

Aus dem Institut für Neurophysiologie
CharitéCentrum 2 für Grundlagenmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Immunzytochemische Untersuchungen zur Ko-Lokalisation des neuronalen
Calcium-Sensor- (NCS-) Proteins VILIP-1 mit dem nikotinischen
Acetylcholinrezeptor ($\alpha_4\beta_2$).

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Cornelia Noack

aus Hoyerswerda

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. Karl-Heinz Braunewell
 2. Prof. Dr. med. Ingo Bechmann
 3. Prof. Dr. med. Jens Dreier

Datum der Promotion: 29.01.2010.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Karl-Heinz Braunewell, der mir die Bearbeitung dieses interessanten Themas ermöglichte und mich in das wissenschaftliche Arbeiten einführte. Er begründete meinen Enthusiasmus an der experimentellen Forschung und deshalb danke ich ihm für seine stete Betreuung und Unterstützung und vor allem für sein Vertrauen.

Prof. Dr. Uwe Heinemann danke ich für die Ermöglichung meiner Forschungstätigkeit an dem Institut für Neurophysiologie.

Der Arbeitsgruppe Signaltransduktion sei gedankt für die angenehme herzliche Arbeitsatmosphäre und für die erholsamen und unterhaltsamen „Kränzchen“.

Dr. Marian Brackmann und Katharina Schönrrath danke ich für die Einführung in die Welt der Laborarbeit, das Lehren vieler Methoden, Kniffe und Tricks und die vielen bereichernden Diskussionen.

Meiner Familie gilt der Dank für ihre Begleitung und Unterstützung.

Dr. Christian Noack danke ich für sein großes Bruder- und Forscherherz. Die vielen Gespräche und Diskussionen waren prägend, sie eröffneten mir immer wieder neue Horizonte und festigten mich in meiner Arbeit und Person.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
1 Einleitung	1
1.1 Neuronale Acetylcholinrezeptoren (nAChR)	1
1.2 Struktur und Eigenschaften des $\alpha_4\beta_2$ nAChR	1
1.3 Der Hippokampus und seine Rolle für die Gedächtnisbildung	4
1.4 Die Rolle des $\alpha_4\beta_2$ nAChR bei Entstehung und Ausprägung von neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen	6
1.4.1 Demenz vom Alzheimer-Typ (DAT)	7
1.4.2 Schizophrenie	8
1.5 Calcium-bindende Proteine (CBP)	9
1.5.1 Neuronale Calcium-Sensor- (NCS-) Proteine	10
1.5.2 Das NCS-Protein VILIP-1 im Kontext neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen	15
1.5.2.1 Demenz vom Alzheimer-Typ (DAT)	15
1.5.2.2 Schizophrenie	17
1.6 Die Interaktion von VILIP-1 mit dem $\alpha_4\beta_2$ nAChR	18
2 Zielsetzung der Arbeit	20
3 Material und Methoden	22
3.1 Material	22
3.1.1 Allgemeine Chemikalien	22
3.1.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien	23
3.1.3 Kits und Enzyme	23
3.1.4 Allgemeine Materialien für die Zellkultur	23
3.1.5 Allgemeine Lösungen	24
3.1.6 Vektoren	25

3.1.7	Bakterienstämme	25
3.1.8	Antikörper	25
3.1.8.1	Primäre Antikörper	25
3.1.8.2	Sekundäre Antikörper	26
3.1.9	Tiere	26
3.2	Methoden	27
3.2.1	Molekularbiologie	27
3.2.1.1	Transformation von Bakterienstämmen	27
3.2.1.2	DNA-Präparation (Maxipräparation)	27
3.2.1.3	Restriktion von DNA	28
3.2.1.4	Agarose-Gelelektrophorese	28
3.2.2	Zellkultur	28
3.2.2.1	Kultivierung von Human embryonic kidney (HEK) 293 Zellen	28
3.2.2.2	Transiente Transfektion	29
3.2.3	Primärkultur hippocampaler Neuronen	29
3.2.3.1	Präparation und Kultivierung	29
3.2.3.2	Transiente Transfektion	30
3.2.4	Pharmakologische Stimulation	30
3.2.5	Immunzytochemie	31
3.2.6	Auswertung	32
4	Ergebnisse	33
4.1	VILIP-1-GFP erhöht die Oberflächenexpression des $\alpha_4\beta_2$ nAChR in ko-transfizierten HEK 293 Zellen	33
4.2	VILIP-1-GFP erhöht die Oberflächenexpression des ko-transfizierten $\alpha_4\beta_2$ nAChR in hippocampalen Neuronen	34
4.3	Endogenes VILIP-1 ist mit dem $\alpha_4\beta_2$ nAChR an der Zellmembran und an intrazellulären Membranen ko-lokalisiert	36

4.4	Calcium-abhängige Lokalisation von VILIP-1 am Golgi-Apparat und der Zelloberfläche, jedoch nicht am ER	37
4.5	Der $\alpha_4\beta_2$ nAChR lokalisiert im ER und dem Golgi-Apparat	39
4.6	Die intrazelluläre Ko-Lokalisation von VILIP-1 mit dem $\alpha_4\beta_2$ nAChR erfolgt Calcium-abhängig im Golgi-Apparat	40
4.7	VILIP-1-GFP moduliert durch Beeinflussung der Exozytose den Transport des nAChR $\alpha_4\beta_2$ an die Zelloberfläche von hippokampalen Neuronen	43
4.8	VILIP-1 ist mit dem $\alpha_4\beta_2$ nAChR in Interneuronen ko-exprimiert	45
5	Ergänzende Ergebnisse aus gemeinsamen Publikationen	49
5.1	VILIP-1 induziert eine funktionelle Hochregulierung des $\alpha_4\beta_2$ nAChR	49
5.2	VILIP-1 vermittelt eine gesteigerte Exozytose des $\alpha_4\beta_2$ nAChR	52
6	Diskussion	55
6.1	Immunzytochemie	55
6.2	VILIP-1-Expression in der Hippokampusformation	57
6.3	Interaktion von $\alpha_4\beta_2$ nAChR und VILIP-1 in hippokampalen Neuronen	58
6.4	VILIP-1 induziert die Translokation des $\alpha_4\beta_2$ nAChR	60
6.5	Eigene Ergebnisse im Kontext weiterführender Daten	64
6.5.1	VILIP-1 nimmt Einfluss auf die Exozytose des $\alpha_4\beta_2$ nAChR	64
6.5.2	Der $\alpha_4\beta_2$ nAChR und synaptische Plastizität	65
6.5.3	Die funktionelle Bedeutung der Interaktion von VILIP-1 und $\alpha_4\beta_2$ nAChR	67
6.6	VILIP-1 und $\alpha_4\beta_2$ nAChR – Hypothesen zur Rolle in der Pathophysiologie neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen	68
6.6.1	Demenz vom Alzheimer-Typ	69
6.6.2	Schizophrenie	70
6.7	Modell der VILIP-1-vermittelten $\alpha_4\beta_2$ nAChR-Hochregulation	74
7	Zusammenfassung	76
	Literaturverzeichnis	78
	Abkürzungsverzeichnis	95

Lebenslauf	100
Publikationen	101
Erklärung	102

1 Einleitung

1.1 Neuronale Acetylcholinrezeptoren (nAChR)

Die nAChR sind Liganden-gesteuerte Ionenkanäle mit einer pentameren Struktur, die zusammen mit GABA¹-A und -C, Glycin- und Serotonin- (5-Hydroxytryptamine 3-) Rezeptoren eine Superfamilie bilden. Der Kationen-selektive Ionenkanal wird aktiviert durch den Neurotransmitter ACh oder durch den Rezeptoragonisten Nikotin. Zum Einen ist der nAChR an der motorischen Endplatte als Übergang vom Nerv zum Muskel zu finden, zum Anderen als neuronaler Rezeptor im peripheren und zentralen Nervensystem wo er prä- und postsynaptisch lokalisiert ist (Hogg et al., 2003, Alkondon und Albuquerque, 2004, Champiaux und Changeux, 2004, Gotti und Clementi, 2004)

1.2 Struktur und Eigenschaften des $\alpha_4\beta_2$ nAChR

Die neuronalen nAChR setzen sich aus verschiedenen Kombinationen von fünf Untereinheiten zusammen. Bekannt sind derzeit 12 Untereinheiten (α_{2-10} ; β_{2-4}) (Hogg et al., 2003), wobei immer mindestens eine α -Untereinheit notwendig ist, um einen bindungsfähigen Rezeptor zu bilden (Briggs et al., 2006). Der $\alpha_4\beta_2$ nAChR ist die im Gehirn vorherrschende Rezeptorvariante neben dem Homopentamer α_7 nAChR. Er kann in einer Stöchiometrie von $(\alpha_4)_2(\beta_2)_3$ oder $(\alpha_4)_3(\beta_2)_2$ vorliegen (Buisson und Bertrand, 2002, Tapia et al., 2007) und auch mit weiteren Untereinheiten kombiniert sein wie beispielsweise mit α_6 ² (Champiaux et al., 2003, Grady et al., 2007, Perez et al., 2008).

Der strukturelle Aufbau des Rezeptors ist gekennzeichnet durch vier hydrophobe Transmembrandomänen (M1-M4), die ihn in der Membran fixieren (zur schematischen Darstellung vergleiche Abbildung 1). Der Rezeptor verfügt über einen extrazellulären N-Terminus, der an der hochspezifischen Liganden-Bindungsstelle beteiligt ist (Sine, 2002). Bindet ein Ligand (ACh beziehungsweise Nikotin), erfolgt eine Konformationsänderung und ein Kationenkanal öffnet sich. Dieser nicht-selektive Kationenkanal wird von der Domäne M2 geformt (Karlin, 2002). Unter Ruhemembranpotentialbedingungen kommt es zum Einstrom von Natrium und teilweise

¹ *gamma*-Aminobuttersäure

² Diese Konstellationen sind vor allem in dopaminergen Neuronen zu finden.

von Calcium. Weiterhin verfügt der nAChR über eine Interaktionsstelle für diverse Proteine, die lange zytoplasmatische Schleife (C2). Über diese Interaktionsstelle zwischen den Transmembrandomänen M3 und M4 können der Membrantransport des Rezeptors beeinflusst und somit die Oberflächenexpression des nAChR reguliert werden (Buisson und Bertrand, 2002, Ren et al., 2005).

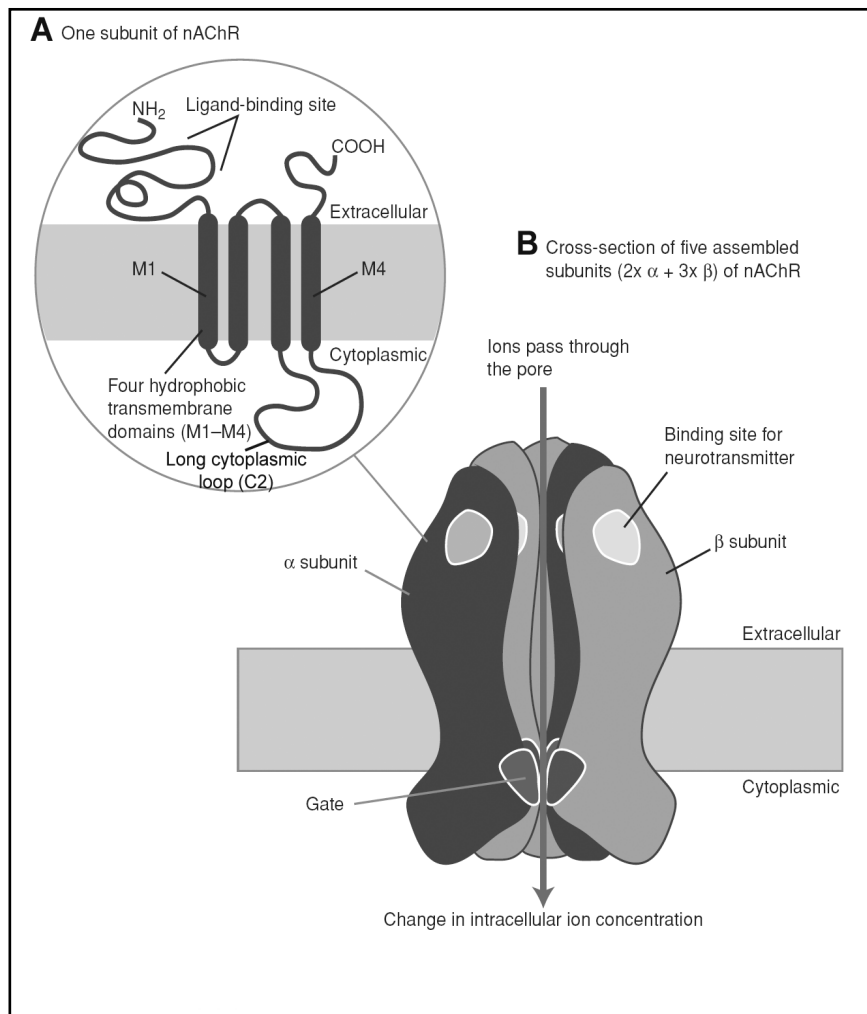


Abbildung 1. Schematische Strukturdarstellung des $\alpha_4\beta_2$ nAChR. Modifiziert nach (Bate und Gardiner, 1999). Der nAChR ist ein Ligandengesteuerter Ionenkanal, der aus fünf Untereinheiten besteht. A zeigt die Struktur einer Untereinheit. Sie verfügt über vier Transmembrandomänen (M1-M4), die den Rezeptor in der Membran verankern. Für Liganden bildet der extrazelluläre N-Terminus die Bindungsstelle. Für die Bindung putativer Interaktionspartner ist die lange zytoplasmatische Schleife (*long cytoplasmatic loop, C2*) verantwortlich. In B ist der Querschnitt eines nAChR zu sehen, der aus α - und β -Untereinheiten zusammengesetzt ist. In seiner Mitte bildet er einen nicht-selektiven Kationenkanal. Nach Bindung eines Liganden, beispielsweise des Neurotransmitters ACh, öffnet sich der Kanal und es kommt zum Einstrom von Kationen in den Intrazellularraum.

sammengesetzt ist. In seiner Mitte bildet er einen nicht-selektiven Kationenkanal. Nach Bindung eines Liganden, beispielsweise des Neurotransmitters ACh, öffnet sich der Kanal und es kommt zum Einstrom von Kationen in den Intrazellularraum.

Eine wesentliche Eigenschaft von Rezeptoren ist es auf andauernde Exposition ihres Liganden mit einer Herabsetzung der Sensitivität und Responsivität der Bindungsstellen zu reagieren, die auch während nachfolgenden Expositionen anhält. Dieser Mechanismus zum Schutz vor Überstimulation wird als Desensibilisierung bezeichnet. In diesem Sinne reagiert der nAChR auf Nikotinapplikation im

amphibischen Zellmodell (Xenopus-Oozyten) (Vibat et al., 1995). Paradoxerweise erhöhen sowohl kurze als auch chronische Stimulationen mit Nikotin³ von Zellen beziehungsweise Gewebe von Säugetieren (darunter auch menschliche(s)) die Sensitivität und Bindungsstellendichte⁴. Zudem bewirken sie eine Zunahme elektrophysiologischer Ströme über dem nAChR in einer einzelnen Zelle⁵ (Buisson und Bertrand, 2001). Nikotin besitzt als quartäres Amin die besondere Eigenschaft, die Zellmembran durchqueren zu können⁶ (Darsow et al., 2005). Daher sind etwaige intrazellulär ausgelöste Effekte auf die Zusammensetzung der Rezeptoruntereinheiten oder Transportvorgänge des nAChR zu berücksichtigen. Die genauen Mechanismen, wie Nikotin das verstärkte Bindungsvermögen des Rezeptors vermittelt, sind noch weitgehend ungeklärt. Es wird diskutiert, dass Nikotin dies entweder über eine vermehrte effektive beziehungsweise relative⁷ Rezeptorrepräsentation an der Membranoberfläche oder durch verstärkte Expression beziehungsweise Stabilisierung hochaffiner Bindungsstellen beeinflussen kann (Hogg et al., 2003). Der $\alpha_4\beta_2$ nAChR kann Liganden mit unterschiedlicher Affinität binden. Ob ein Rezeptor durch Konformationsänderungen der Bindungsdomänen hoch- und niedrigaffine Zustände annehmen und in einem Status stabilisiert werden kann, ist Gegenstand aktueller Diskussionen. Bisher konnten zwei unterschiedliche Rezeptorpopulationen in verschiedenen Systemen⁸ charakterisiert werden, die sich in ihrer Stöchiometrie unterscheiden (Shafae et al., 1999, Buisson und Bertrand, 2001, Tapia et al., 2007). Dabei wurde gezeigt, dass $(\alpha_4)_2(\beta_2)_3$ im Vergleich zu $(\alpha_4)_3(\beta_2)_2$ sensitiver (hochaffin) gegenüber Agonisten (ACh oder Nikotin) und Antagonisten ist (Tapia et al., 2007).

³ Die Größenordnung der chronischen Nikotinstimulation liegt bei ca. 100 nM. Dies gilt als die konstante Konzentration, die im Serum von Rauchern vorliegt und beim Rauchen einer Zigarette auf bis zu 1 μ M ansteigen kann (Buisson und Bertrand, 2001).

⁴ Ermittelt wurde dies mittels den selektiven $\alpha_4\beta_2$ nAChR-Liganden [³H]-Epibatidin und [³H]-Zytisin.

⁵ Dieses Experiment wurde in mit nAChR stabil transfizierten HEK 293 Zellen durchgeführt.

⁶ Diese Eigenschaften besitzen ebenfalls die Liganden [³H]-Epibatidin und [³H]-Zytisin.

⁷ Ein relativ vermehrtes Rezeptorvorkommen kann durch beschleunigtes Recycling oder verzögerte Endozytose erfolgen.

⁸ Oozyten, Gehirngewebe der Ratte, HEK 293 Zellen

1.3 Der Hippokampus und seine Rolle für die Gedächtnisbildung

Der Hippokampus ist als Teil des limbischen Systems eine elementare Struktur des Gehirns. Er ist wesentlich an Phänomenen von Lernen und Gedächtnis sowie an der Entstehung und Verarbeitung von Emotionen beteiligt. Zudem ist der Hippokampus maßgeblich für die zeitliche und örtliche Orientierung verantwortlich. Der Hippokampus ist ein wichtiger Modulator cholinergischer Funktionen. So verfügen hippokampale Neuronen über zahlreiche nAChR, die mehrheitlich an inhibitorischen GABAergen Interneuronen und partiell an exzitatorischen Pyramidenzellen zu finden sind (Xu et al., 2006).

Der Hippokampus ist eingebunden in den Papez-Neuronenkreis. Dieser beschreibt eine Verbindung von Neuronen, die für die Überführung von Erinnerungen aus dem Kurzzeitgedächtnis in das Langzeitgedächtnis verantwortlich ist. Die Unterbrechung des Kreises, durch Läsionen beteiligter Strukturen, führt zur anterograden Amnesie. Diese umfasst eine Speicherstörung für neue Gedächtnisinhalte bei erhaltenem Langzeitgedächtnis.

Ein entscheidender Mechanismus für die Gedächtnisbildung ist die synaptische Plastizität der Neuronen. Durch Phänomene, die die synaptische Aktivität im Sinne einer langanhaltenden Verstärkung (LTP⁹) oder Reduktion (LTD¹⁰) beeinflussen, kann Lernen und Gedächtnisbildung erfolgen (Svoboda und Mainen, 1999, Petrovic et al., 2005, Massey und Bashir, 2007). Maßgeblich verantwortlich dafür ist die synaptische Plastizität des Hippokampus (Milner und Penfield, 1955, Milner, 1959, Lynch, 2004), die unter anderem durch nAChR vermittelt und moduliert wird (Ji et al., 2001). Dort konnten bereits 1973 und 1992 Vorgänge der LTP beziehungsweise LTD nachgewiesen werden¹¹ (Bliss und Lomo, 1973, Dudek und Bear, 1992). Die Modulation synaptischer Eigenschaften wird induziert durch die Aktivierung von Glutamatrezeptoren, die in einem Einstrom von Natrium- und Calcium-Ionen resultiert. Neben der Natrium-vermittelten Membrandepolarisation kommt es durch den vermehrten Einstrom von Calcium in die Zelle zu einem Eingriff in Signalkaskaden bis hin zur Regulation von Genexpression und Proteinsynthese. Es ist bekannt, dass insbesondere die *de novo*

⁹ *long-term potentiation*

¹⁰ *long-term depression*

¹¹ Die Nachweise erfolgten in Rattenhippokampi.

Proteinsynthese ein entscheidender molekularer Mechanismus für die Gedächtnisbildung ist (Wells und Fallon, 2000, Sutton und Schuman, 2006).

Wenn Rezeptoren beziehungsweise Neuronen des Hippokampus sich in ihren Eigenschaften verändern, das heißt zum Nicht-Physiologischen oder apoptotisch werden, kommt es zu einer Beeinträchtigung der Gedächtnisleistung. Betrachtet man die nAChR, vor allem den Subtyp $\alpha_4\beta_2$ nAChR, ist ein solches Geschehen im Rahmen der Demenz vom Alzheimer-Typ zu beobachten (Hogg et al., 2003). Aber auch ein pharmakologischer Eingriff in den ACh-Haushalt durch Anticholinergika, welche die Rezeptoren des ventralen Hippokampus inhibieren, führt langfristig zu kognitiven Beeinträchtigungen (Cooper et al., 1992, Han et al., 2008). Zudem gibt es Zusammenhänge zwischen veränderter Anatomie oder Funktion des Hippokampus und Erkrankungen, die nicht primär durch Gedächtniseinschränkungen charakterisiert sind. So sind bei der Schizophrenie-Erkrankung im Hippokampus ein Volumenverlust¹², gestörte Zellarchitektur sowie eine herabgesetzte exzitatorische Aktivität zu beobachten (Harrison, 1999). Außerdem hat die häufigste Form fokaler Epilepsien im Erwachsenenalter, die mesiale Temporallappenepilepsie, ihren Ausgangspunkt zu 50% im Hippokampus (Engel, 2001). Für die Entstehung epileptischer Anfälle werden Veränderungen auf zellulärer Ebene sowie eine veränderte Neurotransmission im hippokampalen Netzwerk verantwortlich gemacht, die zu einer plötzlichen synchronisierten Entladung von Neuronen führen¹³. Auch wenn die genaue Pathogenese noch nicht vollständig verstanden ist, gibt es charakteristische morphologische Veränderungen. Es wurde in *post mortem* Untersuchungen gezeigt, dass es zu einem Neuronenverlust im Hippokampus und anderen Gehirnarealen, wie dem entorhinalen Kortex und der Amygdala, kommt. Im Hippokampus betrifft dies vor allem die CA¹⁴, 3- und DG¹⁵-Regionen (Bote et al., 2008). Pathohistologisch wird der hippokampale Neuronenverlust und die Proliferation von Gliazellen als Ammonshornsklerose bezeichnet. Bei Patienten mit einer Temporallappenepilepsie und

¹² Dieser Volumenverlust wurde anhand volumetrischer cMRT-Untersuchungen nachgewiesen.

¹³ Es kommt, vereinfacht gesehen, zu einem Ungleichgewicht zwischen Inhibition und Exzitation.

¹⁴ *cornu ammonis*

¹⁵ *gyrus dentatus*

Ammonshornsklerose zeigten sich progrediente kognitive Defizite, die mit der zunehmenden Krankheitsdauer korrelierten (Marques et al., 2007).

1.4 Die Rolle des $\alpha_4\beta_2$ nAChR bei Entstehung und Ausprägung von neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen

Der $\alpha_4\beta_2$ nAChR ist eine wichtige Komponente der synaptischen Übertragung im zentralen Nervensystem (ZNS). Experimente in transgenen Tiermodellen der Maus, in denen die Gene für die Untereinheiten des $\alpha_4\beta_2$ nAChR nicht exprimiert wurden, stellten spezifische Funktionen des Rezeptors heraus. Wird die α_4 -Untereinheit nicht exprimiert, so ist ein Verlust der hochaffinen Nikotin-Bindungsstellen festzustellen, die für den $\alpha_4\beta_2$ nAChR charakteristisch sind (Ross et al., 2000, Hogg et al., 2003). Fehlt den Mäusen die β_2 -Untereinheit, so wurde unter anderem eine gestörte anatomische und funktionelle Entwicklung des visuellen Systems der Tiere beobachtet (Rossi et al., 2001). Die β_2 -knock-out-Mäuse höheren Alters zeigen eine zunehmende kortikale Atrophie, einen Untergang von Neuronen allgemein und speziell der Pyramidenzellen im Hippokampus. Es besteht eine eingeschränkte kortikale Leistungsfähigkeit mit Beeinträchtigung des Denkens, Lernens und der Orientierung (Zoli et al., 1999, Gotti und Clementi, 2004). In Anbetracht dieser Veränderungen im transgenen Tiermodell liegt die Verbindung zu den Krankheitsbildern nahe, die mit einer gestörten Expression des $\alpha_4\beta_2$ nAChR assoziiert sind. Es handelt sich zum Einen um neurodegenerative Erkrankungen des Gehirns und Schizophrenie, zum Anderen um die autosomal-dominante nächtliche Frontallappenepilepsie (ADNFLE). Während die Demenz vom Alzheimer-Typ, Morbus Parkinson¹⁶ und Schizophrenie durch eine verminderte nAChR-Dichte charakterisiert sind, liegt der ADNFLE¹⁷ eine gestörte nAChR-Funktion zu Grunde (Araki et al., 2002).

¹⁶ Im Sinne einer generellen Neurodegeneration, die verschiedene Neurotransmittersysteme betrifft, besteht ebenfalls eine Affektion des cholinergen Neurotransmittersystems (Kelton et al., 2000). Verschiedene Untereinheiten der nAChR werden nur noch mangelhaft exprimiert. Auch der $\alpha_4\beta_2$ nAChR unterliegt im Striatum einer deutlichen Degeneration (Gotti et al., 2006). Die Expression des $\alpha_4\beta_2$ nAChR im Striatum war im Vergleich zur Kontrolle ungefähr um die Hälfte reduziert, was zur Erklärung der dementiellen Komponente des Morbus Parkinson beitragen könnte (Kelton et al., 2000, Gotti et al., 2006).

¹⁷ Die Entstehung der ADNFLE ist mit einer heterozygoten Expression von $\alpha_4\beta_2$ nAChR-Mutanten vergesellschaftet (Marini und Guerrini, 2007). Aufgrund dessen liegt eine gestörte Rezeptorfunktion vor, die durch verschiedene Mechanismen in einer pathologisch gesteigerten Aktivität des cholinergen

Weitere Erkrankungen wie depressive Episoden, Angststörungen und Nikotinabusus, weisen ebenfalls eine Mitbeteiligung des nAChR auf, doch sollen sie hier keine detaillierte Erwähnung finden.

1.4.1 Demenz vom Alzheimer-Typ (DAT)

Die Pathophysiologie der DAT ist gekennzeichnet durch eine progrediente Degeneration kortikaler cholinergischer Neuronen, die zu ausgeprägten kognitiven Defiziten führt, die über das Maß an altersentsprechendem Funktionsverlust hinausgehen. Dabei kommt es zu einer raschen Abnahme der nAChR, während die Abnahme mAChR alterskorreliert erfolgt (Schliebs und Arendt, 2006). Aus der Literatur ist bekannt, dass sich im Rahmen der DAT vor allem die Anzahl der $\alpha_4\beta_2$ nAChR reduziert (Perry et al., 1995, Martin-Ruiz et al., 1999, Guan et al., 2000). Frühzeitig kommt es bei der DAT zu einer ausgeprägten Atrophie mit Verlust hochaffiner Nikotin-Bindungsstellen des entorhinalen Kortex, der eine elementare Schaltstelle zwischen dem Hippokampus und Kortex darstellt (Braak und Braak, 1991, Van Hoesen et al., 1991, Perry et al., 2000). Weiterhin betroffen sind vor allem basale Vorderhirnstrukturen (*Nucleus basalis* Meynert), der Neocortex (frontal und temporo-parietal), der Hippokampus und andere Gehirnareale (Gotti et al., 2006, Schliebs und Arendt, 2006). Zudem findet sich eine herabgesetzte Aktivität der Cholinacetyltransferase und damit eine geringere Konzentrationen von ACh (Gotti und Clementi, 2004). Der mit dem Zelluntergang verbundene Verlust hochaffiner Bindungsstellen und die niedrige Konzentration des ACh führen zu einer verminderten cholinergen Neurotransmission¹⁸, die unter anderem

Systems resultiert. Unter anderem besteht eine erhöhte Sensitivität gegenüber ACh, es kommt zu spontanen Oszillationen aufgrund übererregter Neuronen und zu einer Fehlsteuerung der Neurotransmitter-Freisetzung (GABA, Glutamat) (Combi et al., 2004), was letztlich zu einer erhöhten Vulnerabilität der Neuronen für ein Anfallsgeschehen führt. Zudem zeigte Picard et al., 2006 in einer PET-Studie, dass die $\alpha_4\beta_2$ nAChR (Mutanten und Wildtypen) in bestimmten Gehirnarealen (Epithalamus (*Habenulae*) und *Nucleus interpeduncularis*) von ADNFLE-Patienten stärker exprimiert werden als bei gesunden Probanden (Im präfrontalen Kortex wurde jedoch eine Dichteabnahme beobachtet, die durch den Untergang von Neuronen bei regelmäßig stattfindenden Anfällen gedeutet wird.).

¹⁸ Mitverantwortlich für die Einbußen der kortikalen cholinergen Funktion sind auch direkte morphologische Veränderungen verursacht durch β -Amyloid-Plaques und die Bildung von intrazellulären Neurofibrillen (Vickers et al., 2000).

für die fortschreitenden kognitiven Defizite bei den Erkrankten in den Bereichen Lernen, Gedächtnis, Aufmerksamkeit, Handlungsplanung und Orientierung verantwortlich sind (Vickers et al., 2000, Gotti und Clementi, 2004, Eckman und Eckman, 2007).¹⁹

Ein bedeutender Ansatz für die Therapie der DAT sind Acetylcholin-Esterase- (AChE-) Hemmer. Sie verlängern die Aufenthaltsdauer des ACh im synaptischen Spalt, indem sie die enzymatische Spaltung durch die AChE blockieren. Ziel ist es, das kognitive Niveau zu stabilisieren und das Fortschreiten der dementiellen Entwicklung zu verzögern (Giacobini, 2003).

1.4.2 Schizophrenie

Verglichen mit den neurodegenerativen Erkrankungen scheint der $\alpha_4\beta_2$ nAChR für die Entstehung der Schizophrenie eher untergeordnet zu sein. Vielmehr spielt der α_7 nAChR eine klare Rolle in der Pathophysiologie, indem es zu einem progredienten Verlust von α_7 nAChR im frontalen Kortex kommt (Hogg et al., 2003). Chronische Applikation von Nikotin, wie bei starken Rauchern, kann über den Mechanismus der funktionellen Hochregulation diese Defizite in Teilen kompensieren. Ausgeprägter Nikotinabusus liegt bei bis zu 90% der Erkrankten als eine Art von Selbstmedikation vor (Woodruff-Pak und Gould, 2002). Derzeit wird ein partieller α_7 -Agonist (DMXB-A²⁰) in klinischen Studien als potentiell Therapeutikum getestet (Freedman et al., 2008). Aber auch Veränderungen der $\alpha_4\beta_2$ nAChR-Expression können bei Schizophreniepatienten beobachtet werden. Es gibt Hinweise, dass bei Patienten, die an Schizophrenie leiden, vermehrt kombiniert Mutationen der α_4 - und β_2 -Untereinheiten auftreten. Inwiefern diese Mutationen durch veränderte Dopaminfreisetzung *per se* ein Risiko darstellen an Schizophrenie zu erkranken oder lediglich die mit der Erkrankung vergesellschafteten kognitiven Beeinträchtigungen verursachen, kann anhand des derzeitigen Forschungsstandes nicht beantwortet werden (De Luca et al., 2006).

¹⁹ Neben der gestörten Übertragung von ACh ist auch die anderer Neurotransmitter, wie Glutamat, GABA und Serotonin, beeinflusst und erklärt weitere Facetten der Erkrankung (Gsell et al., 2004).

²⁰ 3-(2,4-dimethoxybenzylidene)-anabaseine

1.5 Calcium-bindende Proteine (CBP)

Calcium spielt eine entscheidende Rolle in den physiologischen Prozessen der Zelle und der Signalübertragung von einer Zelle zur anderen. Die Konzentration von Calcium in der Zelle reguliert die Aktivierung oder Inhibition von Enzymen und Ionenkanälen sowie über den Verlauf von Reaktionskaskaden und Signalübertragungen. Die Konstanthaltung der intrazellulären Calcium-Konzentration ($0,1 \mu\text{M}$) stellt daher eine wichtige Bedingung für Leben und Funktion der Zelle dar. Im Extrazellularraum und den intrazellulären Calcium-Speichern (glattes ER) liegt eine mehr als tausendfach höhere Calcium-Konzentration (1 mM) vor. Dieses starke Konzentrationsgefälle wird aufrecht erhalten unter anderem durch Ionenkanäle und -pumpen (z.B. Spannungs-abhängige beziehungsweise Liganden-gesteuerte Calcium-Kanäle, Calcium-ATPase), autoregulative Vorgänge und durch diverse Proteine (Nowycky und Thomas, 2002, Carafoli, 2005). Die Komplexbildung mit Calcium erfolgt durch spezifische Strukturen dieser Proteine. Eine weit verbreitete und bedeutende Strukturbesonderheit ist das sogenannte EF-Hand-Motiv, das in vielen CBP die hochaffine Calcium-Bindungsstelle beherbergt und die Familie der EF-Hand-Proteine charakterisiert (Abbildung 2) (Ikura und Ames, 2006). Die Bindung von Calcium kann bei verschiedenen EF-Hand-Proteinen unterschiedliche Effekte bewirken. Ein Teil der Proteine führt zur Herabsetzung der Konzentration an freiem Calcium, im Sinne einer Pufferung (neuronal Calcium-Puffer- (NCP-) Proteine)²¹ (Heizmann, 1993). Ein anderer Teil vermittelt den Calcium-Effekt auf weitere zelluläre (enzymatische) Systeme. Dies erfolgt in einigen Proteinen durch eine umfassende Konformationsänderung, die wiederum eine Funktionsänderung des Proteins bewirkt oder auch die Bindung weiterer Proteine erlaubt (Carafoli, 2005). Man spricht dann speziell von Calcium-Sensor-Proteinen. Beispiele sind das ubiquitär vorkommende Protein Calmodulin, das muskelspezifische Protein Troponin C und die neuronalen Calcium-Sensor- (NCS-) Proteine, die alle über vier EF-Hand-Motive verfügen (Burgoyne und Weiss, 2001, Schaub und Heizmann, 2008).

