

Funktionelle Charakterisierung des Arg3.1-mRNA-Bindungsproteins Zinki und seiner Interaktionspartner

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Christina Groß

aus Lüdenscheid

September, 2004

1. Gutachter: Prof. Dr. Dietmar Kuhl
2. Gutacher: Prof. Dr. Gerd Multhaup

Disputation am 2.12.2004

Danksagung

Allen voran möchte ich mich bei Herrn Professor Dietmar Kuhl für die Überlassung des überaus interessanten Themas, die optimalen Arbeitsbedingungen, die großzügig gewährte wissenschaftliche Freiheit und die wertvollen Ratschläge, Hinweise und Anregungen im Laufe meiner Arbeit bedanken. Darüber hinaus danke ich ihm besonders dafür, dass er es mir ermöglicht hat, an verschiedenen nationalen und internationalen Konferenzen teilzunehmen und dort meine Ergebnisse zu präsentieren. Herzlich bedanken möchte ich mich auch für die von ihm gewährte Chance, im Rahmen eines Gastaufenthaltes in einem anderen Labor neue Arbeitstechniken zu erlernen.

Bei Herrn Professor Multhaupt bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Den Hamburger „Ex-Kuhls“ Anika, Peer, Putz und Robert danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und ihr andauerndes Interesse an der Arbeit unseres Labors.

Ein großer Dank geht an alle Kollegen, die mir während der letzten vier Jahre eine nette Arbeitsatmosphäre bereitet und mich sowohl praktisch als auch theoretisch bei meiner Arbeit unterstützt haben. In alphabetischer Reihenfolge sind dies Anastasia, Anita, Anne, Arne, Claudia M., Claudia S., Derk, Fang, Franzi, Kathrin, Micky, Ria, Ulla, Tina und Xiaosong. Dabei möchte ich mich auch bei den „Assoziierten“ bedanken, nämlich bei André für prompte Hilfe in allen Computerfragen und bei Stefan für das schöne Labor. Ganz besonders danke ich Niels für vier abwechslungsreiche Jahre als hervorragender *Bench*-Nachbar, die mich zu dem Schluss kommen ließen: Wir sind Freunde, keine Kollegen!

Abschließend möchte ich mich herzlich bei meiner Familie, meinen Eltern, Oliver und Isabelle, und bei Heiko für ihre riesige Unterstützung, ihr Interesse an meiner Arbeit, das Ertragen so mancher Launen, ihr Mitleiden und -freuen sowie für ihre große Geduld bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	10
1.1	Anatomische Grundlagen von Lernen und Gedächtnis.....	10
1.2	Zelluläre Grundlagen von Lernen und Gedächtnis.....	13
1.3	Molekulare Grundlagen von Lernen und Gedächtnis.....	15
1.4	Aktivitätsregulierte Transkription unmittelbar früh exprimierter Gene.....	18
1.5	Aktivitätsregulierte Translation.....	21
1.6	Dendritische Lokalisation von mRNAs.....	23
1.6.1	Mechanismen des dendritischen mRNA-Transports.....	24
1.6.2	Mechanismen der lokalen Translation dendritischer mRNAs.....	26
1.7	Das Arg3.1-mRNA-bindende Zinkfingerprotein Zinki.....	28
1.8	Zielsetzung der Arbeit.....	31
2.	Ergebnisse.....	33
2.1	Analysen zur Bindung des Zinki-Proteins an die Arg3.1-mRNA.....	33
2.1.1	Sequenzanalyse der Zinkfingerdomänen von Zinki.....	33
2.1.2	Bestimmung der minimalen RNA-Bindungsdomäne von Zinki im Tri-Hybrid-System.....	35
2.1.3	Analyse der Bindung von Zinki an die Arg3.1-mRNA in einem <i>in vitro</i> RNA-Pulldown.....	39
2.2	Untersuchungen zur Rolle Zinkis bei der Translation von mRNAs.....	41
2.2.1	Translationsinhibition durch Zinki im Kaninchenretikulozytenlysate.....	41
2.2.2	Blockade des 80S-Initiationskomplexes durch Zinki.....	44
2.3	Untersuchungen zur subzellulären Verteilung von Zinki.....	47
2.3.1	Somatodendritische Lokalisation von Zinki.....	47
2.3.2	Untersuchungen zur Assoziation von Zinki mit Synapsen.....	50
2.3.3	Untersuchungen zur Lokalisation von Zinki im Zellkern.....	52
2.4	Aktivitätsabhängige Regulation des Zinki-Proteins.....	54
2.4.1	Abnahme der Zinki-spezifischen Immunoreaktivität an aktivierten Synapsen.....	54
2.4.2	Ubiquitinierung und spezifische Degradation von Zinki nach kainatinduziertem Krampfanfall.....	57
2.4.3	Expression von Zinki im Hippokampuslysate nach synaptischer Aktivität.....	60
2.4.4	Aktivitätsregulierte Assoziation von Zinki mit Polysomen.....	63
2.5	Proteininteraktionspartner von Zinki.....	68
2.5.1	Identifikation von Zinki-Interaktionspartnern im Zwei-Hybrid-System.....	68
2.5.1.1	Zwei-Hybrid-Screen nach Proteininteraktionspartnern von Zinki.....	69
2.5.1.2	Potentielle Interaktionspartner von Zinki.....	72
2.5.2	Proteindomänenstruktur von GRF1.....	74
2.5.3	Analyse der GRF1-Zinki-Interaktion im Zwei-Hybrid-System.....	75

