannten Cluster eine reduzierte Präsenz in P-bodies. Als möglicher Regulationsmechanismus wurde die neuronale Aktivität vermutet. Initiale Experimente zeigten hier einen möglichen Einfluss.

Bezüglich der Interaktion zwischen Stau2 und Ago2 konnte gezeigt werden, dass das dsRBP Stau2 die zelluläre Ago2 Lokalisation beeinflusst. Durch Transfektion einer shRNA, welche gegen Stau2 gerichtet ist, und Kotransfektion von eGFP-Ago2 wurden Lokalisationsanalysen durchgeführt. Hier zeigte sich, dass durch die Abwesenheit von Stau2 die Ago2-Assemblierung in P-bodies unterdrückt ist. Mit weiterführenden Experimenten gelang der Nachweis, dass dieser Effekt nicht durch die reine Überexpression einer shRNA zustande kommt, sondern Stau2 spezifisch ist.

Abschließend galt es, Experimente durchzuführen, welche eine funktionelle Eingliederung erlauben. Hierfür wurde zum einen die Methode der eGFP-Ago2 Immunpräzipitation etabliert, zum anderen wurden Rgs4 und Complexin als Stau2 Ziel-mRNAs untersucht. Bei ersterem zeigte sich eine Zunahme der Ago2-Protein-Protein Interaktion in Stau2 defizienten Neuronen. Letzteres führte durch die gegensätzlichen Effekte von Stau2 und Ago2 Reduktion zur These, dass Stau2 Ziel-mRNAs in Abwesenheit von Stau2 von Ago2 gebunden werden. Diese wird auch durch die Ergebnisse der Immunpräzipitation unterstützt. In diesem Zusammenhang zeigten sich morphologische Unterschiede in hippocampalen Neuronen nach Stau2 bzw. Ago Reduktion. Mit Hilfe der Sholl-Analyse konnte diesbezüglich

gezeigt werden, dass Stau2 defizitäre Neurone einen deutlich stärkeren Verzweigungsgrad aufweisen als die Neuronen, welche mit der Kontrolle transfiziert wurden. Eine Ago1/2 Reduktion führte zu einem gegensätzlichen Effekt. Ago1/2 defiziente Neurone zeigten ein geringeres Verzweigungsmuster. Bei Transfektion mit shRNA gegen sowohl Ago1/2 als auch gegen Stau2 konnte der ursprüngliche Phänotyp wiederhergestellt werden.

Aufgrund der erhobenen Ergebnisse zeigt sich eine gegenseitige Abhängigkeit von Stau2 und Ago2, welche entscheidend ist für die so wichtige neuronale Homöostase in Nervenzellen.

8 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten ergaben neue Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen. Die gezeigten Ergebnisse zur Lokalisationsanalyse wurden mit Hilfe von Transfektion und damit mit Hilfe einer Überexpression von Ago2 und dessen Phosphomutanten erzeugt. Bedeutsam wären diesbezüglich Experimente zum Verhalten von endogenem Ago2 in hippocampalen Neuronen. Hier wären valide Antikörper gegen endogenes Ago2, sowie selektiv phosphoryliertes bzw. unphosphoryliertes Ago2 unerlässlich.

Weiterhin treten deutliche Unterschiede in der Lokalisation von eGFP-Ago2 S/T824:34E in HEK 293T Zellen und hippocampalen Neuronen auf. Die hier gezeigten Experimente zur neuronalen Stimulierung bzw. Inhibierung legen einen Regulationsmechanismus in Neuronen über endogene neuronale Aktivität nahe. Weiterführende Experimente auch unter Berücksichtigung von Regulationsmechanismen der Kinase CSNK1a und Phosphatase ANKRD52-PP6C könnten hier vielversprechend und zielführend sein.

Zudem deuten die gezeigten Daten darauf hin, dass Stau2 die Interaktion von Ago2 mit seinen Bindungspartnern beeinflusst. Immunpräzipitationen der assoziierten Proteine brachten hier erste Erkenntnisse. Diese Methode in weiteren Experimenten zu forcieren, sowie die genaue Analyse der Ago2 Interaktionspartner in Stau2 defizienten Neuronen sind lohnenswerte Experimente für die Zukunft, um den Einfluss von Stau2 auf Ago2 in der Zelle und die daraus resultierenden physiologischen Konsequenzen besser verstehen zu können.

9 Anhang

9.1 Antikörper

Tabelle 9.1 Liste der primären Antikörper

Antigen	Ursprung	Hersteller	Verdünnung f. Immunfärbung	Verdünnung f. Western Blot
α -Tubulin	Maus, monoklonal	Sigma-Aldrich		1:5000
β -Actin	Maus, monoklonal	Sigma-Aldrich		1:1000
Ago2	Maus, monoklonal	Sigma	1:500	1:500
Ago2	Hase, monoklonal	Cell Signaling Technology		1:1000
Dcp1a	Maus, polyklonal	Abnova	1:500	
Dcp1a	Maus, monoklonal	Sigma-Aldrich	1:500	
GFP	Maus, monoklonal			1:1000
GW182	Maus, monoklonal		1:10 – 1:100	1:10
Pum2	Ratte, polyklonal	Abcam (ab10361)	1:500	
RCK (DDX6)	Ziege, polyklonal	Abnova	1:500	
RCK (DDX6)	Hase, polyklonal	MBL	1:500	
Stau2 – H22	Hase, polyklonal	Kiebler Lab	1:500	
Stau2 – H7	Hase polyklonal	Kiebler Lab	1:500	1:1000

Anhang

Tabelle 9.2: Liste der fluoreszierenden Sekundärantikörper

Antigen	Spezies	Konjugation	Firmer	Verdünnung f. Immunfärbung
Hase (#20)	Esel	Alexa 647	Molecular Probes (LifeTechnologies)	1:500
Hase (#21)	Esel	Alexa 555	Molecular Probes (LifeTechnologies)	1:1000
Maus (#17)	Esel	Alexa 647	Molecular Probes (LifeTechnologies)	1:500
Maus (#3)	Esel	Alexa 488	Life technologies	1:1000
Ziege (#15)	Kalb	Cy3	Dianova	1:1000

