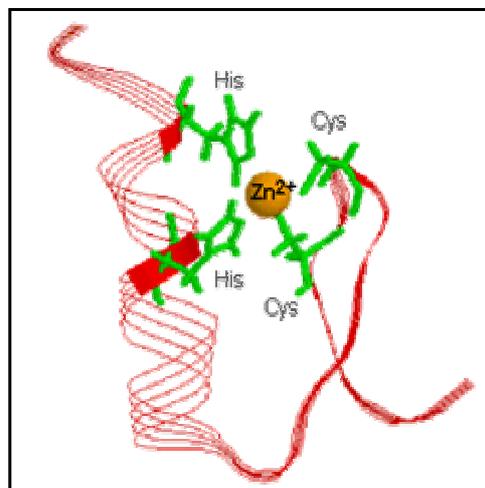


### 3. Diskussion

Studien verschiedener Arbeitsgruppen einschließlich unseres Labors konnten zeigen, dass das Gen Arg3.1 ein wichtiger Faktor für die Ausbildung lang anhaltender Formen neuronaler Plastizität wie Lernen, Gedächtnisbildung und LTP ist (Guzowski et al., 2000; Plath et al., 2003). Eines der faszinierendsten Merkmale von Arg3.1 ist der Transport seiner mRNA bis in die distalen Bereiche der Dendriten nach Induktion synaptischer Aktivität. Dabei akkumulieren sowohl die Arg3.1-mRNA als auch das Arg3.1-Protein spezifisch an aktivierten Synapsen innerhalb der dendritischen Verzweigungen, während nicht aktivierte Regionen ausgespart bleiben (Steward et al., 1998). Obwohl diese Eigenschaft Arg3.1 einzigartig unter den aktivitätsregulierten Genen macht, ist bisher wenig über die Mechanismen des Transports seiner mRNA in die Dendriten bekannt. Auch die Regulation der Translation von Arg3.1 ist bisher noch weitgehend unerforscht. Die lokale Translation dendritischer mRNAs an aktivierten Synapsen wird als wesentlicher Prozess zur Ausbildung synapsenspezifischer lang anhaltender Modifikationen im zentralen Nervensystem diskutiert (Kuhl und Skehel, 1998; Steward und Schuman, 2001). Die Analyse des Transports und der Translation der Arg3.1-mRNA könnte daher einen wichtigen Schritt zur Aufklärung der Funktion dieses Gens bei der Ausbildung synaptischer Plastizität darstellen. Ein erster experimenteller Ansatz unseres Labors zur Klärung dieser Fragestellungen bestand in der Suche nach potentiellen Proteinbindungspartnern der Arg3.1-mRNA mit Hilfe eines Tri-Hybrid-Screens. Auf diese Weise wurde Zinki als spezifisches Arg3.1-mRNA-bindendes Zinkfingerprotein identifiziert. Weitere Analysen in unserem Labor konnten zeigen, dass Zinki hauptsächlich neuronal exprimiert wird und eine somatodendritische Verteilung im Gehirn der Ratte aufweist. Genauere Eigenschaften und vor allem die Funktion von Zinki und seiner Bindung an die Arg3.1-mRNA wurden bisher jedoch noch nicht untersucht. Diese Doktorarbeit sollte daher über eine funktionelle Analyse einen Einblick in die Rolle des Zinki-Proteins in den Nervenzellen des Gehirns geben. Dazu wurden in zellbiologischen, molekularbiologischen und biochemischen Experimenten die Bindung Zinkis an die Arg3.1-mRNA, seine Auswirkung auf die Translation von Arg3.1, seine aktivitätsabhängige subzelluläre Lokalisierung und Expression sowie seine Einbindung in bestimmte Proteinkomplexe analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen im Folgenden diskutiert werden.

### 3.1 Die Bindung von Zink an die Arg3.1-mRNA wird nur von einem Teil der vierzehn Zinkfinger vermittelt

Die Interaktion zwischen dem Zink-Protein und der Arg3.1-mRNA beruht auf der Bindung von Zinkfingerdomänen an bestimmte Nukleotidbereiche der mRNA. Zinkfinger bestehen aus insgesamt vier konservierten Cystein- bzw. Histidinresten, die ein Zink-Ion chelatieren. Ihre ca. 30 Aminosäuren bilden eine  $\beta$ -Haarnadelschleife und eine  $\alpha$ -Helix aus, die durch das Zink-Ion stabilisiert werden (Lee et al., 1989; Abb.3.1).



**Abb. 3.1 Schematischer Aufbau eines  $C_2H_2$ -Zinkfingers**

Die Abbildung zeigt die  $\alpha$ -Helix (links) und die  $\beta$ -Haarnadelschleife (rechts) eines Zinkfingers. Beide Strukturen werden durch Chelatierung des zentralen Zink-Ions über zwei Histidine in der  $\alpha$ -Helix bzw. über zwei Cysteine in der  $\beta$ -Haarnadelschleife stabilisiert. ( $Zn^{2+}$ ), Zink-Ion; (Cys), Cystein-Rest; (His), Histidin-Rest; modifiziert nach [lecture.ecc.u-tokyo.ac.jp/.../Ch4F1b.gif](http://lecture.ecc.u-tokyo.ac.jp/.../Ch4F1b.gif).

Groben Schätzungen zufolge kodiert 1 % des Säugetiergenoms Zinkfingerproteine, von denen viele eine Funktion als DNA-bindende Moleküle und Transkriptionsfaktoren ausüben (Iuchi, 2001). Trotz des gleichen strukturellen Aufbaus binden verschiedene Zinkfinger unterschiedliche DNA-Sequenzen und es gibt keinen allgemeinen Code für diese DNA-Bindung. Allerdings weisen Kristallstrukturanalysen von Zinkfinger-DNA-Komplexen auf gemeinsame Regeln hin. So wird die Bindung vor allem durch die Aminosäurereste der  $\alpha$ -Helix vermittelt, die innerhalb der großen Furche der DNA-Doppelhelix bindet (Wolfe et al., 2000). Die besondere Struktur von RNA-Molekülen könnte darauf hindeuten, dass die Interaktion zwischen RNA und Zinkfingern anderen Regeln folgt. RNA-Moleküle liegen im Gegensatz zu DNA zum Teil einzelsträngig vor, können aber eine vielfältige und komplexe

Sekundärstruktur in Form von Haarnadelschleifen und Doppelhelizes ausbilden, wobei die letzteren eine A-Konformation einnehmen. Diese Strukturen unterscheiden sich deutlich von der hauptsächlich in der B-Konformation vorliegenden DNA-Doppelhelix. Der Transkriptionsfaktor TFIIIA ist ein Beispiel dafür, dass die von Zinkfingern vermittelte RNA-Bindung nicht wie bei DNA innerhalb der großen Furche einer Doppelhelix stattfindet. Kristallstrukturanalysen haben gezeigt, dass die Zinkfinger von TFIIIA an das Rückgrat einer Doppelhelix der 5S RNA und an bestimmte nicht-helikale Sekundärstrukturen binden (Lu et al., 2003). Dennoch demonstrieren Mutationsanalysen, dass auf Seiten der Zinkfinger die Bindung der RNA über die gleichen Aminosäurepositionen der  $\alpha$ -Helix vermittelt wird, die auch für die DNA-Bindung essentiell sind (Friesen und Darby, 1997). Zinki besitzt vierzehn Zinkfinger des Typs Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die vierzehn Zinkfinger nicht gleichermaßen zur Bindung der Arg3.1-mRNA beitragen. Experimente im Tri-Hybrid-System deuten daraufhin, dass die Interaktion mit von N-terminaler Seite her abnehmender Zahl der Zinkfinger schwächer wird, so dass die C-terminalen sieben Zinkfinger 8-14 schließlich keine spezifische Bindung der Arg3.1-mRNA mehr vermitteln. Der kleinste noch bindende Bereich sind die Zinkfinger 7-14, wobei die Zinkfinger 7-9 auch nicht mehr für die Assoziation mit der Arg3.1-mRNA ausreichen. Die stärkste Bindung vermitteln die vollständigen vierzehn Zinkfinger bzw. die zwölf C-terminalen Zinkfinger, die ursprünglich als Arg3.1-mRNA-bindendes Polypeptid im Tri-Hybrid-Screen identifiziert wurden. Diese Ergebnisse können unter anderem auf zwei verschiedene Weisen interpretiert werden, die im Folgenden erläutert werden. Erstens sprechen sie für eine größere Beteiligung der N-terminal gelegenen Zinkfinger an der mRNA-Bindung. Sequenzanalysen zeigen, dass in der N-terminalen Hälfte des Zinkfingerbereichs von Zinki Zinkfinger des Typs **H S S/T L R/Q H E R T H** (Sequenz der  $\alpha$ -Helix) überwiegen. Die Zinkfinger 3 bis 6 sind sogar zu 100 % identisch bzw. weisen nur konservierte Aminosäureaustausche auf. Auffällig ist, dass sobald einer der Zinkfinger aus dieser Gruppe deletiert wird (Zinkfinger 3 im Konstrukt ZF4-, die elf C-terminalen Zinkfinger), die Bindungskapazität deutlich abnimmt, während zwischen den Konstrukten ZF1- (die vollständigen vierzehn Zinkfinger) und ZF3- (die C-terminalen zwölf Zinkfinger) keine deutlichen Unterschiede in der Bindungsstärke feststellbar sind. Die Deletion der ersten beiden Zinkfinger hat also keine wesentliche Auswirkung auf die mRNA-Bindung. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Sequenzanalysen, denn die Sequenz des zweiten Zinkfingers weicht deutlich von der oben erwähnten, vielleicht für die Bindung wichtigen Sequenz der Zinkfinger 3, 4, 5 und 6 ab. Im C-terminalen Zinkfingerbereich, der für die Bindung nicht mehr ausreicht, existiert nur noch ein Zinkfinger (Nr. 11), der über 90

% identisch zu Zinkfinger 3, 4 und 6 ist, der Rest unterscheidet sich in seiner Sequenz deutlich davon. Auf Grund dieser Ergebnisse lässt sich spekulieren, dass die mRNA-Bindung Zinkis über das Sequenzmotiv der  $\alpha$ -Helix der Zinkfinger 3 bis 6 stattfindet. Um diese Hypothese zu überprüfen, müssen nun Zinkfingerkonstrukte hergestellt werden, in denen künstlich eingefügte Punktmutationen zu Aminosäureaustauschen innerhalb dieser Sequenzen führen. Der Test dieser Konstrukte auf ihre Fähigkeit, die Arg3.1-mRNA im Tri-Hybrid-System zu binden, könnte dann Aufschluss über die Relevanz der  $\alpha$ -Helix-Sequenz der Zinkfinger 3 bis 6 für die Interaktion zwischen dem Zinki-Protein und der Arg3.1-mRNA geben. In den bisher veröffentlichten Studien über die Eigenschaften RNA-bindender Zinkfinger anderer Proteine taucht ein solches Sequenzmotiv nicht auf. Stattdessen wurden zum Beispiel bei dem best untersuchten RNA-bindenden Zinkfingerprotein TFIIIA nur einzelne Aminosäuren der  $\alpha$ -Helix identifiziert, die innerhalb der RNA-bindenden Zinkfinger konserviert und notwendig für die Bindung an die 5S RNA waren (Friesen und Darby, 1997). Die zweite Schlussfolgerung, die man aus den Ergebnissen der Tri-Hybrid-Analyse ziehen kann, ist, dass für die Bindung der Arg3.1-mRNA eine größere Proteindomäne notwendig ist, die aus mehreren, nämlich mindestens acht Zinkfingern besteht. Dafür spricht auch die Länge des für die Bindung notwendigen mRNA-Bereiches, den Ulrich Putz in seiner Doktorarbeit isoliert hat. So ist für eine Bindung von Zinki an die Arg3.1-mRNA im Tri-Hybrid-System ein Teil der kodierenden Sequenz und die gesamte 3'UTR der Arg3.1-mRNA notwendig. Dieser Bereich umfasst ca. 2 kb und bindet daher wahrscheinlich schon allein aus sterischen Gründen nicht an nur ein oder zwei Zinkfinger. Der bereits erwähnte Transkriptionsfaktor TFIIIA bindet zum Beispiel über drei Zinkfinger an ein nur 61 bp umfassendes Fragment der 5S RNA (Lu et al., 2003). Hier ist jedoch die schon erwähnte mögliche Ausbildung umfangreicher Sekundär- und Tertiärstrukturen innerhalb einer mRNA zu beachten. Dadurch können Nukleotide, die auf der Primärstruktur weit entfernt von einander liegen, in räumliche Nähe zueinander gebracht werden. Gleichzeitig würde durch eine komplexe Sekundärstruktur der Bereich der Arg3.1-mRNA, der tatsächlich für die Bindung an die Zinkfinger zugänglich ist, deutlich kleiner als die ursprünglichen 2 kb werden. Zukünftige Analysen zur Sekundärstruktur der Arg3.1-mRNA können daher weitere Einblicke in die molekularen Eigenschaften ihrer Bindung an das Zinki-Protein geben. Mit Hilfe computergestützter Analysen können Vorhersagen über die Sekundärstrukturen von mRNAs getroffen werden. Diese basieren entweder auf komparativen Sequenzanalysen oder auf thermodynamischen Berechnungen von Energieminima (Cannone et al., 2002; Zuker, 2003). Letztendlich wird aber nur eine Kristallstrukturanalyse der Arg3.1-mRNA verlässliche Hinweise auf ihre

