

2. Ergebnisse

2.1 Analysen zur Bindung des Zinki-Proteins an die Arg3.1-mRNA

Das Zinkfingerprotein Zinki wurde in zwei unabhängigen Tri-Hybrid-Screens als Arg3.1-mRNA-bindendes Protein identifiziert (Putz, 1996, 1999). Der ursprünglich isolierte Klon umfasste die zwölf C-terminalen Zinkfinger von Zinki. Die durch Koloniehybridisierung einer hippokampalen Ratten-cDNA-Bank und 5'RACE klonierte vollständige cDNA kodiert ein Protein, das aus einer trunkierten KRAB-A-Domäne und insgesamt vierzehn Zinkfingern besteht (Putz, 1999). Proteine, die viele aufeinander folgende Zinkfinger besitzen, können diverse Liganden wie DNA, RNA, Proteine und Lipide, binden (Iuchi, 2001). Es ist also möglich, dass die verschiedenen Zinkfinger von Zinki für die Interaktion mit unterschiedlichen Bindungspartnern zuständig sind. Daher ist die nähere Eingrenzung der Arg3.1-mRNA-Bindungsdomäne von Zinki ein wichtiger Schritt zur Charakterisierung des Zinki-Proteins.

2.1.1 Sequenzanalyse der Zinkfingerdomänen von Zinki

Zinkfinger des Cys₂His₂-Typs, wie sie bei Zinki ausschließlich vorliegen, können in Art und Anzahl der Aminosäuren, die zwischen den konservierten Cystein- und Histidinresten liegen, variieren. Eine allgemeine Strukturformel ist CX₂₋₄CX₁₂HX₂₋₆H, wobei die Aminosäuren eines Zinkfingers jeweils eine β -Haarnadelschleife und eine α -Helix ausbilden. Letztere ist bei einigen Zinkfingerproteinen als DNA- beziehungsweise RNA-Bindungsdomäne identifiziert worden (Wolfe et al., 2000; Iuchi, 2001; Lu et al., 2003). Abbildung 2.1 zeigt die Aminosäuresequenzen der vierzehn Zinkfinger von Zinki, die ausschließlich die Strukturformel CX₂CX₁₂HX₃H haben. Schon ohne eine computergestützte Analyse erkennt man, dass die Sequenzen der Zinkfinger zum Teil sehr ähnlich sind. Der Abgleich der Aminosäuresequenzen mit dem *multiple alignment* Programm CLUSTAL W, das mehrere Aminosäuresequenzen parallel vergleichen kann und nach Homologien ordnet, zeigte, dass die Zinkfinger 1, 3, 4, 5, 6, 7 und 11 die größten Übereinstimmungen aufweisen. Innerhalb der α -Helix sind die Zinkfinger 3, 4 und 6 sogar identisch. Für eine genauere Analyse wurden daher sämtliche Zinkfinger mit Hilfe des Computerprogramms BLAST *Align Two Sequences* gegen Zinkfinger 4 abgeglichen. Abbildung 2.1 zeigt das Ergebnis dieser Sequenzanalyse.

	Zinkfinger	Linker	α -Helix		ZF	
			id.	pos.	id.	pos.
1	CNQC DKAFAYHSSLRHERTH	TGEKLYK	91 %	91 %	85 %	85 %
	1812	1895				
2	CIQC GKAFSDQNTLQRHKRTH	SEEKPKCK	45 %	91 %	57 %	85 %
	1896	1979				
3	CNQC GKAFAHSSLRKHERTH	TGEKPYG	100 %	100 %	95 %	95 %
	1980	2063				
4	CNQC GKAFACHSSLRKHERTH	TGEKPYE	100 %	100 %	100 %	100 %
	2064	2147				
5	CNQC DKAFAYHSSLQKHERTH	TGEKPYG	91 %	100 %	85 %	89 %
	2148	2231				
6	CNQC DKAFACHSSLRKHERTH	TGEKPYE	100 %	100 %	95 %	95 %
	2232	2315				
7	CNQC GKAFACHS TLRKHERI	TGEKPYE	82 %	91 %	90 %	94 %
	2316	2399				
8	CNQC GKAFS MQNTLRVHERTH	TGEKPF E	63 %	82 %	71 %	85 %
	2400	2483				
9	CNQC GKTFKLHS QLRIHKRVH	TGEKPH E	63 %	73 %	66 %	70 %
	2484	2567				
10	CDQC GKTFACPS SFQKHKRVH	S GEKPYG	45 %	73 %	66 %	80 %
	2568	2651				
11	CNQC DKAF AIHSRLRKHERTH	TGEKPF K	91 %	91 %	85 %	85 %
	2652	2735				
12	CNQC GKTF S QSNLQVHKRTH	TGEKPYE	55 %	82 %	61 %	80 %
	2736	2819				
13	CNQC GKAF P YDSSLRVHERTH	TGMKPYE	82 %	82 %	80 %	80 %
	2820	2903				
14	CNQC GKAF GYHSHLQRHERTH	S GEKPY *	73 %	91 %	76 %	85 %
	2904	2984				

Abb. 2.1: Sequenzabgleich der vierzehn Zinkfinger von Zinki

Die Tabelle stellt die Aminosäuresequenzen der vierzehn Zinkfinger von Zinki und ihre jeweiligen Sequenzhomologien zu Zinkfinger 4 dar. Dabei sind die Zinkfinger vom N- zum C-Terminus mit 1-14 durchnummeriert und umfassen die Zinki-cDNA von Nukleotid 1812 bis 2984 (Putz, 1999). Der Nukleotidbereich, der einen Zinkfinger kodiert, ist jeweils unter der ersten und der letzten Aminosäure des Zinkfingers angegeben. Die Cystein- und Histidinreste, die das Zinkatom chelatieren, sind rot. Die Aminosäuren, welche die α -Helix bilden, sind hellgrau unterlegt, die Linkerregion der Zinkfinger ist dunkelgrau unterlegt. Zu der Sequenz des vierten Zinkfingers identische Aminosäuren sind fett gedruckt, konservative Aminosäuresubstituenten kursiv und fett. Die Sequenzhomologie der einzelnen Zinkfinger zu Zinkfinger 4 ist in Prozent jeweils hinter den Sequenzen angegeben. (α -Helix), Die Prozentzahlen beziehen sich auf die hellgrau unterlegte Sequenz der α -Helix. (ZF), Die Prozentzahlen beziehen sich auf die Sequenz des vollständigen Zinkfingers. (id.), Die Prozentzahlen beschreiben den Anteil der zu Zinkfinger 4 identischen Aminosäuren innerhalb der Sequenz. (pos.), Die Prozentzahlen beziehen sich auf positive Aminosäuren, d.h. sie schließen zu Zinkfinger 4 identische Aminosäuren und zusätzlich konservative Aminosäuresubstitutionen ein. Zur besseren Übersicht sind die Prozentzahlen, die den Anteil identischer Aminosäuren angeben, fett gedruckt. (Analyse mit <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html>; Tatusova und Madden, 1999)

Dabei wurde zum einen die gesamte Sequenz der Zinkfinger ausschließlich der Linkerregion und zum anderen nur die Sequenz der α -Helix mit Zinkfinger 4 verglichen. Als „positiv“ werden Aminosäuren gewertet, die entweder identisch zur Vergleichssequenz oder durch eine konservative Substitution entstanden sind. Ein konservativer Aminosäureaustausch weist zwar auf den gleichen evolutionären Ursprung zweier Peptidsequenzen hin, aber die entsprechenden Aminosäuren können trotzdem sehr unterschiedliche Eigenschaften haben. Zum Beispiel ist Alanin (A) hydrophob, sein konservativer Substituent Serin (S) dagegen polar, was gerade die Bindungseigenschaften eines Peptids stark verändern kann. Daher ist für die Beurteilung der Zinkfinger bezüglich ihrer Bindungseigenschaften der Anteil identischer Aminosäuren wichtig, denn schon die Mutation einer Aminosäure kann die Bindungsfähigkeit stark beeinflussen (Yokono et al., 1998). Man stellt große Unterschiede im Ausmaß der Sequenzüberlappung zwischen den vierzehn Zinkfingern fest. So häufen sich die Zinkfinger, deren Aminosäuresequenzen innerhalb der α -Helix über 90 % identisch zu Zinkfinger 4 sind, im N-terminalen Teil des Zinkfingerbereiches von Zinki (Zinkfinger 1, 3, 4, 5, 6, und 11). Die α -Helizes der Zinkfinger 7 und 13 stimmen noch zu über 80 % mit Zinkfinger 4 überein, der Rest weicht deutlich ab. Bis auf Zinkfinger 2 und 8, die zumindest im N-terminalen Teil der α -Helix ein identisches Muster haben (Q N T L), das von den Zinkfingern 3, 4 und 6 stark abweicht, lassen sich die restlichen Zinkfinger nicht mehr in Gruppen identischer beziehungsweise sehr ähnlicher Sequenz einteilen. Auch bezogen auf die Sequenz der vollständigen Zinkfinger bleibt die Tendenz gleich, denn Zinkfinger mit 85 % und mehr identischen Aminosäuren verglichen mit Zinkfinger 4 häufen sich in der N-terminalen Hälfte von Zinki. Vermutlich bilden die vierzehn Zinkfinger also gemäß ihrer Sequenzunterschiede Gruppen unterschiedlicher RNA-, DNA- oder Proteinbindungseigenschaften. Diese Sequenzanalyse bekräftigt somit die Vermutung, dass nicht alle zwölf C-terminalen Zinkfinger, die im *Zwei-Hybrid-Screen* gefunden wurden, gleichermaßen zur Bindung der Arg3.1-mRNA beitragen.

2.1.2 Bestimmung der minimalen RNA-Bindungsdomäne von Zinki im Tri-Hybrid-System

Zur Identifikation der RNA-Bindungsdomäne von Zinki wurden verschiedene Zinkfingerdeletionskonstrukte als Fusionsproteine mit der GAL4-Aktivierungsdomäne hergestellt (s. Tabelle 2.1). Vor dem Hintergrund der Sequenzanalysen war es von besonderem Interesse, die Beteiligung der N-terminal lokalisierten Zinkfinger an der mRNA-

Bindung zu untersuchen. Ziel war es, den Zinkfingerbereich vom N-Terminus ausgehend sukzessiv jeweils um einen Zinkfinger zu verkürzen, um so den Anteil der Zinkfinger, die ähnlich zu Zinkfinger 4 sind, nach und nach zu verkleinern. Die Herstellung dieser Konstrukte erfolgte mittels PCR. Da die Sequenzen der vierzehn Zinkfinger sehr ähnlich sind, wurde derselbe 5'-Primer für alle vierzehn Konstrukte benutzt. Dieser Primer hybridisiert jeweils ca. 30 Nukleotide vor Start eines Zinkfingers (s. Tabelle 2.1, vgl. Abb. 2.1), so dass der diesem Zinkfinger vorangehende Zinkfinger unvollständig ist und daher nicht seine native Konformation annehmen kann. Die Sequenz des Zinkfingers aber, der auf den unvollständigen Zinkfinger folgt, ist komplett, so dass davon auszugehen ist, dass die natürliche Konformation mit β -Haarnadelschleife und α -Helix gebildet wird. Durch den „Universalprimer“ verursachte eventuelle Unterschiede zur Originalsequenz (s. Tabelle 2.1) sollten auf die RNA-Bindung daher keine Auswirkung haben. Sie liegen nämlich komplett im Bereich des unvollständigen Zinkfingers, der nur noch aus Teilen der α -Helix besteht und daher seine Fähigkeit, mRNA zu binden, verloren haben sollte. Die PCR mit diesem Primer ergab mehrere cDNA-Fragmente aufsteigender Größe, deren Länge der jeweiligen Anzahl der amplifizierten Zinkfinger entsprach (s. Abb. 2.2 a). Die PCR-Produkte wurden in den pACTII-Vektor kloniert (Beschreibung der Klonierung s. Kap. 5.2.1). Die einzelnen Klone, die die verschiedenen Zinkfingerkonstrukte enthielten, wurden mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung identifiziert. Insgesamt zwölf der vierzehn Konstrukte konnten auf diese Weise kloniert werden (s. Tabelle 2.1).

Name	Bereich der cDNA	Sequenz des Primerbereiches
ZF1-	1775-2984	<u>C A T G A A A G G A C A C A C A C T G G</u> H E R T H T G
[ZF2-	1860-2984	C A T G A A A G G A C A C A C A C T G G] H E R T H T G
ZF3-	1944-2984	C A T A A A A G A A C A C A C T C G G A H K R T H S E
ZF4-	2028-2984	C A T G A A A G A A C T C A C A C T G G H E R T H T G
ZF5-	2112-2984	C A T G A A A G G A C A C A C A C T G G H E R T H T G
ZF6-	2205-2984	C A T G A A A G G A C A C A C A C T G G H E R T H T G
ZF7-	2280-2984	C A T G A A A G G A C A C A C A C T G G H E R T H T G
ZF8-	2364-2984	C A T G A A A G G A T A C A C A C T G G H E R I H T G
[ZF9-	2448-2984	C A T G A A A G A A C A C A C A C T G G] H E R T H T G
ZF10-	2532-2984	C A C A A A A G A G T A C A C A C T G G H K R V H T G
ZF11-	2616-2984	C A C A A A A G G A C A C A T T C T G G H K R T H T G
ZF12-	2700-2984	C A T G A A A G A A C C C A T A C T G G H E R T H T G
ZF13-	2784-2984	C A T A A A A G A A C A C A C A C T G G H K R T H T G
ZF14-	2868-2984	C A T G A A A G G A C A C A C A C T G G H E R T H T G

Tab. 2.1: Übersicht über die im Tri-Hybrid-System eingesetzten Zinkfingerkonstrukte

Die Tabelle zeigt die für die Tri-Hybrid-Analyse der Arg3.1-mRNA-Bindung an Zinki klonierten Zinkfingerkonstrukte. Es sind jeweils der Name des Konstrukts und der darin enthaltene Bereich der Zinki-cDNA angegeben. Außerdem sind die Nukleotidsequenz und darunter die entsprechende Aminosäuresequenz des Bereiches, an dem sich der für die Klonierung verwendete Primer anlagert, angegeben. Die tatsächliche Primersequenz ist unterstrichen und entspricht der korrekten Sequenz für das Konstrukt ZF1-. Alle Abweichungen der Originalsequenz von Zinki zu dieser Primersequenz sind rot markiert. Die in eckige Klammern eingefassten Konstrukte ZF2- und ZF9- konnten nicht kloniert werden.

Diese Zinkfingerdeletionskonstrukte wurden hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften analysiert. Dazu wurde untersucht, ob sie im Tri-Hybrid-System noch in der Lage waren, an die vollständige Arg3.1-mRNA zu binden (Plasmid pRevRA3.1, s. Kapitel 6.2). Um zu zeigen, dass die Bindung spezifisch ist, wurden die Konstrukte ebenfalls mit der GAPDH-mRNA getestet, die im Tri-Hybrid-System nicht an Zinki bindet (Plasmid pRevRGAP, s.

Kapitel 6.2). Die Zinkfingerkonstrukte wurden mit den Plasmiden pRevRA3.1 beziehungsweise pRevRGAP in den Hefestamm CG 1945 kotransfiziert und eine eventuelle Protein-mRNA-Bindung im X-gal-Assay mittels Blaufärbung verifiziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 2.2 b zusammengefasst. Die Experimente demonstrierten, dass die C-terminalen acht Zinkfinger (ZF7-) ausreichen, um die Arg3.1-mRNA zu binden, während die C-terminalen sieben Zinkfinger (ZF8-) keine Bindung mehr vermitteln. Allerdings zeigen die C-terminalen zwölf Zinkfinger (ZF3-), das heißt die im ursprünglichen *Screen* isolierte Arg3.1-mRNA-Bindungsdomäne, und die vollständigen vierzehn Zinkfinger (ZF1-) die stärkste Blaufärbung. Alle getesteten Konstrukte binden nicht an die GAPDH-mRNA.

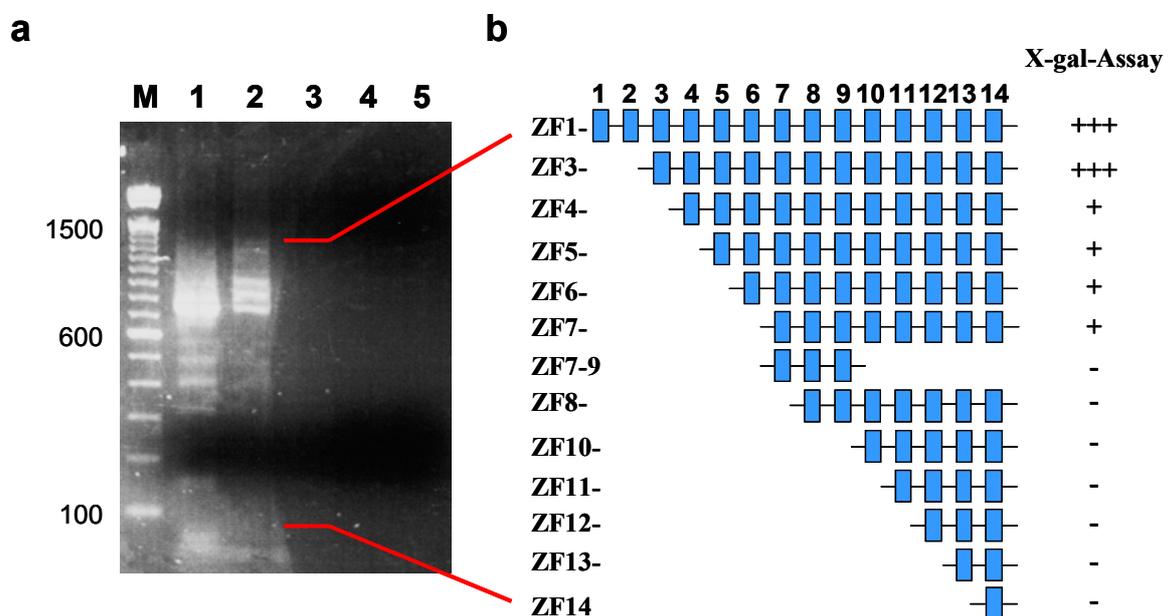


Abb. 2.2: Bindung der Zinkfingerdeletionskonstrukte von Zinki an die Arg3.1-mRNA im Tri-Hybrid-System

Die Abbildung zeigt die Klonierung der Zinkfingerkonstrukte und die Ergebnisse der Analysen ihrer Arg3.1-mRNA-Bindungsfähigkeit im Tri-Hybrid-System. **(a)** DNA-Gelelektrophorese der Produkte der PCR zur Generierung der Zinkfingerkonstrukte. Die unterschiedlichen Amplifikate haben Längen zwischen 81 bp (ZF14) und 1212 bp (ZF1-), wobei die Größenunterschiede zwischen den einzelnen Fragmenten jeweils 84 bp betragen. Dies entspricht der Länge der cDNA eines Zinkfingers. In der Spur (M) ist der DNA-Längenstandard aufgetragen, dessen Bandengrößen in bp angegeben sind. In den Spuren (1) und (2) ist der vollständige PCR-Ansatz aufgetragen, in den Spuren (3) und (4) jeweils ein PCR-Ansatz ohne 3'-Primer beziehungsweise 5'-Primer und in der Spur (5) der PCR-Ansatz ohne cDNA-Template. **(b)** Ergebnisse der Bindungsanalyse der verschiedenen Zinkfingerkonstrukte an die Arg3.1-mRNA im Tri-Hybrid-System. Die einzelnen Zinkfinger sind als blaue Rechtecke dargestellt. Die Bezeichnung der Konstrukte entspricht den in Tabelle 2.1 angegebenen Namen. Das unter (b) aufgeführte Konstrukt ZF 7-9 entstammte nicht der unter (a) gezeigten PCR, sondern wurde separat davon in einer anderen Klonierung hergestellt (s. Text). (+++), starke Blaufärbung im X-gal-Assay; (+), schwache Blaufärbung im X-gal-Assay; (-), keine Blaufärbung im X-gal-Assay.

Zur Bestimmung der Minimalbindungsdomäne wurde die Zahl der Zinkfinger weiter eingegrenzt. Dazu wurden die cDNA der Zinkfinger 7 bis 9 (Nukleotide 2280-2552) mittels PCR amplifiziert und in den pACTII-Vektor inkloniert (ZF7-9, Klonierung s. Kap. 5.2.1). Auch dieses Konstrukt wurde mit den Plasmiden pRevRA3.1 und pRevRGAP getestet. Es konnte keine spezifische Blaufärbung im X-gal-Assay, das heißt also keine Bindung mehr festgestellt werden (s. Abb. 2.2 b). Auf weitere Eingrenzungen der Bindungsdomäne im C-terminalen Bereich von Zinki wurde verzichtet, da durch die bisherigen Ergebnisse deutlich wurde, dass die Arg3.1-mRNA-Bindung durch die additive Wirkung der N-terminalen Zinkfinger vermittelt wird.

2.1.3 Analyse der Bindung von Zinki an die Arg3.1-mRNA in einem *in vitro* RNA-Pulldown

Das Tri-Hybrid-System eignet sich sehr gut zur Identifikation von unbekanntem Protein-mRNA-Interaktionspartnern (Putz et al., 1996). Dieses Hefesystem birgt aber wie das Zwei-Hybrid-System (Fields und Song, 1989) die Gefahr, dass Moleküle außerhalb ihrer physiologischen Umgebung anders modifiziert oder lokalisiert werden und daher Interaktionen detektiert werden können, die *in vivo* gar nicht stattfinden (Putz et al., 2000; Coates und Hall, 2003). Die im Tri-Hybrid-System identifizierten Interaktionen müssen daher noch in unabhängigen Systemen bestätigt werden. Die Bindung von Zinki an die Arg3.1-mRNA wurde in unserem Labor bereits mittels eines North Western Blots unabhängig vom Tri-Hybrid-System gezeigt (s. Kapitel 1.7). Zur weiteren Bestätigung der Bindung wurde während dieser Doktorarbeit ein neuartiger RNA-Pulldown entwickelt, mit dem die spezifische Bindung zwischen Arg3.1-mRNA und Zinki-Protein ebenfalls nachgewiesen werden konnte. Dieser RNA-Pulldown beruht darauf, dass ein Protein mit einer an magnetische Kugeln gekoppelten RNA aus einem Zellysat präzipitiert wird. Dazu wurde das vollständige Arg3.1-Transkript über seine PolyA-Sequenz an T₍₂₅₎-Oligonukleotid-gekoppelte magnetische Kugeln (*Dynabeads*) gebunden und damit rekombinantes EGFP-Zinki-Fusionsprotein aus HEK293-Zellysat präzipitiert (pEGFP-Zinki, s. Kap. 6.2). Als Negativkontrolle diente ein identischer Pulldown mit der GAPDH-mRNA, die im Tri-Hybrid-System nicht an Zinki bindet. Die Arg3.1- und GAPDH-mRNAs wurden durch *in vitro* Transkription generiert (s. Kap. 5.1.18 und 5.2.9). Nach der Präzipitation wurden mRNA und Proteine von den *Dynabeads* eluiert und die Eluate über einen Western Blot mit einem Zinkispezifischen Antiserum sowie RT-PCR mit Arg3.1- beziehungsweise GAPDH-spezifischen

Primern analysiert. In Abbildung 2.3 sind die Ergebnisse eines solchen *Pulldowns* dargestellt. Das Eluat des *Pulldowns* mit Arg3.1-mRNA zeigte im Western Blot ein spezifisches Signal der Größe von EGFP-Zinki, während das Eluat des *Pulldowns* mit GAPDH-mRNA kein Zinki-spezifisches Signal aufwies (Abb. 2.3 a). Auch im Eluat eines Arg3.1-mRNA-*Pulldowns* mit Lysat untransfizierter Zellen konnte keine Zinki-spezifische Bande im Western Blot nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

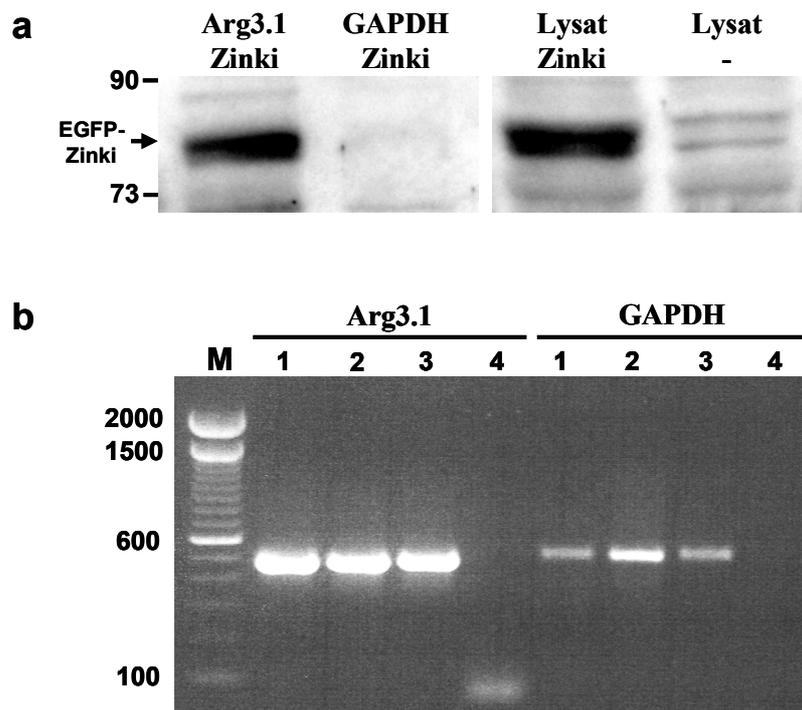


Abb. 2.3: Bindung der Arg3.1-mRNA an das Zinki-Protein *in vitro*

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse von RNA-*Pulldowns* mit an *Dynabeads* gekoppelter Arg3.1-mRNA beziehungsweise GAPDH-mRNA. **(a)** Western-Blot-Analyse der RNA-*Pulldowns*. Zur Detektion des EGFP-Zinki-Proteins wurde ein Zinki-spezifisches Antiserum verwendet. Für die hier gezeigten *Pulldowns* wurde Zelllysate von EGFP-Zinki-transfizierten HEK293-Zellen eingesetzt. Die Spur *Arg3.1-Zinki* zeigt das Eluat eines *Pulldowns*, der mit *in vitro* transkribierter Arg3.1-mRNA durchgeführt wurde, in der Spur, die mit *GAPDH-Zinki* gekennzeichnet ist, wurde für den *Pulldown in vitro* transkribierte GAPDH-mRNA eingesetzt. In der Spur, die mit *Lysat-Zinki* gekennzeichnet ist, wurde das Lysat EGFP-Zinki-transfizierter Zellen aufgetragen. In der Spur die mit *Lysat* gekennzeichnet ist, wurde das Lysat von untransfizierten Zellen aufgetragen. Die Molekulargewichte der Banden des Protein-Längenstandards (hier nicht zu sehen) sind in kDa angegeben. **(b)** DNA-Gelelektrophorese der Produkte der Arg3.1- und GAPDH-RT-PCRs. In den mit (1) gekennzeichneten Spuren wurden die RT-PCR-Produkte von Eluaten der *Pulldowns* mit Lysat von EGFP-Zinki-transfizierten Zellen aufgetragen. In den Spuren (2) und (3) sind RT-PCR-Produkte der *Pulldowns* mit Lysat untransfizierter Zellen aufgetragen und die mit (4) gekennzeichneten Spuren zeigen die Ergebnisse der RT-PCRs mit H₂O anstelle des Eluats. In Spur (M) ist ein DNA-Längenstandard aufgetragen, dessen Bandengrößen in bp angegeben sind. Die berechneten Fragmentgrößen betragen 450 bp für Arg3.1 und 550 bp für GAPDH.

Zur Überprüfung der Kopplung der mRNAs an die *Dynabeads* wurden diese durch RT-PCRs mit Arg3.1- beziehungsweise GAPDH-spezifischen Primern aus den Eluaten amplifiziert. Die Amplifikation zeigte neben der erfolgreichen Kopplung außerdem, dass die mRNAs während des Experiments nicht degradiert worden waren (Abb. 2.3 b).

Diese Experimente demonstrieren eine starke Bindung der Arg3.1-mRNA an das Zink-Protein. Die analysierte Interaktion zeigt eine hohe Spezifität, da GAPDH-mRNA das Zink-Protein nicht präzipitieren konnte. Die Untersuchungen unterstützen daher die ursprünglich im Tri-Hybrid-System identifizierte spezifische Bindung der Arg3.1-mRNA an das Zink-Protein.

2.2 Untersuchungen zur Rolle Zinkis bei der Translation von mRNAs

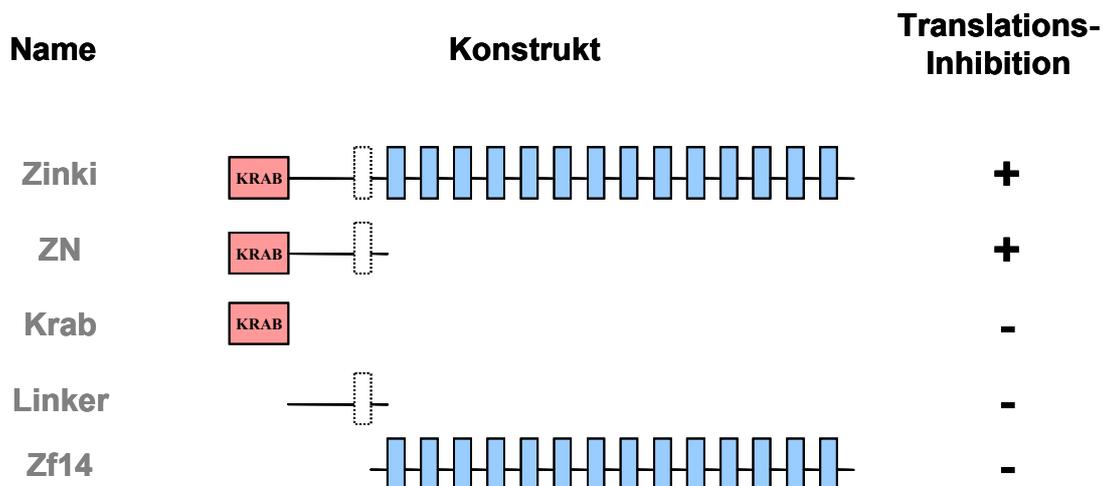
Einer der Mechanismen, der zur Ausbildung synapsenspezifischer Modifikationen beitragen könnte, ist die lokale Translation von mRNAs in aktivierten Bereichen der Dendriten (s. Kap. 1.6). So gibt es zum Beispiel Hinweise darauf, dass die mRNA von Arg3.1 spezifisch an aktivierten Synapsen translatiert werden könnte (Steward et al., 1998; Kuhl und Skehel, 1998; Bagni et al., 2000). Um zu gewährleisten, dass die Synthese des Arg3.1-Proteins tatsächlich nur an Synapsen stattfindet, die einen plastizitätsinduzierenden Stimulus erfahren haben, muss die Translation der Arg3.1-mRNA präzise kontrolliert werden. Möglicherweise gibt es daher neben Mechanismen zur lokalen Aktivierung der Translation als Antwort auf einen synaptischen Reiz ebenso solche Mechanismen, die zur Inhibition der Translation an den nicht aktivierten Synapsen führen. Die genauen Funktionsweisen dieser spezifischen Translationsregulation der Arg3.1-mRNA sind noch nicht bekannt. Allerdings gibt es zahlreiche Hinweise, dass mRNA-bindende Proteine unter anderem eine Rolle bei der Kontrolle der Translation spielen können (Standart und Jackson, 1994; Mendez und Richter, 2001; Mazumder et al., 2003). Eine mögliche Funktion Zinkis könnte daher die Regulation der Translation von Arg3.1 über die Bindung an seine mRNA sein. Diese Vermutung sollte in den folgenden Experimenten überprüft werden.

