



Hochschule für Angewandte Wissenschaften

Fakultät Life Sciences

# Biochemischer Nachweis neu synthetisierter Proteine durch Click-Chemie in hippocampalen Hirnschnitten von Arc/Arg3.1-Wildtyp- und Knockout-Mäusen

Bachelorarbeit  
im Studiengang Biotechnologie

zur Erlangung des akademischen Grades Bachelor of Science

vorgelegt von

**Zadaf Himat**

Hamburg,  
29. August 2014

Betreuer: Prof. Dr. Jörg Andrä  
Dr. Ora Ohana

Die Bachelorarbeit wurde betreut und erstellt im Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH).

## Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass die vorliegende Arbeit nicht im Rahmen eines anderen Prüfungsverfahrens eingereicht wurde. Die Arbeit anderer habe ich nach bestem Wissen und Gewissen durch entsprechende Zitate gekennzeichnet. Mit Ausnahme dieser Zitate ist diese Arbeit mein eigenes Werk



---

Unterschrift

Hamburg, den 29.08.2014

Ort & Datum

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>I</b>
---------------------------------	----------

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>III</b>
------------------------------------	------------

<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
---------------------------	----------

1.1 Hippocampus, eine wichtige Hirnregion für Lernen und Gedächtnis .....	1
---	---

1.2 Zelluläre und molekulare Grundlagen des Lernens und der Gedächtnisbildung .....	3
---	---

1.2.1 Informationen werden über Synapsen von einem Neuron auf das Nächste übertragen .....	3
--	---

1.2.2 Synaptische Plastizität - die Stärke von Synapsen kann durch molekulare Prozesse verändert werden .....	4
---	---

1.3 Das aktivitätsregulierte Gen Arc/Arg3.1 im ZNS .....	6
--	---

1.4 Die Proteinsynthese in Zellen kann durch Cycloheximid inhibiert werden .....	7
--	---

1.5 Click-iT-Technologie: Eine neue Methode zur Untersuchung der Proteinneusynthese .....	8
---	---

1.5.1 Markierung neu synthetisierter Proteine mittels Methionin-Analogen Azidohomoalanin .....	9
--	---

1.5.2 Visualisierung neu synthetisierter Proteine mittels Click-Chemie .....	11
--	----

1.6 Zielsetzung der Arbeit .....	13
----------------------------------	----

<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>14</b>
--------------------------------------	-----------

2.1 Material .....	14
--------------------	----

2.1.1 Material und Chemikalien .....	14
--------------------------------------	----

2.1.2 Technische Geräte.....	14
------------------------------	----

2.1.3 Puffer und Lösungen .....	15
---------------------------------	----

2.1.4 Antikörper .....	19
------------------------	----

2.1.5 Verwendete Kits .....	19
-----------------------------	----

2.2 Methoden .....	20
--------------------	----

2.2.1 Präparation des Mausgehirns, Gewebeschnittherstellung (Slicing) und Aufschluss von Gewebeschnitten.....	20
---	----

2.2.1.1 Präparation akuter hippocampaler Hirnschnitte der Maus .....	20
--	----

2.2.1.2 Pharmakologische Behandlung akuter hippocampaler Hirnschnitte .....	21
---	----

2.2.1.2.1 Markierung neu synthetisierter Proteine mittels Click-iT-AHA .....	21
--	----

2.2.1.2.2 Forskolin-Stimulation.....	22
--------------------------------------	----

2.2.1.3 Lyse und Zellaufschluss akuter hippocampaler Hirnschnitte .....	23
---	----

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden .....	24
--	----

2.2.2.1 TAMRA-Alkin basierte Click-iT-Methode .....	24
---	----

2.2.2.2 Biotin-Alkin basierte Click-iT-Methode.....	25
---	----

2.2.2.3 Proteinaufreinigungsmethoden .....	26
--	----

2.2.2.3.1 Methanol-Chloroform-Proteinfällung.....	26
---	----

2.2.2.3.2	Größenausschlusschromatographie (SEC)/Gelfiltration .....	26
2.2.2.4	Streptavidin-Pull-Down biotinylierter Proteine .....	27
2.2.2.5	Bicinchoninsäure (BCA)-Methode (zur Bestimmung der Protein-konzentration) .....	27
2.2.2.6	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (zur Auftrennung von Protein-gemischen) .....	28
2.2.2.6.1	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	28
2.2.2.6.2	Diskontinuierliche NuPAGE.....	29
2.2.2.7	Western Blot-Verfahren (zum Transfer von Proteinen auf PVDF-Membran) .....	29
2.2.2.8	Fluoreszenz-basierte und immunologische Methoden zur Detektion der Proteinsignale .....	30
2.2.2.8.1	Detektion TAMRA-Alkin -geklickter, neu synthetisierter Proteine .....	30
2.2.2.8.2	Nachweis von Gesamtproteinlevel mittels SYPRO-Ruby -Fluoreszenz-färbung in NuPAGE-Gelen.....	30
2.2.2.9	Detektion immobilisierter Proteine auf PVDF-Membran .....	31
2.2.2.9.1	Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine auf PVDF- Membran .....	31
2.2.2.9.2	Nachweis von Gesamtproteinlevel auf PVDF-Membran mittels LavaPurple Fluoreszenzfärbung .....	32
2.2.2.9.3	Strippen immobilisierter Antikörper von Membranen .....	33
<b>2.3</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Etablierung der Click-Chemie .....</b>	<b>34</b>
3.1.1	Neu synthetisierte Proteine können mittels Click-Chemie in primären, corticalen Neuronenkulturen nachgewiesen werden .....	34
3.1.2	Nachweis neu synthetisierter Proteine in akuten Hirnschnitten .....	38
3.1.2.1	Neu synthetisierte Proteine können mittels Click-Chemie im Hippocampus akuter hippocampaler Hirnschnitte nachgewiesen werden .....	38
3.1.2.2	Neu synthetisierte Proteine können mittels Click-Chemie im Cortex akuter hippocampaler Hirnschnitte nachgewiesen werden .....	41
<b>3.2</b>	<b>Untersuchung des Anteils neu synthetisierter Proteine in akuten hippocampalen Hirnschnitten von Wildtyp- und Arc/Arg3.1-Knockout-Mäusen .....</b>	<b>44</b>
3.2.1	Der Anteil neu synthetisierter Proteine ist im Hippocampus und Cortex akuter hippocampaler Hirnschnitte von Arc/Arg3.1-Wildtyp-Mäusen nicht unterschiedlich .....	45
3.2.2	Der Anteil neu synthetisierter Proteine ist im Hippocampus und Cortex akuter hippocampaler Hirnschnitte von Arc/Arg3.1-Knockout-Mäusen nicht unterschiedlich.....	48
3.2.3	Arc/Arg3.1-Wildtyp-und Knockout-Mäuse zeigen keine signifikanten Unterschiede in der hippocampalen Proteinexpression.....	50
3.2.4	Arc/Arg3.1-Wildtyp und Knockout-Mäuse zeigen keine signifikanten Unterschiede in der corticalen Proteinexpression .....	53
<b>3.3</b>	<b>Der spezifische Nachweis einzelner, neu synthetisierter Proteine bedarf weitere Optimierung mittels Biotin- Streptavidin-Pull-Down Analysen .....</b>	<b>56</b>
<b>3.4</b>	<b>Die Expression einzelner, plastizitätsrelevanter Proteine kann durch Forskolin in Hippocampus induziert werden.....</b>	<b>60</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>64</b>

<b>4.1</b>	<b>Die kupferkatalysierte Click-iT-Methode könnte zum Nachweis neu synthetisierter Proteine in Neuronen etabliert werden.....</b>	<b>64</b>
<b>4.2</b>	<b>Die Proteinexpression ist nicht beeinträchtigt in akuten hippocampalen Hirnschnitten der Arc/Arg3.1-Knockout- Mäuse.....</b>	<b>68</b>
<b>4.3</b>	<b>Der Adenylatcyclase-Aktivator Forskolin erhöht die Proteinexpression spezifischer plastizitätsrelevanter Proteine .....</b>	<b>69</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>73</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>74</b>

# Abkürzungsverzeichnis

ACSF	artifizielle Gehirnflüssigkeit ( <i>artificial cerebrospinal fluid</i> )
AHA	Azidohomoalanin
Arc/Arg3.1	aktivitätsreguliertes Gen ( <i>Activity regulated gene 3.1</i> )
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure( <i>Bicinchoninic acid</i> )
BSA	Serumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat ( <i>cyclic adenosine monophosphate</i> )
CHX	Cycloheximid
CTX	Cortex
CuAAC	Kupfer-katalysierte Azid Alkin [3+2]-Cycloaddition
DMEM	Zellkulturnährmedium ( <i>Dulbecco`s modified eagle medium</i> )
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
FSK	Forskolin
GluR	Glutamatrezeptor
HIP	Hippocampus
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horse raddish peroxidase</i> )
KO	Arc/Arg3.1-Knockout
LDS	Lithiumdodecylsulfat

LTD	Langzeitdepression
LTP	Langzeitpotenzierung ( <i>Long Term Potentiation</i> )
M	Molar (mol/l)
MES	2-( <i>N</i> -Morpholino) ethansulfonsäure
Met	Methionin
mRNA	Messenger- Ribonukleinsäure ( <i>messenger ribonucleic acid</i> )
MOPS	3-( <i>N</i> -Morpholino) propansulfonsäure
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure ( <i>transferribonucleic acid</i> )
Tween 20	Polyoxyethylenesorbitan Monolaurate
TBS	Trisgepufferten Salzlösung ( <i>Tris-buffered saline</i> )
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

Das Nervensystem ist ein erstaunlich hochkomplexes Organ des Körpers. Es ist die Steuerzentrale des gesamten Körpers, indem es die Koordinierung und Steuerung aller Körperfunktionen übernimmt. Somit ermöglicht es den Organismen sich optimal den kontinuierlich verändernden Umweltbedingungen anzupassen und sich zu verhalten. Das Nervensystem wird in das zentrale Nervensystem (ZNS) und das periphere Nervensystem (PNS) gegliedert. Während das periphere Nervensystem alle Nervenbahnen von den Organen zum ZNS (afferente Nerven) und vom ZNS zu den Organen (efferente Nerven) bildet, besteht das ZNS aus Gehirn und Rückenmark.

Um auf die Umweltbedingungen vorteilhaft zu reagieren und sich anzupassen, übernimmt hiermit das Gehirn die zentrale Rolle, indem es Informationen aufnimmt, verarbeitet, weiterleitet, speichert und gegebenenfalls diese wieder abrufen. Die Grundvoraussetzung dieser Fähigkeit, Informationen zu verarbeiten sowie Informationen zu speichern und abzurufen, ist das Lernen und Gedächtnisbildung.

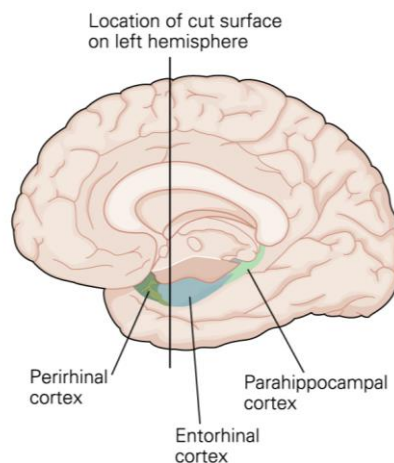
## 1.1 Hippocampus, eine wichtige Hirnregion für Lernen und Gedächtnis

Bei der Gedächtnisbildung wird zwischen zwei Formen unterschieden: das implizite bzw. nicht-deklarative und das explizite bzw. deklarative Gedächtnis (Milner *et al.*, 1998).

Bei dem impliziten Gedächtnis handelt es sich um einen Lernprozess, der Fertigkeiten und motorische Abläufe speichert, die unbewusst wahrgenommen werden. Gegenüber der impliziten Gedächtnisform basiert das deklarative oder explizite Gedächtnis auf die bewusste Speicherung von Fakten oder Ereignissen, welche das Wissen eines Menschen darstellt. Diese Funktion des deklarativen Gedächtnisses wird dem medialen Teil des Temporallappens zugeordnet. Zu diesem gehört der Hippocampus, der entorhinale, perirhinale und parahippocampale Cortex, die in der Abbildung 1 gezeigt sind (Milner *et al.*, 1998; Kandel *et al.*, 2000). Neben der Gedächtnisbildung wird auch nach der Dauer der Speicherung von Informationen unterschieden. Dabei wird die Speicherung von Gedächtnisinhalte für Sekunden bis Minuten als Kurzzeitgedächtnis bezeichnet, während die Speicherung von Tage bis Wochen oder Lebenslang als Langzeitgedächtnis definiert ist.



Die Untersuchung der Gedächtnisforschung erfolgte maßgeblich Mitte der 50er Jahre des 20. Jahrhunderts: Einem Patient (H.M.) wurde aufgrund einer schweren Epilepsie Erkrankung der mediale Temporallappen entfernt. Infolgedessen wurde bei ihm eine besondere Form des Gedächtnisverlustes beobachtet. Er konnte sich neue Fakten oder Ereignisse nicht mehr merken, obwohl er sich an Ereignisse, die mehrere Jahre zurücklagen, erinnerte (Scoville und Milner, 1957).



**Abbildung 1: Darstellung des humanen Hippocampus.** Veranschaulicht ist die mediale linke Hemisphäre. Wichtige Bereiche für die Gedächtnisbildung liegen, wie gekennzeichnet, im medialen Temporallappen. (Kandel *et al.*, 2000).

Interessanterweise waren bei ihm das Wahrnehmungsvermögen, das abstrakte Denken und das Kurzzeitgedächtnis bis 3 Minuten nicht beeinträchtigt. Außerdem waren bei ihm das Lernvermögen für motorische Fertigkeiten und das Sprachvermögen nahezu vollständig intakt. Beim *mirror drawing*, einer Aufgabe zum Nachzeichnen einer Figur, wurde bei ihm innerhalb von drei Tagen zunehmende Geschicklichkeit beobachtet (Milner *et al.*, 1998). Jedoch war er nicht fähig, sich daran zu erinnern, solche Aufgabe schon jemals gemacht zu haben. Daraus wurde ersichtlich, dass es einerseits hinsichtlich der Gedächtnisdauer Unterschiede wie Kurz- und Langzeitgedächtnis gibt und andererseits generell verschiedene Arten von Lern- bzw. Gedächtnisinhalten existieren, die von bestimmten Gehirnregionen übernommen werden. Da bei H.M. das entfernte Hirnareal einen großen Anteil vom Hippocampus und einen kleinen Teil vom Cortex enthielt, kommt dem Hippocampus und Cortex eine entscheidende Rolle bei der Speicherung bestimmter Lerninhalte ins Langzeitgedächtnis zu. Grundlegend dafür sind zelluläre und molekulare Veränderungen innerhalb neuronaler Netzwerke in den einzelnen Hirnregionen.

## 1.2 Zelluläre und molekulare Grundlagen des Lernens und der Gedächtnisbildung

### 1.2.1 Informationen werden über Synapsen von einem Neuron auf das Nächste übertragen

Im menschlichen Gehirn sind circa eine Billion ( $10^{12}$ ) Neuronen, die Nervenzellen in neuronalen Netzwerken miteinander vernetzt (Ho *et al.*, 2011; Garner *et al.*, 2002). Dabei kommunizieren die Neurone über spezialisierte Kontaktstellen, den Synapsen durch elektrische und/oder chemische Signale miteinander. Im humanen Gehirn beträgt die Zahl der Synapsen in etwa eine Billiarde ( $10^{15}$ ) (Ho *et al.*, 2011; Garner *et al.*, 2002). Wir unterscheiden zwei verschiedene Typen von Synapsen, die elektrischen- und chemischen Synapsen. Während die elektrische Synapse ein elektrisches Signal direkt über Membrankontakte, den sogenannten *Gap Junction*, von einem Neuron zum nächsten Neuron weiterleitet, erfolgt die Signalübertragung bei chemischen Synapsen über die Ausschüttung von Botenstoffen, den Neurotransmittern.

Einer der wichtigsten Neurotransmitter chemischer Synapsen ist Glutamat. Glutamat diffundiert nach seiner Ausschüttung über den synaptischen Spalt zur Postsynapse und bindet dort an spezifische Glutamat-Rezeptoren. Wir unterscheiden zwei Haupttypen von Glutamat-Rezeptoren (GluRs): metabotrope Glutamat-Rezeptoren (mGluRs), die mit GTP-bindenden Proteinen assoziiert sind und ionotropen Glutamat-Rezeptoren (iGluRs), die als Liganden gesteuerte Ionenkanäle fungieren und sich durch Binden des Neurotransmitters öffnen. Dabei kommt es zum Einstrom positiver Ladung und damit zur Depolarisation der postsynaptischen Membran. Durch diesen Prozess können Informationen von einem Neuron auf das nächste in Form von Aktionspotentialen weitergeleitet werden (Garner *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2007).

Die ionotropen Glutamat-Rezeptoren (iGluRs) werden in drei bedeutende Subtypen klassifiziert. Hierzu gehören der NMDA-Rezeptor (N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor), der AMPA-Rezeptor ( $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isloxazol-Propionsäure-Rezeptor) sowie der Kainat-Rezeptor (Wenthold *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 2007). Die AMPA-Rezeptoren bestehen aus den vier Rezeptoruntereinheiten: GluA1 bis GluA4. Diese AMPA-Rezeptoruntereinheiten weisen ein Molekulargewicht von 100 bis 110 kDa auf. Die Zusammensetzung der AMPA-Rezeptoren variiert je nach Gehirnregion. Dabei kommen im Hippocampus vorwiegend AMPA-Rezeptoren, die aus den GluA1/GluA2 und GluA2/GluA3

Rezeptoruntereinheiten bestehen, vor (Wenthold *et al.*, 1996). AMPA-Rezeptoren vermitteln einen schnellen Einstrom von Natriumionen und damit die schnelle Depolarisation der Postsynapse. Durch diesen Prozess öffnen sich zusätzlich NMDA-Rezeptoren und vermitteln einen Einstrom des sekundären Botenstoffs (*Second Messenger*) Kalzium. Es ließ sich zeigen, dass Kalzium molekulare Prozesse in Neuronen reguliert, die für die Speicherung von Informationen notwendig sind (Malenka und Bear, 2004; Derkach *et al.*, 2007).

### **1.2.2 Synaptische Plastizität - die Stärke von Synapsen kann durch molekulare Prozesse verändert werden**

Chemische Synapsen bilden sehr dynamische Einheiten, die je nach neuronaler Aktivität verstärkt, abgeschwächt, neu gebildet oder abgebaut werden können. Diese Veränderbarkeit der synaptischen Stärke bezeichnet man als synaptische Plastizität. Es wird angenommen, dass die synaptische Plastizität die zelluläre und molekulare Grundlage für Lern- und Gedächtnisvorgänge bildet (Citri und Malenka, 2008). Man unterscheidet zwischen zwei Formen der synaptischen Plastizität, die Langzeitpotenzierung (*Long Term Potentiation, LTP*) und die Langzeitdepression (*Long Term Depression, LTD*). Bei der LTP kommt es zu einer langanhaltenden Erhöhung der synaptischen Übertragungsstärke, während diese bei der LTD einer langanhaltenden Abschwächung unterliegt (Citri und Malenka, 2008). Im Folgenden soll näher auf das LTP eingegangen werden.

Die LTP wurde zum ersten Mal von Tim Bliss und Terje Lomo im Jahre 1973 entdeckt und beschrieben, nachdem die grundlegende Theorie zur Funktion der Neuronen durch den kanadische Psychologen Donald Hebb im Jahre 1949 aufgestellt wurde (Hebb, 1949; Bliss und Lomo, 1973). Er formulierte eine wesentliche Hypothese zur synaptischen Plastizität, indem er annahm, dass die Synapsen benachbarter Neurone, bei gleichzeitiger prä- und postsynaptischer Aktivierung verstärkt werden können (Hebb, 1949). Diese Hebbsche Regel wurde 24 Jahre später mit der Entdeckung der Langzeitpotenzierung LTP bestätigt. So konnten Bliss und Lomo durch elektrische Stimulationen im Hippocampus von Hasen zeigen, dass eine kurze hochfrequente Stimulation des Hippocampus eine dauerhafte Erhöhung (Potenzierung) der erregenden, postsynaptischen neuronalen Antwort verursacht (Bliss und Lomo, 1973). Sie bezeichneten dieses Phänomen als Langzeitpotenzierung (LTP).

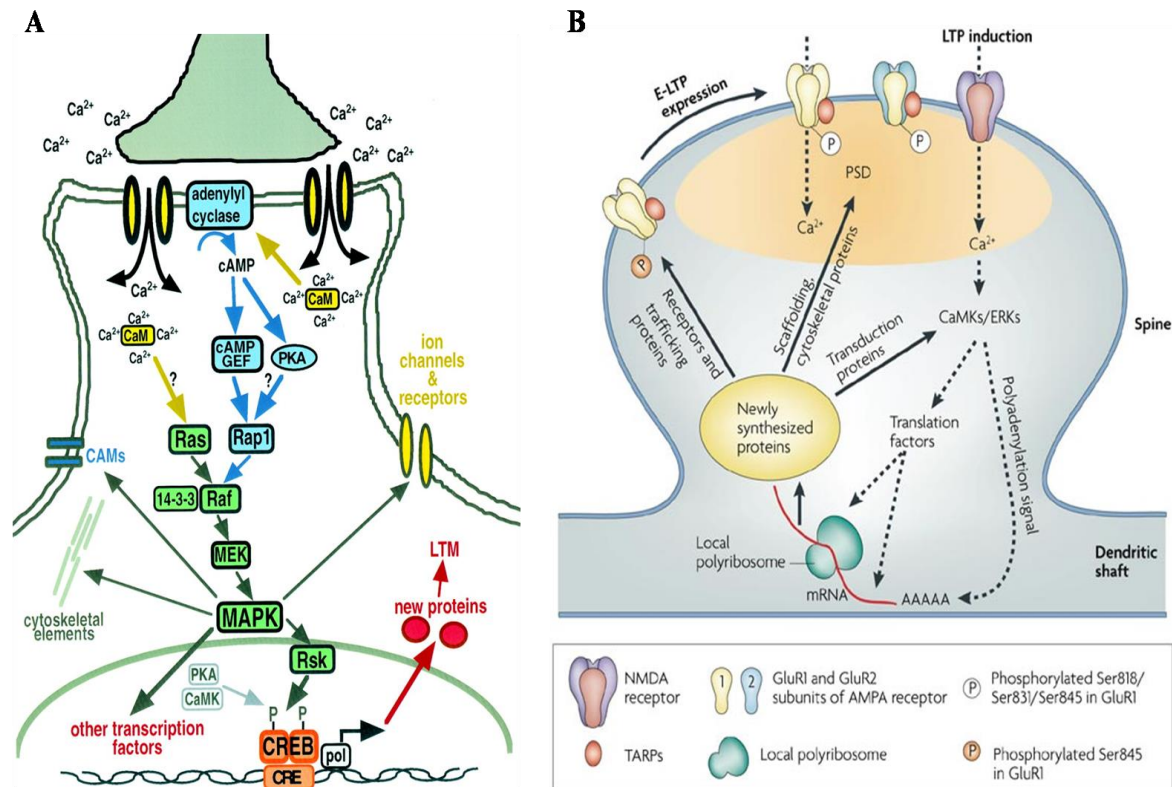
Durch zeitlich unterschiedliche, molekulare Veränderungen an Synapsen lässt sich die LTP in zwei verschiedene Formen unterteilen. Die frühe LTP (*early-LTP*, *E-LTP*) beruht auf Modifikation bereits vorhandener Proteine in Neuronen und zeigt eine synaptische Verstärkung von drei bis zu vier Stunden. Die späte Form der LTP, die mindestens 24 Stunden anhält, beruht hingegen auf morphologischen Veränderungen der Synapse. Durch vermehrten Einbau weiterer AMPA-Rezeptoren in den Synapsen kommt es zu Neu- und Umbildungen der dendritische Dornfortsätze (*Spines*). Infolgedessen kann LTP zu einer Erhöhung der Zahl der Synapsen führen. Diese dynamische Eigenschaft der Synapsen wie Einbau der AMPA-Rezeptoren in der Synapse erfordert die Synthese neuer mRNA und Proteine (Derkach *et al.*, 2007). Dies geht mit der Transkription und Translation von Genen in der Zelle einher (Mayford *et al.*, 2012).

Bei der, für eine L-LTP benötigten Transkription- und Translationsprozesse, werden verschieden komplexe Signaltransduktionskaskaden in Gang gesetzt. Diese ausgelösten Signaltransduktionswege werden beispielsweise über die cAMP-abhängige Proteinkinase A- und *mitogen-activated protein-kinase* (PKA/MAPK), die Proteinkinase C (PKC), die *calcium calmodulin-dependent-kinase* (CaMKIV) oder über *extracellular signal protein related-kinase* (ERK)/ *mitogen-activated protein-kinase* (ERK/MAPK) aktiviert, deren Signalwege hauptsächlich auf einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors *cAMP response element binding protein* (CREB) herbeiführt, wie in der Abbildung 2 gezeigt wird (Impey *et al.*, 1999; Lynk, 2004; Derkach *et al.*, 2007; Mayford *et al.*, 2012).

Weitere Untersuchungen konnten darlegen, dass Transkription- und Translationsprozesse bestimmter Gene bzw. Proteine für die Aufrechterhaltung bzw. Konsolidierung der L-LTP notwendig sind. (Derkach *et al.*, 2007; Bramham und Wells., 2007).

Ein gut untersuchter Stimulator der Gen- und Proteinexpression ist der Adenylatcyclase-Aktivator Forskolin (FSK). Forskolin stimuliert die Freisetzung des *Second Messengers* cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat). cAMP bindet an Proteinkinase A (PKA) und verstärkt dadurch die PKA Aktivität, was dazu führt, dass spezifische Gene induziert werden. Somit bewirkt Forskolin die Aktivierung der cAMP/PKA vermittelte Signaltransduktionskaskade, die die Expression von Genen für die Proteinsynthese induziert (siehe Abbildung 2) (Nguyen und Woo 2003; Nguyen und Kandel 1996; Salin *et al.*, 1996; Derkach *et al.*, 2007). Die neu synthetisierten Proteine können AMPA-Rezeptoruntereinheiten, Gerüstproteine oder andere regulatorische Proteine sein, die für die LTP-Expression erforderlich sind (Derkach *et al.*, 2007). Die Identifizierung und

Charakterisierung dieser neu synthetisierten Proteine ist für die umfassende Aufklärung der molekularen Mechanismen der synaptischen Plastizität von großem Interesse.



**Abbildung 2:** Schematisch dargestellt sind Regulationsmechanismen für die Gen- und Proteinexpression während der synaptischen Plastizität (LTP) in Neuronen. **A.** LTP-induzierende Stimulationen bewirken die Aktivierung des cAMP-PKA-MAPK-Signalwegs und aktivieren den Transkriptionsfaktor CREB. Dieser reguliert die Expression plastizitätsrelevanter Gene, wie der AMPAR-Untereinheiten GluA1 und GluA2, bzw. Arc/Arg3.1. Weiter ließ sich zeigen, dass der MAPK-Signalweg die Proteinexpression in Neuronen regulieren kann. Neu synthetisierte Proteine sind für die Ausbildung synaptischer Plastizität und damit des Lernen und Gedächtnisses notwendig (Impey *et al.*, 1999). **B.** Weiter ließ sich zeigen, dass Proteine auch lokal in Spines synthetisiert werden können und dort für den Einbau neuer AMPAR-Untereinheiten zuständig sind (Derkach *et al.*, 2007).

### 1.3 Das aktivitätsregulierte Gen Arc/Arg3.1 im ZNS

Ein wichtiges Gen für das LTP ist Arc/Arg3.1, *activity-regulated cytoskeleton-associated protein/activity regulated gene 3.1 kb transcription length*, das in den Laboren von Herrn Prof. Dietmar Kuhl und zugleich Prof. Paul Worley identifiziert wurde (Link *et al.*, 1995; Lyford *et al.*, 1995). Arc/Arg3.1 ist ein unmittelbar früh exprimiertes Gen, das als Effektorprotein fungiert und eine entscheidende Rolle bei der späten synaptischen Plastizität wie L-LTP und beim Lernen und Gedächtnis spielt. So wurden in Knockout Mäusen, die kein

Arc/Arg3.1 besitzen, Beeinträchtigungen des Langzeitgedächtnisses nachgewiesen (Plath *et al.*, 2006). Weiter wurde herausgefunden, dass die Ausbildung des Langzeitgedächtnisses in den Arc/Arg3.1-Knockout- Mäusen stark behindert ist. Morphologische Untersuchungen des Gehirns konnten keine Auffälligkeiten im Vergleich zum Wildtyp feststellen (Plath *et al.*, 2006).

Verschiedene pharmakologische bzw. elektrische plastizitätsinduzierende Stimuli vermitteln eine Erhöhung der Arc/Arg3.1-mRNA -und Proteinexpression im Cortex und Hippocampus (Link *et al.*, 1995). Die gebildeten Arc/Arg3.1-mRNA Transkripte und deren entsprechende Arc/Arg3.1-Proteine zeigen ein einzigartiges Verhalten. Sie akkumulieren nach neuronaler Stimulation spezifisch in den dendritischen Bereichen, in denen eine synaptische Aktivierung stattgefunden hat (Link *et al.*, 1995; Steward *et al.*, 1998; Plath *et al.*, 2006). Dieses und andere Indizien sprechen dafür, dass Arc/Arg3.1 an den Prozessen der synaptischen Plastizität beteiligt ist. So wurde gezeigt, dass Arc/Arg3.1 die Expression der AMPA-Oberflächenrezeptoren regulieren kann. Die Abwesenheit des Arc/Arg3.1-Proteins in Knockout-Mäusen erhöht die Anzahl von AMPA-Rezeptoren an der neuronalen Zelloberfläche, während in Wildtyp-Mäusen das Vorhandensein des Arc/Arg3.1-Proteins die Oberflächenexpression von GluA1-AMPA-Rezeptoren reduziert (Chowdhury *et al.*, 2006).