²¹ z.B. Parvalbumin, Calbindin und Calretinin

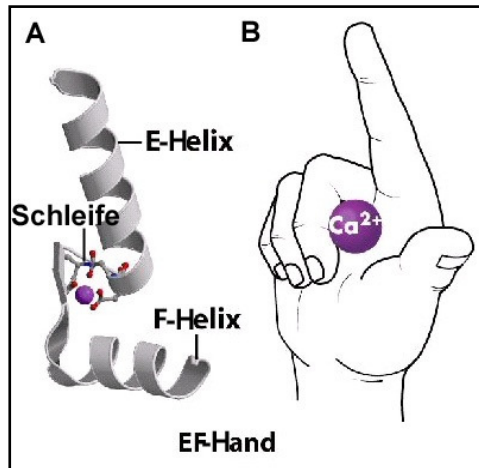


Abbildung 2. Strukturelemente des EF-Hand-Motivs.

Modifiziert nach Universität Maine, Institut für Chemie. (A) zeigt zwei α -Helices (E und F) und eine Schleife aus 12 Aminosäuren, die diese miteinander verbindet. Die Schleife bildet die hochaffine Calcium-Bindungsstelle. (B) Ihre Anordnung lässt sich als eine Hand beschreiben, deren Zeigefinger (E-Helix) und Daumen (F-Helix) senkrecht aufeinander stehen und die restlichen Finger eine zirkuläre Struktur (Calcium- (Ca^{2+} -) Bindungsstelle) formen (<http://chemistry.umeche.maine.edu/MAT500/Proteins8.html>).

1.5.1 Neuronale Calcium-Sensor- (NCS-) Proteine

Ein vermehrter Einstrom von Calcium-Ionen bewirkt die Initialisierung von verschiedenen biochemischen Prozessen. Dazu gehört, neben der Auslösung der Muskelkontraktion, auch die Freisetzung von Hormonen und Neurotransmittern. Neuronale Calcium-Sensor- (NCS-) Proteine stellen eine Klasse der CBP im Nervensystem dar, die die Signaltransduktion in Nervenzellen Calcium-abhängig regulieren und modulieren. Sie vermitteln die Freisetzung von Neurotransmittern und regulieren damit neuronale Aktivität. Einzuordnen sind sie in die große Familie der EF-Hand-Proteine. Die EF-Hand zeichnet sich durch zwei senkrecht aufeinander stehende α -Helices (E und F) aus, deren Schnittpunkt eine Schlaufe aus 12 Aminosäuren darstellt, die die eigentliche Calcium-Bindungsstelle bildet. Die Struktur entspricht der stilisierten Morphe einer Hand (Ikura und Ames, 2006) (vergleiche Abbildung 2). Charakteristischerweise besitzen die NCS-Proteine vier EF-Hand-Motive als putative Bindungsstellen für Calcium, von denen aber nur die zweite und dritte EF-Hand stets und die vierte EF-Hand in einigen Proteinen diese Funktion ausüben. Dagegen kann Calmodulin an allen vier EF-Händen ein Calcium-Ion binden (Burgoyne, 2007). Bei NCS-Proteinen wird der EF-Hand 1 keine Calcium-Bindungsfähigkeit zugesprochen, vielmehr ist dieses Motiv dort in den sogenannten Calcium-Myristoyl-Switch eingebunden (Braunewell und Gundelfinger, 1999). Es handelt sich um ein weiteres typisches Merkmal der NCS-Proteine. Nahezu alle Vertreter dieser Familie weisen ein Konsensusmotiv auf, das über einen N-terminal gebundenen Myristoyl-Rest verfügt, der nach Calcium-Bindung an die Oberfläche des Proteins rotiert (Abbildung 3). Damit werden hydrophobe Aminosäuren exponiert, die die Bindungseigenschaften des NCS-Proteins erweitern. So kann dann eine Bindung an zelluläre Membranen oder ein

anderes Protein erfolgen (Zozulya und Stryer, 1992). Die funktionelle Bedeutung dieses Vorganges liegt vorwiegend in der dadurch ermöglichten stabilen, aber reversiblen, Bindung an Zellmembranen oder intrazelluläre Membranen, die zuvor nur in Form einer instabilen Assoziation erfolgen konnte. Der Calcium-Myristoyl-Switch stellt eine essentielle Eigenschaft der NCS-Proteine dar, die über diesen Mechanismus die Vermittlung von Calcium-Signalen vornehmen können (Heizmann, 1993, Burgoyne und Weiss, 2001).

Allerdings erfolgt der Myristoyl-Switch nicht bei allen Vertretern der NCS-Familie. NCS-1 und KChIP-1 verfügen über einen stets exponierten Myristoyl-Rest, so dass diese Proteine grundlegend Membran-assoziiert vorliegen können. Andererseits verfügen einige NCS-Proteine, wie die Kaliumkanal-interagierenden Proteine- (KChIP-) 2, 3 und 4, über keine Myristoyl-Konsensusmotive und keine konserviert exprimierten N-terminalen Domänen (Burgoyne, 2007). KChIP-2 und 3 ist es aber möglich über einen Palmitoyl-Rest ebenfalls an Membranen zu binden (Takimoto et al., 2002). Lediglich KChIP-4 verfügt über keine primäre Membranbindung, das heißt es liegt primär zytosolisch vor und kann erst über Bindung an Kaliumkanaluntereinheiten mit der Zellmembran assoziiert sein (Burgoyne, 2007).

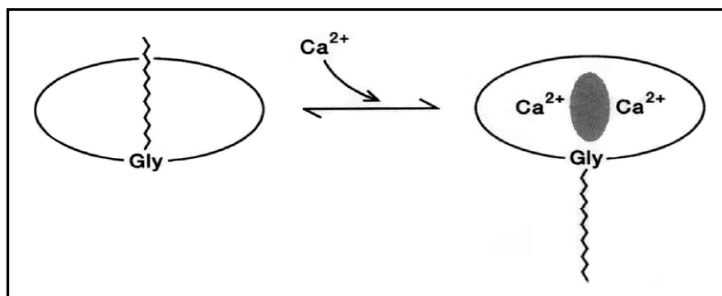


Abbildung 3. Schematische Darstellung des Calcium-Myristoyl-Switch am Beispiel des Recoverins. Modifiziert nach Zozulya und Stryer, 1992. Der hydrophobe Myristoyl-Rest (C₁₄-Fettsäure) ist bei dem Vorgang der Myristoylierung auf die freie Aminogruppe

des N-terminalen Glycins (Gly) übertragen worden. Auf die Bindung eines oder zweier Calcium-Ionen (Ca²⁺) folgt eine Exposition des vorher eingeschlossenen Myristoyl-Restes. Somit steht dann eine hydrophobe Bindungsstelle des Proteins zur Verfügung, die eine Assoziation beispielsweise an Membranen erlaubt und das funktionelle Spektrum des Proteins erweitert.

Die Vertreter der NCS-Proteine, die vorrangig²² im peripheren und zentralen Nervensystem vorkommen, sind in fünf Gruppen eingeteilt (Braunewell und Gundelfinger, 1999). Unter ihnen herrscht eine ausgeprägte Analogie, so dass die

²² Außerdem wurden sie in Gliazellen oder außerhalb des Nervensystems nachgewiesen (Braunewell und Gundelfinger, 1999).

Einteilung anhand der Sequenzhomologien erfolgt. Im Prozess der Entdeckung beziehungsweise Isolierung immer weiterer NCS-Proteine entwickelte sich eine uneinheitliche Terminologie. Mit Hilfe eines phylogenetischen Stammbaumes gelang es, sich entwickelnd vom humanen Calmodulin, die Gruppenmitglieder entsprechend ihrer Sequenzen zu klassifizieren (Abbildung 4).

Die erste von fünf Gruppen umfasst die Guanylatcyclase-aktivierenden Proteine (GCAP) wie GCAP-1, GCAP-2, GCAP-3, GCAP-4-8 und das Guanylatcyclase-inhibierende Protein (GCIP), die in verschiedenen Spezies nachgewiesen werden konnten. Sie gelten als Calcium-abhängige Modulatoren der retinalen Guanylatcyclase, werden spezifisch in den Photorezeptorzellen der Retina exprimiert und spielen eine bedeutende Rolle bei der Dunkeladaptation (Palczewski et al., 2004).

Die zweite Gruppe setzt sich aus den Kaliumkanal-interagierenden Proteinen (KChIP) zusammen. KChIP-1, KChIP-2, KChIP-3 und KChIP-4 zeigen immunhistochemisch eine Kolo-kalisation mit den Kaliumkanaluntereinheiten Kv²³4.2 und Kv4.3 (An et al., 2000, Morohashi et al., 2002). Sie beeinflussen entscheidend das Expressionsmuster, den intrazellulären Transport und auch die molekularen Eigenschaften der Kaliumkanäle (An et al., 2000, Bähring et al., 2001, O'Callaghan et al., 2003, Shibata et al., 2003). Im Gegensatz zu den meisten anderen NCS-Proteinen sind KChIP-2 und 3 nicht in der Lage den *Myristoyl-Switch* zu vollführen, aufgrund des fehlenden Myristoyl-Konsensusmotives. KChIP-3 trägt im Zusammenhang bestimmter physiologischer Prozesse in unterschiedlichen Geweben verschiedene Namen. Als Calcium-abhängiger Modulator der Transkription wird das Protein als DREAM²⁴ benannt (Jacobson et al., 2006). Das als Calsenilin bezeichnete Protein besitzt die Fähigkeit mit Presenilinen zu interagieren. Mutationen in den Genen der Presenilin-Proteine sind mit der Entstehung der DAT verknüpft. So führen die mutierten Preseniline zu einer Induktion apoptotischer Prozesse und zur Bildung von β -Amyloid-Plaques (Buxbaum, 2004). Neben Calsenilin beziehungsweise KChIP-3 ist auch KChIP-4 ein Bindungspartner von Presenilin (Morohashi et al., 2002) und ist ebenfalls im ätiologischen Kontext der DAT zu sehen.

²³ *voltage-gated-potassium-channel*; spannungsabhängiger Kalium-Kanal

²⁴ *downstream regulatory element antagonistic modulator*

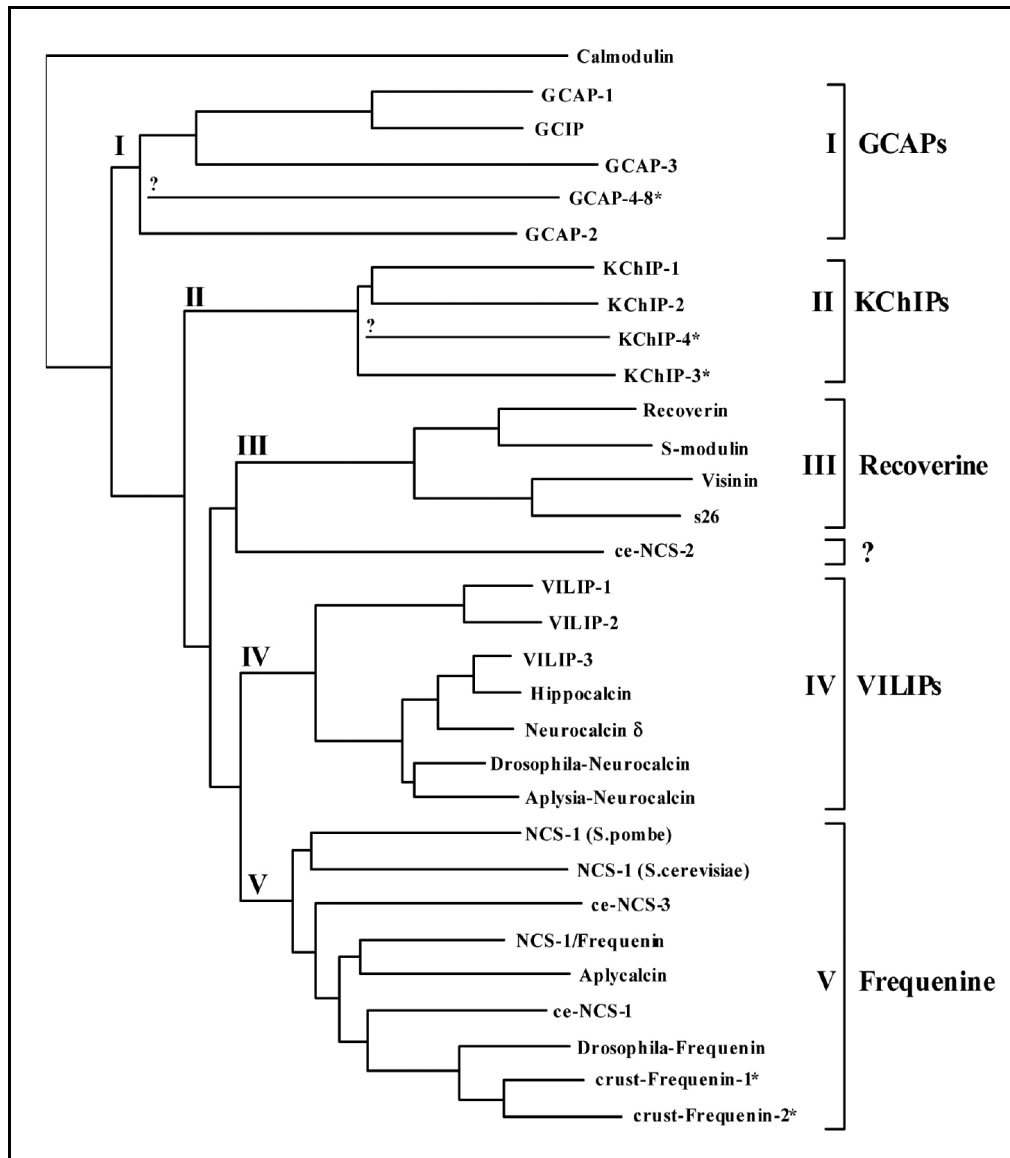


Abbildung 4. Phylogenetischer Stammbaum der NCS-Proteine. Modifiziert nach Braunewell und Gundelfinger, 1999 und Spilker et al., 2002b. Ausgehend von Calmodulin werden hier die phylogenetischen Beziehungen der einzelnen NCS-Proteine zueinander sowie die Gruppeneinteilung dargestellt. Dem zu Grunde liegen Aminosäuresequenzen aus der Swiss-Prot-Datenbank.

(*) KChIP-3: entspricht Calsenilin und DREAM; (*) KChIP-4: entspricht CALP; (*) GCAP-4-8: phylogenetisch bisher nicht eingeordnet; (*) crust-Frequenin-1: kloniert aus dem amerikanischen Flusskrebs; (*) crust-Frequenin-2: kloniert aus der Languste.

Die dritte Gruppe beschreibt die Recoverine und enthält die Gründungsmitglieder der NCS-Familie Visinin (Huhn) und Recoverin (Ratte) sowie ihre Frosch-Orthologen S-Modulin²⁵ und s26 (Kawamura et al., 1996, Kawamura und Tachibanaki, 2002). Hauptsächlich wird diese Gruppe der NCS-Proteine in den retinalen Photorezeptoren

²⁵ Sensitivität-modulierendes Protein

exprimiert und ist dort, wie auch die GCAPs, an der Lichtadaptation beteiligt. Recoverin gilt in diesem Sinne als Negativ-Regulator der Rhodopsin-Kinase und beeinflusst so im Rahmen eines negativen Feedback-Mechanismus den Transmembranrezeptor Rhodopsin (Chen, 2002).

Die vierte Gruppe umfasst die Visinin-ähnlichen Proteine (VILIP²⁶ und NVP²⁷), zu denen das hier näher untersuchte VILIP-1 gehört. VILIP wurde erstmalig aus Hirngewebe des Huhns isoliert und zeigte zu 40% eine Homologie zu dem retinalen NCS-Protein Visinin (siehe oben), was zur entsprechenden Namensgebung führte (Lenz et al., 1992). Die Hauptvertreter dieser Gruppe sind VILIP-1, VILIP-2, VILIP-3, Hippocalcin und Neurocalcin δ . Alle diese Proteine konnten im Menschen nachgewiesen werden (Kuno et al., 1992, Bernstein et al., 1999, Braunewell und Gundelfinger, 1999). Weitere Neurocalcine wurden in Vertebraten und Invertebraten identifiziert (vergleiche Abbildung 4). Die Gruppe der VILIP kommt fast ubiquitär in Neuronen des ZNS vor. Einige Proteine sind jedoch bestimmten Hirnarealen zuzuordnen. So kommt VILIP-3 mehrheitlich im Zerebellum vor, während VILIP-2 nur im Kortex und Hippokampus identifiziert wurde (Braunewell und Gundelfinger, 1999).

Die einzelnen Mitglieder der VILIP-Gruppe sind in unterschiedlichen funktionellen Zusammenhängen beschrieben worden. Exemplarisch sei hier die Funktion von VILIP-1 kurz aufgezeigt. Für VILIP-1 konnte ein Calcium-abhängiger Effekt sowohl auf Adenylatzyklasen (Braunewell et al., 1997) als auch auf Guanylatzyklasen (Braunewell et al., 2001b) gezeigt werden, die konsekutiv die Konzentration der jeweiligen zyklischen Nukleotide beeinflusst. Die Katalyse des zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) konnte in mit VILIP-1 stabil transfizierten C6-Glioma- und tsA201 Zellen (Braunewell et al., 1997, Lin et al., 2002a) und im olfaktorischen System der Ratte (Boekhoff et al., 1997) gezeigt werden. Die Beeinflussung von Guanylatzyklasen wurde für VILIP-1, Neurocalcin δ und Hippocalcin nachgewiesen (Braunewell et al., 2001b, Krishnan et al., 2004, Mammen et al., 2004). Ein weiterer Interaktionspartner von VILIP-1 ist der $\alpha_4\beta_2$ nAChR (vgl. 1.6). Lin et al. wies einen sensitivitätssteigernden Effekt und ein vermehrtes Auftreten des Rezeptors in tsA201 Zellen und Oozyten (*Xenopus*) nach (Lin et al., 2002b). Eine interessante funktionelle

²⁶ *visinin-like protein*

²⁷ *neuronal visinin-like protein*

Bedeutung des Proteins VILIP-1 besteht in der Pathophysiologie neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen, die im Abschnitt 1.5.2 näher dargestellt wird.

Die fünfte Gruppe ist die evolutionsgeschichtlich älteste und bezeichnet Frequenin/NCS-1²⁸. Die Expression von NCS-1 ist verteilt über viele Neuronentypen des ZNS. Unter anderem wird es im Hippokampus exprimiert, wo es in Prozesse wie Lernen und Gedächtnisbildung involviert ist. Wird NCS-1 überexprimiert, kommt es zu einer Zunahme der Synapsenbildung und der synaptischen Transmission (Chen et al., 2001). Gomez et al. zeigte in transgenen *Caenorhabditis elegans*²⁹, die NCS-1 nicht exprimierten, eine deutlich eingeschränkte Gedächtnisfunktion (Gomez et al., 2001). Bei weiteren Prozessen der synaptischen Plastizität, wie der postsynaptische Langzeit-Potenzierung und der präsynaptische Kurzzeit-Potenzierung, kommt es zur Regulierung von NCS-1 (Genin et al., 2001, Sippy et al., 2003). Die Expression des NCS-1 beschränkt sich nicht nur auf das ZNS, sondern ist im Rahmen seiner zahlreichen Funktionen auch in anderen Geweben zu finden (Weiss und Burgoyne, 2001, Kabbani et al., 2002).

Nicht eindeutig einzuordnen ist das NCS-Protein ce-NCS-2, keine Zuordnung hat sich bisher bestätigen können. Vermutlich stellt das Protein, das aus *Caenorhabditis elegans* kloniert wurde, einen eigenen Zweig im Stammbaum dar (De Castro et al., 1995).

1.5.2 Das NCS-Protein VILIP-1 im Kontext neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen

1.5.2.1 Demenz vom Alzheimer-Typ (DAT)

Erklärungsmodelle für die Entstehung einer DAT durch Zellschädigung und Zelltod liefert die Amyloid-Theorie (Eckman und Eckman, 2007). So kommt es zur Akkumulation von unlöslichen β -Amyloid-Plaques im extrazellulären Raum und zur Bildung von Neurofibrillen in den Neuronen (Vickers et al., 2000). Die Amyloid-Peptide stören die Calcium-Homöostase. Es kommt zu einer erhöhten intrazellulären Calcium-Konzentration und damit zu einer veränderten Calcium-vermittelten Signaltransduktion

²⁸ Frequenin wurde ursprünglich aus *Drosophila melanogaster* kloniert, die andere Bezeichnung NCS-1 beschrieb in Abgrenzung dessen den Klon aus Säugetieren.

²⁹ *Caenorhabditis elegans* ist zugehörig zum Stamm der Fadenwürmer.

in Neuronen (Mattson et al., 1992), was zur neuronalen Degeneration führen kann (Mattson, 2007).

In der Literatur wird für das NCS-Protein VILIP-1, im Vergleich zu gesundem Hirngewebe, eine signifikante Abnahme der VILIP-1-Immunreaktivität in Pyramidenzellen und Interneuronen des temporalen Kortex von an Alzheimer Erkrankten beschrieben (Braunewell et al., 2001a). Zudem kann eine Assoziation von VILIP-1 extrazellulär mit β -Amyloid-Plaques und intrazellulär mit den Neurofibrillen beobachtet werden³⁰ (Braunewell et al., 2001a). Die extrazelluläre Lokalisation von VILIP-1 in Assoziation zu β -Amyloid-Plaques deutet auf einen vermehrten Untergang VILIP-1-positiver Neuronen hin³¹, deren Calcium-Homöostase durch das Amyloid gestört wurde. Zusätzlich lässt die Expression von VILIP-1 nahe den Alzheimer-typischen Neurofibrillen eine Beteiligung des Proteins an der übermäßigen Phosphorylierung der Tau-Proteine und der dadurch resultierenden Bildung von Neurofibrillen vermuten (Schnurra et al., 2001).

Im Gegensatz zu den NCS-Proteinen ist die Rolle der NCP-Proteine klarer. Es wird ihnen, vor allem dem Vertreter Calbindin-D28K, eine neuroprotektive Wirkung zugesprochen (Mattson et al., 1991, Heizmann und Braun, 1992), da sie bei provozierte Exzitotoxizität, durch Stimulation mit Glutamat oder Calcium-Ionophoren, die erhöhte intrazelluläre Calcium-Konzentration zum Teil puffern können. Eine solche direkte Steuerung der Calcium-Homöostase ist durch die NCS-Proteine nicht möglich. Vielmehr wird diskutiert, dass die NCS-Proteine die pathologisch erhöhte Calcium-induzierte Signaltransduktion vermitteln und somit zum Derangieren des Calcium-Haushaltes der Zelle beitragen, woraufhin diese apoptotisch wird. VILIP-1 kann anhand dessen eine gewisse Neurotoxizität zugesprochen werden, während für ein anderes NCS-Protein, Hippocalcin, eine protektive Wirkung nachgewiesen wurde (Schnurra et al., 2001, Braunewell, 2005, Korhonen et al., 2005).

Im Rahmen der Entwicklung einer Demenz vom Alzheimer-Typ scheint die veränderte Expression beziehungsweise Funktion sowohl der NCP-Proteine als auch der NCS-

³⁰ Parallel wurde jeweils die Immunreaktivität von VILIP-3 untersucht. In geringerem Ausmaß, verglichen mit VILIP-1, zeigte sich auch für dieses Protein eine herabgesetzte Immunreaktivität im temporalen Kortex und eine Nähe zu Plaques und Neurofibrillen (Braunewell et al., 2001a, Schnurra et al., 2001).

³¹ Im Hirngewebe Gesunder erfolgte keinerlei extrazelluläre VILIP-1-Expression.

Proteine eine Rolle in der Pathophysiologie zu spielen, jedoch mit entgegengesetzter Wirkungsweise.

1.5.2.2 Schizophrenie

Wie auch in der Pathogenese der DAT ist für die Entstehung einer Schizophrenie eine Imbalance des Calcium-Haushaltes und eine damit verbundene veränderte Calcium-Signaltransduktion mitverantwortlich. Es wurde sowohl ein protektiver Effekt für die NCP-Proteine (Parvalbumin, Calbindin und Calretinin) als auch ein Verlust von NCP-positiven Neuronen im Tiermodell (Reynolds und Harte, 2007) und in *post-mortem*-Studien mit an Schizophrenie Erkrankten (Sakai et al., 2008) nachgewiesen. Im Gegensatz zur aktiven Forschung bezüglich der Rolle der NCP-Proteine ist der Wissensstand über die Funktion der NCS-Proteine bei der Entstehung von Schizophrenie als gering einzustufen. Im Rahmen des Phencyclidin- oder Ketamin-Schizophreniemodells³² der Ratte konnte eine herabgesetzte Expression des NCS-Proteins VILIP-1 im *Nucleus accumbens* nachgewiesen werden³³ (Kajimoto et al., 1995, Bernstein et al., 2003). Bei reduzierter Expressionsrate von VILIP-1 konnte im Hippokampus von Verstorbenen, die an Schizophrenie erkrankt waren, ein verändertes Expressionsmuster des Proteins festgestellt werden. So war, im Vergleich zur Kontrolle, die Immunreaktivität von VILIP-1 in Pyramidenzellen verringert, während sie in Interneuronen zunahm. Zudem wurde eine vermehrte Anzahl an VILIP-1-positiven Interneuronen beobachtet (Bernstein et al., 2002). Diese Ergebnisse konnten im Ketamin-Tiermodell bestätigt werden (Bernstein et al., 2003). Insbesondere für die GABAergen Interneuronen ist eine hohe Expression von neuroprotektiven NCP-Proteinen bekannt, deren Expression im Rahmen der Schizophrenie nicht eindeutig geklärt ist. Es wird jedoch eine Abnahme im Hippokampus vermutet (Benes und Berretta, 2001).

³² Anästhetika wie Ketamin oder Phencyclidin können im Tiermodell zu psychotischen Symptomen (Positivsymptome wie Halluzinationen oder Wahnhaftigkeit) führen, die denen der Schizophrenie ähnlich sind (Bubenikova-Valesova et al., 2008).

³³ VILIP-3 zeigte keine Veränderungen im Vergleich zu Kontrolle, Hippocalcin wurde vermehrt exprimiert, jedoch im cingulären Kortex (Bernstein et al., 2003).

1.6 Die Interaktion von VILIP-1 mit dem $\alpha_4\beta_2$ nAChR

In vorhergehenden Experimenten wurde eine Interaktion des $\alpha_4\beta_2$ nAChR³⁴ mit dem NCS-Protein VILIP-1 aufgezeigt. So wies Lin et al. in einem Hefe-2-Hybrid Screen die lange zytoplasmatische Schleife (C2)³⁵ der α_4 -Untereinheit als Interaktionsort nach (Lin et al., 2002b). Es folgte eine Ko-Immunoprecipitation in tsA201 Zellen³⁶, die eine spezifische Immunreaktivität von VILIP-1 mit dem $\alpha_4\beta_2$ nAChR darstellte (Abbildung 5A). In der gleichen Publikation wurde eine doppelt so starke Oberflächenexpression des $\alpha_4\beta_2$ nAChR in tsA201 Zellen nach Ko-Transfektion mit VILIP-1 beobachtet (Abbildung 5B). Weiterhin konnte die Gruppe in Oozyten nach Ko-Expression des Rezeptors mit VILIP-1 eine dreifach erhöhte Rezeptorsensitivität nachweisen.

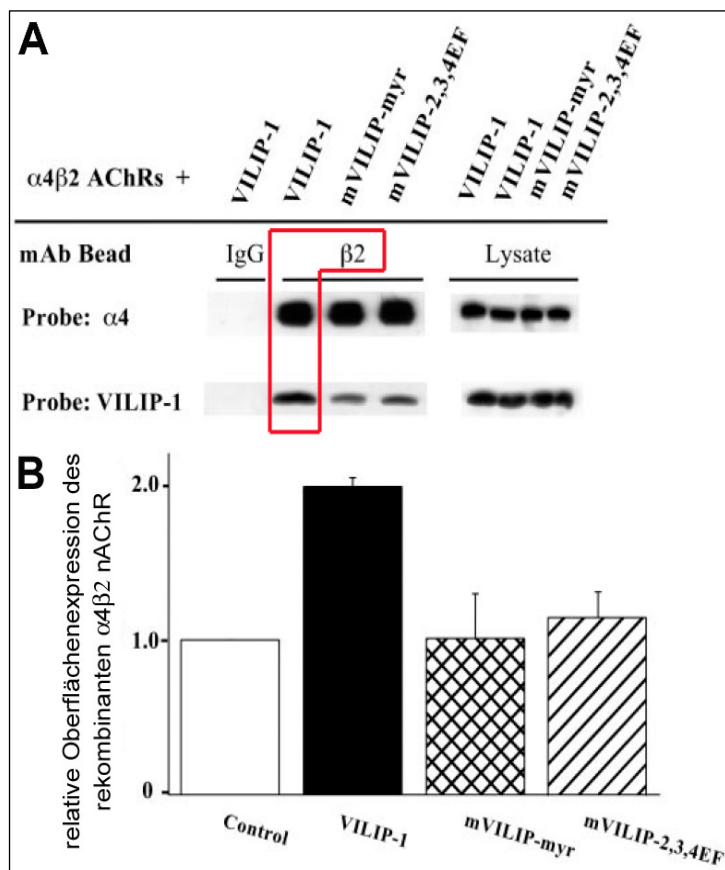


Abbildung 5. VILIP-1 bindet spezifisch an den rekombinanten $\alpha_4\beta_2$ nAChR und erhöht dessen Oberflächenexpression in tsA201 Zellen. Modifiziert nach Lin et al., 2002b. tsA201 Zellen wurden mit den α_4 - und β_2 -Untereinheiten sowie VILIP-1 ko-transfiziert. (A) zeigt eine Ko-Immunoprecipitation, die mit Proteinproben durchgeführt wurde, die zuvor mit *anti- β_2* spezifischen Antikörpern immunisoliert wurden. Eine Ko-Immunreaktivität mit β_2 konnte nach Western Blotting und SDS-PAGE³⁷ für α_4 und VILIP-1 nachgewiesen werden (roter Kasten). In (B) werden ELISA³⁸-Auswertungen dargestellt. Es kann eine Verdopplung der Oberflächenexpression des $\alpha_4\beta_2$ nAChR bei gleichzeitiger Überexpression von VILIP-1 (schwarze Säule) im Vergleich zur

Kontrolle (weiße Säule) nachgewiesen werden.

³⁴ Die Interaktion wurde sowohl für den rekombinanten Rezeptor als auch für den Wildtyp aus Hirngewebe der Ratte gezeigt.

³⁵ vergleiche Abbildung 1

³⁶ tsA201 Zellen sind ein Klon der HEK Zelllinie, die mit dem SV40 T-Antigen stabil transfiziert wurden.

³⁷ Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

³⁸ enzyme linked immunosorbent assay

Die lange zytoplasmatische Schleife der α_4 -Untereinheit des nAChR ist eine Bindungsstelle für VILIP-1 (Lin et al., 2002b). Im Rahmen von Experimenten mit Punktmutanten konnten im Bereich dieser Protein-Protein-Interaktionsstelle bestimmte hydrophobe Leucin-Reste identifiziert werden, die in verschiedenen nAChR-Untereinheiten in hohem Maße konserviert vorliegen (Ren et al., 2005). Sie beherbergen kurze Motive, die für gerichtete Transportvorgänge des Rezeptors, beispielsweise den ER-Export, essentiell sind. Nach Mutation des Leucin-Restes findet eine Oberflächenexpression des Rezeptors nicht mehr statt. Der Transport des zusammengesetzten Rezeptors zum Golgi-Apparat kann nicht mehr erfolgen (Ren et al., 2005). Inwiefern VILIP-1 mit diesem ER-Export-Motiv interagiert und so die Oberflächenexpression des $\alpha_4\beta_2$ nAChR moduliert, wird diskutiert.

Diese Beobachtungen sind Grundlage für die in dieser Arbeit dargelegten Experimente. Ihr Ziel soll es sein Effekte von VILIP-1 auf $\alpha_4\beta_2$ nAChR in hippokampalen Neuronen zu prüfen und den Mechanismus der eventuellen Interaktion näher zu charakterisieren.

2 Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund der herausragenden Rolle des Calciums für intra- und interzelluläre Signalvermittlung stellen NCS-Proteine wichtige Komponenten in der Weiterleitung und Regulation Calcium-induzierter Kaskaden dar. Studien wiesen für verschiedene NCS-Proteine eine Beteiligung an vielfältigen neuronalen Calcium-abhängigen Prozessen nach, unter anderem auch einen direkten Einfluss auf Rezeptoren und Effektoren sowie auf Transportvorgänge. Ein Anstieg der Calcium-Konzentration in der Zelle führt zu einer Konformationsänderung von VILIP-1 im Rahmen des Calcium-Myristoyl-*Switch* und dadurch zu einer vermehrten Membranbindung des Proteins. Im Zusammenhang der Membrantranslokation von VILIP-1 wurde eine Assoziation mit dem $\alpha_4\beta_2$ nAChR und eine Modulation der Rezeptorfunktion und -expression beobachtet.

Der Hippokampus ist unter anderem eine elementare Struktur für Prozesse des Lernens und der Gedächtnisbildung, die im Zentrum neurodegenerativer Pathophysiologien stehen. Sowohl VILIP-1 als auch der $\alpha_4\beta_2$ nAChR wurden in hippokampalen Neuronen identifiziert. Beide sind mit der Entstehung von Nikotinabhängigkeit und verschiedenen neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen des ZNS in Zusammenhang gebracht worden. Aufgrund dessen soll die Untersuchung einer möglichen Interaktion von VILIP-1 und dem $\alpha_4\beta_2$ nAChR speziell in hippokampalen Neuronen erfolgen. Der im Zellkulturmodell bereits beschriebene Nachweis dieser Interaktion soll mittels Immunzytochemie (Ko-Lokalisations-Experimente) auch für Neuronen erfolgen. Weiterführend gilt es zu untersuchen, auf welcher Ebene die Interaktion initiiert wird. Dazu sollen Ko-Färbungen mit Markern verschiedener Kompartimente (Golgi-Apparat, ER) mit und ohne Calcium-Stimulation (Carbachol) durchgeführt werden und Pharmaka (Brefeldin A, Monensin) eingesetzt werden, die Etappen des intrazellulären Transportes unterbrechen.

Ziel der Arbeit soll es sein, eine Interaktion von VILIP-1 und $\alpha_4\beta_2$ nAChR auch in hippokampalen Neuronen nachzuweisen. Weiterhin gilt es mögliche Regulationsmechanismen auf subzellulärer Ebene näher zu untersuchen. Dabei sollen die Daten dieser Arbeit in Zusammenhang mit Ergebnissen der Arbeitsgruppe aus gemeinsamen Publikationen betrachtet werden, die die Interaktion mit Hilfe anderer Methoden untersuchen. Diskutiert werden soll die Grundlage zur möglichen Erklärung

eines pathophysiologischen Effektes der veränderten Expression im Rahmen von Erkrankungen mit kognitiven Einschränkungen (DAT, Schizophrenie und andere).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Allgemeine Chemikalien

Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterialien sind in unten stehender Auflistung benannt und ihren Herstellern zugeordnet. Spezielle Chemikalien, Verbrauchsmaterialien sowie Lösungen sind zu Beginn der jeweiligen Methodenbeschreibung aufgeführt. Die verwendeten Chemikalien wurden in der Qualität *pro analysis* verwendet. Alle Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, in deionisiertem Wasser (ddH₂O) hergestellt.

