

Diplom-Physiologin Irina Zdobnova

Das Thema der Dissertation lautet: „Jacob – an activity-regulated morphogenetic factor for synapto-dendritic cytoarchitecture“

Zusammenfassung

Langfristige Veränderungen der synaptischen Verbindungen zwischen Nervenzellen, wie sie für Lern- und Gedächtnisvorgänge vorgeschlagen werden, erfordern eine de novo Proteinsynthese und eine entsprechende Kontrolle der zu Grunde liegenden Genexpression im Zellkern. Es wird daher seit langem vermutet, dass synaptische Aktivität die Genexpression zur Realisierung plastischer Prozesse direkt steuert. In der Projektgruppe Neuroplastizität am Leibniz Institut für Neurobiologie konnten wir mit Jacob ein Protein identifizieren, das eine wesentliche Rolle bei der Kopplung von synaptischer Aktivierung speziell des NMDA-Rezeptors an plastizitätsrelevante Genexpression zu spielen scheint.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Jacob-Signalweg zum Zellkern genauer untersucht werden. Teil dieses Signalweges ist das synaptische Calcium-Bindungsprotein Caldendrin. Im Gegensatz zu Jacob findet sich Caldendrin nur prominent im subsynaptischen Zytoskelett, der so genannten postsynaptischen Dichte (PSD), aber nicht im Zellkern. In der Primärstruktur von Jacob findet sich in einer zentralen α -helikalen Region ein bipartäres NLS, von dem gezeigt werden konnte, dass es für den Kernimport von Jacob essentiell ist. Dieses NLS ist wiederum Bestandteil der Caldendrin-Bindungsregion. Die Bindungsregion von Caldendrin überlappt mit der von Importin- α , so dass nicht beide Proteine gleichzeitig von Jacob gebunden werden können. Die Caldendrin / Jacob Bindung benötigt aber im Gegensatz zu der Importin- α / Jacob Wechselwirkung die Gegenwart von μM Calcium-Konzentrationen. Daher ist zu vermuten, dass bei niedrigeren Calcium-Konzentrationen, wie sie unter Ruhebedingungen in Nervenzellen vorliegen, Jacob von Importin- α gebunden wird. Nach synaptischer Aktivierung kann Caldendrin aber abhängig von den freien synapto-dendritischen Ca^{2+} -Konzentration Importin- α von Jacob's NLS effizient verdrängen.

Um diesen Mechanismus besser zu verstehen wurde die Kinetik des Kerntransports von Jacob mit Hilfe von konfokaler Fluoreszenz Video-Mikroskopie an lebenden Zellen genauer untersucht. Als wichtige Ergebnisse diese Studien sind festzuhalten, dass Jacob nach Stimulierung von Glutamat-Rezeptoren innerhalb weniger Minuten auch aus weit entfernten

Regionen des Dendriten zum Soma und in den Zellkern wandert. Diese Translokation ist aber nur nachzuweisen wenn das NLS in Jacob vorhanden ist. GFP-Jacob Fusionsproteine bei denen das NLS entfernt wurde verändern ihre Verteilung innerhalb der Zelle nach Stimulation mit Glutamat nicht. Daraus ist zu schließen dass nicht nur der Kernimport von Jacob sondern auch der Transport zum Soma eine Interaktion mit Importinen erfordert. Jacob scheint damit der erste identifizierte „Passagier“ auf dem Importin-Transportweg aus Dendriten und vielleicht auch Synapsen zum Zellkern zu sein.