Elektrophysiologische Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass die Applikation des Translationsinhibitors Cycloheximid (CHX) die Stabilisierung, aber nicht Induktion der LTP im Arc/Arg3.1-Wildtyp beeinträchtigt. Vergleichende Untersuchungen mit Arc/Arg3.1-Knockout-Mäusen konnten keine Beeinträchtigung der LTP nach CHX-Applikation im Arc/Arg3.1-Knockout feststellen (unveröffentlichte Daten). Es ist bisher nicht geklärt durch welche Mechanismen Arc/Arg3.1 diese Translationsabhängigkeit der LTP regulieren kann.

## **1.4 Die Proteinsynthese in Zellen kann durch Cycloheximid inhibiert werden**

Cycloheximid ist ein Chemotherapeutikum mit antibiotischer Wirkung, das ursprünglich aus dem Bakterium *Streptomyces griseus* isoliert wurde. Darüber hinaus fungiert Cycloheximid als ein wichtiger Inhibitor der Proteinbiosynthese in Säugetierzellen. Dabei bindet Cycloheximid an der ribosomalen E-Stelle und hemmt die eEF2-vermittelte Translokation der Aminosäuren. Cycloheximid verhindert dadurch die Bindung der Aminosäure an die

wachsende Polypeptidkette während des Elongationsschritts der Translation (Siegel und Sisler, 1964; Bennett *et al.*, 1965).

Inwieweit die Proteinsynthese in hippocampalen Hirnschnitten von Arc/Arg3.1-Wildtyp- und Knockout-Mäuse durch Cycloheximid inhibiert werden, ist von großem Interesse um weitere Erkenntnis über die Funktion des Arc/Arg3.1-Proteins zu erhalten. Dahingehend ist bisher unbekannt, ob Arc/Arg3.1 eine wichtige Funktion für die Regulation der Proteinbiosynthese in den hippocampalen Hirnschnitten hat. Mithilfe der Click-Chemie sollte der Einfluss von Arg3.1 auf die Translation (Proteinneusynthese) überprüft werden.

## **1.5 Click-iT-Technologie: Eine neue Methode zur Untersuchung der Proteinneusynthese**

Die Analyse von Proteinen, besonders die Untersuchung der Neusynthese und der Veränderung der Expression spielen in der Forschung bzw. in biologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Hierzu hat sich ein zweistufiges Verfahren, die „Click-Technologie“, mit bioorthogonalen chemischen Gruppen durchgesetzt. Dabei werden im ersten Schritt synthetisch modifizierte nicht-kanonische Aminosäuren während der aktiven Translation in Proteine eingebaut, was zur metabolischen Markierung der neu synthetisierten Proteine führt. Im zweiten Schritt wird eine sterisch anspruchsvollere Reportergruppe angehängt und Proteine somit für die Detektion markiert. Dieser Bereich hat sich in den letzten Jahren zu einem spannenden und vielversprechenden Forschungsgebiet entwickelt. Ein wichtiges Ziel ist dabei, einzigartige funktionelle Gruppen in neu synthetisierte Proteine einzuführen, um diese selektiv und effizient sowohl in lebenden Zellen *in vivo* als auch außerhalb von lebenden Organismen *in vitro* zu adressieren. Dabei erlaubt die „Click-Technologie“ die Untersuchung der Proteinneusynthese hinsichtlich der Änderung der Proteinexpression sowie die zeitliche und räumliche Charakterisierung der neu synthetisierten Proteine in Zellen, Geweben und Organismen durch die selektive Markierung von Proteinen mit biochemischen und/oder fluoreszierenden Sonden (Dieterich *et al.*, 2006; Dieck *et al.*, 2012; Hodas *et al.*, 2012).

### 1.5.1 Markierung neu synthetisierter Proteine mittels Methionin-Analogen Azidohomoalanin

Eine weit verbreitete Gruppe der synthetisch modifizierten nicht-kanonischen Aminosäuren stellen Phenylalanin- und Methioninderivate dar, die entweder eine Azid- (Azidohomoalanin, AHA) oder Alkin-Gruppe (Homopropargylglycine, HPG) aufweisen. Die Methionin-Analoga sind strukturell dem Methionin sehr ähnlich und bilden mit einem Azid- oder einer Alkingruppe Analoga der in der Natur vorkommenden Aminosäure Methionin. Die Strukturen der derzeit am meist bekanntesten Methionin-Analoga sind in der Abbildung 3 dargestellt.

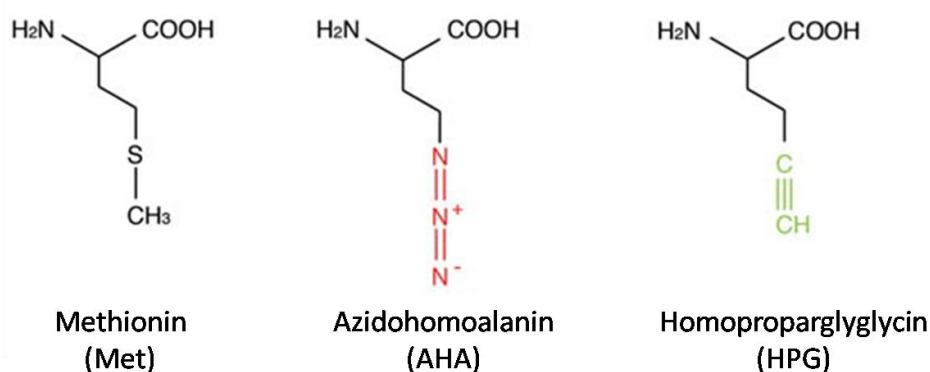


Abbildung 3: Strukturformeln der kanonischen Aminosäure Methionin (Met) und seiner synthetisch modifizierten Analoga Azidohomoalanin (AHA) und Homopropargylglycine (HPG). (Modifiziert nach Dieck *et al.*, 2012).

Die Aufnahme der Aminosäuren-Analoga in den Proteinen basiert auf zwei verschiedenen Verfahren. Dabei handelt es sich um positionsspezifischen und rest -bzw. Anteilsspezifischen Einbaumechanismen (*Site-Specific* and *Residue-Specific Incorporation*). Bei den Positionsspezifischen Einbaumechanismen werden Aminosäuren-Analoga gezielt durch die Erweiterung des genetischen Codes auf mRNA-Ebene in einer definierten Position des naszierenden Proteins eingebaut. Das neu eingefügte Codon codiert spezifisch für die Aminosäuren-Analoga. Zusätzlich ist eine spezifisch generierte tRNA zu exprimieren. Dieser Mechanismus erlaubt einen homogenen Einbau der Aminosäuren-Analoga in das naszierende Protein. Anteilsspezifische Einbaumechanismen bewirken hingegen eine inhomogene Einbau (Kiick *et al.*, 2002; Ngo und Tirrell, 2011).

Der Einbau, der in dieser Arbeit verwendeten nicht-kanonischen Aminosäure AHA in neu synthetisierte Proteine basiert auf dem Prinzip des Anteilsspezifischen Einbaumechanismus. Hier wird die Annahme getroffen, dass das zu untersuchende Gewebe nicht fähig ist, Methionin zu synthetisieren und auf exogene Zuführung angewiesen ist. Exogene Zuführung

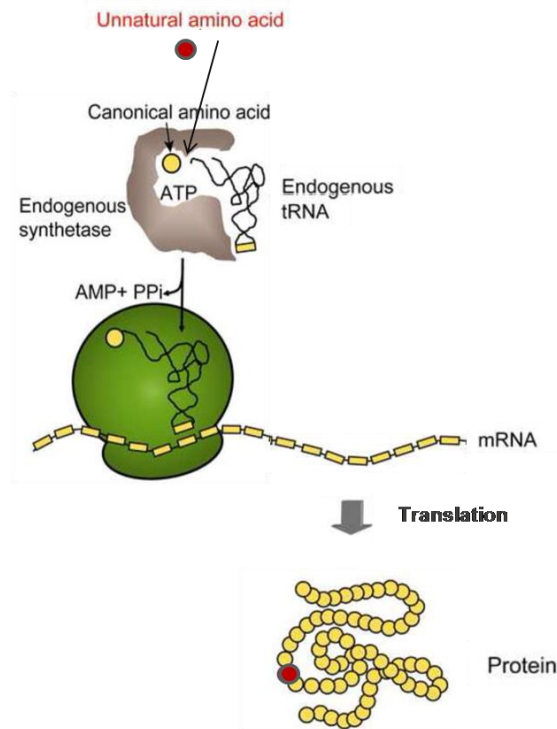


der unnatürlichen Aminosäure AHA führt zu dessen Aufnahme. Zudem wird angenommen, dass Aminoacyl-tRNA-Synthetasen zwischen den einzelnen kanonischen, jedoch nicht unbedingt zwischen den kanonischen und nicht-kanonischen Aminosäuren unterscheiden können, wenn sie beide gleichzeitig im Medium vorhanden sind. Somit können nicht-kanonischen Aminosäuren, die dem natürlichen Methionin strukturell ähnlich sind, anstelle von Methionin in Proteine eingebaut werden (Kiick *et al.*, 2002; Dieterich *et al.*, 2006; Ngo und Tirrell, 2011).

Dabei werden die unnatürlichen nicht-kanonischen Aminosäuren während der aktiven Translation der Proteinsynthese von den Aminoacyl-tRNA-Synthetasen aufgenommen und mit der korrespondierenden Methionyl-Transfer-RNA (Met-tRNA) beladen.

Die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen katalysieren jedoch die Aminoacylierung der nicht-kanonischen Aminosäure mit korrespondierten tRNA unter physiologischen Bedingungen mit einer kollektiven Fehlerrate von ( $10^{-4}$ ) (Kiick *et al.*, 2002). Die Spezifität der Synthetasen kann durch die genaue Kontrolle der Versuchsbedingungen erhöht werden. Durch die Limitierung der endogenen Methionin-Konzentration und die Ergänzung von AHA kann es zur Inkorporation der nicht-kanonischen Aminosäure kommen.

Nach der erfolgreichen Aminosäureaufnahme und der Beladung der tRNA (Aminoacylierung) erfolgt die Proteinneusynthese, bei der die Aminoacyl-tRNA am Ribosom die synthetisch modifizierte nicht-kanonische Aminosäure in das naszierende Protein überträgt, die in der Abbildung 4 veranschaulicht ist (Ngo und Tirrell, 2011).

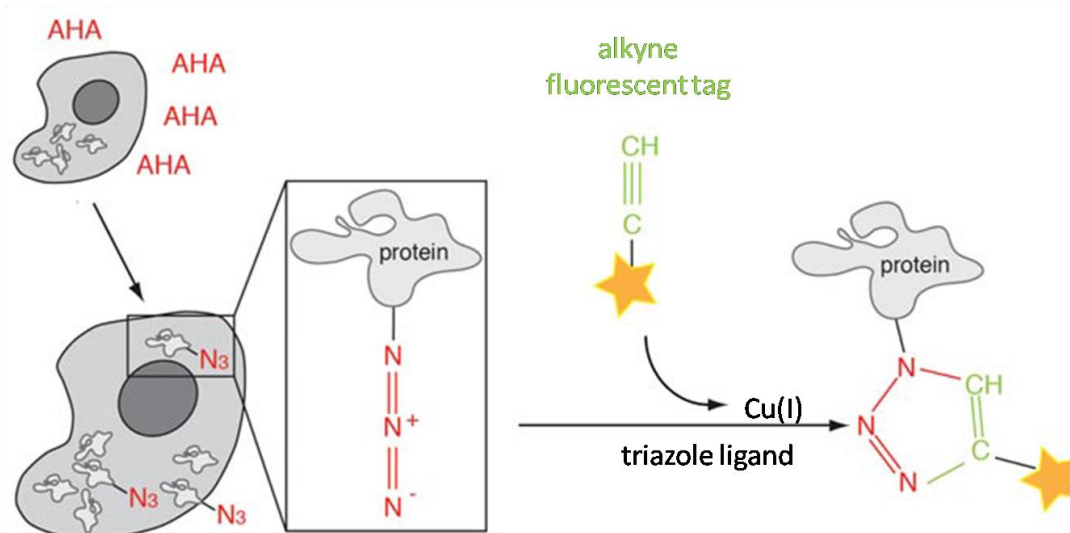


**Abbildung 4: Einbau unnatürlicher nicht-kanonischer Aminosäure AHA während der Proteinneusynthese.** Die unnatürliche Aminosäure AHA wird von der entsprechenden Methionyl-tRNA-Synthetase (grau) anstelle der kanonischen Aminosäure in der Bindungstasche aufgenommen und an die dazugehörige tRNA unter ATP Verbrauch aminoacyliert. Die aminoacylierte-tRNA überträgt diese während der Translation in das synthetisierte Protein am Ribosom (grün). Da der Einbau synthetisch modifizierter Aminosäuren zufällig erfolgt, kommt es zu einer inhomogenen Markierung neu synthetisierter Proteine. So können die Proteine mehr oder weniger synthetisch modifizierte Aminosäuren enthalten (modifiziert nach Wang *et al* 1995; Ngo und Tirrell, 2011).

### 1.5.2 Visualisierung neu synthetisierter Proteine mittels Click-Chemie

Für die Detektion der neu synthetisierten Proteine mit der eingebauten synthetisch modifizierten Aminosäure AHA wurde Kupfer-vermittelte [3+2]-Cycloadditionen von Aziden und Alkinen (CuAAC) verwendet, die auch als „Click-Chemie“ bzw. „Click-Reaktion“ bekannt sind. Dabei werden AHA-markierten Proteine mit entsprechendem Alkin-Molekül umgesetzt (geklickt). Diese Moleküle können Fluorophore wie Tetramethylrhodamin (TAMRA) oder biochemisch Biotin-Alkin sein, über die eine Visualisierung AHA-markierter Proteine durch Fluoreszenz- oder Immundetektion ermöglicht wird. Dieser Prozess ist in Abbildung 5 stark vereinfacht dargestellt. Im Folgenden wird auf die Click-Chemie eingegangen.

Die Click-Chemie wird durch Kupferkatalysierte [3+2]-Cycloaddition (oder 1,3-Dipolaren Cycloaddition) zwischen einem Azid und einem Alkin (CuAAC) bezeichnet (Rostovtsev *et al.*, 2002; Tornøe, *et al.*, 2002). Diese wurde als erstes von Huisgen beschrieben. Jedoch erfordert die Huisgen-Reaktion hohe Temperaturen. Bei der Erweiterung dieser Reaktion gelang es Sharpless und Meldal in 2002, diese durch Verwendung eines Kupferkatalysators in wässriger Milieu sehr schnell bei Raumtemperatur durchzuführen. Die Katalyse der CuAAC erfolgt durch Cu(I), das durch Reduktion von Cu(II) *in situ* hergestellt wird (Rostovtsev *et al.*, 2002; Tornøe, *et al.*, 2002). In beiden Fällen entsteht bei der Reaktion von Alkin und Azid ein 1,4-Regioisomer des Triazols (vgl. Abbildung 5). Infolge der schnellen Reaktionskinetik, der Durchführbarkeit in wässrigen Milieu und der Vielzahl an möglichen Derivaten eignet sich diese Cu(I)-katalysierte Click-Reaktion zur Markierung von Biomolekülen (Link und Tirrell, 2003; Prescher und Bertozzi, 2005; Dieck *et al.*, 2012).



**Abbildung 5: Veranschaulichung der Click-iT-Methode.** Einbau synthetisch modifizierter nicht kanonischer Aminosäure (AHA) in neu synthetisierte Proteine und deren Visualisierung mithilfe der Kupfer-vermittelten [3+2]-Cycloaddition Reaktion („Click-Chemie“) mit entsprechenden Alkin-Fluoreszenz-Sonden. (modifiziert nach Dieck *et al.*, 2012).

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Methoden etabliert werden, die es erlauben, die Proteinsynthese in akuten hippocampalen Hirnschnitten von Mäusen zu untersuchen. Im Fokus stand die Etablierung der Click-iT-Methode, die auf der Markierung neu synthetisierter Proteine basiert. Ein weiteres Ziel war die Erweiterung dieser Technik durch Etablierung einer Biotin-Streptavidin Pull-Down Methode, die die Voraussetzung schafft, die Synthese einzelner gedächtnisrelevanter Proteine spezifisch (wie Arc/Arg3.1, GluA1 und GluA2) nachzuweisen.

Weiter sollte die Funktion des Arc/Arg3.1- Proteins bei der Regulation der Proteinbiosynthese in akuten hippocampalen Hirnschnitten von der Arc/Arg3.1-Wildtyp- und Knockout-Mäuse mittels Click-Chemie untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Material und Chemikalien

Alle in dieser Arbeit benutzten Chemikalien wurden von den folgenden Firmen bezogen: Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland), Pierce (Rockford, USA), Merck (Darmstadt, Deutschland), Fluka (Buchs, Schweiz), Roche (Mannheim, Deutschland), ThermoScientific (Waltham, USA), AppliChem (Darmstadt, Deutschland), Fluorotechnics (Sydney, Australien) und Invitrogen, *Life Technologies*, (Karlsruhe, Deutschland).

Molekulargewichtstandard, Forskolin und Cycloheximid wurden von den Firmen Sigma-Aldrich und ThermoScientific erworben.

Alle laborüblichen Gebrauchsmaterialien wie Pipetten, Pipttenspitzen, Reagenzgefäße, Probenröhrchen etc., die nicht unter den technischen Geräten im Abschnitt 2.1.2 aufgezählt wurden, wurden von den Firmen Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland), Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Schott (Mainz, Deutschland), und Gilson (Middleton, USA) erworben.

#### 2.1.2 Technische Geräte

DynaMag™ Magnet	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Eismaschine AF 20	SCOTSMAN	Berlin, Deutschland
Feinwaage AE 240	Mettler	Greifensee, Schweiz
Fluorescent Image Analyzer FLA 9000	Fujifilm	Tokio, Japan
Gefrierschränke -80°C	SANYO	Moriguchi, Japan

Heizblock 5436	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Hybridisierungssofen7601	GFL	Burgwedel, Deutschland
Laborwaagen PM 4000	Mettler	Greifensee, Schweiz
Luminescent Image Analyzer LAS 4000 mini	Fujifilm	Tokio, Japan
Mikrotom HM 650 V	MICROM	Walldorf, Deutschland
Mikrowelle	SIEMENS	München, Deutschland
Netzgerät	Bio-Rad	München, Deutschland
Reinstwasserfiltrationsanlage	membraPure	Berlin, Deutschland
Schüttler unimax 1010	Heidolph	Kehlheim, Deutschland
Spektrometer	SLT Labinstrument	Crailsheim, Deutschland
Ultraschallgerät SONIFIER- 250	BRANSON	Danbury, USA
Wasserbad	GFL	Burgwedel, Deutschland

### 2.1.3 Puffer und Lösungen

Die verwendeten Substanzen Forskolin und Cycloheximid wurden bei minus 20 °C als konzentrierte Aliquots im entsprechenden Lösungsmittel gelagert: 40 mM Cycloheximid in destilliertem Wasser und 100 mM Forskolin in DMSO.

Vor Versuchsbeginn wurden diese im Kultivierungsmedium ACSF auf die gewünschte Zielkonzentration verdünnt. Anschließend wurden die Hirnschnitte damit inkubiert.

Das Aminosäure-Analogon Azidohomoalanin (*Click-iT<sup>TM</sup> AHA*) wurde entsprechend der Produktanleitung von Invitrogen in DMSO als 50 mM Lösung angesetzt.

Weitere verwendete Lösungen wurden als Konzentrate oder 1x-Lösung wie folgt angesetzt:

<b>ACSF-Lösung</b>	119 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	26 mM	NaHCO <sub>3</sub>
	1,25 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

0,3 mM	MgSO <sub>4</sub>
25 mM	Glucose
2,5 mM	CaCl <sub>2</sub>
pH Wert 7,5-7,7	

Die ACSF-Lösung wurde einen Tag vor Versuchsbeginn angesetzt und bei minus 20°C gelagert.

<b>Blocking-Puffer</b>	5% [w/v]	Magermilchpulver
	0,1% [v/v]	Tween 20
	1x	PBS
<b>IP-Puffer</b>	20 mM	Tris-HCl pH 7,5
	5x	Proteaseinhibitor (Roche)
	5x	Phosphataseinhibitor (Roche)
<b>IP-Waschpuffer</b>	350 mM	NaCl
	20 mM	Tris-HCl pH 7,5
	0,3% [v/v]	Nonidet P-40
	1 mM	EDTA
	1 mM	DTT
	0,1% [w/v]	SDS
	5x	Proteaseinhibitor (Roche)
	5x	Phosphataseinhibitor (Roche)
<b>LDS-Probenpuffer (4x)</b> (NuPAGE)	106 mM	Tris-HCl
	141 mM	Tris-Base
	2% [v/v]	LDS
	10% [v/v]	Glycerin
	0,51 mM	EDTA
	0,22 mM	SERVA Blue G250
	0,175 mM	Phenolrot
	pH 8,5	
<b>Lysis-Puffer A</b>	1% [w/v]	SDS

	50 mM	Tris-HCl pH 8
<b>Lysis-Puffer B</b>	5 mM	EDTA
	5 mM	EGTA
	50 mM	NaF
	1 mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
	1% [v/v]	Triton-X-100
	1 mM	PMSF
	4 µg/ml	Aprotinin
	1 µg/ml	Leupeptin
	200 ng/ml	Pepstatin A
<b>MES SDS-Laufpuffer (20x)</b> (NuPAGE)	1 M	Tris-Base
	2% [w/v]	SDS
	20 mM	EDTA
	1 M	MES
	pH 7,7	
<b>MOPS SDS-Laufpuffer (20x)</b> (NuPAGE)	1 M	Tris-Base
	2% [w/v]	SDS
	20 mM	EDTA
	1 M	MOPS
	pH 7,7	
<b>PBS (10x)</b>	1,37 M	NaCl
	27 mM	KCl
	100 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	20 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	pH 7,4	
<b>PBST (1x)</b>	0,1% [v/v]	Tween 20 in PBS
<b>Sammelgel</b>	4% [v/v]	30% Acrylamid/Bis Solution 29:1
	124 mM	Tris-HCl pH 6,8



	0,1% [w/v]	SDS
	0,072% [w/v]	APS
	0,085% [v/v]	TEMED
<b>SDS-Laufpuffer</b> (SDS-PAGE)	250 mM	Tris-HCl
	1,92 M	Glycin
	1% [w/v]	SDS
<b>SDS-Probenpuffer (5x)</b> (SDS-PAGE)	1 M	Tris-HCl pH 6,8
	10% [w/v]	SDS
	25% [v/v]	Glycerin
	15% [w/v]	Bromphenolblau
	10%	2-Mercaptoethanol
<b>TBS (10x)</b>	150 mM	NaCl
	7,7 mM	Tris-HCl pH 7,5
<b>TBST (1x)</b>	0,1% [v/v]	Tween 20 in TBS
<b>Transferpuffer</b>	25 mM	Tris-HCl
	192 mM	Glycin
	10% [v/v]	Methanol
<b>Trenngel</b>	10% [v/v]	30% Acrylamid/Bis Solution 29:1
	378 mM	Tris-HCl pH 8,8
	0,1% [w/v]	SDS
	0,05% [w/v]	APS
	0,005% [v/v]	TEMED

### 2.1.4 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper wurden, wenn nicht anders angegeben, in entsprechenden Verdünnungen in PBST angesetzt (Tabelle 1).

Die Streptavidin-HRP (*Streptavidine-horse raddish peroxidase*) wurde mit 2% [w/v] Biotin-freiem BSA (Sigma Aldrich) in TBST verdünnt.

Tabelle 1: Verwendete Primärantikörper und Verdünnungen

Antigen	Generiert in Spezies	Klonalität	Hersteller	Verdünnung
$\alpha$ - $\beta$ -Aktin	Maus	polyklonal	Sigma-Aldrich	1:100000
$\alpha$ - Arc/Arg3.1	Kaninchen	polyklonal	Synaptic System	1:15000
$\alpha$ -Arc/Arg3.1 (C7)	Maus	monoklonal	Santa Cruz	1:200
$\alpha$ -GAPDH	Maus	polyklonal	Chemicon	1:100000
$\alpha$ -GluA1	Kaninchen	polyklonal IgG	BD Bioscience	1:1000
$\alpha$ -GluA2	Maus	monoklonal	BD Bioscience	1:1000

Die in dieser Arbeit verwendeten Sekundärantikörper wurden den Angaben entsprechend in PBST verdünnt (vgl. Tabelle 2).

Tabelle 2: Verwendete Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper

Antigen	Enzym/Fluoreszenz	generiert in Spezies	Hersteller	Verdünnung
$\alpha$ -Kaninchen IgG	Peroxidase	Ziege	Vector Laboratories, Inc.	1:10000
$\alpha$ -Maus IgG	Peroxidase	Esel	Vector Laboratories, Inc.	1:10000

### 2.1.5 Verwendete Kits

Tabelle 3: Verwendete, kommerziell erworbene Kits

Kit	Produkt-Nummer	Hersteller
BCA™ Protein Assay Kit	Prod# 23225	Pierce.
Click-iT™ AHA (L-azidohomoalanin) for Nascent Protein Synthesis	C10102	Invitrogen

Click-iT™ Tetramethylrhodamine (TAMRA) Protein Analysis Detection Kit	C33370	Invitrogen
Click-iT™ Biotin Protein Analysis Detection Kit	C33372	Invitrogen
LavaPurple™ Blot Stain Concentrate	LP-012005	Fluorotechnics
SYPRO® Ruby Protein Gel Stain	S12001	Invitrogen

## 2.2 Methoden

Alle biologischen und chemischen Abfälle wurden gemäß der Abfallrichtlinien des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf (UKE) und der ihnen zugrunde liegenden gesetzlichen Bestimmungen entsorgt.

### 2.2.1 Präparation des Mausgehirns, Gewebeschnittherstellung (Slicing) und Aufschluss von Gewebeschnitten

Alle Experimente wurden mit Wildtyp- und Arc/Arg3.1-Knockout-Mäusen der Linie E8KO durchgeführt. Es wurden adulte, männliche Tiere verwendet, die von der zentralen Versuchstierhaltung des UKE zur Verfügung gestellt wurden.

Die E8KO Maus-Linie ist eine bei der ZMNH selbst kreierte Maus-Linie. Diese besteht aus Arc/Arg3.1-Wildtyp- und Knockout-Mäusen. In den Arc/Arg3.1-Knockout-Mäusen wurde das Arc/Arg3.1-Gen durch *Gene Targeting* komplett deletiert. Infolge der Gen-Deletion sind Arc/Arg3.1-Knockout-Mäuse nicht fähig, das Arc/Arg3.1-Protein herzustellen (Plath *et al*, 2006).

#### 2.2.1.1 Präparation akuter hippocampaler Hirnschnitte der Maus

Für die akute Präparation von Hirnschnitten wurde die artifizielle Gehirnflüssigkeit ACSF (*artificial cerebrospinal fluid*) verwendet. ACSF wurde am Vortag angesetzt, ein Teil der Lösung bei minus 20 °C eingefroren und der Rest bei 4 °C aufbewahrt.

Am Versuchstag wurde Präparationsbesteck mit Ethanol desinfiziert, mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend mit ACSF gespült. Das eingefrorene ACSF wurde in einem handelsüblichen Mixer zerstoßen und mit 4 °C kalter ACSF-Lösung versetzt.

Versuchstiere wurden mit Isofluran (1-chloro-2,2,2-trifluoro-ethyl-difluoromethylether) von Abbott narkotisiert. Unmittelbar danach erfolgte die Dekapitation der Maus durch geschultes Personal. Dabei wurde das Genick durchtrennt und der Schädel freigelegt. Um das Gehirn herauszupräparieren, wurde die Schädeldecke vorsichtig mit einer kleinen Schere entlang der Mittellinie eingeschnitten. mithilfe einer Pinzette wurden die rechte und linke Knochenplatte nach außen gebogen und das Cerebellum, der Kleinhirn, wurde mittels Skalpell entfernt. Das Gehirn wurde anschließend aus dem Schädel gehoben und im zerstoßenen Eis unter Begasung mit Carbogen (5% CO<sub>2</sub> und 95% O<sub>2</sub>) für 2 min abgekühlt. Danach wurden die beiden Hemisphären des Gehirns getrennt und bei RT mit Sekundenkleber auf Schneidetischchen des Mikrotoms fixiert. Anschließend wurden die beiden fixierten Hemisphären unverzüglich mit zerstoßenem ACSF-Eis bedeckt und unter Begasung mit Carbogen (5% CO<sub>2</sub> und 95% O<sub>2</sub>) transversale Hirnschnitte mit einer Schnittdicke von 350 µm angefertigt. Nach dem Schneidevorgang wurden die Gehirnschnitte für 2 h bei 37 °C in ACSF und Carbogenbegasung inkubiert (vgl. Abbildung 6). Dies diente zur Verbesserung des Chemotransports (bessere Nährstoff- und Sauerstoffversorgung) sowie zur Einstellung einer gleichen metabolischen Basis nach dem durch das Schneiden bedingten Stress.

