

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zur funktionellen Rolle von VILIP-1: Effekte von Vilip-1 auf Guanylatcyclasen

Ein Effekt von VILIP-1 auf die Produktion von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) in verschiedenen Zellen konnte bereits gut dokumentiert werden (Braunewell und Gundelfinger, 1997; Boekhoff et al., 1997; Braunewell et al., 1997; Lin et al., 2002a; Mahloogi et al., 2003; siehe 2.4 *Zelluläre Funktion von NCS-Proteinen*). Aufgrund der sehr hohen Homologie der katalytischen Domänen der Cyclasen wurde ebenfalls ein Effekt, sowie eine physikalische Interaktion mit den Guanylatcyclasen A und B gefunden. VILIP-1 erhöht abhängig von der Lokalisation die cGMP-Produktion und bindet in calciumabhängiger Weise an die katalytischen Domänen der GCs. Um einen Einfluss von VILIP-1 auf cGMP-Signaltransduktionwege auch in Neuronen zu zeigen, wurde ein Modellsystem gewählt, in dem die Proteine natürlich exprimiert werden. In Körnerzellkulturen aus dem Cerebellum der Ratte konnte ein Effekt von VILIP-1 auf die GC-B festgestellt werden, nicht jedoch auf die GC-A (Braunewell et al., 2001).

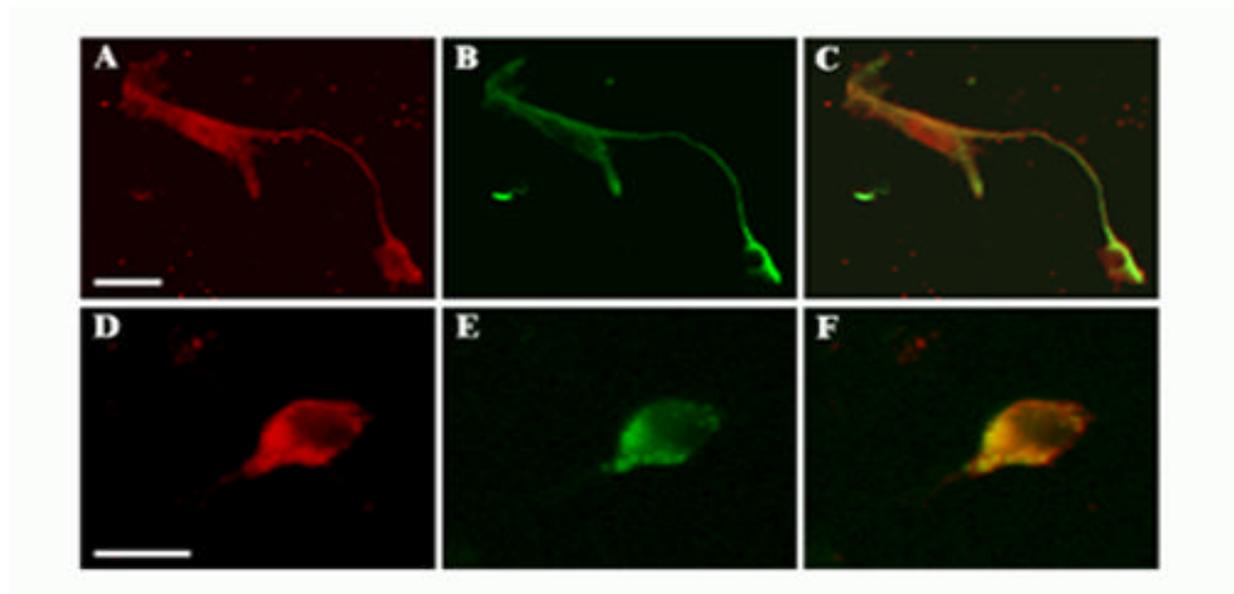


Abb. 5. Expression von GC-A und GC-B in Körnerzellkulturen und Kolokalisation von GC-B mit VILIP-1 in Neuronen

Körnerzellkulturen wurden nach 2,5 Tagen *in vitro* mit Antiseren gegen GC-A, bzw. GC-B (A, bzw. D: Cy3 gekoppelter Zweitantikörper, rote Fluoreszenz), sowie mit polyklonalen GFAP-Antikörpern, bzw. einem monoklonalen VILIP-1 Antikörper (B, bzw. E: Alexa488 gekoppelter Zweitantikörper, grüne Fluoreszenz) gefärbt. C: Überlagerung von A und B, F: Überlagerung von D und E. Balken in A und D = 5 μ m.

Kolokalisationstudien mittels Immunfluoreszenzmikroskopie zeigen, dass VILIP-1 und GC-B

in Körnerzellen kolokalisieren, während GC-A nicht in VILIP-1-positiven Neuronen zu finden ist, sondern in Zellen, die positiv für den Glia-Marker GFAP (glial fibrillary acidic protein) sind (siehe Abb. 5). Da VILIP-1 im Cerebellum der Ratte eine starke Expression in Körnerzellen zeigt, nicht jedoch in Gliazellen, ist zu schließen, dass GC-B, nicht aber GC-A der physiologische Interaktionspartner von VILIP-1 in Körnerzellen aus dem Kleinhirn der Ratte ist (Braunewell et al., 2001).

Ausgehend von diesen Resultaten, wurden im weiteren Verlauf der Arbeit die Effekte von VILIP-1 auf GC-B detailliert untersucht.

4.1.1 Effekte auf Guanylatcyclase-Aktivität in hippocampalen Neuronen

Der Hippokampus ist für die Bildung von Lern- und Gedächtnisfunktionen von besonderer Bedeutung (Milner und Pennfield, 1955; Milner, 1959). Da einige verwandte Proteine der NCS-Familie in Zusammenhang mit diesen Funktionen charakterisiert wurden (siehe 2.4 *Zelluläre Funktion von NCS-Proteinen*), ist es vor diesem Hintergrund interessant zu untersuchen, ob die funktionelle Interaktion von VILIP-1 mit GC-B auch im Hippokampus eine Rolle spielt.

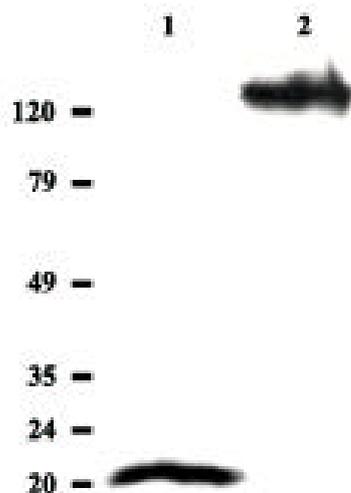


Abb. 6. Westernblotanalyse zur Expression von VILIP-1 und GC-B in Hippokampuskulturen

Bahn 1 zeigt Gesamtzellhomogenat von 14 Tage alten Hippokampuskulturen nach SDS-PAGE und Transfer der Proteine auf Nitrozellulose, dass mit einem Antikörper gegen VILIP-1 aus Kanninchen inkubiert wurde. Bahn 2 zeigt Gesamtzellhomogenat, dass mit einem Antikörper gegen GC-B aus Kanninchen inkubiert wurde. Die Detektion der Primärantikörper erfolgte mittels Inkubation von Peroxidase gekoppelten anti-Kanninchen Sekundärantikörpern (Santa-Cruz), die mit dem ECL-System (Pierce) nachgewiesen wurden. Die Größen des Proteinstandards sind links in kDa angegeben. In Bahn 1 wurden 5 μ g Protein zur SDS-PAGE aufgetragen, in Bahn 2 30 μ g Protein.

Die Guanylatcyclase B ist in verschiedenen Hirnarealen im adulten Rattenhirn exprimiert, unter anderem auch im Hippokampus (Herman et al., 1996). Über eine Expression der Cyclase in hippocampalen Neuronenkulturen ist jedoch nichts bekannt. Eine Westernblotanalyse von 14 Tage alten Hippokampuskulturen mit einem polyklonalen,

affinitätsgereinigtem Antikörper zeigte ein deutliches Signal mit der Größe von ca. 130 kDa (Abb. 6). Die VILIP-1 Expression im Hippokampus und in hippokampalen Neuronenkulturen wurde bereits eingehend beschrieben (Spilker et al., 2002; Spilker und Braunewell 2003), daher erscheint eine Kolokalisation der beiden Proteine im Hippokampus möglich.

4.1.1.1 Verteilung von VILIP-1 und GC-B in hippokampalen Neuronenkulturen

Die Untersuchung der subzellulären Verteilung von VILIP-1 in hippokampalen Neuronen in Kultur zeigt eine starke Expression im Soma der Zellen, aber auch ein Vorkommen in dendritischen Fortsätzen. Nach Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels ist der sogenannte Calcium-Myristoyl-Switch an die Zellmembran sowie an intrazelluläre Membranen, z.B. die des trans-Golginetzwerkes, zu beobachten. Eine Membranlokalisierung ist teilweise auch in nicht stimulierten Neuronen zu beobachten, welche auf Aktivität der Neurone in der Zellkultur schließen lässt. Diese Membranassoziation ist allerdings nicht so massiv wie nach künstlicher Stimulation durch das Calciumionophor Ionomycin (Spilker et al., 2002, Spilker und Braunewell, 2003).

Im Gegensatz zu VILIP-1 ist über die subzelluläre Verteilung der GC-B in hippokampalen Neuronen in Kultur nichts bekannt. Aufgrund der Struktur des Enzyms ist eine Membranlokalisierung zu erwarten. Dies konnte in cerebellaren Körnerzellkulturen bestätigt werden, wo eine partielle Kolokalisation von GC-B mit VILIP-1 an der Zellmembran zu erkennen ist (Abb. 5).

Um zu untersuchen, ob VILIP-1 und GC-B in hippokampalen Neuronen koexprimiert werden, wurden detaillierte Kolokalisationsstudien mittels Immunfluoreszenzmikroskopie durchgeführt.

VILIP-1 und GC-B sind in der überwiegenden Mehrzahl der Neurone in Kultur exprimiert, wie in Kolokalisationsstudien mit dem neuronalen Marker MAP-2 (Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2) festzustellen war. Neurone, die MAP-2-positiv sind, aber keine Immunreaktivität für VILIP-1 oder GC-B zeigen, sind mit einem Pfeil markiert (Abb. 7A, B). Eine Koexpression von VILIP-1 und GC-B ist in einer hohen Anzahl der Zellen zu beobachten, jedoch liegt diese nicht bei 100 Prozent, da es sowohl Zellen gibt, die eine Immunreaktivität für VILIP-1, nicht jedoch für GC-B aufweisen, als auch Zellen in denen das Gegenteil der Fall ist. Desweiteren exprimieren die Neurone die Proteine in unterschiedlicher Stärke und vereinzelt scheint es Zellen zu geben, die weder VILIP-1 noch GC-B exprimieren. Dies lässt sich jedoch nur anhand der Hintergrundfärbung der Zweitantikörper schließen und ist nicht zweifelsfrei zu beurteilen (Abb. 7 C-F).

In kultivierten hippokampalen Neuronen zeigt GC-B die stärkste Immunreaktivität im Soma der Zellen, ist jedoch auch in dendritischen Fortsätzen lokalisiert (Abb. 7 D, G).

Die Membranständigkeit des Enzyms ist besonders in dendritischen Fortsätzen zu beobachten (Abb. 7 G), welches sich in einer partiellen Kolokalisation von GC-B und VILIP-1 im Dendritenbaum auswirkt, da VILIP-1 in dendritischen Fortsätzen vorwiegend eine

Membranassoziation zeigt (Abb.7 H, I).

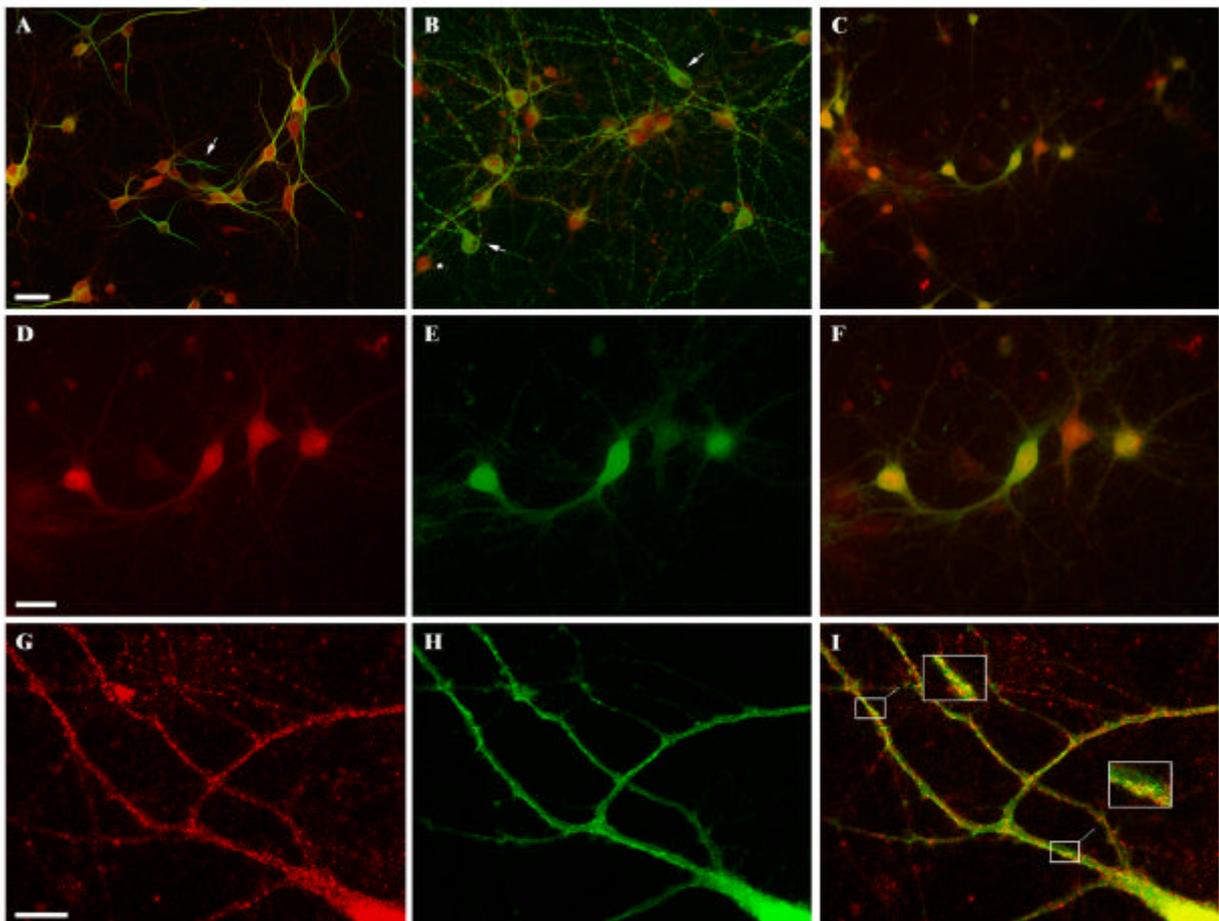


Abb. 7. Verteilung von GC-B und VILIP-1 in hippocampalen Zellkulturen

Hippokampuskulturen wurden nach 14 Tagen *in vitro* fixiert und immungefärbt. **A:** Koimmunfärbung mit polyklonalen Antikörpern gegen MAP-2 (Alexa488-gekoppelter Zweitantikörper) und VILIP-1 (Cy3-gekoppelter Zweitantikörper). Der Pfeil markiert ein MAP-2-positives und VILIP-1-negatives Neuron. **B:** Koimmunfärbung mit polyklonalen Antikörpern gegen MAP-2 (Alexa488-gekoppelter Zweitantikörper) und GC-B (Cy3-gekoppelter Zweitantikörper). Die Pfeile markieren MAP-2-positive und GC-B-negative Neurone. **C:** Koimmunfärbung mit polyklonalen Antikörpern gegen VILIP-1 (Alexa488-gekoppelter Zweitantikörper) und GC-B (Cy3-gekoppelter Zweitantikörper). **D-F:** Ausschnittsvergrößerung aus C. Die Immunreaktivität von GC-B (D) und VILIP-1 (E) sind im Einzelnen dargestellt, sowie die Überlagerung von D und E in F. **G-I:** Vergrößerung eines Dendritenbaums eines Neurons, welcher mit Antikörpern gegen GC-B (G) und VILIP-1 (H) immungefärbt wurde. Die Überlagerung der Aufnahmen ist in I dargestellt, die Kästchen stellen Ausschnittsvergrößerungen aus dem Dendritenbaum dar. Balken in A = 30 μm , in D = 20 μm und in G = 10 μm .

Durch die Kolokalisation VILIP-1 und GC-B in hippocampalen Neuronen in Kultur, besteht die Möglichkeit eines funktionellen Effektes von VILIP-1 auf die Aktivität der GC-B, ähnlich, wie er schon in cerebellaren Körnerzellen gezeigt werden konnte.

4.1.1.2 Effekte von VILIP-1 auf GC-B-Aktivität in hippocampalen Neuronen

Aufgrund der Modulation der Cyclase-Aktivität durch VILIP-1 in verschiedenen Zelllinien und cerebellaren Körnerzellen (Braunewell et al., 2001), sollte ein möglicher Einfluss auf GC-B in dissoziierten hippocampalen Neuronen in Kultur untersucht werden, da beide Proteine in diesen Zellen natürlich exprimiert werden und kolokalisieren. Um einen Effekt von VILIP-1 auf die Aktivität der GC-B charakterisieren zu können, musste die Expression des Proteins im Vergleich zu einer Kontrolle moduliert werden. Als erster Ansatz diente hierzu eine transiente Transfektion von Hippokampuskulturen mit einem Vektor, der die VILIP-1-cDNA kodiert und die Proteinexpression von VILIP-1 erhöht. Mit diesem Vektor transfizierte Kulturen werden im Folgenden als pOPR-V-1 bezeichnet. Als Kontrolle, um Transfektionsartefakte als Effektor der GC-B-Aktivität auszuschließen, wurden Kulturen mit einem leeren Vektor transfiziert, der für kein Protein kodiert. Diese Kulturen werden als pOPR bezeichnet (Vektorkarten, siehe 7. Anhang). Mit Hilfe von modifizierten Antisense-Oligonukleotiden (ODN = Oligodeoxynukleotid) sollte in einem weiteren Ansatz die VILIP-1 Proteinexpression im Vergleich zu Kontrollzellen gesenkt werden. ODN sind circa 20 Basen lange Nukleotide, die den Gegenstrang zu einem bestimmten Bereich der mRNA, hier VILIP-1 mRNA, codieren, an diesen Bereich der mRNA binden und die Translation des Proteins verhindern (Baker et al., 2001, Zamratski et al., 2001; Sequenzen der ODN und Bindungsstellen, siehe 7. Anhang).

Stimulation der in Hippokampusneuronen exprimierten membranständigen Guanylatcyclase GC-B mit dem Liganden C-Typ natriuretisches Peptid (CNP), führte in mit dem Vektor pOPR-VILIP-1 transient transfizierten Zellen 20 Minuten nach Beginn der Stimulation zu einer circa 90%igen Erhöhung des cGMP-Spiegels gegenüber Kontrollzellen, die mit dem leeren Vektor pOPR transient transfiziert wurden (Abb. 8 A).

Die Transfektionseffizienz wurde mittels Westernblotanalyse überprüft. In den mit dem Vektor pOPR-V-1 transient transfizierten Kulturen wurde eine stark erhöhte VILIP-1 Proteinexpression im Vergleich zu den mit dem leeren Kontrollvektor pOPR transfizierten Kulturen gefunden, während die Proteinexpression des konstitutiv exprimierten β -Tubulin unverändert blieb (Abb. 8 B).