<u>Chemikalien</u>	<u>Hersteller</u>
1,4-Diazabicyclooctan (DABCO)	Merck, Darmstadt
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Albumin Fraktion V (BSA ³⁹)	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamin-tetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Glukose	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefe-Extrakt	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ * 6H ₂ O)	Serva, Heidelberg
Magnesiumsulfat (MgSO ₄ * 7H ₂ O)	Roth, Karlsruhe
Mowiol	Calbiochem, Bad Soden
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe

³⁹ *bovine serum albumine*

<u>Chemikalien</u>	<u>Hersteller</u>
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe
Pferdeserum (HS ⁴⁰)	Gibco BRL, Eggenstein
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Tris-Acetat	Roth, Karlsruhe
Tris-Base	Roth, Karlsruhe
Triton X-100 (TX-100)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypton	Roth, Karlsruhe

Tabelle 1 Allgemeine Chemikalien

3.1.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

<u>Verbrauchsmaterialien</u>	<u>Hersteller</u>
Objektträger	Roth, Karlsruhe
Parafilm	Roth, Karlsruhe
Petrischalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Sterile Kulturröhrchen, 3 ml	Simport Plastics, Quebec (Kanada)

Tabelle 2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

3.1.3 Kits und Enzyme

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
Qiagen Endofree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Verschiedene Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Tabelle 3 Kits und Enzyme

3.1.4 Allgemeine Materialien für die Zellkultur

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
10 ml Pipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
15 ml- Zentrifugenröhrchen	Biochrom, Berlin
50 ml- Zentrifugenröhrchen	Biochrom, Berlin

⁴⁰ horse serum

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller</u>
B-27	Gibco BRL, Eggenstein
Deckgläschen, Durchmesser 12 mm	Cotech, Berlin
DNase I	Boehringer/Roche, Mannheim
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM) (4500 mg/l Glukose, 584 mg/l L-Glutamin, 110 mg/l Pyruvat)	Gibco BRL, Eggenstein
Filtereinheiten 0,2 µm steril	Schleicher & Schuell, Dassel
Fötale Kälberserum (FKS)	Gibco BRL, Eggenstein
Hank´s Balanced Salt Solution, Calcium/Mg ²⁺ frei (HBSS)	Gibco BRL, Eggenstein
Kanülen (26G, 20G)	Braun, Melsungen
Kulturschalen mit 24 Vertiefungen	Biochrom, Berlin
L-Glutamin	Gibco BRL, Eggenstein
Lipofectamin 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Neurobasal	Gibco BRL, Eggenstein
Nylonnetz	Sefar, Rüslikon, CH
OptiMEM	Gibco BRL, Eggenstein
Penicillin, Streptomycin, Amphotericin B	Gibco BRL, Eggenstein
Poly-D-Lysin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trypan <i>blue stain</i> 0,4%	Gibco BRL, Eggenstein
Trypsin	Gibco BRL, Eggenstein
Zellkulturflaschen 25cm ²	Biochrom, Berlin

Tabelle 4 Allgemeine Materialien für die Zellkultur

3.1.5 Allgemeine Lösungen

<u>Lösung</u>	<u>Chemikalien</u>
10x PBS	1,5 M NaCl, 83 mM Na ₂ HPO ₄ , 17 mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O, pH 7.4

Tabelle 5 Allgemeine Lösungen

3.1.6 Vektoren

<u>Vektor</u>	<u>Zur Verfügung gestellt von</u>
pEF6- α_4 -flag/- β_2 -flag	R. Anand ⁴¹
pEGFP/-VILIP-1	K.-H. Braunewell
pNSE-GFP/-VILIP-1-GFP	K.-H. Braunewell

Tabelle 6 Vektoren

3.1.7 Bakterienstämme

Für die Transformation von allen Vektoren wurde der Bakterienstamm E.coli DH5 α Zellen (*subcloning efficiency*) (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

3.1.8 Antikörper

3.1.8.1 Primäre Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Spezies</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Firma/Hersteller</u>
<i>anti-α_4</i> , Klon 299	Ratte, monoklonal	1:500	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
<i>anti-Calnexin</i>	Kaninchen, polyklonal	1:2000	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
<i>anti-flag</i>	Kaninchen, polyklonal	1:2500	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
<i>anti-flag</i>	Ziege, polyklonal	1:100	Abcam, Cambridge (Großbritannien)
<i>anti-GAD-65</i>	Maus, monoklonal	1:100	SantaCruz, Heidelberg
<i>anti-Syntaxin 6</i>	Maus, monoklonal	1:1500	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
<i>anti-VILIP-1</i>	Kaninchen, polyklonal	1:1000	K.-H. Braunewell ⁴²
<i>anti-VILIP-1</i>	Ratte, polyklonal	1:1000	K.-H. Braunewell

Tabelle 7 Primäre Antikörper

⁴¹ Wir danken Dr. Rene Anand für die freundlicherweise zur Verfügung gestellten Konstrukte der α_4 - und β_2 -Untereinheiten des nAChR (α_4 - und β_2 -flag).

⁴² eigene Herstellung

3.1.8.2 Sekundäre Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Spezies</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Firma/Hersteller</u>
<i>anti</i> -Kaninchen IgG, Alexa 488	Ziege	1:1000	Molecular Probes, Karlsruhe
<i>anti</i> -Kaninchen IgG, Cy3-gekoppelt	Ziege	1:1000	Dianova, Hamburg
<i>anti</i> -Kaninchen IgG, Cy5-gekoppelt	Esel	1:1000	Dianova, Hamburg
<i>anti</i> -Kaninchen IgG, Cy5-gekoppelt	Ziege	1:1000	Abcam, Cambridge (Großbritannien)
<i>anti</i> -Maus IgG, Alexa 488	Esel	1:1000	Dianova, Hamburg
<i>anti</i> -Maus IgG, Alexa 488	Ziege	1:1000	Molecular Probes, Karlsruhe
<i>anti</i> -Maus IgG, Cy5-gekoppelt	Ziege	1:1000	Abcam, Cambridge (Großbritannien)
<i>anti</i> -Ratte IgG, Cy3-gekoppelt	Ziege	1:1000	Dianova, Hamburg
<i>anti</i> -Ziege IgG, Cy3-gekoppelt	Esel	1:1000	Abcam, Cambridge (Großbritannien)

Tabelle 8 Sekundäre Antikörper

3.1.9 Tiere

Es wurden für die Präparation der Primärkulturen ausschließlich Ratten (*Rattus rattus norvegicus*) des Stammes Wistar aus der Tierhaltung der Charité und von der Firma Charles River Deutschland, Sulzfeld verwendet.

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologie

3.2.1.1 Transformation von Bakterienstämmen

LB-Medium, steril	1% Trypton, 0,5% Hefe-Extrakt, 0,5% NaCl in ddH ₂ O, pH 7,0
LB-Platten (10-20 ml/Platte), steril	1% Agar-Agar, 100 µg/ml Antibiotikum in LB-Medium
SOC-Medium, steril	2% Trypton, 0,5% Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glukose in ddH ₂ O

Die Transformation von 50 µl E.coli mit 100 ng cDNA⁴³ erfolgte nach 30 minütiger Inkubation auf Eis durch Hitzeschock (42°C, 30 s). Nach 2 min auf Eis wurden 250 µl SOC-Medium (37°C) zugegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 225 rpm und 37°C inkubiert. Von einem Ansatz wurden 50 µl und 200 µl auf je eine LB-Platte ausgestrichen, die zuvor mit dem Antibiotikum entsprechend der Resistenzlage des Vektors versetzt wurde und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mindestens zwei einzelstehende Kolonien wurden gepickt und Startkulturen in 3 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Antibiotikum angesetzt (225 rpm, 37°C, 8 h). Eine der beiden Startkulturen wurde dann vollständig in 500 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Antibiotikum überführt und über Nacht bei 225 rpm, 37°C geschüttelt.

3.2.1.2 DNA-Präparation (Maxipräparation)

Die Hauptkulturen wurden zentrifugiert (4500 g, 15 min) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde resuspendiert und aufgereinigt mit Hilfe des Endofree Plasmid Maxi Kits (Qiagen, Hilden) entsprechend der Anleitung des Herstellers. Die so aufgereinigte cDNA wurde für transiente Transfektionen in der Zellkultur und der primären hippokampalen Neuronenkultur verwendet.

⁴³ komplementäre Desoxyribonukleinsäure

3.2.1.3 Restriktion von DNA

Die Kontrolle der in der Maxipräparation aufgereinigten cDNA erfolgte durch Verdau mit verschiedenen Restriktionendonukleasen (REN; MBI Fermentas, St. Leon Rot) entsprechend der Schnittstellen in den Vektoren. 1 µg cDNA wurde mit 10 u/µl REN (bei einigen Enzymen 1 u/µl ausreichend, siehe Liste des Herstellers) sowie dem zugehörigen Puffer (nach Angaben des Herstellers) in ddH₂O bei 37°C über 1 h verdaut.

3.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

50x TAE	2 M Tris-Acetat, 0,05 M EDTA
10x TBE	0,89 M Tris-Base, 0,89 M Borsäure, 0,02 EDTA
6x Gelladepuffer	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
GeneRuler DNA Ladder Mix	Roth, Karlsruhe

Zur Auftrennung der verdauten Konstrukte wurde eine Gelelektrophorese mit 0,8-1% Agarose in 1x Tris-Acetat mit EDTA (TAE) oder Tris-Base mit EDTA und Borsäure (TBE) durchgeführt. Die cDNA-Proben wurden mit 1x DNA-Probenpuffer versetzt und in einer Elektrophoresekammer bei ca. 90 V horizontal aufgetrennt. Durch Zufügen von Ethidiumbromid (1 µl/ 100 ml) konnten die Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht werden und anhand eines Fragmentlängenstandards ihre Größe abgelesen werden.

3.2.2 Zellkultur

3.2.2.1 Kultivierung von Human embryonic kidney (HEK) 293 Zellen

DMEM supplimentiert	10% FKS, 2 mM L-Glutamin, 100 u/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
---------------------	---

Die Kultivierung der HEK 293 Zellen erfolgte in supplimentiertem DMEM in einem Zellkultur-Inkubator (Heraeus, Osterode) bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂. Zweimal pro Woche wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 in neues supplimentiertes Medium umgesetzt. Dazu wurden die Zellen zuvor einmal gewaschen (DMEM) und anschließend 5 min zentrifugiert (1200 g, 4°C).

3.2.2.2 Transiente Transfektion

Die transiente Transfektion von HEK 293 Zellen erfolgte mit Lipofectamin 2000 (Invitrogen, Karlsruhe) 12 h nach Ausplattieren der Zellen in Kulturschalen mit 24 Vertiefungen. Die Vertiefungen wurden zuvor mit Deckgläschen (Durchmesser 12 mm) bestückt, mit Poly-D-Lysin beschichtet und anschließend jeweils 30.000 Zellen ausgesät. Der Transfektionsansatz (50 µl OptiMEM, 1 µl Lipofectamin, 1 µg cDNA) wurde zur Bildung des Liposom-DNA-Komplexes 20 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach einem Mediumwechsel zur Verbesserung der Transfektionseffizienz mit un-supplementiertem DMEM (je 450 µl) wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben. Nach 4-6 h wurde ein erneuter Mediumwechsel mit supplementiertem DMEM durchgeführt. Insgesamt wurde die cDNA 48 h im Brutschrank exprimiert (Ren et al., 2005), dann folgte die Fixierung der Zellen.

3.2.3 Primärkultur hippokampaler Neuronen

3.2.3.1 Präparation und Kultivierung

Poly-D-Lysin	100 mg/l in 0,15 M Borsäure, pH 8,4, nach der Herstellung steril filtriert (Porengröße 0,2 µm)
Medium 1	DMEM, 10% FKS, 2 mM Glutamin, 100 u/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (Pen/Strep), 0,25 µg/ml Amphotericin B
Medium 2	Neurobasal 1 x B27, Pen/Strep (s.o.), 0,5 mM Glutamin
Trypsin	0,2% in HBSS
DNase I	0,01% (200 u) in HBSS, 2,4 mM MgSO ₄

Trächtigen Ratten wurden 19-20 Tage alte Embryos aus der Bauchhöhle entnommen und nach Befreiung von Plazenta und Fruchtblase dekapitiert. Nach Entnahme der Gehirne wurden die Hippokampi unter dem Binokular herauspräpariert und in kaltem HBSS gesammelt. Es folgte nach dreimaligem Waschen mit kaltem HBSS eine 20 minütige Inkubation in Trypsin-Lösung bei 37°C im Wasserbad. Anschließend wurden die Hippokampi erneut dreimal mit kaltem HBSS gewaschen. Zur Dissoziation des Gewebes wurde das HBSS auf 1,6 ml abgenommen, mit 400 µl 0,05%iger DNase-Lösung in ein Eppendorfgefäß überführt und je dreimal langsam durch zwei verschiedene Kanülen abnehmender Weite (20G, 26G) gedrückt. Die Zellsuspension wurde durch ein Nylonnetz (Maschenweite 125 µm) gegeben, um nicht dissoziierte

Gewebestücke zu entfernen, und mit 37°C warmem Medium 1 auf 15 ml aufgefüllt. Nach Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer und Trypan-*blue-stain*-0,4%-Färbelösung wurde die Zellsuspension mit Medium 1 entsprechend verdünnt. Die Zellen wurden in einer Dichte von ca. 50.000 – 70.000 Zellen pro Vertiefung in Kulturschalen mit 24 Vertiefungen auf mit Poly-D-Lysin beschichteten Deckgläschen ausgesät. Nach 24 h erfolgte ein kompletter Medienwechsel auf Medium 2. Weitere Medienwechsel erfolgten einmal pro Woche mit Medium 2, wobei nur etwa die Hälfte des alten Mediums entfernt wurde.

Die Zellkultur-Arbeiten wurden unter einer Steril-Bank (Herasafe, Heraeus, Osterode) durchgeführt. Die Zellen wurden im Zellkultur-Inkubator (Heraeus, Osterode) bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Reinheit der Kulturen wurde mittels des Astrozytenmarkers saures Gliafaserprotein (GFAP⁴⁴) wiederholt geprüft.

3.2.3.2 Transiente Transfektion

Transfektionsmedium Glutamin 1:400, B 27 1:50 in Neurobasal

Die Transfektion hippocampaler Neuronen erfolgte analog der Transfektion von HEK 293 Zellen (siehe 3.2.2.2). Dazu wurden Kulturen 10-14 Tage nach der Präparation verwendet. Der Mediumwechsel vor Hinzugabe des Transfektionsansatzes erfolgte hier jedoch mit o.g. Transfektionsmedium, welches anschließend nicht mehr gewechselt wurde. Die cDNA exprimierte über 20 h (pEF6- α_4 -flag/- β_2 -flag) beziehungsweise 40 h bei Ko-Transfektion mit pNSE-GFP/-VILIP-1-GFP. Daraufhin wurden die Zellen fixiert.

3.2.4 Pharmakologische Stimulation

<u>Pharmakon</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Zeit</u>	<u>Lösungsmittel</u>	<u>Hersteller</u>
Brefeldin A	3,5 μ M	20 h	Ethanol	Für alle Pharmaka:
Carbachol	100 μ M	2 min	ddH ₂ O	Sigma-Aldrich,
Monensin	10 μ M	2 h 15 min	DMSO	Deisenhofen

Hippokampale Neuronen wurden mit VILIP-1-GFP beziehungsweise GFP und den α_4 - und β_2 -flag Untereinheiten ko-transfiziert und 20 h nach der Transfektion mit Brefeldin A für weitere 20 h beziehungsweise 38 h nach der Transfektion mit Monensin für 2 h 15

⁴⁴ *glial fibrillary acidic protein*

min inkubiert. Außerdem wurden die Neuronen 20 h nach Transfektion der α_4 -/ β_2 -flag Untereinheiten für 2 min mit Carbachol stimuliert.

Die Fixierung der Zellen erfolgte in allen Fällen ohne einen vorhergehenden Waschvorgang. Lagen die Pharmaka gelöst beziehungsweise verdünnt in DMSO (Monensin) oder Ethanol (Brefeldin A) vor, so wurden Kontrollexperimente mit diesen Substanzen durchgeführt um zu gewährleisten, dass der beobachtete Effekt nicht auf die Lösungsmittel zurückzuführen ist. Die eingesetzten Pharmaka-Konzentrationen beziehen sich auf bekannte Werte aus der Literatur.

3.2.5 Immunzytochemie

Fixierlösung	3% PFA in PBS
Glycin	25 mM in PBS
Blockierlösung	3% BSA, 5% HS in PBS
Mowiol (<i>Mounting-Medium</i>)	10% Mowiol, 25% Glycerin, 100 mM Tris/HCl (pH 8,5), 2,5% DABCO

Nach entsprechender Expressionszeit wurden die Zellen 5 min mit 3% PFA bei RT fixiert. Um die unspezifische Hintergrundfärbung zu reduzieren folgte zweimal für jeweils 10 min ein Waschschriff mit Glycin. Zur weiteren Prozedur wurden die Deckgläschen mit den darauf wachsenden Zellen in eine feuchte Kammer (mit ddH₂O angefeuchteter Zellstoff, abgedeckt mit Parafilm in einer Petrischale) überführt und in Blockierlösung mit 0,1% TX-100 inkubiert und permeabilisiert. Bei Oberflächenfärbungen wurden die Zellen nicht mit TX-100 permeabilisiert um nur die extrazellulären Epitope anzufärben und somit die Rezeptorlokalisierung an der Zellmembran sichtbar zu machen. Die primären Antikörper wurden in Blockierlösung entsprechend verdünnt (siehe Tabelle 7 Primäre Antikörper) und dabei gegebenenfalls mit TX-100 weiter permeabilisiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper (verdünnt in Blockierlösung, siehe Tabelle 8 Sekundäre Antikörper) appliziert und lichtgeschützt für 1,5 h bei RT inkubiert. Die Antikörperlösung wurde abgesaugt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Um überschüssige Salze und Reagenzien zu entfernen wurden die Deckgläschen in ddH₂O getaucht, trocken getupft und mit Mowiol auf Objektträgern eingebettet (Trockenzeit min. 2 h bei 4°C). Zur

weiteren Fixierung wurden die Übergänge der Deckgläschen zum Objektträger mit Klarlack eingestrichen.

3.2.6 Auswertung

Die Visualisierung der Fluoreszenz-gekoppelten Proteine (GFP, Alexa Green 488, Cy3 und Cy5) erfolgte mit einem Laser-Scanningmikroskop (Leica DM LFSA oder DM 2500; Wetzlar, Deutschland) mit Argon-Ion- (488 nm), Helium-Neon- (543 nm) und Helium-Neon- (633 nm) beziehungsweise Festkörper- (488, 532, 635 nm) Laserlichtanregung. Das Anregungslicht wurde durch dichromatische Strahlenteiler (RSP500 für GFP und DD488/543 für Cy3 beziehungsweise DD488/635 für GFP, Alexa Green 488, Cy5 und DD405/532 für Cy3 Fluoreszenz) eingekoppelt. Das ausgesendete Licht wurde in sequenziellen Rastern im Bereich von 505 nm bis 550 nm (GFP, Alexa Green 488), 550 nm bis 600 nm (Cy3) und 650 nm bis 750 nm (Cy5) zusammengesetzt. Die Einstellung der Lochblende betrug 1 Airy. Für die Experimente an dem aufrecht stehenden Mikroskop wurden Öl-Immersionen-Objektive verwendet (Leica HCX PL APO 63x/1.4 und 100x/1.4). Bei den Aufnahmen mit den Größen 512 x 512 und 1024 x 1024 Pixel betrug die räumliche Auflösung 0.37 $\mu\text{m}/\text{Pixel}$ (in der X- und Y-Achse). Um Bildinformationsverluste zu vermeiden, wurde die geringste Laserintensität, die für ein adäquates Signal-Rausch-Verhältnis notwendig ist, verwendet.

Für die Quantifizierung der Oberflächenexpression des $\alpha_4\beta_2$ nAChR in HEK 293 Zellen wurde konventionelle Fluoreszenzmikroskopie mit dem Leica DMR durchgeführt.

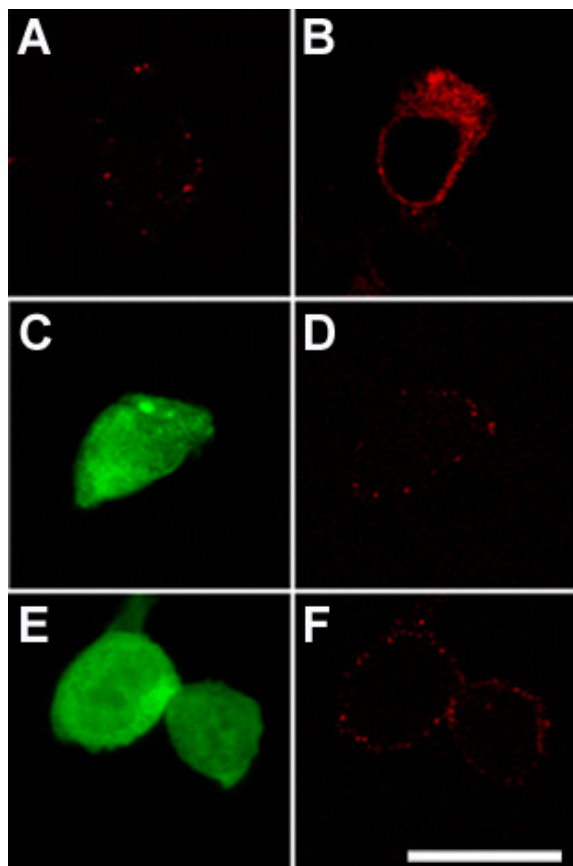
Die Bildbearbeitung erfolgte mit Hilfe von Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems, San Jose, CA).

4 Ergebnisse

Es konnte bereits in Oozyten und tsA201 Zellen gezeigt werden (Lin et al., 2002b), dass VILIP-1 mit dem $\alpha_4\beta_2$ nAChR interagiert und als Folge die Oberflächenexpression und auch die Sensitivität des nAChR an der Zellmembran signifikant erhöht. Diese Ergebnisse stellten den Ausgangspunkt der folgenden Experimente dar.

4.1 VILIP-1-GFP erhöht die Oberflächenexpression des $\alpha_4\beta_2$ nAChR in ko-transfizierten HEK 293 Zellen

Es wurde zunächst ein Protokoll (Ren et al., 2005) zur Oberflächenfärbung im Zellkulturmodell mit HEK 293 Zellen etabliert. Dazu wurden die HEK 293 Zellen in Kulturschalen mit 24 Vertiefungen kultiviert und transient transfiziert. 48 h nach der Transfektion mit den α_4 -flag und β_2 -flag Untereinheiten des nAChR konnte mit Hilfe einer Oberflächenfärbung die Lokalisation des nAChR bei einem Teil der Zellen auch an der Zellmembran nachgewiesen werden (Abbildung 6A). Dabei wurde nur das extrazelluläre Epitop des flag-tag mit Antikörpern markiert und in der Immunfluoreszenz dargestellt. Als Kontrolle wurden die Zellen mit dem Detergens TX-100 permeabilisiert, was die intrazelluläre Verteilung des nAChR zeigte (Abbildung 6B). Bei Ko-Transfektion



von VILIP-1-GFP beziehungsweise GFP mit den α_4 -flag und β_2 -flag Untereinheiten konnte nach 48 h eine deutlich erhöhte Oberflächenexpression des nAChR in den VILIP-1-GFP positiven Zellen beobachtet werden (Abbildung 6E-F) im Vergleich zum leeren GFP Kontrollvektor (Abbildung 6C-D). Zudem fiel bei der immunfluoreszenzmikroskopischen Auswertung auf, dass der Anteil der Zellen, die den nAChR an der Zelloberfläche exprimieren, bei Ko-Expression von VILIP-1-GFP deutlich zunimmt.

Abbildung 6. Transiente Transfektion des $\alpha_4\beta_2$ nAChR allein und Ko-Transfektion mit GFP oder VILIP-1-GFP in HEK 293 Zellen. HEK 293 Zellen,

nach transienter Transfektion der α_4 -flag und β_2 -flag Untereinheiten, zeigen nach 48 h Kultivierung zum Teil eine schwache Oberflächenexpression des $\alpha_4\beta_2$ nAChR (A) bei starker intrazellulärer Expression des Rezeptors nach Permeabilisierung der Zellen mit TX-100 (B). VILIP-1-GFP (E) erhöht bei Ko-Transfektion und Kultivierung über 48 h die Lokalisation des nAChR (F) in der Zellmembran, verglichen mit der GFP ko-transfizierten Kontrolle (C, D). Der Längsbalken in F beträgt 20 μm .

Abbildung 7 zeigt die quantitative Analyse, die einen signifikanten Anstieg der Zellanzahl mit Oberflächenexpression des $\alpha_4\beta_2$ nAChR von 25% auf 64% bei Ko-Expression von VILIP-1-GFP belegt. Die Ko-Expression mit VILIP-1-GFP führte im Zellkulturmodell zu einer vermehrten Oberflächenexpression des $\alpha_4\beta_2$ nAChR im Vergleich zur GFP-Kontrolle. Zudem erhöhte sich signifikant der Anteil der $\alpha_4\beta_2$ nAChR exprimierenden VILIP-1-GFP positiven Zellen.

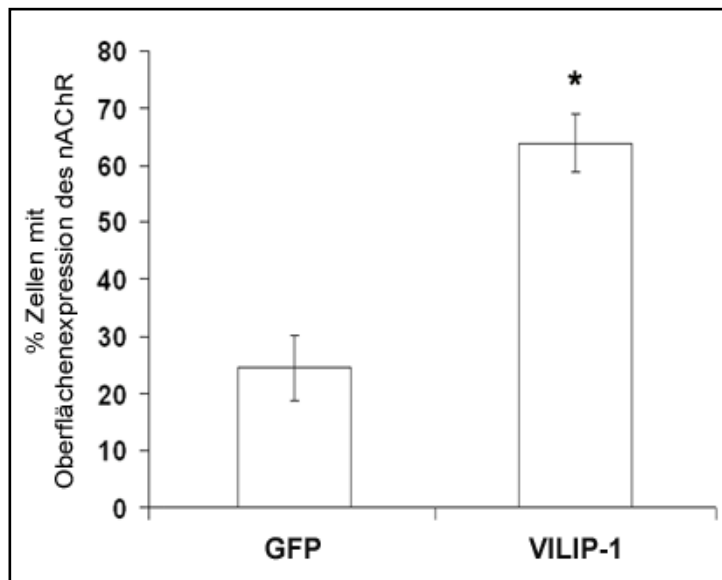


Abbildung 7. VILIP-1-GFP erhöht die Anzahl der nAChR $\alpha_4\beta_2$ exprimierenden Zellen im Zellkulturmodell (HEK 293 Zellen). Quantifizierung der Zellen mit nAChR Oberflächenexpression mittels konventioneller Immunfluoreszenzmikroskopie. VILIP-1-GFP positive Zellen weisen zu 64% eine Lokalisation des $\alpha_4\beta_2$ nAChR an der Zelloberfläche auf. In der Kontrolle mit GFP Ko-Transfektion zeigen dies lediglich 25% der Zellen. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von vier

verschiedenen Experimenten, die jeweils doppelt ausgeführt wurden. Das Sternchen stellt die im *Student's t-test* (zweiseitig, ungepaart) ermittelte Signifikanz in Bezug auf die Kontrolle dar (* $p < 0,05$).

4.2 VILIP-1-GFP erhöht die Oberflächenexpression des ko-transfizierten $\alpha_4\beta_2$ nAChR in hippokampalen Neuronen

Nachdem im Zellkulturmodell eine Interaktion zwischen VILIP-1 und dem $\alpha_4\beta_2$ nAChR gezeigt werden konnte, stellt sich weiterführend die Frage inwiefern VILIP-1 auch im Hippokampus, einer elementaren Struktur des ZNS, für Prozesse des Lernens und des Gedächtnis, ein möglicher Modulator der nAChR-Expression ist. Dazu wurde analog zu den Versuchen in HEK 293 Zellen nun in der primären hippokampalen Neuronenkultur

ein entsprechendes Modell zur Oberflächenfärbung etabliert. Hippokampale Neuronen wurden mit VILIP-1-GFP sowie den α_4 -flag und β_2 -flag Untereinheiten ko-transfiziert. Im Gegensatz zu HEK 293 Zellen werden VILIP-1 und $\alpha_4\beta_2$ nAChR in hippokampalen Neuronen endogen exprimiert. Durch die Verwendung von getaggter cDNA kommt es zu einer spezifischen Antikörperfärbung des tag-Epitopes, die somit nur die überexprimierte cDNA und nicht den endogenen Pool der genannten Proteine darstellt.

Abbildung 8A-B zeigt eine Oberflächenfärbung in mit GFP transfizierten Neuronen, in der keine oder eine nur sehr schwache Expression des ko-transfizierten $\alpha_4\beta_2$ nAChR an der Zellmembran beobachtet werden konnte. Mit VILIP-1-GFP hingegen (Abbildung 8C-D) zeigte sich eine charakteristische Lokalisation des $\alpha_4\beta_2$ nAChR an der Zelloberfläche, vergleichbar mit der in HEK 293 Zellen.

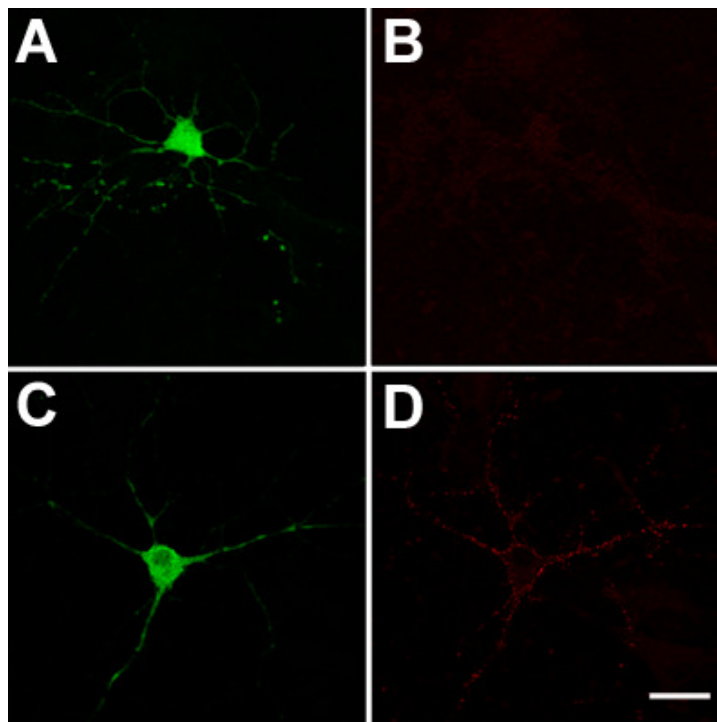


Abbildung 8. Transiente Ko-Transfektion des nAChR $\alpha_4\beta_2$ mit GFP beziehungsweise VILIP-1-GFP in primären hippokampalen Neuronen. Primäre hippokampale Neuronen wurden für 10-14 Tage kultiviert und anschließend mit den α_4 -flag und β_2 -flag Untereinheiten und VILIP-1-GFP beziehungsweise GFP ko-transfiziert. Während nach 40 h die GFP transfizierten Zellen eine sehr schwache Oberflächenexpression des $\alpha_4\beta_2$ nAChR aufweisen (A, B), ist bei VILIP-1-GFP positiven Neuronen eine deutliche Oberflächenlokalisierung des $\alpha_4\beta_2$ nAChR zu beobachten (C, D). Der Längsbalken in D beträgt 20 μm .

Eine quantitative Auswertung der VILIP-1-GFP positiven Neuronen ergab, dass in dieser Gruppe die Zahl der Neuronen, die den $\alpha_4\beta_2$ nAChR an der Zellmembran exprimieren, größer ist als bei der mit GFP transfizierten Kontrollgruppe. 74% der VILIP-1-GFP positiven Neuronen zeigen eine Oberflächenexpression des Rezeptors im Vergleich zu 25% in der GFP-Kontrolle (Abbildung 9). Damit bestätigt sich der Einfluss von VILIP-1-GFP auf das Expressionsverhalten des $\alpha_4\beta_2$ nAChR, der bereits im HEK

293 Zellkulturmodell beobachtet werden konnte (Abbildung 7). In die quantitative Auswertung wurden zusätzlich Auszählungen von Experimenten einbezogen, die Dr. Marian Brackmann in Zusammenarbeit durchgeführt hat.

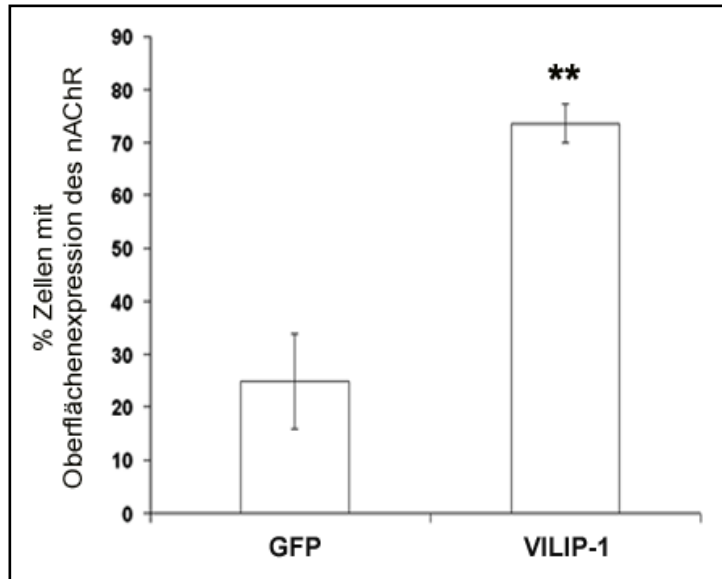


Abbildung 9. VILIP-1-GFP erhöht die Anzahl der $\alpha_4\beta_2$ nAChR exprimierenden Zellen in der hippocampalen Neuronenkultur. Quantifizierung der Neuronen, die eine Oberflächenexpression des nAChR aufweisen, mittels eines Laser-Scanningmikroskopes. 74% der VILIP-1-GFP positiven Neuronen zeigen eine Oberflächenlokalisation des $\alpha_4\beta_2$ nAChR. In der GFP-Kontrolle hingegen nur 25%. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens vier

verschiedenen Experimenten, die jeweils dreifach ausgeführt wurden. Die Sternchen stellen die im *Student's t-test* (zweiseitig, ungepaart) ermittelte Signifikanz in Bezug auf die Kontrolle dar (** $p < 0,01$).

4.3 Endogenes VILIP-1 ist mit dem $\alpha_4\beta_2$ nAChR an der Zellmembran und an intrazellulären Membranen ko-lokalisiert

Um die Frage zu untersuchen, auf welcher Ebene eine Interaktion zwischen VILIP-1 und dem $\alpha_4\beta_2$ nAChR stattfindet, wurden in Neuronen die α_4 -flag und β_2 -flag Untereinheiten überexprimiert und mit endogenem VILIP-1 ko-gefärbt. In Abbildung 10 zeigt sich kongruent zu den Ergebnissen der Oberflächenfärbung eine Ko-Lokalisation an der Zellmembran (Abbildung 10C, gelb), aber auch deutlich intrazellulär (Abbildung 10F, gelb). Als Ort der subzellulären Interaktion ist, zur Initiierung von Translokation bzw. Transportmechanismen, der Golgi-Apparat wahrscheinlich. Dafür spricht, dass VILIP-1 Calcium-abhängig im Golgi-Apparat lokalisiert ist (Spilker et al., 2002a). Möglich ist aber auch, dass VILIP-1 in anderen Kompartimenten, wie dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) oder an endosomalen Membranen, den Transport des $\alpha_4\beta_2$ nAChR an die Zelloberfläche beeinflusst.