2.2.1 Translationsinhibition durch Zinkis im Kaninchenretikulozytenlysat

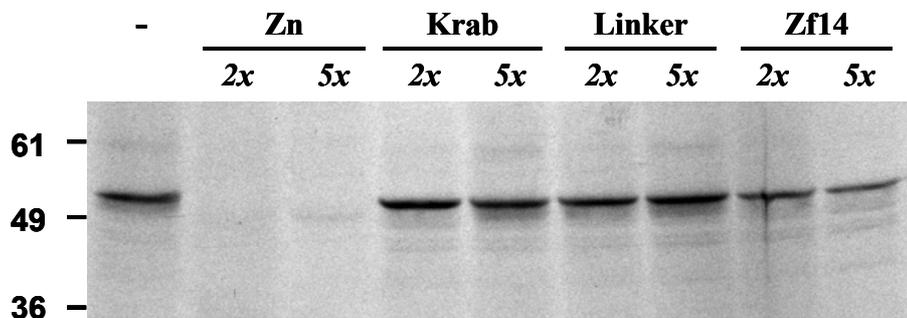
Um eine mögliche Beteiligung Zinkis an der Translationsregulation zu klären, wurde der Einfluss von Zink-Protein auf die Translation von Arg3.1-mRNA in einem von Lagerbauer et al. entwickelten *in vitro* Assay untersucht (Lagerbauer et al., 2001). Dazu wurde die in

in vitro transkribierte Arg3.1-mRNA zunächst mit verschiedenen Proteindomänen von Zinki inkubiert (Abb. 2.4 a). Folgende Domänen wurden eingesetzt: der N-Terminus (ZN, AS 1-65), dessen Untereinheiten KRAB-Domäne (Krab, AS 1-12) und Pseudozinkfinger (Linker, AS 12-65), die vierzehn Zinkfinger (ZF14, AS 61-463) und das vollständige Zinki-Protein (Zinki, AS 1-463) (Klonierungen s. Kap. 5.2.2). Anschließend wurde die Translation durch Zugabe von Kaninchenretikulozytenlysat und Aminosäuren gestartet. Die getesteten mRNAs waren mit einer 5'-*Cap*-Struktur versehen, die die Translationseffizienz verbessert (Dasso und Jackson, 1989). Zur späteren Detektion der translatierten Proteine mittels SDS-PAGE und Autoradiographie wurde ³⁵S-markiertes Methionin verwendet. Abbildung 2.4 b zeigt, dass schon zweifacher molarer Überschuss des N-Terminus von Zinki ausreichend ist, die Translation von Arg3.1 deutlich zu inhibieren. Der gleiche Effekt wird nach Inkubation mit dem vollständigen Zinki-Protein beobachtet (vgl. Abb. 2.4 d), wohingegen die vierzehn Zinkfinger ohne den N-Terminus die Translation von Arg3.1 auch im fünffachen molaren Überschuss nicht inhibieren. Für eine effektive Translationsinhibition in diesem System ist also der N-Terminus von Zinki sowohl notwendig als auch ausreichend. Um die minimale Domäne einzugrenzen, die für die Inhibition der Arg3.1-Translation ausreichend ist, wurde der N-Terminus von Zinki weiter unterteilt (Klonierung s. Kap. 5.2.2). Die trunkierte KRAB-A-Domäne und der Pseudozinkfinger wurden auf ihre Fähigkeit, die Proteinsynthese zu hemmen, getestet. In Abbildung 2.4 b ist zu erkennen, dass diese Konstrukte keinen Effekt mehr auf die Arg3.1-Translation ausübten. Die Daten zeigen, dass zur Hemmung der Proteinsynthese in diesem System der vollständige N-Terminus von Zinki notwendig ist. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass die Translationsinhibition nicht durch die Arg3.1-mRNA-Bindungsdomäne von Zinki, nämlich die Zinkfinger, sondern durch eine von der mRNA-Bindung unabhängige Domäne, den N-Terminus, vermittelt wird. Eine reduzierte Proteinsynthese kann allerdings auch durch verstärkte Degradation der mRNA verursacht werden, ohne dass spezifische Mechanismen der Translation inhibiert werden. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde die Stabilität der Arg3.1-mRNA nach Inkubation mit den verschiedenen Proteinen durch eine Arg3.1-spezifische RT-PCR überprüft. Da die Arg3.1-mRNA aus allen Ansätzen amplifiziert werden konnte, ist davon auszugehen, dass keines der im Translationsassay eingesetzten Proteine zu einer verstärkten Degradation der mRNA führte (Abb. 2.4 c). Die verringerte Proteinsynthese ist demnach auf eine Inhibition der Translation zurückzuführen.

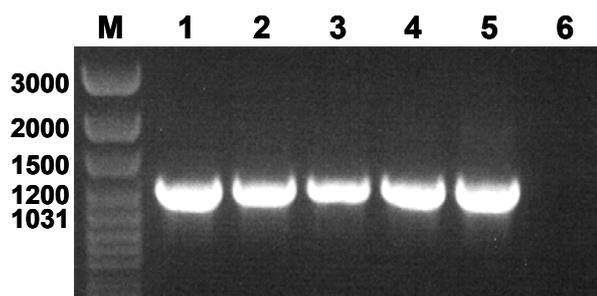
a



b



c



d

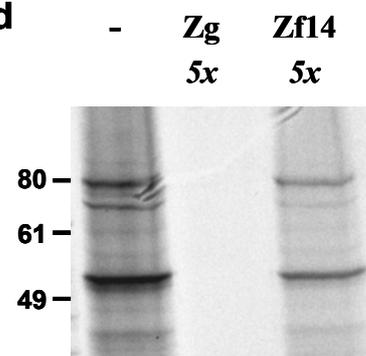


Abb. 2.4: Inhibition der Translation von Arg3.1-mRNA durch das Zinki-Protein *in vitro*

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse eines *in vitro* Translationsassays im Retikulozytenlysat nach Inkubation der eingesetzten mRNA mit verschiedenen Domänen des Zinki-Proteins. **(a)** Übersicht über die verwendeten Zinki-Proteindomänen und ihren Einfluss auf die Translation. (*Zinki*), vollständiges Zinki-Protein (AS 1-463); (*Zn*), N-Terminus von Zinki (AS 1-65); (*Krab*), trunkierte KRAB-A-Domäne von Zinki (AS 1-12); (*Linker*), Pseudozinkfinger von Zinki (AS 12-65); (*Zf14*), vierzehn Zinkfinger von Zinki (AS 61-463). **(b)** Autoradiographie der *in vitro* Translationsassays mit Arg3.1-mRNA und verschiedenen Proteindomänen von Zinki. Die Proteine wurden in jeweils zweifachem (2x) beziehungsweise fünffachem (5x) molaren Überschuss zur mRNA eingesetzt. In der Spur (-) wurde als Positivkontrolle die *in vitro* Translation ohne Protein durchgeführt. Die

→

Weiterhin wurde untersucht, ob Zinki im Retikulozytenlysat die Translation der Arg3.1-mRNA spezifisch inhibiert oder ob es sich um einen allgemeinen Effekt handelt. Dazu wurde der Assay auch mit anderen mRNAs durchgeführt. Abbildung 2.4 d zeigt als Beispiel die Ergebnisse des Translationsassays mit RNA B, einer Kontroll-RNA, die eine Protease kodiert, welche sich selber in Peptide der Größe von 6 kD bis 82 kD spaltet. Der fünffache molare Überschuss von Zinki-Protein führte zu einer vollständigen Inhibition der Translation dieser mRNA. Zinki inhibierte die Translation der RNA B also im gleichen Maße wie die von Arg3.1. Diese Experimente demonstrieren, dass die Inkubation mit Zinki-Protein im Retikulozytenlysat zu einer generellen Inhibition der Translation führt, unabhängig von der Art der getesteten mRNA.

2.2.2 Blockade des 80S-Initiationskomplexes durch Zinki

Die Translation von mRNA ist mit Initiation, Elongation und Termination ein mehrstufiger, komplexer Mechanismus. An diesem Vorgang sind viele unterschiedliche Faktoren beteiligt (Ramakrishnan, 2002), so dass eine Inhibition des Ablaufs auf vielfältige Weise an vielen verschiedenen Punkten stattfinden kann. Dennoch haben Studien gezeigt, dass die Phase der Initiation den Hauptkontrollpunkt der Translation darstellt (Preiss und Hentze, 2003). Es ist daher von Interesse, den Zeitpunkt, an dem ein Protein die Translation inhibiert, näher einzugrenzen. Das Retikulozytenlysat eignet sich auch für Untersuchungen zu dieser Frage, da der Einsatz von Reagenzien, die die Translation spezifisch inhibieren, in diesem System einfach durchführbar ist. Cycloheximid zum Beispiel verhindert den Peptidyltransfer an der 60S-Untereinheit der Ribosomen, so dass mRNAs nach Zusammenlagerung der 40S- und 60S-Untereinheit nicht weiter translatiert werden, sondern im 80S-Initiationskomplex

Molekulargewichte der Banden des Protein-Längenstandards (auf der Autoradiographie nicht zu sehen) sind in kDa angegeben. (c) DNA-Gelelektrophorese der Produkte der RT-PCR mit Arg3.1-spezifischen Primern nach Inkubation der mRNA mit verschiedenen Zinki-Domänen. Spur (1) enthält die RT-PCR-Produkte nach Inkubation mit dem N-Terminus von Zinki (ZN, AS 1-65), (2) nach Inkubation mit den vierzehn Zinkfingern (ZF14, AS 61-463), (3) nach Inkubation mit dem vollständigen Zinki-Protein (Zinki, AS 1-463), (4) nach Inkubation mit GST, (5) ohne Protein und in Spur (6) wurde der Ansatz einer RT-PCR ohne mRNA aufgetragen. In der Spur (M) ist der DNA-Längenstandard aufgetragen, dessen Bandengrößen in bp angegeben sind. Das Arg3.1-Amplifikat ist ca. 1,1 kb groß. (d) Autoradiographie des Translationsassays mit RNA B. Diese RNA kodiert ein Polypeptid, dessen interne Proteasedomäne das Protein spezifisch in kleinere Peptide spaltet (82 kDa, 74 kDa, 52 kDa, 30 kDa, 22 kDa, 6 kDa), wobei die drei kleinsten Banden auf diesem Ausschnitt der Gelelektrophorese nicht mehr zu sehen sind. Die Beschriftung entspricht der Beschriftung unter Punkt (a).

„gefangen“ bleiben (Baliga et al., 1969; McKeehan und Hardesty, 1969). Während aktiv translatierte mRNAs unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich in der Polysomenfraktion zu finden sind, reichern sie sich nach Cycloheximidbehandlung in der 80S-Fraktion an. Ist der Zusammenbau des 80S-Komplexes gestört (zum Beispiel durch ein die Translation inhibierendes Protein), dann findet eine solche Anreicherung nicht mehr statt.

Zur näheren Analyse des Effekts der Translationsinhibition durch Zinki sollte in einem weiteren Experiment untersucht werden, ob Zinki die Translation auf der Stufe der Initiation hemmt. Zu diesem Zweck wurde zunächst ³⁵S-markierte Arg3.1-mRNA mit dem N-Terminus von Zinki (AS 1-65) beziehungsweise den vierzehn Zinkfingern (AS 61-463) inkubiert und anschließend für fünf Minuten in cycloheximidbehandeltem Retikulozytenlysat translatiert. Der Reaktionsansatz wurde dann über einen kontinuierlichen Sucrosedichtegradienten aufgetrennt und anschließend in Fraktionen gesammelt. Die Anreicherung der Arg3.1-mRNA in den einzelnen Fraktionen wurde über Quantifizierung der Radioaktivität in *counts per minute (cpm)* mit Hilfe eines Szintillationszählers bestimmt. Abbildung 2.5 a zeigt die Verteilung der mRNA nach Inkubation mit dem N-Terminus von Zinki beziehungsweise mit den vierzehn Zinkfingern. Während bei Zugabe der vierzehn Zinkfinger zum Reaktionsansatz die mRNA in den 80S-Fraktionen (Fraktionen 8-11) deutlich angereichert ist, ist sie nach der Inkubation mit dem N-Terminus von Zinki hauptsächlich in den leichteren Fraktionen der so genannten *messenger* Ribonukleoproteine (mRNPs, Fraktionen 1-4) zu finden. In keinem von drei unabhängigen Versuchen wurde unter Zugabe des N-Terminus von Zinki ein Anstieg der Arg3.1-mRNA in den Fraktionen des 80S-Komplexes beobachtet. Zur Quantifizierung des Effektes wurde für jedes dieser Experimente jeweils die Summe der *cpms* in den Fraktionen des 80S-Initiationskomplexes nach Inkubation mit dem N-Terminus beziehungsweise den vierzehn Zinkfingern von Zinki bestimmt (Tabelle der *cpm* s. Kap. 9.1.1). Die statistische Analyse der so erhaltenen Werte zeigt, dass sich nach Inkubation mit dem N-Terminus von Zinki signifikant weniger Arg3.1-mRNA in den 80S-Fraktionen anreichert als nach Inkubation mit den vierzehn Zinkfingern von Zinki (Abb. 2.5 b). Das lässt vermuten, dass der N-Terminus von Zinki die Translation der Arg3.1-mRNA zumindest in diesem *in vitro* System auf der Stufe der 80S-Initiationskomplexbildung inhibiert. Dagegen behindern die vierzehn Zinkfinger von Zinki, die die Translation im Retikulozytenlysat nicht hemmen, auch die Anreicherung der Arg3.1-mRNA im 80S-Komplex nach Cycloheximidbehandlung nicht (vgl. Abb. 2.4). Dieses Experiment konnte also zeigen, dass die spezifisch durch den N-Terminus von Zinki vermittelte Inhibition der Translation vermutlich auf Stufe der Bildung des Initiationskomplexes stattfindet.

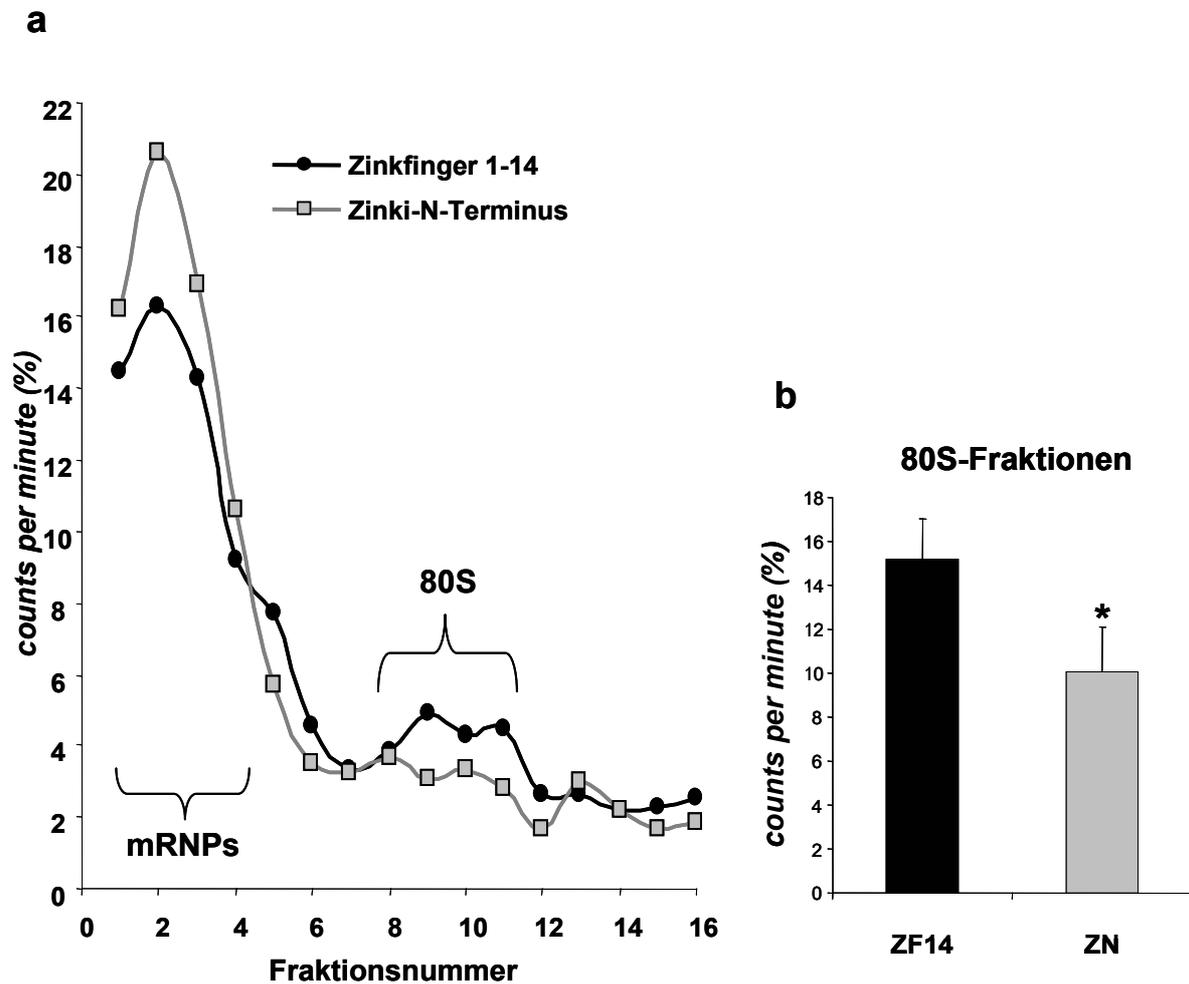


Abb. 2.5: Einfluss verschiedener Zinki-Domänen auf die Bildung des 80S-Initiationskomplexes *in vitro*

Die Abbildung zeigt die Arg3.1-mRNA-Verteilung nach Inkubation der mRNA mit dem N-Terminus bzw. den vierzehn Zinkfingern von Zinki in einem cycloheximidbehandelten Retikulozytenlysat. **(a)** Der Graph stellt die Verteilung der Arg3.1-mRNA in einem Sucrosedichtegradienten exemplarisch für ein Experiment dar. Die graue Linie zeigt die mRNA-Verteilung nach Inkubation mit dem N-Terminus von Zinki (AS 1-65), die schwarze Linie dagegen die mRNA-Verteilung nach Inkubation mit den vierzehn Zinkfingern von Zinki (AS 61-463). Aufgetragen sind jeweils die *cpm* (*counts per minute*) in Prozent der Summe der *cpm* aller 16 Fraktionen eines 5-25 %igen Sucrosedichtegradienten. Die *cpm* sind ein Maß für die Radioaktivität und damit für die Arg3.1-mRNA-Konzentration. Die Fraktionen der nicht in der Translation befindlichen *messenger* Ribonukleoproteine (*mRNPs*, 1-4) beziehungsweise des 80S-Initiationskomplexes (*80S*, 8-11) sind durch geschweifte Klammern gekennzeichnet. **(b)** Quantifizierung von drei unabhängigen Experimenten. Die Balken stellen jeweils den Mittelwert der Summen der *cpm* innerhalb der 80S-Initiationskomplexfraktionen dar. Nach Inkubation mit dem N-Terminus von Zinki (*ZN*) reichert sich signifikant weniger Arg3.1-mRNA in den 80S-Fractionen an als nach Inkubation mit den vierzehn Zinkfingern (*ZF14*) (*ZF14*: $15,2 \pm 1,9$; *ZN*: $10,1 \pm 2,0$; einseitiger ungepaarter Student-t-Test * $p < 0,05$; Tabelle der *cpm* s. Kap. 9.1.1; Beschreibung der Analyse s. Kap. 5.5.15).

2.3 Untersuchungen zur subzellulären Verteilung von Zinki

Die genaue Aufklärung der subzellulären Verteilung des Zinki-Proteins ist unter anderem aus den folgenden drei Gründen interessant. Erstens ist die Expression und Lokalisation des Bindungspartners von Zinki, der Arg3.1-mRNA, aktivitätsreguliert. Die Arg3.1-mRNA wird nach Induktion bis in die distalen Bereiche von Dendriten und dort spezifisch zu aktivierten Synapsen transportiert (Abb. 1.2; Link et al., 1995, Lyford et al. 1995; Steward et al., 1998). Es ist daher für die weitere Charakterisierung von Zinki wichtig zu untersuchen, ob das Zinki-Protein ebenfalls mit Synapsen assoziiert ist und ob seine Lokalisation auch durch synaptische Aktivität verändert wird. Zweitens gibt es, wie die im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Experimente zeigen, Hinweise darauf, dass Zinki an der Regulation der Translation beteiligt sein könnte. Diese mögliche Funktion Zinkis deutet auf eine Assoziation des Zinki-Proteins mit Komponenten des Translationsapparates, wie zum Beispiel den Polysomen, hin. Und drittens gleicht der Aufbau des Zinki-Proteins mit trunkierter KRAB-A-Domäne und vierzehn Zinkfingern der Struktur eines Transkriptionsfaktors. Sollte Zinki tatsächlich eine Rolle bei der Transkription spielen, dann müsste das Zinki-Protein auch im Nukleus vorliegen. Die aus diesen Beobachtungen resultierenden Fragen sind also:

- Ist das Zinki-Protein dendritisch beziehungsweise an Synapsen lokalisiert?
- Ist Zinki im Zellkern lokalisiert?
- Ist die subzelluläre Verteilung von Zinki aktivitätsreguliert?
- Ist Zinki mit den Ribosomenuntereinheiten beziehungsweise Polysomen assoziiert?

2.3.1 Somatodendritische Lokalisation von Zinki

Zunächst wurde die subzelluläre Verteilung Zinkis an Gehirndünnschnitten der Maus untersucht. Dazu wurden Immunogoldfärbungen mit einem Zinki-spezifischen Antiserum an Gehirnschnitten einer unbehandelten Maus durchgeführt. Wie in der Gesamtansicht des Gehirns (Abb. 2.6 a) zu sehen ist, wird das Zinki-Protein konstitutiv im Hippokampus und im Kortex exprimiert. Abbildung 2.6 b zeigt eine Vergrößerung des Hippokampus, hier ist Zinki in der CA1- und CA3-Region und im *Gyrus dentatus* lokalisiert, wobei jeweils die dendritischen Schichten (*Stratum radiatum* der CA1-Region, *Stratum lucidum* und *pyramidale* der CA3-Region und *Stratum moleculare* des *Gyrus dentatus*) eine besonders starke Färbung aufweisen. Die Zinki-Expression kann dabei in allen genannten Bereichen von den proximalen bis in die distalen Bereiche der dendritischen Verästelungen detektiert werden

(Abb. 2.6 c-f). Abbildung 2.6 d zeigt, dass Zinki auch in den basalen Dendriten der CA1-Pyramidenzellen nachgewiesen werden kann. Im Gegensatz zum Hippokampus ist die Expression von Zinki in der Amygdala weniger stark detektierbar (Abb. 2.6 g). Im entorhinalen Kortex dagegen wird Zinki in den Schichten II bis VI stark exprimiert (Abb. 2.6 h). Die Vergrößerung zeigt eine deutliche somatodendritische Lokalisierung (Abb. 2.6 i). Da Zinki als Bindungspartner der aktivitätsregulierten Arg3.1-mRNA identifiziert worden war, ist die Untersuchung seiner Expression nach Induktion synaptischer Aktivität von besonderem Interesse. Zu diesem Zweck wurden ebenfalls immunohistochemische Färbungen mit Zinkispezifischem Antiserum an Gehirnen von kainatbehandelten Mäusen durchgeführt. Es konnte kein lichtmikroskopisch detektierbarer Unterschied in der Zinki-Expression vier Stunden nach kainatinduzierter synaptischer Aktivität festgestellt werden (siehe hierzu Kapitel 2.4.1, Abb. 2.9 d, e und Kapitel 2.5.7.1, Abb. 2.20).

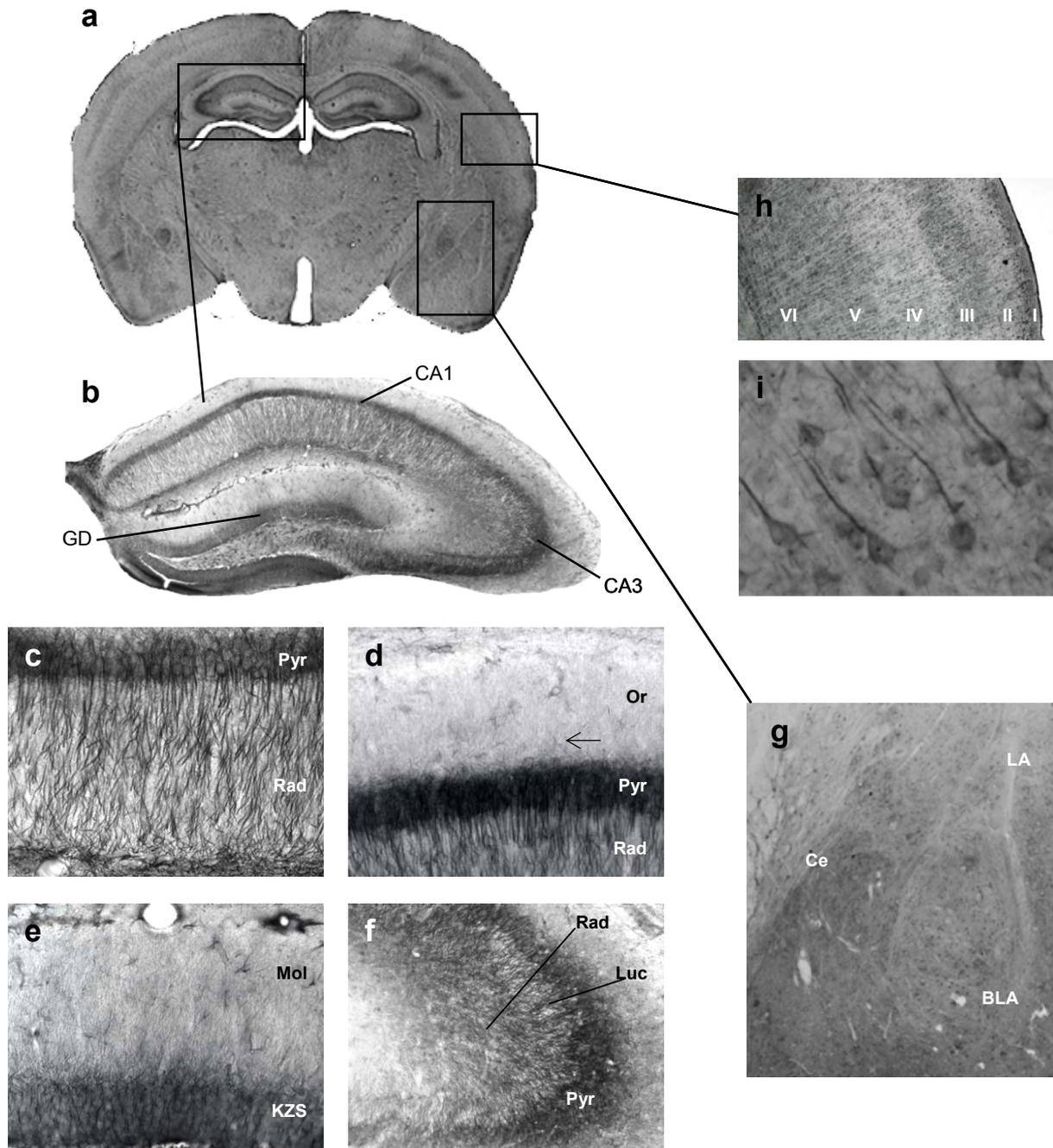


Abb. 2.6: Verteilung des Zinki-Proteins im Mausehirn

Die Abbildung zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen der Immunogoldfärbung eines koronalen Gehirndünnschnittes einer unbehandelten Maus mit einem Zinki-spezifischen Antiserum. **(a)** Gesamtansicht des Gehirns. Der Hippokampus, die Amygdala und ein Bereich des entorhinalen Kortexes, die in **(b)**, **(g)** und **(h)** vergrößert dargestellt sind, sind durch offene Rechtecke markiert. **(b)** Vergrößerung des Hippokampus. Die Bereiche der CA1- und CA3-Region sowie des *Gyrus dentatus* sind jeweils gekennzeichnet. **(c-f)** Vergrößerungen der verschiedenen Bereiche des Hippokampus. Dargestellt sind **(c)** die Pyramidalzellschicht mit den apikalen Dendriten der CA1-Region (*Stratum pyramidale* und *Stratum radiatum*), **(d)** die Pyramidalzellschicht mit den basalen Dendriten der CA1-Region (*Stratum pyramidale* und *Stratum oriens*), **(e)** der *Gyrus dentatus* und **(f)** die CA3-Region. Der Pfeil in Abbildung **(d)** verweist auf die Lokalisation des Zinki-Proteins in den basalen Dendriten der CA1-Region. **(g)** Vergrößerung der Amygdala. **(h)** Vergrößerung eines Teils des entorhinalen Kortexes. Die sechs Zellschichten sind durch römische Ziffern gekennzeichnet. **(i)** Vergrößerte

2.3.2 Untersuchungen zur Assoziation von Zinki mit Synapsen

Das Arg3.1-Protein ist innerhalb der postsynaptischen Dichte (PSD) lokalisiert (Plath et al., 2003) und dort spezifisch mit dem NMDA-Rezeptorkomplex über Bindung an das Strukturprotein PSD95 assoziiert (Husi und Grant, 2001; Plath et al., 2003). Um genauere Informationen zur Rolle Zinkis in Hinblick auf die Regulation der Arg3.1-mRNA beziehungsweise des Proteins zu erhalten, wurden elektronenmikroskopische und biochemische Analysen durchgeführt, die zeigen sollten, ob Zinki ebenfalls in der PSD lokalisiert ist. Dazu wurden zunächst in Zusammenarbeit mit Dr. Michaela Schweizer (ZMNH) elektronenmikroskopische Analysen der Zinki-spezifischen Immunogoldfärbungen von Gehirndünnschnitten einer unbehandelten Maus durchgeführt (Abb. 2.7 a und b). Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen deutlich die Lokalisation von Zinki in Dendriten, sowohl im dendritischen Schaft (Abb. 2.7 b), als auch im Dornfortsatz (Abb. 2.7 a). Allerdings kann keine spezifische Assoziation Zinkis mit bestimmten Organellen oder subzellulären Strukturen, wie zum Beispiel der PSD detektiert werden (Abb. 2.7 a). Das Protein scheint gleichmäßig verteilt im Zytosol vorzuliegen. Ähnliche Ergebnisse brachte die Western-Blot-Analyse der Fraktionen einer biochemischen Aufreinigung der PSD (Aufreinigung und SDS-PAGE durchgeführt von Dr. Niels Plath in unserem Labor). Bei dieser Aufreinigung erhält man ausgehend vom postnukleären Lysat schrittweise immer reinere Fraktionen der synaptischen Membranen, von den Synaptosomen, welche die postsynaptischen *Spines* und präsynaptischen *Boutons* enthalten, über die *synaptic junctions*, die aus post- und präsynaptische Membranen bestehen, bis hin zur postsynaptische Dichte (PSD), die sich aus postsynaptischer Membran und den daran assoziierten Proteinkomplexen zusammensetzt. Zinki ist in den Fraktionen des Zytosols und der Synaptosomen detektierbar, während es sich im Gegensatz zu Arg3.1 nicht mehr in den Fraktionen der *synaptic junctions* und der PSD befindet (s. Abb. 2.7 c). Diese biochemische Analyse unterstützt die Ergebnisse aus der elektronenmikroskopischen Analyse, denn Zinki befindet sich in räumlicher Nähe zu Synapsen, ist aber nicht direkt mit den prä- beziehungsweise postsynaptischen Membranen assoziiert.

