

3 Ergebnisse

3.1 Der Effekt von Glutamat auf hippocampale Neuronenkulturen

Versuche, die Symptomatik der Schizophrenien als Folge einer gestörten Neurotransmission zu erklären, konzentrierten sich lange Zeit auf das dopaminerge System. In jüngerer Zeit rückten jedoch weitere Neurotransmitter ins Blickfeld der Forschung (Egan und Weinberger 1997). Dabei scheint besonders Glutamat (Olney und Farber 1995) eine wachsende Bedeutung zuzukommen. In weiteren Studien konnten verminderte Glutamatkonzentrationen und reduzierte Marker für die Glutamatfunktion in Gehirnen von schizophreniekranken Menschen nachgewiesen werden (Eastwood und Harrison 2005).

3.1.1 Der Effekt von Glutamat auf die Proteinexpression von VILIP-1 in hippocampalen Neuronenkulturen

Interessanterweise führt der Glutamatmangel in kortikalen Hirnregion zu einer sekundären Erhöhung der Glutamatkonzentration in nachgeschalteten Hirnregionen, wie zum Beispiel dem Hippokampus. Dies wird mit einer verminderten Hemmung der exzitatorischen Neurone durch inhibitorische Interneurone erklärt (Olney et al. 1999). Zusätzlich ist bekannt, dass der Agonist metabotroper Glutamatrezeptoren der Gruppe I (RS)-3,5-Dihydroxyphenylglycin (DHPG) eine Erhöhung der VILIP-1-Expression in hippocampalen Neuronenkulturen bewirkt (Braunewell et al. 2003). Deshalb wurde als erstes untersucht, ob die erhöhte Glutamatkonzentration für die veränderte VILIP-1-Expression verantwortlich sein könnte.

Dazu wurden hippocampale Zellkulturen mit 100 μ M Glutamat für 10 Minuten stimuliert, das Nährmedium anschließend ausgetauscht und die Kulturen weitere 2, 8 bzw. 24 Stunden inkubiert. Danach wurden die Zellen homogenisiert und die Proteine isoliert, elektrophoretisch aufgetrennt, auf PVDF-Membran transferiert. Mittels spezifischer Antikörper konnte die Expression von VILIP-1 mit einem Molekulargewicht (Mw) von 22 kDa und α -Tubulin mit einem Mw von 50 kDa nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5).

Die densitometrische Quantifizierung der detektierten Banden ergab bereits 2 Stunden nach Glutamatapplikation eine signifikante Reduktion der VILIP-1-Expression um 17%, die nach 24 Stunden weiter bis auf 40% der anfänglichen Menge abnahm. Für α -Tubulin, das als nicht reguliertes Kontrollprotein eingesetzt werden sollte, wurde 24 Stunden nach Glutamatapplikation

jedoch eine Reduktion der Immunreaktivität um 40% beobachtet, was für eine Störung der zytoskelettalen Integrität spricht (siehe Abbildung 6).

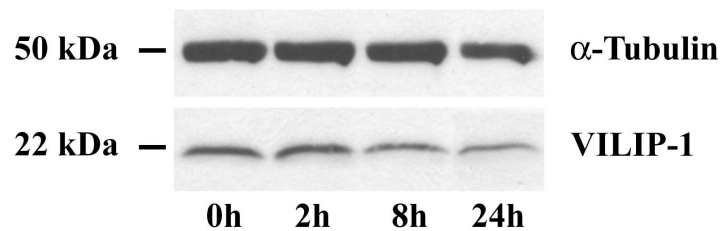


Abbildung 5: Expression von VILIP-1 und α -Tubulin in hippocampalen Neuronenkulturen nach Glutamatapplikation. Die Expression von VILIP-1 und α -Tubulin ohne (0h) und 2, 8 und 24 Stunden nach 10minütiger Glutamatbehandlung (100 μ M) wurde untersucht. SDS-Gele wurden pro Bahn mit 20 μ g Protein aus Gesamtzellhomogenaten beladen. Die Proteine wurden anschließend auf PVDF-Membranen transferiert und mit einem polyklonalen Antikörper gegen VILIP-1 (aus Kaninchen) bzw. einem monoklonalen Antikörper gegen α -Tubulin (aus Maus, Sigma) inkubiert. Die Detektion der Primärantikörper erfolgte mit Peroxidase-gekoppelten anti-Kaninchen- bzw. anti-Maus-Sekundärantikörpern (Santa Cruz), die wiederum mit dem ECL-System (Pierce) nachgewiesen wurden.

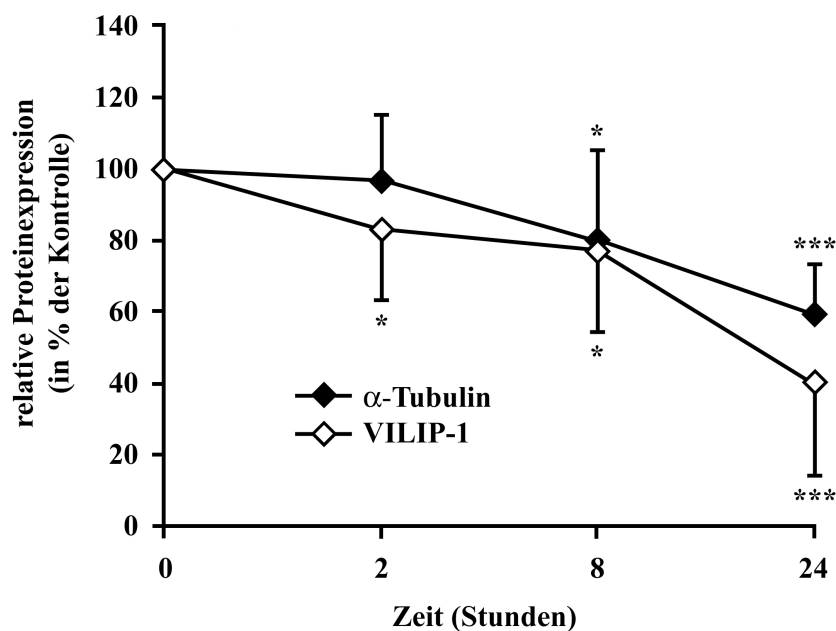


Abbildung 6: Quantifizierung der Western-Blot-Analysen von hippocampalen Zellkulturen nach Glutamatbehandlung. Immunreaktive Banden von VILIP-1 und α -Tubulin wurden densitometrisch ausgewertet (NIH Image 1.61). Der Graph zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens 5 verschiedenen Experimenten ($n \geq 5$). Die Sternchen symbolisieren die mittels zweiseitigem student's t-Test ermittelten Signifikanzen im Bezug auf die Kontrolle (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

Über eine wirksame und dennoch nicht zytotoxische Glutamatkonzentration gibt es in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben. 100 μM werden teilweise als subtoxisch (Mattson et al. 1988) und teilweise als stark toxisch (Dargusch et al. 2001) beschrieben. In diesem Fall muss ein zytotoxischer Effekt vermutet werden, der keine verlässliche Aussage über den Einfluss des Glutamats auf die Proteinexpression zulässt.

3.1.2 Glutamat-induzierter Zelltod in hippocampalen Neuronenkulturen kann durch Gabe des NMDA-Rezeptorantagonisten MK-801 verhindert werden

Nachdem die Western-Blot-Analyse eine Reduktion der Gesamtproteinmenge nach Glutamatbehandlung ergab, sollte nun versucht werden, die Vermutung eines neurotoxischen Effekts zellulär zu beweisen. Da sowohl in Gehirnen von an Schizophrenie erkrankten Verstorbenen als auch im Ketamin-Tiermodell für Schizophrenien eine differenzierte VILIP-1-Expression in Pyramidenzellen und Interneuronen beobachtet werden konnte (Bernstein et al. 2002; Bernstein et al. 2003), bestand außerdem die Frage, wie sich eine Glutamatstimulation auf die einzelnen hippocampalen Neuronensubpopulationen auswirken würde. Durch immunzytochemische Doppelfärbungen konnten beide Fragestellungen gleichzeitig bearbeitet werden.

Hippokampale Neuronenkulturen wurden mit Antikörpern gegen den Interneuronenmarker Glutamatdecarboxylase (GAD-65) (Abbildung 7 B) und VILIP-1 (Abbildung 7 A) gefärbt. In unbehandelten Zellkulturen wurden 90% aller Neurone vom polyklonalen VILIP-1-Antikörper angefärbt (Spilker et al. 2002). Eine GAD-65-Immunreaktivität war nur in einer bestimmten Subpopulation nachzuweisen, die zu 50% auch eine VILIP-1-positive Immunfärbung zeigte (Abbildung 7 C: die Pfeile markieren VILIP-1-positive Interneurone, die Pfeilspitzen zeigen VILIP-1-negative Interneurone) und an der Gesamtzahl aller angefärbter Neurone einen Anteil von ca. 20% hat (Abbildung 7 C: 29 immunreaktive Neurone von denen 6 Neurone GAD-65-positiv sind). Damit werden ca. 95% aller hippocampalen Neurone immunzytochemisch erfasst. Die Zellkulturen wurden erneut für 10 Minuten mit 100 μM Glutamat stimuliert, kurz gewaschen und weiter inkubiert. Acht Stunden nach der Stimulation konnte eine deutliche Reduktion der VILIP-1-positiven Neurone festgestellt werden. Die Struktur des Zellrasens war deutlich alteriert. Neben degenerierten pyknotischen Zellkörpern, Zelltrümmern, Neuriten und lochartigen Strukturauflösungen (Abbildung 7 D: Sternchen) verblieben nur wenige morphologisch intakt erscheinende Neurone.

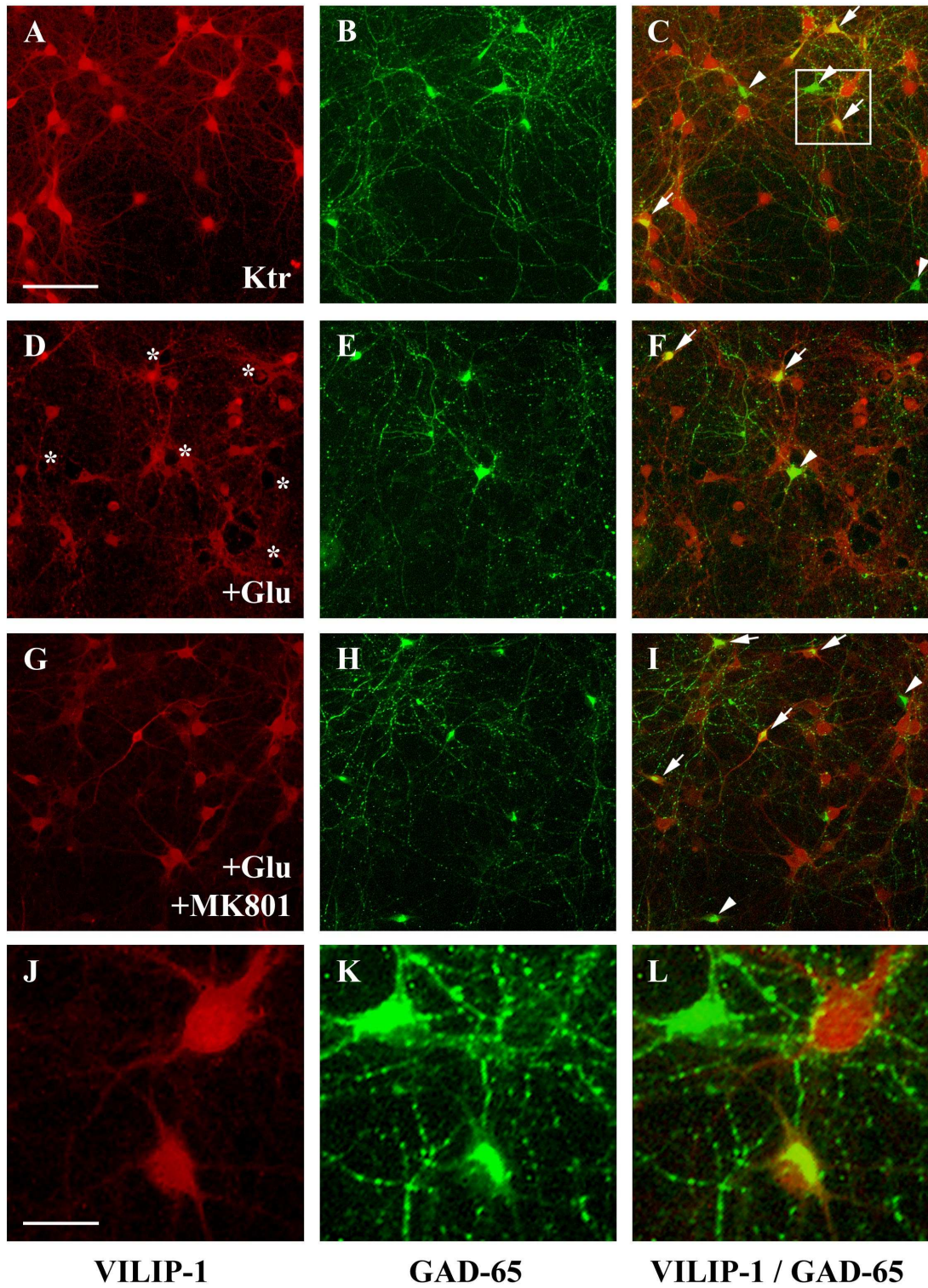


Abbildung 7: (Seite 35) Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen von VILIP-1 und GAD-65 in hippocampalen Neuronenkulturen mit und ohne Applikation von 100 μ M Glutamat und 50 μ M MK-801. 16 Tage alte hippocampale Neurone wurden für 10 Minuten stimuliert, nach weiteren 8 Stunden fixiert und mit polyklonalen Antikörpern gegen VILIP-1 (aus Kaninchen, Cy3-markierte Zweitantikörper, rote Fluoreszenz, A, D, G und J) und monoklonalen Antikörpern gegen den Interneuronenmarker GAD-65 (aus Maus, Alexa Fluor™ 488-markierte Zweitantikörper, grüne Fluoreszenz, B, E, H und K) gefärbt. C, F, I und L zeigen die übereinander gelegten Bilder. Die Bilder A-C zeigen eine unbehandelte Kontrolle. Die Zellen in D-F wurden mit Glutamat stimuliert. In den Bildern G-I wurden die Zellen 30 Minuten vor Glutamatapplikation mit dem NMDA-Rezeptorantagonisten MK-801 behandelt. Die Ausschnittsvergrößerung aus C zeigt in J-L je ein Beispiel für die untersuchten hippocampalen Neuronensubpopulationen, d. h. eine VILIP-1- und GAD-65-positive Zelle (VILIP-1-positives Interneuron), eine VILIP-1-negative aber GAD-65-positive Zelle (VILIP-1-negatives Interneuron) und eine VILIP-1-positive aber GAD-65-negative Zelle (sonstiges hippocampales Neuron, zum Beispiel Pyramidenzellen). Insgesamt werden ca. 95% aller hippocampalen Neurone immunzytochemisch erfasst. Die Pfeile markieren GAD-65- und VILIP-1-positive Neurone, während die Pfeilspitzen auf GAD-65-positive aber VILIP-1-negative Neurone zeigen. Die Sternchen in A markieren Zeichen einer starken zellulären Degeneration. Die Fluoreszenz wurde an einem Leica-Fluoreszenzmikroskop (Leica DM RA) visualisiert. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mittels der CCD-Kamera Leica DC200 (768x582 Pixel) und der Software Leica-DC-Viewer (Leica, Wetzlar), die Auswertung mit Hilfe von Adobe Photoshop 5.5 für Macintosh (Adobe Systems, San Jose, CA). Längsbalken in A= 100 μ m und in J = 25 μ m.

Dieser zelltoxische Effekt von Glutamat konnte durch die Applikation des NMDA-Rezeptorantagonisten MK-801 unterbunden werden. Neuronenkulturen, die gleichzeitig für 10 Minuten mit 50 μ M MK-801 und 100 μ M Glutamat behandelt wurden, zeigten 8 Stunden nach Stimulation weder eine signifikante Reduktion der Gesamtzellzahl noch sonstige Zeichen einer zytotoxischen Schädigung (Abbildung 7 G-I). Solch ein neuroprotektiver Effekt konnte bereits bei kortikalen Kulturen beschrieben werden (Rogers und Hunter 1997).

Eine quantitative Analyse der Gesamtzellzahlen ergab nach Glutamatapplikation eine Reduktion der Gesamtzellzahl um 38% auf 62%, die durch eine MK-801-Gabe fast vollständig antagonisiert werden konnte (94%). Die Reduktion der Gesamtzellzahl entspricht damit fast exakt der in der Western-Blot-Analyse ermittelten Reduktion der α -Tubulin-Expression (siehe 3.1.1). Die Applikation zweier metabotroper Gruppe I Glutamatrezeptorantagonisten konnte die Zellzahlreduktion hingegen nicht beeinflussen. Trotz gleichzeitiger Gabe von 50 μ M (S)-4-Carboxyphenylglycin (4CPG) bzw. 100 μ M 2-Methyl-6-(phenylethynyl)pyridin (MPEP) verringerte sich die Gesamtzellzahl signifikant auf 64% bzw. 69%. Die quantitative Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen ist in Abbildung 8 dargestellt.

Somit konnte die in den Western-Blot-Analysen gefundene 40-60%ige Reduktion der Proteinexpression und die vermutete Störung der zytoskelettalen Integrität auf einen NMDA-Rezeptor-vermittelten zytotoxischen Effekt des Glutamats zurückgeführt werden.

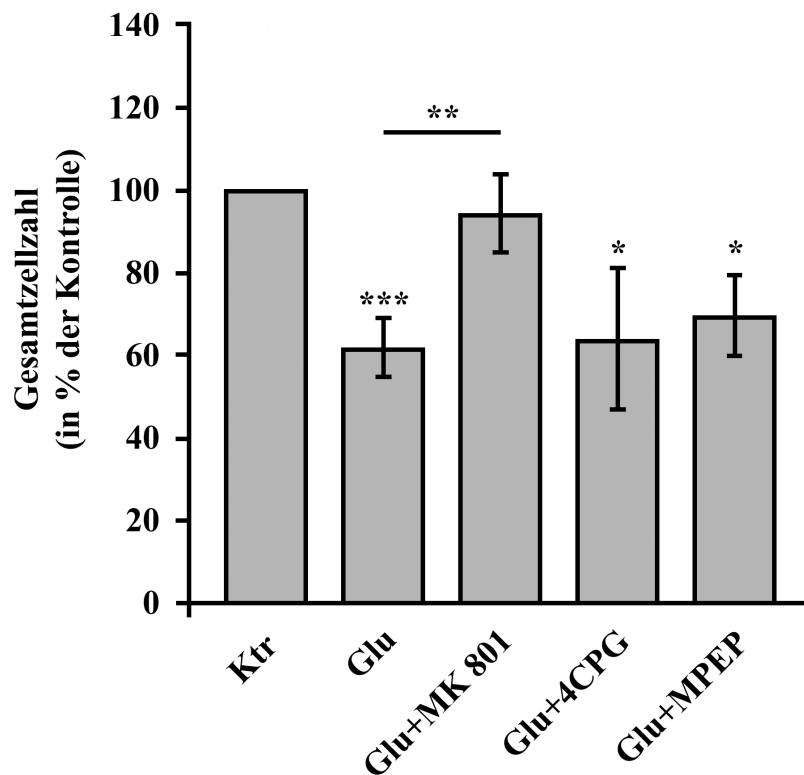


Abbildung 8: Quantitative Auswertung doppel-immunfluoreszenzgefärbter Bilder (siehe Abbildung 7). Der Zelltod wurde anhand der relativen Reduktion der Gesamtzellzahl der immunzytochemisch gefärbten Neurone mit und ohne Behandlung mit Glutamat (100 μ M), dem NMDA-Rezeptorantagonisten MK-801 (50 μ M) und den metabotropen Gruppe I Glutamatrezeptorantagonisten 4CPG (50 μ M) und MPEP (100 μ M) quantifiziert. Die Grafik zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens 4 verschiedenen Experimenten ($n \geq 4$). Die Sternchen symbolisieren die mittels zweiseitigem gepaartem student's t-test ermittelten Signifikanzen bezogen auf die Kontrolle (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

3.1.3 Hippokampale Interneurone reagieren sensibler auf eine exzitotoxische Glutamatstimulation

Bei der Auswertung der Gesamtzellzahlen der Neuronenkulturen entstand der Eindruck, dass durch die Glutamatapplikation die Zahl der GAD-65-positiven Neurone besonders stark reduziert wurde. Die Färbeintensität der positiven Zellen war vergleichbar mit der Färbeintensität der Kontrollkulturen, so dass nicht von einer generellen Abnahme der GAD-65-Immunreaktivität sondern von einer Zellzahlreduktion ausgegangen werden muss (vergleiche Abbildung 7 B und E).

Die separate Auswertung der Interneuronenzellzahl bestätigte die Vermutung. Acht Stunden nach 10minütiger Stimulation mit 100 μM Glutamat sank die Anzahl der Interneurone auf 37% verglichen mit Kontrollkulturen und damit deutlich stärker als die Gesamtzellzahl (62%). Auch hier ließ sich der zytotoxische Glutamateffekt mit dem NMDA-Rezeptorantagonisten MK-801, jedoch nicht mit den Antagonisten der metabotropen Glutamatrezeptoren der Gruppe I 4CPG und MPEP signifikant antagonisieren. Die gleichzeitige Behandlung der mit 100 μM Glutamat stimulierten Neuronenkultur mit 50 μM MK-801 zeigte nur eine sehr geringfügige, nicht signifikante Interneuronenzahlreduktion auf 87% gegenüber 37% bei alleiniger Glutamatapplikation. Bei der Applikation von 100 μM Glutamat und 50 μM 4CPG sank die Interneuronenzahl auf 45%, bei 100 μM Glutamat und 100 μM MPEP auf 41% verglichen mit unbehandelten Neuronenkulturen. Auch diese Ergebnisse liegen deutlich unter den Werten der Gesamtzellzahlanalyse (vergleiche Abbildung 8 und Abbildung 9).

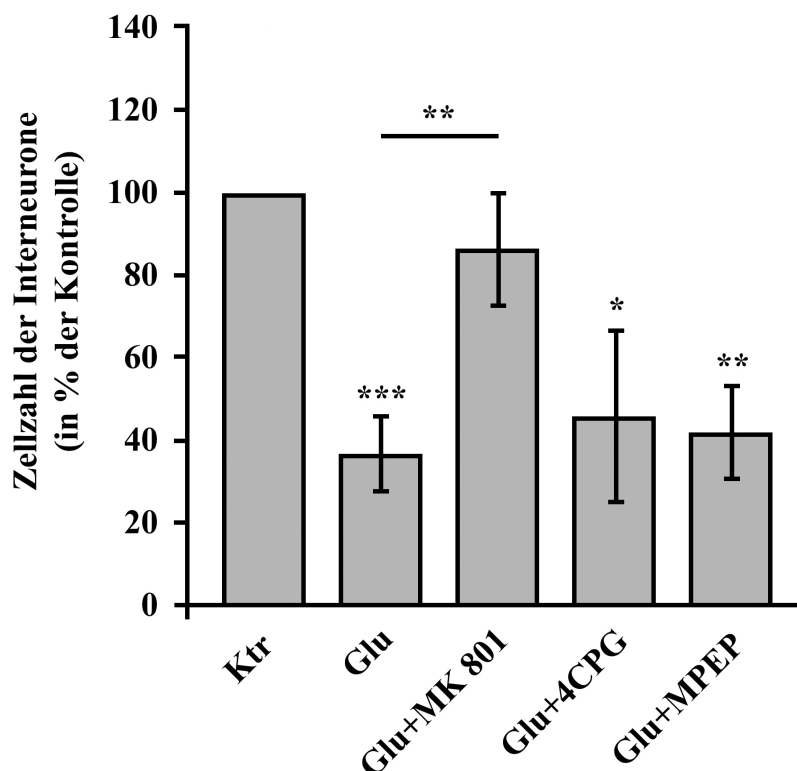


Abbildung 9: Quantitative Auswertung doppel-immunfluoreszenzgefärbter Bilder (siehe Abbildung 7). Der Zelltod wurde anhand der relativen Reduktion der Interneuronenzahl mit und ohne Behandlung mit Glutamat (100 μM), dem NMDA-Rezeptorantagonisten MK-801 (50 μM) und den metabotropen Gruppe I Glutamatrezeptorantagonisten 4CPG (50 μM) und MPEP (100 μM) quantifiziert. Die Grafik zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens 4 verschiedenen Experimenten ($n \geq 4$). Die Sternchen symbolisieren die mittels zweiseitigem gepaartem student's t-test ermittelten Signifikanzen bezogen auf die Kontrolle (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Zusammenfassend deutet dies darauf hin, dass Interneurone empfindlicher gegenüber NMDA-Rezeptor-induzierter Exzitotoxizität sind als die Mehrzahl der übrigen hippocampalen Neurone.

3.1.4 Glutamat erhöht die Expression von VILIP-1 in hippocampalen Interneuronen unabhängig von zytotoxischen Effekten

Die ursprüngliche Intention der Stimulation mit Glutamat war, die Proteinexpression in hippocampalen Neuronen zelltypspezifisch zu untersuchen. Aus der Literatur ist bekannt, dass eine zelltypspezifisch veränderte VILIP-1-Expression sowohl in Gehirnen von an Schizophrenie erkrankten Verstorbenen als auch im Ketamin-Tiermodell für Schizophrenien auftritt (Bernstein et al. 2002; Bernstein et al. 2003). Durch die Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen mit GAD-65- und VILIP-1-Antikörpern konnte die VILIP-1-Expression isoliert in Interneuronen untersucht werden (siehe Abbildung 7).

Wenn die Neuronenkulturen 10 Minuten mit 100 μ M Glutamat stimuliert wurden, konnte 8 Stunden später in den Immunfluoreszenzfärbungen parallel zur oben beschriebenen Gesamtzellzahlreduktion ein gegenüber den Kontrollkulturen erhöhter Anteil VILIP-1-positiver Interneurone festgestellt werden (siehe Abbildung 7 F). In den unbehandelten Zellkulturen betrug der Anteil VILIP-1-positiver Interneurone an der Gesamtzellzahl aller GAD-65-positiven Zellen im Durchschnitt 51%. Dieser Anteil stieg nach Glutamatapplikation auf 66% signifikant an. Dieser Effekt blieb auch nach Antagonisierung der zytotoxischen Glutamatwirkung durch MK-801 bestehen (siehe Abbildung 7 I). Der Anteil VILIP-1-positiver Interneurone betrug 62% (siehe Abbildung 10). Dieses Ergebnis entspricht den Beobachtungen der oben zitierten Literatur (Bernstein et al. 2002; Bernstein et al. 2003), wo eine Hochregulierung der VILIP-1-Expression in bestimmten hippocampalen Interneuronen nachgewiesen wurde. Ebenso ist aus der Literatur bekannt, dass VILIP-1 in Abhängigkeit von metabotropen Glutamatrezeptoren der Gruppe I reguliert wird (Braunewell et al. 2003). Deshalb wurde anschließend untersucht, ob die beobachtete VILIP-1-Regulation in Interneuronen durch einen Antagonisten der metabotropen Glutamatrezeptoren der Gruppe I beeinflusst werden kann. Hippokampale Zellkulturen, die zusätzlich zur Applikation von 100 μ M Glutamat und 50 μ M MK-801 mit 50 μ M des metabotropen Gruppe I Glutamatrezeptorantagonisten 4CPG behandelt wurden, wiesen keine Erhöhung des Anteils VILIP-1-positiver Interneurone auf. Die Reduktion im Vergleich zu den nur mit Glutamat und MK-801 behandelten Kulturen war signifikant (siehe Abbildung 10). Um auszuschließen, dass es sich um interferierende Effekte von Rezeptoragonisten und -antagonisten handelte, wurden die Neurone nur mit MK-801 bzw. 4CPG behandelt. Interessanterweise stellte

sich eine geringe aber signifikante Erhöhung der VILIP-1-positiven Interneurone von 51% ohne Stimulation auf 58% 8 Stunden nach MK-801 Behandlung heraus, während 50 μ M 4CPG keinen signifikanten Effekt hatten (54%, siehe Abbildung 10). Damit konnte die Beobachtung, dass die Erhöhung der VILIP-1-Expression in den hippocampalen Interneuronen von metabotropen Glutamatrezeptoren der Gruppe I vermittelt wird (Braunewell et al. 2003), bestätigt werden. Zusätzlich ergab sich ein erster Hinweis, dass zu diesem Effekt die hippocampalen Interneurone beitragen.

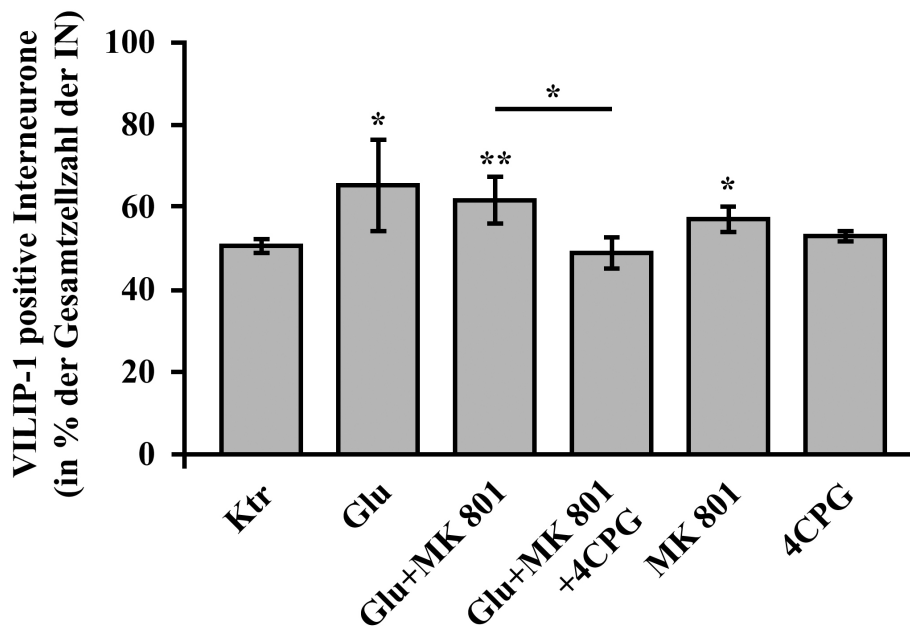


Abbildung 10: Quantitative Auswertung doppel-immunfluoreszenzgefärbter Bilder (siehe Abbildung 7). Die Regulation der VILIP-1-Expression in hippocampalen Interneuronen wurde anhand des relativen Anteils VILIP-1-positiver Interneurone an der Gesamtzellzahl GAD-65-positiver Neurone mit und ohne Behandlung mit Glutamat (100 μ M), dem NMDA-Rezeptorantagonisten MK-801 (50 μ M) und dem metabotropen Gruppe I Glutamatrezeptorantagonisten 4CPG (50 μ M) untersucht. Die Grafik zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens 4 verschiedenen Experimenten ($n \geq 4$). Die Sternchen symbolisieren die mittels zweiseitigem gepaartem student's t-test ermittelten Signifikanzen bezogen auf die Kontrolle (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

3.2 DHPG bestätigt den Glutamateffekt auf die VILIP-1-Expression

Um den Einfluss von metabotropen Glutamatrezeptoren der Gruppe I auf die Expression von VILIP-1 in hippocampalen Interneuronen ohne den störenden zytotoxischen Effekt des Glutamats genauer untersuchen und gleichzeitig die Ergebnisse der bisherigen Experimente verifizieren zu können, wurde in den folgenden Experimenten statt des Glutamats der metabotrope Gruppe I Glutamatrezeptoragonist DHPG eingesetzt.

3.2.1 Die VILIP-1-Expression in hippocampalen Interneuronen wird von metabotropen Glutamatrezeptoren reguliert.

Hippokampale Neuronenkulturen wurden mit 50 μM DHPG behandelt und nach 8 Stunden immunzytochemisch analysiert. Unter diesen Bedingungen war ein Zelltod, wie nach Glutamatbehandlung zu sehen, nicht feststellbar. Unbehandelte Kontrollen, die mit polyklonalen anti-VILIP-1-Antikörpern und monoklonalen anti-GAD-65-Antikörpern angefärbt wurden, boten das gleiche Bild wie unter 3.1.2 beschrieben: 20% aller immunreaktiven Zellen waren GAD-65-positiv und damit Interneurone und bei 52% dieser Interneurone trat eine Koexpression mit VILIP-1 auf (siehe Abbildung 11 A-C und Abbildung 12). Neuronenkulturen, die mit 50 μM DHPG dauerhaft behandelt wurden, zeigten nach 8 Stunden in den immunzytochemischen Färbungen eine Erhöhung der Anzahl der VILIP-1-positiven Interneurone um 15% auf 67% (siehe Abbildung 11 D-F und Abbildung 12). Da aus den Experimenten mit Glutamat bekannt war, dass sich ein solcher Effekt mit 4CPG antagonisieren lässt, wurden die Neurone 30 Minuten vor DHPG-Behandlung mit 50 μM 4CPG inkubiert. Die unter DHPG-Applikation erhöhte Zellzahl VILIP-1-positiver Interneurone konnte dadurch wieder auf das Ausgangsniveau reduziert werden (siehe Abbildung 11 G-I und Abbildung 12). DHPG als Agonist der Gruppe I der metabotropen Glutamatrezeptoren erhöht also spezifisch die Anzahl VILIP-1-positiver Interneurone.

Diese Gruppe I besteht aus den beiden Rezeptorsubtypen mGluR1 und mGluR5. Um einen Hinweis zu erhalten, welcher der beiden Rezeptoren für die beobachtete VILIP-1-Regulation verantwortlich sein könnte, wurde versucht den DHPG-Effekt mit dem selektiven mGluR5-Antagonisten MPEP zu blocken. Dies gelang nicht. Neuronenkulturen, die gleichzeitig mit 50 μM DHPG und 100 μM MPEP stimuliert wurden, zeigten nach 8 Stunden eine signifikante Erhöhung der Anzahl VILIP-1-positiver Interneurone um 12% auf 64% (siehe Abbildung 11 J-L und Abbildung 12). Die Tatsache, dass der beobachtete Effekt eines Agonisten der Rezeptoren mGluR1 und mGluR5 durch einen selektiven mGluR5 Antagonisten nicht beeinflusst werden konnte, lenkt den Blick auf den metabotropen Glutamatrezeptorsubtyp 1. Dessen Bedeutung sollte nun durch direkte Antagonistengabe bestätigt werden.

CPCCOEt ist ein nicht-kompetitiver Antagonist des metabotropen Glutamatrezeptor 1 mit einer IC_{50} von 6,5 μM (Litschig et al. 1999). Mit der Applikation von 50 μM CPCCOEt gelang es, den regulatorischen Effekt von DHPG auf die VILIP-1-Expression zu unterbinden (siehe Abbildung 11 M-O).

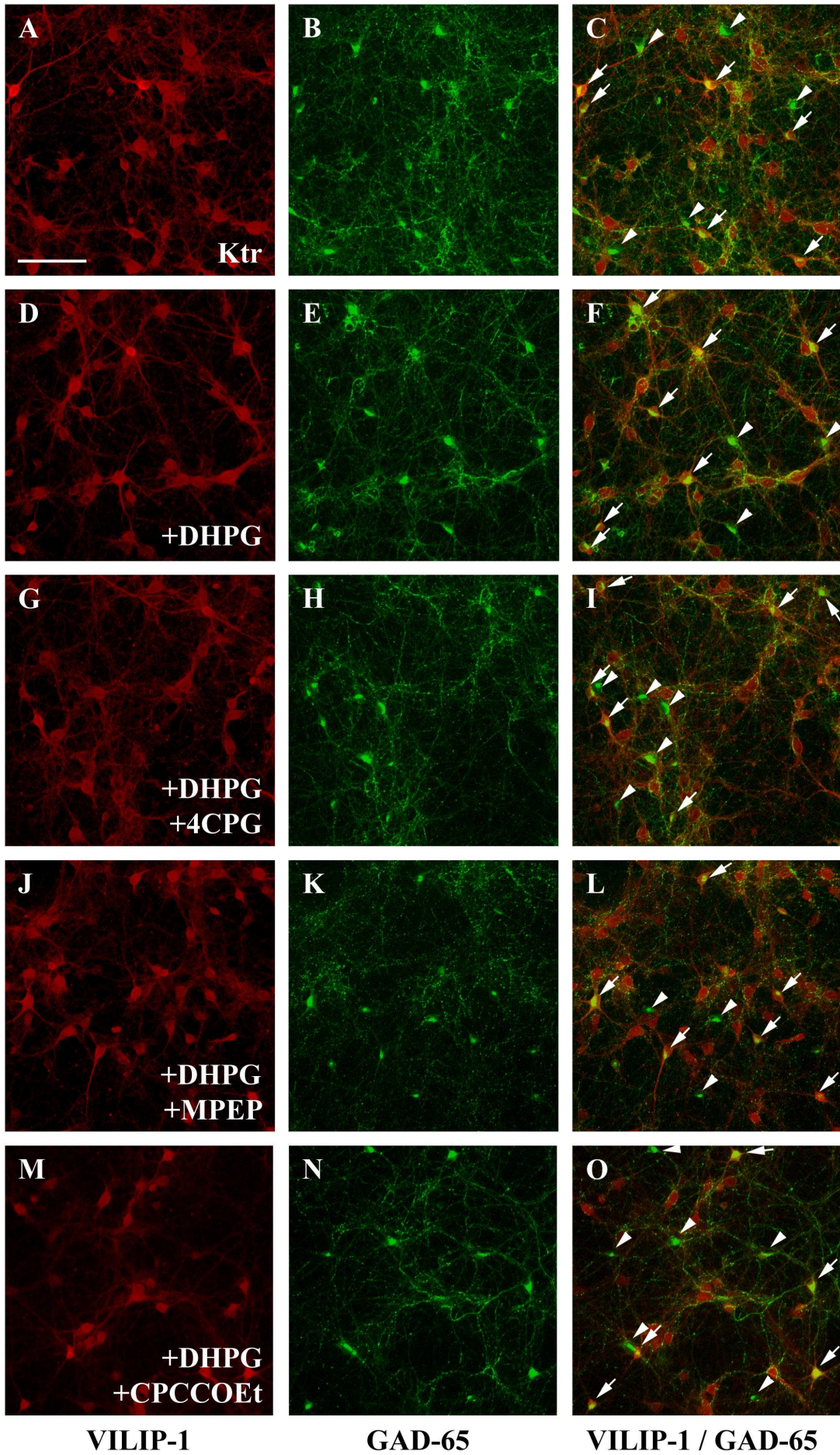


Abbildung 11: (Seite 42) **Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen von VILIP-1 und GAD-65 in hippocampalen Neuronenkulturen mit und ohne Applikation von 50 μ M DHPG, 50 μ M 4CPG, 100 μ M MPEP und 50 μ M CPCCOEt.** 16 Tage alte hippocampale Neurone wurden für 8 Stunden stimuliert, im Anschluss fixiert und mit polyklonalen Antikörpern gegen VILIP-1 (aus Kaninchen, Cy3-markierte Zweitantikörper, rote Fluoreszenz, A, D, G, J und M) und monoklonalen Antikörpern gegen den Interneuronenmarker GAD-65 (aus Maus, Alexa Fluor™ 488-markierte Zweitantikörper, grüne Fluoreszenz, B, E, H, K und N) gefärbt. C, F, I, L und O zeigen die übereinander gelegten Bilder. Die Bilder A-C zeigen eine unbehandelte Kontrolle. Die Zellen in D-F wurden mit DHPG stimuliert. In den Bildern G-I wurden die Zellen 30 Minuten vor DHPG-Gabe mit 4CPG, in den Bildern J-L mit MPEP und in den Bildern M-O mit CPCCOEt behandelt. Die Pfeile markieren GAD-65 und VILIP-1-positive Neurone, während die Pfeilspitzen auf GAD-65-positive aber VILIP-1-negative Neurone zeigen. Die Fluoreszenz wurde an einem Leica-Fluoreszenzmikroskop (Leica DM RA) visualisiert. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mittels der CCD-Kamera Leica DC200 (768x582 Pixel) und der Software Leica-DC-Viewer (Leica, Wetzlar), die Auswertung mit Hilfe von Adobe Photoshop 5.5 für Macintosh. Längsbalken in A= 100 μ m.

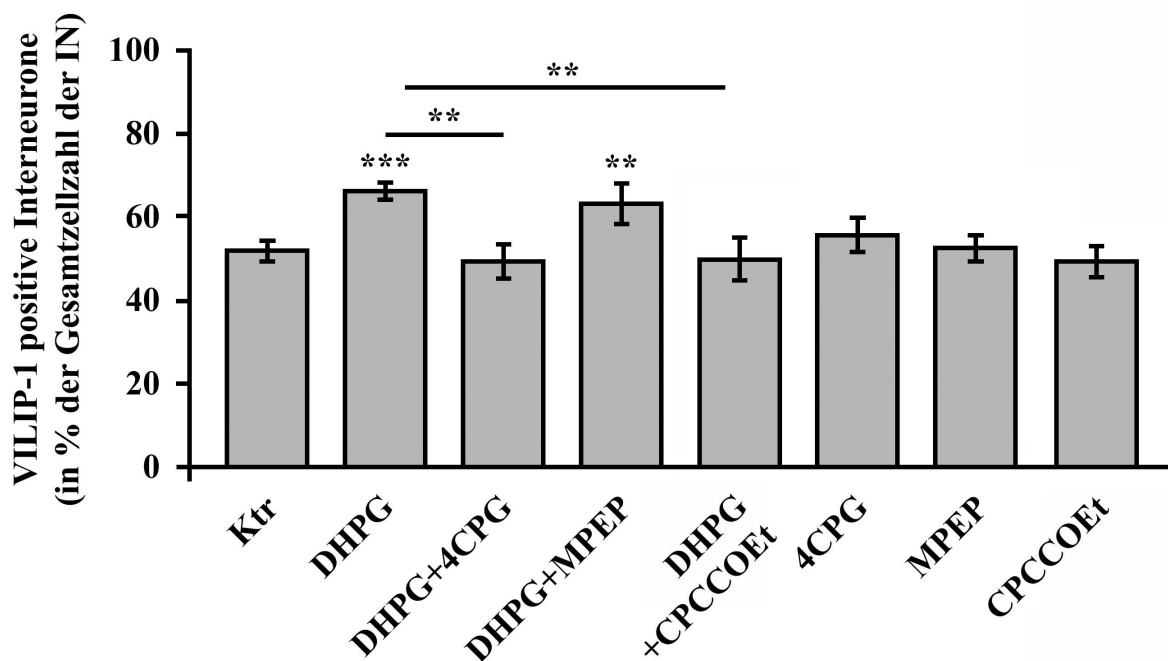


Abbildung 12: **Quantitative Auswertung doppel-immunfluoreszenzgefärbter Bilder (siehe Abbildung 11).** Die Regulation der VILIP-1-Expression in hippocampalen Interneuronen wurde anhand des relativen Anteils VILIP-1-positiver Interneurone an der Gesamtzellzahl GAD-65-positiver Neurone mit und ohne Behandlung mit DHPG (50 μ M), dem metabotropen Glutamaterezeptorantagonisten der Gruppe I 4CPG (50 μ M), einem Antagonisten des Subtyps 5, MPEP (100 μ M), und einem Antagonisten des Subtyps 1, CPCCOEt (50 μ M), der metabotropen Glutamaterezeptoren untersucht. Die Grafik zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens 4 verschiedenen Experimenten ($n \geq 4$). Die Sternchen symbolisieren die mittels zweiseitigem student's t-Test ermittelten Signifikanzen im Bezug auf die Kontrolle (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Die quantitative Auswertung erbrachte mit einem Anteil VILIP-1-positiver Interneurone an der Gesamtinterneuronenzahl von 51% ein ähnliches Ergebnis wie zuvor die Applikation von 4CPG (siehe Abbildung 12). Eine Beteiligung des metabotropen Glutamatrezeptors 1 an der VILIP-1-Regulation konnte somit direkt nachgewiesen werden.

Die alleinige Gabe der Antagonisten 4CPG, MPEP und CPCCOEt führte zu keiner signifikanten Veränderung der VILIP-1-Expression in Interneuronen (siehe Abbildung 12).

Um der Frage einer möglichen Interaktion von metabotropen Glutamatrezeptoren des Subtypes 1 und VILIP-1 in hippocampalen Interneuronen weiter nachzugehen, sollten Kolokalisationsstudien durchgeführt werden.

Dabei war bereits bekannt, dass mGluR1 β und mGluR5, nicht jedoch mGluR1 α , in hippocampalen Pyramidenzellen zu finden sind (Lujan et al. 1997; Shigemoto et al. 1997; Ferraguti et al. 1998), während mGluR1 α im Hippokampus nur in Interneuronen und dort insbesondere in Somatostatin-haltigen GABAergen Neuronen des Stratum oriens und des Alveus exprimiert wird (Baude et al. 1993; Pellegrini-Giampietro 2003; Ferraguti et al. 2004).

Mittels Kolokalisation konnte für mGluR1 α gezeigt werden, dass er mit VILIP-1 im Hippokampus *in vivo*, insbesondere in Interneuronen des Stratum oriens der CA1-Region und im Gyrus dentatus, assoziiert ist (unveröffentlichte Daten: Zhao et al.).

3.2.2 mGluR1 α ist mit VILIP-1 in hippocampalen Interneuronen koexprimiert

Um die Ergebnisse der *in vivo* Studien, die zeigen, dass VILIP-1 mit mGluR1 α kolokalisiert, in der hippocampalen Zellkultur zu bestätigen, wurden immunzytochemische Färbungen mit dem Interneuronenmarker GAD-65, mGluR1 α und VILIP-1 durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass ein Teil der hippocampalen Interneurone in den Somata und Neuriten stark immunreaktiv für mGluR1 α ist (siehe Abbildung 13 A, B, D und E), während die übrigen Neurone und Interneurone nur eine schwache Färbung der Zellkörper zeigen (siehe Abbildung 13 A).

Die stark mGluR1 α -immunreaktiven Neurone waren bei allen immunzytochemischen Färbungen zu 100% GAD-65-positiv und damit Interneurone (Abbildung 13 A und B). Auffällig war die intensive Färbung der Dendriten, womit sich die stark mGluR1 α -positiven Interneurone trotz eines relativ geringen Anteils von ca. 11% an der Gesamtzahl der Interneurone gut auffinden bzw. diskriminieren ließen.

Die schwächer mGluR1 α -positiven Neurone zeigten nur teilweise eine Koexpression mit GAD-65 (Abbildung 13 A). Außerdem waren GAD-65-positive Zellen nachweisbar, die keine

Immunreaktivität für mGluR1 α zeigten (Abbildung 13 A und C). Daraus folgt, dass die mGluR1 α -Expression in Interneuronen des Hippokampus sehr verschieden sein kann.

Obwohl mGluR1 α als ein Interneuronen-spezifischer Rezeptor beschrieben wird, scheinen auch nicht-GABAerge Neurone mGluR1 α -positiv zu sein (Abbildung 13 A). Anhand dieser Färbungen kann nicht entschieden werden, ob es sich bei den schwach positiv gefärbten Zellen um eine unspezifische Immunreaktivität, zum Beispiel in Form von Kreuzreaktivität mit mGluR1 β handelt oder um den Nachweis von mGluR1 α in hippokampalen Hauptneuronen.

Abschließend sollte die Frage bearbeitet werden, ob es Hinweise für eine Kolo-kalisation von VILIP-1 und mGluR1 α gibt, denn eine intrazelluläre gemeinsame Expression der beiden Proteine erhöht die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion und damit eines direkten Zusammenhangs von Rezeptorstimulation und Proteinregulation. Da es wegen einer Antikörperkreuzreaktion von Maus- und Rattenantikörpern nicht möglich war, immunzytochemische Dreifachfärbungen durchzuführen, wurde nur die Koexpression von VILIP-1 mit mGluR1 α untersucht.

Eine Koexpression von VILIP-1 mit mGluR1 α konnte sowohl in stark als auch in schwach mGluR1 α exprimierenden Neuronen gefunden werden (Abbildung 13 D-F). Da von den vorausgegangenen Experimenten bekannt war, dass es sich bei den stark mGluR1 α -positiven Neuronen immer um Interneurone handelt, waren diese von besonderem Interesse. Unter diesen konnten sowohl VILIP-1-negative (Abbildung 13 D) als auch VILIP-1-positive (Abbildung 13 E und F) Neurone gefunden werden. Interessanterweise lag bei den stark mGluR1 α exprimierenden Zellen der Anteil VILIP-1-positiver Neurone mit ca. 20% deutlich unter dem durchschnittlichen Anteil VILIP-1 exprimierender Interneurone von 51-52% an der Gesamtzahl der Interneurone.

Bei den übrigen Neuronen waren sowohl eine Koexpression von VILIP-1- und schwacher mGluR1 α -Immunreaktivität als auch eine isolierte Expression von VILIP-1 oder mGluR1 α nachweisbar (Abbildung 13 D und E). Da bei diesen Zellen jedoch unklar blieb, um welchen Zelltyp es sich im Einzelnen handelte und ob die schwache mGluR1 α -Immunreaktivität spezifisch war, waren diese Zellen nur eingeschränkt auswertbar. Insgesamt ist also eine zelluläre Koexpression von VILIP-1 mit dem metabotropen Glutamaterezeptor 1 α , dessen Stimulation zu einer signifikanten Erhöhung der VILIP-1-Expression führt, nachweisbar. Da beide Proteine jedoch ubiquitär in Soma und Fortsätzen detektierbar sind, kann über eine spezifische subzelluläre Kolo-kalisation keine Aussage getroffen werden.

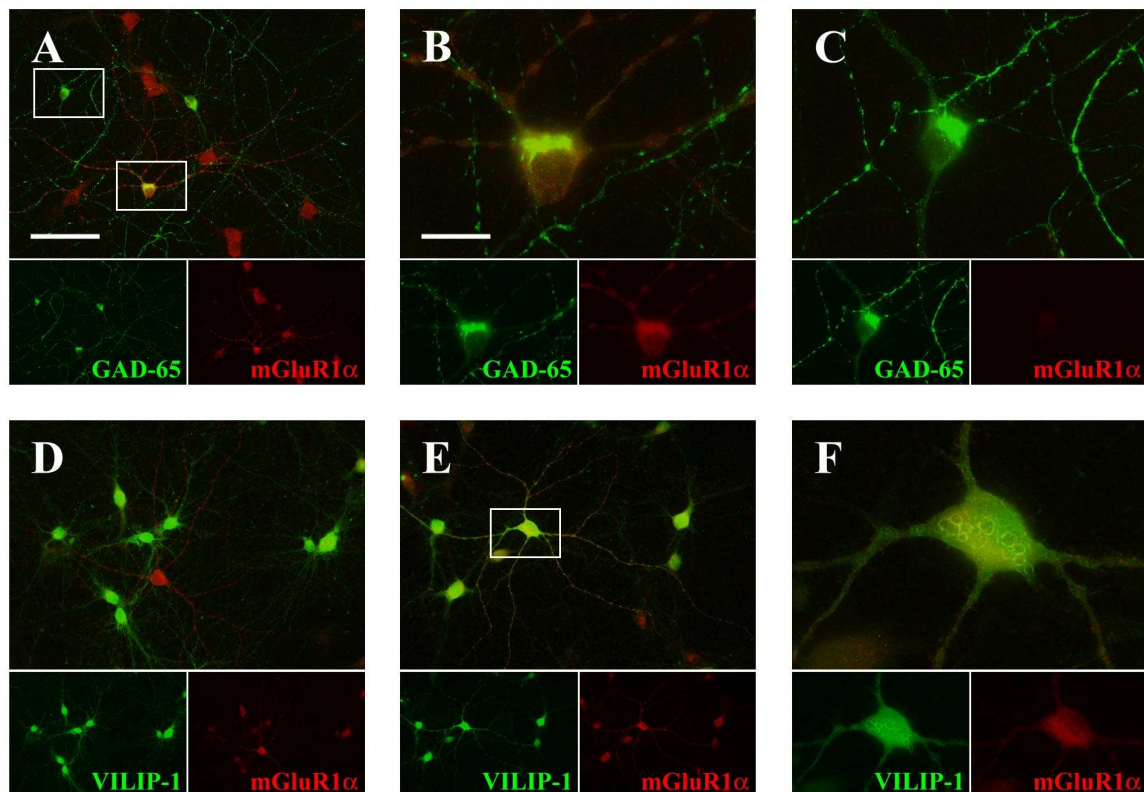


Abbildung 13: Koexpression von mGluR1 α mit VILIP-1 und GAD-65 in hippocampalen Interneuronen. Mit Hilfe von Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen mit mGluR1 α , VILIP-1 und GAD-65 wurde die Lokalisation des mGluR1 α und dessen mögliche zelluläre Koexpression mit dem Interneuronenmarker GAD-65 und VILIP-1 untersucht. 16 Tage alte hippocampale Neurone wurden fixiert und mit polyklonalen Antikörpern gegen mGluR1 α (aus Kaninchen, Cy3-markierte Zweitantikörper, rote Fluoreszenz, A-F), monoklonalen Antikörpern gegen GAD-65 (aus Maus, Alexa Fluor™ 488-markierte Zweitantikörper, grüne Fluoreszenz, A, B und C) und polyklonalen Antikörpern gegen VILIP-1 (aus Ratte, Alexa Fluor™ 488-markierte Zweitantikörper, grüne Fluoreszenz, D, E und F) gefärbt. Die großen Bilder zeigen die überlagerten Bilder der jeweils dazugehörigen klein abgebildeten Einzelfärbungen. In Bild A ist ein typischer Ausschnitt einer hippocampalen Zellkultur gezeigt. Die Bilder B und C zeigen 5fache Vergrößerungen der in A eingerahmten Ausschnitte. D zeigt ein stark mGluR1 α -positives, jedoch VILIP-1-negatives Neuron, E zeigt ein stark mGluR1 α -positives und VILIP-1-positives Neuron. F zeigt eine 5fache Vergrößerung des in E eingerahmten Ausschnitts. Die Fluoreszenz wurde an einem Leica-Fluoreszenzmikroskop (Leica DM RA) visualisiert. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mittels der CCD-Kamera Leica DC200 (768x582 Pixel) und der Software Leica-DC-Viewer (Leica, Wetzlar), die Auswertung mit Hilfe von Adobe Photoshop 5.5 für Macintosh. Längsbalken in A= 100 μ m, in B= 20 μ m.