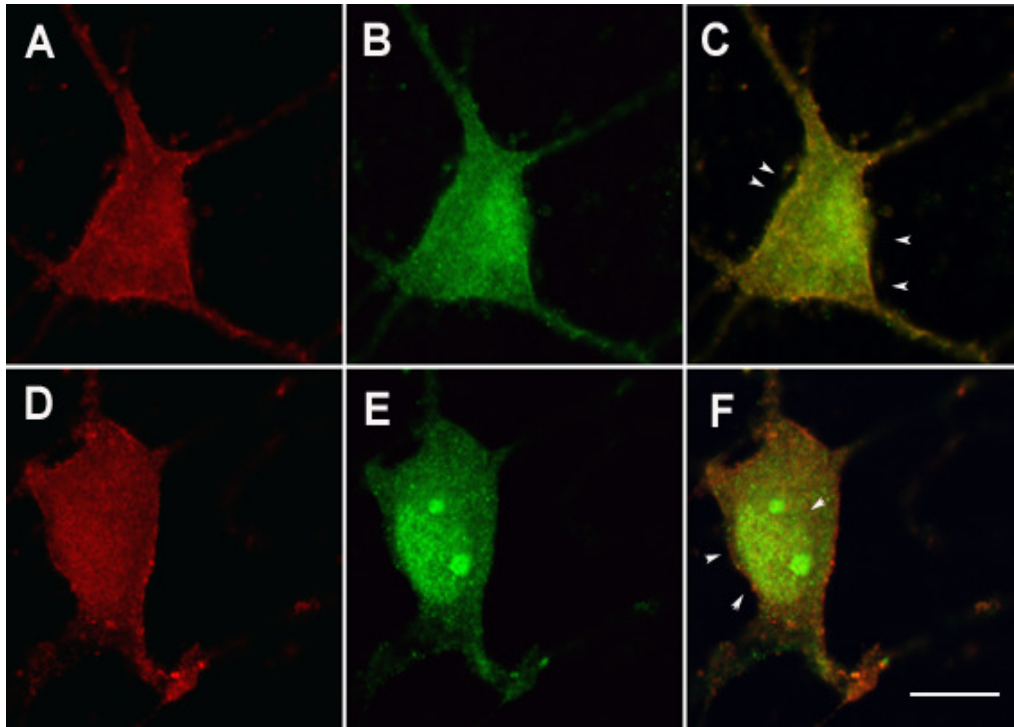


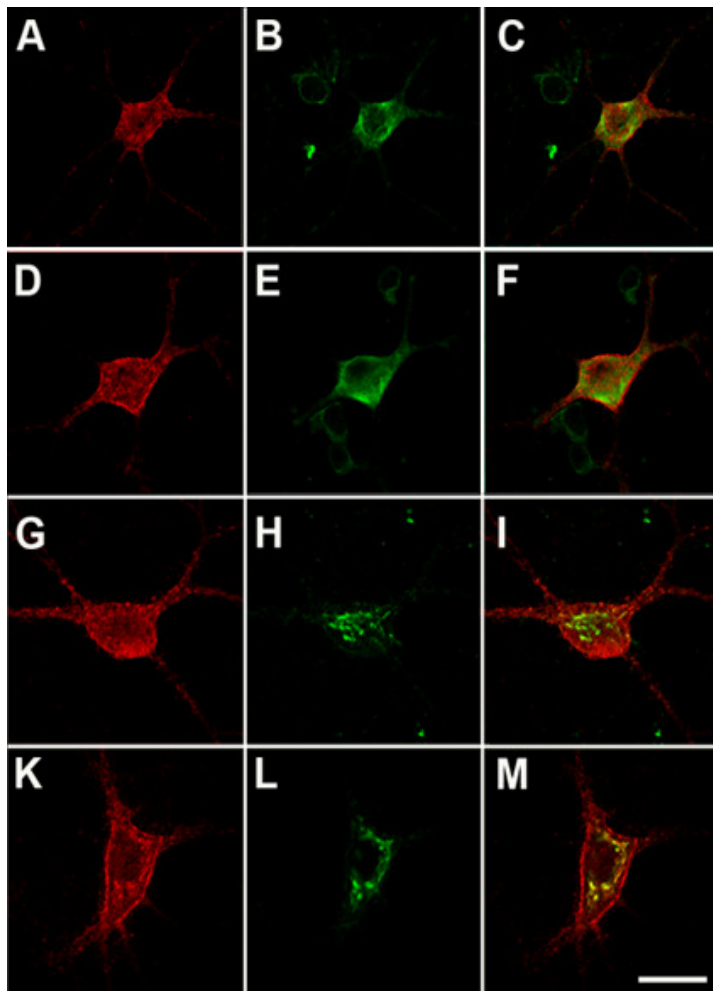
Abbildung 10. Endogenes VILIP-1 ko-lokalisiert an der Oberfläche, aber auch an intrazellulären Membranen mit dem $\alpha_4\beta_2$ nAChR. In hippocampalen Neuronen zeigt VILIP-1 eine Ko-Lokalisation mit dem Rezeptor an Membranen von intrazellulären Kompartimenten. Nach einer Kultivierung der Neuronen über 10-14 Tage wurden die α_4 -flag und β_2 -flag Untereinheiten (B, C, E, F; grüner Kanal) für 20 h überexprimiert und anschließend mit endogenem VILIP-1 (A, C, D, F; roter Kanal) ko-gefärbt. Die Pfeile in C zeigen Ko-Lokalisationen (gelb) an der Zelloberfläche und in F an intrazellulären Membranen. Der Längsbalken in D beträgt 20 μm .

4.4 Calcium-abhängige Lokalisation von VILIP-1 am Golgi-Apparat und der Zelloberfläche, jedoch nicht am ER

Diese Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Marian Brackmann durchgeführt. Abbildung 11 zeigt ein von ihm durchgeführtes Experiment, dessen Auswertung freundlicherweise von ihm für diese Arbeit zur Verfügung gestellt wurde.

Die subzelluläre Ko-Lokalisation konnte in weiteren konfokalen immunfluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen näher spezifiziert werden. Für VILIP-1 ist eine Calcium-abhängige Oberflächen- und Golgi-Lokalisation nach Calcium-Myristoyl-Switch bereits bekannt (Spilker et al., 2002a). Nach Calcium-Stimulation wird der hydrophobe Myristoyl-Rest exponiert und ermöglicht so eine Bindung an Membranen. Abbildung 11 zeigt hippocampale Neuronen, deren intrazelluläre Calcium-Konzentration durch Carbachol-Stimulation (Abbildung 11D-F, K-M) erhöht wurde sowie die zugehörigen

Kontrollen (Abbildung 11A-C, G-I). Es konnte eine vermehrte Translokation von VILIP-1 an die Oberfläche nach Carbachol-Stimulation gezeigt werden (Abbildung 11D, K). Wurden die Neuronen zusätzlich mit dem ER-Marker Calnexin (Abbildung 11B, E) gefärbt, war keine Lokalisation von VILIP-1 an dem ER zu beobachten, weder in der Kontrolle noch nach Carbachol-Applikation (Abbildung 11C, F; VILIP-1: rot, Calnexin: grün). Bei Ko-Färbung mit Syntaxin 6 (Abbildung 11H, L), einem *trans*-Golgi-Marker, konnte für VILIP-1 in der Kontrolle eine geringgradige Lokalisation an dem Golgi-Apparat nachgewiesen werden (Abbildung 11I; Ko-Lokalisation: gelb), die sich nach Calcium-Stimulation signifikant erhöhte (Abbildung 11M, gelb). Als zusätzliche Kontrolle wurden analoge Versuche durchgeführt, in denen der intrazelluläre Calcium-Anstieg mit Ionomycin induziert wurde (Daten nicht gezeigt). Der in diesen Experimenten reproduzierte Calcium-Myristoyl-Switch (nach Ionomycin-Applikation) (Spilker et al.,



2002a) ist mit den Ergebnissen der vorliegenden Abbildung (nach Carbachol-Stimulation) kongruent.

Der Golgi-Apparat erscheint daher als möglicher Ort der Interaktion von VILIP-1 mit dem $\alpha_4\beta_2$ nAChR, die zu einem gesteigerten Zellmembrantransport des Rezeptors führt. Das ER ist aufgrund fehlender Ko-Lokalisation von Calnexin mit VILIP-1 ein unwahrscheinlicher Ausgangspunkt für eine vermehrte Oberflächenexpression des $\alpha_4\beta_2$ nAChR.

Abbildung 11. VILIP-1 ko-lokalisiert in hippocampalen Neuronen nicht mit dem ER, aber Calcium-abhängig am

Golgi-Apparat und der Zelloberfläche. 14 Tage alte hippocampale Neuronen wurden unbehandelt als Kontrolle fixiert (A-C, G-I) beziehungsweise für 2 min mit Carbachol (100 μ M) stimuliert und im Anschluss sofort fixiert (D-F, K-M). Carbachol induziert durch Erhöhung der Calcium-Konzentration in der Zelle, eine deutliche Translokation von VILIP-1 an die Zellmembran (D, K). In einer Ko-Färbung der Neuronen gegen

den ER-Marker Calnexin (B, E; grüner Kanal) und VILIP-1 (A, D; roter Kanal) konnte weder in der Kontrolle (C) noch nach Calcium-Stimulation (F) eine Ko-Lokalisation nachgewiesen werden. Nach Ko-Färbung gegen den Golgi-Marker Syntaxin 6 (H, L; grüner Kanal) und VILIP-1 (G, K; roter Kanal) konnte neben einer verstärkten Oberflächenlokalisation auch eine deutlich vermehrte Lokalisation im Golgi-Apparat (M; Ko-Lokalisation: gelb) gegenüber der Kontrolle (I; gelb) gezeigt werden. Der Längsbalken in M beträgt 20 μm .

4.5 Der $\alpha_4\beta_2$ nAChR lokalisiert im ER und dem Golgi-Apparat

Eine Dreifach-Färbung wurde etabliert, um die subzelluläre Lokalisation des $\alpha_4\beta_2$ nAChR näher zu untersuchen. Es konnte für den $\alpha_4\beta_2$ nAChR eine Lokalisation sowohl im Golgi-Apparat als auch im ER gezeigt werden. Primäre Neuronenkulturen wurden nach 20 h Überexpression der α_4 -flag und β_2 -flag Untereinheiten des nAChR gegen den flag-tag (Abbildung 12A, D), Calnexin (Abbildung 12B) und Syntaxin 6 (Abbildung 12E) gefärbt. Ein repräsentatives Neuron wird in Abbildung 12 gezeigt. Dort kann in der ersten Reihe (Abbildung 12A-C), wie bei Ren et al. bereits beschrieben (Ren et al., 2005), eine Ko-Lokalisation (Abbildung 12C, magenta) des $\alpha_4\beta_2$ nAChR mit dem ER-Marker Calnexin beobachtet werden. In der zweiten Reihe ist in F (gelb) zu sehen, dass der $\alpha_4\beta_2$ nAChR ebenso im Golgi-Apparat (Marker: Syntaxin 6) lokalisiert ist, wenn auch geringfügiger.

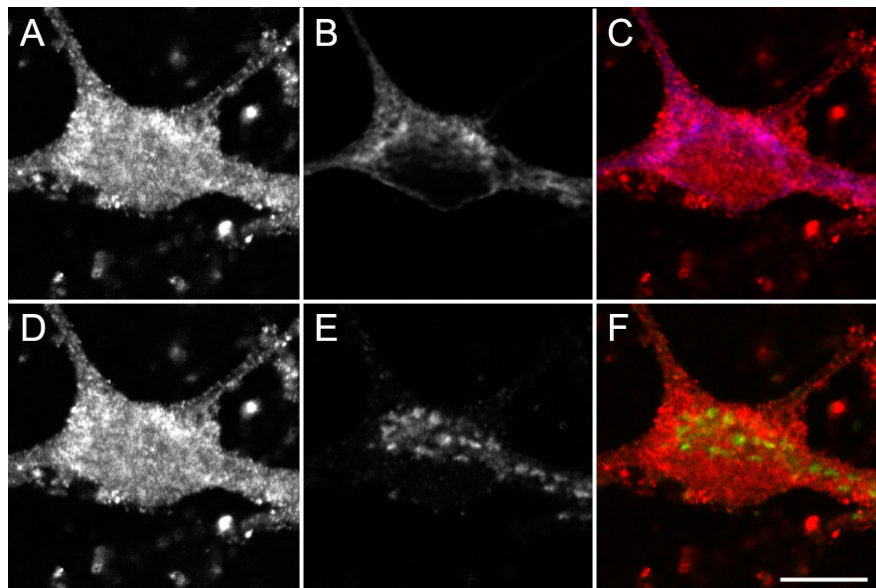


Abbildung 12. Lokalisation des $\alpha_4\beta_2$ nAChR im ER und dem Golgi-Apparat. Es erfolgte die Transfektion von primären hippocampalen Neuronen (10-14 Tage in Kultur) mit α_4 -flag und β_2 -flag über 20 h. Anschließend wurde eine Dreifach-Färbung mit Antikörpern gegen das flag-tag und gegen die spezifischen Marker Calnexin und

Syntaxin 6 für das ER und den Golgi-Apparat durchgeführt. Anhand eines repräsentativen Neurons wird zum Einen in A-C die Ko-Lokalisation (C, magenta) des $\alpha_4\beta_2$ nAChR (A) mit Calnexin (B) gezeigt. Zum Anderen ist in D-F eine schwache, aber deutliche, Ko-Lokalisation (F, gelb) von $\alpha_4\beta_2$ nAChR (D) und Syntaxin 6 (E) zu beobachten. Wurden alle drei Kanäle der unterschiedlichen Färbungen

übereinandergelegt, so konnte keine Ko-Lokalisation in Form von weißen Pixeln nachgewiesen werden (Daten hier nicht gezeigt). Der Längsbalken in F beträgt 20 μm .

4.6 Die intrazelluläre Ko-Lokalisation von VILIP-1 mit dem $\alpha_4\beta_2$ nAChR erfolgt Calcium-abhängig im Golgi-Apparat

In vorangegangenen Untersuchungen wurde getrennt von einander gezeigt, dass sowohl VILIP-1 (nach Calcium-Stimulation) als auch der $\alpha_4\beta_2$ nAChR im Golgi-Apparat lokalisiert sind. Um eine eventuelle Calcium-abhängige Interaktion von VILIP-1 mit dem $\alpha_4\beta_2$ nAChR an der Membran des Golgi-Apparates direkt darzustellen, wurde eine Dreifach-Immunfluoreszenzfärbung in hippocampalen Neuronen durchgeführt. Es wurden die transfizierten Untereinheiten α_4 -flag und β_2 -flag des nAChR zusammen mit endogen exprimiertem VILIP-1 und dem Golgi-Marker Syntaxin 6 gefärbt. In den eingefügten Vergrößerungen des im weißen Rahmen eingeschlossenen Ausschnitts sind jeweils die einzelnen Kanäle dargestellt (VILIP-1, oberes Fenster: roter Kanal; $\alpha_4\beta_2$ nAChR, mittleres Fenster: grüner Kanal; Syntaxin 6, unteres Fenster: blauer Kanal) und die Punkte der Ko-Lokalisation mit Pfeilen markiert. In einem Teil der Zellen wurde die intrazelluläre Calcium-Konzentration mittels Carbachol-Stimulation (Abbildung 13B) erhöht. Im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 13A) zeigt VILIP-1 nach Calcium-Stimulation (Abbildung 13B) die typisch vermehrte Oberflächenlokalisation und eine stärkere Ko-Lokalisation (Abbildung 13A,B; weiß, Pfeile) mit dem $\alpha_4\beta_2$ nAChR und Syntaxin 6.

das Fünffache nach Carbachol-Zugabe gezeigt werden. So waren in den Kontrollneuronen absolut 9 Ko-Lokalisationspunkte zu zählen und in der stimulierten Neuronengruppe 44 Ko-Lokalisationspunkte.

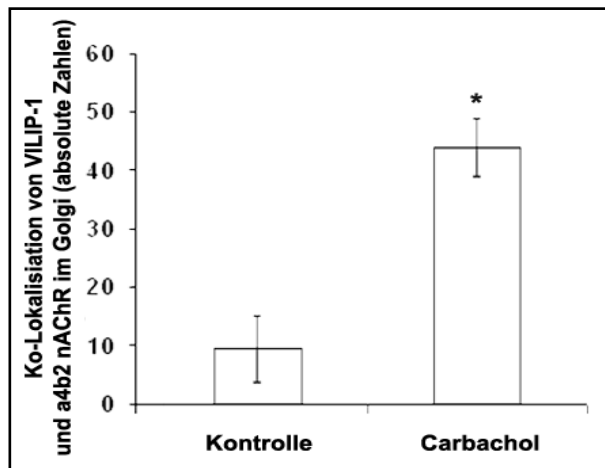


Abbildung 14. Calcium-abhängige Zunahme der Ko-Lokalisation von VILIP-1 und $\alpha_4\beta_2$ nAChR im Golgi-Apparat. Quantifizierung der weißen Pixelgruppen, die eine Ko-Lokalisation von VILIP-1 mit dem $\alpha_4\beta_2$ nAChR und dem Golgi-Marker Syntaxin 6 anzeigen. Die Auswertung einzelner hippocampaler Neuronen erfolgte mit Adobe Photoshop und ist in absoluten Zahlen dargestellt. In der Gruppe der Kontrollzellen (Abbildung 13A) wurde in geringem Maße eine Ko-Lokalisation aller drei Epitope gezählt (9). Eine signifikante Zunahme

nach Carbachol-Stimulation (Abbildung 13B) konnte mit 44 weißen Arealen der Ko-Lokalisation nachgewiesen werden. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei verschiedenen Experimenten, die jeweils zweifach ausgeführt wurden. Die Sternchen stellen die im *Student's t-test* (zweiseitig, ungepaart) ermittelte Signifikanz in Bezug auf die Kontrolle dar (* $p < 0,05$).

Die für eine Interaktion von VILIP-1 und $\alpha_4\beta_2$ nAChR notwendige Calcium-abhängige Assoziation von VILIP-1 an intrazellulären Membranen kann aufgrund der gezeigten Ergebnisse auf den Golgi-Apparat eingegrenzt werden, während das ER nur sehr unwahrscheinlich eine Rolle spielt. Des Weiteren rückt der *trans*-Golgi-Apparat in den Fokus. Das SNARE⁴⁵-Protein Syntaxin 6 ist ein Marker für den *trans*-Golgi-Apparat und ist an der Modulation von Membrantransportprozessen beteiligt (Bock et al., 1997). Eine Beteiligung an der Calcium-abhängigen Interaktion von VILIP-1 mit dem $\alpha_4\beta_2$ nAChR und der darauf folgenden Steigerung der Oberflächenexpression des Rezeptors wäre denkbar.

⁴⁵ soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor

4.7 VILIP-1-GFP moduliert durch Beeinflussung der Exozytose den Transport des nAChR $\alpha_4\beta_2$ an die Zelloberfläche von hippocampalen Neuronen

Es konnte eine Ko-Lokalisation von VILIP-1 mit dem $\alpha_4\beta_2$ nAChR im *trans*-Golgi-Apparat in vorangegangenen Experimenten gezeigt werden. Mit Hilfe von Pharmaka wurde nun in hippocampalen Neuronen getestet, inwiefern die gesteigerte Oberflächenexpression des $\alpha_4\beta_2$ nAChR auf Prozesse der Exozytose zurückzuführen ist.

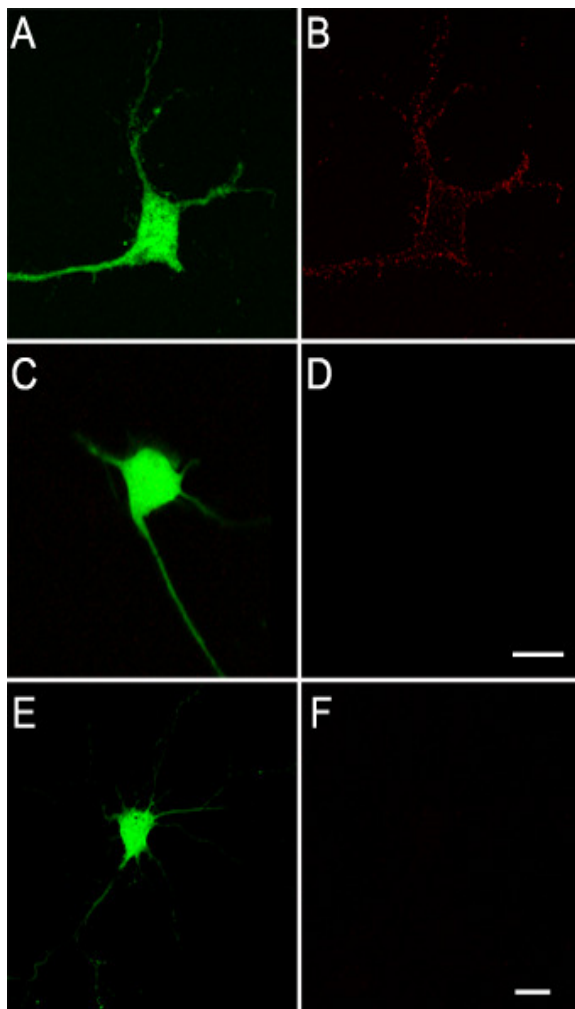


Abbildung 15. Brefeldin A und Monensin inhibieren den VILIP-1-GFP induzierten Oberflächentransport von $\alpha_4\beta_2$ nAChR. Es erfolgte eine transiente Transfektion in hippocampalen Neuronen von VILIP-1-GFP (A, C, E) und α_4 -, β_2 -flag des nAChR (B, D, F). In C, D wurde nach 20 h Expressionzeit für weitere 20 h Brefeldin A (3,5 μ M) in das Medium der Neuronen appliziert. In E, F wurde für 2 h 15 min Monensin (10 μ M) zugegeben. Die Neuronen wurden ohne einen zwischengeschalteten Waschschrift fixiert und eine Oberflächenfärbung durchgeführt. Die Kontrolle (A, B) zeigt bei Ko-Expression von VILIP-1-GFP und $\alpha_4\beta_2$ nAChR eine deutliche Oberflächenlokalisierung des Rezeptors. Bei Zugabe von Brefeldin A (C, D) und konsekutiver Zerstörung des Golgi-Apparates, bei Erhalt des ER, ist keine durch VILIP-1-GFP getriggerte nAChR-Lokalisation an der Zellmembran mehr zu beobachten. Nach Monensin-Applikation führt die Unterbindung des *trans*-Golgi-Exportes und des Recyclings ebenfalls zu einem Sistieren der VILIP-1-GFP induzierten Expression des nAChR an der Oberfläche.

Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass der Effekt von VILIP-1 auf die zunehmende Membranlokalisierung des Rezeptors über eine Regulation von Exozytoseprozessen zustande kommt. Der Längsbalken in D, F beträgt 20 μ m.

Zunächst wurde Brefeldin A, nach Transfektion mit VILIP-1-GFP und den α_4 -, β_2 -flag Untereinheiten, für 20 h appliziert und anschließend eine Oberflächenfärbung (vergleiche 4.2) durchgeführt. Brefeldin A ist ein Stoffwechselprodukt aus Pilzen (Makrolid-Antibiotikum) und führt zu einer Zerstörung des Golgi-Apparates, der dann mit

dem ER verschmilzt (Misumi et al., 1986). Abbildung 15 zeigt eine Oberflächenfärbung unter den bekannten Kontrollbedingungen mit charakteristischer Rezeptorexpression an der Zellmembran (Abbildung 15A, B). Nach Brefeldin A Exposition (Abbildung 15C, D) ist bei fehlender Permeabilisierung der Neuronen keine Expression des $\alpha_4\beta_2$ nAChR an der Zellmembran mehr nachweisbar. Da der Membrantransport des $\alpha_4\beta_2$ nAChR nach Zerstörung des Golgi-Apparates, bei erhaltenem ER, zum Erliegen kommt, ist anzunehmen, dass VILIP-1 den Transport des Rezeptors zur Zelloberfläche im Golgi-Apparat induziert. Damit bestätigt das pharmakologische Experiment eine funktionelle Bedeutung der in Abbildung 14 belegten Ko-Lokalisation von VILIP-1 und dem $\alpha_4\beta_2$ nAChR im Golgi-Apparat.

Zur Kontrolle wurden entsprechende endogene Färbungen in HEK 293 Zellen mit den spezifischen Markern Syntaxin 6 (Golgi-Apparat, Abbildung 16B, E) und Calnexin (ER, Abbildung 16A, D) angefertigt. Das in Abbildung 16 gezeigte Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Marian Brackmann durchgeführt. Es konnte 20 h nach Zugabe von Brefeldin A eine Fusion, in Form einer Ko-Lokalisation beider Marker (Abbildung 16F), im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 16C), festgestellt werden. Dieses Resultat entspricht den bereits publizierten Daten in tsA201 Zellen (Ren et al., 2005).

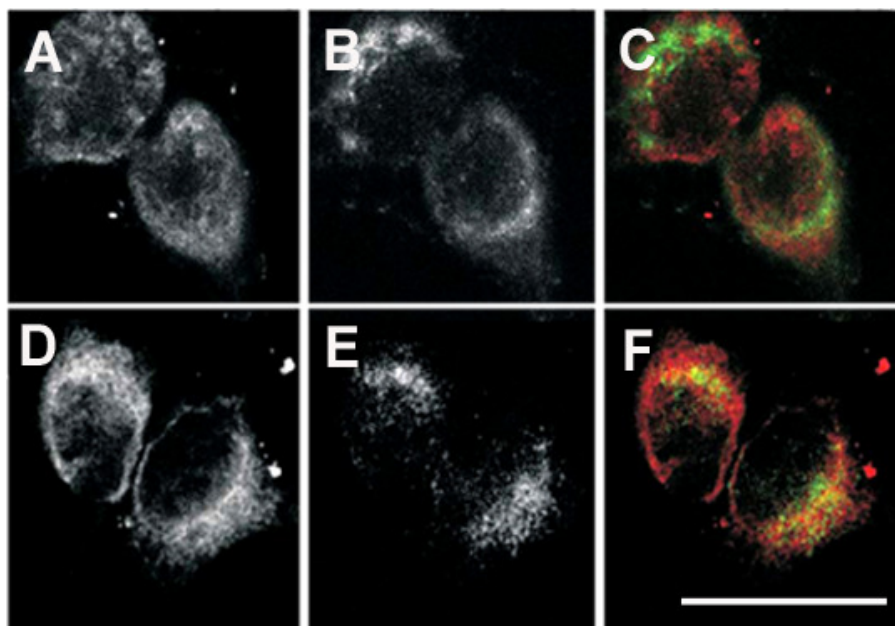


Abbildung 16. Brefeldin A zerstört den Golgi-Apparat und es kommt zur Fusion mit dem ER. HEK 293 Zellen wurden entweder 20 h nach Applikation von Brefeldin A (D-F) oder unbehandelt (A-C) fixiert und gegen die spezifischen Marker Syntaxin 6 (Golgi-Apparat) (B, E) und Calnexin (ER) (A, D) gefärbt. In der Kontrolle ist keine Ko-

Lokalisation beider Kompartimente (C, Syntaxin 6 grün, Calnexin rot) zu beobachten. Hingegen 20 h nach Zugabe von Brefeldin A ist die Struktur des Golgi (E) nicht mehr nachzuvollziehen und es erfolgt eine weitestgehende Verschmelzung mit dem ER (F, gelb). Der Längenbalken in F beträgt 20 μm .

Zudem wurde eine Oberflächenfärbung mit Monensin (Abbildung 15E, F) in der gleichen Weise durchgeführt. Monensin ist ein Natrium-Ionophor, das in endosomalen Kompartimenten die notwendige Ansäuerung verhindert und somit die Funktion unter anderem in *post*-Golgi-Transportkompartimenten und von Recyclingprozessen unterbindet (Tartakoff, 1983). Es ist bekannt, dass Monensin verschiedene VILIP-1-abhängige Transportvorgänge zu inhibieren vermag (Brackmann et al., 2005). In dem hier gezeigten Versuch wurde Monensin für 2 h 15 min appliziert. Im Anschluss daran war zu sehen, dass trotz Ko-Expression mit VILIP-1-GFP (Abbildung 15E) der $\alpha_4\beta_2$ nAChR (Abbildung 15F) nicht mehr zur Zellmembran transportiert wird. Zuvor konnte gezeigt werden, dass das unter anderem im *trans*-Golgi vorkommende SNARE-Protein Syntaxin 6 mit den beiden Interaktionspartnern VILIP-1 und $\alpha_4\beta_2$ nAChR ko-lokalisiert. Führt eine pharmakologische Hemmung der *trans*-Golgi Freisetzung zur Unterbindung des VILIP-1 Effektes auf den Rezeptor, festigt dies die Annahme, dass VILIP-1 einen Einfluss auf Exozytoseprozesse besitzt und auf dieser Ebene die Expression des $\alpha_4\beta_2$ nAChR moduliert.

4.8 VILIP-1 ist mit dem $\alpha_4\beta_2$ nAChR in Interneuronen ko-exprimiert

In Gehirnen von verstorbenen Schizophreniepatienten wurde eine veränderte VILIP-1-Expression im Hippokampus festgestellt. Aus der Literatur ist bekannt, dass einige Pathomechanismen der Schizophrenie zelltypspezifisch sind. Die untersuchten Hippokampi zeigten eine verschobene Expression von VILIP-1, so lag dort eine erhöhte Immunreaktivität in Interneuronen vor und eine verminderte in Pyramidenzellen (Bernstein et al., 2002). In hippokampalen Interneuronen nachgewiesen wurde auch der $\alpha_4\beta_2$ nAChR, der dort die GABA-Freisetzung moduliert (Albuquerque et al., 2000). Allerdings ist die Rolle des Rezeptors in der Entstehung und Ausprägung der Schizophrenie weitestgehend unklar, es wird jedoch eine Beteiligung angenommen (siehe 1.5.2.2). Aufgrund dieser Daten wurde eine mögliche Interaktion von VILIP-1 und dem $\alpha_4\beta_2$ nAChR speziell in Interneuronen untersucht. Es erfolgte eine Dreifach-Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung von VILIP-1 (Abbildung 17D) und der α_4 -Untereinheit (Abbildung 17B), die jeweils in der hippokampalen Neuronenkultur endogen exprimiert werden. Zur Identifizierung der Interneuronen wurde der spezifische Interneuronmarker Glutamatdecarboxylase (GAD-65) (Abbildung 17C) verwendet. Abbildung 17A zeigt vergrößert die übereinander gelegten, farbig codierten Kanäle.

Weiß erscheinen die Zellen (Pfeile), die gegen jeden der drei Antikörper immunreaktiv waren. Das heißt es handelt sich um Interneuronen, die sowohl VILIP-1 als auch $\alpha_4\beta_2$ nAChR exprimieren.

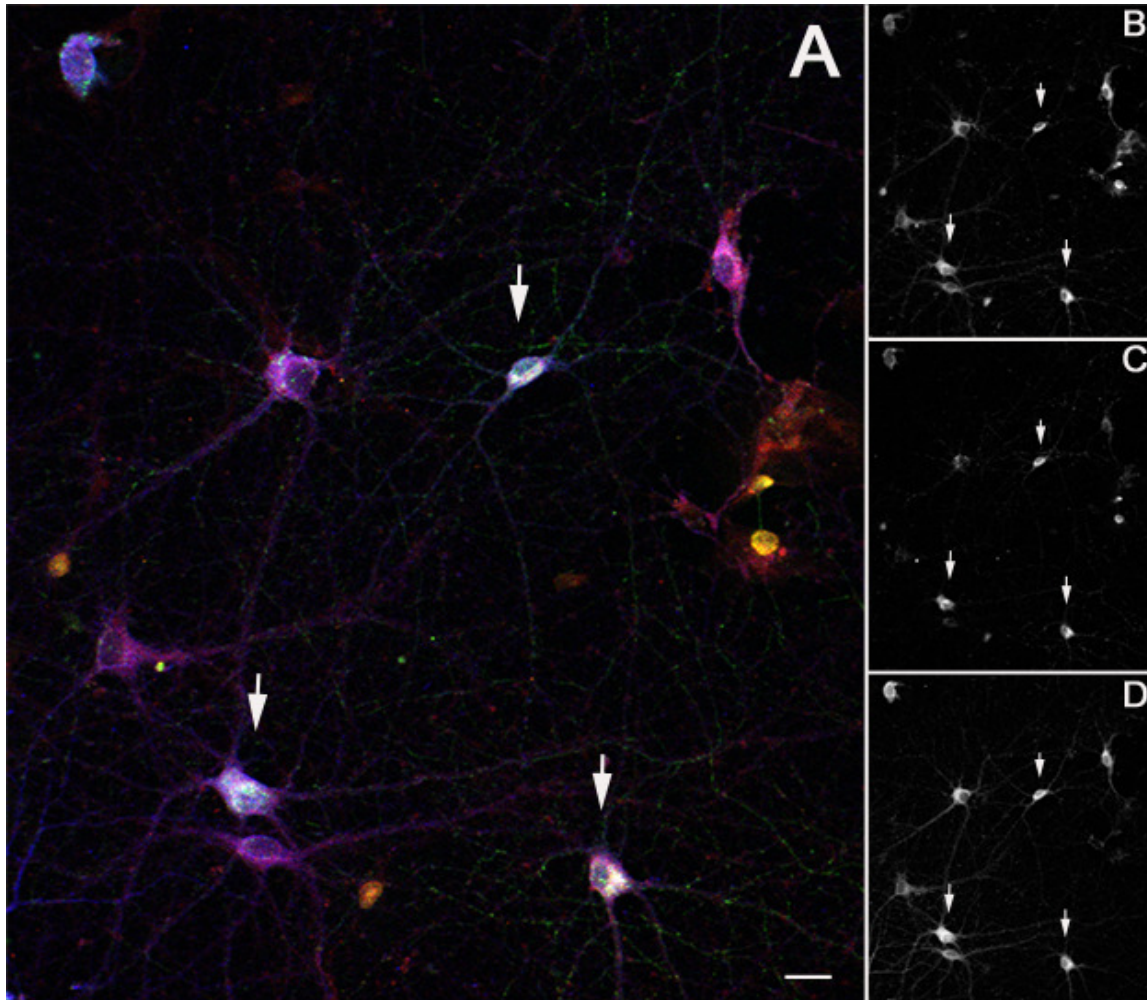


Abbildung 17. Nachweis von VILIP-1 und $\alpha_4\beta_2$ nAChR in Interneuronen der hippocampalen Neuronenkultur. Auf die Kultivierung primärer hippocampaler Neuronen über 14 Tage folgte die Fixierung und Permeabilisierung der Neuronen. Die anschließende Antikörperfärbung richtete sich gegen den spezifischen Interneuronmarker GAD-65 (C) und die endogen exprimierten Proteine VILIP-1 (D) und α_4 (Klon 299, B). A stellt eine repräsentative Übersicht der gefärbten Neuronenkultur dar. Es handelt sich um eine Ansicht aller drei übereinander gelegten Kanäle. Die Pfeile markieren Interneuronen (weiß), die VILIP-1 und auch die α_4 -Untereinheit des $\alpha_4\beta_2$ nAChR exprimieren. In den nebenstehenden Verkleinerungen sind die einzelnen Kanäle in Graustufen dargestellt. Der Längsbalken in A beträgt 20 μm .