## **2.2.1.2 Pharmakologische Behandlung akuter hippocampaler Hirnschnitte**

### **2.2.1.2.1 Markierung neu synthetisierter Proteine mittels Click-iT-AHA**

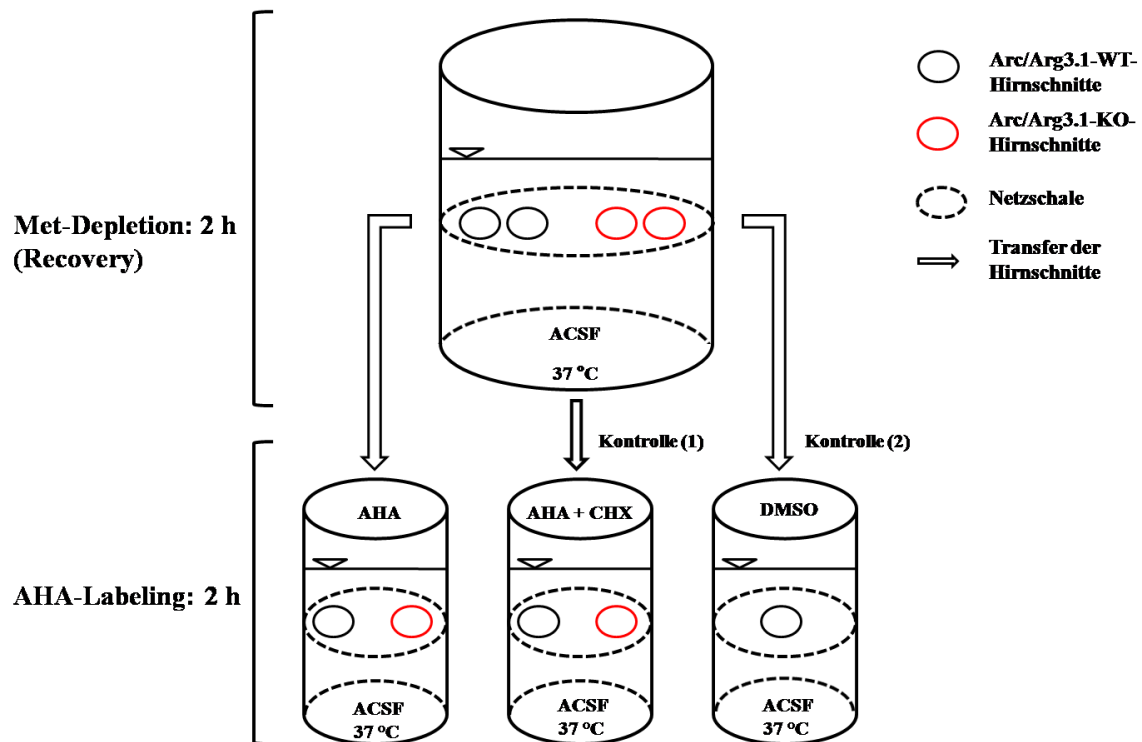
Azidohomoalanin (AHA) ist ein chemisch synthetisiertes Analogon der Aminosäure Methionin und wird bei der Proteinbiosynthese von der zelleigenen Translationsapparat in neu synthetisierte Proteine eingebaut. Ein häufig verwendeter Inhibitor der Proteinneusynthese in Zellen ist Cycloheximid (CHX).

Ein Ziel dieser Arbeit war, die Funktion des Arc/Arg3.1-Proteins für die Proteinsynthese zu ermitteln. Dazu wurden Hippocampus und Cortex von Arc/Arg3.1-Wildtyp- und Knockout-Mäusen als zu untersuchenden Geweben gewählt.

Um die Proteinneusynthese in akuten hippocampalen Hirnschnitten zu analysieren, wurden die akuten hippocampalen Hirnschnitten nach der zweistündigen Erholung (*Recovery*) für 2 h mit dem Methionin-Analogon AHA (Endkonzentration: 100 µM) inkubiert. Die Inkubation

erfolgte bei 37 °C in ACSF unter Carbogenbegasung. Um die Spezifität des AHA Signals zu kontrollieren, wurden parallele Ansätze (1) mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid (Endkonzentration: 80 µM) bzw. (2) der AHA-Trägersubstanz DMSO (Endkonzentration: 0,2% [v/v]) durchgeführt. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt.

Durch den Vergleich von CHX- behandelten und CHX- unbehandelten Hirnschnitten lässt sich die Proteinneusynthese durch die Inkorporation von AHA untersuchen.



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der Markierung neu synthetisierter Proteine in hippocampalen Hirnschnitten von Arc/Arg3.1-Wildtyp- und Knockout-Mäusen. Hippocampale Hirnschnitte wurden unmittelbar nach der Gehirnschnittanfertigung für die Erholung für 2 h bei 37 °C in ACSF unter Zuführung von Carbogengas inkubiert. Für die AHA-Markierung neu synthetisierter Proteine wurden die hippocampalen Hirnschnitte in eine 100 µM AHA-Lösung (ACSF) transferiert. Als Kontrollen wurden Hirnschnitte (1) mit 100 µM AHA und dem Proteinsyntheseinhibitor 80 µM Cycloheximid bzw. (2) mit 0,2% DMSO (v/v) parallel behandelt.

ACSF: Gehirnflüssigkeitslösung; AHA: Azidohomoalanin; CHX: Cycloheximid; DMSO: Dimethylsulfoxid; Met: Methionin; WT: Arc/Arg3.1-Wildtyp; KO: Arc/Arg3.1-Knockout.

#### 2.2.1.2.2 Forskolin-Stimulation

Da die Proteinexpression von bestimmten aktivitätsregulierenden Proteine unter basalen Bedingung sehr gering ist (Citri und Malenka, 2008), wurde akute hippocampale Hirnschnitte mit dem Substanz Forskolin stimuliert und Induktion der Proteinexpression anhand

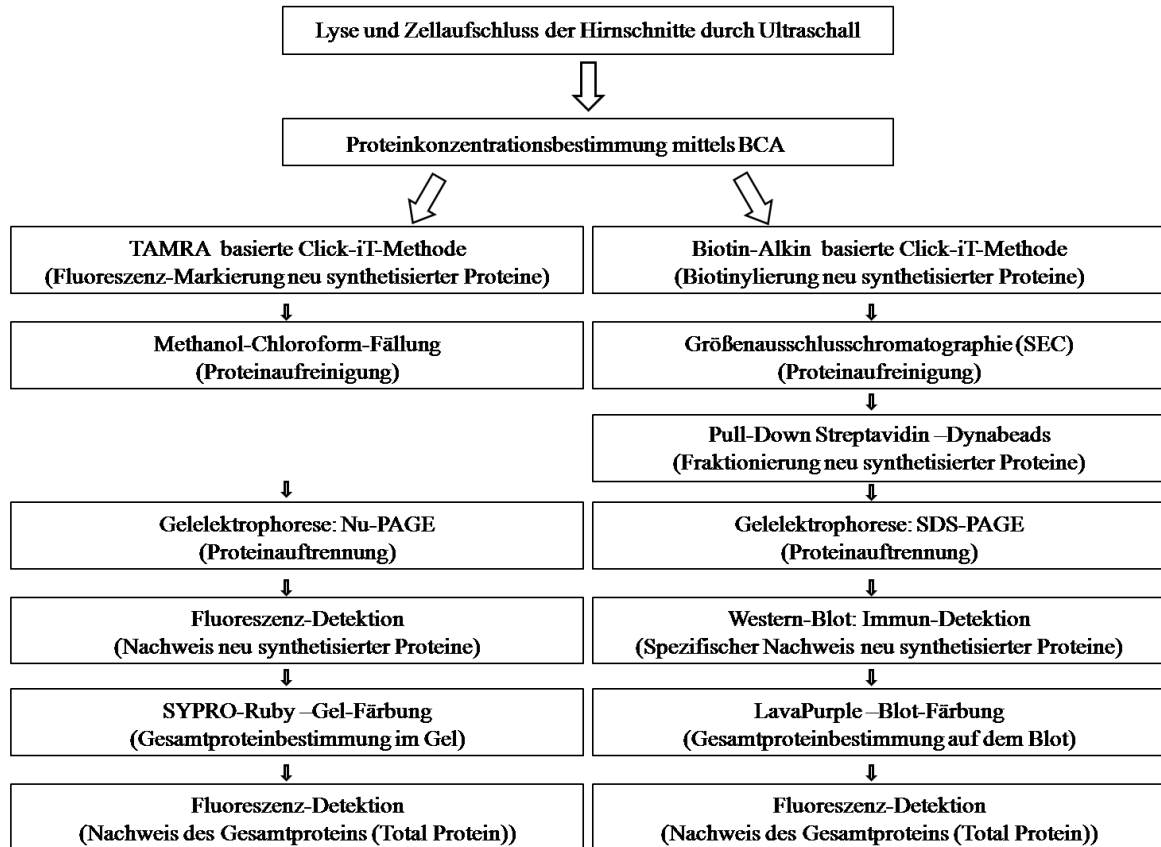
ausgewählter plastizitätsrelevanter Proteine analysiert. Infolgedessen wurde zur Untersuchung der aktivitätsinduzierten Stimulation der Proteinsynthese ein bereits weit verbreitetes Stimulationsprotokoll verwendet. Dabei wurden hippocampale Hirnschnitte bei 30 °C in ACSF unter Carbogenbegasung mit dem cAMP-abhängigen Adenylatcyclase-Aktivator Forskolin (Endkonzentration: 50 µM) stimuliert. Zur Kontrolle wurden hippocampale Hirnschnitte in einem parallelen Ansatz mit der Trägersubstanz DMSO (Endkonzentration: 0,1% [v/v]) inkubiert. Nach 30 min wurde die Stimulationslösung durch ACSF ersetzt und die Schnitte für 1,5 h inkubiert.

### **2.2.1.3 Lyse und Zellaufschluss akuter hippocampaler Hirnschnitte**

Nach der pharmakologischen Behandlung wurden aus den hippocampalen Hirnschnitten der Hippocampus und Cortex präpariert. Alle Präparationsschritte erfolgten auf Eis. Um eine Proteinkonzentration von 4-5 µg/µl zu erhalten, wurden 4 Cortices und 4 Hippocampi in 200 µl und 100µl Lysis-Puffer homogenisiert. Für die Untersuchung der basalen Proteinneusynthese mittels Click-iT-Methode wurden die Schnitte in Lysis-Puffer A entsprechend der Click-iT-AHA Protokolls (Invitrogen) homogenisiert. Die Homogenisierung der Forskolin stimulierten Proben erfolgte nach einem bereits in unserem Labor etabliertes Protokoll in Lysis-Puffer B.

Die Homogenisierung wurde durch mehrmaliges Auf- und Abziehen mit Injektions-Kanülen (Ø 0,40 X 20 mm) durchgeführt. Für den vollständigen Zellaufschluss wurden die Hippocampus- und Cortexhomogenate 4-5 mal für 15 s bei einer Tastgrad (*duty cycle*) und einer Amplitude von 30% bei 4 °C sonifiziert. Nach jeder Ultraschallbehandlung wurden die Proben kurz bei 18000 g zentrifugiert. In einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden größere Geweberückstände bei 18000-20000 g für 10 min und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet verworfen.

Nachfolgende Schritte des Versuchs sind in einem Fließschema in der Abbildung 7 dargestellt.



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung des Versuchsablaufs nach der pharmakologischen Behandlung akuter hippocampaler Hirnschnitte. Nach der Inkubation der hippocampalen Hirnschnitte mit dem Methionin-Analogon AHA werden die Schnitte mit dem Lysispuffer homogenisiert und mittels Ultraschall lysiert. Von den Lysaten, mit denen die fluoreszenz-basierte Click-iT-Methode oder biochemisch-basierte Biotin-Alkin Click-iT-Methode durchgeführt wird, werden die Gesamteinkonzentrationen ermittelt und diese anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Mithilfe der fluoreszenz-basierenden Click-iT-Methode werden neu synthetisierte Proteine nachgewiesen. Bei der biochemisch-basierten Biotin-Alkin Click-iT-Methode wird der gesamte Pool neu synthetisierter Proteine mittels Streptavidin- Pull-Down angereichert und per Western Blot und immunologischer Untersuchungen spezifisch nachgewiesen.

## 2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.2.1 TAMRA-Alkin basierte Click-iT-Methode

Zum Nachweis neu synthetisierter Proteine wurden die Probenlysate (vgl. 2.2.1.2.1 und 2.2.1.3) mithilfe der Click-iT-Methode mit einem Fluoreszierenden „Tag“ TAMRA-Alkin Fluorophore markiert. Dazu wurden die Proben nach der AHA- bzw. Kontrollbehandlung nach dem Protokoll des (*Click-iT<sup>TM</sup> Tetramethylrhodamine [TAMRA] Protein Analysis Detection*) Kits markiert (geklickt). Die Durchführung erfolgte bei RT. Nach jedem Schritt wurden die Proben für 5 s gevortext.

Zunächst wurde für jede Probe 100 µg Protein mit 40 µl *2x Click-iT Reaction Buffer* versetzt und mit destilliertem Wasser auf 80 µl aufgefüllt. Danach wurden 5 µl einer 40 mM Kupfersulfatlösung, sowie 5 µl des frisch angesetzten *Click-iT Reaction Buffer Additive 1* hinzupipettiert und die Ansätze für 3 min bei RT inkubiert. In einem weiteren Schritt wurden die Proben mit 10 µl *Click-iT Reaction Buffer Additive 2* versetzt und sofort mit Aluminiumfolie umwickelt. Die Proben wurden 45 min im Überkopfschüttler bei RT inkubiert. Mithilfe der nachfolgenden Methanol-Chloroform-Proteinfällung wurden freie nicht-gekoppelte TAMRA-Alkin- Moleküle und weitere Komponenten des Click-iT-Kits entfernt.

### 2.2.2.2 Biotin-Alkin basierte Click-iT-Methode

Für die spezifische Untersuchung einzelner neu synthetisierter Proteine wurden Proteinlysate mit Biotin-Alkin mittels *Click-iT<sup>TM</sup> Biotin-Alkin Protein Analysis Detection Kit* analysiert. Kurz: Dafür wurden 600 µg jedes Proteinlysats mit 200 µl *2x Click-iT Reaction Buffer* (Biotin-Alkin) versetzt. Danach wurden 40 mM Kupfersulfatlösung, sowie 25 µl *Click-iT Reaction Buffer Additive 1* zu den Proben hinzugefügt und 3 min bei RT inkubiert. In einem weiteren Schritt wurde zu den Proben 50 µl *Click-iT Reaction Buffer Additive 2* pipettiert. Die Proben wurden anschließend 45 min im Überkopfschüttler inkubiert. Um freie nicht-gekoppelten Biotin-Alkin Moleküle und die übrigen Click-iT-Komponenten aus den Proben zu entfernen, wurde eine Proteinaufreinigung nach der Größenausschlusschromatographie (SEC) durchgeführt. Die Durchführung der SEC erfolgte bei RT. Unmittelbar nach jedem Schritt wurden die Proben für 5 s gevortext.

Eine Aufreinigung mittels Methanol-Chloroform-Fällung von Proteinen war hier nicht möglich, da die gefällten Proteine unlösliche Präzipitate im IP-Puffer bildeten. Durch das Verwenden der SEC-Aufreinigungsmethode könnten die Proteinproben von freien Biotin-Molekülen getrennt und direkt in IP-Puffer umgepuffert werden.



### 2.2.2.3 Proteinaufreinigungsmethoden

#### 2.2.2.3.1 Methanol-Chloroform-Proteinfällung

Zur Aufreinigung der Zelllysate wurde eine Methanol-Chloroform-Proteinfällung bei RT durchgeführt. Dazu wurden Proben (100 µl) jeweils mit 300 µl Methanol, 75 µl Chloroform und 200 µl destilliertem Wasser versetzt. Die Proben wurden anschließend für 5 min bei 18000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Zugabe von 225 µl Methanol wurden die Proben 5 min bei 18000 g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Dieser Schritt wurde wiederholt. Das Proteinpellet wurde für mindestens 15 min bei RT im Dunklen getrocknet. Danach wurden die Pellets in Nu-PAGE LDS-Probenpuffer aufgenommen und 10 min bei 70°C erhitzt.

#### 2.2.2.3.2 Größenausschlusschromatographie (SEC)/Gelfiltration

Zur Entfernung freier, ungebundener Biotin-Alkin-Moleküle wurden die Proben über Größenausschlusschromatographie (SEC)-Säule (*Micro Bio-Spin<sup>TM</sup> Chromatography Columns*) von Bio-Rad mit einer P-6 oder P-30-Polyacrylamid Gelmatrix verwendet.

Größenausschlusschromatographie (SEC)/Gelfiltration ist eine flüssigchromatographische Methode zur Trennung von Biomolekülen unterschiedlicher Größe bzw. unterschiedlicher hydrodynamischen Volumens in einer porösen Gelmatrix. Dabei wandern kleinere Moleküle deutlich langsamer durch die Gelmatrix als große Moleküle. Diese Methode wird für die Umpufferung, Entsalzung sowie zur Trennung von Molekülgruppen, die sich in der zu trennenden Größe stark unterscheiden, eingesetzt.

Die Säulen wurden mit jeweils 500 µl IP-Puffer 3-4 mal äquilibriert und nach jedem Äquilibrierungsschritt bei 1000 g für 1 min bei RT zentrifugiert. Die Proben wurden auf die Säulen appliziert und das Eluat gesammelt und sofort auf Eis gekühlt. Anschließend wurde Proteinkonzentration des Eluats bestimmt (vgl. 2.2.2.5). Ein Prozent wurde als Input abgenommen, mit SDS-Probenpuffer versetzt, 10 min bei 95 °C gekocht und bei minus 20 °C eingefroren. Die restlichen 99% des Eluats wurden für den Biotin-Streptavidin Pull-Down (vgl. 2.2.2.4) eingesetzt.

#### 2.2.2.4 Streptavidin-Pull-Down biotinylierter Proteine

Die Fraktionierung und Anreicherung neu synthetisierter Proteine erfolgte durch das Streptavidin-Biotin Pull-Down System. Streptavidin-Biotin-Komplexe haben eine Bindungskonstante von  $10^{15}/l$  und bilden somit eine der stärksten nicht-kovalenten Bindungen. Die hohe Bindungsaffinität stellt sicher, dass der einmal gebildete Komplex nicht durch Änderung des pH-Wertes, Anwesenheit von chaotropen Substanzen oder durch wiederholte Waschschriffe gelöst wird.

Für den Pull-Down wurden magnetische „Streptavidin-Dynabeads“ von Invitrogen und der „DynaL MPC“ (*DynaL Magnetic Particle Concentrator*) verwendet. 50  $\mu$ l Dynabeads wurden 4 mal mit IP-Puffer gewaschen und anschließend 20 min mit IP-Puffer äquilibriert. Das Eluat (Endkonzentration: 0,67  $\mu$ g/ $\mu$ l) aus der SEC-Aufreinigung (Vgl. 2.2.2.3.2) wurde zu den Beads gegeben und über Nacht im Überkopfschüttler bei 4 °C inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und die Dynabeads 5 mal mit IP-Waschpuffer gewaschen. Waschschriffe erfolgten für 10 min im Überkopfschüttler bei RT. Zur Kontrolle der Spezifität des Pull-Downs wurden Dynabeads (1) mit AHA-gelabelten nicht biotinylierten Lysat bzw. (2) mit einem nicht-AHA-gelabelten biotinylierten Lysat inkubiert. Die Dynabeads wurden anschließend mit 40  $\mu$ l mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die präzipitierten Proteine wurden nachfolgend durch SDS-PAGE (vgl. 2.2.2.6.1) aufgetrennt und durch Western Blot-Verfahren immunologisch (vgl. 2.2.2.9.1) analysiert.

#### 2.2.2.5 Bicinchoninsäure (BCA)-Methode (zur Bestimmung der Proteinkonzentration)

Die Proteinkonzentrationsbestimmung der Gewebelysate (vgl. 2.2.1.3) erfolgte mit dem BCA-Protein Assay Kit. Der BCA-Assay basiert auf einer kolorimetrischen Messung, bei der die Proteinkonzentration proportional zur Farbentwicklung ist. Das Prinzip des Farbschlags beruht auf der Anwesenheit von Proteinen. Dabei bewirken Aminosäuren eine Reduktion von zweiwertigen Kupferionen zu einwertigen Ionen im alkalischen Milieu (Biuret-Reaktion). Diese Reduktion der Kupferionen führt zu einer Komplexbildung mit Bicinchoninsäure, dem BCA-Reagenz. Da die Komplexbildung mit einem Farbumschlag verbunden ist, lässt sich diese Reaktion photometrisch bestimmen.

Für die Proteinbestimmung wurden je 3  $\mu$ l der Proben und 22  $\mu$ l PBS bzw. Lysispuffer in Doppelbestimmung in einer Mikrotiterplatte mit 200  $\mu$ l BCA-Reagenz A und B im Verhältnis

50:1 versetzt. Parallel hierzu wurde eine BSA-Standardreihe im Konzentrationsbereich von 0 - 2,0 mg/ml erstellt. Der Ansatz wurde für 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Absorptionsmessung erfolgte am Spektrometer bei einer Wellenlänge von 550 nm. Mithilfe der Standardreihe wurde anhand der gemessenen Extinktionen die Proteinkonzentration der einzelnen Proben ermittelt.

## **2.2.2.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (zur Auftrennung von Protein- gemischen)**

### 2.2.2.6.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli in einem zweistufigen vertikalen Gelsystem, bestehend aus Trenn- und Sammelgel durchgeführt. Durch das Reduktionsmittel  $\beta$ -Mercaptoethanol im Probenpuffer und durch starkes Erhitzen (95 °C für 10 min) werden Disulfidbrücken reduziert und die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine aufgelöst. Das im Gel und im Probenpuffer enthaltene SDS verleiht den Proteinen eine negative Nettoladung, wodurch eine Wanderung der Proteine in einem elektrischen Feld möglich wird.

Für die Auftrennung von Proteinen wurden zunächst 8%ige Trenngele in den Gießstand gegossen und mit 1%ige SDS oder Ethanol überschichtet, um eine glatte und luftblasenfreie Oberfläche zu erhalten. Nach der 30 min Polymerisierung wurde das 1%ige SDS bzw. das Ethanol abgenommen und das Trenngel mit dem 4%igen Sammelgel überschichtet. Direkt nach dem Gießen wurde ein Kamm in das Sammelgel gesteckt, um Geltaschen zu formen.

Die Elektrophorese wurde anschließend im „Biometra Electrophoresis System“ von Analytik Jena durchgeführt. Die Proteinlösungen wurden vor dem Auftragen auf das SDS-Gel mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95 °C denaturiert. Zunächst wurden die Proteine bei einer Spannung von 80 Volt fokussiert. Nach Übergang der Bromphenolblau markierten Lauffront in das Trenngel wurde die Spannung auf 130-150 Volt erhöht und die Proteinprobe im elektrischen Feld aufgetrennt. Als Molekulargewichtsmarker für die Analyse von Proteinen wurde der *PageRuler<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder* verwendet. Nach der elektrophoretischen Auftrennung und dem Proteintransfer mittels Western Blot-Technik

(vgl. 2.2.2.7) wurden Proteine durch die Verwendung spezifischer Antikörper (vgl. 2.2.2.9.1) nachgewiesen.

#### 2.2.2.6.2 Diskontinuierliche NuPAGE

Zur Untersuchung der TAMRA-Alkin markierten Proteine wurden Proteinproben mittels diskontinuierliche NuPAGE<sup>®</sup>NOVEX<sup>®</sup>4 -12% Bis-Tris Gradienten-Polyacrylamidgele von Invitrogen unter denaturierenden Bedingung aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte in den pH neutralen (pH 7,0) Puffersystems. Diese bietet unter anderem im Gegensatz zum SDS-PAGE nach Laemmli maximale Proteinstabilität während der Elektrophorese, eine schärfere Auflösung, und geradlinige Laufbanden. Dies führt bei der Analyse der Banden zu genaueren Ergebnissen.

Proteinpellets wurden nach der Proteinfällung in 13-16 µl NuPAGE<sup>®</sup>LDS-Probenpuffer aufgenommen. Das Pellet wurde 4-5 mal trituriert und bei 70 °C für 10 min denaturiert. Unter diesen milden Erhitzungsbedingungen ist eine vollständige Reduktion von Disulfidbrücken der Proteine gegeben und gleichzeitig werden die Proteine vor Degradation geschützt. Nach der Denaturierung wurden die Proben kurz zentrifugiert und nochmals mit der Pipette trituriert, um sicherzustellen, dass das Proteinpellet vollständig aufgelöst wurde. Die Auftrennung der Proteine erfolgte am selben Tag in „XCell SureLock<sup>®</sup>Mini-Cell“-Laufkammer von Invitrogen. Die Proteinproben wurden dabei für 50 min in MOPS-SDS-Laufpuffer bei einer konstanten Spannung von 185 Volt separiert. Als Molekulargewichtsmarker für die Analyse der Proteine wurde der *PageRuler<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder* verwendet. Die Detektion entsprechender TAMRA-Alkin Fluoreszenzsignal erfolgte mithilfe des Fluoreszenzmessgeräts FLA 9000 (vgl. 2.2.2.8.1).

#### **2.2.2.7 Western Blot-Verfahren (zum Transfer von Proteinen auf PVDF-Membran)**

Für den spezifischen Nachweis von Proteinen durch Immundetektion wurden die denaturierten Proteine nach der SDS-PAGE (vgl. 2.2.2.6.1) auf eine PVDF-Membran von Millipore der Porengröße 0,45 µm unter Verwendung des „Mini Trans-Blot Cell“-Systems von Bio-Rad übertragen.

Die Membran wurde 15 s in Methanol aktiviert und 2 min mit destilliertem Wasser gewaschen. Die PVDF-Membran sowie 3 MM Whatman-Papier wurden von dem Proteintransferpuffer äquilibriert. Der Blot wurde ausgehend von der Kathodenseite wie folgt aufgebaut: Schwamm, 2 Lagen Whatman-Papier, SDS-Gel, PVDF-Membran, erneut 2 Lagen Whatman-Papier und Schwamm. Die Proteinübertragung wurde bei einer konstanten Spannung von 100 Volt für 90 min in eisgekühltem Transferpuffer durchgeführt. Nach dem Transfer von Proteinen erfolgte die Detektion spezifischer Proteine mittels Antikörper (vgl. 2.2.2.9.1).

## **2.2.2.8 Fluoreszenz-basierte und immunologische Methoden zur Detektion der Proteinsignale**

### **2.2.2.8.1 Detektion TAMRA-Alkin -geklickter, neu synthetisierter Proteine**

Nach der NuPAGE-Elektrophorese wurden die Gele mit destilliertem Wasser gewaschen. TAMRA-geklickten Proteine wurden am Fluoreszenzmessgerät FLA 9000 mit einem Laser der Wellenlänge 532 nm angeregt und die Intensität des emittierten Lichts gemessen (Pixelgröße: 20 µm). Die Exzitation- und Emissionsmaxima des Fluoreszenzfarbstoffs TAMRA-Alkin liegen bei 542 nm und 568 nm.

Die Stärke der Emission ist direkt proportional zur Menge der neu synthetisierten Proteine. Erhaltene Proteinsignale wurden mit dem Programm Multi Gauge V3.2 oder ImageJ qualitativ ausgewertet.

### **2.2.2.8.2 Nachweis von Gesamtproteinlevel mittels SYPRO-Ruby -Fluoreszenzfärbung in NuPAGE-Gelen**

Zur Detektion der aufgetragenen Gesamtproteinmenge wurde das *SYPRO<sup>®</sup> Ruby Protein Gel Stain Kit* verwendet.

Die Methode basiert auf fluoreszierende Farbstoffe, die selektiv an basische Aminosäuren der Proteine binden. Die Bindung erfolgt über hydrophobe Wechselwirkungen in SDS-Micellen und eignet sich daher zur Färbung von 1-D und 2-D SDS-Gelen. Da die SYPRO-Ruby-Färbung fluoreszenz-basierte Methode ist, zeigt diese im Gegensatz zur Silber- oder Coomassiefärbung einen breiteren linearen Bereich zur Quantifizierung der aufgetragenen

Proteinmenge, d. h. eine bessere Korrelation zwischen der gemessenen Signalintensität und der Proteinkonzentration. Die Sensitivität der SYPRO-Ruby-Färbung liegt bei 0,25-1 ng Protein.

Wie üblichen Proteinfärbemethoden beruht die SYPRO-Ruby-Färbung auf drei Schritten: Fixieren, Färben und Waschen. Alle Schritte wurden im Dunklen bei RT durchgeführt. Nach der Gel-Elektrophorese wurde das Gel in einer Mikrowelle mit 100 ml Fixier-Lösung (50% [v/v] Methanol; 7% [v/v] Essigsäure) überführt und für 15 min auf einem Schwenker geschüttelt. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Das Gel wurde in 100 ml SYPRO-Ruby-Färbungskonzentrat gegeben und 3 mal jeweils 30 s bei 650 W in der Mikrowelle auf 80-85 °C erhitzt und anschließend jeweils für 5 min geschüttelt. Das Gel wurde 2 mal mit SYPRO-Ruby Waschlösung (10% [v/v] Methanol; 7% [v/v] Essigsäure) für 30 min gewaschen. Durch zwei weitere Waschschrte mit destilliertem Wasser wurden Reste der SYPRO-Ruby-Lösung entfernt. Die anschließende Detektion des Gesamtproteinsignals erfolgte bei einer Wellenlänge von 610 nm (Pixelgröße: 25 µm) am Fluoreszenzmessgerät FLA 9000.