tatsächliche Sekundärstruktur geben. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Bindung der Zinkfinger von Zinki an die Arg3.1-mRNA keine „Alles-oder-nichts“-Reaktion ist, sondern dass die einzelnen Zinkfinger gemeinsam zur vollständigen Bindungskapazität beitragen. Dies ist ein typisches Merkmal der zinkfingervermittelten RNA-Bindung, wie ebenfalls am Beispiel von TFIIIA gezeigt werden konnte. TFIIIA enthält neun aufeinander folgende Zinkfinger, wobei die Zinkfinger 4-6 hauptsächlich für die 5S RNA-Bindung zuständig sind und die Zinkfinger 1-3 im Wesentlichen die Bindung der DNA des 5S RNA Gens vermitteln (Clemens et al., 1993). *Footprint*-Analysen machten deutlich, dass die Bindung von TFIIIA an die 5S RNA ein Resultat der additiven Wirkung der spezifischen Interaktionen der einzelnen Zinkfinger mit der RNA ist (Giel-Pietraszuk und Barciszewska, 2002). TFIIIA ist ein Beispiel für ein Protein, dessen große Zahl an Zinkfingern unterschiedliche Funktionen erfüllen kann, nämlich DNA- und RNA-Bindung. Ein anderes Zinkfingerprotein, Ikaros, besitzt je nach Spleißvariante bis zu sechs Zinkfinger des Typs C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, von denen die N-terminalen vier Zinkfinger DNA binden und die beiden C-terminalen Zinkfinger Proteinbindung vermitteln. Proteininteraktionen, die durch Zinkfinger vermittelt werden, treten meist zwischen Zinkfingern oder zinkfingerähnliche Strukturen auf (Crossley et al., 1995; Mackay und Crossley, 1998). Die für die Proteininteraktion benötigten Zinkfinger sind auf den Proteinen häufig isoliert von den DNA-bindenden Zinkfingern lokalisiert. Allerdings gibt es auch Proteine, in denen derselbe Zinkfinger sowohl DNA- als auch Proteinbindung vermittelt (z.B. im C<sub>4</sub>-Zinkfingerprotein GATA-1; Merika und Orkin, 1995). Ähnliche Eigenschaften könnten auch die Zinkfinger von Zinki besitzen. Allerdings konnte in dieser Arbeit auf Grund von Limitationen des Zwei-Hybrid-Systems nicht untersucht werden, ob ein Teil der Zinkfinger von Zinki auch Proteinbindungen vermittelt (siehe hierzu Kap. 2.5.1). Es kann daher keine Aussage über die Proteinbindungseigenschaften der Zinkfinger von Zinki gemacht werden.

Bei der Interpretation der Ergebnisse zur Bestimmung der minimalen RNA-Bindungsdomäne von Zinki muss beachtet werden, dass sie lediglich auf Tri-Hybrid-Experimenten beruhen. Weiterführende Analysen der Bindung zwischen dem Zinki-Protein und der Arg3.1-mRNA sollten daher andere, vom Hefe-System unabhängige Verfahren einschließen. So könnten Artefakte ausgeschlossen werden, die durch spezifische Eigenschaften des Tri-Hybrid-Systems hervorgerufen werden (Putz et al., 2000; Coates und Hall, 2003). Diese treten zum Beispiel als Folge der Tatsache auf, dass in einem heterologen System gearbeitet wird, in dem die Proteine künstlich auf engen Raum im Zellkern zusammengebracht werden. Auf diese Weise werden unter Umständen Interaktionen festgestellt, die in Neuronen auf Grund

unterschiedlicher Lokalisierung der Bindungspartner nicht stattfinden. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass unterschiedliche posttranslationale Modifikationen, die in Hefen beziehungsweise in Neuronen stattfinden, einen Einfluss auf die mRNA-Bindungsfähigkeit der Proteine haben. Die Interaktion von Zinki mit der Arg3.1-mRNA konnte während dieser Arbeit auch in einem von Hefen unabhängigen *in vitro* System gezeigt werden. In diesem neuartigen RNA-Pulldown konnte *in vitro* transkribierte Arg3.1-mRNA ein rekombinantes Zinki-Protein aus Zelllysate präzipitieren. Ein entsprechender Pulldown mit GAPDH-mRNA demonstrierte die Spezifität des Assays, denn GAPDH-mRNA konnte Zinki nicht präzipitieren. Diese Technik des RNA-Pulldowns kann daher als eine vom Tri-Hybrid-System unabhängige Methode angesehen werden, spezifische Protein-mRNA-Bindungen nachzuweisen. Sie lässt sich als Alternative zum Hefesystem auch für die weitere Bestimmung der RNA-Bindungsdomäne von Zinki bzw. der Proteinbindungsdomäne der Arg3.1-mRNA einsetzen. Damit können neben den oben erwähnten Problemen auch andere Beschränkungen des Tri-Hybrid-Systems überwunden werden, wie zum Beispiel die unspezifische Aktivierung der Expression der Reportergene durch sehr kurze Konstrukte (vgl. Kap. 2.5.3).

### 3.2 Zinki inhibiert die Translation *in vitro*

Interaktionen zwischen Proteinen und mRNA können unterschiedliche Funktionen haben. Neben einer möglichen Rolle RNA-bindender Proteine beim Transport von mRNAs zum Beispiel in Form von Ribonukleopartikeln (Tiedge et al., 1991) gibt es auch Hinweise auf ihre Beteiligung an der Regulation der Translation (Standart und Jackson, 1994; Mendez und Richter, 2001; Mazumder et al., 2003). In einem während dieser Doktorarbeit durchgeführten *in vitro* Assay hemmte Zinki die Translation der Arg3.1-mRNA. Ein weiteres Experiment deutete darauf hin, dass diese Hemmung möglicherweise auf der Stufe der Initiation stattfand. Es zeigte, dass der N-Terminus von Zinki *in vitro* den Zusammenbau des 80S-Initiationskomplexes störte. Allerdings war die Zinki-vermittelte Inhibition der Translation in diesem System mRNA-unspezifisch, denn das Zinki-Protein blockierte die Translation aller getesteten mRNAs. Eine Erklärung für diese unspezifische Inhibition könnten die unphysiologischen Bedingungen des Retikulozytenlysats sein. Es handelt sich hierbei um ein zellfreies System, in dem also keinerlei Kompartimentalisierung und damit spezifische Lokalisation von Proteinen oder mRNAs stattfinden kann. Bemerkenswerterweise vermitteln die mRNA-bindenden vierzehn Zinkfinger von Zinki keine Translationsinhibition in diesem

System. Damit kann eine durch die Zinki-Bindung verursachte bloße Maskierung der mRNA, die sie unzugänglich für die Komponenten des Translationsapparates macht, ausgeschlossen werden. Den Effekt der Maskierung von mRNA beobachtet man zum Beispiel bei der Bindung des durch die intrazelluläre Eisenkonzentration regulierten Proteins IRP an das IRE-Sequenzelement im 5'-Bereich der Ferritin mRNA. Durch diese Interaktion, die nur bei niedrigem Eisengehalt in der Zelle stattfindet, wird der Zusammenbau des 43S-Prä-Initiationskomplexes verhindert, indem die entsprechenden Bindungsstellen für die Translationsfaktoren auf Seiten der mRNA durch das IRP verdeckt werden (Gray und Hentze, 1994). Im Fall von Zinki wird die Inhibition der Translation durch den N-Terminus verursacht. Diese Domäne ist von der eigentlichen RNA-Bindungsdomäne Zinkis räumlich getrennt und sie ist dennoch in der Lage, die Komponenten des Translationsapparates an ihrer normalen Funktion zu hindern. Dies ist kein Effekt, der durch jedes im hohen molekularen Überschuss im Retikulozytenlysat vorliegendes Protein verursacht wird. Nur wenn der N-Terminus von Zinki vollständig vorhanden war, ließ sich in den hier durchgeführten Experimenten eine Translationsinhibition beobachten. Alle anderen getesteten Proteine wie die vierzehn Zinkfinger, die KRAB-Domäne, der Linker (Pseudozinkfinger) und GST führten nicht zu einer Blockade der Proteinsynthese. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass der N-Terminus von Zinki spezifisch mit der Funktion des Translationsapparates interferiert. In einem zellfreien *in vitro* System wie dem Retikulozytenlysat könnte ein unphysiologisch hoher molekularer Überschuss dieser Proteindomäne dazu ausreichen, den Translationsvorgang generell zu blockieren. In Zellen muss Zinki vermutlich in der unmittelbaren Umgebung des Translationsapparates lokalisiert sein, um inhibitorisch auf die Proteinsynthese wirken zu können.

*In vivo* könnte die Spezifität der Inhibition der Proteinsynthese durch das Zinki-Protein über seine Assoziation mit der Arg3.1-mRNA vermittelt werden. Durch diese Bindung könnte der N-Terminus von Zinki in räumliche Nähe der Ribosomenuntereinheiten und Translationsfaktoren gebracht werden. Ergebnisse dieser Doktorarbeit deuten daraufhin, dass Zinki den Einbau der Arg3.1-mRNA in den 80S-Initiationskomplex blockiert. In einem Sucroседichtegradienten von cycloheximidbehandeltem Retikulozytenlysat reicherte sich nach Inkubation mit dem N-Terminus von Zinki weniger Arg3.1-mRNA in den Fraktionen des 80S-Initiationskomplexes an als nach Inkubation mit den vierzehn Zinkfingern von Zinki. Dieser Effekt war zwar gering, konnte aber in drei unabhängigen Versuchen beobachtet werden. Das Experiment muss nun in weiteren Ansätzen wiederholt werden, um seine Signifikanz zu untermauern. Außerdem lässt der Versuchsansatz keine Aussagen über die Art

der Inhibition der Translationsinitiation zu. Die Translationsinitiation in Eukaryoten kann auf zwei verschiedene Weisen stattfinden. Bei der *cap*-vermittelten Initiation bindet ein Komplex, bestehend aus der 40S- Ribosomenuntereinheit, verschiedenen Translationsinitiationsfaktoren und einer methionintragenden tRNA, an die 5' *Cap*-Struktur eukaryotischer mRNAs und bildet so den 43S-Prä-Initiationskomplex. Dieser wandert entlang der 5'UTR bis zum AUG-Startcodon, wo dann durch Rekrutierung der 60S-Untereinheit der 80S-Initiationskomplex entsteht (Pestova et al., 2001). Bei der *cap*-unabhängigen Translation wird die Translationsinitiation über so genannte IRES-Sequenzen vermittelt. Solche IRES-Sequenzen wurden zunächst in viraler RNA entdeckt (Bienkowska-Szewczyk und Ehrenfeld, 1988), später auch in einigen eukaryotischen mRNAs (Macejak und Sarnow, 1991). Der Mechanismus der IRES-vermittelten Translationsinitiation ist noch nicht genauer bekannt, aber er ist neueren Studien zufolge unabhängig von den üblichen Translationsinitiationsfaktoren (Kozak, 2003). *In vivo* gewährleistet er die Translation bestimmter mRNAs, auch wenn die allgemeine, *cap*-vermittelte Proteinsynthese der Zelle inhibiert ist, so zum Beispiel bei Mitose oder Apoptose (Holcik und Korneluk, 2000; Pyronnet et al., 2000). Arg3.1 besitzt eine IRES innerhalb seiner 5' untranslatierten Region und seine mRNA kann über *cap*-abhängige und *cap*-unabhängige Mechanismen translatiert werden (Pinkstaff et al., 2001). Ob Zinki in die 5' *Cap*-Struktur- oder die IRES-vermittelte Initiation der Translation von Arg3.1 eingreift, lässt sich anhand der während dieser Doktorarbeit durchgeführten Experimente nicht beurteilen, da die eingesetzte mRNA sowohl das IRES als auch eine 5' *Cap*-Struktur beinhaltet. Weiterführende Experimente müssen nun zeigen, welcher dieser beiden Vorgänge durch Zinki gestört wird. Die Inhibition der Proteinsynthese auf Ebene der Initiation ist ein üblicher Mechanismus zur Kontrolle der Translation, denn die meisten bekannten regulatorischen Prozesse greifen auf dieser Stufe ein (Preiss und Hentze, 2003).

Der N-Terminus von Zinki, der für die Translationsinhibition ausreicht, setzt sich aus einer trunkierten KRAB-A-Domäne und einem Pseudozinkfinger zusammen. Vollständige KRAB-Domänen bestehen aus 75 Aminosäuren, die zwei amphipathische  $\alpha$ -Helizes ausbilden. (Bellefroid et al. 1991). Sie fungieren als Transkriptionsrepressoren (Margolin et al., 1994; Peng et al., 2000) und sind in etwa einem Drittel aller humanen Zinkfingerproteine enthalten (Bellefroid et al., 1991). Mit Hilfe von Deletionskonstrukten konnte gezeigt werden, dass die Minimaldomäne, die noch einen repressiven Effekt auf die Transkription hat und dabei eine vollständige  $\alpha$ -Helix ausbildet, aus 45 Aminosäuren des C-terminalen Bereiches der KRAB-A-Domäne besteht (Margolin et al., 1994). Die trunkierte Domäne im offenen Leserahmen

von Zinki enthält nur die elf C-terminalen Aminosäuren von KRAB-A und ist daher vermutlich nicht mehr fähig, die Transkription zu inhibieren. Der N-terminale Bereich der KRAB-A-Domäne von Zinki liegt in seiner 5'UTR und wird nicht translatiert. Eine solche trunkierte KRAB-A-Domäne ist auch in anderen Zinkfingerproteinen beschrieben worden. So exprimiert eine bestimmte Spleißvariante des RNA-bindenden Zinkfingerproteins ZNF74 ebenfalls nur eine trunkierte Form der KRAB-A-Domäne und inhibiert die Transkription nicht, während die Spleißvariante mit vollständiger KRAB-A- und -B-Domäne einen funktionsfähigen Transkriptionsrepressor kodiert (Grondin et al., 1996; Cote et al., 2001). In dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass Zinki nicht im Zellkern lokalisiert ist. Dies ist neben dem Hinweis, dass die trunkierte KRAB-A-Domäne wahrscheinlich keine Funktion als Transkriptionsrepressor ausüben kann, ein weiteres Indiz dafür, dass die Rolle Zinkis nicht innerhalb der Transkriptionsregulation liegt. Einschränkend muss allerdings erwähnt werden, dass in dem im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Zwei-Hybrid-Screen zwei Proteine als potentielle Interaktionspartner von Zinki identifiziert wurden, die an der Transkriptionsregulation beteiligt sind bzw. sein könnten (s. hierzu Kap. 2.5.1.2). Anstelle einer Inhibition der Transkription vermittelt die KRAB-A-Domäne im Falle von Zinki möglicherweise die Inhibition der Translation. Damit ist Zinki nach gegenwärtigem Wissensstand das erste KRAB-Domäne-enthaltende Protein, das an der Kontrolle der Translation beteiligt sein könnte. Für die Inhibition der Translation ist allerdings auch die Linkerregion, d.h. also der degenerierte Zinkfinger von Zinki notwendig. Eine Aussage zur Funktion dieses Linkers, zum Beispiel als stabilisierender und strukturgebender Faktor für die trunkierte KRAB-A-Domäne oder als eigentlicher Translationsinhibitor, kann auf Grund der Ergebnisse dieser Doktorarbeit nicht getroffen werden. Degenerierte Zinkfinger treten in vielen Zinkfingerproteinen auf (Looman et al., 2002). Sie können Zink-Ionen nicht mehr chelatieren und es ist nicht bekannt, welche Aufgabe sie erfüllen.

Die Ergebnisse zur Translationsinhibition durch Zinki müssen kritisch betrachtet werden, da sie lediglich auf Experimenten beruhen, die in einem *in vitro* System, dem Kaninchenretikulozytenlysat, durchgeführt wurden. So findet man zum Beispiel hinsichtlich des Effekts eines anderen neuronalen RNA-bindenden Proteins, nämlich FMRP, auf die Translation im Retikulozytenlysat widersprüchliche Angaben in der Literatur. Die Deletion von FMRP führt beim Menschen zum so genannten *Fragile-X-Syndrom*, einer der weltweit am häufigsten auftretenden, X-chromosomal vererbten Geisteskrankheiten, die durch eine Trinukleotidexpansion am 5'-Ende des *fmr1*-Gens verursacht wird. Das Produkt des *fmr1*-Gens ist FMRP, das über zwei KH-Domänen und eine RGG-Box viele verschiedene

neuronale RNAs, einschließlich seines eigenen Transkripts, bindet (Siomi et al., 1993; Ashley et al., 1993; Brown et al., 2001; vgl. Kap. 1.2 und 1.6). Lagerbauer und Kollegen konnten zeigen, dass FMRP die Translation von mRNAs im Retikulozytenlysat und in *Xenopus* Oozyten inhibiert. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit für Zinki vermuten lassen, funktioniert die Hemmung möglicherweise ebenfalls über die Blockade des Zusammenbaus des 80S-Initiationskomplexes. Dieser Effekt ist wie bei Zinki mRNA-unspezifisch, das heißt auch die Translation von mRNAs, die FMRP nicht bindet, wird inhibiert (Lagerbauer et al., 2001). Dagegen sehen Schaeffer und Kollegen nur bei RNAs mit einem künstlich eingefügten FMRP-Bindungsmotiv eine Hemmung der Proteinsynthese durch FMRP (Schaeffer et al., 2001). Eine weitere Arbeitsgruppe berichtet ebenfalls über die FMRP-vermittelte Translationsinhibition von aus Rattengehirn isolierter mRNA im Retikulozytenlysat und es gibt auch bei dieser Arbeit Hinweise darauf, dass spezifisch nur die mRNA inhibiert wird, die an FMRP bindet (Li et al., 2001). Eine Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten variierende Mengen an RNA und Protein sein, die im Retikulozytenlysat eingesetzt wurden. Auch die Anwesenheit von Kompetitor-mRNA hat möglicherweise einen Effekt auf die Spezifität der Inhibition (Schaeffer et al., 2001). Trotz dieser teils widersprüchlichen Ergebnisse konnte für FMRP in verschiedenen Studien auch *in vivo* eine Verbindung zur Translationsregulation gefunden werden. *Microarray*-Studien zum Beispiel zeigten, dass in Lymphoblasten-Zelllinien von Patienten, die am *Fragile-X*-Syndrom leiden, eine bestimmte Gruppe von mRNAs eine veränderte Assoziation mit Polysomen verglichen zu Zellen gesunder Menschen aufweist (Brown et al., 2001). Für einen Teil dieser mRNAs mit verändertem Translationsprofil konnte in Ko-Immunopräzipitationen mit Mausgehirnlysat auch die Bindung an FMRP nachgewiesen werden. Außerdem deuten andere Analysen daraufhin, dass FMRP über die nicht-translatierte BC1-RNA *in vivo* die Translation bestimmter mRNAs inhibieren könnte (Zalfa et al., 2003). Darüber hinaus ist FMRP mit aktiv translatierenden Polyribosomen assoziiert (Corbin et al., 1997; Feng et al., 1997a,b). Diese Bestätigungen der Ergebnisse aus dem Retikulozytenlysat *in vivo* könnten ein Hinweis auf die physiologische Relevanz solcher *in vitro* Assays sein. Vor kurzem wurde allerdings eine Studie veröffentlicht, in der FMRP *in vivo* einen positiven Einfluss auf die Translation hatte (Todd et al., 2003). Die Experimente von Todd und Kollegen deuten darauf hin, dass die Anwesenheit von FMRP notwendig für die verstärkte Translation von PSD95 nach Aktivierung metabotroper Glutamatrezeptoren ist. Dieser Widerspruch zu den Ergebnissen im Retikulozytenlysat macht deutlich, dass die Funktion eines Proteins stark von der Einbindung in seine zelluläre Umgebung und der Anwesenheit spezifischer Signalkomplexe abhängt. In

wie weit Zinki auch außerhalb des Retikulozytenlysats zum Beispiel in Neuronen eine Auswirkung auf die Translation der Arg3.1-mRNA haben könnte, muss nun in weiterführenden Studien untersucht werden. Ein erster Hinweis auf eine funktionelle Verbindung zwischen Zinki und dem Translationsapparat in Neuronen könnte die in dieser Doktorarbeit gefundene aktivitätsregulierte Assoziation von Zinki mit polysomenhaltigen subzellulären Fraktionen sein.

### **3.3 Die Lokalisation und Stabilität von Zinki wird aktivitätsabhängig reguliert**

Plastische Vorgänge im Gehirn, wie zum Beispiel die Verarbeitung und Speicherung neuer Informationen, erfordern Modifikationen der synaptischen Übertragung. Diese gehen einher mit Veränderungen der Transkription, Translation, Proteindegradation und Proteinverteilung innerhalb der Neuronen (Davis und Squire, 1984; Weiler et al., 1995; Martin et al., 2000; Cline, 2003; Schwartz, 2003; Triller und Choquet, 2003). Eine besondere Bedeutung kommt dabei den aktivitätsregulierten (unmittelbar frühen) Genen zu, deren Expression konstitutiv sehr schwach ist und erst durch synaptische Aktivität hochreguliert wird (s. Kap. 1.4). Während Arg3.1 zu dieser Gruppe der aktivitätsregulierten Gene gehört, wird sein Bindungspartner Zinki konstitutiv stark exprimiert. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass sich die subzelluläre Verteilung und die Stabilität Zinkis als Folge von Stimuli, die neuronale Aktivität erzeugen, verändern. Folgende Ergebnisse der Untersuchungen zur Lokalisation und Expression des Zinki-Proteins demonstrieren seine aktivitätsabhängige Regulation:

1. Die Proteinexpression von Zinki wird nach laminaspezifischer Stimulierung im Bereich der aktivierten Synapsen schwächer.
2. Zinki assoziiert nach kainatinduziertem Krampfanfall mit polysomenhaltigen Fraktionen.
3. Zinki wird nach kainatinduziertem Krampfanfall zu einem kleinen Teil polyubiquitiniert und degradiert.

zu 1) Immunohistochemische Studien an Gehirnen, bei denen nur ein bestimmter Abschnitt der Dendriten des *Gyrus dentatus* über einen elektrophysiologischen Reiz stimuliert wurde, zeigten eine verringerte Expression Zinkis im Bereich der aktivierten Synapsen. Die Reduktion des Zinki-Proteins in Folge von synaptischer Aktivität könnte auf zwei verschiedene Weisen erfolgen. So ist einerseits ein Mechanismus vorstellbar, bei dem Zinki

aus den aktivierten Bereichen heraus transportiert wird. Andererseits könnte das Zinki-Protein aber auch spezifisch an aktivierten Synapsen degradiert werden. Im ersten Fall, d.h. bei einem aktiven Transport von Zinki aus den stimulierten Bereichen der Dendriten heraus, müsste es zu einer Akkumulation des Proteins in anderen, unstimulierten Bereichen der Zelle kommen. Die immunohistochemischen Färbungen laminaspezifisch induzierter Gehirnschnitte zeigen ein etwas stärkeres Zinki-spezifisches Signal in der unstimulierten unteren Molekularschicht verglichen zu Kontrollgehirnen. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass Zinki nach laminaspezifischer synaptischer Potenzierung aus dem Bereich aktivierter Synapsen innerhalb der mittleren Molekularschicht in den Bereich nicht aktivierter Synapsen der unteren Molekularschicht des *Gyrus dentatus* transportiert wird. Eine solche aktivitätsabhängige Veränderung der subzellulären Lokalisierung eines Proteins könnte in unfraktionierten Zelllysaten nicht detektiert werden, da diese lediglich den Gesamtgehalt an Proteinen innerhalb der Zellen widerspiegeln. In einer Analyse von Hippokampuslysaten unbehandelter und kainatstimulierter Mäuse konnte keine aktivitätsabhängige Veränderung des Zinki-Proteins detektiert werden, was die aktivitätsregulierte subzelluläre Umverteilung von Zinki daher zumindest nicht ausschließt. Zu dieser Hypothese der aktivitätsabhängigen Veränderung der Lokalisation von Zinki steht allerdings die Beobachtung im Widerspruch, dass die Verteilung des Zinki-Proteins nach kainatinduziertem Krampfanfall in immunohistochemischen Färbungen von Gehirnschnitten unverändert bleibt. Verließe Zinki auch nach Kainatgabe Regionen aktivierter Synapsen, so würde eine deutliche Abnahme seiner dendritischen Färbung erwartet werden. Diese bleibt jedoch unverändert stark. Eine mögliche Erklärung ist, dass durch Kainatinduktion sowohl Somata als auch Dendriten der Neuronen aktiviert werden. Es gibt bei dieser Art der Stimulation also praktisch keine inaktiven Bereiche innerhalb der Zelle mehr, in die das Zinki-Protein transportiert werden könnte. Außerdem ist zu beachten, dass die beiden hier angewandten Methoden zur Auslösung synaptischer Aktivität auf völlig andersartigen molekularen Vorgängen basieren. Es handelt sich dabei auf der einen Seite um einen kainatinduzierten generalisierten Krampf und auf der anderen Seite um die elektrophysiologische Stimulierung genau definierter Nervenbahnen. Diese beiden verschiedenen Mechanismen könnten dementsprechend einen sehr unterschiedlichen Einfluss auf das Zinki-Protein haben. Es ist also durchaus vorstellbar, dass Zinki je nach Art der Induktion synaptischer Aktivität unterschiedlich reguliert wird.

zu 2) Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit Hilfe von biochemischen Fraktionierungen auch ein Hinweis auf eine durch Kainat induzierte subzelluläre Umverteilung des Zinki-Proteins gefunden werden. In kontinuierlichen und diskontinuierlichen

Sucroседichtegradienten von Gehirnllysaten konnte ein Teil des Zinki-Proteins nach kainatinduziertem Krampfanfall in polysomenhaltigen Fraktionen nachgewiesen werden, während es unter Kontrollbedingungen ausschließlich in den Fraktionen geringer Dichte vorhanden war. Auch in diesem Fall könnte die synaptische Potenzierung einen aktiven Transport des Zinki-Proteins innerhalb der Zelle auslösen. In wie weit die kainatinduzierte Assoziation mit Fraktionen höherer Dichte den gleichen oder ähnlichen Mechanismen unterliegt, die zu einer Änderung der Lokalisation des Zinki-Proteins in den Dendriten nach laminaspezifischer Stimulierung führen, kann auf Grund der vorliegenden Ergebnisse nicht festgestellt werden. Neben einer Umverteilung durch aktiven Transport könnte die kainatinduzierte Assoziation mit Polysomen aber auch durch die Bindung Zinkis an die Arg3.1-mRNA verursacht werden. Synaptische Aktivität führt zur Transkription der mRNA und zur Synthese des Proteins von Arg3.1 (Link et al., 1995; Lyford et al., 1995; Steward et al., 1998). Es gibt Hinweise darauf, dass nach synaptischer Aktivität die neu synthetisierte Arg3.1-mRNA mit Polysomen, dem Ort aktiver Translation innerhalb der Zelle, assoziiert ist (Bagni et al., 2000). Diese Polysomen bestehen aus Ribosomen, die, vergleichbar mit einer Perlenkette, an der mRNA aufgereiht sind und diese translatieren (Miller et al., 1970). Zinki bindet einen Bereich der Arg3.1-mRNA, der ca. 390 bp der kodierenden Region und die vollständige 3'UTR einschließt. Dieser Teil der mRNA ist größtenteils nicht von Ribosomen besetzt, da die 40S- und die 60S-Untereinheiten der Ribosomen nach Erreichen eines Stopcodons von der mRNA abdissoziieren. Daher könnte Zinki vermutlich mit der Arg3.1-mRNA assoziiert bleiben, auch wenn diese Teil der aktiv translatierenden Polysomen ist. Unter Kontrollbedingungen wäre die Menge an Arg3.1-mRNA, die translatiert wird, wahrscheinlich zu gering, um eine im Western Blot detektierbare Menge des Zinki-Proteins an Polysomen zu binden. Dieser mögliche Mechanismus zur kainatinduzierten Assoziation Zinkis mit Polysomen könnte zum Beispiel durch Fraktionierungen von Gehirnllysaten der Arg3.1-*Knockout*-Mäuse, die keine Arg3.1-mRNA mehr exprimieren, untersucht werden. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass Zinki auch die CaMKII-mRNA bindet (Putz, 1999), die durch synaptische Aktivierung, wie zum Beispiel nach BDNF-Stimulation, verstärkt translatiert wird (Aakalu et al., 2001). Das Zinki-Protein könnte also auch in Abwesenheit der Arg3.1-mRNA durch seine Bindung an die CaMKII-mRNA mit den Polysomen assoziieren.

zu 3) Neben dem aktiven Transport des Zinki-Proteins aus stimulierten dendritischen Regionen heraus ist auch ein Mechanismus vorstellbar, bei dem die Abnahme der Zinki-Immunoreaktivität in Bereichen aktivierter Synapsen durch eine spezifische Degradation des Zinki-Proteins herbeigeführt wird. Diese zweite Hypothese wird durch Experimente dieser

Doktorarbeit unterstützt, die zeigen, dass ein kleiner Teil des Zinki-Proteins nach kainatinduzierter synaptischer Aktivität durch das Ubiquitin-Proteasom-System markiert und abgebaut wird. Das Ubiquitin-Proteasom-System ist ein zellulärer Mechanismus, mit Hilfe dessen zum Abbau bestimmte Proteine mit Poly-Ubiquitinketten versehen, durch die 19S-Untereinheit des Proteasoms gebunden und anschließend durch den 20S-Kernpartikel spezifisch degradiert werden (Finley et al., 1984; Ciechanover et al., 1984). Die Ubiquitinierung von Proteinen ist ein spezifischer Prozess, der über eine Abfolge von enzymatischen Reaktionen stattfindet. Diese werden durch das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1, das Ubiquitin-konjugierende Enzym E2 und die Ubiquitin-Ligase E3 katalysiert (Tanaka et al., 1998). Die hier durchgeführten Experimente deuten daraufhin, dass nur ein sehr geringer Prozentsatz (0,5 %) des vorhandenen Zinki-Proteins ubiquitiniert und spezifisch degradiert wird. Weder in immunohistochemischen Färbungen des Hippokampus noch in Western-Blot-Analysen von Hippokampuslysaten konnte eine Abnahme des Zinkispezifischen Signals nach kainatinduziertem Krampfanfall detektiert werden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass der durch Kainat induzierte Effekt zu gering ist, um mit diesen Techniken detektiert zu werden. Bei dem *Pulldown* mit S5a-Protein, das an poly-ubiquitinierte Proteine bindet, wurden spezifisch die so modifizierten Proteine angereichert. Auf diese Weise war trotz geringer Menge das durch synaptische Aktivität poly-ubiquitinierte Zinki dann im Western Blot nachweisbar. Es gibt verschiedene Hinweise darauf, dass das Ubiquitin-Proteasom-System eine Rolle bei plastischen Vorgängen in Neuronen spielt (Steward und Schuman, 2003; Cline, 2003). So verändern sich zum Beispiel das Maß der Ubiquitinierung von Proteinen und damit auch das Maß ihres proteasomenabhängigen Abbaus innerhalb der postsynaptischen Dichte nach Aktivierung oder Blockierung der synaptischen Übertragung (Ehlers, 2003). Proteine, die durch neuronale Aktivität verstärkt ubiquitiniert und abgebaut werden, sind zum Beispiel die Strukturproteine Shank und GKAP, sowie die NMDA-Rezeptoruntereinheit NR1. Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit, die darauf hinweisen, dass das Arg3.1-mRNA-bindende Protein Zinki zu einem kleinen Teil aktivitätsabhängig durch das Ubiquitin-Proteasom-System reguliert wird, könnten also ein weiteres Indiz dafür sein, dass die ubiquitinvermittelte spezifische Degradation von Proteinen einen wichtigen Faktor bei der Ausbildung synaptischer Plastizität darstellt. Das Ubiquitin-Proteasom-System ist darüber hinaus auch in neuropathologische Prozesse involviert. Zum Beispiel wird die neurodegenerative Erkrankung Morbus Parkinson unter anderem durch Mutationen in verschiedenen Genen ausgelöst, die dem Ubiquitinsystem angehören (Leroy et al., 1998; Kitada et al., 1998; Shimura et al., 2000). Weitere neurodegenerative Erkrankungen, die mit

der Bildung von Proteinpräzipitaten einhergehen, wie zum Beispiel die Alzheimerkrankheit, die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) und Chorea Huntington, wurden ebenfalls mit dem Ubiquitin-Proteasom-System in Verbindung gebracht. In diesen Fällen ist allerdings oft nicht geklärt, ob Störungen im ubiquitinvermittelten Abbau durch das Proteasom Ursache oder Wirkung der Krankheit sind (Ciechanover und Brundin, 2003).

Die vorangehend beschriebenen Studien geben erste Hinweise auf eine mögliche Funktion Zinkis hinsichtlich seines Bindungspartners, der Arg3.1-mRNA. Zusammengefasst deuten sie darauf hin, dass Zinki ein negativer Regulator der Arg3.1-mRNA sein könnte. Dafür sprechen einerseits die Ergebnisse zur Translationsinhibition durch Zinki und andererseits die Beobachtungen, dass das Zinki-Protein Bereiche aktivierter Synapsen verlässt und als Folge eines kainatinduzierten Krampfanfalls zum Teil durch das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut wird. Die mRNA und das Protein von Arg3.1 dagegen werden durch neuronale Aktivität induziert und akkumulieren spezifisch an aktivierten Synapsen. Damit ist ein Szenario vorstellbar, bei dem Zinki unter Kontrollbedingungen, das heißt zum Beispiel in Bereichen unstimulierter Synapsen, die Synthese des Arg3.1-Proteins unterbindet. Nach Induktion synaptischer Aktivität könnte das Zinki-Protein dann aus den Bereichen, die stimuliert wurden, entweder durch spezifische Degradation oder durch aktiven Transport entfernt werden und so die Translation von Arg3.1 ermöglichen. Diese Theorie zur möglichen Funktion Zinkis bei der Ausbildung synaptischer Plastizität beruht allerdings zum größten Teil auf Spekulationen und muss in weiterführenden Experimenten überprüft werden.

### 3.4 Proteininteraktionspartner von Zinki

Eine Möglichkeit, mehr über die Funktion eines Proteins in der Zelle zu erfahren, ist die Analyse seiner Einbindung in bestimmte Proteinkomplexe. Im zweiten Teil der Doktorarbeit wurde daher die funktionelle Rolle Zinkis über die Identifikation möglicher Proteininteraktionspartner näher untersucht. Dazu wurde im Hefe Zwei-Hybrid-System eine hippocampale Ratten-cDNA-Bank mit dem N-Terminus von Zinki durchmustert. Es wurden insgesamt elf verschiedene Proteine als spezifische Interaktionspartner von Zinki isoliert, die bereits in Kapitel 2.5.1.2 beschrieben wurden. Näher diskutiert werden sollen hier nur PA28 $\gamma$  und GRF1, das auch in weiteren Experimenten analysiert wurde.

#### 3.4.1 Zinki bindet im Zwei-Hybrid-System spezifisch an PA28 $\gamma$

PA28 (oder auch S11) ist neben der 19S (PA700)-Untereinheit, die poly-ubiquitinierte Proteine bindet und entfaltet, eine weitere regulatorische Komponente des Proteasomenkomplexes. Diese regulatorischen Untereinheiten aktivieren den 20S-Kernpartikel, der den ATP-abhängigen Abbau von Proteinen vermittelt (Coux et al., 1996; Bochtler et al., 1999). Der PA28-Komplex des Proteasoms setzt sich aus PA28 $\alpha$ - und PA28 $\beta$ -Heterooligomeren oder PA28 $\gamma$ -Homooligomeren zusammen. Die aus den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten bestehenden PA28-Heterooligomere binden Peptide unabhängig von ihrer Ubiquitinierung und führen sie dem 20S-Kernpartikel zu, wo sie degradiert und anschließend für die Antigenpräsentation durch MHC-Klasse-1-Rezeptoren weiterprozessiert werden (Ahn et al., 1996). Sie sind daher ein Bestandteil der Immunantwort und ihre Expression wird durch  $\gamma$ -Interferon induziert (Realini et al., 1994). Die Funktion der als Interaktionspartner von Zinki identifizierten  $\gamma$ -Untereinheit von PA28 dagegen ist noch weitgehend unbekannt. PA28 $\gamma$  wurde insgesamt viermal im Zwei-Hybrid-Screen isoliert, wobei alle vier Klone die 217 C-terminalen Aminosäuren des 255 Aminosäuren umfassenden Proteins beinhalten. PA28 $\gamma$  liegt *in vivo* phosphoryliert vor (Li et al., 1996) und es gibt widersprüchliche Angaben über die Lokalisation des Proteins, die jedoch darauf hinweisen, dass das Protein sowohl im Kern als auch im Zytosol vorhanden ist (Wojcik et al., 1998; Wojcik, 1999). *Knockout*-Studien zeigen, dass PA28 $\gamma$  eine Rolle bei der Zellproliferation spielen könnte, denn Fibroblasten PA28 $\gamma$ -defizienter Mäuse sind größer und wachsen bis zu einer geringeren Dichte als Fibroblasten von Wildtypmäusen (Murata et al., 1999). Darüber hinaus haben die PA28 $\gamma$ -*Knockout*-Mäuse ein reduziertes Körpergewicht. Die Expression und Lokalisation von PA28 $\alpha$

und PA28 $\beta$  sind in diesen Mäusen nicht verändert. Dies spricht dafür, dass PA28 $\gamma$  eine spezifische Funktion in der Zelle erfüllt, die sich von der Funktion der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten unterscheidet und nicht durch diese kompensiert werden kann. *In vitro* Experimente zeigen aber, dass auch Homooligomere von PA28 $\gamma$  in der Lage sind, die proteolytische Funktion des 20S-Kernpartikels zu aktivieren (Gao et al., 2004). Neben den Ergebnissen zur Ubiquitinierung von Zinki nach kainatinduziertem Krampfanfall ist diese mögliche Interaktion mit PA28 $\gamma$  also ein zweiter Hinweis auf eine Verbindung zwischen Zinki und dem Proteasom-System. In wie weit PA28 $\gamma$  in den spezifischen Abbau von Zinki durch das Proteasom-System involviert ist, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