Abbildung der Pyramidenzellen des entorhinalen Kortexes. (CA1), *Cornu ammonis* Region 1; (CA3), *Cornu ammonis* Region 3; (GD), *Gyrus dentatus*; (Pyr), Pyramidalzellschicht; (Rad), *Stratum radiatum*; (Or), *Stratum oriens*; (Mol), *Stratum moleculare*; (KZS), Körnerzellschicht; (Luc), *Stratum lucidum*; (LA), Laterale Amygdala; (BLA), Basolaterale Amygdala; (Ce), Zentrale Amygdala; (I-VI), Zellschichten des Kortexes.

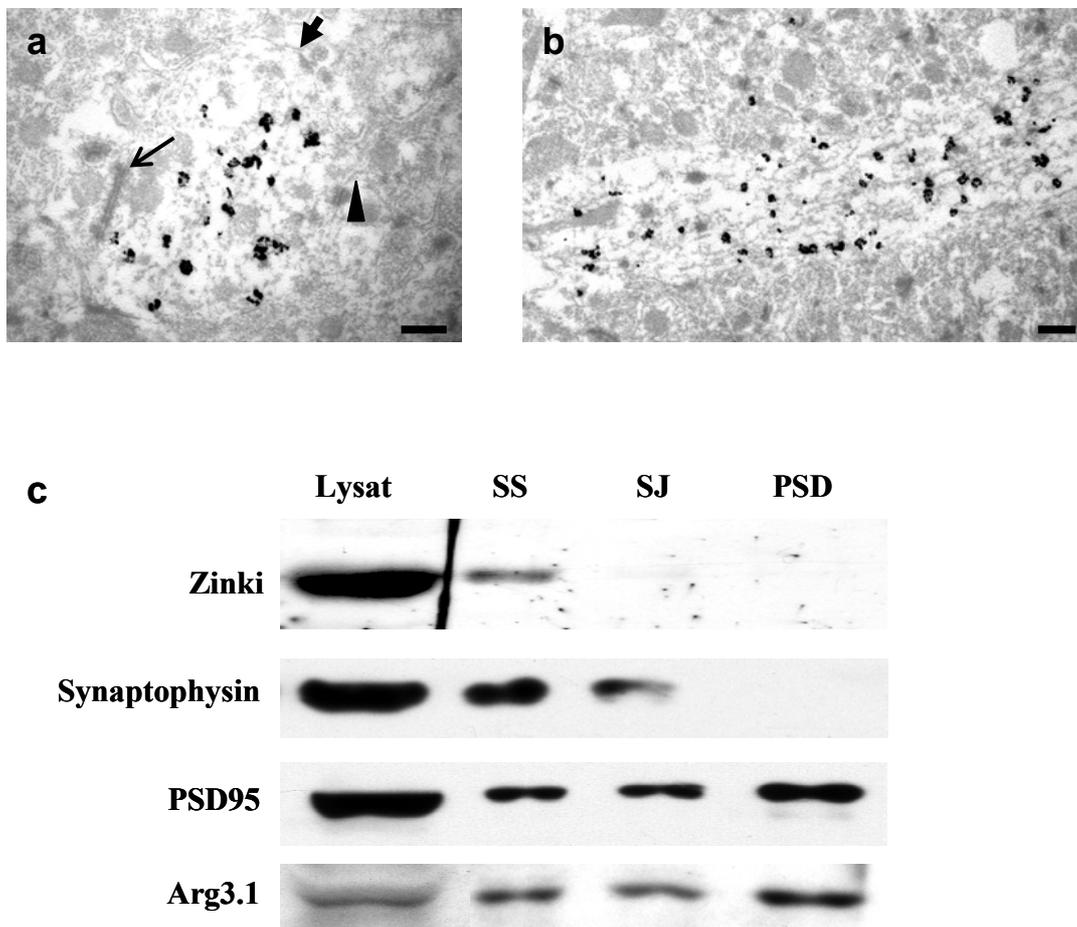


Abb. 2.7: Analyse der dendritischen Lokalisation Zinkis

(a, b) Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Immunogoldfärbung eines Gehirndünnschnittes einer unbehandelten Maus mit Zink-spezifischem Antiserum. Die elektronendichten kolloidalen Goldpartikel, die sich an Stellen mit Zink-Immunoreaktivität anlagern, erscheinen in der Aufnahme als schwarze Punkte. (a) Dendritischer Dornfortsatz mit „Kopf“ (Pfeil) und „Hals“ (Pfeilkopf). Zink ist im Dornenkopf deutlich angereichert, aber nicht spezifisch mit der PSD (offener Pfeil) assoziiert. Skalierung: 200 nm. (b) Dendrit mit starker Zink-Immunoreaktivität, die gleichmäßig im dendritischen Schaft verteilt erscheint und nicht mit bestimmten Strukturen assoziiert ist. Skalierung: 200 nm. (c) Analyse der PSD-Aufreinigungsfraktionen. Zu sehen sind die Detektion eines Western Blots der PSD-Aufreinigungsfraktionen mit Zink-spezifischem und Arg3.1-spezifischem Antiserum sowie die Kontrollen der Fraktionierung. Arg3.1 ist im Gegensatz zu Zink sowohl in den *synaptic junctions* als auch in der PSD detektierbar. Als Kontrollen dienten Western-Blot-Analysen mit Antikörpern gegen Synaptophysin, das an der präsynaptischen Membran lokalisiert und daher nicht mehr in der PSD-Fraktion detektierbar ist, und PSD95, das in der postsynaptischen Dichte lokalisiert ist. (SS), Synaptosomen; (SJ), *synaptic junctions*; (PSD), postsynaptische Dichte. Der Western Blot der PSD-Aufreinigungsfraktionen und die Kontrollen der Fraktionierung wurden von Dr. Niels Plath zu Verfügung gestellt.

2.3.3 Untersuchungen zur Lokalisation von Zinki im Zellkern

Die Expression von Zinki ist in immunohistochemischen Färbungen somatodendritisch. Der Zellkern ist ausgespart, was in elektronenmikroskopischen Analysen von Zinki-Immunogoldfärbungen bestätigt werden konnte (Abb. 2.8 c). Dies ist besonders bemerkenswert, da die Domänenstruktur von Zinki mit einer trunkierten KRAB-A-Domäne und vierzehn Zinkfingern so oder ähnlich bei einer großen Gruppe von Transkriptionsfaktoren zu finden ist. Diese Transkriptionsfaktoren binden über ihre Zinkfinger an DNA und vermitteln über ihre KRAB-Domänen (bestehend aus den KRAB-A- und KRAB-B-Subdomänen) Transkriptionshemmung (Margolin et al., 1994). Transkriptionsfaktoren üben ihre Funktion im Zellkern aus, so dass ihre Lokalisation zumindest zeitweise nukleär sein muss. Dieser scheinbare Widerspruch zwischen der ausschließlich zytosolischen Lokalisation von Zinki und seiner Domänenstruktur, die eine Rolle als Transkriptionsfaktor im Kern vermuten lässt, sollte in einem weiteren Experiment untersucht werden. Um eine nukleäre Lokalisation Zinkis ausschließen zu können, wurde eine biochemische Aufreinigung von Zellkernen durchgeführt und diese dann im Western Blot auf Zinki-Immunoreaktivität getestet. Dieser biochemische Nachweis wurde gewählt, da immunohistochemische Färbungen im Kern stark von pH-Wert und Fixierungsbedingungen abhängen können. Daher können immunohistochemische Darstellungen von Proteinverteilungen unter Umständen Artefakten unterliegen, anstatt die physiologische Lokalisation widerzuspiegeln (Dr. Michaela Schweizer, persönliche Mitteilung). Die Aufreinigung der Zellkerne erfolgte mittels Zentrifugation eines Mausgehirnlysats durch ein 1,8 molares Sucrosekissen. Die Reinheit der Fraktionierung wurde durch eine lichtmikroskopische Aufnahme der auf diese Weise erhaltenen Zellkernfraktion überprüft (Abb. 2.8 b). Die Western-Blot-Analyse des Mausgehirnlysats und der lysierten Kerne in Abbildung 2.8 a bekräftigt die immunohistochemischen Befunde (s. Abb. 2.8 c), denn Zinki ist nur im Lysat detektierbar, nicht aber in der Kernfraktion. Zur weiteren Untersuchung der potentiellen Kernlokalisation von Zinki wurde eine Sequenzanalyse durchgeführt. Nukleäre Proteine besitzen in der Regel eine Kernlokalisationssequenz, kurz NLS genannt. Diese besteht aus wenigen Aminosäuren und ist essentiell und häufig ausreichend für den Transport eines Proteins in den Zellkern (Tinland et al., 1992; Moede et al., 1999). Allerdings gibt es eine große Zahl verschiedener solcher Kernlokalisationssequenzen. Die Ableitung einer allgemeinen Konsensussequenz ist daher problematisch. Mit Hilfe des Computerprogramms *PredictNLS server* ist es aber dennoch möglich, Aminosäuresequenzen nach sämtlichen bisher experimentell

nachgewiesenen sowie weiteren, theoretisch hergeleiteten, potentiellen Kernlokalisationssequenzen zu durchsuchen (Cokol et al., 2000). Zinki besitzt entsprechend einer Analyse mit diesem Computerprogramm keine Aminosäuresequenz, die seinen Transport in den Zellkern vermitteln könnte.

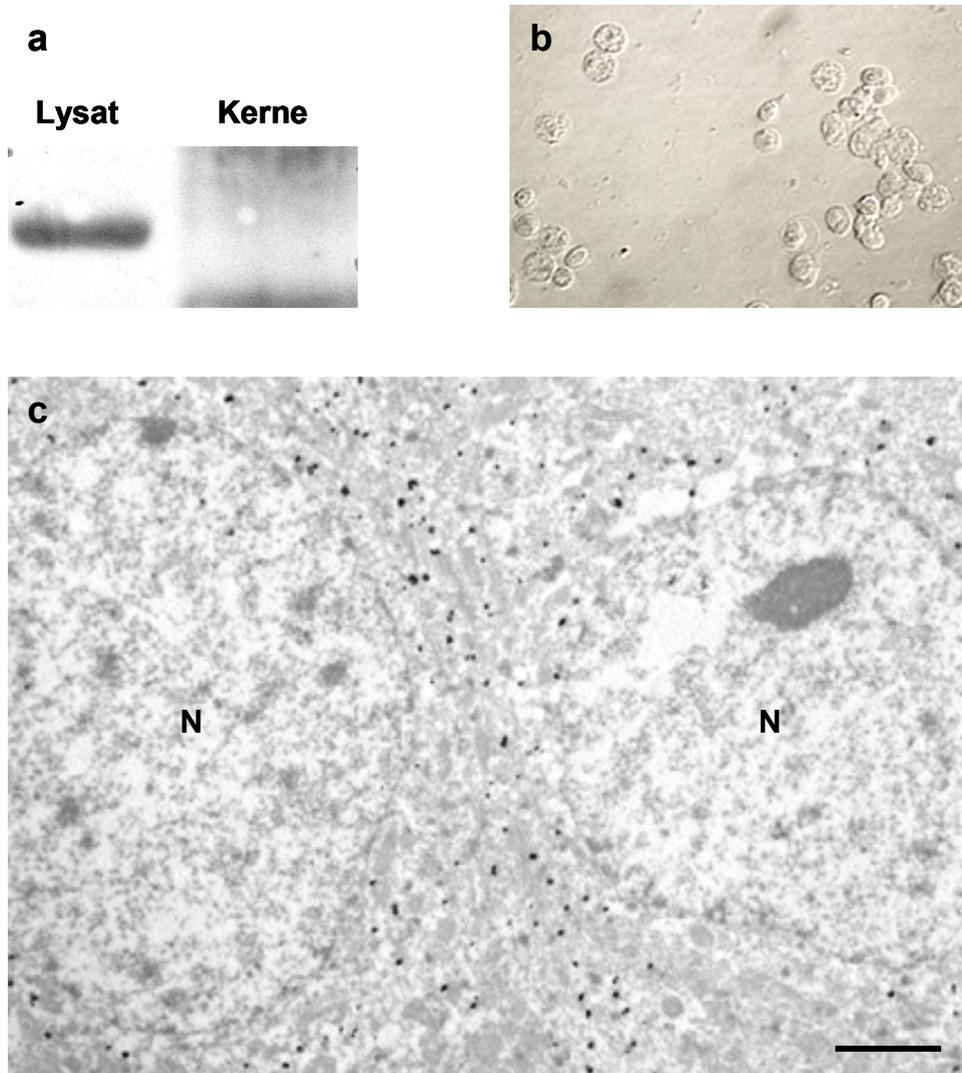


Abb. 2.8: Untersuchungen zur nukleären Lokalisation des Zinki-Proteins

Die Abbildung zeigt die Analyse einer biochemischen Aufreinigung von Zellkernen und elektronenmikroskopische Aufnahmen einer Immunogoldfärbung mit einem Zinki-spezifischen Antiserum. **(a)** Western-Blot-Analyse der Lysat- und Kernfraktion aus Mausgehirnlysate mit einem Zinki-spezifischen Antiserum. Das Zinki-Protein ist nur in der Spur, die mit Lysat beladen wurde, detektierbar (*Lysat*), nicht aber in der Spur mit den aufgereinigten Kernen (*Kerne*). **(b)** Lichtmikroskopische Aufnahme der Kernfraktion. Man erkennt die einzelnen Zellkerne, andere Organellen oder Verunreinigungen durch Zellschrott dagegen sind kaum detektierbar. **(c)** Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Immunogoldfärbung mit einem Zinki-spezifischen Antiserum an Gehirndünnschnitten der Maus. Hier sind die elektronendichten kolloidalen Goldpartikel nur im Zytosol, nicht aber in den Kernen detektierbar. (*N*), Nukleus; Skalierung: 1 μm .

2.4 Aktivitätsabhängige Regulation des Zinki-Proteins

Studien zu *Arg3.1-Knockout*-Mäusen in unserem Labor und Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass *Arg3.1* ein aktivitätsreguliertes Gen ist, das eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von LTP sowie beim Lernen und der Gedächtnisbildung spielt (s. Kap. 1.4; Guzowski et al., 2000; Plath et al., 2003). Zinki wurde als Bindungsprotein der *Arg3.1*-mRNA identifiziert, daher sollte das Zinki-Protein auch in Hinblick auf seine mögliche Regulation durch synaptischer Aktivität analysiert werden. Erste Untersuchungen zur aktivitätsabhängigen Regulation von Zinki mittels immunohistochemischer Färbungen an Gehirndünnschnitten haben gezeigt, dass Zinki konstitutiv stark exprimiert wird (s. Kap. 2.3.1). Dabei konnte lichtmikroskopisch keine veränderte Expression nach einem kainatinduzierten epileptischen Anfall detektiert werden. Andere aktivitätsabhängige Regulationsmechanismen könnten aber zum Beispiel die subzelluläre Lokalisation oder die Stabilität des Zinki-Proteins betreffen. Diese Vermutungen sollten in weiteren Experimenten zur subzellulären Verteilung und spezifischen Degradation des Zinki-Proteins untersucht werden.

2.4.1 Abnahme der Zinki-spezifischen Immunoreaktivität an aktivierten Synapsen

In einer weiterführenden Studie zur aktivitätsregulierten Verteilung des Zinki-Proteins wurde seine Expression nach laminaspezifischer synaptischer Potenzierung untersucht. Dazu wurden immunohistochemische Färbungen mit einem Zinki-spezifischen Antiserum an Mausgehirnen durchgeführt, in denen selektiv die Synapsen der mittleren Molekularschicht des *Gyrus dentatus* stimuliert worden waren. Diese Aktivierung erfolgte über hochfrequente Stimulierung der Axone des mittleren *Tractus perforans*, der in den *Gyrus dentatus* des Hippokampus projiziert und dort präferentiell die Synapsen der mittleren Molekularschicht innerviert (Steward, 1976). Eine solche Reizung führt zur synaptischen Potenzierung der mittleren Molekularschicht (der mittleren „Lamina“), während die Synapsen der unteren und oberen Molekularschicht nicht aktiviert werden. Diese elektrophysiologischen Arbeiten wurden von Mick Errington im Labor von Prof. Tim Bliss am NIMR in London durchgeführt. Er stimulierte *in vivo* den mittleren *Tractus perforans* anästhesierter Mäuse nach einem Protokoll, das auch zur Induktion von LTP verwendet wird (viermalige Wiederholung von vier Zügen á vier Stimuli mit 400 Hz und 200 ms Abstand zwischen den Zügen). Vier

Stunden nach dieser Reizung wurden die Mäuse getötet. Die daran anschließenden immunohistochemischen Analysen erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Niels Plath in unserem Labor. Abbildung 2.9 zeigt immunohistochemische Färbungen mit Arg3.1- und Zinki-spezifischen Antiseren des *Gyrus dentatus* in Kontrollgehirnen sowie in kainatinduzierten und laminaspezifisch stimulierten Gehirnen. Die Intensitäten der Färbungen wurden densitometrisch ausgewertet (Abb. 2.9 g, h; Auswertung durchgeführt von Dr. Niels Plath). Eine schwache basale Expression von Arg3.1-Protein ist in der Körnerzellschicht und der Molekularschicht des *Gyrus dentatus* unter Kontrollbedingungen sichtbar (Abb. 2.9 a). Vier Stunden nach einem kainatinduzierten Krampfanfall dagegen ist die Arg3.1-Expression stark erhöht und kann bis in die distalen Bereiche der Dendriten nachgewiesen werden (Abb. 2.9 b). Nach laminaspezifischer Stimulierung der mittleren Molekularschicht des *Gyrus dentatus* kommt es zu einer Anreicherung der Arg3.1-Immunoreaktivität in den Somata und in den aktivierten Bereichen der Dendriten der Körnerzellen, während in den nicht stimulierten Bereichen der unteren und oberen Molekularschicht weniger Arg3.1 detektierbar ist (Abb. 2.9 c). Abbildung 2.9 g zeigt die densitometrische Auswertung der drei Färbungen mit einem Anstieg der Immunoreaktivität für Arg3.1 innerhalb der mittleren Molekularschicht nach laminaspezifischer Stimulierung. Die Zinki-Expression verhält sich dagegen völlig anders. Sie ist konstitutiv hoch (Abb. 2.9 d) und verändert sich nach kainatinduziertem Krampfanfall nicht (Abb. 2.9 e). Nach laminaspezifischer Stimulierung jedoch nimmt die Zinki-Immunoreaktivität gerade in den Bereichen aktivierter Synapsen ab, während sie in der nicht stimulierten oberen Molekularschicht gleich bleibt und in der unteren Molekularschicht leicht zunimmt (Abb. 2.9 f und 2.9 h).

Diese Analysen deuten darauf hin, dass Zinki durch synaptische Potenzierung negativ reguliert wird. Während das Arg3.1-Protein an den aktivierten Synapsen akkumuliert, wird Zinki spezifisch aus diesen Bereichen entfernt. Dies könnte entweder durch aktiven Transport oder durch Degradation geschehen.

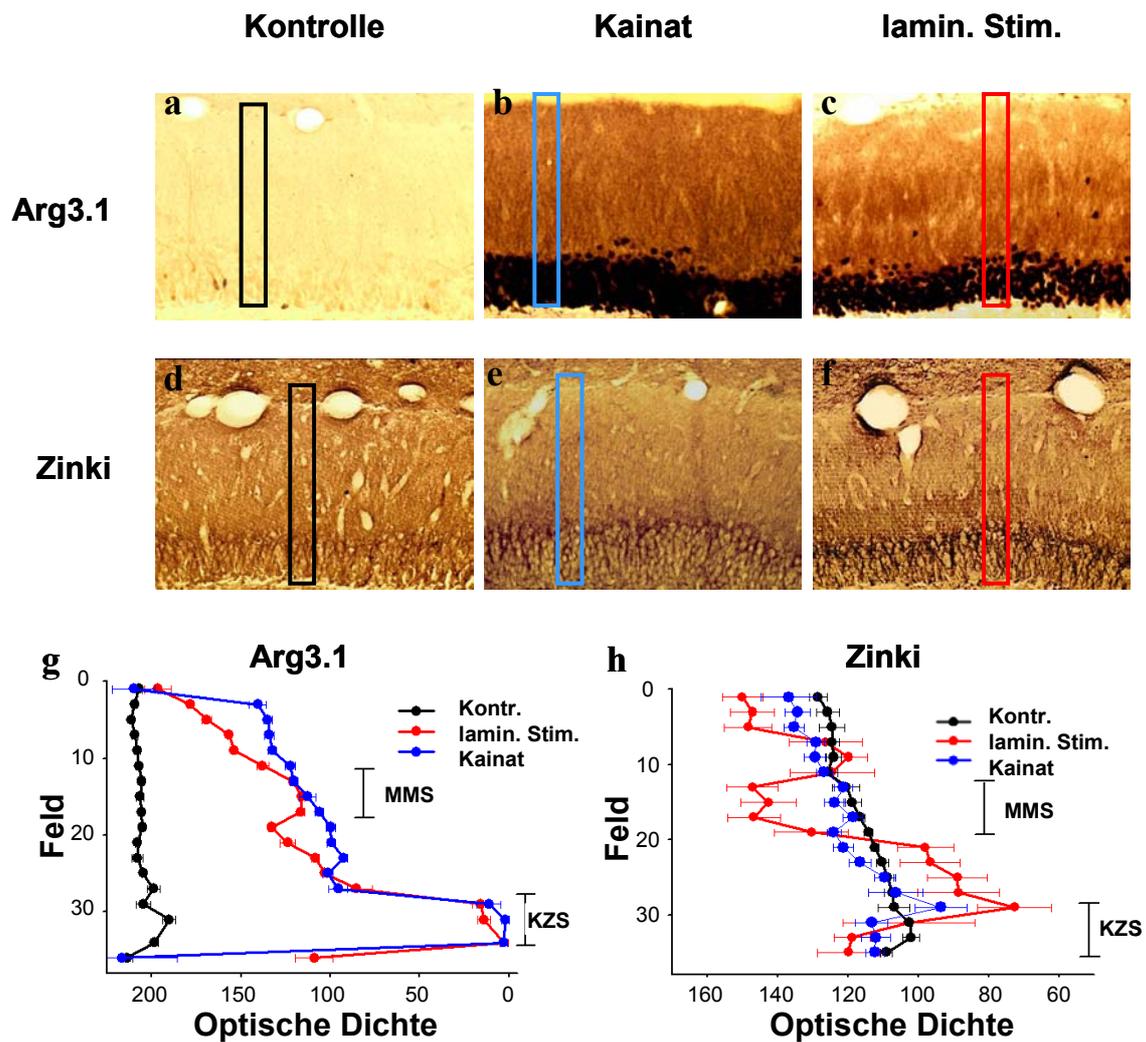


Abb. 2.9: Analyse der Arg3.1- und Zink-Proteinexpression nach unterschiedlichen Stimulationen

(a-c) Immunohistochemische Färbungen des *Gyrus dentatus* mit einem Arg3.1-spezifischen Antiserum, (d-f) Immunohistochemische Färbungen des *Gyrus dentatus* mit einem Zink-spezifischen Antiserum. (a, d) Proteinexpression von Arg3.1 und Zink unter Kontrollbedingungen. Die basale Expression von Arg3.1 in den Körnerzellen ist sehr schwach, das Zink-Protein dagegen wird konstitutiv stark in den Somata und Dendriten der Körnerzellen exprimiert. (b, e) Proteinexpression von Arg3.1 und Zink 4 h nach kainatinduziertem Krampfanfall. Während die Expression des Arg3.1-Proteins in den Somata und Dendriten der Körnerzellen verglichen zur basalen Expression stark ansteigt, bleibt die Expression des Zink-Proteins unverändert hoch. (c, f) Proteinexpression von Arg3.1 und Zink 4 h nach hochfrequenter laminaspezifischer Stimulation der mittleren Molekularschicht über den *Tractus perforans*. Das Arg3.1-Protein akkumuliert selektiv an den aktivierten Synapsen, dagegen nimmt die Zink-spezifische Immunoreaktivität gerade in diesem Bereich ab. (g, h) Densitometrische Auswertung der Färbungen anhand ihrer optischen Dichte. Für die Analyse wurden die gekennzeichneten Regionen (offene Balken) in 36 horizontale Felder aufgeteilt, deren jeweilige Pixelintensität aus dem Mittelwert von 20 Einzelmessungen berechnet wurde. Die im Diagramm dargestellten Werte repräsentieren dabei je zwei benachbarte Felder. (MMS), mittlere Molekularschicht; (KZS,) Körnerzellschicht; (Kontr.), Kontrolle; (Kainat), 4 h nach Kainat induziertem Krampfanfall; (lam. Stim.), 4 h nach laminaspezifischer Stimulierung der mittleren Molekularschicht des *Gyrus dentatus*.

2.4.2 Ubiquitinierung und spezifische Degradation von Zinki nach kainatinduziertem Krampfanfall

Neben der regulierten Translation von Proteinen gibt es in einer Zelle ebenso Mechanismen, mit denen Proteine spezifisch abgebaut werden können. Die gerichtete Degradation von Proteinen verhindert zum Beispiel die Akkumulation von Molekülen, die toxisch für die Zelle sein könnten (Ashkenas und Byers, 1997). Außerdem ist nicht nur die Neusynthese, sondern auch der regulierte Abbau von Proteinen für die Ausbildung morphologischer Veränderungen der Zelle, insbesondere der Neuronen, erforderlich (Cline, 2003). Prokaryotische und eukaryotische Zellen besitzen einen gemeinsamen Mechanismus für diese spezifische Degradation von Proteinen, nämlich das Ubiquitin-Proteasom-System (Finley et al., 1984; Ciechanover et al., 1984). Dabei dient eine kleine Peptidkette (76 Aminosäuren), das Ubiquitin, als Markierung der Proteine für den Abbau durch das Proteasom. Das Proteasom besteht in der Regel aus einem 20S-Kernpartikel, in dem der ATP-abhängige Abbau der Proteine stattfindet, und einer regulatorischen Untereinheit, der 19S-Untereinheit, welche die ubiquitinierten Proteine bindet. Die Ubiquitinierung erfolgt über eine Enzymkaskade, wobei die Proteine nach und nach kovalent mit Ubiquitinmolekülen in Form einer Ubiquitinkette versehen werden. Man spricht daher auch von poly-ubiquitinierten Proteinen. Das Protein S5a, ein Bestandteil der 19S-Untereinheit, bindet spezifisch die Proteine, die mit einer Poly-Ubiquitinkette versehen worden sind (Deveraux et al., 1995). Es eignet sich daher, um aus Zelllysaten poly-ubiquitinierte, also für den Abbau bestimmte Proteine zu präzipitieren (Layfield et al., 2001).

Die Expression von Zinki nimmt nach laminaspezifischer synaptischer Potenzierung im Bereich der aktivierten Synapsen ab. Diese Reduktion des Proteins könnte zum Beispiel durch den gerichteten aktivitätsregulierten Abbau Zinkis über das Ubiquitin-Proteasom-System verursacht werden. Um die Hypothese zu untersuchen, dass Zinki als Folge synaptischer Aktivität spezifisch degradiert wird, wurde ein *Pulldown* mit rekombinant hergestelltem S5a-Protein der 19S-Proteasomuntereinheit durchgeführt. Auf diese Weise sollte spezifisch poly-ubiquitiniertes Zinki aus einem Gehirnlisat präzipitiert und mittels Western-Blot-Analyse detektiert werden. Ein Vergleich der Menge an präzipitiertem, also poly-ubiquitiniertem Zinki unter Kontrollbedingungen und nach kainatinduziertem Krampfanfall sollte Aufschluss über eine mögliche aktivitätsabhängige Degradation geben.

Die cDNA des S5a-Proteins wurde über PCR aus Mausnieren-cDNA amplifiziert und für die bakterielle Überexpression als GST-Fusionsprotein in den Vektor pGEX-KG einkloniert

(Klonierung s. Kap. 5.2.3). Sowohl das Fusionsprotein GST-S5a als auch GST wurden in Bakterien überexprimiert und über die Bindung an glutathiongekoppelte Sepharose aufgereinigt (vgl. Kap. 2.5.5.1). Abbildung 2.10 d zeigt die Expression und Aufreinigung dieser beiden Proteine. Die gereinigten Proteine wurden mit Gehirnlysaten unbehandelter und kainatinduzierter Mäuse inkubiert und nach mehreren Waschschritten von der glutathiongekoppelten Sepharose eluiert. Die Eluate wurden durch einen Western Blot mit Zinki-spezifischem Antiserum analysiert. Abbildungen 2.10 a-c zeigen die Western-Blot-Analysen eines *S5a-Pulldowns* aus Gehirnlysat unbehandelter und kainatinduzierter Mäuse mit einem Zinki-spezifischen Antiserum. Aus dem Gehirnlysat kainatbehandelter Tiere konnte mit GST-S5a Zinki-Protein präzipitiert werden, während aus dem Lysat einer unbehandelten Maus deutlich weniger Zinki präzipitiert wurde (Abb. 2.10 a und e). Drei Beobachtungen sprechen dafür, dass das Zinki-Protein tatsächlich spezifisch auf Grund seiner Poly-Ubiquitinierung an S5a gebunden hat. Erstens wurde Zinki nicht durch einen *Pulldown* mit dem GST-Protein ohne daran fusioniertes S5a-Protein aus Gehirnlysat präzipitiert (Abb. 2.10 c). So konnte gezeigt werden, dass die Präzipitation von Zinki durch Bindung an das Protein S5a vermittelt wurde und nicht auf eine unspezifische Interaktion mit GST oder der glutathiongekoppelten Sepharose zurückzuführen ist. Zweitens erkennt man in dem mit einem Zinki-spezifischen Antiserum detektierten Western Blot mehrere Banden, die oberhalb von 54 kDa, dem eigentlichen Molekulargewicht von Zinki, liegen (Abb. 2.10 a). Diese Beobachtung lässt sich durch eine Zunahme des Molekulargewichts von Zinki auf Grund der kovalenten Modifikation mit unterschiedlich langen Poly-Ubiquitinketten erklären. Und drittens wurde bei einem *S5a-Pulldown* ohne den Proteasomeninhibitor MG-132, der die Degradation poly-ubiquitinerter Proteine durch das noch intakte Proteasom im Lysat verhindert, kein Zinki mehr präzipitiert (Abb 2.10 b). Eine Erklärung dafür ist, dass der Anteil an Zinki-Protein, der bei Anwesenheit von MG-132 im Lysat präzipitiert wurde, ohne die spezifische Inhibition des Proteasoms abgebaut wurde. Dies spricht dafür, dass das Zinki-Protein nach kainatinduzierter synaptischer Aktivität durch Poly-Ubiquitinierung für die proteasomvermittelte Degradation markiert wurde.

