

**Dipl.-Biol. Diana Hübler**

**Thema der Promotion: Untersuchung der räumlichen Expression und subzellulären Lokalisation von CtBP1/BARS50- und CtBP2-Isoformen im adulten Nagerhirn**

## **Summary**

The family of **C-terminal binding proteins** is uniquely found in plants and in animals. Vertebrates contain two genes, CtBP1 and CtBP2, whose protein products are involved in embryogenesis, apoptosis, oncogenesis and activity-dependent gene expression. The CtBP1 gene codes for two isoforms of CtBP1: CtBP1-L and CtBP1-S/BARS50. The founding member of the CtBP family, CtBP1-L, has been extensively studied as transcriptional co repressor of a large number of transcriptional factors. The short isoform, CtBP1-S/BARS50, was first identified as a cytosolic protein. Here it is necessary for several membrane fission steps at the Golgi apparatus and the fragmentation of the Golgi complex at the beginning of mitosis. Furthermore, a synaptic localization of CtBP1/BARS50 could be demonstrated, but the exact molecular nature of synaptically localized CtBP1/BARS50 is unknown.

The CtBP2 gene gives rise to three isoforms. The two isoforms CtBP2, a nuclear co repressor and CtBP2-S, a cytosolic protein with unknown function exhibit high homology to the isoforms of the CtBP1/BARS50 family proteins. A third isoform, RIBEYE, is a major constituent of ribbon synapses in retinal photoreceptors and bipolar cells, inner hair cells of the cochlea or pinealocytes of epiphysis.

After all, it remained unknown, how the members of the CtBP protein family are distributed in the adult brain and if CtBP1-L, CtBP1-S/BARS50, CtBP2 and CtBP2-S exhibit specific cellular localizations or if they localize both to the nucleus and the cytosol in neurons. Therefore the main objective of this doctoral thesis was to analyze the protein expression patterns of CtBP1/BARS50 and CtBP2 proteins in the adult mouse brain and their subcellular distribution in neurons.

Analysis of the spatial expression pattern in the adult mouse brain demonstrated that CtBP1/BARS50 and CtBP2 proteins display individual expression patterns, differing in their spatial and cell-specific expression as well as their expression levels throughout different brain areas.

Analysis of the subcellular distribution of CtBP1/BARS50 demonstrated that all CtBP1/BARS50 isoforms show dual synapto-nuclear localization in neurons, with CtBP1/BARS50 more enriched in the synaptosomal as compared to the nuclear protein fraction.

This is the first study demonstrating that CtBP2 is localized at conventional chemical synapses. Furthermore, immune electron microscopy visualizations revealed that this synaptic localization of CtBP2 is restricted to the close vicinity of presynaptic active zones. Principally, CtBP2 is more strongly enriched in the nuclear fraction compared to the synaptosomal fraction. Moreover, the present work includes differential targeting of the two isoforms CtBP2 and CtBP2-S in neurons, showing predominant CtBP2 in cell nuclei and dual CtBP2-S synapto-nuclear localization.

Two-D-gel analysis of synaptosomal and nuclear fractions revealed that both CtBP1/BARS50 isoforms are synaptically localized and that CtBP1/BARS50 is highly phosphorylated in both fractions.

In summary, the present work shows that CtBP1/BARS50 and CtBP2 differ in their spatial and cell specific expression patterns, in their expression levels as well as in their subcellular distributions. In parallel it could be shown that all members of the CtBP protein family except for CtBP2, exhibit dual synaptic and nuclear localization. These findings represent the basis for further analysis of the synaptic function of members of the CtBP protein family.

**Dipl.-Biol. Diana, Hübler**

**Thema der Promotion: Untersuchung der räumlichen Expression und subzellulären Lokalisation von CtBP1/BARS50- und CtBP2-Isoformen im adulten Nagerhirn**

## **Zusammenfassung**

Die Proteine der **C-terminalen Bindungs-Protein-Familie** sind in Pflanzen und Tieren konserviert. Das Wirbeltier-Genom enthält dabei zwei CtBP-Gene, CtBP1 und CtBP2, deren Proteinprodukte unter anderem an der Regulation der embryonalen Entwicklung, der Apoptose, der Onkogenese und der aktivitäts-abhängigen Genexpression beteiligt sind.