In Abbildung 18 wird die Ko-Lokalisation von VILIP-1 (grün) und der α_4 -Untereinheit (rot) in der vergrößerten Darstellung eines ausgewählten Interneurons näher charakterisiert.

Auch hier ist eine Ko-Expression (gelb) beider Proteine sowohl subzellulär als auch an der Zellmembran zu beobachten. Ein handelt sich um ein ähnliches Expressionsmuster wie in Pyramidenzellen (vergleiche Abbildung 10).

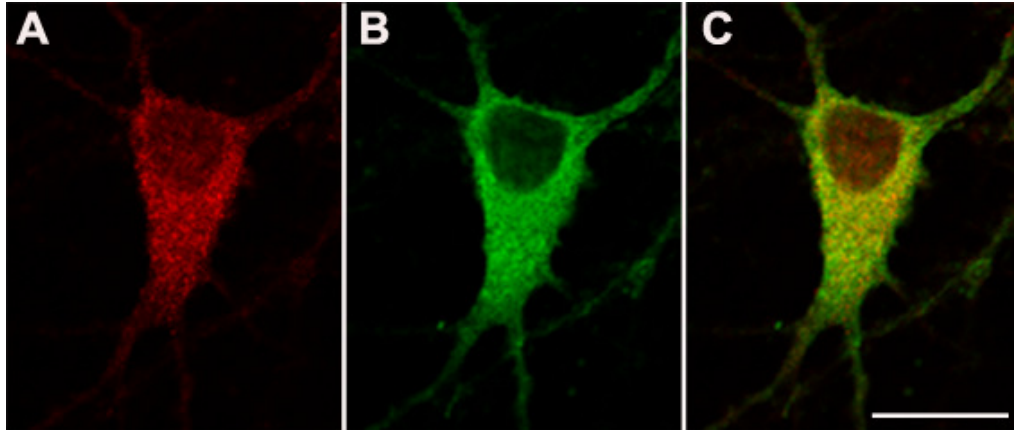


Abbildung 18. Interneuronen zeigen Ko-Expression von VILIP-1 und $\alpha_4\beta_2$ nAChR. Ein repräsentatives GAD-65-positives Interneuron aus den Immunfluoreszenzfärbungen der Abbildung 17 ist hier in der Vergrößerung dargestellt. Der rote Kanal (A) repräsentiert die α_4 -Untereinheit (Klon 299) des $\alpha_4\beta_2$ nAChR, der grüne Kanal (B) zeigt VILIP-1. In der übereinandergelegten Ansicht (C) erscheinen Orte der Ko-Lokalisation als gelbe Pixel. Eine gemeinsame Expression des Rezeptors und VILIP-1 besteht sowohl an intrazellulären Membranen (vereinbar mit dem Golgi-Apparat) als auch an der Zellmembran. Der Längsbalken in C beträgt 20 μm .

Die quantitative Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen ist in Abbildung 19 dargestellt. In der verwendeten primären hippocampalen Neuronenkultur werden 20% der Zellen durch Interneuronen repräsentiert (Spilker et al., 2002a, Gierke et al., 2008). In der GAD-65-positiven Interneuronpopulation (entspricht 100%) exprimieren 52% der Zellen VILIP-1. Zu einem hohen Prozentsatz (90%) ist der $\alpha_4\beta_2$ nAChR in Interneuronen immunreaktiv. Eine gemeinsame Expression von VILIP-1 mit dem Rezeptor liegt in 48% der Fälle vor. Diese Zahlen lassen vermuten, dass, wenn Interneuronen VILIP-1-positiv sind, gleichzeitig auch eine Expression des $\alpha_4\beta_2$ nAChR besteht. Diese Ko-Expression stellt die Voraussetzung für weitere Untersuchungen bezüglich der Interaktion von VILIP-1 und $\alpha_4\beta_2$ nAChR in Interneuronen im Rahmen der Schizophrenie-Pathophysiologie dar.

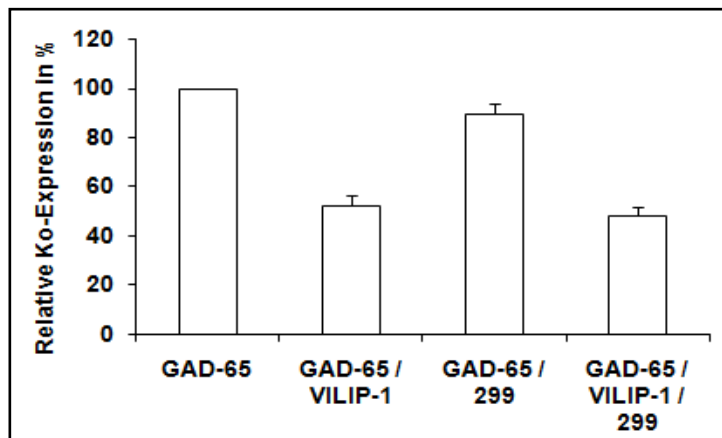


Abbildung 19. GAD-65-positive Interneuronen exprimieren VILIP-1 und $\alpha_4\beta_2$ nAChR. Das Diagramm stellt die Quantifizierung des in Abbildung 17 gezeigten Experimentes dar. 20% der Zellen in der hippocampalen Neuronenkultur sind GAD-65-positive Interneuronen. Ihre Anzahl wurde als 100%-Marke gesetzt. Die Mehrheit der Interneuronen (90%) exprimiert die α_4 -

Untereinheit des nAChR (GAD-65/299). Eine endogene VILIP-1-Expression findet sich in 52% der Interneuronen (GAD-65/VILIP-1). Der gemeinsame Nachweis von VILIP-1 und der Rezeptoruntereinheit liegt mit 48% im Bereich der Anzahl der Interneuronen, die überhaupt VILIP-1 exprimieren (GAD-65/VILIP-1/299). Dies deutet darauf hin, dass in den VILIP-1-positiven Interneuronen gleichzeitig auch der $\alpha_4\beta_2$ nAChR exprimiert wird. Im Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens drei verschiedenen Experimenten dargestellt, die jeweils doppelt ausgeführt wurden.

5 Ergänzende Ergebnisse aus gemeinsamen Publikationen

Die hier aufgeführten Daten wurden in unserer Arbeitsgruppe erhoben und stehen in engem inhaltlichen Zusammenhang mit den im Ergebnisteil (4) beschriebenen Experimenten. Sie sind Teil zweier gemeinsamer Publikationen (Gierke et al., 2008, Zhao et al., 2008b). Erst im Kontext mit unten beschriebenen elektrophysiologischen und biochemischen Daten ist es möglich, die funktionelle Bedeutung der in dieser Dissertation vorgestellten Ergebnisse zu erläutern und zu diskutieren.

5.1 VILIP-1 induziert eine funktionelle Hochregulierung des $\alpha_4\beta_2$ nAChR

Auf elektrophysiologischer Ebene führte VILIP-1 zur funktionellen Hochregulierung des $\alpha_4\beta_2$ nAChR. VILIP-1 überexprimierende Neuronen zeigten bei ACh-Applikation eine Reizantwort mit signifikant höherer Amplitude als die Kontrollneuronen (Abbildung 20) (Zhao et al., 2008b).

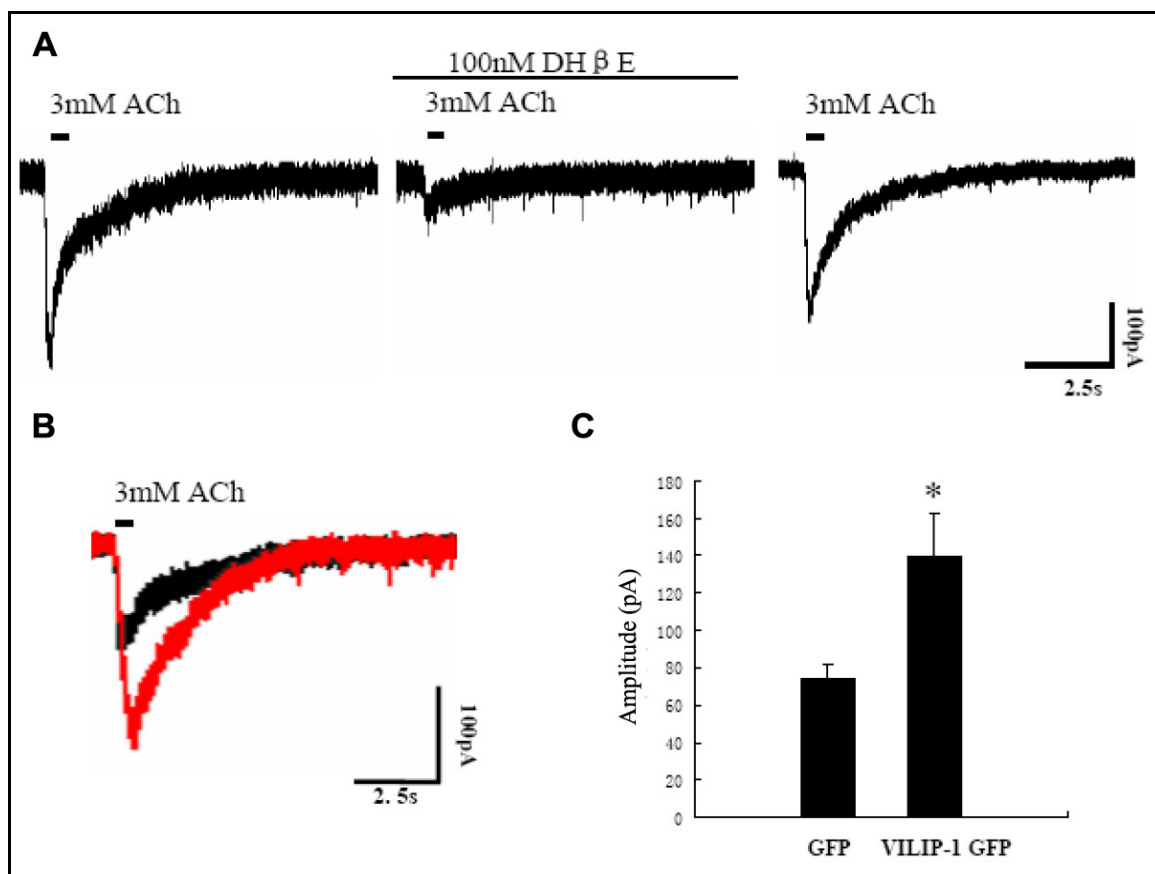


Abbildung 20. Potenzierung der ACh-induzierten Ströme in hippocampalen Neuronen nach VILIP-1-Überexpression. Modifiziert nach Zhao et al., 2008b. Die patch-clamp-Ganzzellableitung in

hippokampalen Neuronen erfolgte nach maximal 14 Tagen Kultivierung. A zeigt die durch 3 mM ACh-Applikation evozierten Ströme (A/s), die in einem repräsentativen Neuron abgeleitet wurden. Durch den nAChR-Antagonisten Dihydro- β -erythroidin (DH β E; 100 nM) können diese gehemmt werden. Nach Auswaschen des Antagonisten lassen sich die Ströme zum Teil wieder evozieren. B zeigt ACh-induzierte Ströme nach transienter Transfektion (48 h) mit GFP (schwarze Spur) oder VILIP-1-GFP (rote Spur). Nach VILIP-1-Transfektion kommt es zu einer deutlichen Zunahme der maximalen Strom-Amplitude. Die Quantifizierung der Strom-Amplituden (C) zeigt eine signifikante Zunahme nach VILIP-1-GFP-Überexpression. Im Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei beziehungsweise zwei verschiedenen Experimenten (GFP: n=14; VILIP-1-GFP: n=13) dargestellt. Das Sternchen stellt die im *Student's t-test* (zweiseitig, ungepaart) ermittelte Signifikanz in Bezug auf die Kontrolle dar (* p<0,05). Weitere Informationen über die Methoden und Materialien siehe Zhao et al., 2008b.

Diese Daten werden unterstützt durch patch-clamp-Ganzzellaufnahme nach Inhibierung der VILIP-1-Genexpression. Durch Transfektion von siRNA⁴⁶, die sich gegen VILIP-1 richtet, wurde die Genexpression des Proteins fast vollständig inhibiert⁴⁷. Die Ableitung der Reizantwort nach ACh-Applikation zeigte eine signifikante Reduktion der evozierten Strom-Amplitude (Daten hier nicht gezeigt) (Zhao et al., 2008b)⁴⁸.

In den Abbildungen 17, 18 und 19 wird die Interaktion von VILIP-1 mit dem $\alpha_4\beta_2$ nAChR speziell in hippocampalen Interneuronen nachgewiesen. Ein funktioneller Effekt dieser Interaktion ergibt sich aus den in Abbildung 21 dargestellten elektrophysiologischen Daten. In der gemischten hippocampalen Neuronenkultur (mit einem Anteil von 20% GAD-positiven Interneuronen) wiesen Pyramidenzellen in enger Nachbarschaft von VILIP-1-GFP-exprimierenden Interneuronen eine signifikant erhöhte ACh-induzierte Frequenz inhibitorischer postsynaptischer Ströme (IPSC⁴⁹) im Vergleich zu GFP-exprimierenden Interneuronen auf (Gierke et al., 2008). Aufgrund der immunzytochemisch nachgewiesenen Interaktion von VILIP-1 und $\alpha_4\beta_2$ nAChR in

⁴⁶ *small interfering ribonucleinacid*

⁴⁷ Durch den sogenannten Mechanismus der RNA-Interferenz kommt es nach Transfektion der siRNA in die Zelle zur Degradierung der mRNA (*messenger RNA*) des Zielgenes und damit zu einer reduzierten Expression des Genproduktes (Tuschl 2001).

⁴⁸ Es erfolgte eine Ko-Transfektion der siRNA mit den α_4 -flag und β_2 -flag Untereinheiten des nAChR.

⁴⁹ *inhibitory postsynaptic currents*

Interneuronen ist anzunehmen, dass VILIP-1 über eine funktionelle Hochregulation des $\alpha_4\beta_2$ nAChR zu einer Verstärkung der IPSC in Pyramidenzellen führt.

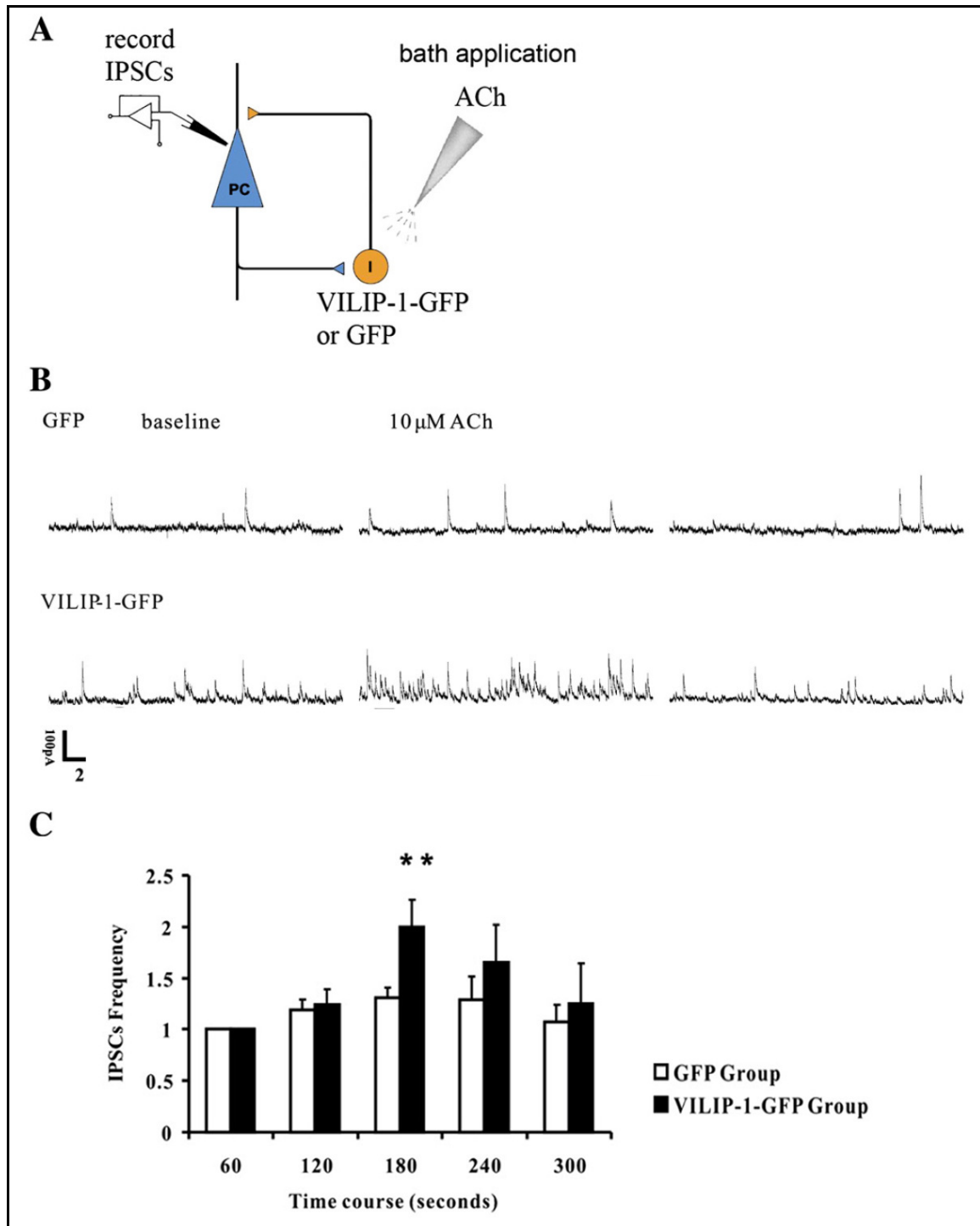


Abbildung 21. VILIP-1 verstärkt ACh-induzierte IPSC in hippocampalen Neuronen. Modifiziert nach Gierke et al., 2008. A illustriert das durchgeführte Experiment mittels patch-clamp-Ganzzellableitung in der hippocampalen Neuronenkultur. Nach Applikation von 10 μ M ACh erfolgt die Ableitung an einem pyramidalen Neuron, das sich in enger Nachbarschaft zu einem GFP- beziehungsweise VILIP-1-GFP-positiven Interneuron befindet. Es wird angenommen, dass während der Ableitung eine synaptische

Verbindung der Neuronen besteht. Die patch-clamp-Ganzzelleableitung in hippocampalen Neuronen erfolgte nach 10-14 Tagen Kultivierung und transienter Transfektion über weitere 5-6 Tage mit GFP oder VILIP-1-GFP. B zeigt die durch 10 μM ACh-Applikation evozierten IPSC (Ampere pro Sekunde) einer repräsentativen Pyramidenzelle bei benachbartem GFP- (oben) beziehungsweise VILIP-1-GFP-positiven Interneuron (unten). Die Nachbarschaft eines VILIP-1-GFP-positiven Interneurons bewirkt eine deutliche Zunahme der IPSC im Vergleich zur GFP-Kontrolle. Dass die evozierten IPSC ACh-vermittelt sind, wird gezeigt durch den Rückgang der IPSC-Frequenz auf baseline-Niveau nach Auswaschen des ACh. Die Quantifizierung der IPSC-Frequenz (C) zeigt eine signifikante Zunahme nach VILIP-1-GFP-Überexpression. Das Sternchen stellt die im *Student's t-test* (zweiseitig, ungepaart) ermittelte Signifikanz in Bezug auf die Kontrolle dar (** $p < 0,01$). Weitere Informationen über die Methoden und Materialien siehe Gierke et al., 2008.

5.2 VILIP-1 vermittelt eine gesteigerte Exozytose des $\alpha_4\beta_2$ nAChR

Mit Hilfe biochemischer Experimente konnte der Einfluss von VILIP-1 auf Transportprozesse des $\alpha_4\beta_2$ nAChR näher bestimmt werden. So zeigte sich, dass VILIP-1 die Exozytose des Rezeptors an die Zelloberfläche begünstigt (Zhao et al., 2008b).

Die Durchführung eines Biotinylierungs-Assay ermöglicht die Darstellung der an die Zelloberfläche gebundenen Proteine. Dafür wurden HEK 293 Zellen mit VILIP-1 beziehungsweise einem Leervektor transient transfiziert. Nach 48 h zeigte sich eine vergleichbare Gesamtmenge an Rezeptoren in den Zellen (Abbildung 22A, links), jedoch eine deutlich höhere Repräsentanz des Rezeptors an der Zellmembran bei VILIP-1-Überexpression mit einer Zunahme um 50% im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 22A, Mitte und B). Die Bestimmung der relativen Exozytose erfolgte nach enzymatischer Verdauung aller Oberflächenproteine. In einem Zeitintervall von 10 min wurde die (wieder) zunehmende Oberflächenexpression des $\alpha_4\beta_2$ nAChR gemessen (Abbildung 22A, rechts). Es konnte eine zweieinhalbfache Steigerung der (relativen) Exozytose des $\alpha_4\beta_2$ nAChR bei VILIP-1 Ko-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden (Abbildung 22C).

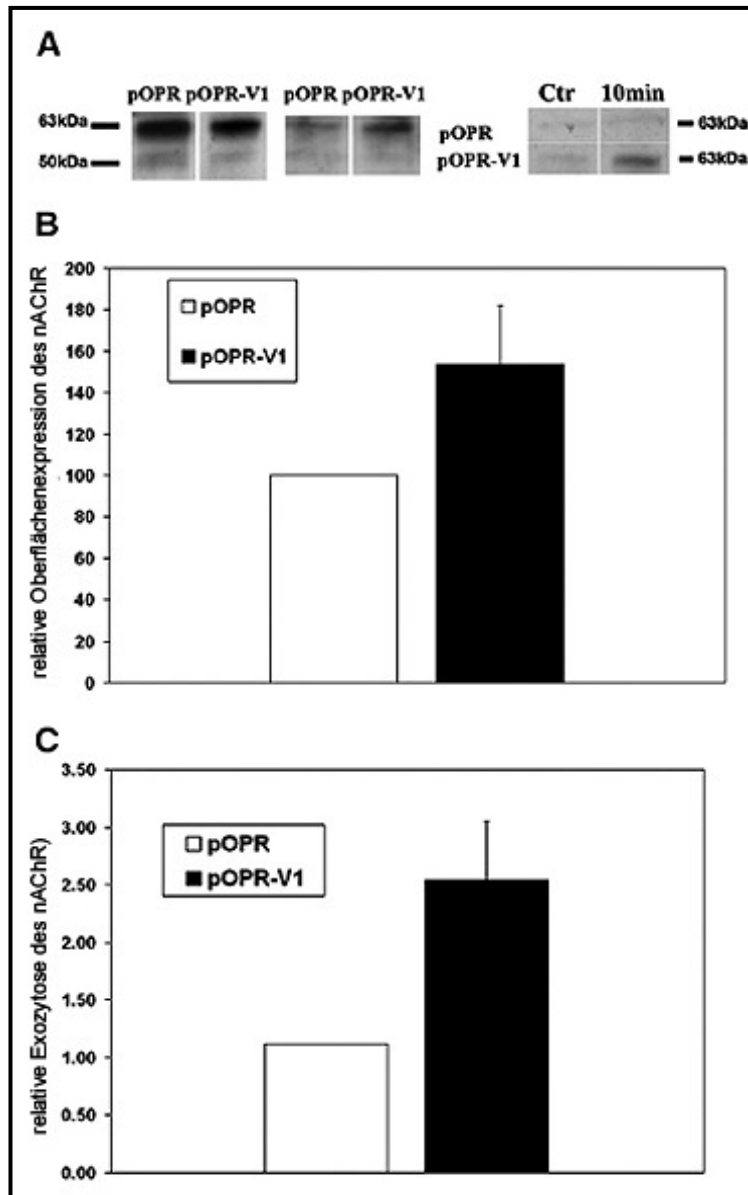


Abbildung 22. VILIP-1 induziert die Exozytose des $\alpha_4\beta_2$ nAChR HEK 293 Zellen wurden mit VILIP-1 (beziehungsweise Kontrollvektor) sowie den α_4 - und β_2 -Untereinheiten des nAChR transient transfiziert. Nach 48 h wurden die Kulturen auf 4° gekühlt, um die Zellaktivität zu stoppen und mit Biotin⁵⁰ versetzt. Die biotinylierten Proteine repräsentieren so den *status quo* aller vorhandenen Oberflächenproteine zum Zeitpunkt der Biotin-Applikation (A, Mitte). Anschließend wurden die Zellen gesammelt, lysiert und die Proteine extrahiert. Zur Kontrolle wurde die Gesamtmenge des $\alpha_4\beta_2$ nAChR bestimmt, in dem die Zellen zuerst lysiert und dann biotinyliert wurden. Es zeigen sich gleiche Ausgangswerte an „verfügbaren“ Rezeptoren in den Zellen nach VILIP-1-Überexpression *versus* Kontrolle (A, links). Aus den gewonnenen Lysaten wurden gleiche Mengen an Proteinen mit Streptavidin-beschichteten Perlen versetzt. Die hohe Affinität des Biotins zu Streptavidin

ermöglicht die Isolierung der biotinylierten Proteine in mehreren Waschschritten. Danach wurden die biotinylierten Proteine wieder von den Perlen extrahiert und mit Hilfe einer SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt (um 55 beziehungsweise 70 kDa für die α_4 - und β_2 -Untereinheiten). Die Proteingele wurden anschließend geblottet und mit *anti-flag* Antikörpern zum Nachweis des $\alpha_4\beta_2$ nAChR gefärbt. Nach Inkubation mit dem Peroxydase-gekoppelten Zweitantikörper erfolgte die Detektion mittels ECL-System. Durch das Umsetzen des Peroxydase-Substrates (ECL) erfolgt die Emission von Chemilumineszenz, die durch Exposition auf einen lichtempfindlichen Film sichtbar wird. B zeigt die quantitative (densitometrische) Auswertung der Rezeptoren, die nach einer Expressionszeit (VILIP-1 beziehungsweise Kontrollvektor) von 48 h an der Zelloberfläche vorliegen. VILIP-1 (schwarzer Balken) führt im Vergleich zur Kontrolle (weißer Balken) zu einer um 50% gesteigerten Rezeptormenge an der Zellmembran. A,

⁵⁰ Sulfosuccinimidyl 2-(biotinamido)-ethyl-1, 3-dithiopropionat (Sulfo-NHS-SS-Biotin); verwendete Konzentration: 0,15 mg / ml

rechts Um die Exozytose des $\alpha_4\beta_2$ nAChR zeitabhängig zu quantifizieren, wurden zunächst alle Oberflächenproteine enzymatisch mit Trypsin verdaut. Die dann zeitabhängig (wieder) zunehmende Oberflächenexpression des $\alpha_4\beta_2$ nAChR wurde durch Biotinylierung nach null und zehn Minuten gemessen. C Die densitometrische Auswertung zeigt bei VILIP-1 Ko-Expression (schwarzer Balken) eine zweieinhalbfache Steigerung der erneuten Expression an der Zellmembran, das heisst der (relativen) Exozytose des $\alpha_4\beta_2$ nAChR im Vergleich zur Kontrollgruppe (weißer Balken). Für die quantitativen Auswertungen (B,C) konnte keine Signifikanz ($p < 0,05$) im *Student's t-test* (zweiseitig, ungepaart) in Bezug auf die Kontrolle erreicht werden. Weitere Informationen über die Methoden und Materialien siehe Zhao et al., 2008b.

6 Diskussion

6.1 Immunzytochemie

Die vorliegende Arbeit widmet sich dem Nachweis spezieller Protein-Protein-Interaktionen und der Charakterisierung der Calcium-abhängigen subzellulären Translokation von VILIP-1 (Interaktionen und Transportmechanismen) mittels immunzytochemischer Färbungen (4). Mit Hilfe von Falschfarbendarstellungen wird überprüft, ob eine Ko-Lokalisation der Epitope vorliegt. Ist dies der Fall, wird die enge räumliche Nähe als Interaktion zweier Proteine interpretiert. Die hier näher untersuchte Interaktion von $\alpha_4\beta_2$ nAChR mit seinem Bindungspartner VILIP-1 wurde zuvor auch durch Ko-Immunpräzipitation in tsA201-Zellen charakterisiert (Abbildung 5) (Lin et al., 2002b).

Ein wesentliches Ergebnis dieser Arbeit ist es, dass VILIP-1 in hippokampalen Neuronen zu einer Translokation von $\alpha_4\beta_2$ nAChR an die Zellmembran führt. Dieser Nachweis und der Versuch den Mechanismus dahinter darzustellen, erfolgte ausschließlich anhand immunzytochemischer Untersuchungen.

Die näher untersuchten Proteine VILIP-1 und $\alpha_4\beta_2$ nAChR werden in hippokampalen Neuronen endogen exprimiert. Dennoch erfolgte in den hier vorgestellten Experimenten häufig eine transiente Transfektion der cDNA dieser Proteine, um die putativen Effekte zu verdeutlichen. Bezüglich der α_4 - und β_2 -Untereinheiten des nAChR konnte für die Untersuchung in pyramidalen Neuronen auf eine transiente Transfektion grundsätzlich nicht verzichtet werden, denn die Färbung der endogenen Rezeptor-Untereinheiten genügte nicht zur adäquaten Darstellung der Oberflächen- und subzellulären Verteilung. Die Überexpression des $\alpha_4\beta_2$ nAChR entsprach dem Bild der Normalverteilung des endogenen Rezeptors, allerdings mit einer erhöhten Intensität des Signals. Lediglich zum Nachweis der endogenen Expression von VILIP-1 und $\alpha_4\beta_2$ nAChR (in Interneuronen) wurden die Rezeptoruntereinheiten mit entsprechenden Antikörpern direkt angefärbt (Abbildungen 18 und 19). Für die Auswertung dieser Experimente wurde mit Übersichtsdarstellungen gearbeitet. Da die geringere Vergrößerung des Objektivs mit einer größeren Lichtstärke einhergeht, war die Darstellung der endogenen $\alpha_4\beta_2$ nAChR zufriedenstellend. Außerdem erforderte das Ziel, die (GAD-65-

immunreaktive) Interneuron-Population näher zu charakterisieren, den Nachweis endogen exprimierter Rezeptoren.

Zur erleichterten Identifizierung der $\alpha_4\beta_2$ nAChR überexprimierenden Neuronen und um den Effekt von VILIP-1 besser beurteilen zu können, wurde VILIP-1 für die Durchführung von Oberflächenfärbungen transient transfiziert.

Für die Transfektion der α_4 - und β_2 -Untereinheiten des nAChR sowie von VILIP-1 wurde „getaggte“ cDNA verwendet, bei der ein zusätzliches Peptid exprimiert wird, für das ein Antikörper existiert. Wird cDNA eines oder beider Proteine in der Zelle zur Verdeutlichung überexprimiert, kann ein Antikörper, der sich direkt gegen das Protein richtet, nicht zwischen endogenem und transfiziertem Antigen unterscheiden. Daher fiel die Wahl auf getaggte cDNA. Dabei erfolgt eine spezifische Antikörperfärbung des tag-Epitopes, das an dem transfizierten Protein exprimiert wird (α_4 - und β_2 -flag-Oktapeptid). Eine andere Möglichkeit besteht darin das zu transfizierende Protein direkt mit einem fluoreszierenden Protein zu koppeln (VILIP-1-GFP), so dass keine Antikörper-Färbung mehr notwendig ist. Der endogene Protein-Pool wird bei diesem Vorgehen nicht repräsentiert.

Durch die Methode der Oberflächenfärbung werden nur die Rezeptoren sichtbar, die in der Zellmembran lokalisiert sind. Ist kein nachweisbarer Anteil an Rezeptoren in die Zellmembran eingebaut, ist kein Signal⁵¹ mit dem Mikroskop detektierbar. Es ist dann nicht möglich abzuschätzen, ob das Neuron α_4 - und β_2 -flag cDNA exprimiert. Um diese Frage zu klären, wurden zur Kontrolle einige Kulturen permeabilisiert und dann entsprechend gefärbt. Es zeigte sich eine regelrechte Verteilung des $\alpha_4\beta_2$ nAChR in allen Zellen, die ebenfalls VILIP-1-GFP beziehungsweise nur GFP exprimierten (für HEK 293 Zellen siehe Abbildung 6, für Neuronen werden die Daten hier nicht gezeigt).

Die hohe Rate der Ko-Expression des $\alpha_4\beta_2$ nAChR und VILIP-1-GFP beziehungsweise GFP kann durch die Transfektionsmethode der Lipofektion erklärt werden (Felgner et al., 1987). Die dazu verwendete liposomenhaltige Reagenz bildet mit der zugegebenen cDNA spontan Komplexe. Werden unterschiedliche Vektoren gleichzeitig pipettiert, gelangen diese dadurch in räumliche Nähe zueinander und werden von Liposomen umschlossen. Diese Komplexe fusionieren mit der Zellmembran und schleusen ihren

⁵¹ Ein eventuelles Signal kann nicht vom unspezifisch gefärbten Hintergrund abgegrenzt werden.

Inhalt in der Zelle. Mehrere cDNA-Vektoren werden so gemeinsam internalisiert. Das heißt, ist eine Zelle (VILIP-1-)GFP-immunreaktiv, ist anzunehmen, dass in dieser α_4 - und β_2 -flag erfolgreich ko-transfiziert wurden.

Eine gezielte endogene Färbung von VILIP-1 erfolgte bei Experimenten, die die subzelluläre Lokalisation untersuchten. Denn die Auswertung dieser Experimente bedurfte einer großen Auflösung, das heißt einer differenzierten Darstellung der VILIP-1-Proteine. GFP ist ein vergleichsweise großes Protein (Prasher et al., 1992), das für diese Versuche die VILIP-1-Expression zu grob und unscharf widerspiegelt. Deshalb wurde ein für VILIP-1 hoch spezifischer Antikörper eingesetzt (vergleiche Tabelle 7). Gegenüber einer Auswahl anderer NCS-Proteine⁵² mit hoher Homologie zu VILIP-1 zeigte dieser Antikörper keine Kreuzreaktionen (Spilker et al., 2002a).

6.2 VILIP-1-Expression in der Hippokampusformation

VILIP-1 wurde in Hirngeweben verschiedener Spezies nachgewiesen⁵³. In den hier durchgeführten Experimenten wurde mit primären hippocampalen Rattenneuronen gearbeitet. Im Rattenhippocampus wird VILIP-1 ubiquitär exprimiert, in Prinzipal- und Interneuronen⁵⁴. Allerdings zeigten sich deutliche Unterschiede in der Stärke der Immunreaktivität bezogen auf die verschiedenen Neuronenpopulationen des Hippokampus. Während in Prinzipalzellen für VILIP-1 ein mäßiges Vorkommen nachgewiesen wurde, konnte in Interneuronen eine stärkere Immunreaktivität gezeigt werden (Zhao und Braunewell, 2008). Dies lässt vermuten, dass die funktionelle Bedeutung von VILIP-1 populationspezifisch variiert.