9.2 Primer und Plasmide

Tabelle 9.3 Liste der verwendeten qPCR Primer

Gen	Spezies	Primername	Effizienz	Sequenz 5' nach 3'
Ago1	Ratte	Ago1 rat qPCR fwd1 Ago1 rat qPCR rev1	2,02	CAACATCACTCACCCGTTTG GCAGGTGCTGGGATAGAGAC
Ago2	Ratte	Ago2_fwd Ago2_rev	2,02	ACAAGCTGGTTTTGCGCTAC TTGCTGATCTCCTCTTGCCG
Calm3	Ratte/ Maus	Calm3 F1 Calm3 R1	2,0	ACAGCGAGGAGGAGATACGA CATAATTGACCTGGCCGTCT
Camk2a	Ratte/ Maus	Camk2a for (kosik) rat Camk2a rev (kosik) rat	1,98	AAACTGAAGGGAGCCATCCT TCCATTGCTTATGGCTTCGATC
Complexin 1	Ratte	Cplex F1 Cplex R1	1,91	GAGGCAGAACGTGAGGTCAT GAGTCAGGCTGCCTTCTGAG
Dcp1a	Ratte	Dcp1a rat qPCR fwd1 Dcp1a rat qPCR rev1	2,1	CCACCCCTGAGAGCTTCATA CACCTTAGGCTGGGCAAATA
PPIa	Ratte/ Maus	PP1A_qPCR_for PP1A_qPCR_rev	1,94	GTCAACCCACCGTGTCTT CTGCTGTCTTTGGAACCTTG
Rgs4	Ratte/ Maus	rgs4 rat fwd1 rgs4 rat rev1	1,93	AGTCCAAGGCCAAGAAGAT AACATGTTCCGGCTTGCTC
RhoA	Ratte/ Maus	RhoA-Luci_for RhoA-Luci_rev	2,03	AAGGACCAGTCCCAGAGGT TGCCAGCTGTGTCCATAA
Stau2	Ratte/ Maus	Stau2 F2 Stau2 R2	1,96	GAACATCTCCTGCTGCTGAAG ATCCTTGCTAAATATCCAGTTGT

Tabelle 9.4 Liste der lentiviralen Konstrukte

Konstrukt	Vektor	Virusnummer	Spezies
Fu3a H1-shAgo1 pCamKIIa-tagRFP	AD422 FU3a	V51	Maus
Fu3a H1-shAgo2 pCamKIIa-tagRFP	Fu3a pCamKIIa tagRFP	V40	Mensch
Fu3a H1-shNTC pCamKIIa-tagRFP	Fu3a pCamKIIa tagRFP	V29	Maus
Fu3a H1-shPum2 pCamKIIa-tagRFP	Fu3a pCamKIIa tagRFP	V31	Maus/Ratte
Fu3a H1-shStau2-2 pCamKIIa-tagRFP	Fu3a pCamKIIa tagRFP	V30	Maus/Ratte
FU3a pCMV-eGFP- Ago2	AD422 FU3a	V48	Mensch
FU3a pCMV-eGFP- Ago2 824:34 A	AD422 FU3a	V49	Mensch
FU3a pCMV-eGFP- Ago2 824:34 E	AD422 FU3a	V50	Mensch

Tabelle 9.5 Liste der DNA-Plasmide

Konstrukt	Vektor	Plasmidnummer	Spezies
pCMV-eGFP-Ago2 A620W L694W	pEGFP-C3	#492	Mensch
pCMV-eGFP-Ago2 wt	pEGFP-C3	#489	Mensch
pCMV-eGFP-Ago2-824- 34A	pEGFP-C3	#490	Mensch
pCMV-eGFP-Ago2-824- 34E	pEGFP-C3	#491	Mensch
pCMV-eGFP-Ago2wt- shresistant	pEGFP-C3	#532	Mensch
pEGFP-N3	pEGFP	#75	
pEGFPstop-C2	pEGFP-C2	#202	
pSuperior-tagBFP- shAgo2	pSuperior	#536	Ratte
pSuperior-tagBFP-shHuR	pSuperior	#537	Ratte
pSuperior-TagBFP-shNTC	pSuperior	#345	
pSuperior-TagBFP- shStau2-2	pSuperior	#346	Ratte
pTagRFP-Staufen2 (62kDa rescue)	pTagRFP	#519	Maus

shStau2-2	pSuperior	#15	Ratte
siNTC (sh-control2)	pSuperior	#12	
TagRFP-C	pTagRFP	#67	

Tabelle 9.6 Liste der shRNA Sequenzen

Konstrukt	Sequenz
shAgo2	GTTTCGTGAATTTGGGATCATTGTACAATGATCCCAAATTCACGAACA
shNTC	GATCCCCCTCCAAAGTTCGAATGGTTTTCAAGAGAAACCATTTCGAACTTTGGAGG GGGATCTA
shHuR	GAAGAGGCAATTACCAGTTTCATTCAAGAGATGAAACTGGTAATTGCCTCTTC
shStau2-2 (Goetze et al., 2006)	GATCCCCGATATGAACCAACCTTCAATTCAAGAGATTGAAGGTTGGTTCATATCTT TTTGGAAA
shPum2	ACCAAGTTGGTCTGGATTC

9.3 Lösungen und Medien

Tabelle 9.7 Rezeptur der Lösungen und Medien

Lösungen	Substanzen
100% Blockierungslösung	10x PBS 2% fetales Kalbserum (BSA) 2% FCS 0,2% Fischhaut Gelatine in Wasser
2x BES-gepufferte Kochsalzlösung (BBS) pH=7,15 - 7,2	50 mM BES (N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic Säure) 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ 280 mM NaCl ₂
DMEM + FCS medium (für 500 ml)	Dulbeco's modified Eagle's medium (DMEM) 5 ml GlutaMAX supplement 5 ml Pyruvate 10% FCS
HBSS (Transfektion) pH=7,3	135 mM NaCl ₂ 20 nM HEPES 4 mM KCl 1mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM CaCl ₂