### **2.2.2.9 Detektion immobilisierter Proteine auf PVDF-Membran**

#### **2.2.2.9.1 Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine auf PVDF-Membran**

Nach dem Transfer der Proteine mittels Western Blot wurde die PVDF-Membran zunächst kurz mit PBST gewaschen und freie Bindungskapazitäten der Membran für 1 h bei RT mit Blocking-Puffer (5 % [w/v] Magermilchpulver in PBST) abgesättigt. Dies verhindert eine unspezifische Bindung der primären Antikörper. Danach wurde die Membran 3 mal für 5 min mit PBST gewaschen und anschließend über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper in PBST (vgl. Tabelle 1) unter leichtem Schwenken inkubiert. Um nicht gebundenen Primärantikörper zu entfernen, wurde die Membran 3 mal 5 min mit PBST bei RT unter leichter Agitation gewaschen. Die Membran wurde in einem weiteren Schritt mit sekundärem Antikörper für 1 h in PBST inkubiert. Die hier verwendeten sekundären Antikörper sind spezifisch gegen den Primärantikörper gerichtet und an Meerrettichperoxidase HRP gekoppelt (vgl. Tabelle 2). Um überschüssige, nicht-gebundene sekundäre Antikörper zu entfernen, wurde die Membran erneut 3 mal für 5 min mit PBST gewaschen.

Die Messung der Peroxidaseaktivität auf der Membran erfolgte mittels der *Enhanced Chemiluminescence*-(ECL)-Methode am LAS 4000. Dazu wurde die Membran in frisch angesetzter Chemilumineszenz Entwicklerlösung (Peroxid-Lösung [*Super Signal<sup>®</sup> West Pico Stable Peroxide Solution*] und Substratlösung [*Super Signal<sup>®</sup> West Pico Stable Luminol/Enhancer Solution*] im Verhältnis 1:2 gemischt) für 1 min und 30 s unter ständigem Schütteln inkubiert. Chemilumineszenzsignale wurden mithilfe des LAS 4000 detektiert.

#### 2.2.2.9.2 Nachweis von Gesamtproteinlevel auf PVDF-Membran mittels LavaPurple Fluoreszenzfärbung

Gesamtproteinlevel auf PVDF-Membranen wurde durch die fluoreszenz-basierte Färbung von Proteinen mittels *LavaPurple<sup>TM</sup>* von Fluorotechnics untersucht. Grundlegend für diese Methode ist der Farbstoff Epicocconon, der im sauren Milieu reversibel an Arginin-, Histidin- und Lysinreste in Proteinen bindet (Bell und Karuso, 2003). Infolge dieser Bindung entwickelt Epicocconon eine starke Fluoreszenz, welche eine sensitive Quantifizierung von Proteinen in 1-D und 2-D Gelen ermöglicht.

Bei der Färbung wurden alle Schritte im Dunkeln unter leichtem Schütteln bei RT durchgeführt. Zunächst wurde die PVDF-Membran direkt nach dem Transfer kurz mit destilliertem Wasser gewaschen und mit 125 µl *LavaPurple<sup>TM</sup>*-Konzentrat in 50 ml Färbungspuffer (100 mM Borsäure, pH 10,5 wurde mit NaOH eingestellt) für 30 min gefärbt. Danach erfolgte die Fixierung und Versauerung (*Acidification*), bei der die Membran in 50 ml Fixierungslösung (15% [v/v] Ethanol; 1% [v/v] Essigsäure; pH 2,3 wurde mit Essigsäure eingestellt) für 5 min inkubiert wurde. Diese Behandlung führt zu einer grünlichen Verfärbung des Blots. Anschließend wurde die Membran 3 mal mit 100% Ethanol für jeweils 3 min gewaschen, bis der grüne Hintergrund vollständig entfernt war. Schließlich wurde die Membran für 30 min vollständig getrocknet und Fluoreszenzintensitäten am Fluoreszenzmessgerät FLA 9000 mit einer Wellenlänge von 532 nm ermittelt. Nach der Detektion wurde die Membran kurz in Methanol aktiviert und in 50 ml Entfärbungslösung (50 mM Ammoniumcarbonat-Lösung) über Nacht bei RT entfärbt. Die Membran wurde 1 h in Blocking-Puffer abgesättigt, mit dem gewünschten Primärantikörper inkubiert und Chemilumineszenzsignale entsprechend Punkt (2.2.2.9.1) detektiert.

### 2.2.2.9.3 Strippen immobilisierter Antikörper von Membranen

Um auf einer Membran verschiedene Proteine nachweisen zu können, wurden die primären und sekundären Antikörper von der PVDF-Membran entfernt (gestrippt). Vor dem Strippen wurden die Proteine auf der Membran fixiert, indem die Membran für 2 min in Methanol geschwenkt und anschließend für 20 min bei der RT getrocknet wurde. Die getrocknete Membran wurde anschließend erneut in Methanol unter leichtem Schütteln aktiviert und mit PBS gewaschen.

Zum Strippen wurde die Membran im Stripping-Puffer (62,5 mM Tris-HCl pH 6,5; 2% [w/v] SDS; 100 mM 2-Mercaptoethanol) für 30 min bei 55 °C unter Rotation im Hybridisierungsofen inkubiert und anschließend mit PBS und PBST gewaschen. Zum Schluss wurde die Membran für 1 h in Blocking-Puffer gesättigt, und mit dem gewünschten Antikörper inkubiert und detektiert (vgl. 2.2.2.9.1).

## 2.3 Statistik

Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität erfolgte mit dem Programm ImageJ/Multi Gauge V3.2. Dabei wurde der Fluoreszenzsignal neu synthetisierter Proteine pro Bahn (*Lane*) erfasst und ins Verhältnis zum Gesamtproteinsignal gesetzt. Vergleiche wurden relativ zu AHA-behandelten Proben durchgeführt. Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. Die statistische Auswertung der Experimente erfolgte mithilfe des *Mann Whitney Rank Sum Test*; bei Vergleichen von mehr als zwei Gruppen wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse „*TWO WAY ANOVA*“ durchgeführt (AHA und AHA mit CHX und Hippocampus und Cortex). Signifikante Unterschiede wurden mithilfe der „Bonferroni t-Test“ ermittelt. Ein  $p \leq 0.05$  \* wurde als gerade signifikant  $p \leq 0.01$  \*\* signifikant und  $p \leq 0.001$  \*\*\* hochsignifikant betrachtet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Sigma Plot 12.0.



## 3 Ergebnisse

Die Proteinsynthese in Zellen ist ein hochregulierter Prozess, der bei Störung zu Beeinträchtigungen von Prozessen des Lernens und der Gedächtnisbildung führt (Plath *et al.*, 2006, Mayford *et al.*, 2012). So ließ sich zeigen, dass die Aufrechterhaltung der Langzeitpotenzierung von einer Neusynthese von Proteinen abhängig ist (Vickers *et al.*, 2005). Eine wichtige Methode zur Untersuchung der Proteinneusynthese ist die Click-iT-Methode. Bei dieser Methode werden neu synthetisierte Proteine mithilfe der CuAAC-Reaktion markiert. Zur Etablierung dieser Methode wurden zwei verschiedene neuronale Systeme: (1) das System der dissoziierten, corticalen Neuronenkultur und (2) das System akuter hippocampaler Hirnschnitte verwendet. In dem nachfolgenden Abschnitt werden die Ergebnisse zur Untersuchung der neu synthetisierten Proteine in akuten hippocampalen und corticalen Hirnschnitten vorgestellt. Weiter werden die Ergebnisse des Vergleichs neu synthetisierter Proteine aus Arc/Arg3.1-Wildtyp- und Arc/Arg3.1-Knockout-Mäusen präsentiert. Der dritte Abschnitt befasst sich schließlich mit der Nachweis der Expression einzelner, neu synthetisierter Proteine. Im letzten Abschnitt lege ich schließlich die Ergebnisse zur Untersuchung der aktivitätsabhängigen Proteinexpression in akuten hippocampalen Hirnschnitten aus Arc/Arg3.1-Wildtyp-Mäusen dar.

### 3.1 Etablierung der Click-Chemie

#### 3.1.1 Neu synthetisierte Proteine können mittels Click-Chemie in primären, corticalen Neuronenkulturen nachgewiesen werden

Die metabolische Markierung neu synthetisierter Proteine durch den Einbau chemisch modifizierter Methionin-Analoga (z.B.: AHA) wurde bereits durch Schuman und Tirrell (2006) in dissoziierten hippocampalen Neuronen demonstriert (Dieterich *et al.*, 2006; Dieterich *et al.*, 2007). Eine effiziente Methode zum anschließenden Nachweis AHA-gelabelter Proteine ist die FUNCAT (*fluorescent noncanonical amino acid tagging*)-Methode (Dieck *et al.*, 2012). Bei dieser Methode werden AHA-gelabelte Proben mit Fluorophoren markiert und können mittels eines Fluoreszenzscanners detektiert werden.

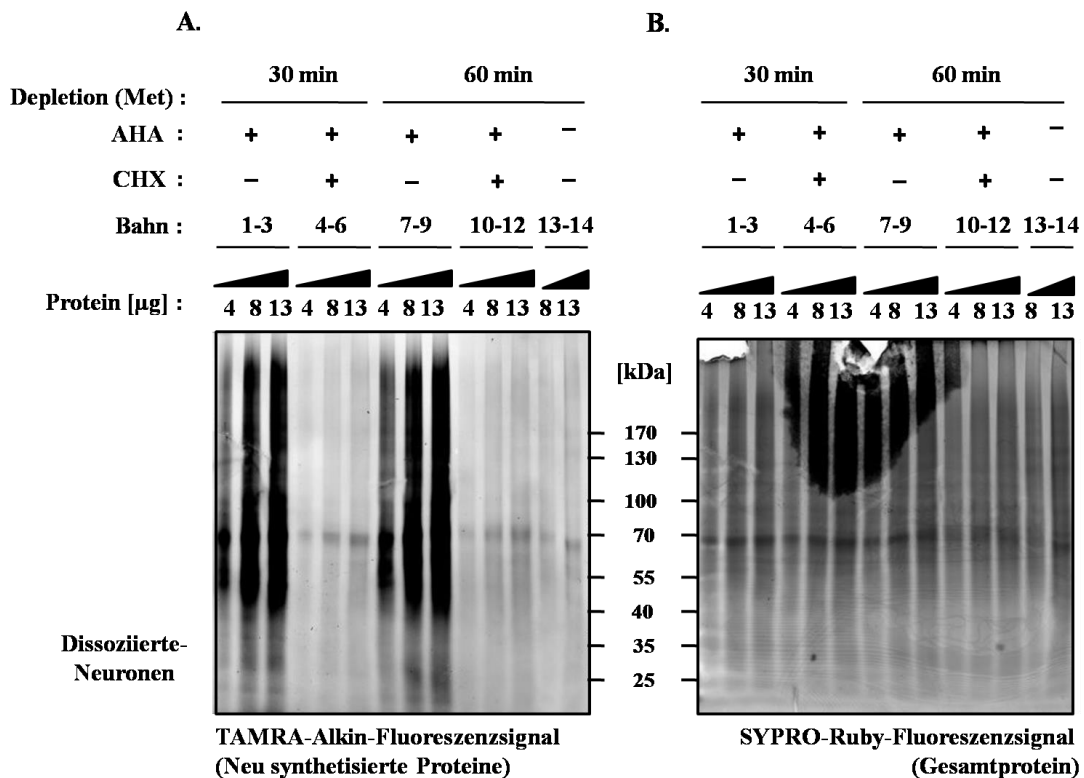
Die Etablierung der Click-Chemie erfolgte zunächst auf dissoziierten, corticalen Neuronenkulturen. Da Methionin die als erste translatierte Aminosäure bei der Proteinbiosynthese ist, wurden die Zellen für 30 bzw. 60 min in Methionin freiem DMEM inkubiert. Durch diesen Inkubationsschritt wird endogenes Methionin verbraucht und ein stationärer Zustand der Proteinsynthese in den Zellen herbeigeführt (Dieterich *et al.*, 2006). Die Expression der Proteinsynthese wird anschließend durch die Applikation der Methionin-Analoga (AHA) aktiviert, indem zelleigene Methionyl-tRNA-Synthetasen AHA aufnehmen und in Proteine einbauen. Zum Nachweis der AHA Inkorporation in neu synthetisierten Proteinen wurden Proteinlysate (vgl. 2.3.1.3) mithilfe der Fluoreszenz-basierenden TAMRA-Alkin Click-iT-Methode (vgl. 2.3.2.1) markiert. Die Proteine wurden anschließend mittels NuPAGE<sup>®</sup> 4-12% Bis-Tris Gradientengele (vgl. 2.3.2.5.1) elektrophoretisch aufgetrennt und Proteinlevel fluorometrisch bestimmt. Das TAMRA-Alkin Fluoreszenzsignal (vgl. 2.3.2.7.1) diente zur Detektion neu synthetisierter Proteine.

Gesamtproteinlevel wurde mittels SYPRO-Ruby-Färbungen bestimmt (610 nm). Zur Kontrolle der Translationsabhängigkeit wurden Neuronenkulturen nach der Methionin-Depletion mit AHA und dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid behandelt. Eine weitere Kontrolle ist die Behandlung von Neuronenkulturen mit DMSO (0,08%) anstatt von AHA.

Der Abbildung 8 ist auf der linken Seite das TAMRA-Alkin Fluoreszenzsignal zu entnehmen. Dieses zeigt die Menge neu synthetisierter Proteine. Zur Optimierung des Protokolls wurden unterschiedliche Proteinmengen (4, 8 und 13 µg) auf das Gel aufgetragen. In der Abbildung ist sowohl für den 30-Minuten-, als auch 60-Minutenzeitpunkt zu erkennen, dass die Proteinlysate AHA behandelte Neuronenkulturen (Bahn 1-3 und 7-9) ein stärkeres TAMRA-Fluoreszenzsignal aufweisen, als die mit AHA und CHX (Bahn 4-6 und 10-12) bzw. DMSO-behandelten Kontrollen/Neuronenkulturen (13 und 14). Weiter ist ersichtlich, dass eine höhere Menge aufgetragener Proteinlysate mit einem stärkeren Fluoreszenzsignal einhergeht. Ferner kann ich zeigen, dass die parallele Inkubation des Translationsinhibitors CHX das AHA-vermittelte Fluoreszenzsignal reduzieren kann. Die CHX- und AHA-behandelten Proben zeigen somit ein schwaches Fluoreszenzsignal, ähnlich dem DMSO-inkubierter Neuronenkulturen. Eine mögliche Ursache für diese Hintergrundfluoreszenz sind möglicherweise schwache unspezifische Reaktionen der Click-iT-Reagenzien.

Dem rechten Teil der Abbildung 8 ist das Gesamtproteinsignal mithilfe der SYPRO-Ruby-Färbemethode dargestellt. SYPRO-Ruby-Gesamtproteinsignale dienten als Ladungskontrolle für die auf das Gel aufgetragene Proteing Gesamtmenge. Durch die Normalisierung auf das

SYPRO-Ruby-Signal konnten Unterschiede der Auftragsmenge einzelner Proben herausgerechnet werden. Die starke Schwarzfärbung des Gels im oberen Bereich wurde durch das Kochen des Gels während der SYPRO-Ruby-Färbung hervorgerufen. Für die Analyse wurde nur der untere Bereich ab 100 kDa berücksichtigt.

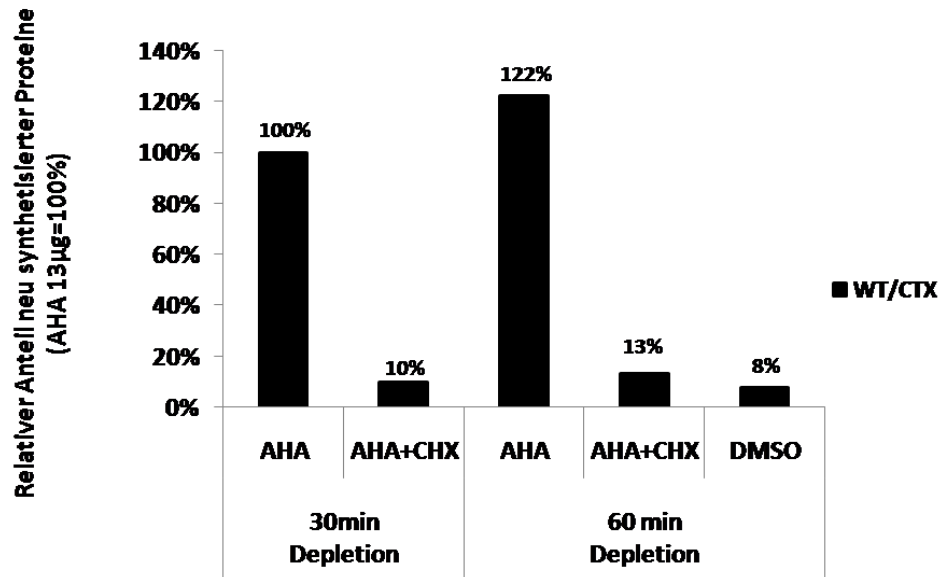


**Abbildung 8: Untersuchung und Nachweis der Proteinneusynthese mittels fluoreszenz-basierender TAMRA-Alkin Click-iT-Methode in dissoziierten corticalen Neuronen.** Die Etablierung der Click-iT-Methode und Nachweis der neu synthetisierten Proteine erfolgte wie unter 3.1.1 beschrieben. **A:** Dargestellt ist das TAMRA-Alkin-Fluoreszenzsignal, das die Menge neu synthetisierter Proteine zeigt. Diese wurden im NuPAGE<sup>®</sup>4 -12% Bis-Tris Gradientengels bei einer Wellenlänge von 532 nm gemessen. Um die optimal bzw. maximal mögliche Fluoreszenzintensität zu ermitteln, wurden Proben in dreifacher Auftragung mit zunehmender Proteinmenge von 4, 8 und 13 µg derselben Probe aufgetragen. Bahn 1-3 und 7-9 zeigen die AHA-behandelten Proben bei der 30 min bzw. 60 min (Met)-Depletion. Bahn 4-6 und 10-12 zeigen die entsprechenden Kontrollproben mit AHA und CHX. Bahn 13 und 14 zeigen das Fluoreszenzsignal der DMSO-Kontrollproben. **B:** Dargestellt ist Gesamtproteinlevel mithilfe der SYPRO-Ruby Fluoreszenzfärbung. Signalmessungen erfolgten bei einer Wellenlänge von 610 nm. Die Abbildung ist repräsentativ für ein Experiment (n=1).

AHA: Azidohomoalanin; CHX: Cycloheximid; Met: Methionin; (+): mit; (-): ohne.

In der Abbildung 9 sind die Ergebnisse der relativen Quantifizierung der Proteinsignale dargestellt. Die Quantifizierung des in Abbildung 8 gezeigten Gels erfolgte mithilfe der Programme ImageJ und Multi Gauge V3.2. Dabei wurden nur die 13 µg-Proteinproben berücksichtigt. Das TAMRA-Alkin Fluoreszenzsignal neu synthetisierter Proteine wurde ins

Verhältnis zum entsprechenden SYPRO-Ruby Gesamtproteinensignal gesetzt, um den relativen Anteil neu synthetisierter Proteine zu ermitteln. Alle Werte wurden relativ zur AHA-Probe 30 min nach der Methionin-Depletion dargestellt. Auffällig ist dabei der starke Unterschied zwischen den AHA- und den mit AHA und CHX-behandelten Proben. Wie der Grafik zu entnehmen ist, bewirkt die Zugabe von CHX eine Reduktion des Anteils neu synthetisierter Proteine an der Gesamtproteinmenge. Der relative Anteil neu synthetisierter Proteine beträgt bei den mit AHA- und CHX-behandelten Proben nur noch 10%. Die „nicht-AHA“-behandelte Probe zeigt hingegen ein Hintergrundsignal von 8%. Berücksichtigt man dieses Hintergrundsignal, ergibt sich ein relativer Anteil der neu synthetisierten Proteinmenge von 2% bei der mit AHA und CHX-inkubierten Probe. Bei der 60 minütigen Methionin-Depletion ist der Anteil neu synthetisierter Proteine nach der AHA-Inkubation gegenüber der 30 minütigen Depletion erhöht (vgl. Abb. 9; 30 min AHA: 100%; 60 min AHA: 122%). Wie auch bei der 30 minütigen Depletion zu sehen ist, bewirkt die Applikation des Translationsinhibitors Cycloheximid eine Reduktion des Anteils neu synthetisierter Proteine auf 13%.



**Abbildung 9: Cycloheximid-Behandlung reduziert den relativen Anteil neu synthetisierter Proteine in dissoziierten corticalen Neuronen.** Die dissoziierten corticalen Neuronen der adulten Arc/Arg3.1-Wildtyp-Maus wurden einer 30- bzw. 60minütigen Met-Depletion unterzogen und anschließend 2 h mit AHA gelabelt. Mittels Click-iT-Methode wurde die Proteinneusynthese untersucht. Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität erfolgte mittels ImageJ und korreliert direkt mit dem Anteil neu synthetisierter Proteine. Signale wurden auf das AHA (13 µg)-Signal der 30 min Met-Depletion normalisiert und alle andere Werte relativ dazu dargestellt.

AHA: Azidohomoalanin; CHX: Cycloheximid; WT: Wildtyp; CTX: Cortex; (+): mit.

Meine Ergebnisse lassen auf eine erfolgreiche Inkorporation von AHA in Proteine nach der 30 bzw. 60 minütigen Methionin-Depletion schließen. Durch die Verwendung von CHX kann ich zudem zeigen, dass das AHA-vermittelte Proteinsignal translationsabhängig generiert wird. Ich konnte somit die Click-iT-Methode zum Nachweis neu synthetisierter Proteine in dissoziierten corticalen Neuronen erfolgreich etablieren. Für zukünftige Fragestellungen sollte die Methode in *in vivo* näheren Systemen etabliert werden. Dazu wurde der Anteil neu synthetisierter Proteine in akuten hippocampalen Hirnschnitten (*ex vivo*) analysiert.

### **3.1.2 Nachweis neu synthetisierter Proteine in akuten Hirnschnitten**

Da sowohl der Hippocampus, als auch der Cortex als wichtige Gehirnareale für Lern- und Gedächtnisvorgänge identifiziert werden konnten (Eichenbaum *et al.*, 1999; Lyford *et al.*, 1995), haben sich meine Untersuchungen zur Proteinexpression in akuten hippocampalen Hirnschnitten auf diese beiden Hirnareale beschränkt. Der Fokus meiner Untersuchungen lag dabei auf der Etablierung der Click-iT-Methode in dem System der akuten hippocampalen Hirnschnitte.

#### **3.1.2.1 Neu synthetisierte Proteine können mittels Click-Chemie im Hippocampus akuter hippocampaler Hirnschnitte nachgewiesen werden**

Die metabolische Markierung der Proteinneusynthese mithilfe der Click-iT-Methode konnte bereits 2012 von Dieterich in akuten hippocampalen Hirnschnitten demonstriert werden (Dieck *et al.*, 2012). Bisher hat jedoch eine Studie die Proteinneusynthese mittels Kupfer katalysierter Click-Chemie in hippocampalen Hirnschnitten zeigen können (Hodas *et al.*, 2012).

Um dies zu etablieren wurden transversale hippocampale Hirnschnitte mit einer Dicke von 350  $\mu\text{m}$  angefertigt. Für die anschließende Erholung („*Recovery*“) und die Methionin-Depletion wurden die Schnitte für 2 h bei 37 °C in Carbogen-begastem ACSF inkubiert (vgl. 2.2.1.1). Nach der Methionin-Depletion wurden die Schnitte für 2 h mit AHA (100  $\mu\text{M}$ ), AHA (100  $\mu\text{M}$ ) und CHX (80  $\mu\text{M}$ ) oder als Negativkontrolle mit der Trägersubstanz DMSO (0,2% [v/v]) behandelt (vgl. 2.2.1.2.1). Die Hippocampi wurden anschließend lysiert (vgl. 2.2.1.3) und AHA-haltige Proteine mittels TAMRA-Alkin -Click-

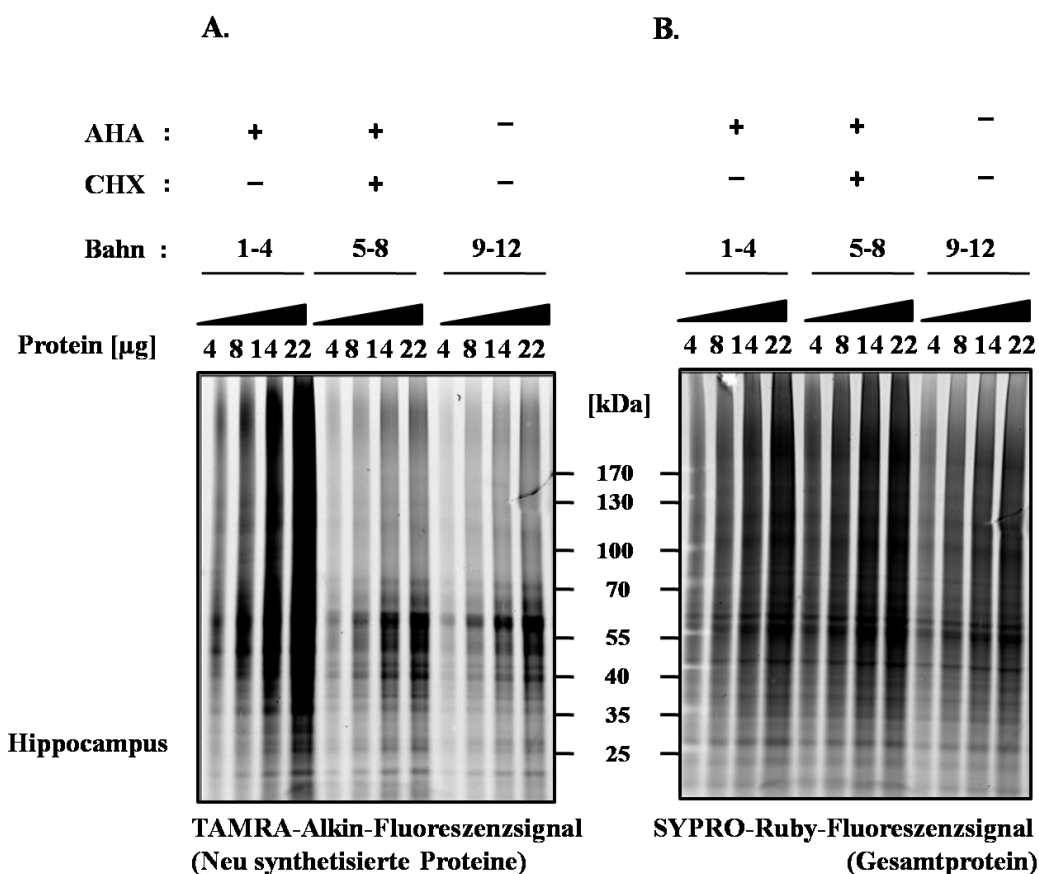
iT-Methode (vgl. 2.2.2.1) markiert. Nach der Proteinaufreinigung wurden die Proteinproben mittels NuPAGE<sup>®</sup>4-12% Bis-Tris Gradientengele (vgl. 2.2.2.6.1) aufgetrennt. Um ein optimales Fluoreszenzsignal zu erhalten, wurden von jeder Probe unterschiedlicher Proteinmengen (4, 8, 14 und 22 µg derselben Probe) auf das Gel aufgetragen. Proteinsignale wurden im Gel fluorometrisch bei 532 nm (TAMRA-Alkin Fluoreszenzsignal) bzw. 610 nm (SYPRO-Ruby Gesamtproteinsignal) detektiert (vgl. 2.2.2.8.2).

In der Abbildung 10 ist links das TAMRA- und rechts das SYPRO-Ruby Fluoreszenzsignal eines repräsentativen Gels abgebildet. Die Abbildung zeigt, dass eine Erhöhung der aufgetragenen Proteinmenge (4, 8, 14, 22 µg derselben Probe) mit einer Erhöhung des TAMRA-Alkin-Signals und SYPRO-Ruby-Signals einhergeht. Um den Anteil der neu synthetisierten Proteine zu ermitteln, wurde das TAMRA-Alkin Signal auf das entsprechende SYPRO-Ruby Gesamtproteinsignal normalisiert. Die in der Abbildung 11 gezeigten Daten sind relativ zur (14 µg) AHA Probe dargestellt, da dieses ein optimales, nicht gesättigtes Fluoreszenzsignal lieferte. Die weitere Analyse lässt einen starken Unterschied zwischen den AHA-(Bahn: 1-4) und den mit AHA und CHX-behandelten Proben erkennen. (Bahn: 5-8) (vgl. Abbildung 10 und 11). Entsprechend den Versuchen auf corticalen Neuronenkulturen (vgl. Abbildung 9) konnte auch in den hippocampalen Hirnschnitten eine Reduktion des TAMRA-Alkin Signals durch Zugabe des Translationsinhibitors CHX beobachtet werden (vgl. Abbildung 11: AHA: 100%; AHA+CHX: 36%). Daraus kann geschlossen werden, dass die Proteinsynthese für die Generierung des AHA-Signals notwendig ist. Vergleicht man die Signalintensität der CHX- (Bahn: 5-8) bzw. DMSO-behandelten Proben (Bahn: 9-12), so kann in letzteren eine etwas stärkere Signalintensität gemessen werden (Abbildung 11: CHX+AHA: 36%; DMSO: 38%). Nach der Normalisierung auf das SYPRO-Ruby-Gesamtproteinsignal ergibt sich somit eine relative Signalstärke von 2%, für die 14 µg Bahn der DMSO-Banden.

Da die Proteine der DMSO-behandelten Kontrollproben nicht mit AHA gelabelt wurden, sollte hier theoretischerweise kein TAMRA-Alkin Fluoreszenzsignal auftreten. Eine mögliche Erklärung für dieses Hintergrundsignal ist die Annahme von Nebenreaktionen der Click-it-Komponenten mit endogenen Proteinen (z.B.: Aminosäureseitenketten oder posttranslationale Modifikationen). Da das Proteinsignal der CHX-Proben somit geringer ist, als das Hintergrundsignal, kann in den akuten hippocampalen Hirnschnitten eine vollständige Inhibition der Proteinsynthese durch CHX angenommen werden.

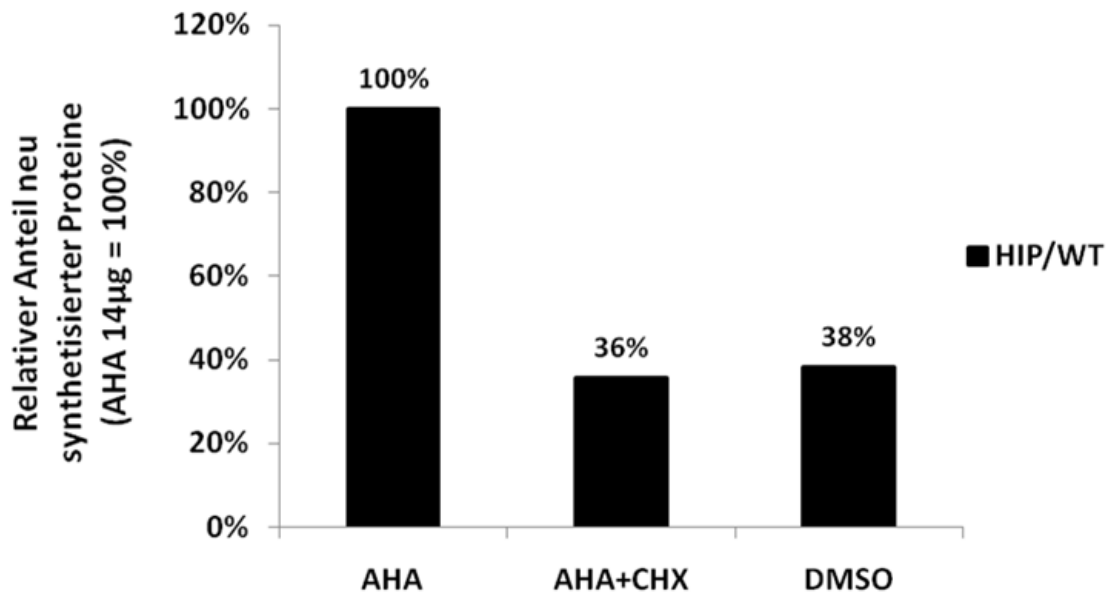
Meine Ergebnisse lassen somit auf eine erfolgreiche Inkorporation von AHA in Proteine nach der 2 stündigen Methionin-Depletion und 2 stündigen AHA-Labeling schließen. Wie schon in

dem System der primären Neuronenkulturen gezeigt, konnte ich durch die Verwendung von CHX darlegen, dass das AHA-vermittelte Proteinsignal translationsabhängig generiert wird. Ich konnte somit die Click-iT Methode zum Nachweis neu synthetisierter Proteine auch in dem System der akuten hippocampalen Hirnschnitten erfolgreich etablieren.



**Abbildung 10: Untersuchung und Nachweis der Proteinneusynthese in akuten hippocampalen Hirnschnitten der adulten Arc/Arg3.1-Wildtyp-Maus.** Die Etablierung der Click-iT-Methode und Nachweis der neu synthetisierten Proteine erfolgte wie unter 3.1.2.1 beschrieben. **A:** Dargestellt ist das TAMRA-Alkin-Fluoreszenzsignal, das die Menge neu synthetisierter Proteine zeigt. Diese wurden im NuPAGE®4 -12% Bis-Tris Gradientengels bei einer Wellenlänge von 532 nm gemessen. Um die optimal bzw. maximal mögliche Fluoreszenzintensität bei den Hirnschnitten zu ermitteln, wurden Proben in vierfacher Auftragung mit zunehmender Proteinmenge von 4, 8 und 13 µg derselben Probe aufgetragen. Bahn 1-4 zeigen die AHA-behandelten Proben nach der 2 h *Recovery* und 2 h AHA-Behandlung. Bahn 5-8 zeigen die entsprechenden Kontrollproben mit AHA und CHX. Bahn 9-12 zeigen die Fluoreszenzsignale der DMSO-Kontrollproben. **B:** Dargestellt ist der Gesamtproteinlevel mithilfe der SYPRO-Ruby Fluoreszenzfärbung. Signalmessungen erfolgten bei einer Wellenlänge von 610 nm. Die Abbildung ist repräsentativ für ein Experiment (n=1).

AHA: Azidohomoalanin; CHX: Cycloheximid; Met: Methionin; (+): mit; (-): ohne.



**Abbildung 11:** Cycloheximid-Behandlung reduziert den relativen Anteil AHA-gelabelter Proteine (Proteinneusynthese) in akuten hippocampalen Hirnschnitten der adulten Arc/Arg3.1-Wildtyp-Maus. Die akuten hippocampalen Hirnschnitten der adulten Arc/Arg3.1-Wildtyp-Maus wurden einer 2stündigen *Recovery* (Met-Depletion) unterzogen und anschließend 2 h mit AHA gelabelt. Mittels Click-iT-Methode wurde die Proteinneusynthese untersucht. Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität erfolgte mittels ImageJ und korreliert direkt mit dem Anteil neu synthetisierter Proteine. Signale wurden auf das AHA (14 µg)-Signal normalisiert und alle andere Werte relativ dazu dargestellt.

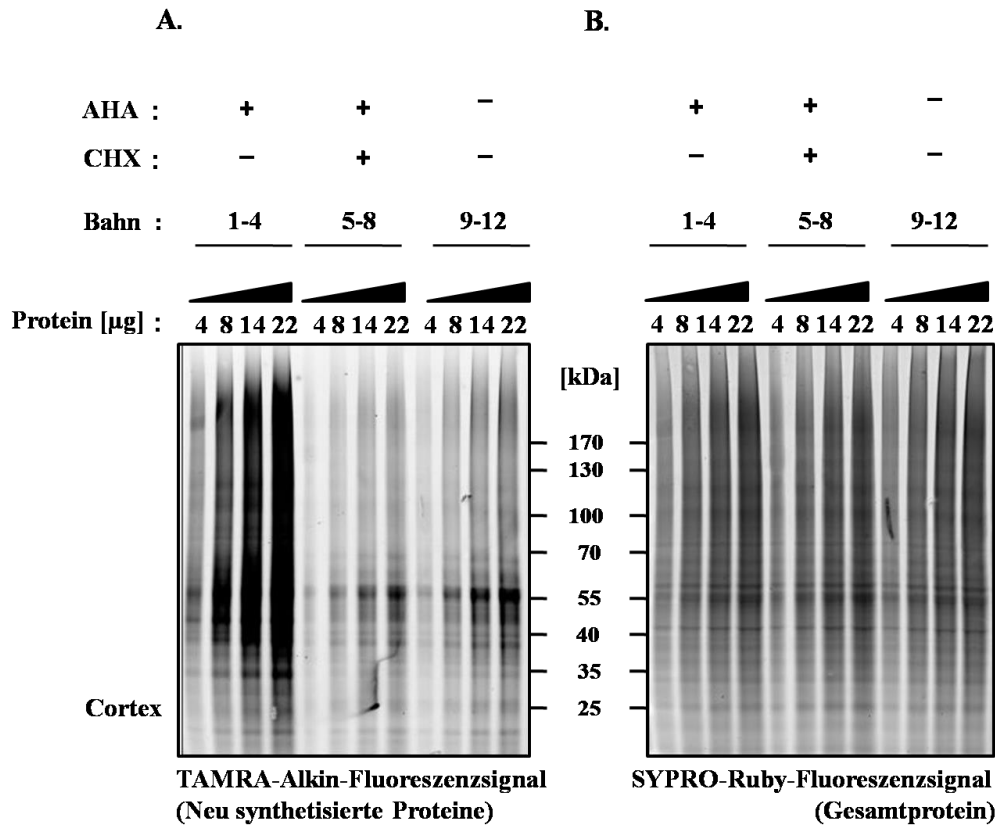
AHA: Azidohomoalanin; CHX: Cycloheximid; DMSO: Dimethylsulfoxid; HIP: Hippocampus; WT: Wildtyp; (+): mit.

### 3.1.2.2 Neu synthetisierte Proteine können mittels Click-Chemie im Cortex akuter hippocampaler Hirnschnitte nachgewiesen werden

Die Untersuchung der Proteinneusynthese im Cortex erfolgte wie bereits im Abschnitt 3.2.1.1 für die hippocampalen Hirnschnitte der Wildtyp-Mäuse beschrieben.

Der Abbildung 12 ist links das TAMRA- und im rechten Teil das SYPRO-Ruby-Fluoreszenzsignal zu entnehmen. Die Abbildung zeigt, dass eine Erhöhung der aufgetragenen Proteinmenge (4, 8, 14, 22 µg derselben Probe) mit einer Erhöhung des TAMRA-Alkin-Signals und SYPRO-Ruby-Signals einhergeht. Der Vergleich der AHA- (Bahn 1-4) und CHX-behandelten Proben (Bahn 9-12) legt dar, dass die AHA-behandelten Proben deutlich stärkere Signalintensitäten im TAMRA-Signal aber nicht SYPRO-Ruby-Signal aufweisen.





**Abbildung 12: Untersuchung und Nachweis der Proteinneusynthese in akuten corticalen Hirnschnitten der adulten Arc/Arg3.1-Wildtyp-Maus.** Die Etablierung der Click-iT-Methode und Nachweis der neu synthetisierten Proteine erfolgte wie unter 3.2.1 beschrieben. **A:** Dargestellt ist das TAMRA-Akin-Fluoreszenzsignal, das die Menge neu synthetisierter Proteine zeigt. Diese wurden im NuPAGE<sup>®</sup>4 -12% Bis-Tris Gradientengels bei einer Wellenlänge von 532 nm gemessen. Um die optimal bzw. maximal mögliche Fluoreszenzintensität bei den Hirnschnitten zu ermitteln, wurden Proben in vierfacher Auftragung mit zunehmender Proteinmenge von 4, 8 und 13  $\mu$ g derselben Probe aufgetragen. Bahn 1-4 zeigen die AHA-behandelten Proben bei den (2 h *Recovery* und 2 h AHA-Behandlung). Bahn 5-8 zeigen die entsprechenden Kontrollproben mit AHA und CHX. Bahn 9-12 zeigen die Fluoreszenzsignale der DMSO-Kontrollproben. **B:** Dargestellt ist Gesamtproteinlevel mithilfe der SYPRO-Ruby Fluoreszenzfärbung. Signalmessungen erfolgten bei einer Wellenlänge von 610 nm. Die Abbildung ist repräsentativ für ein Experiment (n=1).

AHA: Azidohomoalanin; CHX: Cycloheximid; Met: Methionin; (+): mit; (-): ohne.

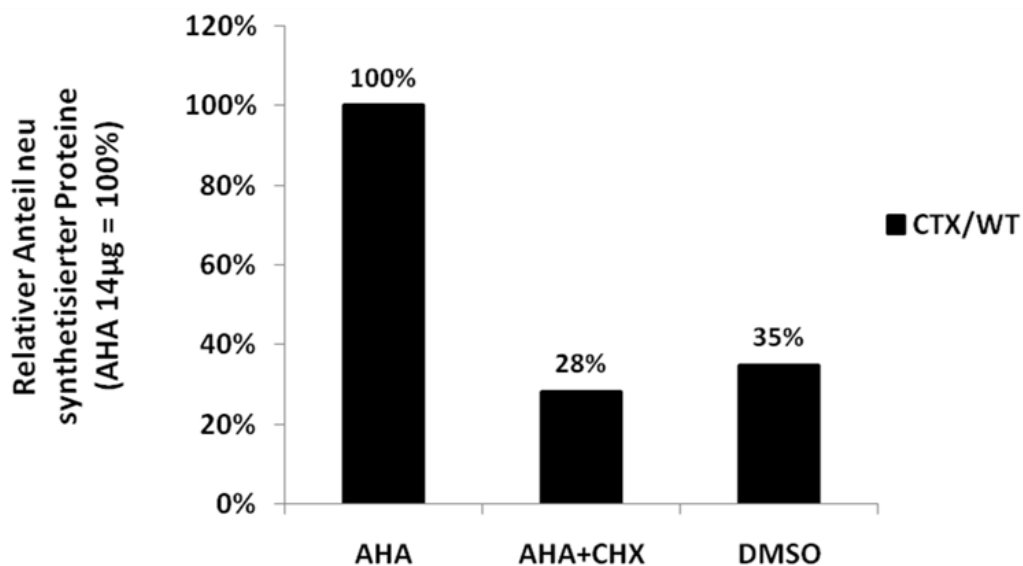
TAMRA-Signalintensitäten wurden mithilfe des Programms ImageJ quantifiziert und auf die SYPRO-Ruby-Signale normalisiert. Die Ergebnisse der Quantifizierung sind in Abbildung 13 dargestellt.

Der Abbildung ist zu entnehmen, dass die Zugabe des Translationsinhibitors CHX den relativen Anteil AHA-markierter Proteine auf 28% reduziert (AHA 14 $\mu$ g: 100%; AHA+CHX: 14 $\mu$ g: 28%). Damit ergibt sich ein Anteil neu synthetisierter Proteine von 72%.

Vergleicht man die Signalintensität der CHX- (Bahn: 5-8) bzw. DMSO-behandelten Proben (Bahn: 9-12), so kann auch im Cortex in letzteren eine etwas stärkere Signalintensität

gemessen werden. Da das TAMRA-Alkin-Fluoreszenzsignal der CHX-Proben somit geringer ist, als das Hintergrundsignal in den DMSO-behandelten Proben, kann auch im Cortex eine vollständige Inhibition der Proteinsynthese durch CHX angenommen werden. Das Hintergrundsignal bei der DMSO-Probe (Bahn: 9-12) wird vermutlich durch verbleibenden Click-iT Komponenten nach der Methanol-Chloroform-Fällung hervorgerufen.

Wie bereits im Hippocampus gezeigt, konnte ich die Click-iT-Methode erfolgreich zur metabolischen Markierung von Proteinen einsetzen. Versuche mit dem Translationsinhibitor CHX lassen annehmen, dass das AHA-Labeling von Proteinen durch die Proteinsynthese reguliert wird. Ich konnte somit die Click-iT-Methode zum Nachweis neu synthetisierter Proteine in akuten hippocampalen Hirnschnitten etablieren.



**Abbildung 13: Cycloheximid-Behandlung reduziert den relativen Anteil AHA-gelabelter Proteine (Proteinneusynthese) in akuten corticalen Hirnschnitten der adulten Arc/Arg3.1-Wildtyp-Maus.** Die akuten hippocampalen Hirnschnitten der adulten Arc/Arg3.1-Wildtyp-Maus wurden einer 2stündigen *Recovery* (Met-Depletion) unterzogen und anschließend 2 h mit AHA gelabelt. Mittels Click-iT-Methode wurde die Proteinneusynthese untersucht. Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität erfolgte mittels ImageJ. Das TAMRA-Alkin-Fluoreszenzsignal wurde ins Verhältnis zum Gesamtproteinsignal (SYPRO-Ruby-Signal) gesetzt. Dieses korreliert mit dem Anteil neu synthetisierter Proteine. Signale wurden auf das AHA (14 µg)-Signal normalisiert und alle andere Werte relativ dazu dargestellt. AHA: Azidohomoalanin; CHX: Cycloheximid; CTX: Cortex; DMSO: Dimethylsulfoxid; WT: Wildtyp; (+): mit

### **3.2 Untersuchung des Anteils neu synthetisierter Proteine in akuten hippocampalen Hirnschnitten von Wildtyp- und Arc/Arg3.1-Knockout-Mäusen**

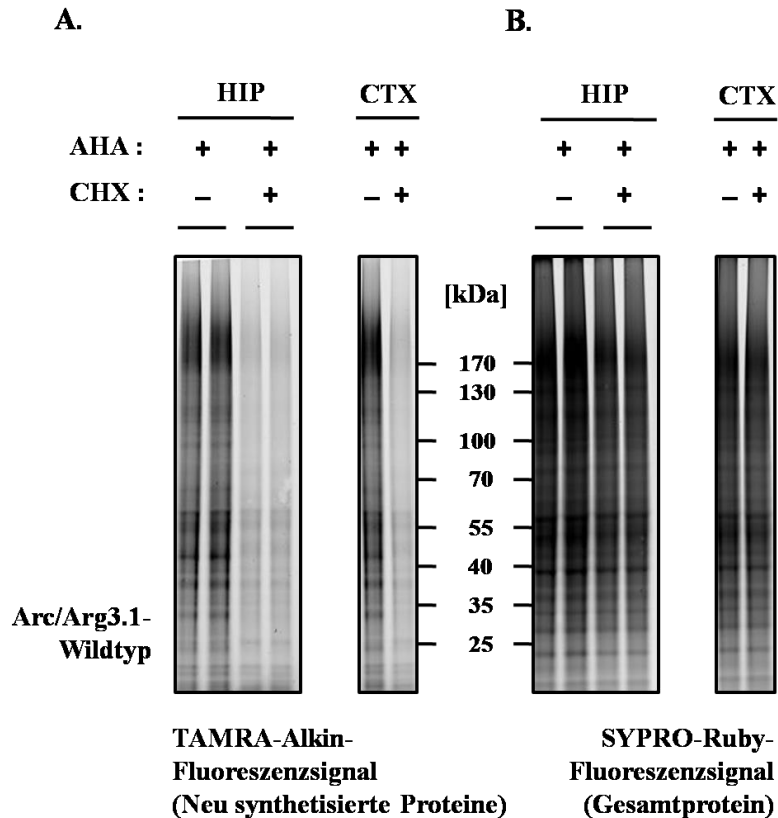
Die Notwendigkeit einer Neusynthese von Proteinen für die langfristige Speicherung von Gedächtnisinhalten konnte bereits in mehreren, unabhängigen Studien bestätigt werden. So ließ sich zeigen, dass die Synthese von Proteinen für eine langanhaltende Stabilisierung verschiedene Formen der synaptischen Plastizität notwendig ist. Eine besondere Funktion haben in diesen Zusammenhang Gene, deren Expression aktivitätsabhängig reguliert werden. Ein wichtiges aktivitätsreguliertes Gen für synaptische Plastizität ist das aktivitätsregulierte, cytoskelett-assoziierte Gen Arc/Arg3.1. Es wird angenommen, da die Expression des Arc/Arg3.1-Proteins während verschiedener Formen der synaptischen Plastizität lokal aktiviert werden kann (Park *et al.*, 2008). Weiterführende Untersuchungen konnten zeigen, dass ein Knockout bzw. Knockdown des Arc/Arg3.1-Gens mit Beeinträchtigungen bei der Gedächtniskonsolidierung bzw. der Stabilisierung von verschiedenen Formen der synaptischen Plastizität assoziiert ist (Plath *et al.*, 2006; Messaoudi *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2008; Waung *et al.*, 2008). Welche molekulare Funktion Arc/Arg3.1 für Mechanismen der synaptischen Plastizität spielt, ist bislang weitgehend ungeklärt. Es wird angenommen, dass Arc/Arg3.1 die Expression von AMPA-Rezeptoren an der neuronalen Zelloberfläche reguliert (Shepherd *et al.*, 2006; Waung *et al.*, 2008). Da Arc/Arg3.1-Knockout-Mäuse Beeinträchtigungen in der Konsolidierung von verschiedensten Formen der synaptischen Plastizität (LTP und LTD) zeigen, sollte in dieser Arbeit geklärt werden, inwieweit ein Knockout des Arc/Arg3.1-Gens und damit des Arc/Arg3.1-Proteins zu Veränderungen der Proteinsynthese in Neuronen führt. Hierzu wurde mithilfe der Click-iT-Methode die Neusynthese von Proteinen in akuten hippocampalen Hirnschnitten von Arc/Arg3.1-Wildtyp und Arc/Arg3.1-Knockout-Mäusen analysiert.

### **3.2.1 Der Anteil neu synthetisierter Proteine ist im Hippocampus und Cortex akuter hippocampaler Hirnschnitte von Arc/Arg3.1-Wildtyp-Mäusen nicht unterschiedlich**

Nach der vorangegangenen Etablierung der Click-iT-Methode wurde diese zur Untersuchung der Proteinexpression in akuten hippocampalen Hirnschnitten von Arc/Arg3.1-Wildtyp-Mäusen genutzt (vgl. Abschnitt 3.1.2.1 und 3.1.2.2).

In der Abbildung 14 ist ein repräsentatives Gel aus drei unabhängigen Experimenten abgebildet. Zu erkennen ist, dass AHA-behandelte Proben sowohl im Hippocampus als auch im Cortex ein starkes TAMRA-Fluoreszenzsignal zeigen (vgl. Abbildung 14 links). Weiter ist ersichtlich, dass die Behandlung mit dem Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid (CHX) das Proteinsignal sowohl im Hippocampus, als auch im Cortex deutlich reduziert. Gesamtproteinlevel wurde durch SYPRO-Ruby-Färbungen untersucht. Hier ließen sich keine signifikanten Unterschiede im Expressionslevel zwischen Hippocampus und Cortex bzw. „mit“ und „ohne“-CHX-Behandlung erkennen.

Die Quantifizierung erhaltener TAMRA- und SYBRO-Ruby-Fluoreszenzsignale erfolgte mithilfe des Programms ImageJ. TAMRA-Signale wurden auf SYBRO-Ruby-Signale normalisiert und sind relativ zur hippocampalen AHA-Probe in Abbildung 14 dargestellt.



**Abbildung 14: Untersuchung der Proteinneusynthese im Hippocampus und Cortex akuter hippocampaler Hirnschnitte der adulten Arc/Arg3.1-Wildtyp-Maus.** A: Dargestellt sind TAMRA-Alkin- Fluoreszenzsignale, die die Menge neu synthetisierter Proteine darstellen. Diese wurde im NuPAGE<sup>®</sup>4 -12% Bis-Tris Gradientengel bei einer Wellenlänge von 532 nm gemessen. Für die HIP- Proben wurde eine doppelte Auftragung durchgeführt (22 µg Protein pro Bahn) und Cortex jeweils einfach. Bahn: 1 und 2 HIP\_AHA-behandelten Proben; Bahn: 3 und 4 HIP\_AHA mit CHX. Bahn 5 CTX\_AHA-behandelte Probe; Bahn: 6 CTX\_AHA mit CHX-behandelten Proben. **B:** Dargestellt ist das SYPRO-Ruby Fluoreszenzsignal, das für den Gesamtproteinanteil steht und bei einer Wellenlänge von 610 nm ermittelt wurde. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente (n=3).

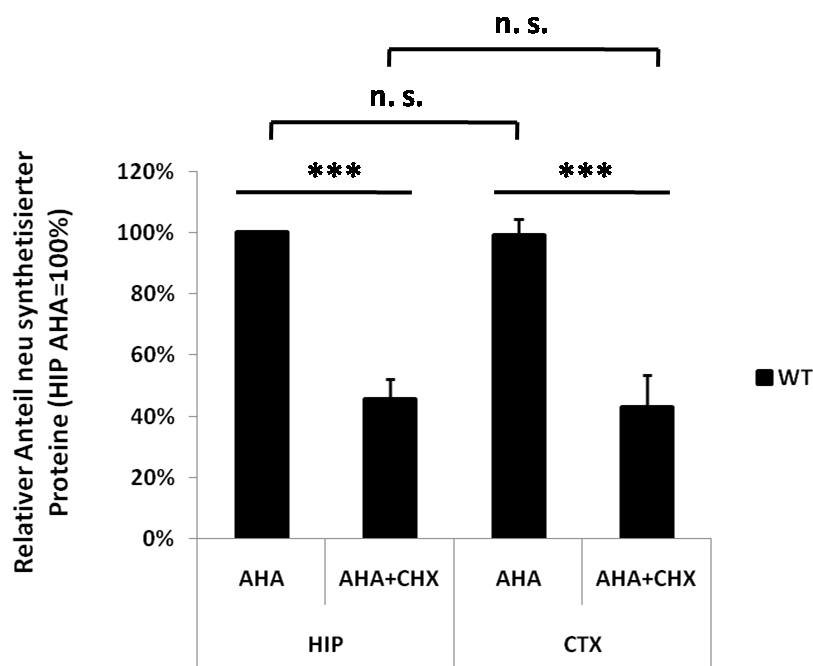
AHA: Azidohomoalanin; CHX: Cycloheximid; CTX: Cortex; HIP: Hippocampus; Met: Methionin. (+): mit; (-): ohne.

Die Statistische Analysen des Signals zeigen, dass die Applikation von CHX eine signifikante Reduktion des Anteils neu synthetisierter Proteine im Hippocampus (AHA: 100% ± 0,00%; AHA + CHX: 48,81% ± 8,052%; p ≤ 0,001) und Cortex (AHA: 99% ± 7,53%; AHA + CHX: 47,90% ± 13,01%; p ≤ 0,001) vermittelt. Dies besagt, dass mit 99,99%iger Sicherheit eine Neusynthese von Proteinen in dem hier untersuchten Zeitraum stattfindet und der Unterschied nicht auf Zufall beruht.

Die weitere Analyse lässt auf ähnliche Expressionslevel neu synthetisierter Proteine im Hippocampus und Cortex schließen. So konnten keine signifikanten Unterschiede im normalisierten TAMRA-Alkin-Fluoreszenzsignal AHA bzw. AHA-CHX-behandelter Hippocampus- und Cortex-Proben nachgewiesen werden (HIP\_AHA: 100% ± 0,00%;

CTX\_AHA:  $99\% \pm 7,53\%$ ;  $p=0,916$  (HIP\_AHA + CHX:  $48,81\% \pm 8,052\%$ ;  
 CTX\_AHA + CHX:  $47,90\% \pm 13,01\%$ ;  $p=0,794$ ).

Die lässt ähnliche molekulare Mechanismen zur Regulation der Proteinsynthese im Hippocampus und Cortex annehmen.



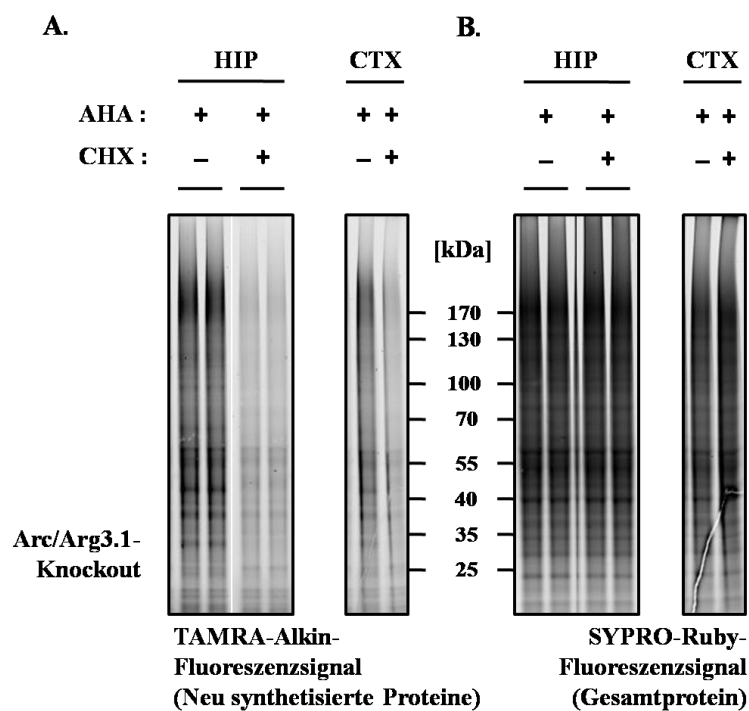
**Abbildung 15: Der relative Anteil neu synthetisierter Proteine im Hippocampus und Cortex akuter hippocampaler Hirnschnitte der adulten Arc/Arg3.1-Wildtyp-Mäuse ist nicht signifikant unterschiedlich.** Das Balkendiagramm zeigt die Quantifizierung neu synthetisierter Proteine. Dargestellt sind die mittleren Werte der Fluoreszenzintensität aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardfehler aller behandelten Proben AHA und AHA mit CHX im Cortex und Hippocampus adulter Arg3.1- Wildtyp-Mäuse. Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität erfolgte mittels ImageJ. Das TAMRA-Alkin-Fluoreszenzsignal wurde ins Verhältnis zum Gesamtproteinsignal (SYPRO-Ruby-Signal) gesetzt. Dieses korreliert mit dem Anteil neu synthetisierter Proteine. Signale wurden auf das HIP\_AHA (14 µg)-Signal normalisiert und alle anderen Werte relativ dazu dargestellt.

AHA: Azidohomoalanin; CHX: Cycloheximid; CTX: Cortex; HIP: Hippocampus; WT: Arc/Arg3.1-Wildtyp; n.s.: statistisch nicht signifikant.

### 3.2.2 Der Anteil neu synthetisierter Proteine ist im Hippocampus und Cortex akuter hippocampaler Hirnschnitte von Arc/Arg3.1-Knockout-Mäusen nicht unterschiedlich

In weiteren Versuchen wurde die Proteinexpression mithilfe der Click-iT-Methode in akuten hippocampalen Hirnschnitten von Arc/Arg3.1-Knockout-Mäusen untersucht (Punkten 3.1.2.1 und 3.1.2.2).

Abbildung 16 zeigt ein repräsentatives Gel aus drei unabhängigen Experimenten. Im linken Teil der Abbildung ist das TAMRA, im rechten Teil das SYPRO-Ruby-Fluoreszenzsignal zu sehen. Es ist zu erkennen, dass die AHA-behandelten Proben sowohl im Hippocampus, als auch Cortex ein starkes Fluoreszenzsignal aufweisen. Die Zugabe des Proteinsynthese-Inhibitors Cycloheximid (CHX) bewirkt eine signifikante Reduktion des TAMRA- aber nicht SYBRO-Ruby-Fluoreszenzsignals.



**Abbildung 16: Untersuchung der Proteinneusynthese im Hippocampus und Cortex akuter hippocampaler Hirnschnitte der adulten Arc/Arg3.1-Knockout-Mäuse.** A: Dargestellt sind TAMRA-Alkin- Fluoreszenzsignale, die die Menge neu synthetisierter Proteine darstellen. Diese wurde im NuPAGE® 4 -12% Bis-Tris Gradientengel bei einer Wellenlänge von 532 nm gemessen. Für die HIP- Proben wurde eine doppelte Auftragung durchgeführt (22 µg Protein pro Bahn) und Cortex jeweils einfach. Bahn: 1 und 2 HIP\_AHA-behandelten Proben; Bahn: 3 und 4 HIP\_AHA mit CHX. Bahn 5 CTX\_AHA-behandelte Probe; Bahn: 6 CTX\_AHA mit CHX-behandelten Proben. B: Dargestellt ist das SYPRO-Ruby Fluoreszenzsignal, das für den Gesamtproteinanteil steht und bei einer Wellenlänge von 610 nm ermittelt wurde. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente (n=3).

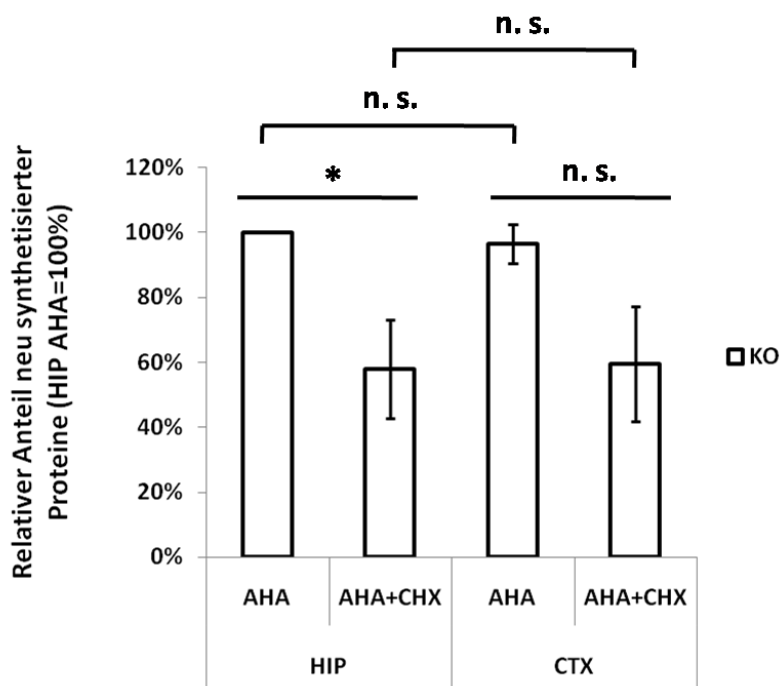
AHA: Azidohomoalanin; CHX: Cycloheximid; CTX: Cortex; HIP: Hippocampus; Met: Methionin. (+): mit; (-): ohne

Die Quantifizierung der Fluoreszenzsignale erfolgte mithilfe des Programms ImageJ, dabei wurden TAMRA-Signale auf das SYBRO-Ruby-Gesamtproteinsignal normalisiert. Die erhaltenen Werte wurden in Abbildung 17 grafisch dargestellt. Der Grafik ist zu entnehmen, dass CHX sowohl im Hippocampus (HIP\_AHA: 100%  $\pm$  0,00%; HIP\_AHA + CHX: 58,02%  $\pm$  6,07%;  $p=0,039$ ) als auch im Cortex (CTX\_AHA: 96,55%  $\pm$  6,07%; CTX\_AHA + CHX: 59,51%  $\pm$  17,68%;  $p=0,061$ ) eine starke Reduktion des TAMRA-Fluoreszenzsignals induziert.

Im Gegensatz zum Hippocampus zeigten weitere Analysen jedoch keinen statistisch signifikanten Unterschied im Cortex. Eine mögliche Ursache hierfür ist der geringe Stichprobenumfang. In zukünftigen Untersuchungen sollte der Stichprobenumfang deshalb auf 5-6 Experimente erhöht werden. Die weitere Analyse lässt auf ähnliche Expressionslevel neu synthetisierter Proteine im Hippocampus und Cortex von Arc/Arg3.1-Knockout-Mäusen schließen. So konnten sowohl im Hippocampus als auch im Cortex keine signifikanten Unterschiede im normalisierten TAMRA-Fluoreszenzsignal zwischen den mit AHA bzw. AHA-CHX-behandelten Proben beobachtet werden (HIP\_AHA: 100%  $\pm$  0,00%; CTX\_AHA: 96,55%  $\pm$  6,07%;  $p=0,844$ ) (HIP\_AHA + CHX: 58,02%  $\pm$  6,07%; CTX\_AHA + CHX: 59,51%  $\pm$  17,68%;  $p=0,933$ ).

Ergebnisse lassen somit auf ähnliche molekulare Mechanismen für die Regulation der Proteinsynthese in Hippocampus und Cortex schließen.





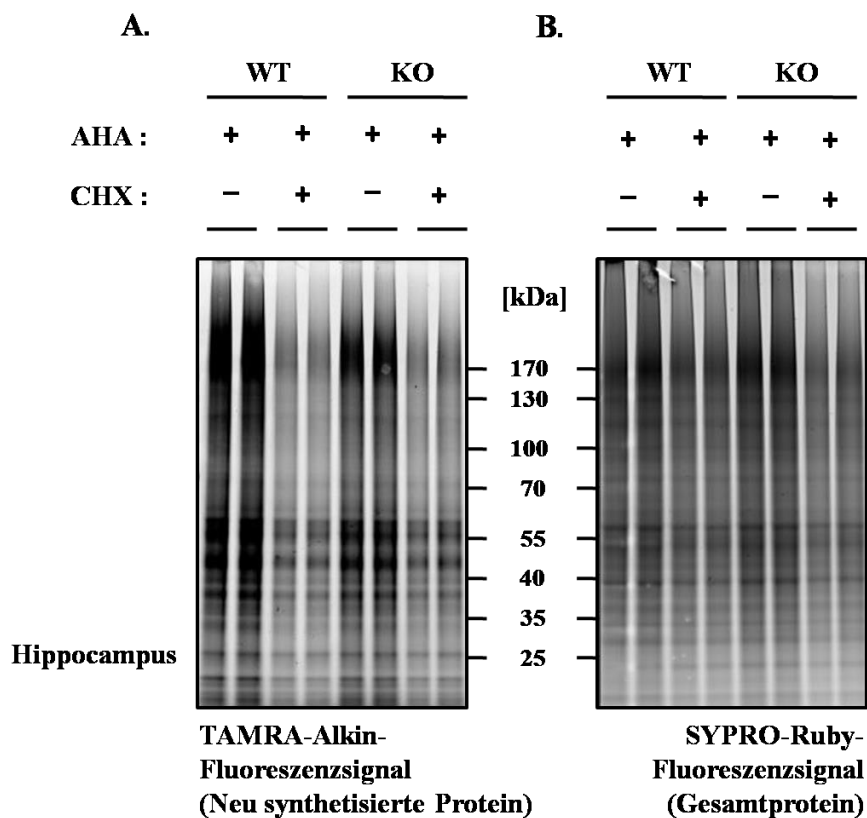
**Abbildung 17: Der relative Anteil neu synthetisierter Proteine im Hippocampus und Cortex akuter hippocampaler Hirnschnitte der adulten Arc/Arg3.1-Knockout-Mäuse ist nicht unterschiedlich.** Das Balkendiagramm zeigt die Quantifizierung neu synthetisierter Proteine. Dargestellt sind die mittleren Werte der Fluoreszenzintensität aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardfehler aller behandelten Proben AHA und AHA mit CHX im Cortex und Hippocampus adulter Arg3.1- Wildtyp-Mäusen. Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität erfolgte mittels ImageJ. Das TAMRA-Alkin-Fluoreszenzsignal wurde ins Verhältnis zum Gesamtproteinsignal (SYPRO-Ruby-Signal) gesetzt. Dieser korreliert mit dem Anteil neu synthetisierter Proteine. Signale wurden auf das HIP\_AHA (14 µg)-Signal normalisiert und alle anderen Werte relativ dazu dargestellt. AHA: Azidohomoalanin; CHX: Cycloheximid; CTX: Cortex; HIP: Hippocampus; KO: Arc/Arg3.1-Knockout; n.s.: statistisch nicht signifikant.

### 3.2.3 Arc/Arg3.1-Wildtyp-und Knockout-Mäuse zeigen keine signifikanten Unterschiede in der hippocampalen Proteinexpression

Vorangegangene Experimente (vgl.: 3.2.1 und 3.2.2) konnten zeigen, dass die Synthese neuer Proteine im Hippocampus von Arc/Arg3.1-Wildtyp, als auch Arc/Arg3.1-Knockout-Mäusen durch die Applikation des Translationsinhibitors Cycloheximid blockiert werden konnte. Um Arc/Arg3.1-abhängige Unterschiede im Proteinexpressionsniveau zu analysieren, wurde die Proteinexpression in einem parallelem Ansatz im Hippocampus von Arc/Arg3.1-Wildtyp- und

Knockout-Mäusen bestimmt. Als Methode wurde die von mir etablierte Kupferkatalysierte Click-iT-Methode verwendet.

Die Abbildung 18 zeigt links das TAMRA- und rechts das SYBRO-Ruby-Fluoreszenzsignal eines repräsentativen Gels aus 3 unabhängigen Versuchen. In der Abbildung ist zu sehen, dass die AHA-behandelte Probe sowohl im Arc/Arg3.1-Wildtyp (Bahn: 1 und 2), als auch im Arc/Arg3.1-Knockout (Bahn: 5 und 6) ein starkes Fluoreszenzsignal aufweisen. Die Behandlung mit Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid (CHX) reduziert in beiden Genotypen das TAMRA-Signal. Für die Quantifizierung der Fluoreszenzsignale wurde das TAMRA-Alkin-Signal auf das SYPRO-Ruby-Gesamtproteinlevel normalisiert.



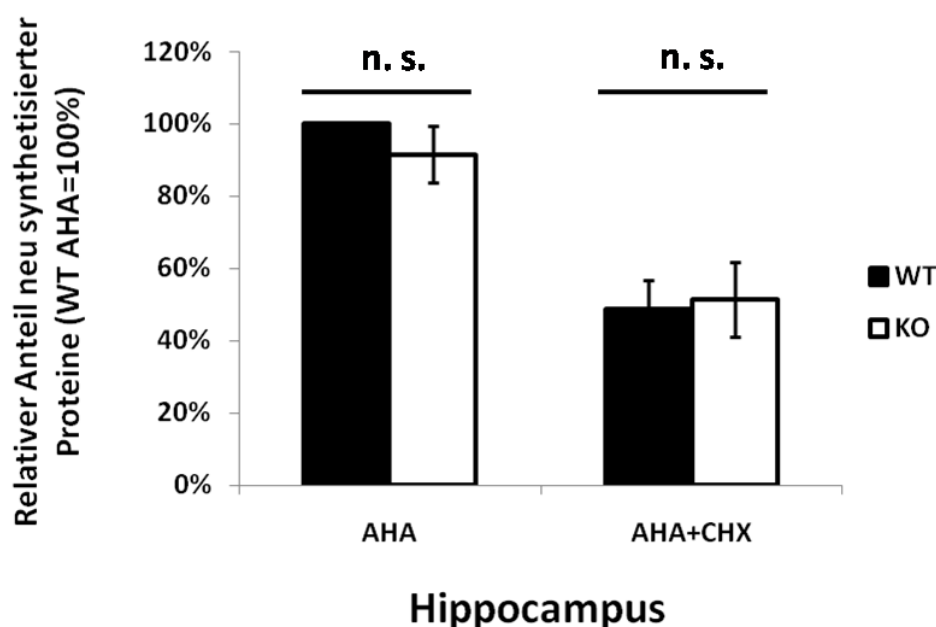
**Abbildung 18: Vergleich der Proteinneusynthese-Unterschiede im Hippocampus akuter hippocampaler Hirnschnitte zwischen den adulten Arc/Arg3.1-Wildtyp und Knockout-Mäusen.** A: Dargestellt ist TAMRA-Alkin-Fluoreszenzsignal, repräsentativ für die Menge neu synthetisierter Proteine. Diese wurde am NuPAGE®4 -12% Bis-Tris Gradientengels bei der Wellenlänge 532 nm gemessen. Es wurden 22 µg Protein, doppelte Auftragung durchgeführt. Bahn: 1 und 2 HIP\_WT\_AHA-behandelten Proben; Bahn: 3 und 4 HIP\_WT\_AHA mit CHX-behandelten Proben; Bahn: 5 und 6 HIP\_KO\_AHA behandelten Proben; Bahn: 7 und 8 HIP\_KO\_AHA mit CHX- behandelten Proben dar. B: Dargestellt ist SYPRO-Ruby Fluoreszenzsignal, das für den Gesamtproteinanteil steht und bei der Wellenlänge von 610 nm ermittelt wurde. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente (n=3).

AHA: Azidohomoalanin; CHX: Cycloheximid; CTX: Cortex; HIP: Hippocampus; KO: Arc/Arg3.1-Knockout; Met: Methionin; WT: Arc/Arg3.1-Wildtyp; (+): mit; (-): ohne.

Die Abbildung 19 zeigt die Quantifizierung der Ergebnisse. Aus dem Balkendiagramm ist ersichtlich, dass TAMRA-Fluoreszenzsignale nach AHA- bzw. AHA +CHX-Behandlung im Arc/Arg3.1 Knockout nicht signifikant unterschiedlich zum Arc/Arg3.1-Wildtyp sind (HIP\_WT\_AHA: 100%  $\pm$  0,00%; HIP\_KO\_AHA: 91%  $\pm$  7,89%,  $p=0,453$ ).

Die CHX-vermittelte Reduktion des TAMRA-Signals ist somit in Wildtyp und Arc/Arg3.1-Knockout-Mäusen ähnlich stark.

Daher lässt sich schlussfolgern, dass Arc/Arg3.1-Knockout-Mäuse im Hippocampus keine Beeinträchtigungen in der Neusynthese von Proteinen (Translation) zeigen. Dies lässt darüber hinaus eine ähnliche Regulation der Translation im Hippocampus bei den Genotypen annehmen.



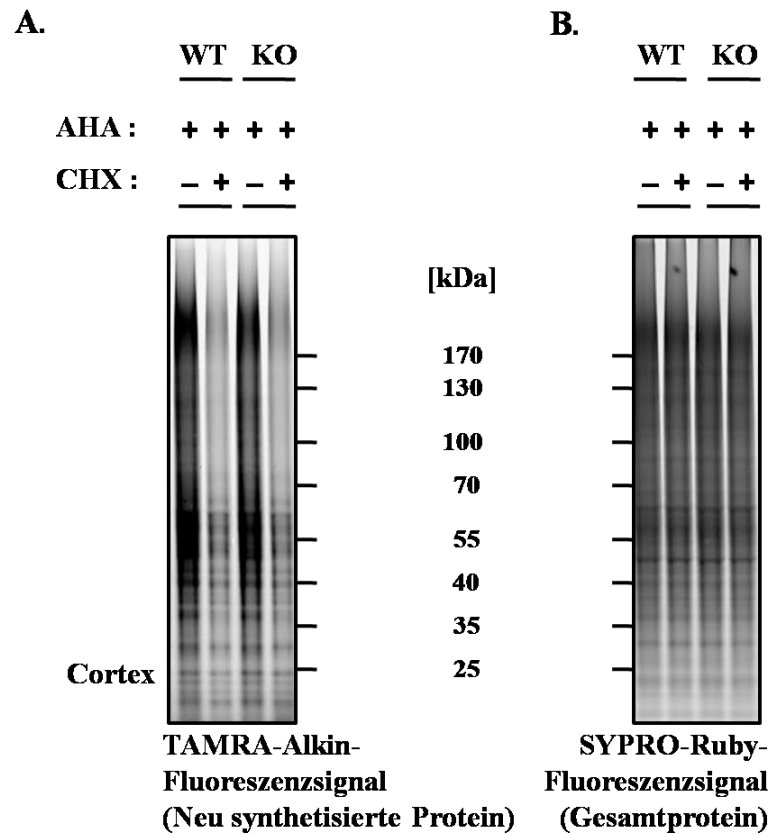
**Abbildung 19: Die Proteinneusynthese im Hippocampus akuter hippocampaler Hirnschnitte unterscheidet sich nicht zwischen adulten Arc/Arg3.1-Wildtyp- und Knockout-Mäusen.** Das Balkendiagramm zeigt die Quantifizierung neu synthetisierter Proteine. Dargestellt sind die mittleren Werte der Fluoreszenzintensität aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardfehler aller behandelten Proben AHA und AHA mit CHX im Hippocampus adulter Arg3.1-Wildtyp- und Knockout-Mäusen. Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität erfolgte mittels ImageJ. Das TAMRA-Alkin-Fluoreszenzsignal wurde ins Verhältnis zur Gesamtproteinsignal (SYPRO-Ruby-Signal) gesetzt. Dieser korreliert mit dem Anteil neu synthetisierter Proteine. Signale wurden auf das HIP\_WT\_AHA (14  $\mu$ g)-Signal normalisiert und alle anderen Werte relativ dazu dargestellt.

AHA: Azidohomoalanin; CHX: Cycloheximid; HIP: Hippocampus; KO: Arc/Arg3.1-Knockout; WT: Arc/Arg3.1-Wildtyp; n.s.: statistisch nicht signifikant.

### 3.2.4 Arc/Arg3.1-Wildtyp und Knockout-Mäuse zeigen keine signifikanten Unterschiede in der corticalen Proteinexpression

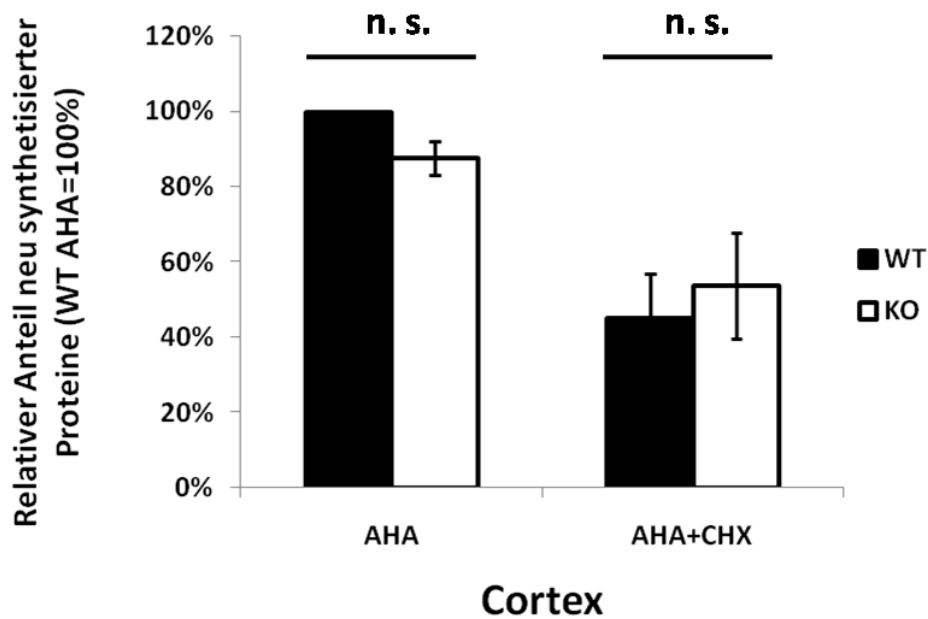
Entsprechend Punkt 3.2.3 wurde zusätzlich zum Hippocampus die Proteinexpression im Cortex akuter hippocampaler Hirnschnitte von Arc/Arg3.1-Wildtyp- und Knockout-Mäusen analysiert. Dabei lag der Fokus der Experimente auf der Identifizierung Arc/Arg3.1-abhängiger Unterschiede in der Proteinexpression. Die Abbildung 20 zeigt links das TAMRA- und rechts das SYBRO-Ruby-Fluoreszenzsignal eines repräsentativen Gels aus 3 unabhängigen Versuchen. Dabei ist zu erkennen, dass AHA-behandelte Cortex-Proben sowohl im Arc/Arg3.1-Wildtyp (Bahn: 1), als auch im Arc/Arg3.1-Knockout (Bahn: 3) ein starkes Fluoreszenzsignal aufweisen. Wie auch in vorangegangenen Experimenten ließ sich zeigen, dass die Applikation des Translationsinhibitors Cycloheximid (CHX) das TAMRA-Fluoreszenzsignal in beiden Genotypen reduziert. Die Ergebnisse der Quantifizierung sind in Abbildung 21 dargestellt. Dabei wurde das TAMRA-Alkin-Fluoreszenzsignal auf das SYPRO-Ruby-Fluoreszenzsignal (Gesamtproteinlevel) normalisiert. Aus dem Graph geht hervor, dass TAMRA-Fluoreszenzsignale AHA-, als auch AHA + CHX behandelten Proben im Arc/Arg3.1- Knockout nicht signifikant unterschiedlich zum Arc/Arg3.1- Wildtyp-Mäusen sind (CTX\_WT\_AHA: 100% ± 0,00%; CTX\_KO\_AHA: 88% ± 4,45%, p=0,377) (CTX\_WT\_AHA ± CHX: 45% ± 11,69%; CTX\_KO\_AHA ± CHX: 54% ± 14,05%, p=0,542).

Daher lässt sich schlussfolgern, dass Arc/Arg3.1-Knockout-Mäuse keine Beeinträchtigungen in der corticalen Proteinsynthese aufweisen. So ist der Anteil neu synthetisierter Proteine im Wildtyp- und Arc/Arg3.1-Knockout nicht signifikant unterschiedlich.



**Abbildung 20: Vergleich der Proteinneusynthese-Unterschiede im Cortex akuter hippocampaler Hirnschnitte zwischen den adulten Arc/Arg3.1-Wildtyp und Knockout-Mäusen.** **A:** Dargestellt ist TAMRA-Alkin-Fluoreszenzsignal, repräsentativ für die Menge neu synthetisierter Proteine. Diese wurde am NuPAGE®4 -12% Bis-Tris Gradientengels bei der Wellenlänge 532 nm gemessen. Es wurden 22 µg Protein, doppelte Auftragung durchgeführt. Bahn: 1 CTX\_WT\_AHA behandelten Proben; Bahn: 2 CTX\_WT\_AHA mit CHX-bahandelten Probe; Bahn: 3 CTX\_KO\_AHA behandelten Proben; Bahn: 4 CTX\_KO\_AHA mit CHX- behandelten Proben dar. **B:** Dargestellt ist SYPRO-Ruby Fluoreszenzsignal, das für die Gesamtproteinanteil steht und bei der Wellenlänge von 610 nm ermittelt wurde. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente (n=3).

AHA: Azidohomoalanin; CHX: Cycloheximid; CTX: Cortex; CTX: Cortex; KO: Arc/Arg3.1-Knockout; Met: Methionin; WT: Arc/Arg3.1-Wildtyp; (+): mit; (-): ohne.



**Abbildung 21: Die Proteinneusynthese im Cortex akuter hippocampaler Hirnschnitte unterscheidet sich nicht zwischen adulten Arc/Arg3.1-Wildtyp- und Knockout-Mäusen.** Das Balkendiagramm zeigt die Quantifizierung neu synthetisierter Proteine. Dargestellt sind die mittleren Werte der Fluoreszenzintensität aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardfehler aller behandelten Proben AHA und AHA mit CHX im Cortex adulter Arg3.1- Wildtyp- und Knockout-Mäusen. Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität erfolgte mittels ImageJ. Das TAMRA-Alkin-Fluoreszenzsignal wurde ins Verhältnis zum Gesamtproteinsignal (SYPRO-Ruby-Signal) gesetzt. Dieser korreliert mit dem Anteil neu synthetisierter Proteine. Signale wurden auf das CTX\_WT\_AHA (14 µg)-Signal normalisiert und alle anderen Werte relativ dazu dargestellt.

AHA: Azidohomoalanin; CHX: Cycloheximid; CTX: Cortex; KO: Arc/Arg3.1-Knockout; WT: Arc/Arg3.1-Wildtyp; n.s.: statistisch nicht signifikant; (+): mit.

### **3.3 Der spezifische Nachweis einzelner, neu synthetisierter Proteine bedarf weitere Optimierung mittels Biotin-Streptavidin-Pull-Down Analysen**

In den vorangegangenen Experimenten konnte ich zeigen, dass der Knockout des Arc/Arg3.1-Gens zu keinen Beeinträchtigungen im Level neu synthetisierter Proteine führt. Dies schließt jedoch nicht aus, dass Arc/Arg3.1 die Proteinexpression einzelner, plastizitätsrelevanter Proteine beeinflussen/regulieren kann. Um dies zu klären, wurden Expressionslevel einzelner, plastizitätsrelevanter Proteine analysiert. Der Fokus der Untersuchung lag dabei auf den Proteinen: Arc/Arg3.1 sowie der GluA1- und GluA2-Untereinheit des AMPA-Rezeptors.

Dabei wurden, wie bereits zuvor beschrieben (vgl. 3.1.2.1), neu synthetisierte Proteine in akuten hippocampalen Hirnschnitten mit AHA-gelabelt und anschließend mittels Kupferkatalysierter Click-Chemie mit Biotin-Alkin markiert (vgl. 2.2.2.2). Mithilfe der Größenausschlusschromatographie (vgl. 2.2.2.3.2) konnte nun gebundene, freie Biotin-Alkin Moleküle aus dem Proteinlysate entfernt werden. Darüber hinaus konnten Proteine in IP-Puffer umgepuffert werden. Durch einen anschließenden Streptavidin-Pulldown konnten neu synthetisierte, Biotin-markierte Proteine aus den Proteinlysaten fraktioniert werden (vgl. 2.2.2.4). Die Fraktion der biotinylierten Proteine wurden per SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt (vgl. 2.2.2.6.1) und anschließend per Western Blot auf PVDF-Membran transferiert (vgl. 2.2.2.7). Die Bestimmung der aufgetragenen Gesamtproteinmenge erfolgte durch LavaPurple-Fluoreszenzfärbungen (vgl. 2.2.2.9.2) (vgl. Abbildung 22 rechts). Fluoreszenzsignale wurden bei einer Wellenlänge von 532 nm detektiert. Nach der anschließenden Entfärbung wurde der Blot mit 2,5% Biotin-freiem BSA blockiert. Der Anteil einzelner Proteine wurde durch spezifische Antikörper für Arc/Arg3.1, GluA1, GluA2,  $\beta$ -Aktin und GAPDH überprüft. Zur Kontrolle der Biotinylierung wurde die Membran zusätzlich mit Streptavidin-HRP inkubiert und das Proteinsignal durch die ECL-Methode detektiert (vgl. 2.2.2.9.1) (vgl. Abbildung 22 links).

Abbildung 22 zeigt links das Chemilumineszenzsignal des Nachweises Biotin-markierter Proteine. Rechts ist das Fluoreszenzsignal der Lava-Purple-Färbung abgebildet. Die Abbildung zeigt ein starkes Streptavidin-HRP Chemilumineszenz-Signal in der Pull-Down-Fraktion AHA-behandelter Proben (Bahn1: 1% Input (Inp); Bahn 2: PD (Pull-Down)). Im Gegensatz zur Input-Fraktion kann sowohl für die AHA, AHA+CHX und DMSO-Proben eine Anreicherung des Streptavidin-HRP-Signals in der Pull-Down-Fraktion beobachtet werden.

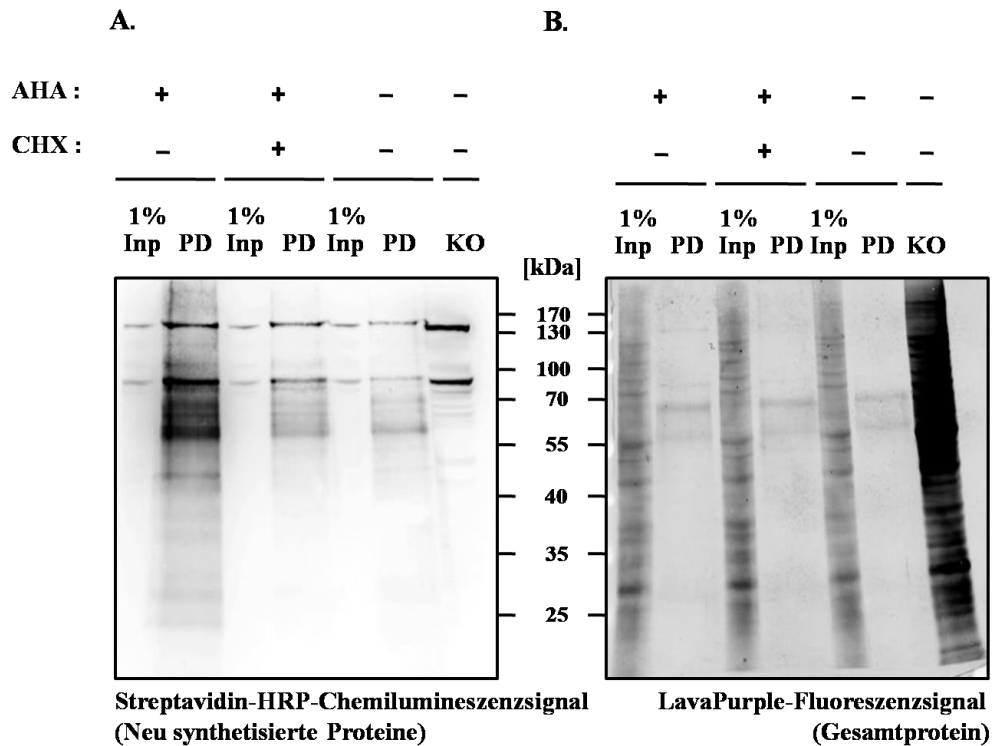
Dies bestätigt die Anreicherung neu synthetisiert biotinylierter Proteine durch den Pull-Down mittels Streptavidin-Beads.