### 3.4.2 Zinki bindet GRF1 *in vivo* und *in vitro*

GRF1 ist ein neuronaler GDP/GTP-Austauschfaktor für Ras und katalysiert den Übergang der inaktiven, GDP-gebundenen Form von Ras in die aktive, GTP-gebundene Form. Nur in der GTP-gebundenen Form aktiviert Ras die nachgeschalteten Effektormoleküle und Signaltransduktionswege (s. hierzu Abb. 3.2). Das sind zum Beispiel der MAPK-Weg, die PI3-Kinase oder RalGDS (Robbins et al., 1992; Rodriguez-Viciano et al., 1994; Kodaki et al., 1994; Hofer et al., 1994). RalGDS ist ein GDP/GTP-Austauschfaktor für die GTPase Ral, die wiederum die für Modifikationen des Zytoskeletts verantwortlichen GTPasen CDC42 und Rac inhibiert (Feig et al., 1996). Die genannten Moleküle und Signalwege spiegeln nur einen sehr kleinen und unvollständigen Teil der in den Ras-Signalweg eingebundenen Faktoren wider. Auf Grund der hohen Komplexität seiner Signalintegration und -weiterleitung wird Ras daher häufig als „molekularer Schalter“ bezeichnet. Abgesehen von seiner Wirkung als GDP/GTP-Austauschfaktor für Ras kann GRF1 auch die kleine GTPase Rac aktivieren. Diese Wirkung wird über seine N-terminal gelegene Dbl-Homologie-Domäne vermittelt (Innocenti et al., 1999), eine konservierte katalytische Domäne in Rho/Rac-spezifischen GDP/GTP-Austauschfaktoren (Cerione und Zheng, 1996). Rac gehört zu der Familie der Rho/Rac-GTPasen, deren Funktion im Wesentlichen die Regulation des Zytoskeletts betrifft (Wong et al., 2000; BurrIDGE und Wennerberg, 2004).

GRF1 wurde von 102 sequenzierten Klonen des Zwei-Hybrid-Screens insgesamt 58-mal identifiziert. Von den 58 Klonen waren 19 unabhängige Klone, das heißt sie beinhalteten jeweils einen anderen Bereich der cDNA von GRF1. Dieser Befund weist auf eine (im Zwei-Hybrid-System) starke und glaubwürdige Interaktion hin. Der Screen wurde mit einer hippokampalen cDNA-Bibliothek pentylentetrazolinduzierter Ratten durchgeführt, der

durchmusterte *Pool* an cDNAs unterscheidet sich also deutlich vom Expressionsprofil unter Kontrollbedingungen. In dieser Arbeit wurde jedoch erstmals gezeigt, dass GRF1 kein aktivitätsreguliertes Gen ist und seine Expression sich nach pharmakologisch induzierten epileptischen Anfällen nicht verändert (vgl. Abb. 2.22). Die Isolierung einer solchen großen Zahl von GRF1-kodierenden Klonen ist daher nicht durch eine unnatürliche Anhäufung des GRF1-Transkripts in der für die cDNA-Bibliothek-Synthese eingesetzten mRNA-Präparation zu erklären, sondern beruht vermutlich auf einer starken Assoziation zwischen Zinki und GRF1 im Zwei-Hybrid-System. Durch die Analyse der Zinki-Bindungsdomäne von GRF1 im Zwei-Hybrid-System konnte gezeigt werden, dass die Interaktion über den C-Terminus von GRF1 vermittelt wird. Die drei C-terminalen Aminosäuren von GRF1 sind dabei essentiell für die Bindung. Alle im Zwei-Hybrid-Screen identifizierten cDNAs der Proteinbindungspartner von Zinki beinhalten, bis auf eine Ausnahme, nämlich *Aplp1*, den vollständigen C-Terminus des jeweiligen Proteins (s. Tabelle 2.1). Dies und die Tatsache, dass die Deletion der C-terminalen drei Aminosäuren von GRF1 seine Bindung an Zinki aufhebt, legt die Vermutung nahe, dass Zinki seine Interaktionspartner über eine spezifische C-terminale Erkennungssequenz bindet. Beim Vergleich der jeweils C-terminalen 20 Aminosäuren der identifizierten Proteininteraktionspartner mit Hilfe des Computerprogramms CLUSTAL W konnte aber keine gemeinsame Konsensussequenz ermittelt werden, die auf einen einheitlichen Bindungsmodus mit dem N-Terminus von Zinki schließen ließ.

Die Interaktion zwischen Zinki und GRF1 konnte in verschiedenen *Pulldown*-Experimenten bestätigt werden. Sowohl ein GST-Fusionsprotein von Zinki als auch ein rekombinantes Zinki-Protein mit *His<sub>6</sub>-tag* konnten GRF1 spezifisch aus einem Mausgehirnlysat präzipitieren. Umgekehrt wurde ein in HEK293-Zellen exprimiertes EGFP-Zinki-Protein mit einem GST-Fusionsprotein, das die C-terminalen 350 Aminosäuren von GRF1 enthielt, präzipitiert, während die C-terminalen 24 Aminosäuren von GRF1 dazu nicht mehr ausreichten. Auffällig beim Vergleich dieser Experimente ist, dass die rekombinanten Zinki-Proteine sehr gut in der Lage waren, endogenes GRF1 aus einem Gehirnlysat zu präzipitieren, während die Präzipitation von endogenem Zinki aus Mausgehirnlysat mit einem rekombinanten GRF1-Protein nicht erfolgreich war. Lediglich in sekundären Zellen überexprimiertes Zinki wurde von GRF1 gebunden. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass GRF1 auf Grund der Fusion an GST eine veränderte, unnatürliche Proteinkonformation annimmt, die zu einer Abschwächung seiner Bindung an Zinki führt. Ein weiteres Problem könnte darin bestehen, dass jeweils mit rekombinanten Proteinen, deren cDNAs aus der Ratte stammten, Proteine aus einem Mausgehirnlysat präzipitiert werden sollten. Es ist also möglich, dass rekombinantes

GRF1 aus der Ratte zwar in der Lage ist, das rekombinante Zinki, dessen cDNA aus dem gleichen Organismus stammt, zu präzipitieren, seine Affinität zum Maus-Homolog von Zinki aber zu gering ist, um eine Bindung im *Pulldown*-Assay zu vermitteln. Die Isolierung der cDNA des Maus-Homologs von Zinki könnte Aufschluss über diese Fragestellungen geben. Trotz dieser Einschränkung konnte die im Zwei-Hybrid-System identifizierte Proteininteraktion zwischen Zinki und GRF1 überzeugend *in vitro* verifiziert werden.

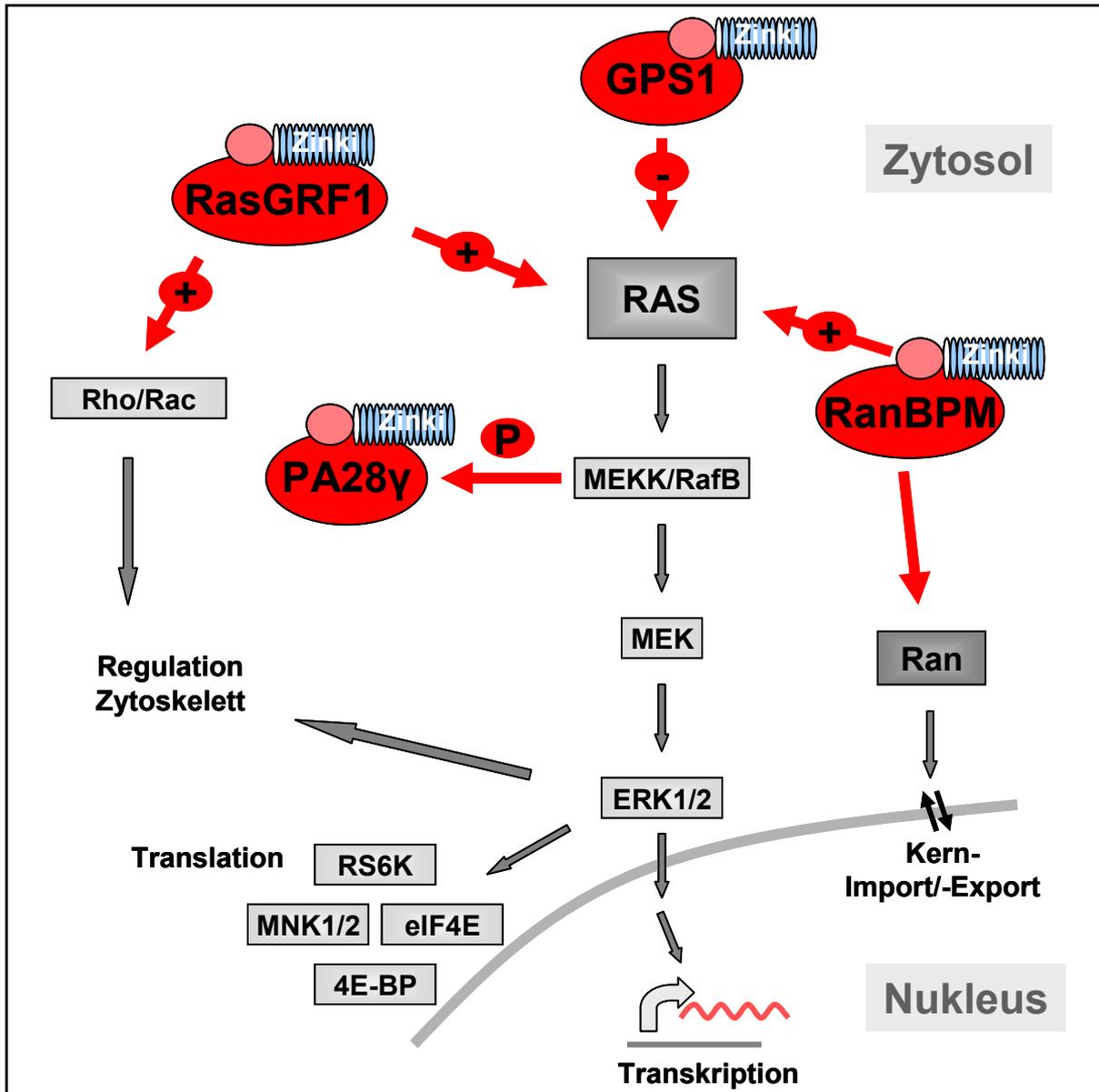
Darüber hinaus konnte die Interaktion zwischen Zinki und GRF1 nicht nur *in vitro*, sondern auch über eine Ko-Immunopräzipitation *in vivo* nachgewiesen werden. Bei einer Ko-Immunopräzipitation wird mit Hilfe eines Antikörpers (in diesem Fall gegen Zinki) ein spezifisches Protein und alle daran gebundenen Proteine, d.h. also ein ganzer Proteinkomplex präzipitiert. Das Protein GRF1 konnte auf diese Weise mit einem Zinki-spezifischen Antiserum kopräzipitiert werden. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die beiden Proteine auch *in vivo* in einem Komplex lokalisiert sind. Ebenso demonstrierten immunohistochemische Färbungen mit Zinki-spezifischem Antiserum beziehungsweise GRF1-spezifischen Antikörpern eine Kolokalisierung der beiden Proteine in Gehirndünnschnitten. Dabei stimmten sowohl die Gehirnbereiche, in denen die Proteine nachgewiesen werden konnten, als auch ihre subzelluläre somatodendritische Verteilung im Wesentlichen überein. Subzelluläre Verteilungen von Proteinen können zusätzlich anhand von Zellfraktionierungen verglichen werden. Die Analyse der Fraktionen einer Aufreinigung von postsynaptischen Dichten zeigte, dass beide Proteine in den Synaptosomen enthalten sind. Im Gegensatz zu Zinki ist GRF1 aber auch in der postsynaptischen Dichte detektierbar. Dies entspricht den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die GRF1 ebenfalls in der postsynaptischen Membran nachweisen konnten (Sturani et al., 1997). Die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten elektronenmikroskopischen und biochemischen Analysen der Verteilung seines Bindungspartners Zinki haben dagegen gezeigt, dass das Protein zwar in Dendriten und deren Dornfortsätzen lokalisiert ist, aber nicht mit der postsynaptischen Dichte assoziiert ist. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass GRF1 in der Zelle in zwei verschiedenen Proteinkomplexen vorliegen könnte. Einer dieser Komplexe ist dendritisch lokalisiert und enthält vermutlich auch Zinki, bei dem anderen handelt es sich um die postsynaptische Dichte, wo GRF1 nicht an Zinki gebunden vorliegt. Für zwei verschiedene GRF1-enthaltende Zellfraktionen spricht auch die Tatsache, dass GRF1 zwar in der PSD-Fraktion detektiert werden konnte, allerdings dort nicht angereichert war, wie zum Beispiel PSD95, das ursprünglich als in der postsynaptischen Dichte lokalisiertes Protein identifiziert wurde (Nieto-Sampedro, et al., 1981). Auch kürzlich veröffentlichte Arbeiten einer anderen

Arbeitsgruppe weisen daraufhin, dass GRF1 sowohl in Synaptosomen als auch im Zytosol vorhanden ist (Zippel et al., 2004). Diese Studie zeigt, dass GRF1 im Zytosol mit Mikrotubuli, also dem Zytoskelett assoziiert ist. Ob Zinki über seinen Interaktionspartner GRF1 ebenfalls an das Zytoskelett gebunden ist, müssen weitere Experimente zeigen. Das Protein GRF1 existiert abgesehen von seiner möglichen Assoziation mit zwei verschiedenen Proteinkomplexen auch hinsichtlich seiner enzymatischen Funktion in zwei unterschiedlichen Zuständen. Es kann nämlich entweder als ein aktiver GDP/GTP-Austauschfaktor oder als ein inaktives Enzym vorliegen. Verschiedene Faktoren können die enzymatische Funktion von GRF1 aktivieren. Zu diesen gehören Kalzium, heterotrimere G-Proteine und der NMDA-Rezeptor (vgl. Kap. 2.5.7 des Ergebnisteils), aber auch diverse Kinasen wie CamKII, Ack, Lck, und PKA (Sturani et al., 1997; Kiyono et al., 2000; Giglione et al., 2001; Baouz et al., 2001). Außerdem ist GRF1 ein bifunktionaler GDP/GTP-Austauschfaktor, der sowohl Ras über die C-terminale katalytische Domäne CDC25 als auch Rac über seine mehr N-terminal gelegene Dbl-Homologie-Domäne aktivieren kann. Eine interessante Frage zur Aufklärung der Signalweiterleitung durch GRF1 könnte daher sein, in wie weit seine enzymatische Aktivität mit seiner Lokalisation in unterschiedlichen Proteinkomplexen innerhalb der Zelle korreliert und ob die Bindung von GRF1 an Zinki an dieser Regulation beteiligt ist.

#### **3.4.3 Verschiedene mögliche Proteininteraktionspartner von Zinki sind in den Ras/MAPK-Signalweg involviert**

Mit Hilfe des während dieser Doktorarbeit durchgeführten Zwei-Hybrid-Screens wurden neben GRF1 noch weitere Mitglieder des Ras/MAPK-Weges als mögliche Proteininteraktionspartner von Zinki identifiziert. Dazu gehörten die Proteine GPS1 und RanBPM, die unterschiedliche Funktionen innerhalb dieser Signalkaskade erfüllen. In Zellen, die mit v-Src, einer konstitutiv aktiven Form der Src-Kinase, transfiziert waren, verhindert GPS1 die normalerweise durch dieses Onkogen ausgelöste Aktivierung des Ras/MAPK-Weges (Spain et al., 1996). Diese Beobachtung deutet daraufhin, dass GPS1 eine supprimierende Wirkung auf den Ras/MAPK-Weg haben könnte. Der genaue Mechanismus dieses Effekts ist allerdings noch nicht bekannt. RanBPM wurde ursprünglich als Bindungspartner der kleinen GTPase Ran identifiziert (Nakamura et al., 1998). Ran ist involviert in den Kerntransport von Proteinen sowie in den Zusammenbau der mitotischen Spindel und der Kernhülle, wodurch es einen wichtigen Faktor für die räumliche und zeitliche Organisation in eukaryotischen Zellen darstellen könnte (Quimby und Dasso, 2003).

Abgesehen von seiner Bindung an Ran gibt es aber auch Hinweise, dass RanBPM die GTPase Ras aktivieren kann und damit in die Signaltransduktion des Ras/MAPK-Weges involviert ist (Wang et al., 2002a). Kürzlich wurde gezeigt, dass der schon erwähnte potentielle Zinki-Interaktionspartner PA28 $\gamma$  sowohl mit RafB, als auch mit MEKK3 interagiert, zwei funktionellen Homologen im Ras/MAPK-Signaltransduktionsweg (Hagemann et al., 2003). Zusätzlich zu dieser Bindung konnten Hagemann und Kollegen zeigen, dass PA28 $\gamma$  durch MEKK3 phosphoryliert wird und seine Expression in Anwesenheit dieser Kinase hochreguliert wird. Diese Befunde deuten daraufhin, dass auch eine Verbindung zwischen PA28 $\gamma$  und dem Ras/MAPK-Signalweg besteht. Die Identifikation einer größeren Zahl von Proteinen eines Signaltransduktionsweges als Bindungspartner von Zinki könnte bedeuten, dass Zinki mit diesem Signalkomplex assoziiert ist und vielleicht sogar eine Funktion innerhalb seiner Signalkaskade übernimmt. Abbildung 3.2 gibt einen Überblick über den Ras/MAPK-Signalweg und die Einbindung der putativen Bindungspartner von Zinki in diesen Komplex. Der Ras/MAPK-Signalweg ist eine wichtige Signalkaskade innerhalb der Zelle und besteht im Wesentlichen aus einer Abfolge hintereinander geschalteter Proteinkinasen, die letztendlich über die Phosphorylierung von Effektorproteinen die Transkription und Translation in der Zelle regulieren (Frodin und Gammeltoft, 1999; Arthur und Cohen, 2000; Wiggin et al., 2002; Yang et al., 2003). Zentrale Schaltstelle des Ras/MAPK-Signaltransduktionsweges ist die kleine GTPase Ras, die diverse extrazelluläre und intrazelluläre Signale integriert und an die nachgeschalteten Effektormoleküle, die MAPK Kinase Kinasen (wie zum Beispiel RafB und MEKK3) weitergibt. Neben seiner Bedeutung bei Zellteilung, -wachstum und -differenzierung und damit unter anderem auch bei der Ausbildung von Tumoren (Chong et al., 2003) spielt dieser Signaltransduktionsweg ebenso eine Rolle bei plastischen Vorgängen im Gehirn, wie zum Beispiel Lernen und Gedächtnisbildung (Mazzucchelli und Brambilla, 2000; Thomas und Huganir, 2004).



**Abb. 3.2:** Schematische Übersicht über den Ras/MAPK-Signalweg und die Einbindung potentieller Zinki-Bindungspartner

Die Abbildung zeigt eine Übersicht über den Ras/MAPK-Signalweg und mit ihm assoziierte Signaltransduktionsmoleküle. Die im Zwei-Hybrid-Screen identifizierte potentiellen Bindungspartner von Zinki sind rot gekennzeichnet, ihre jeweilige Funktion hinsichtlich anderer Proteine ist durch rote Pfeile dargestellt. Dabei bedeutet ein einfacher roter Pfeil lediglich eine Bindung, (+) und (-) bezeichnen eine aktivierende bzw. inhibierende Wirkung und (P) bedeutet Phosphorylierung. Die Richtung des Pfeils zeigt, ob die Zinki-Bindungspartner Ziel oder Ursprung der Wirkung sind. **GRF1** aktiviert einerseits Ras, das über die MAPK-Kaskade z. B. einen Einfluss auf die Transkription und Translation hat. Andererseits kann GRF1 aber auch die in die Regulation des Zytoskeletts involvierten GTPasen der Rho/Rac-Familie aktivieren. **RanBPM** bindet die GTPase Ran, die unter anderem den Kernimport und -export reguliert, und aktiviert ebenfalls Ras. **GPS1** hat eine inaktivierende Wirkung auf Ras und die nachgeschalteten Signalwege. Die Proteasomenuntereinheit **PA28γ** interagiert mit den Ras-Effektorproteinen MEKK3 und RafB und wird durch diese phosphoryliert.

### 3.5 Die Deletion von GRF1 und anderen Komponenten des Ras/MAPK-Weges führt zu Defiziten bei der Ausbildung synaptischer Plastizität

Mehrere im Zwei-Hybrid-System identifizierte Interaktionspartner von Zink1 stellen eine direkte (GPS1, RanBPM und GRF1) oder eine indirekte (PA28 $\gamma$ ) Verbindung zwischen Zink1 und dem Ras/MAP-Kinaseweg her. Frühere Studien in unserem Labor konnten zeigen, dass die Induktion von Arg3.1 durch cAMP und Kalzium in PC12-Zellen und Primärkulturen hippocampaler Neuronen von der Aktivierung der MAP Kinase abhängt (Waltereit et al., 2001). Arbeiten verschiedener anderer Labore innerhalb der letzten Jahre bekräftigen die Annahme, dass der Ras/MAPK-Weg eine wichtige Rolle bei der Ausbildung synaptischer Plastizität spielt (Thomas und Huganir, 2004). Erkenntnisse zur Bedeutung dieses Signaltransduktionsweges bei plastischen Vorgängen im Gehirn wurden und werden hauptsächlich durch spezifische Blockade eines Faktors der Kaskade gewonnen. Diese Blockade kann durch chemische Inhibitoren oder durch Deletion des entsprechenden Gens erreicht werden. Schon relativ früh konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die pharmakologische Hemmung der Proteinkinase MEK die Induktion von LTP im Hippokampus verhindert (English und Sweatt, 1997). Die Analysen verschiedener Mauslinien, in denen Komponenten des Ras/MAPK-Weg durch genetische Manipulationen deletiert wurden, unterstreichen seine Bedeutung für die Ausbildung synaptischer Plastizität. Ein Beispiel ist das Protein NF1, das die GTPase-Funktion von Ras erhöht und damit zu seiner rascheren Inaktivierung führt. Mäuse, die eine heterozygote Deletion dieses Proteins aufweisen, zeigen Defizite in räumlichem Lernen, die durch pharmakologische Inhibition von Ras wieder aufgehoben werden können (Silva et al., 1997; Costa et al., 2002). Bei Menschen führt eine Mutation dieses Gens zu Neurofibromatosis, einer Erbkrankheit, die zu Störungen der Entwicklung und des Wachstums von Nervenzellen führt, was eine verstärkte Tumorbildung und eine deutlichen Reduktion der kognitiven Fähigkeiten hervorruft. Die Auswirkungen einer Deletion des Zink1-Bindungspartners GRF1 auf die Ausbildung synaptischer Plastizität in Mäusen werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Es gibt Studien über insgesamt drei unabhängige GRF1-*Knockout*-Mauslinien, die sich im Phänotyp zum Teil deutlich voneinander unterscheiden. Alcino Silva und Mitarbeiter haben eine Neomycinkassette in die N-terminal gelegene Dbl-Homologie-Domäne von GRF1 (s. hierzu Kap. 2.5.2, Abb. 2.14) inseriert, die in Mäusen zur vollständigen Deletion des Transkripts führte. Sie berichten von leichten Defiziten im hippocampusabhängigen Lernverhalten dieser Mäuse, wohingegen amygdalaabhängiges Lernen nicht beeinträchtigt ist (Giese et al., 2001).

