

Abstract

The study presented here focused on the characterization of the interaction of the neuronal protein p42^{IP4} (centaurin α 1; ADAP1) with the metalloendopeptidase nardilysin (NRD) and the modification of the interaction through tubulin.

NRD belongs to the inverzincin / M16 family of metalloendopeptidases, which have the ability to act as a protease and in a non-enzymatic way. We investigated, whether NRD acts as protease on p42^{IP4}. We could show here that recombinant, enzymatically active NRD does not cleave p42^{IP4}. Using a substrate of the metalloendopeptidase in an enzymatic assay revealed that the presence of p42^{IP4} enhances the enzymatic activity of NRD.

It has been published before that p42^{IP4} and NRD are developmentally regulated with a time-dependent overlap in their expression in developing human brain. To investigate this on cellular level, we used SH-SY5Y cells and differentiated them into a more neuronal phenotype with 10 μ M retinoic acid (RA). Differentiation of these neuroblastoma cells by RA treatment resulted in an upregulation of NRD protein levels, with a 6-fold rise after 15 days. NRD expression was detectable in the neurites of RA-stimulated SH-SY5Y cells and NRD was localized in vesicular structures.

p42^{IP4} is not expressed in SH-SY5Y cells and an expression cannot be induced through stimulation with RA. We therefore produced SH-SY5Y cells, stably transfected with GFP-tagged-p42^{IP4} and used this cell system as a model to investigate whether a functional interaction exists between both proteins. Interestingly SH-SY5Y-p42^{IP4} cells showed an enhanced NRD protein expression already at an earlier time point after RA treatment. We propose that p42^{IP4} influences the transcription of NRD.

It is known from the literature that NRD can interact with β -tubulin and p42^{IP4} with α -tubulin. Therefore, we were interested to find out, whether tubulin can influence the interaction between NRD and p42^{IP4}. Using confocal microscopy, we observed a colocalization of NRD, p42^{IP4}, and tubulin in the cytosol and on the plasma membrane in the neuroblastoma cells SH-SY5Y, stably transfected with p42^{IP4}. To examine the importance of tubulin for the interaction of NRD with p42^{IP4} we treated these cells with nocodazole, a microtubule depolymerisation agent. Nocodazole did not affect colocalization of p42^{IP4} and tubulin, but caused a clear redistribution of the proteins in cells. Then and a colocalization of p42^{IP4}, tubulin, and NRD was visible exclusively in multiple foci. We hypothesize that this colocalization, which occurs only in these foci, might have a functional role in transport processes along microtubules, via an interaction with other proteins. p42^{IP4} might help to transport NRD along microtubules via an interaction with KIF13B. To investigate the interaction between NRD, p42^{IP4}, and tubulin observed in the neuroblastoma cells, we performed Far-Western Blots to detect the protein-protein interactions directly. We could demonstrate that tubulin potentiates the interaction between NRD and functionally renatured p42^{IP4}. The enhancement depends on the polymerization of tubulin.

Moreover, the interaction between p42^{IP4}, NRD, and tubulin is very specific. We tested several mutants of NRD for their binding properties to tubulin and p42^{IP4}. NRD, with a mutation in the Zn²⁺-binding motif (HFLAH->HFLEH) behaved like unmutated NRD. The mutation of a highly conserved cysteine residue in NRD to alanine abolished the potentiation by tubulin. The NRD mutant lacking the characteristic acidic domain (DAC) was able to bind p42^{IP4}, but addition of tubulin could not significantly potentiate the binding to p42^{IP4}. The interaction of p42^{IP4} with Δ DAC proves that p42^{IP4} also binds to NRD outside the DAC. The tubulin mediated enhancement of the interaction between p42^{IP4} and NRD, supports our concept of a novel role of p42^{IP4} as a linker between the actin and tubulin network in neural cells.

Furthermore, the interaction of both proteins is possibly important with regard to Alzheimer's disease (AD). The protein p42^{IP4} has been found to be colocalized with neuritic plaques in AD brains and to interact with RanBPM- a protein, which can activate the β -secretase (BACE1). Opposite to that, NRD has been shown to enhance the release of the neuroprotective sAPP α . We therefore studied whether p42^{IP4} affects the cleavage of APP. We could demonstrate here that overexpression of p42^{IP4} in SH-SY5Y cells has no effect on the shedding of APP, as both the release of the neuroprotective sAPP α and the release of A β 40 remain on the basal level.

Zusammenfassung

In der hier präsentierten Arbeit wurde die Interaktion zwischen dem neuronalen Protein p42^{IP4} (centaurin α 1; ADAP1) und der Metalloendopeptidase Nardilysin (NRD), sowie die Modifikation dieser Interaktion durch Tubulin untersucht.

NRD gehört zur Familie der Inverzinkin / M16 Metalloendopeptidasen. Einige Mitglieder dieser Familie haben die Fähigkeit, sowohl als Protease, wie auch auf nicht-enzymatische Weise ihre Wirkung zu entfalten. Es wurde hier als erstes untersucht, ob NRD als Protease auf p42^{IP4} wirken kann. Es konnte dabei gezeigt werden, dass rekombinantes, enzymatisch aktives NRD p42^{IP4} nicht schneidet. Durch den Einsatz eines Substrates der Metalloendopeptidase in einem enzymatischen Assay konnte gezeigt werden, dass unter Anwesenheit von p42^{IP4} die enzymatische Aktivität von NRD verstärkt wird.

