

Diplom-Biochemiker Gustavo Alejandro Acuña Sanhueza

Zusammenfassung der Dissertation

Thema der Dissertation-Characterization of SPAR2 a novel RapGAP prominently expressed in cerebellar granule cells

Zusammenfassung

Rap-GTPasen gehören als Mitglieder der Ras-Familie zu der Gruppe kleiner GTP-bindender Proteine, welche eine Vielzahl zellulärer Prozesse regulieren, wie beispielsweise Zellproliferation und –differenzierung, Umbau des Zytoskeletts sowie synaptische Plastizität und Morphologie.

In jüngster Zeit wurde ein bisher unbekanntes, GTPase aktivierendes Protein (GAP) für Rap-GTPasen identifiziert und SPAR2 genannt. SPAR2 zeigt eine signifikante Sequenzhomologie zu SPAR1 (spine-associated RapGAP), einem synaptischen RapGAP, für das eine Regulation der Spine-Morphologie in Neuronen hippokampaler Primärkulturen beschrieben wurde. Gemeinsam mit SPAR1 gehören SPAR2 und SPAR3 zur Familie der SPAR-Proteine mit identischen Domänen, wie z. B. RapGAP- und PDZ-Domäne. Durch GAP-Assays *in vitro* konnte gezeigt werden, dass SPAR2 über GAP-Aktivität gegenüber der kleinen GTPase Rap verfügt. SPARs sind gekennzeichnet durch unterschiedliche Aktin-bindende Eigenschaften, was durch co-lokalisierungs- und biochemische Studien belegt wurde.

Untersuchungen mittels *in situ* Hybridisierung zeigten, dass die Transkripte von SPAR1 und SPAR2 im Gehirn unterschiedlich verteilt sind, wobei SPAR2 hauptsächlich in Körnerzellen des Cerebellums und Hippokampus exprimiert wird. Darüber hinaus ist die Expression von SPAR2 im Cerebellum entwicklungsabhängig reguliert und erreicht das Maximum zum Zeitpunkt der Synaptogenese. Nach subzellulärer Fraktionierung ist eine starke Anreicherung von SPAR2 in Synaptosomen des Cerebellums und in der Postsynaptische Dichte (PSD)-Fraktion zu beobachten, was es als synaptisches Protein kennzeichnet. Charakterisierte Antikörper gegen SPAR2 detektieren das Protein im Soma und in Dendriten von Körnerzellen im cerebellären Primärkulturen. Übereinstimmend mit früheren Beobachtungen wird auch in diesen Kulturen die SPAR2-Expression entwicklungsabhängig reguliert.

In Primärkulturen cerebellärer Körnerzellen ist SPAR2 nur in einer kleinen Fraktion excitatorischer Synapsen lokalisiert. Im Gegensatz dazu ist das Protein nicht in inhibitorischen Synapsen vorhanden, welche mit dem Marker GAD-65 detektiert wurden.

ProSAPiP1, ein Mitglied der Fezzin-Familie, co-präzipitiert mit SPAR2 aus Proteinextrakten des Cerebellums und subzellulärer Fraktionen. In isolierten *lipid rafts* aus Ratten Kleinhirn sind beide Proteine in den selben Fraktionen nachweisbar. Die Anreicherung weiterer Rap-GTPasen in diesen Fraktionen deutet darauf hin, dass es sich dabei um Regionen mit erhöhter Konzentration von Signalmolekülen handelt.

Es ist bekannt, dass Raps und BDNF an der durch Neurotrophin-Rezeptoren vermittelten Signaltransduktion beteiligt sind. Der BDNF Rezeptor TrkB und seine verkürzten Isoformen sind durch überlappende Verteilung mit SPAR2 und Raps in den isolierten *lipid rafts* gekennzeichnet. In Immunpräzipitationsexperimenten konnte TrkB mit SPAR2 von Lysaten des Cerebellums co-präzipitiert werden. Dies deutet darauf hin, dass möglicherweise beide Proteine innerhalb eines Komplexes in Cerebellären Synapsen vorliegen. Darüber hinaus konnte in *pull down*-Experimenten mit SPAR2- und TrkB-Fusionsproteinen eine direkte Interaktion zwischen beiden Proteinen gezeigt werden. Im Gegensatz dazu war für SPAR1 keine Interaktion mit TrkB nachweisbar, was die Hypothese bekräftigt, dass SPAR1 und SPAR2 an verschiedenen Signalwegen beteiligt sind. Außerdem wurden die Bindungsregionen von SPAR2 und TrkB mittels des Hefe-2-Hybridsystems ermittelt. SPAR2 bindet unabhängig an zwei verschiedenen Regionen des zytosolischen Abschnitts von TrkB. In

weiterführenden *pull down* assays wurde durch Zugabe eines SPAR2-bindenden Peptids die komplette Blockierung der SPAR2-TrkB-Interaktion erreicht, was deren Spezifität unterscheidet.

