

Dipl. Biol. Miriam Ratliff

Dr. med.

Einfluss der Metalloproteinase 3 auf die Expression der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors

Promotionsfach: Anatomie und Zellbiologie

Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. Jochen Kuhse

Der NMDA-Rezeptor ist wesentlich an der synaptischen Plastizität und damit an dem zellulären Mechanismus der Gedächtnisbildung beteiligt. Plastizität setzt voraus, dass die Rezeptorausstattung an der Synapse modifiziert werden kann. Für den NMDA-Rezeptor erfolgt diese Modifikation auf verschiedenen Ebenen, zum Einen durch eine variable Zusammensetzung des tetrameren Rezeptors aus verschiedenen Untereinheiten oder über eine Veränderung der Anzahl vorhandener funktioneller NMDA-Rezeptoren an der postsynaptischen Membran. NMDA-Rezeptorumverteilung erfolgt durch bidirektionale laterale Diffusion, Exozytose und Endozytose. Die von uns publizierten Daten beschreiben erstmals einen neuen Prozess der die Zahl funktioneller NMDA-Rezeptoren an der Postsynapse reguliert. Diese Arbeit untersucht in primären spinalen Neuronen und in Rattenhirngewebe den Einfluss von MMP3 auf die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors. Wir postulieren, basierend auf den gewonnenen Daten, dass MMP3 aktivitätsabhängig die NR1-Untereinheit an der Glyzinbindungsdomäne proteolytisch prozessiert.

Wir haben kultivierte spinale Neurone am 22. Tag in Kultur für 4 Tage mit 10 μ M NMDA behandelt. Die postsynaptische NMDA-Rezeptorlokalisierung wurde durch Immunzytochemie mit Antikörpern gegen die extrazelluläre S2-Glyzinbindende Domäne der NR1-Untereinheit sowie in einem weiteren Experiment mit einem Antikörper gegen das intrazelluläre C2-Epitop untersucht. In Doppelfärbungen wird Synaptophysin, ein präsynaptischer Marker, genutzt um die postsynaptische Lokalisation der NR1-Untereinheit nachzuweisen. Wir haben das Verhältnis der postsynaptischen NR1-Lokalisationen zu präsynaptischer Synaptophysinlokalisierung in 50 Neuronen über eine Dendritenlänge von 30 μ m aus drei unabhängigen

Experimenten untersucht. Nach prolongierter NMDA-Stimulation beobachteten wir in unseren spinalen neuronalen Primärzellkulturen, dass selektiv das extrazelluläre S2-Epitop der NR1-Untereinheit reduziert wird. So sinkt der Kolokalisationsindex in behandelten Neuronen im Vergleich zu unbehandelten Zellen von $0,66 \pm 0,03$ (Mittelwert \pm SEM) auf $0,2 \pm 0,03$. In den gleichen Kulturen verändert sich interessanterweise der Kolokalisationsindex der intrazellulären C2-Domäne von behandelten im Vergleich zu unbehandelten spinalen Neuronen nicht.

Matrixmetalloproteinasen prozessieren Proteine der extrazellulären Matrix proteolytisch. Durch dreitägige Zugabe eines Inhibitors für Matrixmetalloproteinasen (NNGH; $1,3 \mu\text{M}$), der unter anderem auch die MMP3 inhibiert, kommt es nach chronischer NMDA-Stimulation nicht mehr zu dem Verlust des S2-Epitops. Der Kolokalisationsindex der extrazellulären S2-Untereinheit mit Synaptophysin beträgt in diesen Kulturen $0,66 \pm 0,03$ und war von dem Kolokalisationsindex unbehandelter Neurone nicht signifikant verschieden. Diese Beobachtung impliziert, dass die Applikation von NNGH die Ektodomänenprozessierung durch MMPs insbesondere durch MMP3 reduziert.

Immunzytochemisch konnte gezeigt werden, dass MMP3 sowohl in Neuronen als auch in nicht neuronalen Zellen exprimiert wird. Durch einen bislang ungeklärten Mechanismus kommt es nach NMDA Stimulation zu einer gesteigerten Expression der aktiven Form von MMP3 in kultivierten spinalen Neuronen, dies konnten wir in Immunoblots nachweisen. In gelzymografischen Untersuchungen sieht man, dass in Gewebeextrakten unserer spinaler Kulturen und im Kulturüberstand proteolytisch aktive Enzyme vorhanden sind, die Gelatine prozessieren. Dieser Assay ist nicht spezifisch für die MMP3.

Sowohl in Immunoblots aus Ratten-Gehirnlysat als auch aus behandelten kultivierten spinalen Neuronen konnten wir ein Fragment der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors von 64 kDa nachweisen, es wird von einem Antikörper gegen das S2-Epitop erkannt.

Wir nehmen an, dass MMP3 die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors prozessiert. Diesen modifizierten Rezeptoren fehlt die Glyzinbindedomäne. Es ist davon auszugehen, dass der Kalziumeinstrom durch diese Rezeptoren deutlich verringert ist bzw. nicht mehr vorhanden ist. Der übermäßige Kalziumeinstrom vermittelt den Glutamat induzierten Untergang von Neuronen. Die Ergebnisse dieser

Arbeit deuten darauf hin, dass in Situationen hoher Glutamat Konzentrationen die MMP3 Expression steigt. Aktive MMP3 modifiziert die NR1-Untereinheit proteolytisch. Unsere Hypothese ist, dass dadurch die neuronale Apoptose durch anhaltend erhöhte Glutamat Konzentration, wie sie *in vivo* z. B. nach Trauma oder Ischämie vorkommt, reduziert wird.