

# **Roles of Bassoon in assembling the presynaptic active zone for neurotransmitter release**

**von: Diplom Biologin Daria Davydova**

## Summary

Chemical synapses are highly specialized cellular junctions between neurons and their target cells, composed of a presynaptic bouton, which harbors synaptic vesicles (SVs), a postsynaptic terminal, which contains receptors for neurotransmitters and a synaptic cleft, which separates the pre- and postsynaptic compartments. In presynaptic terminals, SVs form clusters around a specialized region of the plasma membrane, known as the active zone. At the active zone a complex protein network forms the cytomatrix at the active zone (CAZ). It is thought to be involved in tethering SVs and in the spatial and temporal organization of the exocytosis machinery. Bassoon and Piccolo, two related proteins, are core components of this CAZ.

Bassoon and Piccolo are transported on membranous organelles, called Piccolo-Bassoon transport vesicles (PTVs). They are transported from the neuronal soma to distal axonal locations, where they participate in assembling new presynaptic terminals. Despite their net anterograde transport, PTVs move in both directions within the axon. How PTVs are linked to retrograde motors is unclear. In this study, a direct interaction of Bassoon with dynein light chains (DLCs) DLC1 and DLC2 is reported. This interaction potentially links PTVs to retrograde dynein motor complexes. Three independently functional DLC-binding sites were identified on Bassoon, all resembling but not exactly matching the DLC-binding consensus sequence (K/R)XTQT. Both DLCs interact with Bassoon in yeast and mammalian cells. A newly developed mito-targeting system confirmed the functionality of the heterologous expression in COS-7 cells. Quantitative binding assays revealed a significantly higher affinity of Bassoon for DLC2 than for DLC1. These data suggest that, via its interaction with DLCs, Bassoon might function as a cargo adapter for the retrograde motor dynein.

In a mouse mutant for Bassoon the lack of functional protein leads to impaired fast exocytosis and reduced  $Ca^{2+}$  current in cochlea inner hair cells, suggesting insufficient recruitment and/or stabilization of voltage-dependent calcium channels (VDCCs) in the presynaptic active zone. The molecular mechanism for these findings is unclear. In this study an interaction between the CAZ proteins Bassoon and Piccolo with Rim-binding proteins (RBPs), binding partners for the Rab3-effector Rim as well as VDCCs –  $Ca_v2.1$  and  $Ca_v2.2$ , is reported. RBP1 and RBP2 interact with specific PXXP motifs in Bassoon and Piccolo preferentially via their first SH3 domain. The interaction between RBPs and Bassoon can be inhibited by phosphorylation of the Ser-2893 residue in the RBP-interacting P $\Psi$ PP motif of Bassoon, while Piccolo's interaction with RBPs is phosphorylation-independent. The existence of three SH3 domains in RBPs and several described binding partners – Rim1,  $Ca_v2.2$ , Bassoon and Piccolo – raised the question whether RBPs might serve as physical modules linking VDCCs with SVs and components of the CAZ. Indeed, quantitative *in vitro* assays disclosed clear differences in binding affinities of distinct RBP-SH3 domains to Rim1,  $Ca_v2.2$ , Bassoon and Piccolo. This suggests that RBPs might interact with these proteins simultaneously in a RBP-based protein complex. In immunofluorescence analysis the amount of presynaptic  $Ca_v2.1$  was significantly reduced in Bassoon knockout compared with wild-type synapses. To assess whether Bassoon effects on VDCC localization require RBPs as linkers connecting these two proteins, the distribution of  $Ca_v2.1$  in rat hippocampal neurons transfected either with EGFP-tagged wild-type Bassoon or RBP-binding deficient Bassoon mutant was compared. Bassoon clustering in the cell body was observed in both cases, while endogenous RBP2 and  $Ca_v2.1$  were co-recruited only to clusters formed by wild-type Bassoon. At synapses formed by axons of neurons transfected with EGFP-tagged wild-type Bassoon the intensities of immunofluorescence of both RBP2 and  $Ca_v2.1$  showed strong positive correlation with the intensity of EGFP fluorescence. On the contrary, a negative correlation was observed for the RBP2 and  $Ca_v2.1$  immunofluorescence intensities and EGFP fluorescence intensity at synapses containing RBP binding-deficient Bassoon mutant. Overall, the data suggest that Bassoon is involved in recruitment and exact localization of VDCCs in the presynaptic terminal active zones. This mechanism requires RBPs, which interact simultaneously with Bassoon and VDCCs and therefore can serve as physical linkers for this protein complex assembly.

