

## 4. Zusammenfassung

Aktivitätsabhängige Veränderungen der neuronalen Verschaltungen im Gehirn bilden die Grundlage für das Erlernen neuer Aufgaben sowie das Speichern von Informationen. Während kurzzeitige Veränderungen der synaptischen Übertragung auf posttranslationalen Modifikationen bereits vorhandener Proteine beruhen, benötigen lang andauernde Veränderungen an Synapsen die Neusynthese von mRNAs und Proteinen. Bis heute ist jedoch weitgehend ungeklärt, auf welche Weise Prozesse wie Transkription oder Translation, die im Zellkern beziehungsweise im Zellkörper stattfinden, Veränderungen spezifisch an weit entfernten, aktivierten Synapsen bewirken können. Eine wichtige Funktion dabei könnten dendritisch lokalisierte mRNAs ausüben. Diese mRNAs werden nach ihrer Synthese in die Dendriten transportiert, wo sie lokal an aktivierten Synapsen translatiert werden und dort spezifische Veränderungen der molekularen Zusammensetzung hervorrufen könnten. Die Arg3.1-mRNA nimmt eine Sonderstellung unter den dendritischen mRNAs ein. Arg3.1 ist ein aktivitätsreguliertes Gen, das erst als Folge plastizitätsinduzierender neuronaler Stimulation exprimiert wird. Bei seiner Induktion werden die mRNA und das Protein von Arg3.1 bis in die distalen Dendriten von Neuronen verteilt und akkumulieren dort spezifisch an aktivierten Synapsen. Die Analyse des gerichteten Transports und der regulierten Translation der Arg3.1-mRNA könnte daher wesentlich zur Aufklärung der zu lang anhaltender synaptischer Plastizität führenden Prozesse beitragen. In unserem Labor konnte mit Hilfe des Hefe Tri-Hybrid-Systems ein spezifischer Proteinbindungspartner der Arg3.1-mRNA identifiziert werden. Dieses Zinkfingerprotein, das Zinki genannt wurde, spielt möglicherweise eine zentrale Rolle bei der Regulation des Transports und der Translation der Arg3.1-mRNA.

In dieser Doktorarbeit wurden die Bindung des Proteins Zinki an die Arg3.1-mRNA und dessen Funktion bei der Arg3.1-Translation in molekularbiologischen, biochemischen und immunohistochemischen Analysen näher untersucht. Zunächst konnte mit Hilfe von Deletionsstudien gezeigt werden, dass für eine Bindung der Arg3.1-mRNA im Tri-Hybrid-System die C-terminalen acht der insgesamt vierzehn Zinkfinger von Zinki notwendig sind. Die sieben N-terminal gelegenen Zinkfinger, die größtenteils ein übereinstimmendes Sequenzmotiv in ihrer  $\alpha$ -Helix aufweisen, tragen wesentlich zur vollständigen Bindung bei. In einem in dieser Arbeit entwickelten *in vitro* RNA-Pulldown konnte die spezifische Interaktion zwischen Zinki und der Arg3.1-mRNA unabhängig vom Tri-Hybrid-System nachgewiesen werden. Erste Hinweise auf die funktionelle Bedeutung dieser Bindung bei der Regulation der

Proteinsynthese lieferte ein *in vitro* Translationsassay, in dem Zinki die Translation von Arg3.1, aber auch die anderer mRNAs inhibierte. Weitere Untersuchungen zum Mechanismus dieser Translationsinhibition deuten auf eine durch den N-Terminus von Zinki vermittelte Blockade des Zusammenbaus des 80S-Initiationskomplexes hin. In elektronenmikroskopischen und biochemischen Analysen konnte Zinki ausschließlich in den Somata und Dendriten von Neuronen detektiert werden. Dort war Zinki zwar in räumlicher Nähe zu Synapsen lokalisiert, aber nicht spezifisch mit synaptischen Membranen assoziiert. Mehrere weiterführende Experimente wiesen daraufhin, dass die subzelluläre Verteilung und die Stabilität des Zinki-Proteins durch neuronale Aktivität reguliert werden. Frühere Studien in unserem Labor hatten gezeigt, dass die laminaspezifische Stimulierung der mittleren Molekularschicht des *Gyrus dentatus* zu einer Abnahme der Zinki-spezifischen Immunoreaktivität in den Bereichen der aktivierten Synapsen führte. In dieser Arbeit konnte darüber hinaus die spezifische, ubiquitinvermittelte Degradation eines geringen Anteils des vorhandenen Zinki-Proteins als Folge von kainatinduzierter neuronaler Aktivität nachgewiesen werden. Außerdem wurde unter gleichen Stimulationsbedingungen in biochemischen Fraktionierungen eine Umverteilung des Zinki-Proteins vom Zytosol zu den polysomenhaltigen Fraktionen höherer Dichte beobachtet. Die in diesem Abschnitt der Arbeit durchgeführten Experimente unterstützen die Annahme einer Funktion Zinkis bei der Regulation der Arg3.1-Translation. Darüber hinaus deuten sie daraufhin, dass das Zinki-Protein selber durch synaptische Aktivität negativ reguliert wird.