VILIP-1 ko-lokalisiert mit $\alpha_4\beta_2$ nAChR in der CA1- und DG-Region des Hippokampus, die anatomisch und funktionell eine elementare Bedeutung inne haben (Kesner et al., 2004, Zhao und Braunewell, 2008). Vor allem die Ko-Lokalisation in der CA1-Region

⁵² Diese Proteine sind VILIP-2, VILIP-3, und Hippocalcin. Eine Kreuzreaktivität mit NCS-Proteinen geringerer Homologie (Neurocalcin, NCS-1) erscheint daher ebenfalls unwahrscheinlich.

⁵³ Ratte (Kuno et al., 1992), Huhn (Lenz et al., 1992), Maus (Lenz et al., 1996), Mensch (Bernstein et al., 1999)

⁵⁴ Das Verteilungsmuster ist im Vergleich zum Huhn (erstmalige Isolierung von VILIP-1 (Lenz et al., 1992)) sehr ähnlich.

weist auf einen funktionell relevanten Einfluss der Interaktion beider Proteine hin (Zhao und Braunewell, 2008). Neuronen, die die Ko-Immunreaktivität zeigten, waren mehrheitlich Interneuronen. Diese Beobachtung unterstützt vorangegangene elektrophysiologische Daten, die die Expression funktioneller nAChR vor allem in Interneuronen beschrieben (Albuquerque et al., 2000, Alkondon et al., 2000). Aufgrund dessen ist die in dieser Arbeit begonnene populationsspezifische Untersuchung der Interaktion in weiteren Arbeiten der Arbeitsgruppe intensiviert worden (Gierke et al., 2008, Zhao und Braunewell, 2008, Zhao et al., 2008b).

Im Gegensatz zur Ratte liegt VILIP-1 im menschlichen Hippokampus nicht ubiquitär vor. VILIP-1 konnte mehrheitlich in der CA1-, CA4- und Hilus-Region (Interneuronen und Pyramidenzellen) detektiert werden. In den CA2-, CA3- und DG-Regionen zeigten nur wenige Neuronen eine VILIP-1-Immunreaktivität (Bernstein et al., 1999, Bernstein et al., 2002). Inwiefern das unterschiedliche Expressionsmuster von VILIP-1 die Aussagekraft der im Rattenmodell postulierten Pathophysiologien und deren Übertragung auf den Menschen relativiert, gilt es zukünftig in *post-mortem*-Studien zu überprüfen. Allerdings sind bei einem Vergleich zwischen den immunzytochemischen Ergebnissen der Ratte und des Menschen unterschiedliche Gewebeeigenschaften zu bedenken, die durch unterschiedliche Fixierungsvorgänge entstehen können.

6.3 Interaktion von $\alpha_4\beta_2$ nAChR und VILIP-1 in hippokampalen Neuronen

NCS-Proteine sind in der Lage Aktivität oder Expression verschiedener Rezeptorproteine direkt zu regulieren. Beispielsweise beeinflussen NCS-1 und KChIP die Zelloberflächenexpression von Kalium- und Calcium-Kanälen (An et al., 2000, Weiss und Burgoyne, 2001). VILIP-1 beeinflusst Calcium-abhängig die Aktivität von Adenylat- und Guanylatzyklen und steigert somit die Konzentrationen der zyklischen Nukleotide cAMP und cGMP (Braunewell et al., 1997, Braunewell et al., 2001b, Lin et al., 2002a, Spilker et al., 2002b, Brackmann et al., 2005). Außerdem beeinflusst VILIP-1 den Clathrin-abhängigen Transport der Guanylatzyklase B (GC-B) und des Transferrinrezeptors zur Zellmembran (Brackmann et al., 2005). Für die GC-B, die unter anderem als Rezeptor des natriuretischen Peptids Typ C (CNP⁵⁵) dient, wurde eine Zunahme der Oberflächenexpression bei Überexpression von VILIP-1 beobachtet⁵⁶

⁵⁵ *c-type natriuretic peptide*

⁵⁶ in PC-12- und C6-Zellen

(Braunewell et al., 2001b, Brackmann et al., 2005). Dass VILIP-1 einen ähnlichen Einfluss auf den $\alpha_4\beta_2$ besitzt, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. So steigert sich bei VILIP-1 Überexpression das Vorkommen des Rezeptors an der Zelloberfläche hippocampaler Neuronen. Initiiert wird diese Interaktion dadurch, dass VILIP-1 an die zytoplasmatische Domäne des nAChR bindet (Lin et al., 2002b).

Eine zentrale Rolle in diesen Regulationsmechanismen spielt der Calcium-Myristoyl-Switch (1.5.1), was sich in Experimenten mit VILIP-1-Myristoyl-Mutanten verdeutlichen ließ. Aufgrund der Mutation kann der Myristoyl-Rest sich nicht Calcium-abhängig exponieren und VILIP-1 ist nicht mehr in der Lage, an Membranen zu binden (Spilker et al., 1997). Als Folge dessen zeigte sich eine deutlich verminderte Zelloberflächenexpression der GC-B (Brackmann et al., 2005) und des $\alpha_4\beta_2$ nAChR (Lin et al., 2002b).

Anhand von Schnittpräparaten⁵⁷ wurde für VILIP-1 und den $\alpha_4\beta_2$ nAChR eine Ko-Lokalisation innerhalb der Hippokampusformation in der CA1- und DG-Region näher beschrieben (Zhao und Braunewell, 2008). VILIP-1 und der $\alpha_4\beta_2$ nAChR werden dort sowohl in Pyramidenzellen als auch in Interneuronen ko-exprimiert (Gierke et al., 2008, Zhao und Braunewell, 2008). Dabei kommt es durch VILIP-1 aber zu keinem erhöhten Vorkommen des Rezeptors in der Zelle⁵⁸. In der vorliegenden Arbeit wurde die bereits beobachtete Ko-Lokalisation des nAChR $\alpha_4\beta_2$ mit VILIP-1 in hippocampalen Neuronen näher charakterisiert. Es konnte eine Interaktion beider Proteine an der Zelloberfläche und auch subzellulär, genauer im Golgi-Apparat, nachgewiesen werden. Damit wurde der im Zellkulturmodell bekannte Effekt⁵⁹ von VILIP-1 auf die Oberflächenexpression des $\alpha_4\beta_2$ nAChR erstmals in hippocampalen Neuronen gezeigt.

Zunächst wurde jedoch die Methode der Oberflächenfärbung in der Zelllinie HEK 293 angewandt und der oben beschriebene VILIP-1-Effekt, das heißt eine Zunahme des $\alpha_4\beta_2$ nAChR an der Zellmembran, bestätigt (4.1). Zudem konnte nach Überexpression von VILIP-1 gezeigt werden, dass bei signifikant mehr HEK 293 Zellen der Rezeptor an der Zelloberfläche überhaupt vorliegt. Im Anschluss wurden die für diese

⁵⁷ Die Schnittpräparate wurden von Rattenhippokampi angefertigt.

⁵⁸ Grundlage sind immunzytochemische Untersuchungen der Arbeitsgruppe. Die Daten sind hier nicht gezeigt.

⁵⁹ vergleiche Lin et al., 2002b und Ren et al., 2005

Untersuchungen angewandten Methoden zur Oberflächenfärbung in primären hippocampalen Neuronen etabliert (4.2). Diese Immunfluoreszenzfärbungen zeigten in Pyramidenzellen nach VILIP-1-Überexpression eine deutliche Ko-Lokalisation von VILIP-1 und dem Rezeptor an der Zelloberfläche. Außerdem bewirkt VILIP-1, dass in ca. $\frac{3}{4}$ der VILIP-1-positiven hippocampalen Neuronen $\alpha_4\beta_2$ nAChR an der Zellmembran nachzuweisen ist. Im Vergleich dazu zeigten nur $\frac{1}{4}$ der VILIP-1-negativen Neuronen ein Rezeptorvorkommen an der Oberfläche der Zelle.

Diese beschriebenen Beobachtungen können durch verschiedene Mechanismen erklärt werden. Einerseits kann VILIP-1 eine Umverteilung des bereits vorhandenen zellulären Pools an $\alpha_4\beta_2$ nAChR bewirken. Andererseits kann eine effektive Zunahme des Rezeptors durch gesteigerte Genexpression den VILIP-1-Effekt erklären. Allerdings konnte in immunzytochemischen⁶⁰ und molekularbiologischen Untersuchungen der Arbeitsgruppe nach VILIP-1-Überexpression keine Zunahme des Rezeptorvorkommens in der Zelle verzeichnet werden, so dass nicht von einem Effekt auf die Genexpression ausgegangen wird (Abbildung 22A). Diese Daten werden gestützt durch Erkenntnisse aus der Interaktion von VILIP-1 mit einem weiteren Rezeptor, der GC-B. Auch dieser Rezeptor liegt nach VILIP-1-Überexpression verstärkt an der Zellmembran vor. Western-Blot-Untersuchungen zeigten für VILIP-1 ko-transfizierte und Kontrollvektor ko-transfizierte hippocampale Neuronen identische Proteinmengen des Interaktionspartners GC-B (Brackmann et al., 2005). Aufgrund dessen ist als Mechanismus die Umverteilung (Translokation) des $\alpha_4\beta_2$ nAChR in der Zelle bei gleichbleibender Proteinmenge (Genexpression) wahrscheinlich.

6.4 VILIP-1 induziert die Translokation des $\alpha_4\beta_2$ nAChR

Für die Hypothese der VILIP-1-induzierten Translokation des $\alpha_4\beta_2$ nAChR spricht auch die zytosolische Interaktion beider Proteine (4.3). Die Untersuchungen der subzellulären Lokalisation beider Proteine erfolgte in den „Transport-Kompartimenten“ ER und Golgi-Apparat. VILIP-1 ist im ER weder unter Kontrollbedingungen noch nach Calcium-Stimulation nachweisbar. Im Golgi-Apparat hingegen ist das Protein bereits in der Kontrolle geringgradig und nach Calcium-Stimulation deutlicher nachzuweisen (4.4).

⁶⁰ Die Daten sind hier nicht gezeigt.

Eine Immunreaktivität des $\alpha_4\beta_2$ nAChR ist unstimuliert in beiden Kompartimenten vorhanden. Im Vergleich zum Golgi-Apparat ist diese im ER jedoch stärker (4.5). Da lediglich im Golgi-Apparat eine Immunreaktivität beider Proteine besteht, wurde dieser näher untersucht.

Der Golgi-Apparat nimmt aus dem ER kommende neu-synthetisierte Proteine auf (*cis*-Golgi-Netzwerk) und sezerniert sie über das *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN). Im TGN kommt es zur Zuweisung der Proteine entsprechend ihres Bestimmungsortes. Ein solcher kann die Zellmembran, aber auch Endosomen und Lysosomen sein (Griffiths und Simons, 1986). Das TGN kann also als zentrale „Sortierungsstation“ in der Zelle angesehen werden, die Prozesse wie Exo- und Endozytose sowie Recycling vermittelt (Gu et al., 2001). Der verwendete Golgi-Marker Syntaxin 6 ist ein SNARE-Protein, das als Fusionsprotein an Vesikeln und anderen Membranen fungiert (Sollner et al., 1993, Kuliawat et al., 2004). Es ist am TGN lokalisiert und dort genauer an Stachelsaum- (*coated*) und glatten (*non-coated*) Vesikeln und gilt daher als Marker des TGN. Die Stachelsaum-Vesikel sind umgeben von Clathrin-Adapterprotein-Komplexen (CCV⁶¹), die Vesikeltransport im Sinne der Endozytose an der Zellmembran und dann den Transport zu Endosomen (Recycling) oder Lysosomen (Degradierung) vermitteln. Clathrin bindet an die Endosommembran über das Adapterprotein-1 (AP-1). AP-1 kommt somit eine direkte Beteiligung am endosomalen Recycling und am retrograden Transport (vom Endosom zum TGN) zu (Sorkina et al., 1999, Meyer et al., 2000). Demnach deutet die nachgewiesene Ko-Lokalisation von Syntaxin 6 mit AP-1 auf eine Beteiligung des SNARE-Proteins auf Transport- und Fusionsprozesse der Endozytose und des Recyclings hin (Bock et al., 1997, Gu et al., 2001).

Mit Hilfe einer Dreifach-Färbung in hoher Auflösung konnte im Golgi-Apparat hippokampaler Neuronen eine Calcium-abhängige Ko-Lokalisation von VILIP-1 mit dem Rezeptor beobachtet und quantifiziert werden (4.6). Der evozierte Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration scheint durch Aktivierung des Calcium-Myristoyl-Switch eine vorübergehende Lokalisation beider Interaktionspartner an der Membran des TGN zu bewirken. Eine Beteiligung des ER erscheint bei vorliegenden Ergebnissen als unwahrscheinlich.

⁶¹ *clathrin-coated vesicles*

Die nähere subzelluläre Lokalisation der Interaktionspartner wurde bereits in vorangegangenen Publikationen näher beschrieben. Spilker et al. zeigten für VILIP-1 eine deutliche, Calcium-abhängige (nach Myristoyl-*Switch*) Immunreaktivität mit dem Golgi-Marker Syntaxin 6 (Spilker und Braunewell, 2003). Lin et al. beobachteten in zerebellären Körnerzellen⁶² eine mögliche Immunreaktivität des $\alpha_4\beta_2$ nAChR im ER oder Golgi-Apparat (Lin et al., 2002b). Der immunzytochemische subzelluläre Nachweis des $\alpha_4\beta_2$ nAChR wurde aber als unzureichend interpretiert, um ihn einem Kompartiment zuzuordnen. Eine subzelluläre Ko-Lokalisation von VILIP-1 und dem $\alpha_4\beta_2$ nAChR wurde ebenfalls als unwahrscheinlich bewertet. Ren et al. konnten bei 30 °C eine deutliche Ko-Lokalisation des $\alpha_4\beta_2$ nAChR mit dem ER⁶³ zeigen (Ren et al., 2005). Nach einem Temperatur-*Shift* auf 37 °C, der eine plötzliche Freisetzung der Rezeptorproteine aus dem ER in den Golgi-Apparat initiiert, erfolgte zusätzlich eine Ko-Lokalisation mit dem Golgi-Marker Giantin. Unter spezifizierten Untersuchungsbedingungen (vergleiche 3.2), wie der Durchführung einer Calcium-Stimulation und Dreifach-Färbung sowie die Verwendung eines Laser-Scanningmikroskopes und einer starken Vergrößerung, konnten die oben genannten neuen Aussagen über die zytosolische Interaktion beider Proteine getroffen werden. Interessanterweise war ein Temperatur-*Shift* (Ren et al., 2005) bei VILIP-1 Ko-Expression nicht notwendig, so dass alle Experimente bei 37 °C durchgeführt werden konnten.

Es kann aufgrund bisheriger Studien VILIP-1 und anderen NCS-Proteinen ein Einfluss auf Transportvorgänge zugesprochen werden. So ko-lokalisieren Neurocalcin δ mit dem Transportvesikelprotein Clathrin (Ivings et al., 2002) und Hippocalcin mit β_2 -Adaptin, einer Untereinheit des Adapterprotein-2 Komplexes⁶⁴ (Palmer et al., 2005). NCS-1 interagiert mit dem ADP-Ribosylierungsfaktor- (ARF-) 1⁶⁵, der den *trans*-Golgi Export der CCV reguliert (Gu et al., 2001, Haynes et al., 2005). Speziell für VILIP-1 sind vielfältige Interaktionen bekannt. Spilker et al. zeigten eine Ko-Lokalisation von VILIP-1 mit Aktin, ein Filamentprotein des Zytoskeletts, das für die Golgi-Morphologie und den

⁶² Diese entstammten der primären Neuronenkultur (Ratte).

⁶³ Der Nachweis des ER erfolgte mittels des ER-Markers Calnexin.

⁶⁴ Der Adapterprotein-2 Komplex stellt die Bindung des Clathrins an die Zielmembran her.

⁶⁵ ARF-1 ist eine kleine GTPase, die an der Bildung von COP1-Vesikeln aus den Golgi-Membranen beteiligt ist (Xiang et al., 2007).

Vesikeltransport, im Sinne einer Endozytose, beteiligt ist⁶⁶ (Spilker et al., 2002a). VILIP-1 spielt ebenfalls eine Rolle bei Recyclingprozessen, indem es mit Clathrin interagiert und dessen subzelluläre Verteilung moduliert (Blondeau et al., 2004, Brackmann et al., 2005). Zudem erfolgt eine Modulation des Clathrin-abhängigen Transportes (Rezeptor-Recycling) der GC-B und des Transferrinrezeptors (Maxfield und McGraw, 2004, Brackmann et al., 2005). Weiterhin konnte eine Calcium-abhängige Lokalisation⁶⁷ im Golgi-Apparat aufgezeigt werden, wo VILIP-1 mit dem SNARE Syntaxin 6 ko-lokalisiert (Spilker et al., 2002a). Insgesamt weisen diese Daten auf eine Beteiligung des NCS VILIP-1 an Transportprozessen des Recyclings- und/oder der Endozytose hin, die vom TGN ausgehen.

Unterstützt werden diese Ergebnisse durch pharmakologische Experimente, wie sie in Abbildung 15C dargestellt sind. Für die dort gezeigten immunzytochemischen Untersuchungen wurden Pharmaka verwendet, die den Golgi-Apparat selbst zerstören (Brefeldin A) oder den trans-Golgi-Export inhibieren (Monensin), wobei aber das ER funktionsfähig bleibt (Tartakoff, 1983, Misumi et al., 1986). Durch direktes Ausschalten der TGN-assoziierten (konstitutiven) Exozytose kam die VILIP-1-getriggerte Oberflächenexpression des $\alpha_4\beta_2$ nAChR zum Erliegen (4.7). In den oben besprochenen Experimenten konnte das TGN bereits als möglicher Ort der Interaktion von VILIP-1 und dem $\alpha_4\beta_2$ nAChR bestimmt werden (Abbildungen 11 und 13). Diese Daten weisen darauf hin, dass das NCS-Protein VILIP-1 nach erfolgtem Calcium-Einstrom den Transport des $\alpha_4\beta_2$ nAChR zur Zelloberfläche auf der Ebene des Golgi-Apparates induziert und in diesem Sinne konstitutive Exozytose regulieren kann. Zudem kann ein Einfluss von VILIP-1 auf Recyclingvorgänge postuliert werden, denn Monensin führt auch zur Blockade von Recyclingprozessen (Stein et al., 1984).

Auch wenn der genaue Transportmechanismus, der die Translokation des Rezeptors vermittelt, an dieser Stelle nicht benannt werden kann, lässt sich anhand der in dieser Forschungsarbeit ermittelten Daten aber ein möglicher Initiierungsschritt der $\alpha_4\beta_2$ nAChR Translokation an die Zellmembran formulieren. Dieser „erste Schritt“ scheint Calcium-abhängig auf TGN-Ebene zu erfolgen. Ein Anstieg der intrazellulären Calcium-

⁶⁶ Für Neurocalcin δ ist ebenfalls eine Ko-Lokalisation mit Aktin bekannt (Ivings et al., 2002).

⁶⁷ Die Membranbindung erfolgt nach dem Calcium-Myristoyl-Switch (1.5.1).

Konzentration, beispielsweise durch erhöhte nAChR- oder Glutamaterezeptor-Aktivität⁶⁸ (Zhao et al., 2008a), bedingt den Myristoyl-Switch. VILIP-1 ist dann in der Lage reversibel an das SNARE-Protein Syntaxin 6 des TGN zu binden, wo es den $\alpha_4\beta_2$ nAChR „einfängt“. Diese Interaktion beider Proteine am Golgi-Apparat, einem Schlüssel-Kompartiment für intra- und extrazelluläre Transportprozesse, könnte schließlich zu einem erhöhten Rezeptorvorkommen an der Zelloberfläche führen. Betrachtet man diese Hypothese im Kontext der oben beschriebenen Literatur, dass nämlich Syntaxin 6 an CCV assoziiert ist, die Endozytose und Recycling steuern, und VILIP-1 mit Clathrin im Rahmen des Rezeptor-Recyclings⁶⁹ interagiert, kann weiterführend postuliert werden: VILIP-1 moduliert Calcium-abhängig den Clathrin-vermittelten Transport von Syntaxin 6-positiven Vesikeln (Zhao et al., 2008b). Wenn tatsächlich die Initiierung des Clathrin-abhängigen Transportes im TGN zu einem höheren Rezeptorvorkommen an der Zelloberfläche führt, ist als Mechanismus eine Beschleunigung der Endozytose und des Recycling endozytierter Rezeptoren wahrscheinlich.

6.5 Eigene Ergebnisse im Kontext weiterführender Daten

Der Effekt von VILIP-1 auf den $\alpha_4\beta_2$ nAChR lässt sich durch Einbeziehung elektrophysiologischer und biochemischer Experimente noch umfassender beschreiben. Diese gingen aus Arbeiten der Arbeitsgruppe hervor und sind Gegenstand gemeinsamer Publikationen.

6.5.1 VILIP-1 nimmt Einfluss auf die Exozytose des $\alpha_4\beta_2$ nAChR

Die VILIP-1-vermittelte gesteigerte Oberflächenpräsenz des $\alpha_4\beta_2$ nAChR ist wahrscheinlich auf Beeinflussung von Transportmechanismen und nicht auf eine gesteigerte Genexpression zurückzuführen (6.4). Es fanden sich Hinweise für einen Einfluss von VILIP-1 auf die Exozytose des $\alpha_4\beta_2$ nAChR in HEK 293 Zellen. In biochemischen Experimenten⁷⁰ der Arbeitsgruppe konnte die Exozytose des $\alpha_4\beta_2$ nAChR quantifiziert werden (Abbildung 22). Nachdem initial alle Oberflächenproteine

⁶⁸ Dementsprechend ist eine Zunahme der intrazellulären Calcium-Konzentration *in vitro* induzierbar mit Carbachol, Nikotin oder Glutamat.

⁶⁹ VILIP-1 beeinflusst das Rezeptor-Recycling der GC-B und des Transferrinrezeptors.

⁷⁰ Biotinylierungs-Assay

enzymatisch verdaut wurden, wurde die zeitabhängige Zunahme der Oberflächenexpression (relative Exozytose) des $\alpha_4\beta_2$ nAChR gemessen. VILIP-1 beschleunigt die Exozytose des Rezeptors, so dass nach 10 min die zweieinhalbfache Menge an Rezeptorproteinen an der Zellmembran im Vergleich zur Kontrollgruppe vorlag. Allerdings erlangten diese Experimente keine Signifikanz im *Student's t-test*. Trotzdem scheinen diese Daten in eine ähnliche Richtung zu weisen, wie sie auch durch Ergebnisse dieser Arbeit aufgezeigt wird. So entsprechen die vorliegenden Ergebnisse den pharmakologischen Experimenten, wie sie in Abbildung 15C dargestellt sind. Dort konnte durch Unterbindung der TGN-vermittelten konstitutiven Exozytose⁷¹ keine Oberflächenexpression des $\alpha_4\beta_2$ nAChR nach VILIP-1-Überexpression mehr beobachtet werden. In Zusammenschau mit den in Abbildung 22 zusätzlich vorgestellten Experimenten ist ein Einfluss von VILIP-1 auf die konstitutive Exozytose des $\alpha_4\beta_2$ nAChR wahrscheinlich.

Zusammenfassend können für die Zunahme der $\alpha_4\beta_2$ nAChR-Oberflächenexpression zwei Transportmechanismen herausgestellt werden, die VILIP-1 Calcium-abhängig zu regulieren scheinen. Zum Einen kann VILIP-1 an der Regulation der Syntaxin 6-positiven, Clathrin-abhängigen Transportprozesse wie Endozytose und Recycling endozytierter Proteine beteiligt sein. Zum Zweiten ist ein Clathrin-unabhängiger Einfluss auf die konstitutive Exozytose zu nennen.

6.5.2 Der $\alpha_4\beta_2$ nAChR und synaptische Plastizität

Der $\alpha_4\beta_2$ nAChR ist ein bedeutender Regulator von Signalverarbeitung und –vermittlung innerhalb komplexer Regelkreise, die unter anderem Lernen und Gedächtnis induzieren (Radcliffe et al., 1999, Albuquerque et al., 2000, Kenney und Gould, 2008).

Eine physiologische Grundlage des Entstehens von Lernen und Gedächtnis ist die synaptische Plastizität von Neuronen im reifen Hippokampus (Martin et al., 2000). Aktivitäts-abhängig erfolgt eine verstärkte oder verminderte synaptische Übertragung in hippokampalen Neuronen. Kommt es zu einer starken gleichzeitigen Erregung mehrerer Glutamat-Rezeptoren, führt dies zu einer lang anhaltenden Verstärkung (LTP) der

⁷¹ Die Unterbringung erfolgte durch Zerstörung des Golgi-Apparates (Brefeldin A) bzw. Inhibition des TGN (Monensin).

synaptischen Übertragung (MacDonald et al., 2006). Vermittelt wird dies über die konsekutiv ansteigende Calcium-Konzentration in der Zelle. Somit kommt es zu einer veränderten Verschaltung von Informationen zwischen Neuronen und zu einer spezifischen funktionellen Antwort, die Vorgänge wie Lernen und Gedächtnisbildung ermöglichen (Whitlock et al., 2006). Werden Glutamat-Rezeptoren nur in geringem Maße erregt und demnach die intrazelluläre Calcium-Konzentration nur leicht erhöht, so kommt es zu einer lang anhaltenden Reduktion (LTD) der synaptischen Antwort (Massey und Bashir, 2007). Prozesse, die LTP und LTD modulieren beziehungsweise eine Balance zwischen beiden Zuständen herstellen, werden als Metaplastizität zusammengefasst (Abraham und Tate, 1997, Mockett und Hulme, 2008). An diesen beschriebenen Phänomenen sind sowohl ionotrope (NMDA⁷²-) als auch metabotrope (mGluR⁷³) Rezeptoren beteiligt (Collingridge et al., 1983, McGuinness et al., 1991, Dudek und Bear, 1992, Bashir et al., 1993, MacDonald et al., 2006).

Die Regulation der präsynaptischen Glutamat-Ausschüttung kann unter anderem durch eine erhöhte präsynaptische nAChR-Aktivität erfolgen. nAChR steuern die Ausschüttung von Neurotransmittern wie GABA oder Glutamat (McGehee et al., 1995, Albuquerque et al., 1997). Dementsprechend sind Nikotin und andere $\alpha_4\beta_2$ nAChR-Liganden in der Lage, LTP beziehungsweise LTD zu induzieren (Buccafusco et al., 2005). Zudem modulieren nAChR als Kationenkanäle auch unmittelbar die intrazelluläre Calcium-Konzentration (Fucile, 2004). Allerdings ist der mehrheitliche Anteil des nAChR-vermittelten Calcium-Einstroms dem α_7 nAChR zuzuschreiben (Zhao et al., 2008a). An diesem Punkt scheint der $\alpha_4\beta_2$ nAChR mit dem α_7 nAChR „zusammenzuarbeiten“ beziehungsweise auf diesen Subtyp angewiesen zu sein, der den für die Informationsverarbeitung und –weiterleitung so elementaren intrazellulären Calcium-Anstieg vermittelt.

Ein weiterer Einfluss auf Neurotransmitter-Regelkreise erfolgt durch Aktivierung GABAerger Interneuronen. Die erhöhte nAChR-Aktivität führt so zu einer Verstärkung inhibitorischer postsynaptischer Ströme (IPSC⁷⁴), die im Rattenhippokampus zu 65% auf den $\alpha_4\beta_2$ nAChR⁷⁵ zurückzuführen sind (Braga et al., 2004).

⁷² N-Methyl-D-Aspartat

⁷³ metabotroper Glutamatrezeptor

⁷⁴ *inhibitory postsynaptic currents*

Diese hier beschriebenen Eigenschaften des $\alpha_4\beta_2$ nAChR ermöglichen es synaptische Plastizität direkt zu induzieren und aufrechtzuerhalten und so einen nachhaltigen Effekt auf kognitive Funktionen auszuüben (Ji et al., 2001, Ge und Dani, 2005).

6.5.3 Die funktionelle Bedeutung der Interaktion von VILIP-1 und $\alpha_4\beta_2$ nAChR

Ausgehend von den in 5.1 erläuterten elektrophysiologischen Daten lässt sich für die Interaktion von VILIP-1 mit $\alpha_4\beta_2$ nAChR eine funktionelle Bedeutung ableiten. So führt VILIP-1 zur funktionellen Hochregulation des $\alpha_4\beta_2$ nAChR (Abbildung 20). Das bedeutet, dass bei Interaktion von VILIP-1 mit dem Rezeptor eine Liganden-Bindung die Reizantwort des Rezeptors steigert. Die Auswirkungen dieses Effektes wurden für Interneuronen näher charakterisiert. Eine gesteigerte Reizantwort des $\alpha_4\beta_2$ nAChR führt zu einer Aktivierung GABAerger Interneuronen, die umliegende Neuronen inhibieren. Abbildung 21 zeigt die Frequenzzunahme der $\alpha_4\beta_2$ nAChR-vermittelten IPSC in hippokampalen Neuronen bei Überexpression von VILIP-1.

In Anbetracht dessen lässt sich für die gezeigte VILIP-1-vermittelte Translokation des Rezeptors an die Zelloberfläche eine funktionelle Bedeutung benennen. Indem VILIP-1 die Verteilung des Rezeptors moduliert, ist es somit auch ein Regulator der Funktionen des $\alpha_4\beta_2$ nAChR. Auf Basis des immunzytochemischen Nachweises der VILIP-1-Rezeptor-Interaktion und der elektrophysiologischen Daten ist ein Einfluss von VILIP-1 auf die hippokampale Netzwerkaktivität zu vermuten.

Interessanterweise konnte in Western-Blot-Untersuchungen gezeigt werden, dass eine LTP-Induktion⁷⁶ über Gruppe 1 mGluR *in vivo* zu einer signifikant vermehrten Expression von VILIP-1⁷⁷ um 35% führt (Braunewell et al., 2003, Brackmann et al., 2004). Eine *de novo* Proteinsynthese ist eine der Voraussetzungen für eine nachhaltige Bildung von Gedächtnisinhalten (Nguyen et al., 1994, Wells und Fallon, 2000). Dies erfolgt auch speziell in den Hippokampusregionen CA1 und DG, in denen VILIP-1 und $\alpha_4\beta_2$ nAChR ko-lokalisieren (6.2) (Krug et al., 1984, Frey et al., 1988, Braunewell et al., 2003). Die CA1 und DG-Regionen sind als funktionell bedeutsame Strukturen, insbesondere für die Bildung neuer Gedächtnisinhalte (Langzeitgedächtnis), bekannt.

⁷⁵ Die IPSC sind zusätzlich zu 35% auf den Rezeptorsubtyp α_7 nAChR zurückzuführen.

⁷⁶ Durch den spezifischen Gruppe 1 mGluR-Agonisten (R,S)-3,5-*dihydroxyphenylglycin* (DHPG) wird eine langsame (*slow-onset*) Potenzierung induziert.

⁷⁷ Das gilt auch für NCS-1.

Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass VILIP-1 die hippocampale Netzwerkaktivität über die funktionelle Hochregulation des $\alpha_4\beta_2$ nAChR indirekt beeinflussen kann. Zudem scheinen VILIP-1 und $\alpha_4\beta_2$ nAChR von dem jeweils anderen in ihrer Aktivität abhängig zu sein, sodass die Interaktion mit zunehmender Dauer stabilisiert oder gar verstärkt wird. Die Calcium-abhängige Interaktion beider Proteine resultiert in einer gesteigerten Membranassoziation und Hochregulierung der Rezeptoraktivität. Es kommt zur $\alpha_4\beta_2$ nAChR-vermittelten Induktion synaptischer Plastizität in Form von LTP. LTP steigert wiederum die Expression des Interaktionspartners VILIP-1. Es ist möglich, dass erst durch diesen positiven Feedbackmechanismus ein relevanter Effekt im Neuron erzielt beziehungsweise aufrechterhalten werden kann.

Diese Hypothese wird unterstützt durch Daten des VILIP-1-Interaktionspartners GC-B. Ebenso wie der $\alpha_4\beta_2$ nAChR kommt auch dieser Rezeptor VILIP-1-abhängig vermehrt an der Zelloberfläche vor. Auch für die GC-B konnte ein Einfluss auf die synaptische Plastizität nachgewiesen werden. So führt die GC-B zu einer Verstärkung der induzierten LTP um 50%⁷⁸. So kann auch in diesem Kontext VILIP-1 als möglicher Calcium-abhängiger, indirekter Modulator von Plastizitätsphänomenen gesehen werden, in dem es die Oberflächenpräsentation des Rezeptors beeinflusst.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und der Literatur beschreiben eine physiologische Verknüpfung von VILIP-1 und $\alpha_4\beta_2$ nAChR, die in einer Effektverstärkung der Partner resultiert. Sie kann in den großen Kontext der Induktion von Lernen und Gedächtnis eingeordnet werden. Um eine genauere Aussage über diese Beziehung treffen zu können, sind weiterführende Experimente erforderlich.

6.6 VILIP-1 und $\alpha_4\beta_2$ nAChR – Hypothesen zur Rolle in der Pathophysiologie neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen

Sowohl VILIP-1 als auch der $\alpha_4\beta_2$ nAChR wurden mit der Entstehung verschiedener neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen des ZNS in Zusammenhang gebracht (Hogg et al., 2003, Braunewell, 2005) (vergleiche 1.4, 1.5.2).

⁷⁸ Dies erfolgt nach Applikation seines Agonisten CNP (bisher unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe).

6.6.1 Demenz vom Alzheimer-Typ

Die Demenz vom Alzheimer-Typ (DAT) ist charakterisiert durch eine stetig abnehmende Zahl an hochaffinen $\alpha_4\beta_2$ nAChR und einer reduzierten Konzentration des Neurotransmitters ACh (Whitehouse und Kalara, 1995, Gotti et al., 2006). Im Tiermodell⁷⁹ führten Infusionen von DH β E, einem selektiven $\alpha_4\beta_2$ nAChR Antagonisten, in den ventralen Hippokampus zu einer deutlichen Reduktion kognitiver Funktionen⁸⁰ (Arthur und Levin, 2002). Zudem kommt es pathophysiologisch zur Akkumulation von β -Amyloid, das insgesamt den Calcium-Haushalt instabilisiert und die intrazelluläre Calcium-Konzentration erhöht mit wahrscheinlich zytotoxischer Wirkung (Mattson et al., 1992). Insgesamt kommt es bei diesem Krankheitsbild zu einer herabgesetzten cholinergen Neurotransmission und neuronalen Degeneration, unter anderem im Kortex und dem Hippokampus (Mattson, 2007). Die resultierende kognitive Beeinträchtigung betrifft elementare Funktionen des Hippokampus, wie Gedächtnisbildung und -abruf, Aufmerksamkeit und Lernen.