	1mM MgCl ₂ 10 mM D-glucose
Immunpräzipitation Washing Puffer; übernommen von (Rajgor et al., 2018)	10 mM Tris 150 mM NaCl ₂ 0,5mM EDTA
Immunpräzipitation Lyse Puffer übernommen von (Rajgor et al., 2018)	10 mM Tris 150 mM NaCl ₂ , 0,5 mM EDTA 0,4% NP40 Protease Inhibitor
NMEM + B27 (für 150 ml)	25 ml 10 x Minimal Essential Medium (MEM) 5 ml 1x B27 supplement 10 ml NaHCO ₃ 5,5% 7,5 ml Glucose 20% 2,5 ml Pyruvate 1,1% 2,5 ml L-Glutamin
Paraformaldehyde (PFA)	16% PFA in HBSS (pH 7,4)
PBS-Tween (0,1%)	PBS + 0,1% Tween
SDS gel-running buffer (10x)	250 mM Tris 1,92 M Glycin 1% SDS
Transfektionsmedium pH=7,4	10xMEM 1 mM sodium pyruvate 15 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1- piperazineethanesulfonic Säure) 2 mM L-glutamine 1x B27 supplement 33 mM D-glucose 20%
Western Blot Blockierungslösung	1x TBS pH 7,6 2% BSA 0,1% Tween 20 0,1% Na Azide
Western Blot Puffer (10x)	250 mM Tris 1.92 M Glycin Für 1x Verdünnung wurden 20% Methanol zugefügt

9.4 Geräte

Tabelle 9.8 Verwendete Geräte

Kategorie	Beschreibung
Zentrifuge	Eppendorf centrifuge 5430
Zentrifuge	Eppendorf centrifuge 5417 R
Zentrifuge	Thermo Scientific Multifuge X3R centrifuge
Fluoreszenz Scanner	Li-COR Odyssey
Spectrophotometer	Thermo Scientific Nano Drop 2000c
Thermocycler	Bio Rad s100 Thermal Cycler
Mikroskop	Zeiss Z1 Axio Observer 63x Plan-Apochromat Ölimmersionsobjektiv Lichtquelle: COLIBRI.2 LED und HXP 120 C Kamera: AxioCam 506 mono
qPCR System	Light Cycler® 96 (Roche)

9.5 Software

Tabelle 9.9 Liste der verwendeten Softwares

Software	Verwendung
ApE-A plasmid Editor v2.0	Plasmidkarten und Klonierungen
Image Studio™ Lite	Quantifizierung der Intensität der Western Blot Banden
Image J Fiji	Quantifizierung der Ago2/Dcp1a und RCK Partikels und Sholl-Analyse
Zeis ZEN	Quantifizierung der Fluoreszenz (Proteinexpression) in Neuronen
Prism GraphPad	Erstellen der Diagramme und Graphen
Affinity Designer	Erstellen der Abbildungen
Light Cycler 96 Roche	Quantifizierung der q-PCR
EndNote X9	Literaturverwaltung
Microsoft Excel	Analyse der Daten und Signifikanztestungen

9.6 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 2-1 Schematische Darstellung des neuronalen mRNA Transports und der lokalen Translation an Synapsen (modifiziert nach (Doyle & Kiebler, 2011))</i>	4
<i>Abbildung 2-2 Struktur von humanem Argonate 2</i>	9
<i>Abbildung 2-3: Schematische Darstellung der Ago2 Phosphomutanten</i>	14
<i>Abbildung 5-1 Lichtmikroskopische Aufnahmen von transfizierten HEK 293T Zellen und Neuronen</i> ...	36
<i>Abbildung 5-2 Partikuläre Lokalisation von eGFP-Ago2 in HEK 293T Zellen und hippocampalen Neuronen</i>	37
<i>Abbildung 5-3 Kolokalisation von eGFP-Ago2 mit den P-body Markern RCK und Dcp1a</i>	38
<i>Abbildung 5-4 Unterschiedliche Lokalisation der eGFP-Ago2 Phosphomutanten in Neuronen</i>	40
<i>Abbildung 5-5 EGFP-Ago2 unabhängige Lokalisation des P-body Markers Dcp1a</i>	42
<i>Abbildung 5-6 Inhibierung der neuronalen Aktivität führt zu einer Anreicherung von eGFP-Ago2 in P-bodies</i>	44
<i>Abbildung 5-7 shStau2 vermittelte Reduktion der Stau2 Expression</i>	47
<i>Abbildung 5-8 Stau2 reguliert eGFP-Ago2 Lokalisation in hippocampalen Neuronen</i>	49
<i>Abbildung 5-9 Reduktion von Stau2 beeinflusst nicht die P-body Assemblierung in hippocampalen Neuronen</i>	51
<i>Abbildung 5-10 Pum2 und HuR beeinflussen nicht die eGFP-Ago2 Lokalisation in hippocampalen Neuronen</i>	54
<i>Abbildung 5-11 Reorganisation der eGFP-Ago2 Partikel nach Stau2 Überexpression</i>	58
<i>Abbildung 5-12 Stau2 Regulation der eGFP-Ago2 Lokalisation in hippocampalen Neuronen ist unabhängig von der eGFP-Ago2 Phosphorylierung</i>	60
<i>Abbildung 5-13 Quantitative Bestimmung der Ago2 Depletion</i>	62
<i>Abbildung 5-14 EGFP-Ago2 Partikel nach Ago2 Reduktion in hippocampalen Neuronen</i>	64
<i>Abbildung 5-15 Doppelte Reduktion von shStau2 und shAgo2 und Auswirkung auf Stau2 Ziel-mRNAs</i>	66
<i>Abbildung 5-16 Immunpräzipitation von eGFP in kortikalen Neuronen (Pilotprojekt)</i>	68
<i>Abbildung 5-17 Stau2 beeinflusst neuronales Dendritenwachstum</i>	71

9.7 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 2.1 Klassen von kleinen regulatorischen RNAs und ihre Funktion. Übernommen und angepasst nach Chu & Rana, 2007</i>	7
<i>Tabelle 4.1 Primer Mastermix für die cDNA Synthese</i>	30
<i>Tabelle 4.2 Mastermix 2 für die cDNA Synthese</i>	31
<i>Tabelle 4.3 SYBR Green Mastermix</i>	31
<i>Tabelle 4.4 Primer Mastermix</i>	32

