

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

DISSERTATION

Untersuchung zu Regulationsmechanismen der Expression von neuronalen
Calciumsensor (NCS)-Proteinen in hippokampalen Neuronenkulturen: Bedeutung
für physiologische und pathologische Prozesse im zentralen Nervensystem
am Beispiel der Schizophrenien

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Paul Gierke
aus Berlin

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. K.-H. Braunewell
2. Dr. A. Hofmann
3. Prof. Dr. rer. nat. R. Hass

Datum der Disputation: 18. 12. 2006

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Schizophrenien	1
1.1.1	Entwicklungsstörungen als Ursachen der Schizophrenien.....	1
1.1.2	Neurotransmission bei Schizophrenien	2
1.2	Der Hippokampus	3
1.2.1	Hippokampale Hauptneurone und der trisynaptische Schaltkreis.....	3
1.2.2	Gliederung und Funktionen hippokampaler Interneurone	5
1.3	Die Glutamatrezeptoren	6
1.3.1	Die Bedeutung des NMDA-Rezeptors für die Langzeitpotenzierung	7
1.3.2	Die ionotropen Glutamatrezeptoren und Zelltoxizität	7
1.3.3	Die Expression und Funktion metabotroper Glutamatrezeptoren.....	8
1.3.4	Glutamatrezeptoren und synaptische Plastizität.....	9
1.4	Die Bedeutung des Calciumions als zellulärer Botenstoff.....	10
1.5	Calciumbindende Proteine	12
1.5.1	Die Familien der calciumbindenden Proteine (CBP).....	12
1.5.2	Die Familie der intrazellulären neuronalen Calciumsensor (NCS)-Proteine	13
1.5.3	Calciumbindungsproteine im Hippokampus.....	18
1.5.4	Die Expression der NCS-Proteine bei Schizophrenien	19
1.6	Zielsetzung der Arbeit	21
2	Material und Methoden	22
2.1	Material	22
2.1.1	Allgemeine Chemikalien.....	22
2.1.2	Allgemeine Verbrauchsmaterialien.....	23
2.1.3	Biochemische Kits.....	23
2.1.4	Allgemeine Materialien für die Zellkultur	24
2.1.5	Allgemeine Lösungen	24
2.1.6	Rezeptoragonisten und -antagonisten.....	25
2.1.7	Antikörper	25
2.1.7.1	Primäre Antikörper.....	25
2.1.7.2	Sekundäre Antikörper	26
2.1.8	Tiere	26

2.2	Methoden.....	26
2.2.1	Primärkultur hippocampaler Neurone.....	26
2.2.2	Pharmakologische Stimulation von Zellkulturen.....	27
2.2.3	Biochemische Methoden.....	28
2.2.3.1	Proteinisolation.....	28
2.2.3.2	Proteinbestimmung.....	28
2.2.3.3	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	28
2.2.3.4	Coomassie-Brilliantblue-Färbung.....	29
2.2.3.5	Western-Blotting und Immundetektion.....	29
2.2.4	Immunzytochemie.....	30
2.2.5	Auswertung.....	31
2.2.5.1	Auswertung der Western-Blot-Daten.....	31
2.2.5.2	Auswertung der Immunzytochemie-Bilder.....	31
3	Ergebnisse.....	32
3.1	Der Effekt von Glutamat auf hippocampale Neuronenkulturen.....	32
3.1.1	Der Effekt von Glutamat auf die Proteinexpression von VILIP-1 in hippocampalen Neuronenkulturen.....	32
3.1.2	Glutamat-induzierter Zelltod in hippocampalen Neuronenkulturen kann durch Gabe des NMDA-Rezeptorantagonisten MK-801 verhindert werden.....	34
3.1.3	Hippokampale Interneurone reagieren sensibler auf eine exzitotoxische Glutamatstimulation.....	37
3.1.4	Glutamat erhöht die Expression von VILIP-1 in hippocampalen Interneuronen unabhängig von zytotoxischen Effekten.....	39
3.2	DHPG bestätigt den Glutamateffekt auf die VILIP-1-Expression.....	40
3.2.1	Die VILIP-1-Expression in hippocampalen Interneuronen wird von metabotropen Glutamatrezeptoren reguliert.....	41
3.2.2	mGluR1 α ist mit VILIP-1 in hippocampalen Interneuronen koexprimiert.....	44
4	Diskussion.....	47
4.1	Glutamaterge Unterfunktion bei schizophrenieformen Defiziten.....	48
4.2	Exzessive Stimulation der Glutamatrezeptoren bei den Schizophrenien.....	49
4.2.1	Interneurone sind vulnerabler – Enthemmung exzitatorischer Schaltkreise.....	50
4.2.2	Mögliche Bedeutung neuroprotektiver Mechanismen.....	51
4.3	Die VILIP-1-Regulation in hippocampalen Interneuronen.....	53