Man könnte zunächst annehmen, dass VILIP-1 reaktiv, bei erhöhten intrazellulären Calcium-Konzentrationen, die sinkende Zahl der $\alpha_4\beta_2$ nAChR an der Zellmembran durch eine vermehrte Translokation des Rezeptors an die Oberfläche teilweise ausgleichen kann. Auch durch seinen Sensitivitäts-steigernden Effekt auf den $\alpha_4\beta_2$ nAChR (Lin et al., 2002b) ist eine Funktion als Modulator vorstellbar, der dem Verlust an hochaffinen nAChR Bindungsstellen entgegen wirken könnte. Allerdings scheint diese Wirkung, wenn überhaupt, nur temporär effektiv zu sein. Zu komplex ist die Funktion von VILIP-1. Vielmehr zeichnen weitere Experimente ein eher neurotoxisches Profil des NCS-Proteins im Kontext der DAT. So ist die Anzahl an VILIP-1 exprimierenden Neuronen im temporalen Kortex herabgesetzt (Braunewell et al., 2001a, Loring et al., 2001) und VILIP-1 mit den pathophysiologischen Charakteristika, intrazellulären Neurofibrillen und extrazellulären β -Amyloid-Plaques, assoziiert (Braunewell et al., 2001a, Schnurra et al., 2001). Dies zeigt an, dass vorwiegend VILIP-1-exprimierende Neuronen apoptotisch werden und so VILIP-1 im Extrazellularraum nachweisbar ist. Die ursächlich durch β -Amyloid veränderte Calcium-Homöostase könnte möglicherweise durch eine gesteigerte VILIP-1-Expression

⁷⁹ Die tierexperimentellen Studien wurden in Ratten durchgeführt.

⁸⁰ Die kognitiven Einschränkungen konnten durch systemische Nikotin-Applikation wieder aufgehoben werden.

unterhalten werden. Bei anhaltend gesteigerter Aktivität von VILIP-1 beziehungsweise generell von NCS-Proteinen⁸¹, scheint der instabile Calcium-Haushalt zu dekompensieren und den Tod des Neurons zu bedingen. Zusätzlich erfolgt auch eine direkte Induktion pathophysiologischer Prozesse. So induziert VILIP-1 die Bildung (Tau-Phosphorylierung) von Neurofibrillen (Schnurra et al., 2001), deren Expression in den Neuronen ebenfalls zur Apoptose führt (Vickers et al., 2000).

Ist VILIP-1 im Rahmen der DAT Calcium-abhängig in seiner Aktivität gesteigert, kommt es zur Induktion neurotoxischer Prozesse wie Apoptose und Tau-Phosphorylierung. Aufgrund dieser pathognomonischen Nebeneffekte ist die hochregulierende Interaktion des Proteins mit dem $\alpha_4\beta_2$ nAChR für eine positive Beeinflussung des Krankheitsverlaufes als nicht ausreichend zu interpretieren.

6.6.2 Schizophrenie

Die Rolle speziell des $\alpha_4\beta_2$ nAChR bei der Entstehung von Schizophrenie ist noch weitestgehend ungeklärt. Jedoch wiesen De Luca et al. bei einigen Schizophreniepatienten eine Mutation der Untereinheiten α_4 und β_2 nach, die einen negativen Effekt auf die Expression des Rezeptors und die nAChR-vermittelte Dopaminfreisetzung besitzt (De Luca et al., 2006).

Eine beeinträchtigte Funktion der nAChR spiegelt sich auch darin wieder, dass Schizophreniepatienten häufiger (bis zu 90%) und stärker rauchen als die übrige Bevölkerung, so dass Nikotinabusus als eine Art Selbstmedikation gesehen werden könnte (Olincy et al., 1997, Kumari und Postma, 2005). In klinischen Studien verbesserte sich bei den Patienten durch Nikotinapplikation die Aufmerksamkeit und Kognition, aber auch (Jacobsen et al., 2004, AhnAllen et al., 2008). Mittels fMRI⁸²-Scans wurde ebenfalls nach Nikotinzufuhr eine erhöhte Aktivierungsrate⁸³ und

⁸¹ Das NCS-Protein Calsenilin ist in kortikalen Neuronen bei der DAT hochreguliert und ist wie VILIP-1 mit den β -Amyloid-Plaques assoziiert. Es wird postuliert, dass die Überexpression von Calsenilin zur Apoptose von Neuronen, zur Induktion der Tau-Phosphorylierung und Bildung von β -Amyloid führt (Jo et al., 2001, Braunevell et al., 2005) (vergleiche 1.5.1).

⁸² *functional Magnetic Resonance Imaging*

⁸³ Thalamus und *gyrus cinguli*

Konnektivität zwischen spezifischen Hirnregionen⁸⁴, im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe, nachgewiesen (Jacobsen et al., 2004). Es ist bekannt, dass eine chronische Nikotinstimulation zur funktionellen Hochregulation des $\alpha_4\beta_2$ nAChR mit einer erhöhten Sensitivität und verstärkten Reizantwort (Buisson und Bertrand, 2001) sowie zu einer gesteigerten Präsentation des $\alpha_4\beta_2$ nAChR an der Zelloberfläche (Corringer et al., 2006) führt. Diese Effekte über die hochaffinen $\alpha_4\beta_2$ nAChR könnten die kognitiven (negativen⁸⁵) Symptome der Schizophrenie positiv beeinflussen. Patkar et al. wiesen Nikotinabusus als additive Selbsttherapie tatsächlich gehäuft bei ausgeprägten negativen Symptomen nach, die oft nicht genügend durch Neuroleptika kompensiert werden können (Patkar et al., 2002).

Für VILIP-1 konnte sowohl im Schizophrenie-Tiermodell als auch in Hippokampi verstorbener Schizophreniepatienten eine Umverteilung beobachtet werden⁸⁶. Im Nucleus accumbens konnte ein Verlust von VILIP-1-mRNA⁸⁷ von mehr als 40% bestimmt werden (Kajimoto et al., 1995). In Pyramidenzellen nimmt die VILIP-1-Immunreaktivität ab, während sie in Interneuronen zunimmt (Bernstein et al., 2002). Zudem ist VILIP-1 in mehr Interneuronen überhaupt nachweisbar (Bernstein et al., 2003). Anhand dieser Beobachtungen stellt sich die Frage, was passiert, wenn der in dieser Arbeit beschriebene Effekt von VILIP-1 auf den $\alpha_4\beta_2$ nAChR in bestimmten Zellpopulationen verstärkt und in anderen reduziert auftritt.

In diesem Kontext stehen die Daten den Abbildungen 17, 18 und 19. Dort wird die Verteilung von VILIP-1 in Interneuronen näher charakterisiert. Es zeigte sich, dass in nahezu allen (GAD-positiven) Interneuronen (90%) der $\alpha_4\beta_2$ nAChR vorkommt. Ein gemeinsamer Nachweis von VILIP-1 und $\alpha_4\beta_2$ nAChR erfolgte in knapp 50% der Zellen. Eine alleinige VILIP-1-Immunreaktivität trat in den untersuchten Interneuronen selten auf. Betrachtet man nun die Daten von Bernstein et al. (Bernstein et al., 2002), scheint eine Anteilzunahme der VILIP-1 immunreaktiven Interneuronen und das verstärkte Vorkommen des Proteins pro Interneuron in einer Zunahme der Interaktionen zwischen

⁸⁴ zwischen Thalamus und Kortex

⁸⁵ Ein negatives kognitives Symptom ist die gedankliche Verarmung.

⁸⁶ Auch das CBP Calbindin zeigt ein verändertes Vorkommen bei Schizophrenien (Daviss und Lewis 1995). Diese Beobachtungen sind Hinweise für ein Modell der gestörten Calcium-abhängigen Neurotransmission bei Schizophrenien (Lidow 2003).

⁸⁷ Diese Daten wurden unter der Bezeichnung NVP-1 publiziert.

VILIP-1 und $\alpha_4\beta_2$ nAChR zu resultieren. Der VILIP-1-Effekt auf den $\alpha_4\beta_2$ nAChR gewinnt so im Rahmen der Schizophrenie eine größere Bedeutung. Diese Ergebnisse sind eingebettet in nähere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zur Pathophysiologie der Schizophrenie (Gierke et al., 2008, Zhao et al., 2008a), die in 5.1 auszugsweise näher dargelegt wurden. Die dort vorgestellten elektrophysiologischen Experimente liefern eine Antwort auf die oben gestellte Frage zur funktionellen Bedeutung des gesteigerten VILIP-1-Einflusses auf den $\alpha_4\beta_2$ nAChR. So erhöht sich in Pyramidenzellen, die sich in enger Nachbarschaft zu VILIP-1-GFP-exprimierenden Interneuronen befinden, nach ACh-Applikation die Frequenz inhibierender postsynaptischer Ströme (IPSC) im Vergleich zu GFP-exprimierenden Interneuronen⁸⁸. Es ist anzunehmen, dass die Vermittlung dieses Effektes auf den $\alpha_4\beta_2$ nAChR zurückzuführen ist, denn nAChR sind an sich grundlegende Modulatoren der GABAergen Interneuronen in verschiedenen Hirnarealen (Alkondon et al., 1999, Covernton und Lester, 2002, Alkondon und Albuquerque, 2004, Couey et al., 2007). Nashmi et al. zeigten außerdem, dass es nach Aktivierung des $\alpha_4\beta_2$ nAChR durch ACh- oder Nikotinstimulation zu einer Impulszunahme der GABAergen Neuronen im Mesenzephalon⁸⁹ und einer konsekutiven Hemmung der nachgeschalteten Neuronen kommt (Nashmi et al., 2007). Auch speziell in der hippokampalen Neuronenkultur konnte bereits nach ACh-Stimulation verstärkt IPSC an Pyramidenzellen abgeleitet werden (Couey et al., 2007, Gierke et al., 2008). Weiterhin zeigen in Interneuronen durchgeführte elektrophysiologische (Alkondon et al., 2000) und immunzytochemische Untersuchungen (Abbildung 19) eine mehrheitliche Aktivität beziehungsweise Expression des $\alpha_4\beta_2$ nAChR-Subtyps. Zudem erfolgte in den oben beschriebenen Experimenten (Abbildung 21) eine pharmakologische Antagonisierung des α_7 nAChR⁹⁰ (Gierke et al., 2008).

Aufgrund der oben geführten Diskussion über die Effekte von VILIP-1 auf das Vorkommen und die Aktivität des $\alpha_4\beta_2$ nAChR liegt es nahe, dass die pathologisch gesteigerte Präsenz von VILIP-1 in Interneuronen auch dort zu einer Calcium-abhängigen, vorübergehenden Aktivierung zusätzlicher $\alpha_4\beta_2$ nAChR führen kann. Also

⁸⁸ Der Nachweis erfolgte mit Hilfe von patch-clamp-Ganzzellaufnahmen (in vitro).

⁸⁹ Mittelhirn (Teil des Hirnstamms)

⁹⁰ Diese Antagonisierung wurde durch die Applikation von MLA erzielt.

könnte es so zu einer Verstärkung der $\alpha_4\beta_2$ nAChR-vermittelten Hemmung der kommunizierenden Neuronen (Pyramidenzellen), das heißt zu einer herabgesetzten hippokampalen Funktion, kommen. Dauert dieser Zustand an, können aufgrund der gestörten Neurotransmitter-Regelkreise Phänomene synaptischer Plastizität beeinträchtigt werden und klinisch relevante kognitive Einschränkungen die Folge sein, die im Zusammenhang der Schizophrenie beschrieben werden (Hogg et al., 2003, Braunewell, 2005). Dem entspricht der Nachweis einer Ko-Lokalisation von VILIP-1 und $\alpha_4\beta_2$ nAChR in Interneuronen der CA1-Region des Hippokampus⁹¹ (Zhao und Braunewell, 2008); ein weiterer Hinweis für die Einflussnahme beider Interaktionspartner auf kognitive Funktionen (vergleiche 6.2).

Für den α_7 nAChR ist eine engere Verknüpfung mit der Pathogenese der Schizophrenie belegt (Hogg et al., 2003). Eine mögliche direkte Interaktion mit VILIP-1 konnte bisher nicht festgestellt werden. Allerdings besteht die Hypothese (Zhao et al., 2008a), einer „Zusammenarbeit“ zwischen den beiden Rezeptor-Subtypen α_7 und $\alpha_4\beta_2$. Zhao et al. zeigten, dass Nikotin-Stimulation zu einem Calcium-Einstrom führt, der hauptsächlich durch α_7 nAChR-Aktivierung vermittelt wird (Zhao et al., 2008a). Der $\alpha_4\beta_2$ nAChR hat daran nur eine geringfügige Beteiligung. Das könnte bedeuten, dass der Calcium-Myristoyl-Switch und die nachfolgende Interaktion von VILIP-1 und $\alpha_4\beta_2$ nAChR durch den α_7 nAChR induziert beziehungsweise erst so ermöglicht wird.

Der häufige Nikotinabusus bei Schizophreniepatienten vermittelt seinen Effekt, wie oben beschrieben, primär über den hochaffinen $\alpha_4\beta_2$ nAChR. Da allerdings bei gleichbleibender Zigarettenanzahl größere Nikotinmengen⁹² konsumiert werden (Olincy et al., 1997), wird postuliert, dass so auch die niedrigaffinen α_7 nAChR angesprochen werden können (Adler et al., 1998).

Offen bleibt jedoch die Frage, wie die verschiedenen oben genannten Beobachtungen für die nAChR-Subtypen zusammenhängen bzw. sich bedingen. Einerseits besteht ein positiver Effekt von Nikotin hauptsächlich auf den $\alpha_4\beta_2$ nAChR. Andererseits wird der intrazelluläre Calcium-Konzentrationsanstieg nach Liganden-Bindung mehrheitlich über den α_7 nAChR vermittelt. Die erhöhte Calcium-Konzentration in der Zelle führt zu einer

⁹¹ Rattenhippokampi

⁹² Dies wird erzielt durch stärkere Zigaretten und/oder intensiveres Inhalieren.

Translokation von VILIP-1 und zu einer (pathophysiologisch) gesteigerten $\alpha_4\beta_2$ nAChR-VILIP-Interaktion in Interneuronen. Die Annahme, dass starker Nikotinabusus auch zu einer Nikotin-Bindung an niedrigaffinen α_7 nAChR führt, kann ein möglicher Ausgangspunkt für das Zusammenspiel der nAChR sein. Im Sinne eines positiven Feedbackmechanismus kann nach α_7 nAChR-Aktivierung durch Calcium-Einstrom eine strukturelle und funktionelle Hochregulation des $\alpha_4\beta_2$ nAChR (über Interaktion mit VILIP-1) erfolgen, die Symptome reduzieren kann und somit die Nikotinabhängigkeit verstärken könnte. Unterstützt wird diese Hypothese durch Studien, die eine sehr niedrige Erfolgsrate einer Nikotinentwöhnung und hohe Rückfallraten aufzeigen (Addington et al., 1997, Ziedonis und George, 1997).

Eine ausführlichere immunzytochemische Charakterisierung der Interaktion von VILIP-1 und dem $\alpha_4\beta_2$ nAChR in der hippokampalen Interneuronpopulation lässt sich jedoch aus den Untersuchungsergebnissen nicht ableiten. Als interessante und konkretisierende Weiterführung dieser Arbeit sind nähere Untersuchungen in Interneuronen, eventuell unter Etablierung des Ketamin-Modells, notwendig.

6.7 Modell der VILIP-1-vermittelten $\alpha_4\beta_2$ nAChR-Hochregulation

Zusammenfassend kann man einen Mechanismus der Interaktion zwischen $\alpha_4\beta_2$ nAChR und VILIP-1 beschreiben, der in Abbildung 23 graphisch dargestellt ist. Eine intrazelluläre Calcium-Konzentrationserhöhung wird durch einen Neurotransmitter (Glutamat, ACh) oder ein Pharmakon⁹³ an Glutamat- oder nACh-Rezeptoren hervorgerufen (Signal 1). Der Calcium-Einstrom bewirkt eine Konformationsänderung des NCS-Proteins VILIP-1, den *Myristoyl-Switch*, der eine Membran-Translokation des Proteins sowohl an die Zellmembran als auch an den *trans*-Golgi-Apparat⁹⁴ ermöglicht. An diesen Membranen ko-lokalisiert das Protein mit dem $\alpha_4\beta_2$ nAChR und interagiert mit ihm. Es werden Exozytose- und Recyclingprozesse induziert, die zur Translokation des Rezeptors an die Zelloberfläche führen. Zusätzlich bewirkt VILIP-1 eine Sensitivitätssteigerung des $\alpha_4\beta_2$ nAChR (Lin et al., 2002b) gegenüber ACh und Nikotin (Signal 2) und eine funktionelle Hochregulation des Rezeptors. Die Anzahl der hochaffinen $\alpha_4\beta_2$ nAChR-Bindungsstellen wird erhöht, die Liganden-Sensitivität und die

⁹³ Die Erhöhung wird *in vitro* durch Nikotin oder Carbachol erreicht.

⁹⁴ Syntaxin 6-positives TGN

Reizantwortstärke des Rezeptors nehmen zu. Entsprechend dieses Modells könnte VILIP-1 als ein Induktor und Modulator der nikotinergen Neurotransmission gewertet werden, die in komplexen Regelkreisen zur Steuerung motorischer, emotionaler und kognitiver Signale beiträgt. Somit besitzt VILIP-1 einen Einfluss auf die hippocampale Netzwerkaktivität und $\alpha_4\beta_2$ nAChR-vermittelte synaptische Plastizität.

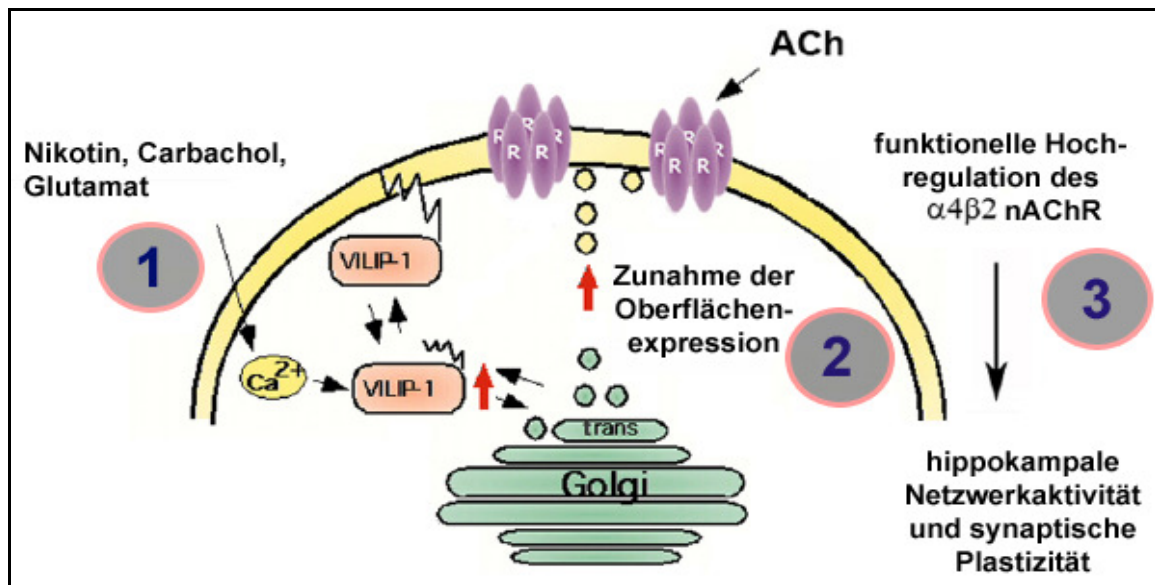


Abbildung 23. Modell der Interaktion von VILIP-1 mit dem $\alpha_4\beta_2$ nAChR und der VILIP-1 induzierten Hochregulation des $\alpha_4\beta_2$ nAChR. Modifiziert nach Zhao et al., 2008b. Es wird schematisch ein Neuron dargestellt, dessen intrazelluläre Calcium- (Ca^{2+} -) Konzentration durch beispielsweise Glutamat (1) erhöht wird. Reaktiv erfolgt bei dem EF-Hand-Protein VILIP-1 der Calcium-Myristoyl-Switch, der durch Exposition einer Fettsäure die Membranassoziation des Proteins bewirkt. Das Protein ist dabei mit dem $\alpha_4\beta_2$ nAChR am Syntaxin 6-positiven TGN und der Zellmembran ko-lokalisiert. Ausgehend vom TGN kommt es zur VILIP-1-vermittelten Induktion von Exozytose- und Recyclingprozessen des Rezeptors und darüber zu einer gesteigerten Oberflächenpräsentation (2). Neben einer vermehrten Sensitivität gegenüber Liganden nach VILIP-1-Überexpression (Lin et al., 2002b), kommt es auch zu einer erhöhten Anzahl an hochaffinen Bindungsstellen und einer gesteigerten Rezeptorantwort (funktionelle Hochregulation) auf ACh-Stimulation (Zhao et al., 2008b) (3). Diese Effekte führen zu einer gesteigerten hippocampalen Netzwerkaktivität und beeinflussen die $\alpha_4\beta_2$ nAChR-vermittelte synaptischen Plastizität.

7 Zusammenfassung

Der $\alpha_4\beta_2$ nAChR ist die im menschlichen Gehirn am Häufigsten vertretene Rezeptorisoform und vermittelt elementare physiologische, aber auch pathophysiologische Prozesse. Der Rezeptor ist ein wichtiger Modulator der Neurotransmission, indem er die Ausschüttung der Neurotransmitter Glutamat, Dopamin und GABA reguliert. Eine besondere Bedeutung hat er innerhalb der Hippokampusformation inne, wo er als Vermittler synaptischer Plastizität fungiert und im Rahmen dessen Gedächtnisbildung und Lernen moduliert. Aufgrund dieser komplexen Funktionen nimmt der $\alpha_4\beta_2$ nAChR auch eine zentrale Rolle in Pathophysiologien verschiedener neurologischer (DAT, Morbus Parkinson, ADNFLE) und psychiatrischer (Schizophrenie, Angsterkrankungen) Erkrankungen ein.

Über die lange zytoplasmatische Schleife der α_4 -Untereinheit ist der Rezeptor in der Lage, verschiedene Interaktionen einzugehen. So auch mit dem NCS-Protein VILIP-1. VILIP-1 ist ein NCS-Protein, das in der Lage ist, reversibel Calcium-abhängig an subzelluläre und Zellmembranen zu binden. Es ist bekannt, dass VILIP-1 mit weiteren Rezeptoren interagiert. So beeinflusst das Protein den Clathrin-abhängigen Rezeptortransport des Transferrinrezeptors und der GC-B. Die Interaktion mit dem $\alpha_4\beta_2$ nAChR konnte bisher im Zellkulturmodell und in Oozyten nachgewiesen werden, wo VILIP-1 das Vorkommen des Rezeptors an der Zellmembran und die Sensitivität gegenüber Agonisten erhöht.

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels immunfluoreszenzchemischer Untersuchungen erstmals eine Interaktion von VILIP-1 und dem $\alpha_4\beta_2$ nAChR in der primären hippokampalen Neuronenkultur nachgewiesen werden. Weiterführend konnte der Golgi-Apparat als Ort der Einflussnahme herausgestellt werden. Sowohl VILIP-1 als auch der Rezeptor ko-lokalisieren Calcium-abhängig am TGN. Es ist anzunehmen, dass dort die Translokation des Rezeptors an die Oberfläche, nach Calcium-Einstrom, initiiert wird. Als möglicher Mechanismus konnte zum Einen der Einfluss auf Recyclingprozesse Syntaxin 6 positiver Stachelsaumvesikel (*Clathrin-coated vesicles*) dargestellt werden. Zum Anderen scheint auch eine Beeinflussung der Exozytose, gezeigt in pharmakologischen Experimenten, stattzufinden.

Eine weitere Folge der Protein-Rezeptor-Interaktion ist die Steigerung der Sensitivität und des Rezeptorvorkommens (an Membranen) des $\alpha_4\beta_2$ nAChR. In diesem Zusammenhang erfolgt ein vermehrtes Vorkommen hochaffiner Bindungsstellen und eine erhöhte Reizantwortstärke auf ACh-Stimulation in hippokampalen Neuronen. VILIP-1 kann über diese funktionelle Hochregulation des $\alpha_4\beta_2$ nAChR die nikotinerge Neurotransmission (Prozesse synaptischer Plastizität) und Interneuronaktivität modulieren. Des Weiteren kann eine Hypothese zur Rolle von VILIP-1 in der Pathophysiologie der DAT und Schizophrenie diskutiert werden.

Literaturverzeichnis

- Abraham, W. C. and Tate, W. P., 1997. Metaplasticity: a new vista across the field of synaptic plasticity. *Prog Neurobiol.* 52, 303-323.
- Addington, J., el-Guebaly, N., Addington, D. and Hodgins, D., 1997. Readiness to stop smoking in schizophrenia. *Can J Psychiatry.* 42, 49-52.
- Adler, L. E., Olincy, A., Waldo, M., Harris, J. G., Griffith, J., Stevens, K., Flach, K., Nagamoto, H., Bickford, P., Leonard, S. and Freedman, R., 1998. Schizophrenia, sensory gating, and nicotinic receptors. *Schizophr Bull.* 24, 189-202.
- AhnAllen, C. G., Nestor, P. G., Shenton, M. E., McCarley, R. W. and Niznikiewicz, M. A., 2008. Early nicotine withdrawal and transdermal nicotine effects on neurocognitive performance in schizophrenia. *Schizophr Res.* 100, 261-269.
- Albuquerque, E. X., Alkondon, M., Pereira, E. F., Castro, N. G., Schratzenholz, A., Barbosa, C. T., Bonfante-Cabarcas, R., Aracava, Y., Eisenberg, H. M. and Maelicke, A., 1997. Properties of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: pharmacological characterization and modulation of synaptic function. *J Pharmacol Exp Ther.* 280, 1117-1136.
- Albuquerque, E. X., Pereira, E. F., Mike, A., Eisenberg, H. M., Maelicke, A. and Alkondon, M., 2000. Neuronal nicotinic receptors in synaptic functions in humans and rats: physiological and clinical relevance. *Behav Brain Res.* 113, 131-141.
- Alkondon, M. and Albuquerque, E. X., 2004. The nicotinic acetylcholine receptor subtypes and their function in the hippocampus and cerebral cortex. *Prog Brain Res.* 145, 109-120.
- Alkondon, M., Pereira, E. F., Eisenberg, H. M. and Albuquerque, E. X., 1999. Choline and selective antagonists identify two subtypes of nicotinic acetylcholine receptors that modulate GABA release from CA1 interneurons in rat hippocampal slices. *J Neurosci.* 19, 2693-2705.
- Alkondon, M., Pereira, E. F., Eisenberg, H. M. and Albuquerque, E. X., 2000. Nicotinic receptor activation in human cerebral cortical interneurons: a mechanism for inhibition and disinhibition of neuronal networks. *J Neurosci.* 20, 66-75.
- An, W. F., Bowlby, M. R., Betty, M., Cao, J., Ling, H. P., Mendoza, G., Hinson, J. W., Mattsson, K. I., Strassle, B. W., Trimmer, J. S. and Rhodes, K. J., 2000.

- Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature*. 403, 553-556.
- Araki, H., Suemaru, K. and Gomita, Y., 2002. Neuronal nicotinic receptor and psychiatric disorders: functional and behavioral effects of nicotine. *Jpn J Pharmacol*. 88, 133-138.
- Arthur, D. and Levin, E. D., 2002. Chronic inhibition of alpha4beta2 nicotinic receptors in the ventral hippocampus of rats: impacts on memory and nicotine response. *Psychopharmacology (Berl)*. 160, 140-145.
- Bahring, R., Dannenberg, J., Peters, H. C., Leicher, T., Pongs, O. and Isbrandt, D., 2001. Conserved Kv4 N-terminal domain critical for effects of Kv channel-interacting protein 2.2 on channel expression and gating. *J Biol Chem*. 276, 23888-23894.
- Bashir, Z. I., Jane, D. E., Sunter, D. C., Watkins, J. C. and Collingridge, G. L., 1993. Metabotropic glutamate receptors contribute to the induction of long-term depression in the CA1 region of the hippocampus. *Eur J Pharmacol*. 239, 265-266.
- Bate, L. and Gardiner, M., 1999. Molecular genetics of human epilepsies. *Expert Rev Mol Med*. 1999, 1-22.
- Benes, F. M. and Berretta, S., 2001. GABAergic interneurons: implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology*. 25, 1-27.
- Bernstein, H. G., Baumann, B., Danos, P., Diekmann, S., Bogerts, B., Gundelfinger, E. D. and Braunewell, K. H., 1999. Regional and cellular distribution of neural visinin-like protein immunoreactivities (VILIP-1 and VILIP-3) in human brain. *J Neurocytol*. 28, 655-662.
- Bernstein, H. G., Becker, A., Keilhoff, G., Spilker, C., Gorczyca, W. A., Braunewell, K. H. and Grecksch, G., 2003. Brain region-specific changes in the expression of calcium sensor proteins after repeated applications of ketamine to rats. *Neurosci Lett*. 339, 95-98.
- Bernstein, H. G., Braunewell, K. H., Spilker, C., Danos, P., Baumann, B., Funke, S., Diekmann, S., Gundelfinger, E. D. and Bogerts, B., 2002. Hippocampal expression of the calcium sensor protein visinin-like protein-1 in schizophrenia. *Neuroreport*. 13, 393-396.

- Bliss, T. V. and Lomo, T., 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol.* 232, 331-356.
- Blondeau, F., Ritter, B., Allaire, P. D., Wasiak, S., Girard, M., Hussain, N. K., Angers, A., Legendre-Guillemain, V., Roy, L., Boismenu, D., Kearney, R. E., Bell, A. W., Bergeron, J. J. and McPherson, P. S., 2004. Tandem MS analysis of brain clathrin-coated vesicles reveals their critical involvement in synaptic vesicle recycling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 3833-3838.
- Bock, J. B., Klumperman, J., Davanger, S. and Scheller, R. H., 1997. Syntaxin 6 functions in trans-Golgi network vesicle trafficking. *Mol Biol Cell.* 8, 1261-1271.
- Boekhoff, I., Braunewell, K. H., Andreini, I., Breer, H. and Gundelfinger, E., 1997. The calcium-binding protein VILIP in olfactory neurons: regulation of second messenger signaling. *Eur J Cell Biol.* 72, 151-158.
- Bote, R. P., Blazquez-Llorca, L., Fernandez-Gil, M. A., Alonso-Nanclares, L., Munoz, A. and De Felipe, J., 2008. Hippocampal sclerosis: histopathology substrate and magnetic resonance imaging. *Semin Ultrasound CT MR.* 29, 2-14.
- Braak, H. and Braak, E., 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82, 239-259.
- Brackmann, M., Schuchmann, S., Anand, R. and Braunewell, K. H., 2005. Neuronal Ca²⁺ sensor protein VILIP-1 affects cGMP signalling of guanylyl cyclase B by regulating clathrin-dependent receptor recycling in hippocampal neurons. *J Cell Sci.* 118, 2495-2505.
- Brackmann, M., Zhao, C., Schmieden, V. and Braunewell, K. H., 2004. Cellular and subcellular localization of the inhibitory glycine receptor in hippocampal neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 324, 1137-1142.
- Braga, M. F., Pereira, E. F., Mike, A. and Albuquerque, E. X., 2004. Pb²⁺ via protein kinase C inhibits nicotinic cholinergic modulation of synaptic transmission in the hippocampus. *J Pharmacol Exp Ther.* 311, 700-710.
- Braunewell, K., Riederer, P., Spilker, C., Gundelfinger, E. D., Bogerts, B. and Bernstein, H. G., 2001a. Abnormal localization of two neuronal calcium sensor proteins, visinin-like proteins (vilips)-1 and -3, in neocortical brain areas of Alzheimer disease patients. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 12, 110-116.

- Braunewell, K. H., 2005. The darker side of Ca²⁺ signaling by neuronal Ca²⁺-sensor proteins: from Alzheimer's disease to cancer. *Trends Pharmacol Sci.* 26, 345-351.
- Braunewell, K. H., Brackmann, M. and Manahan-Vaughan, D., 2003. Group I mGlu receptors regulate the expression of the neuronal calcium sensor protein VILIP-1 in vitro and in vivo: implications for mGlu receptor-dependent hippocampal plasticity? *Neuropharmacology.* 44, 707-715.
- Braunewell, K. H., Brackmann, M., Schaupp, M., Spilker, C., Anand, R. and Gundelfinger, E. D., 2001b. Intracellular neuronal calcium sensor (NCS) protein VILIP-1 modulates cGMP signalling pathways in transfected neural cells and cerebellar granule neurones. *J Neurochem.* 78, 1277-1286.
- Braunewell, K. H. and Gundelfinger, E. D., 1999. Intracellular neuronal calcium sensor proteins: a family of EF-hand calcium-binding proteins in search of a function. *Cell Tissue Res.* 295, 1-12.
- Braunewell, K. H., Spilker, C., Behnisch, T. and Gundelfinger, E. D., 1997. The neuronal calcium-sensor protein VILIP modulates cyclic AMP accumulation in stably transfected C6 glioma cells: amino-terminal myristoylation determines functional activity. *J Neurochem.* 68, 2129-2139.
- Briggs, C. A., Gubbins, E. J., Marks, M. J., Putman, C. B., Thimmapaya, R., Meyer, M. D. and Surowy, C. S., 2006. Untranslated region-dependent exclusive expression of high-sensitivity subforms of alpha4beta2 and alpha3beta2 nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol.* 70, 227-240.
- Buccafusco, J. J., Letchworth, S. R., Bencherif, M. and Lippiello, P. M., 2005. Long-lasting cognitive improvement with nicotinic receptor agonists: mechanisms of pharmacokinetic-pharmacodynamic discordance. *Trends Pharmacol Sci.* 26, 352-360.
- Buisson, B. and Bertrand, D., 2001. Chronic exposure to nicotine upregulates the human (alpha)4((beta)2 nicotinic acetylcholine receptor function. *J Neurosci.* 21, 1819-1829.
- Buisson, B. and Bertrand, D., 2002. Nicotine addiction: the possible role of functional upregulation. *Trends Pharmacol Sci.* 23, 130-136.
- Burgoyne, R. D., 2007. Neuronal calcium sensor proteins: generating diversity in neuronal Ca²⁺ signalling. *Nat Rev Neurosci.* 8, 182-193.