<i>Tabelle 4.5 Ablauf der qPCR.....</i>	<i>32</i>
<i>Tabelle 9.1 Liste der primären Antikörper.....</i>	<i>83</i>
<i>Tabelle 9.2: Liste der fluoreszierenden Sekundärantikörper.....</i>	<i>84</i>
<i>Tabelle 9.3 Liste der verwendeten qPCR Primer.....</i>	<i>84</i>
<i>Tabelle 9.4 Liste der lentiviralen Konstrukte.....</i>	<i>85</i>
<i>Tabelle 9.5 Liste der DNA-Plasmide.....</i>	<i>85</i>
<i>Tabelle 9.6 Liste der shRNA Sequenzen.....</i>	<i>86</i>
<i>Tabelle 9.7 Rezeptur der Lösungen und Medien.....</i>	<i>86</i>
<i>Tabelle 9.8 Verwendete Geräte.....</i>	<i>88</i>
<i>Tabelle 9.9 Liste der verwendeten Softwares.....</i>	<i>88</i>

10 Literaturverzeichnis

- Aizer, A., & Shav-Tal, Y. (2008). Intracellular trafficking and dynamics of P bodies. *Prion*, 2(4), 131-134. doi:10.4161/pri.2.4.7773
- Albright, T. D., Jessell, T. M., Kandel, E. R., & Posner, M. I. (2000). Neural science: A century of progress and the mysteries that remain. *Cell* 100, S1-S55. doi:10.1016/s0896-6273(00)80912-5
- Andrei, M. A., Ingelfinger, D., Heintzmann, R., Achsel, T., Rivera-Pomar, R., & Luhrmann, R. (2005). A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. *RNA*, 11(5), 717-727. doi:10.1261/rna.2340405
- Aravin, A., Gaidatzis, D., Pfeffer, S., Lagos-Quintana, M., Landgraf, P., Iovino, N., . . . Tuschl, T. (2006). A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature*, 442(7099), 203-207. doi:10.1038/nature04916
- Bartel, D. P. (2018). Metazoan MicroRNAs. *Cell*, 173(1), 20-51. doi:10.1016/j.cell.2018.03.006
- Bauer, K. E., Segura, I., Gaspar, I., Scheuss, V., Illig, C., Ammer, G., . . . Kiebler, M. A. (2019). Live cell imaging reveals 3'-UTR dependent mRNA sorting to synapses. *Nat. Commun*, 10(1), 3178. doi:10.1038/s41467-019-11123-x
- Bohmert K., C., I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M., Benning, C. (1998). AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. *EMBO J*, 17(1), 170-180. doi:10.1093/emboj/17.1.170
- Boland, A., Huntzinger, E., Schmidt, S., Izaurralde, E., & Weichenrieder, O. (2011). Crystal structure of the MID-PIWI lobe of a eukaryotic Argonaute protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108(26), 10466-10471. doi:10.1073/pnas.1103946108
- Brenques, M., Teixeira, D., & Parker, R. (2005). Movement of Eukaryotic mRNAs Between Polysomes and Cytoplasmic Processing Bodies. *Science*, 310(5747), 486-489. doi:10.1126/science.1115791
- Carmell, M. A., Xuan, Z., Zhang, M. Q., & Hannon, G. J. (2002). The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev*, 16(21), 2733-2742. doi:10.1101/gad.1026102
- Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4), 642-655. doi:10.1016/j.cell.2009.01.035

- Castello, A., Fischer, B., Eichelbaum, K., Horos, R., Beckmann, B. M., Strein, C., . . . Hentze, M. W. (2012). Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins. *Cell*, *149*(6), 1393-1406. doi:10.1016/j.cell.2012.04.031
- Chekulaeva, M., & Filipowicz, W. (2009). Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Curr Opin Cell Biol*, *21*(3), 452-460. doi:10.1016/j.ceb.2009.04.009
- Chu, C., & Rana, T. (2007). Small RNAs: Regulators and guardians of the genome. *J. Cell. Physio.*, *213*(2), 412-419. doi:10.1002/jcp.21230
- Cougot, N., Babajko, S., & Seraphin, B. (2004). Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *J. Cell Biol*, *165*(1), 31-40. doi:10.1083/jcb.200309008
- Cougot, N., Bhattacharyya, S. N., Tapia-Arancibia, L., Bordonne, R., Filipowicz, W., Bertrand, E., & Rage, F. (2008). Dendrites of mammalian neurons contain specialized P-body-like structures that respond to neuronal activation. *J Neurosci*, *28*(51), 13793-13804. doi:10.1523/JNEUROSCI.4155-08.2008
- Dahm, R., & Kiebler, M. (2005). Cell biology: silenced RNA on the move. *Nature*, *438*, 432-435. doi:10.1038/438432a
- De Vries, L., Zheng, B., Fischer, T., Elenko, E., & Farquhar, M. G. (2000). The regulator of G Protein signaling family. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, *40*, 235-271. doi:10.1146/annurev.pharmtox.40.1.235.
- Denli, A. M., & Hannon, G. J. (2003). RNAi: an ever-growing puzzle. *Trends Biochem Sci*, *28*(4), 196-201. doi:10.1016/s0968-0004(03)00058-6
- Doench, J. G., Petersen, C. P., & Sharp, P. A. (2003). siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev*, *17*(4), 438-442. doi:10.1101/gad.1064703
- Doyle, M., & Kiebler, M. A. (2011). Mechanisms of dendritic mRNA transport and its role in synaptic tagging. *EMBO J*, *30*(17), 3540-3552. doi:10.1038/emboj.2011.278
- Duchaîne, T. F., Hemraj, I., Furic, L., Deitinghoff, A., Kiebler, M., & DesGroseillers, L. (2002). Stauf2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles. *J Cell Sci*, *115*(16), 3285-3295. doi:10.1242/jcs.115.16.3285
- Ehse, J., Fernandez-Moya, S. M., Schroger, L., & Kiebler, M. A. (2021). Synergistic regulation of Rgs4 mRNA by HuR and miR-26/RISC in neurons. *RNA Biol*, *18*(7), 988-998. doi:10.1080/15476286.2020.1795409