Vergleicht man die Chemilumineszenzsignale AHA-behandelter und mit AHA und CHX-behandelter Proben (Bahn: 4 PD), so zeigen die mit CHX-behandelten Proben ein stark reduziertes Streptavidin-Signal. Dies zeigt, dass eine Neusynthese von Proteinen stattgefunden hat und diese mittels Click-Chemie mit Biotin-Alkin gekoppelt werden konnten. In vorangegangenen Experimenten konnte ich zeigen, dass CHX die Neusynthese von Proteinen inhibiert. Da in DMSO-behandelten Proben neu synthetisierte Proteine nicht mit AHA bzw. Biotin gelabelt wurden, handelt es sich bei dem hier beobachteten DMSO-Signal um ein Hintergrundsignal. Dieses wird vermutlich durch unspezifische Bindungen von Proteinen an Beads, Streptavidin oder endogenes Biotin verursacht. So konnte durch histochemische Färbungen gezeigt werden, dass endogenes Biotin in akuten hippocampalen Hirnschnitten (Hippocampus) angereichert ist (Wang und Pevsner, 1999). Infolgedessen können Proteine in Zellen oder Geweben endogene biotinyliert und so an Beads angereichert werden, die ein Hintergrund hervorrufen.

Die zusätzlich aufgetragene Knockout-Probe wurde weder AHA-gelabelt, biotinyliert noch an Streptavidin-Beads immobilisiert. Diese Probe dient als Spezifitätskontrolle für die Immundetektion des Arc/Arg3.1-Proteins. Die Knockout-Probe zeigt ein deutlich stärkeres Streptavidin-HRP-Signal. Dieses geht einher mit einem starken Lava-Purple-Signal. Das erhöhte Streptavidin-Signal in der Knockout-Probe (KO) ist somit auf eine erhöhte Menge aufgetragenen Proteins zurückzuführen.

Der Vergleich der Lava-Purpel-Signale AHA-, AHA+CHX- und DMSO-behandelter Proben zeigt für alle Proben ein ähnliches Signal in der Input- bzw. Pull-Down-Fraktion. Zu erwarten wäre eine höheres Signal bei der AHA-behandelten Probe im Gegensatz zur AHA+CHX- und DMSO-Probe. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass der Anteil neu synthetisierter, biotinylierter Proteine unterhalb der Nachweisgrenze der LavaPurple-Färbungsmethode liegt.

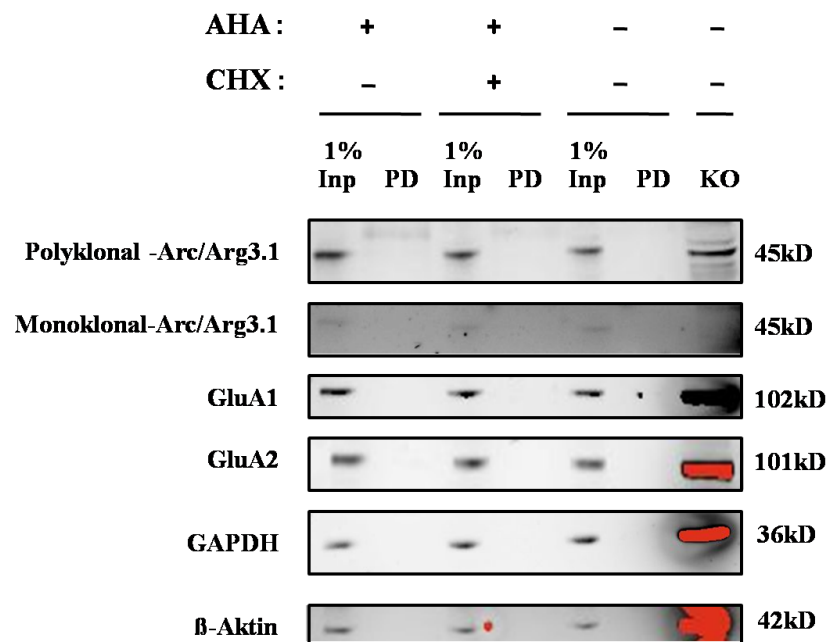




**Abbildung 22: Pull-Down neu synthetisiert biotinylierter Protein mittels Biotin-Streptavidin Pull-Down.** A: Western Blot Analyse mittels Streptavidin-HRP (1:15000) nach Pull-Down. Corticale Gewebelysate (600 µg) wurden durch Click-Chemie biotinyliert, 1% davon als Input aufgetragen und der Rest mit Beads inkubiert. B: LavaPurple-Fluoreszenzsignal (Wellenlänge 532 nm) des Gesamtproteins. Die Abbildung ist repräsentativ für ein Experiment. AHA: Azidohomoalanin; CHX: Cyclohexomid; HRP: *horse radish peroxidase*; Inp: Input; KO: Arc/Arg3.1 Knockout; PD: Pull-Down-Fraktion; (+): mit; (-): ohne.

Nachdem ich den Anteil neu synthetisierter Proteine mithilfe der Biotin-Alkin-basierte Click-iT-Methode nachweisen konnte, sollte im nächsten Schritt die Expression einzelner, plastizitätsabhängiger Proteine in Arc/Arg3.1-Wildtyp- und Knockout-Mäusen analysiert werden. Der Nachweis erfolgte mittels spezifischer, HRP-gekoppelter Antikörper auf PVDF-Membranen. Die Abbildung 23 zeigt einen repräsentativen Western Blot. Der Abbildung ist zu entnehmen, dass weder die AHA-gelabelten, noch die DMSO-inkubierten Proben ein Chemilumineszenzsignal für Arc/Arg3.1 zeigen. Hingegen ist in allen Input-Fractionen ein deutliches Arc/Arg3.1-Signal mit dem polyklonalen Arc/Arg3.1-Antikörper zu erkennen. Die Verwendung des monoklonalen Arg3.1-C7-Antikörpers zeigt die Spezifität des Arc/Arg3.1-Signals. So ist in der Arc/Arg3.1-Knockout Probe kein Arc/Arg3.1-Chemilumineszenzsignal zu erkennen. Die Untersuchung der GluA1-, GluA2-, GAPDH- und  $\beta$ -Actin-Expression zeigt für keins der Proteine ein Chemilumineszenzsignal in der Pull-Down-Fraktion. Hingegen ließ sich für alle Proteine ein Proteinsignal in der Input-Fraktion nachweisen.

Zusammenfassend konnte ich zeigen, dass die in der 2stündigen AHA-Inkubationszeit eine Neusynthese von Proteinen stattfindet. Weiter konnte ich darlegen, dass ich den Anteil neu synthetisierter Proteine erfolgreich aus Lysaten hippocampaler Hirnschnitte fraktionieren kann. Innerhalb dieser Fraktion konnte ich keiner der untersuchten Proteine: Arc/Arg3.1, GluA1, GluA2, GAPDH und  $\beta$ -Aktin nachweisen. Eine mögliche Ursache hierfür ist eine geringe Aktivierung der Synthese dieser Proteine. So konnte gezeigt werden, dass die Expression des Arc/Arg3.1- bzw. GluA1-Proteins erst durch plastizitätsinduzierende Stimulationen vermittelt werden. Basierend darauf sollten in weiteren Experimenten die Expression des Arc/Arg3.1-, GluA1-, und GluA2-Proteins nach Forskolin-Stimulation in akuten hippocampalen Hirnschnitten analysiert werden.



**Abbildung 23: Immundetektion einzelner, neu synthetisierter Proteine mittels Antikörper nach Pull-Down.** Corticale Gewebelysate (600  $\mu$ g) wurden durch Click-Chemie biotinyliert, 1% davon als Input aufgetragen und der Rest mit Beads inkubiert. Es wurden folgenden Antikörper gegen Arc/Arg3.1 (polyklonal: 1:15000), Arc/Arg3.1 (monoklonal: 1:200), GluA1/2 (1:1000) und  $\beta$ -Actin (1:100000) sowie Ladekontrolle GAPDH (1:100000) untersucht.

AHA: Azidohomoalanin; CHX: Cycloheximid; GluA1/2: Glutamatrezeptoren; Inp: Input; KO: Arc/Arg3.1 Knockout; PD: Pull-Down-Fraktion; (+): mit; (-): ohne.

### **3.4 Die Expression einzelner, plastizitätsrelevanter Proteine kann durch Forskolin in Hippocampus induziert werden**

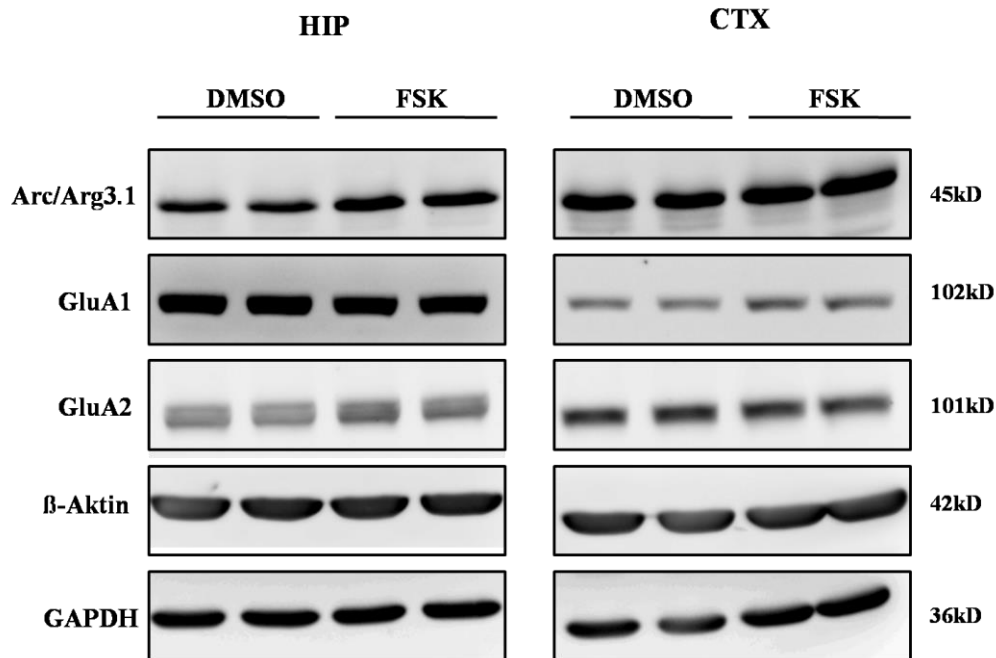
Untersuchungen zur Expression plastizitätsrelevanter Proteine konnten zeigen, dass sowohl die Arc/Arg3.1-, als auch GluA1-Proteinexpression durch plastizitätsinduzierende Stimulationen aktiviert werden kann (Bloomer *et al.*, 2007; Man *et al.*, 2007). Ein Protokoll zur Induktion von synaptischer Plastizität ist die pharmakologische Stimulation akuter hippocampaler Hirnschnitte mit Forskolin (Huang *et al.*, 1996; Gobert *et al.*, 2008).

Forskolin (FSK) bewirkt die Aktivierung der Adenylatcyclase, wodurch vermehrt zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) produziert wird. Dies aktiviert unter anderem die cAMP-abhängige Protein-Kinase-A (PKA) und vermittelt eine Aktivierung der Proteinsynthese in Neuronen (Seamon *et al.*, 1981).

Mithilfe der Forskolin-Stimulation sollte die Expression plastizitätsabhängiger Proteine in akuten hippocampalen Hirnschnitten induziert werden. Der Fokus der Untersuchung lag dabei auf der Analyse von Expressionsleveln der Proteine Arg3.1, GluA1 und GluA2. Dazu wurden akute hippocampale Hirnschnitten aus dem Arc/Arg3.1-Wildtyp hergestellt (Schnittdicke 350 µm). Zur Erholung („*Recovery*“) wurden die Hirnschnitte für 2 h in ACSF inkubiert und anschließend für 30 min mit 50 µM Forskolin in ACSF stimuliert. Nach der Stimulation wurden die Schnitte für weitere 1,5 h in ACSF inkubiert. Während allen Inkubationsschritten wurden die Zellen mit Carbogen begast. Proteinlysate wurde mittels Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt (vgl. 2.2.2.6.1) und per Western Blot auf PVDF-Membranen transferiert. Der Nachweis erfolgte mittels spezifischer Antikörper für die Proteine Arc/Arg3.1, GluA1 und GluA2. Die untersuchten Proteine waren in der Größe durch mitgeführte Größen-Standards bestimmbar. Expressionslevel der Proteine wurden mithilfe der ECL-Reaktion analysiert (vgl. 2.2.2.9.1). Während der Detektion konnten Unterschiede in der Expressionsstärke der Arc/Arg3.1, GluA1 und GluA2 Proteine zwischen DMSO- und Forskolin-behandelten Proben anhand von unterschiedlich starken Banden untersucht werden. DMSO wurde als Trägersubstanz für die Lösung von Forskolin verwendet.

Die Abbildung 24 zeigt die ECL-Chemilumineszenzsignale der jeweils untersuchten Proteine Arc/Arg3.1, GluA1, GluA2 und GAPDH. Abgebildet sind repräsentative Western Blots aus drei unabhängigen Experimenten für Arc/Arg3.1, GluA1 (zwei Experimenten für GluA2). Dem Blot ist zu entnehmen, dass das Chemilumineszenzsignal des Arc/Arg3.1-Proteins nach der 30 minütigen Forskolin-Stimulation (FSK) sowohl im Hippocampus (HIP) als auch

Cortex (CTX) zunimmt. Die Proteinsignale der AMPA-Rezeptoruntereinheiten GluA1 und GluA2 lassen hingegen keine Veränderung nach der Forskolin-Stimulation im Hippocampus und Cortex erkennen. GAPDH diene als Lade- und Normalisierungskontrolle.



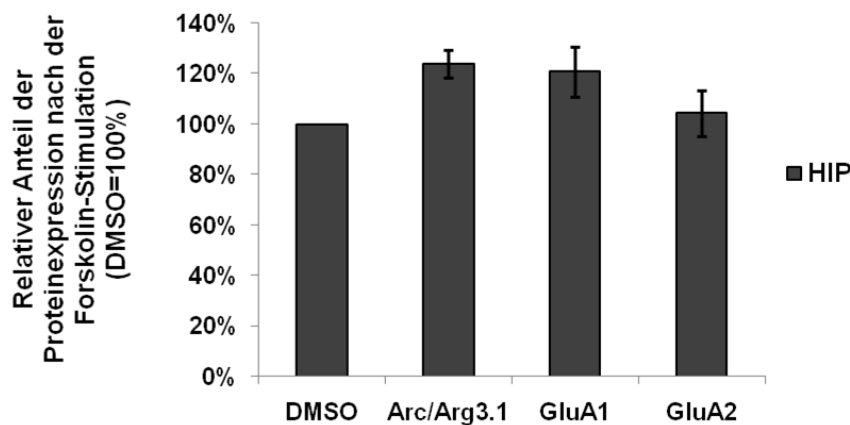
**Abbildung 24:** Die Expression einzelner, plastizitätsrelevanter Proteine kann durch Forskolin-Stimulation in Hippocampus der adulten Arc/Arg3.1-Wildtyp-Mäusen induziert werden. In jeder Spur wurden 15 µg Protein aufgetragen. Zuerst wurde die Membran mit einem Polyklonalen Antikörper gegen Arc/Arg3.1, folgend β-Actin und GluA1 getrennt inkubiert. Der gleiche Blot wurde gestrippt und erneut mit einem polyklonalem anti-GluA2-Antikörper und GAPDH untersucht. Die Expression des GAPDH diene als Ladekontrolle. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängigen Experimente; (GluA2 wurde 2 mal untersucht).

CTX: Cortex; DMSO: Dimethylsulfoxid; FSK: Forskolin; GluA1/2: Glutamatrezeptoren; HIP: Hippocampus.

Für die Quantifizierung der Chemilumineszenzsignale wurde das Programm ImageJ verwendet. Die Intensität der Proteinbanden wurde auf die entsprechenden GAPDH-Intensitäten normalisiert und relativ zur DMSO-Probe in Abbildung 25 und 26 dargestellt. Die quantitative Analyse der exprimierten Proteine im Hippocampus (Abbildung 25) zeigt, dass die pharmakologische Stimulation mit Forskolin die Arc/Arg3.1- als auch GluA1-Expression im Hippocampus beeinflusst. So wird sowohl das Arc/Arg3.1 (DMSO: 100 % ± 0%; FSK: 124% ± 5,46%), als auch das GluA1-Expressionslevel (DMSO: 100 % ± 0%; FSK: 121% ± 9,92%) durch die Forskolin-Stimulation erhöht. GluA2-Expressionslevel zeigen hingegen nur eine schwache Veränderung der Expressionslevel durch Forskolin (DMSO: 100 % ± 0%; FSK: 104% ± 9,13%). Betrachtet man hingegen die Expression der jeweiligen Proteine im Cortex (Abbildung 24), so ist keine Erhöhung des Expressionslevel durch die

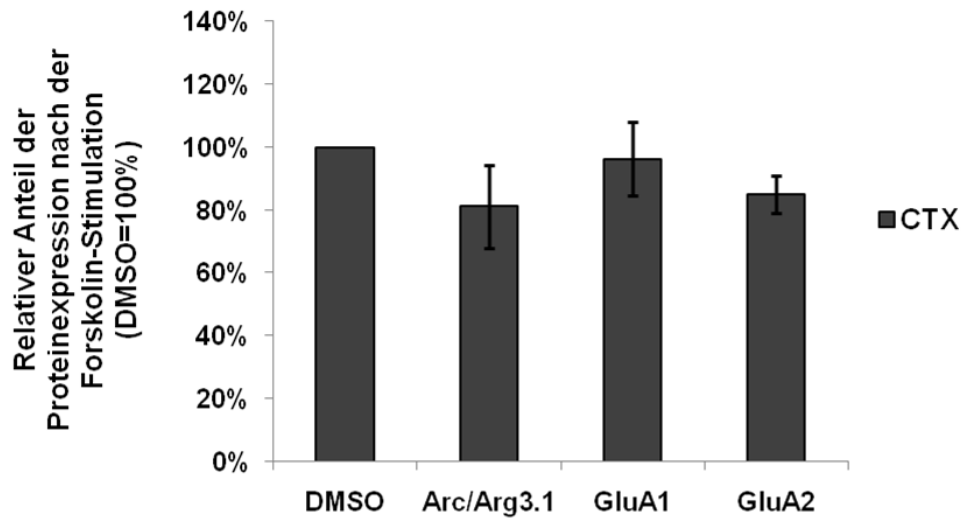
Forskolin-Stimulation zu erkennen. Dieser Unterschied zu den Beobachtungen aus dem Western Blot ist auf ein verstärktes Signal der Ladekontrolle GAPDH zurückzuführen. Vielmehr zeigt die Quantifizierung, dass Arc/Arg3.1 und GluA2-Proteinlevel durch die Forskolin-Stimulation im Cortex reduziert werden (Arc/Arg3.1\_DMSO: 100 % ± 0%, Arc/Arg3.1\_FSK: 81% ± 13%; GluA2\_DMSO: 100 % ± 0%, GluA2\_FSK: 85% ± 5,93%). GluA1-Expressionslevel im Cortex sind durch die Forskolin-Stimulation nicht beeinflusst (GluA1\_DMSO: 100% ± 0%, GluA1\_FSK: 96% ± 11,7%). Auffällig ist, dass die Schwankung der Proteinexpressionslevel im Cortex deutlich höher ist, als im Hippocampus.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Forskolin im Hippocampus die Expression der Proteine Arc/Arg3.1 und GluA1, jedoch nicht GluA2 induziert. Im Cortex hingegen ließ sich keine Erhöhung der Proteinexpression für Arc/Arg3.1, GluA1 und GluA2 beobachten.



**Abbildung 25: Forskolin induziert die Proteinexpression von Arc/Ar3.1 und GluA1 in Hippocampus.** Dargestellt ist der relative Anteil der Proteinexpression nach 30minütiger Forskolin-Stimulation für die Proteine Arc/Arg3.1, GluA1 und GluA2. Proteinlevel wurde auf GAPDH normalisiert und relativ zur DMSO-Probe dargestellt.

DMSO: Dimethylsulfoxid; GluA1/2: Glutamatrezeptoren; HIP: Hippocampus



**Abbildung 26: Forskolin bewirkt keine Erhöhung der Proteinlevel im Cortex akuter hippocampaler Hirnschnitte.**

Dargestellt ist der relative Anteil der Proteinexpression nach 30minütiger Forskolin-Stimulation für die Proteine Arc/Arg3.1, GluA1 und GluA2. Proteinlevel wurde auf GAPDH normalisiert und relativ zur DMSO-Probe dargestellt.

DMSO: Dimethylsulfoxid; GluA1/2: Glutamatrezeptoren; HIP: Hippocampus

## 4 Diskussion

Die Neusynthese von Proteinen in Zellen hat eine wichtige Funktion für verschiedenste zelluläre Prozesse, wie die Regulation und Aufrechterhaltung des Metabolismus, der Proliferation und Differenzierung. Weiterführende Untersuchungen konnten zeigen, dass die Proteinneusynthese auch eine wichtige Funktion für Prozesse des Lernens und der Gedächtnisbildung hat. Grundlegend für diese Prozesse sind Veränderungen der synaptischen Übertragung. So ließ sich zeigen, dass die Translation eine zentrale Rolle für die Aufrechterhaltung langanhaltender Formen der synaptischen Plastizität (hier: LTP) im Hippocampus und Cortex hat.

### 4.1 Die kupferkatalysierte Click-iT-Methode könnte zum Nachweis neu synthetisierter Proteine in Neuronen etabliert werden

In der vorliegenden Arbeit habe ich die Click-iT-Methode zum Nachweis neu synthetisierter Proteine in Neuronen etablieren können. Vorgegangene Studien konnten ebenfalls mithilfe dieser Methode die Proteinneusynthese in verschiedenen Zellsystemen demonstrieren (Kiick *et al.*, 2002; Link und Tirrell, 2003; Dieterich *et al.*, 2006; Dieterich *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012). Trotz ihrer hohen Spezifität findet diese Methode, für die Untersuchung der Proteinsynthese in neuronalen Gewebeschnitten, bisher nur wenig Anwendung (Hodas *et al.*, 2012).

Die Ergebnisse meiner Untersuchungen legen dar, dass ich die kupferkatalysierten Click-iT-Methode erfolgreich zum Nachweis neu synthetisierter Proteine in zwei verschiedenen neuronalen Systemen etablieren konnte. So war es mir möglich, unter den von mir verwendeten Bedingungen, neuronale Proteine mit dem Methionin Analoga AHA zu markieren und die Translationsabhängigkeit des AHA-Labelings nachzuweisen. Weiter konnte ich durch die Verwendung von Biotin-gekoppeltem AHA und dem anschließenden Streptavidin-Biotin Pull-Down den Anteil neu synthetisierter Proteine aus Proteinlysaten fraktionieren und nachweisen. Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen bereits vorgegangener Studien zur Click-iT-Methode überein. So konnten auch Dieterich *et al.*,

2006 mithilfe der Click-iT-Methode und eines anschließenden Neutravidin-Pulldowns den Anteil AHA-gelabelter Proteine in HEK293-Zellen nachweisen. Diese Ergebnisse ließen sich in Experimenten von Liu *et al.*, 2012 bestätigen. Meine Ergebnisse lassen somit darauf schließen, dass mithilfe der Click-iT-Methode neu synthetisierte, AHA-gelabelte Proteine erfolgreich in primären Neuronenkulturen, als auch akuten hippocampalen Hirnschnitten nachgewiesen werden können.

Streptavidin Pull-Down-Experimente zum Nachweis einzelner, spezifischer Proteine konnten zeigen, dass unter basalen Bedingungen, keine Neusynthese des Arc/Arg3.1- bzw. GluA1-Proteins beobachtet werden kann. Diese Beobachtungen stimmen überein mit Beobachtungen vorangegangener Studien, die zeigen, dass die Arc/Arg3.1- und GluA1-Proteinexpression erst durch aktivitätsinduzierende Stimuli vermittelt wird (Waltereit *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2008; Derkach *et al.*, 2007; Bloomer *et al.*, 2008). So findet eine Neusynthese des Arc/Arg3.1- bzw. GluA1-Proteins erst nach plastizitätsinduzierenden Stimulationen statt. Dies konnte auch in mehreren, unabhängigen Studien bestätigt werden (Park *et al.*, 2008; Bloomer *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu den aktivitätsregulierten Genen, sollten die sogenannten „Housekeeping genes“ ( $\beta$ -Aktin und GAPDH) auch unter basalen, nicht-stimulierten Bedingungen eine kontinuierliche, anhaltende Proteinsynthese zeigen. Leider ließ sich diese Beobachtung mithilfe der Streptavidin-Pull Down-Experimenten nicht bestätigen. So konnten keine Biotin-AHA-gelabelten  $\beta$ -Aktin- bzw. GAPDH-Proteine aus dem Gesamtproteinlysat fraktioniert werden. Mögliche Ursachen hierfür sind: (1) Eine geringe Proteinsynthese während des untersuchten Labeling-Zeitraums, wodurch das Expressionslevel der Proteine unterhalb der Nachweisgrenze der hier verwendeten Detektionsmethode liegt. (2) Darüber hinaus ließ sich zeigen, dass die Affinität der Methionyl-tRNA-Synthetasen für das Aminosäure-Analoga (AHA) gegenüber der natürlichen Aminosäure (Methionin) 400-fach geringer ist (Kiick *et al.*, 2002). Diesem Problem kann zwar durch die Limitierung der Methionin-Verfügbarkeit in Zellkulturen und Gewebeschnitten entgegengewirkt werden. Weiter kann (3) eine geringe Aminosäuren-Analoga-Konzentration einen vollständigen Labelingsprozess beeinträchtigen, so dass nicht alle neu synthetisierte Proteine gelabelt werden. Desweiteren ist nicht auszuschließen (4), dass die neu synthetisierten Proteine, die beim Pull-Down nachgewiesen wurden, Einfluss auf die zu untersuchenden plastizitätsrelevanten Proteine (Arc/arg3.1; GluA1 und GluR2) haben könnten. So können die neu synthetisierten vermutlich die Synthese plastizitätsrelevanter Proteine während des zu untersuchenden Zeitraums herunterregulieren.



Die Untersuchung neu synthetisierter Proteine mithilfe der fluoreszenz-basierenden TAMRA-Alkin Click-iT-Methode zeigte eine Zunahme des TAMRA-Alkin-Fluoreszenzsignals in den DMSO-Kontrollproben in Abhängigkeit von der Proteinmenge. Dies konnte sowohl in den Versuchen der primären Neuronenkultur, als auch akuten hippocampalen Hirnschnitten beobachtet werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass möglicherweise endogene Proteine mit den Click-iT-Reagenzien unspezifische Reaktionen eingehen können. So könnten posttranslationale Modifizierungen endogener Proteine, wie die Glykosylierung, Myristylierung, Palmitoylierung, sowie Ubiquitinierung unspezifische Reaktion hervorrufen. Zudem konnten vorangegangene Untersuchungen zeigen, dass nicht vollständig aufgeschlossene bzw. denaturierte Proteine die Effektivität der Click-iT-Reaktion verringern können und somit zum Hintergrundsignal beitragen (Dieterich *et al.*, 2006). Nicht-optimale Bedingungen für die Lyse und Aufreinigung der Proteinlysate können somit zum Hintergrundsignal beitragen.

Alternative Methoden zum Nachweis neu synthetisierter Proteine sind (1) die SILAC und (2) die SUnSET-Methode. Die SILAC-Methode (*Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture*) nutzt den metabolischen Einbau der nicht-radioaktiven Isotope, Arginin und Lysin. Sie wird vorwiegend in sich teilenden Zellkultursystemen verwendet. Für die Markierung werden die Zellkulturen mit dem  $^{12}\text{C}$ -oder  $^{13}\text{C}$ -gelabelten Aminosäuren Arginin und Lysin inkubiert. Für eine vollständige Markierung neu synthetisierter Proteine ist häufig mit langen Inkubationszeiten (circa fünf Zellteilungen) verbunden. Nach dem Labeling werden die Proteine mit der Protease Trypsin inkubiert, die die Proteine selektiv nach den Aminosäuren Arginin und Lysin spaltet. Die Detektion der Peptidfragmente erfolgt mittels massenspektrometrischer Methoden. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass keine zusätzlicher *in vitro*-Markierungsschritt erforderlich ist, wodurch diverse Aufreinigungsschritte entfallen, die zu Proteinverlusten führen können (Krüger und Mann, 2006). Eine nicht-radioaktive Methode zur metabolischen Markierung neu synthetisierter Proteine, ist die sogenannten „*Surface Sensing of Translation*“ (SUnSET)- Technik (Schmidt *et al.*, 2009). Bei dieser Methode wird der Proteinsyntheseinhibitor Puromycin als Marker genutzt. Puromycin bindet an die A-(Eingangs)-Stelle des Ribosomens und geht bei der Elongation mit der wachsende Polypeptidkette eine kovalente Bindung ein (Nathans, Daniel 1964). Die Synthese des Proteins wird an der Stelle der Puromycin-Bindung abgebrochen. Somit entstehen unterschiedlich lange Polypeptidketten neu synthetisierter Proteine, die an ihrem C-Terminus mit Puromycin markiert sind. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass pro entstehendes

Polypeptid ein Puromycin-Molekül vorhanden ist (homogene Markierung und Verteilung). Zudem erfordert diese Methode keine „Starvation“/Methionin-Limitierung, welche einen Stressor für die Zellen darstellt. Die Detektion kann mittels Immundetektion durch Anti-Puromycin Antikörper, Click-Chemie und weiteren Analysen-Methoden erfolgen. Ein Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass einzelne neu synthetisierte Proteine nicht spezifisch nachgewiesen werden können, da sie als unterschiedlich lange Peptide vorkommen. Die Click-iT-Methode hat sich in den letzten zehn Jahren durchgesetzt, da die Verwendung chemisch modifizierter Aminosäuren-Analoga wie Azidohomoalanin (AHA) die folgenden Vorteile bietet: (1) Die Markierung neu synthetisierter Proteine basiert auf der zelleigenen Translationsmachenerie ohne toxische oder sterische Beeinflussung der Proteinsynthese. (2) Die Detektion/Analyse erfolgt über eine kupferkatalysierte Azid-Alkin-Click-Reaktion (Click-Chemie), die in der Natur in biologischen Systemen nicht vorkommt und damit der Methode eine hohe Spezifität und Effizienz verleiht. (3) Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass die Reaktionszeiten der einzelnen Schritte sehr schnell sind und somit eine Markierung der Proteine unter physiologischen Bedingungen erfolgen kann. Darüber hinaus zeichnet sich diese Click-it Methode durch eine einfache Durchführbarkeit und eine Vielzahl verfügbarer Liganden (Biotin, Fluoreszenzmoleküle, Lipide, Zuckermoleküle) aus. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass nur die Proteine markiert werden, die in ihre Aminosäuresequenz die ersetzbare Aminosäure zum Beispiel Methionin codieren. Weiter kann es zu einer mehrfachen (inhomogenen) Markierung kommen, wenn dieses Codon mehrfach in der mRNA-Sequenz des Proteins enthalten ist (Prescher und Bertozii 2005).

