

**Beteiligung des Calciumsensors VILIP- 1 (Visinin-like protein-1) an
synaptischer Plastizität: Regulation der Expression in Modellen der
hippokampalen Plastizität und Einfluss auf
Signaltransduktionsmechanismen.**

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin**

vorgelegt von

**Diplombiologen Marian Brackmann
aus Bad Oeynhausen**

April, 2004

1. Gutachter: Prof. Dr. Uwe Heinemann

2. Gutachter: Prof. Dr. Ferdinand Hucho

Disputation am 20.08.2004

Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2000 bis Juni 2001 in der Abteilung Neurochemie/Molekularbiologie des Leibniz-Instituts für Neurobiologie in Magdeburg, und vom Juli 2001 bis Dezember 2003 in der Arbeitsgruppe Signaltransduktion des Neurowissenschaftlichen Forschungszentrums der Charité, Humboldt-Universität Berlin angefertigt.

An erster Stelle möchte ich PD Dr. Karl-Heinz Braunewell für die Möglichkeit danken, an einem so interessanten und vielseitigen Projekt arbeiten zu dürfen, für seine Betreuung und Hilfsbereitschaft und dafür, dass er immer Zeit gefunden hat, mit mir zu diskutieren.

Prof. Uwe Heinemann danke ich für die Betreuung und die Arbeitsmöglichkeit in dem Johannes-Müller-Institut für Physiologie.

Prof. Ferdinand Hucho danke ich für die Betreuung dieser Arbeit.

Prof. Eckart Gundelfinger danke ich für die Arbeitsmöglichkeit in der Abteilung Neurochemie, für seine Unterstützung und viele schöne Fussballspiele.

Dr. Christina Spilker danke ich dafür, dass sie mir viele Methoden beigebracht hat, und dass sie immer Zeit für hilfreiche Diskussionen und ein Späßchen gefunden hat.

Mein besonderer Dank gilt Heidi Wickborn, Kathrin Schuhmacher und Martina Rabe für die vielen kleinen und großen Hilfen bei der Arbeit im Labor und drumherum und für die gute Stimmung, die nie Langeweile aufkommen ließ.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Neurochemie/Molekularbiologie und der Arbeitsgruppe Signaltransduktion sei für die Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima gedankt.

Svenja Kottmeyer und meiner Familie danke ich für ihre immerwährende Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	2
2.1 Calciumbindende Proteine	3
2.2 Die Familie der intrazellulären neuronalen Calciumsensor (NCS)-Proteine	4
2.3 Struktur von NCS-Proteinen und der Calcium-Myristoylswitch.....	6
2.4 Zelluläre Funktion von NCS-Proteinen.....	8
2.5 Struktur und Funktion von Guanylatcyclasen.....	13
2.6 Mechanismen der Gedächtnisbildung, unter besonderer Berücksichtigung von Guanylatcyclasen und metabotroper Glutamatrezeptoren.....	15
3. Material und Methoden.....	17
3.1 Material	17
3.1.1 Chemikalien.....	17
3.1.2 Kits und Enzyme für die Molekularbiologie und Biochemie	17
3.1.3 Vektoren.....	18
3.1.4 Bakterienstämme	18
3.1.5 Allgemeine Lösungen.....	18
3.1.6 Antikörper	18
3.1.6.1 Primäre Antikörper.....	18
3.1.6.1 Sekundäre Antikörper.....	19
3.1.7 Oligonukleotide.....	19
3.1.7.1 Antisense-Oligonukleotide.....	19
3.1.7.2 Primer für die PCR	20
3.1.8 Allgemeine Materialien für die Zellkultur	20
3.1.9 Tiere.....	21
3.2 Methoden.....	21
3.2.1 Molekularbiologie.....	21
3.2.1.1 RNA-Präparation und reverse Transkription.....	21
3.2.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	21
3.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese.....	22
3.2.1.4 Transformation von Bakterien.....	22
3.2.1.5 DNA-Präparation (Midipräparation)	22
3.2.2 Biochemische Methoden.....	23
3.2.2.1 Aufreinigung von Glutathion-S-Transferase (GST-) Fusionsproteinen.....	23
3.2.2.2 Affinitätsreinigung von Antiseren.....	23

3.2.2.3	Proteinbestimmung.....	24
3.2.2.4	Immunpräzipitation.....	24
3.2.2.5	Subzelluläre Fraktionierung.....	25
3.2.2.6	cGMP- Messung in hippokampalen Zellkulturen.....	25
3.2.2.7	ELISA.....	25
3.2.2.8	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	26
3.2.2.9	Westernblot und Immundetektion.....	26
3.2.3	Zellkultur.....	27
3.2.3.1	Kultivierung von C6-Gliomazellen.....	27
3.2.4	Primärkulturen.....	28
3.2.4.1	Präparation von Körnerzellen aus dem Cerebellum.....	28
3.2.4.2	Präparation und Kultivierung von hippokampalen Neuronen.....	28
3.2.5	Immuncytochemie.....	29
3.2.6	Pharmakologische Stimulation von Zellkulturen.....	29
4	Ergebnisse	31
4.1	Untersuchungen zur funktionellen Rolle von VILIP-1: Effekte von Vilip-1 auf Guanylatcyclasen.....	31
4.1.1	Effekte auf Guanylatcyclase-Aktivität in hippokampalen Neuronen.....	32
4.1.1.1	Verteilung von VILIP-1 und GC-B in hippokampalen Neuronenkulturen.....	33
4.1.1.2	Effekte von VILIP-1 auf GC-B-Aktivität in hippokampalen Neuronen.....	35
4.1.2	Effekte von VILIP-1 auf den Phosphorylierungsgrad von Guanylatcyclase B.....	39
4.1.2.1	Effekte von VILIP-1 auf den Phosphorylierungsgrad in C6 Gliomazelllinien.....	39
4.1.2.2	Effekte von VILIP-1 auf den Phosphorylierungsgrad in hippokampalen Neuronen.....	42
4.1.3	Effekte auf Membrantransport und Rezeptorlokalisierung.....	45
4.1.3.1	ELISA zur Bestimmung der Oberflächenexpression der Guanylatcyclase B in C6 Gliomazellen.....	46
4.1.3.2	Oberflächenexpression des nikotinischen Azetylcholinrezeptors $\alpha 4$ in hippokampalen Zellkulturen.....	50
4.1.3.3	Der Effekt von VILIP-1 auf Clathrin-vermittelte Endozytose.....	53
4.1.3.4	Effekte von Pharmaka, die Membrantransportvorgänge blockieren, auf die cGMP-Produktion	55
4.2	Untersuchungen zur funktionellen Rolle von VILIP-1: Regulation der VILIP-1 Proteinexpression in verschiedenen Plastizitätsmodellen.....	58
4.2.1	Regulation der VILIP-1 Proteinexpression in pharmakologisch stimulierten hippokampalen Zellkulturen.....	58
4.2.2	Regulation der VILIP-1 Proteinexpression in pharmakologisch stimulierten Hippokampi <i>in vivo</i>	66
4.2.3	Regulation der VILIP-1 Proteinexpression nach LTP-Stimulation im Hippokampus <i>in vivo</i> ..	68
4.2.4	Regulation der VILIP-1 Proteinexpression nach LTP-Stimulation im Subikulum <i>in vitro</i>	70

4.3 Der Effekt des GC-B Liganden CNP auf die Expression von LTP im Subikulum in vitro.....	71
5 Diskussion	73
5.1. Der Einfluss von VILIP-1 auf die Guanylatcyclyase B in hippokampalen Neuronen und Zelllinien	73
5.1.1. Der Effekt von VILIP-1 auf Guanylatcyclyaseaktivität in hippokampalen Neuronen.....	73
5.1.2. Untersuchungen zum molekularen Mechanismus des VILIP-1 Effektes	75
5.2. Die Regulation von VILIP-1 in verschiedenen Modellen synaptischer Plastizität	80
5.3. Zusammenfassung und Ausblick.....	84
5.4. Summary.....	86
6 Literatur.....	88
7 Anhang	108
7.1 Abkürzungen.....	108
7.2 Sequenzen un Vektorkarte.....	110