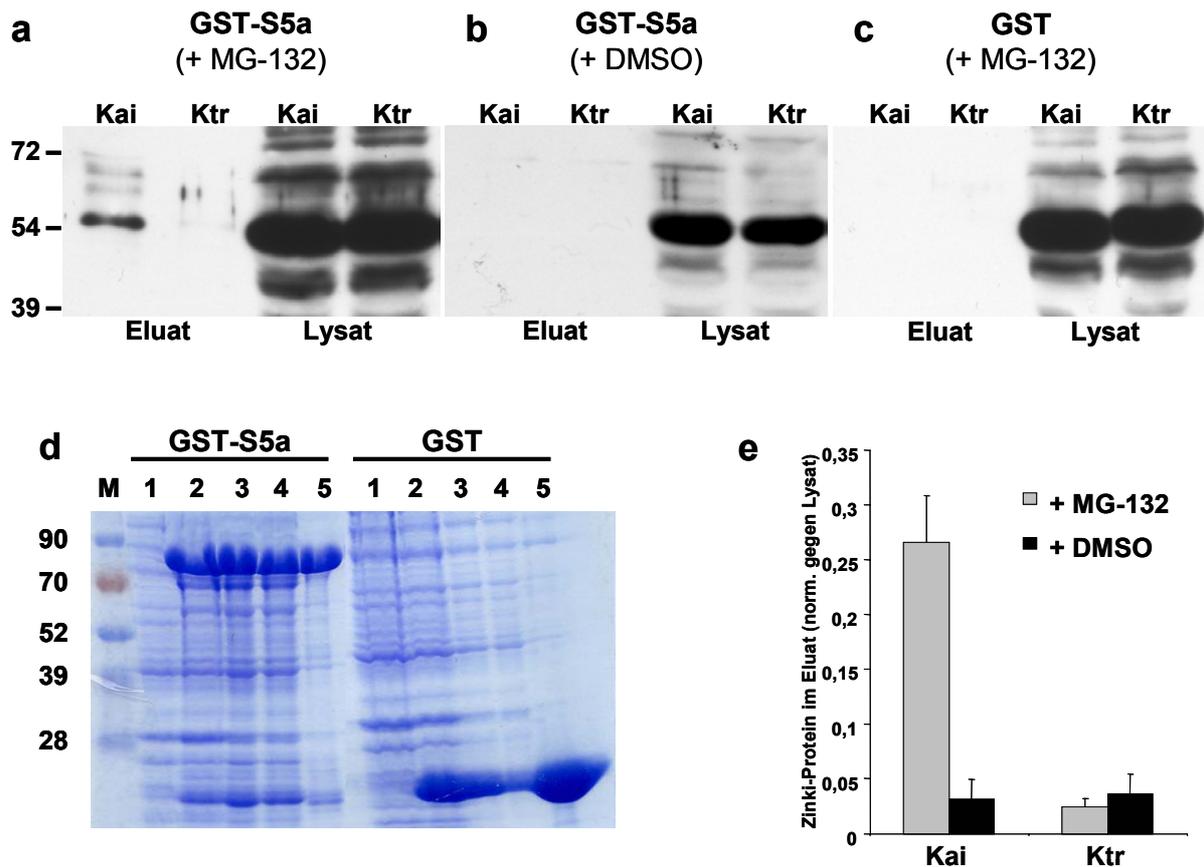


Abb. 2.10: Analyse der Poly-Ubiquitinierung von Zinkin nach synaptischer Aktivität

Die Abbildung zeigt Ergebnisse eines GST-S5a-Pull-downs aus unbehandeltem und kainatinduziertem Mausgehirnlysat. **(a-c)** Western-Blot-Analyse der S5a- und GST-Pull-downs mit einem Zinkin-spezifischen Antiserum. In den mit *Eluat* bezeichneten Spuren sind die Eluate der *Pull-downs* aufgetragen. In den mit *Lysat* gekennzeichneten Spuren wurden jeweils ca. 2 % der Proteinmenge des für den *Pull-down* verwendeten Mausgehirnlysat aufgetragen. In den mit (*Kai*) gekennzeichneten Spuren stammte das Lysat von Gehirnen 4 h nach kainatinduziertem Krampfanfall, in den mit (*Ktr*) bezeichneten Spuren stammte das Lysat von Kontrollgehirnen. **(a)** *Pull-down* mit GST-S5a unter Zugabe des Proteasomeninhibitors MG-132, **(b)** *Pull-down* mit GST-S5a mit dem äquivalenten Volumen DMSO anstelle von MG-132, **(c)** *Pull-down* mit GST unter Zugabe von MG-132. Die Molekulargewichte der Banden des eingesetzten Protein-Längenstandards (hier nicht zu sehen) sind in kDa angegeben. **(d)** Coomassiefärbung der SDS-Page zum Nachweis der bakteriellen Expression und der Aufreinigung von GST-S5a und GST. Aufgetragen sind in Spur (*M*) der Protein-Längenstandard, dessen Molekulargewichte in kDa angegeben sind, in den mit (*1*) gekennzeichneten Spuren die Bakterienlysate vor Induktion mit IPTG und in den Spuren (*2*), (*3*) und (*4*) die Bakterienlysate jeweils 1 h, 2 h und 3 h nach Induktion. Die Spuren (*5*) zeigen das GST-S5a-Protein und das GST-Protein nach Aufreinigung über glutathiongekoppelte Sepharose. **(e)** Densitometrische Analyse zweier unabhängiger S5a-Pull-down-Experimente. Verglichen wurden die Signalstärken der Zinkin-spezifischen Banden in den Eluaten der S5a-Pull-downs, die mit und ohne MG-132 durchgeführt wurden. Die Signale der Zinkin-spezifischen Banden in den aufgetragenen Lysaten wurden als 1 definiert und die Signale in den mit Eluaten beladenen Spuren dagegen normalisiert. Die Signalstärken sind als Balkendiagramm dargestellt (Beschreibung der Analyse s. Kap. 5.5.8). (+ *MG-132*, graue Balken), Quantifikation des Signals für das präzipitierte Zinkin-Protein bei Inhibition des Proteasoms; (+ *DMSO*, schwarze Balken), Quantifikation des Signals für das präzipitierte Zinkin-Protein ohne Inhibition des Proteasoms; (*Kai*), (*Ktr*), siehe Beschreibung unter (a-c). Es ist eine mehr als zehnfache Erhöhung des Zinkin-spezifischen Signals nach kainatinduzierter Aktivität zu sehen. Ohne MG-132

→

Allerdings wurde in diesem Experiment nur ein kleiner Prozentsatz des Zinki-Proteins nach kainatinduziertem Krampfanfall durch S5a präzipitiert. Der Anteil des nach synaptischer Aktivität poly-ubiquitinierten Zinki-Proteins sollte daher in densitometrischen Auswertungen näher bestimmt werden (Beschreibung der Analysen s. Kap. 5.5.8.; Tabelle der Signalintensitäten s. Kap. 9.1.2). Eine quantitative Analyse der Western Blots zeigte, dass ca. 0,5 % des im Lysat vorhandenen Zinki-Proteins nach kainatinduzierter Aktivität durch S5a gebunden wurden. Diese Quantifizierung ist allerdings nur als eine sehr grobe Abschätzung anzusehen, da die Intensität der Bande des Zinki-Proteins im Lysat sehr hoch war, so dass man nicht mehr von einem linearen Verhältnis zwischen Bandenintensität und Proteinmenge ausgehen konnte. Die spezifische Präzipitation von Zinki durch das S5a-Protein nach kainatinduzierter Aktivität konnte in zwei unabhängigen Versuchen detektiert werden. Durch einen quantitativen Vergleich des mit und ohne MG-132 präzipitierten Zinki-Proteins in diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des Proteasoms eine ca. achtfache Erhöhung der Menge von an S5a gebundenem Zinki-Protein hervorrief, verglichen zu Bedingungen, bei denen die Funktion des Proteasoms nicht gestört war (Abb. 2.10 e). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass ein geringer Anteil des Zinki-Proteins spezifisch nach kainatinduzierter synaptischer Aktivität abgebaut wird.

2.4.3 Expression von Zinki im Hippokampuslysate nach synaptischer Aktivität

In einem weiteren Versuch sollte geklärt werden, ob die kainatinduzierte Degradation Zinkis auch in Western Blots hippokampaler Lysate detektierbar ist. Dazu wurde die Menge an Zinki-Protein, die nach kainatinduziertem Krampfanfall im Hippokampus nachweisbar war, mit der unter Kontrollbedingungen detektierbaren Zinki-Proteinmenge verglichen. Es wurden Proteinlysate von hippokampalen Präparationen unbehandelter und kainatbehandelter Mäuse hergestellt und das Zinki-Protein durch Western-Blot-Analysen mit Zinki-spezifischem Antiserum detektiert (Abb. 2.11). Da in früheren Studien gezeigt werden konnte, dass Arg3.1 ein Marker für synaptische Aktivität ist (Link et al., 1995; Guzowski et al. 1999), wurde zusätzlich eine Western-Blot-Analyse mit einem Arg3.1-spezifischen Antiserum durchgeführt. Diese diente als Nachweis für die Induktion synaptischer Aktivität und zeigte

reduziert sich das Zinki-spezifische Signal im Eluat nach kainatinduzierter Aktivität um mehr als das achtfache und erreicht annähernd Kontrollniveau (Kai + MG-132: $0,266 \pm 0,043$; Ktr + MG-132: $0,024 \pm 0,007$; Kai + DMSO: $0,031 \pm 0,018$; Ktr + DMSO: $0,036 \pm 0,018$; Tabelle der Signalintensitäten s. Kap. 9.1.2).

eine deutliche Anreicherung des Arg3.1-Proteins vier Stunden nach kainatinduziertem Krampf. Im Lysat unbehandelter Mäuse dagegen konnte das Arg3.1-Protein auch bei Auftragung sehr großer Mengen an Gesamtprotein (10 µg) nur schwach detektiert werden (Abb. 2.11 a und b). Da die Expression von GAPDH nicht aktivitätsreguliert ist (Waltereit et al, 2001), diente der quantitative Nachweis des GAPDH-Proteins als interner Standard, um sicherzustellen, dass vergleichbare Mengen an Protein aufgetragen wurden. Die densitometrische Quantifikation der Western Blots demonstriert, dass sich der Anteil an Zinki-Protein im Lysat nach synaptischer Aktivität verglichen zu Kontrollbedingungen nicht signifikant verändert (Abb. 2.11 b; Tabelle der Signalintensitäten s. Kap. 9.1.3). Die Ergebnisse des *S5a-Pulldowns* deuten darauf hin, dass ein sehr kleiner Prozentsatz (0,5 %) des Zinki-Proteins nach kainatinduzierter Aktivität poly-ubiquitiniert und wahrscheinlich durch das Proteasom abgebaut wird. Diese spezifische Degradation ließ sich in den hier beschriebenen Western-Blot-Analysen von Hippokampuslysaten ebenso wie in immunohistochemischen Färbungen von Gehirnschnitten (Abb. 2.9 d und e) nicht nachweisen. In beiden Versuchsansätzen blieb die Menge an detektierbarem Zinki-Protein im Maushippokampus nach kainatinduziertem Krampfanfall gleich. Zusammengefasst sprechen diese Beobachtungen dafür, dass es nach synaptischer Aktivität nicht zu einem generellen Abbau des Zinki-Proteins kommt, sondern dass nur eine kleine, spezifische Fraktion des im Hippokampus vorhandenen Zinki-Proteins degradiert wird.

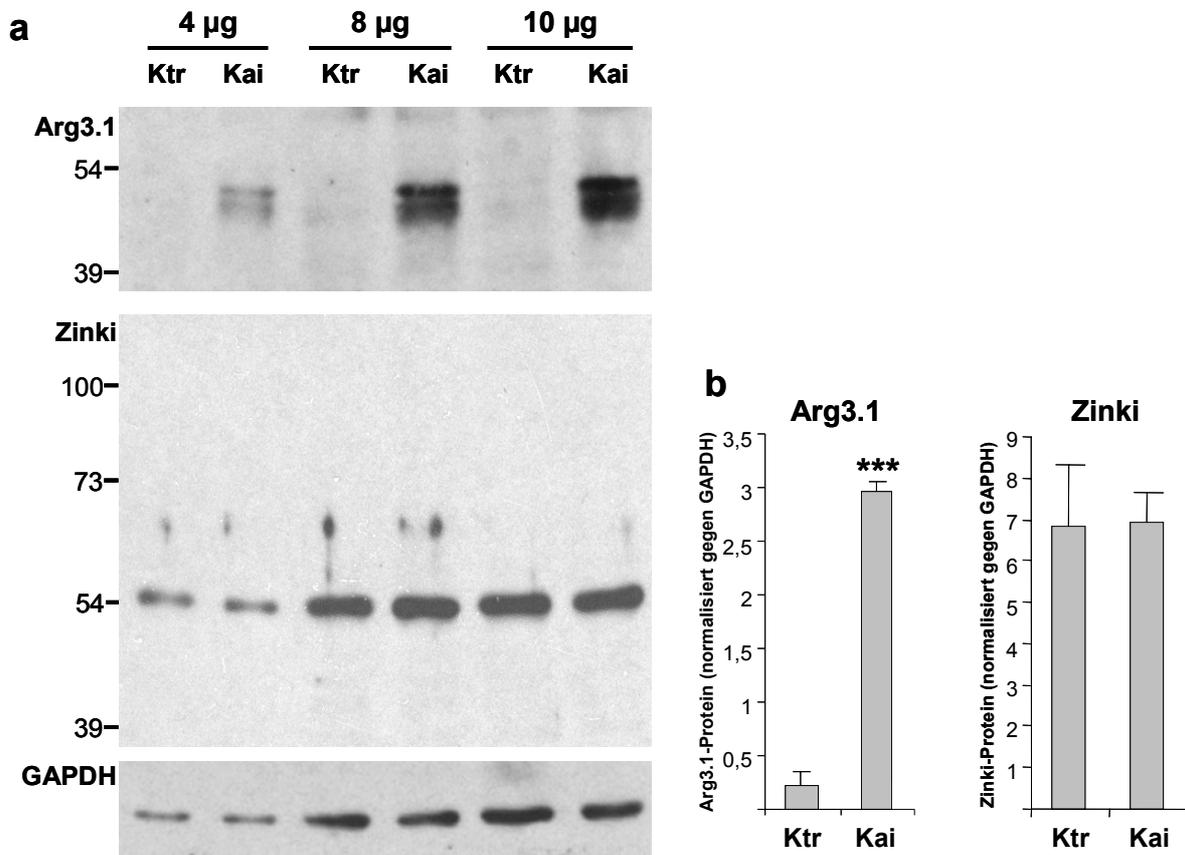


Abb. 2.11: Quantitative Analyse der Zinki-Expression im Hippokampus vor und nach generalisierter neuronaler Aktivität

(a) Western-Blot-Analysen vergleichbarer Proteinmengen von Hippokampuslysate einer unbehandelten Maus (*Ktr*) und einer Maus 4 h nach kainatinduziertem Krampfanfall (*Kai*) mit Arg3.1- und Zinki-spezifischen Antiseren sowie GAPDH-spezifischen Antikörpern. Es wurden von links nach rechts 4 µg, 8 µg und 10 µg Protein der jeweiligen Lysate aufgetragen. Die Detektion mit einem Arg3.1-spezifischen Antiserum diene als Nachweis der neuronalen Aktivität, die Detektion mit GAPDH-spezifischen Antikörpern als Beladungs-Kontrolle des Proteingels. Die Molekulargewichte der Banden des Protein-Längenstandards (hier nicht zu sehen) sind in kDa angegeben. (b) Densitometrische Quantifikation des Western Blots unter (a) (Beschreibung der Analyse s. Kap. 5.5.8). Die Signalintensität der GAPDH-spezifischen Banden wurde jeweils als 1 gesetzt und die Intensitäten des Zinki- und Arg3.1-Signals dagegen normalisiert. Das Balkendiagramm stellt den Mittelwert der densitometrischen Auswertungen aller drei Auftragungen dar. Die Expression des Arg3.1-Proteins erhöht sich signifikant nach kainatinduzierter synaptischer Aktivierung, während das Zinki-Protein keine signifikanten Veränderungen zeigt (Arg3.1 Ktr: $0,22 \pm 0,13$; Arg3.1 Kai: $2,97 \pm 0,09$; einseitiger, gepaarter Student-t-Test $***p < 0,001$; Zinki Ktr: $6,85 \pm 1,49$; Zinki Kai: $6,92 \pm 0,72$; Tabelle der Signalintensitäten s. Kap. 9.1.3).

2.4.4 Aktivitätsregulierte Assoziation von Zinki mit Polysomen

Da Zinki *in vitro* die Translation hemmen kann (vgl. Kapitel 2.2), sollte in folgenden Experimenten untersucht werden, ob Zinki *in vivo* mit dem Translationsapparat assoziiert ist. Zur Klärung dieser Frage wurden mit Hilfe eines kontinuierlichen Sucroседichtegradienten (10-47 %) die ribosomalen Untereinheiten beziehungsweise Polysomen eines Mausgehirnlysats fraktioniert (Siomi et al., 1996). Von den einzelnen Fraktionen wurde jeweils die Absorption bei 260 nm bestimmt, um die Ribosomenverteilung zu dokumentieren. Außerdem wurden RNA und Protein isoliert und mittels Agarosegel beziehungsweise Western Blot analysiert. In Abbildung 2.12 ist der Vergleich der ribosomalen Fraktionen eines Gehirns einer unbehandelten Maus mit denen einer Maus vier Stunden nach kainatinduziertem Krampf zu sehen. Anhand der Absorptionskurve bei 260 nm (Abb. 2.12 a), der Verteilung der ribosomalen RNAs (Abb. 2.12 b) und der Verteilung des ribosomalen Proteins S6 (RPS6, Abb. 2.12 c) lassen sich die Fraktionen nach mRNPs, 40S- und 60S-Ribosomenuntereinheiten, 80S-Initiationskomplex und Polysomen unterteilen. Allerdings bedeutet diese Einteilung nicht, dass in den Fraktionen ausschließlich die genannten Komponenten der Zelle enthalten sind. Bei dieser Aufreinigung reichern sich sämtliche Bestandteile der Zelle an der für sie spezifischen Dichte innerhalb des Sucrosegradienten an, lediglich größere Organellen wie Kerne und Mitochondrien wurden vor der Fraktionierung durch Zentrifugation entfernt (s. Methodenteil Kap. 5.5.13). Unter Kontrollbedingungen befindet sich Zinki nur in den ersten Fraktionen (Abb. 2.12 d). Es assoziiert also mit Strukturen geringerer Dichte, zum Beispiel den freien mRNPs, die nicht an der Translation beteiligt sind. Vier Stunden nach einem kainatinduzierten Anfall jedoch ist Zinki auch in der letzten der polysomalen Fraktion zu detektieren (Fraktion 14, Abb. 2.12 e), wobei es allerdings in den anderen polysomalen Fraktionen (11-13; vgl. Abb. 2.12 a) nicht nachgewiesen werden kann. Dies weist daraufhin, dass das Zinki-Protein nach synaptischer Aktivität nicht generell an Polysomen lokalisiert vorliegt, sondern spezifisch mit den polysomalen Fraktionen größerer Dichte assoziiert ist. Diese Beobachtung konnte in zwei weiteren unabhängigen Experimenten wiederholt werden. Die Detektion der Western Blots mit GAPDH-spezifischen Antikörpern diente als Beispiel für die Verteilung eines nicht durch synaptische Aktivität regulierten Proteins in den Fraktionen der Ribosomenaufreinigung (vgl. Abb. 2.11). Abbildungen 2.12 f und g zeigen, dass sowohl unter Kontrollbedingungen als auch vier Stunden nach kainatinduziertem Krampfanfall ein Großteil des GAPDH-Proteins in den Fraktionen der mRNPs und der 40S-Ribosomen vorliegt. Auch in Fraktionen höherer

Dichte einschließlich der Polysomen kann GAPDH detektiert werden. Dabei ist die Bandenintensität der Fraktionen 8-11 unter Kontrollbedingungen größer als nach synaptischer Aktivität, wo GAPDH nur in Spuren nachweisbar ist. Diese mögliche aktivitätsabhängige Regulation der Verteilung des GAPDH-Proteins wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht näher untersucht. In der letzten Fraktion jedoch, in der Zinki nach Kainat angereichert ist, wurden unter den beiden verschiedenen experimentellen Bedingungen vergleichbare Mengen GAPDH nachgewiesen. Dies deutet daraufhin, dass die für das Zinki-Protein beobachtete Anreicherung in Fraktion 14 einen spezifischen Effekt darstellt.

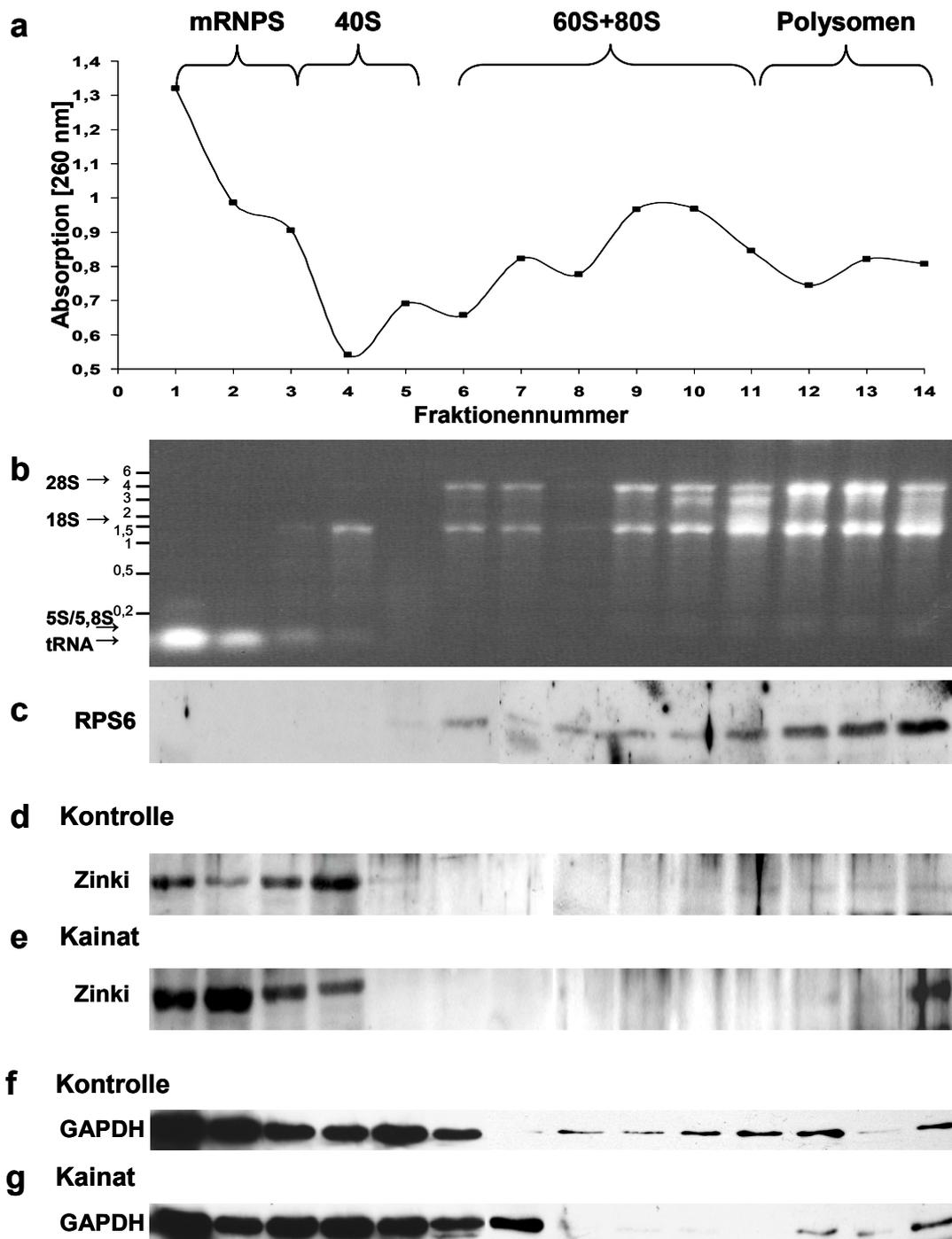


Abb. 2.12: Aktivitätsabhängige Verteilung des Zink-Proteins in ribosomalen Fraktionen

Die Abbildung zeigt das Ergebnis einer kontinuierlichen Sucrosedichtegradientenzentrifugation eines Mausgehirnlysats unter Kontrollbedingungen und 4 h nach kainatinduzierter synaptischer Aktivität. **(a-c)** Exemplarische Analyse der Fraktionen eines 10-47 %igen Sucrosedichtegradienten. **(a)** Graphische Darstellung der Absorption bei 260 nm; **(b)** Ergebnis der RNA-Gelelektrophorese mit den beiden prominenten Banden der 18S und 28S ribosomalen RNA (1900 und 4200 bp), die Bestandteil der 40S- beziehungsweise 60S-Untereinheiten des Ribosoms sind. Die 18S rRNA ist in den Fraktionen 3-14 nachweisbar, die 28S rRNA in den Fraktionen 6-14. Die 5S und 5,8S rRNAs (120 und 180 bp), die beide Bestandteile der 60S-Untereinheit sind, sind als schwache Bande in den Fraktionen 9-14 detektierbar. In den Fraktionen 1-3 ist außerdem eine relativ starke Bande der tRNAs zu sehen (70-90

→

Diese bemerkenswerte, aktivitätsbedingte Umverteilung des Zinki-Proteins konnte in einem weiteren Versuch bestätigt werden. Bei diesem Experiment wurden über einen vierstufigen diskontinuierlichen Sucrosedichtegradienten Zytosol, Membranen geringer Dichte (Plasmamembran, Golgi-Membran, glattes endoplasmatisches Retikulum), Membranen hoher Dichte (rauhes endoplasmatisches Retikulum) und das freie Polysomensediment aufgereinigt (nach Feng et al., 1997; s. Kap. 5.5.14). Dabei reicherte sich Zinki bei der Aufreinigung von Gehirnllysate einer unbehandelten Maus lediglich in den ersten beiden Fraktionen (Zytosol und Membranen geringer Dichte) an. Nach der Fraktionierung eines Gehirnllysats einer vier Stunden zuvor mit Kainat behandelten Maus dagegen konnte Zinki in allen vier Fraktionen, d.h. auch in den ribosomen- beziehungsweise polysomenhaltigen Fraktionen detektiert werden (Abb. 2.13 a). Zur Qualitätskontrolle der Aufreinigung wurden die Western Blots der Fraktionierungen mit RPS6-spezifischen Antikörpern detektiert. Die deutliche Anreicherung dieses ribosomalen Proteins in den Fraktionen des rauhen endoplasmatischen Retikulums und der freien Polysomen lässt darauf schließen, dass sich die Polysomen tatsächlich hauptsächlich in diesen Fraktionen befanden (Abb. 2.13 b).

Diese Fraktionierungsexperimente geben einen Hinweis darauf, dass die Assoziation von Zinki mit Proteinkomplexen großer Dichte, wie den RNA- und proteinenthaltenden Polysomen, über synaptische Aktivität reguliert wird. Unter Kontrollbedingungen befindet sich das Protein hauptsächlich in den löslichen Fraktionen des Zytosols, während erst nach kainatinduzierter synaptischer Aktivität eine Verschiebung zu Fraktionen höherer Dichte stattfindet.

bp). Die Größen der Banden des RNA-Größenstandards (auf dem Gelausschnitt nicht zu sehen) sind in kb angegeben. **(c)** Western-Blot-Detektion mit Antikörpern gegen das ribosomale Protein S6 (RPS6), das Bestandteil der 40S-Untereinheit des Ribosoms ist. Das Protein ist in den Fraktionen 5-14 detektierbar. Anhand dieser Analysen sind die Fraktionen der mRNPs (Fraktionen 1-3), der ribosomalen 40S-Untereinheiten (Fraktionen 3-5), der ribosomalen 60S-Untereinheiten und des 80S-Initiationskomplexes (Fraktionen 6-11) und der Polysomen (Fraktionen 11-14) jeweils mit geschweiften Klammern gekennzeichnet. **(d)** Western-Blot-Detektion des Zinki-Proteins in den Fraktionen des Gehirnllysats einer unbehandelten Maus mit einem Zinki-spezifischen Antiserum. Das Zinki-Protein ist in den Fraktionen 1-4 detektierbar, d.h. also in den Fraktionen der mRNPs und der 40S ribosomalen Untereinheit. **(e)** Western-Blot-Detektion des Zinki-Proteins in den Fraktionen des Gehirnllysats einer Maus 4 h nach kainatinduziertem Krampfanfall. In diesem Fall ist das Zinki-Protein ebenfalls in den Fraktionen 1-4 detektierbar und zusätzlich in der letzten Polysomenfraktion Nr. 14. **(f, g)** Western-Blot-Detektion des GAPDH-Proteins in den Sucrosedichtegradientenfraktionen unter Kontrollbedingungen (f) und 4 h nach kainatinduziertem Krampfanfall (g). In Fraktion Nr. 14 ist unter beiden Bedingungen eine vergleichbare Menge GAPDH nachweisbar.

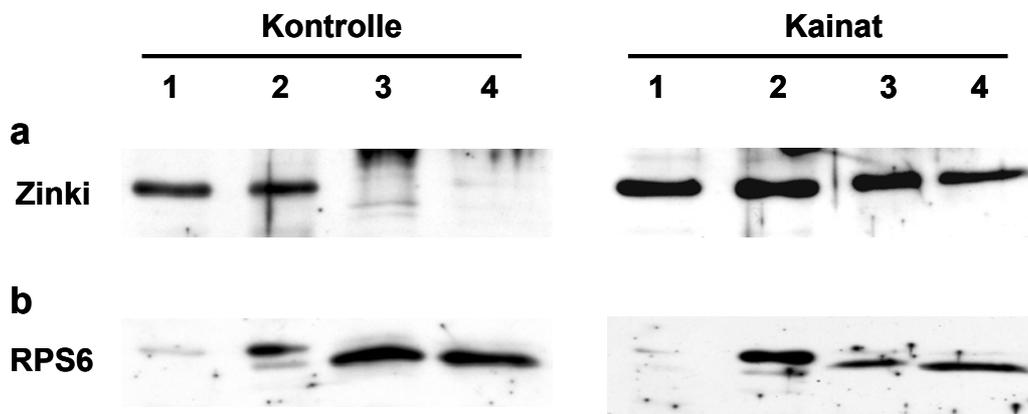


Abb. 2.13: Analyse der Zinkin-Proteinverteilung in subzellulären Fraktionierungen

Die Abbildung zeigt die Analyse einer diskontinuierlichen Sucrosedichtegradientenzentrifugation von Mausgehirnlysaten unter Kontrollbedingungen und 4 h nach kainatinduziertem Krampfanfall. In den Spuren (1) bis (4) wurden folgende Fraktionen der Aufreinigung aufgetragen: (1), Zytosol; (2), Membranen geringer Dichte (Plasmamembranen, Golgi-Membranen, glattes endoplasmatisches Retikulum); (3), Membranen hoher Dichte (rauhes endoplasmatisches Retikulum); (4), freies Polysomensediment. **(a)** Western-Blot-Analyse der Zell-Fraktionierungen mit einem Zinkin-spezifischen Antiserum. Zinkin ist unter Kontrollbedingungen nur in Fraktion (1) und (2) detektierbar und erst nach kainatinduziertem Krampfanfall auch in den Fraktionen höherer Dichte (3 und 4) nachweisbar. **(b)** Western-Blot-Analyse mit RPS6-spezifischen Antikörpern. Sie dient als Qualitätskontrolle der Fraktionierung, da nur in den polysomenhaltigen Fraktionen (3) und (4) das ribosomale Protein S6 nachgewiesen werden kann.