Das CtBP1-Gen codiert für zwei Haupt-Transkripte, CtBP1-L und CtBP1-S/BARS50. Die CtBP1-L-Isoform ist das Gründungsmitglied der CtBP-Proteinfamilie und ist hauptsächlich als Transkriptions-Ko-Repressor einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren bekannt. CtBP1-S/BARS50 wurde dagegen als cytosolisches Protein identifiziert, wo es an verschiedenen Abschnürungsprozessen vom Golgi-Apparat und der regulierten Golgi-Fragmentierung vor dem Eintritt in die Mitose beteiligt ist. Zudem konnte CtBP1/BARS50 als Bestandteil der CAZ konventioneller chemischer Synapsen identifiziert werden, wobei die exakte molekulare Natur des synaptischen CtBP1/BARS50 unklar ist.

Das CtBP2-Gen codiert für drei Transkripte. CtBP2, einem Zellkern-ständigen Transkriptions-Ko-Repressor, CtBP2-S, einem cytosolisches Protein mit noch unklarer Funktion, und RIBEYE, einem Hauptbestandteil in Bandsynapsen der Photorezeptor- und Bipolar-Zellen der Retina, in Pinealocyten der Epiphyse und in inneren Haarzellen der Cochlea. CtBP2 und CtBP2-S zeigen dabei eine sehr hohe Sequenz-Ähnlichkeit zu CtBP1/BARS50.

Unklar ist, wie die Mitglieder der CtBP-Proteinfamilie in den Hirnarealen des adulten Nagerhirns exprimiert werden, und ob CtBP1-L, CtBP1-S/BARS50, CtBP2 und CtBP2-S spezifisch in einem Zellkompartiment lokalisiert sind oder sowohl nukleäre als auch cytosolische Lokalisationen im Neuron zeigen.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit standen die Untersuchung des Expressionsmusters der Mitglieder der CtBP1/BARS50- und CtBP2-Proteinfamilie im adulten Gehirn und die Untersuchung des subzellulären Verteilungsmusters der CtBP-Proteine in Neuronen.

Die Untersuchung des Expressionsmusters der CtBP-Proteine im adulten Gehirn zeigte ein individuelles Expressionsmuster der CtBP1/BARS50- und CtBP2-Proteine. Dabei unterscheiden sich die Proteinprodukte beider Gene in ihren räumlichen Expressionen, dem Expressionsniveau in den einzelnen Hirnarealen und ihrer Zelltyp-spezifischen Expression.

Die Untersuchung der subzellulären Verteilung der CtBP1/BARS50-Proteine ergab, dass alle Isoformen sowohl im Zellkern als auch den Synapsen lokalisiert sind. Das CtBP1/BARS50 in der Synaptosomen-Fraktion, im Vergleich zur Zellkern-Fraktion, aber in größeren Mengen vorkommt.

Für die CtBP2-Proteine kann hier erstmals eine Lokalisation an konventionellen chemischen Synapsen beschrieben werden. Gleichzeitig zeigen immun-elektronenmikroskopische Aufnahmen, dass die synaptische CtBP2-Lokalisation auf den Bereich um die aktive Zone beschränkt ist. Grundsätzlich sind aber CtBP2-Proteine in der Zellkern-Fraktion, im Vergleich zur Synaptosomen-Fraktion, stärker angereichert. Zudem kann hier gezeigt werden, dass die beiden CtBP2-Isoformen, CtBP2 und CtBP2-S, unterschiedliche subzelluläre Verteilungen aufweisen. Wobei CtBP2 fast vollständig im Zellkern, CtBP2-S dagegen sowohl im Zellkern als auch in Synapsen lokalisiert ist.

Auch die durchgeführte 2D-gelelektrophoretische Analyse von CtBP1/BARS50 in den Zellkern- und Synaptosomen-Fraktionen bestätigt die synaptische Lokalisation der CtBP1-L- und CtBP1-S/BARS50-Isoformen und zeigt gleichzeitig, dass die CtBP1/BARS50-Isoformen in beiden Fraktionen unterschiedlich phosphoryliert sind.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass sich die CtBP1/BARS50- und CtBP2-Isoformen in ihren Hirnareal- und Zelltyp-spezifischen Expressionsmustern, ihrem Expressionsniveau und ihren subzellulären Verteilungen unterscheiden. Gleichzeitig kann für die Mitglieder der CtBP-Proteinfamilie, außer CtBP2 selbst, sowohl eine nukleäre als auch synaptische Lokalisation gezeigt werden. Dies wiederum stellt die Grundlage für weiterführende Untersuchungen der synaptischen Funktionen der Mitglieder der CtBP-Proteinfamilie dar.