- Burgoyne, R. D. and Weiss, J. L., 2001. The neuronal calcium sensor family of Ca²⁺-binding proteins. *Biochem J.* 353, 1-12.
- Buxbaum, J. D., 2004. A role for calsenilin and related proteins in multiple aspects of neuronal function. *Biochem Biophys Res Commun.* 322, 1140-1144.
- Carafoli, E., 2005. Calcium--a universal carrier of biological signals. Delivered on 3 July 2003 at the Special FEBS Meeting in Brussels. *Febs J.* 272, 1073-1089.
- Champtiaux, N. and Changeux, J. P., 2004. Knockout and knockin mice to investigate the role of nicotinic receptors in the central nervous system. *Prog Brain Res.* 145, 235-251.
- Champtiaux, N., Gotti, C., Cordero-Erausquin, M., David, D. J., Przybylski, C., Lena, C., Clementi, F., Moretti, M., Rossi, F. M., Le Novere, N., McIntosh, J. M., Gardier, A. M. and Changeux, J. P., 2003. Subunit composition of functional nicotinic receptors in dopaminergic neurons investigated with knock-out mice. *J Neurosci.* 23, 7820-7829.
- Chen, C. K., 2002. Recoverin and rhodopsin kinase. *Adv Exp Med Biol.* 514, 101-107.
- Chen, X. L., Zhong, Z. G., Yokoyama, S., Bark, C., Meister, B., Berggren, P. O., Roder, J., Higashida, H. and Jeromin, A., 2001. Overexpression of rat neuronal calcium sensor-1 in rodent NG108-15 cells enhances synapse formation and transmission. *J Physiol.* 532, 649-659.
- Collingridge, G. L., Kehl, S. J. and McLennan, H., 1983. The antagonism of amino acid-induced excitations of rat hippocampal CA1 neurones in vitro. *J Physiol.* 334, 19-31.
- Combi, R., Dalpra, L., Tenchini, M. L. and Ferini-Strambi, L., 2004. Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy--a critical overview. *J Neurol.* 251, 923-934.
- Cooper, J. A., Sagar, H. J., Doherty, S. M., Jordan, N., Tidswell, P. and Sullivan, E. V., 1992. Different effects of dopaminergic and anticholinergic therapies on cognitive and motor function in Parkinson's disease. A follow-up study of untreated patients. *Brain.* 115 (Pt 6), 1701-1725.
- Corringer, P. J., Sallette, J. and Changeux, J. P., 2006. Nicotine enhances intracellular nicotinic receptor maturation: a novel mechanism of neural plasticity? *J Physiol Paris.* 99, 162-171.
- Couey, J. J., Meredith, R. M., Spijker, S., Poorthuis, R. B., Smit, A. B., Brussaard, A. B. and Mansvelder, H. D., 2007. Distributed network actions by nicotine increase

- the threshold for spike-timing-dependent plasticity in prefrontal cortex. *Neuron*. 54, 73-87.
- Covernton, P. O. and Lester, R. A., 2002. Prolonged stimulation of presynaptic nicotinic acetylcholine receptors in the rat interpeduncular nucleus has differential effects on transmitter release. *Int J Dev Neurosci*. 20, 247-258.
- Darsow, T., Booker, T. K., Pina-Crespo, J. C. and Heinemann, S. F., 2005. Exocytic trafficking is required for nicotine-induced up-regulation of alpha 4 beta 2 nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem*. 280, 18311-18320.
- Daviss, S. R. and Lewis, D. A., 1995. Local circuit neurons of the prefrontal cortex in schizophrenia: selective increase in the density of calbindin-immunoreactive neurons. *Psychiatry Res*. 59, 81-96.
- De Castro, E., Nef, S., Fiumelli, H., Lenz, S. E., Kawamura, S. and Nef, P., 1995. Regulation of rhodopsin phosphorylation by a family of neuronal calcium sensors. *Biochem Biophys Res Commun*. 216, 133-140.
- De Luca, V., Voineskos, S., Wong, G. and Kennedy, J. L., 2006. Genetic interaction between alpha4 and beta2 subunits of high affinity nicotinic receptor: analysis in schizophrenia. *Exp Brain Res*. 174, 292-296.
- Dudek, S. M. and Bear, M. F., 1992. Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89, 4363-4367.
- Eckman, C. B. and Eckman, E. A., 2007. An update on the amyloid hypothesis. *Neurol Clin*. 25, 669-682, vi.
- Engel, J., Jr., 2001. Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned? *Neuroscientist*. 7, 340-352.
- Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M. and Danielsen, M., 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84, 7413-7417.
- Freedman, R., Olincy, A., Buchanan, R. W., Harris, J. G., Gold, J. M., Johnson, L., Allensworth, D., Guzman-Bonilla, A., Clement, B., Ball, M. P., Kutnick, J., Pender, V., Martin, L. F., Stevens, K. E., Wagner, B. D., Zerbe, G. O., Soti, F. and Kem, W. R., 2008. Initial Phase 2 Trial of a Nicotinic Agonist in Schizophrenia. *Am J Psychiatry*.

- Frey, U., Krug, M., Reymann, K. G. and Matthies, H., 1988. Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, blocks late phases of LTP phenomena in the hippocampal CA1 region in vitro. *Brain Res.* 452, 57-65.
- Fucile, S., 2004. Ca²⁺ permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium.* 35, 1-8.
- Ge, S. and Dani, J. A., 2005. Nicotinic acetylcholine receptors at glutamate synapses facilitate long-term depression or potentiation. *J Neurosci.* 25, 6084-6091.
- Genin, A., Davis, S., Meziane, H., Doyere, V., Jeromin, A., Roder, J., Mallet, J. and Laroche, S., 2001. Regulated expression of the neuronal calcium sensor-1 gene during long-term potentiation in the dentate gyrus in vivo. *Neuroscience.* 106, 571-577.
- Giacobini, E., 2003. Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease. *Neurochem Res.* 28, 515-522.
- Gierke, P., Zhao, C., Bernstein, H. G., Noack, C., Anand, R., Heinemann, U. and Braunevel, K. H., 2008. Implication of neuronal Ca²⁺ -sensor protein VILIP-1 in the glutamate hypothesis of schizophrenia. *Neurobiol Dis.* 32, 162-175.
- Gomez, M., De Castro, E., Guarin, E., Sasakura, H., Kuhara, A., Mori, I., Bartfai, T., Bargmann, C. I. and Nef, P., 2001. Ca²⁺ signaling via the neuronal calcium sensor-1 regulates associative learning and memory in *C. elegans*. *Neuron.* 30, 241-248.
- Gotti, C. and Clementi, F., 2004. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol.* 74, 363-396.
- Gotti, C., Moretti, M., Bohr, I., Ziabreva, I., Vailati, S., Longhi, R., Riganti, L., Gaimarri, A., McKeith, I. G., Perry, R. H., Aarsland, D., Larsen, J. P., Sher, E., Beattie, R., Clementi, F. and Court, J. A., 2006. Selective nicotinic acetylcholine receptor subunit deficits identified in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies by immunoprecipitation. *Neurobiol Dis.* 23, 481-489.
- Grady, S. R., Salminen, O., Laverty, D. C., Whiteaker, P., McIntosh, J. M., Collins, A. C. and Marks, M. J., 2007. The subtypes of nicotinic acetylcholine receptors on dopaminergic terminals of mouse striatum. *Biochem Pharmacol.* 74, 1235-1246.
- Griffiths, G. and Simons, K., 1986. The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science.* 234, 438-443.
- Gsell, W., Jungkunz, G. and Riederer, P., 2004. Functional neurochemistry of Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des.* 10, 265-293.

- Gu, F., Crump, C. M. and Thomas, G., 2001. Trans-Golgi network sorting. *Cell Mol Life Sci.* 58, 1067-1084.
- Guan, Z. Z., Zhang, X., Ravid, R. and Nordberg, A., 2000. Decreased protein levels of nicotinic receptor subunits in the hippocampus and temporal cortex of patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 74, 237-243.
- Han, L., Agostini, J. V. and Allore, H. G., 2008. Cumulative anticholinergic exposure is associated with poor memory and executive function in older men. *J Am Geriatr Soc.* 56, 2203-2210.
- Harrison, P. J., 1999. The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain.* 122 (Pt 4), 593-624.
- Haynes, L. P., Thomas, G. M. and Burgoyne, R. D., 2005. Interaction of neuronal calcium sensor-1 and ADP-ribosylation factor 1 allows bidirectional control of phosphatidylinositol 4-kinase beta and trans-Golgi network-plasma membrane traffic. *J Biol Chem.* 280, 6047-6054.
- Heizmann, C. W., 1993. Calcium signaling in the brain. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 53, 15-23.
- Heizmann, C. W. and Braun, K., 1992. Changes in Ca(2+)-binding proteins in human neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci.* 15, 259-264.
- Hogg, R. C., Raggenbass, M. and Bertrand, D., 2003. Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 147, 1-46.
- Ikura, M. and Ames, J. B., 2006. Genetic polymorphism and protein conformational plasticity in the calmodulin superfamily: two ways to promote multifunctionality. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 1159-1164.
- Ivings, L., Pennington, S. R., Jenkins, R., Weiss, J. L. and Burgoyne, R. D., 2002. Identification of Ca²⁺-dependent binding partners for the neuronal calcium sensor protein neurocalcin delta: interaction with actin, clathrin and tubulin. *Biochem J.* 363, 599-608.
- Jacobsen, L. K., D'Souza, D. C., Mencl, W. E., Pugh, K. R., Skudlarski, P. and Krystal, J. H., 2004. Nicotine effects on brain function and functional connectivity in schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 55, 850-858.
- Jacobson, D. A., Cho, J., Landa, L. R., Jr., Tamarina, N. A., Roe, M. W., Buxbaum, J. D. and Philipson, L. H., 2006. Downstream regulatory element antagonistic modulator regulates islet prodynorphin expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 291, E587-595.

- Ji, D., Lape, R. and Dani, J. A., 2001. Timing and location of nicotinic activity enhances or depresses hippocampal synaptic plasticity. *Neuron*. 31, 131-141.
- Kabbani, N., Negyessy, L., Lin, R., Goldman-Rakic, P. and Levenson, R., 2002. Interaction with neuronal calcium sensor NCS-1 mediates desensitization of the D2 dopamine receptor. *J Neurosci*. 22, 8476-8486.
- Kajimoto, Y., Shirakawa, O., Kuno, T., Nishino, N. and Nakai, H., 1995. Delayed changes in neural visinin-like calcium-binding protein gene expression caused by acute phencyclidine administration. *J Neural Transm Gen Sect*. 100, 257-262.
- Karlin, A., 2002. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Rev Neurosci*. 3, 102-114.
- Kawamura, S., Kuwata, O., Yamada, M., Matsuda, S., Hisatomi, O. and Tokunaga, F., 1996. Photoreceptor protein s26, a cone homologue of S-modulin in frog retina. *J Biol Chem*. 271, 21359-21364.
- Kawamura, S. and Tachibanaki, S., 2002. S-modulin. *Adv Exp Med Biol*. 514, 61-68.
- Kelton, M. C., Kahn, H. J., Conrath, C. L. and Newhouse, P. A., 2000. The effects of nicotine on Parkinson's disease. *Brain Cogn*. 43, 274-282.
- Kenney, J. W. and Gould, T. J., 2008. Modulation of hippocampus-dependent learning and synaptic plasticity by nicotine. *Mol Neurobiol*. 38, 101-121.
- Kesner, R. P., Lee, I. and Gilbert, P., 2004. A behavioral assessment of hippocampal function based on a subregional analysis. *Rev Neurosci*. 15, 333-351.
- Korhonen, L., Hansson, I., Kukkonen, J. P., Brannvall, K., Kobayashi, M., Takamatsu, K. and Lindholm, D., 2005. Hippocalcin protects against caspase-12-induced and age-dependent neuronal degeneration. *Mol Cell Neurosci*. 28, 85-95.
- Krishnan, A., Venkataraman, V., Fik-Rymarkiewicz, E., Duda, T. and Sharma, R. K., 2004. Structural, biochemical, and functional characterization of the calcium sensor neurocalcin delta in the inner retinal neurons and its linkage with the rod outer segment membrane guanylate cyclase transduction system. *Biochemistry*. 43, 2708-2723.
- Krug, M., Lossner, B. and Ott, T., 1984. Anisomycin blocks the late phase of long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats. *Brain Res Bull*. 13, 39-42.
- Kuliawat, R., Kalinina, E., Bock, J., Fricker, L., McGraw, T. E., Kim, S. R., Zhong, J., Scheller, R. and Arvan, P., 2004. Syntaxin-6 SNARE involvement in secretory and endocytic pathways of cultured pancreatic beta-cells. *Mol Biol Cell*. 15, 1690-1701.

- Kumari, V. and Postma, P., 2005. Nicotine use in schizophrenia: the self medication hypotheses. *Neurosci Biobehav Rev.* 29, 1021-1034.
- Kuno, T., Kajimoto, Y., Hashimoto, T., Mukai, H., Shirai, Y., Saheki, S. and Tanaka, C., 1992. cDNA cloning of a neural visinin-like Ca(2+)-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 184, 1219-1225.
- Lenz, S. E., Henschel, Y., Zopf, D., Voss, B. and Gundelfinger, E. D., 1992. VILIP, a cognate protein of the retinal calcium binding proteins visinin and recoverin, is expressed in the developing chicken brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 15, 133-140.
- Lidow, M. S., 2003. Calcium signaling dysfunction in schizophrenia: a unifying approach. *Brain Res Brain Res Rev.* 43, 70-84.
- Lin, L., Braunewell, K. H., Gundelfinger, E. D. and Anand, R., 2002a. Functional analysis of calcium-binding EF-hand motifs of visinin-like protein-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 296, 827-832.
- Lin, L., Jeanclos, E. M., Treuil, M., Braunewell, K. H., Gundelfinger, E. D. and Anand, R., 2002b. The calcium sensor protein visinin-like protein-1 modulates the surface expression and agonist sensitivity of the alpha 4beta 2 nicotinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem.* 277, 41872-41878.
- Loring, J. F., Wen, X., Lee, J. M., Seilhamer, J. and Somogyi, R., 2001. A gene expression profile of Alzheimer's disease. *DNA Cell Biol.* 20, 683-695.
- Lynch, M. A., 2004. Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev.* 84, 87-136.
- MacDonald, J. F., Jackson, M. F. and Beazely, M. A., 2006. Hippocampal long-term synaptic plasticity and signal amplification of NMDA receptors. *Crit Rev Neurobiol.* 18, 71-84.
- Mammen, A., Simpson, P. J., Nighorn, A., Imanishi, Y., Palczewski, K., Ronnett, G. V. and Moon, C., 2004. Hippocalcin in the olfactory epithelium: a mediator of second messenger signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 322, 1131-1139.
- Marini, C. and Guerrini, R., 2007. The role of the nicotinic acetylcholine receptors in sleep-related epilepsy. *Biochem Pharmacol.* 74, 1308-1314.
- Marques, C. M., Caboclo, L. O., da Silva, T. I., Noffs, M. H., Carrete, H., Jr., Lin, K., Lin, J., Sakamoto, A. C. and Yacubian, E. M., 2007. Cognitive decline in temporal lobe epilepsy due to unilateral hippocampal sclerosis. *Epilepsy Behav.* 10, 477-485.

- Martin, S. J., Grimwood, P. D. and Morris, R. G., 2000. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci.* 23, 649-711.
- Martin-Ruiz, C. M., Court, J. A., Molnar, E., Lee, M., Gotti, C., Mamalaki, A., Tsouloufis, T., Tzartos, S., Ballard, C., Perry, R. H. and Perry, E. K., 1999. Alpha4 but not alpha3 and alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subunits are lost from the temporal cortex in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 73, 1635-1640.
- Massey, P. V. and Bashir, Z. I., 2007. Long-term depression: multiple forms and implications for brain function. *Trends Neurosci.* 30, 176-184.
- Mattson, M. P., 2007. Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell.* 6, 337-350.
- Mattson, M. P., Cheng, B., Davis, D., Bryant, K., Lieberburg, I. and Rydel, R. E., 1992. beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci.* 12, 376-389.
- Mattson, M. P., Rychlik, B., Chu, C. and Christakos, S., 1991. Evidence for calcium-reducing and excito-protective roles for the calcium-binding protein calbindin-D28k in cultured hippocampal neurons. *Neuron.* 6, 41-51.
- Maxfield, F. R. and McGraw, T. E., 2004. Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5, 121-132.
- McGehee, D. S., Heath, M. J., Gelber, S., Devay, P. and Role, L. W., 1995. Nicotine enhancement of fast excitatory synaptic transmission in CNS by presynaptic receptors. *Science.* 269, 1692-1696.
- McGuinness, N., Anwyl, R. and Rowan, M., 1991. The effects of trans-ACPD on long-term potentiation in the rat hippocampal slice. *Neuroreport.* 2, 688-690.
- Meyer, C., Zizioli, D., Lausmann, S., Eskelinen, E. L., Hamann, J., Saftig, P., von Figura, K. and Schu, P., 2000. mu1A-adaptin-deficient mice: lethality, loss of AP-1 binding and rerouting of mannose 6-phosphate receptors. *Embo J.* 19, 2193-2203.
- Milner, B., 1959. The memory defect in bilateral hippocampal lesions. *Psychiatr Res Rep Am Psychiatr Assoc.* 11, 43-58.
- Milner, B. and Penfield, W., 1955. The effect of hippocampal lesions on recent memory. *Trans Am Neurol Assoc.* 42-48.
- Misumi, Y., Miki, K., Takatsuki, A., Tamura, G. and Ikehara, Y., 1986. Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem.* 261, 11398-11403.

- Mockett, B. G. and Hulme, S. R., 2008. Metaplasticity: new insights through electrophysiological investigations. *J Integr Neurosci.* 7, 315-336.
- Morohashi, Y., Hatano, N., Ohya, S., Takikawa, R., Watabiki, T., Takasugi, N., Imaizumi, Y., Tomita, T. and Iwatsubo, T., 2002. Molecular cloning and characterization of CALP/KChIP4, a novel EF-hand protein interacting with presenilin 2 and voltage-gated potassium channel subunit Kv4. *J Biol Chem.* 277, 14965-14975.
- Nashmi, R., Xiao, C., Deshpande, P., McKinney, S., Grady, S. R., Whiteaker, P., Huang, Q., McClure-Begley, T., Lindstrom, J. M., Labarca, C., Collins, A. C., Marks, M. J. and Lester, H. A., 2007. Chronic nicotine cell specifically upregulates functional alpha 4* nicotinic receptors: basis for both tolerance in midbrain and enhanced long-term potentiation in perforant path. *J Neurosci.* 27, 8202-8218.
- Nguyen, P. V., Abel, T. and Kandel, E. R., 1994. Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP. *Science.* 265, 1104-1107.
- Nowycky, M. C. and Thomas, A. P., 2002. Intracellular calcium signaling. *J Cell Sci.* 115, 3715-3716.
- O'Callaghan, D. W., Hasdemir, B., Leighton, M. and Burgoyne, R. D., 2003. Residues within the myristoylation motif determine intracellular targeting of the neuronal Ca²⁺ sensor protein KChIP1 to post-ER transport vesicles and traffic of Kv4 K⁺ channels. *J Cell Sci.* 116, 4833-4845.
- Olincy, A., Young, D. A. and Freedman, R., 1997. Increased levels of the nicotine metabolite cotinine in schizophrenic smokers compared to other smokers. *Biol Psychiatry.* 42, 1-5.
- Palczewski, K., Sokal, I. and Baehr, W., 2004. Guanylate cyclase-activating proteins: structure, function, and diversity. *Biochem Biophys Res Commun.* 322, 1123-1130.
- Palmer, C. L., Lim, W., Hastie, P. G., Toward, M., Korolchuk, V. I., Burbidge, S. A., Banting, G., Collingridge, G. L., Isaac, J. T. and Henley, J. M., 2005. Hippocampal functions as a calcium sensor in hippocampal LTD. *Neuron.* 47, 487-494.
- Patkar, A. A., Gopalakrishnan, R., Lundy, A., Leone, F. T., Certa, K. M. and Weinstein, S. P., 2002. Relationship between tobacco smoking and positive and negative symptoms in schizophrenia. *J Nerv Ment Dis.* 190, 604-610.

- Perez, X. A., Bordia, T., McIntosh, J. M., Grady, S. R. and Quik, M., 2008. Long-term nicotine treatment differentially regulates striatal $\alpha 6\alpha 4\beta 2^*$ and $\alpha 6(\text{non}\alpha 4)\beta 2^*$ nAChR expression and function. *Mol Pharmacol.* 74, 844-853.
- Perry, E., Martin-Ruiz, C., Lee, M., Griffiths, M., Johnson, M., Piggott, M., Haroutunian, V., Buxbaum, J. D., Nasland, J., Davis, K., Gotti, C., Clementi, F., Tzartos, S., Cohen, O., Soreq, H., Jaros, E., Perry, R., Ballard, C., McKeith, I. and Court, J., 2000. Nicotinic receptor subtypes in human brain ageing, Alzheimer and Lewy body diseases. *Eur J Pharmacol.* 393, 215-222.
- Perry, E. K., Morris, C. M., Court, J. A., Cheng, A., Fairbairn, A. F., McKeith, I. G., Irving, D., Brown, A. and Perry, R. H., 1995. Alteration in nicotine binding sites in Parkinson's disease, Lewy body dementia and Alzheimer's disease: possible index of early neuropathology. *Neuroscience.* 64, 385-395.
- Petrovic, M., Horak, M., Sedlacek, M. and Vyklicky, L., Jr., 2005. Physiology and pathology of NMDA receptors. *Prague Med Rep.* 106, 113-136.
- Picard, F., Bruel, D., Servent, D., Saba, W., Fruchart-Gaillard, C., Schollhorn-Peyronneau, M. A., Roumenov, D., Brodtkorb, E., Zuberi, S., Gambardella, A., Steinborn, B., Hufnagel, A., Valette, H. and Bottlaender, M., 2006. Alteration of the in vivo nicotinic receptor density in ADNFLE patients: a PET study. *Brain.* 129, 2047-2060.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. and Cormier, M. J., 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene.* 111, 229-233.
- Radcliffe, K. A., Fisher, J. L., Gray, R. and Dani, J. A., 1999. Nicotinic modulation of glutamate and GABA synaptic transmission of hippocampal neurons. *Ann N Y Acad Sci.* 868, 591-610.
- Ren, X. Q., Cheng, S. B., Treuil, M. W., Mukherjee, J., Rao, J., Braunewell, K. H., Lindstrom, J. M. and Anand, R., 2005. Structural determinants of $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor trafficking. *J Neurosci.* 25, 6676-6686.
- Reynolds, G. P. and Harte, M. K., 2007. The neuronal pathology of schizophrenia: molecules and mechanisms. *Biochem Soc Trans.* 35, 433-436.
- Ross, S. A., Wong, J. Y., Clifford, J. J., Kinsella, A., Massalas, J. S., Horne, M. K., Scheffer, I. E., Kola, I., Waddington, J. L., Berkovic, S. F. and Drago, J., 2000.

- Phenotypic characterization of an alpha 4 neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit knock-out mouse. *J Neurosci.* 20, 6431-6441.
- Rossi, F. M., Pizzorusso, T., Porciatti, V., Marubio, L. M., Maffei, L. and Changeux, J. P., 2001. Requirement of the nicotinic acetylcholine receptor beta 2 subunit for the anatomical and functional development of the visual system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 6453-6458.
- Sakai, T., Oshima, A., Nozaki, Y., Ida, I., Haga, C., Akiyama, H., Nakazato, Y. and Mikuni, M., 2008. Changes in density of calcium-binding-protein-immunoreactive GABAergic neurons in prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropathology.* 28, 143-150.
- Schaub, M. C. and Heizmann, C. W., 2008. Calcium, troponin, calmodulin, S100 proteins: from myocardial basics to new therapeutic strategies. *Biochem Biophys Res Commun.* 369, 247-264.
- Schliebs, R. and Arendt, T., 2006. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* 113, 1625-1644.
- Schnurra, I., Bernstein, H. G., Riederer, P. and Braunevel, K. H., 2001. The neuronal calcium sensor protein VILIP-1 is associated with amyloid plaques and extracellular tangles in Alzheimer's disease and promotes cell death and tau phosphorylation in vitro: a link between calcium sensors and Alzheimer's disease? *Neurobiol Dis.* 8, 900-909.
- Shafae, N., Houg, M., Truong, A., Viseshakul, N., Figl, A., Sandhu, S., Forsayeth, J. R., Dwoskin, L. P., Crooks, P. A. and Cohen, B. N., 1999. Pharmacological similarities between native brain and heterologously expressed alpha4beta2 nicotinic receptors. *Br J Pharmacol.* 128, 1291-1299.
- Shibata, R., Misonou, H., Campomanes, C. R., Anderson, A. E., Schrader, L. A., Doliveira, L. C., Carroll, K. I., Sweatt, J. D., Rhodes, K. J. and Trimmer, J. S., 2003. A fundamental role for KChIPs in determining the molecular properties and trafficking of Kv4.2 potassium channels. *J Biol Chem.* 278, 36445-36454.
- Sine, S. M., 2002. The nicotinic receptor ligand binding domain. *J Neurobiol.* 53, 431-446.
- Sippy, T., Cruz-Martin, A., Jeromin, A. and Schweizer, F. E., 2003. Acute changes in short-term plasticity at synapses with elevated levels of neuronal calcium sensor-1. *Nat Neurosci.* 6, 1031-1038.

- Sollner, T., Bennett, M. K., Whiteheart, S. W., Scheller, R. H. and Rothman, J. E., 1993. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell*. 75, 409-418.
- Sorkina, T., Bild, A., Tebar, F. and Sorkin, A., 1999. Clathrin, adaptors and eps15 in endosomes containing activated epidermal growth factor receptors. *J Cell Sci*. 112 (Pt 3), 317-327.
- Spilker, C. and Braunewell, K. H., 2003. Calcium-myristoyl switch, subcellular localization, and calcium-dependent translocation of the neuronal calcium sensor protein VILIP-3, and comparison with VILIP-1 in hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci*. 24, 766-778.
- Spilker, C., Dresbach, T. and Braunewell, K. H., 2002a. Reversible translocation and activity-dependent localization of the calcium-myristoyl switch protein VILIP-1 to different membrane compartments in living hippocampal neurons. *J Neurosci*. 22, 7331-7339.
- Spilker, C., Gundelfinger, E. D. and Braunewell, K. H., 1997. Calcium- and myristoyl-dependent subcellular localization of the neuronal calcium-binding protein VILIP in transfected PC12 cells. *Neurosci Lett*. 225, 126-128.
- Spilker, C., Gundelfinger, E. D. and Braunewell, K. H., 2002b. Evidence for different functional properties of the neuronal calcium sensor proteins VILIP-1 and VILIP-3: from subcellular localization to cellular function. *Biochim Biophys Acta*. 1600, 118-127.
- Stein, B. S., Bensch, K. G. and Sussman, H. H., 1984. Complete inhibition of transferrin recycling by monensin in K562 cells. *J Biol Chem*. 259, 14762-14772.
- Sutton, M. A. and Schuman, E. M., 2006. Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory. *Cell*. 127, 49-58.
- Svoboda, K. and Mainen, Z. F., 1999. Synaptic $[Ca^{2+}]_i$: intracellular stores spill their guts. *Neuron*. 22, 427-430.
- Takimoto, K., Yang, E. K. and Conforti, L., 2002. Palmitoylation of KChIP splicing variants is required for efficient cell surface expression of Kv4.3 channels. *J Biol Chem*. 277, 26904-26911.
- Tapia, L., Kuryatov, A. and Lindstrom, J., 2007. Ca^{2+} permeability of the $(\alpha 4)_3(\beta 2)_2$ stoichiometry greatly exceeds that of $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ human acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol*. 71, 769-776.

- Tartakoff, A. M., 1983. Perturbation of vesicular traffic with the carboxylic ionophore monensin. *Cell*. 32, 1026-1028.
- Tuschl, T., 2001. RNA interference and small interfering RNAs. *Chembiochem*. 2, 239-245.
- Van Hoesen, G. W., Hyman, B. T. and Damasio, A. R., 1991. Entorhinal cortex pathology in Alzheimer's disease. *Hippocampus*. 1, 1-8.
- Vibat, C. R., Lasalde, J. A., McNamee, M. G. and Ochoa, E. L., 1995. Differential desensitization properties of rat neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit combinations expressed in *Xenopus laevis* oocytes. *Cell Mol Neurobiol*. 15, 411-425.
- Vickers, J. C., Dickson, T. C., Adlard, P. A., Saunders, H. L., King, C. E. and McCormack, G., 2000. The cause of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*. 60, 139-165.
- Weiss, J. L. and Burgoyne, R. D., 2001. Voltage-independent inhibition of P/Q-type Ca²⁺ channels in adrenal chromaffin cells via a neuronal Ca²⁺ sensor-1-dependent pathway involves Src family tyrosine kinase. *J Biol Chem*. 276, 44804-44811.
- Wells, D. G. and Fallon, J. R., 2000. In search of molecular memory: experience-driven protein synthesis. *Cell Mol Life Sci*. 57, 1335-1339.
- Whitehouse, P. J. and Kalaria, R. N., 1995. Nicotinic receptors and neurodegenerative dementing diseases: basic research and clinical implications. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 9 Suppl 2, 3-5.
- Whitlock, J. R., Heynen, A. J., Shuler, M. G. and Bear, M. F., 2006. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*. 313, 1093-1097.
- Woodruff-Pak, D. S. and Gould, T. J., 2002. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: involvement in Alzheimer's disease and schizophrenia. *Behav Cogn Neurosci Rev*. 1, 5-20.
- Xu, J., Zhu, Y. and Heinemann, S. F., 2006. Identification of sequence motifs that target neuronal nicotinic receptors to dendrites and axons. *J Neurosci*. 26, 9780-9793.
- Zhao, C., Anand, R. and Braunewell, K. H., 2008a. Nicotine-induced Ca(2+)-myristoyl Switch of Neuronal Ca(2+) Sensor VILIP-1 in Hippocampal Neurons: A Possible Crosstalk Mechanism for Nicotinic Receptors. *Cell Mol Neurobiol*.
- Zhao, C. and Braunewell, K. H., 2008. Expression of the neuronal calcium sensor visinin-like protein-1 in the rat hippocampus. *Neuroscience*.

- Zhao, C. J., Noack, C., Brackmann, M., Gloveli, T., Maelicke, A., Heinemann, U., Anand, R. and Braunewell, K. H., 2008b. Neuronal Ca(2+) sensor VILIP-1 leads to the upregulation of functional alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptors in hippocampal neurons. *Mol Cell Neurosci*.
- Ziedonis, D. M. and George, T. P., 1997. Schizophrenia and nicotine use: report of a pilot smoking cessation program and review of neurobiological and clinical issues. *Schizophr Bull.* 23, 247-254.
- Zoli, M., Picciotto, M. R., Ferrari, R., Cocchi, D. and Changeux, J. P., 1999. Increased neurodegeneration during ageing in mice lacking high-affinity nicotine receptors. *Embo J.* 18, 1235-1244.
- Zozulya, S. and Stryer, L., 1992. Calcium-myristoyl protein switch. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 11569-11573.

Department of Chemistry, University of Maine, Orono, Maine. EF-Hand Terminology. (Accessed May 4, 2008, at <http://chemistry.umeche.maine.edu/MAT500/Proteins8.html>)

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
ADP	Adenosindiphosphat
AP-1	Adapterprotein-1
ARF-1	ADP-Ribosylierungsfaktor-1
BSA	<i>bovine serum albumine</i> ; Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
C	Kohlenstoff-Atome
CA	<i>cornu ammonis</i>
Ca ²⁺	Calcium-Ion
CALP	<i>calcium-like peptides</i>
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CBP	Calcium-Bindungsprotein, Calcium-bindendes Protein
CCV	<i>clathrin-coated vesicles</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
cMRT	craniale Magnetresonanztomographie
CNP	<i>c-type natriuretic peptide</i>
CO ₂	Kohlendioxid
DABCO	1,4-Diazabicyclooctan
DAG	Diacylglycerin

DAT	Demenz vom Alzheimer-Typ
ddH ₂ O	deionisiertes Wasser
DG	<i>gyrus dentatus</i>
DHβE	Dihydro-β-erythroidin
DHPG	(R,S)-3,5-Dihydroxyphenylglycin
DMEM	<i>dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMXB-A	<i>3-(2,4-dimethoxybenzylidene)-anabaseine</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DREAM	<i>downstream regulatory element antagonist modulator</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	<i>et alii</i>
FKS	Fötale Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GABA	<i>gamma</i> -Aminobuttersäure
GAD	Glutamat-Decarboxylase
GCAP	Guanylatcyclase-aktivierendes Protein
GC-B	Guanylatzyklase B
GCIP	Guanylatcyclase-inhibierendes Protein
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>

GFP	grün fluoreszierendes Protein
Gly	Glycin
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
h	Stunde
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HCl	Salzsäure
HS	<i>horse serum</i> , Pferdeserum
IgG	Immunglobulin G
IPSC	<i>inhibitory postsynaptic currents</i> , inhibitorische postsynaptische Ströme
KChIP	Kalium-Kanal-interagierendes Protein
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
Kv	<i>voltage-gated-potassium-channel</i> ; Spannungs-abhängiger Kalium-Kanal
l	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
LTD	<i>long-term depression</i> ; Langzeit-Depression
LTP	<i>long-term potentiation</i> ; Langzeit-Potenzierung
mAChR	muskarinerner Acetylcholinrezeptor
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
M	Molare Masse
MgCl ₂ · 6H ₂ O	Magnesiumchlorid
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor

MgSO ₄ * 7H ₂ O	Magnesiumsulfat
min	Minuten
MLA	<i>methyllycaconitine citrate</i>
mRNA	<i>messenger</i> RNA
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCP	Neuronale Calcium-Puffer
NCS	Neuronale Calcium-Sensor(en)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NVP	<i>neuronal visinin-like protein</i>
PFA	Paraformaldehyd
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PC12	Phäochromocytoma-Linie 12
Pen/Strep	Penicillin und Streptomycin
pH	Wasserstoffionenkonzentration
REN	Restriktionendonukleasen
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SCC	<i>squamous cell carcinoma</i>
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	<i>small interfering</i> RNA
S-Modulin	Sensitivität modulierendes Protein

SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>
TAE	Tris-Acetat und EDTA
TBE	Tris-Base, Borsäure und EDTA
TGN	<i>trans</i> -Golgi-Netzwerk
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TX-100	Triton X-100
U	Unit
UV	ultraviolett
V	Volt
VILIP	<i>visinin-like protein</i>
ZNS	zentrales Nervensystem

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationen

Referierte Originalarbeiten

Paul Gierke, CongJian Zhao, Hans-Gert Bernstein, Cornelia Noack, Rene Anand, Uwe Heinemann and Karl-Heinz Braunewell (2008). "Implication of neuronal Ca²⁺-sensor VILIP-1 in the glutamate hypothesis of schizophrenia." *Neurobiol Dis.* 32, 162-175.

Cornelia Noack*, CongJian Zhao*, Marian Brackmann*, Tengis Gloveli, Alfred Maelicke, Uwe Heinemann, Rene Anand and Karl-Heinz Braunewell (2008). "Neuronal Ca²⁺-sensor VILIP-1 leads to the upregulation of functional $\alpha_4\beta_2$ nicotinic acetylcholine receptors in hippocampal neurons." *Mol Cell Neurosci.* 40, 280-292.

Karl-Heinz Braunewell, Blessy Paul, Wassim Altarche-Xifro, Cornelia Noack, Kristian Lange and Andreas Hofmann (2008). "Interactions of Visinin-like Proteins with Phospho-inositides" *Biochemistry*, submitted.

* Diese Autoren leisteten einen gleichwertigen wissenschaftlichen Beitrag.

Vortrag

Cornelia Noack: "Molecular mechanisms influencing surface expression of $\alpha_4\beta_2$ nAChR in hippocampal neurons: an immunofluorescence approach." (gehalten 20.02.2007) in: Labor-Symposium des Instituts für Neurophysiologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, 20.02.2007.

Erklärung

Ich, Cornelia Noack, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Immunzytochemische Untersuchungen zur Ko-Lokalisation des neuronalen Calcium-Sensor (NCS)-Proteins VILIP-1 mit dem nikotinischen Acetylcholinrezeptor ($\alpha_4\beta_2$).“ selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift