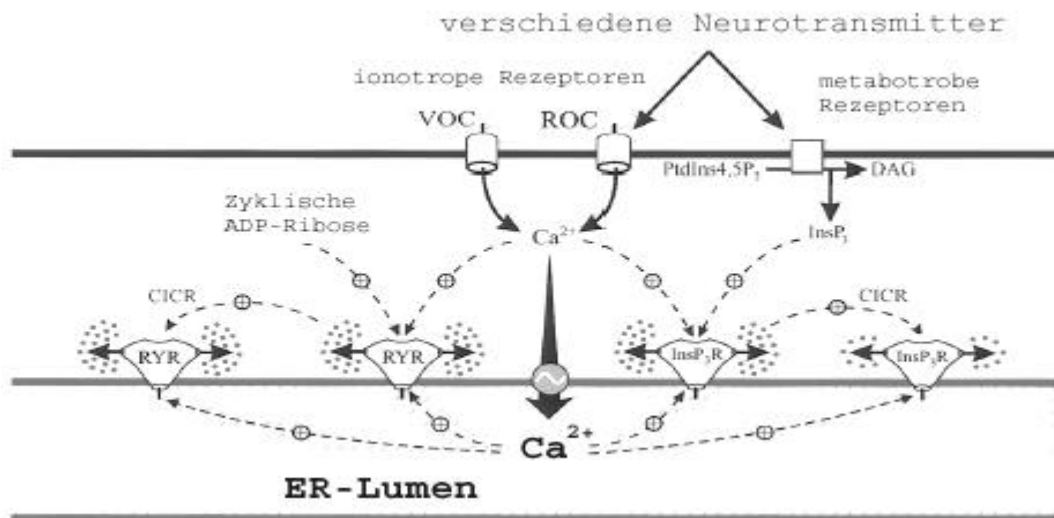


## 2. Einleitung

Das zweiwertige Calciumion ( $\text{Ca}^{2+}$ ) spielt eine herausragende Rolle bei einer Vielzahl zellulärer Vorgänge. Die durch Calcium gesteuerten Prozesse reichen von Skelett- und Herzmuskelkontraktion, Blutgerinnung und Sekretion bis hin zu Genexpression, Zellproliferation, Differenzierung und Zelltod. Die strikte Regulation der intrazellulären Konzentration des als sekundären Botenstoff agierenden Calciumions ist Voraussetzung für seine vielfältigen Wirkungsweisen. So liegt die intrazelluläre Calciumkonzentration in Vertebratenzellen mit  $10^{-7}$  M etwa 10000-mal niedriger als außerhalb der Zelle und kann durch extrazelluläre Signale transient um das 10-100fache erhöht werden (Carafoli and Penniston, 1985).

In der neuronalen Signalverarbeitung spielt Calcium sowohl bei elektrischer Erregung und Neurotransmitterfreisetzung als auch bei der Aktivierung intrazellulärer Enzyme und Signalkaskaden eine wichtige Rolle. So wird in der Präsynapse nach Eintreffen des Aktionspotentials die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöht, was wiederum die Freisetzung der Neurotransmitter in den synaptischen Spalt einleitet (Bennett, 1999). Die postsynaptisch von Calcium gesteuerten Prozesse sind sehr vielfältig und reichen von der Aktivierung einfacher Enzymkaskaden bis zur Regulation der Gentranskription und Prozessen, die die Eigenschaften des Neurons langfristig verändern und somit eine Rolle bei Lern- und Gedächtnisvorgängen spielen.

Langfristige Veränderungen der synaptischen Übertragung wie die Langzeitpotenzierung (LTP) und die Langzeitdepression (LTD) werden als molekulare Mechanismen für Lernen und Gedächtnis angesehen (Svoboda and Mainen, 1999). Da Calciumsignale eine Vielzahl von Prozessen einleiten können, müssen sie sowohl räumlich und zeitlich als auch in ihrer Amplitude definiert sein, um spezifische Mechanismen in Gang zu setzen. Dabei kann Calcium auf unterschiedlichen Wegen in das Cytosol einer Nervenzelle gelangen. Aktionspotentiale und exzitatorische Stimuli können zum Calciumeinstrom durch spannungsabhängige Calciumkanäle in der Zellmembran führen. Postsynaptische Calciumströme werden meistens durch Aktivierung ligandengesteuerter Ionenkanäle, wie des NMDA-Rezeptors oder von AMPA-Rezeptoren, induziert (Blackstone and Sheng, 1999; Blackstone and Sheng, 2002). Darüber hinaus spielt die Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern, zum Beispiel nach Aktivierung Inositol-1,4,5-Trisphosphat ( $\text{IP}_3$ )-gekoppelter Signalwege oder calciuminduzierter Calciumfreisetzung durch Ryanodin- oder  $\text{IP}_3$ -Rezeptoren in der Membran des endoplasmatischen Retikulums, eine wichtige Rolle (Berridge, 1998; Berridge et al., 2000, 2003; siehe Abb. 1).



**Abb. 1. Calciumsignale in Nervenzellen (verändert nach Berridge, 1998)**

Calcium kann auf unterschiedlichen Wegen in das Cytosol der Zelle gelangen, aus dem Extrazellularraum durch spannungsabhängige (VOC) oder ligandenabhängige (ROC) Ionenkanäle, aus intrazellulären Speichern nach Aktivierung von Inositol-1,4,5-Trisphosphat- (InsP<sub>3</sub>R) oder Ryanodinrezeptoren (RYR) durch intrazelluläre Botenstoffe (InsP<sub>3</sub> oder cADP-Ribose) oder durch calciuminduzierte Calciumfreisetzung (CICR).

## 2.1 Calciumbindende Proteine

Unterschiedliche Calciumsignale werden oftmals durch Bindung des Calciumions an spezielle Effektoren, die calciumbindenden Proteine, in physiologisch distinkte Zellantworten überführt. Im Laufe der Evolution haben sich verschiedene Gruppen von calciumbindenden Proteinen entwickelt, die sich anhand ihrer Calciumbindungsdomäne unterscheiden. Die größte und am besten untersuchte Gruppe, ist die Superfamilie der EF-Hand-Proteine (Heizmann and Hunziker, 1991; Persechini et al., 1989) mit mehr als 300 Mitgliedern, die in 45 Untergruppen unterteilt werden (Kawasaki et al., 1998). Weitere, nach ihren Calciumbindungsmotiven zu unterscheidende, Gruppen sind die C2-Domänen enthaltenden Proteine (Rizo and Sudhof, 1998), wie Mitglieder der Proteinkinase C-Familie und der Synaptotagmine, sowie die Gruppe der Annexine.

Die Calciumbindungsdomäne der EF-Hand-Proteine wurde erstmalig durch röntgenkristallographische Untersuchungen an Parvalbumin, einem aus Karpfenmuskel aufgereinigten 12 kDa großen Protein, identifiziert. Zwei  $\alpha$ -Helices, im Parvalbumin die Helices E und F, sind durch eine Schleife aus 12 Aminosäuren, welche die eigentliche calciumbindende Struktur darstellt, miteinander verbunden. Der Name EF-Hand basiert auf der Tatsache, dass sich die N-terminal gelegene E-Helix als Zeigefinger, die Schleife als gekrümmter Mittelfinger und die C-terminal gelegene F-Helix als Daumen der rechten Hand darstellen lässt. Innerhalb der Superfamilie der EF-Hand-Proteine können zwei Gruppen unterschieden werden. Proteine wie Parvalbumin oder die Calbindine, die Calcium ohne wesentliche Konformationsänderungen binden werden als Calciumpufferproteine bezeichnet.

Im Gegensatz dazu führen die so genannten Calciumsensor-Proteine nach Calciumbindung eine signifikante Konformationsänderung durch, die als Auslöser ihrer modulatorischen oder regulatorischen Aktivitäten betrachtet wird.

Zur Gruppe der Calciumsensor-Proteine gehören Enzymregulatoren, wie das ubiquitäre Calmodulin, Proteine des Skelettmuskels, die Gruppe der S100-Proteine und die im folgenden ausführlich beschriebene Gruppe der intrazellulären neuronalen Calciumsensor (NCS)-Proteine.

## **2.2 Die Familie der intrazellulären neuronalen Calciumsensor (NCS)-Proteine**

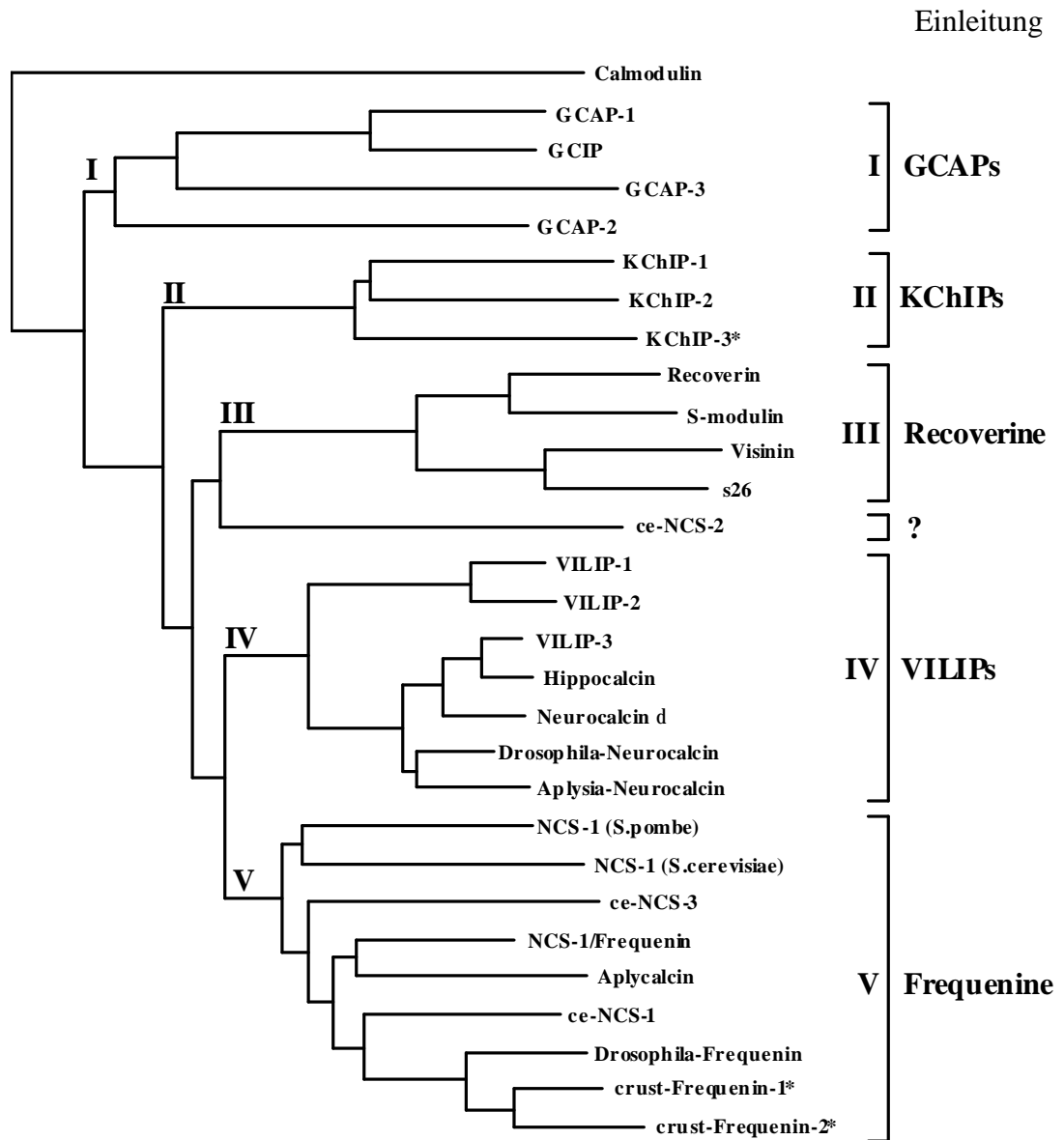
Die Familie der NCS-Proteine umfasst heute mehr als 40 Mitglieder, welche vorwiegend im zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert werden. In frühen Studien wurde über die Aufreinigung einiger NCS-Proteine mittels calciumabhängiger hydrophober Interaktionschromatographie berichtet. Anfang der 90er Jahre konnte die cDNA der ersten NCS-Proteine Visinin und Recoverin kloniert werden. Seitdem sind eine Vielzahl von NCS-Proteinen in verschiedenen Vertebraten- und Invertebratenspezies identifiziert worden. Aufgrund ihrer hohen Sequenzhomologie, sowohl zwischen verschiedenen Spezies als auch innerhalb einer Spezies, ist es schwierig, zwischen paralogen und orthologen Proteinen zu unterscheiden. Zudem sind einige NCS-Proteine zur selben Zeit von verschiedenen Arbeitsgruppen kloniert und unterschiedlich benannt worden, was zu einer uneinheitlichen Terminologie geführt hat.

Die Familie der NCS-Proteine kann aufgrund von Sequenzhomologien in fünf Untergruppen unterschieden werden. Ausgehend von der Sequenz des humanen Calmodulin, ist in Abbildung 2 ein phylogenetischer Stammbaum der NCS-Proteinfamilie dargestellt.

Die erste Gruppe umfasst die retinaspezifischen Guanylatcyclase-aktivierenden Proteine (GCAPs, „guanylate cyclase activating protein“), die in verschiedenen Vertebratenspezies identifiziert wurden. Dazu gehören GCAP-1 (Gorczyca et al., 1994; Palczewski et al., 1994), GCAP-2 (Dizhoor et al., 1995), GCAP-3 (Haeseleer et al., 1999) und das aus Frosch klonierte Guanylatcyclase-inhibierende Protein GCIP (Li et al., 1998).

Die Kaliumkanal-interagierenden Proteine (KChIPs, „Kv-channel interacting proteins“, An et al., 2000a) stellen die zweite Gruppe dar, welche bisher ausschließlich in Säugetieren gefunden wurden. KChIP3 wurde zeitgleich und in verschiedenen Zusammenhängen auch als Calsenilin (Buxbaum et al., 1998) und DREAM (Carrion et al., 1999) beschrieben (siehe 2.4 Zelluläre Funktion von NCS-Proteinen).

Zur Gruppe III gehören die oben genannten Gründungsmitglieder der NCS-Familie, Visinin und Recoverin, und ihre Frosch-Orthologen S-modulin („Sensitivitäts-modulierendes Protein“, Kawamura und Murakami, 1991; Kawamura et al., 1992) und s26 (Kawamura et al., 1996).



**Abb. 22. Phylogenetischer Stammbaum der NCS-Proteine**

Der Stammbaum zeigt die phylogenetischen Beziehungen der einzelnen NCS-Proteine zueinander sowie die Gruppeneinteilung basierend auf Aminosäuresequenzen aus der SWISSPROT-Datenbank (nach Spilker et al., 2002a. (\* KChIP-3 entspricht Calsenilin und DREAM; crust-Frequenin-1 wurde aus dem amerikanischen Flusskrebs, crust-Frequenin-2 aus der Languste kloniert (Jeromin et al., 1999)).

Wie die GCAPs der Gruppe I sind sie hauptsächlich in Zapfen- (Visinin und s26) und Stäbchen- (Recoverin und S-modulin) Photorezeptorzellen der Retina exprimiert. Die Gruppe IV, die Visinin-ähnlichen Proteine (VILIPs, für „Visinin-like proteins“ oder NVPs für „neuronale Visinin-ähnliche Proteine“), beinhaltet Proteine, u.a. das hier untersuchte VILIP-1, die in verschiedenen Neuronenpopulationen im gesamten Zentralnervensystem verschiedener Spezies vorhanden sind. In diese Gruppe gehören VILIP-1, VILIP-2, VILIP-3, Hippocalcin und die Neurocalcine, die in Vertebraten identifiziert wurden. Nachdem die humane cDNA von Neurocalcin  $\delta$  (NCALD, Wang et al., 2001) kloniert wurde, welches einige Autoren bis dahin als Speziesortholog von VILIP-3 bezeichneten, obwohl beide Proteine nur 90%

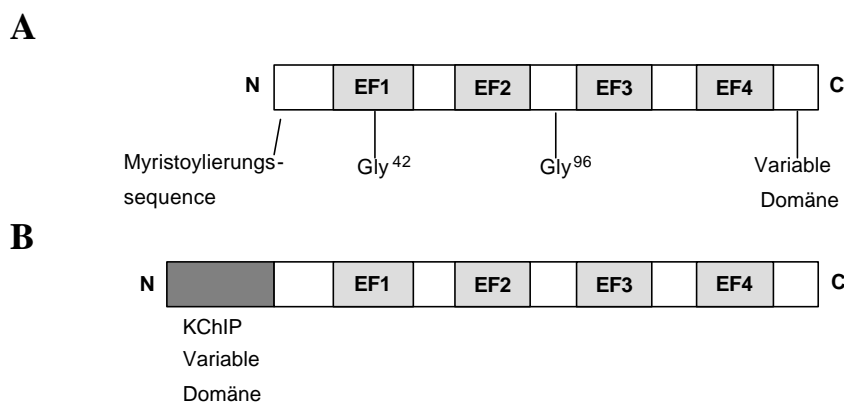
Identität aufweisen, sind nun im Menschen fünf verschiedene VILIPs bekannt. Darüber hinaus sind zwei zur VILIP-Gruppe gehörende Proteine in Invertebraten identifiziert worden, Neurocalcin aus *Drosophila melanogaster* (Teng et al., 1994) und Neurocalcin aus *Aplysia californica* (siehe Abb.2) (Dyer et al., 1996).

Die evolutionsgeschichtlich älteste Gruppe stellen die Frequenine als Gruppe V dar (auch NCS-1 für „neuronaler Calciumsensor I“ genannt, Nef et al., 1995; Pongs et al., 1993). Mitglieder dieser Gruppe wurden in verschiedenen Spezies, von der Hefe bis zum Mensch, gefunden, wobei die Aminosäuresequenzen innerhalb der Gruppe hoch konserviert sind. So ist zum Beispiel Frequenin aus *Saccharomyces cerevisiae* (Hendricks et al., 1999) 59% identisch zum humanen Frequenin. Vertebraten-Frequenin/NCS-1 ist in Mensch, Ratte, Maus, Huhn und *Xenopus* identifiziert worden, darüber hinaus gibt es mehrere Invertebraten-Frequenine (siehe Abb. 2).

Ein NCS-Protein, das aus *C. elegans* kloniert wurde, konnte bisher keiner Gruppe eindeutig zugeordnet werden und stellt wohl einen eigenen Zweig im Stammbaum der NCS-Proteine dar (De Castro et al., 1995).

### 2.3 Struktur von NCS-Proteinen und der Calcium-Myristoylswitch

NCS-Proteine bestehen je nach Untergruppe aus 185-256 Aminosäuren und besitzen vier putative Calciumbindungsstellen. Darüber hinaus befindet sich am N-Terminus fast aller NCS-Proteine eine Konsensussequenz für N-terminale Myristoylierung (Towler et al., 1988). In der Tat konnte für viele NCS-Proteine die N-terminale Myristoylierung oder Acylierung experimentell gezeigt werden (siehe unten). Die KChIPs (Gruppe II in Abb. 2) unterscheiden sich in ihrer Struktur teilweise von den klassischen NCS-Proteinen. Sie besitzen eine variable N-terminale Domäne, die wesentlich länger ist als in anderen NCS-Proteinen. Für KChIP-2 (An et al., 2000b) und KChIP-3/Calsenilin/DREAM (Spreafico et al., 2001) konnte nach Aufklärung der genomischen Struktur gezeigt werden, dass durch alternatives Spleißen unterschiedliche N-terminale Domänen entstehen können. Darüber hinaus fehlt in diesen beiden NCS-Proteinen die N-terminale Myristoylierungskonsensussequenz (siehe Abb. 3). Die erste EF-Hand ist in allen NCS-Proteinen degeneriert und kann aufgrund einer konservierten Cystein-Prolin-Substitution an Position 3 und 4 der Calcium-Koordinationsschleife kein Calcium mehr binden. Darüber hinaus ist die vierte EF-Hand der Recoverine aufgrund einer internen Salzbrücke ebenfalls unfähig zur Calciumbindung, wohingegen EF-Hände 2 und 3 funktionell aktiv sind. In den VILIPs und Frequeninen existieren drei putativ funktionelle Calciumbindungsstellen. Die Bindung von drei Mol Calcium pro Mol Protein konnte durch biophysikalische Untersuchungen zum Beispiel für Hippocalcin (Kobayashi et al., 1993) oder für Neurocalcin  $\delta$  (Ladant, 1995) bestätigt werden.



**Abb. 3. Domänenstruktur von NCS-Proteinen (nach Burgoyne und Weiss, 2001)**

Schematische Darstellung der Struktur der GCAPs, Recoverine, VILIPs, Frequenine (**A**) und KChIPs (**B**). Gly<sup>42</sup> und Gly<sup>96</sup> markieren die Glycinreste, um die bei der calciuminduzierten Konformationsänderung eine Rotation der Aminosäurekette stattfindet. N = N-Terminus, C = C-Terminus.

Nachdem NCS-Proteine Calcium binden, kommt es zur Konformationsänderung und zur Exposition des Myristoyl-Restes aus einer hydrophoben Tasche in das umgebende Milieu und zur Exposition hydrophober Aminosäuren an die Oberfläche des Moleküls, sodass diese Strukturen für Interaktionen mit putativen Zielmolekülen und/oder zellulären Membranen zugänglich sind (Ames et al., 1997). Bei N-terminaler Myristoylierung wird Myristat, eine gesättigte C<sub>14</sub>-Fettsäure, kotranslational vom Myristoyl-CoA auf die freie Aminogruppe eines Glycins am N-Terminus eines Proteins übertragen. Die Reaktion wird durch das Enzym N-Myristoyl-Transferase katalysiert, das eine spezifische Konsensussequenz im jeweiligen Protein erkennt (Towler et al., 1988). N-terminale Myristoylierung kann für ein Protein unterschiedliche funktionelle Bedeutungen haben. Die häufigste Funktion einer Myristoylierung ist sicherlich die Assoziation eines Proteins an die Zellmembran oder andere Membrankompartimente, wobei der Myristoylrest zwar essentiell für die Assoziation ist, für eine stabile Verankerung jedoch nicht ausreicht (Peitzsch und McLaughlin, 1993). Neben dem Calcium-Myristoylswitch der NCS-Proteine gibt es zwei weitere Schaltermechanismen, mit denen myristoylierte Proteine an Membranen binden können. Der Myristoyl-elektrostatistische Switch beruht auf der Interaktion einer polybasischen Region des Moleküls mit den sauren Phospholipiden der Membran. Einige virale Proteine bedienen sich des Myristoyl-proteolytischen Switches. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass ein myristoyliertes Vorläuferprotein des HI-Virus über Myristoylrest und basische Aminosäuren stabil mit der Plasmamembran assoziiert ist. Nach proteolytischer Abspaltung des C-terminalen Teiles ist die Membranassoziation reduziert und der Myristoylrest ist im N-terminalen Spaltprodukt verborgen (siehe Resh, 1999).

Während die beiden letztgenannten Schaltermechanismen nicht, oder nur sehr langsam reversibel sind, bietet der Liganden-Myristoylswitch, wie der Calcium-Myristoylswitch die Möglichkeit, schneller und reversibel mit den Zielmolekülen zu interagieren. So ist eine

intrazelluläre Calciumkonzentration von 200 nM ausreichend, um eine Translokation von Hippocalcin an Membranen zu induzieren. Dabei ist die Geschwindigkeit dieses Effekts von der Calciumkonzentration abhängig und beginnt unmittelbar nach Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels, während nach zehn Sekunden keine weitere Membranassoziation des Proteins mehr zu beobachten ist ( $t_{1/2} = 0,9$  s; O'Callaghan et al., 2003). Für zwei weitere Mitglieder der VILIPs, VILIP-1 und VILIP-3, konnte ebenfalls ein reversibler Calcium-Myristoylswitch in lebenden Zellen nachgewiesen werden (Spilker et al., 2002b, Spilker und Braunewell, 2003), bei dem die Membranassoziation dieser Proteine in lebenden hippokampalen Neuronen nach 10 bis 20 Sekunden vollendet ist. Bemerkenswert ist eine leicht unterschiedliche subzelluläre Verteilung der beiden verwandten Proteine nach Calciumstimulation (Spilker und Braunewell, 2003). Jedoch vollführen nicht alle Mitglieder der Familie der NCS-Proteine, obwohl sie Calcium binden, einen Calcium-Myristoylswitch. NCS-1 und KChIP1 zeigen unabhängig von der Calciumkonzentration eine Membranassoziation, unterziehen sich nach Calciumbindung jedoch einer Konformationsänderung, die die Proteine funktionell aktiviert. Eine unterschiedliche Lokalisation von NCS-1 und KChIP1 führt zu distinkten zellulären Antworten nach globalen, sowie lokalen Veränderungen der Calciumkonzentration (O'Callaghan und Burgoyne, 2003). Im Gegensatz dazu scheint die funktionelle Aktivität von VILIP-1 nicht von der Calciumbindung per se abhängig zu sein, sondern wird durch die subzelluläre Verteilung determiniert (Braunewell et al., 2001; Lin et al., 2002a).

## **2.4 Zelluläre Funktion von NCS-Proteinen**

Arbeiten der letzten Jahre verdeutlichen zunehmend, dass Mitglieder der NCS-Familie, sowie verwandte Calciumbindungsproteine, eine zentrale Positionen in der Funktion von Neuronen einnehmen. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten kürzlich zeigen, dass NCS-Proteine an diversen essentiellen neuronalen Prozessen wie der Modulation von Ionenkanälen, dem Recycling von Ionenkanälen und Rezeptoren über Membrantransport sowie der Kontrolle der Apoptose beteiligt sind. Durch ihre Fähigkeit Calcium zu binden, sind die NCS-Proteine in der Lage, diese sekundären Botenstoffkaskaden direkt in physiologische Antworten zu übersetzen und verschiedenste neuronale Prozesse zu modulieren (Braunewell und Gundelfinger, 1999; Burgoyne und Weiss, 2001; Burgoyne et al., 2004).

### **KChIPs (Kaliumkanal interagierende Proteine)**

Die KChIPs wurden bei dem Versuch, durch einen Hefe-2-Hybrid-Screen akzessorische Untereinheiten für A-Typ Kv4-Kaliumkanäle zu finden, identifiziert (An et al., 2000a). Dabei stellte sich heraus, dass die KChIPs spezifisch, in calciumunabhängiger Weise mit der cytoplasmatischen N-terminalen Domäne der Kv4-Kaliumkanäle interagieren, eine funktionelle Modulation jedoch calciumabhängig ist. KChIPs verzögern die Inaktivierung und beschleunigen die Wiederherstellung zum aktivierbaren Zustand von Kv4-Kaliumkanälen (Bähring et al., 2001). So wird angenommen, dass KChIPs wichtige Regulatoren der Kv4-

Kanäle sind, die für die transienten, auswärtsgerichteten Kaliumströme vieler erregbarer Zelltypen verantwortlich sind. Aufschluss über den molekularen Mechanismus, der dieser Modulation zugrunde liegt konnte kürzlich gegeben werden. KChIPs1-3 verändern die intrazelluläre Verteilung, sowie die molekularen Eigenschaften von Kv4.2 alpha-Untereinheiten. Durch die Bindung von KChIPs an die N-terminale Domäne der Kv4.2-Kanäle wird der Phosphorylierungsgrad verändert, sowie ein hydrophober Bereich maskiert, der einen Transport vom Endoplasmatischen Reticulum (ER) zur Zelloberfläche verhindert. (Shibata et al., 2003).

KChIP3 ist identisch mit zwei anderen NCS-Proteinen, die zur gleichen Zeit beschrieben wurden: Calsenilin, ein Presenilin-interagierendes Protein (Buxbaum et al., 1998), sowie DREAM (downstream-regulatory-element-antagonist modulator), das an bestimmte DNA-Sequenzen (DRE, downstream-regulatory-element) bindet und als calciumabhängiger Repressor der Transkription fungiert (Carrion et al., 1999).

In Neurogliomazellen überexprimiertes Calsenilin erhöht die Freisetzung von Calcium aus dem ER und macht die Zellen damit empfänglicher für apoptotische Reize (Lilliehook et al., 2002). Des Weiteren sind eine reduzierte Aβ-Fragment-Produktion und eine erhöhte LTP in Calsenilin knock-out Mäusen zu beobachten (Lilliehook et al., 2003).

DREAM ist nach der Bindung von Calcium nicht mehr in der Lage an die DRE-Sequenz zu binden, so dass es zu einer calciumabhängigen Aktivierung der Gentranskription kommt. In DREAM knock-out Mäusen ist eine erhöhte Prodynorphin Expression zu finden, da das Prodynorphin-Gen eine DRE-Konsensussequenz enthält, was zu einer verminderten Schmerzwahrnehmung in diesen Tieren führt (Cheng et al., 2002).

Die Frage, ob es sich bei den beschriebenen Funktionen von KChIP-3/Calsenilin/DREAM tatsächlich um pleiotrope Effekte eines Proteins handelt, oder auf alternatives Spleißen der mRNA und das Vorhandensein verschiedener Isoformen zurückzuführen ist, muss noch geklärt werden.

### **Recoverine und GCAPs**

Am besten charakterisiert sind die Recoverine und GCAPs, die spezifisch in Photorezeptorzellen exprimiert sind, womit eine Beteiligung an der retinalen Signaltransduktion naheliegt. Im sehr gut untersuchten Signaltransduktionsapparat der Photorezeptorzellen (siehe Philippov, 2000; Polans et al., 1996) kommen den NCS-Proteinen Aufgaben bei calciumabhängigen Adaptationsprozessen zu.

Photoerregung des Transmembranrezeptors Rhodopsin führt zur Aktivierung einer G-Proteingekoppelten Signalkaskade, in deren Verlauf es zum Abfall der intrazellulären cGMP- und Calciumkonzentration und damit zur Erregungsweiterleitung kommt. Es konnte gezeigt werden, dass Recoverin (Klenchin et al., 1995) und S-Modulin (Kawamura, 1993) bei hohen Calciumkonzentrationen, also im dunkeladaptierten Zustand der Photorezeptorzelle, die Rhodopsin-Kinase durch eine direkte calciumabhängige Interaktion inhibieren (Chen et al., 1995; Gorodovikova und Philippov, 1993). Fällt die Calciumkonzentration in der Zelle nach



Photoaktivierung des Lichtrezeptors Rhodopsin ab, wird die Rhodopsin-Kinase aktiv und es kommt zur Phosphorylierung und damit zu einer Inaktivierung des photoerregten Rhodopsins. Die GCAPs greifen an anderer Stelle in die Signalkaskade in Photorezeptorzellen ein. Ein wichtiger Schritt bei der Rückkehr zum dunkeladaptierten Zustand ist die Wiederherstellung der cGMP-Konzentration durch die retinale Guanylatcyclase (retGC), die durch den Abfall der Calciumkonzentration aktiviert wird. Die GCAPs haben dabei modulatorischen Einfluss, indem sie die retGC bei hohen Calciumkonzentrationen inhibieren und bei Verringerung der Calciumkonzentration nach Photoerregung aktivieren (Dizhoor und Hurley, 1996; Haeseleer et al., 1999; Rudnicka-Nawrot et al., 1998). Somit unterscheiden sie sich zum Beispiel von den Recoverinen, da sie in calciumfreier Form Einfluss auf ihre Zielmoleküle ausüben.

### **Frequenine**

Frequenin wurde ursprünglich aus *Drosophila melanogaster* kloniert (Pongs et al., 1993). Für Frequenin und dem homologen Protein aus Säugetieren NCS-1 sind mittlerweile eine Vielzahl von Funktion bekannt geworden. Frequenin/NCS-1 wurde in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* als Interaktionspartner einer Phosphatidylinositol-4-OH-Kinase (PiK1) identifiziert (Hendricks et al., 1999) und eine Beteiligung an Exocytose in PC12- Zellen nachgewiesen (McFerran et al., 1998). Des weiteren interagiert NCS-1 sowohl mit Kv4.3 Kaliumkanälen in Form einer akzessorische Untereinheit und erhöht dessen Präsentation auf der Zelloberfläche (Guo et al., 2002), als auch mit P/Q-Calciumkanälen, die es in einer spannungsunabhängigen Weise mittels der Tyrosinkinase inhibiert Src (Weiss et al., 2001).

Eine weitere Funktion von NCS-1 scheint bei pathologischen Prozessen im Gehirn zu liegen, da NCS-1 Einfluss auf die Desensitivierung von Dopamin D2-Rezeptoren hat. NCS-1 interagiert mit dem D2-Rezeptor/GRK2 („G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase 2“-Komplex und vermindert eine ligandenabhängige Internalisierung über einen Mechanismus, der eine erniedrigte Phosphorylierung des Rezeptors bewirkt (Kabbani et al., 2002). In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis wurde eine erhöhte Expression von NCS-1 im dorsolateralen Präfrontalcortex von Schizophrenie Patienten gefunden (Koh et al., 2003), einer Hirnregion, in der es zu einer veränderten dopaminergen Transmission bei Patienten mit schizophrenen Erkrankungen kommt.

Eine Verbindung zu Lern- und Gedächtnisvorgängen konnte ebenfalls hergestellt werden. NCS-1, in NG108 Zellen überexprimiert, erhöht die Synapsenbildung sowie die synaptische Transmission (Chen et al., 2001) und wird im Gyrus Dentatus nach LTP-Stimulation hochreguliert (Genin et al., 2001). Im Nematoden *Caenorhabditis elegans* wurde gezeigt, dass NCS-1 an assoziativen Lernvorgängen beteiligt ist. Eine Überexpression des Proteins verbesserte die Gedächtnisfunktion der Tiere, während das Erlernen von Verhaltensweisen und das Erinnerungsvermögen der knock-out Tiere stark beeinträchtigt war (Gomez et al., 2001).

In dissoziierten hippocampalen Neuronen konnte gezeigt werden, dass NCS-1 nicht nur einen Einfluss auf LTP oder Gedächtnisbildung hat, sondern auch auf kurzzeitige Potenzierung

(STP, engl.: *short term potentiation*) und *paired pulse* Faszilitierung, was auf einen präsynaptischen Mechanismus schliessen lässt. Eine erhöhte NCS-1 Expression kann eine *paired pulse* Depression in eine Faszilitierung umwandeln, ohne dabei die basale synaptische Transmission oder die initiale Freisetzungswahrscheinlichkeit von Neurotransmittern zu verändern (Sippy et al., 2003). Die molekularen Mechanismen, die diesen Prozessen zugrunde liegen, sind bislang wenig bekannt.

## VILIPs

Einzelne Proteine der VILIP-Gruppe sind ebenso wie Frequenin/NCS-1 in unterschiedlichen funktionellen Zusammenhängen beschrieben worden. Ausgehend von Studien über die Beteiligung von Recoverinen an photorezeptorspezifischen Signalwegen wurde untersucht, ob NCS-Proteine einen generellen Einfluss auf G-Protein-gekoppelte Signalkaskaden ausüben. So konnte gezeigt werden, dass VILIP-1 und NCS-1 *in vitro* einen S-modulin-ähnlichen Effekt haben, indem sie inhibierend auf die Rhodopsin-Kinase-Aktivität wirken (DeCastro et al., 1995).

In stabil transfizierten Zelllinien hat VILIP-1 modulatorische Effekte auf die Konzentration zyklischer Nukleotide, die allerdings nicht auf Modulation von Rezeptorkinase-Aktivität sondern offenbar auf Interaktion mit membranständigen Cyclase-Enzymen beruhen. Nach Stimulation der Adenylat-Cyclase in C6-Glioma-Zellen oder tsA201-Zellen ergab sich in VILIP-1-transfizierten Zellen eine signifikant erhöhte cAMP-Konzentration verglichen mit nicht transfizierten Kontrollzellen (Braunewell et al., 1997a; Lin et al., 2002a). Eine Modulation des cAMP-Spiegels durch rekombinantes VILIP-1 konnte auch im olfaktorischen System der Ratte gezeigt werden, wo VILIP-1 stark exprimiert wird (Boekhoff et al., 1997). Ein Effekt von VILIP-1 auf den cAMP-Spiegel wurde auch in nicht-neuralen Zellen gefunden. Nicht-aggressive Carcinoma-Zelllinien aus der Haut der Maus, zeigen eine hohe VILIP-1 Expression, einhergehend mit erhöhten cAMP-Spiegeln, während invasive Zellen eine verringerte VILIP-1 Proteinexpression und verringerte cAMP-Spiegel aufweisen. Es konnte sogar gezeigt werden, dass die Überexpression von VILIP-1 in invasiven Zellen diese über eine erhöhte cAMP-Akkumulation in nicht-invasive Zellen überführt (Mahloogi et al., 2003).

Ein Hefe-2-Hybrid Screen, bei dem Interaktionspartner für die  $\alpha 4$  Untereinheit des nikotinischen Azetylcholinrezeptors gesucht wurden, identifizierte VILIP-1 als Interaktionspartner der cytoplasmatischen Domäne der Rezeptoruntereinheit. Biochemische und elektrophysiologische Untersuchungen ergaben, dass VILIP-1 sowohl die Zelloberflächenexpression, als auch die Empfindlichkeit des Rezeptors für den Agonisten Azetylcholin erhöht (Lin et al., 2002).

In transfizierten Zellen und in primären Neuronen aus dem Cerebellum wurde ein modulatorischer Effekt von VILIP-1 auf Guanylatcyclase-Aktivität festgestellt. Da die katalytischen Domänen von Guanylat- und Adenylatcyclasen hoch homolog sind, wurde ein

direkter Effekt von VILIP-1 auf diese Domäne vermutet. Tatsächlich konnte *in vitro* eine calciumabhängige Interaktion zwischen rekombinantem VILIP-1 und der katalytischen Domäne von Guanylatcyclasen gezeigt werden (Braunewell et al., 2001a).

Ähnlich wie NCS-1, scheint VILIP-1 ebenfalls eine Rolle bei neurologischen Erkrankungen zu spielen. Eine veränderte VILIP-1 Proteinexpression wurde in Gehirnen von Patienten mit Morbus Alzheimer und Schizophrenie gefunden (Schnurra et al., 2001; Braunewell et al., 2001; Bernstein et al., 2002, 2003), sowie erhöhte neurotoxische Effekte nach Calciumstimulation in VILIP-1 transfizierten Zellen (Schnurra et al., 2001).

Ein weiteres Protein aus der VILIP-Gruppe, das eine Aktivierung von Cyclasen zeigt, ist Neurocalcin  $\delta$ . Rekombinantes Neurocalcin  $\delta$  aktiviert *in vitro* bei hohen Calciumkonzentrationen spezifisch die retinale Guanylatcyclase 1 (Kumar *et al.*, 1999). Kürzlich konnte eine physiologische Interaktion von Neurocalcin  $\delta$  und der retinalen Guanylatcyclase in den sekundären Neuronen der Retina gezeigt werden (Krishnan et al., 2004).

Hippocalcin wurde durch Hefe-2-Hybrid-Screens als Interaktionspartner von zwei verschiedenen Proteinen identifiziert. Bei einem handelt es sich um das neuronale Apoptose-Inhibitor-Protein (NAIP, „neuronal apoptosis inhibitory protein“, Mercer et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass Hippocalcin-Expression bei calcium-induziertem Zelltod von transfizierten neuronalen Zelllinien zu einer Potenzierung des protektiven Effekts von NAIP führte, jedoch diesen protektiven Effekt nicht auf sympathische Neurone nach Entzug des Wachstumsfaktors NGF („neuronal growth factor“) hatte (Lindholm et al., 2002).

Ein weiterer Interaktionspartner von Hippocalcin ist die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase-Kinase (MAPKKK) MLK2 (Nagata et al., 1998). Hippocalcin interagiert spezifisch mit dem C-terminalen Teil von MLK2, die funktionelle Signifikanz dieser Interaktion konnte jedoch bisher nicht geklärt werden.

Weitere funktionelle Hinweise für Hippocalcin ergaben sich aus Untersuchungen von Hippocalcin-defizienten Mäusen (Kobayashi et al., 2000). Obwohl diese Mäuse keinen auffälligen Phänotyp hatten und der Hippocampus sich morphologisch normal entwickelte, zeigten sie Lerndefizite in Verhaltensexperimenten. Auf molekularer Ebene konnte gezeigt werden, dass die Ionomycin- oder NMDA-induzierte Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK2 in semi-*in vivo* Hippocampusschnitten von Hippocalcin-defizienten Mäusen im Vergleich zu wildtypischen Mäusen stark verringert war. Somit hat Hippocalcin möglicherweise modulatorischen Einfluss auf MAP-Kinase-Signalwege.

VILIP-3, das eine 94 %ige Homologie zu Hippocalcin hat, zeigt ebenfalls einen Effekt auf die Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2, sowie auf die Proteinexpression von ERK2 in transfizierten neuronalen Zelllinien (Spilker et al., 2002b).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass NCS-Proteine an verschiedensten

neuronalen calciumabhängigen Prozessen, wie synaptischer Transmission und Lernvorgänge, Regulation von Genexpression, Transport von Rezeptoren, Modulation von Ionenkanälen und membranassoziierten Enzymen beteiligt sein können. Ob diese Effekte auf die unterschiedlichsten Zielmoleküle und Interaktionspartner gemeinsame zugrundeliegende Mechanismen haben, bedarf noch der Aufklärung.

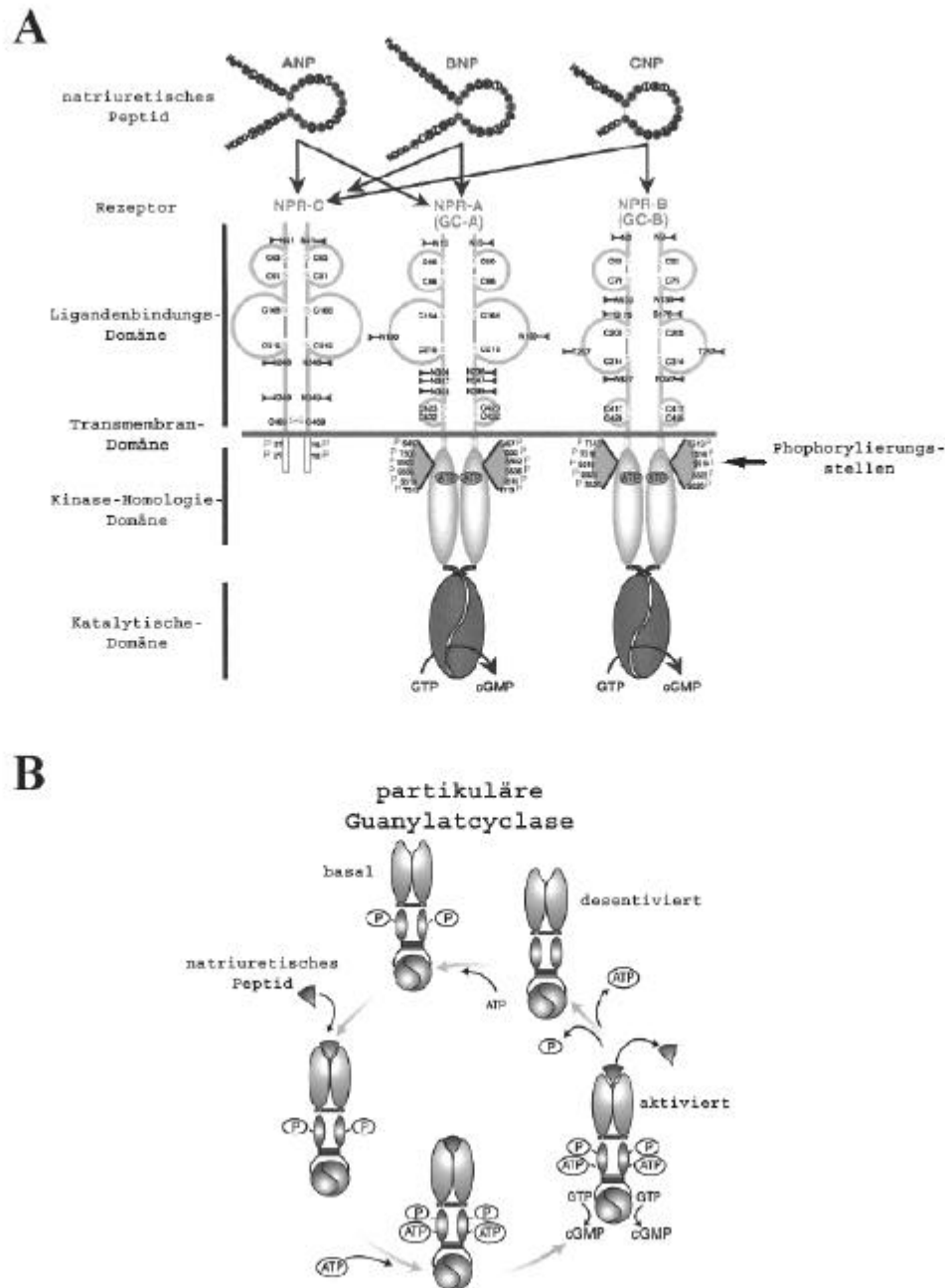
Darüber hinaus hat sich in letzter Zeit gezeigt, dass NCS-Proteine möglicherweise auch bei neurologischen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Schizophrenie eine Rolle spielen, da für einige Proteine der VILIP-Gruppe eine veränderte Expression in Gehirnen von Alzheimer Patienten und Schizophrenie Erkrankten festgestellt werden konnte (Shimohama et al., 1996; Schnurra et al., 2001; Braunewell et al., 2001; Bernstein et al., 2002, 2003), während NCS-1 eine veränderte Expression in Gehirnen Schizophrenie Patienten zeigt und einen Einfluss auf die dopaminerge Transmission hat (Koh et al., 2002; Kabbani et al., 2002).

## 2.5 Struktur und Funktion von Guanylatcyclasen

Die Modulation von Adenylatcyclasen durch VILIP-1 (siehe 2.4 *Zelluläre Funktion von NCS-Proteinen*) gab Anlass, einen möglichen Effekt von VILIP-1 auf Guanylatcyclasen zu untersuchen, da die katalytischen Untereinheiten der Cyclasen sehr hoch homolog sind. Eine Substitution von zwei einzelnen Aminosäuren reicht aus, um die Präferenz der Enzyme für Adenosintriphosphat (ATP), bzw. Guanosintriphosphat (GTP) auszutauschen (Tucker et al., 1998).

Die Guanylat-Cyclasen (GCs) sind cytoplasmatische oder membranassoziierte Enzyme, die die Synthese von zyklischem GMP (cGMP) aus GTP katalysieren. cGMP ist ein sekundärer Botenstoff, der z.B. die Proteinkinase G (PKG oder cGK, „cGMP-abhängige Kinase) aktiviert. Die Guanylat-Cyclasen können in verschiedene Familien untergliedert werden: Die löslichen GCs, die aus einem Heterodimer von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit bestehen, und die partikulären, membrangebundenen GCs, die im aktiven Zustand Homodimere oder Homotetramere bilden (Wilson und Chinkers, 1995; Simpson et al., 1999). Die lösliche GC wird durch den retrograden, diffusiblen Botenstoff Stickstoffmonoxid (NO) aktiviert.

Sieben Mitglieder der partikulären Guanylat-Cyclase Familie sind derzeit in Säugetieren bekannt. Zu ihnen gehören die retinalen Isoformen retGC-1 (GC-E) und retGC-2 (GC-F) (Yang et al. 1995), der hauptsächlich im Dünndarm exprimierte Enterotoxinrezeptor GC-C (Mann et al., 1997), der olfaktorische Rezeptor GC-D (Fülle et al., 1995), als auch die natriuretischen Peptid-Rezeptoren GC-A und GC-B, die als Rezeptoren für ANP, BNP und CNP (atriale, brain-derived und C-Typ natriuretische Peptide) dienen (Wedel und Garbers, 1997). Ein weiteres Mitglied dieser Familie ist der sogenannte *clearance*-Rezeptor NPR-C („natriuretischer Peptid Rezeptor C“), der keine funktionelle intrazelluläre Domäne besitzt. Die Aufgabe dieses Rezeptors besteht hauptsächlich darin, ANP, BNP und CNP aus dem extrazellulären Raum zu entfernen, obwohl auch Verbindungen zu Signalkaskaden in bestimmten Geweben postuliert wurden (Andreassi et al., 2001; Callahan et al., 2004).



**Abb. 4. Domänenstruktur von Guanylatcyclasen (nach Potter und Hunter, 2001) und Modell der Aktivierung der partikulären Guanylatcyclase (nach Lukas et al., 2000)**

**A:** Schematische Darstellung der Struktur der GC-A (NPR-A), GC-B (NPR-B) und des NPR-C. **B:** putatives Modell der Aktivierung einer pGC anhand von GC-A. Erläuerungen im Text. P = phosphorylierte Aminosäuren, ATP = Adenosin-Triphosphat, GTP = Guanosin-Triphosphat, cGMP = zyklische Guanosinmonophosphat.

Mitglieder dieser Familie besitzen eine extrazelluläre Ligandenbindungs-Domäne, eine Transmembran-Domäne, eine Kinase-Homologie-Domäne (KHD) und die hoch konservierte katalytische Domäne (siehe Abb. 4 A).

Die Bindung von ANP an die extrazelluläre Domäne der GC-A induziert eine Konformationsänderung der Bindungsdomäne, die wahrscheinlich wiederum eine Bindung von ATP an die KHD erleichtert und so zu einer Konformationsänderung der KHD führt. Dies ermöglicht es den katalytischen Domänen aktive Dimere zu bilden und cGMP zu produzieren. Der genaue Mechanismus, wie die Bindung des Hormons zu einer Konformationsänderung der zytosolischen Komponenten der GC-A führt, ist noch unbekannt, es wird jedoch angenommen, dass ein sehr ähnlicher Mechanismus für die GC-B existiert.

GC-A, als auch GC-B, kann nur aktiviert werden, wenn die KHD vollständig phosphoryliert ist. Im Gegensatz zu vielen anderen Rezeptoren, wie zum Beispiel G-Protein gekoppelte Rezeptoren (Kim et al., 2003), werden diese Rezeptoren nicht durch Phosphorylierung, sondern durch Dephosphorylierung desensitiviert (Potter und Garbers, 1996). Fünf Phosphorylierungsstellen, ausschließlich Phosphoserin und Phosphothreonin, sind im N-terminalen Bereich der KHD der GC-B bekannt, während es in der GC-A sechs sind (Potter und Garbers, 1998a; Potter und Garbers, 1998b, siehe Abb. 4A, B). Bei der Desensitivierung dieser Enzyme ist zwischen der homologen Desensitivierung und der heterologen Desensitivierung zu unterscheiden. Während die homologe Desensitivierung die Bindung des natriuretischen Peptides voraussetzt und der Rezeptor eine globale Dephosphorylierung erfährt, wird bei der heterologen Desensitivierung nur eine einzelne Aminosäure in der GC-B dephosphoryliert (Ser-523), sowie eine Proteinkinase C-abhängige Phosphatase aktiviert (Potter und Garbers, 1994).

Über die Funktion von partikulären Guanylatcyclasen im Nervensystem ist sehr wenig bekannt, obwohl GC-A und GC-B dort in vielen Hirnarealen exprimiert sind (Stephan et al., 1999). Bislang sind sie in der Peripherie als Regulatoren des lokalen Blutdrucks, der Diurese und der Zellteilung eingehend charakterisiert worden (Für Übersichtsartikel siehe: Lucas et al., 2000; Tremblay et al., 2002).

## **2.6 Mechanismen der Gedächtnisbildung, unter besonderer Berücksichtigung von Guanylatcyclasen und metabotroper Glutamatrezeptoren**

Eines der großen Ziele der modernen Neurobiologie ist es, zu verstehen, wie Gedächtnisbildung funktioniert und Lernprozesse wiederum Gedächtnisinhalte verändern können. Gleichzeitig ist dieses Gebiet eine der grössten und am schnellsten wachsenden Fachrichtungen. Im Rahmen dieser Arbeit ist es nicht möglich eine ausführliche Einleitung zu diesem Thema zu schreiben, deshalb soll hier nur eine kurze Einführung gegeben werden.

Als zelluläres Korrelat der Gedächtnisbildung wird allgemein eine veränderte synaptische Transmission zwischen den Neuronen angenommen. Experimentell kann diese durch die Phänomene der Langzeitpotenzierung (LTP, Bliss und Lomo, 1973), sowie der Langzeitdepression (LTD, Dudek und Bear, 1992) der synaptischen Transmission im Hippokampus der Ratte dargestellt werden. Die Bedeutung der hippokampalen Region für die Gedächtnisbildung ist bereits seit den fünfziger Jahren bekannt (Milner und Pennfield, 1955; Milner, 1959) und seither eingehend untersucht worden. Neuere Daten zeigen, dass für

erfolgreiches, dauerhaftes Lernen *de novo* Proteinsynthese notwendig ist (Wells und Fallon, 2000).

Sowohl einige Formen der LTP, als auch einige Formen der LTD benötigen eine Aktivierung der ionotropen N-Methyl-D-Aspartat Rezeptoren (NMDAR, Collingridge et al., 1983; Dudek und Bear, 1992), bzw. der metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR, McGuinness et al., 1991; Bashir et al., 1993; Manahan-Vaughan, 1997).

Ein Mitglied der Cyclase-Familie ist an den oben genannten Prozessen beteiligt. Die lösliche Guanylatcyclase ist sowohl im Zusammenhang mit LTP (Schuman und Madison, 1991) und LTD (Daniel et al., 1993) charakterisiert worden. Sie wird durch die diffusiblen Botenstoffe Stickstoffmonoxid (NO) und Kohlenstoffmonoxid (CO), sowie Calcium aktiviert (Schmidt et al., 1992). Sie zeigt eine Anreicherung in der Präsynapse (Burette et al., 2002) und ist in einem retrograden Mechanismus involviert, der die synaptische Transmission beeinflusst (Zhuo et al., 1994). Eine Beteiligung von partikulären Guanylatcyclasen an Lern- und Gedächtnisvorgängen wurde bislang erst in einem Befund gezeigt. Die Applikation von CNP, des Liganden der GC-B, in das Gehirn von Ratten steigerte die Lernleistung der Tiere in passiven Vermeidungstests (Telegdyet al., 1999)

mGluR sind G-Proteingekoppelte Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen. In dieser Familie sind derzeit acht verschiedene Rezeptoren bekannt, die in drei Gruppen unterteilt werden. Die Gruppe I mGluR besteht aus den Rezeptoren mGluR1 und mGluR5, in Gruppe II sind mGluR2 und mGluR3 und in Gruppe III mGluR4, 6, 7, 8 zusammengefasst. Während die Gruppe I nach Stimulation die Phospholipase C aktiviert, inhibieren Gruppe II und III die Adenylatcyclase. Die Beteiligung der mGluR an synaptischen Plastizitätsvorgängen scheint sehr divers und reicht von der Modulation ionotroper Kanäle bis zu der Aktivierung von intrazellulärer Signalkaskaden über sekundäre Botenstoffe (für Übersichtsartikel siehe Anwyl, 1999). Die Aktivierung von mGluR führt zu einer Verlängerung tetanisch-induzierter LTP (Behnisch und Reymann, 1993; Manahan-Vaughan und Reymann, 1996) und sie induziert eine Form chemisch-induzierter LTP, der *slow-onset* Potenzierung, die keine elektrische Stimulation benötigt (Bortolotto und Collingridge, 1992; Manahan-Vaughan und Reymann, 1995a,b, 1997). Die Applikation von DHPG, einem spezifischen Gruppe I mGluR Agonisten, führt *in vitro* zu LTD in der CA1 Region des Hippokampus, die von Proteintranslation aber nicht von RNA-Transkription abhängig ist (Huber et al., 2000). Die Vorbereitung (priming) von LTP durch mGluRs erfordert ebenfalls Proteinsynthese, besonders auf der Ebene der Translation (Raymond et al., 2000). Der Effekt der Gruppe I mGluR auf Proteinsynthese konnte in hippokampalen Zellkulturen gezeigt werden. Hier führte eine Applikation von DHPG in das Zellkulturmedium zu einer erhöhten Proteintranslation im Zellsoma und in den neuronalen Dendriten (Weiler und Greenough, 1993; Weiler et al., 1997; Job und Eberwine, 2001). So scheinen mGluRs der Gruppe I besonders in Formen der synaptische Plastizität involviert zu sein, die Proteinsynthese erfordert und auf diese Weise langanhaltende Veränderungen in der synaptischen Transmission der Neurone hervorruft.