4.4	Charakterisierung der betroffenen Neurone	55
4.5	VILIP-1, synaptische Plastizität und Schizophrenien	58
4.5.1	Einfluss auf das glutamaterge System.....	58
4.5.2	Die Beteiligung des cholinergen Systems	61
4.6	Ausblick	62
5	Zusammenfassung	64
6	Literaturverzeichnis.....	65
	Abkürzungsverzeichnis	88
	Danksagung.....	90
	Lebenslauf	91
	Publikationen.....	92
	Erklärung.....	93

5 Zusammenfassung

Die Schizophrenien werden zu den nicht-organischen Psychosen gezählt. Neben produktiven Symptomen wie Halluzinationen und Wahnvorstellungen sind die Patienten im Wesentlichen durch negative Symptome wie Aufmerksamkeits- und Gedächtnisstörungen beeinträchtigt.

Neben einer gestörten dopaminergen Neurotransmission scheint insbesondere das glutamaterge NMDA-Rezeptor-vermittelte System in bestimmten Hirnregionen gehemmt zu sein. Diese Hemmung führt in nachgeschalteten Gebieten wie dem Hippokampus, einer Hirnstruktur, die für Lern- und Gedächtnisfunktionen essentiell ist, zu einer erhöhten Glutamatstimulation. Diese Stimulation mit hohen Dosen Glutamat geht mit einer Störung der Calciumhomöostase einher. Daher könnte das NCS-Protein VILIP-1 an der Pathologie der Schizophrenien beteiligt sein.

In Gehirnschnitten verstorbener Schizophreniekranker konnte im Hippokampus einerseits eine verminderte Expression von VILIP-1 in Pyramidenzellen und andererseits eine erhöhte Anzahl VILIP-1-positiver Interneurone nachgewiesen werden. Im Tierexperiment führte bei Ratten eine systemische Ketaminapplikation zu ähnlichen Veränderungen. Ketamin ist ein Antagonist am NMDA-Rezeptor und kann beim Menschen akute Psychosen auslösen.

Die veränderte Expression von VILIP-1 bei Schizophrenien führt zu der Frage nach der Regulation von VILIP-1 und der möglichen Bedeutung für pathophysiologische Prozesse.

Mittels Western-Blot-Analysen und Immunzytochemie wurde der Einfluss einer glutamatergen Stimulation auf die VILIP-1-Expression in hippocampalen Interneuronen herausgearbeitet.

Die Stimulation mit Glutamat zeigte einen zelltoxischen Effekt, wobei Interneurone besonders stark betroffen waren. Die wichtigste Konsequenz dieser selektiven Vulnerabilität könnte ein enthemmter exzitatorischer Schaltkreis mit massiven Funktionsstörungen des Hippokampus sein. Die Exzitotoxizität konnte durch den NMDA-Rezeptorantagonisten MK-801 unterbunden werden. Dabei bestätigte sich, dass Glutamat gleichzeitig den Anteil VILIP-1-positiver Interneurone signifikant erhöht. Durch die Anwendung spezifischer Agonisten und Antagonisten der mGluRs stellte sich heraus, dass mGluR1 α an der Regulation der VILIP-1-Expression beteiligt ist. Durch Kofärbungen von VILIP-1 mit mGluR1 α und die Auswertung bekannter Koexpressionsstudien konnte geschlussfolgert werden, dass vermutlich nur bestimmte Interneuronssubpopulationen von den beobachteten Veränderungen betroffen sind.

Diese Ergebnisse sind von besonderer Bedeutung, da bekannt ist, dass mGluRs sowohl die synaptische Plastizität als auch die VILIP-1-Expression im Hippokampus *in vivo* beeinflussen. Pathologische Veränderungen der VILIP-1-Expression in Interneuronen könnten daher einen Einfluss auf die synaptische Plastizität haben und so die für Schizophrenien typischen Aufmerksamkeits- und Gedächtnisstörungen partiell erklären.

Abkürzungsverzeichnis

4CPG	(S)-4-Carboxyphenylglycine
ADP	Adenosindiphosphat
AMPA	Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-4-propionat
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-Phosphat
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
C	Celsius
cADPR	Zyklische Adenosindiphosphat-Ribose
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CBP(s)	Calciumbindungsprotein(e), Calciumbindende Proteine
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
CNQX	6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
CO ₂	Kohlendioxid
CPCCOEt	7-hydroxyiminocyclopropan[b]chromen-1a-carboxylic acid ethyl ester
DAG	Diacylglycerin
DHPG	Dihydroxyphenylglycin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alias
FKS	Fötales Kälberserum
GAD	Glutamic acid decarboxylase
GFAP	glial fibrillary acidic protein
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCl	Salzsäure
HS	Pferdeserum (horse serum)
IgG	Immunglobulin G

