

Molecular determinants for the subcellular distribution of the synapto-nuclear protein messenger Jacob

M. Sc. Jale Sahin

Jacob is a novel PSD protein component identified as an interaction partner of the neuronal calcium sensor protein Caldendrin in rat brain. Similar to Caldendrin, Jacob is found in the PSD, and somato-dendritic compartments of neurons, but different from Caldendrin it is also found in neuronal nuclei. It was previously shown by our lab that after stimulation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors, Jacob translocates to the nucleus resulting in a rapid stripping of synaptic contacts and a drastically altered morphology of the dendritic tree. Nuclear translocation of Jacob from distal dendrites requires the classical Importin pathway and is mediated by Importin- α binding to nuclear localization signal (NLS) of Jacob. The NLS sequence of Jacob is located in the central α -helical region of the protein and includes an incomplete IQ domain- a region for Caldendrin binding. At elevated calcium (Ca^{2+}) levels Caldendrin controls extranuclear localization of Jacob by competing with Importin- α binding. Under high Ca^{2+} concentrations, which can only be achieved by activation of synaptic NMDA receptor activation, Caldendrin binds to the IQ domain of Jacob, masks the NLS sequence and subsequent Importin- α binding, thereby prevents the nuclear translocation of Jacob. In addition N-myristoylation of Jacob, which attaches the protein to membranous structures in the cell, is another way to regulate the extranuclear localization of Jacob.

In this PhD thesis further determinants for the subcellular distribution of Jacob and its transport to the nucleus were investigated. In the first part of the thesis, the interaction of Jacob with a neurofilament protein, α -Internexin was characterized. Furthermore, α -Internexin was proposed to provide a docking site for Jacob in the somato-dendritic compartment of neurons. In order to test this hypothesis, the Jacob- α -Internexin interaction was further characterized and found that α -Internexin possesses two different interaction sites for Jacob.

Over-expression of extranuclear Jacob in young hippocampal primary neurons results in the formation of huge dendritic PSD-like protrusions. These protrusions can recruit various Jacob-interaction partners and PSD components. In the second part of the thesis, mechanisms of how Jacob induces dendritic protrusions and recruitment of other proteins into these protrusions were addressed. It was shown that α -Internexin is not found in these protrusions. Instead it has a negative influence on the formation of these processes. It was also shown before by our lab that Jacob can form homo-dimers. Here, it was asked whether Jacob dimers, potentially oligomers, can initiate the formation of these processes. Prior to investigate this hypothesis, Jacob dimer formation was investigated in detail and the minimal dimerization sequence was identified.

As noted before, Jacob is N-myristoylated and has to be cut-off from the N-terminus, prior to its nuclear translocation after NMDA receptor activation. Therefore, at last, mechanisms of how Jacob is released from the docking sites were addressed. Role of Calpain, a cysteine protease, in N-terminal truncation and subsequent nuclear trafficking of Jacob were investigated. It was shown that nuclear translocation of endogenous Jacob is blocked after NMDA stimulation in the presence of Calpain inhibitors *in vitro*. Furthermore, *in vivo* results indicate that translocation of green-fluorescent-protein (GFP)-tagged wt-Jacob from distal dendrites of transfected neurons is completely attenuated after NMDA bath application in the presence of a Calpain inhibitor. Finally, *in vitro* Calpain cleavage assays revealed that Jacob is a novel Calpain substrate in neurons.

Molecular determinants for the subcellular distribution of the synaptonuclear protein messenger Jacob