2.5 Proteininteraktionspartner von Zinki

Die bisher beschriebenen Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf die aktivitätsabhängige Regulation des Zinki-Proteins und eine mögliche Funktion Zinkis bei der Translation von Arg3.1 hin. Zur Analyse dieser und weiterer Eigenschaften des Proteins ist es hilfreich, die Einbindung Zinkis in bestimmte Signaltransduktionswege zu untersuchen. Durch die Identifikation und Analyse potentieller Proteininteraktionspartner besteht die Möglichkeit, mehr über die Funktion eines Proteins zu erfahren. Proteine liegen in der Zelle häufig mit anderen Proteinen zu großen Komplexen assoziiert vor, mit denen sie funktionelle Einheiten und Netzwerke bilden (Levchenko, 2003). Über die Identifikation von Interaktionspartnern lassen sich Proteine speziellen Komplexen oder Netzwerken und damit auch Signaltransduktionswegen zuordnen.

2.5.1 Identifikation von Interaktionspartnern im Zwei-Hybrid-System

Eine bewährte Methode für die Isolation unbekannter Proteininteraktionspartner ist das Hefe Zwei-Hybrid-System (Fields und Song, 1989; s. Kap. 1.7). Mit seiner Hilfe lässt sich zum einen überprüfen, ob zwei Proteine miteinander interagieren, und zum anderen eignet sich das Zwei-Hybrid-System zum Durchmustern ganzer cDNA-Banken. Um Interaktionspartner von Zinki zu identifizieren, wurde mit dem N-Terminus von Zinki (trunkierte KRAB-A-Domäne und Pseudozinkfinger) eine hippokampale Ratten-cDNA-Bank durchmustert. Die cDNAs wurden aus einer Total-mRNA-Fraktion gewonnen, die vier Stunden nach einem pentylentetrazolinduzierten Krampfanfall isoliert worden war. Für den *Screen* wurde nicht das vollständige Zinki-Protein verwendet, da dieses Konstrukt (pAS2-Zg, Klonierung s. Kap. 5.2.4) in ersten *Screen*-Versuchen Ergebnisse lieferte, die anschließend nicht bestätigt werden konnten. Eine Ursache hierfür könnten die im vollständigen Protein enthaltenen vierzehn Zinkfinger sein. Eine solche Zahl von Zinkfingern kann zu Falschpositiven im Zwei-Hybrid-System führen, da diese als potentielle DNA-Bindungsdomäne möglicherweise die Reportergene unspezifisch aktivieren können. Nach diesen Vorversuchen wurde die cDNA des N-Terminus von Zinki (Nukleotide 1596-1790, AS 1-65) über PCR amplifiziert und in den Vektor pAS2 einkloniert (pAS2-ZN, Klonierung s. Kap. 5.2.4). Dieses Konstrukt wurde als Köderprotein für den *Screen* eingesetzt und enthielt eine DNA-Sequenz, die die DNA-Bindungsdomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors kodierte und mit der Zinki-kodierenden Sequenz verbunden war. Hefen, die dieses Plasmid trugen, wurden in einem zweiten Schritt

mit der hippokampalen Ratten-cDNA-Bank pACTII-libIII, (s. Kap. 6.2) transformiert. Die cDNA-Bank pACTII-libIII enthielt über 2×10^6 unabhängige cDNAs, die an das 3'-Ende der cDNA für die Aktivierungsdomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors kloniert worden waren (Putz et al., 1996). Hefeklone, die auf diese Weise Fusionsproteine der GAL4-Aktivierungsdomäne exprimierten, welche mit dem Köderprotein interagierten, bildeten einen funktionsfähigen GAL4-Transkriptionsfaktor aus. Sie wurden über die Aktivierung der Reportergene identifiziert.

2.5.1.1 Zwei-Hybrid-Screen nach Proteininteraktionspartnern von Zinki

Für den Zwei-Hybrid-Screen wurde die cDNA-Bank pACTII-libIII in pAS2-ZN-tragende CG1945-Hefen transformiert. Basierend auf der Transformationsrate und der eingesetzten Menge an pACTII-libIII-DNA konnte berechnet werden, dass bei dieser Hefetransformation ca. $2,5 \times 10^7$ Hefeklone entstanden waren. Dies entsprach wahrscheinlich mehr als der zehnfachen Menge an in der cDNA-Bank enthaltenen unabhängigen cDNAs (über 2×10^6 , s.o.). Ausgehend von der Tatsache, dass statistisch gesehen nur jede sechste dieser cDNAs in der richtigen Orientierung und im richtigen Leserahmen zur GAL4-Aktivierungsdomäne vorliegt, reduziert sich die Zahl der Hybridproteine, die als potentielle Bindungsproteine im Zwei-Hybrid-Screen in Frage kommen, weiter. Die hohe Zahl der durchmusterten Hefeklone ($2,5 \times 10^7$) ließ darauf schließen, dass sämtliche dieser Hybridproteine auf ihre mögliche Interaktion mit Zinki getestet wurden. Auf Grund dieser Berechnungen war weiterhin davon auszugehen, dass in diesem Screen Klone, die demselben cDNA-Synthese-Ereignis entstammten, mehrfach auftreten würden. Hefeklone, die Hybridproteine enthielten, welche mit Zinki interagierten, wurden durch ihre Aktivierung der Reportergene identifiziert. Dazu wurden sie zunächst über ihr Wachstum ohne die Aminosäure Histidin vorselektioniert (Methodik s. Kap. 5.4.1.4). Die Synthese dieser Aminosäure wird im Zwei-Hybrid-System durch das Reportergen His3 angeschaltet. Auf Grund der großen Zahl von 1800 positiven Kandidatenklonen wurde zur Steigerung des Selektionsdrucks die Konzentration des Histidin-Biosynthesehemmers 3-Aminotriazol im Hefe-Medium erhöht. Zusätzlich wurden die Klone in einem X-gal-Assay hinsichtlich der Expression des zweiten Reportergens, des LacZ-Gens, untersucht. Das LacZ-Gen kodiert für die β -Galactosidase, die im X-gal-Assay eine spezifische Blaufärbung der Hefen bewirkt. Dadurch konnte die Zahl der positiven Klone um fünfzig Prozent reduziert werden. Anschließend wurde das Köderplasmid aus den Hefen mittels Cycloheximidselektion eliminiert, so dass der pACTII-Vektor isoliert werden konnte. Das war möglich, weil der pAS2-Vektor ein Gen trägt, das Cycloheximidsensitivität

vermittelt, der verwendete Hefestamm CG1945 selber aber cycloheximidresistent ist. Auf diese Weise können in cycloheximidhaltigem Medium nur noch Hefen wachsen, die den pAS2-Vektor nicht mehr tragen. Durch Ausplattieren der Klone auf cycloheximidhaltigem Agar konnten so Hefen selektiert werden, die nur noch den pACTII-Vektor enthielten. Die isolierten Klone des Hefestammes CG1945 (Paarungstyp a) wurden mit Hefen vom Stamm Y187 (Paarungstyp α), die das Plasmid pAS-ZN trugen, einer Hefeverpaarung unterzogen. Bei einer Hefeverpaarung fusionieren jeweils zwei haploide Hefen eines unterschiedlichen Paarungstyps miteinander zu diploiden Hefen, die dann die gesamte DNA beider Klone besitzen. Die daraus resultierenden Hefen wurden einem X-gal-Assay unterzogen. Außerdem wurden die positiven Klone mit Hefen des Stammes Y187 verpaart, die ein Kontrollplasmid trugen, das voraussichtlich nicht mit den Interaktionspartnern von Zinki interagiert. Bei diesem Kontrollplasmid handelte es sich um ein Fusionsprotein aus der GAL4-DNA-Bindungsdomäne und dem murinen Protein p53 (pAS-p53; s. Kap. 6.2). Auch die aus dieser Verpaarung resultierenden Hefen wurden im X-gal-Assay getestet. Dreißig Prozent der getesteten Klone wurden nur mit Zinki blau, nicht aber mit der Kontrolle p53. Aus diesen Klonen, die also spezifisch mit Zinki interagierten, wurde das jeweilige pACTII-Plasmid isoliert und in Bakterien amplifiziert.

Letztendlich wurden auf diese Weise ca. 300 Klone als im Zwei-Hybrid-System spezifische Interaktionspartner von Zinki identifiziert. Von diesen Klonen wurden 102 ansequenziert und ihre cDNAs mit Hilfe des Computerprogramms BLASTN 2.2.7 identifiziert. Daran anschließend wurde überprüft, ob die daraus resultierenden Proteine im richtigen Leserahmen zur GAL4-Aktivierungsdomäne des pACTII-Vektors lagen. Dies traf auf 82 der 102 sequenzierten cDNAs zu. Von diesen 82 cDNAs, die mittels Datenbankanalysen identifiziert werden konnten und deren Aminosäuren im richtigen Leserahmen zur GAL4-Aktivierungsdomäne lagen, waren 30 unabhängige Klone, das heißt sie beruhten auf unterschiedlichen Synthese-Ereignissen bei der cDNA-Herstellung. Sie kodierten elf verschiedene Proteine, welche in Tabelle 2.2 nach Funktion in der Zelle geordnet aufgelistet sind. Die restlichen 20 der insgesamt 102 sequenzierten Klone konnten nicht näher spezifiziert werden. Die cDNAs von zwölf dieser Klone konnten in den Datenbanken von BLASTN 2.2.7 nicht gefunden werden und bei acht weiteren Klonen lag der Bereich der cDNA innerhalb der 3'UTR bekannter cDNAs. Bei den letzteren muss es sich also um zufällige Peptidketten handeln, die *in vivo* nicht existieren, aber mit dem N-Terminus von Zinki zumindest im Zwei-Hybrid-System interagieren. Diese Klone wurden nicht weiter untersucht.

Zinki-Interaktionspartner im Zwei-Hybrid-System			
	Acc. No.	cDNA	Σ
Ras- Signaltransduktionsweg			
Guanine nucleotide releasing factor for Ras (GRF1)	X67241.1	2752-3804	59 [19]
G protein pathway suppressor 1 (GPS1)	BC061746.1	452-1986	2 [1]
Ran binding protein M (RanBPM)	XM_344580.1	477-2277	2 [2]
Transkriptionsfaktoren und assoziierte Proteine			
Small androgen receptor interacting protein (SARIP)	AJ132390.1	923-1541	8 [1]
c-fos	X06769.1	988-1400	1
DNA-Replikation			
CDC47	XM_213728.2	1771-2160	2 [1]
Ubiquitin-Proteasom-System			
Proteasome (prosome, macropain) 28 subunit,3 (PA28)	NM_011192.1	311-1400	4 [1]
Neurodegenerative Krankheiten			
Amyloid beta (A4) precursor-like protein 1 (Aplp1)	NM_007467.1	83-1500	1
Cholecystokinin (Cck)	NM_012829	63-706	1
Zellulärer Transport			
Ring finger protein 22 (Rnf22)	NM_031786.1	1961-2890	1
Unbekannte Funktion			
Jumping translocation breakpoint (Jtb)	NM_019213.1	364-897	1

Tab. 2.2: Übersicht über die im Zwei-Hybrid-Screen identifizierten Interaktionspartner von Zinki

Die Tabelle zeigt die als putative Interaktionspartner von Zinki identifizierten Proteine. Es ist jeweils der Name des Proteins, die Genbank *Accession*-Nummer (*Acc. No.*), der Bereich der cDNA, den der im *Screen* identifizierte Klon enthielt (*cDNA*), und die Zahl der identifizierten Klone angegeben. Die Ziffer in den eckigen Klammern bezeichnet die Anzahl der unabhängigen Klone einer cDNA, die isoliert wurden. Die Klone sind nach Themengebieten geordnet aufgelistet.

2.5.1.2 Potentielle Interaktionspartner von Zinki

Auffällig ist, dass über die Hälfte (58) der sequenzierten Klone GRF1 kodieren (*Guanine nucleotide releasing factor for Ras*, auch bekannt als RASGRF1 und CDC25Mm). Davon sind 19 unabhängige Klone, das heißt jeder dieser 19 Klone unterscheidet sich von den anderen in Hinblick auf den Bereich der cDNA von GRF1, den er enthält. Diese Klone resultieren also aus unabhängigen Synthese-Ereignissen bei der cDNA-Herstellung. Das spricht für eine starke und im Zwei-Hybrid-System reproduzierbare Interaktion. Neben GRF1 wurden noch zwei weitere Regulatoren des Ras-Signaltransduktionsweges identifiziert. Dies waren GPS1, das nach Überexpression den Ras-Signaltransduktionsweg hemmt (Spain et al., 1996), und RanBPM, ein Interaktionspartner der kleinen GTPase Ran, der unter anderem auch Ras aktiviert (Wang et al., 2002a). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Zinki in den Ras-Signaltransduktionsweg involviert sein könnte.

Eine andere Gruppe von putativen Interaktionspartnern des Zinki-Proteins ist in DNA-Transkription und DNA-Replikation involviert. Zu dieser Gruppe gehört das unmittelbar früh exprimierte Gen c-Fos, das ebenso wie Arg3.1 unter anderem durch synaptische Aktivität auslösende Stimuli, wie zum Beispiel Metrazol oder Kainat, induziert wird (Morgan et al., 1987; Dragunow et al., 1989; Gahring et al., 1996). Es gehört zur Familie der Fos-Proteine, die zusammen mit den Jun-Proteinen den heterodimeren Transkriptionsfaktor AP-1 bilden. AP-1 aktiviert die Expression von Genen, die eine AP-1-Bindungssequenz innerhalb ihrer Promotorregion besitzen, und spielt bei verschiedenen biologischen Prozessen, wie zum Beispiel Zellproliferation und –überleben, eine Rolle (Karin et al., 1997). Außerdem werden AP-1 und insbesondere c-Fos eine Funktion bei neuronaler Protektion und Degeneration zugesprochen (Cho et al., 2001; Herdegen und Waetzig, 2001). Abgesehen von c-Fos wurde ein weiteres Protein insgesamt achtmal gefunden, das in Mechanismen der Transkriptionsregulation involviert sein könnte. Dieses Protein SARIP (*small androgen receptor interacting protein*) wurde in einem Zwei-Hybrid-Screen als einer von fünf Interaktionspartnern des Androgenrezeptors identifiziert (Moilanen et al., 1998 a, b und 1999; Rouleau et al., 2002; Sequenz: Reeben, 1999). Der Androgenrezeptor gehört zur Familie der nukleären Rezeptoren, die nach Ligandenbindung in den Zellkern wandern. Dort regulieren sie die Transkription bestimmter Gene über Bindung an spezifische Erkennungssequenzen innerhalb ihres Promotorbereiches. Nukleäre Rezeptoren binden entweder direkt an die basalen Transkriptionsfaktoren oder vermitteln ihre Wirkung indirekt über Bindung an Ko-Aktivatoren beziehungsweise -Repressoren. Des Weiteren benötigen sie Faktoren, welche die dicht gepackte Chromatinstruktur der DNA remodellieren und diese so zugänglich für DNA-

Bindungsproteine macht. Vier der fünf identifizierten Androgenrezeptor-Bindungspartner wirken als Ko-Regulatoren des Androgenrezeptors (Rouleau et al., 2002). Das in diesem *Screen* als potentieller Bindungspartner von Zinki identifizierte Protein SARIP wurde noch nicht näher charakterisiert. Die Analysen der anderen vier Androgenrezeptor-Bindungspartner aber legen die Vermutung nahe, dass auch SARIP eine Funktion bei der Androgenrezeptor-regulierten Transkription ausüben könnte. Darüber hinaus wurde als möglicher Bindungspartner von Zinki das Protein CDC47 identifiziert. CDC47 gehört zur Familie der MCM-Proteine, welche die DNA-Replikation in eukaryotischen Zellen regulieren (Kimura et al., 1996). Eukaryotische Zellen replizieren ihre DNA genau einmal während der S-Phase des Zellzyklus. Diese einzelne Replikationsrunde wird vermutlich unter anderem durch die Proteine der MCM-Familie kontrolliert, die während der G-Phase an das Chromatin binden und so die DNA-Replikation verhindern könnten. Die bisher beschriebenen Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass das Zinki-Protein nicht im Zellkern lokalisiert ist. Über seine potentielle Bindung an die Proteine c-Fos, SARIP und CDC47 könnte es aber dennoch eine indirekte Rolle bei Transkription und Replikation von DNA spielen.

Ein in Hinblick auf die vorangehenden Experimente zur gerichteten Degradation von Zinki durch das Ubiquitin-Proteasom-System (Kap. 2.4.2) interessanter Klon, der im Zwei-Hybrid-*Screen* viermal als Bindungspartner von Zinki gefunden wurde, ist die γ -Untereinheit des Proteasomenaktivators 28 (PA28 γ). Das Protein PA28 ist eine regulatorische Untereinheit des 20S-Proteasoms und involviert in die Aktivierung des Proteasoms (Ma et al., 1992). Allerdings ist es nicht an der Erkennung und dem Abbau ubiquitiniertes Proteine beteiligt, sondern hauptsächlich für die Degradation von Peptiden und die Antigenpräsentation durch MHC-Klasse-1-Rezeptoren zuständig (Ahn et al., 1996). Auf dieses Protein wird in der Diskussion noch näher eingegangen werden (Kap. 3.4.1).

Außerdem wurden Interaktionspartner gefunden, die in Zusammenhang mit neurodegenerativen Krankheiten stehen. Zu dieser Gruppe gehört zum einen A β 1 (*Amyloid beta (A4) precursor-like protein 1*), das in neuritischen Plaques von Gehirnen von Patienten, die an der Alzheimerkrankheit leiden, akkumuliert (Bayer et al., 1997), und Cholecystokinin, ein Neuropeptid, das sowohl im Dünndarm als auch von Neuronen des ZNS sekretiert wird. Im Verdauungstrakt aktiviert es die Sekretion von Pankreas-Enzymen und die Kontraktion der Gallenblase, während es im Gehirn verschiedene Aufgaben, wie zum Beispiel Kontrolle der Nahrungsaufnahme und des Sättigungsgefühls übernimmt, aber auch im Zusammenhang mit der Ausbildung eines Langzeitgedächtnisses diskutiert wird (Fink et al., 1998; Sebret et al., 1999). So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass Cholecystokinin in die stressinduzierte

Hemmung des räumlichen Gedächtnisses involviert ist (Dauge et al., 2003). Cholecystokinin ist in einem Mausmodell für die Alzheimerkrankheit in den Moosfasern des Hippokampus herunterreguliert (Diez et al., 2003). Ferner deuten Studien auf eine Beteiligung an neuronalen Erkrankungen wie Schizophrenie und an der Wirkungsweise von Drogen hin (Zhang et al., 2000; Loonam et al., 2003). Als weitere Interaktionspartner von Zinki wurden Rnf22 (*Ring finger protein 22*), das mit Motorproteinen und dem Zytoskelett assoziiert ist (El-Husseini et al., 2001) und Jtb (*Jumping translocation breakpoint*), ein nicht genauer beschriebenes Transmembranprotein (Hatakeyama et al., 1999) gefunden. Von diesen elf potentiellen Proteininteraktionspartnern von Zinki wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit der am häufigsten identifizierte Klon GRF1 genauer analysiert.

2.5.2 Proteindomänenstruktur von GRF1

GRF1 ist ein GDP/GTP-Austauschfaktor für die kleine GTPase Ras (Crechet et al., 1990; Martegani et al., 1992), der hauptsächlich neuronal exprimiert wird. Der offene Leserahmen von GRF1 umspannt 3732 Nukleotide und kodiert damit 1244 Aminosäuren. Die Domänenstruktur von GRF1 ist in Abbildung 2.14 dargestellt. In der Reihenfolge vom N-Terminus zum C-Terminus besteht GRF1 aus einer Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH, Haslam et al., 1993, vermittelt Membranbindung), einer *coiled-coiled*-Domäne (CC, Lupas, 1996, vermittelt Oligomerisierung von Proteinen), einer *Ilimaquinone*-Domäne (IQ, Farnsworth et al., 1995, Ca^{2+} /Calmodulin-Bindungsstelle, vermittelt Ca^{2+} -Sensitivität), einer Dbl-Homologie-Domäne (DH, Hart et al., 1991, GDP/GTP-Austauschfaktor für Rho/Rac), einer zweiten PH-Domäne und der C-terminalen katalytischen Domäne (RasGEF, cdc25, Crechet et al., 1990) (Buchsbaum et al., 1996). Eine Analyse mit dem Computerprogramm Pfam 11.0, das Aminosäuresequenzen nach bekannten, konservierten Proteindomänen durchsucht, zeigte die genauen Sequenzbereiche der einzelnen Domänen (Abb. 2.14).

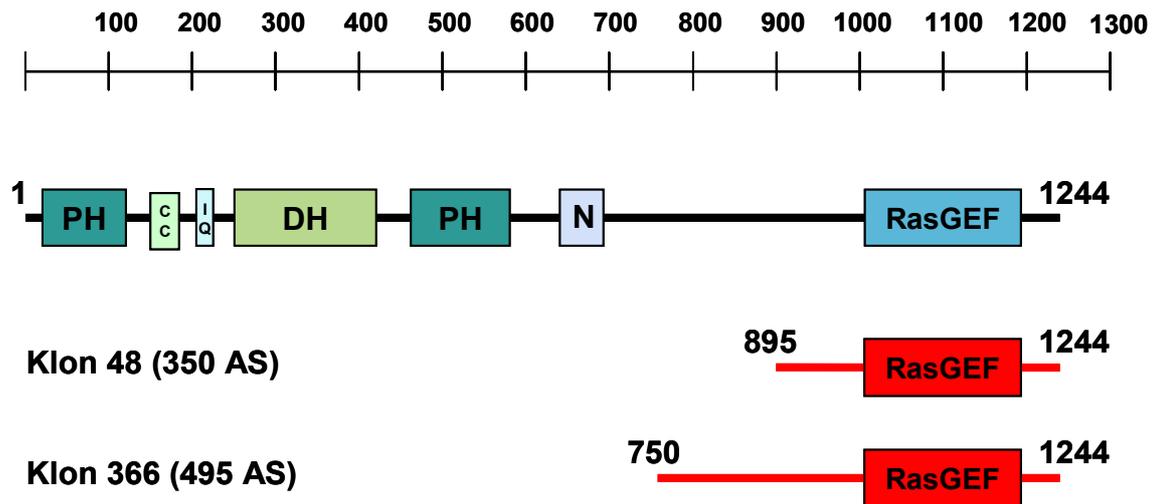


Abb. 2.14: Proteindomänenstruktur von GRF1

Die Abbildung zeigt den Aufbau des GRF1-Proteins. Die einzelnen Domänen, sowie der kürzeste und längste im Zwei-Hybrid-Screen identifizierte GRF1-Klon (Klon 48 und 366) sind maßstabsgerecht entsprechend der Aminosäureskala oben eingezeichnet. (*PH*), Pleckstrin-Homologie-Domäne; (*CC*), *coiled-coil*-Domäne; (*IQ*), *Ilimaquinone*-Domäne; (*DH*), Dbl-Homologie-Domäne oder auch RhoGEF-Domäne (PF00621); (*N*), RasGEF_N (PF00618): N-terminales Motiv, Protein-Domäne unbekannter Funktion, die bei vielen Ras-spezifischen GDP/GTP-Austauschfaktoren N-terminal von der RasGEF-Domäne liegt; (*RasGEF*), RasGEF-Domäne (Pf00618): Guaninnukleotid-austauschfaktoren für Ras-ähnliche kleine GTPasen (nach Buchsbaum et al., 1996 und *Pfam 11.0*-Analyse).

2.5.3 Analyse der GRF1-Zinki-Interaktion im Zwei-Hybrid-System

Alle 19 individuellen GRF1-Klone, die im Zwei-Hybrid-Screen isoliert wurden, beinhalten den vollständigen C-Terminus des Proteins. Der längste Klon (Klon 366) erstreckt sich über die letzten 1485 Nukleotide (495 Aminosäuren, Aminosäure 750 - 1244), der kürzeste Klon (Klon 48) über die letzten 1050 Nukleotide (350 Aminosäuren, Aminosäure 895 - 1244) (Abb. 2.14). Die oben beschriebene Analyse mit dem Programm Pfam 11.0 zeigte, dass diese Sequenz die katalytische Domäne von GRF1 umschließt, die so genannte RasGEF-Domäne (Aminosäuren 1006-1191, Abb. 2.14). Zunächst wurde versucht, den Bereich von GRF1, der mit Zinki interagiert, einzugrenzen, um so eine minimale Bindungsdomäne zu identifizieren. Auch für solche Analysen von Proteininteraktionen eignet sich das Zwei-Hybrid-System. Der kürzeste GRF1-Klon wurde dafür in drei Konstrukte mit je 105 Aminosäuren unterteilt (Klonierung Kap. 5.2.5). Tabelle 2.3 zeigt schematisch den Aufbau der Konstrukte, die für die Eingrenzung der Minimalbindungsdomäne von GRF1 verwendet wurden. Diese Subdomänen

wurden zusammen mit pAS2-ZN in CG1945-Hefen kotransfiziert und auf ihre Interaktion mit Zinki im Zwei-Hybrid-System überprüft. Als Negativkontrolle wurden die GRF1-Deletionskonstrukte mit dem Plasmid pAS-p53 getestet.

Konstrukt		cDNA-Bereich (Nukleotide)	Proteinsequenz (Aminosäuren)
pACTII-G1		2857-3171	930-1034
pACTII-G2		3172-3486	1035-1139
pACTII-G3		3487-3801	1140-1244
pACTII-Gk		3730-3801	1221-1244
pACTII-Gdel		2857-3792	930-1241

Tab. 2.3: Schematische Darstellung der GRF1-Deletionskonstrukte zur Bestimmung der minimalen Bindungsdomäne

Die Tabelle gibt einen Überblick über die im Zwei-Hybrid-System eingesetzten GRF1-Deletionskonstrukte. Dabei sind die Namen der verschiedenen Konstrukte und der jeweilige cDNA-beziehungsweise Aminosäurebereich, den sie beinhalten, angegeben. (Die Nummerierungen beziehen sich dabei auf die GRF1-*Accession*-Nr. X67241.1). Die Lage der Konstrukte innerhalb des GRF1-Proteins ist in Form von Balken relativ zum kleinsten im Zwei-Hybrid-System identifizierten GRF1-Klon wiedergegeben (2. Spalte). Dieser GRF1-Klon wurde in die drei gleich großen Konstrukte pACTII-G1, -G2 und -G3 unterteilt. Darüber hinaus wurden das Konstrukt pACTII-Gk, das die C-terminalen 24 Aminosäuren von GRF1 enthält, und das Konstrukt pACTII-Gdel, das aus den C-terminalen 315 Aminosäuren von GRF1 ohne die letzten drei Aminosäuren des C-Terminus besteht, kloniert. Bis auf pACTII-Gdel enthält keines der Konstrukte die vollständige katalytische Domäne von GRF1 (RasGEF). Nur die Plasmide pACTII-G3 und pACTII-GK beinhalten den kompletten C-Terminus von GRF1. (Klonierung s. Kap. 5.2.5)

Dabei konnte nur mit dem C-terminalen Konstrukt pACTII-G3 und pAS2-ZN ein schwaches Wachstum auf Platten ohne Histidin und mit 10 mM 3-Aminotriazol detektiert werden, während die Negativkontrolle mit pAS-p53 deutlich weniger wuchs (Abb. 2.15 a und b). Die Konstrukte pACTII-G1 und pACTII-G2 zeigten kein Wachstum. Auch im X-gal-Assay färbten sich nur die mit pAS2-ZN und pACTII-G3 kotransfizierten Hefen schwach blau, alle anderen Kombinationen färbten sich nicht (Übersicht Abb. 2.15 a). Zusätzlich wurde das Plasmid pAS-p53 mit pACTII-SV40 kotransfiziert, einem Plasmid, das ein Fusionsprotein aus der GAL4-Aktivierungsdomäne und dem SV40 *large T-Antigen* kodiert. Die beiden Proteine

p53 und SV40 *large T-Antigen* interagieren *in vivo* miteinander (McCormick und Harlow, 1980) und bewirken im Zwei-Hybrid-System eine verlässliche Aktivierung der Reportergene. Sie dienen deshalb in diesen Experimenten als Positivkontrolle (Abb. 2.15 a-c). Weitere Eingrenzungen der C-terminalen Bindungsdomäne waren nicht erfolgreich, da ein nur die C-terminalen 24 Aminosäuren umspannendes Konstrukt pACTII-GK (Tab. 2.3, Klonierung s. Kap. 5.2.5) eine Aktivierung der Reportergene in Abwesenheit der GAL4-DNA-Bindungsdomäne bewirkte. Eine ähnliche unspezifische Aktivierung trat bei dem Versuch der Bestimmung der Bindungsdomäne auf Seiten des Zinki-N-Terminus auf. Dort ergab die Unterteilung des N-Terminus in KRAB-Domäne (pAS2-KRAB, AS 1-11) und Linkerregion (pAS2-ZL, AS 12-65) zwei Konstrukte, die beide die Expression der Reportergene des Zwei-Hybrid-Systems in Abwesenheit der GAL4-Aktivierungsdomäne bewirkten (Klonierung s. Kap. 5.2.4). Hybridproteine, die wie in diesen Fällen das Ablesen der Reportergene ohne die jeweils andere Domäne des GAL4-Transkriptionsfaktors hervorrufen, bezeichnet man als autoaktivierend. Autoaktivierung im Zwei-Hybrid-System tritt oft bei sehr kurzen Konstrukten auf, wie den drei zuletzt beschriebenen (persönliche Beobachtung). Die mit Hilfe des Zwei-Hybrid-Systems ermittelbaren minimalen Bindungsdomänen sind also die N-terminalen Aminosäuren 1-65 von Zinki (trunkierte KRAB-Domäne und Linkerregion) und die 105 C-terminalen Aminosäuren 1140-1244 von GRF1.

Auffällig bei der Analyse der im Zwei-Hybrid-Screen gefundenen Klone ist, dass bei allen Klonen bis auf APLP1 der vollständige C-Terminus erhalten ist (s. Tab. 2.2). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Bindung an das Zinki-Protein über die C-terminalen Aminosäuren des jeweiligen Interaktionspartners vermittelt wird. Um diese Hypothese zu testen, wurden mittels PCR die letzten drei Aminosäuren (Leucin-Prolin-Threonin) von GRF1 deletiert (Tab. 2.3, Klonierung s. Kap. 5.2.5). Das resultierende Konstrukt pACTII-Gdel wurde im Zwei-Hybrid-System auf eine spezifische Interaktion mit dem N-Terminus von Zinki getestet. Das Ergebnis des X-gal-Assays (Abb. 2.15 c) zeigt, dass mit dem C-terminalen Deletionskonstrukt von GRF1 keine Interaktion, also keine Blaufärbung mehr festgestellt werden konnte, während der ursprüngliche GRF1-Klon spezifisch mit pAS2-ZN interagiert und deutlich blau wurde. Die letzten drei Aminosäuren von GRF1 sind also essentiell für dessen Interaktion mit Zinki im Zwei-Hybrid-System.