IN	Interneuron
IP ₃ (-R)	Inositol-1,4,5-Triphosphat(-Rezeptor)
kDa	Kilodalton
M	molar
min	Minuten
MK 801	(5R,10S)-(+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine
MPEP	2-Methyl-6-(phenylethynyl)pyridine
NBT	4-Nitroblue-Tetrazoliumchlorid
NCS	Neuronale Calciumsensoren
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher
NGF	Nervenwachstumsfaktor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NVP	neural Visinin-like protein
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate-buffered Saline
PC12	Phäochromocytoma-Linie 12
PCP	Phencyclidin
pH	Wasserstoffionenkonzentration
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PMCA	Plasmamembran-Calcium-ATPase
PVDF	Polyvinyliden-Fluorid
RNA	Ribonukleinsäure
ROC	Receptor Operated Channel
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
RYR	Ryanodinrezeptor
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SERCA	Sarco-Endoplasmatisches-Retikulum-Calcium-ATPase
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
VILIP	„Visinin-like protein“
VOC	Voltage Operated Channel
ZNS	zentrales Nervensystem

Danksagung

Mein Dank gilt vor allem meinem Betreuer PD Dr. Karl-Heinz Braunewell, für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe dieses spannende Thema zu bearbeiten. Seine engagierte, intensive und kontinuierliche Betreuung hat diese Arbeit entscheidend geprägt. Die Zusammenarbeit mit ihm war zu jeder Zeit motivierend und bereichernd.

Prof. Uwe Heinemann hat diese Arbeit an seinem Institut ermöglicht. Dafür und für sein Interesse am Fortschreiten der Arbeit möchte ich ihm an dieser Stelle danken.

Den Zweitgutachtern danke ich für die Mitbeurteilung dieser Arbeit.

Danken möchte ich Dr. Marian Brackmann für die Einführung in die Welt der Molekularbiologie, für seine Diskussionsbereitschaft, seine Kritik und sein Interesse. Hol´ schon mal die Flagge.

Dr. Christina Spilker möchte ich besonders für die Einweisung in die Immunzytochemie und die unzähligen kleinen und großen Ratschläge danken.

Prof. Stephan Patt danke ich für die kritische und gewissenhafte Korrektur des Manuskripts.

Zudem möchte ich allen Mitarbeitern der AG Signaltransduktion, die zum Zustandekommen dieser Arbeit beigetragen haben, herzlich danken.

Ein besonderer Dank gilt Felicitas Murach für ihre Hilfe, ihren Rückhalt und ihre Geduld.

Schließlich möchte ich meinen Eltern danken, die mich uneingeschränkt gefördert haben, mein Studium ermöglichten und diese Arbeit mit Interesse verfolgten.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Publikationen

Referierte Originalarbeiten:

Gierke, P., C. Zhao, et al. (2004). "Expression analysis of members of the neuronal calcium sensor protein family: combining bioinformatics and Western blot analysis." Biochem Biophys Res Commun 323(1): 38-43.

Zhao, C., P. Gierke, et al. (2006). „Metabotropic glutamate receptor 1 dependent upregulation of the neuronal calcium sensor protein VILIP-1 in hippocampal interneurons: link to the NMDA receptor hypofunction hypothesis and schizophrenia.“ in Vorbereitung.

Vorträge:

Doktorandenseminar des Neurowissenschaftlichen Forschungszentrums der Charité, Humboldt Universität zu Berlin, AG Braunewell 18. 11. 2002

Thema: Regulation der Expression von neuronalen Calciumsensor (NCS)-Proteinen durch Neurotrophine

Doktorandenseminar des Neurowissenschaftlichen Forschungszentrums der Charité, Humboldt Universität zu Berlin, AG Braunewell 03. 05. 2004

Thema: Untersuchung zur veränderten Expression des neuronalen Calciumsensor (NCS)-Proteins VILIP-1 in hippocampalen Interneuronen bei Schizophrenie

Posterbeiträge:

29th Göttingen Neurobiology Conference and 5th Meeting of the German Neuroscience Society 11.-15. 06. 2003

Titel: The role of the calcium sensor protein VILIP-1 in neuronal signalling. K.-H. Braunewell, C. Spilker, C. Zhao, P. Gierke und M. Brackmann.

Berlin Neuroscience Forum 22.-24. 04. 2004

Titel: The Neuronal Calcium Sensor (NCS) Protein VILIP-1 in Schizophrenia: Regulation by mGluRs in hippocampal neurons. P. Gierke, H.-G. Bernstein und K.-H. Braunewell.

Erklärung

„Ich, Paul Gierke, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: *„Untersuchung zu Regulationsmechanismen der Expression von neuronalen Calciumsensor (NCS)-Proteinen in hippocampalen Neuronenkulturen: Bedeutung für physiologische und pathologische Prozesse im zentralen Nervensystem am Beispiel der Schizophrenien“* 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