Darüber hinaus haben diese Mäuse ein reduziertes Körpergewicht. Eine weitere GRF1-*Knockout*-Mauslinie wurde von Itier und Kollegen durch Deletion der C-terminal gelegenen katalytischen Domäne generiert, was auch hier zum vollständigen Verlust des Transkripts führte (Itier et al., 1998). Diese Mäuse zeigen ebenfalls ein reduziertes Körpergewicht und wurden nicht auf Defizite im Verhalten oder bei der Ausbildung von LTP getestet. Auch Brambilla und Kollegen haben durch genetische Modifikationen, die die katalytische Domäne im C-Terminus deletieren und die Transkription von GRF1 vollständig verhindern, GRF1-*Knockout*-Mäuse generiert. Diese zeigen jedoch keine Auffälligkeiten bei der Bewältigung und Konsolidierung hippokampusabhängiger Lernaufgaben, sind allerdings beeinträchtigt in der Konsolidierung von amygdalaabhängigem Lernen (Brambilla et al., 1997). In Korrelation dazu haben diese Mäuse keine Defizite der LTP in der CA1-Region, sind aber deutlich inhibiert in der Ausbildung von LTP in der Amygdala. Insgesamt weisen die hippokampalen Neuronen dieser GRF1-*Knockout*-Mäuse eine höhere basale synaptische Aktivität und eine stärkere elektrophysiologische Erregbarkeit auf (Tonini et al., 2001). Die unterschiedlichen Ergebnisse der Analysen von GRF1-*Knockout*-Mäusen könnten teilweise auf Faktoren wie abweichende genetische Hintergründe der Mauslinien oder verschiedene experimentelle Bedingungen zurückgeführt werden. Trotz dieser Widersprüche machen die Analysen der GRF1-*Knockout*-Mäuse deutlich, dass GRF1 eine wichtige Rolle bei der Ausbildung synaptischer Plastizität spielt.

#### **3.5.1 Die Zinki-Expression im Gehirn von GRF1-*Knockout*-Mäusen ist nicht verändert**

Unserem Labor wurden sechs der von Riccardo Brambilla und Mitarbeitern generierten GRF1-*Knockout*-Mäuse einschließlich ihrer Wildtypgeschwister für weitere Untersuchungen zu Verfügung gestellt. Über die Analyse der Verteilung der Arg3.1-mRNA und der Expression des Arg3.1- und Zinki-Proteins in den Gehirnen dieser Mäuse sollte festgestellt werden, ob das Fehlen des Zinki-Bindungspartners GRF1 eine Auswirkung auf die Proteinlokalisierung von Zinki und Arg3.1 oder die mRNA-Verteilung von Arg3.1 hat. Die Expression des Zinki-Proteins ist im GRF1-*Knockout* unverändert, unter Kontrollbedingungen genauso wie nach generalisierter neuronaler Aktivität. Weder im Hippokampus noch in der Amygdala oder im somatosensorischen und entorhinalen Kortex konnte eine Veränderung der Stärke seiner Expression oder seiner somatodendritischen Verteilung nachgewiesen werden. Die zelluläre Expression, Stabilität und Lokalisation von Zinki ist demzufolge also nicht

abhängig von der Anwesenheit seines Interaktionspartners GRF1. Dies spricht dafür, dass die somatodendritische Verteilung Zinkis durch andere Faktoren hervorgerufen und/oder stabilisiert wird. Im Zwei-Hybrid-Screen mit Zinki konnten noch zehn weitere spezifische Proteinbindungspartner identifiziert werden. Auch wenn davon auszugehen ist, dass nicht alle zehn Proteine tatsächlich *in vivo* an das Zinki-Protein binden, weist diese große Zahl möglicher Interaktionspartner auf eine Einbindung Zinkis in verschiedene Proteinkomplexe hin. Dies könnte erklären, warum die Deletion eines seiner Bindungspartner keine deutliche Auswirkung auf die subzelluläre Verteilung des Zinki-Proteins hat. Hinzukommt, dass keine der durchgeführten Analysen zur Bindung von Zinki an GRF1 einen Beweis für eine direkte Interaktion darstellt. Sowohl in Hefen als auch bei *Pulldown*-Assays und Ko-Immunopräzipitationen aus Gehirn- beziehungsweise Zelllysate könnte die Bindung der beiden Proteine über ein oder mehrere zwischengeschaltete Proteine vermittelt werden. Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten lichtmikroskopischen Analysen kann außerdem keine Aussage über das Vorliegen Zinkis in bestimmten Proteinkomplexen getroffen werden. Für weitergehende Studien wäre es daher von Interesse zu untersuchen, ob Zinki sowohl im Wildtyp als auch im GRF1-*Knockout* mit Komponenten des Ras-Signalwegs assoziiert ist. Außerdem deuten Ergebnisse dieser Arbeit an, dass Zinki abgesehen von GRF1 ebenso das GRF1-Homolog GRF2 bindet (s. hierzu Kap. 2.5.5.1, Abb. 2.17). GRF2 ist ca. 80 % homolog zu GRF1 und wird ebenfalls im ZNS, aber auch in anderen Geweben wie Lunge, Herz und Niere exprimiert (Fam et al., 1997). Die beiden Proteine unterscheiden sich hauptsächlich in einem Bereich N-terminal von der katalytischen CDC25-Domäne, und sie besitzen identische enzymatische Funktionen. Ihre enzymatische Aktivität wird darüber hinaus durch die gleichen Faktoren, wie zum Beispiel Kalzium, reguliert (Fan et al., 1998). Auch wenn Doppel-*Knockout*-Studien darauf hinweisen, dass die beiden Proteine unterschiedliche Funktionen ausüben und sich nicht gegenseitig kompensieren (Fernandez-Medarde et al., 2002), könnte die Bindung von Zinki an GRF2 das Fehlen von GRF1 ausgleichen. Hinzu kommt, dass die Zinki-Expression und -Lokalisation in Arg3.1-defizienten Mäusen ebenfalls unverändert ist. Auch die Abwesenheit eines seiner RNA-Bindungspartner, der Arg3.1-mRNA, hat demnach keine lichtmikroskopisch detektierbare Auswirkungen auf die Verteilung des Zinki-Proteins. Diese Beobachtung könnte wie im Falle von GRF1 auch hier durch die Existenz vieler mRNA-Bindungspartner von Zinki erklärt werden. So konnte neben der Arg3.1-mRNA bereits eine weitere mRNA identifiziert werden, die spezifisch an Zinki bindet, nämlich die ebenfalls dendritisch lokalisierte CaMKII-mRNA (Putz, 1999). Zusammengefasst sprechen die immunohistochemischen Analysen der GRF1- und auch der Arg3.1-*Knockout*-Mäuse

dafür, dass die Lokalisierung von Zinki nicht abhängig ist von der Anwesenheit einzelner Interaktionspartner. Die subzelluläre Verteilung des Zinki-Proteins wird daher vermutlich über seine Einbindung in umfangreichere Protein- und RNA-Komplexe reguliert.

### **3.5.2 Die Arg3.1-Expression im Gehirn von GRF1-*Knockout*-Mäusen ist verändert**

Im Gegensatz zur Zinki-Expression zeigte die Arg3.1-Expression in GRF1-*Knockout*-Mäusen Unterschiede auf Proteinebene und noch deutlicher auf RNA-Ebene, die nur nach kainatinduziertem Krampf auftraten. In den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen war die Expression von Arg3.1 in der CA1- und CA3- Region des Hippokampus in GRF1-*Knockout*-Mäusen stärker als im Wildtyp. Im *Gyrus dentatus* dagegen schien die Deletion von GRF1 zu einer schwächeren Arg3.1-Expression zu führen. Dieses Phänomen wurde auf Protein- und auf RNA-Ebene in zwei verschiedenen Tieren beobachtet, was einen zufälligen Effekt unwahrscheinlicher macht. Die basale Expression von Arg3.1 war in beiden Genotypen vergleichbar schwach und auf Proteinebene kaum detektierbar. Embryonale hippocampale Neuronen von GRF1-*Knockout*-Tieren haben ein depolarisiertes Ruhepotential im Vergleich zu Wildtypneuronen und bilden deutlich mehr spontane Aktionspotentiale aus (Tonini et al., 2001). Adulte hippocampale Neuronen von GRF1-*Knockout*-Mäusen zeigen außerdem höhere EPSPs in der CA1-Region und in der Amygdala (Brambilla et al., 1997). Brambilla und Kollegen führen diese erhöhte Aktivität GRF1-defizienter Neuronen auf eine veränderte intrinsische Erregbarkeit der Neuronen zurück, die durch die Störung des Gleichgewichts von Ionenleitfähigkeiten in den Zellen ausgelöst wird. Diese elektrophysiologischen Eigenschaften der Neuronen von GRF1-*Knockout*-Mäusen könnten ein Indiz für eine wichtige Funktion von GRF1 bei der Kontrolle neuronaler Erregbarkeit sein. In diesen Zusammenhang könnte auch die veränderte Expression des aktivitätsregulierten Gens Arg3.1 gestellt werden. Arg3.1 ist ein Marker für neuronale Aktivität, seine Expression wird durch diverse plastizitätsauslösende Stimuli induziert, wie zum Beispiel LTP und die Exploration neuer Umweltreize (Link et al., 1995; Montag-Sallaz et al., 1999; Pinaud et al., 2001; Kelly und Deadwyler, 2002). Sein Expressionsmuster könnte daher die veränderte synaptische Übertragung in GRF1-*Knockout*-Mäusen widerspiegeln. Noch auffälliger als die veränderte Expression der Arg3.1-mRNA und des Proteins im Hippokampus ist die starke Hochregulation der mRNA nach kainatinduziertem Krampf in Schicht III des entorhinalen Kortexes und des somatosensorischen Kortexes der GRF1-*Knockout*-Mäuse. Die Verteilung

der Arg3.1-mRNA in Wildtypgehirnen nach Kainatinjektion zeigt eine erhöhte Expression in den Schichten II, III, IV und VI des entorhinalen und somatosensorischen Kortexes. Dieses Expressionsmuster ist auch in Ratten nach Gabe von Pentylentetrazol (Link et al., 1995), nach Präsentation sensorischer Reize (*enriched environment*, Pinaud et al., 2001) und nach dem Erlernen einer neuen Aufgabe (Kelly und Deadwyler, 2002) zu detektieren. Eine signifikante Erhöhung des Arg3.1-mRNA-Signals in Schicht III des entorhinalen Kortexes von Wildtypmäusen oder -ratten beobachtet man nach keiner der genannten Stimulationsarten. Der entorhinale Kortex ist die wichtigste Quelle des Signaleingangs in den Hippokampus und zusammen mit dem *Subiculum* auch das bedeutendste Ziel für den Informationsfluss aus dem Hippokampus heraus (Köhler, 1986; Witter et al., 1989; van Groen et al., 2003). Seine tieferen Zellschichten IV-VI sind Eingangspunkt für Signale aus der CA1-Region und dem Subiculum (Witter et al., 1989). Sie kommunizieren mit den mehr an der Oberfläche gelegenen Zellschichten II und III (Köhler, 1986) und leiten Information aus dem Hippokampus weiter in andere kortikale Regionen (Swanson und Cowan, 1977). Die Projektionen der oberen Zellschichten II und III dagegen bilden als *Tractus perforans* den Hauptsignaleingang in den Hippokampus (Steward und Scoville, 1976). In der Maus projizieren dabei die Neuronen der Schicht II in die Molekularschicht des *Gyrus dentatus* und die Neuronen der Schicht III in die CA1- und CA3-Region des Hippokampus (van Groen et al., 2003). Bemerkenswerterweise ist das Arg3.1-Protein und noch deutlicher seine mRNA gerade in der CA1- und CA3-Region des Hippokampus von GRF1-*Knockout*-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp hochreguliert. Die Regionen veränderter Arg3.1-Expression im Gehirn von GRF1-*Knockout*-Mäusen korrelieren also mit den neuronalen Verschaltungswegen. Veränderungen in Zellschicht III des entorhinalen Kortexes stehen möglicherweise auch im Zusammenhang mit der größeren Empfindlichkeit in Bezug auf Krampfgifte, die in diesen Mäusen beobachtet werden kann (Tonini et al., 2001), denn die Zellschicht III des entorhinalen Kortex ist am Krankheitsbild der Epilepsie beteiligt. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Temporallappenepilepsie die spezifische Degradation von Neuronen dieser Zellschicht mit sich führt (Du et al., 1993, 1995; Schwarcz et al., 2000). Ob die erhöhte Expression der Arg3.1-mRNA in der kortikalen Zellschicht III tatsächlich eine Auswirkung auf die physiologischen Eigenschaften dieser Neuronen hat, ist allerdings fraglich, da dieses Expressionsmuster nur auf mRNA-Ebene detektiert werden konnte. Auf Proteinebene war diese spezielle Verteilung im GRF1-*Knockout* nicht zu erkennen, die Expression war lediglich generell leicht erhöht verglichen zum Wildtyp.