2.5.4	Klonierung des offenen Leserahmens von GRF1	79
2.5.5	Nachweis der Interaktion Zinki-GRF1 <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	80
2.5.5.1	Nachweis der Zinki-GRF1-Interaktion in <i>Pulldown</i> -Experimenten.....	80
	His ₆ - <i>Pulldown</i> mit rekombinantem Zinki-Protein.....	81
	GST- <i>Pulldown</i> mit rekombinantem Zinki-Protein.....	81
	GST- <i>Pulldown</i> mit rekombinantem GRF1-Protein.....	82
2.5.5.2	Nachweis der GRF1-Zinki-Interaktion <i>in vivo</i> durch Ko-Immunopräzipitation.....	82
2.5.6	Vergleich der subzellulären Verteilung von Zinki und GRF1.....	85
2.5.6.1	Expressionsmuster von GRF1 in Gehirnen von Mäusen.....	85
2.5.6.2	Assoziation von GRF1 mit der PSD.....	88
2.5.7	Analyse der Zinki- und Arg3.1-Expression in GRF1- <i>Knockout</i> -Mäusen.....	89
2.5.7.1	Zinki- und Arg3.1-Proteinexpression in GRF1- <i>Knockout</i> -Mäusen.....	90
2.5.7.2	Arg3.1-mRNA-Verteilung in GRF1- <i>Knockout</i> -Mäusen.....	94
3.	Diskussion	103
3.1	Die Bindung von Zinki an die Arg3.1-mRNA wird nur von einem Teil der vierzehn Zinkfinger vermittelt.....	104
3.2	Zinki inhibiert die Translation <i>in vitro</i>	108
3.3	Die Lokalisation und Stabilität von Zinki wird aktivitätsabhängig reguliert.....	113
3.4	Proteininteraktionspartner von Zinki.....	118
3.4.1	Zinki bindet im Zwei-Hybrid-System spezifisch an PA28γ.....	118
3.4.2	Zinki bindet GRF1 <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	119
3.4.3	Verschiedene mögliche Proteininteraktionspartner von Zinki sind in den Ras/MAPK-Signalweg involviert.....	122
3.5	Die Deletion von GRF1 und anderen Komponenten des Ras/MAPK-Weges führt zu Defiziten bei der Ausbildung synaptischer Plastizität.....	125
3.5.1	Die Zinki-Expression im Gehirn von GRF1- <i>Knockout</i> -Mäusen ist nicht verändert.....	126
3.5.2	Die Arg3.1-Expression im Gehirn von GRF1- <i>Knockout</i> -Mäusen ist verändert.....	128
3.6	Funktionelle Zusammenhänge zwischen GRF1, Arg3.1 und Zinki.....	131
3.7	Ausblick.....	132
4.	Zusammenfassung	135
	Summary	137
5.	Methoden	139
5.1	Amplifikation, Präparation, Modifikation und Analyse von Nukleinsäuren.....	139
5.1.1	PCR.....	139
5.1.2	Reverse Transkription.....	139
5.1.3	Größenauftrennung von DNA mittels DNA-Gelelektrophorese.....	140
5.1.4	Elution von DNA aus Agarosegelen.....	140
5.1.5	Restriktionsverdau von DNA.....	140
5.1.6	Klenow-Reaktion.....	140
5.1.7	Dephosphorylierung von DNA.....	141