Es ist aus Veröffentlichungen bekannt, dass p42^{IP4} und NRD entwicklungsbiologisch reguliert werden und die Expression beider Proteine während der Entwicklung des humanen Gehirns eine zeitliche Überlappung aufweist. Um dies auf zellulärer Ebene zu untersuchen, verwendeten wir hier die Neuroblastoma Zellen SH-SY5Y, um diese mit Hilfe von 10 μ M Retinsäure (RA) in einen neuronalen Phänotyp zu differenzieren. Die Differenzierung dieser Neuroblastomazellen mit Hilfe von RA hatte eine verstärkte Expression von NRD zur Folge, wobei nach 15 Tagen ein 6-facher Anstieg der NRD-Expression zu verzeichnen war. Die Expression von NRD ließ sich dabei in den Neuriten der mit RA stimulierten SH-SY5Y Zellen nachweisen und NRD konnte auch in vesikulären Strukturen beobachtet werden.

p42^{IP4} hingegen wird nicht in SH-SY5Y Zellen exprimiert und die Expression kann auch nicht durch Stimulation mit RA induziert werden. Deshalb wurden SH-SY5Y-p42^{IP4} Zellen hergestellt und als Modell genutzt, um zu untersuchen, inwiefern eine funktionelle Interaktion zwischen beiden Proteinen besteht. Interessanterweise zeigten SH-SY5Y Zellen, die stabil mit GFP-p42^{IP4} transfiziert wurden, zu früheren Zeitpunkten der RA Behandlung eine verstärkte Expression von NRD. Es wird deshalb vorgeschlagen, dass p42^{IP4} die Transkription von NRD beeinflusst.

Es ist aus der Literatur bekannt, dass NRD mit β -Tubulin und p42^{IP4} mit α -Tubulin interagiert. Aus diesem Grund wollten wir herauszufinden, ob Tubulin die Interaktion zwischen NRD und p42^{IP4} beeinflussen kann. Mittels Konfokalmikroskopie konnte in SH-SY5Y Neuroblastomazellen, die stabil mit p42^{IP4} transfiziert wurden, eine Kolokalisation von NRD, p42^{IP4} und Tubulin im Zytoplasma und an der Plasmamembran vorgefunden werden. Um die Bedeutung von Tubulin für die Interaktion von NRD mit p42^{IP4} genauer zu untersuchen, wurden diese Zellen mit Nocodazol behandelt, welches eine Substanz darstellt, die Mikrotubuli depolymerisieren kann. Nocodazol zeigte keine Beeinflussung der Kolokalisation von p42^{IP4} und Tubulin, verursachte aber eine eindeutige Umverteilung dieser Proteine in den Zellen, wobei eine Kolokalisation von p42^{IP4}, Tubulin und NRD ausschließlich in Multiplen

Foci zu verzeichnen war. Wir vermuten, dass diese Kollokalisierung im Zusammenspiel mit anderen Proteinen eine Rolle beim Transport entlang von Mikrotubuli spielen könnte. p42^{IP4} könnte dabei via Interaktion mit KIF13B, eine Rolle beim Transport von NRD entlang der Mikrotubuli besitzen. Um die in den Neuroblastomazellen beobachtete Interaktion zwischen NRD, p42^{IP4} und Tubulin zu untersuchen, wurden Far Western Blots durchgeführt. Die Protein-Protein Interaktion wurde dabei direkt auf dem Western Blot detektiert. Es konnte gezeigt werden, dass Tubulin die Interaktion zwischen NRD und dem zuvor auf der Membran funktionell renaturierten p42^{IP4} verstärkt. Jedoch scheint diese Verstärkung vom Polymerisationsstatus des Tubulins abzuhängen.

Weiterhin scheint die Interaktion zwischen p42^{IP4}, NRD und Tubulin sehr spezifisch zu sein. Wir untersuchten verschiedene Mutanten von NRD hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften gegenüber Tubulin und p42^{IP4}. Die NRD-Mutante, die eine Mutation im Zn²⁺-bindenden Motiv (HFLAH->HFLEH) besitzt, verhielt sich dabei wie nicht mutiertes NRD. Interessanterweise verursachte die Mutation eines in NRD hoch konservierten Cysteins zu Alanin eine Aufhebung der Potenzierung durch Tubulin. Die NRD-Mutante, der die charakteristische Saure Domäne (DAC) fehlt, war in der Lage p42^{IP4} zu binden, aber die Zugabe von Tubulin konnte die Interaktion mit p42^{IP4} nicht signifikant potenzieren. Die Interaktion von p42^{IP4} mit der Deletionsmutante Δ DAC zeigt, dass p42^{IP4} bei der Interaktion mit NRD auch außerhalb der DAC binden kann. Durch die von Tubulin vermittelte Verstärkung der Interaktion zwischen p42^{IP4} und NRD schlagen wir für p42^{IP4} eine neue Rolle als Linker zwischen dem Actin- und Tubulin-Zytoskelett in neuronalen Zellen vor.

Darüber hinaus ist die Interaktion beider Proteine möglicherweise im Hinblick auf die Alzheimer Erkrankung (AD) von Bedeutung. Das Protein p42^{IP4} wurde in Gehirnen von AD Patienten vorgefunden, wobei es mit den AD-Plaques kollokalisiert. Weiterhin interagiert p42^{IP4} mit RanBPM, einem Protein das die β -Sekretase (BACE1) aktivieren kann. Im Gegensatz dazu ist von NRD bekannt, dass es die Freisetzung des neuroprotektiven sAPP α verstärkt. Deshalb wurde untersucht, ob p42^{IP4} einen Effekt auf die Spaltung von APP hat. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexprimierung von p42^{IP4} in SH-SY5Y Zellen keinen Einfluß auf die Prozessierung von APP hat. Sowohl die Freisetzung von neuroprotektivem sAPP α , wie auch die Freisetzung von A β 40 bleiben auf einem basalen Spiegel.