Interessanterweise erhöhte sich in kultivierten cerebellären Körnerzellen die Co-Lokalisation von SPAR2 und TrkB durch Zugabe von BDNF. Dies deutet darauf hin, dass Aktivierung und Dimerisierung von TrkB ausschlaggebend für die Bindung von SPAR2 sind. Die funktionelle Konsequenz dieser Bindung wurde in Primärkulturen cerebellärer Körnerzellen weiter untersucht. Mit SPAR2 transfizierte Körnerzellen zeigten eine starke Reduzierung der TrkB-Rezeptoren an der Zelloberfläche. Diese Runterregulierung konnte in heterologen Expressionssystemen reproduziert werden.

SPAR2 fördert und verstärkt die Internalisierung des TrkB-Rezeptors und hat somit möglicherweise eine besondere Funktion innerhalb TrkB-vermittelter Signalprozesse.

Diplom-Biochemiker Gustavo Alejandro Acuña Sanhueza

Abstract of the Dissertation

Theme of the Dissertation-Characterization of SPAR2, a novel RapGAP prominently expressed in cerebellar granule cells

Summary

The Rap GTPases belong to the Ras family of small GTP-binding proteins, which regulate a variety of cellular processes including cell proliferation, differentiation, cytoskeletal rearrangements, synaptic plasticity and morphology. Recently a novel GTPase activating protein (GAP) for Rap GTPases, termed SPAR2, was identified. SPAR2 shows significant sequence homology to SPAR (spine-associated RapGAP), a synaptic RapGAP that was reported to regulate spine morphology in cultured hippocampal neurons. Together with SPAR1, SPAR2 and SPAR3 comprise the SPAR family of proteins, which share several domains like the RapGAP and the PDZ domain. By *in vitro* GAP assays it was shown that SPAR2 has GAP activity for the small GTPase Rap. SPARs showed different actin-binding properties as revealed by co-localization and biochemical studies.

In situ hybridization studies in rat brain revealed a differential tissue distribution of SPAR and SPAR2 with SPAR2 transcripts being mainly expressed in cerebellar and hippocampal granule cells. Moreover, in the cerebellum SPAR2 is developmentally regulated with a peak of expression around the period of synapse formation. In subcellular fractionation experiments SPAR2 is enriched in rat cerebellar synaptosomes and postsynaptic density (PSD) fractions indicating that it is a synaptic protein. Antibodies against SPAR2 recognized a somatic and dendritic epitope in cultured rat cerebellar granule cells. In line with previous findings, SPAR2 expression in cerebellar neurons also showed a developmental regulation.

SPAR2 seems to be localized only in a subset of excitatory synapses in cultured cerebellar granule cells and no relation with inhibitory synaptic marker GAD-65 was noticed.

ProSAPiP1, a Fezzin-family member, co-precipitates with SPAR2 from cerebellum. Subcellular fractionations and lipid rafts isolation of extracted cerebellum showed a similar distribution of both proteins. Rap GTPases were also enriched in the lipid raft fraction. Lipid rafts a special platform particularly for signaling molecules.

It is known that Raps and Brain-derived neurotrophin factor (BDNF) are involved in neurotrophin receptor signal transduction. The BDNF receptor TrkB and its truncated isoforms displayed an overlapping distribution with SPAR2 and Raps in lipid raft isolations. In immunoprecipitation experiments TrkB co-precipitates with SPAR2 from cerebellar lysates indicating that both proteins might be present in the same complex in cerebellar synapses. Furthermore, pull down experiments with SPAR2 and TrkB fusion proteins revealed a direct interaction. SPAR1 did not show any interaction with TrkB supporting the idea that SPAR1 and SPAR2 might be involved in different signaling pathways. Additionally, the binding interface of SPAR2 and TrkB were mapped employing the yeast two hybrid system. SPAR2 binds two independent interacting interfaces of the cytosolic TrkB region. Furthermore, a complete blockade of the interaction with a SPAR2 binding peptide in pull down assays demonstrates the specificity of TrkB-SPAR2 interaction.

Interestingly in cultured rat cerebellar granule cells co-localization of SPAR2 and TrkB was enhanced after treatment with BDNF indicating that activation and dimerization of TrkB might be crucial for binding of SPAR2. The functional consequence of the binding was addressed in cultured cerebellar granule cells. SPAR2 transfected granule neurons, showed a great reduction of the surface level of the TrkB receptor. Moreover, the surface down-regulation was reproduced in a heterologous system (COS-7 cells). Taken together, SPAR2 promotes and enhances the internalization of the TrkB receptor and might have a specific function in TrkB mediated signaling.