Zusammenfassung

Für die Reaktion auf äußere Reize muss ein Organismus in der Lage sein, die Expression bestimmter Gene schnell und präzise kontrollieren zu können. Beim Prozess des Lernens und der Gedächtnisbildung ist dieser Vorgang im Gehirn von großer Bedeutung, da die neuronalen Vernetzungen sich in ständiger Veränderung befinden. Die Kontrolle der Genexpression kann dabei auf Ebene der Transkription, der mRNA-Prozessierung, des Transports einer mRNA aus dem Zellkern und der Translation bis hin zur Degradation einer mRNA erfolgen. Dabei kommt dem gerichteten Transport einiger mRNA-Spezies in bestimmte Zellkompartimente von Neuronen und nicht-neuronalen Zellen eine besondere Rolle zu. In Neuronen, die durch tausende Synapsen miteinander verknüpft sind und auf Reize schnell reagieren müssen, ist der gerichtete mRNA-Transport in die Dendriten und die lokale Translation an Synapsen von besonderer Bedeutung. Der Transport von mRNAs in die Dendriten erfolgt in messenger Ribonukleoproteinpartikeln (mRNPs), die mit Hilfe von Motorproteinen entlang des Zytoskeletts in die Dendriten gelangen. Dieser Transport wird durch Sequenzen (*cis*-agierende Elemente) innerhalb der zu transportierenden mRNA gesteuert, die mit bestimmten Proteinen (*trans*-agierende Faktoren) unter Ausbildung von mRNPs interagieren. Zu den *trans*-agierenden Faktoren gehört auch das multifunktionelle Poly(A)-Bindungsprotein (PABP), das spezifisch unter anderem an das *cis*-Element der Vasopressin-mRNA bindet und deren Transport in die Dendriten vermittelt. PABP ist ein während der Evolution hochkonserviertes Protein und weist zahlreiche Funktionen in eukaryotischen Zellen auf. Es besteht N-terminal aus vier nicht-identischen RNA-Bindungsdomänen vom Typ RRM (*RNA-recognition motif*) und C-Terminal aus einer prolinreichen Region und einer strukturierten C-terminalen Domäne (PABC oder MLLE genannt).

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems wie am Modell der Ratte ein neuer Interaktionspartner von PABP identifiziert. Hierbei handelt es sich um die kurze Variante des Makorin RING-Zinkfinger Proteins 1 (Makorin1, MKRN1). Diese Interaktion konnte sowohl im artifiziellen Hefe-Zwei-Hybrid-System als auch im Zellkultursystem von Säugern durch Koimmunpräzipitation und mit Hilfe eines sogenannten PDZ-Pulldowns bestätigt werden.

Makorin1 ist ein modular aufgebautes Protein: N-terminal weist es drei Zinkfinger sowie einen Makorin-Typ-Zinkfinger auf. C-terminal folgen eine RING-Finger-Domäne sowie ein weiteres

Zinkfinger-Motiv. Bei der kurzen Proteinvariante ist der C-Terminus verkürzt. Der C-terminale Zinkfinger fehlt, und die RING-Finger-Domäne ist um die letzten sechs Aminosäuren verkürzt. Zur Identifizierung des Interaktionsbereiches wurden Versuche mit Makorin1- und PABP-Deletionsmutanten durchgeführt. Diese zeigten, dass bei der PABP/Makorin1-short-Interaktion der Aminosäurebereich 111-234 beteiligt ist. Dieser Bereich umfasst die Zinkfinger-Domäne 3 und die Aminosäuren zwischen den Zinkfinger-Domänen 2 und 3. Die RING-Finger-Domäne und der Makorin-Typ Zinkfinger binden nicht an das PABP. Seitens PABP sind an dieser Interaktion mindestens zwei der vier RRM's beteiligt.

Über die Funktion des Makorin1-Proteins ist bisher kaum etwas bekannt. Aufgrund der Präsenz der Zinkfinger wird vermutet, dass Makorin1 ein RNA-bindendes Protein darstellt. Die lange Makorin1-Variante fungiert bei einigen Proteinen als eine E3-Ubiquitinligase und ist zu Auto-Ubiquitinylierung fähig. Es konnte gezeigt werden, dass die verkürzte Proteinvariante aufgrund der unvollständigen RING-Finger Domäne diese Funktion nicht mehr besitzt.

Bei der Analyse verschiedener Gewebe der Ratte (Herz, Gehirn, Milz, Lunge, Leber, Muskel, Niere, Testis) wurde festgestellt, dass die mRNA-Expression beider Makorin1-Varianten im Gehirn und im Hoden am stärksten ist.

Parallel zur mRNA-Expression wurde die Proteinexpression im Gehirn sowohl durch *Western Blot*-Analysen als auch immunzytologisch und immunhistochemisch nachgewiesen. Die protein-chemische Analyse zeigte darüberhinaus, dass die kurze Makorin1-Isoform überwiegt. Wie erwartet entsprachen im Gehirn die Intensitäten der Proteinverteilung denen der mRNA-Verteilung.

Die Untersuchungen zur intrazellulären Verteilung von endogenem Makorin1 in eukaryotischen HeLa-Zellen bewiesen die Präsenz sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma. In Neuronen wurde es in Somata, in den Dendriten und in den Nuklei detektiert.

In isolierten hippocampalen Synaptosomen sowie in der postsynaptischen Dichte (PSD) ist die kurze Makorin1-Isoform angereichert. Dies wurde postuliert und hier zum ersten Mal gezeigt und ist deswegen von besonderer Bedeutung, besitzen diese Neuronenstrukturen bei der synaptischen Plastizität und damit bei Lernprozessen und Gedächtnis doch eine zentrale Rolle. Die Überprüfung, ob Makorin1-short sowie PABP an der aktiven Translation beteiligt sind, ergab in der Tat den starken Hinweis, dass eine Beteiligung bei der Proteinsynthese auf der Ebene der Translationsinitiation gegeben ist. Ob Makorin1-short bei der Translationsregulation der -Vasopressin-mRNA- in den Dendriten eine Rolle spielt, ist bisher offen. Mit Hilfe einer Affinitätschromatographie mit immobilisierter RNA konnte *in vitro* jedoch gezeigt werden,

dass Makorin1 an die -Vasopressin-mRNA- bindet. Ob diese Bindung direkt oder indirekt über das PABP erfolgt, müssen weitere Experimente zeigen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen zudem auch auf eine mögliche Beteiligung von Makorin1-short am mRNA-Abbau durch den NMD (*nonsense-mediated mRNA decay*)-Mechanismus hin. Es wurde das UPF1-Protein, ein Schlüsselprotein von NMD, als potenzieller Interaktionspartner identifiziert.