These findings provide a new insight in the mechanism contributing to the organization of the exocytosis machinery and regulation of synaptic transmission.

## Zusammenfassung

Chemische Synapsen sind hoch spezialisierte Zell-Zell-Kontakte zwischen Neuronen und ihren Zielzellen. Sie bestehen aus einem präsynaptischen Bouton, der mit synaptischen Vesikeln angefüllt ist, einem postsynaptischen Kompartiment, welches die Neurotransmitterrezeptoren und dem damit verknüpften Apparat zur Signaltransduktion enthält, und einem synaptischen Spalt, der Prä- und Postsynapse voneinander trennt. In der präsynaptischen Endigung bilden die synaptischen Vesikel eine Traube an der aktiven Zonen – jener spezialisierten Region der Plasmamembran an der die Neurotransmitterfreisetzung erfolgt. An der aktiven Zone befindet sich ein hoch komplexes Proteinnetzwerk, welches als Cytomatrix an der aktiven Zone (CAZ) oder präsynaptisches Gitter bekannt ist. Es wird vermutet, dass Komponenten dieser CAZ an der Rekrutierung von synaptischen Vesikeln und der Organisation der Exocytosemaschinerie beteiligt sind. Bassoon und Piccolo, zwei nahe miteinander verwandte Proteine, sind integrale Komponenten dieser CAZ.

Diese beiden ungewöhnlich großen Proteine werden auf membranären Organellen, den so genannten Piccolo-Bassoon-Transportvesikeln (PTVs), aus dem Soma ins Axon bis hin zu deren distalen Enden transportiert. Sie sind entlang des Axons am Aufbau neuer synaptischer Verbindungen beteiligt sind. Trotz ihres in der Summe anterograden Transports werden die PTVs innerhalb des Axons in beide Richtungen transportiert. Bislang war unklar, wie PTVs an einen dafür notwendigen retrograden Motor gekoppelt sein könnten. In dieser Studie wird eine Interaktion von Bassoon mit den leichten Ketten von Dynein, der *dynein light chain 1* (DLC1) sowie der *dynein light chain 2* (DLC2) untersucht. Hierdurch könnten PTVs mit Dyneinkomplexen, die als retrograde Motoren an axonalen Microtubuli fungieren, verknüpft sein. Es zeigte sich, dass Bassoon drei voneinander unabhängig funktionierende DLC-Bindungsstellen besitzt, die zwar alle der Konsensussequenz (K/R)XTQT ähneln, aber nicht exakt mit ihr übereinstimmen. Diese Bindungsstellen sind in der homologen Region von Piccolo nicht zu finden. Die beiden DLC-Isoformen interagieren mit Bassoon im Hefe-Zwei-Hybrid-System und in Säugetierzellen. Quantitative Bindungstests ergaben weiterhin, dass DLC2 eine signifikant höhere Affinität zu Bassoon besitzt als DLC1. Interaktionsstudien in einem im Rahmen der Arbeit neu etablierten heterologen Expressionssystem in COS7-Zellen, dem *Mito-targeting*-System, bestätigte die Funktionalität der Bassoon-DLC-Interaktion. Werden Mitochondrien in COS7-Zellen durch die Expression von Bassoon-Fusionsproteinen mit *Mito-targeting*-Signalen auf der Oberfläche dekoriert so können diese über DLC an Microtubuli-Motoren binden und retrograd transportiert werden. Sie reichern sich dann nachweislich am Microtubuli-Organisationszentrum (MTOC) an. Diese Daten lassen vermuten, dass Bassoon durch die Interaktion mit DLCs als Cargo-Adaptor der PTVs für den retrograden Motor Dynein fungiert.