5.1.8	Phosphorylierung von DNA.....	141
5.1.9	Hybridisierung von Oligonukleotiden.....	141
5.1.10	Phenol/Chloroform-Extraktion.....	141
5.1.11	Fällung von DNA aus wässrigen Lösungen.....	141
5.1.11.1	Isopropanolfällung.....	141
5.1.11.2	Ethanol-fällung.....	141
5.1.12	Ligation eines DNA-Fragments in ein DNA-Plasmid.....	142
5.1.13	Herstellung transformationskompetenter Bakterien.....	142
5.1.13.1	Ultrakompetente (chemokompetente) Bakterien.....	142
5.1.13.2	Elektroporationskompetente Bakterien.....	142
5.1.14	Transformation von Bakterien.....	142
5.1.14.1	Transformation chemokompetenter Bakterien.....	142
5.1.14.2	Transformation elektrokompeter Bakterien.....	143
5.1.15	Plasmidisolation aus Bakterien.....	143
5.1.15.1	Plasmidaufarbeitung im kleinen Maßstab.....	143
5.1.15.1.1	Aufarbeitung mittels NaOH/SDS-Lyse.....	143
5.1.15.1.2	Aufarbeitung mittels Ionenaustauscher-Säule.....	143
5.1.15.2	Plasmidaufarbeitung im großen Maßstab mittels Ionenaustauscher-Säule.....	143
5.1.16	Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA.....	144
5.1.17	DNA-Sequenzierung.....	144
5.1.18	<i>In vitro</i> Transkription von RNA.....	144
5.1.18.1	Quantitative Transkription <i>gecapter</i> mRNA.....	144
5.1.18.1.1	Sp6-Transkription.....	144
5.1.18.1.2	T7-Transkription.....	145
5.1.18.2	Herstellung ³⁵ S-markierter mRNA.....	145
5.1.19	Größenauftrennung von RNA in Formamid-Agarosegelen.....	146
5.1.20	Fällung von RNA aus wässrigen Lösungen.....	146
5.1.20.1	Isopropanolfällung.....	146
5.1.20.2	Ethanol-fällung.....	146
5.2	Klonierungen.....	146
5.2.1	Klonierung der Zinkfingerdeletionskonstrukte für das Tri-Hybrid-System.....	146
5.2.2	Klonierung der GST-Fusionsproteine von Zinki für den <i>in vitro</i> Translationsassay und den GST-Pulldown.....	146
5.2.3	Klonierung des GST-S5a-Konstrukts für den <i>Pulldown</i> poly-ubiquitiniierter Proteine.....	147
5.2.4	Klonierung der Zinki-Konstrukte für das Zwei-Hybrid-System.....	147
5.2.5	Klonierung der GRF1-Konstrukte für das Zwei-Hybrid-System.....	147
5.2.6	Klonierung des offenen Leserahmens von GRF1.....	148
5.2.7	Klonierung des His ₆ -Zinki-Fusionsproteins für den His ₆ - <i>Pulldown</i>	148
5.2.8	Klonierung der GST-Fusionsproteine von GRF1 für den GST-Pulldown.....	148
5.2.9	Klonierung der Konstrukte für die <i>in vitro</i> Transkription.....	148
5.3	Sequenzanalysen.....	149
5.3.1	Analyse von Aminosäuresequenzen.....	149

5.3.2	Analyse von DNA-Sequenzen.....	149
5.4	Hefe-Zwei-/Tri-Hybrid-Methoden.....	149
5.4.1	Transformation von Hefen.....	149
5.4.1.1	Übernachtskulturen.....	149
5.4.1.2	Zelltiterbestimmung einer Hefekultur.....	150
5.4.1.3	Simultane und sequentielle <i>Small-Scale</i> -Transformation.....	150
5.4.1.4	Zwei-Hybrid-Screen.....	150
5.4.2	Proteininteraktionstests der transformierten Hefen.....	151
5.4.2.1	Histidin-Assay.....	151
5.4.2.2	X-gal-Assay.....	151
5.4.3	Cycloheximidgegenselenktion zur Plasmidisolierung in Hefen.....	151
5.4.4	Hefeverpaarung.....	152
5.4.5	Plasmidisolierung aus Hefen.....	152
5.4.6	Herstellung und Auftauen von Hefeglycerinstocks.....	152
5.5	Proteinbiochemische Arbeitsmethoden.....	153
5.5.1	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	153
5.5.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	153
5.5.3	Analyse eines Proteingels mittels Autoradiographie.....	153
5.5.4	Coomassiefärbung eines Proteingels.....	154
5.5.5	Western Blot.....	154
5.5.6	Detektion eines Western Blots.....	154
5.5.7	Entfernen der Erst- und Zweitantikörper eines bereits detektierten Western Blots.....	155
5.5.8	Densitometrische Auswertung detektierter Western Blots.....	155
5.5.9	Proteinaufreinigung.....	155
5.5.9.1	Expression rekombinanter Proteine in <i>E.coli</i>	155
5.5.9.1.1	Animpfen einer Bakterienkultur.....	155
5.5.9.1.2	Induktion der Proteinexpression.....	155
5.5.9.1.3	Test der Proteininduktion.....	156
5.5.9.2	Aufreinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine aus <i>E.coli</i>	156
5.5.9.2.1	Bakterienlyse.....	156
	Standardmethode.....	156
	Methode zur Lyse schwerlöslicher Proteine.....	156
5.5.9.2.2	Kopplung des Proteins an Glutathion-Sepharose.....	156
5.5.9.2.3	Elution des Proteins von der Glutathion-Sepharose.....	156
5.5.9.3	Aufreinigung von His ₆ -rekombinanten Proteinen aus <i>E.coli</i>	157
5.5.9.3.1	Bakterienlyse.....	157
5.5.9.3.2	Kopplung des rekombinanten Proteins an Ni-NTA-Agarose.....	157
5.5.9.3.3	Elution des rekombinanten Proteins von der Ni-NTA-Agarose.....	157
5.5.10	<i>Pulldowns</i> und Immunopräzipitationen.....	157
5.5.10.1	Herstellung eines Mausgehirnlysats.....	157
5.5.10.2	<i>Pulldown</i> mit GST-Fusionsproteinen.....	157
5.5.10.3	<i>Pulldown</i> mit His ₆ -rekombinanten Proteinen.....	158
5.5.10.4	Ko-Immunopräzipitation.....	158