- Ehse, J., Schlegel, M., Schroger, L., Schieweck, R., Derdak, S., Bilban, M., . . . Kiebler, M. A. (2022). The dsRBP Staufen2 governs RNP assembly of neuronal Argonaute proteins. *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/gkac487
- Elbashir, S. M., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, 15(2), 188-200. doi:10.1101/gad.862301
- Ender, C., & Meister, G. (2010). Argonaute proteins at a glance. *J Cell Sci*, 123(Pt 11), 1819-1823. doi:10.1242/jcs.055210
- Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., & Izaurralde, E. (2007). P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(1), 9-22. doi:10.1038/nrm2080
- Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., Schweizer, D., & Izaurralde, E. (2007). P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol*, 27(11), 3970-3981. doi:10.1128/MCB.00128-07
- Eulalio, A., Huntzinger, E., Nishihara, T., Rehwinkel, J., Fauser, M., & Izaurralde, E. (2009). Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *RNA*, 15(1), 21-32. doi:10.1261/rna.1399509
- Fernandez-Moya, S. M., Bauer, K. E., & Kiebler, M. A. (2014). Meet the players: local translation at the synapse. *Front Mol Neurosci*, 7, 84. doi:10.3389/fnmol.2014.00084
- Finnegan, E. J., & Matzke, M. A. (2003). The small RNA world. *J Cell Sci*, 116(Pt 23), 4689-4693. doi:10.1242/jcs.00838
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M., Kostas, S., Driver, S., & Mello, C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806-811. doi:10.1038/35888
- Fitzgerald, K., White, S., Borodovsky, A., Bettencourt, B. R., Strahs, A., Clausen, V., . . . Simon, A. (2017). A Highly Durable RNAi Therapeutic Inhibitor of PCSK9. *N Engl J Med*, 376(1), 41-51. doi:10.1056/NEJMoa1609243
- Fritzsche, R., Karra, D., Bennett, K. L., Ang, F. Y., Heraud-Farlow, J. E., Tolino, M., . . . Kiebler, M. A. (2013). Interactome of two diverse RNA granules links mRNA localization to translational repression in neurons. *Cell Rep*, 5(6), 1749-1762. doi:10.1016/j.celrep.2013.11.023
- Gerstberger, S., Hafner, M., & Tuschl, T. (2014). A census of human RNA-binding proteins. *Nat Rev Genet*, 15(12), 829-845. doi:10.1038/nrg3813

- Girard, A., Sachidanandam, R., Hannon, G. J., & Carmell, M. A. (2006). A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature*, *442*(7099), 199-202. doi:10.1038/nature04917
- Goetze, B., Grunewald, B., Baldassa, S., & Kiebler, M. (2004). Chemically controlled formation of a DNA/calcium phosphate coprecipitate: application for transfection of mature hippocampal neurons. *J Neurobiol*, *60*(4), 517-525. doi:10.1002/neu.20073
- Goetze, B., Tuebing, F., Xie, Y., Dorostkar, M. M., Thomas, S., Pehl, U., . . . Kiebler, M. A. (2006). The brain-specific double-stranded RNA-binding protein Stauf2 is required for dendritic spine morphogenesis. *J Cell Biol*, *172*(2), 221-231. doi:10.1083/jcb.200509035
- Golden, D. E., Gerbasi, V. R., & Sontheimer, E. J. (2008). An inside job for siRNAs. *Mol Cell*, *31*(3), 309-312. doi:10.1016/j.molcel.2008.07.008
- Golden, R. J., Chen, B., Li, T., Braun, J., Manjunath, H., Chen, X., . . . Mendell, J. T. (2017). An Argonaute phosphorylation cycle promotes microRNA-mediated silencing. *Nature*, *542*(7640), 197-202. doi:10.1038/nature21025
- Grivna, S. T., Beyret, E., Wang, Z., & Lin, H. (2006). A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. *Genes Dev*, *20*(13), 1709-1714. doi:10.1101/gad.1434406
- Heraud-Farlow, J. E., Sharangdhar, T., Li, X., Pfeifer, P., Tauber, S., Orozco, D., . . . Kiebler, M. A. (2013). Stauf2 regulates neuronal target RNAs. *Cell Rep*, *5*(6), 1511-1518. doi:10.1016/j.celrep.2013.11.039
- Höck, J., & Meister, G. (2008). The Argonaute protein family. *Genome Biol*, *9*(2), 210. doi:10.1186/gb-2008-9-2-210
- Hoy, S. M. (2018). Patisiran: First Global Approval. *Drugs*, *78*(15), 1625-1631. doi:10.1007/s40265-018-0983-6
- Huntzinger, E., & Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet*, *12*(2), 99-110. doi:10.1038/nrg2936
- Hutvagner, G., & Simard, M. J. (2008). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *9*(1), 22-32. doi:10.1038/nrm2321
- Hutvagner, G., & Zamore, P. D. (2002). A microRNA in a Multiple-Turnover RNAi Enzyme Complex. *Science*, *297*(5589), 2056-2060. doi:10.1126/science.1073827

- Iadevaia, V., & Gerber, A. P. (2015). Combinatorial Control of mRNA Fates by RNA-Binding Proteins and Non-Coding RNAs. *Biomolecules*, 5(4), 2207-2222. doi:10.3390/biom5042207
- Ingelfinger, D., Arndt-Jovin, D. J., Luhrmann, R., & Achsel, T. (2002). The human LSm1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrnl in distinct cytoplasmic foci. *RNA*, 8, 1489-1501. doi:10.1017/S1355838202021726
- Iwasaki, Y. W., Siomi, M. C., & Siomi, H. (2015). PIWI-Interacting RNA: Its Biogenesis and Functions. *Annu Rev Biochem*, 84, 405-433. doi:10.1146/annurev-biochem-060614-034258
- Javier Martinez, A. P., Henning Urlaub, Reinhard Lührmann,, & Tuschl, a. T. (2002). Single-Stranded Antisense siRNAs Guide Target RNA Cleavage in RNAi. *Cell Press*. doi:10.1016/s0092-8674(02)00908-x
- Jee, D., & Lai, E. C. (2014). Alteration of miRNA activity via context-specific modifications of Argonaute proteins. *Trends Cell Biol*, 24(9), 546-553. doi:10.1016/j.tcb.2014.04.008
- Jiang, C., & Schuman, E. M. (2002). Regulation and function of local protein synthesis in neuronal dendrites. *Trends Biochem Sci*, 27(10). doi:10.1016/S0968-0004(02)02190-4
- Jiang, P., Singh, M., & Collier, H. A. (2013). Computational assessment of the cooperativity between RNA binding proteins and MicroRNAs in Transcript Decay. *PLoS Comput Biol*, 9(5), e1003075. doi:10.1371/journal.pcbi.1003075
- Jin, S., Zhan, J., & Zhou, Y. (2021). Argonaute proteins: structures and their endonuclease activity. *Mol Biol Rep*, 48(5), 4837-4849. doi:10.1007/s11033-021-06476-w
- Kaech, S., & Banker, G. (2006). Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc*, 1(5), 2406-2415. doi:10.1038/nprot.2006.356
- Kang, H., & Schuman, E. M. (1996). A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity. *Science*, 273, 1402-1406. doi:10.1126/science.273.5280.1402
- Kawamata, T., & Tomari, Y. (2010). Making RISC. *Trends Biochem Sci*, 35(7), 368-376. doi:10.1016/j.tibs.2010.03.009
- Kempermann, G. (2016). *Die Revolution im Kopf - Wie neue Nervenzellen unser Gehirn ein Leben lang jung halten*: Droemer.