In einer Mausmutanten für Bassoon kommt es in Abwesenheit von funktionellem Bassoon-Protein in den inneren Haarzellen der Cochlea zu einer behinderten Exocytose und reduzierten  $Ca^{2+}$ -Strömen, was auf eine unvollständige Rekrutierung und/oder Stabilisierung von spannungsabhängigen Calciumkanälen (*voltage-dependent calcium channels*: VDCCs) in der aktiven Zone hindeutet [Khimich et al. (2005) Nature 434:889-894]. Der genaue molekulare Mechanismus hierfür ist jedoch bisher unklar. In dieser Studie wird eine Bindung von Bassoon und Piccolo an RIM-bindende Proteine (RBPs), gezeigt. RBPs binden neben dem CAZ-Protein RIM (Rab3-interacting molecule) auch VDCCs und könnten somit als Bindeglieder zwischen CAZ-Netzwerk, Exocytose-Maschinerie und Calciumkanälen der präsynaptischen Membran von großem Interesse sein.

RBP1 und RBP2 interagieren vorrangig über die erste SH3-Domäne mit spezifischen PXXP-Motiven in Bassoon und Piccolo. Bemerkenswerterweise kann die Interaktion von RBPs und Bassoon durch Phosphorylierung des Ser-2893-Restes im mit RBP interagierenden P<sub>SP</sub>PP-Motiv von Bassoon inhibiert werden. Die Interaktion mit Piccolo ist dagegen phosphorylierungsunabhängig. Die Existenz von drei SH3-Domänen in RBPs und mehreren verschiedenen Bindungspartnern – Rim1, Ca<sub>v</sub>2.1, Bassoon und Piccolo – stellte die Frage auf, ob RBPs wirklich als Bindungsmodule fungieren, die VDCCs mit SVs und Komponenten der CAZ verknüpfen, oder ob die Interaktionspartner um Bindung an RBPs konkurrieren. Tatsächlich deckten *in vitro*-Experimente deutliche Unterschiede in den Bindungsaffinitäten verschiedener RBP-SH3-Domänen zu Rim1, Ca<sub>v</sub>2.1, Bassoon und Piccolo auf. Dies lässt

darauf schließen, dass RBPs tatsächlich mit allen diesen Proteinen gleichzeitig in einem RBP-basierten Proteinkomplex interagieren könnten. Um herauszufinden, ob der Einfluss von Bassoon auf die Lokalisation von VDCCs von RBPs als Verknüpfungselemente beider Proteine abhängt, wurde die Verteilung von  $Ca_v2.1$  in hippocampalen Primärkultur-Neuronen aus der Ratte verglichen, die entweder mit EGFP-markiertem wildtypischen Bassoon oder einer entsprechend markierten RBP-Bindungsmutanten von Bassoon transfiziert wurden. In beiden Fällen wurden Ansammlungen von Bassoon im Zellkörper beobachtet, wobei endogene RBP2 und  $Ca_v2.1$  jedoch nur zu Ansammlungen von wildtypischen Bassoon, nicht aber zu Bassoon, das nicht zur Interaktion mit RBP in der Lage war, rekrutiert wurden. An Synapsen von Axonen, die von mit EGFP-markierten wildtypischen Bassoon transfizierten Neuronen stammen, wurde eine starke positive Korrelation zwischen den Immunfluoreszenz-Intensitäten von RBP2 und  $Ca_v2.1$  mit der EGFP-Intensität gemessen. Im Gegensatz dazu war eine negative Korrelation zwischen der RBP2- und  $Ca_v2.1$ -Intensität mit der EGFP-Intensität an Synapsen vorhanden, die die RBP-Bindungsmutante von Bassoon enthielten. In dieser Studie konnte weiter gezeigt werden, dass die Menge an präsynaptischem Calciumkanal  $Ca_v2.1$  in Synapsen der Bassoon-mutanten Maus im Vergleich zu wildtypischen Synapsen signifikant kleiner ist.

Zusammenfassend lassen die Daten darauf schließen, dass Bassoon an der Retention und/oder der exakten Lokalisation von VDCCs in den präsynaptischen Nervenendigungen beteiligt ist. Der Retentionsmechanismus benötigt RBPs, die gleichzeitig mit Bassoon und VDCCs interagieren können und demnach als Integrationsglied für die Bildung dieses Proteinkomplexes dienen kann. Diese Resultate ermöglichen einen neuen Einblick in die Mechanismen, die zur Organisation der Exocytosemaschinerie und der Regulation von synaptischer Transmission beitragen.