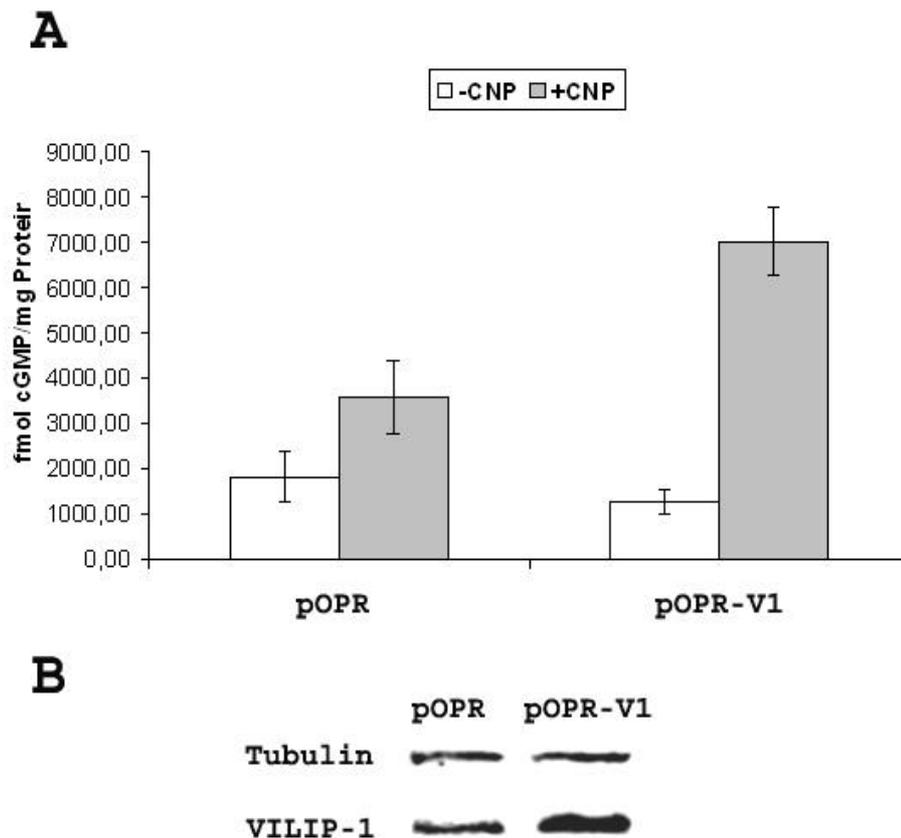


Abb. 8. cGMP-Messungen in transient transfizierten hippocampalen Zellkulturen und Kontrolle der Transfektionseffizienz

Hippokampuskulturen wurden nach 6 Tagen *in vitro* transient transfiziert. Das Stimulationsexperiment erfolgte 24 h nach Transfektionsbeginn. **A:** Repräsentatives cGMP-Stimulationsexperiment. Zellen, die mit dem leeren Kontrollvektor pOPR (linkes Balkenpaar) oder mit dem Vektor pOPR-V-1(rechtes Balkenpaar) transfiziert wurden, wurden 20 min mit 0,2 μ M CNP stimuliert. Anschließend wurde der cGMP-Gehalt der Zellen gemessen. Dargestellt ist die Erhöhung der cGMP-Konzentration in fmol cGMP/mg Protein in CNP-stimulierten Proben (CNP) gegenüber der unstimulierten Kontrolle (Ktr). Phosphodiesterasen wurden durch die Zugabe von 10 μ M IBMX inhibiert **B:** Kontrolle der Transfektionseffizienz mittels Westernblotanalyse. Bahn pOPR zeigt Gesamtzellhomogenat aus Hippokampuskulturen 24 h nach Beginn der Transfektion mit dem leeren Kontrollvektor pOPR. Bahn pOPR-V1 zeigt Gesamtzellhomogenat aus Hippokampuskulturen 24 h nach Beginn der Transfektion mit dem Vektor pOPR-VILIP-1. Es wurden 10 μ g Protein aufgetragen. Die untere Bande zeigt die Expression von VILIP-1, während die obere Bande die Expression des konstitutiv exprimierten Kontrollproteins β -Tubulin zeigt.

Um mehrere dieser Experimente zusammenzufassen, wurde eine veränderte Darstellung gewählt. Die einzelnen Experimente unterschieden sich in den Mengen des produzierten cGMPs bezogen auf die Proteinmenge teilweise recht deutlich. Die Tendenz der Experimente war allerdings eindeutig.

In Abb. 9 ist eine Zusammenfassung der durchgeführten cGMP-Stimulationsexperimente in hippocampalen Neuronen dargestellt. Dabei wurde die Darstellung so gewählt, dass die Werte der einzelnen Experimente als Prozent der Stimulation der Zellen, die mit dem Kontrollvektor

(pOPR) transfiziert wurden, umgerechnet und zusammengefasst wurden.

Eine verstärkte VILIP-1 Proteinexpression erhöht die Aktivität der Guanylatcyclase B nach Stimulation mit dem Liganden CNP um 93,6 Prozent gegenüber den Kontrollzellen (Abb. 9). Dieser hochsignifikante Effekt ($p < 0,005$; zweiseitiger Student's T-Test, $n = 7$) zeigt, dass VILIP-1 die Aktivität der GC-B nach Stimulation in dissoziierten hippocampalen Neuronen erhöht, während die basale Aktivität der GC-B ebenfalls leicht ansteigt, aber nicht signifikant verändert wird.

Da eine verstärkte VILIP-1 Proteinexpression die Aktivität der GC-B nach Stimulation erhöht, sollte nun untersucht werden, ob eine verminderte VILIP-1 Proteinexpression ebenfalls einen Einfluss auf Cyclase-Aktivität hat. Hierzu wurden Antisense-Oligonukleotide (ODN) verwendet, die gegen verschiedene Bereiche der VILIP-1 mRNA gerichtet waren.

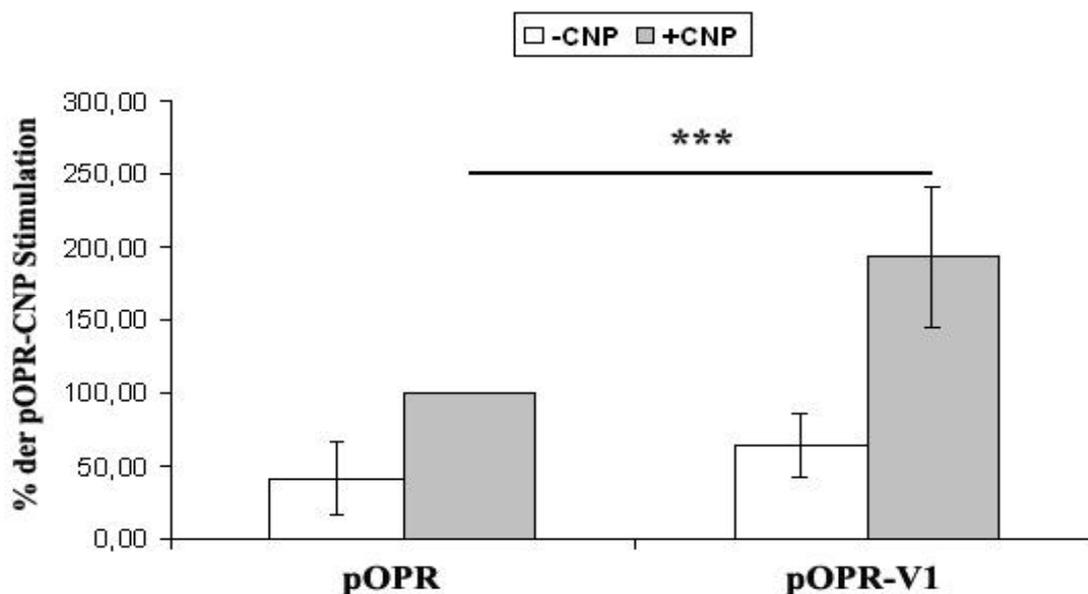


Abb. 9. Zusammenfassung der cGMP-Messungen in transient transfizierten hippocampalen Zellkulturen

Die Darstellung der Messungen erfolgte als prozentuale Angaben der mit CNP stimulierten und dem Kontrollvektor (pOPR) transfizierten Werte, die als 100% gesetzt wurden. Die GC-B Aktivität ist in Zellen, in denen VILIP-1 überexprimiert ist (pOPR-V-1), signifikant erhöht ($p < 0,005$ (***) , zweiseitiger Student's T-Test, $n = 7$). Die Markierung zeigt die Signifikanz zwischen den entsprechenden Werten.

Die hier verwendeten ODN wurden anhand der bekannten Sequenz der VILIP-1 mRNA (PubMed Accession No. D10666) generiert und mit Hilfe des PubMed/BLAST-Programms kontrolliert (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Die Modifikation der ODN besteht aus einem Ersetzen der bei der RNA oder DNA üblichen 3'-5'- Phosphodiesterbrücke durch eine Phosphorothioratbrücke zwischen den jeweils vier endständigen Nukleotiden. Dies hat eine erhöhte Nukleaseresistenz der ODN zur Folge, d.h. eine längere Halbwertszeit der ODN nach Applikation in Kultur, welche circa 10 Stunden für unmodifizierte ODN beträgt (Baker et al., 2001; Zamaratski et al., 2001). Um eine höhere Effektivität der ODN zu erreichen, wurde eine Mischung appliziert.

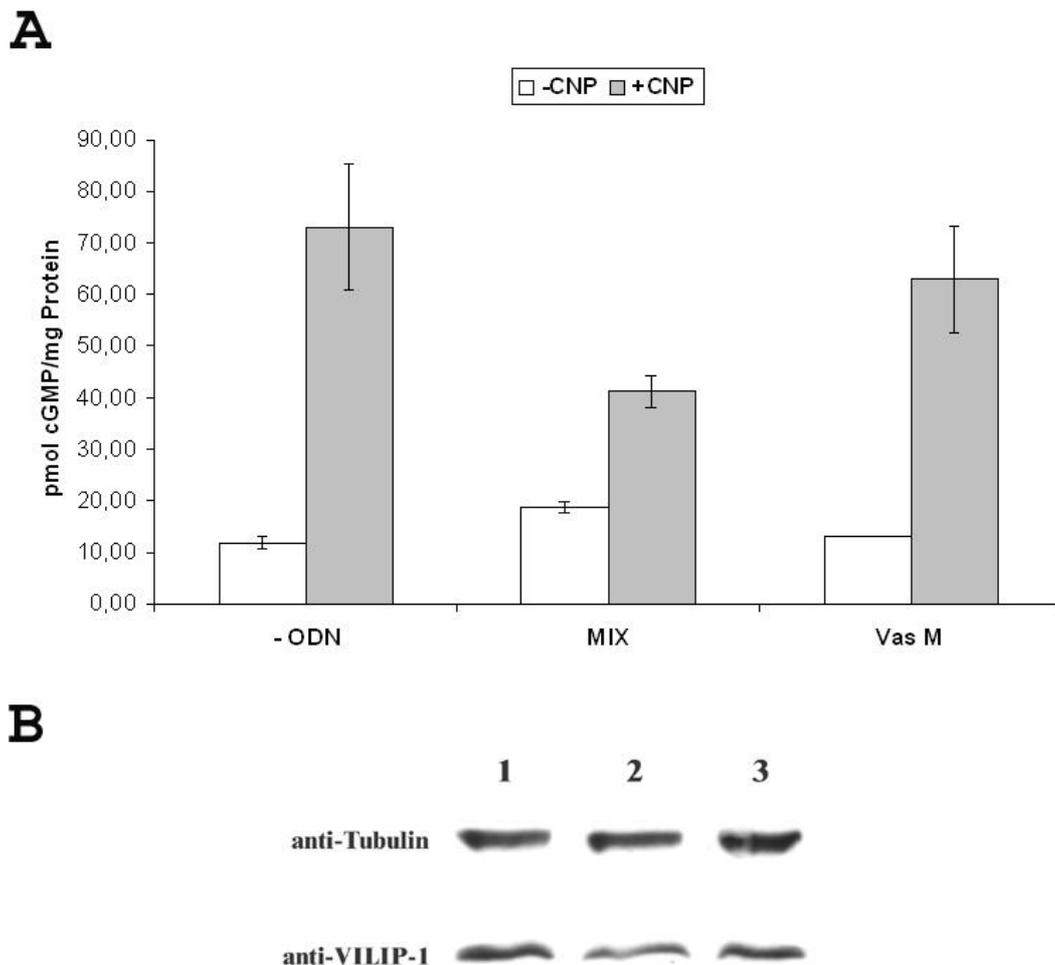


Abb. 10. cGMP-Messung in hippocampalen Zellkulturen nach ODN-Behandlung und Kontrolle der Proteinexpression

Hippokampuskulturen wurden nach 7 Tagen in für 2 Tage mit verschiedenen ODN behandelt. Dabei wurden die ODN nach 24 Stunden erneut zugegeben. **A:** cGMP-Stimulationsexperiment. Zellen, die nicht mit ODN (-ODN), einer Mischung aus zwei bindenden ODN (MIX), oder einem Missmatch-ODN (Vas M) behandelt wurden, wurden 20 min mit 0,2 μ M CNP stimuliert. Anschließend wurde der cGMP-Gehalt der Zellen gemessen (cGMP-RIA Amersham). Dargestellt ist die Erhöhung der cGMP-Konzentration in pmol cGMP/mg Protein in CNP-stimulierten Proben (CNP) gegenüber der unstimulierten Kontrolle (Ktr). Phosphodiesterasen wurden durch die Zugabe von 10 μ M IBMX inhibiert **B:** Kontrolle der Effizienz der ODN-Behandlung mittels Westernblotanalyse. Bahn 1 zeigt Gesamtzellhomogenat aus 9 Tage alten Hippokampuskulturen, die keine Behandlung erfahren haben, Bahn 2 zeigt Homogenat aus Kulturen desselben Experiments die 48 h mit 2 verschiedenen, an VILIP-1 mRNA bindenden ODN in einer Konzentration von je 1,5 μ M behandelt wurden. Bahn 3 zeigt Homogenat, das 48 Stunden mit einem Missmatch-ODN in einer Konzentration von 3 μ M behandelt wurde. Die untere Bande zeigt die Expression von VILIP-1, während die obere Bande die Expression von β -Tubulin als Kontrolle zeigt. 10 μ g Protein wurden in Bahn 1-3 zur SDS-PAGE aufgetragen. Es ist zu beachten, dass die Ergebnisse in A und B aus zwei verschiedenen Experimenten stammen.

Dabei war ein als AS2 bezeichnetes ODN direkt gegen die Sequenz um das ATG-Startcodon

der VILIP-1 mRNA gerichtet, während ein als VAS1 bezeichnetes ODN gegen eine 20 Nukleotide nach dem Startcodon beginnende Sequenz gerichtet ist. Als Kontrolle, um unspezifische Effekte der ODN-Applikation auszuschließen, wurde ein *Mismatch*-ODN (VAS M) gewählt, welches auf der Sequenz des AS2-ODN basiert, jedoch soweit verändert wurde, dass es laut Datenbankanalyse nicht mehr an VILIP-1 mRNA bindet.

Die Dauer der Applikation betrug 48 Stunden und begann am achten Tag der Kultivierung *in vitro*. Die in der Mixtur enthaltenen ODN AS2 und Vas1 wurden in einer Konzentration von je 1,5 μM appliziert, während das Kontrolloligonukleotid Vas M in einer Konzentration 3 μM appliziert wurde. 24 Stunden nach der ersten ODN-Gabe wurden die ODN ein zweites Mal appliziert, um einen ausreichend hohen ODN-Titer zu gewährleisten, da auch modifizierte ODN einem Abbau unterliegen.

Die in Abbildung 10 B dargestellte Westernblotanalyse zeigt einen deutlichen Effekt der an VILIP-1-mRNA-bindenden ODN auf die VILIP-1 Proteinexpression in hippokampalen Neuronen. Durch die ODN-Behandlung erreicht die VILIP-1 Proteinexpression nur circa 50 Prozent der VILIP-1 Proteinexpression von unbehandelten Kulturen (Abb. 10 B, Bahn 2), während das Kontrolloligonukleotid nur einen sehr geringen Einfluss auf die VILIP-1 Proteinmenge hat. Die Proteinexpression von β -Tubulin scheint durch die Applikation von ODN nicht verändert zu werden (Abb 10 B, vergl. Bahnen 1-3). Nach der oben genannten Behandlung der dissoziierten Hippokampuskulturen ergab die Stimulation der GC-B mittels 0,2 μM CNP für 20 min eine verminderte cGMP-Akkumulation in den mit der ODN-Mixtur behandelten Zellen. Die cGMP-Menge erreichte nur circa 55 Prozent des Wertes der unbehandelten Kulturen, während die Applikation des Kontrolloligonukleotids Vas M nur zu einer leichten Erniedrigung der cGMP-Akkumulation führte.

Die hier gezeigten Daten sind nur von eingeschränkter Aussagekraft, da es bisher nicht gelang die VILIP-1 Proteinexpression in hippokampalen Neuronenkulturen mittels der Applikation von bindenden ODN reproduzierbar zu senken. Die Abbildungen 10 A und B resultieren aus zwei verschiedenen Experimenten.

4.1.2 Effekte von VILIP-1 auf den Phosphorylierungsgrad von Guanylatcyclase B

Um den Effekt von VILIP-1 auf die GC-B-Aktivität erklären zu können, sollte der genaue molekulare Wirkmechanismus untersucht werden. Da die Aktivität der Guanylatcyclasen A und B primär über Phosphorylierung, bzw. Dephosphorylierung gesteuert wird, wurde der Einfluss von VILIP-1 auf den Grad der Phosphorylierung der GC-B nach Aktivierung des Enzyms untersucht.

4.1.2.1 Effekte von VILIP-1 auf den Phosphorylierungsgrad in C6 Gliomazelllinien

Zunächst sollte der mögliche Einfluss von VILIP-1 auf den Phosphorylierungsgrad der GC-B in der Gliomazelllinie C6 untersucht werden. Diese Zellen exprimieren natürlicher Weise die GC-B, nicht aber VILIP-1. Deshalb wurden parentale, nicht transfizierte C6-Zellen als Kontrolle eingesetzt und mit stabil transfizierten, VILIP-1-exprimierenden C6.2-Zellen

verglichen, um Rückschlüsse auf einen VILIP-1-Effekt zu ziehen.

Der Phosphorylierungsgrad des Enzyms wurde mittels Antikörpern, die gegen Phosphoserin und Phosphothreonin (Chemicon/Santa Cruz) gerichtet sind, mittels Westernblotanalyse kontrolliert werden. Hierzu wurde die GC-B mit affinitätsgereinigtem polyklonalen Antikörpern immunpräzipitiert und die Eluate einer Westernblotanalyse unterzogen. Die immunpräzipitierte GC-B ist mit einer Größe von circa 130 kDa deutlich detektierbar und gegenüber dem Zellhomogenat stark angereichert (Abb. 11, Bahn 1 und 2). Dabei ist festzustellen, dass fast ausschließlich das intakte Enzym präzipitiert wird und somit, im Gegensatz zu den Zellhomogenaten, kein Abbauprodukt oder die katalytische Domäne detektierbar ist (Braunewell et al., 2001, siehe Abb. 11, vergleiche Bahnen 1, 2 mit Bahnen 3, 4). Jedoch ist in Bahn 1 und besonders deutlich in Bahn 2 eine Bande von circa 50 kDa zu erkennen, die etwas unterhalb der katalytischen Domäne der GC-B in Bahn 3 und 4 läuft. Dies ist sehr wahrscheinlich die schwere Kette des Antikörpers mit dem präzipitiert wurde, da dieser aus Kaninchen gewonnen wurde und der Zweitantikörper gegen Kaninchen gerichtet ist. Aus diesem Grund wird in späteren Abbildungen nur das ganze Enzym mit der entsprechenden Größe gezeigt.

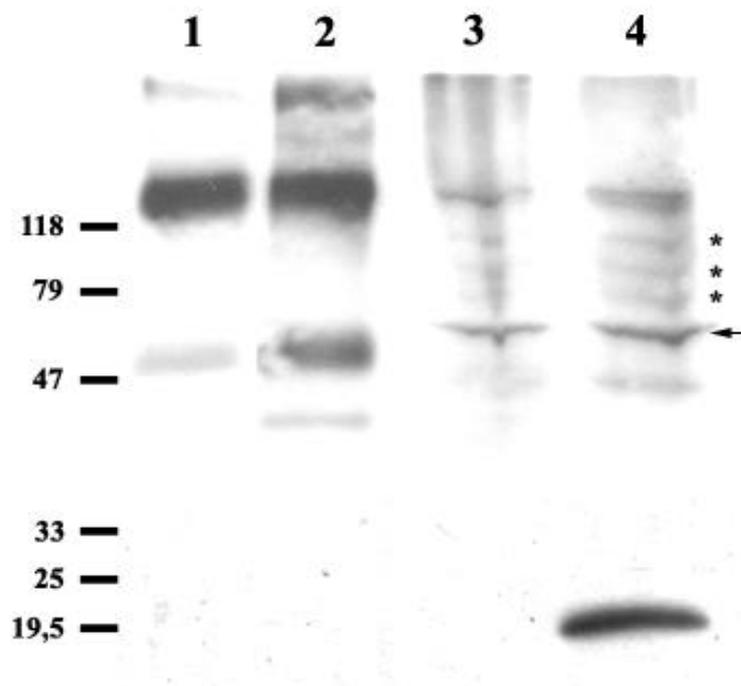


Abb. 11. Immunpräzipitation der GC-B aus C6 und C6.2 Zellen

C6/C6.2-Zellen wurden homogenisiert und nach Zentrifugation wurde der Überstand mit an Agarosebeads gekoppelten Antikörper gegen GC-B inkubiert. Die Eluate wurden einer SDS-PAGE unterzogen und anschließend geblottet. Die Blotmembran wurde auf der Höhe von circa 40 kDa geteilt und der höhermolekulare Teil mit dem GC-B-Antikörper, der niedermolekulare Teil mit dem Kaninchen VILIP-1-Antikörper inkubiert. Die Immunreaktivität wurde mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper gegen Kaninchen detektiert. Bahn 1 zeigt das Eluat der Immunpräzipitation aus C6-Zellen, Bahn 2 zeigt das Eluat der Immunpräzipitation

aus C6.2-Zellen. In Bahn 3, bzw. Bahn 4 ist das Gesamtzellhomogenat aus C6-, bzw. C6.2-Zellen gezeigt. Die Sterne markieren Abbauprodukte, während der Pfeil die katalytische Domäne der GC-B markiert. Die Größen des Proteinstandards sind links in kDa angegeben. In Bahn 1 und 2 sind je 40 µl Eluat, in Bahn 3 und 4 je 20 µg Protein aufgetragen.

Der in Abb. 11 dargestellte Blot zeigt ebenfalls, dass eine Koimmunopräzipitation von VILIP-1 mit GC-B unter diesen Umständen nicht möglich ist, obwohl eine calciumabhängige Interaktion von VILIP-1 mit der katalytischen Domäne der GC-B bereits gezeigt werden konnte (Braunewell et al., 2001). VILIP-1 ist lediglich, wie nicht anders zu erwarten, im Zellhomogenat der C6.2 Zellen zu detektieren (Abb. 11, Bahn 4).

Um eine mögliche Veränderung des Phosphorylierungsgrads des Enzyms zu bestimmen wurden C6 und C6.2 Zellen 20 Minuten mit CNP stimuliert und mit unstimulierten C6 und C6.2 Zellen verglichen. Die Zellhomogenate der vier Proben wurden, wie bereits oben erwähnt, immunpräzipitiert und einer Westernblotanalyse unterzogen. Nachdem die Immunreaktion der Anti-Phosphoantikörper dokumentiert worden war, wurden die Antikörper mittels Inkubation mit einem sauren Puffer entfernt (pH 2,2; *Stripping-Puffer*). Anschließend wurde der Blot erneut blockiert und mit Anti-GC-B Antikörpern inkubiert, um den relativen Phosphorylierungsgrad des Enzyms unter den verschiedenen Bedingungen zu ermitteln. Der Erfolg der Behandlung mit dem Stripping-Puffer wurde durch eine anschließende Inkubation nur mit Zweitantikörpern kontrolliert. Hier konnte kein Signal detektiert werden, was bedeutet, dass die Erstantikörper vollständig, bzw. unterhalb der Sensitivitätsgrenze des Systems entfernt wurden.

Eine Analyse der Phosphorylierung der GC-B ergab, dass das Enzym 20 Minuten nach Stimulation im Vergleich zum nicht stimulierten Enzym um circa 30 Prozent dephosphoryliert wird (Abb12). Der Grad der Phosphorylierung (Abb. 12A, a-P) wurde zur Menge der GC-B (Abb. 12A, GC-B) normalisiert. In VILIP-1-exprimierenden C6.2 Zellen konnte keine Dephosphorylierung der GC-B nach 20 minütiger Stimulation mit CNP festgestellt werden (Abb. 12 A, C6.2). Die Zusammenfassung verschiedener Experimente zeigt, dass in C6 Zellen nach Stimulation der GC-B eine signifikante Dephosphorylierung gegenüber dem nicht stimulierten Enzym stattfindet ($p < 0,05$ (*), zweiseitiger Student's T-Test, $n = 4$). Die stimulierte GC-B zeigt nur eine durchschnittliche Phosphorylierung von 76,7 Prozent im Bezug auf das nicht stimulierte Enzym. In C6.2 Zellen ist dagegen nach 20 Minuten keine Dephosphorylierung der GC-B detektierbar, da der Grad der Phosphorylierung im stimulierten und nicht stimulierten Enzym gleich ist. Für die Zusammenfassung wurde der Grad der Phosphorylierung der GC-B in den nicht stimulierten Zellen jeweils gleich 100 Prozent gesetzt und der Wert nach CNP-Stimulation entsprechend angeglichen.

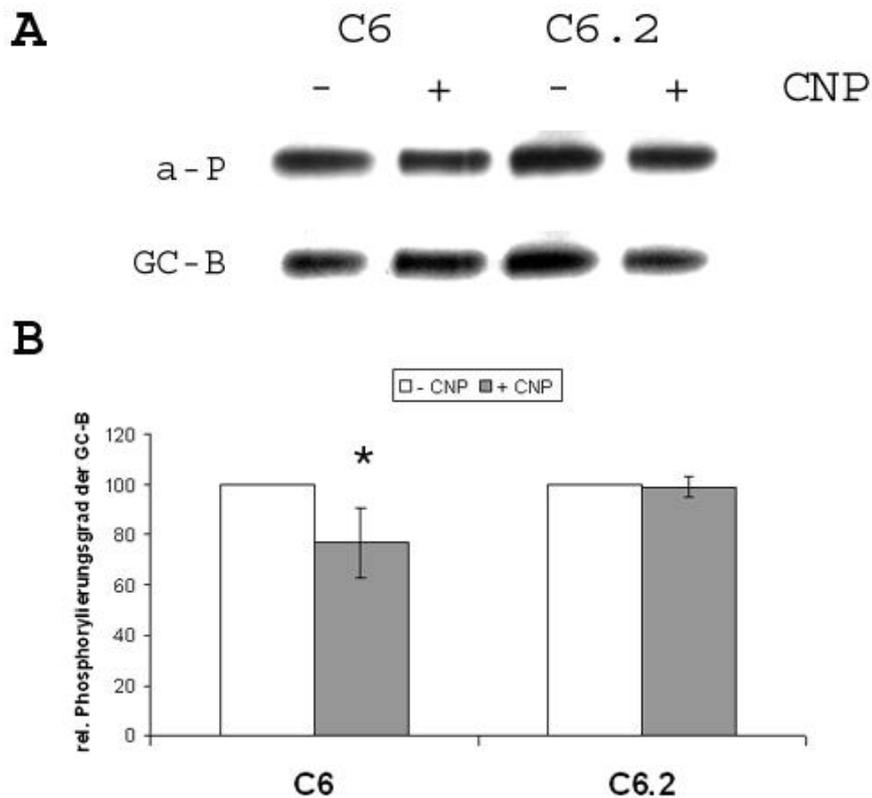


Abb. 12. Phosphorylierung der GC-B nach CNP-Stimulation in C6 und C6.2 Zellen

C6/C6.2-Zellen wurden 20 Minuten mit CNP stimuliert. Als Kontrolle wurden jeweils unstimulierte Zellen verwendet. **A:** In der oberen Reihe ist die immunpräzipitierte GC-B aus C6 und C6.2 Zellen ohne und mit CNP-Stimulation gezeigt, die mit affinitätsgereinigtem GC-B Antikörper detektiert wurde. In der unteren Reihe ist derselbe Blot dargestellt, wobei diesmal die Immunreaktivität durch anti-Phosphoserin/-threonin (Chemicon/Santa Cruz) gezeigt ist. **B:** Zusammenfassung von verschiedenen Stimulationsexperimenten. Der Grad der Phosphorylierung der GC-B aus unstimulierten Zellen wurde jeweils als 100 Prozent gesetzt und der Grad der Phosphorylierung der GC-B aus stimulierten Zellen jeweils in Relation dazu angegeben. Dabei ist zu beachten, dass die Stärke der Phosphorylierung jeweils an der Menge der immunpräzipitierten GC-B normalisiert wurde. In C6-Zellen zeigt die stimulierte GC-B eine signifikant erniedrigte Phosphorylierung um circa 23 Prozent gegenüber der nicht stimulierten GC-B ($p < 0,05$ (*), zweiseitiger Student's T-Test, $n = 4$). In C6.2 Zellen ist keine Dephosphorylierung nach CNP-Stimulation zu beobachten.

4.1.2.2 Effekte von VILIP-1 auf den Phosphorylierungsgrad in hippocampalen Neuronen

Da ein Einfluss von VILIP-1 auf die Phosphorylierung der GC-B in Gliomazellen nachgewiesen werden konnte, sollte nun überprüft werden, ob dies auch in primären Neuronenkulturen der Fall ist. Die Versuche hierzu wurden in hippocampalen Neuronenkulturen durchgeführt, in denen sowohl GC-B und VILIP-1 natürlich exprimiert werden, als auch eine Kollokalisierung, sowie ein funktioneller Effekt von VILIP-1 auf die GC-B bereits gezeigt werden konnten (siehe 4.1.1). Die Modulation des VILIP-1 Proteinspiegels sollte hier, so wie bei den cGMP-Messungen über eine Proteinüberexpression von VILIP-1

mittels transienter Transfektion von sechs Tage alten Kulturen erfolgen. Die Experimente fanden dementsprechend 24 Stunden nach Transfektion statt.

Analog zu der Vorgehensweise in den Gliomazelllinien wurde eine Immunpräzipitation mit sieben Tage alten Hippokampuskulturen durchgeführt. Auch hier zeigte sich, dass die GC-B als ganzes Enzym gut zu präzipitieren ist. In Abb. 13 A, Bahn 1, ist eine Bande in der Höhe von circa 130 kDa deutlich zu erkennen. Die GC-B konnte mittels Immunpräzipitation deutlich gegenüber dem Zellhomogenat angereichert werden (Vergleiche Bahn 1 und 3). Während im Zellhomogenat der C6 Zellen deutliche Abbauprodukte der GC-B zu erkennen waren, sind solche im Zellhomogenat der Hippokampuskulturen nicht zu erkennen (Abb. 13 A, Bahn 3).

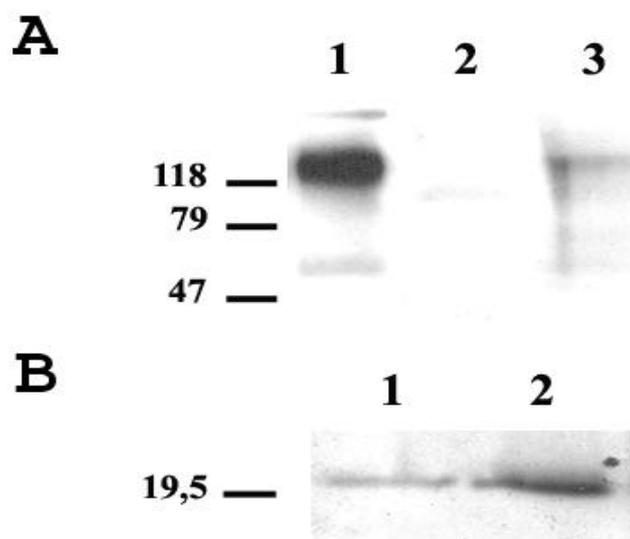


Abb. 13. Immunpräzipitation der GC-B aus hippokampalen Neuronenkulturen und Überprüfung der Transfektionseffizienz

Hippokampale Neurone wurden nach sieben Tagen *in vitro* homogenisiert. **A:** Nach Zentrifugation wurde der Überstand mit an Agarosebeads gekoppelten Antikörper gegen GC-B inkubiert. Das Eluat und der Durchfluss wurden einer SDS-PAGE unterzogen und anschließend geblottet. Die Blotmembran wurde mit dem GC-B-Antikörper inkubiert. Die Immunreaktivität wurde mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper gegen Kaninchen detektiert. Bahn 1 zeigt Eluat der Immunpräzipitation, Bahn 2 zeigt den Durchfluss der Immunpräzipitation. In Bahn 3 ist Gesamtzellhomogenat aus hippokampalen Neuronenkulturen gezeigt. In Bahn 1 und 2 sind je 40 µl Eluat, in Bahn 3 je 20 µg Protein aufgetragen.

B: Gesamtzellhomogenat aus hippokampalen Neuronenkulturen, das mit den Vektoren pOPR und pOPR-V-1 transfiziert worden war, wurde einer SDS-PAGE unterzogen und anschließend geblottet. Die Blotmembran wurde mit dem VILIP-1 Antikörper inkubiert. Die Immunreaktivität wurde mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper gegen Kaninchen detektiert. In Bahn 1 und 2 sind je 20 µg Protein aufgetragen. Die Größen des Proteinstandards sind links in kDa angegeben.

Um einen Eindruck der Effizienz der Immunpräzipitation zu bekommen wurde der Durchfluss des Zellhomogenats nach der Präzipitation ebenfalls einer SDS-PAGE unterzogen. Die GC-B konnte dort jedoch nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 13 A, Bahn 2). Die Transfektionseffizienz wurde analog zu den cGMP-Experimenten ebenfalls per Westernblotanalyse kontrolliert. Auch hier konnte eine verstärkte VILIP-1 Proteinexpression in mit dem Vektor pOPR-V-1 transfizierten gegenüber mit dem leeren Vektor pOPR transfizierten Kulturen, festgestellt werden.

Die Messung des Phosphorylierungsgrads der GC-B erfolgte wie unter 4.1.2.1. Dabei wurden, die mit pOPR oder pOPR-V-1 transfizierten, CNP-stimulierten Hippokampuskulturen, mit nicht stimulierten Kulturen verglichen. In Abbildung 14 A ist ein repräsentatives Experiment dargestellt. Wie auch in den C6 Gliomazellen ist eine deutliche Dephosphorylierung nach CNP-Stimulation in den mit pOPR transient transfizierten Hippokampusneuronen zu erkennen. Dieser Effekt wird noch verstärkt, wenn der Grad der Phosphorylierung an der präzipitierten Menge an GC-B normalisiert wird. In den Hippokampus-neuronen, in denen VILIP-1 überexprimiert wurde, ist diese stimulationsbedingte Dephosphorylierung der GC-B nicht zu erkennen. Abbildung 14 B zeigt die Zusammenfassung von zwei Experimenten. Nach 20 minütiger CNP-Stimulation der mit dem leeren Vektor transfizierten Neuronen ist die GC-B um 34 Prozent weniger phosphoryliert, als in nicht stimulierten Kontrollzellen. In den Neuronen, die VILIP-1 überexprimieren, ist jedoch eher eine leichte, 15 prozentige Zunahme der Phosphorylierung nach Stimulation mit CNP gegenüber nicht stimulierten Kontrollzellen zu erkennen.

Es ist auffällig, dass bereits in nicht stimulierten Neuronen, die mit dem leeren Vektor transfiziert wurden, die GC-B stärker phosphoryliert ist, als in den VILIP-1 überexprimierenden Hippokampusneuronen (Abb. 14A). Dies trifft auch für die Gliomazelllinie zu, wo die GC-B in den VILIP-1 negativen C6 Zellen ebenfalls eine stärkere Phosphorylierung im Vergleich zu den VILIP-1-exprimierenden C6.2 Zellen zeigt (Abb. 12A).

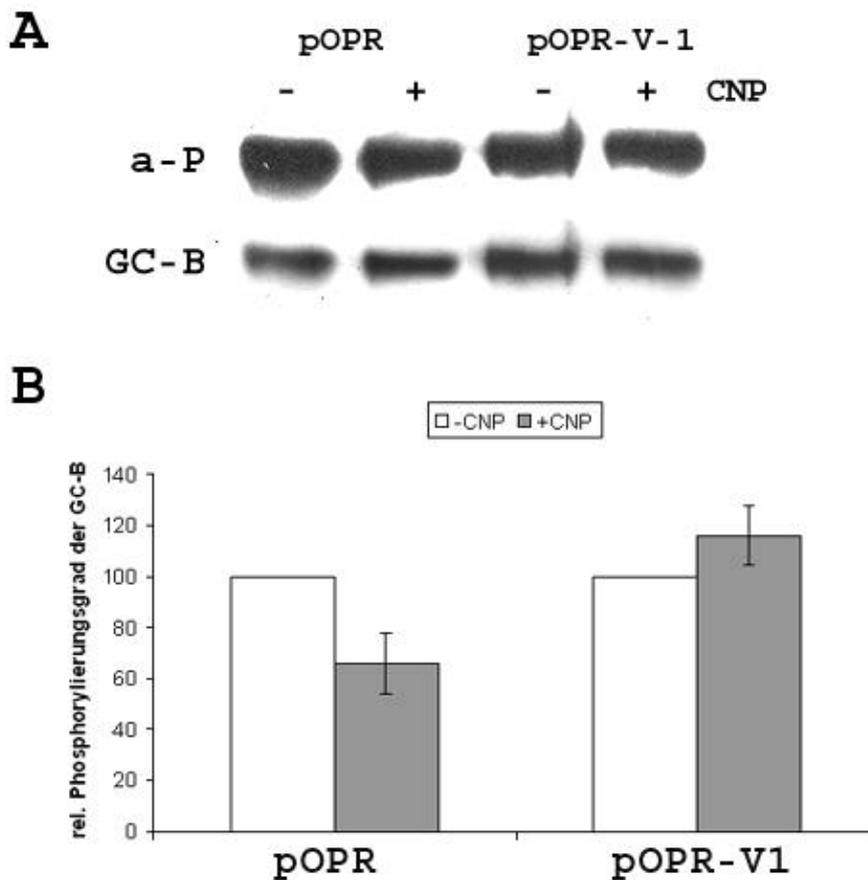


Abb. 14. Phosphorylierung der GC-B nach CNP-Stimulation in hippocampalen Neuronen

Mit den Vektoren pOPR und pOPR-V-1 transfizierte hippocampale Neuronenkulturen wurden 20 Minuten mit CNP stimuliert. Als Kontrolle wurden jeweils unstimulierte Zellen verwendet. **A:** In der oberen Reihe ist die immunpräzipitierte GC-B aus pOPR und pOPR-V-1 transfizierten Zellen ohne und mit CNP-Stimulation, die mit affinitätsgereinigtem GC-B Antikörper detektiert wurde, gezeigt. In der unteren Reihe ist derselbe Blot dargestellt, wobei diesmal die Immunreaktivität durch anti-Phosphoserin/-threonin (Chemicom/Santa Cruz) gezeigt ist. **B:** Zusammenfassung von verschiedenen Stimulationsexperimenten. Der Grad der Phosphorylierung der GC-B aus unstimulierten Zellen wurde jeweils als 100 Prozent gesetzt und der Grad der Phosphorylierung der GC-B aus stimulierten Zellen jeweils in Relation angegeben. Dabei ist zu beachten, dass die Stärke der Phosphorylierung jeweils an der Menge der immunpräzipitierten GC-B normalisiert wurde.

4.1.3 Effekte auf Membrantransport und Rezeptorlokalisierung

Die Desensitivierung der GC-B wird nicht nur über Phosphorylierung, bzw. Dephosphorylierung geregelt, sondern wie bei den meisten Rezeptoren auch über Internalisierung des Rezeptors. Beide Prozesse sind nicht strikt zu trennen, darum soll im Folgenden untersucht werden, ob VILIP-1 ebenfalls die Rezeptorlokalisierung, das heißt, die Zelloberflächenexpression des Rezeptors beeinflusst.

4.1.3.1 ELISA zur Bestimmung der Oberflächenexpression der Guanylatcyclyase B in C6 Gliomazellen

Ein möglicher Effekt von VILIP-1 auf die Desensitivierung und damit auch auf die Rezeptorlokalisierung sollte zunächst in C6/C6.2 Zellen untersucht werden. Nachdem GC-B den Liganden CNP bindet, wird ein Desensitivierungsprozess aktiviert, der zu einer Dephosphorylierung und Endozytose des Enzyms führt. Ein Anteil der Rezeptoren wird nach einiger Zeit wieder zur Zelloberfläche transportiert. Eine direkte Bestimmung der an der Zelloberfläche lokalisierten GC-B mit dem vorhandenen Antikörper war nicht möglich, da dieser die intrazelluläre katalytische Domäne erkennt. Aus diesem Grund wurden Liganden-Bindungsstudien mit biotinyliertem CNP durchgeführt. C6, bzw. VILIP-1 exprimierende C6.2 Zellen, wurden über verschiedene Zeiträume mit biotinyliertem CNP bei 37°C inkubiert und anschließend mit Paraformaldehyd fixiert. Dadurch werden die zu diesem Zeitpunkt auf der Zelloberfläche verbliebenen GC-B-Rezeptoren zum einen kovalent an den Liganden gebunden, zum anderen werden jegliche Endo- oder Exozytosevorgänge der Zellen unterbunden. Dies bedeutet, dass nach der jeweiligen Stimulationsdauer mit biotinyliertem CNP die relative Menge der an der Zelloberfläche lokalisierten GC-B Moleküle bestimmt werden kann. Die Rezeptordichte der GC-B an der Zelloberfläche wurde mittels Streptavidin-gekoppelter Peroxidase-Färbung im ELISA analysiert.

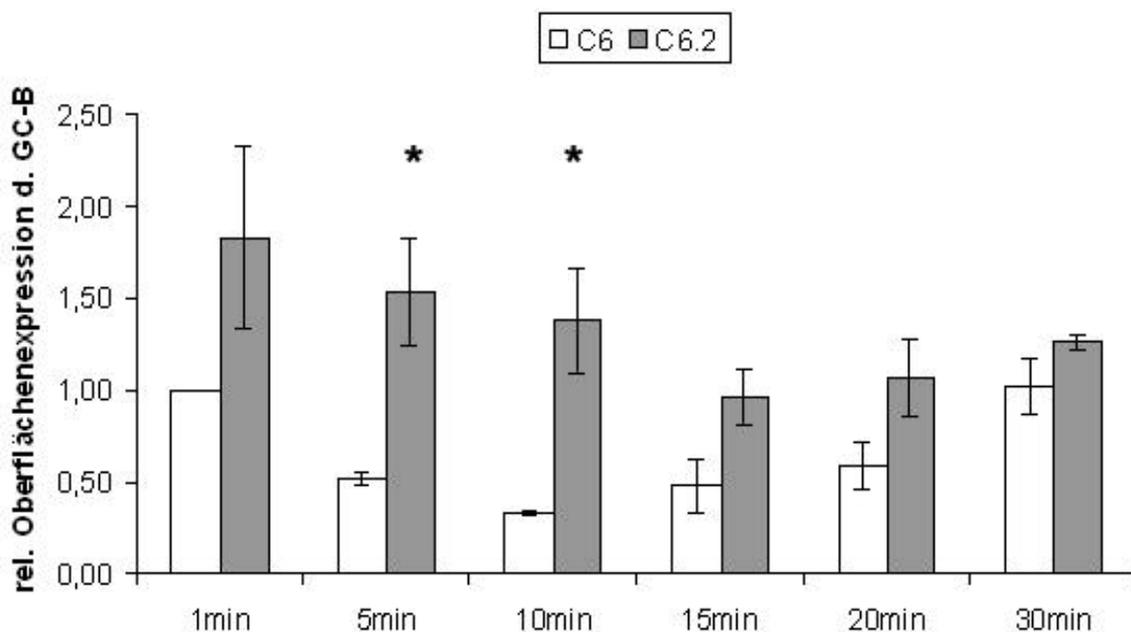


Abb. 15. Zelloberflächenexpression der GC-B nach CNP-Stimulation in C6/C6.2 Gliomazellen

C6/C6.2 Zellen wurden über verschiedene Zeiträume mit 0,2 μ M biotinyliertem CNP inkubiert und anschließend fixiert. Die Detektion des an die GC-B gebundenen, auf der Zelloberfläche lokalisierten, biotinylierten CNPs erfolgte mittels Streptavidin-gekoppelter Peroxidase. Die Optische Dichte (OD) der Färbelösung wurde für die jeweiligen Zeitpunkte bei 450 nm in einem Dynex MR II ELISA-Reader gemessen. Die Zusammenfassung der Messungen zur Zelloberflächenexpression der GC-B erfolgte für die jeweiligen Zeitpunkte aus drei bis sechs Experimenten, wobei die Messwerte auf den 1min-Wert der C6-Zellen bezogen wurden. Die einzelnen Werte in

den Experimenten wurden mit einer Doppelbestimmung ermittelt. Sterne markieren Signifikanz der Werte aus C6.2 Zellen gegenüber C6 Zellen ($p < 0.05$, zweiseitiger Student's T-Test, $n = 3$). Die Fehlerbalken zeigen den mittleren Standardfehler (S.E.M.).

Diese Art der Erfassung der Zelloberflächenexpression der GC-B lässt eine Bestimmung der basalen Oberflächenexpression nicht zu, da diese erst nach Zugabe des Liganden möglich ist. Als erster Zeitpunkt der Messung wurde eine Minute gewählt. Nach dieser Zeit sollte eine gleichmäßige Bindung des Liganden an den Rezeptor erfolgt sein. Kürzere Inkubationszeiten brachten stärkere Schwankungen und konnten nicht als Referenz-Zeitpunkt gewählt werden. Als Referenzwert, an dem andere Messwerte relativiert wurden, diente die gemessene OD des 1 Minutenwertes der C6 Zellen.

Nach fünf Minuten Inkubation mit dem Liganden waren nur 50 Prozent der GC-B-Rezeptoren im Vergleich zum Referenzwert auf der Zelloberfläche in C6 Zellen zu detektieren, nach zehn Minuten nur noch 33 Prozent. Nach längeren Inkubationszeiten steigt die GC-B Rezeptordichte auf der Zelloberfläche wieder an und nach 30 Minuten erreicht sie die Dichte des Referenzwertes. Die VILIP-1-exprimierenden C6.2 Zellen zeigen eine durchweg erhöhte Zelloberflächenexpression der GC-B. Nach einer Minute Stimulation beträgt der Messwert 183 Prozent des einminütigen Referenzwertes der C6 Zellen. Aufgrund des hohen Standardfehlers ist dieser Unterschied nicht signifikant. Jedoch nach fünf und zehn minütiger Stimulation ist die Zelloberflächenexpression in C6.2 Zellen gegenüber den jeweiligen Zeitpunkten in C6 Zellen signifikant erhöht. Werden die C6.2 Zellen länger mit CNP stimuliert, bleibt der gemessene Wert höher als in C6 Zellen, aber nicht signifikant erhöht.

Während in C6 Zellen bereits nach fünf minütiger Stimulation nur noch die Hälfte der GC-B gegenüber der einminütigen Stimulation auf der Oberfläche zu detektieren ist und nach zehn Minuten nur noch 33 Prozent, scheint die Endozytose der GC-B in C6.2 Zellen verlangsamt zu sein. Nach fünf minütiger Stimulation sind in C6.2 Zellen 84 Prozent der GC-B gegenüber der einminütigen Stimulation auf der Oberfläche zu detektieren, nach zehn Minuten noch 75 Prozent. Das Minimum in diesen Zellen ist nach 15 Minuten erreicht, gegenüber zehn Minuten in C6 Zellen. Ab diesem Zeitpunkt steigt die Rezeptordichte der GC-B auf der Zelloberfläche wieder an, erreicht jedoch in dem hier gemessenen Zeitrahmen nicht wieder das Niveau, das zu Beginn der Stimulation gemessen wurde (Abb. 15).

Um auszuschließen, dass die hier gemessenen Unterschiede zwischen VILIP-1 negativen C6 Zellen und VILIP-1-exprimierenden C6.2 Zellen auf einer erhöhten Proteineexpression der GC-B in C6.2 Zellen als sekundären Effekt durch die stabile Transfektion beruhen, wurde das Expressionsniveau der GC-B auf Proteinebene zwischen beiden Zelllinien verglichen. Eine Westernblotanalyse mit Gesamtzellhomogenat der Zelllinien zeigt, dass es keine Unterschiede auf Proteinebene bezüglich der Expression der GC-B gibt (Abb. 16). Als Kontrolle wurde die Expression von β -Tubulin ebenfalls verglichen. Auch hier sind keine Unterschiede festzustellen.

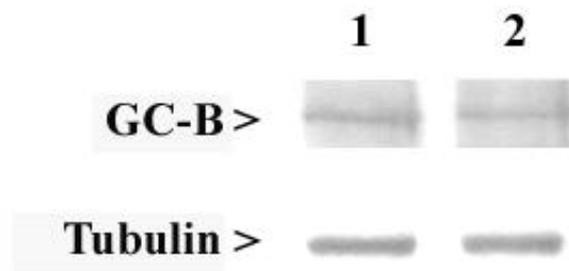


Abb. 16. Kontrolle der Proteinexpression der GC-B in C6/C6.2 Gliomazellen

Mit C6/C6.2 Gesamtzellhomogenat wurde eine SDS-PAGE durchgeführt und anschließend geblottet. Die Blotmembran wurde auf der Höhe von 70 kDa durchtrennt und die obere Hälfte mit anti GC-B Antikörper, die untere Hälfte mit anti β -Tubulin Antikörper inkubiert. Die Detektion der Primärantikörper erfolgte mittels Inkubation von Peroxidase-gekoppelten anti-Kanarienvogel (GC-B) und anti-Maus (β -Tubulin) Sekundärantikörpern, die mit dem ECL-System nachgewiesen wurden. Bahn 1 zeigt Homogenat aus C6 Zellen, Bahn 2 Homogenat aus C6.2 Zellen. Die Markierungen auf der linken Seite indizieren die gefärbten Proteine. Es wurden je 20 μ g Protein eingesetzt.

Eine Untersuchung der Zelloberflächenexpression der GC-B in hippocampalen Neuronen mit Hilfe von biotinyliertem CNP, analog zu den Experimenten in den Gliomazelllinien, sollte Aufschluss darüber bringen, ob VILIP-1 auch in diesem Modellsystem einen Einfluss auf die Rezeptorlokalisierung hat. Es konnten jedoch in mehreren Experimenten keine auswertbaren, reproduzierbaren Messungen gemacht werden. Der Grund hierfür könnte die Expression des natriuretischen Peptid Clearance-Rezeptors (NPR-C) sein, der sowohl ANP, als auch CNP bindet und daraufhin internalisiert wird. Da über eine Expression dieses Rezeptors im Hippokampus der Ratte, als auch C6 Gliomazelllinien bislang nichts bekannt ist, sollte die Existenz des NPR-C in beiden Zelltypen mittels RT-PCR (Reverse Transkription der isolierten RNA mit nachfolgender Polymerasekettenreaktion) überprüft werden. Primer wurden gegen die Transmembran-/Intrazelluläre Domäne des Rezeptors gerichtet. Als Grundlage hierfür diente die mRNA-Sequenz des NPR-C aus Ratte (PubMed-Nucleotide, Acc.-No. L27339, Sequenz und Primerbindungsstellen siehe 7. Anhang). Die Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy-Kit aus kultivierten hippocampalen Neuronen und C6-Zellen isoliert. 1 μ g dieser RNA wurde mit einem Oligo-dT18 Primer revers zu cDNA transkribiert. Wiederum jeweils 1 μ l dieser cDNA wurde für die PCR eingesetzt, um die vier verschiedenen Primer zu testen (zwei 5'Primer und zwei 3'Primer wurden gefertigt). In Abb. 17 A ist zu sehen, dass alle möglichen Primerkombinationen in C6 Zellen funktionieren. Der Größenmarker (100 bp- 2 kbp) in der Mitte zeigt im unteren Bereich schwächere Banden und die erste deutliche Bande mit einer Größe von 500 Basenpaaren (bp) an. Alle Markerbanden sind entsprechend im Abstand von 100 Basenpaaren. Primerkombination 1 (Hippokampus (H)

und C6 je Bahn1), die die am äußersten 5'-Ende und am 3'-Ende der mRNA gelegenen Primer verwendet, sollte eine Bande in der Größe von 392 bp produzieren. In Bahn 1 der Hippokampus- und der C6-Proben ist eine Bande in der erwarteten Größe deutlich zu erkennen. Bahn 2 zeigt eine Bande in der Größe von etwas über 200 bp. In dieser Primerkombination sind der 5'-Primer und der 3'-Primer sich auf der mRNA am nächsten gelegen. Die erwartete Größe von 213 bp wird hier bestätigt. In Bahn 3 und Bahn 4 wurden jeweils Kombinationen der 5'- und 3'-Primer für die PCR eingesetzt, die Banden in den erwarteten Größen von 313, bzw. 292 bp produzierten. Es ist auffällig, dass in den PCRs, in denen hippocampale cDNA eingesetzt wurde, einige unspezifische Banden zu sehen sind. Primerkombination 4 scheint hier nicht gut zu funktionieren.

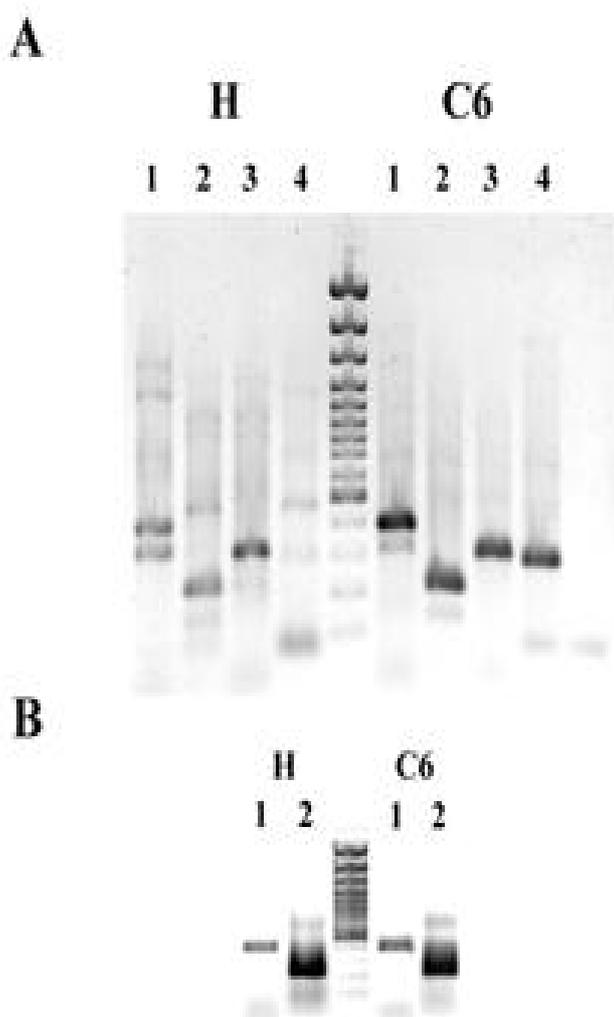


Abb. 17. Kontrolle der Expression der NPR-C in hippocampalen Neuronen und C6-Gliomazellen

Gesamt-RNA aus sieben Tage alten Hippokampuskulturen und C6 Zellen wurde mit einem Oligo-18dt Primer in cDNA umgeschrieben und einer PCR-Analyse unterzogen. **A:** Primertest von verschiedenen Primerkombinationen (siehe Text). Dabei wurden in Bahn 1-4 je die gleichen Kombinationen mit cDNA aus dem Hippokampus und C6 Zellen getestet. **B:** *Nested PCR*. In Bahn 1 wurde eine PCR mit Primerkombination 1 und jeweils cDNA aus hippocampaler Zellkultur und C6 Zellen durchgeführt Bahn 2 zeigt eine zweite PCR, in der Primerkombination 2 und das jeweilige PCR-Produkt aus der ersten PCR verwendet wurden. A, B: Der Größenstandard ist ein 100 bp-Marker, bei dem die unterste deutlich sichtbare Bande einer Größe von 500 bp entspricht H: hippocampale Zellkultur; C6: C6 Zellen.

Um eine sehr hohe Spezifität des Nachweises des NPR-C zu erzielen, wurde eine so genannte *nested PCR* durchgeführt. Dies bedeutet, dass eine erste PCR mit einem weiter auseinanderliegenden Primerpaar (hier: Primerkombination 1) durchgeführt wird und das PCR-Produkt als Template für eine zweite PCR eingesetzt wird, in der Primer verwendet werden, die innerhalb der mit dem ersten Primerpaar amplifizierten Sequenz binden (hier: Primerkombination 2).

In Abb. 17 B ist eine *nested PCR* gezeigt, bei der die erste PCR mit Primerkombination 1 und cDNA aus hippokampalen Kulturen, bzw. C6 Zellen durchgeführt wurde und das jeweilige PCR-Produkt als Template für die zweite PCR mit Primerkombination 2 eingesetzt wurde. In Bahn 1 im Hippokampus (H) und C6 Zellen (C6) ist die zu erwartende Bande von 392 bp deutlich zu erkennen. Die Bande in Bahn 2 von circa 200 bp entspricht der erwarteten Größe von 213 bp und zeigt eindeutig, dass der NPR-C in C6 Zellen, als auch in hippokampalen Neuronenkulturen exprimiert wird.

Die Existenz des NPR-C-Rezeptors erklärt daher nicht, warum keine reproduzierbaren Daten zur Zelloberflächenexpression der GC-B in hippokampalen Kulturen erhalten wurden, da dieser Rezeptor ebenfalls in C6-Zellen exprimiert wird. Es ist weiterhin zu beachten, dass die Effekte, die in C6/C6.2-Zellen gefunden wurden, nicht ausschliesslich von der GC-B herrühren.

4.1.3.2 Oberflächenexpression des nikotinischen Azetylcholinrezeptors $\alpha 4$ in hippokampalen Zellkulturen

Lin et al., 2002 konnten zeigen, dass VILIP-1 nicht nur die Sensitivität für Agonisten des nikotinischen Azetylcholinrezeptors (nAChR) $\alpha 4\beta 2$ erhöht, sondern auch dessen Expression auf der Zelloberfläche in tsA201 Zellen. Die Expression von nAChRs im Hippokampus wurde bereits gut charakterisiert (Albuquerque et al., 1997). Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob VILIP-1 auch die Zelloberflächenexpression und die Desensitivierung des $\alpha 4\beta 2$ -nAChRs in hippokampalen Neuronen moduliert, um möglicherweise die Beeinflussung der Zelloberflächenexpression von Rezeptoren als allgemeines Wirkprinzip von VILIP-1 beschreiben zu können. Im Gegensatz zu den Experimenten unter 4.1.3.1, konnte der Nachweis des an der Zelloberfläche lokalisierten nAChR direkt erfolgen, da ein Antikörper gegen den extrazellulären N-Terminus der $\alpha 4$ -Untereinheit zur Verfügung stand. So wurden sieben Tage alte hippokampale Zellkulturen eine Dreiviertelstunde mit dem Antikörper inkubiert und für verschiedene Zeiträume mit 10 μ M Nikotin stimuliert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die auf der Zelloberfläche verbliebenen, an die Rezeptoren gebundenen Antikörper mittels Inkubation des Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers detektiert. Die Messung der Dichte der auf der Zelloberfläche lokalisierten nAChR $\alpha 4$ -Untereinheiten erfolgte mit einem kolorimetrischen Assay auf ELISA-Basis nach Zugabe des Peroxidasesubstrats 3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidine.

Um eine Aussage über einen möglichen VILIP-1 Effekt machen zu können, wurde die VILIP-1 Proteinexpression mittels transienter Transfektion erhöht. Hierzu wurden hippokampale

Zellkulturen mit dem eukaryontischen Vektor pOPR-V-1 transfiziert und mit dem leeren Kontrollvektor pOPR transfizierten Zellen verglichen. Die Effizienz der Transfektion wurde mittels Westernblotanalyse, wie unter 4.1.1.2 beschrieben, kontrolliert.

Die transiente Transfektion des pOPR-V-1 Vektors führt 24 Stunden nach Transfektion zu einer deutlichen Erhöhung der VILIP-1 Proteinexpression, verglichen mit Zellen, die mit dem leeren Vektor pOPR als Kontrolle transfiziert wurden (Abb. 17 B).

Die Stimulation mit 10 μ M Nikotin führt in den mit dem leeren Vektor transfizierten hippocampalen Neuronen zu einer langsamen Internalisierung des Rezeptors. Nach 10 Minuten ist kein Effekt auf die Zelloberflächenexpression der α 4-Untereinheit zu messen. Jedoch ist die Rezeptordichte nach 20 Minuten auf 59,64 Prozent der Kontrolle gesunken, während nach einer halbstündigen Stimulation die Rezeptordichte wieder Kontrollniveau erreicht. Bemerkenswert ist, dass nach zweiminütiger Stimulation die α 4-Zelloberflächenexpression um 17,74 Prozent gegenüber der Kontrolle erhöht ist.

Eine gesteigerte Zelloberflächenexpression der α 4-Untereinheit des nikotinischen Azetylcholinrezeptors konnte in VILIP-1 überexprimierenden Zellen gemessen werden. In nicht stimulierten Kulturen, ist die Zelloberflächenexpression der α 4-Untereinheit in Zellen, die eine erhöhte VILIP-1 Proteinexpression aufweisen, hoch signifikant um 22,62 Prozent gegenüber den mit dem leeren Vektor transfizierten Zellen erhöht (Abb. 17 A, $p < 0.005$, zweiseitiger Student's T-Test, $n = 5$). Nach zweiminütiger Stimulation ist, wie in den mit dem leeren Vektor transfizierten Hippokampusneuronen, eine erhöhte Rezeptordichte verglichen mit nicht stimulierten Neuronen messbar, jedoch liegt das Niveau über dem der mit pOPR transfizierten Neurone. Dieser Unterschied ist aufgrund der geringen Anzahl der Experimente und der relativ großen Standardabweichung nicht signifikant. Bei den folgenden Messpunkten ist die Rezeptordichte in den VILIP-1 überexprimierenden Zellen signifikant erhöht ($p < 0.05$, zweiseitiger Student's T-Test, $n = 2$). Dabei ist der größte Unterschied nach 20 Minuten zu messen. Insgesamt ist festzuhalten, dass eine Internalisierung der α 4-Untereinheit in Zellen, die eine erhöhte VILIP-1 Proteinexpression aufweisen, nicht zu messen ist. In diesen Zellen ist die Zelloberflächenexpression des nAChR gegenüber Zellen, die mit dem Kontrollvektor transfiziert wurden, zu jedem Messpunkt erhöht.

Die 30-minütige Stimulation mit 30 mM Kaliumchlorid, was zu einer Erhöhung der neuronalen Aktivität führt, zeigt sowohl in pOPR, als auch in pOPR-V-1 transfizierten Zellen eine verminderte α 4-Untereinheit Oberflächenexpression, die in beiden Fällen circa 20 Prozent, verglichen mit den jeweiligen Kontrollen, betrug. Auch hier ist festzustellen, dass die nAChR-Rezeptordichte der VILIP-1 überexprimierenden Zellen höher ist. Dieser Unterschied ist allerdings nicht signifikant.

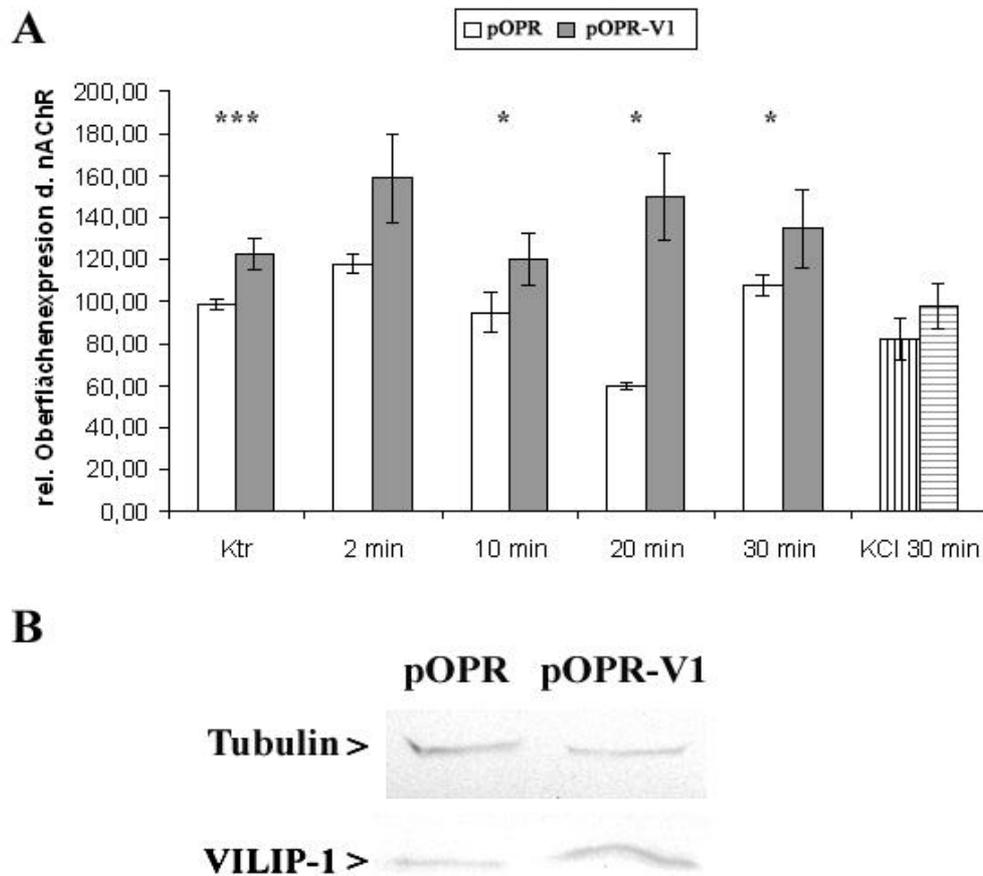


Abb. 18. Zelloberflächenexpression der nAChR α 4-Untereinheit nach Stimulation in hippocampalen Neuronenkulturen und Kontrolle der Transfektionseffizienz.

Hippokampuskulturen wurden nach 6 Tagen *in vitro* transient transfiziert. Die Experimente erfolgten 24 h nach Transfektion. **A:** Mit den Vektoren pOPR und pOPR-V-1 transfizierte hippocampale Neuronenkulturen wurden über verschiedene Zeiträume mit 10 μ M Nikotin oder 30 Minuten mit 30 mM KCl inkubiert und anschließend fixiert. Die Detektion des an die α 4-Untereinheit gebundenen, auf der Zelloberfläche lokalisierten anti-nAChR Antikörpers erfolgte mittels Streptavidin-gekoppelter Peroxidase. Die Optische Dichte (OD) der Färbelösung wurde für die jeweiligen Zeitpunkte bei 450 nm in einem Dynex MR11 ELISA-Reader gemessen. Die Zusammenfassung der Messungen zur Zelloberflächenexpression der α 4-Untereinheit erfolgte für die jeweiligen Zeitpunkte aus zwei bis fünf Experimenten. Die einzelnen Werte in den Experimenten wurden mit einer Doppelbestimmung ermittelt. Sterne markieren Signifikanz der Werte aus pOPR-V-1 transfizierten Zellen gegenüber pOPR transfizierten Zellen (***) = $p < 0.005$, * = $p < 0.05$, zweiseitiger Student's T-Test, $n = 2$). **B:** Gesamtzellhomogenat aus hippocampalen Neuronenkulturen, die mit den Vektoren pOPR und pOPR-V-1 transfiziert wurden und einer SDS-PAGE unterzogen und anschließend geblottet wurden. Die Blotmembran wurde geteilt und mit VILIP-1 Antikörper, sowie β -Tubulin Antikörper inkubiert. Die Detektion der Primärantikörper erfolgte mittels Inkubation von Peroxidase-gekoppelten anti-Kaninchen (VILIP-1) und anti-Maus (β -Tubulin) Sekundärantikörpern, die mit dem ECL-System nachgewiesen wurden. Bahn 1 zeigt das Homogenat aus pOPR transfizierten Zellen, Bahn 2 Homogenat aus pOPR-V-1 transfizierten Zellen. Die Markierungen auf der linken Seite indizieren die gefärbten Proteine. Pro Bahn wurden je 20 μ g Protein eingesetzt.

4.1.3.3 Der Effekt von VILIP-1 auf Clathrin-vermittelte Endozytose

Da ein Effekt von VILIP-1 auf die Zelloberflächenexpression und Desensitivierung von zwei verschiedenen Rezeptoren gezeigt werden konnte, sollte nun ein genereller Effekt auf Membrantransportvorgänge untersucht werden. Hierzu wurde eine Analyse der Clathrin-vermittelten Endozytose nach einem Protokoll von Beattie et al., 2000 verwendet. Dabei wird die Verteilung von Clathrin nach einer subzellulären Fraktionierung untersucht.

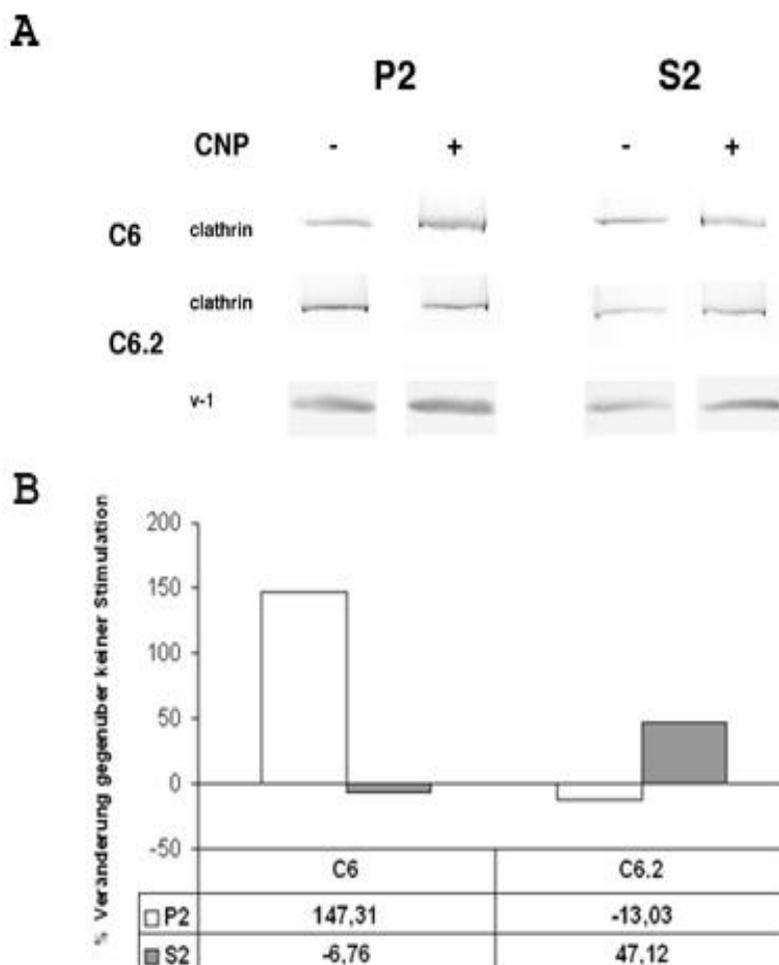


Abb. 19. Der Einfluss von VILIP-1 auf Clathrin-vermittelte Endozytose in C6/C6.2 Zellen.

Repräsentatives Zellfraktionierungs-Experiment in C6/C6.2 Gliomazellen. **A:** Westernblotanalyse der Membranfraktion P2 und der zytosolischen Fraktion S2 von C6/C6.2 Zellen. Je 5 µg Protein der Fraktionen wurden einer SDS-PAGE unterzogen und auf Nitrocellulosemembran geblottet. Die Blotmembran wurde auf der Höhe von 70 kDa geteilt und der höhermolekulare Teil wurde mit anti-Clathrin Antikörper, der niedermolekulare Bereich mit anti-VILIP-1 Antikörper inkubiert. Die Detektion der Primärantikörper erfolgte mittels Inkubation von Peroxidase-gekoppelten anti-Kaninchen (VILIP-1) und anti-Maus (Clathrin) Sekundärantikörpern, die mit dem ECL-System nachgewiesen wurden. Die obere Reihe zeigt die Verteilung von Clathrin in C6 Zellen ohne und mit CNP-Stimulation, die mittlere Reihe zeigt die Verteilung in C6.2 Zellen und die untere Reihe die von VILIP-1 in C6.2 Zellen. In C6 Zellen war keine VILIP-1 Immunreaktivität zu detektieren. **B:** Densitometrische Auswertung der in A dargestellten Clathrin-Banden mit dem Programm NIH Image 1.62. Die Werte stellen die Veränderung der Lokalisation von Clathrin in den stimulierten Zellen im Verhältnis zu den nicht stimulierten Zellen dar.

C6/C6.2 Zellen wurden kultiviert, 20 Minuten mit 0,2 μ M CNP behandelt und anschliessend einer subzellulären Fraktionierung nach einem bereits eingehend charakterisierten Fraktionierungsprotokoll unterzogen (Grimes et al., 1996). Das resultierende Pellet P2 enthält kleine und große Fragmente der Plasmamembran, intrazelluläre und andere zelluläre Membranen, sowie Zellorganellen (z.B. Mitochondrien, Ribosomen). Der Überstand S2 enthält das Zytosol. Auf diese Weise ist eine Trennung zwischen dem Zytosol und jeglichen Membrankomponenten der Zelle möglich. Eine Stimulation der Clathrin-vermittelten Endozytose führt zu einer verstärkten Assoziation von Clathrin mit Membrankompartimenten (Beattie et al., 2000).

In nicht stimulierten C6.2 Zellen wurde gegenüber C6 Zellen eine leicht verstärkte Assoziation des 180 kDa schweren Clathrin an Membrankomponenten (P2) festgestellt, während eine leichte Abnahme von Clathrin in der zytosolischen Fraktion zu beobachten war (Abb. 19 A). So scheint VILIP-1 die basale Verteilung von Clathrin zu beeinflussen. Die CNP-Stimulation der Zellen führte zu einer veränderten Lokalisation von Clathrin, so dass man folgern kann, dass die Internalisierung der GC-B und/oder des NPR-C über Clathrin-vermittelte Endozytose geschieht.

In CNP-stimulierten C6 Zellen ist gegenüber den nicht stimulierten Zellen eine Zunahme von Clathrin um 147 Prozent in der P2 Fraktion detektierbar. In der S2 Fraktion ist eine geringe Abnahme von knapp sieben Prozent in CNP-stimulierten C6 Zellen gegenüber nicht stimulierten Zellen zu registrieren. In C6.2 Zellen jedoch induziert die Stimulation mit CNP keine zusätzliche Assoziation von Clathrin mit Membranen. Es ist im Gegenteil eine geringe Abnahme um 13 Prozent gegenüber nicht stimulierten Zellen zu beobachten. Analog dazu ist eine relative Zunahme von Clathrin um 47 Prozent in der löslichen Fraktion S2 zu beobachten. VILIP-1 ist sowohl in der löslichen Fraktion, als auch in der Membranfraktion zu detektieren. Es scheint, dass nach CNP-Stimulation die Menge von VILIP-1 im Zytosol zunimmt, während die Menge im Pellet nahezu konstant bleibt (Abb. 19 A, B).

Um verschiedene subzelluläre Fraktionierungsexperimente zusammenfassen zu können, wurde eine veränderte Form der Darstellung gewählt. In Abb. 20 ist die relative Veränderung der Verteilung von Clathrin in der Fraktion P2 gegenüber der Fraktion S2 nach CNP-Stimulation angegeben.

Zusammenfassend konnte keine veränderte Lokalisation von VILIP-1 in C6.2 Zellen nach CNP-Stimulation festgestellt werden, während es deutliche Unterschiede in der Verteilung von Clathrin in den Fraktionen P2 und S2 zwischen C6 und C6.2 Zellen gab.

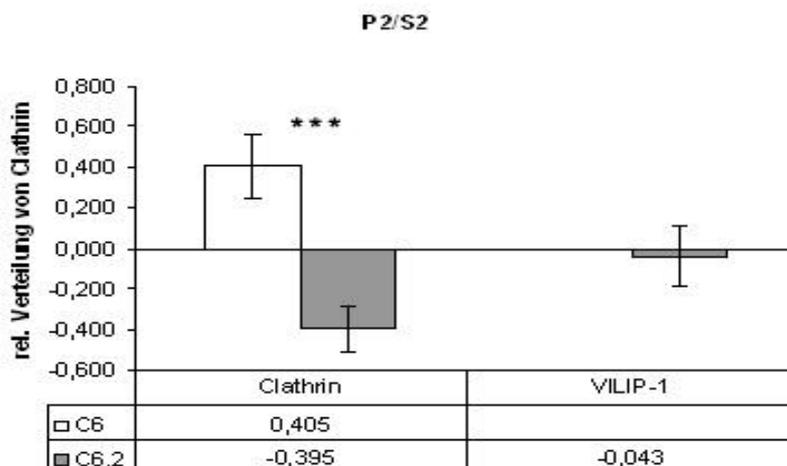


Abb. 20. Vergleich der Clathrin-vermittelten Endozytose in C6/C6.2 Zellen.

Zusammenfassung der Zellfraktionierungs-Experimente. Dargestellt ist die relative Veränderung der Verteilung von Clathrin in der Fraktion P2 gegenüber der Fraktion S2 nach CNP-Stimulation. Sterne markieren den signifikanten Unterschied in der Lokalisation von Clathrin zwischen C6 und C6.2 Zellen nach CNP-Stimulation ($p < 0,005$, zweiseitiger Student's T-Test, $n = 6$). Die Fehlerbalken zeigen den mittleren Standardfehler (S.E.M.).

Während in C6 Zellen nach CNP-Stimulation eine signifikante Zunahme von Clathrin in der P2 Fraktion mit einhergehender Abnahme in der S2 Fraktion zu beobachten ist ($p < 0,05$, zweiseitiger Student's T-Test, $n = 6$), ist ein gegenteiliger Effekt in C6.2 Zellen festzustellen. Hier induziert die CNP-Stimulation eine Abnahme von Clathrin in der Membranfraktion (P2), bei gleichzeitiger Zunahme in der zytosolischen Fraktion (S2). Dieser Effekt ist ebenfalls signifikant ($p < 0,01$, zweiseitiger Student's T-Test, $n = 6$). Der Unterschied in der Verteilung von Clathrin nach CNP-Stimulation zwischen C6 und C6.2 Zellen ist ebenfalls hochsignifikant ($p < 0,005$, zweiseitiger Student's T-Test, $n = 6$).

VILIP-1 scheint nicht nur die basale Verteilung von Clathrin zu beeinflussen, sondern auch einen Effekt auf die Clathrin-vermittelte Endozytose zu haben, die hier mit CNP stimuliert wurde.

4.1.3.4. Effekte von Pharmaka, die Membrantransportvorgänge blockieren, auf die cGMP-Produktion

Inhibitoren des Membrantransports wurden eingesetzt, um zu untersuchen, welche Effekte diese auf die Aktivität der GC-B, sowie auf die Modulation der GC-B durch VILIP-1 haben. Monensin (Mon) ist ein Ionophor, welches die Natrium- und Protonen-Gradienten kollabieren lässt, die für die Ansäuerung der Endosomen notwendig sind und somit Rezeptorrecycling inhibiert. Wortmannin (WM), ein zellmembrangängiges Pilzgift, inhibiert die Phosphoinositol-3-Kinase irreversibel und verhindert die Regeneration von Endosomen. Der dritte hier eingesetzte Inhibitor Phenylarsinoxid (PAO) reagiert mit Sulfhydrylgruppen und erzeugt stabile Ringstrukturen, die die Rezeptor-vermittelte Endozytose inhibieren. Diese Inhibitoren wurden in aus der Literatur bekannten Konzentrationen eingesetzt, um den Membrantransport der Zelloberflächenrezeptoren an unterschiedlichen Stellen zu

unterbrechen. Die cGMP-Stimulationsexperimente wurden wie unter 4.1.1.2 beschrieben durchgeführt. Die verwendeten Inhibitoren wurden mit den Zellen entsprechend vorinkubiert (Mon 45 Minuten, WM 60 Minuten und PAO 15 Minuten vor CNP-Stimulation), um ihre Wirksamkeit zu gewährleisten.

Eine transiente Transfektion mit pOPR-V-1 führt wiederum, wie in Abschnitt 4.1.1.2 berichtet, zu einer signifikanten Erhöhung der cGMP-Akkumulation gegenüber Kulturen, die mit dem leeren Vektor pOPR als Kontrolle transfiziert wurden ($p < 0,005$ (***) , zweiseitiger Student's T-Test, $n = 7$). Der Effekt ist jedoch niedriger als zuvor beschrieben, da es sich hier nur um eine 38 prozentige Erhöhung handelt. In Zellen, die mit dem leeren Vektor transfiziert wurden, reduziert die Zugabe von Monensin die cGMP-Produktion auf 75 Prozent des Kontrollwertes, während Wortmannin eine Erhöhung um 20 Prozent bewirkt, die jedoch nicht signifikant ist. PAO hingegen reduziert die cGMP-Produktion auf 54 Prozent des Kontrollwertes. Aufgrund der niedrigen Anzahl der mit PAO durchgeführten Experimente ($n = 2$) ist dieser deutliche Unterschied nicht signifikant. In den hippokampalen Neuronen, die VILIP-1 überexprimieren, erhöht Wortmannin die cGMP-Akkumulation nach CNP-Stimulation um knapp 30 Prozent gegenüber den ausschließlich mit CNP stimulierten, VILIP-1 überexprimierenden Neuronen. PAO reduziert die Aktivität der GC-B auf 43 Prozent des CNP-Wertes. Dies entspricht dem in den mit pOPR transfizierten Kulturen gemessenen Wert. In den pOPR transfizierten Neuronen waren nach PAO-Zugabe 54 Prozent des Kontrollwertes zu messen, in den pOPR-V-1 transfizierten Neuronen sind es 60 Prozent. Monensin erniedrigt ebenfalls die cGMP-Produktion, in den mit pOPR-V-1 transfizierten Zellen. Durch die Zugabe von Monensin werden noch 57 Prozent der cGMP-Akkumulation im Vergleich zu den nur CNP-stimulierten Zellen gemessen (79 Prozent des Kontrollwertes zu 138 Prozent des Kontrollwertes). Bemerkenswert ist, dass das Ionophor Monensin eine signifikante Reduktion der cGMP-Akkumulation, sowohl in pOPR als auch pOPR-V-1 transfizierten Zellen bewirkt ($p < 0,05$ (*), zweiseitiger Student's T-Test, $n = 3$). Weiterhin ist dabei auffällig, dass Monensin den VILIP-1 Effekt aufzuheben scheint, da die cGMP-Werte in pOPR und pOPR-V-1 transfizierten Zellen gleich niedrig sind. Während Wortmannin nur einen leichten, positiven Effekt auf die cGMP-Akkumulation hat, der den VILIP-1 Effekt nicht beeinflusst, reduzieren Monensin und PAO die cGMP-Produktion.

Eine veränderte cGMP-Akkumulation ist zwischen VILIP-1 überexprimierenden und in der Proteinexpression nicht veränderten hippokampalen Neuronen nach Zugabe dieser beiden Inhibitoren nicht mehr festzustellen. Präliminäre Daten zeigen, dass das Pilzgift Brefeldin A, welches den Golgi-Apparat zerstört, keinen Effekt auf die cGMP-Akkumulation hat (Abb. 20B). Weder in kontrolltransfizierten, noch in VILIP-1-überexprimierenden Neuronen ist ein Unterschied in der cGMP-Menge zwischen Brefeldin A/CNP behandelten und nur mit CNP-stimulierten Zellen messbar.

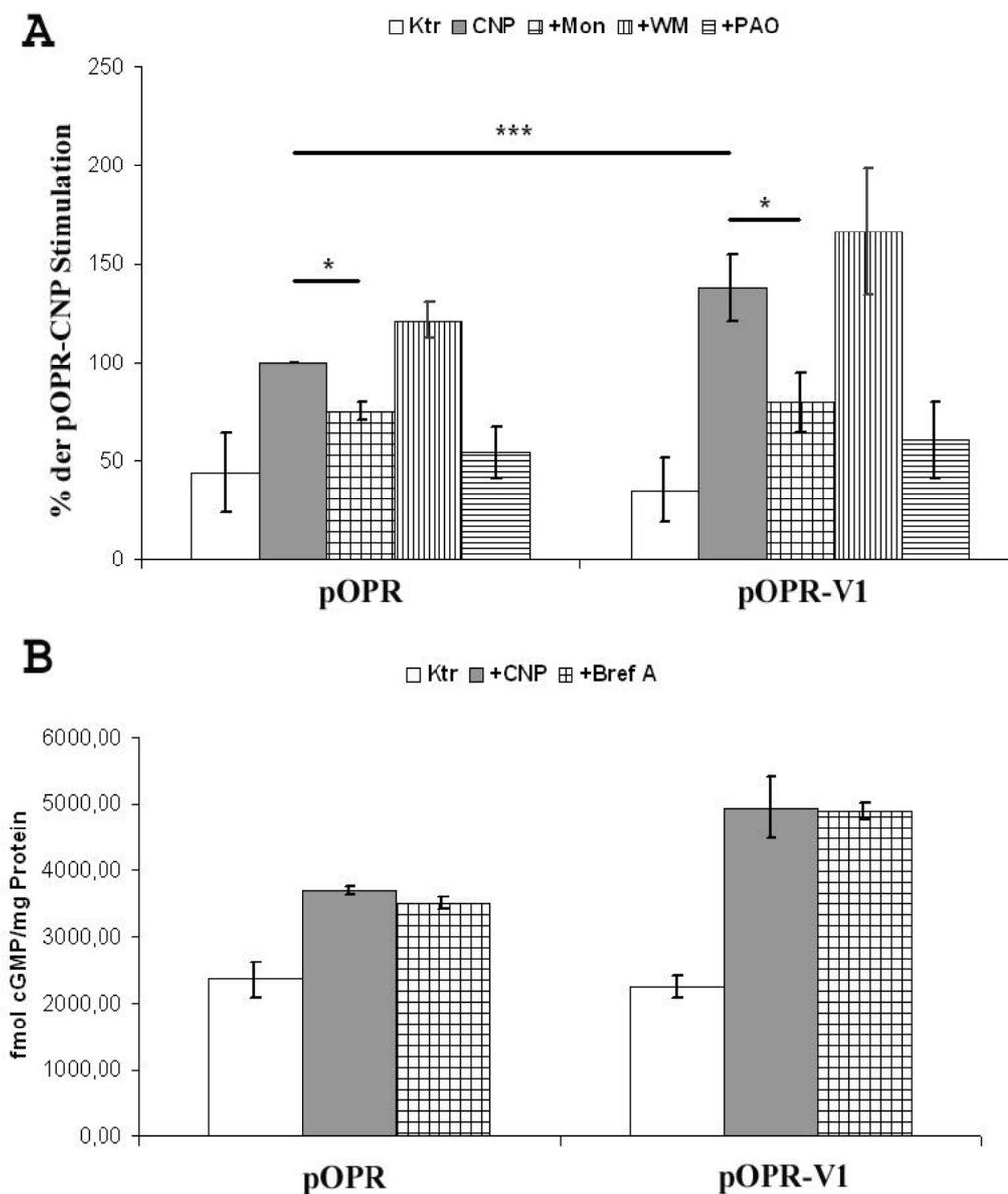


Abb. 20. Effekte von Inhibitoren des Membrantransports auf die cGMP-Produktion in transient transfizierten Hippokampuskulturen.

Zusammenfassung der cGMP-Stimulationsexperimente, die mit Inhibitoren des Membrantransports durchgeführt wurden. Hippokampuskulturen wurden nach 6 Tagen *in vitro* transient transfiziert. Die Stimulationsexperimente erfolgten 24 h nach Transfektions, wie unter 4.1.1.2 beschrieben, mit den Inhibitoren Mon, WM und PAO. Die prozentuale Darstellung der Messungen zeigt die cGMP-Akkumulation in den mit CNP stimulierten und dem Kontrollvektor (pOPR) transfizierten Zellen, die als 100% gesetzt wurden. Sterne zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Werten, die mit einem Pfeil markiert sind ($p < 0,005$ (***) , $p < 0,05$ (*), zweiseitiger Student's T-Test, $n = 3$).

4.2 Untersuchungen zur funktionellen Rolle von VILIP-1: Regulation der VILIP-1 Proteinexpression in verschiedenen Plastizitätsmodellen

Der erste Teil der Arbeit zeigt einen Effekt von VILIP-1 auf cGMP-Signalkaskaden. cGMP ist ein sekundärer Botenstoff, der eine wichtige Funktion bei Lern- und Gedächtnisvorgängen einnimmt (Schuman und Madison, 1991; Monfort et al., 2002).

Gleichzeitig sind neuronale Calciumsensor Proteine, wie VILIP-1 und NCS-1, sind im hohen Maße im Hippokampus der Ratte exprimiert, einer Hirnregion, der eine besondere Funktion bei Lernvorgängen und der Gedächtnisbildung zukommt. Für NCS-1 konnte bereits gezeigt werden, dass es nach Induktion von LTP im Hippokampus der Ratte *in vitro* reguliert wird (Genin et al., 2001) und bei assoziativen Lernvorgängen im Nematoden *C. elegans* eine Rolle spielt (Gomez et al., 2001). Über das verwandte Protein VILIP-1 ist in diesen Zusammenhängen wenig bekannt, präliminäre Daten zeigen jedoch eine erhöhte Expression der VILIP-1 mRNA im Hippokampus von Ratten 24 und 48 Stunden nach LTP-Induktion (Manahan-Vaughan und Braunewell, 1999). Ob VILIP-1 in diesen Prozessen tatsächlich eine Rolle spielt, soll im folgenden Teil der Arbeit untersucht werden. Sollte VILIP-1 nach plastizitätsrelevanten Stimuli reguliert werden, könnte dies aufgrund der gezeigten Funktion die Eigenschaften von hippokampalen Neuronen langfristig verändern und so zu Lern- und Gedächtnisvorgängen beitragen.

Daher wurde zunächst in verschiedenen Plastizitätsmodellen eine Regulation von VILIP-1 auf Proteinebene untersucht.

4.2.1 Regulation der VILIP-1 Proteinexpression in pharmakologisch stimulierten hippokampalen Zellkulturen

Im hippokampalen Zellkulturmodell wurde untersucht, welcher Effekt eine gesteigerte neuronale Aktivität auf die VILIP-1 Proteinexpression hat. KCl erhöht die intrazelluläre Calciumkonzentration in den Zellen und führt so zu einer gesteigerten Generation von Aktionspotentialen. Es wurden drei Wochen alte hippokampale Neuronenkulturen über einen Zeitraum von 8 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen Kaliumchlorid (KCl) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einer Westernblotanalyse unterzogen. Die Blotmembran wurde auf der Höhe von 35 kDa geteilt und der Bereich bis 35 kDa wurde mit einem anti-VILIP-1 Antikörper, der Bereich von 35 kDa aufwärts mit einem anti- β -Tubulin Antikörper inkubiert. Durch die Stimulation der neuronalen Aktivität mit KCl ist eine deutliche erhöhte VILIP-1 Proteinexpression zu detektieren. In Abb. 22 A ist zu erkennen, dass bereits 10 mM KCl zu

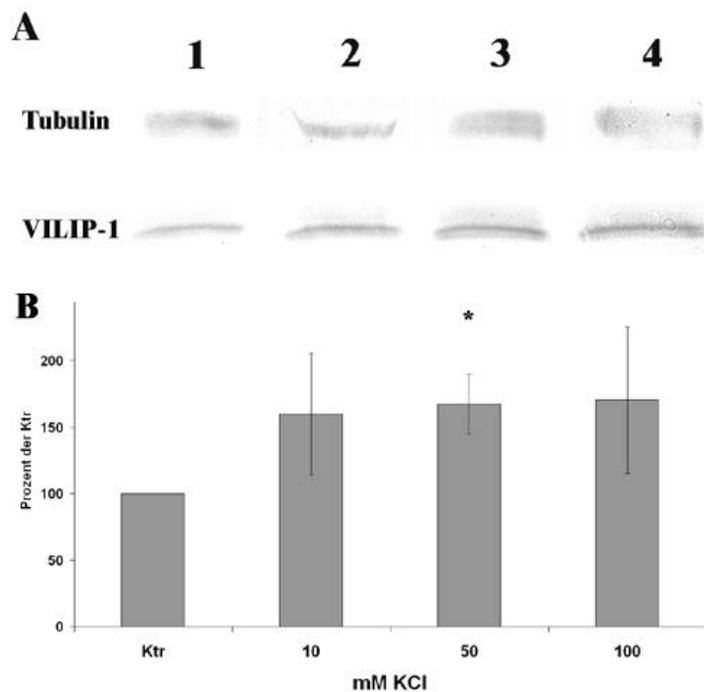


Abb. 22. Regulation der VILIP-1 Proteinexpression nach KCl-Stimulation in Hippokampuskulturen

Hippokampale Neurone in Kultur wurden über 8 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen KCl stimuliert und eine Veränderung der VILIP-1 Proteinexpression wurde mittels Westernblotanalyse überprüft. Die Detektion der Primärantikörper erfolgte mittels Inkubation von alkalischer Phosphatase-gekoppelten anti-Kaninchen (gegen VILIP-1 Antikörper gerichtet) und anti-Maus (gegen β -Tubulin Antikörper) Sekundärantikörpern.

A: In der oberen Reihe ist die Stärke der Expression von β -Tubulin als Kontrolle gezeigt, während die untere Reihe die VILIP-1 Expression zeigt. In Bahn 1 ist die unstimulierte Kontrolle zu sehen, Bahn 2-4 zeigen steigende Konzentrationen von KCl (10, 50 und 100 mM). Pro Bahn wurden 10 μ g Protein verwendet **B:** Zusammenfassung der Stimulationsexperimente. Die Menge von VILIP-1 aus unstimulierten Zellen wurde jeweils als 100 Prozent gesetzt und der Grad der Regulation von VILIP-1 aus stimulierten Zellen jeweils in Relation angegeben. Dabei ist zu beachten, dass der Grad der Regulation jeweils an der Menge des detektierten β -Tubulin normalisiert wurde. Der Stern markiert eine signifikante Erhöhung der VILIP-1 Proteinexpression ($p < 0,05$ (*), zweiseitiger Student's T-Test, $n = 3$).

einer erhöhten VILIP-1 Expression führen. Dieser Effekt wird durch höhere Konzentrationen von KCl nur noch wenig verstärkt. Eine signifikante Hochregulation von VILIP-1 ist nach der Zugabe von 50 mM KCl festzustellen ($p < 0,05$ (*), zweiseitiger Student's T-Test, $n = 4$) (Abb. 22 B).

Die Aminosäure Glutamat ist der häufigste exzitatorische Neurotransmitter im Nervensystem der Säugetiere und aktiviert verschiedene Rezeptoren, wie die ionotropen und die metabotropen Glutamatrezeptoren. Für beide Rezeptortypen konnte eine Beteiligung an Plastizitätsprozessen gezeigt werden (Collingridge et al., 1983; McGuinness et al., 1991). Im Folgenden soll untersucht werden, welchen Effekt eine Stimulation der glutamatergen Rezeptoren in hippocampalen Neuronenkulturen auf die Proteinexpression von VILIP-1 hat. Zunächst wurde der allgemeine Effekt von Glutamat untersucht.

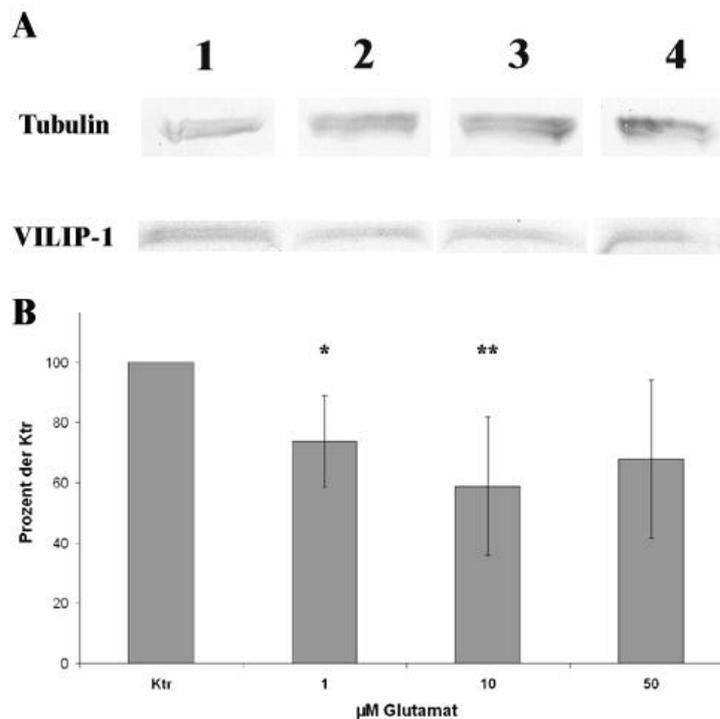


Abb. 23. Regulation der VILIP-1 Proteinexpression nach Glutamat-Stimulation in Hippokampuskulturen Hippokampale Neurone in Kultur wurden über 8 Stunden mit verschiedenen Glutamat/Glycin Konzentrationen stimuliert und eine Veränderung der VILIP-1 Proteinexpression mittels Westernblotanalyse analog zu Abb. 22 überprüft.

A: In der oberen Reihe ist die Stärke der Expression von β -Tubulin als Kontrolle gezeigt, während die untere Reihe die VILIP-1 Expression zeigt. In Bahn 1 ist die unstimulierte Kontrolle zu sehen, Bahn 2-4 zeigen steigende Konzentrationen von Glutamat (1, 10 und 50 μM). Pro Bahn wurden 10 μg Protein aufgetragen **B:** Zusammenfassung der Stimulationsexperimente. Die Menge von VILIP-1 aus unstimulierten Zellen wurde jeweils als 100 Prozent gesetzt und der Grad der Regulation von VILIP-1 aus stimulierten Zellen jeweils in Relation angegeben. Dabei ist zu beachten, dass der Grad der Regulation jeweils an der Menge des detektierten β -Tubulin normalisiert wurde. Die Sterne markieren signifikante Reduktion der VILIP-1 Proteinexpression im Vergleich zur basalen Expression ($p < 0,05$ (*), zweiseitiger Student's T-Test, $n = 4$).

Drei Wochen alte hippocampale Zellkulturen wurden über einen Zeitraum von acht Stunden mit verschiedenen Konzentrationen Glutamat stimuliert. Dabei wurde Glutamat im Verhältnis von zehn zu eins mit der Aminosäure Glycin appliziert, um auch die ionotropen NMDA-Rezeptoren aktivieren zu können. Bereits bei der Applikation von 1 μM Glutamat lässt sich eine reduzierte VILIP-1 Proteinexpression gegenüber nicht stimulierten Zellen beobachten, die nach Applikation von 10 μM Glutamat noch deutlicher ausfällt (Abb. 23 A). Die Stimulation mit der hohen Konzentration von 50 μM Glutamat führt ebenfalls zu einer reduzierten VILIP-1 Proteinexpression. Im Gegensatz zu den niedrigeren Konzentrationen ist die VILIP-1 Expression hier nicht signifikant erniedrigt ($p < 0,05$ (*), zweiseitiger Student's T-Test, $n = 4$).

Nicht nur ionotrope, sondern auch metabotrope Rezeptoren spielen eine entscheidende Rolle bei Plastizitätsprozessen. So konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von mGluRs tetanisch induzierte LTP *in vivo* und *in vitro* verlängert (Behnisch und Reymann, 1993; Bashir

et al., 1993; Manahan-Vaughan et al., 1996; Manahan-Vaughan und Reymann 1996), sowie Proteinsynthese, besonders auf der Ebene der Translation, induziert (Raymond et al., 2000).

Desweiteren induziert eine chemische Stimulation, die keine weitere elektrische Stimulation erfordert, eine sogenannte *Slow-Onset* Potenzierung. Die Applikation von Gruppe I und II mGluR Agonisten in den dritten Ventrikel des Rattenhirns führt zu einer langsamen Potenzierung im Hippokampus (Manahan-Vaughan et al., 1995, 1996; Braunewell et al., 2003). In hippokampalen Zellkulturen führt eine Stimulation mit 10 μM (1S, 3R)-1-Aminocyclopentan-1,3-Dicarboxylat (ACPD) oder 20 μM (R, S)-3, 5 Dihydroxyphenylglycin (DHPG) zu einer erhöhten VILIP-1 Expression nach 24 Stunden (Braunewell et al., 2003).

Zu früheren Zeitpunkten ist ebenfalls eine erhöhte VILIP-1 Proteinexpression nach mGluR Stimulation zu beobachten. Der spezifische mGluR Gruppe I Agonist DHPG induziert 8 Stunden nach Applikation von verschiedenen Konzentrationen eine Dosis-abhängige Regulation von VILIP-1 über die basale Expression, während die Expression von β -Tubulin unverändert bleibt (Abb. 24 A). Die Quantitative Auswertung verschiedener Experimente ergab eine signifikant erhöhte VILIP-1 Proteinexpression, beginnend ab einer DHPG-Konzentration von 15 μM (Abb. 24 B, ANOVA, $n = 2$, $p < 0.01$ (**), $p < 0,001$ (***)). Höhere Konzentrationen DHPG führen zu keiner weiter erhöhten VILIP-1 Proteinexpression, so dass ein Plateau ab 30 μM erreicht wird. Die Spezifität des mGluR Effektes auf die VILIP-1 Proteinexpression wurde durch die Applikation eines mGluR Antagonisten überprüft. 8 Stunden nach DHPG Stimulation (50 μM) konnte eine signifikant erhöhter VILIP-1 Proteinexpression festgestellt werden. Dieser Effekt konnte durch die gleichzeitige Applikation von DHPG (50 μM) und des mGluR Antagonisten (S)-4-Carboxyphenylglycin (4CPG, 50 μM) inhibiert werden. Der Antagonist alleine hat in dieser Konzentration keinen Effekt auf die VILIP-1 Proteinexpression (Abb. 25 A), noch wurde in verschiedenen anderen Konzentrationen ein Effekt gefunden. Eine Quantifizierung der Westernblots verschiedener Experimente zeigt eine um 60 Prozent erhöhte VILIP-1 Proteinexpression in Zellen, die mit DHPG behandelt wurden, während Zellen, die mit DHPG und 4CPG oder mit 4CPG alleine behandelt wurden, nur eine basale VILIP-1 Proteinexpression zeigen (Abb. 25 B).

Um einen detaillierten Eindruck über den zeitlichen Verlauf der Regulation des NCS-Proteins VILIP-1 durch Gruppe I mGluRs zu erlangen, wurden hippokampale Zellkulturen über verschiedene Zeiträume mit einer DHPG-Konzentration inkubiert, von der bekannt ist, dass sie nach 8 Stunden zu einer erhöhten VILIP-1 Proteinexpression führt.

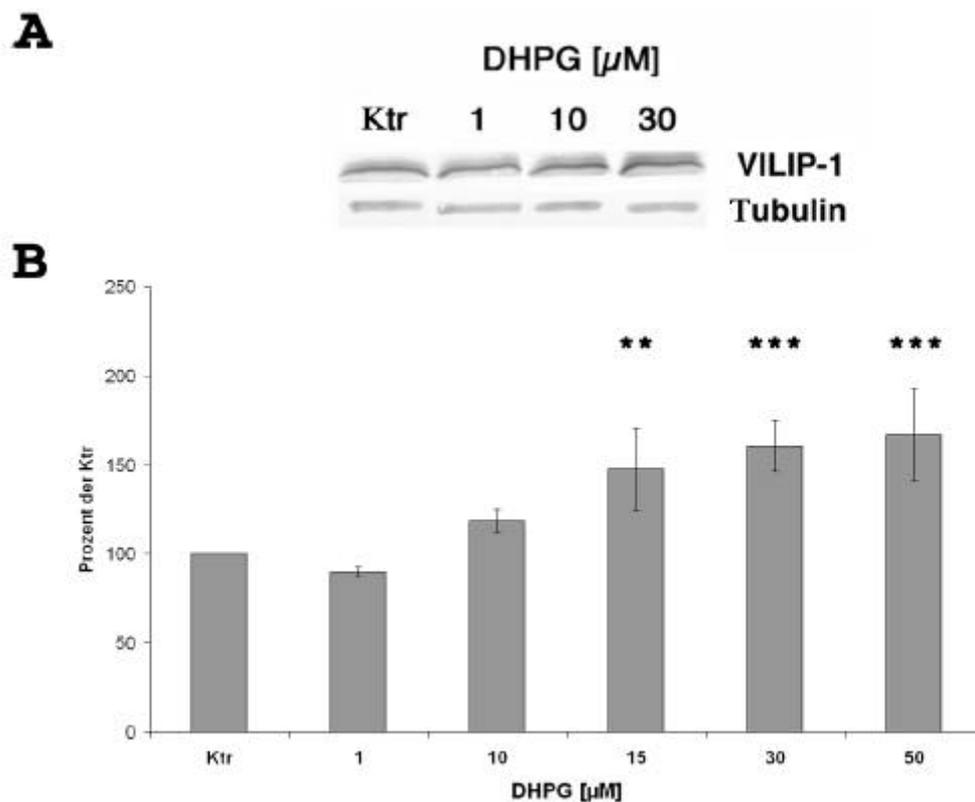


Abb. 24. Regulation der VILIP-1 Proteinexpression durch DHPG in hippocampalen Kulturen

A: Westernblotanalyse der Gesamtzellhomogenate aus drei Wochen alten hippocampalen Zellkulturen, die nicht (Ktr) oder mit 1, 10 und 30 μ M Gruppe I mGluR Agonisten DHPG für 8 Stunden behandelt wurden. Die Detektion der Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen VILIP-1 und β -Tubulin. Es wurden je 10 μ g Protein für die SDS-PAGE verwendet. **B:** Zusammenfassung der Stimulationsexperimente. Die Menge von VILIP-1 aus unstimulierten Zellen (Ktr) wurde jeweils als 100 Prozent gesetzt und der Grad der Regulation von VILIP-1 aus stimulierten Zellen jeweils in Relation angegeben. Dabei ist zu beachten, dass der Grad der Regulation jeweils an der Menge des detektierten β -Tubulin normalisiert wurde. Die Sterne markieren signifikante Regulation der VILIP-1 Proteinexpression im Vergleich zur basalen Expression (ANOVA, $n = 2$, $p < 0.01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

So zeigt sich bereits nach 30 Minuten DHPG-Stimulation (50 μ M) eine leicht erhöhte VILIP-1 Proteinexpression, während nach einer Stunde keine Veränderung gegenüber der basalen VILIP-1 Proteinmenge feststellbar ist. Nach zwei Stunden Inkubation mit 50 μ M DHPG ist die VILIP-1 Proteinexpression wiederum, jedoch nicht signifikant, erhöht (Abb. 26 A). Nach vier Stunden Inkubation zeigt sich eine deutlich erhöhte VILIP-1 Proteinexpression, wie sie auch nach acht Stunden festgestellt wurde (Abb. 26 B, C). So scheint eine frühe Phase der VILIP-1 Expression nach DHPG-Stimulation zu existieren, in der nach 30 Minuten bereits erhöhte VILIP-1 Proteinmengen zu detektieren sind, wie auch eine späte Phase, in der die VILIP-1 Proteinexpression deutlich erhöht ist.

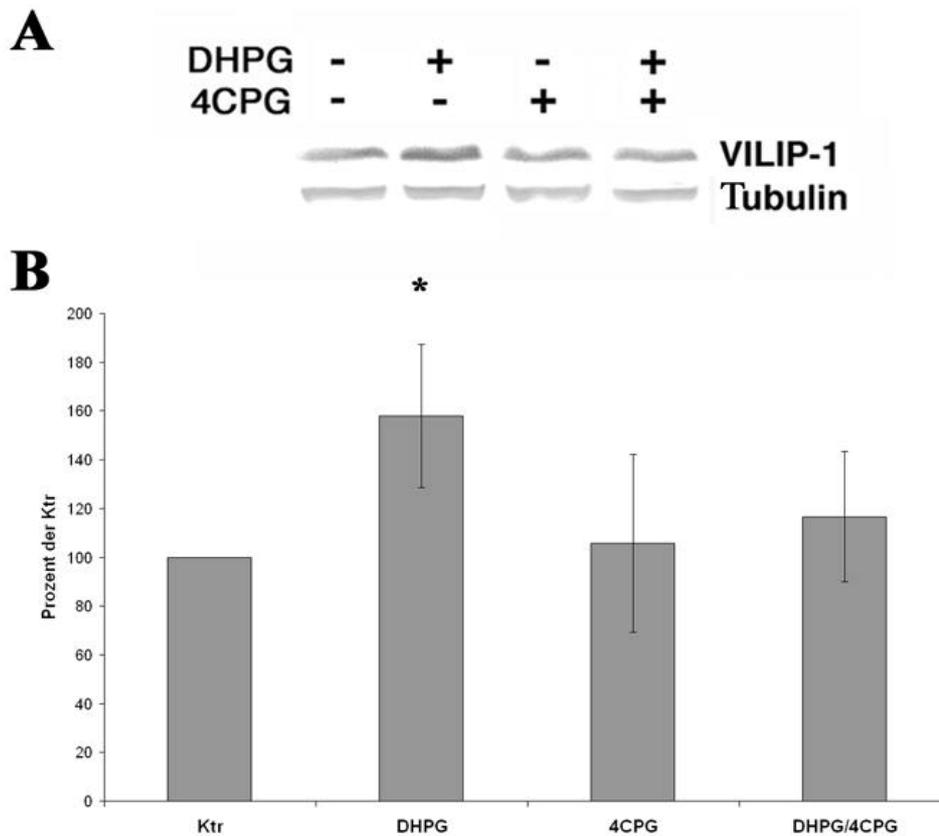


Abb. 25. Kontrolle der Spezifität der DHPG-induzierten VILIP-1 Proteinexpression

A: Westernblotanalyse von Gesamtzellhomogenat aus drei Wochen alten hippocampalen Zellkulturen, die nicht (Ktr) oder mit DHPG (50 μ M), 4CPG (50 μ M), sowie DHPG und 4CPG (DHPG/4CPG je 50 μ M) für 8 Stunden behandelt wurden. Die Detektion der Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen VILIP-1 und β -Tubulin. Es wurden je 10 μ g Protein für die SDS-PAGE verwendet. **B:** Zusammenfassung der Stimulationsexperimente. Die Menge von VILIP-1 aus unstimulierten Zellen (Ktr) wurde jeweils als 100 Prozent gesetzt und der Grad der Regulation von VILIP-1 aus stimulierten Zellen jeweils in Relation angegeben. Dabei ist zu beachten, dass der Grad der Regulation jeweils an der Menge des detektierten β -Tubulin normalisiert wurde. Die Sterne markieren signifikante Regulation der VILIP-1 Proteinexpression im Vergleich zur basalen Expression (ANOVA, n = 4, p<0.05(*)).

Quantitative Auswertungen der Westernblots ergaben, dass die VILIP-1 Proteinexpression nach 30 Minuten um circa 30 Prozent erhöht ist, jedoch nach einer Stunde wieder auf die basale Proteinmenge sinkt. Nach zweistündiger Stimulation mit DHPG ist wiederum ein leichter Anstieg der VILIP-1 Expression um 26 Prozent zu verzeichnen, während nach vier Stunden ein Plateau erreicht wird, bei dem die VILIP-1 Proteinexpression um circa 50 Prozent erhöht ist. Nach acht Stunden Inkubationsdauer kann keine weitere Erhöhung der VILIP-1 Proteinexpression gemessen werden.

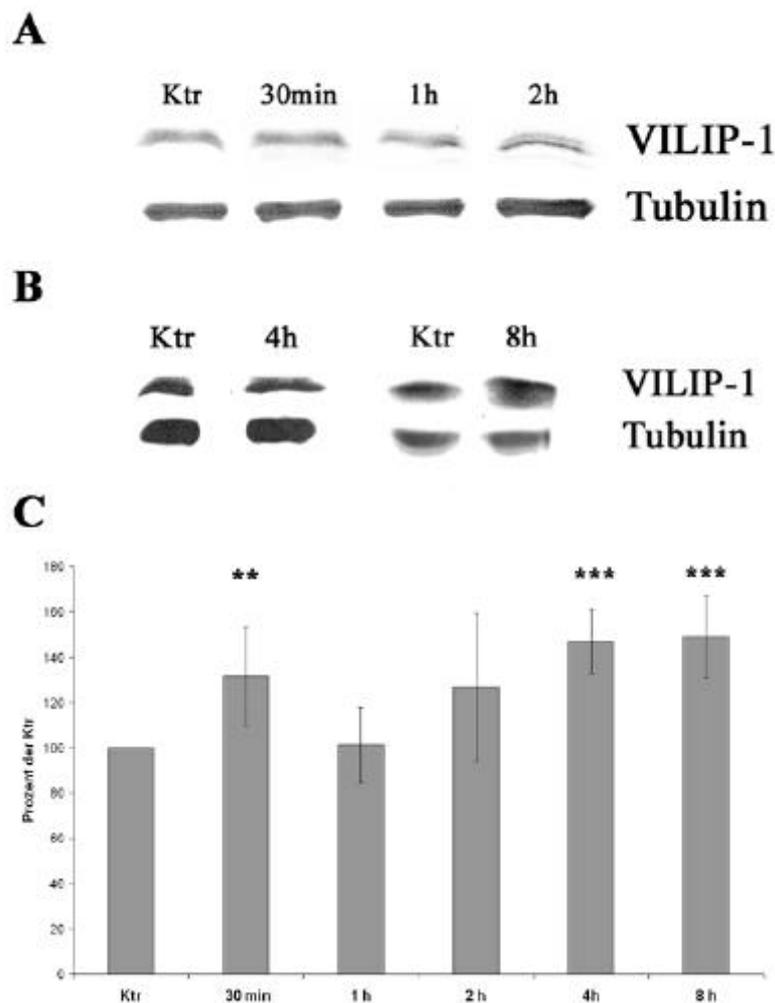


Abb. 26. Der zeitliche Verlauf der DHPG-induzierten VILIP-1 Expression

Hippokampale Neurone in Kultur wurden über verschiedene Zeiträume mit 30 μ M DHPG stimuliert und eine Veränderung der VILIP-1 Proteinexpression wurde mittels Westernblotanalyse analog zu Abb. 22 überprüft. **A:** Westernblotanalyse des Gesamtzellhomogenats aus drei Wochen alten hippokampalen Zellkulturen, die nicht (Ktr), 30 Minuten, 1h oder 2h mit 30 μ M DHPG stimuliert wurden. **B:** Westernblotanalyse des Gesamtzellhomogenats aus drei Wochen alten hippokampalen Zellkulturen, die nicht (Ktr), 4h oder 8h mit 30 μ M DHPG stimuliert wurden. A,B: Die Detektion der Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen VILIP-1 und β -Tubulin. Es wurden je 10 μ g Protein für die SDS-PAGE verwendet. **C:** Zusammenfassung der Stimulationsexperimente. Die Menge von VILIP-1 aus unstimulierten Zellen (Ktr) wurde jeweils als 100 Prozent gesetzt und der Grad der Regulation von VILIP-1 aus stimulierten Zellen jeweils in Relation angegeben. Dabei ist zu beachten, dass der Grad der Regulation jeweils an der Menge des detektierten β -Tubulin normalisiert wurde. Die Sterne markieren signifikante Regulation der VILIP-1 Proteinexpression im Vergleich zur basalen Expression (zweiseitiger Student's T-Test, $n = 4$, $p < 0.01$ (**), $p < 0,001$ (***)).

Während der Anstieg der VILIP-1 Proteinexpression in der frühen Phase (30 min) nur leicht signifikant ist, wird in der späten Phase ab dem Zeitpunkt vier Stunden eine sehr hohe Signifikanz erreicht (Abb. 26 C, $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) , zweiseitiger Student's T-Test, $n = 4$). Durch die zusätzliche Applikation des mRNA-Transkriptioninhibitors Actinomycin D (2 μ M) eine Stunde vor dem Experiment, war es möglich, den späten DHPG-induzierten

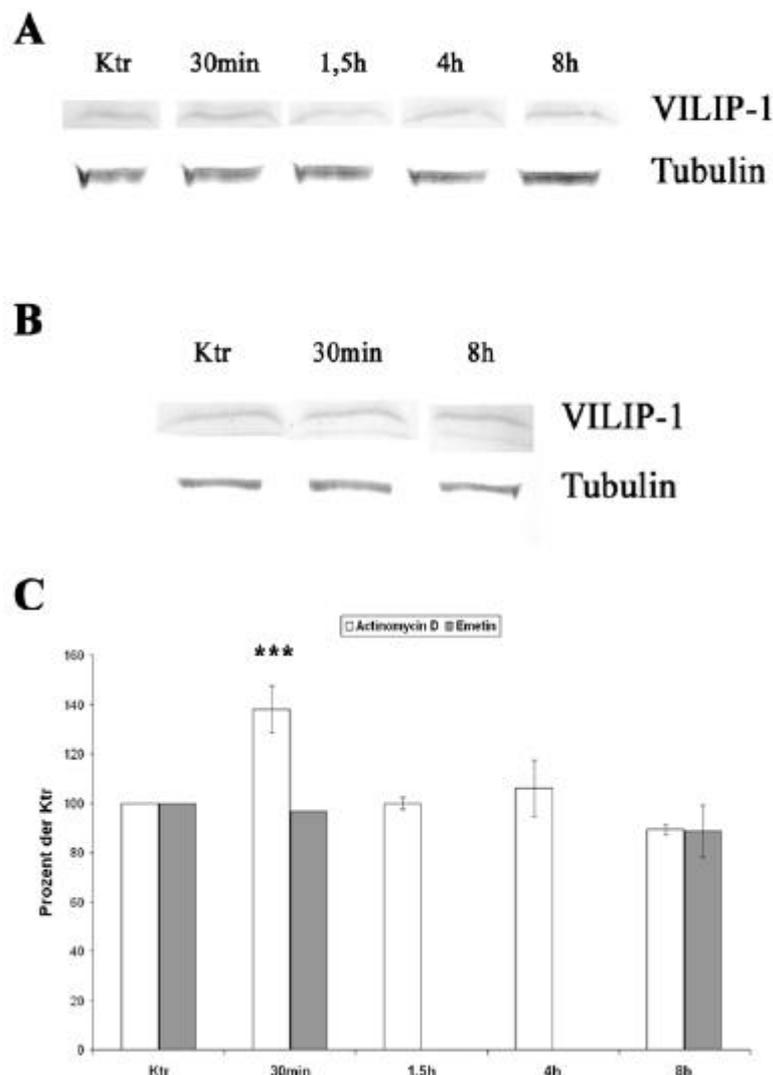


Abb. 27. VILIP-1 Proteinexpression in Abhängigkeit von mRNA-Transkription und Proteintranslation

Hippokampale Neurone in Kultur wurden mit DHPG stimuliert. Gleichzeitig wurde die mRNA Transkription (A) oder die Proteintranslation (B) inhibiert. Eine Veränderung der VILIP-1 Proteinexpression wurde mittels Westernblotanalyse analog zu Abb. 22 überprüft. **A:** Westernblotanalyse des Gesamtzellhomogenats aus drei Wochen alten hippocampalen Zellkulturen, die nicht (Ktr), 30 Minuten, 1,5h, 4h oder 8h mit 30 μ M DHPG stimuliert wurden. Der Transkriptionshinhibitor Actinomycin D wurde 1h vor Stimulationsbeginn zugefügt **B:** Westernblotanalyse des Gesamtzellhomogenats aus drei Wochen alten hippocampalen Zellkulturen, die nicht (Ktr), 30 Minuten oder 8h mit 30 μ M DHPG stimuliert wurden. Der Translationshinhibitor Emetin wurde 30 Minuten vor Stimulationsbeginn zugefügt. **A, B:** Die Detektion der Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen VILIP-1 und β -Tubulin. Es wurden je 10 μ g Protein für die SDS-PAGE verwendet. **C:** Zusammenfassung der Stimulationsexperimente aus A und B. Die Menge von VILIP-1 aus unstimulierten Zellen (Ktr) wurde jeweils als 100 Prozent gesetzt und der Grad der Regulation von VILIP-1 in stimulierten Zellen jeweils in Relation angegeben. Dabei ist zu beachten, dass der Grad der Regulation jeweils an der Menge des detektierten β -Tubulin normalisiert wurde. Die Sterne markieren signifikante Regulation der VILIP-1 Proteinexpression im Vergleich zur basalen Expression (zweiseitiger Student's T-Test, $n = 3$, $p < 0,001$ (***)).

Anstieg in der VILIP-1 Proteinexpression zu inhibieren, während nach einer 30-minütigen Stimulation immer noch eine signifikant erhöhte VILIP-1 Proteinexpression zu beobachten war (Abb. 27 A, zweiseitiger Student's T-Test, $n = 3$, $p < 0,001$ (***)). Im Gegensatz dazu inhibierte die Applikation des Proteintranslationsinhibitors Emetin ($4 \mu\text{M}$), die eine halbe Stunde vor dem Experiment erfolgte, sowohl den frühen, nach dreißig Minuten detektierbaren Anstieg der VILIP-1 Proteinexpression, als auch die späte, nach vier, bzw. acht Stunden erhöhte Expression des Proteins (Abb. 27 B). Quantitative Auswertungen der Westernblots zeigen, dass die Inhibition der RNA-Transkription nicht die frühe Phase der DHPG-induzierten erhöhten VILIP-1 Proteinexpression unterbindet, wohl aber die späte Phase, die nach vier Stunden zu erhöhten VILIP-1 Proteinmengen führt. So ist 30 Minuten nach DHPG-Stimulation immer noch ein signifikanter Anstieg der VILIP-1 Proteinexpression um circa 30 Prozent im Vergleich zur basalen Expression messbar, obwohl neue Transkription von mRNA nicht möglich ist (Abb. 27 C, zweiseitiger Student's T-Test, $n = 3$, $p < 0,001$ (***)). In den späteren Messpunkten 1,5 h, 4 h und 8 h ist kein Anstieg der VILIP-1 Proteinexpression mehr zu detektieren. Wenn allerdings die Proteintranslation unterbunden wird, ist weder nach 30 Minuten noch nach 8 Stunden, ein Anstieg in der VILIP-1 Proteinexpression nach DHPG-Stimulation vorhanden.

4.2.2 Regulation der VILIP-1 Proteinexpression in pharmakologisch stimulierten Hippokampi *in vivo*

Da eine Regulation von VILIP-1 insbesondere durch Gruppe I metabotrope Glutamatrezeptoren in hippokampalen Zellkulturen gezeigt werden konnte, sollte diese Regulation der Expression an der DHPG-induzierten *slow-onset* Potenzierung oder an der mGluR-Voraktivierung der LTP (Manahan-Vaughan und Reymann, 1997; Raymond et al., 2000; Braunewell et al., 2003) korreliert werden. Dazu wurde DHPG *in vivo* in einer Konzentration von der bekannt ist, dass sie Proteinsynthese und eine langsame (*slow-onset*) Potenzierung induziert, oder eine Faszilitierung der LTP bewirkt, in den dritten Ventrikel der Ratte appliziert. Diese, in den Arbeiten Braunewell et al., 2003, sowie Brackmann et al., eingereicht, untersuchten Hippokampi, wurden von Prof. Dr. Denise Manahan-Vaughan im Rahmen einer Kollaboration zur Verfügung gestellt. Die Hippokampi wurden 24 Stunden nach der Induktion der Potenzierung auf eine mögliche Regulation der NCS Proteine VILIP-1 und NCS-1 mit Hilfe der Westernblotanalyse untersucht. NCS-1 wird nach Induktion von LTP im Hippokampus der Ratte *in vitro* reguliert (Genin et al., 2001) und sollte unter diesen Bedingungen ebenfalls untersucht werden. Für die Westernblotanalyse wurden spezifische Antikörper gegen VILIP-1 und NCS-1 verwendet. Applikation von $50 \mu\text{M}$ DHPG führte zu einer erhöhten Expression von VILIP-1 im ipsilateralen Hippokampus (Abb. 28 A, VILIP-1 +DHPG), im Vergleich zu mit Kochsalzlösung ($0,9\%$ NaCl) behandelten Hippokampi (Abb. 28 A, VILIP-1 -DHPG). Eine ähnliche Regulation wurde für NCS-1 ebenfalls gefunden (Abb. 28 B, NCS-1), während die Proteinexpression des Kontrollproteins β -Tubulin unverändert

blieb (Abb. 28 A, B, Tubulin). Eine Quantifizierung der Westernblots ergab eine signifikante Erhöhung der VILIP-1 Proteinexpression um circa 35 Prozent 24 Stunden nach DHPG Injektion. Die quantitative Auswertung der Westernblots für NCS-1 ergab ähnliche Werte (Abb. 28 C). Folglich ist eine DHPG-Konzentration, die

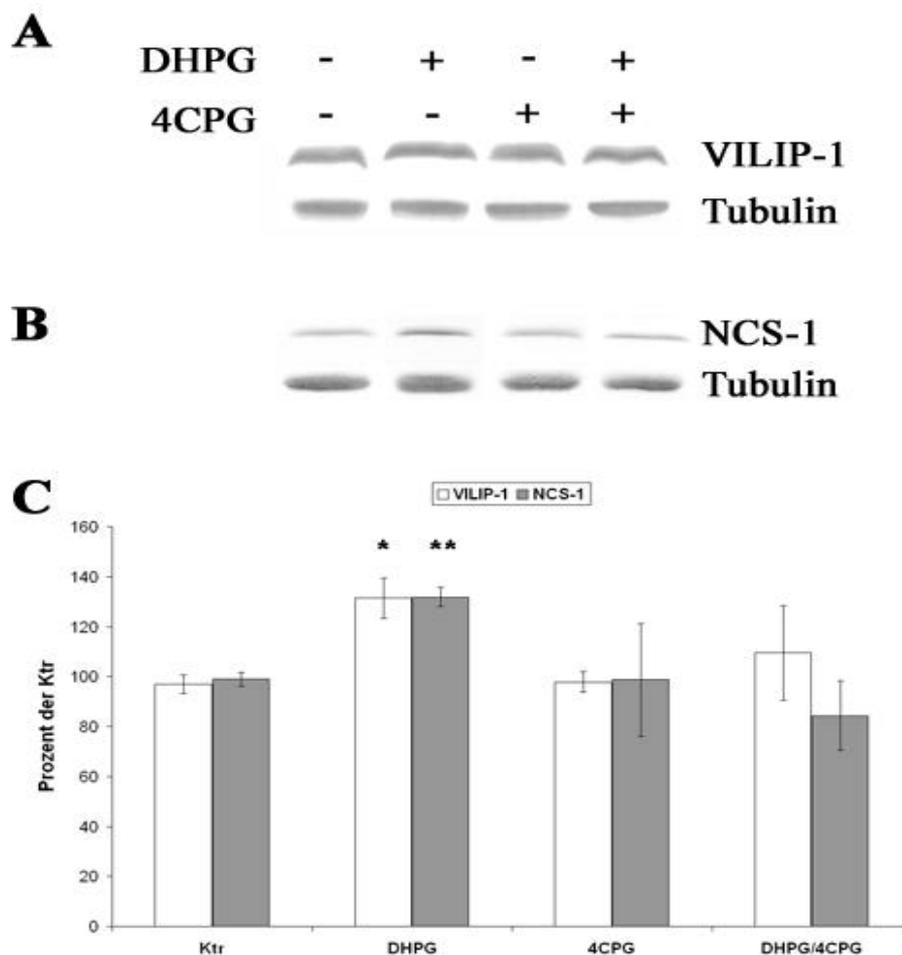


Abb. 28 DHPG-induzierte Proteinexpression im Hippokampus *in vivo*

A: Westernblotanalyse von Gesamtzellhomogenat aus Hippokampi 24 Stunden nach der Injektion von DHPG (50 μ M), 4CPG (50 μ M), sowie DHPG und 4CPG (DHPG/4CPG je 50 μ M) oder 0,9% NaCl (-DHPG/-4CPG). Die Detektion der Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen VILIP-1 und β -Tubulin. Es wurden je 20 μ g Protein für die SDS-PAGE verwendet. **B:** Westernblotanalyse von DHPG und 4CPG behandelten Hippokampi analog zu A. Die Detektion der Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen NCS-1 und β -Tubulin. Es wurden je 20 μ g Protein für die SDS-PAGE verwendet. Die Anordnung der Proben ist A entsprechend. **C:** Zusammenfassung der Stimulationsexperimente. Die Menge von VILIP-1 und NCS-1 aus unstimulierten Zellen (Ktr) wurde jeweils als 100 Prozent gesetzt und der Grad der Regulation von VILIP-1 oder NCS-1 aus stimulierten Zellen jeweils in Relation angegeben. Dabei ist zu beachten, dass der Grad der Regulation jeweils an der Menge des detektierten β -Tubulin normalisiert wurde. Die Sterne markieren signifikante Regulation der VILIP-1 oder NCS-1 Proteinexpression im Vergleich zur basalen Expression (zweiseitiger Student's T-Test, n = 3, p<0,05 (*), p<0,01 (**)).

ausreichend ist, LTP in Form von *slow-onset* Potenzierung zu induzieren, ebenfalls ausreichend die Proteinexpression von VILIP-1 und NCS-1 zu erhöhen. Die Spezifität des Effektes wurde durch die Koapplikation von DHPG und 4CPG gezeigt. Während die

Applikation von 50 μ M 4CPG keinerlei Effekte auf die Expression von VILIP-1, NCS-1, oder des Kontrollproteins β -Tubulin hatte (Abb. 28 A, B, +4CPG), konnte die Koapplikation von DHPG mit dem mGluR Gruppe I Antagonisten 4CPG die durch DHPG-induzierte Proteinexpression von VILIP-1 und NCS-1 inhibieren (Abb. 28 A, B, +DHPG/+4CPG). Eine Quantifizierung der Westernblots ergab, dass durch die Koapplikation von DHPG und 4CPG, die durch DHPG induzierte signifikant um 35 Prozent erhöhte Proteinexpression von VILIP-1 und NCS-1 (Abb. 28 C, zweiseitiger Student's T-Test, $n = 3$, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**)), wieder weitgehend auf die basale Expressionsmenge reduziert wird. Während die Koapplikation von DHPG und 4CPG die VILIP-1 Expression auf 109 Prozent reduziert, wird NCS-1 auf 84 Prozent des basalen Wertes reduziert. So scheint die DHPG-induzierte erhöhte Proteinexpression von VILIP-1 und NCS-1 im Hippokampus *in vivo* durch metabotrope Glutamatrezeptoren der Gruppe I reguliert zu werden.

4.2.3 Regulation der VILIP-1 Proteinexpression nach LTP-Stimulation im Hippokampus *in vivo*

Da NCS-1, als auch VILIP-1 eine Regulation durch mGluRs auf Proteinebene erfahren (Braunewell et al., 2003; Brackmann et al., eingereicht) und die mRNA von NCS-1 nach LTP-Induktion ebenfalls verstärkt transkribiert wird (Genin et al., 2001), wurde im Folgenden untersucht, ob die Proteine nach LTP-Induktion reguliert werden.

In Kollaboration mit Prof. Dr. W. Abraham wurden Hippokampi, genauer die Gyri Dentati untersucht, nachdem in lebenden Ratten eine LTP im Hippokampus mittels einer Hochfrequenzstimulation (HFS) von 50 Trains mit 250 μ s Pulsen über die Eingangsfasern (Perforant Path) induziert wurde (Die *in vivo*-Elektrophysiologie erfolgte im Labor von Prof. Dr. Abraham, Universität von Otago, Dunedin, Neuseeland). Die Hippokampi wurden 0, 2, 8 und 24 Stunden nach Induktion der LTP präpariert und der Gyrus Dentatus (DG) einer Westernblotanalyse mit spezifischen Antikörpern gegen VILIP-1 und NCS-1 unterzogen. Als Kontrolle dienten sowohl nicht stimulierte DG als auch der nicht stimulierte, kontralaterale DG als intraindividuelle Referenz. Gegenüber nicht stimulierten, kontralateralen DG zeigt VILIP-1 in stimulierten Hippokampi eine leicht erhöhte Proteinexpression acht Stunden nach LTP-Induktion, die sich nach 24 Stunden weiter verstärkt (Abb. 29 A, vergleiche ipsilateral (I) gegenüber kontralateral (K)). Die Proteinexpression des Kontrollproteins β -Tubulin dagegen ist nicht verändert. NCS-1 zeigt schon in den nach null Stunden entnommenen DG eine erhöhte Proteinexpression auf der ipsilateralen Seite im Vergleich zur kontralateralen Seite. Jedoch ist auch hier eine erhöhte Proteinexpression 8, bzw. 24 Stunden nach LTP-Induktion festzustellen (Abb. 29 B, vergleiche ipsilateral (I) gegenüber kontralateral (K)). Die hier gezeigten Westernblots spiegeln nur bedingt die Situation nach der Analyse mehrerer Individuen wieder. Eine quantitative Analyse der Westernblots zeigt, dass aufgrund hoher individueller Unterschiede weder bei VILIP-1 noch bei NCS-1 durch die Induktion der LTP eine signifikant erhöhte Proteinexpression nach acht oder 24 Stunden erreicht wird

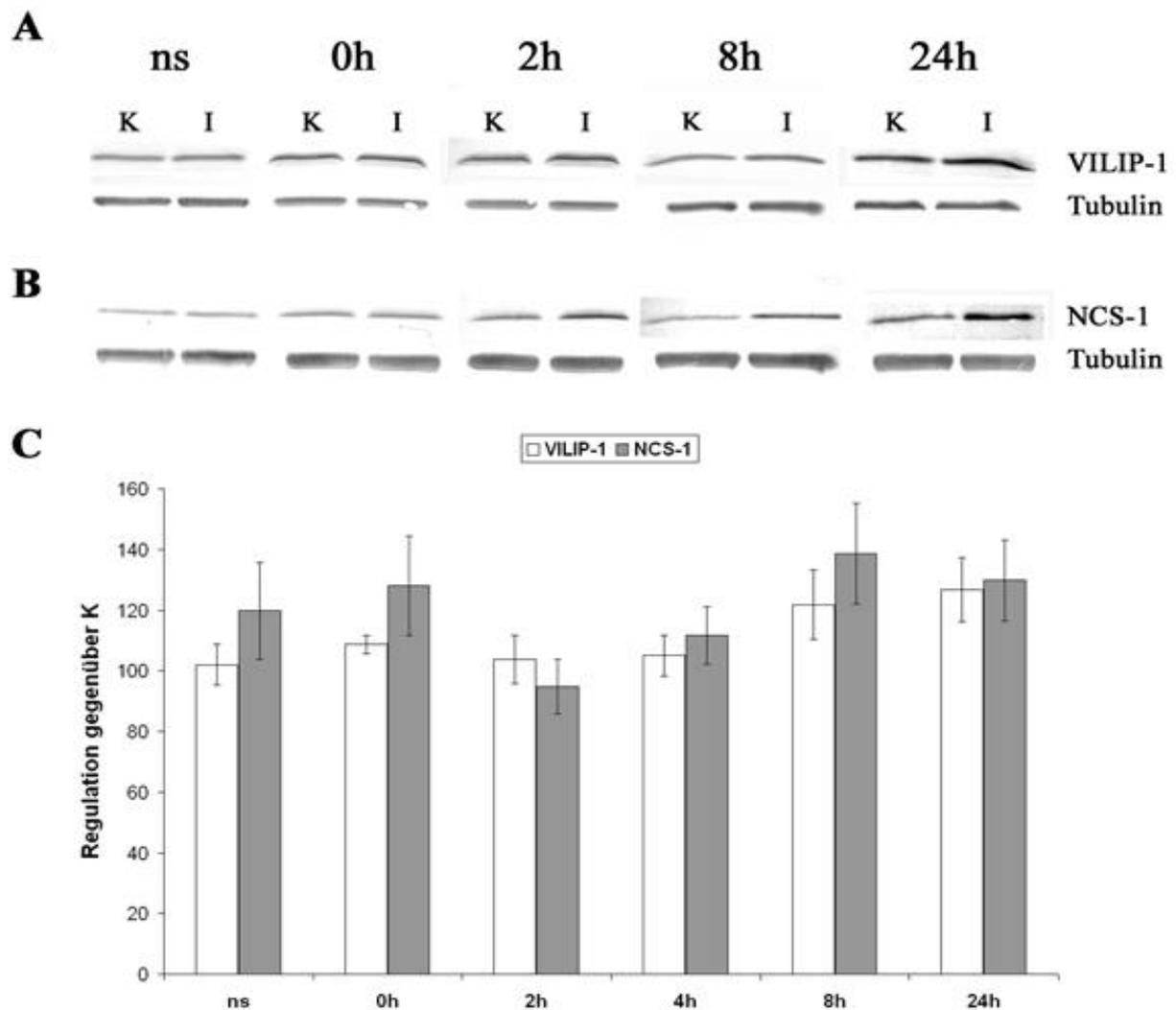


Abb. 29. Zeitabhängige Proteinexpression von NCS-Proteinen im Gyrus Dentatus *in vivo* nach LTP-Stimulation

Über die Eingangsfasern (Perforant Path) wurde im Gyrus Dentatus in Ratten *in vivo* LTP mittels Hochfrequenzstimulation (HFS), 50 Trains, 250 μ s Pulse induziert. 0, 2, 4, 8 und 24 Stunden nach Induktion der LTP wurden die Hippocampi präpariert und der Gyrus Dentatus (DG) einer Westernblotanalyse unterzogen. Als Kontrolle dienten sowohl nicht stimulierte, ipsilaterale DG (ns) als auch der nicht stimulierte, kontralaterale DG (K) als intraindividuelle Referenz (stimulierte Seite = ipsilaterale Seite (I)). **A:** Westernblotanalyse von Gesamtzellhomogenat der DG zu verschiedenen Zeitpunkten nach LTP-Induktion. Die Detektion der Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen VILIP-1 und β -Tubulin. Es wurden je 20 μ g Protein für die SDS-PAGE verwendet. **B:** Westernblotanalyse von LTP-induzierten DG analog zu A. Die Detektion der Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen NCS-1 und β -Tubulin. Es wurden je 20 μ g Protein für die SDS-PAGE verwendet. Die Anordnung der Proben ist A entsprechend. **C:** Zusammenfassung der Stimulationsexperimente. Zur Quantifizierung wurde die Expression von VILIP-1 und NCS-1 auf der ipsilateralen Seite an der von β -Tubulin normalisiert und mit der kontralateralen Expression verglichen. Fehlerbalken zeigen SEM.

(zweiseitiger Student's T-Test, $p > 0,1$, $n = 3$). Zur Quantifizierung wurde die Expression von VILIP-1 und NCS-1 auf der ipsilateralen Seite an der von β -Tubulin normalisiert und mit der

kontralateralen Expression verglichen. Obwohl die erhöhte Proteinexpression von VILIP-1 und NCS-1 in der Zusammenfassung 24 Stunden nach LTP-Induktion ein Niveau erreicht, dass ungefähr dem 24 Stunden nach Injektion von DHPG entspricht (siehe 4.2.2), erreicht es aufgrund der großen individuellen Unterschiede hinsichtlich der Proteinexpression keine Signifikanz (Abb. 29 C).

Die Proteinexpression von VILIP-1 ist nach acht Stunden um 22 Prozent, bzw. um 27 Prozent nach 24 Stunden erhöht, während NCS-1 das Maximum mit knapp 40 Prozent nach acht Stunden erreicht und nach 24 Stunden wieder auf 30 Prozent sinkt. Auffällig ist, dass die nicht stimulierte, als auch die Nullstunden Kontrolle ein erhöhtes Expressionsniveau für NCS-1 zeigen.

4.2.4 Regulation der VILIP-1 Proteinexpression nach LTP-Stimulation im Subikulum *in vitro*

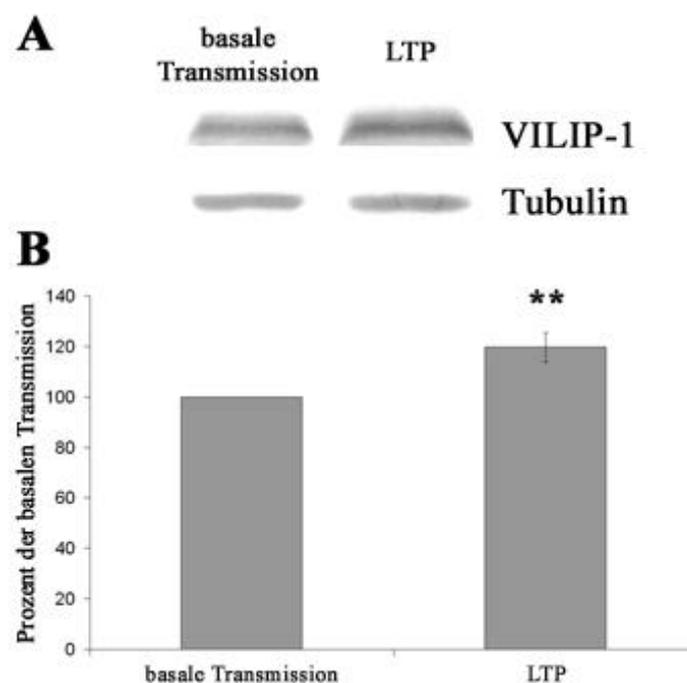


Abb. 30. Proteinexpression von VILIP-1 nach LTP-Stimulation im Subikulum *in vitro*

In Subikulumschnitten der Ratte wurde *in vitro* mittels einer 4 mal 100 Hz Stimulation LTP induziert. Die Schnitte wurden 30 Minuten nach LTP-Induktion aufgearbeitet und mit Schnitten, in denen die basale Transmission gemessen wurde, verglichen. **A:** Westernblotanalyse von Gesamtzellhomogenat der Subikulumschnitte eine halbe Stunde nach LTP-Induktion. Die Detektion der Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen VILIP-1 und β -Tubulin. Es wurden je 10 μ g Protein für die SDS-PAGE verwendet. **B:** Zusammenfassung der Stimulationsexperimente. Die Menge von VILIP-1 aus Schnitten, in denen die basale Transmission gemessen wurde, wurde als 100 Prozent gesetzt und der Grad der Regulation von VILIP-1 aus stimulierten Zellen in Relation angegeben. Dabei ist zu beachten, dass der Grad der Regulation an der Menge des detektierten β -Tubulin normalisiert wurde. Fehlerbalken zeigen SEM. Die Sterne markieren signifikante Regulation der VILIP-1 Proteinexpression im Vergleich zur basalen Expression (zweiseitiger Student's T-Test, $p < 0,01$, $n = 10$).

In Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. J. Behr wurden Subikulumschnitte, in denen LTP mit vier mal 100 Hz Stimuli induziert worden war, auf eine mögliche Regulation der Proteinexpression von VILIP-1 untersucht. Eine Westernblotanalyse von Subikulumschnitten, die 30 Minuten nach LTP-Induktion aufgearbeitet wurden, zeigt eine verstärkte Proteinexpression von VILIP-1 gegenüber Schnitten, in denen nur die basale Neurotransmission gemessen wurde (Abb. 30 A). Die Proteinexpression des Kontrollproteins β -Tubulin blieb nach der Behandlung unverändert. Quantitative Auswertungen der Westernblots ergab eine um 20 Prozent signifikant erhöhte VILIP-1 Proteinexpression bereits eine Stunde nach LTP-Induktion gegenüber Subikulumschnitten, die eine Kontrollableitung erfuhren (Abb. 30 B, zweiseitiger Student's T-Test, $p < 0,01$, $n = 10$). So scheint in diesem Modellsystem bereits eine sehr frühe aktivitätsabhängige Regulation von VILIP-1 stattzufinden, während im DG *in vivo* nur eine späte DHPG-induzierte Regulation, nach acht, bzw. 24 Stunden festgestellt werden konnte (vergleiche 4.2.3).

4.3 Der Effekt des GC-B Liganden CNP auf die Expression von LTP im Subikulum *in vitro*

Der Einfluss von löslichen Guanylatcyclasen auf synaptische Prozesse wie LTP und LTD ist seit längerer Zeit bekannt (Zhuo et al., 1994; Linden et al., 1995), während es sehr wenige Informationen über eine Beteiligung von pGC an synaptischer Plastizität gibt.

Wie unter 4.2.4 gezeigt wurde, induziert die Stimulation von LTP im Subikulum eine verstärkte Proteinexpression von VILIP-1. Die Expression des Interaktionspartners von VILIP-1, die GC-B, konnte auf Proteinebene im Subikulum der Ratte nachgewiesen werden (Abb. 31, siehe Einschub). So konnte der Einfluss der GC-B auf die synaptische Transmission in akuten Schnitten des Subikulum der Ratte untersucht werden, um eine mögliche Beteiligung von Signalkaskaden, auf die VILIP-1 einwirkt, zu evaluieren.

N. Buck aus der Arbeitsgruppe PD Dr. J. Behr führte die elektrophysiologischen Messungen an den Subikulum-Schnitten durch. Dabei wurde das LTP-Protokoll, welches unter 4.2.4 beschrieben wurde, verwendet.

Die Applikation von CNP auf die Schnitte erfolgte in einer Konzentration von 10 nM 20 Minuten vor Beginn der LTP-Stimulation. In dieser Zeit zeigt es keinen Effekt auf die basale Neurotransmission. Nach der Induktion von LTP ist jedoch eine teilweise signifikante, bis zu 50 Prozent erhöhte Potenzierung in CNP-behandelten im Vergleich zu unbehandelten Schnitten zu messen. Dieser Effekt von CNP bleibt über den gemessenen Zeitraum von einer halben Stunde bestehen. 25 Minuten nach LTP-Induktion ist ein leichter Rückgang in der CNP-induzierten erhöhten Potenzierung zu beobachten. Diese vorläufige Untersuchung stellt den ersten Befund dar, der eine Beteiligung der GC-B an synaptischen Plastizitätsprozessen nahe legt, die wiederum eine Rolle von VILIP-1 in Lern- und Gedächtnisvorgängen unterstützt.

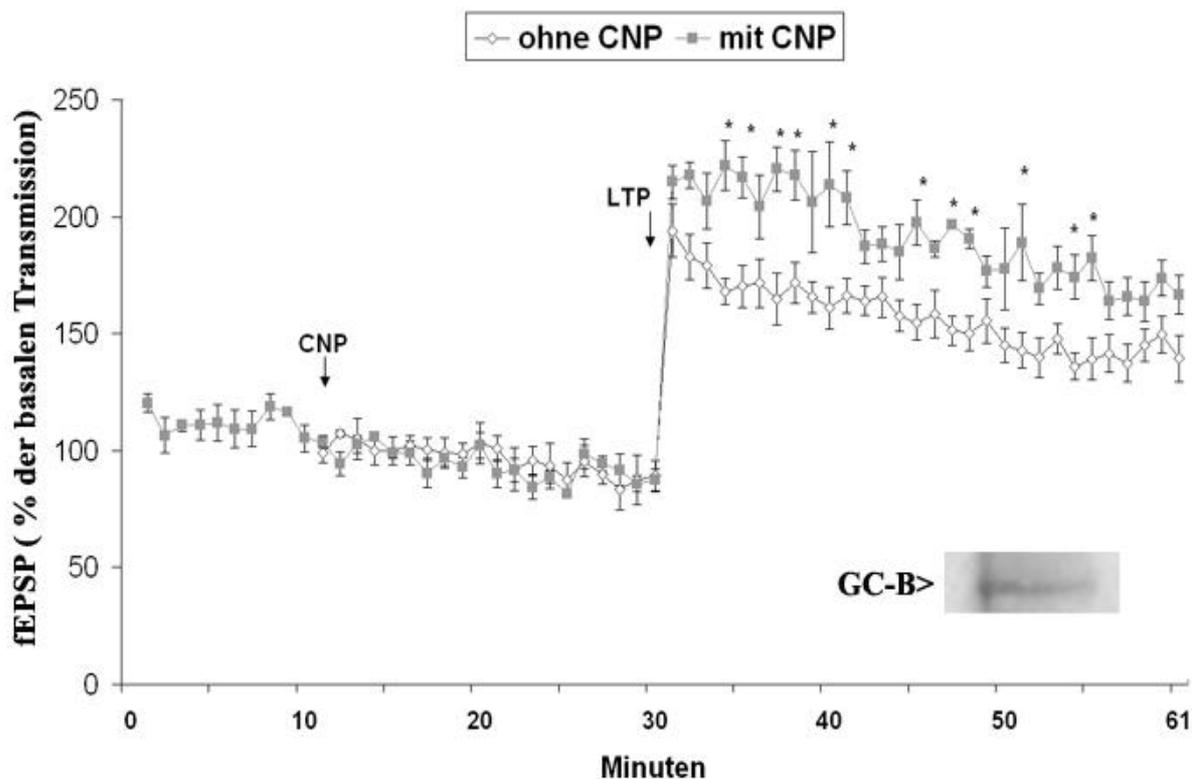


Abb. 31 Der Effekt von CNP auf die LTP-Expression im Subikulum *in vitro*

In Subikulumschnitten der Ratte wurde *in vitro* mittels einer 4 mal 100 Hz Stimulation LTP induziert. CNP wurde in einer Konzentration von 10 nM 20 Minuten vor Beginn der LTP-Stimulation in die Schnitte eingewaschen. Die Applikation von CNP und die Stimulation der LTP sind in der Abbildung markiert. Dargestellt ist die Veränderung der extrazellulären exzitatorischen Feldpotentiale (fEPSP) gegenüber der basalen Neurotransmission in Prozent (% der basalen Transmission). Der Einschub in der rechten unteren Ecke zeigt eine Westernblotanalyse des Gesamtzellhomogenat aus Subikulum. Die Detektion des Proteins erfolgte mit spezifischen aufgereinigten polyklonalen Antikörpern gegen die GC-B. Es wurden 5 μ g Protein für die SDS-PAGE eingesetzt. Sterne markieren signifikante Unterschiede in der LTP-Expression zu den unbehandelten Schnitten (zweiseitiger Student's T-Test, $p < 0,05$, $n = 3$).