Die Deletion der Arg3.1-mRNA und des Proteins führt zu starken Beeinträchtigungen in der Ausbildung lang anhaltender synaptischer Modifikationen. So sind Arg3.1-*Knockout*-Mäuse unter anderem inhibiert in der räumlichen Gedächtnisbildung (Plath et al., 2003). Das Fehlen dieses Proteins verursacht also eine deutliche Beeinträchtigung der Funktion des Hippokampus. Ein leicht verändertes Expressionsmuster von Arg3.1 in dieser Region, wie im Falle der GRF1-*Knockout*-Mäuse scheint die Funktion des Hippokampus in Bezug auf die Konsolidierung hippokampusabhängiger Lernaufgaben jedoch nicht nennenswert zu beeinflussen, denn die hier analysierten GRF1-*Knockout*-Mäuse zeigen keine offensichtlichen Defizite in räumlichem Lernen. Im Gegensatz dazu ist ihre Fähigkeit zur Konsolidierung von furchtkonditioniertem Lernen beeinträchtigt (Brambilla et al., 1997), was für eine Störung der Funktion der Amygdala spricht. Auch die Arg3.1-*Knockout*-Mäuse zeigen Defizite bei der Ausbildung von amygdalaabhängigem Langzeitgedächtnis (Plath et al., 2003). Es konnte jedoch kein wesentlicher Unterschied in der Expression von Arg3.1-mRNA und -Protein in der Amygdala zwischen Wildtypmäusen und GRF1-*Knockout*-Mäusen detektiert werden. Die Defizite der GRF1-*Knockout*-Tiere bei der Konsolidierung von Furchtkonditionierung sind also wahrscheinlich nicht auf Änderungen der Arg3.1-Expression zurückzuführen. Das leicht modifizierte Arg3.1-Expressionsmuster hängt demnach vermutlich nicht mit den Lern- und Verhaltensdefiziten der GRF1-*Knockout*-Mäuse zusammen.

Diese Ergebnisse zur Expression des Arg3.1-Proteins und seiner mRNA in den GRF1-*Knockout*-Mäusen und ihre Interpretation sind allerdings unter Vorbehalt zu sehen, da sie auf der Analyse von nur wenigen Tieren beruhen, also lediglich vorläufig sind und auf jeden Fall in weiteren Experimenten mit höheren Zahlen von Versuchstieren bestätigt werden müssen.

### 3.6 Funktionelle Zusammenhänge zwischen GRF1, Arg3.1 und Zinki

GRF1 ist ein zweiseitiger GDP/GTP-Austauschfaktor, der sowohl Ras als auch Rac aktivieren kann. Auf diese Weise übernimmt das Protein eine Funktion bei der Kontrolle der Ras-vermittelten Genexpression und bei der Rac-vermittelten Modulation des Zytoskeletts. Beides können elementare Mechanismen solcher Prozesse sein, die zu Veränderungen der synaptischen Übertragung im Gehirn führen. Die Bedeutung von GRF1 für die Ausbildung neuronaler Plastizität (Orban et al., 1999) wird außerdem durch die veränderte Expression von Arg3.1 im Gehirn von GRF1-*Knockout*-Mäusen unterstrichen. Arg3.1 ist elementar für aktivitätsinduzierte Modifikationen im Gehirn, wie zum Beispiel LTP, sein differentielles Expressionsmuster könnte daher ein Zeichen für die Störung dieser Vorgänge, hervorgerufen durch die Deletion von GRF1, sein. Neuere Studien geben weitere Hinweise auf eine Beteiligung von GRF1 an plastischen Vorgängen im Gehirn, denn GRF1 interagiert mit der NMDA-Rezeptoruntereinheit NR2B und die Aufhebung dieser Bindung verhindert die NMDA-Rezeptor-abhängige Aktivierung von ERK1/2 (Krapivinsky et al., 2003). Arg3.1 ist Bestandteil des NMDA-Rezeptorkomplexes (Husi et al., 2000; Plath et al., 2003) und seine Expression ist NMDA-Rezeptor-abhängig (Link et al., 1995; Steward und Worley, 2001). Die Assoziation von GRF1 mit NR2B und seine so vermittelte Beteiligung an der Signaltransduktion des NMDA-Rezeptors schafft also neben der Interaktion mit Zinki eine weitere funktionelle Verknüpfung zwischen Arg3.1 und GRF1. In wie weit Zinki in diesen Signaltransduktionsweg eingreift oder ob seine Interaktion mit GRF1 eine andere Bedeutung hat, konnte während der Doktorarbeit nicht geklärt werden. Auch die Frage nach einer funktionellen Verknüpfung zwischen der Bindung von Zinki an GRF1 und seiner möglichen Rolle als Translationsinhibitor bleibt offen. In diesem Zusammenhang erwähnenswert ist, dass die Veränderungen der Arg3.1-Proteinexpression im Hippokampus der GRF1-*Knockout*-Mäuse die veränderte mRNA-Expression widerspiegeln. Diese Effekte sind also nicht auf eine gestörte Translationsregulation von Arg3.1 in den GRF1-*Knockout*-Mäusen zurückzuführen. Auffällig ist allerdings die starke Hochregulation der Arg3.1-mRNA in Zellschicht III des entorhinalen Kortexes, die auf Proteinebene nicht detektierbar ist. Dies könnte ein Hinweis auf eine inhibierte Arg3.1-Proteinsynthese in Abwesenheit des Zinki-Bindungspartners GRF1 sein. Dennoch sprechen die Analysen der GRF1-*Knockout*-Mäuse eher für eine GRF1-abhängige Regulation der Arg3.1-Expression auf Ebene der Transkription als auf Ebene der Translation. Die Abwesenheit des Zinki-Bindungspartners GRF1 kann also auf Grund dieser Ergebnisse nicht in einen Kontext mit der möglichen Funktion Zinkis als

Inhibitor der Translation von Arg3.1 gestellt werden. Es gibt jedoch verschiedene Hinweise darauf, dass der MAPK-Weg eine wichtige Funktion bei der Regulation der Proteinsynthese einnimmt. Die Mitglieder der an der Translationsinitiation beteiligten RSK-Familie zum Beispiel sind Substrate von ERK1/2, die am Ende der Ras/MAPK-Signalkaskade steht (Frodin und Gammeltoft, 1999). Darüber hinaus wird durch die Inhibition der Phosphorylierung von ERK1/2 die Phosphorylierung der Translationsfaktoren eIF4E und 4E-BP1, sowie des ribosomalen Proteins S6 gehemmt und gleichzeitig die durch neuronale Aktivität induzierte Translation blockiert (Kelleher III. et al., 2004). Dies ist also ein direktes Indiz für eine aktivierende Rolle des Ras/MAPK-Signaltransduktionsweges bei der Regulation der Proteinsynthese (vgl. hierzu auch Abb. 3.1). Im Gegensatz dazu gibt es ebenso Hinweise auf eine inhibierende Wirkung dieser Signalkaskade auf die Translation. Das Ribonukleoprotein hnRNP-K zum Beispiel ist ebenfalls ein Substrat von ERK1/2. Es ist nur in phosphorylierter Form in der Lage, die Translation bestimmter mRNAs, die das sogenannte Differenzierungs-Kontroll-Element DICE tragen, zu hemmen (Habelhah et al., 2001). Auch die Kinasen MNK1 und 2 werden durch ERK1/2-Phosphorylierung aktiviert und blockieren so die Proteinsynthese (Knauf et al., 2001). Ausgehend von der Ras/MAPK-Signalkaskade gibt es also verschiedene Wege, die die Translation auf unterschiedliche Weisen beeinflussen. Ob auch die Proteinbindung von GRF1 an Zinki eine Verbindung zwischen dem Ras/MAPK-Weg und den Prozessen der Translation herstellt, kann ausgehend von den vorliegenden Ergebnissen nicht festgestellt werden.

Die Aufklärung der funktionellen Zusammenhänge zwischen der Zinki-GRF1-Interaktion, der Signaltransduktion des RAS/MAPK-Weges und der Inhibition der Arg3.1-Translation durch Zinki könnte einen wesentlichen Beitrag zur Entschlüsselung der Funktion von Zinki hinsichtlich der Ausbildung neuronaler Plastizität leisten.

### 3.7 Ausblick

Die Analyse eines Proteins, das an die aktivitätsregulierte und dendritisch lokalisierte Arg3.1-mRNA bindet, ist ein viel versprechender Ansatz zur Aufklärung der molekularen Prozesse, die zu synapsenspezifischen Modifikationen in Neuronen führen. Die Resultate dieser Doktorarbeit geben erstmals Hinweise auf mögliche Funktionen des Arg3.1-mRNA-bindenden Proteins Zinki, die nun in weiterführenden Studien überprüft werden müssen.

Die hier gezeigten Ergebnisse zur Zinki-vermittelten Translationsinhibition im Retikulozytenlysat geben Anlass zu einer Reihe von darauf aufbauenden Experimenten. Dazu

sollen zunächst Analysen zum Mechanismus der Inhibition im Retikulozytenlysat im Vordergrund stehen. Ähnlich wie schon mit Cycloheximid durchgeführt, sollen weitere Reagenzien eingesetzt werden, die die Translationsinitiation auf verschiedenen Stufen hemmen, um so die genauen molekularen Prozesse der inhibitorischen Wirkung von Zinki aufzuklären. Durch den Einsatz von Kompetitor-RNA, die nicht an Zinki bindet, soll überprüft werden, ob Zinki unter physiologischen Bedingungen spezifisch die Translation von Arg3.1 hemmen könnte. Letztendlich aber werden erst *in vivo* durchgeführte Experimente Aufschluss über eine tatsächliche Beteiligung des Zinki-Proteins an der Kontrolle der Proteinsynthese geben. Deshalb soll in einer nächsten Stufe der Einfluss von überexprimierten Zinki-Protein auf die Arg3.1-Translation in hippokampalen Primärneuronen untersucht werden.

Ein weiterer wichtiger Ansatzpunkt für Fortsetzungsstudien ist die aktivitätsabhängige Regulation des Zinki-Proteins. Alle drei Aspekte, nämlich der Effekt der laminaspezifischen Stimulierung auf die Verteilung Zinkis in Dendriten, seine kainatinduzierte Assoziation mit polysomenhaltigen Fraktionen und die spezifische Degradation des Zinki-Proteins nach Kainatstimulation, sollen zunächst hinsichtlich ihres zeitlichen Verlaufs untersucht werden. Um die Beteiligung der beiden Bindungspartner von Zinki, des GRF1-Proteins und der Arg3.1-mRNA, an diesen Prozessen zu bestimmen, sollen identische Experimente in Arg3.1- bzw. GRF1-*Knockout*-Mäusen durchgeführt werden.

In fortführenden Untersuchungen zur aktivitätsabhängigen Degradation des Zinki-Proteins soll die Ubiquitin-Ligase, durch die Zinki spezifisch ubiquitiniert wird, identifiziert werden. Dazu sollen bekannte neuronale Ubiquitin-Ligasen in *in vitro* Assays auf ihre Fähigkeit, Zinki zu ubiquitinieren, getestet werden. Daran anschließend sollen die auf Seiten Zinkis für die Ubiquitinierung notwendigen Proteindomänen durch Deletionsanalysen identifiziert werden.

Die Funktion Zinkis innerhalb der Ras/MAPK-Signaltransduktion wird ein zusätzlicher zentraler Punkt der weiterführenden Forschung werden. In Ras-Bindungs-Assays sollen die Auswirkungen Zinkis auf die Aktivität von Ras untersucht werden. Ist eine negative oder positive Funktion Zinkis hinsichtlich der Ras-Aktivität erkennbar, sollen über Deletionen und Punktmutationen die dafür verantwortliche Proteindomäne beziehungsweise die Aminosäuren auf Seiten Zinkis identifiziert werden.

Auch die Rolle des Ras/MAPK-Weges hinsichtlich der Expression von Arg3.1 soll weiter untersucht werden. In diesem Zusammenhang wird die Analyse der GRF1-*Knockout*-Mäuse

fortgeführt werden, wobei vor allem der zeitliche und räumliche Verlauf der veränderten Arg3.1-Expression nach kainatinduziertem Krampfanfall genauer verfolgt werden soll.

Neben GRF1 wurden in dieser Arbeit noch zehn weitere potentielle Protein-Bindungspartner von Zinki identifiziert, die zukünftig näher analysiert werden müssen. Zunächst sollen die Interaktionen über *Pulldown*-Assays verifiziert werden. Lassen sie sich bestätigen, soll wie im Falle von GRF1 mit Hilfe von spezifischen Antikörpern ihre Lokalisation *in vivo* sowohl hinsichtlich der allgemeinen Verteilung im Gehirn als auch in Bezug auf das Vorliegen in einem Proteinkomplex mit Zinki untersucht werden.

Letztendlich können weitere und umfassendere Einblicke in die genaue Funktion von Zinki nur durch seine Deletion *in vivo* gewonnen werden. In weiterführenden Projekten soll daher das Maus-Homolog von Zinki identifiziert und schließlich eine *Zinki-Knockout*-Maus generiert werden.