Aufgrund dieser Interaktionsanalysen kann man die Schlussfolgerung ziehen, dass für eine starke Interaktion zwischen Zinki und GRF1 die C-terminalen 350 Aminosäuren ausreichend sind und eine schwache Bindung noch durch die letzten 105 Aminosäuren vermittelt wird, während eine Deletion der letzten drei Aminosäuren die Interaktion völlig aufhebt.

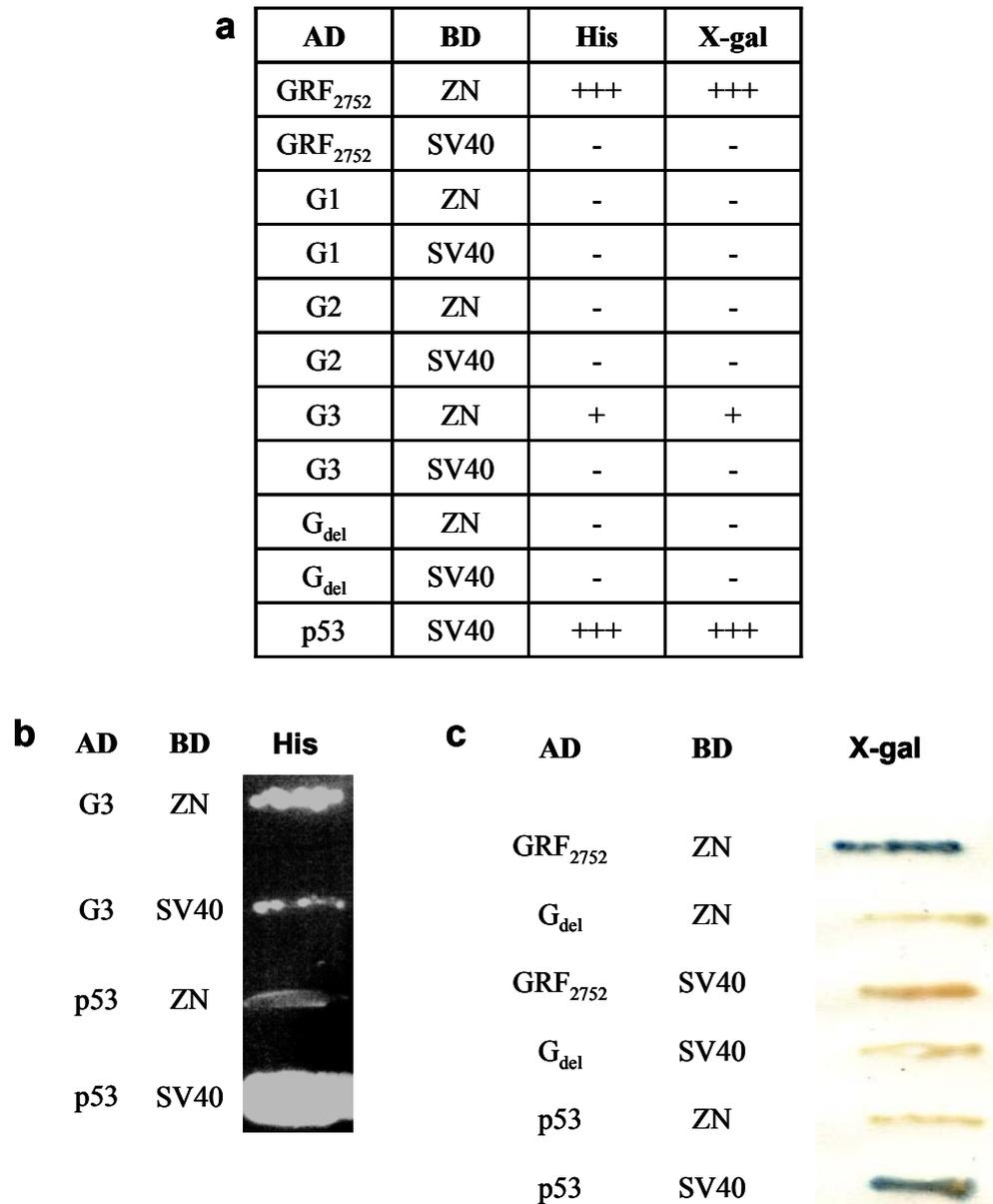


Abb. 2.15: Bindung von Zinki an verschiedene Deletionskonstrukte von GRF1

Dargestellt sind die Resultate der Experimente im Zwei-Hybrid-System zur Eingrenzung der minimalen Bindungsdomäne von GRF1. **(a)** Tabellarische Übersicht der Ergebnisse der Untersuchungen zur Interaktion der Subdomänen des GRF1-C-Terminus mit Zinki. Angegeben sind die jeweiligen Konstrukte, die auf Interaktion getestet wurden, sowie die Resultate des Histidin-Wachstumstests beziehungsweise des X-gal-Assays. **(b)** Exemplarische Abbildung des Wachstums des G3-Konstrukts auf einer Hefe-Agarplatte ohne Histidin. Hefen, welche die Fusionsproteine von G3 und ZN exprimierten, wuchsen deutlich stärker als Hefen, welche die Fusionsproteine von G3 und SV40 bzw. ZN und p53 exprimierten. **(c)** Deletion der C-terminalen Aminosäuren von GRF1. Dargestellt ist das Ergebnis eines X-gal-Assays von Hefen, die mit dem ursprünglich identifizierten GRF1-Klon beziehungsweise dem C-terminalen Deletionskonstrukt, dem die drei letzten Aminosäuren fehlten, und Zinki transformiert wurden. Lediglich das Konstrukt mit dem vollständigen C-Terminus interagiert spezifisch mit Zinki und wurde im X-gal-Assay deutlich blau. (AD), Fusionsproteine der GAL4-Aktivierungsdomäne; (BD), Fusionsproteine der GAL4-DNA-Bindungsdomäne. Die Namen der eingesetzten GRF1-Konstrukte entsprechen den in Tabelle 2.3 aufgelisteten. (+++), starkes Wachstum ohne Histidin und mit 10 mM 3-Aminotriazol (*His*) bzw. starke Blaufärbung im X-gal-

→

2.5.4 Klonierung des offenen Leserahmens von GRF1

Der längste im Zwei-Hybrid-Screen isolierte GRF1-Klon umspannte die Nukleotide 2316 bis 3804 (s. Kap. 2.5.2, Abb. 2.14). Für spätere Experimente sollte der komplette offene Leserahmen (Nukleotide 70-3804) kloniert werden. Dazu wurden zunächst in zwei getrennten PCRs die 5'-Hälfte und die 3'-Hälfte der cDNA von GRF1 aus hippokampaler Ratten-cDNA amplifiziert. Die beiden um 25 Nukleotide überlappenden Amplifikate wurden anschließend als *Template* in einer SOE-PCR (Ho et al., 1989; Horton et al., 1989) zur Generierung der vollständigen cDNA eingesetzt. Die daraus resultierende GRF1-cDNA wurde dann in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3 kloniert (pcDNA3-GRF1, genaue Beschreibung der Klonierung s. Kap. 5.2.6). Das Konstrukt wurde in HEK293-Zellen transfiziert und die Expression über SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse mit GRF1-spezifischen Antikörpern überprüft. Die spezifische Bande für GRF1 ist bei einer Höhe von ca. 140 kDa detektierbar, was der aus der Zahl der Aminosäuren des Proteins (1244) berechenbaren theoretischen Größe entspricht (Abb. 2.16). HEK293-Zellen sind menschlichen Ursprungs und exprimieren ein humanes Homolog von GRF1. Die verwendeten GRF1-spezifischen Antikörper erkennen GRF1 aus Ratte, Maus und Mensch, daher detektieren sie auch im Lysat der untransfizierten Zellen die endogene GRF1-spezifische Bande. Sie ist jedoch deutlich schwächer und läuft etwas höher als das Protein aus Ratte. Ein Vergleich der Sequenz des Ratten-GRF1 (*Accession*-Nr. X67241.1) mit der Sequenz des humanen GRF1 (*Accession*-Nr. NM_002891.3) mit Hilfe des Computerprogramms BLAST *Align Two Sequences* zeigte, dass das humane GRF1 auf Nukleinsäureebene 87 % homolog zur rattenspezifischen Sequenz von GRF1 ist. Humanes GRF1-Protein besitzt 29 Aminosäuren mehr als Ratten-GRF1, sein erwartetes Molekulargewicht ist daher um ca. 3,2 kDa größer. Dies erklärt das unterschiedliche Laufverhalten der beiden GRF1-Homologe in der SDS-PAGE.

Assay (*X-gal*); (+), schwaches Wachstum bzw. schwache Blaufärbung; (-) kein Wachstum bzw. keine Blaufärbung; (ZN), N-Terminus von Zink (AS 1-65); (SV40), SV 40 *large antigen T*; (p53), murines p53-Protein; (GRF₂₇₅₂), kürzester im Zwei-Hybrid-Screen identifizierter GRF1-Klon; (G_{del}), GRF1-Konstrukt ohne die drei C-terminalen Aminosäuren. Die Interaktion zwischen p53 und SV40 diente bei allen Experimenten als Positivkontrolle.

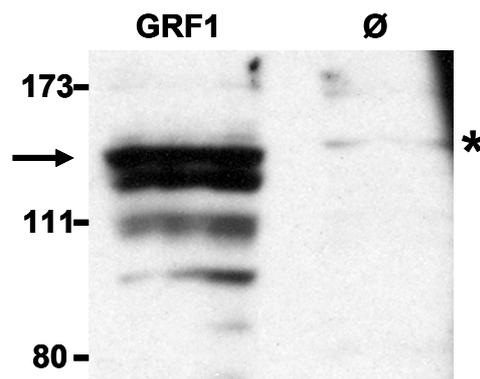


Abb. 2.16: Überexpression des GRF1-Proteins aus der Ratte in HEK293-Zellen

Western-Blot-Analyse von Lysaten transfizierter und untransfizierter HEK293-Zellen mit GRF1-spezifischen Antikörpern. Es wurden jeweils vergleichbare Proteinmengen aufgetragen. Das Lysat von Zellen, die mit pcDNA3-GRF1 (*GRF1*) transfiziert wurden, zeigt eine starke spezifische Bande bei ca. 140 kDa (Pfeil), während das Lysat untransfizierter Zellen (\emptyset) nur eine sehr schwache, etwas höher laufende Bande zeigt, die auch im Lysat transfizierter Zellen detektierbar ist (*). Dabei handelt es sich um endogenes humanes GRF1, das 29 AS größer als das Ratten-Homolog ist. Im Lysat der transfizierten Zellen sind weitere Banden zwischen 90 und 130 kDa detektierbar, die im Lysat nicht-transfizierter Zellen nicht auftreten. Dies könnten Abbaubanden des überexprimierten Ratten-GRF1 sein, ihre genaue Identifikation ist jedoch unter den gegebenen experimentellen Bedingungen nicht möglich. Die Molekulargewichte der Banden des Protein-Längenstandards (hier nicht zu sehen) sind in kDa angegeben.

2.5.5 Nachweis der Interaktion Zinki-GRF1 *in vitro* und *in vivo*

GRF1 wurde im Hefe Zwei-Hybrid-System als Proteinbindungspartner von Zinki identifiziert. Zur Bestätigung dieser Bindung und zur Einschätzung ihrer physiologischen Relevanz wurden weitere Proteininteraktionsexperimente durchgeführt.

2.5.5.1 Nachweis der Zinki-GRF1-Interaktion in *Pulldown*-Experimenten

Eine Möglichkeit zur Analyse von Proteininteraktionen *in vitro* ist die Präzipitation (oder auch der *Pulldown*) von Proteinen aus einem Gewebe- oder Zelllysat mit Hilfe eines an eine Matrix gekoppelten rekombinanten Proteins. Für diesen Nachweis wurden verschiedene rekombinante Zinki-Proteine hergestellt, mit denen GRF1 aus einem Mausgehirnlysat präzipitiert werden konnte. Umgekehrt konnte durch rekombinantes GRF1 in HEK293-Zellen überexprimiertes Zinki präzipitiert werden.

His₆-Pulldown mit rekombinantem Zinki-Protein

Bei einem His₆-Pulldown wird ein mit sechs Histidinresten (His₆) versehenes Protein in Bakterien exprimiert und über Nickel-NTA-Agarose aufgereinigt (Janknecht et al., 1991). Nickel-Nitrilotriessigsäure (Nickel-NTA) bindet spezifisch an sechs aufeinander folgende Histidinreste, die über Klonierung der cDNA in den richtigen Leserahmen eines His₆-tragenden Vektors (pQE-Vektoren, *Qiagen*) entweder N- oder C-terminal an das Protein fusioniert werden. In diesem Fall wurde der gesamte offene Leserahmen von Zinki in den Vektor pQE30 kloniert (pQE30-Zg, Klonierung s. Kap. 5.2.7). Auf diese Weise konnte ein N-terminales His₆-Zinki-Fusionsprotein in Bakterien überexprimiert und über Nickel-NTA-Agarose aufgereinigt werden. Das Protein wurde anschließend an aktivierte NHS-Sepharose gekoppelt und mit Mausgehirnlysate inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurde das Präzipitat von der Sepharose eluiert. Präzipitiertes GRF1-Protein wurde durch Western-Blot-Analysen der Eluate mit GRF1-spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Abbildung 2.17 a zeigt, dass GRF1 nur durch Zinki-Protein aus dem Gehirnlysate präzipitiert wurde, nicht aber durch an NHS-Sepharose gekoppeltes BSA, das als Negativkontrolle diente.

GST-Pulldown mit rekombinantem Zinki-Protein

Für ein weiteres Pulldown-Experiment wurde die cDNA des offenen Leserahmens von Zinki (Aminosäuren 1-463) beziehungsweise des N-Terminus von Zinki (Aminosäuren 1-65) in den Vektor pGEX-KG inkloniert (pGEX-KG-Zg und pGEX-KG-ZN, Klonierung s. Kap. 5.2.2). Mit Hilfe des Vektors pGEX-KG können N-terminale Fusionsproteine aus der Glutathion-S-Transferase (GST) und einem Protein von Interesse in Bakterien exprimiert werden. GST bindet mit hoher Affinität an Glutathion, daher können GST-Fusionsproteine über glutathiongekoppelte Sepharose aufgereinigt werden (Smith und Johnson, 1988). Die so aufgereinigten Zinki-Fusionsproteine wurden mit Mausgehirnlysate inkubiert, anschließend gewaschen und die Eluate über SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Sowohl mit dem vollständigen Zinki-Protein als auch mit dem N-Terminus von Zinki konnte GRF1 präzipitiert werden. Ein Pulldown mit GST ohne daran fusioniertes Protein diente als Negativkontrolle und konnte GRF1 nicht aus Gehirnlysate präzipitieren (Abb. 2.17 b). Die Bindung wurde daher spezifisch durch GRF1 und nicht durch GST vermittelt.

Sowohl bei dem Pulldown mit His₆-Zinki als auch bei dem Pulldown mit GST-Zinki ist mit GRF1-spezifischen Antikörpern im Präzipitat eine Doppelbande detektierbar. Nur die obere Bande repräsentiert dabei GRF1. Bei der unteren Bande handelt es sich um das Protein GRF2, ein weiteres Mitglied der GRF-Familie, das ca. 80 % homolog zu GRF1 ist (Fam et al., 1997). GRF2 ist um 54 Aminosäuren kleiner als GRF1 und wird ebenfalls von den GRF1-

spezifischen Antikörpern erkannt. Diese Analysen deuten an, dass Zinki in der Lage ist, beide GRF-Homologe zu binden (s. hierzu auch Diskussion Kap. 3.5.1).

GST-Pulldown mit rekombinantem GRF1-Protein

Mit Hilfe des Zwei-Hybrid-Systems konnte die Bindungsdomäne von GRF1 auf die C-terminalen 105 Aminosäuren eingeschränkt werden. Eine weitere Eingrenzung war in diesem System nicht erfolgreich, da ein Konstrukt, das nur die C-terminalen 24 Aminosäuren von GRF1 beinhaltet (pAS2-GK), autoaktivierend im Zwei-Hybrid-System war (s. Kap. 2.5.3). Um die Bindungsfähigkeit dieses Konstruktes dennoch zu testen, wurde es in den Vektor pGEX-KG kloniert (pGEX-KG-GK, Klonierung s. Kap. 5.2.8). Entsprechend wurde der kürzeste GRF1-Klon aus dem Zwei-Hybrid-Screen (Klon 48, beinhaltet die C-terminalen 350 Aminosäuren) ebenfalls in pGEX-KG kloniert (pGEX-KG-GRF, Klonierung s. Kap. 5.2.8). Die Fusionsproteine wurden in Bakterien exprimiert, über glutathiongekoppelte Sepharose aufgereinigt und mit Lysat von HEK293-Zellen inkubiert, die mit pEGFP-Zinki (s. Kap. 6.2) transfiziert waren. Anschließend wurde die Sepharose gewaschen, die Präzipitate wurden von der Sepharose eluiert und die Eluate mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Western-Blot-Detektion mit einem Zinki-spezifischen Antiserum zeigt, dass die C-terminalen 24 Aminosäuren von GRF1 nicht ausreichend für eine Bindung an EGFP-Zinki sind (Abb. 2.17 c). Dagegen präzipitieren die C-terminalen 350 Aminosäuren von GRF1 Zinki aus dem Zelllysat. Damit konnte eine Interaktion auch in diesem *Pulldown*-Experiment gezeigt werden. Die im Western Blot detektierte Bande ist allerdings schwach, was für eine geringe Präzipitationseffizienz spricht. Eine Präzipitation von endogenem Zinki aus Gehirnllysat mit GST-GRF war nicht erfolgreich. Mögliche Gründe für diese Ergebnisse werden in der Diskussion näher ausgeführt (s. Kap. 3.4.2).

2.5.5.2 Nachweis der GRF1-Zinki-Interaktion *in vivo* durch Ko-Immunopräzipitation

Bei den oben beschriebenen *Pulldown*-Experimenten handelt es sich um *in vitro* Nachweise für die Interaktion von GRF1 und Zinki. Sie unterstützen zwar die im Zwei-Hybrid-System erhaltenen Ergebnisse, sagen aber noch nichts aus über die physiologische Relevanz der gefundenen Proteininteraktion. Daher war es für die Einschätzung der physiologischen Bedeutung der Proteininteraktion wichtig zu untersuchen, ob die Bindung zwischen Zinki und GRF1 auch *in vivo* in Neuronen nachgewiesen werden konnte. Eine experimentelle Methode, mit der dieser Frage nachgegangen werden kann, ist die Ko-Immunopräzipitation. Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern wird hier ein Protein aus einem Gewebe- oder Zelllysat präzipitiert. Proteine, die *in vivo* an dieses Protein binden, sollten unter geeigneten

Pufferbedingungen kopräzipitiert werden und über Western-Blot-Analyse spezifisch nachweisbar sein. Auf diese Weise können auch ganze Proteinkomplexe präzipitiert und anschließend aufgereinigt werden (s. zum Beispiel Husi und Grant, 2001). In dieser Arbeit wurde ein Mausgehirnlysat mit Zinki-spezifischem Antiserum aus Kaninchen inkubiert und der Immunglobulin-Protein-Komplex anschließend mit Hilfe von Protein-A-gekoppelter Sepharose präzipitiert. Protein-A ist ein Zellwandprotein des Bakteriums *Staphylococcus aureus*, das an den Fc-Teil von Immunglobulin G bindet (Harlow und Lane, 1988) und daher die vorhandenen Immunglobuline des Typs G aus dem Lysat präzipitiert. Von den Antikörpern erkanntes Zinki und an Zinki gebundene Proteinkomplexe können dann aus dem Lysat kopräzipitiert und über SDS-PAGE und Western Blot analysiert werden. Die Detektion mit einem Zinki-spezifischen Antiserum und GRF1-spezifischen Antikörpern zeigte, dass die Immunglobuline des Antiserums Zinki gebunden haben und GRF1 kopräzipitiert wurde (Abb. 2.17 d). Das Zinki-Protein ist nur in geringen Mengen im Präzipitat detektierbar, was anhand der schwachen Zinki-spezifischen Bande im Western Blot deutlich wird. Dies spricht für eine niedrige Präzipitationseffizienz des Zinki-spezifischen Antiserums. Allerdings konnte ein Serum nicht-immunisierter Kaninchen, das als Negativkontrolle diente, weder Zinki noch GRF1 präzipitieren. Das macht die Spezifität der Ko-Immunopräzipitation deutlich. Die Ergebnisse dieser Ko-Immunopräzipitation sind ein weiterer, von den vorangehend beschriebenen Experimenten unabhängiger Nachweis der Interaktion zwischen Zinki und GRF1. Außerdem deuten sie daraufhin, dass die beiden Proteine *in vivo* im Gehirn der Maus in einem Proteinkomplex vorliegen. Auch in diesem Fall wurde mit den GRF1-spezifischen Antikörpern im Präzipitat eine Doppelbande detektiert. Zinki bindet das GRF1-Homolog GRF2 also vermutlich auch *in vivo* (vgl. hierzu Kap. 2.5.5.1 und Diskussion Kap. 3.5.1).

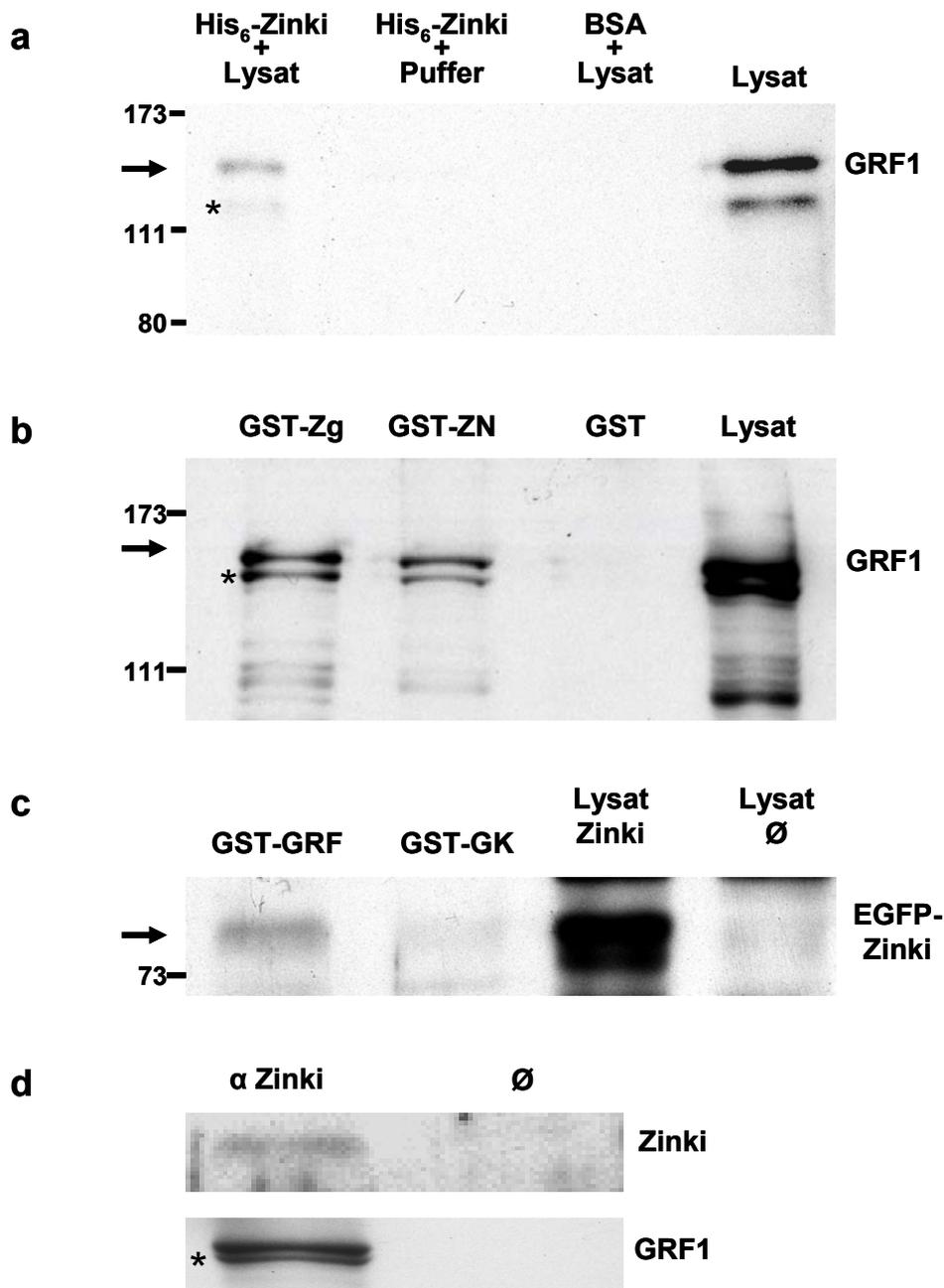


Abb. 2.17: Nachweis der Interaktion zwischen Zinkin und GRF1 *in vitro* und *in vivo*

(a) *Pulldown* mit rekombinantem His₆-Zinkin-Protein aus Mausgehirnlysate. Western-Blot-Detektion mit GRF1-spezifischen Antikörpern des *Pulldowns* mit His₆-Zinkin. Aufgetragen sind die Eluate der Präzipitation mit His₆-Zinkin aus Gehirnlysate (*His₆-Zinkin+Lysat*), mit His₆-Zinkin aus Lysepuffer (*His₆-Zinkin+Puffer*), mit BSA aus Gehirnlysate (*BSA+Lysat*) sowie das Gehirnlysate (*Lysat*). GRF1 ist lediglich in den Eluates des *Pulldowns* mit His₆-Zinkin aus Gehirnlysate und im Gehirnlysate nachweisbar. (b) *Pulldown* mit rekombinanten GST-Zinkin-Proteinen aus Mausgehirnlysate. Zu sehen ist eine Western-Blot-Detektion mit GRF1-spezifischen Antikörpern des *Pulldowns* mit GST-Zinkin (*GST-Zg*), GST-Zinkin-N-Terminus (*GST-ZN*) und GST aus dem Gehirnlysate einer unbehandelten Maus. GRF1 ist sowohl im Eluat des GST-Zinkin-*Pulldowns* als auch im Eluat des GST-ZN-*Pulldowns* und im Gehirnlysate (*Lysat*) nachweisbar, aber nicht im Eluat des GST-*Pulldowns*. (c) *Pulldown* mit rekombinanten GST-GRF1-Proteinen. Zu sehen ist die Western-Blot-Detektion mit einem Zinkin-spezifischen Antiserum des *Pulldowns* mit *GST-GRF* (C-terminale 350 AS von GRF1) und *GST-GK*

→

2.5.6 Vergleich der subzellulären Verteilung von Zinki und GRF1

Proteine, die *in vivo* miteinander interagieren, das heißt in den gleichen Proteinkomplexen vorliegen, sollten in der Zelle auch kolokalisieren. In einem weiteren Schritt wurde daher die Lokalisation von Zinki und GRF1 in Neuronen von Gehirndünnschnitten verglichen. Zinki zeigt eine ausgeprägte somatodendritische Verteilung in Neuronen des Hippokampus und des entorhinalen Kortexes, die sich bis in die distalen Bereiche der Dendriten erstreckt. Allerdings ist Zinki nicht mit Synapsen oder der postsynaptischen Dichte assoziiert (s. Kap. 2.3.1 und 2.3.2). Zur weiteren Beurteilung und Analyse der Interaktion ist es also wichtig zu erfahren, ob GRF1 ein ähnliches Verteilungsmuster hat oder ob sich die Kolokalisation der beiden Proteine nur auf bestimmte Bereiche der Zelle beschränkt und damit die Interaktion auch nur in bestimmten Regionen eine spezifische Funktion ausübt.

2.5.6.1 Expressionsmuster von GRF1 im Gehirn von Mäusen

Abbildung 2.18 zeigt DAB-Färbungen mit GRF1-spezifischen Antikörpern beziehungsweise Zinki-spezifischem Antiserum an Gehirndünnschnitten un behandelter Mäuse. Die Verteilung von GRF1 ist wie die von Zinki somatodendritisch, wobei die GRF1-Immunoreaktivität wie auch die von Zinki in den Dendriten des Hippokampus bis in die distalen Bereiche verfolgt werden kann. In den Zellkernen der Neuronen kann dagegen keine Färbung detektiert werden. Die Übersicht über den Hippokampus zeigt, dass GRF1, vergleichbar mit Zinki, dabei sowohl in der CA1- und der CA3-Region als auch im *Gyrus dentatus* exprimiert wird (Abb. 2.18 a und b). Diverse Vergrößerungen verdeutlichen die überlappende dendritische Lokalisation von Zinki und GRF1 in den entsprechenden Bereichen (Abb. 2.18 c-k), und zwar sowohl im *Stratum radiatum* der CA1-Region (Abb. 2.18 c und e) als auch in den proximalen und distalen Dendriten (*Stratum lucidum* bzw. *Stratum pyramidale*) der CA3-Region (Abb. 2.18 h

(C-terminale 24 AS von GRF1) aus EGFP-Zinki-transfizierten HEK293-Zellen. Zusätzlich aufgetragen sind das Lysat von EGFP-Zinki-transfizierten Zellen (*Lysat Zinki*) und das Lysat nicht-transfizierter Zellen (*Lysat Ø*). Lediglich im Eluat des GST-GRF-Pulldowns und im Lysat transfizierter Zellen ist EGFP-Zinki nachweisbar, jedoch nicht im Eluat des GST-GK-Pulldowns oder im Lysat untransfizierter Zellen. **(d)** Ko-Immunopräzipitation von GRF1 und Zinki mit Zinki-spezifischem Antiserum. Das Gehirnlisat einer un behandelten Maus wurde mit Zinki-spezifischem Antiserum (*αZinki*) beziehungsweise Serum nicht-immunisierter Kaninchen (*Ø*) inkubiert. Die Antikörper-Protein-Komplexe wurden anschließend mittels Protein-A-gekoppelter Sepharose präzipitiert. Dargestellt sind die Western-Blot-Analysen der Eluate dieser Präzipitationen mit dem Zinki-spezifischen Antiserum und GRF1-spezifischen Antikörpern. Sowohl Zinki als auch GRF1 werden mit dem Zinki-spezifischen Antiserum aus Gehirnlisat präzipitiert, jedoch nicht mit dem Serum nicht-immunisierter Kaninchen. Die mit Stern gekennzeichneten Banden unter (a), (b) und (d) repräsentieren das Protein GRF2 (s. Text). Die Molekulargewichte der Banden des Protein-Längenstandards (hier nicht zu sehen) sind in kDa angegeben.

und k) und im *Stratum moleculare* des *Gyrus dentatus* (Abb. 2.18 g und i). Dabei deutet sich auch eine Lokalisation beider Proteine in den basalen Dendriten des *Stratum oriens* der CA1-Region an (Abb. 2.18 d und f). In den Zellkernen kann dagegen in keinem der Bereiche eine Färbung detektiert werden. Auffällig ist, dass die Expression von GRF1 in der CA3-Region im Vergleich zu seiner Expression in den übrigen Bereichen des Hippokampus und im Vergleich zur Zinki-Expression etwas schwächer ist. Wie im Hippokampus ist auch die Verteilung der beiden Proteine im Kortex sehr ähnlich. Beispielfhaft ist hier die Färbung im entorhinalen Kortex dargestellt, wo Zinki und GRF1 in den Schichten II-VI exprimiert werden (Abb. 2.18 l und m). Vergrößerungen der Zellschichten des entorhinalen Kortexes zeigen, dass die GRF1-spezifischen Antikörper und das Zinki-spezifische Antiserum sowohl die proximalen als auch die distalen Dendriten der Pyramidenzellen anfärben (Abb. 2.18 n und o). Abbildungen 2.18 p und q zeigen die Verteilung des GRF1- und des Zinki-Proteins in der Amygdala. Hier wird Zinki etwas schwächer als GRF1 exprimiert. Diese immunohistochemische Analyse von Gehirnschnitten verdeutlicht, dass Zinki und GRF1 im Mausgehirn in den gleichen Zellen und mit sehr ähnlicher subzellulärer Verteilung exprimiert werden. Die räumliche Nähe von Zinki und GRF1 *in vivo* im Gehirn der Maus bestärkt eine physiologische Bedeutung der gezeigten Interaktion der beiden Proteine. Die GRF1-Expression und -Verteilung ist wie die von Zinki konstitutiv hoch. Die etwas niedrigere Signalstärke für GRF1 vor allem in den distalen Dendriten des Hippokampus und des entorhinalen Kortexes ist eventuell auf eine generell schwächere Färbung zurückzuführen und nicht durch eine vergleichsweise niedrigere Expression von GRF1 in diesen Bereichen bedingt. Darüber hinaus zeigten GRF1-spezifische immunohistochemische Färbungen und *in situ* Hybridisierungen auf Gehirnschnitten kainatbehandelter Mäuse keine Veränderung seiner Expression nach generalisierter neuronaler Aktivität (siehe hierzu Kap. 2.5.7.2, Abb. 2.22 a). Diese Beobachtung stimmt mit den Resultaten der Untersuchungen zur Zinki-Expression überein, denn auch immunohistochemische Färbungen und Western-Blot-Analysen mit Zinki-spezifischem Antiserum zeigten keine detektierbaren Veränderungen nach Kainatinduktion (siehe hierzu Kap. 2.4.1 und 2.4.3, Abb. 2.9 u. 2.11).

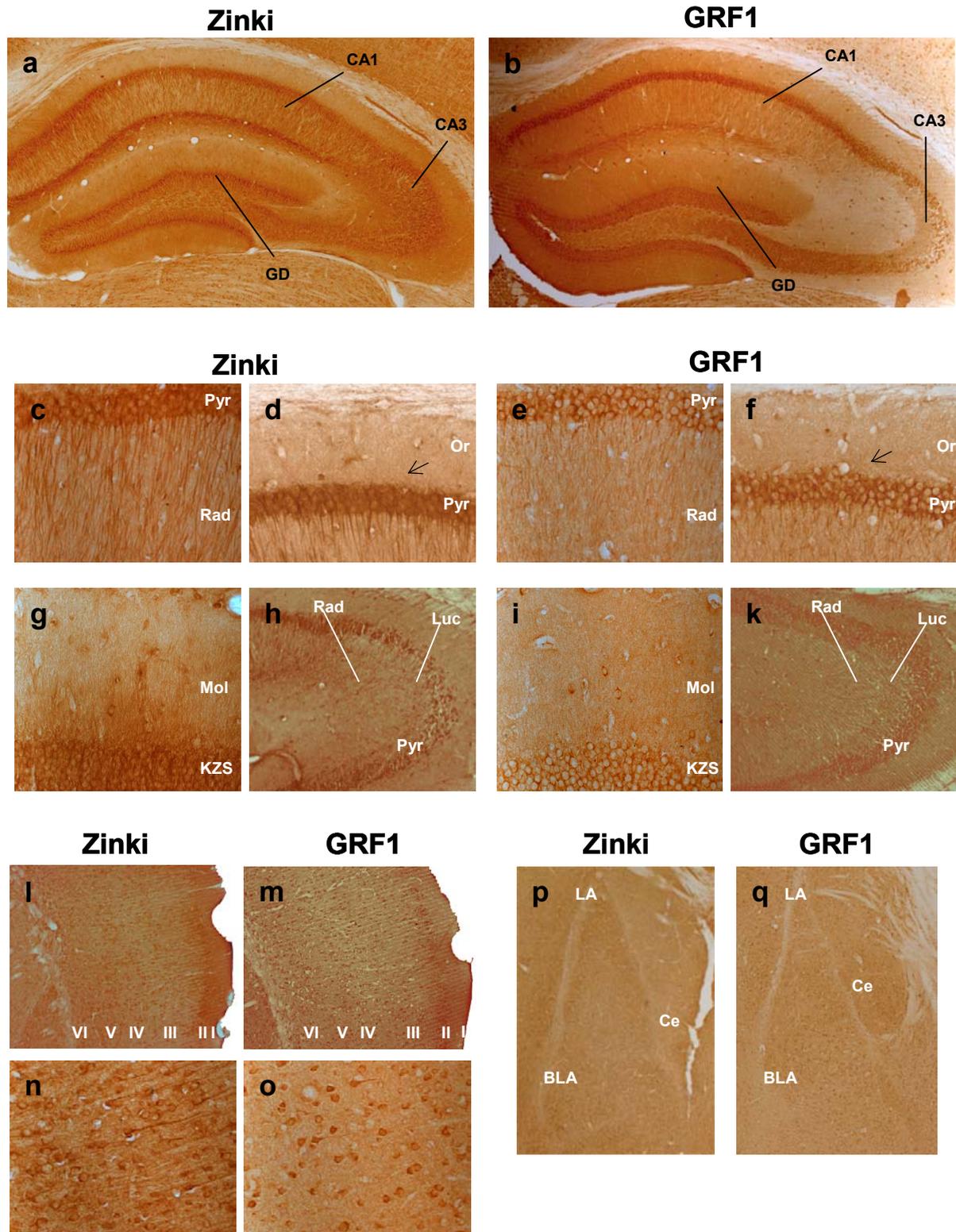


Abb. 2.18: Vergleich der Proteinverteilung von Zink und GRF1 im Mausgehirn

Die Abbildung zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen von immunohistochemischen Färbungen an Gehirndünnschnitten einer unbehandelten Maus. Die Abbildungen (a), (c), (d), (g), (h), (l), (n) und (p) zeigen Färbungen mit einem Zink-spezifischen Antiserum (*Zink*) und die Abbildungen (b), (e), (f), (i), (k), (m), (o) und (q) mit GRF1-spezifischen Antikörpern (*GRF1*). (a, b) Übersicht über den Hippokampus. (c, e) Pyramidalschicht mit apikalen Dendriten (*Stratum radiatum*) der CA1-Region.

→

2.5.6.2 Assoziation von GRF1 mit der PSD

Zinki ist ein dendritisch lokalisiertes Protein, das sowohl in den *Spines*, als auch im Schaft von Dendriten lokalisiert ist. Elektronenmikroskopische Analysen und biochemische Untersuchungen lassen allerdings darauf schließen, dass Zinki nicht spezifisch mit Synapsen oder der postsynaptischen Dichte assoziiert ist (siehe hierzu Kap. 2.3.2, Abb. 2.7). In lichtmikroskopischen Aufnahmen immunohistochemischer Färbungen sind die subzellulären Verteilungen von GRF1 und Zinki sehr ähnlich (Abb. 2.18). Um zu analysieren, ob auch die Verteilung innerhalb der Dendriten gleich ist, wurde die Assoziation von GRF1 mit der postsynaptischen Dichte untersucht. Dazu wurden die Fraktionen einer biochemischen Aufreinigung der postsynaptischen Dichte mit SDS-PAGE aufgetrennt und der Western Blot anschließend mit GRF1-spezifischen Antikörpern detektiert (Aufreinigung durchgeführt von Dr. Niels Plath, vgl. Kap. 2.3.2, Abb. 2.7). GRF1 ist in allen Aufreinigungsfractionen detektierbar, das heißt also dem Lysat, den Synaptosomen, den *synaptic junctions* und der PSD (Abb. 2.19). Es assoziiert demnach im Gegensatz zu Zinki mit den synaptischen Membranen, insbesondere der postsynaptischen Dichte. Allerdings sind die GRF1-spezifischen Banden in den Fraktionen der Synaptosomen, der *synaptic junctions* und der postsynaptischen Dichte deutlich schwächer als im Lysat. Das weist auf eine geringere Konzentration des GRF1-Proteins in den Membranfraktionen im Vergleich zum Lysat hin. GRF1 scheint also nicht an der post- oder präsynaptischen Membran angereichert zu sein, so wie zum Beispiel PSD95 oder Synaptophysin (vgl. Abb. 2.7). Tatsächlich spricht die relative Verteilung von GRF1 in den Aufreinigungsfractionen dafür, dass das Protein nur zu einem kleinen Teil mit synaptischen Membranen assoziiert ist, der überwiegende Teil befindet sich dagegen im Zytosol der Dendriten. Dort überlappt die subzelluläre Verteilung von GRF1 mit der von Zinki, das ausschließlich zytosolisch lokalisiert ist und sich nicht an den Membranen der Synapsen nachweisen lässt (s. hierzu Kap. 2.3.2, Abb. 2.7). Diese Analysen legen die Schlussfolgerung nahe, dass die Proteininteraktion zwischen Zinki und GRF1 im Zytosol der Zelle stattfindet. Die Tatsache, dass abgesehen von der gezeigten Kollokalisierung in

(d, f) Pyramidalschicht mit basalen Dendriten (*Stratum oriens*) der CA1-Region. Beide Proteine können schwach in den basalen Dendriten nachgewiesen werden (s. Pfeile). (g, i) *Gyrus dentatus*, (h, k) CA3-Region, (l, m) entorhinaler Kortex mit den Schichten I-VI, (n, o) Vergrößerungen von (l) und (m). (p, q) Amygdala. Die Abbildungen zeigen, dass Zinki und GRF1 in den gleichen Bereichen des Gehirns mit vergleichbarer somatodendritischer Lokalisierung exprimiert werden. (CA1), *Cornu ammonis* Region 1; (CA3), *Cornu ammonis* Region 3; (GD), *Gyrus dentatus*; (Pyr), Pyramidalzellschicht; (Rad), *Stratum radiatum*; (Or), *Stratum oriens*; (Mol), *Stratum moleculare*; (KZS), Körnerzellschicht; (Luc), *Stratum lucidum*; (LA), Laterale Amygdala; (BLA), Basolaterale Amygdala; (Ce), Zentrale Amygdala; (I-VI), Zellschichten des Kortexes.

immunohistochemisch gefärbten Gehirnen (vgl. Abb. 2.18) die subzelluläre Verteilung von GRF1 und Zinki auch in biochemischen Fraktionierungen stark überlappt, ist ein weiteres Indiz für die Interaktion der beiden Proteine *in vivo*.

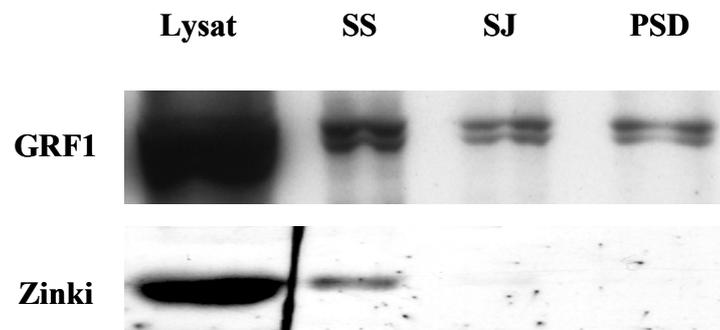


Abb. 2.19: Lokalisation von GRF1 und Zinki in der postsynaptischen Dichte

Dargestellt sind die Western-Blot-Analysen der PSD-Aufreinigungsfractionen mit GRF1-spezifischen Antikörpern bzw. mit Zinki-spezifischem Antiserum. GRF1 ist in allen Stufen der Aufreinigung einschließlich der PSD-Fraktion detektierbar, während Zinki im Lysat und den Synaptosomen nachweisbar ist. (*SS*), Synaptosomen; (*SJ*), *synaptic junctions*; (*PSD*), postsynaptische Dichte (vgl. Abb. 2.7).

2.5.7 Analyse der Zinki- und Arg3.1-Expression in GRF1-Knockout-Mäusen

GRF1 wurde als neuronenspezifischer GDP/GTP-Austauschfaktor von Ras identifiziert (Martegani et al., 1992; Ferrari et al., 1994; Zippel, et al., 1997). Seine enzymatische Funktion als Ras-spezifischer GEF kann durch verschiedene Signale aktiviert werden, wie zum Beispiel durch Kalzium (Farnsworth et al., 1995) oder über heterotrimere G-Proteine (Shou et al., 1995; Mattingly und Macara, 1996). Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass GRF1 an die NR2B-Untereinheit des NMDA-Rezeptors bindet und dass diese Bindung essentiell für die NMDA-Rezeptor-vermittelte Aktivierung des ERK-Signaltransduktionsweges ist (Krapivinsky et al., 2003). Der NMDA-Rezeptor ist ein Koinzidenzdetektor prä- und postsynaptischer Aktivität, wie sie von Hebb für die lang andauernde Verstärkung der synaptischen Übertragung zweier Nervenzellen postuliert wurde (Harris et al., 1984; Malenka und Nicoll, 1993; vgl. Kap. 1.3). Auch die ERK-abhängige Signaltransduktion spielt eine Schlüsselrolle bei der Ausbildung lang anhaltender synaptischer Plastizität wie LTP sowie Lernen und Gedächtnisbildung (Impey et al., 1999; Adams und Sweatt, 2002). GRF1 könnte

also als Bindeglied zwischen NMDA-Rezeptor und ERK-Signalweg ein wichtiger Faktor für die Regulation dieser Prozesse sein. Riccardo Brambilla und Kollegen haben eine Maus generiert, in der das Gen für GRF1 teilweise deletiert und damit die Expression von GRF1 vollständig aufgehoben ist (Brambilla et al., 1997). Die GRF1-*Knockout*-Mäuse zeigen signifikante Defizite in der Konsolidierung amygdalaabhängiger Lernaufgaben, wie der Furchtkonditionierung. In Korrelation dazu ist in diesen Mäusen auch die Ausbildung von LTP in Bereichen der Amygdala beeinträchtigt (Brambilla et al., 1997; Tonini et al., 2001). Dagegen sind sowohl die LTP in der CA1-Region als auch hippocampusabhängiges Lernen bei den GRF1-*Knockout*-Mäusen nicht verändert. Um die funktionelle Bedeutung der Proteininteraktion zwischen GRF1 und Zinki weitergehend zu analysieren, wurden sowohl die Proteinexpression von Zinki und Arg3.1 als auch die mRNA-Expression von Arg3.1 in GRF1-*Knockout*-Mäusen untersucht. Die GRF1-*Knockout*-Mäuse samt Wildtypgeschwistern wurden freundlicherweise von Riccardo Brambilla zu Verfügung gestellt.

2.5.7.1 Zinki- und Arg3.1-Proteinexpression in GRF1-*Knockout*-Mäusen

Gehirndünnschnitte von einem unbehandelten und einem kainatinduzierten GRF1 *Knockout*/Wildtyp-Geschwisterpaar wurden immunohistochemisch mit Zinki-beziehungsweise Arg3.1-spezifischen Antiseren gefärbt und lichtmikroskopisch analysiert. In Abbildung 2.20 sind die Ergebnisse der Färbungen mit Zinki-spezifischem Antiserum dargestellt. Die Übersicht über das gesamte Gehirn (Abb. 2.20 a) zeigt keine deutlichen Unterschiede bei Lokalisation oder Stärke der Zinki-Proteinexpression in GRF1-*Knockout*-Mäusen verglichen zum Wildtyp. Dies trifft sowohl auf die Expression unter Kontrollbedingungen als auch auf die Expression nach kainatinduziertem Krampfanfall zu. Die Zinki-Expression ist in den GRF1-*Knockout*-Mäusen ebenfalls konstitutiv und verändert sich vier Stunden nach generalisierter neuronaler Aktivität nicht. Eine vergrößerte Darstellung des Hippokampus zeigt die unveränderte somatodendritische Lokalisation von Zinki in GRF1-*Knockout*-Mäusen (Abb. 2.20 b). Weitere Vergrößerungen der CA1- und der CA3-Region, beziehungsweise des *Gyrus dentatus* machen deutlich, dass Zinki in den GRF1-*Knockout*-Mäusen und im Wildtyp bis in die distalen Bereiche der Dendriten lokalisiert ist (Abb. 2.20 c-e). Auch die Verteilung von Zinki in den Schichten I-VI des entorhinalen Kortexes (Abb. 2.20 f) und in der lateralen, basolateralen und zentralen Amygdala (Abb. 2.20 g) ist in Wildtyp- und GRF1-*Knockout*-Mäusen gleich.

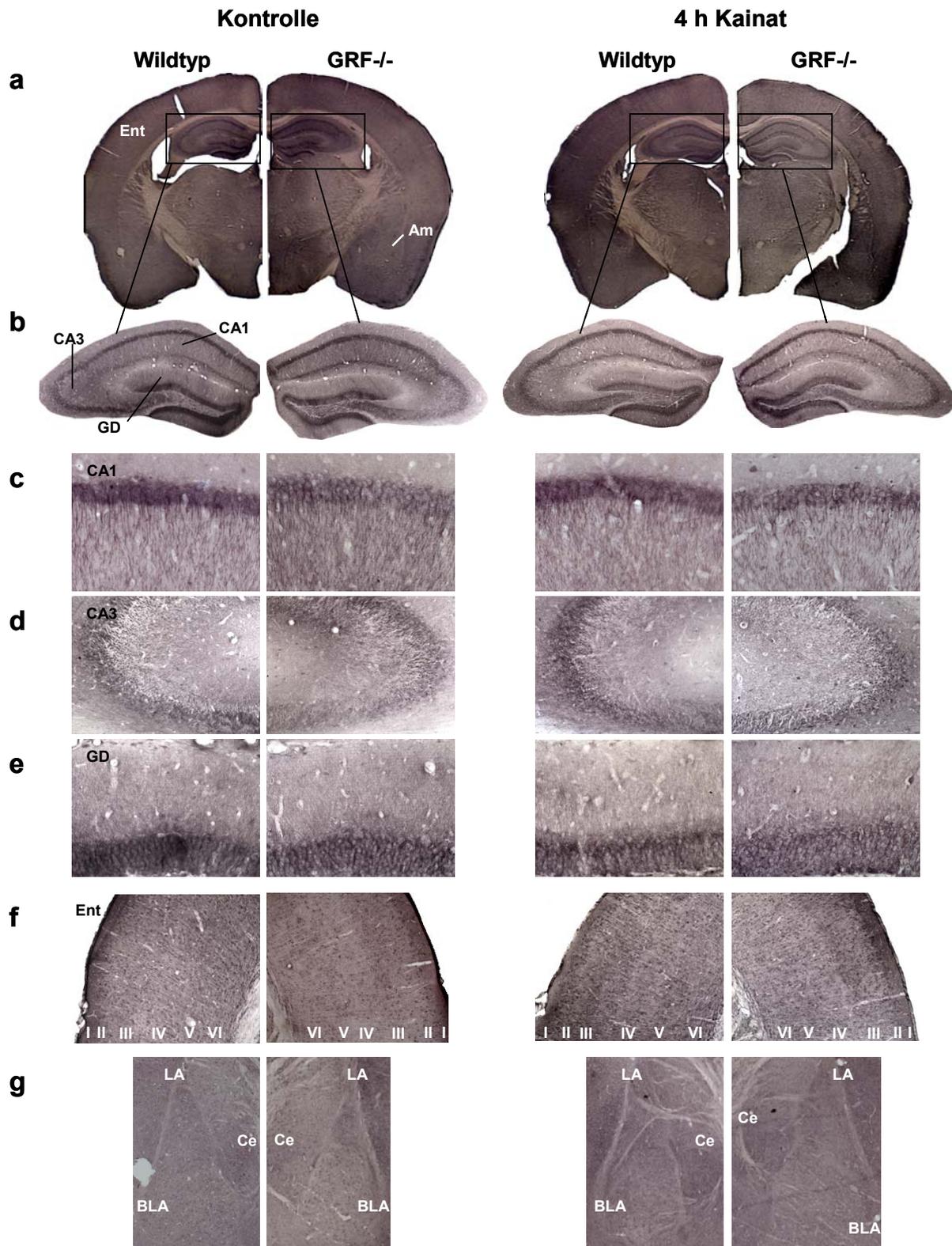


Abb. 2.20: Expression des Zink-Proteins in Gehirnen von Wildtyp- und GRF1-Knockout-Mäusen

Die Abbildung zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen immunohistochemischer Färbungen mit einem Zink-spezifischen Antiserum auf Gehirndünnschnitten von GRF1-Knockout- und Wildtypmäusen. Jeweils nebeneinander sind Färbungen an einer Wildtypmaus (*Wildtyp*) und an einer GRF1-Knockout-Maus (*GRF^{-/-}*) unter Kontrollbedingungen (*Kontrolle*, links) und 4 h nach kainatinduziertem

→

Abbildung 21 zeigt die Arg3.1-spezifische immunohistochemische Färbung an Gehirnen der GRF1-*Knockout*-Mäuse. Das Arg3.1-Protein wird in den GRF1-*Knockout*-Mäusen wie im Wildtyp unter Kontrollbedingungen nur sehr schwach exprimiert (Abb. 2.21 a) und erst nach kainatinduziertem Krampfanfall stark hochreguliert (Abb. 2.21 b). Vergrößerungen der CA1- und CA3-Region sowie des *Gyrus dentatus* zeigen, dass das Arg3.1 Protein unabhängig von der Expression von GRF1 somatodendritisch lokalisiert ist (Abb. 2.21 c). Allerdings scheint es im GRF1-*Knockout* zu einer leichten Veränderung des Expressionsmusters von Arg3.1 zu kommen, wie man anhand der vergrößerten Abbildung des Hippokampus der beiden Genotypen nach synaptischer Aktivität erkennen kann (Abb. 2.21 b). Diese Abbildung deutet daraufhin, dass die Expression von Arg3.1 in der CA1- und der CA3-Region im GRF1-*Knockout* stärker als im Wildtyp, im *Gyrus dentatus* dagegen schwächer ist. Die Tendenz zeigt sich auch in weiteren Vergrößerungen dieser Bereiche (Abb. 2.21 c). Auffällig ist ebenfalls der Anstieg der Expression in den Schichten II, III, IV und VI des entorhinalen Kortexes des *Knockouts* im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 2.21 d). Zusammenfassend kann man sagen, dass die somatodendritische Lokalisierung von Zink- und Arg3.1-Protein in GRF1-*Knockout*-Mäusen auf lichtmikroskopischer Ebene unverändert ist. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass sowohl die Verteilung von Arg3.1 im Hippokampus als auch die Stärke seiner Expression im entorhinalen Kortex nach kainatinduziertem Krampfanfall vom Wildtyp abweichen.

Krampfanfall (4 h Kainat, rechts) dargestellt. **(a)** Gesamtübersicht über koronale Gehirndünnschnitte, **(b)** Vergrößerung des Hippokampus, **(c)** weitere Vergrößerungen der CA1-Region, **(d)** der CA3-Region und **(e)** des *Gyrus dentatus*. **(f)** Vergrößerung eines Bereiches des entorhinalen Kortexes. **(g)** Übersicht über die Amygdala. In keiner der analysierten Gehirnregionen ist eine genotyp- bzw. aktivitätsabhängige Veränderung der Expression detektierbar. (*Am*), Amygdala; (*Ent*), entorhinaler Kortex; (*CA1*), *Cornu ammonis* Region 1; (*CA3*), *Cornu ammonis* Region 3; (*GD*), *Gyrus dentatus*; (*LA*), Laterale Amygdala; (*BLA*), Basolaterale Amygdala; (*Ce*), Zentrale Amygdala; (*I-VI*), Zellschichten des Kortexes.

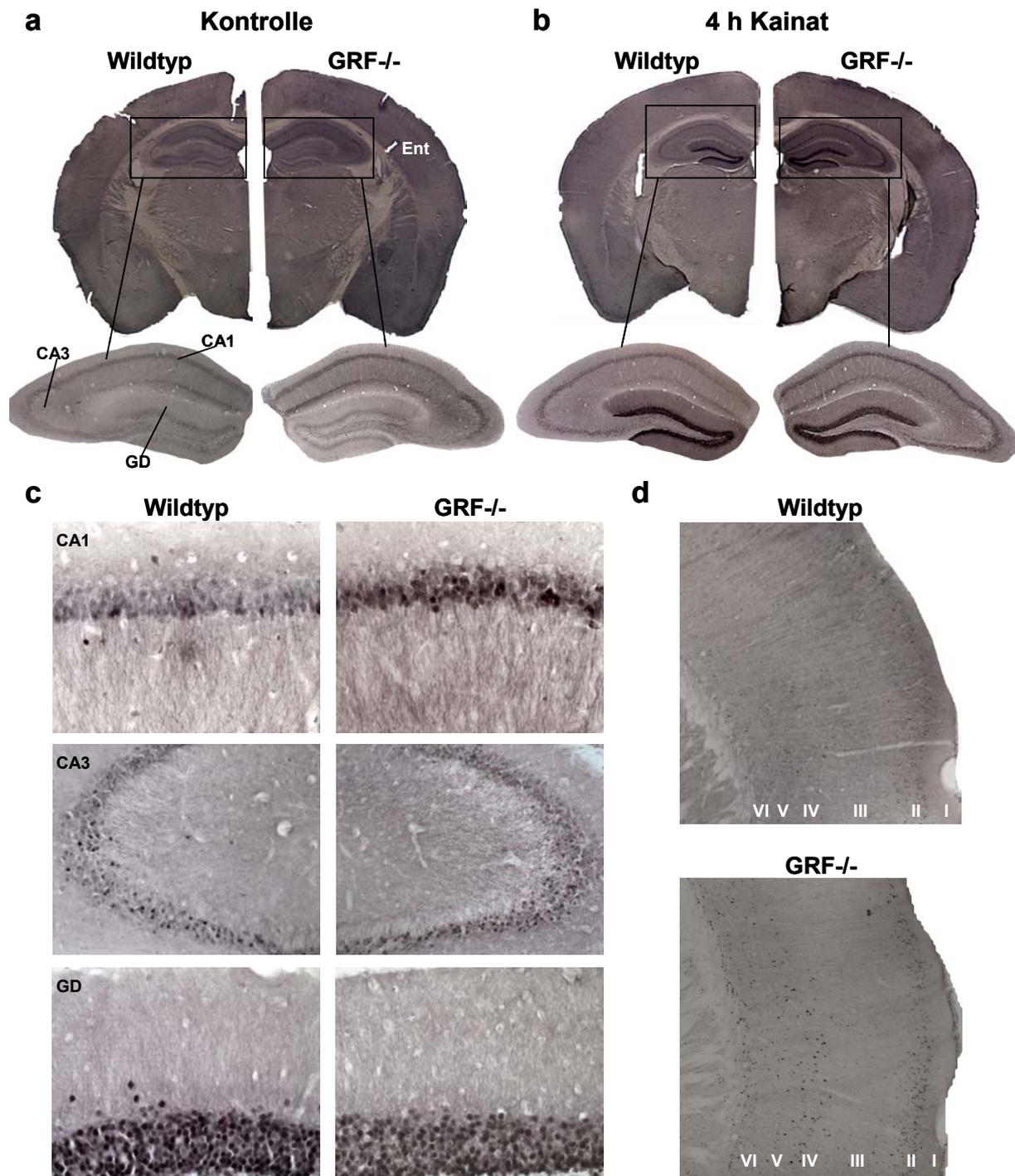


Abb. 2.21: Expression des Arg3.1-Proteins in Gehirnen von Wildtyp- und GRF1-Knockout-Mäusen

Die Abbildung zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen immunohistochemischer Färbungen mit einem Arg3.1-spezifischen Antiserum an Gehirndünnschnitten von Wildtyp- (*Wildtyp*) und GRF1-Knockout-Mäusen (*GRF-/-*). **(a)** Übersicht über das Gehirn und den Hippokampus unter Kontrollbedingungen, bzw. **(b)** 4 h nach einem kainatinduziertem Krampfanfall. **(c)** Vergrößerungen der CA1- und CA3-Region sowie des *Gyrus dentatus*, bzw. **(d)** des entorhinalen Kortexes 4 h nach einem kainatinduzierten Krampfanfall. Die Arg3.1-spezifische Färbung weist in der GRF1-Knockout-Maus nach kainatinduziertem Krampfanfall ein leicht verändertes Muster auf. Die CA1- und CA3-Region sowie der entorhinale Kortex zeigen eine stärkere Färbung, während diese im *Gyrus dentatus*

→

2.5.7.2 Arg3.1-mRNA-Verteilung in GRF1-Knockout-Mäusen

Zinki wurde als Bindungsprotein der Arg3.1-mRNA identifiziert. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass Zinki an der Regulation der Arg3.1-mRNA beteiligt sein könnte, da es in einem *in vitro* Assay seine Translation inhibiert (s. Kap. 2.2). Diese Funktion Zinkis bei der Translation könnte durch seine Proteininteraktionspartner, wie zum Beispiel GRF1, modifiziert werden. Untersuchungen zur Arg3.1-Proteinexpression in den GRF1-Knockout-Mäusen geben Hinweise auf eine leichte Veränderung des Expressionsmusters von Arg3.1-Protein in Abwesenheit von GRF1. Um der Frage nachzugehen, ob dieser Effekt eine veränderte Expression der Arg3.1-mRNA widerspiegelt oder ob es sich um eine Störung der Translationsregulation handelt, wurde die mRNA-Expression von Arg3.1 im GRF1-Knockout näher untersucht. Dazu wurden auf Gefrierdünnschnitten von kainatinduzierten beziehungsweise unbehandelten GRF1-Knockout-Mäusen und deren Wildtypgeschwistern *in situ* Hybridisierungen mit Arg3.1-spezifischen radioaktiven Sonden durchgeführt. Als zusätzliche Kontrolle der Genotypen der Mäuse wurde die mRNA-Expression von GRF1 ebenfalls mit spezifischen radioaktiven Sonden überprüft. Abbildung 2.22 zeigt eine Übersicht über die Ergebnisse der *in situ* Hybridisierungen. Mit der GRF1-spezifischen Sonde ließ sich nur in Wildtypgehirnen ein Signal detektieren, nicht aber in den GRF1-Knockout-Mäusen (Abb. 2.22 a). Außerdem zeigen die GRF1-spezifischen *in situ* Hybridisierungen, dass sich die GRF1-Expression in den Wildtypen nach kainatinduziertem Krampfanfall lichtmikroskopisch nicht erkennbar ändert. Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass GRF1 kein durch synaptische Aktivität induzierbares Gen ist. Die Arg3.1-mRNA-Expression unter Kontrollbedingungen ist bei beiden Genotypen sehr schwach. Vier Stunden nach kainatinduziertem Krampfanfall ist die Arg3.1-mRNA dagegen sowohl im Wildtyp wie auch im GRF1-Knockout stark hochreguliert und wird bis in die distalen Bereiche der Dendriten der Körnerzellen des *Gyrus dentatus* und der Pyramidenzellen der CA1-Region transportiert (Abb. 2.22 b und c).

schwächer ist. Diese Effekte wurden nicht quantifiziert, da es sich um die vorläufigen Resultate der Analyse jeweils nur eines Tieres handelt. (*Ent*), entorhinaler Kortex; (*CA1*), *Cornu ammonis* Region 1; (*CA3*), *Cornu ammonis* Region 3; (*GD*), *Gyrus dentatus*; (*I-VI*), Zellschichten des Kortexes.