Die erzielten Ergebnisse belegen die Eignung des etablierten Markierungsverfahrens mittels nicht-kanonischer Aminosäure Azidohomoalanin (AHA) und des darauf basierenden Nachweissystem (Tetramethylrhodamin (TAMRA)-Alkin basierte Click-Chemie) für zukünftige Untersuchungen der Proteinexpression in den neuronalen Systemen der primären Neuronenkultur und der akuten hippocampalen Hirnschnitte.

## **4.2 Die Proteinexpression ist nicht beeinträchtigt in akuten hippocampalen Hirnschnitten der Arc/Arg3.1-Knockout-Mäuse**

Die Neusynthese von Proteinen ist notwendig für die Aufrechterhaltung langanhaltender Veränderungen in der Signalübertragung an Synapsen. Diese Veränderungen an den Synapsen, sprich die synaptische Plastizität, bildet die Grundlage für Prozesse des Lernens und der Gedächtnisbildung auf zellulärer Ebene. So ließ sich zeigen, dass die Konsolidierung der Langzeitpotenzierung (LTP), eine bestimmte Form der Synaptischen Plastizität, von der neuronalen Proteinsynthese abhängig ist. Bereits vorangegangene Untersuchungen konnten aufdecken, dass das aktivitätsregulierte Gen Arc/Arg3.1 an regulativen Prozessen der synaptischen Plastizität beteiligt ist (Link *et al.*, 1996; Plath *et al.*, 2006; Messaoudi *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2008). So ließ sich in unser Arbeitsgruppe demonstrieren, dass der Knockout des Arc/Arg3.1-Gens die Konsolidierung des LTPs, sowie Lern- und Gedächtnisvorgänge negativ beeinflusst (Plath *et al.*, 2006). Arc/Arg3.1 stellt somit ein wichtiges, aktivitätsreguliertes Gen für die langanhaltende Stabilisierung der synaptischen Veränderungen dar.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten mögliche Veränderungen der Proteinexpression durch den Knockout des Arc/Arg3.1-Gens analysiert werden. Dazu wurden Proteinexpressionslevel mithilfe der von mir etablierten Click-iT-Methode in akuten hippocampalen Hirnschnitten von Arc/Arg3.1-Wildtyp und Arc/Arg3.1-Knockout-Mäusen untersucht. Die Ergebnisse meiner Experimente legen dar, dass sowohl in Arc/Arg3.1-Knockout als auch in Arc/Arg3.1-Wildtyp-Mäusen eine Neusynthese von Proteinen unter nicht stimulierten, basalen Bedingungen stattgefunden hat. So ließen sich sowohl im Hippocampus, als auch Cortex signifikante Unterschiede in der Menge neu synthetisierter Proteine (AHA-Intensität) zwischen AHA- und AHA + Cyloheximid-behandelten Proben beobachten. Weiter konnte ich zeigen, dass die Proteinneusynthese im Arc/Arg3.1-Knockout im Vergleich zum Arc/Arg3.1-Wildtyp nicht beeinträchtigt ist. So zeigten Arc/Arg3.1-Knockout- und Arc/Arg3.1-Wildtyp-Mäuse keine signifikanten Unterschiede in dem Anteil neu synthetisierter Proteine bzw. der Gesamtproteinexpression. Dies konnte sowohl im Hippocampus, als auch im Cortex beobachtet werden. Zusammenfassend konnte ich zeigen, dass Arc/Arg3.1-Knockout-Mäuse keine signifikanten Beeinträchtigungen der Proteinsynthese unter den von mir untersuchten Bedingungen aufweisen. Diese Beobachtungen werden unterstützt durch Untersuchungen von

Lee *et al.*, (2004), die zeigen, dass Arc/Arg3.1-Wildtyp- und Knockout-Mäuse keine signifikanten Unterschiede im Expressionslevel der Proteine GluA1, GluA2 aufweisen (Lee *et al.*, 2004). In Übereinstimmung damit können wir schlussfolgern, dass

(1) die Proteinneusynthese sowohl im Hippocampus, als auch im Cortex von Arc/Arg3.1-Wildtyp und Arc/Arg3.1-Knockout-Mäusen auf ähnlichen molekularen Prozessen basiert.

(2) Scheint die basale Proteinexpression in Arc/Arg3.1-Wildtyp und -Knockout-Neuronen nicht von Arc/Arg3.1 abhängig zu sein.

Dies lässt uns vermuten, dass Arc/Arg3.1 keine direkte oder indirekte Funktion für die Regulation der basalen Proteinneusynthese ausübt. Da Arc/Arg3.1 ein aktivitätsreguliertes Gen ist, dessen Expression durch plastizitätsinduzierende Stimulationen aktiviert werden kann, ist nicht auszuschließen, dass Arc/Arg3.1 die aktivitätsregulierte Synthese spezifischer Proteine regulieren kann. Dies bedarf weiterer Untersuchungen. Ein vorstellbares Experiment wäre zum Beispiel der Vergleich der Proteinneusynthese einzelner, plastizitätsrelevanter Proteine in akuten hippocampalen Hirnschnitten von Arc/Arg3.1-Wildtyp- und Knockout-Mäusen nach verschiedenen plastizitätsinduzierenden Stimulationen. Neuere Untersuchungen lassen darüber hinaus annehmen, dass Arc/Arg3.1 die Transkription einzelner Gene sowie die intrazelluläre Lokalisierung von Proteinen beeinflussen kann (Waung *et al.*, 2008).

### **4.3 Der Adenylatcyclase-Aktivator Forskolin erhöht die Proteinexpression spezifischer plastizitätsrelevanter Proteine**

Ein weitverbreitetes pharmakologisches Stimulationsprotokoll zur Induktion von synaptischer Plastizität ist die Applikation des Adenylatcyclase-Aktivators Forskolin (FSK). Vorangegangene Studien konnten zeigen, dass die Behandlung akuter hippocampaler Hirnschnitte mit Forskolin zur Aktivierung der Adenylatcyclase (AC) und damit zu einer gesteigerten intrazellulären Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) führt (Salin *et al.*, 1996; Seamon *et al.*, 1981). Diese erhöhte cAMP-Konzentration aktiviert die nachgeschaltete Proteinkinase A (PKA), die während der synaptischen Plastizität an der Regulation der Protein-, als auch Genexpression beteiligt ist (Nguyen and Woo, 2003).

Meine Ergebnisse zeigen, dass Proteinexpressionslevel in akuten hippocampalen Hirnschnitten durch die Applikation von Forskolin (50  $\mu$ M) erhöht werden. Dabei konnten

spezifisch erhöhte Expressionslevel der Proteine Arc/Arg3.1 und GluA1 im Hippocampus beobachtet werden. Vorangegangene Experimente von Waltereit *et al.*, 2001 und Bloomer *et al.*, 2007 konnten diese Beobachtungen in dem System der primären Neuronenkultur bestätigen. In elektrophysiologischen Untersuchungen ließ sich zudem demonstrieren, dass die Forskolin-induzierte Proteinsynthese für die Induktion des späten L-LTPs, eine Form der synaptischen Plastizität, (hier: Langzeitpotenzierung, Late-LTP) notwendig ist (Nguyen und Kandel 1996; Salin und Malenka 1996; Gobert *et al.*, 2008).

Untersuchungen im Cortex konnten im Gegensatz zum Hippocampus keine Forskolin-induzierte Erhöhung des Arc/Arg3.1 bzw. GluA1 Expressionslevel beobachten. Diese Ergebnisse stimmen nicht überein mit Beobachtungen vorangegangener Studien. So konnten Man *et al.*, 2007 zeigen, dass die Forskolin-Applikation einen signifikanten Anstieg der GluA1-AMPA-Rezeptoren in primären corticalen Neuronenkulturen bewirkt (Man *et al.*, 2007). Das Ausbleiben der Forskolin-vermittelten Arc/Arg3.1-Induktion im Cortex könnte zudem aus einer erhöhten basalen Arc/Arg3.1-Expression im Cortex resultieren (bisher unveröffentlichte Daten). So konnten bisherige Studien zeigen, dass das Arc/Arg3.1-Expressionslevel in Neuronen nur innerhalb eines engen Expressionsbereichs durch Synthese und Degradationsmechanismen reguliert wird (Park *et al.*, 2008; Greer *et al.*, 2010). Da die für den Cortex erhaltenen Daten nur aus zwei unabhängigen Experimenten resultieren, bedarf es weiterer Untersuchungen, um die hier erzielten Ergebnisse zu bestätigen. Eine weitere Erklärung für die Divergenz der hier erzielten Beobachtungen zu den bereits publizierten Ergebnisse kann auf Unterschiede in der Kultivierung von Neuronenkulturen bzw. der Präparation, Inkubation und Behandlung akuter hippocampaler Hirnschnitte zurückgeführt werden.

Zusammenfassend konnte ich in der vorliegenden Arbeit die kupferkatalysierte Click-iT-Methode zum Nachweis neusynthetisierter Proteine erfolgreich in dem System der primären Neuronenkultur, sowie im System der akuten hippocampalen Hirnschnitte etablieren. Meine weiteren Untersuchungen konnten zeigen, dass Arc/Arg3.1-Knockout-Mäuse keine Beeinträchtigungen in der Proteinneusynthese zeigen. Im Hinblick auf nachfolgende Experimente konnte ich darlegen, dass die Arc/Arg3.1-, als auch GluA1-Expression durch die plastizitätsinduzierende Forskolin-Stimulation im Hippocampus akuter hippocampaler Hirnschnitte des Arc/Arg3.1-Wildtyps induziert werden kann. Um die Proteinneusynthese spezifischer, plastizitätsrelevanter Proteine näher untersuchen zu können, sollten in zukünftigen Experimenten die Proteinexpression nach plastizitätsinduzierenden Stimulationen untersucht werden. Ein mögliches Experiment wäre z.B.: die Behandlung akuter

hippocampaler Hirnschnitte mit Forskolin und die anschließende Analyse der Proteinneusynthese mithilfe der kupferkatalysierten Biotin-Alkin-Click-iT-Methode und einem anschließenden Streptavidin Pull-Downs.

## 5 Zusammenfassung

Chemische Synapsen bilden nicht nur die Kontaktstelle zwischen individuellen Neuronen und übernehmen die Übertragung elektrischer Signale, sondern stellen auf molekularer Ebene die Grundlage für Lernprozesse dar. Durch die molekulare und strukturelle Änderung der synaptischen Verbindungen zwischen den Neuronen findet die Speicherung von Information und darauffolgend Erinnerungen im Gehirn statt. Dabei erfordern lang anhaltende Veränderungen von Synapsen die Neusynthese von mRNA und Proteinen, während kurzzeitige Veränderungen von Synapsen auf bereits vorhandenen Proteinen beruhen. Die Etablierung von Techniken, mit denen sich gedächtnis- und lernrelevante Proteine wie Arc/Arg3.1, GluA1 und GluA2 unter einer Vielzahl von neu synthetisierten Proteinen nachweisen lassen, stellt eine große Herausforderung dar. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Etablierung der Click-iT-Methode. Diese Methode erlaubt eine Markierung von neu synthetisierten Proteinen mithilfe der nicht-kanonischen Aminosäure Azidohomoalanin (AHA). Die Verwendung verschiedener Alkin-Moleküle ermöglicht in der Click-iT-Reaktion eine Visualisierung AHA-markierter Proteine über verschiedene biochemisch- oder Fluoreszenz-basierte Methoden und erlaubt so die qualitative Analyse der Proteinneusynthese. Zunächst wurde die Click-iT-Methode in corticalen Neuronen der adulten Arc/Arg3.1-Wildtyp-Maus angewandt. Die Inkorporation von AHA zeigte, dass eine Proteinneusynthese in Neuronenkulturen stattfindet. Anschließend erfolgte die Übertragung dieser Methode auf das System der akuten hippocampalen Hirnschnitte. Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl im Arc/Arg3.1-Wildtyp, als auch im Arc/Arg3.1-Knockout eine Neusynthese von Proteinen unter basalen Bedingungen stattfindet und dass Arc/Arg3.1-Knockout-Mäuse weder im Hippocampus noch im Cortex Beeinträchtigungen in der basalen Proteinsynthese zeigen. Der spezifische Nachweis einzelner plastizitätsrelevanter Proteine, wie Arc/Arg3.1, GluA1 und GluA2, konnte mithilfe der Biotin-Streptavidin Pull-Down-Methode keine positiven Ergebnisse unter unstimulierten Bedingungen liefern. Pharmakologische, plastizitäts-induzierende Stimulation mit dem Adenylatcyclase-Aktivator Forskolin zeigten eine Erhöhung der Proteinexpression von Arc/Arg3.1 und GluA1 im Hippocampus akuter hippocampaler Hirnschnitte.

Die Click-iT-Methode wurde erfolgreich zum Nachweis der Proteinneusynthese angewandt. Für die Untersuchung spezifischer, plastizitätsrelevanter Proteine ist jedoch eine vorangehende plastizitätsinduzierende Stimulation notwendig.

## 6 Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich bei allen, die zum Gelingen meiner Bachelorarbeit beigetragen haben.

Für die Möglichkeit meine Bachelorarbeit im *Institute for Molecular and Cellular Cognition* am ZMNH anfertigen zu können, bedanke ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dietmar Kuhl.

Ein herzliches Dankeschön gilt Dr. Ora Ohana, die mir die Bearbeitung dieses interessanten Themas ermöglicht hat. Außerdem bedanke ich für ihre Zuversicht an mir bei der Bewältigung der Aufgabenstellung.

Herrn Prof. Dr. Jörg Andrä danke ich herzlich für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit seitens der Hochschule für Angewandte Wissenschaften.

Besonders herzlich bedanke ich mich bei den Doktoren, Jerome Gruhlich und Lars Binkle für die Unterstützung während der praktischen Arbeit, die auf großartige Weise kompetente und fachlich unterstützt haben. Außerdem danke ich Herrn Dr. Gruhlich für die wissenschaftliche Betreuung während der Anfertigung dieser Arbeit und seiner Hilfestellung bei inhaltlichen Korrekturen.

Ganz besonders herzlich bedanke ich mich bei Sabine Graf und Uwe Borgmeyer, die ebenfalls zur Unterstützung meiner Arbeit beigetragen haben.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und Geschwistern, die mir dieses Studium ermöglichen.



## Literaturverzeichnis

**Bell, P. J. L. und Karuso, P. (2003).** Epicocconone, a novel fluorescent compound from the fungus *Epicoccum nigrum*. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**: 9304

**Bennett, L. L., Ward, V. L. und Brockmann, R. W. (1965).** Inhibition of Protein Synthesis *in vitro* by Cycloheximide and related Glutarimide Antibiotics. *Biochim. Biophys. Acta.*, **103**: 478-485

**Berggren, K. N., Schulenberg, B., Lopez, M. F., Steinberg, T. H., Bogdanova, A., Smejkal, G., Wang, A. und Patton, W. F. (2002).** An improved formulation of SYPRO Ruby protein gel stain: Comparison with the original formulation and with a ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) formulation. *Proteomics.*, 486–498

**Bliss, T. V. und Lomo, T. (1973).** Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol* **232**: 331-356.

**Bloomer, Wendy A. C., VanDongen, Hendrika M. A. und VanDongen, Antonius M. J. (2007).** Arc/Arg3.1 Translation Is Controlled by Convergent N-Methyl-D-Aspartate and Gs-coupled Receptor Signaling Pathways. *J. Biol. Chem.*, **283**: 582–592

**Bramham, C. R. und Wells, D. G. (2007).** Dendritic mRNA: transport, translation und function. *Nat. Rev. Neurosci.*, **8**(10): 776-789

**Citri, A. und Malenka, R. C. (2008).** Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology.*, **33**(1): 18-41

**Chowdhury, S., Shepherd, J. D., Okuno, H., Lyford, G., Petralia, R. S., Plath, N., Kuhl, D., Hugarir, R. L. und Worley, P. F. (2006).** Arc/Arg3.1 interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking. *Neuron.*, **52**: 445– 459.

**Derkach, V. A., Oh, M. C., Guire, E. S. und Soderling, T. R. (2007).** Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.*, **8**(2): 101-113

**Dieck**, T. S., Müller, A., Nehring, A., Hinz, I. F., Bartnik, I., Schuman, E. M. und Dieterich, D. C. (2012). Metabolic Labeling with Noncanonical Amino Acids and Visualization by Chemoselective Fluorescent Tagging. *Current Protocols in Cell Biology.*, 7.11.1-7.11.29

**Dieterich**, D. C., Link, A. J., Graumann, J., Tirrell, D. A. und Schuman, E. M. (2006). Selective identification of newly synthesized proteins in mammalian cells using bioorthogonal noncanonical amino acid tagging (BONCAT). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **103**: 9482–9487.

**Dieterich**, D. C., Lee, J. J., Link, A. J., Graumann, J., Tirrell, D. A. und Schuman, E. M (2007). Labeling, detection and identification of newly synthesized proteomes with bioorthogonal non-canonical amino-acid tagging. *Nat. Protoc.*, **2**: 532–540.

**Dieterich**, D. C., Hodas, J. J. L., Gouzer, G., Shadrin, I. Y., Ngo, J. T., Triller, A., Tirrell, D. A. und Schuman, E. M (2010). In situ visualization and dynamics of newly synthesized proteins in rat hippocampal neurons. *Nat. Neurosci.* **13**: 897–905

**Eichenbaum**, H., Dudchenko, P., Wood, E., Shapiro, M., und Tanila, H. (1999). The hippocampus, memory, and place cells: is it spatial memory or a memory space? *Neuron.*, **23**: 209–22

**Garner**, C. C., Zhai, R., G., Gundelfinger, E., D. und Ziv, N., E. (2002). Molecular mechanisms of CNS synaptogenesis. *Trends in Neurosci.*, **25**

**Gobert**, D., Topolnik, L., Azzi, M., Huang, L., Badeaux, F., DesGroseillers, L., Sossin, W. H. and Lacailla, J. C. (2008). Forskolin induction of late-LTP and up-regulation of 5' TOP mRNA translation via mTOR, ERK, and PI3K in hippocampal pyramidal cells. *J. Neurochem.* **106**: 1160–1174

**Greer**, P. L. Hanayama, R., Bloodgood, B. L. Mardinly, A. R., Lipton, D. M. Flavell, S. W., Kim, T. K. Griffith, E. C., Waldon, Z., Maehr, R., Ploegh, H. L., Chowdhury, S., Worley, P. F., Steen, J. und Greenberg, M. E. (2010). The Angelman Syndrome-Protein Ube3A Regulates Synapse Development by Ubiquitinating Arc. *Cell.*, **140**: 1–13

**Hebb**, D.O. (1949). The organisation of behavior: a neurophysiological theory. *Wiley, New York*

**Ho**, V. M., Lee, J. A. und Martin, K. C. (2011). The Cell Biology of Synaptic Plasticity. *Science.*, **334**: 623

**Hodas**, J. J. L., Nehring, A., Höche, N., Sweredoski, M. J., Pielot, R., Hess, S., Tirrell, D. A., Dieterich, D. C. und Schuman, E. M. (2012). Dopaminergic modulation of the hippocampal neuropil proteome identified by bioorthogonal noncanonical amino acid tagging (BONCAT). *Proteomics.*, **12**: 2464–2476

**Huang**, F., Chotiner, J. K. und Steward, O. (2007). Actin Polymerization and ERK Phosphorylation Are Required for Arc/Arg3.1 mRNA Targeting to Activated Synaptic Sites on Dendrites. *J. Neurosci.*, **27**(34): 9054 –9067

**Huang**, Y. Y., Nguyen, P. V., Abel, T., und Kandel, E. R. (1996). Long-lasting Forms of Synaptic Potentiation in the Mammalian Hippocampus. *Learning and Memory.*, **3**:74-85

**Huisgen**, Rolf (1961). 1,3-Dipolar cycloadditions. *Proc. Chem. Soc.*, 357-396

**Impey**, S., Obrietan, K. und Storm, D. R. (1999). Making New Connections: Role of ERK/MAP Kinase Signaling in Neuronal Plasticity. *Neuron.*, **23**: 11–14

**Jiang**, I., Suppiramaniam, V. und Wooten, M. W. (2007). Posttranslational Modifications and Receptor-Associated Proteins in AMPA Receptor Trafficking and Synaptic Plasticity. *Neurosignals.*, **15**: 266–282

Kandel, E. R., Schwartz, J. A. und Jessel, T. M. (2000). Principles of Neuronal Science. ISBN 13: 978-0-07-11200-5

**Kiick**, K. L., Saxon, E., Tirrell, D. A. und Bertozzi, C. R. (2002). Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation. *PNAS.*, **99**: 19-24

**Krüger, M.** und Mann, M. (2006). SILAC, Präzise Methode zur MS-basierten quantitativen Proteomanalyse. *BIOspektrum.*, 378-380

**Lee, S. H.,** Simonetta, A. und Sheng, M. (2004). Subunit Rules Governing the Sorting of Internalized AMPA Receptors in Hippocampal Neurons. *Neuron.*, **43**: 221–236

**Link, W.,** Konietzko, U., Kauselmann, G., Krug, M., Schwanke, B., Frey, U. und Kuhl, D. (1995) Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proc Natl Acad Sci.*, **92**: 5734–5738

**Link, A. J.** und Tirrell, D. A. (2003). Cell surface labeling of Escherichia coli via copper(I)-catalyzed [3+2] cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**: 11164-11165

**Liu, J.,** Xu, Y., Stoleru, D. und Salic, A. (2012). Imaging protein synthesis in cells and tissues with an alkyne analog of puromycin. *PNAS.*, **109**: 413–418

**Lyford, G. L.,** Yamagata, K., Kaufmann, W. E., Barnes, C. A., Sanders, L. K., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Lanahan, A. A. und Worley, P. F. (1995). Arc, a growth factor and activityregulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron.*, **14**, 433-445.

**Lynch, M. A.** (2004). Long-term potentiation and memory. *Physiol. Rev.* **84**(1): 87-136

**Malenka, R. C.** und Bear, M. F. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron.*, **44**(1): 5-21

**Man, H. Y.,** Sekine-Aizawa, Y. und Huganir, R. L. (2007). Regulation of  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor trafficking through PKA phosphorylation of the Glu receptor 1 subunit. *PNAS.*, **104**(9): 3579–3584

**Mayford, M.,** Siegelbaum, S., A. und Kandel, E., R. (2012). Synapses and Memory Storage *Cold Spring Harb Perspect Biol*

**Messaoudi**, E., Kanhema, T., Soule, J., Tiron, A., Dageyte, G., Silva, B. d. und Bramham, C. R. (2007). Sustained Arc/Arg3.1 Synthesis Controls Long-Term Potentiation Consolidation through Regulation of Local Actin Polymerization in the Dentate Gyrus *In Vivo*. *J. Neurosci.*, **27**(39): 10445–10455

**Milner**, B., Squire, L. R. und Kandel E. R. (1998). Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron.*, **20**: 445-468

**Nathans**, Daniel (1964). Puromycin Inhibition of Protein Synthesis - Incorporation of Puromycin into Peptide Chains. *Proc Natl Acad Sci.*, **51**: 585-592

**Ngo**, J. T. und Tirrell, D. A. (2011). Non-Canonical Amino Acids in the Interrogation of Cellular Protein Synthesis. *Acc. Chem. Res.*, **44**: 677-685

**Nguyen**, Peter V. und Kandel, E. R. (1996). A Macromolecular Synthesis-Dependent Late Phase of Long-Term Potentiation Requiring CAMP in the Medial Perforant Pathway of Rat Hippocampal Slices. *J. Neurosci.*, **76**(10): 3189-3198

**Nguyen**, P. V. und Woo N. H. (2003). Regulation of hippocampal synaptic plasticity by cyclic AMP-dependent protein kinases. *Prog Neurobiol.*, **71**:401-437

**Park**, S., Park, J. M., Kim, S., Kim, J. A., Shepherd, J. D., Smith-Hicks, C. L., Chowdhury, S., Kaufmann, W., Kuhl, D., Ryazanov, A. G., Haganir, R. L., Linden, D. J. und Worley, P. F. (2008). Elongation Factor 2 and Fragile X Mental Retardation Protein Control the Dynamic Translation of Arc/Arg3.1 Essential for mGluR-LTD. *Neuron.*, **59**: 70–83

**Plath**, N., Ohana, O., Dammermann, B., Errington, M.L., Schmitz, D., Gross, C., Mao, X., Engelsberg, A., Mahlke, C., Welzl, H., Kobalz, U., Stawrakakis, A., Fernandez, E., Waltereit, R., Bick-Sander, A., Therstappen, E., Cooke, S.F., Blanquet, V., Wurst, W., Salmen, B., Bösl, M. R., Lipp, H. P., Grant, S. G. N., Bliss, T. V. P., Wolfer, D. P. und Kuhl, D. (2006). Arc/Arg3.1 Is Essential for the Consolidation of Synaptic Plasticity and Memories. *Neuron.*, **52**: 437-444

**Prescher, J. A.** und Bertozzi, C. R. (2005). Chemistry in living systems. *Nat. Chem. Biol.* **1**: 13–21.

**Rostovtsev, V. V.,** Green, L. G. Fokin, V. V. and Sharpless, K. B. (2002). A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective ligation of azides and terminal alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**: 2596-2599

**Salin, P. A.,** Malenka, R. C. und Nicoll, R. A (1996). Cyclic AMP Mediates a Presynaptic Form of LTP at Cerebellar Parallel Fiber Synapses. *Neuron.*, **16**: 797–803

**Scoville, W., B.** und Milner B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.*, **20**: 11-21

**Schmidt, E. K.,** Clavarino, G., Ceppi, M. und Pierre, P. (2009). SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nature.*, 275-277

**Seamon, K. B.,** Padgett, W, und Daly, J. W. (1981). Forskolin: Unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad Sci.*, **78**: 3363-3367

**Shepherd, J. D.,** Rumbaugh, G., Wu, J., Chowdhury, S., Plath, N., Kuhl, D., Huganir, R. L., und Worley, P. F. (2006). Arc/Arg3.1 mediates homeostatic synaptic scaling of AMPA receptors. *Neuron.*, **52**: 475–484

**Siegel, M. R.** und Sisler, H. D. (1964). Site of Action of Cycloheximide in cells of *Saccharomyces Pastorianus* II. The Nature of Inhibition of Protein Synthesis in a Cell-Free System. *Biochim. Biophys. Acta.*, **87**: 83-89

**Steward, O.,** Wallace, C. S., Lyford, G. L. und Worley, P. F. (1998). Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron.*, **21**: 741-751

**Tornøe, C. W.,** Christensen, C. und Meldal, M. (2002). Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *J. Org. Chem.*, **67**: 3057-3064

**Vickers, C. A., Dickson, K. S. und Wyllie, D. J. (2005).** Induction and maintenance of late-phase long-term potentiation in isolated dendrites of rat hippocampal CA1 pyramidal neurones. *J Physiol.*, **568**: 803–813

**Waltereit, R., Dammermann, B., Wulff, P., Scafidi, J., Staubli, U., Kauselmann, G., Bundman, M., und Kuhl, D. (2001).** Arg3.1/Arc mRNA Induction by Ca<sup>2+</sup> and cAMP Requires Protein Kinase A and Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular Regulated Kinase Activation. *J. Neurosci.* **21**: 5484–5493

**Wang, H. und Pevsner, J. (1999).** Detection of endogenous biotin in various tissues: novel function in the hippocampus and implications for its use in avidin-biotin technology. *Cell Tissue Res.*, **296**: 511-516

**Waung, M. W., Pfeiffer, B. E., Nosyreva, E. D., Ronesi, J. A., und Huber, K. M. (2008).** Rapid translation of Arc/Arg3.1 selectively mediates mGluR-dependent LTD through persistent increases in AMPAR endocytosis rate. *Neuron.*, **59**: 84–97

**Wenthold, R. J., Petralia, R. S., Blahos II, J. und Niedzielski, A. S. (1996).** Evidence for Multiple AMPA Receptor Complexes in Hippocampal CA1/CA2 Neurons. *J. Neurosci.*, **76** (6): 1982-1989

