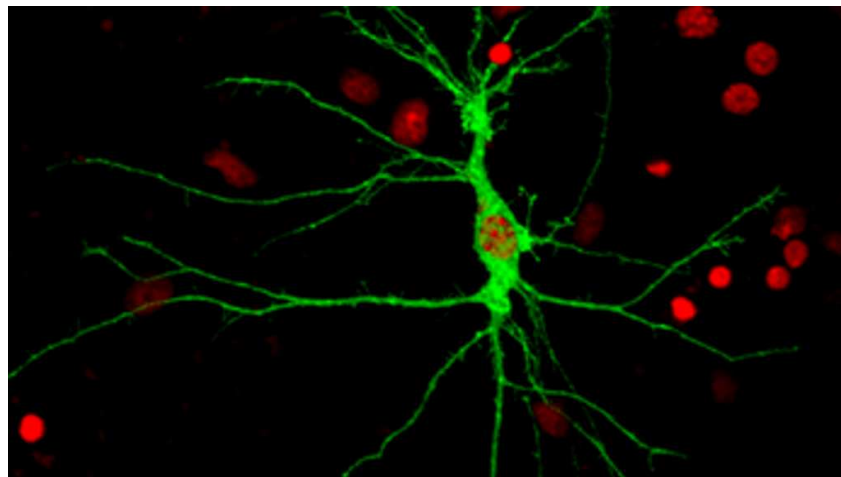


Michael R. Kreutz

Projektgruppe Neuroplastizität,
Leibniz-Institut für Neurobiologie

Zwischen Plastizität und Tod: Der Jacobsweg in Neuronen



Zwischen Plastizität und Tod: Der Jacobsweg in Neuronen

Dr. Michael R. Kreutz
Projektgruppe Neuroplastizität
Leibniz-Institut für Neurobiologie
Brennekestr. 6
39118 Magdeburg
Tel. 0391-6263-516
Fax 0391-6263-229
Email kreutz@ifn-magdeburg.de
www.ifn-magdeburg.de

Zusammenfassung

Nervenzellen sind komplizierte Gebilde, anders als die meisten Körperzellen besitzen sie fein verzweigte grazile Fortsätze, die einem Antennenwald gleich ihre Umgebung nach Signalen abhören. Bis zu 10.000 Kontakte kann so ein nur wenige Mikrometer großes Neuron mit anderen Zellen unterhalten, und jeder dieser Kontakte hat vermutlich eine ganz eigene Stimme im Gesamt-Konzert der Synapsen. So viel Pluralität erfordert Ordnung in der Kommunikation mit der „Zentrale“, denn dort, im Zellkern des Neurons, müssen die Signale aus der Peripherie in eine zelluläre Invest-Strategie übersetzt werden: viel genutzte, aktive Synapsen werden ausgebaut und verstärkt, und die weniger aktiven Kontaktstellen werden vorübergehend stillgelegt oder abgebaut – das ist synaptische Plastizität. Das Komplizierte daran: an allen Synapsen ist der Indikator für Aktivität derselbe: einströmende Calcium-Ionen, und wenn ihre Konzentration besonders hoch ist, kann das auch durch Übererregung zum Sterben der Zelle führen. Plastizität oder Tod – macht allein die Calcium-Dosis den Unterschied? Auf der Suche nach Molekülen, die als Signalmittler die unterschiedlichen Botschaften der Synapsen zum Zellkern bringen können, haben wir ein neues molekulares Tandem gefunden: der erste Partner, genannt *Jacob*, ist der Bote zwischen Synapse und Zellkern. Das *Jacob*-Protein kann aus den neuronalen Fortsätzen über ein molekulares Erkennungssignal in den Zellkern hineingelangen, wo es Prozesse in Gang setzt, die zu Abbauvorgängen an den Synapsen führen. Der zweite Partner, genannt *Calendrin*, spürt in den aktiven Synapsen die eingeströmten Calcium-Ionen auf, bindet dann an *Jacob* und verhindert so dessen Einwandern in den Zellkern und den damit verbundenen Synapsen-Rückbau - der „Jacobs-Weg“ ist unterbrochen. Dieser neu entdeckte Mechanismus stellt ein interessantes Modell dar, wie Nervenzellen unterscheiden können, ob Signale von physiologisch aktivierten Kontaktstellen kommen oder durch pathophysiologische Ursachen wie Ischämie oder Schlaganfall hervor gerufen sind. Solche Schädigungen des ZNS können zum massiven Verlust von Neuronen führen, aber die detaillierten Prozesse, die dabei in den Zellen ablaufen, waren bisher noch nicht bekannt.

Einleitung

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 unserer Arbeitsgruppe konnten wir mit *Jacob* ein Protein identifizieren, das eine wesentliche Rolle bei der Kopplung von synaptischer

Aktivierung und speziell des NMDA-Rezeptors an plastizitätsrelevante Genexpression zu spielen scheint. Die Anreicherung von Jacob im Zellkern führt zu deutlichen Veränderungen in der Morphologie der Nervenzellen. Diese Veränderungen können abhängig von der Charakteristik des ursprünglichen NMDA-Rezeptor Signals einen Verlust synaptischer Kontakte sowie eine verminderte Komplexität von dendritischen Fortsätze beinhalten oder aber eine Stabilisierung bzw. die Neubildung von Synapsen zur Folge haben. Die von der Schram-Stiftung geförderten Arbeiten hatten zum Ziel I) die Transportmechanismen für den Kernimport von Jacob und dessen Regulation aufzuklären, (II) Proteinkomplexe im Zellkern zu isolieren, innerhalb derer Jacob Einfluss auf die zelluläre Genexpression nimmt, (III) sowie Mechanismen zu analysieren, die der von Jacob im Zellkern vermittelten Reduktion von Spine-Synapsen und dendritischen Fortsätzen zu Grunde liegen.

Ergebnisse

Auf der Beobachtung aufbauend das Jacob ausschließlich nach Stimulation von NMDA-Rezeptors in den Zellkern genannt, transloziert und die Anreicherung von Jacob im Zellkern zu deutlichen Veränderungen in der Morphologie der Nervenzellen führt haben wir den Jacobsweg in Neuronen genauer charakterisiert (Dieterich et al., 2008 (Abbildung 1)).

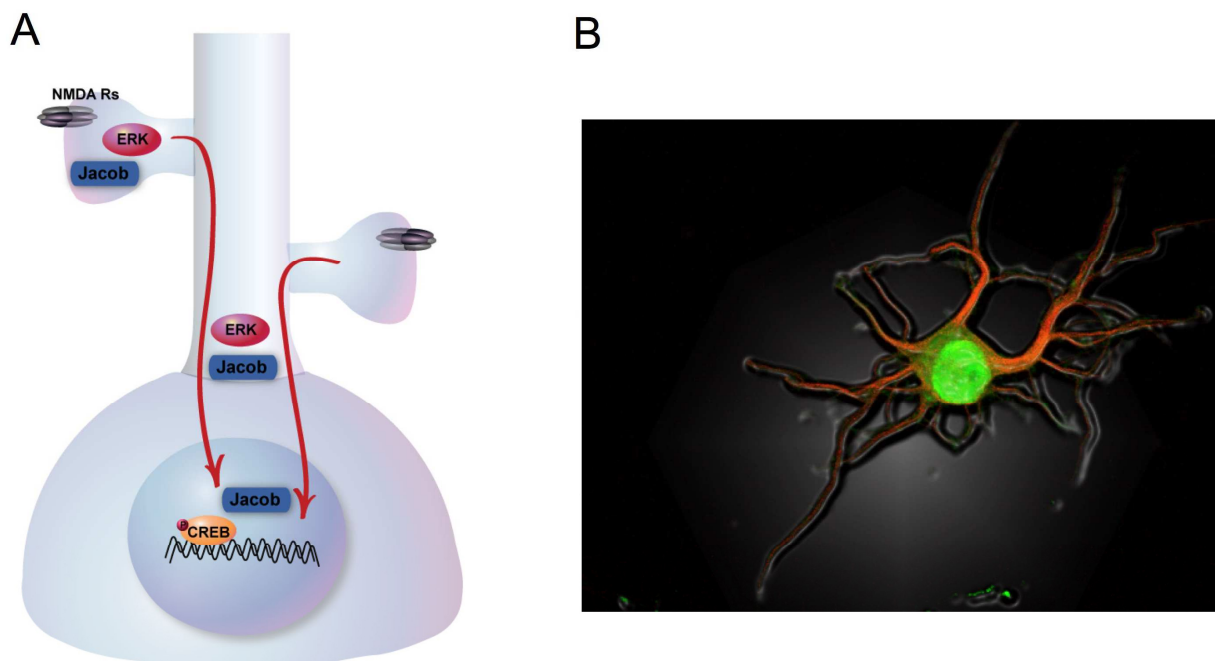


Abbildung 1: (A) Langfristige Veränderungen der synaptischen Kontaktstellen von Nervenzellen erfordern die Kommunikation von NMDA-Rezeptoren an der Zelloberfläche mit dem Zellkern. Jacob ist ein synapto-nukleärer Bote der Signale von NMDA-Rezeptoren an die Genexpression koppelt. Eine wichtige Rolle spielen hierbei der Transkriptionsfaktor CREB und die Kinase ERK. (B) Ein Neuron (Zellfortsätze sind in Rot sichtbar) in einer Primärkultur in dessen Zellkern sich Jacob ansammelt (sichtbar in Grün) zieht seine dendritischen Fortsätze zurück.

Teil des Signalweges ist das synaptische Calcium-Bindungsprotein Caldendrin (Seidenbecher et al., 1998). Im Gegensatz zu Jacob findet sich Caldendrin vor allem prominent im subsynaptischen Zytoskelett (Seidenbecher et al., 1998, Laube et al., 2002) wo es über eine Ca^{2+} -abhängige Bindung ein nukleäres Lokalisierungssignal (NLS) in Jacob maskiert (Dieterich et al., 2008). Die hierzu notwendigen Ca^{2+} -Konzentrationen werden vermutlich nur in dendritischen Spine-Synapsen unterhalb der postsynaptischen Membran erreicht, so dass Caldendrin Jacob nur nach Aktivierung synaptischer NMDA-Rezeptoren in der Synapse fixiert. Der Kerntransport von Jacob erfolgt über den klassischen Importin-Transportweg (Dieterich et al., 2008).

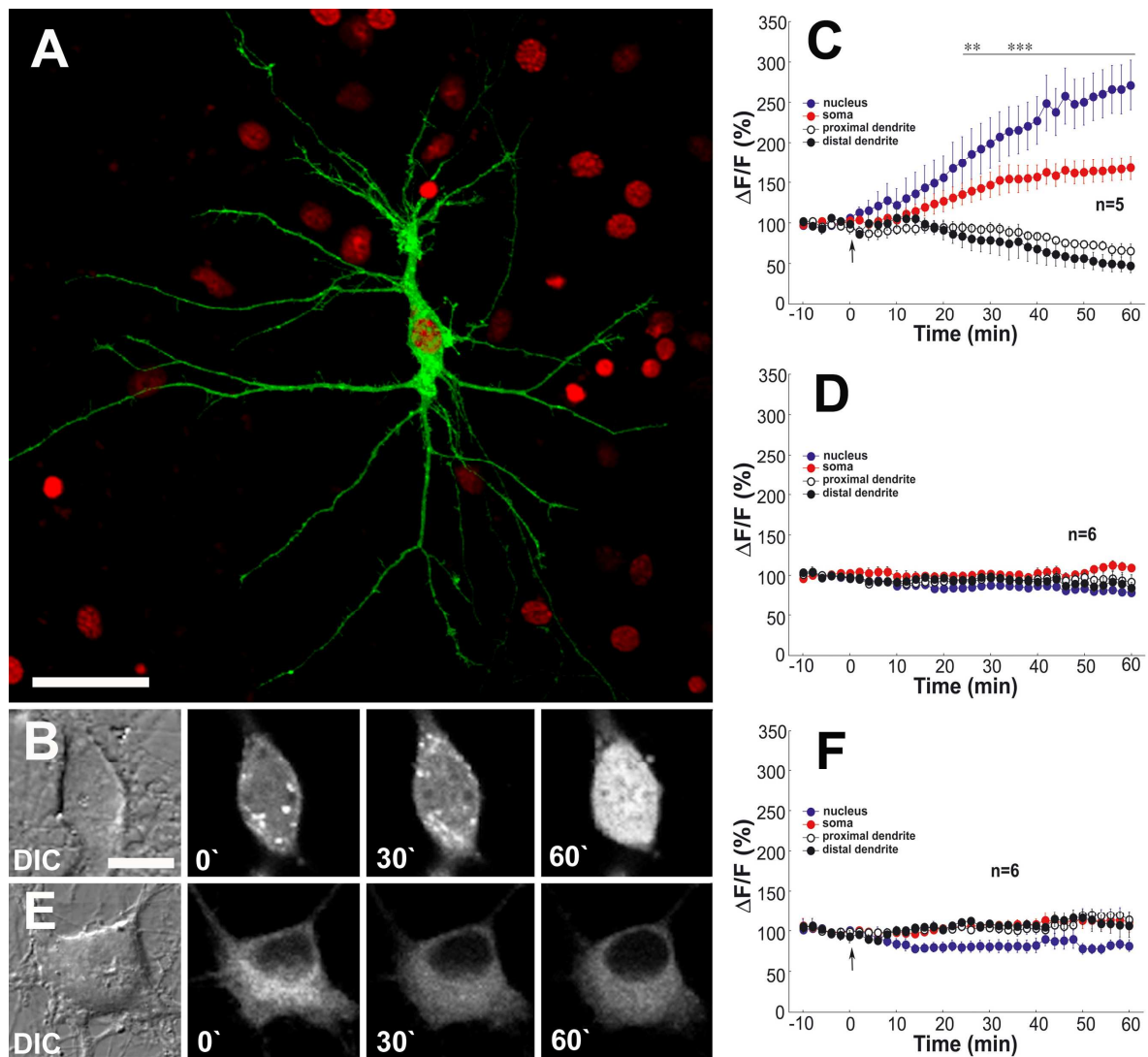


Abbildung 2: A zeigt in Grün eine mit Jacob-GFP transfizierte Zelle. In Rot sind Zellkerne dargestellt. B dokumentiert die Akkumulation von Jacob im Soma und

Zellkern nach Stimulation von Glutamat-Rezeptoren. C und D zeigt die quantitative Auswertung von Jacob-GFP Fluoreszenz in verschiedenen Zellkompartimenten. E und F zeigen, dass Jacob ohne NLS nach Glutamat-Stimulation nicht in den Zellkern wandert.

Der Zellkern ist von Membranen umgeben, die für Proteine undurchlässig sind. In der Kernmembran sind jedoch Kernporen eingelassen, die für die meisten Makromoleküle ab einem bestimmten Molekulargewicht nicht passierbar sind. Dies gilt jedoch nicht für Importine, einer Familie von Proteinen, die als Teil eines Transportsystems das Privileg genießen nicht nur die Kernpore nahezu ungehindert zu passieren sondern bei ihrem Eintritt in den Zellkern auch Passagiere mitnehmen können. Dies sind unter anderem Proteine, die direkt oder indirekt Einfluss auf die Genexpression nehmen. Nun wird nicht jedes Protein von den Importinen akzeptiert, sondern die Eintrittskarte für den Kernimport wird meist über das Vorhandensein eines NLS gelöst, das von den Importinen erkannt wird. Diese hoch-spezifische Bindung hat aber vermutlich nicht nur Bedeutung für den Kernimport selbst sondern auch unmittelbar für den Transport von Proteinen aus der Synapse und den Dendriten zum Zellkern. Von besonderem Interesse für das vorgeschlagene Projekt sind Befunde aus jüngster Zeit, die nahe legen, dass in Nervenzellen Importine nach Aktivierung von NMDA-Rezeptoren, aus Synapsen und Dendriten in den Zellkern wandern (Thompson et al., 2004). Dies deutet darauf hin, dass die Kommunikation zwischen Synapse und Zellkern zumindest teilweise auf dem klassischen Importin-Transportweg beruht. In Nervenzellen wurde aber bisher für diesen Signalweg kein „Passagier“ mit regulatorischer Funktion im Zellkern identifiziert. Jacob ist das erste „Cargo“ auf diesem Weg und die Caldendrin-Jacob-Importin-Interaktion der erste molekulare Mechanismus, der aufzeigt wie ein NMDA-Rezeptor induziertes Ca^{2+} -Signal diesen Transportweg kontrolliert (Dieterich et al., 2008 (Abbildung 2)).

NMDA-Rezeptoren finden sich sowohl in Synapsen als auch in der peri- und extrasynaptischen Plasmamembran, die über keinen synaptischen Zell-Zellkontakt verfügt. Wir konnten zeigen, dass die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren zwar absolut essentiell für den Kernimport von Jacob ist, dass aber die Aktivierung von extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren eine deutlich prominentere Umverteilung von Jacob aus Dendriten in den Zellkern zur Folge hat als die selektive Aktivierung von synaptischen NMDA-Rezeptoren. Dies ist vermutlich auf die Maskierung des NLS

von synaptischem Jacob durch Caldendrin zurückzuführen (Dieterich et al., 2008). Wir haben uns daher gefragt, wie das über den NMDA-Rezeptor vermittelte Ca^{2+} -Signal auf den Jacob / Importin-Transport umgeschaltet wird. Synaptisch lokalisierte NMDA-Rezeptoren befinden sich, im Gegensatz zu extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren, mit der MAP-Kinase ERK in einer gemeinsamen Mikrodomäne. Das Ca^{2+} -Signal des NMDA-Rezeptors kontrolliert die Aktivität dieser Kinase, und es wird vermutet, dass die enzymatische Aktivität von ERK synaptische Ca^{2+} -Signale an die Genexpression im Zellkern koppelt. Daher waren wir nicht überrascht, als wir feststellten, dass die ERK-Kinase keinen Einfluss auf die Translokation von Jacob nimmt, wenn wir NMDA-Rezeptoren außerhalb der Synapse aktivieren. Wenn wir jedoch ERK-Kinasen nach Aktivierung synaptischer NMDA-Rezeptoren pharmakologisch ausschalten, verbleibt Jacob in der Synapse und transloziert nicht in den Zellkern. Wir vermuten daher, dass synaptisches Jacob im Gegensatz zu extrasynaptischem ERK-phosphoryliert in den Zellkern transloziert. Diese könnte fundamentale Konsequenzen für die von Jacob vermittelte Genexpression haben.

Die oben dargestellten Experimente führten zu der Vermutung, dass Jacob im Zellkern mit dem Transkriptionsfaktor CREB auch funktionell assoziiert sein könnte. Da Jacob unter Bedingungen neuronaler Erregung in den Zellkern wandert, die auch die CREB-kontrollierte Genexpression blockieren (CREB *shut-off*), haben wir nachfolgend untersucht welche Konsequenzen die Präsenz von Jacob im Zellkern für die Aktivierung von CREB hat. Die Überexpression von nukleärem Jacob hatte eine drastische Abnahme von transkriptionell aktiven CREB zur Folge (Dieterich et al., 2008 (Abbildung 3). Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass Jacob Bestandteil des CREB ‚*shut-off pathways*‘ ist. Wir führten daher das umgekehrte Experiment durch und haben gezielt die Präsenz von Jacob im Zellkern durch den Einsatz von RNAi-Interferenz unterbunden. Danach stimulierten wir selektiv extrasynaptische NMDA-Rezeptoren und fanden im Gegensatz zu Kontrollen keinen CREB ‚*shut-off*‘, d.h. keine Abnahme von transkriptionell aktivem CREB (Dieterich et al., 2008). Darüber hinaus vermindert der nukleäre Knock-down von Jacob deutlich die NMDA-Rezeptor induzierte Zytotoxizität und fördert den Erhalt synaptischer Kontakte nach Auslösung des CREB *shut-offs* (Dieterich et al., 2008). Interessanterweise hat die Überexpression von Jacob im Zellkern nach Stimulation von synaptischen, aber nicht von extrasynaptischen NMDA-Rezeptoren den gegenteiligen Effekt. Wir fanden unter diesen Bedingungen eine deutliche Zunahme

von phosphorylierten CREB im Zellkern. Wiederum vermuten wir hier einen Zusammenhang mit einer potentiellen ERK-Phosphorylierung von Jacob. Jacob findet sich im Zellkern im Euchromatin in einem Proteinkomplex mit CREB angereichert und der nukleäre Jacob-Komplex enthält DNA (Dieterich et al., 2008). Daher ist zu vermuten, dass Jacob direkt Einfluss auf die Transkriptionsregulation nimmt.

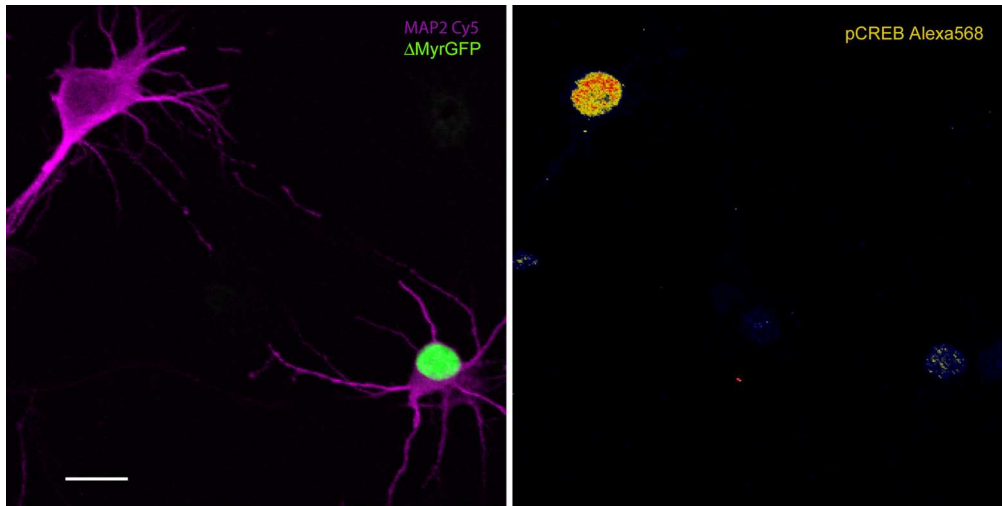


Abbildung 3: In Grün ist die Akkumulation Jacob im Zellkern eines Neurons sichtbar. Die benachbarte Zelle im linken Bildrand ist nicht transfiziert. Als neuronaler Marker ist im violetten Kanal MAP2 dargestellt. Im rechten Bild ist transkriptionell aktives CREB nach Stimulation exzitatorischer Synapsen in beiden Nervenzellen dargestellt. Das mit Jacob transfizierte Neuron zeigt keine Aktivierung von CREB.

Zitierte Literatur

Dieterich DC, Karpova A, Mikhaylova M, Zdobnova I, König I, Landwehr M, Kreutz M, Smalla KH, Richter K, Landgraf P, Reissner C, Böckers TM, Zuschratter W, Spilker C, Seidenbecher CI, Garner CC, Gundelfinger ED, Kreutz MR. Caldendrin – Jacob: A Protein Liaison that Couples NMDA Receptor Signalling to the Nucleus. *PLoS Biology* 6:e34, 2008.

Laube G, Seidenbecher CI, Richter K, Dieterich DC, Hoffmann B, Landwehr M, Smalla KH, Winter C, Böckers TM, Wolf G, Gundelfinger ED, Kreutz MR (2002) The neuron-specific Ca^{2+} -binding protein caldendrin: gene structure, splice isoforms, and expression in the rat central nervous system. *Mol Cell Neurosci* 19:459-475.

Seidenbecher CI, Langnaese K, Sanmarti-Vila L, Böckers TM, Smalla KH, Sabel BA, Garner CC, Gundelfinger ED, Kreutz MR (1998) Caldendrin, a novel neuronal calcium-binding protein confined to the somato-dendritic compartment. *J Biol Chem* 273:21324-21331.