Eine Depolarisierung neuronaler Zellmembranen mit Kaliumchlorid hat eine unspezifische Aktivierung einer Vielzahl intrazellulärer Signalkaskaden zur Folge, die auch eine quantitativ erhebliche Freisetzung von Calcium-Ionen aus intrazellulären Speichern beinhaltet. Dennoch resultiert aus einer Depolarisierung mit Kaliumchlorid nur ein relativ geringer Anstieg der Importin- und Jacob-Proteinmengen im Zellkern und diese schon reduzierte Transportdynamik beider Proteine ist bei einer parallelen Blockierung der NMDA-Rezeptoren gar nicht mehr nachweisbar. Diese Ergebnisse sind insofern bemerkenswert, als das sie Anlass zu der Vermutung geben, i) das der quantitativ vernachlässigbare Einstrom von extrazellulären Calcium-Ionen durch den NMDA-Rezeptor unabdingbar für den Kernimport von Jacob ist und ii) das bei erhöhter neuronale Aktivität, die mit hohen Konzentrationen von freien Calcium-Ionen einhergeht, Jacob vermutlich über die Caldendrin-Bindung in Synapsen und Dendriten festgehalten und der Kernimport verhindert wird. NMDA-Rezeptoren finden sich sowohl in Synapsen als auch in der extrasynaptischen Plasmamembran die über keinen synaptischen Zell-Zellkontakt verfügt. Um zu überprüfen, ob die synaptische oder extrasynaptische Lokalisierung des NMDA-Rezeptors Einfluss auf die Transportdynamik von Jacob und Importinen hat, haben wir uns den Umstand zu Nutze gemacht, dass man in Primärkulturen durch die pharmakologische Blockierung inhibitorischer Synapsen (hierzu haben wir den GABA_A-Rezeptor Antagonisten Bicuculline verwendet) und eine damit verbundene verminderte Hemmung exzitatorischer Neurone, die Freisetzung von Glutamat an synaptischen Kontakten indirekt stimulieren kann. Die Aktivierung von glutamatergen Synapsen mit diesem Protokoll führte zwar erwartungsgemäß zu einer Translokation von Importinen und Jacob zum Zellkern und die pharmakologische Blockade von NMDA-Rezeptoren resultierte wiederum in einem verminderten Kernimport, aber die Umverteilung von Jacob aus Dendriten und Synapsen zum Zellkern war weit weniger ausgeprägt als bei Aktivierung von synaptischen und extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren. In nachfolgenden Experimenten wurden synaptische NMDA-Rezeptoren irreversibel ausgeschaltet und es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von ausschließlich extrasynaptischen NMDA-

Rezeptoren immer noch zu einem prononcierten Kernimport von Jacob und auch Importinen führt.

Die Anreicherung von Jacob im Zellkern führt zu deutlichen Veränderungen in der Morphologie der Nervenzellen inklusive dem Verlust synaptischer Kontakte sowie einer Vereinfachung der dendritischen Fortsätze. Jacob ist im Zellkern mit der nukleären Matrix sowie dem Euchromatin assoziiert. Da Jacob unter Bedingungen neuronaler Erregung in den Zellkern wandert die auch die CREB-kontrollierte Genexpression blockieren (in der Literatur als CREB shut-off pathway bezeichnet), wurde nachfolgend untersucht welche Konsequenzen die Präsenz von Jacob im Zellkern für die Aktivierung von CREB hat.

Eine gezielte Überexpression von Jacob im Zellkern hatte eine drastische Abnahme von transkriptionell aktiven CREB unabhängig von den eingesetzten Stimulationsbedingungen zur Folge. Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass Jacob Bestandteil des CREB ‚shut-off pathways‘ ist. Es konnte in der Tat gezeigt werden das Jacob im Zellkern funktionell an den Transkriptionsfaktor CREB gekoppelt ist und unter pathophysiologischen Bedingungen als Bestandteil des CREB ‚shut-off pathways‘ eine prominente Rolle beim späten neuronalen Zelluntergang nach exzitotoxischer Schädigung einnimmt. So hat eine gezielte Überexpression von Jacob im Zellkern eine drastische Abnahme von transkriptionell aktiven CREB unabhängig von den eingesetzten Stimulationsbedingungen zur Folge. Ein nukleärer Knock-down von Jacob vermindert deutlich die NMDA-Rezeptor induzierte Zytotoxizität und fördert den Erhalt synaptischer Kontakte und verhindert die Inaktivierung von CREB. Es ist daher zu vermuten, dass Jacob als Regulator des NMDA-Rezeptor induzierten CREB *shut-offs* Genexpression steuert, die in neurodegenerative Prozesse einmündet.

Schließlich konnte gezeigt werden das Jacob auch außerhalb des Zellkerns starke morphogenetische Effekte hat. Dies betrifft vor allem die Morphologie dendritischer Dornen. Die Überexpression von Jacob außerhalb des Zellkerns führt zur Nukleation des subsynaptischen Zytoskeletts sowie einer prominenten Vergrößerung der Postsynapse. Aus diesen Befunden ist zu schließen, dass die Kontrolle der subzellulären Verteilung von Jacob eine wichtige Rolle f. Plastizitätsprozesse spielt.