M. Sc. Jale Sahin

Jacob ist ein neues Mitglied der PSD-Proteine und wurde als Interaktionspartner des neuronalen Kalzium-Sensorproteins Caldendrin im Rattenhirn identifiziert. Ähnlich wie Caldendrin ist Jacob in der PSD und im somato-dendritischen Kompartiment von Neuronen lokalisiert, befindet sich darüber hinaus aber zusätzlich in deren Zellkernen. Bereits in früheren Untersuchungen wurde durch unser Labor gezeigt, dass nach Stimulation des N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptors eine Translokation von Jacob in den Zellkern stattfindet, was eine sehr schnelle Reduzierung synaptischer Kontakte zur Folge hat und zu einer drastischen, morphologischen Veränderung dendritischer Fortsätze führt. Die Translokation von Jacob aus den distalen Bereichen der Dendriten in den Zellkern verläuft über den klassischen „Importin-Pathway“ und wird durch eine Bindung von Importin- α an das Kernlokalisierungssignal (nuclear localization signal, NLS) von Jacob vermittelt. Die NLS-Sequenz von Jacob befindet sich in der zentralen α -helikalen Region des Proteins, welche außerdem eine unvollständige IQ-Domäne, den Bereich für die Caldendrin-Bindung, enthält. In Abhängigkeit von der jeweiligen Kalzium- (Ca^{2+}) Konzentrationen kontrolliert Caldendrin die Lokalisation Jacobs außerhalb des Zellkerns, indem es kompetitiv die Bindung an Importin- α verhindert. Bei hohen Ca^{2+} -Konzentrationen, welche nur durch Aktivierung synaptischer NMDA-Rezeptoren erreicht werden können, bindet Caldendrin an die IQ-Domäne von Jacob, maskiert die NLS-Bindungsstelle und verhindert somit durch Blockierung der Importin- α -Bindung den Kerntransport von Jacob. Zusätzlich stellt die N-Myristoylierung von Jacob, welche das Protein an Membranstrukturen der Zelle bindet, einen weiteren Weg zur Regulation der Lokalisation von Jacob außerhalb des Zellkerns dar.

Die vorgelegte Doktorarbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung weiterer Determinanten, die die subzelluläre Verteilung von Jacob und seinen Transport in den Zellkern beeinflussen. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde erstmalig die Interaktion zwischen α -Internexin, einem Protein des Neurofilaments und Jacob nachgewiesen und charakterisiert. In diesem Zusammenhang wurde vorgeschlagen, dass α -Internexin eine Bindungsstelle für Jacob im somato-dendritischen Kompartiment von Neuronen darstellt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Jacob- α -Internexin-Interaktion detaillierter charakterisiert, mit dem Resultat, dass α -Internexin offensichtlich über zwei Bindungsdomänen für Jacob verfügt. Überexpression von Jacob Δ NLS in jungen Primärneuronen des Hippokampus führt in den Dendriten zu einer Bildung großer, PSD-artiger Protrusionen. In diese können verschiedene Jacob-Interaktionspartner und PSD-Komponenten rekrutiert werden. Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, durch welche Mechanismen Jacob die Entstehung von Protrusionen induziert sowie andere Proteine in diesen Bereich rekrutiert. α -Internexin selbst konnte nicht in den Protrusionen nachgewiesen werden. Anstatt dessen scheint es die Bildung dieser Bereiche negativ zu beeinflussen. Da in unserem Labor auch gezeigt werden konnte, dass Jacob Homodimere bildet, wurde in diesem Zusammenhang zusätzlich untersucht, ob Jacob-Dimere (möglicherweise auch Oligomere) die Bildung der Protrusionen initiieren können. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die Jacob-Dimer-Bildung detaillierter analysiert und die kleinste erforderliche Dimerisierungssequenz identifiziert.

Wie eingangs beschrieben, ist Jacob N-myristoyliert und muss vom N-Terminus gespalten werden, bevor dessen Translokation durch Aktivierung des NMDA-Rezeptors stattfinden kann. Abschließend wurden daher Mechanismen untersucht, in deren Folge Jacob

von den jeweiligen Bindungsstellen freigesetzt wird. Die Rolle von Calpain, einer Cystein-Protease, bei der Spaltung des N-Terminus sowie anschließendem Kerntransport von Jacob stand dabei im Mittelpunkt weiterer Untersuchungen. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Kerntransport von endogenem Jacob nach Stimulation durch NMDA in Gegenwart von Calpain-Inhibitoren blockiert wurde. Darüberhinaus zeigen Ergebnisse von Experimenten *in vivo*, dass die Translokation von „green-fluorescent-protein“ (GFP)-markiertem Jacob-wt in distalen Dendriten transfizierter Neurone nach NMDA-Applikation vollständig durch die Gegenwart eines Calpain-Inhibitors verhindert wird. Letztendlich konnte durch Spaltungs-Assays mit Calpain *in vitro*, erstmalig Jacob als dessen Substrat innerhalb von Neuronen beschrieben werden.