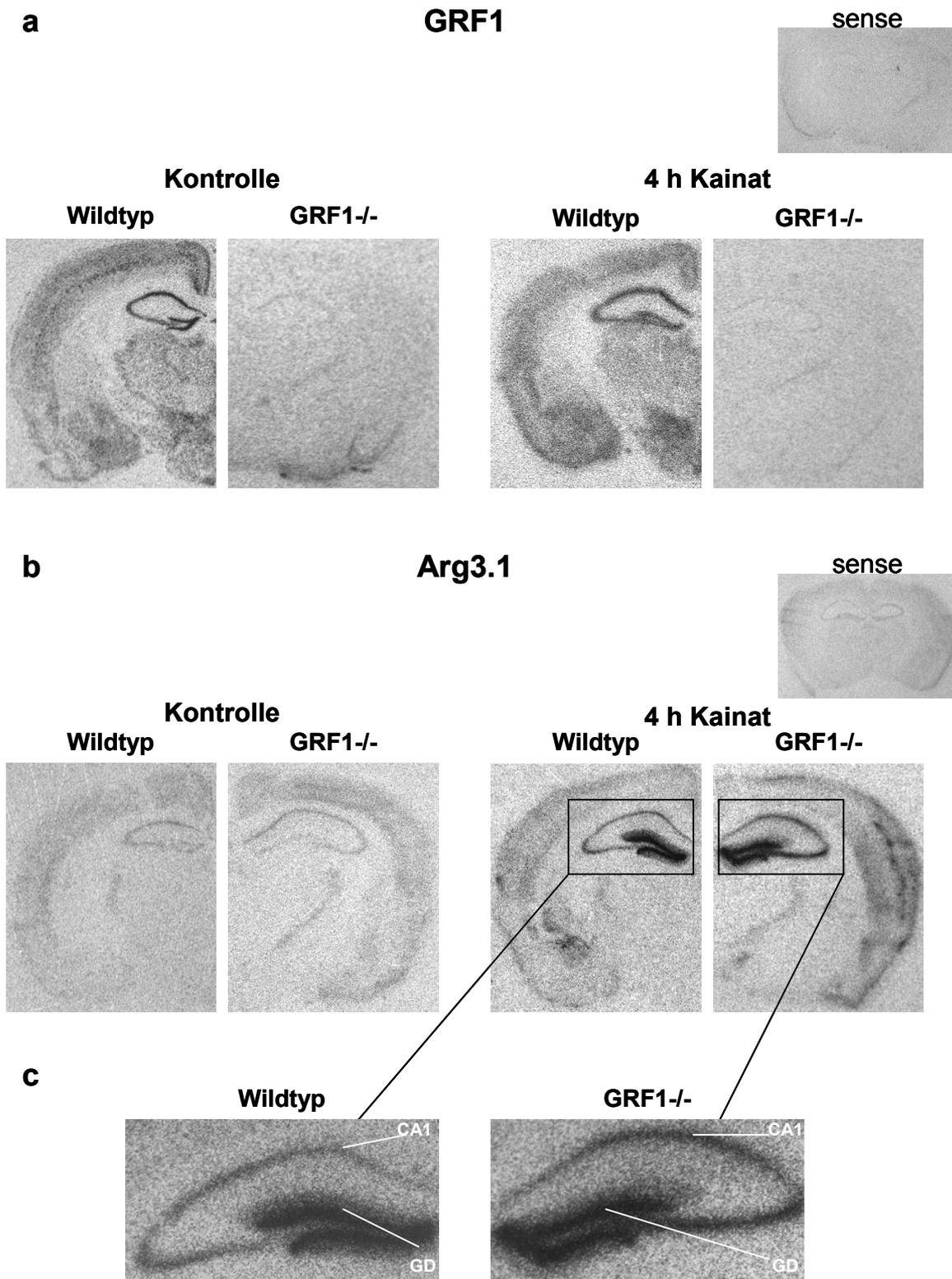


Abb. 2.22: GRF1- und Arg3.1-mRNA-Expression in Wildtyp- und GRF1-Knockout-Mäusen

Die Abbildung zeigt Autoradiographien radioaktiver *in situ* Hybridisierungen auf Gefrierdünnschnitten von Gehirnen der GRF1-Knockout-Mäuse (GRF^{-/-}) und deren Wildtypgeschwistern (Wildtyp), jeweils 4 h nach kainatinduziertem Krampfanfall (4 h Kainat) beziehungsweise unter Kontrollbedingungen (Kontrolle). (a) *In situ* Hybridisierung mit einer GRF1-

→

Die Arg3.1-mRNA-Expression im GRF1-*Knockout* nach Kainatinduktion unterscheidet sich in zwei Punkten deutlich von der im Wildtyp. Erstens zeigt die Zellschicht III in definierten Bereichen des entorhinalen Kortexes und des somatosensorischen Kortexes 2 ein sehr starkes Arg3.1-mRNA-spezifisches Signal, das im Wildtyp nicht vorhanden ist (Abb. 2.23 a und b). Zweitens ist die Arg3.1-mRNA-Expression im Hippokampus verändert (Abb. 2.24). Zur besseren räumlichen Auflösung der Signale wurden die hybridisierten Schnitte mit einer Photo-Emulsion behandelt. Bei diesem Verfahren („*dipping*“) findet die Photoreaktion mit der radioaktiv markierten Sonde direkt im Gewebe statt. Zusätzlich wurde eine Färbung der Zellkörper mit Methylgrün durchgeführt, um einzelne Gehirnstrukturen besser sichtbar zu machen.

Abbildungen 2.23 c und d zeigen eine Vergrößerung der *gedippten* Gehirnschnitte im Bereich des entorhinalen und Teilen des somatosensorischen Kortexes. Im GRF1-*Knockout* erkennt man eine deutliche Hochregulation der Arg3.1-mRNA-Expression in der Zellschicht III des entorhinalen und Teilen des somatosensorischen Kortexes (Zuordnung nach van Groen, 2001). Wie schon aus den Autoradiographien ersichtlich, ist die Arg3.1-mRNA in Schicht III nicht über den gesamten entorhinalen und somatosensorischen Kortex hochreguliert, sondern geht beim Übergang vom somatosensorischen Kortex 2 in das *Barrel*-Feld des somatosensorischen Kortexes 1 (S1BF) deutlich zurück (Abb. 2.23 b). Auch in den Zellschichten II, IV und VI ist das Signal der Arg3.1-mRNA im GRF1-*Knockout* detektierbar, jedoch deutlich schwächer als in Zellschicht III. Die verstärkte Expression der Arg3.1-mRNA in GRF1-*Knockout*-Mäusen beschränkt sich also hauptsächlich auf die Schicht III des entorhinalen Kortexes. In den anderen Bereichen des Kortexes ist die Arg3.1-mRNA-Expression vergleichbar mit der des Wildtyps und entspricht den Resultaten früherer Studien (Link et al., 1995). Zum Nachweis des Arg3.1-Proteins sind immunohistochemische DAB-Färbungen der gleichen Areale mit einem Arg3.1-spezifischen Antiserum durchgeführt worden (Abb. 2.23 e und f). Bemerkenswerterweise ist auf Proteinebene keine GRF1-*Knockout*-spezifische Erhöhung der Arg3.1-Expression in Schicht III des entorhinalen

spezifischen *Antisense*-Sonde. Hybridisierungen mit einer *Sense*-Sonde zeigen kein spezifisches Signal (kleines Bild). Lediglich im Wildtyp ist ein GRF1-spezifisches Signal detektierbar. **(b)** *In situ* Hybridisierung mit einer Arg3.1-spezifischen *Antisense*-Sonde. Hybridisierungen mit einer *Sense*-Sonde zeigen kein spezifisches Signal (kleines Bild). Sowohl im Wildtyp als auch im GRF1-*Knockout* ist eine deutliche Hochregulation der Arg3.1-mRNA nach Kainatinduktion erkennbar. **(c)** Vergrößerung der Hippokampi von (b) nach kainatinduziertem Krampfanfall. In beiden Genotypen lässt sich die Arg3.1-mRNA sowohl im Zellkörper als auch in den Dendriten des *Gyrus dentatus* und der CA1 detektieren. (CA1), *Cornu ammonis* Region 1; (CA3), *Cornu ammonis* Region 3; (GD), *Gyrus dentatus*.

Kortexes zu erkennen. Stattdessen ist das Arg3.1-Protein im *GRF1-Knockout* in den Schichten II, III, IV und VI des entorhinalen Kortexes nach kainatinduziertem Krampf hochreguliert. In diesen Schichten findet man auch im Wildtyp spezifisch eine erhöhte Arg3.1-Expression nach Krampfanfall, die aber nicht so stark wie im *GRF1-Knockout* ausfällt. Diese Beobachtungen resultieren allerdings aus den Analysen nur eines Tieres und sind daher als vorläufig zu bewerten.

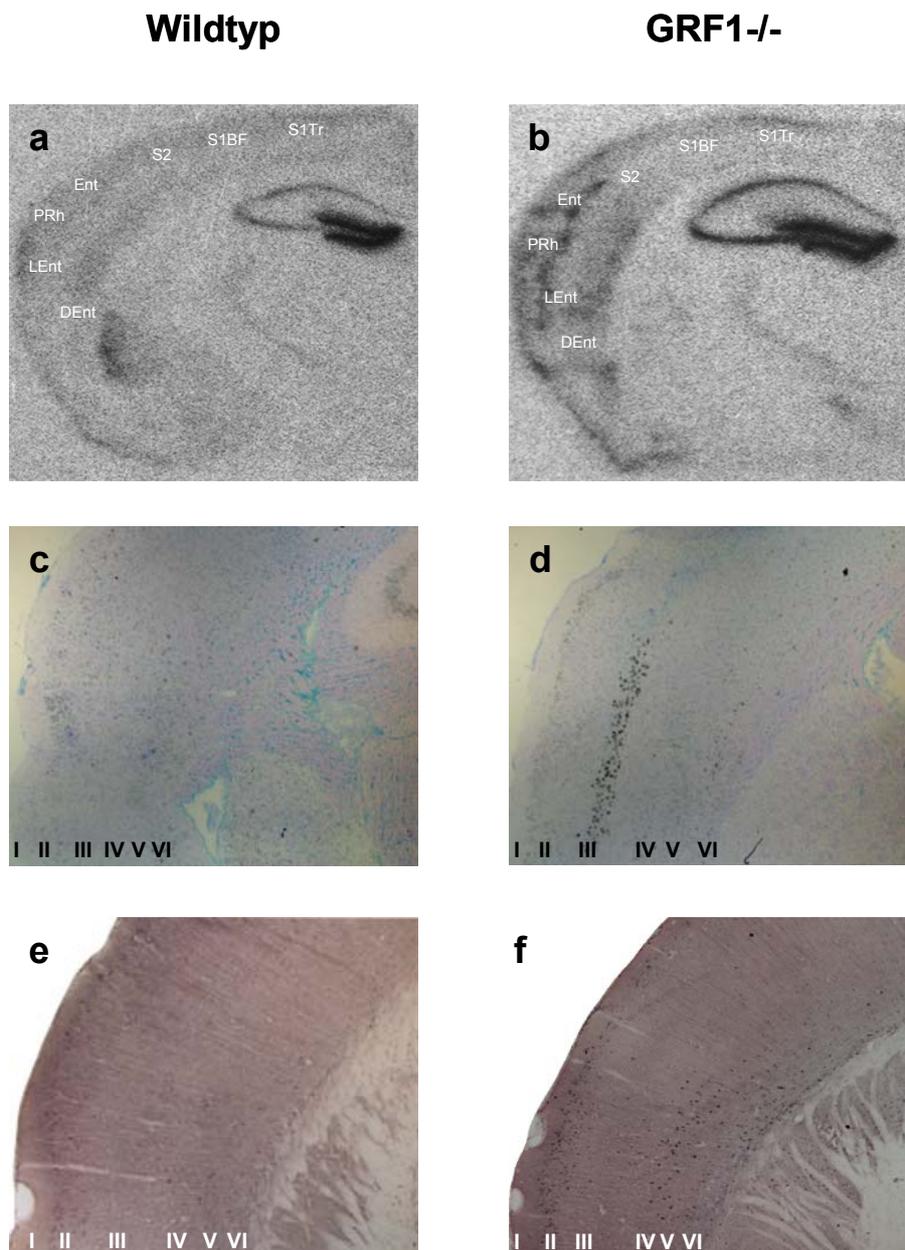


Abb. 2.23: Arg3.1-Expression im Kortex von Wildtyp- und *GRF1-Knockout*-Mäusen

Analyse der Arg3.1-mRNA- und Arg3.1-Protein-Expression im Kortex von Wildtyp- (*Wildtyp*) und *GRF1-Knockout*-Mäusen (*GRF1-/-*) 4 h nach kainatinduziertem Krampfanfall. (a, b) Autoradiographie

→

Abbildung 2.24 verdeutlicht die veränderte Expression der Arg3.1-mRNA im Hippokampus der GRF1-*Knockout*-Mäuse nach kainatinduziertem Krampfanfall. Die vergrößerten Abbildungen des Hippokampus der *gedipten* Gehirnschnitte zeigen, dass die Arg3.1-mRNA in der CA3-Region und im *Stratum radiatum* der CA1-Region der GRF1-*Knockout*-Mäuse stärker exprimiert wird als in den entsprechenden Regionen in Wildtypmäusen. Die Körnerzellschicht und die Molekularschicht des *Gyrus dentatus* dagegen zeigen ein geringeres Arg3.1-spezifisches Signal (Abb. 2.24). Es handelt sich daher nicht um eine generalisierte verstärkte Expression von Arg3.1-mRNA im Hippokampus der GRF1-*Knockout*-Mäuse, sondern um ein spezifisch verändertes Expressionsmuster. Im Gegensatz zu den Veränderungen im entorhinalen Kortex entsprechen diese Unterschiede in der mRNA-Verteilung im Hippokampus allerdings den Beobachtungen auf der Ebene der Proteinexpression. Auch das Arg3.1-Protein wird nach kainatinduziertem Krampfanfall in der CA1- und CA3-Region der GRF1-*Knockout*-Mäuse stärker exprimiert als im Wildtyp, während die Expression im *Gyrus dentatus* schwächer ist (s. Abb. 2.21).

der mit Arg3.1-spezifischer Sonde hybridisierten Gefrierdünnschnitte (a) einer kainatinduzierten Wildtypmaus und (b) einer kainatinduzierten GRF1-*Knockout*-Maus. Man erkennt ein starkes Signal in Schicht III des entorhinalen und somatosensorischen Kortexes der GRF1-*Knockout*-Maus. Die Kortextbereiche wurden mit Hilfe eines Gehirnatlasses zugeordnet (*mouse brain library*, <http://www.mbl.org/main.html>; Franklin und Paxinos, 1997). (c, d) Lichtmikroskopische Aufnahmen *gedipter* Arg3.1-spezifischer *in situ* Hybridisierungen auf Gehirnen (c) einer kainatinduzierten Wildtypmaus und (d) eines kainatinduzierten GRF1-*Knockouts*. Zu sehen sind Vergrößerungen eines Bereiches des entorhinalen Kortexes. Man erkennt deutlich die starke Arg3.1-mRNA-spezifische Färbung in den Zellen der kortikalen Schicht III des GRF1-*Knockouts*. (e, f) Immunohistochemische Färbungen eines Bereiches des entorhinalen Kortexes mit einem Arg3.1-spezifischen Antiserum von (e) einer kainatinduzierten Wildtypmaus und (f) einer kainatinduzierten GRF1-*Knockout*-Maus. Hier erkennt man eine Erhöhung der Arg3.1-Expression in den Schichten II, III, IV und VI im GRF1-*Knockout*. Da diese Abbildungen auf vorläufigen Ergebnissen nur eines Experimentes beruhen, wurden die Unterschiede der Arg3.1-mRNA- und Arg3.1-Proteinexpression im GRF1-*Knockout* nicht quantifiziert. (S1BF), somatosensorischer Kortex 1 *Barrel* Feld; (S2), somatosensorischer Kortex 2; (Ent), entorhinaler Kortex; (PRh), perirhinaler Kortex; (LEnt), lateraler entorhinaler Kortex; (DEnt), dorsaler entorhinaler Kortex; (I-VI), Zellschichten des Kortexes.

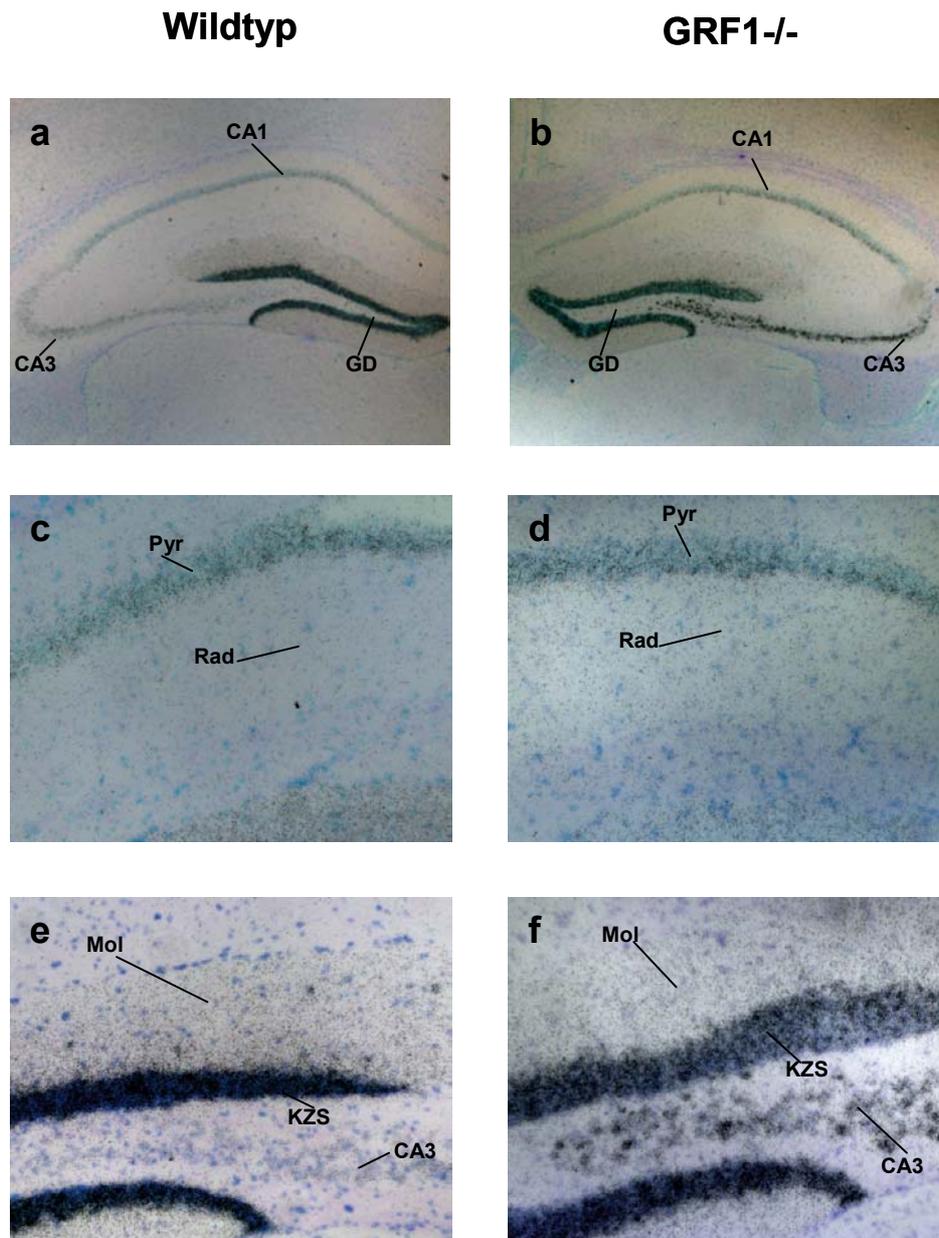


Abb. 2.24: Arg3.1-mRNA-Expression im Hippokampus von Wildtyp- und GRF1-Knockout-Mäusen

Analyse der Arg3.1-mRNA-Expression im Hippokampus von Wildtypmäusen (*Wildtyp*, (a), (c), (e)) und GRF1-Knockout-Mäusen (*GRF1*^{-/-}, (b), (d), (f)) 4 h nach kainatinduziertem Krampfanfall. Die mit Arg3.1-spezifischer Sonde hybridisierten Gefrierschnitte wurden in Photo-Emulsion *gedippt*, zwei Wochen exponiert, entwickelt, mit Methylgrün angefärbt und lichtmikroskopisch ausgewertet. (a, b) Abbildung des Hippokampus, (c, d) Vergrößerung der CA1-Region und (e, f) Vergrößerung des *Gyrus dentatus*. Die Arg3.1-mRNA scheint in den pyramidalen und radialen Schichten der CA1- und der pyramidalen Schicht der CA3-Region des Hippokampus von GRF1-Knockout-Mäusen stärker, in der Körnerzellschicht und der Molekularschicht des *Gyrus dentatus* dagegen schwächer exprimiert zu werden. Die Abbildungen spiegeln die Resultate nur eines Experimentes wider, das daher noch nicht quantifiziert und statistisch ausgewertet werden konnte. (CA1), *Cornu ammonis* Region 1; (CA3), *Cornu ammonis* Region 3; (GD), *Gyrus dentatus*; (Pyr), Pyramidalschicht der CA1-Region; (Rad), *Stratum radiatum* der CA1-Region; (Mol), Molekularschicht des *Gyrus dentatus*; (KZS), Körnerzellschicht des *Gyrus dentatus*.

Wie schon erwähnt, zeigen die GRF1-*Knockout*-Mäuse Defizite in der Ausbildung von LTP in der Amygdala sowie bei der Konsolidierung von amygdalaabhängigen Lernaufgaben (Brambilla et al., 1997). Auch Arg3.1-*Knockout*-Mäuse sind in der Bildung von amygdalaabhängigem Langzeitgedächtnis beeinträchtigt (Plath et al., 2003). Aus diesem Grund wurde die Expression der Arg3.1-mRNA und des Arg3.1-Proteins besonders in der Amygdala der GRF1-*Knockout*-Mäuse genauer untersucht. Abbildung 2.25 zeigt einen Überblick über die Arg3.1-Expression in der Amygdala von GRF1-*Knockout*-Mäusen und Wildtypmäusen vier Stunden nach einem kainatinduzierten Krampfanfall. Die Vergrößerung der Amygdala von *gedippten*, Arg3.1-spezifischen *in situ* Hybridisierungen zeigt eine starke Expression der Arg3.1-mRNA in diesem Bereich des Gehirns sowohl im Wildtyp als auch im GRF1-*Knockout* (Abb. 2.25 c und d). Auch auf Proteinebene ließ sich kein wesentlicher Unterschied der Arg3.1-Expression in den GRF1-defizienten Mäusen feststellen (Abb. 2.25 e und f). Die immunohistochemischen Färbungen mit einem Arg3.1-spezifischen Antiserum zeigen eine starke Expression des Arg3.1-Proteins besonders in den lateralen und zentralen Kernen der Amygdala, sowohl im Wildtyp als auch in der GRF1-*Knockout*-Maus. Bis auf wenige Neuronen am Übergang zwischen Striatum und Amygdala, die im *Knockout* eine stärkere Immunoreaktivität zeigten, war die Arg3.1-Expression in den beiden Genotypen vergleichbar. Die Deletion von GRF1 scheint also keine wesentlichen Auswirkungen auf die Verteilung der Arg3.1-mRNA und des Arg3.1-Proteins in der Amygdala zu haben.

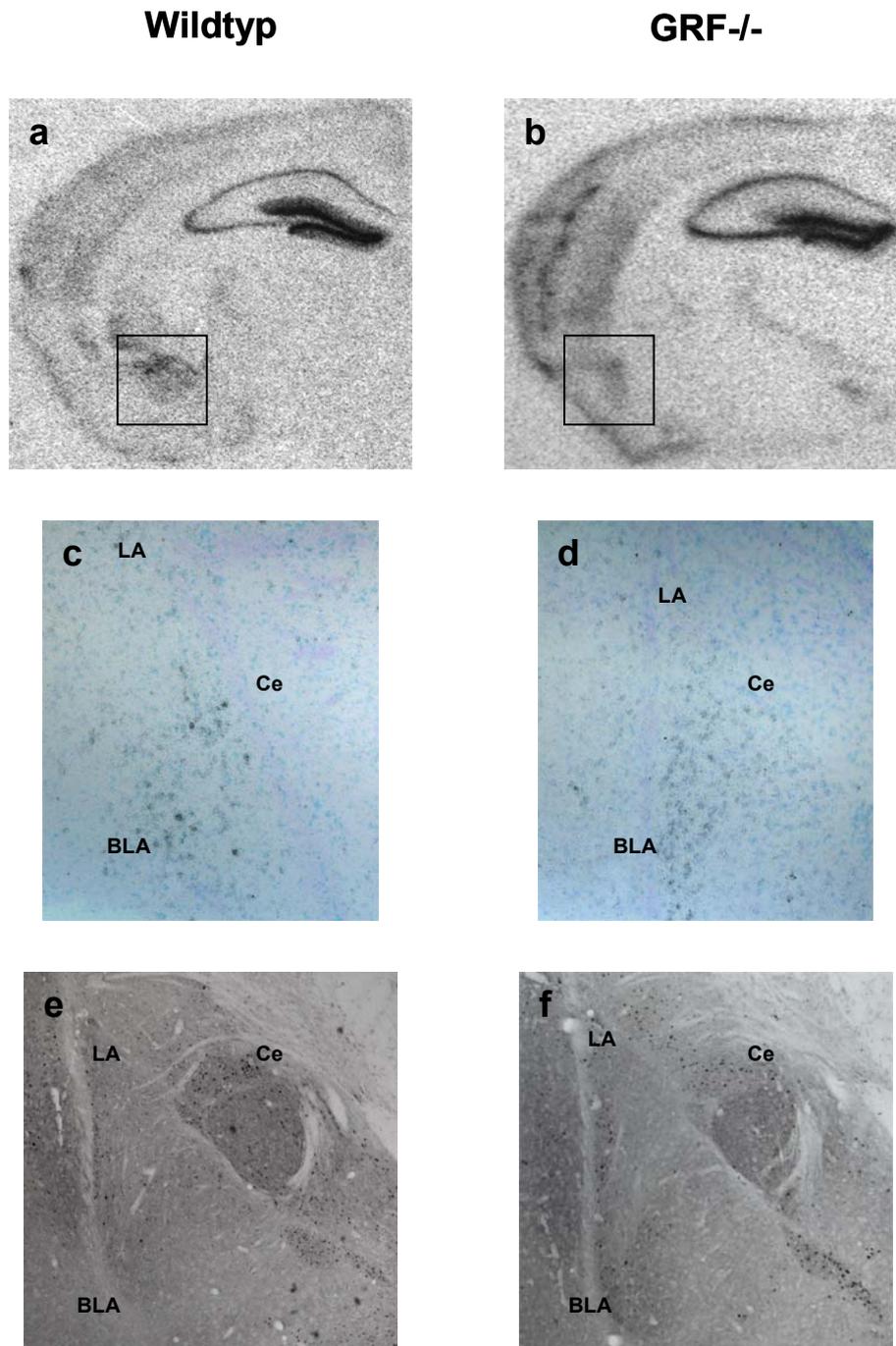


Abb. 2.25: Arg3.1- Expression in der Amygdala von Wildtyp- und GRF1-Knockout-Mäusen

Analyse der Arg3.1-mRNA- und Arg3.1-Protein-Expression in der Amygdala von Wildtypmäusen (*Wildtyp*, (a), (c), (e)) und GRF1-Knockout-Mäusen (*GRF1*^{-/-}, (b), (d), (f)) 4 h nach kainatinduziertem Krampfanfall. (a-d) Die *in situ* Hybridisierungen mit Arg3.1-spezifischer Sonde zeigen eine starke Expression der Arg3.1-mRNA im Bereich der Amygdala. (a, b) Übersicht über Autoradiographien des gesamten Gehirns. Die Lage der Amygdala ist durch offene Rechtecke gekennzeichnet. (c, d) Vergrößerung der Amygdala von *gedippten in situ* Hybridisierungen. Sowohl in der GRF1-Knockout-Maus als auch im Wildtyp sind starke Signale über große Bereiche der lateralen und basolateralen Amygdala detektierbar. (e, f) Immunohistochemische Färbungen mit einem Arg3.1-spezifischen Antiserum. Die Abbildungen stellen Vergrößerungen der Amygdala dar. Es sind keine wesentlichen Unterschiede in der Arg3.1-Expression zu erkennen. (LA), Laterale Amygdala; (BLA), Basolaterale Amygdala; (Ce), Zentrale Amygdala.

Die Untersuchungen zur Expression von Arg3.1 in GRF1-*Knockout*-Mäusen haben gezeigt, dass sowohl die Arg3.1-mRNA als auch das Protein ein verändertes Expressionsmuster innerhalb des Hippokampus und des entorhinalen Kortexes aufweist. Die Deletion von GRF1 hat demnach also eine Auswirkung auf die Expression von Arg3.1. Um zu überprüfen, ob auch umgekehrt die Deletion von Arg3.1 eine Auswirkung auf die Expression von GRF1 hat, wurden GRF1-spezifische immunohistochemische Färbungen an Gehirnschnitten der schon erwähnten Arg3.1-*Knockout*-Mäuse durchgeführt, die in unserem Labor generiert wurden (s. Kap. 1.4). Die GRF1-Proteinexpression in den Arg3.1-*Knockout*-Mäusen ist im Vergleich zum Wildtyp unverändert (Daten nicht gezeigt). Die Deletion von Arg3.1 scheint demnach keinen Einfluss auf die GRF1-Expression zu haben. Im Gegensatz zur Arg3.1-Expression konnten keine Unterschiede in der Verteilung oder Menge des in GRF1-*Knockout*-Mäusen synthetisierten Zinki-Proteins festgestellt werden. Auch Zinki-spezifische immunohistochemische Färbungen auf Gehirnschnitten von Arg3.1-*Knockout*-Mäusen zeigten keine Veränderung der Proteinexpression von Zinki in Abhängigkeit vom Genotyp (Daten nicht gezeigt). Die Verteilung des Zinki-Proteins im Gehirn scheint also weder von der Anwesenheit eines seiner mRNA-Bindungspartner Arg3.1 noch von der Anwesenheit eines seiner Proteininteraktionspartner GRF1 abzuhängen (s. hierzu Kap. 3.5.1 der Diskussion).