5.5.10.5	RNA-Pulldown mit Dynabeads® Oligo (dT) 25	158
5.5.11	<i>In vitro</i> Translationsassay (Retikulozytenlysate).....	159
5.5.12	Herstellung von Sucroседichtegradienten.....	159
5.5.13	Ribosomenpräparation aus Mausgehirnlysate	159
5.5.14	Fraktionierung von Mausgehirnlysate.....	160
5.5.15	Analyse des Translationsinitiationskomplexes.....	160
5.5.16	Zellkernpräparation	161
5.5.17	PSD-Aufreinigung.....	161
5.6	Immunohistochemische Arbeitsmethoden und <i>in situ</i> Hybridisierung.....	161
5.6.1	Herstellung von Paraformaldehydschnitten des Mausgehirns.....	161
5.6.2	Immunohistochemie mit DAB.....	162
5.6.3	Immunogoldfärbung.....	162
5.6.4	<i>In situ</i> Hybridisierung von Gehirndünnschnitten.....	163
5.6.4.1	Herstellung von Gehirndünnschnitten	163
5.6.4.2	Vorbereitung der Schnitte.....	163
5.6.4.3	Hybridisierung.....	164
5.6.4.4	Waschen.....	164
5.6.4.5	<i>Dipping</i> der hybridisierten Schnitte.....	164
5.7	Methoden der sekundären Zellkultur.....	164
5.7.1	Auftauen von sekundären Zellen.....	164
5.7.2	Passagieren von sekundären Zellen.....	165
5.7.3	Einfrieren von sekundären Zellen	165
5.7.4	Transfektion von sekundären Zellen.....	165
5.7.5	Herstellung eines Zelllysates.....	165
5.8	Tierversuche	165
5.8.1	Induktion von epileptischen Anfällen.....	166
6.	Material.....	167
6.1	Antikörper.....	167
6.2	Plasmide.....	167
6.3	Primer.....	168
6.4	Geräte.....	169
6.5	Chemikalien.....	169
6.6	Radiochemikalien.....	171
6.7	Nukleinsäuren.....	171
6.8	Größenstandards.....	171
6.9	Agarose, Medienkomponenten und Zellkulturreagenzien	171
6.10	Enzyme.....	172
6.11	Kitsysteme, modifizierte Sepharose/Agarose, Färbelösungen.....	172
6.12	Bakterien- und Hefestämme, eukaryotische Zelllinien.....	172
6.13	Sonstige Materialien.....	173
6.14	Puffer, Lösungen und Medien.....	174

7.	Literaturverzeichnis	179
8.	Lebenslauf	199
9.	Anhang	200
9.1	Tabellen.....	200
9.1.1	<i>cpm</i> -Werte der 80S-Initiationskomplexanalyse.....	200
9.1.2	Signalintensitäten der Banden der Western Blots des <i>S5a-Pulldowns</i>	200
9.1.3	Signalintensitäten der Banden der Western Blots der Hippokampuslysate.....	200
9.2	Abkürzungsverzeichnis.....	201