- Khvorova, A., Reynolds, A., & Jayasena, S. D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs Exhibit Strand Bias. *Cell*, *115*, 209-216. doi:10.1016/S0092-8674(03)00801-8
- Kiebler, M. A., & Bassell, G. J. (2006). Neuronal RNA granules: movers and makers. *Neuron*, *51*(6), 685-690. doi:10.1016/j.neuron.2006.08.021
- Kiebler, M. A., Hemraj, I., Verkade, P., Köhrmann, M., Fortes, P., Marión, R., . . . Dotti, C. (1999). The Mammalian Staufen Protein Localizes to the Somatodendritic Domain of Cultured Hippocampal Neurons- Implications for Its Involvement in mRNA Transport *J. Neurosci.*, *19*(1), 288-297. doi:10.1523/jneurosci.19-01-00288.1999
- Kiebler, M. A., Jansen, R. P., Dahm, R., & Macchi, P. (2005). A putative nuclear function for mammalian Staufen. *Trends Biochem Sci*, *30*(5), 228-231. doi:10.1016/j.tibs.2005.03.005
- Kim, V. N. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *6*(5), 376-385. doi:10.1038/nrm1644
- Kim, V. N., Han, J., & Siomi, M. C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *10*(2), 126-139. doi:10.1038/nrm2632
- Kobayashi, H., & Tomari, Y. (2016). RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins. *Biochim Biophys Acta*, *1859*(1), 71-81. doi:10.1016/j.bbagr.2015.08.007
- Köhrmann, M., Luo, M., Kaether, C., DesGroseillers, L., Dotti, C., & Kiebler, M. (1999). Microtubule-dependent Recruitment of Staufen-Green Fluorescent Protein into Large RNA-containing Granules and Subsequent Dendritic Transport in Living Hippocampal Neurons. *Mol Biol Cell*, *10*, 2945-2953. doi:10.1091/mbc.10.9.2945
- Kozomara, A., & Griffiths-Jones, S. (2014). miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res*, *42*(Database issue), D68-73. doi:10.1093/nar/gkt1181
- Kretz, M., Siprashvili, Z., Chu, C., Webster, D. E., Zehnder, A., Qu, K., . . . Khavari, P. A. (2013). Control of somatic tissue differentiation by the long non-coding RNA TINCR. *Nature*, *493*(7431), 231-235. doi:10.1038/nature11661
- Kristen, A. V., Ajroud-Driss, S., Caounceição, I., Gorevic, P., Kyriakides, T., & Obici, L. (2019). Patisiran, an RNAi therapeutic for the treatment of hereditary transthyretin-mediated amyloidosis. *Neurodegener. Dis. Manag.* , *9*, 5-23. doi:10.2217/nmt-2018-0033

- Kwak, P. B., & Tomari, Y. (2012). The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nat Struct Mol Biol*, 19(2), 145-151. doi:10.1038/nsmb.2232
- L. Cerutti, N. M., A. Bateman. (2000). Domains in gene silencing and cell differentiation proteins- the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends Biochem Sci*, 25(10), 481-482. doi:10.1016/S0968-0004(00)01641-8
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*, 23(20), 4051-4060. doi:10.1038/sj.emboj.7600385
- Lessel, D., Zeitler, D. M., Reijnders, M. R. F., Kazantsev, A., Hassani Nia, F., Bartholomäus, A., . . . Kreienkamp, H. J. (2020). Germline AGO2 mutations impair RNA interference and human neurological development. *Nat Commun*, 11(1), 5797. doi:10.1038/s41467-020-19572-5
- Li, Y., Estep, J. A., & Karginov, F. V. (2018). Transcriptome-wide Identification and Validation of Interactions between the miRNA Machinery and HuR on mRNA Targets. *J Mol. Biol.*, 430(3), 285-296. doi:10.1016/j.jmb.2017.12.006
- Lian, S., Jakymiw, A., Eystathioy, T., Hamel, J. C., Fritzler, M. J., & Chan, E. K. (2006). GW bodies, microRNAs and the cell cycle. *Cell Cycle*, 5(3), 242-245. doi:10.4161/cc.5.3.2410
- Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E., & Sattler, M. (2003). Structure and nucleic-acid binding of the Drosophila Argonaute 2 PAZ domain. *Nature*, 426(6965), 465-469. doi:doi:10.1038/nature02123
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M. A., Hannon, G. J., & Parker, R. (2005). MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol*, 7(7), 719-723. doi:10.1038/ncb1274
- Lui, J., Carmell, M. A., Rivas, F. V., Marsden, C. G., Thomson, J. M., Song, J. J., . . . Hannon, G. J. (2004). Argonaute2 Is the Catalytic Engine of Mammalian RNAi. *Science*, 305(5689), 1437-1441. doi:10.1126/science.1102513
- Lykke-Andersen, J. (2002). Identification of a human decapping complex associated with hUpf proteins in nonsense-mediated decay. *Mol Cell Biol*, 22(23), 8114-8121. doi:10.1128/mcb.22.23.8114-8121.2002
- Ma, J. B., Yuan, Y. R., Meister, G., Pei, Y., Tuschl, T., & Patel, D. J. (2005). Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the A. fulgidus Piwi protein. *Nature*, 434(7033), 666-670. doi:10.1038/nature03514

- Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D. P., & Zamore, P. D. (2005). Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell*, *123*(4), 607-620. doi:10.1016/j.cell.2005.08.044
- McMahon, H. T., Missler, M., Li, C., & Südhof, T. C. (1995). Complexins: Cytosolic proteins that regulate SNAP receptor function *Cell*, *83*(1), 111-119. doi:10.1016/0092-8674(95)90239-2
- Meister, G. (2013). Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nat Rev Genet*, *14*(7), 447-459. doi:10.1038/nrg3462
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., & Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*, *15*(2), 185-197. doi:10.1016/j.molcel.2004.07.007
- Meister, G., Landthaler, M., Peters, L., Chen, P. Y., Urlaub, H., Luhrmann, R., & Tuschl, T. (2005). Identification of novel argonaute-associated proteins. *Curr Biol*, *15*(23), 2149-2155. doi:10.1016/j.cub.2005.10.048
- Meister, G., & Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, *431*(7006), 343-349. doi:10.1038/nature02873
- Mikl, M., Vendra, G., & Kiebler, M. A. (2011). Independent localization of MAP2, CaMKIIalpha and beta-actin RNAs in low copy numbers. *EMBO Rep*, *12*(10), 1077-1084. doi:10.1038/embor.2011.149
- Montgomery, M., Xu, S., & Fire, A. (1998). RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(26), 15502-15507. doi:10.1073/pnas.95.26.15502
- Moore, C. B., Guthrie, E. H., Huang, M. T., & Taxman, D. J. (2010). Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown. *Methods Mol Biol*, *629*, 141-158. doi:10.1007/978-1-60761-657-3_10
- Oh, J. Y., Kwon, A., Jo, A., Kim, H., Goo, Y. S., Lee, J. A., & Kim, H. K. (2013). Activity-dependent synaptic localization of processing bodies and their role in dendritic structural plasticity. *J Cell Sci*, *126*(9), 2114-2123. doi:10.1242/jcs.125690
- Ohr, T., Mutze, J., Staroske, W., Weinmann, L., Hock, J., Crell, K., . . . Schwill, P. (2008). Fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence cross-correlation spectroscopy reveal the cytoplasmic origination of loaded nuclear RISC in vivo in human cells. *Nucleic Acids Res*, *36*(20), 6439-6449. doi:10.1093/nar/gkn693

- Paradis-Isler, N., & Boehm, J. (2018). NMDA receptor-dependent dephosphorylation of serine 387 in Argonaute 2 increases its degradation and affects dendritic spine density and maturation. *J Biol Chem*, 293(24), 9311-9325. doi:10.1074/jbc.RA117.001007
- Park, E., Gleghorn, M. L., & Maquat, L. E. (2013). Stauf2 functions in Stauf1-mediated mRNA decay by binding to itself and its paralog and promoting UPF1 helicase but not ATPase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(2), 405-412. doi:10.1073/pnas.1213508110
- Parker, J. S., Roe, S. M., & Barford, D. (2005). Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain–siRNA guide complex. *Nature*, 434(7033), 663-666. doi:10.1038/nature03462
- Parker, R., & Sheth, U. (2007). P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell*, 25(5), 635-646. doi:10.1016/j.molcel.2007.02.011
- Peters, L., & Meister, G. (2007). Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Mol Cell*, 26(5), 611-623. doi:10.1016/j.molcel.2007.05.001
- Pfaff, J., Hennig, J., Herzog, F., Aebersold, R., Sattler, M., Niessing, D., & Meister, G. (2013). Structural features of Argonaute-GW182 protein interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110(40), E3770-3779. doi:10.1073/pnas.1308510110
- Pfaff, J., & Meister, G. (2013). Argonaute and GW182 proteins: an effective alliance in gene silencing. *Biochem Soc Trans*, 41(4), 855-860. doi:10.1042/BST20130047
- Quevillon Huberdeau, M., Zeitler, D. M., Hauptmann, J., Bruckmann, A., Fressigne, L., Danner, J., . . . Meister, G. (2017). Phosphorylation of Argonaute proteins affects mRNA binding and is essential for microRNA-guided gene silencing in vivo. *EMBO J*, 36(14), 2088-2106. doi:10.15252/embj.201696386
- Rajgor, D., Sanderson, T. M., Amici, M., Collingridge, G. L., & Hanley, J. G. (2018). NMDAR-dependent Argonaute 2 phosphorylation regulates miRNA activity and dendritic spine plasticity. *EMBO J*, 37(11), e97943. doi:10.15252/embj.201797943
- Rana, T. M. (2007). Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(1), 23-36. doi:10.1038/nrm2085
- Rao, D. D., Vorhies, J. S., Senzer, N., & Nemunaitis, J. (2009). siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Adv Drug Deliv Rev*, 61(9), 746-759. doi:10.1016/j.addr.2009.04.004

- Redondo, R. L., & Morris, R. G. (2011). Making memories last: the synaptic tagging and capture hypothesis. *Nat Rev Neurosci*, 12(1), 17-30. doi:10.1038/nrn2963
- Reim, K., Mansour, M., Varoqueaux, F., McMahon, H. T., Südhof, T. C., Brose, N., & Rosenmund, C. (2001). Complexins Regulate a Late Step in Ca²⁺-Dependent Neurotransmitter Release. *Cell*, 104(1), 71-81. doi:10.1016/S0092-8674(01)00192-1
- Rüdel, S., Wang, Y., Lenobel, R., Korner, R., Hsiao, H. H., Urlaub, H., . . . Meister, G. (2011). Phosphorylation of human Argonaute proteins affects small RNA binding. *Nucleic Acids Res*, 39(6), 2330-2343. doi:10.1093/nar/gkq1032
- Salzman, D. W., Nakamura, K., Nallur, S., Dookwah, M. T., Metheetrairut, C., Slack, F. J., & Weidhaas, J. B. (2016). miR-34 activity is modulated through 5'-end phosphorylation in response to DNA damage. *Nat Commun*, 7, 10954. doi:10.1038/ncomms10954
- Schirle, N., & MacRae, I. J. (2012). The Crystal Structure of Human Argonaute2. *Science*, 336(6084), 1037-1040. doi:10.1126/science.1221551
- Sen, G. L., & Blau, H. M. (2005). Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol*, 7(6), 633-636. doi:10.1038/ncb1265
- Sharangdhar, T., Sugimoto, Y., Heraud-Farlow, J., Fernandez-Moya, S. M., Ehses, J., Ruiz de Los Mozos, I., . . . Kiebler, M. A. (2017). A retained intron in the 3'-UTR of Calm3 mRNA mediates its Staufen2- and activity-dependent localization to neuronal dendrites. *EMBO Rep*, 18(10), 1762-1774. doi:10.15252/embr.201744334
- Sheth, U., & Parker, R. (2003). Decapping and Decay of Messenger RNA occur in Cytoplasmic Processing Bodies. *Science*, 300(5620), 805-808. doi:10.1126/science.1082320
- Sholl, D. (1953). Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anatomy*, 87(4), 387-406.
- Song, J. J., Liu, J., Tolia, N. H., Schneiderman, J., Smith, S. K., Martienssen, R. A., . . . Joshua-Tor, L. (2003). The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol*, 10(12), 1026-1032. doi:10.1038/nsb1016
- St Johnston, D. (2005). Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(5), 363-375. doi:10.1038/nrm1643