Im zweiten Teil der Doktorarbeit wurde die Einbindung Zinkis in Proteinnetzwerke innerhalb der Zelle untersucht. In einem Hefe Zwei-Hybrid-Screen wurden mehrere potentielle Bindungspartner von Zinki gefunden, die am Ras/MAPK-Signaltransduktionsweg beteiligt sind. Bei einem dieser Interaktionspartner handelt es sich um GRF1, einen GDP/GTP-Austauschfaktor von Ras. Dieser wurde in weiteren Experimenten eingehend charakterisiert. *In vitro* und *in vivo* Bindungsassays sowie immunohistochemische und biochemische Analysen unterstützten eine physiologische Bedeutung der gefundenen Zinki-GRF1-Interaktion. In GRF1-*Knockout*-Mäusen konnte darüber hinaus eine Veränderung des Arg3.1-Expressionsmusters nach plastizitätsproduzierender Stimulation beobachtet werden. Die Expression und subzelluläre Verteilung von Zinki dagegen änderte sich in GRF1-*Knockout*-Mäusen nicht. Die Ergebnisse des zweiten Teils der Doktorarbeit weisen auf eine Verbindung zwischen Zinki und der Ras/MAPK-Kaskade hin und geben Anlass zu weiterführenden Studien hinsichtlich der Beteiligung von Zinki an diesem Signaltransduktionsweg.

## 4. Summary

Activity dependent changes of neuronal connectivity are the basic requirements for acquisition and storage of information. Short-term changes of synaptic efficacy depend on the posttranslational modification of pre-existing proteins, whereas long-lasting changes require mRNA and protein synthesis. However, the mechanisms that link events taking place in the nucleus or soma like transcription or translation to specific changes at distantly located activated synapses still remain elusive. Dendritically localized mRNAs may play a central role in these processes. After synthesis, these mRNAs are transported into the dendrites where they might be translated locally at activated synapses leading to specific alterations in their molecular composition. Among dendritic mRNAs, Arg3.1 mRNA expression is unique. Arg3.1 is an activity-dependent gene whose transcription is induced rapidly by synaptic activity. Upon induction, Arg3.1 mRNA and protein are distributed throughout the dendritic arbour and accumulate specifically at activated synapses. The analysis of directed Arg3.1 mRNA transport and its regulated translation may therefore considerably contribute to our understanding of processes resulting in long-lasting synaptic plasticity. Using the yeast Tri-Hybrid System our laboratory identified a specific Arg3.1 mRNA binding protein, a zinc finger protein named Zinki that could play an important role in the regulation of Arg3.1 mRNA transport and translation.

In this PhD thesis molecular biological, biochemical and immunohistochemical methods were applied to further investigate the binding of Zinki to Arg3.1 mRNA and its functional role in the regulation of translation. Initial experiments using deletion constructs demonstrated that the C-terminal eight zinc fingers out of fourteen zinc fingers of the entire Zinki protein were necessary for effective binding to the Arg3.1 mRNA in the yeast Tri-Hybrid System. The majority of the N-terminally located seven zinc fingers share a common sequence motif within the  $\alpha$ -helix and contribute largely to proper binding. Moreover, the interaction between Zinki and the Arg3.1 mRNA could be verified in independent *in vitro* RNA-pulldown-assays that were developed in this work. First evidence for a functional role of Zinki in the regulation of protein synthesis was obtained using an *in vitro* translation assay. Here, Zinki inhibited the translation of Arg3.1 as well as other control mRNAs. Further investigations concerning the mechanisms of this translational inhibition suggested that the N-terminus of Zinki blocks the assembly of the 80S initiation complex. Electron microscopy analyses and biochemical

studies demonstrated that Zinki protein is exclusively localized in the somata and dendrites of neurons. Despite being localized closely to synapses, Zinki was not found to be associated with synaptic membranes. Furthermore, several experiments indicated that the subcellular distribution and the stability of Zinki protein are regulated by neuronal activity. Previous studies conducted in our laboratory had shown that upon lamina specific stimulation of the middle molecular layer of the dentate gyrus, Zinki vacates activated regions within the dendritic arbour. Studies conducted in this PhD thesis provided evidence that following synaptic activation a small portion of Zinki protein is degraded by the ubiquitin-proteasome-machinery. In addition, using similar synaptic stimulation protocols Zinki protein redistributes from the cytosol to polysome-containing high-density fractions. Taken together, the experiments conducted in the first part of this work suggest an important role of Zinki in the regulation of Arg3.1 mRNA translation. Moreover, the experiments indicate that Zinki itself is subject to negative regulation by synaptic activity.

In the second part of the thesis, the integration of Zinki into intracellular protein networks was examined. A yeast Two-Hybrid Screen identified several putative protein interaction partners of Zinki that are part of the Ras/MAPK signal transduction pathway. One of those was GRF1, a guanine nucleotide exchange factor for Ras. GRF1 was intensively characterized in subsequent experiments. *In vitro* and *in vivo* binding assays as well as immunohistochemical and biochemical analyses supported the physiological importance of the Zinki-GRF1-interaction. Additionally, in GRF1 knockout mice an alteration in the expression pattern of Arg3.1 was observed following plasticity producing stimulation. In contrast, the expression and subcellular distribution of Zinki protein remained unaltered in GRF1 knockout mice. The results of the second part of this PhD thesis indicate that Zinki might play a role in the Ras/MAPK signalling cascade and strongly encourages continued research of Zinki's participation in this signal transduction pathway.