- Sternburg, E. L., Estep, J. A., Nguyen, D. K., Li, Y., & Karginov, F. V. (2018). Antagonistic and cooperative AGO2-PUM interactions in regulating mRNAs. *Sci Rep*, 8(1), 15316. doi:10.1038/s41598-018-33596-4
- Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N., & Zamore, P. D. (2004). A Protein Sensor for siRNA Asymmetry. *Science*, 306(5700), 1377-1380. doi:10.1126/science.1102755
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 4350-4354. doi:10.1073/pnas.76.9.4350
- Valdmanis, P. N., Gu, S., Schuermann, N., Sethupathy, P., Grimm, D., & Kay, M. A. (2012). Expression determinants of mammalian argonaute proteins in mediating gene silencing. *Nucleic Acids Res*, 40(8), 3704-3713. doi:10.1093/nar/gkr1274
- Weng, Y., Xiao, H., Zhang, J., Liang, X. J., & Huang, Y. (2019). RNAi therapeutic and its innovative biotechnological evolution. *Biotechnol Adv*, 37(5), 801-825. doi:10.1016/j.biotechadv.2019.04.012
- Yuan, Y. R., Pei, Y., Ma, J. B., Kuryavyi, V., Zhadina, M., Meister, G., . . . Patel, D. J. (2005). Crystal structure of *A. aeolicus* argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. *Mol Cell*, 19(3), 405-419. doi:10.1016/j.molcel.2005.07.011
- Zeitelhofer, M., Karra, D., Macchi, P., Tolino, M., Thomas, S., Schwarz, M., . . . Dahm, R. (2008). Dynamic interaction between P-bodies and transport ribonucleoprotein particles in dendrites of mature hippocampal neurons. *J Neurosci*, 28(30), 7555-7562. doi:10.1523/JNEUROSCI.0104-08.2008
- Zeitelhofer, M., Vessey, J. P., Xie, Y., Tubing, F., Thomas, S., Kiebler, M., & Dahm, R. (2007). High-efficiency transfection of mammalian neurons via nucleofection. *Nat Protoc*, 2(7), 1692-1704. doi:10.1038/nprot.2007.226
- Zeng, Y., Sankala, H., Zhang, X., & Graves, P. R. (2008). Phosphorylation of Argonaute 2 at serine-387 facilitates its localization to processing bodies. *Biochem J*, 413(3), 429-436. doi:10.1042/BJ20080599

11 Danksagung

Zuallererst möchte ich meinen Doktorvater Professor Dr. Michael Kiebler für die großartige Möglichkeit, in seinem Labor zu arbeiten, danken. Für mich war es eine einmalige Erfahrung, die mir die Chance gegeben hat, mich nicht nur fachlich, sondern auch persönlich weiterzuentwickeln. Er war für mich ein hervorragender Lehrer, der mich motiviert hat, das Beste aus mir rauszuholen und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Vielen Dank für diese große Unterstützung und das Vertrauen.

Mein besonderer Dank geht an meine großartige Betreuerin Janina, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Sie hat mir unermüdlich meine zahlreichen Fragen beantwortet, mir viele Techniken gezeigt und mir damit einen einmaligen Einblick in das wissenschaftliche Arbeiten ermöglicht. Sie ist eine hilfsbereite und geduldige Betreuerin für mich gewesen und ich habe sehr viel von ihr gelernt.

Ich möchte außerdem Sabine und Christin für die Präparationen der primären Neuronenkulturen danken. Dank an meine Laborkollegen Sandra, Karl und Rico, die mir jederzeit mit Rat zur Seite standen und von denen ich fachlich viel gelernt habe. Danke auch an Ulrike und Renate, die mich großartig in die qRT-PCR und in das Klonieren eingeführt haben.

Ein großer Dank geht an meine Familie. Insbesondere an meine Eltern, meine Mutter Jasenka und mein Vater Manfred, die mich immer unterstützen und mich ermutigt haben meinen Weg zu gehen. Besondere Dank geht auch an meine Schwester Dajana, die mir in allen Situationen zur Seite steht und immer ein offenes Ohr für mich hat. Danke an meinen Freund Tobias, der mir im gesamten Verlauf der Entstehung dieser Arbeit den Rücken gestärkt hat und mich stets motiviert hat, das Beste aus mir herauszuholen. Wir sind ein unschlagbares Team.

Abschließend möchte ich mich bei allen meinen Freunden bedanken, die mich auf meinem Weg begleitet haben. Danke für viele schöne Momente. Ich bin sehr froh, so großartige Menschen an meiner Seite zu wissen.

Publikation

Ehse, J., Schlegel, M., Schroger, L., Schieweck, R., Derdak, S., Bilban, M., Bauer, K., Harner, M., Kiebler, M. A. (2022). The dsRBP Stau2 governs RNP assembly of neuronal Argonaute proteins. *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/gkac487

Vortrag

Schlegel, M., Ehse, J. Kiebler, M. A. (15.06.2019). Ago2 phosphorylation and Stau2 knockdown in neurons leads to distinct Ago2 protein localisation. *MMS ScienceCon in Munich*